



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
“ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ”

Παρασκευή Πολυμερικών  
Μικροβελόνων με Τρισδιάστατη  
Εκτύπωση για τη Διαδερμική  
Χορήγηση Φαρμακολογικά  
Δραστικών Ουσιών

---

Αντωνάρα Λευκοθέα

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2020

### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παρασκευάς Δάλλας (Επιβλέπων)  
Επίκ. Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Μ. Ρέκκας  
Αναπλ. Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μιχαήλ Ράλλης  
Αναπλ. Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών



## Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης “Βιομηχανική Φαρμακευτική” του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Παρασκευά Δάλλα, για την πολύτιμη καθοδήγησή του, την υπομονή του και τη συνεχή εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθ’ όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για όλες τις συμβουλές και τις επιστημονικές γνώσεις που μου δίδαξε .

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Ρέκκα για τις καθοριστικής και καίριας σημασίας συμβουλές στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού, αλλά και για τη δυνατότητα εργασίας στον εξοπλισμό του εργαστηρίου του. Χωρίς την πολύτιμη συμβολή του η παρούσα διπλωματική εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη για το χρόνο που αφιέρωσε, την ενθάρρυνση του αλλά και τη συνεργασία μας στα πλαίσια διεξαγωγής των εργαστηρίων προπτυχιακών φοιτητών “Φαρμακευτικής Τεχνολογίας”.

Θέλω να ευχαριστήσω επιπλέον, όλους τους συνάδελφους του εργαστηρίου για το πνεύμα συνεργασίας που έδειξαν και ιδιαιτέρως την υποψήφια διδάκτορα Τσινταβή Ελένη και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Σαρίκα Αλεξάνδρα, Σπανέα Δημήτριο και Γκοτσόπουλο Ζώη-Γεώργιο για όλη τη βοήθεια καθώς και τη συνεχή και ανιδιοτελή υποστήριξη όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς την οικογένεια μου και τους φίλους μου. Η συνεχής στήριξη και πίστη τους μου έδινε ώθηση να συνεχίσω σε όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας και να αντεπεξέλθω σε κάθε δυσκολία. Η παρουσία τους στη ζωή μου ήταν αυτή που με έφτασε μέχρι εδώ σήμερα.

*“The beauty of research is that you never know where it’s going to lead”*

*Richard Roberts*

*Nobel Prize in Physiology or Medicine*

*1993*



# Περιεχόμενα

---

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| Περίληψη .....                                                      | 11 |
| Abstract .....                                                      | 13 |
| <b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                              |    |
| 1. Εισαγωγή .....                                                   | 17 |
| 2. Ιστορική Αναδρομή .....                                          | 19 |
| 2.1 Πριν τον 19 <sup>ο</sup> αιώνα.....                             | 19 |
| 2.2 19 <sup>ος</sup> αιώνας .....                                   | 20 |
| 2.3 20 <sup>ος</sup> αιώνας και σύγχρονη εποχή.....                 | 20 |
| 3. Ανατομία και Λειτουργίες του Δέρματος.....                       | 23 |
| 3.1 Εισαγωγή.....                                                   | 23 |
| 3.2 Επιδερμίδα.....                                                 | 24 |
| 3.2 Δερμίδα .....                                                   | 26 |
| 3.3 Εξαρτήματα του δέρματος .....                                   | 27 |
| 3.4 Αιμοφόρα Αγγεία & Νεύρα .....                                   | 28 |
| 4. Μηχανισμοί Διαπέρασης ουσιών από το Δέρμα .....                  | 29 |
| 4.1 Οδοί Διαπέρασης Δέρματος.....                                   | 29 |
| 4.1.1 Διαπέραση Μέσω Εξαρτημάτων (Transappendageal Route).....      | 30 |
| 4.1.2 Διαπέραση Μέσω Κεράτινης Στιβάδας (Transepidermal Route)..... | 30 |
| 4.2 Στάδια Διαδερμικής Απορρόφησης και Θεωρία Διάχυσης .....        | 31 |
| 4.2.1 Θεωρία Διάχυσης .....                                         | 32 |
| 5. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Απορρόφηση .....                   | 35 |
| 5.1 Βιολογικοί Παράγοντες.....                                      | 35 |
| 5.1.1 Ηλικία .....                                                  | 35 |
| 5.1.2 Ανατομική Περιοχή .....                                       | 36 |
| 5.1.3 Φύλο .....                                                    | 36 |
| 5.1.4 Φυλή .....                                                    | 37 |
| 5.1.5 Βαθμός Ενυδάτωσης .....                                       | 37 |
| 5.1.6 Θερμοκρασία .....                                             | 38 |
| 5.1.7 Κατάσταση του Δέρματος .....                                  | 38 |
| 5.1.8 Μεταβολισμός του Δέρματος .....                               | 38 |
| 5.2 Φυσικοχημικοί Παράγοντες .....                                  | 39 |

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.1 Μοριακό Βάρος και Σχήμα .....                            | 39 |
| 5.2.2 Συντελεστής Κατανομής .....                              | 39 |
| 5.2.3 Διαλυτότητα και Σημείο Τήξεως.....                       | 39 |
| 5.2.4 pH και Ιονισμός .....                                    | 40 |
| 6. Μέθοδοι Ενίσχυσης Διαδερμικής Απορρόφησης.....              | 41 |
| 6.1 Παθητικές.....                                             | 42 |
| 6.1.1 Επιλογή Κατάλληλης Δραστικής Ουσίας ή Προφαρμάκου .....  | 42 |
| 6.1.2 Ιονικά Ζεύγη.....                                        | 42 |
| 6.1.3 Ευτηκτικά Μίγματα.....                                   | 43 |
| 6.1.4 Υπερκορεσμένα Συστήματα.....                             | 43 |
| 6.1.5 Χημικοί Επιταχυντές Διαβατότητας.....                    | 44 |
| 6.1.6 Ενυδάτωση .....                                          | 46 |
| 6.1.7 Λιποσώματα και ανάλογα .....                             | 47 |
| 6.1.8 Σωματίδια Υψηλής Ταχύτητας.....                          | 48 |
| 6.2 Ενεργητικές .....                                          | 50 |
| 6.2.1 Υπέρηχοι (Phonophoresis, Sonophoresis).....              | 50 |
| 6.2.2 Ιοντοφόρηση.....                                         | 51 |
| 6.2.3 Ηλεκτροδιάτρηση .....                                    | 52 |
| 6.2.4 Μαγνητοφόρηση.....                                       | 52 |
| 6.2.5 Ραδιοκύματα .....                                        | 53 |
| 6.2.6 Φωτομηχανικά Κύματα .....                                | 54 |
| 6.2.7 Εκτομή Κεράτινης Στιβάδας .....                          | 54 |
| 6.2.8 Διάταξη Μικροβελόνων .....                               | 55 |
| 7. Μικροβελόνες Για Διαδερμική Χορήγηση .....                  | 57 |
| 7.1 Εισαγωγή.....                                              | 57 |
| 7.2 Ιστορικά Στοιχεία.....                                     | 58 |
| 7.3 Κατηγορίες Μικροβελόνων .....                              | 59 |
| 7.3.1 Στερεές Μικροβελόνες (Solid Microneedles) .....          | 60 |
| 7.3.2 Επικαλυμμένες Μικροβελόνες (Coated Microneedles) .....   | 62 |
| 7.3.3 Διαλυόμενες Μικροβελόνες (Dissolving Microneedles) ..... | 64 |
| 7.3.4 Κενές Μικροβελόνες (Hollow Microneedles) .....           | 68 |
| 7.4 Συμμόρφωση και ασφάλεια ασθενών .....                      | 69 |
| 7.4.1 Μείωση πόνου .....                                       | 70 |

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.4.2 Ερεθισμός δέρματος .....                                           | 71  |
| 7.4.3 Μόλυνση δέρματος.....                                              | 71  |
| 7.5 Εγκεκριμένα Προϊόντα Μικροβελόνων .....                              | 72  |
| 8. Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης Διαδερμικής Απορρόφησης.....             | 73  |
| 8.1 In Vivo Μελέτες.....                                                 | 74  |
| 8.1.1 Αξιολόγηση Αγγειοσύσπασης .....                                    | 74  |
| 8.1.2 Μέθοδος Tape Stripping.....                                        | 75  |
| 8.1.3 Μέθοδος Μικροδιάλυσης .....                                        | 75  |
| 8.2 In Vitro Μελέτες .....                                               | 76  |
| 8.2.1 Επιλογή Κυττάρου Διάχυσης .....                                    | 77  |
| 8.2.2 Επιλογή Μεμβράνης.....                                             | 79  |
| 8.2.3 Επιλογή Διαλύματος Υποδοχέα .....                                  | 81  |
| 8.2.4 Διεξαγωγή Πειράματος Διαπερατότητας .....                          | 81  |
| 9.1 Εισαγωγή.....                                                        | 83  |
| 9.2 Χημική Δομή και Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά .....                    | 84  |
| 9.3 Φαρμακολογικές δράσεις και Ανεπιθύμητες Ενέργειες.....               | 85  |
| 9.4 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά .....                                 | 89  |
| 9.4.1 Απορρόφηση και Κατανομή.....                                       | 89  |
| 9.4.2 Μεταβολισμός .....                                                 | 90  |
| 9.4.3 Απέκκριση .....                                                    | 91  |
| 10. Τρισδιάστατη Εκτύπωση (3d Printing).....                             | 93  |
| 10.1 Ιστορικά Στοιχεία.....                                              | 93  |
| 10.2 Επισκόπηση και αρχείο .STL.....                                     | 94  |
| 10.3 Μέθοδοι Τρισδιάστατης Εκτύπωσης .....                               | 95  |
| 10.4 Υλικά & Εφαρμογές.....                                              | 103 |
| 11. Ο Πειραματικός Σχεδιασμός Στην Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων..... | 107 |
| 11.1 Εισαγωγή στην Ποιότητα.....                                         | 107 |
| 11.1.1 Η Φαρμακευτική Βιομηχανία μέχρι σήμερα .....                      | 107 |
| 11.1.2 Ορισμός Της Ποιότητας .....                                       | 108 |
| 11.2 Σχεδιασμός της Ποιότητας-“Quality by Design”(QbD) .....             | 112 |
| 11.2.1 Βασικές Αρχές και Οφέλη του QbD.....                              | 112 |
| 11.2.2 Στάδια υλοποίησης του QbD.....                                    | 113 |
| 11.3 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments) .....               | 116 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 11.3.1 Ορισμός Πειραματικού Σχεδιασμού.....                                                                                   | 116 |
| 11.3.2 Πλεονεκτήματα και στάδια Πειραματικού Σχεδιασμού.....                                                                  | 116 |
| 11.3.2 Τύποι Πειραματικών Σχεδιασμών .....                                                                                    | 118 |
| 12. Σκοπός Μελέτης .....                                                                                                      | 121 |
| <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                                                                                      |     |
| 13. Υλικά και εξοπλισμός.....                                                                                                 | 125 |
| 13.1 Υλικά.....                                                                                                               | 125 |
| 13.2 Εξοπλισμός.....                                                                                                          | 125 |
| 14. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης .....                                                                                  | 127 |
| 14.1 Λήψη φάσματος UV .....                                                                                                   | 127 |
| 14.2 Περιγραφή αναλυτικής μεθόδου HPLC .....                                                                                  | 127 |
| 14.3 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος & Κινητής Φάσης .....                                                                   | 128 |
| 14.4 Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων .....                                                                                      | 129 |
| 14.5 Έλεγχος παρεμποδίσεων στην χρωματογραφική κορυφή .....                                                                   | 129 |
| 16. Μελέτη διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα υποδοχέα (Receptor Solution) ...                                                 | 130 |
| 17. Παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων .....                                                                                  | 131 |
| 17.1 Επιλογή διαστάσεων πολυμερικών μικροβελόνων.....                                                                         | 131 |
| 17.1.1 Σχήμα.....                                                                                                             | 131 |
| 17.1.2 Αριθμός Μικροβελόνων .....                                                                                             | 132 |
| 17.1.3 Ύψος Μικροβελόνων .....                                                                                                | 134 |
| 17.1.4 Πλάτος Βάσης Μικροβελόνων .....                                                                                        | 134 |
| 17.1.5 Διάμετρος μύτης.....                                                                                                   | 134 |
| 17.2 Μέθοδος Μικροχύτευσης και τροποποίησή της .....                                                                          | 135 |
| 17.3 Παρασκευή εκμαγείων με τεχνολογία FDM.....                                                                               | 136 |
| 17.3.1 Καθορισμός γεωμετρίας εκμαγείου.....                                                                                   | 137 |
| 17.3.2 Ρύθμιση παραμέτρων εκτύπωσης και βελτιστοποίησή τους με την εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού (DoE) ..... | 139 |
| 17.4 Μορφοποίηση Μίγματος Υδροβρωμικής Γκαλανταμίνης-Πολυμερών .....                                                          | 143 |
| 17.4.1 Επιλογή Πολυμερικών Υλικών .....                                                                                       | 143 |
| 17.4.2 Παρασκευή PVA/PVP μικροβελόνων με την εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού (DoE) .....                       | 145 |
| 17.4.3 Διαδικασία Παρασκευής Μίγματος Υδροβρωμικής Γκαλανταμίνης-Πολυμερών .....                                              | 147 |
| 17.4.4 Βελτιστοποίηση σύνθεσης.....                                                                                           | 148 |

|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 17.5 Αξιολόγηση πολυμερικών μικροβελόνων.....                                    | 149 |
| 18. Εργαστηριακές Μέθοδοι Παρασκευής Διαδερμικών Συστημάτων (Patches).....       | 153 |
| 18.1 Εκτέλεση Επιστρώσεων – Δημιουργία ΔΘΣ (Patches).....                        | 153 |
| 18.2 Τεχνική Regular Patch .....                                                 | 154 |
| 19. Πειράματα Διαδερμικής Διαπερατότητας .....                                   | 155 |
| 20. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας ..... | 159 |

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

|                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 21. Φάσμα UV .....                                                                                                                                                                              | 163 |
| 22. Αναλυτική μέθοδος HPLC.....                                                                                                                                                                 | 164 |
| 23. Μελέτη διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα (Receptor Solution) .....                                                                                                             | 167 |
| 24. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού για τις ρυθμίσεις εκτύπωσης των εκμαγείων .....                                                                            | 168 |
| 25. Ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού για την μορφοποίηση των υμενίων των μικροβελόνων .....                                                                                        | 175 |
| 25.1 Ανάλυση απόκρισης αθροιστικής ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη Strat-M <sup>®</sup> ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm <sup>2</sup> ), μέχρι και τις 24h ..... | 179 |
| 25.2 Ανάλυση απόκρισης επί τοις % απώλεια ύδατος κατά την ξήρανση (LOD). .....                                                                                                                  | 185 |
| 25.3 Βελτιστοποίηση σύνθεσης (Optimization-Numerical) .....                                                                                                                                     | 190 |
| 27. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M <sup>®</sup> και του ανθρώπινου δέρματος .....                                                                            | 195 |
| 28. Αξιολόγηση πολυμερικών μικροβελόνων .....                                                                                                                                                   | 197 |
| 28.1 Αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης.....                                                                                                                                                | 197 |
| 28.2 Αποτελέσματα εκτίμησης βάθους διαπέρασης .....                                                                                                                                             | 200 |
| 28.3 Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ...                                                                                                                        | 202 |

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| Συμπεράσματα .....                    | 207 |
| Προτάσεις για μελλοντική μελέτη ..... | 209 |
| Βιβλιογραφία .....                    | 211 |
| Παράρτημα I .....                     | 225 |
| Παράρτημα II.....                     | 229 |
| Παράρτημα III.....                    | 233 |

|                    |     |
|--------------------|-----|
| Παράρτημα IV ..... | 237 |
|--------------------|-----|

## Περίληψη

---

Η διαδερμική χορήγηση φαρμακολογικά δραστικών ουσιών έχει συμβάλλει σημαντικά στη καθημερινή ιατρική πρακτική, αποτελώντας μία ελκυστική εναλλακτική τόσο στη χρήση υποδόριων βελόνων όσο και στην από του στόματος χορήγηση. Η θεραπευτική, όμως, δράση των περισσότερων χημικών παραγόντων είναι περιορισμένη. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην ύπαρξη της κεράτινης στιβάδας η οποία λειτουργεί ως “φραγμός”, οπότε μικρός αριθμός μορίων προσεγγίζει το σημείο δράσης. Μια καινοτόμος φαρμακοτεχνική μορφή, αυτή των μικροβελόνων, ενισχύει τη διαπέραση των φαρμάκων προκαλώντας διατάραξη της κεράτινης στιβάδας με τη δημιουργία μικροπόρων. Κατά αυτό τον τρόπο, η ΦΔΟ διαχέεται απευθείας στην επιδερμίδα ή στα ανώτερα στρώματα της δερμίδας, όπου εντοπίζεται το δίκτυο των τριχοειδών αγγείων.

Η κατηγορία μικροβελόνων που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι αυτή των πολυμερικών μικροβελόνων, διότι είναι βιοδιασπώμενες, με δυνατότητα ελέγχου του ρυθμού αποδέσμευσης των ενσωματωμένων ΦΔΟ, καθώς και μη τοξικές/ερεθιστικές. Οι πολυμερικές μικροβελόνες παρασκευάζονται ως επί το πλείστον με τη τεχνική της μικροχύτευσης, η οποία όμως προαπαιτεί την κατασκευή εκμαγείων από πρότυπες διατάξεις. Προκειμένου, επομένως, να απλοποιηθεί η διαδικασία παρασκευής, προτάθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία η εφαρμογή της τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης FDM για την απευθείας παραγωγή PLA εκμαγείων. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα μείωσης του ολικού κόστους, εξοικονόμησης πόρων και εύκολης τροποποίησης των υπό μελέτη διαστάσεων. Ωστε να ταυτοποιηθούν οι ρυθμίσεις στις οποίες αποδίδονται με ακρίβεια οι θεωρητικά ορισμένες, κατά την σχεδίαση του εκμαγείου, διαστάσεις εφαρμόστηκαν οι αρχές του Πειραματικού Σχεδιασμού.

Με την ολοκλήρωση της παρασκευής των εκμαγείων, ακολούθησε η παραγωγή πολυμερικών PVA/PVP μικροβελόνων υδροβρωμικής γκαλανταμίνης, σε κατάλληλες αναλογίες συστατικών που προέκυψαν από το λογισμικό του προγράμματος Design-Expert. Η υδροβρωμική γκαλανταμίνη αποτελεί ένα φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer, το οποίο χορηγείται per os. Λόγω όμως των ανεπιθύμητων ενεργειών της στο γαστρεντερικό σύστημα και της χαμηλής διαπερατότητας που εμφανίζει ως άλας από το δέρμα, επιλέχθηκε ως πρότυπο μόριο για χορήγηση μέσω μικροβελόνων. Οι παρασκευασθέντες συνθέσεις, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τη πραγματοποίηση πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας με τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup>, η οποία προσμοιάζει ικανοποιητικά το ανθρώπινο δέρμα καθώς και για τη μέτρηση απώλειας ύδατος κατά τη ξήρανση (LOD).

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, επιλέχθηκε η σύνθεση με εκείνη με η οποία συνδυάζει μέγιστη αθροιστική ποσότητα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), στις 24h και ελάχιστη απώλεια ύδατος ώστε

να αποφευχθεί η καθίζηση κρυστάλλων της ουσίας. Η βέλτιστη αυτή μορφοποίηση χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για την πραγματοποίηση επιβεβαιωτικών πειραμάτων των θεωρητικά προβλεπόμενων τιμών από τον Πειραματικό Σχεδιασμό καθώς και σε *ex vivo* πειράματα με δέρμα πλήρους πάχους, προκειμένου να συγκριθεί με την αντίστοιχη σύνθεση χωρίς μικροβελόνες. Τέλος, έγινε προσπάθεια γραμμικής συσχέτισης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη τεχνητή μεμβράνη και το δέρμα πλήρους πάχους για κάθε σημείο δειγματοληψίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι εφικτή η παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων μέσω τρισδιάστατα εκτυπωμένων εκμαγείων. Όσον αφορά τον συνδυασμό PVA/PVP/Galantamine, ως βέλτιστη πρόεκυψε η μορφοποίηση με αναλογίες PVA(5,5%w/v)-PVP(5%w/v)-Galantamine(3mg/0,636cm<sup>2</sup>). Για τη σύνθεση αυτή, μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup> και του δέρματος πλήρους πάχους υπήρξε πολύ καλή γραμμική συσχέτιση ( $R^2=0,9947$ ), με τη τεχνητή μεμβράνη να εμφανίζει επίπεδα 6 φορές μεγαλύτερα για όλες τις ώρες δειγματοληψίας. Τέλος, η ύπαρξη μικροβελόνων πράγματι αυξάνει έως και 6 φορές, μέχρι τις 24 ώρες, τα επίπεδα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπερνούν το δέρμα. Μάλιστα, για επιφάνεια 1cm<sup>2</sup> προσεγγίζονται τα επιθυμητά θεραπευτικά επίπεδα στο αίμα, οπότε η σύνθεση αυτή αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μορφή για περαιτέρω κλινικές μελέτες.

# Abstract

---

Transdermal delivery of active pharmaceutical ingredients (APIs) has made a significant contribution in daily medical practice, being an attractive alternative to both hypodermic needles and oral administration. However, the effect of most therapeutic agents is limited. This phenomenon is attributed to the existence of the stratum corneum which acts as a "barrier" and only a small number of molecules finally approach the point of action. An innovative pharmaceutical dosage form, that of microneedles, enhances the permeability of drugs by disrupting the stratum corneum and creating micropores. In this way, APIs diffuse directly into the epidermis or the upper layers of the dermis, where the network of capillaries is located.

The type of microneedles that is of particular interest is that of polymeric microneedles, because they are biodegradable, with the ability to control the release rate of the incorporated API, as well as non-toxic / irritating. Polymeric microneedles are mostly made by the micromoulding technique, which, however, requires the manufacture of molds from master templates. Therefore, in order to simplify the manufacturing process, it was proposed in the present dissertation to apply the FDM 3D printing technology for the direct production of PLA molds. This method enables the reduction of total costs, saving of resources and easy modification of the dimensions under study. In order to identify the printing parameters to which the theoretically defined dimensions are accurately attributed, the principles of Experimental Design were applied.

With the completion of the mold preparing, the production of polymeric PVA/PVP microneedles of galantamine hydrobromide followed, in appropriate proportions of ingredients that emerged from the software of the Design-Expert program. . Galantamine hydrobromide is the drug of choice for the treatment of Alzheimer's disease, which is administered orally. However, due to its side effects on the gastrointestinal tract and its low permeability as a salt from the skin, it was selected as a standard molecule for administration through microneedles. The prepared compositions were then used to perform transdermal permeability experiments with Strat-M<sup>®</sup> artificial membrane which satisfactorily resembles human skin, as well as to measure water loss during drying (LOD).

From the results of the above studies, the composition selected combines maximum cumulative amount of galantamine hydrobromide that penetrated the membrane,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), up to 24h and minimal water loss to prevent precipitation of drug crystals. This optimal formulation was later used to perform confirmatory experiments of the theoretically predicted values from the Experimental Design as well as in *ex vivo* experiments with full-thickness skin, in order to be compared with the corresponding composition without microneedles. Finally, an attempt to establish linear correlation

between the results obtained from the artificial membrane and the full-thickness skin for each sampling point was obtained.

The results showed that it is possible to make polymeric microneedles through 3D printed molds. Regarding the PVA/PVP/Galantamine combination the formulation with PVA (5.5% w/v)-PVP (5%w /v)-Galantamine (3mg/0.636cm<sup>2</sup>) ratios emerged as optimal. For this composition, there was a very good linear correlation ( $R^2 = 0.9947$ ) between the Strat-M<sup>®</sup> artificial membrane and the full-thickness skin, with the artificial membrane showing levels 6 times higher for all sampling hours. Finally, the presence of microneedles increases the levels of galantamine hydrobromide up to 6 times until 24 hours. In fact, for a surface of 1cm<sup>2</sup> the desired therapeutic levels in the blood are approached, so this composition is a very promising form for further clinical studies.

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



## 1. Εισαγωγή

Οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες (ΦΔΟ) χορηγούνται επί το πλείστον ως μορφοποιημένα σκευάσματα παρά υπό την μορφή καθαρών συστατικών. Αυτά τα σκευάσματα μπορεί να είναι από απλά διαλύματα μέχρι και περίπλοκα συστήματα χορήγησης πχ δισκία, καψάκια κλπ. Ιδανικά ένα τέτοιο σύστημα χορήγησης είναι φιλικό προς τον χρήστη, μη επεμβατικό και ικανό να αποδεσμεύσει το δραστικό μόριο στοχευμένα στους επιθυμητούς ιστούς, εντός ορισμένου χρόνου με το απαιτούμενο μοτίβο αποδέσμευσης και δοσολογίας. Η τελική επιλογή της μορφής εξαρτάται άμεσα από τα φαρμακοδυναμικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της υπό μελέτη ουσίας, την δόση στην οποία είναι αποτελεσματική καθώς και από την ηλικία και την γενικότερη κατάσταση υγείας του ασθενούς.

Τις τελευταίες δεκαετίες η διαδερμική χορήγηση έχει ερευνηθεί εντατικά και έχει γίνει πεδίο πειραματισμού της βιοϊατρικής με ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει, τα οποία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 1:** Πλεονεκτήματα και περιορισμοί διαδερμικής οδού χορήγησης (Brown, 2006)

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Περιορισμοί                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Αποφυγή του μεταβολισμού πρώτης δόδου και άλλων παραμέτρων που σχετίζονται με τον ΓΕ σωλήνα όπως το pH, ο χρόνος γαστρικής κένωσης κλπ</li> <li>Παρατεταμένη και ελεγχόμενη αποδέσμευση για μεγάλο χρονικό διάστημα</li> <li>Μείωση ανεπιθύμητων ενεργειών σχετιζόμενων με συστηματική τοξικότητα πχ ελαχιστοποίηση μεγίστων και ελαχίστων στα επίπεδα του αίματος</li> <li>Βελτιωμένη αποδοχή και συμμόρφωση από τους ασθενείς</li> <li>Άμεση πρόσβαση στον ιστό-στόχο πχ θεραπεία διαταραχών δέρματος όπως ψωρίαση, έκζεμα και λοιμώξεις από μύκητες</li> <li>Εύκολος τερματισμός χορήγησης σε περίπτωση ανεπιθύμητων ενεργειών είτε συστηματικών είτε τοπικών</li> <li>Βολική και ανώδυνη χορήγηση</li> <li>Μείωση του συνολικού κόστους υγειονομικής περίθαλψης λόγω της ευκολίας χρήσης</li> <li>Εναλλακτική οδός σε περιπτώσεις που η χορήγηση per os δεν είναι δυνατή (πχ αναίσθητους ασθενείς ή με ναυτία)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Μοριακό βάρος κάτω των 500 Da είναι απαραίτητο για την διάχυση μέσω της κεράτινης στιβάδας</li> <li>Επαρκή διαλυτότητα στην λιπαρή και την υδατική φάση-τιμές logP(οκτανόλη/νερό) μεταξύ 1-3 απαιτούνται για την διαπέραση της κεράτινης και των υποκείμενων υδατικών στιβάδων του δέρματος για συστηματική χορήγηση</li> <li>Διατομική και διαπληθυσμιακή μεταβλητότητα σχετιζόμενη με την διαπερατότητα ακέραιου και ασθενούς δέρματος. Αυτό υποδηλώνει ότι θα υπάρχει αργό, μέτριο και γρήγορο προφίλ απορρόφησης μέσω του δέρματος οδηγώντας σε μεταβαλλόμενη βιολογική απόκριση</li> <li>Μεταβολισμός πριν την συστηματική κυκλοφορία-η παρουσία ενζύμων στο δέρμα όπως πεπτιδάσες και εστεράσες πορεί να μεταβολίζουν το δραστικό προς αδρανή μορφή, μειώνοντας κατ'έκταση την αποτελεσματικότητά του</li> <li>Ερεθισμός και ευαισθητοποίηση του δέρματος: το δέρμα ως ένας ανοσολογικός φραγμός μπορεί να ενεργοποιηθεί από την έκθεση σε συστατικά όπως τα φάρμακα ή τα έκδοχα, οδηγώντας στην εκδήλωση ερυθρήματος, οιδήματος κλπ</li> </ul> |

Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι οι κυριότεροι περιορισμοί αυτής την οδού χορήγησης σχετίζονται με την ικανότητα του κάθε μορίου να διαπερνά την κεράτινη στιβάδα, που αποτελεί και τον κυριότερο φραγμό του δέρματος. Οι νεότερες λοιπόν προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, έχουν ως στόχο την παράκαμψη του φραγμού αυτού μέσω διαφόρων τεχνικών δίνοντας την δυνατότητα χορήγησης πληθώρας μορίων. Μία εξ αυτών χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία (Zorec, 2013).

## 2. Ιστορική Αναδρομή

### 2.1 Πριν τον 19<sup>ο</sup> αιώνα

Τοπικές θεραπείες υπό την μορφή γλισχρασμάτων, επιδέσμων, εκχυλισμάτων κλπ οι οποίες είτε εφαρμόζονται είτε τρίβονται στην επιφάνεια του δέρματος, χρησιμοποιούνται ήδη από τις απαρχές της ανθρωπότητας, σύμφωνα με στοιχεία από καταγραφές σε πήλινες πλάκες των Σουμέριων (Kramer, 1963). Μετέπειτα, οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν έλαια (όπως καστορέλαιο, ελαιόλαδο, σησαμέλαιο), λίπη (κυρίως ζωικής προέλευσης), αρώματα (όπως πικραμύγδαλο, μέντα, δεντρολίβανο) καθώς και άλλα συστατικά για την παρασκευή δερματολογικών και καλλυντικών προϊόντων, τα οποία χαρακτηρίζονταν από ποικιλία μορφών πχ πομάδες, κρέμες, χρωστικές ματιών και νυχιών κλπ (Forbes, 1955).

Ο πλέον γνωστός πάπυρος του Ebers (1550 π.Χ.) περιγράφει πάνω από 800 συνταγές και 700 περίπου φάρμακα, αποτελώντας μία από τις πληρέστερες καταγραφές της αρχαιότητας (LaWall, 1927). Περιέχει πολλές συνταγές για την θεραπεία δερματικών παθήσεων συμπεριλαμβανομένων εγκαυμάτων, πληγών, φουσκαλών και εκκρίσεων. Άλλα σκευάσματα χρησιμοποιήθηκαν για την διατήρηση του τριχωτού της κεφαλής αλλά και την επαγωγή της ανάπτυξης του, για την βελτίωση του δέρματος και την καλαισθησία του σώματος. Επίσης έχουμε την πρώτη επίσημη καταγραφή διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου με στόχο την συστηματική κυκλοφορία όπως η τοπική εφαρμογή λιβανιού για την ανακούφιση πονοκεφάλων και ένα προϊόν που εφαρμόζεται στην κοιλιακή χώρα για την αντιμετώπιση πόνων από ταινία (Bryan, 1930). Μία χιλιετία αργότερα, ο Γαληνός, Έλληνας γιατρός εισήγαγε την έννοια της μορφοποίησης φαρμακευτικών βοτάνων και άλλων εκδόχων σε δοσολογικές μορφές. Μάλιστα η cold cream, μία από τις πλέον γνωστές παρασκευές του, έχει παρόμοια σύσταση με αυτήν που χρησιμοποιείται σήμερα (Bender, 1966).



Εικόνα 1: Πάπυρος του Ebers  
(Brittanica, 2020)

Η εφαρμογή φαρμακευτικών εμπλάστρων (πρόγονοι των σημερινών διαδερμικών συστημάτων) για την θεραπεία τοπικών παθήσεων του δέρματος ήταν ιδιαίτερα εκτεταμένη και στην αρχαία Κίνα (2000 π.Χ.). Συγκεκριμένα τα έμπλαστρα αυτά περιείχαν συνδυασμούς συστατικών από φαρμακευτικά φυτά διεσπαρμένα σε μία βάση κόλλας από ελαστικά κόμμεα που εφαρμοζόταν σε ένα υπόστρωμα στήριξης κατασκευασμένο από ύφασμα ή χαρτί (Chien, 1987). Αντίθετα προς την κινεζική θεώρηση, η Δύση απλοποίησε την δομή τους εισάγοντας μεμονωμένες δραστικές

ουσίες και όχι συνδυασμούς αυτών καταλήγοντας στις σημερινές μορφές χορήγησης (Pastore, 2015).

## 2.2 19<sup>ος</sup> αιώνας

Η Γερμανική Φαρμακοποιία του 1872, απαριθμούσε 28 μορφοποιήσεις εμπλάστρων, στις οποίες περιλαμβάνονται σκευάσματα τόσο για τοπική θεραπεία (μολύνσεις, ερεθισμούς δέρματος κλπ), όσο και για συστηματική χορήγηση προς ίαση φυματίωσης, όγκων και γαστρεντερικών προβλημάτων. Παρά τις καταγραφές αυτές και τις περιπτώσεις συστηματικής δηλητηρίασης από την εξωτερική χορήγηση μπελαντόνας υπήρχαν ακόμα δημοσιεύσεις που υποστήριζαν ότι το ακέραιο δέρμα είναι πρακτικά αδιαπέραστο σε όλες τις ουσίες ανεξαρτήτως των χαρακτηριστικών τους. Αυτός είναι και ο λόγος που ο αριθμός των διαδερμικών μειώθηκε, στην αντίστοιχη Γερμανική Φαρμακοποιία του 1883 στις 11 (Pastore, 2015).

## 2.3 20<sup>ος</sup> αιώνας και σύγχρονη εποχή

Με την είσοδο του νέου αιώνα, ο Schwenkenbecker το 1904, διατύπωσε ότι αντίθετα με τις ήδη υπάρχουσες θεωρήσεις, το δέρμα είναι διαπερατό σε ουσίες συγγενών προς τα λιπίδια, αλλά όχι στο νερό και στους ηλεκτρολύτες (Schwenkenbecker, 1904). Πολλές περιπτώσεις δηλητηρίασης, κυρίως παιδιών, καταγράφηκαν στις αρχές του 1900 μετά την τοπική εφαρμογή νιτροβενζολίου ή βαφών ανιλίνης σε χρωματιστά ρούχα και παπούτσια, ενισχύοντας την έννοια της συστηματικής απορρόφησης μετά την τοπική εφαρμογή προϊόντων (White, 1909). Παράλληλα, ο θάνατος ενός νεαρού άντρα μετά από ατύχημα με διαρροή φιάλης φαινόλης στο σώμα του, υπογράμμισε τις πιθανές θανατηφόρες συνέπειες που σχετίζονται με την υπερέκθεση σε δραστικές ουσίες που εφαρμόζονται στο δέρμα (Johnstone, 1948).

Την ίδια περίοδο, επιπλέον επιβεβαίωση ήρθε με διάφορες *in vivo* μελέτες, οι οποίες έδειξαν συστηματική απορρόφηση μετά από τοπική εφαρμογή σκευασμάτων, μετρώντας τα επίπεδα του φαρμάκου σε αίμα, ούρα και κόπρανα (Malkinson, 1963). Συγκεκριμένα, χαρακτηριστικές φαρμακολογικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ως μόρια αναφοράς για την εκτίμηση της απορρόφησης προς την συστηματική κυκλοφορία. Για παράδειγμα, οι ορμόνες του φύλου διερευνήθηκαν εκτεταμένα σε ποντίκια και χοίρους με την εφαρμογή τοπικών αλοιφών ή κρεμών για την διατήρηση των γενετικών λειτουργιών. Παρομοίως, η εκδήλωση σπασμών σε ποντίκια, αρουραίους και χοίρους παρατηρήθηκε με την εξωτερική εφαρμογή ισχυρά τοξικών αλκαλοειδών στρυχνίνης (Moore, 1938).

Η πρώτη επιστημονικά τεκμηριωμένη κλινική διαχείριση μίας συστηματικής πάθησης μέσω τοπικής εφαρμογής σκευάσματος αποδίδεται στον Zondek πριν από περίπου 70 χρόνια. Ανέφερε ότι η χλωροξυλενόλη, ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που

χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα στους σάπωνες και σε αντισηπτικά διαλύματα, μπορεί να είναι αποτελεσματική για την θεραπεία ουρογεννητικών λοιμώξεων όταν εφαρμόζεται τοπικά σε 30% αλοιφή λανολίνης. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι, η συστηματική απορρόφηση πολλών δραστικών που χρησιμοποιούνται σήμερα σε θεραπευτικά διαδερμικά συστήματα, έχει αποδειχθεί πολύ νωρίτερα λόγω τοξικότητας που προκαλούσαν κατά την παρασκευή, χρήση των προϊόντων από τους καταναλωτές και την γεωργία. Για παράδειγμα, η νιτρογλυκερίνη που χρησιμοποιείται σήμερα σε διαδερμικά συστήματα για την πρόληψη και την θεραπεία της στηθάγχης, έγινε πρώτη γνωστή ήδη από τις αρχές του 1900 από το ‘‘κεφάλι της νιτρογλυκερίνης’’, έναν έντονο πονοκέφαλο που βίωναν εργαζόμενοι σε βιομηχανίες εκρηκτικών ή που χειρίζονταν υλικά που την περιείχαν (Pastore, 2015).

#### Ανάπτυξη διαδερμικών συστημάτων χορήγησης

Η συμβολή του Dale Wurster στην κατανόηση της διαδερμικής απορρόφησης σπανίως αναγνωρίζεται (Roberts, 2013). Σημαντικά στοιχεία αυτής της εργασίας, τα οποία συνδέονται με την διαδερμική χορήγηση, είναι ο καθορισμός του συστήματος χορήγησης ως προς την δόση, την επιφάνεια, τον φορέα, η ποσοτικοποίηση της απορρόφησης στα ούρα σε σχέση με τον χρόνο και η εφαρμογή των φαρμακοκινητικών αρχών για τον προσδιορισμό της προκύπτουσας κινητικής απελευθέρωσης του φαρμάκου.

Στις πρώτες μελέτες διαδερμικών μελετών του Wurster, ο μαθητής του, Sherman Kramer κόλλησε ένα κύτταρο διάχυσης, που περιείχε μια καθορισμένη δόση σαλικυλικών εστέρων, στο αντιβράχιο εθελοντών και ακολούθως εκτιμήθηκε η συστηματική απορρόφηση με την μέτρηση των σαλικυλικών που αποβάλλονται στα ούρα. Η έκταση της απορρόφησης μπορεί να τροποποιηθεί μεταβάλλοντας την επιφάνεια διάχυσης του κυττάρου και τον βαθμό ενυδάτωσης του δέρματος (Wurster, 1961). Το πρωτεύον κύτταρο διάχυσης που σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη τους φαίνεται να είναι ο πρόδρομος των κυττάρων που χρησιμοποιούνται σήμερα και μπορεί να θεωρηθεί ακόμα και ως το πρωτότυπο των σημερινών εμπορικά διαθέσιμων διαδερμικών συσκευών.

Μία δεκαετία μετά τις μελέτες του Kramer, κατατέθηκε το πρώτο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας χρήσης μεμβράνης ελεγχόμενου ρυθμού για την μελέτη της αποδέσμευσης ουσιών στην συστηματική κυκλοφορία από τον βιοχημικό και επιχειρηματία Alejandro Zaffaroni το 1971 (Zaffaroni, 1971). Το 1972, οι (Beckett, 1972), σύγκριναν την συστηματική απορρόφηση της εφεδρίνης μέσω του δέρματος με αυτήν που επιτυγχάνεται μετά από per os χορήγηση. Συγκεκριμένα, φόρτωσαν διάλυμα εφεδρίνης/ αιθανόλης σε συγκολλητική, αδιαπέραστη ταινία την οποία στην συνέχεια εφάρμοσαν σε άντρα εθελοντή. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν από τον Riegelman (1974) (Riegelman, 1974). Παρατηρήθηκε, ότι τα έμπλαστρα έδιναν την δυνατότητα διατήρησης σταθερών επιπέδων στο αίμα μετά την τοπική χορήγηση, με τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα να μεταβάλλονται με την αλλαγή

της αρχικής συγκέντρωσης, της σύστασης του φορέα ή/και της επιφάνειας του δέρματος που γίνεται η εφαρμογή.

Από τα δραστικά μόρια που έχουν μελετηθεί με την πάροδο του χρόνου, μόλις 19 δραστικές ουσίες είναι εμπορικά διαθέσιμες. Αυτός ο μικρός αριθμός μορίων μορφοποιημένων σε διαδερμικά συστήματα αποδίδεται στα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει η φαρμακολογικά δραστική ουσία για να διαπεράσει τον φραγμό του δέρματος (Banerjee, 2014).

**Πίνακας 2: FDA εγκεκριμένα Διαδερμικά Θεραπευτικά Συστήματα (Banerjee, 2014)**

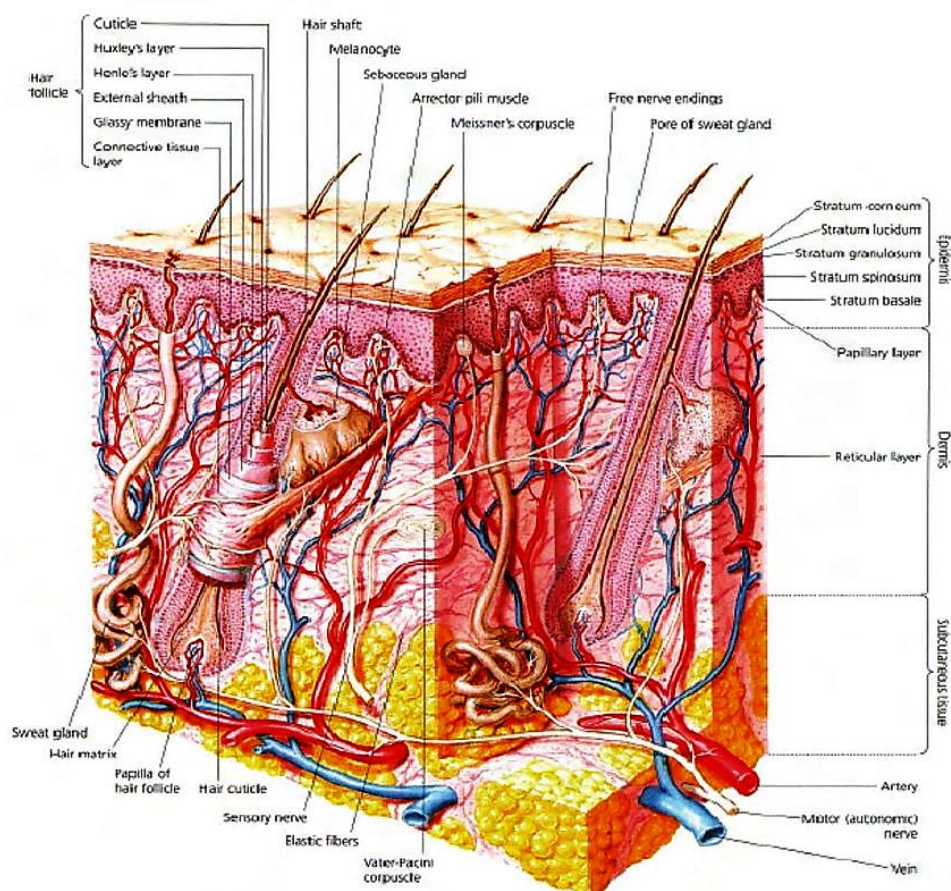
| <b>FDA εγκεκριμένα Διαδερμικά Θεραπευτικά Συστήματα (ΔΘΣ)</b> |                       |                                                    |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Δραστική Ουσία</b>                                         | <b>Εμπορικό Όνομα</b> | <b>Ημερομηνία έγκρισης<br/>(μέρα/μήνας/χρόνος)</b> |
| Επολαμίνη Δικλοφενάκης                                        | Flector®              | 31/1/2007                                          |
| Κλονιδίνη                                                     | Catapres-TTS®         | 10/10/1984                                         |
| Λιδοκαΐνη                                                     | Lidocaine®            | 21/5/1996                                          |
| Λιδοκαΐνη και Τετρακαΐνη                                      | Synera®               | 23/6/2005                                          |
| Μεθυλοφαινιδάτη                                               | Daytrana®             | 6/4/2005                                           |
| Νικοτίνη                                                      | Nicoderm®             | 2/8/1996                                           |
|                                                               | Habitrol®             | 12/11/1999                                         |
|                                                               | Prostep®              | 23/12/1998                                         |
|                                                               | Nicotrol®             | 3/7/1996                                           |
| Νιτρογλυκερίνη                                                | Transderm-Nitro®      | 27/2/1996                                          |
|                                                               | Nitro-Dur®            | 4/4/1995                                           |
|                                                               | Minitran®             | 30/8/1996                                          |
| Οιστραδιόλη                                                   | Vivelle®              | 28/10/1994                                         |
|                                                               | Climara®              | 22/12/1984                                         |
|                                                               | Vivelle-Dot®          | 8/1/1999                                           |
|                                                               | Alora®                | 20/12/1996                                         |
|                                                               | Menostar®             | 8/6/2004                                           |
|                                                               | Estraderm®            | 10/9/1986                                          |
| Οιστραδιόλη/ Λεβονογεστρέλη                                   | Climara-Pro®          | 21/11/2013                                         |
| Οξυβουτινίνη                                                  | Oxytrol®              | 26/2/2003                                          |
| Ριβαστιγμίνη                                                  | Exelon®               | 6/7/2007                                           |
| Ροτιγοτίνη                                                    | Neupro®               | 9/5/2007                                           |
| Σαλικυλικός Μεθυλεστέρας και Μινθόλη                          | Salonpas®             | 20/2/2008                                          |
| Σκοπολαμίνη                                                   | Transdermscoop®       | 1/1/1982                                           |
| Τεστοστερόνη                                                  | Testoderm-AT®         | 18/12/1997                                         |
| Τεστοστερόνη                                                  | Androderm®            | 29/9/1995                                          |
| Υδροχλωρική Λιδοκαΐνη και επινεφρίνη                          | Lidopel®              | 26/10/2004                                         |
| Φαιντανύλη                                                    | Duragesic®            | 7/8/1990                                           |

### 3. Ανατομία και Λειτουργίες του Δέρματος

#### 3.1 Εισαγωγή

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος. Ζυγίζει γύρω στα 4 kg και καλύπτει επιφάνεια  $2\text{m}^2$ . Αποτελεί το σύνορο με το εξωτερικό περιβάλλον με σημαντικότερη λειτουργία του αυτή του φραγμού, εμποδίζοντας την είσοδο τοξικών χημικών ουσιών και παθογόνων μικροοργανισμών καθώς και την απώλεια νερού και συστατικών. Δευτερευόντως, αποτελεί σημαντικό αισθητήριο όργανο, ρυθμίζει την θερμοκρασία του σώματος, παράγει σμήγμα, συνθέτει βιταμίνη D κλπ (Weller, 2015).

Το δέρμα έχει τρεις κύριες στιβάδες. Η εξωτερική είναι η επιδερμίδα, η οποία σταθεροποιείται μέσω της ισχυρής σύνδεσης της με την υποκείμενη στιβάδα-την δερμίδα (χόριο), με συνδετικό ιστό. Κάτω από την δερμίδα, υπάρχει χαλαρός συνδετικός ιστός που συνήθως περιέχει μεγάλη ποσότητα λίπους (Weller, 2015). Το δέρμα διαθέτει επίσης εξαρτήματα, τα οποία είναι οι αδένες (σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί), οι τρίχες και τα νύχια. Αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική οδό χορήγησης, για συστηματικά φάρμακα τα οποία εμφανίζουν προβλήματα κατά την χορήγηση από το στόμα ή παρεντερικά.

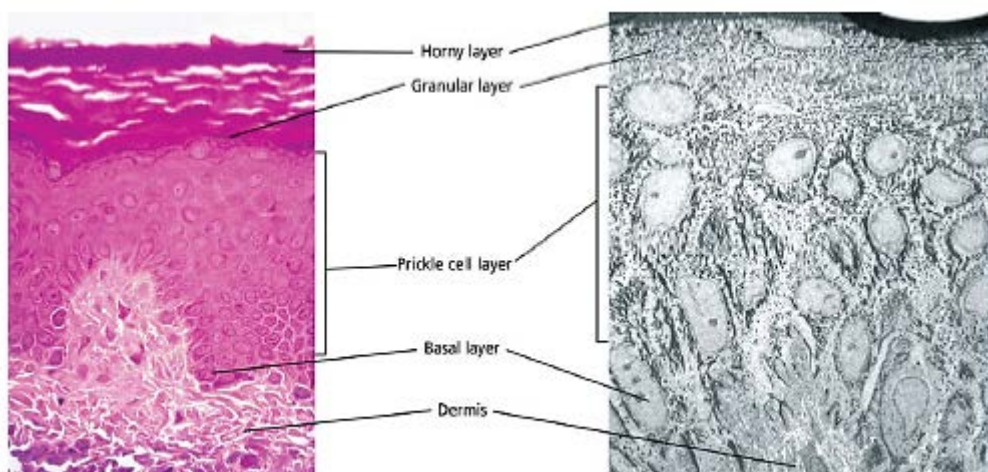


Εικόνα 2: Δομή δέρματος (Habif, 2015)

### 3.2 Επιδερμίδα

Το πάχος της επιδερμίδας κυμαίνεται από 0,05mm στην περιοχή των βλεφάρων μέχρι και 1,5 mm στις παλάμες και στις πατούσες. Αποτελείται από πολλές στιβάδες στενά “πακεταρισμένων” κυττάρων, από τα οποία τα πιο επιφανειακά είναι πεπλατυσμένα και γεμάτα με κερατίνη. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες (Habif, 2015):

- Κερατινοκύτταρα και
- Μη-κερατινοκύτταρα
  - i. Μελανοκύτταρα, δένδροειδούς δομής κύτταρα που μπορούν να συνθέσουν μελανίνη και εντοπίζονται στην βασική στιβάδα
  - ii. Κύτταρα του Merkel, που λειτουργούν ως αργά αποκρινόμενοι υποδοχείς του ερεθίσματος της αφής και τα
  - iii. Κύτταρα του Lagerhans, επίσης δένδροειδούς μορφής κύτταρα που σχετίζονται άμεσα με το ανοσοποιητική απόκριση του δέρματος στα αντιγόνα



Εικόνα 3: Εγκάρσια τομή δέρματος (Weller, 2015)

Η επιδερμίδα απαρτίζεται από τις εξής παρακάτω υποστιβάδες από το εσωτερικό προς το εξωτερικό (Roberts, 2008)

- Βασική Στιβάδα (Stratum basale)  
Η Stratum basale είναι μια μονή στιβάδα αποτελούμενη από κυλινδρικά ή κυβοειδή κύτταρα συνδεδεμένων με την μεμβράνη που βρίσκεται από κάτω. Τα βασικά κύτταρα υπόκεινται συνεχώς σε μίτωση και τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν κινούνται προς το εξωτερικό διατηρώντας την επιδερμίδα ανανεωμένη καθώς τα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας απομακρύνονται συνεχώς από την επιφάνειά της (Roberts, 2008)

- Ακανθωτή Στιβάδα (Stratum Spinosum)

Πάνω από την βασική στιβάδα είναι ένα στρώμα της επιδερμίδας πάχους 5-10 κυτταρικών στιβάδων, το οποίο ονομάζεται ακανθωτή στιβάδα ή Stratum Spinosum. Απαρτίζεται από κύτταρα των οποίων το σχήμα, η δομή και η ενδοκυττάρια οργάνωση εξαρτάται από την θέση τους. Ο ενδοκυττάριος χώρος ανάμεσα σε αυτά τα κύτταρα γεφυρώνεται από πληθώρα δεσμοσωμάτων, η μορφολογία των οποίων έχει δώσει το χαρακτηριστικό όνομα αυτής της στιβάδας (Kolarsick, 2011).

- Κοκκιώδη Στιβάδα (Stratum Granulosum)

Το πιο επιφανειακό στρώμα της επιδερμίδας αποτελούμενο από ζώντα κύτταρα, επίπεδης μορφολογίας, που περιέχουν στο εσωτερικό τους πληθώρα κοκκίων κερατουαλίνης. Αυτοί οι κόκκοι θεωρείται ότι παίζουν βασικό ρόλο στην κερατινοποίηση και στην λειτουργία της επιδερμίδας ως φραγμός (Roberts, 2008). Το πάχος της κυμαίνεται ανάλογα με το πάχος της υπερκερίμενης κεράτινης στιβάδας. Πιο συγκεκριμένα, σε περιοχές με λεπτή κεράτινη στιβάδα το κυμαίνεται από 1 έως 3 στιβάδες κυττάρων αντίθετα με την περιοχή κάτω από τις παλάμες των χεριών και των πελμάτων των ποδιών που μπορεί να φτάσει μέχρι και τις 10 κυτταρικές στιβάδες.

- Διαυγής Στιβάδα (Stratum Lucidum)

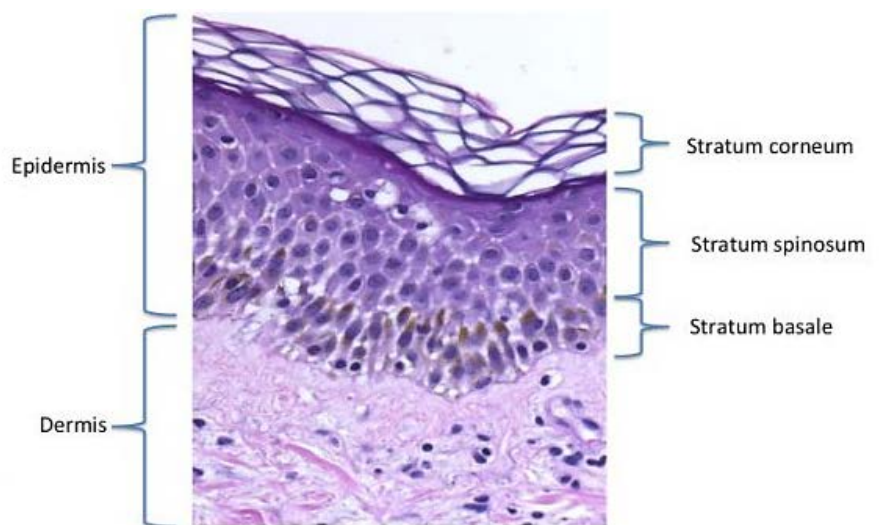
Η διαυγής είναι μια λεπτή, ημιδιαφανής και ομοιογενής στιβάδα κυττάρων μεταξύ της κοκκιώδους και της κεράτινης. Εντοπίζεται μόνο σε ορισμένες ανατομικές περιοχές που χαρακτηρίζονται από το μεγάλο πάχος του δέρματος ή την απουσία τριχών πχ πέλματα. Απαρτίζεται από πολλές στιβάδες πλήρως κερατινοποιημένων, στενά συμπιεσμένων κυττάρων απαλλαγμένα από πυρήνα και οργάνδια. Το κυτταρόπλασμά τους περιέχει φωσφολιπίδια συνδεδεμένα με πρωτεΐνες και μια πρωτεΐνη τύπου κερατίνης.

- Κεράτινη Στιβάδα (Stratum Corneum)

Το πιο επιφανειακό τμήμα της επιδερμίδας είναι η κεράτινη στιβάδα, η οποία αποτελείται από

στρώματα  
πλήρως  
κερατινοποιημένων  
νεκρών  
κυττάρων που  
ανανεώνονται  
συνεχώς. Η  
κεράτινη  
στιβάδα  
θεωρείται το  
κύριο εμπόδιο  
στην δερματική  
απορρόφηση των

ουσιών. Συγκεκριμένα, η  
πολυγωνική μορφολογία των κυττάρων (‘‘τούβλα’’) εξασφαλίζει την



Εικόνα 4: Δομή επιδερμίδας (Elias, 2020)

ελάχιστη αναλογία όγκου-επιφάνειας, επιτρέποντας την πλήρωση του μεσοκυττάριου χώρου με λιπιδικά συστατικά χωρίς διάκενα (“λάσπη”). Αυτή η δομή της (“τοίχος από τούβλα και λάσπη”) εμποδίζει τόσο την είσοδο ουσιών από το περιβάλλον (συμπεριλαμβανομένων και των δραστικών ουσιών) όσο και την άδηλη απώλεια νερού λόγω εξάτμισης (Roberts, 2008).

### 3.2 Δερμίδα

Η δερμίδα απαρτίζεται από πυκνό συνδετικό ιστό ακανόνιστης δομής που εκτείνεται ανάμεσα στην επιδερμίδα και το υποδόριο λίπος. (Dermal Absorption-Roberts). Ανάλογα με την ανατομική περιοχή που εντοπίζεται έχει διαφορετικό πάχος (0,3mm στα βλέφαρα έως και 3,0 mm στην πλάτη) και με την πάροδο της ηλικίας χάνει την ελαστικότητά της.

Ρόλος της είναι η υποστήριξη της επιδερμίδας-τόσο δομικά όσο και διατροφικά με την τροφοδότησή της με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και όπως όλοι οι τύποι συνδετικού ιστού απαρτίζεται από τρία συστατικά: κύτταρα, ίνες και άμορφη ουσία (Weller, 2015) (Habif, 2015).

- Κύτταρα δερμίδας

Τα κυριότερα κύτταρα της δερμίδας είναι οι ινοβλάστες, και παράλληλα με αυτά υπάρχει μικρός αριθμός από μονοκύτταρα μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, δερματικά δενδριτικά και μαστοκύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι μόνιμα ή μεταβατικά. Άλλα κύτταρα του αίματος εντοπίζονται στην περιοχή κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Οι λειτουργίες τους σχετίζονται τόσο με την παραγωγή κολλαγόνου, ελαστίνης κλπ (ινοβλάστες) όσο και με την ανοσολογική απόκριση του δέρματος.

- Ίνες της δερμίδας

Η δερμίδα αποτελείται από ίνες, κυρίως κολλαγόνου (60-70% επί του ξηρού βάρους του δέρματος), πακεταρισμένες σε δεσμίδες. Όταν το δέρμα είναι τεταμένο, το κολλαγόνο, με την ψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, αποτρέπει το σκίσιμό του και οι ελαστικές ίνες, που αναμειγνύονται με αυτό, το επαναφέρουν στην αρχική του κατάσταση. Οι δικτυωτές ίνες είναι λεπτές ίνες κολλαγόνου, που εντοπίζονται στο δέρμα των εμβρύων και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία του δέρματος στους ενήλικες.

- Άμορφη Ουσία

Η άμορφη ουσία της δερμίδας αποτελείται κυρίως από δύο γλυκοζάμινογλυκάνες (υαλουρονικό οξύ και θεική δερματάνη) με μικρότερες ποσότητες από θεική ηπαράνη και θεική χονδροϊτίνη. Οι γλυκοζάμινογλυκάνες συμπλέκονται με πυρηνική πρωτεΐνη και υπάρχουν υπό την μορφή πρωτεογλυκανών.

Οι λειτουργίες της αφορούν:

- i. Την δέσμευση ύδατος, επιτρέποντας την δίοδο θρεπτικών συστατικών, ορμονών και προϊόντων μεταβολισμού μέσω της δερμίδας
- ii. Λειτουργεί ως λιπαντικός παράγοντας μεταξύ του κολλαγόνου και των ελαστικών ινών κατά την κίνηση του δέρματος και
- iii. Δίνει τον απαραίτητο όγκο, καθιστώντας την δερμίδα ως ένα στρώμα απόσβεσης κραδασμών (Weller, 2015)

### 3.3 Εξαρτήματα του δέρματος

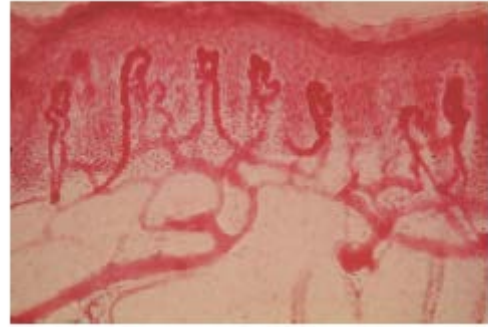
Τα εξαρτήματα του δέρματος όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι:

- Τρίχες: Οι τρίχες είναι κερατινοποιημένες δομές προερχόμενες από δερματικές εισδοχές και απαντώνται σχεδόν σε όλη την επιφάνεια του σώματος. Ο θύλακας της τρίχας είναι “βυθισμένος” υπό γωνία στην δερμίδα, με τον βολβό να φτάνει ορισμένες φορές μέχρι και το υποδόριο λίπος. Βασική τους λειτουργία είναι η προστασία από εξωτερικούς παράγοντες και η διασπορά των προϊόντων των ιδρωτοποιών αδένων (Kolarsick, 2011) (Roberts, 2008).
- Αδένες: Διακρίνονται σε δύο τύπους τους ιδρωτοποιούς και τους σμηγματογόνους αδένες. Οι πρώτοι σχετίζονται άμεσα με την ρύθμιση της θερμοκρασίας μέσω της έκκρισης του ιδρώτα, ο οποίος κατά την χορήγηση φαρμάκων μπορεί να λειτουργήσει και ως φορέας δραστικών μορίων επιδρώντας στην διαπερατότητά τους. Οι δεύτεροι παράγουν το σμήγμα, μια ουσία η οποία προέρχεται από την αποσύνθεση των κυττάρων του σμηγματογόνου αδένα. Δεν έχει εκφορητικό μέρος και το σμήγμα φθάνει στην επιφάνεια μέσα από το θύλακα (Roberts, 2008).
- Νύχια: Τα νύχια παρέχουν προστασία στα άκρα των δακτύλων, ενισχύουν την αίσθηση και επιτρέπουν τον χειρισμό μικρών αντικειμένων. Το υποκείμενο έδαφος των νυχιών περιέχει αιμοφόρα αγγεία, νεύρα, μελανοκύτταρα και έχει παράλληλες ραβδώσεις (Kolarsick, 2011).

### 3.4 Αιμοφόρα Αγγεία & Νεύρα

#### Αιμοφόρα αγγεία

Παρόλο που το δέρμα καταναλώνει μικρές ποσότητες οξυγόνου, η άφθονη αιματική παροχή του λειτουργεί ως ρυθμιστής της θερμοκρασίας του σώματος. Τα αιμοφόρα αγγεία εντοπίζονται σε δύο κύρια οριζόντια στρώματα. Το βαθύ πλέγμα που εκτείνεται ακριβώς κάτω από το υποδόριο λίπος και τα αρτηριόλιά του παροχετεύουν τις τρίχες και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Το επιφανειακό πλέγμα εντοπίζεται στην δερμίδα και τα αγγεία του δημιουργούν τριχοειδείς βρόγχους (Habif, 2015).



**Εικόνα 5:** Απεικόνιση δικτύου τριχοειδών του δέρματος (Weller, 2015)

#### Νεύρα

Η αίσθηση του πόνου, της φαγούρας και της θερμοκρασίας λαμβάνεται και μεταφέρεται μέσω αμύελων νευρικών απολήξεων που βρίσκονται πλησίον της επιδερμικής-δερμидικής σύνδεσης, στην περιοχή του θηλώδους χορίου (Habif, 2015).

## 4. Μηχανισμοί Διαπέρασης ουσιών από το Δέρμα

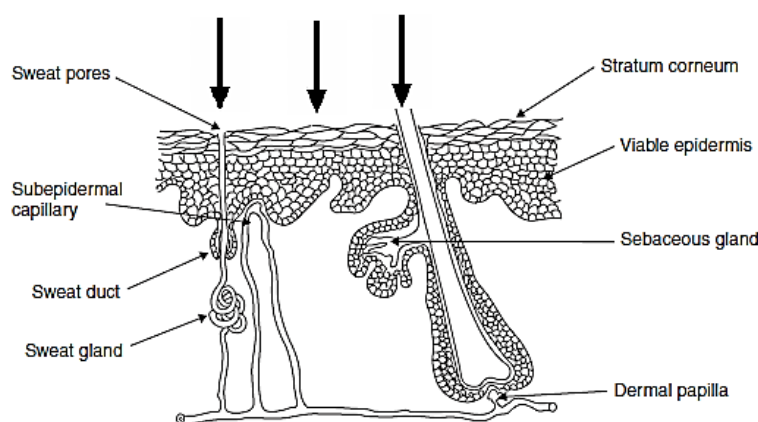
Το δέρμα, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, αποτελεί όργανο που πέραν του ρόλου του ως φραγμού είναι και περιοχή χορήγησης φαρμακολογικά δραστικών ουσιών για τοπική, και σε μικρότερο βαθμό για συστηματική θεραπεία. Ανάλογα λοιπόν με τον θεραπευτικό στόχο υπάρχουν τρεις περιπτώσεις απορρόφησης: η επιδερμική, τοπική και συστηματική. Καλλυντικά, εντομοαπωθητικά και απολυμαντικά είναι παραδείγματα μορφοποιήσεων σχεδιασμένων να διατηρούν τα δραστικά συστατικά τους στην επιφάνεια του δέρματος. Τα τοπικά σκευάσματα επιτρέπουν την διαπέραση του δραστικού σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος και τέλος, μορφοποιήσεις διαδερμικών συστημάτων στοχεύουν την μεταφορά του δραστικού στην συστηματική κυκλοφορία.

### 4.1 Οδοί Διαπέρασης Δέρματος

Μία ουσία που εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος διαθέτει τις παρακάτω πιθανές οδούς διαπέρασης του δέρματος :

- i. Ιδρωτοποιούς αδένες,
- ii. Τριχοθυλάκια και σμηγματογόνους αδένες που εκβάλλουν σε αυτά
- iii. Ακέραιη κεράτινη στιβάδα

Αυτές οι οδοί δεν είναι αποκλειστικές για κάθε δραστικό μόριο. Μάλιστα τα περισσότερα από αυτά διαπερνούν το δέρμα μέσω συνδυασμού οδών και η σχετική κατανομή τους σε αυτές σχετίζεται με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε φαρμάκου (Benson, 2012).



Εικόνα 6: Οδοί διαπέρασης δέρματος (Benson, 2012)

#### 4.1.1 Διαπέραση Μέσω Εξαρτημάτων (Transappendageal Route)

Τα εξαρτήματα του δέρματος προσφέρουν μία συνεχή και απευθείας δίοδο μέσω του φραγμού της κεράτινης στιβάδας. Συγκεκριμένα αποτελούν το 0,1%- 1% της ολικής επιφάνειας του δέρματος και σύμφωνα με τους Otberg *et al* (Otberg N, 2008). Ο αριθμός των θυλακίων, η διάμετρος του ανοίγματος και ο όγκος τους είναι καθοριστικοί παράμετροι της απορρόφησης των δραστικών μορίων μέσω αυτών (Vaibhav Rastogi, 2012). Θεωρείται δε, ότι η συγκεκριμένη οδός κυριαρχεί κατά την φάση υστέρησης (*lag time*) της διαδικασίας διάχυσης.

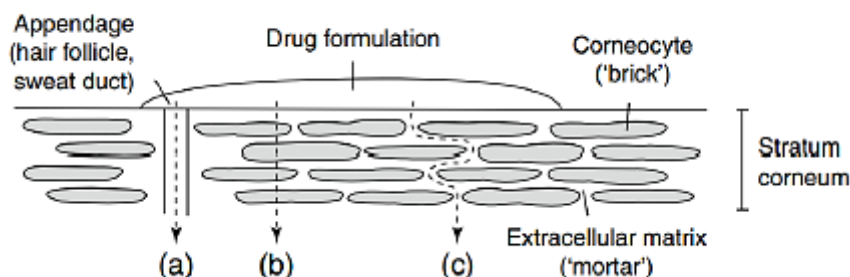
Εσφαλμένα έχει εγκαθιδρυθεί ότι τα εξαρτήματα είναι δίοδοι χαμηλής αντίστασης στην διαπέραση των ουσιών, καθώς οι ιδρωτοποιοί αδένες είναι γεμάτοι με ιδρώτα (υδρόφιλο περιβάλλον) και οι σμηγματογόνοι αδένες με λιπιδικό σμήγμα. Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει προσπάθεια στόχευσης αυτών των περιοχών κατά την χορήγηση μορίων. Αυτός ο στόχος μπορεί να επιτευχθεί είτε μεταβάλλοντας την μορφοποίηση είτε αλλάζοντας την δομή του δραστικού μορίου όπως διατυπώθηκε από τους Lu *et al* (Lu CP, 2016). Στην μεν πρώτη περίπτωση περιλαμβάνεται η χρήση δοσολογικών μορφών βασισμένων σε σωματίδια/ κυστίδια και η προσθήκη εκδόχων αναμίξιμων με το σμήγμα, στην δε δεύτερη περίπτωση η βελτιστοποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως το μέγεθος, η λιποφιλία, η διαλυτότητα και το φορτίο.

#### 4.1.2 Διαπέραση Μέσω Κεράτινης Στιβάδας (Transepidermal Route)

Οι διαθέσιμες οδοί που μπορεί να ακολουθήσει ένα μόριο μέσω της κεράτινης στιβάδας είναι δύο: η ενδοκυτταρική διαμέσου των κερατινοκυττάρων (transcellular route) και η διακυτταρική λιπιδική οδός μεταξύ των κερατινοκυττάρων (intercellular).

- i. Ενδοκυτταρική Οδός (Transcellular route): Θεωρείται ως η πολική οδός της κεράτινης στιβάδας, λόγω της περιεχόμενης ενδοκυττάριας μήτρας κεράτινης η οποία είναι σχετικά ενυδατωμένη και κατ' επέκταση υδρόφιλη στην φύση της. Η ενδοκυτταρική οδός απαιτεί όχι μόνο την κατανομή και διάχυση στα κερατινοκύτταρα αλλά και την κατανομή και διάχυση στα ενδιάμεσα λιπιδικά στρώματα. Λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της αφορά κυρίως υδρόφιλα δραστικά μόρια.
- ii. Διακυτταρική Οδός (Intercellular Route): Η διακυτταρική οδός περιλαμβάνει την διάχυση του φαρμάκου μέσω της λιπιδικής μήτρας της κεράτινης στιβάδας. Η συγκεκριμένη δίοδος αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για δύο λόγους: α) οι δραστικές ουσίες πρέπει να ακολουθήσουν μία ελικοειδή πορεία λόγω της παρουσίας των κερατινοκυττάρων σε αντίθεση με την σχετικά απευθείας διαδρομή της ενδοκυτταρικής οδού και β) η διακυττάρια περιοχή χαρακτηρίζεται από ποικιλομορφία στην σύσταση των λιπιδικών στρωμάτων. Θεωρείται ως η κύρια οδός διαπέρασης λόγω του ότι η πλειονότητα των

χορηγούμενων δραστικών μορίων είναι λιπόφιλης φύσεως (Vaibhav Rastogi, 2012)



Εικόνα 7: Αποτύπωση οδών διαπέρασης μέσω της κεράτινης στιβάδας (Keng Wooi Ng, 2015)

## 4.2 Στάδια Διαδερμικής Απορρόφησης και Θεωρία Διάχυσης

Η απορρόφηση των φαρμακολογικά δραστικών μορίων από ένα διαδερμικό σύστημα χορήγησης προς την συστηματική κυκλοφορία μπορεί να θεωρηθεί ως ένα “πέρασμα” από διαδοχικά στρώματα δέρματος (ή φραγμούς) και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Αποδέσμευση από την μορφοποίηση
- Διείσδυση στην κεράτινη στιβάδα και διάχυση μέσω αυτής
- Κατανομή από την κεράτινη στιβάδα στην ζώσα επιδερμίδα πριν προσεγγίσει τα αγγεία που εντοπίζονται στην δερμίδα

Η κατανομή του φαρμάκου στην κεράτινη στιβάδα είναι το πρώτο περιοριστικό βήμα καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις οι δραστικές ουσίες αποδεσμεύονται άμεσα από τον φορέα. Στην διεπαφή μορφοποίησης/δέρματος, η κατανομή του φαρμάκου στο δέρμα είναι άμεσα εξαρτώμενη από την σχετική διαλυτότητα του δραστικού μορίου στα συστατικά του συστήματος χορήγησης και την κεράτινη στιβάδα. Σε κάποιες περιπτώσεις βέβαια, η αποδέσμευση του δραστικού μπορεί να ελέγχεται από την μορφοποίηση, όπως συμβαίνει στα διαδερμικά συστήματα που διαθέτουν φραγμό ελεγχόμενου ρυθμού. Στην συνέχεια ακολουθεί διάχυση του δραστικού διαμέσου της κεράτινης και όταν προσεγγίσει τα βαθύτερα στρώματα της, υφίσταται ένα δεύτερο βήμα κατανομής στην διεπαφή ΚΣ/ζώσας επιδερμίδας. Ως αποτέλεσμα, για φάρμακα υψηλής λιποφιλίας, η ζώσα επιδερμίδα μπορεί να αποτελέσει ένα ισχυρό εμπόδιο της απορρόφησης, καθώς απαιτείται η κατανομή του δραστικού σε μία υδρόφιλη περιοχή. Μόλις, το φαρμακολογικά δραστικό μόριο προσεγγίσει τα βαθύτερα στρώματα της ζώσας επιδερμίδας, το αγγειακό δίκτυο της δερμίδας επιτρέπει την άμεση απορρόφηση του φαρμάκου στην συστηματική κυκλοφορία.

#### 4.2.1 Θεωρία Διάχυσης

Στην παραδοσιακή θεώρηση της κινητικής διαδερμικής χορήγησης, η κεράτινη στιβάδα ορίζεται ως ο φραγμός που καθορίζει τον ρυθμό εισόδου προς την ζώσα επιδερμίδα για τις περισσότερες εξωγενείς ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών. Η μεταφορά διαμέσου της ΚΣ γενικά περιγράφεται υποθέτοντας μία διαδικασία διάχυσης μέσω μίας ομοιογενούς μεμβράνης, χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η βιολογική της πολυπλοκότητα.

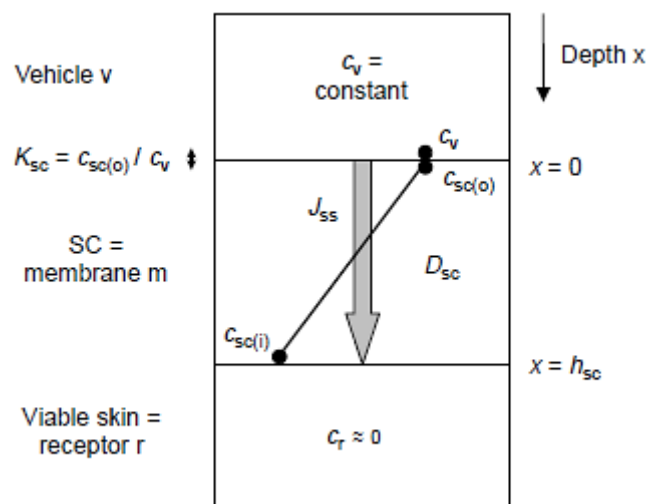
##### Πρώτος νόμος του Fick

Αν λοιπόν θεωρήσουμε απλή παθητική διάχυση κατά την οποία τα μόρια κινούνται με τυχαίο τρόπο από μία περιοχή σε μία άλλη βάσει διαβάθμισης της συγκέντρωσης, τότε η μεταφορά στην ΚΣ μπορεί να περιγραφεί βάση του πρώτου νόμου του Fick:

$$J_{ss} = -D \frac{\partial C_{sc}}{\partial x}$$

Όπου  $J_{ss}$  είναι η ροή (ρυθμός ροής μάζας του υλικού ανά μονάδα επιφάνειας περιοχής εφαρμογής, πχ  $\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$ ),  $\partial C_{sc}$  η μεταβολή της συγκέντρωσης της διαχεόμενης ουσίας στην κεράτινη στιβάδα (πχ  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ),  $x$  το πάχος του φραγμού (πχ  $\text{cm}$ ) και  $D$  ο συντελεστής διάχυσης του μορίου (πχ  $\text{cm}^2/\text{h}$ ). Το αρνητικό πρόσημο καταδεικνύει ότι η ροή των μορίων πραγματοποιείται προς τις περιοχές χαμηλών συγκεντρώσεων (Benson, 2012) (Dancik, 2008).

Μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε συνθήκες σταθερής κατάστασης (steady state) όπου το προφίλ μεταβολής συγκέντρωσης στο δέρμα είναι ανεξάρτητο του χρόνου (Sugibayashi, 2017).



Εικόνα 8: Διάχυση ουσιών μέσω μεμβράνης (Dancik, 2008)

Άρα για συνθήκες σταθερής κατάστασης μπορούμε να εξάγουμε την παρακάτω σχέση:

$$J_{ss} = D \frac{\Delta C_{sc}}{h_{sc}}$$

Όπου  $\Delta C_{sc} = C_{sc(0)} - C_{sc(i)}$ . Εφόσον επικρατούν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) στον δέκτη η συγκέντρωση  $C_{sc(i)}$  ισούται πρακτικά με μηδέν και η μεταβολή της συγκέντρωσης με  $\Delta C_{sc} \approx C_{sc(0)}$ . Επειδή όμως η συγκέντρωση στην κεράτινη στιβάδα είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, γίνεται συσχετισμός με την συγκέντρωση του φορέα  $C_v$  μέσω της σταθεράς κατανομής  $K_{sc}$ . Οπότε προκύπτει η παρακάτω σχέση:

$$J_{ss} = D \frac{C_{sc(0)} - C_{sc(i)}}{h_{sc}} \approx D \frac{C_{sc(0)}}{h_{sc}} = D \frac{K_{sc} C_v}{h_{sc}}$$

ή, ορίζοντας έναν συντελεστή διαπερατότητας σταθερής κατάστασης  $k_p = D \frac{K_{sc}}{h_{sc}}$  (Dancik, 2008)

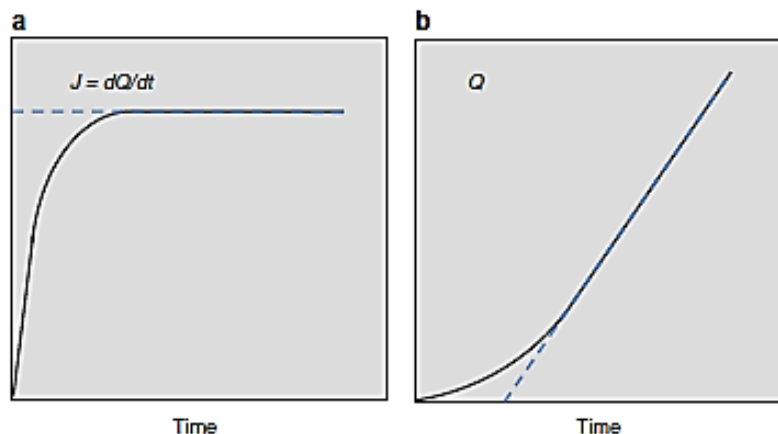
$$J_{ss} = k_p C_v$$

Εν συνεχεία, η αθροιστική ποσότητα  $Q$  που διέρχεται ανά μονάδα επιφάνειας δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$J_{ss} = \frac{dQ_{ss}(t)}{A dt} \rightarrow Q_{ss}(t) = K_{sc} A C_v h_{sc} \left( \frac{Dt}{h_{sc}^2} - \frac{1}{6} \right)$$

#### Απεριόριστο και Πεπερασμένο Σύστημα Δόσεων

Στο απεριόριστο σύστημα δόσεων, η ποσότητα του φαρμάκου που εφαρμόζεται πάνω στο δέρμα είναι αρκετά μεγάλη, ώστε η μείωση του στον φορέα με την πάροδο του χρόνου να θεωρηθεί πρακτικά αμελητέα. Αντίθετα, στο πεπερασμένο σύστημα δόσεων, η συγκέντρωση του δραστικού μειώνεται σταδιακά μέσα στον χρόνο εφαρμογής και ουσιαστικά φτάνουμε σε ένα πλατώ δόσης του φαρμάκου στον δέκτη. Η δεύτερη περίπτωση είναι εκείνη κιόλας που προσεγγίζει καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες, καθώς οι περισσότερες μορφοποιήσεις έχουν ορισμένη διαθέσιμη δόση του φαρμάκου.



**Εικόνα 9:** Τυπικός ρυθμός διαπερατότητας,  $J$  και αθροιστική ποσότητα,  $Q$  των δραστικών ουσιών μέσω του δέρματος. Η ροή  $J$  προσεγγίζει μία σταθερή τιμή ενώ η αθροιστική ποσότητα  $Q$  γίνεται ανάλογη του χρόνου μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (**α**) Απεριόριστο σύστημα δόσεων, (**β**) Πεπερασμένο σύστημα δόσεων (**Dancik, 2008**)

Από την επέκταση της ευθείας στον άξονα του χρόνου, βρίσκουμε τον χρόνο υστέρησης (lag time), ο οποίος δίνεται από την σχέση (Dancik, 2008) (Sugibayashi, 2017):

$$t_{lag} = \frac{h_{sc}^2}{6D}$$

### Δεύτερος Νόμος του Fick

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο πρώτος νόμος του Fick ισχύει σε περιπτώσεις σταθερής κατάστασης, όπου η ροή μεταβάλλεται ανεξάρτητα του χρόνου. Αντίθετα, ο δεύτερος νόμος εφαρμόζεται συνήθως σε διάχυση μη σταθερής κατάστασης όπου η συγκέντρωση του δραστικού μεταβάλλεται σε σχέση με τον χρόνο και περιγράφεται από την σχέση που ακολουθεί παρακάτω (Dancik, 2008):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

## 5. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Απορρόφηση

Υπάρχουν διάφοροι φυσιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον φραγμό του δέρματος, και συνεπώς την διαπερατότητα του δέρματος. Ανάλογα με την φύση τους μπορούμε να τους διακρίνουμε σε τρεις κατηγορίες: τους βιολογικούς (σχετιζόμενοι με το δέρμα), περιβαλλοντικούς και φυσικοχημικούς (σχετιζόμενοι με την δραστική ουσία) (Morris, 2011).

### 5.1 Βιολογικοί Παράγοντες

#### 5.1.1 Ηλικία

Η σχέση ηλικίας και δομής του δέρματος έχει μελετηθεί εκτενώς από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (Roskos, 1989). Υπάρχουν σαφείς ενδείξεις δομικών μεταβολών του δέρματος ενώ πραγματοποιείται η διαδικασία της γήρανσης, όπως είναι η μείωση του πάχους της επιδερμίδας και δερμίδας, η απώλεια προσκόλλησης μεταξύ των κερατινοκυττάρων, η μείωση του αριθμού μελανοκυττάρων και κυττάρων του Langerhans καθώς και η αύξηση των ινών κολλαγόνου τύπου 3 (Fore, 2006).

Είναι όμως αυτές οι δομικές αλλαγές ικανές να επηρεάσουν την διαδερμική απορρόφηση; Η επιστημονική κοινότητα έχει δώσει δύο διαφορετικές απαντήσεις στο παραπάνω ερώτημα. Η πρώτη υποστηρίζει ότι η κεράτινη στιβάδα παραμένει ακέραιη και αμετάβλητη στο πέρασμα του χρόνου, ανεξαρτήτως των λοιπών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα. Αντίθετα, ορισμένοι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι η διαπερατότητα μη λιπόφιλων μορίων όπως η υδροκορτιζόνη, το βενζοϊκό οξύ, το ακετυλοσαλικυλικό οξύ και η καφεΐνη είναι σημαντικά χαμηλότερη στους ηλικιωμένους σε σχέση με άτομα μικρότερης ηλικίας (Roskos, 1989). Παρόλ' αυτά, στην ίδια έρευνα, βρέθηκε ότι η απορρόφηση της τεστοστερόνης και της οιστραδιόλης είναι παρόμοια στις δύο ηλικιακές ομάδες, υποδηλώνοντας ότι η διαπερατότητα των υδρόφοβων δραστικών ουσιών παραμένει ανεπηρέαστη από την ηλικία. Αυτό θεωρητικά σχετίζεται με την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό της ΚΣ που είναι πρόδηλο από την μείωση του φυσικού παράγοντα ενυδάτωσης (NMF) (Williams, 2003).

Παρομοίως, η διαπερατότητα των υδρόφιλων δραστικών είναι σαφώς μεγαλύτερη σε δέρμα νεογνών σε σχέση με αυτό των ενηλίκων (Evans, 1985). Αυτό συμβαίνει, επειδή το δέρμα απαιτεί 3-5 μήνες από την γέννηση για να ωριμάσει και να διαμορφώσει παρόμοιο πάχος και δυνατότητες φραγμού όπως αυτές των ενηλίκων (Williams, 2003). Άρα, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την χορήγηση τοπικών σκευασμάτων για την αποφυγή τοξικών φαινομένων λόγω της αυξημένης απορρόφησης.

### 5.1.2 Ανατομική Περιοχή

Η δομή του δέρματος μεταβάλλεται όχι μόνο μεταξύ ατόμων, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ανατομικών περιοχών του ίδιου ατόμου. Για παράδειγμα, η επιδερμίδα είναι μέχρι και 13 φορές παχύτερη στα πέλματα των ποδιών και τις παλάμες των χεριών εν συγκρίσει με τα βλέφαρα και τα χείλη. Συχνά θεωρείται ότι το πάχος της ΚΣ είναι άμεσα συνδεδεμένο με την αντίσταση στην απορρόφηση των δραστικών, άρα θα ήταν αναμενόμενο η διαπερατότητα των φαρμάκων στα πέλματα και τις παλάμες να είναι χαμηλότερη σε σχέση με την περιοχή των βλεφάρων και των χειλιών. Είναι ενδιαφέρον όμως, ότι αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε, καθώς έχουν επιτευχθεί παρόμοια προφίλ απορρόφησης σε περιοχές διαφορετικού πάχους και αντίστοιχα προφίλ διαφορετικής διαπερατότητας σε περιοχές ίδιου πάχους (Wester, 1989).

Για αυτόν τον λόγο, χρησιμοποιείται μία γενικευμένη σειρά ιεράρχησης των διαφορετικών περιοχών διαπερατότητας όπου το δέρμα της επιγεννητικής περιοχής θεωρείται ότι έχει την μεγαλύτερη απορρόφηση, ακολουθημένο από το δέρμα του προσώπου και του λαιμού, του κορμού (στήθος, στομάχι, πλάτη), του βραχίονα και τέλος της περιοχής των ποδιών (Williams, 2003).

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της περιοχής εφαρμογής είναι η αξιολόγηση της ικανότητας συγκόλλησης του επιθέματος στο δέρμα, δηλαδή η ευκολία στην αφαίρεση του επιθέματος και η αποφυγή ή ελαχιστοποίηση τυχόν ερεθισμών. Ως εκ τούτου, συχνά συνίσταται η χορήγηση διαδερμικών συστημάτων στο δέρμα του κορμού ή του βραχίονα. Αποκλίσεις από τα προτεινόμενα σημεία εφαρμογής αποδίδονται στον τύπο του φαρμάκου και στην διαπερατότητα του δέρματος. Για παράδειγμα, δραστικά μόρια όπως η φαιντανύλη, κλονιδίνη κλπ εμφανίζουν υψηλές τιμές διαπερατότητας λόγω των βέλτιστων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που διαθέτουν και κατ' επέκταση η περιοχή εφαρμογής παίζει ελάχιστο ρόλο στην απορρόφηση. Αντίθετα, δραστικά όπως η λιδοκαΐνη και σκοπολαμίνη προτείνεται να εφαρμόζονται κοντά στις περιοχές ενδιαφέροντος, όπως είναι πχ οι περιοχές του πόνου για την λιδοκαΐνη. Επιπλέον, οι περιοχές με τριχοφυΐα θα πρέπει γενικά να αποφεύγονται ή εναλλακτικά να έχει προηγηθεί αφαίρεση τους (Hadgraft, 2004).

### 5.1.3 Φύλο

Μία από τις διαφορές μεταξύ αρσενικού και θηλυκού δέρματος είναι το μέγεθος των κερατινοκυττάρων, με αυτά που λαμβάνονται από άρρενες δότες να τείνουν να είναι μεγαλύτερα από αυτά που εντοπίζονται σε θηλυκά άτομα (Williams, 2003). Άλλες διαφορές είναι ότι οι άντρες φαίνεται να έχουν μεγαλύτερους πόρους στο δέρμα καθώς και περισσότερο ενεργούς σμηγματογόνους αδένες σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Giacomoni, 2009). Το pH των αρσενικών ατόμων είναι επίσης σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με αυτό των γυναικών (Jacobi, 2005). Αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν ενδεχομένως να μεταφραστούν σε μεταβλητότητα στην διαδερμική χορήγηση των δραστικών ουσιών, ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που έχουν

πραγματοποιηθεί δεν δείχνουν σημαντικές διαφορές. Γενικευμένο συμπέρασμα, όμως δεν μπορεί να εξαχθεί λόγω του μικρού αριθμού πειραμάτων και του περιορισμένου αριθμού δραστικών που έχουν χρησιμοποιηθεί (Morris, 2011).

#### 5.1.4 Φυλή

Από μελέτες σύγκρισης απορρόφησης δραστικών με δείγματα δέρματος διαφορετικής φυλής έχει βρεθεί ότι, η διαπερατότητα του δέρματος της Αφρο-Καραϊβικής φυλής είναι χαμηλότερη σε σχέση με αυτή της Καυκάσιας φυλής (Stoughton, 1969). Αυτή η διαφορά αποδίδεται στην διαφορετική δομή του δέρματος μεταξύ των φυλών. Συγκεκριμένα, το δέρμα της Αφρο-Καραϊβικής φυλής διαθέτει μεγαλύτερο αριθμό στρωμάτων κερατινοκυττάρων στην κεράτινη στιβάδα, υποδηλώνοντας ότι η πυκνότητα της ΚΣ είναι μεγαλύτερη (Weigand, 1974). Επιπλέον, η ακεραιότητα της ΚΣ είναι ενισχυμένη λόγω του μεγάλου βαθμού κυτταρικής προσκόλλησης και του υψηλού λιπιδικού περιεχομένου (Reinertson, 1959). Παράλληλα, παρατηρείται μειωμένο ποσοστό νερού που σε συνδυασμό με τα παραπάνω δικαιολογεί τα χαμηλότερα επίπεδα απορρόφησης (Berardesca, 1991).

Μία ξεχωριστή μελέτη συνέκρινε την διαπερατότητα μεταξύ τεσσάρων εθνικοτήτων, χρησιμοποιώντας τον νικοτινικό μεθυλεστέρα ως ουσίας αναφοράς. Διαπιστώθηκε ότι η σειρά κατάταξης ήταν Αφρο-Καραϊβική < Ασιατική < Καυκάσια < Ισπανική. Βάσει αυτών των δεδομένων, οι κλινικοί ιατροί θα πρέπει να αναμένουν μεταβλητότητα στα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα και να γνωρίζουν που οφείλεται αυτή, ώστε να γίνεται κατάλληλη προσαρμογή της δοσολογίας (Leopold, 1996).

#### 5.1.5 Βαθμός Ενυδάτωσης

Η κεράτινη στιβάδα αποτελείται από 10% με 20% νερό και διαθέτει ικανότητα απορρόφησης μέχρι και 20 φορές άνω του φυσιολογικού όταν διαβραχεί για σύντομο χρονικό διάστημα (Barry, 1983). Η ενυδάτωση αυτή του δέρματος, προκαλεί την διόγκωση των κερατινοκυττάρων, επηρεάζοντας κατ' επέκταση το "πακετάρισμα" των λιπιδίων της ΚΣ. Αυτές οι διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε συγχώνευση των διακοπτόμενων ενδοκυτταρικών και διακυτταρικών οδών διαπέρασης, σχηματίζοντας συνεχείς διαδρομές χορήγησης, οι οποίες αυξάνουν την ροή δραστικών μέσω της ΚΣ.

Οι επιστήμονες έχουν προσπαθήσει να εκμεταλλευτούν την αύξηση στην διαπερατότητα λόγω ενυδάτωσης, περιλαμβάνοντας στην μορφοποίηση μη πορώδη υλικά επένδυσης, ώστε να προκαλέσουν την απόφραξη του δέρματος (φαινόμενο απόφραξης). Η προσέγγιση, αυτή βέβαια έχει και τα μειονεκτήματά της όπως μεγάλη διακύμανση στην απορρόφηση, ερεθισμούς και τάση για μικροβιακή ανάπτυξη στην περιοχή (Patil, 1994).

### 5.1.6 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία του δέρματος, αντίθετα από αυτή του οργανισμού, δεν διατηρείται σταθερή και επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, η κυκλοφορία του αέρα και η υγρασία. Η διαπερατότητα του δέρματος είναι ευθέως ανάλογη της θερμοκρασίας, με υψηλότερες θερμοκρασίες να προκαλούν αύξηση ρευστότητας των λιπιδικών στρωμάτων και κατ' επέκταση αύξηση του συντελεστή διάχυσης του φαρμάκου (Roberts, 2002). Ένα σύστημα που προκαλεί απόφραξη και μειώνει την απώλεια θερμότητας από το δέρμα, είναι πιθανό να ελαττώσει και τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας στην περιοχή εφαρμογής. Αν και αυτή η απλή προσέγγιση είναι μια κατάλληλη μέθοδος για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας, μπορεί να προκαλέσει ελαφρά αύξηση της στην περιοχή εφαρμογής (Ibrahim, 2005).

### 5.1.7 Κατάσταση του Δέρματος

Το δέρμα έρχεται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον και κατ' επέκταση είναι το πρώτο όργανο του σώματος που υφίσταται φθορά αν ένα άτομο εκτεθεί σε ερεθιστικές ουσίες ή ακραίες συνθήκες. Οι χαρακτηριστικοί παράγοντες που μεταβάλλουν την ακεραιότητα του δέρματος διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: χημικούς (διαλύτες, απορρυπαντικά), περιβαλλοντικούς (ακραίες θερμοκρασίες, UV ακτινοβολία) και παθολογικούς (μηχανική βλάβη, παθήσεις όπως δερματίτιδα, έκζεμα) (Washington, 2001).

Το τραυματισμένο ή παθολογικό δέρμα που προκύπτει έχει αποδειχθεί ότι έχει αυξημένη διαπερατότητα σε σχέση με το ακέραιο δέρμα λόγω της φλεγμονώδους αντίδρασης που μειώνει τις ιδιότητες φραγμού. Για αυτόν τον λόγο είναι σκόπιμο η εφαρμογή των διαδερμικών συστημάτων να αποφεύγεται σε παθολογικό δέρμα, λόγω του κινδύνου εκδήλωσης ανεπιθύμητων ενεργειών (Morris, 2011).

### 5.1.8 Μεταβολισμός του Δέρματος

Το δέρμα είναι ένα μεταβολικά ενεργό όργανο και η διέλευση μέσω αυτού εκθέτει την φαρμακολογικά δραστική ουσία σε ποικιλία ενζύμων. Ένζυμα που εμπλέκονται στις φάσεις I (οξειδωση, υδρόλυση κλπ) και II (μεθυλίωση, γλυκουρονιδίωση) μεταβολικών διεργασιών έχουν απομονωθεί από το δέρμα (Liu, 1994). Συγκεντρωτικά, αυτά τα ενζυμικά συστήματα συμβάλλουν στον μεταβολισμό πρώτης διόδου του δέρματος, ο οποίος μπορεί να μειώσει την βιοδιαθεσιμότητα του συστατικού που εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος. Επιπλέον, μεταβολισμός του δραστικού μπορεί να προκληθεί και από το μικροβίωμα που εντοπίζεται στην επιφάνεια του δέρματος και στα υποκείμενα στρώματά του. Παρά, όμως, την ποικιλία των μεταβολικών οδών που πραγματοποιούνται, η συνολική ενζυματική δραστηριότητα είναι κατά πολύ χαμηλότερη από εκείνη στο ήπαρ, της τάξεως του 10% (Hotchkiss, 1998).

## 5.2 Φυσικοχημικοί Παράγοντες

### 5.2.1 Μοριακό Βάρος και Σχήμα

Το μέγεθος και το σχήμα της δραστικής ουσίας επηρεάζει άμεσα την ικανότητα διάχυσης διαμέσου της κεράτινης στιβάδας. Έχει αποδειχθεί ότι η σχέση μεταξύ του μεγέθους της δραστικής και της διαπερατότητας είναι αντίστροφη. Γενικά, τα μόρια που επιλέγονται για διαδερμική χορήγηση τείνουν να έχουν μέγεθος κάτω των 500 Da, λόγω της φτωχής απορρόφησης των μεγαλύτερων μορίων (Benson, 2012).

### 5.2.2 Συντελεστής Κατανομής

Ο συντελεστής κατανομής σχετίζεται με την ικανότητα μιας ουσίας να κατανεμηθεί μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, συνήθως οκτανόλη- νερό ή επτάνιο-ρυθμιστικό. Πιο απλουστευμένα, υψηλή τιμή συντελεστή κατανομής αντιπροσωπεύει και υψηλή λιποφιλία και είναι συχνά συνδεδεμένη πειραματικά με αύξηση της διαπερατότητας μέσω των λιπιδικών στρωμάτων της κεράτινης στιβάδας. Οι (Barry, 1987) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συντελεστής κατανομής, που συνήθως περιγράφεται ως  $\log P$  ή  $\log K_{ow}$ , επηρεάζει την οδό που θα ακολουθήσει η δραστική για να διαπεράσει το δέρμα. Μόρια με κυρίως υδρόφιλες ιδιότητες θα έχουν συγκριτικά μεγαλύτερη τάση να διασχίζουν το δέρμα μέσω των υδρόφιλων οδών, όπως είναι τα πληρωμένα με ενυδατωμένη κερατίνη κύτταρα. Δραστικές ουσίες με ενδιάμεσες ιδιότητες –δηλαδή  $\log P$  μεταξύ 1 και 3- θα διασχίσουν το δέρμα μέσω λιπιδικών και υδρόφιλων οδών, με κυρίαρχη όμως την διακυττάρια οδό. Λιπόφιλα μόρια ( $\log P > 3$ ) διαχέονται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της διακυττάριας οδού. Ιδανικά η δραστική προς χορήγηση θα πρέπει να διαθέτει τόσο λιπόφιλες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα της κεράτινης στιβάδας και του αυξανόμενου υδρόφιλου χαρακτήρα των υποκείμενων στρωμάτων (Moss, 2015).

### 5.2.3 Διαλυτότητα και Σημείο Τήξεως

Η διαδερμική απορρόφηση της δραστικής ουσίας επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την διαλυτότητα της στον φορέα χορήγησης. Αν η ουσία είναι περισσότερο διαλυτή στην κεράτινη στιβάδα σε σχέση με τον φορέα χορήγησης, τότε η συγκέντρωση της στην κεράτινη στιβάδα θα είναι μεγαλύτερη από αυτήν στον φορέα όταν επέλθει ισορροπία. Όταν μάλιστα, η δραστική είναι πλήρως διαλυτοποιημένη στην μορφοποίηση, ο ρυθμός διάχυσης είναι αυξημένος λόγω μεγαλύτερης διάχυσης από τον φορέα.

Όσον αφορά το σημείο τήξεως, λόγω του συσχετισμού του με την διαλυτότητα στο νερό, χρησιμοποιείται από πολλά μοντέλα πρόβλεψης για τον καθορισμό της διαλυτότητας (Ostrenga, 1971).

#### 5.2.4 pH και Ιονισμός

Η επικρατούσα λιπόφιλη φύση της κεράτινης στιβάδας υποδηλώνει ότι η μη ιονισμένη μορφή της δραστικής είναι πιθανότερο να διαπεράσει το δέρμα σε σχέση με την ιονισμένη. Ο βαθμός ιονισμού της δραστικής, επομένως, είναι κρίσιμος στην βελτιστοποίηση της διαδερμικής απορρόφησης. Σύμφωνα με την θεωρία pH-μερισμού, αν ένα μόριο είναι μη ιονισμένο, θα απορροφηθεί μέσω της διακυτταρικής οδού, ενώ αν είναι ιονισμένο, λόγω του φραγμού που δημιουργούν τα λιπιδικά στρώματα της κεράτινης στιβάδας, θα διαπεράσει το δέρμα κυρίως μέσω των πόρων και εξαρτημάτων. Από μελέτες έχει προκύψει, ότι η διαφορά αυτή στην οδό που ακολουθούν οι δύο μορφές επηρεάζει την διαπερατότητα- με την ιονισμένη μορφή να εμφανίζει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα (Moss, 2015).

Η προσαρμογή λοιπόν του pH θα μεταβάλλει τις ποσότητες της δραστικής που είναι διαθέσιμη σε ιονισμένη και μη ιονισμένη μορφή, επηρεάζοντας κατ' επέκταση την διαλυτότητα, συγκέντρωση και τελικά τον ρυθμό διάχυσης διαμέσου του δέρματος (Vaibhav Rastogi, 2012).

**Πίνακας 3:** Ιδανικές Ιδιότητες Δραστικών για Διαδερμική Χορήγηση (Vaibhav Rastogi, 2012)

| <b>Ιδανικές Ιδιότητες Δραστικών για Διαδερμική Χορήγηση</b> |                                             |
|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Παράμετροι</b>                                           | <b>Ιδιότητες</b>                            |
| Δοσολογία                                                   | Να είναι χαμηλή (μικρότερη των 20 mg/ημέρα) |
| Χρόνος Ημιζωής                                              | 10 ή λιγότερο (h)                           |
| Μοριακό Βάρος                                               | <500 Da                                     |
| Συντελεστής Κατανομής                                       | logP (οκτανόλη-νερό) μεταξύ 1.0 και 3.0     |
| Σημείο Τήξεως                                               | <200° C                                     |
| pH                                                          | Μεταξύ 5.0 και 9.0                          |

## 6. Μέθοδοι Ενίσχυσης Διαδερμικής Απορρόφησης

Η λειτουργία φραγμού του δέρματος είναι κρίσιμη για την αποτροπή απώλειας ύδατος από το σώμα και την υποστήριξη ζωής σε ξηρές συνθήκες. Αυτή η προστατευτική λειτουργία επίσης παρεμποδίζει την πρόσληψη φαρμάκων και την συστηματική απορρόφηση των απαιτούμενων θεραπευτικών δόσεων. Ως εκ τούτου, πολλές στρατηγικές αναπτύχθηκαν για την ενίσχυση της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσω του δέρματος (Lane, 2012). Αυτές μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις παθητικές και τις ενεργητικές μεθόδους ενίσχυσης. Ενώ οι παθητικές μέθοδοι είναι βασισμένες στην μορφοποίηση και την χρήση χημικών παραγόντων, οι ενεργητικές μέθοδοι χρησιμοποιούν κάποιου είδους φυσική δύναμη για την διατάραξη του φραγμού της κεράτινης στιβάδας ή/ και την παροχή κινητήριας δύναμης στην δραστική ουσία (Zorec, 2013).

**Πίνακας 4:** Μέθοδοι ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης (Barry, 2006) (Zorec, 2013)



## 6.1 Παθητικές

### 6.1.1 Επιλογή Κατάλληλης Δραστικής Ουσίας ή Προφαρμάκου

Αν είναι δυνατόν, επιλέγουμε μία δραστική ουσία που διαθέτει τις βέλτιστες φυσικοχημικές ιδιότητες για να διαχέεται επαρκώς από το δέρμα, και κατά αυτόν τον τρόπο εξαλείφονται τυχόν προβλήματα διαπερατότητας. Αυτές οι ιδιότητες όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο είναι: χαμηλό μοριακό βάρος, επαρκής διαλυτότητα σε λάδι και ύδωρ, υψηλός (βέλτιστος) συντελεστής κατανομής, και χαμηλό σημείο τήξεως, που σχετίζεται με καλή διαλυτότητα όπως προβλέπεται από την θεωρία ιδανικής διαλυτότητας (Barry, 2006).

Σε περίπτωση που η φαρμακολογικά δραστική ουσία δεν πληρεί τις απαιτούμενες προϋποθέσεις, μπορεί αντί αυτής να χρησιμοποιηθεί κάποιο πρόδρομο μόριο (προφάρμακο) που εντός του οργανισμού θα μεταβολισθεί στην ενεργό μορφή. Τα προφάρμακα συνήθως σχεδιάζονται με την σύνδεση λιπόφιλων τμημάτων στην μητρική ένωση. Αυτή η αύξηση της λιποφιλίας διευκολύνει την κατανομή της ουσίας στην κεράτινη στιβάδα άρα και την απορρόφησή της (Zorec, 2013).

Παρόλ' αυτά, τα κορεσμένα συστήματα των περισσότερων φαρμάκων αποτυγχάνουν να προσδώσουν επαρκή βιοδιαθεσιμότητα και συνήθως καταφεύγουμε σε εναλλακτικές προσεγγίσεις (Barry, 2006).

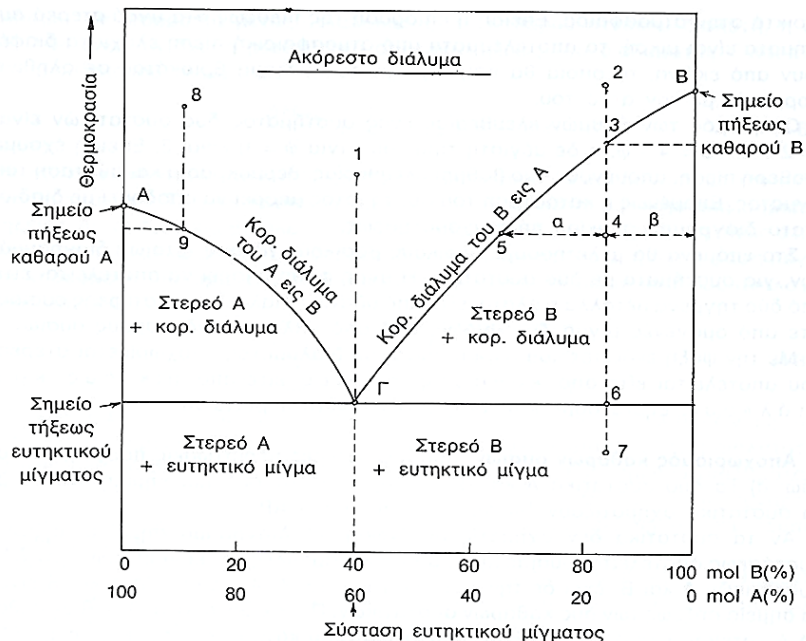
### 6.1.2 Ιονικά Ζεύγη

Τα ζεύγη ιόντων ορίζονται ως ουδέτεροι-μη ιονισμένοι σχηματισμοί που προκύπτουν από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ιόντων και είναι επαρκώς λιπόφιλα ώστε να διαλύονται σε λιπιδικά μέσα όπως η κεράτινη στιβάδα (Lane, 2012). Συγκεκριμένα, καθώς τα επιμέρους φορτία εξουδετερώνονται προσωρινά, το σύμπλοκο κατανέμεται στα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας. Στην συνέχεια, το ζεύγος ιόντων διαχέεται στην διεπιφάνεια που ορίζεται από τα κερατινοκύτταρα και την ζώσα επιδερμίδα και διασπάται στα επιμέρους φορτισμένα δομικά τμήματά του. Τα τμήματα αυτά διαχέονται στο υδατικό περιβάλλον της επιδερμίδας προς τα βαθύτερα στρώματα του δέρματος.

Χαρακτηριστικά, αυτή η προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί στην μορφοποίηση εμπορικού τοπικού πηκτώματος άλατος διαιθυλαμίνης της δικλοφενάκης. Γενικότερα, όμως η χρήση της είναι περιορισμένη λόγω του ότι οποιαδήποτε παραγόμενη βελτίωση παρατηρηθεί είναι μετρίου βαθμού (Barry, 2006).

### 6.1.3 Ευτηκτικά Μίγματα

Η μείωση του σημείου τήξεως μιας ουσίας προς χορήγηση θα προκαλέσει αύξηση της διαλυτότητάς της στο δέρμα και κατ' επέκταση αύξηση διαπερατότητας. Αυτή η ενέργεια μπορεί να επιτευχθεί με την δημιουργία ευτηκτικού μίγματος. Σε ένα απλό δυαδικό ευτηκτικό σύστημα, το ένα συστατικό επάγει την διαδικασία κρυσταλλοποίησης του άλλου σε ορισμένες αναλογίες. Οπότε, το συνολικό σύστημα που προκύπτει έχει χαμηλότερο ΣΤ από τα μεμονωμένα συστατικά.

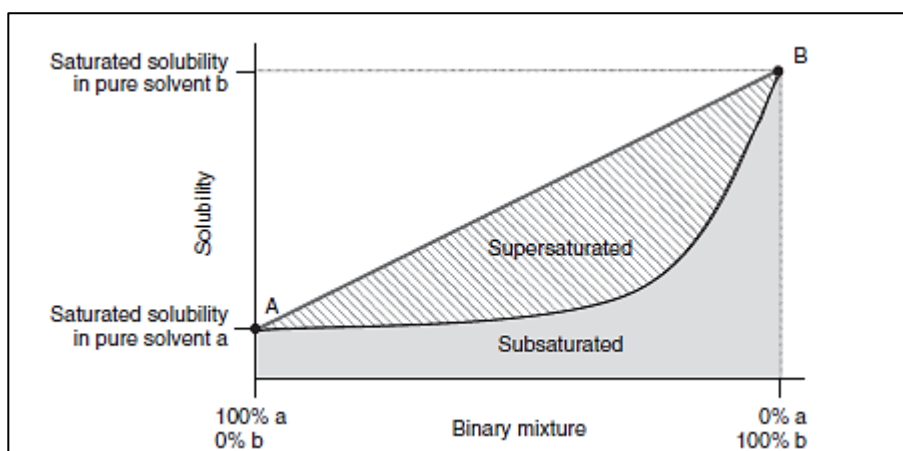


Εικόνα 10: Διάγραμμα φάσεων (Κατσάνος, 1993)

Αυτή η προσέγγιση έχει εφαρμοστεί σε ορισμένα εμπορικά σκευάσματα όπως είναι η αναισθητική κρέμα EMLA<sup>®</sup>, η οποία αποτελείται από το ευτηκτικό μίγμα λιδοκαΐνης-πριλοκαΐνης και έχει αναφερθεί η ενισχυμένη αναισθητική της δράση. Παρόμοιας λογικής μορφοποίηση έχει δημιουργηθεί για την ενίσχυση διαπερατότητας ιβουπροφένης και προπρανολόλης από τους Scott και συνεργάτες. (Barry, 2006)

### 6.1.4 Υπερκορεσμένα Συστήματα

Η ροή μέσω μίας μεμβράνης είναι άμεσα εξαρτώμενη από την θερμοδυναμική δραστηριότητα (ή χημικό δυναμικό) της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας στον εκάστοτε φορέα. Βάσει αυτής της λογικής, ο Higuchi



Εικόνα 11: Διαλυτότητα φαρμάκου σε δυαδικό σύστημα διαλυτών (Lane, 2012)

χρήση υπερκορεσμένων συστημάτων για την ενίσχυση της διαδερμικής χορήγησης.

Ως υπερκορεσμένο χαρακτηρίζεται το σύστημα εκείνο στο οποίο το φαρμακολογικά δραστικό μόριο είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από το όριο διαλυτότητάς του και κατ' επέκταση εμφανίζει μεγαλύτερη απορρόφηση.

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την παρασκευή τέτοιων συστημάτων οι οποίες περιγράφονται εν συντομία παρακάτω:

- *Συστήματα Συνδιαλυτών*: Ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο διαλύτη με την μεγαλύτερη διαλυτότητα, είναι δυνατόν να παρασκευαστεί κορεσμένο ή υπερκορεσμένο διάλυμα, απλά με την προσθήκη διαλύτη μικρότερης διαλυτότητας. Για παράδειγμα, παρασκευάζοντας κορεσμένο διάλυμα στον διαλύτη b, και αραιώνοντας με καθαρό διαλύτη a, υπερκορεσμένα διαλύματα μπορούν να παραχθούν κατά μήκος της γραμμής AB.
- *Απώλεια Διαλύτη*: Μετά την εφαρμογή ενός σκευάσματος, η εξάτμιση οποιωνδήποτε πτητικών συστατικών θα αυξήσει την συγκέντρωση της δραστικής και θα προκύψει υπερκορεσμένο διάλυμα εφ' όσον η ποσότητα του φαρμάκου θα υπερβαίνει την διαλυτότητα στα πτητικά συστατικά. Πλεονέκτημά της είναι η αποφυγή των προβλημάτων σταθερότητας, καθώς το υπερκορεσμένο σύστημα παράγεται *in situ*.
- *Άλλες τεχνικές*: περιλαμβάνονται πιο περίπλοκες τεχνικές όπως θέρμανση/ψύξη και παραγωγή στερεών διασπορών.

Παρόλ' αυτά, επειδή η θερμοδυναμική δραστηριότητα των υπερκορεσμένων μορφοποιήσεων είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των κορεσμένων, είναι εγγενώς ασταθής, γεγονός που αποτρέπει την παραγωγή και αποθήκευση τους για μεγάλο χρονικό διάστημα (Lane, 2012).

### 6.1.5 Χημικοί Επιταχυντές Διαβατότητας

Οι χημικοί επιταχυντές είναι φαρμακολογικά αδρανή συστατικά τα οποία αλληλεπιδρούν με την κεράτινη στιβάδα και μειώνουν προσωρινά την αντίσταση του δέρματος (Lane, 2012) (Barry, 2006). Πολλές ουσίες έχουν ταυτοποιηθεί ως επιταχυντές διαβατότητας, όπως το νερό, σουλφοξείδια και ανάλογά τους, αλκοόλες, επιφανειοδραστικά, πολυόλες, αιθέρια έλαια κλπ, με την ασφάλεια χρήσης τους να αποτελεί την κύρια ανησυχία- γεγονός που περιορίζει την κλινική τους χρήση. Για αυτό το λόγο, οι επιστήμονες κατά την αναζήτηση νέων επιταχυντών διαβατότητας, κατέγραψαν μία λίστα ιδιοτήτων που θα πρέπει να διαθέτει ένας ιδανικός επιταχυντής:

Πίνακας 5: Ιδιότητες ιδανικού επιταχυντή διαβατότητας (Lane, 2012)

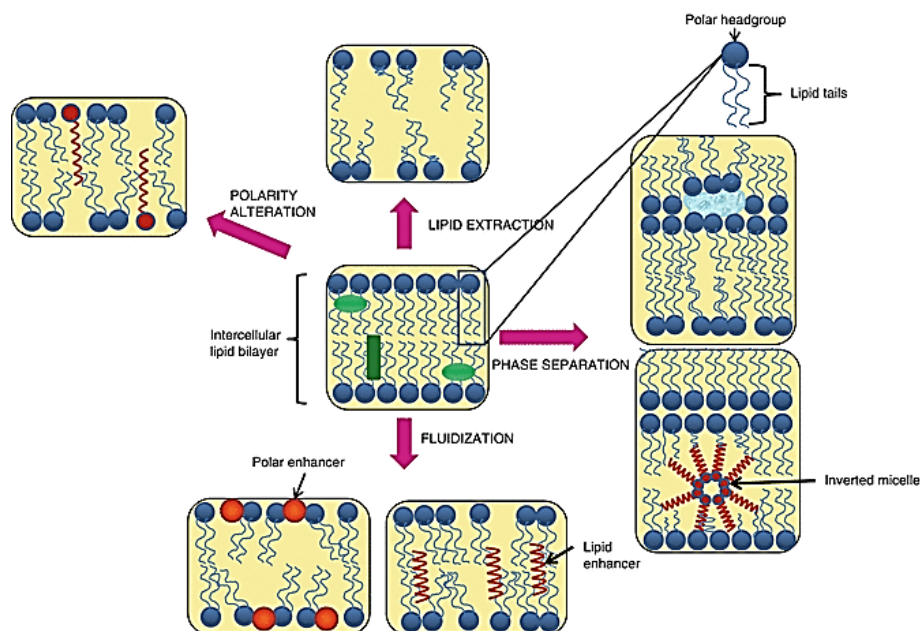
### Ιδανικός Χημικός Επιταχυντής Διαβατότητας

- Φαρμακολογικά αδρανής
- Μη ερεθιστικός, μη αλλεργιογόνος, μη τοξικός
- Μη καταστροφικός στα ζώντα κύτταρα
- Γρήγορη έναρξη και προβλέψιμη διάρκεια δράσης
- Τα αποτελέσματα της δράσης είναι ταχέως και απολύτως αναστρέψιμα με την αφαίρεση
- Δεν προκαλεί απώλεια ενδογενών συστατικών από το δέρμα
- Φυσική και χημική συμβατότητα με δραστικές ουσίες και έκδοχα στην δοσολογική μορφή
- Καλλυντικά αποδεκτός όταν εφαρμόζεται στο δέρμα
- Άσπιμος, χαμηλού κόστους, άγευστος, άχρωμος

Λόγω της ποικιλομορφίας των χαρακτηριστικών τους έχουν προταθεί διάφορα συστήματα κατηγοριοποίησής τους, ορισμένα από τα οποία αναφέρονται στην συνέχεια. Συγκεκριμένα, οι (Lambert, 1993) έχουν ταξινομήσει τους περισσότερους επιταχυντές σε τρεις κύριες τάξεις: σε αυτούς που δρουν ως διαλύτες και δέκτες δεσμού υδρογόνου (πχ διμέθυλοσουλφοξείδιο, DMSO, DMF, διμέθυλοφορμαμίδιο κλπ), στα απλά λιπαρά οξέα και τις αλκοόλες, και στους ασθενείς επιφανειοδραστικούς παράγοντες που περιέχουν πολικές ομάδες μεσαίου μεγέθους (πχ Azone®). Οι (Hori, 1990), κάνοντας χρήση των δεδομένων του Fujita διαμόρφωσαν ένα διάγραμμα απεικόνισης χημικών επιταχυντών στηριζόμενοι στις ανόργανες και οργανικές ιδιότητές τους. Το διάγραμμα αυτό διαθέτει δύο διακριτές περιοχές: η μία περιλαμβάνει συστατικά όπως DMSO, αιθανόλη, προπυλένογλυκόλη, Ν-μέθυλο πυρρολιδόνη και η άλλη αζόνη, ολεϊκό οξύ κλπ, υπονοώντας ότι αυτά τα χημικά μόρια έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Οι Pfister et al τους κατηγοριοποίησαν σε πολικούς και μη πολικούς, σύμφωνα με την παράμετρο διαλυτότητας Hildebrand (Pfister, 1990)

Μία από τις πιο απλές και πλέον χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις ταξινόμησης επιταχυντών διαβατότητας είναι εκείνη που στηρίζεται στη θεωρία Lipid-Protein Partitioning (LPP). Πλεονέκτημα της είναι ότι αποτελεί έναν εύκολο τρόπο τόσο ταξινόμησης των χημικών επιταχυντών όσο και ανάλυσης των διαφόρων τρόπων δράσης τους (Barry, 2006). Κεντρική ιδέα αυτής της θεωρίας είναι ότι οι επιταχυντές συνήθως δρουν μέσω ενός ή συνδυασμού εκ των τριών παρακάτω κύριων μηχανισμών (Barry, 1991).

- Τροποποίηση Λιπιδίων: επιταχυντές που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία (πχ αζόνη και παράγωγα, τερπένια, λιπαρά οξέα, αλκοόλες, DMSO) διαταράσσουν την οργάνωση των λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα, καθιστώντας την πιο διαπερατή και αυξάνοντας τον συντελεστή διάχυσης της ουσίας. Θεωρείται ότι αλληλεπιδρούν με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες σε τρεις κύριες περιοχές:



**Εικόνα 12:** Πιθανοί μηχανισμοί επίδρασης χημικών επιταχυντών στη λιπιδική διπλοστιβάδα (Dragicevic, 2015)

- i. Αλληλεπίδραση με τις πολικές κεφαλές των λιπιδικών ομάδων (πχ Azone<sup>®</sup>): λόγω της δημιουργίας δεσμών H ή/και μέσω ιονικών δυνάμεων διαταράσσουν την δόμηση των διπλοστιβάδων στις πολικές περιοχές, προκαλώντας την ρευστοποίηση των μεμβρανών και την αύξηση του όγκου του νερού μεταξύ των λιπιδικών στρωμάτων.
  - ii. Αλληλεπίδραση στους υδάτινους τομείς των λιπιδικών διπλοστιβάδων (πχ προπυλενογλυκόλη, αιθανόλη, Transcutol<sup>®</sup>, N-μέθυλο πυρρολιδόνη): αυτοί οι διαλύτες αλλάζουν την παράμετρο διαλυτότητας του δέρματος ώστε να προσεγγίζει αυτή της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας.
  - iii. Αλληλεπίδραση με τις αλκυλικές αλυσίδες των λιπιδίων (επιταχυντές μακράς αλυσίδας και μειωμένης πολικότητας όπως ολεϊκό οξύ, isopropyl myristate κλπ): διαταράσσουν την οργάνωση των λιπιδίων προκαλώντας ρευστοποίηση της μεμβράνης.
- Τροποποίηση Πρωτεϊνών: Ένας άλλος τρόπος δράσης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με την κερατίνη των κερατινοκυττάρων, προκαλώντας την μετουσίωση της πρωτεϊνικής δομής της στον χώρο και την διαταραχή της οργάνωσης των λιπιδίων. Αποτελεί δευτερευούσης σημασίας στόχο, καθώς η ενδοκυτταρική οδός απορρόφησης λαμβάνει χώρα σε μικρότερο ποσοστό.
  - Βελτίωση Κατανομής: Ορισμένοι διαλύτες (πχ προπυλενογλυκόλη, αιθανόλη, Transcutol<sup>®</sup>, N-μέθυλο πυρρολιδόνη) μπορούν να διεισδύσουν στην ΚΣ και να αλλάξουν τις χημικές της ιδιότητες. Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί την αύξηση της διαλυτότητας του φαρμάκου στην ΚΣ άρα και του συντελεστή κατανομής του (Dragicevic, 2015).

### 6.1.6 Ενυδάτωση

Το πλέον άφθονο στην φύση υδρόφιλο συστατικό, το οποίο είναι γνωστό ότι ενισχύει την διαπερατότητα τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων φαρμακολογικά δραστικών ουσιών από την κεράτινη στιβάδα, είναι το νερό. Ως ενδογενές συστατικό της

κεράτινης στιβάδας σε ποσοστό 15-20% ξηρού βάρους του ιστού, χρησιμοποιήθηκε για να επιτευχθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας στο σημείο δράσης (Dragicevic, 2015). Παράγοντες ενυδάτωσης, υμένα και διαδερμικά συστήματα που προκαλούν εγκλεισμό, μαζί με αλοιφές υδρόφοβης βάσης, ενισχύουν την διαπερατότητα μέσω διαταραχής της συμπαγούς δομής της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Barry, 2006).

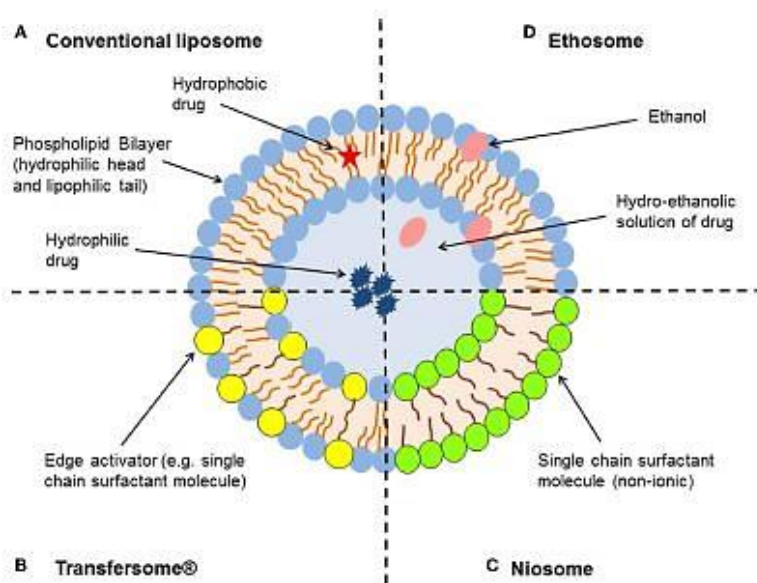
#### 6.1.7 Λιποσώματα και ανάλογα

Τα λιποσώματα είναι επιστημονικώς αποδεκτά λιπιδικά κυστίδια, νανο-μεγέθους, τα οποία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στην τοπική χορήγηση φαρμακολογικά δραστικών ουσιών. Σχηματίζονται από μία ή πολλαπλές λιπιδικές διπλοστιβάδες οι οποίες εγκλείουν στο εσωτερικό των κυστιδίων την υδατική φάση. Τα λιποσώματα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα ως φορείς της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας-για παράδειγμα είναι βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και ικανά να ενκαψυλιώσουν τόσο υδατοδιαλυτά όσο και λιποδιαλυτά συστατικά.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα προαναφερθέντα συστήματα αποδεσμεύουν την δραστική ουσία δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, προτείνονται οι παρακάτω τέσσερις μηχανισμοί: αέρας μεταφορά των φορτωμένων με δραστική ουσία κυστιδίων στα διάφορα στρώματα του δέρματος (I), δράση των λιποσωμάτων ως επιταχυντές διαβατότητας μέσω της ικανότητάς ρευστοποίησης των μεμβρανών (II), ανταλλαγή δραστικής ουσίας μεταξύ φορέα-δέρματος μέσω σύντηξης της λιπιδικής διπλοστιβάδας που περιέχει την ουσία με την επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (III), και απορρόφηση μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος (τριχοθυλάκια και σμηγματογόνοι αδένες). Γενικά, ο μηχανισμός/ή οι μηχανισμοί που θα λάβουν χώρα, εξαρτώνται από την μορφοποίηση και ιδίως από την σύνθεση και το μέγεθος των σωματιδίων. Σωματίδια μεγέθους  $\leq 300$  nm επιτυγχάνουν ορισμένου βαθμού αποδέσμευση του περιεχομένου τους στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος, με τις μέγιστες τιμές να επιτυγχάνονται για μεγέθη σωματιδίων  $\leq 70$  nm. Η πλειονότητα, πάντως των τοπικά εφαρμοζόμενων λιποσωμάτων θα συσσωρευτεί στα ανώτερα στρώματα της κεράτινης στιβάδας και θα λειτουργήσουν περισσότερο ως “δεξαμενή” επιτυγχάνοντας κυρίως τοπική δράση.

Με απώτερο σκοπό την περαιτέρω ενίσχυση της διαπερατότητας των ενκαψυλιωμένων μορίων, αλλαγές στην σύσταση και την δομή των συμβατικών λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν οι παρακάτω νέοι τύποι:

- *Νιοσώματα*: κυστίδια αποτελούμενα από μη ιονικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες μονής αλυσίδας σε συνδυασμό με χοληστερόλη. Έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν την δομή της κεράτινης στιβάδας λόγω των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων τους, καθιστώντας την κατ' επέκταση πιο "χαλαρή" και διαπερατή.
- *Τρανσφεροσώματα*: Θεωρούνται ως η πρώτη γενιά των λιποσωμάτων που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευκαμπτότητα ή δυνατότητα παραμόρφωσης. Αποτελούν έναν καινοτόμο τύπο κυστιδίων υγρής κατάστασης που η σύσταση τους περιλαμβάνει φωσφολιπίδια και έναν ενεργοποιητή (edge activator), ο οποίος είναι συνήθως κάποιος επιφανειοδραστικός παράγοντας μονής



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων τύπων λιποσωμάτων (Hua, 2015)

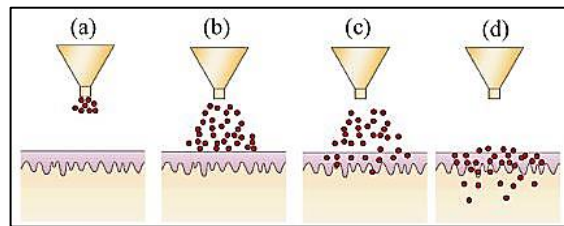
αλυσίδας (πχ Span 60/65/80, Tween 20/60/80 κλπ). Ο ενεργοποιητής δρα αποσταθεροποιώντας τις λιπιδικές διπλοστιβάδες και αυξάνοντας την παραμόρφωσή τους με μείωση της επιφανειακής τάσης.

- *Αιθοσώματα*: Το σύστημα των αιθοσωμάτων αποτελείται από φωσφολιπίδια, σχετικά υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (20-50%) και νερό. Η εισαγωγή υψηλού ποσοστού αιθανόλης όχι μόνο δεν καταστρέφει την κυστιδιακή δομή, αλλά επιτρέπει τον σχηματισμό σωματιδίων υψηλής ρευστότητας. Κατά αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η διαπέραση τους στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος και αυξάνεται η απορρόφηση (Hua, 2015).

### 6.1.8 Σωματίδια Υψηλής Ταχύτητας

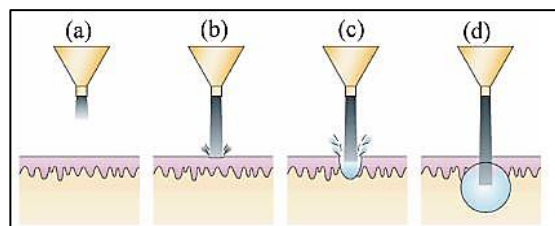
Η χορήγηση σωματιδίων υψηλής ταχύτητας πραγματοποιείται μέσω δύο συστημάτων:

- Με τους Εγχυτήρες Ψεκασμού Κόνεως (Powder jet injectors) για την χορήγηση εμβολίων ή φαρμακολογικά δραστικών ουσιών υπό μορφή ξηράς κόνεως στα επιφανειακά στρώματα του δέρματος. Ο βασικός μηχανισμός της συσκευής περιλαμβάνει κάποιο πεπιεσμένο αέριο ως πηγή ισχύος (συνήθως ήλιο), το διαμέρισμα της δραστικής που περιέχει την μορφοποίηση και ένα ακροφύσιο για να κατευθύνει την σωματιδιακή ροή.



Εικόνα 15: Απεικόνιση εγχυτήρα ψεκασμού κόνεως (Arora, 2008)

- Με τους Εγχυτήρες Ψεκασμού Υγρών (Liquid jet injectors), στους οποίους χρησιμοποιείται ψεκασμός υψηλής ταχύτητας για την ρήξη του δέρματος και την χορήγηση υγρών χωρίς την χρήση βελόνας. Ο βασικός μηχανισμός της συσκευής προσομοιάζει αυτόν που περιγράφηκε προηγουμένως, δηλαδή αποτελείται από μία πηγή ισχύος (πεπιεσμένο αέριο ή ελατήριο), το διαμέρισμα της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας και ένα ακροφύσιο τυπικής διαμέτρου 150-300  $\mu\text{m}$  (Arora, 2008).



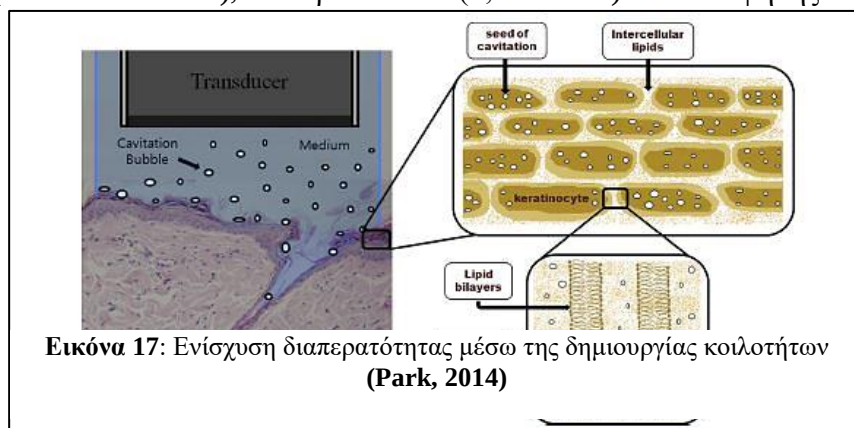
Εικόνα 16: Απεικόνιση εγχυτήρα ψεκασμού υγρών (Arora, 2008)

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου-πχ απαλλαγή από τον πόνο και την φοβία βελόνων, βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και βιοδιαθεσιμότητα, στόχευση ελεγχόμενη αποδέσμευση, ακρίβεια στην δοσολογία και ασφάλεια-έχουν αναφερθεί προβλήματα με μώλωπες και σωματίδια που αναπηδούν στην επιφάνεια του δέρματος. Οι ρυθμιστικές αρχές έχουν ανησυχίες σχετικά με την βλάβη που προκαλείται από την διείσδυση των σωματιδίων υψηλής ταχύτητας στην κεράτινη στιβάδα και την διευκόλυνση της εισόδου εξωτερικών παραγόντων όπως είναι τα βακτήρια στους ζώντες ιστούς (Barry, 2006).

## 6.2 Ενεργητικές

### 6.2.1 Υπέρηχοι (Phonophoresis, Sonophoresis)

Η χρήση υπερήχων για την ενισχυμένη χορήγηση ΦΔΟ διαμέσου του δέρματος αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην θεραπεία ενός τύπου πολυαρθρίτιδας το 1954. Οι υπέρηχοι είναι ηχητικά κύματα με συχνότητα μεγαλύτερη των 20kHz-το ανώτατο όριο της ανθρώπινης ακοής, άρα δεν γίνονται αντιληπτά από τον άνθρωπο. Διακρίνονται ανάλογα με την περιοχή των συχνοτήτων σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα χαμηλής συχνότητας (LFS: 20-100kHz), τα θεραπευτικά (0,7-3 MHz) και τα υψηλής συχνότητας (HFS: >3MHz). Η πρώτη και η τελευταία κατηγορία έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της διαπερατότητας του δέρματος. Αρχικά, οι ερευνητικές ομάδες είχαν επικεντρωθεί στους υπερήχους υψηλής



**Εικόνα 17:** Ενίσχυση διαπερατότητας μέσω της δημιουργίας κοιλοτήτων (Park, 2014)

συχνότητας, οι οποίοι όμως στην συνέχεια αντικαταστάθηκαν από τους χαμηλής συχνότητας λόγω του ότι το βάθος διαπέρασης είναι αντιστρόφως ανάλογο της συχνότητας, περιορίζοντας κατ' επέκταση την δράση των κυμάτων υψηλής συχνότητας στα ανώτερα στρώματα της κεράτινης στιβάδας.

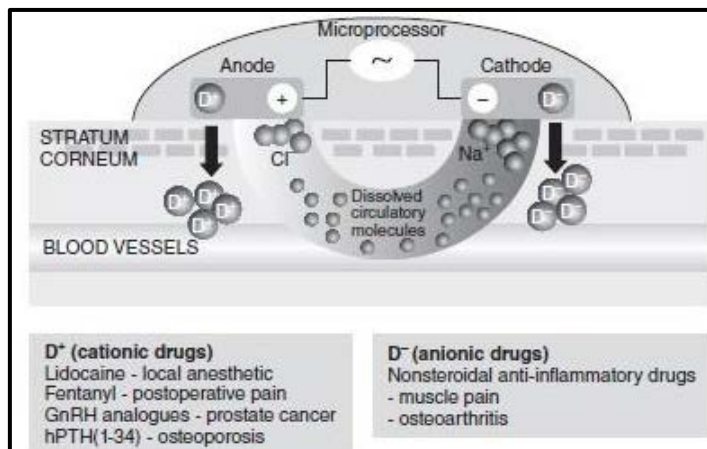
Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ενισχύεται η διαπερατότητα περιλαμβάνουν θερμικές επιδράσεις (thermal effects), δυνάμεις ακτινοβολίας (radiation forces), μεταφορά (convection) και ακουστική δημιουργία κοιλοτήτων (acoustic cavitation) (Oberli, 2014). Η τελευταία μέθοδος, που είναι και η κυριότερη, διαταράσσει την “πακεταρισμένη” δομή των λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα, μέσω της δημιουργίας φυσαλίδων. Συγκεκριμένα, όταν εφαρμοστεί δύναμη μεγαλύτερη της επιφανειακής τάσης σε ένα υγρό, τότε σε αυτό σχηματίζονται φυσαλίδες, με μέγεθος αντιστρόφως ανάλογο της αρχικής συχνότητας που προκάλεσε την δύναμη. Στην συνέχεια, οι φυσαλίδες αυτές εκρήγνυνται με βίαιο τρόπο δημιουργώντας ροές υγρού οι οποίες διαβρώνουν τα νεκρά κύτταρα της ΚΣ και δημιουργούν ελεύθερο χώρο για την απορρόφηση (Oberli, 2014).

Συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους ενίσχυσης όπως είναι οι χημικοί επιταχυντές, ιοντοφόρηση, ηλεκτροφόρηση κλπ και φαίνεται να επιτυγχάνουν ενίσχυση της διαπερατότητας μέχρι και χίλιες φορές (Barry, 2006).

## 6.2.2 Ιοντοφόρηση

Η ιοντοφόρηση χρησιμοποιεί συνεχές ρεύμα χαμηλής εντάσεως (περίπου  $0,5 \text{ mA/cm}^2$ ) για την διαπέραση ιονικών μορίων μέσω μεμβρανών αποτελώντας μια μη επεμβατική μέθοδο ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για υδατοδιαλυτά ιονικά

φάρμακα όπως είναι τα πεπτίδια, τα οποία εμφανίζουν πολύ περιορισμένη διαπερατότητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Grice, 2012).



**Εικόνα 18:** Μηχανισμός ενίσχυσης διαπερατότητας με εφαρμογή ιοντοφόρησης (Kalaria, 2012)

Τρεις είναι οι κύριοι μηχανισμοί που προωθούν την είσοδο της ΦΔΟ:

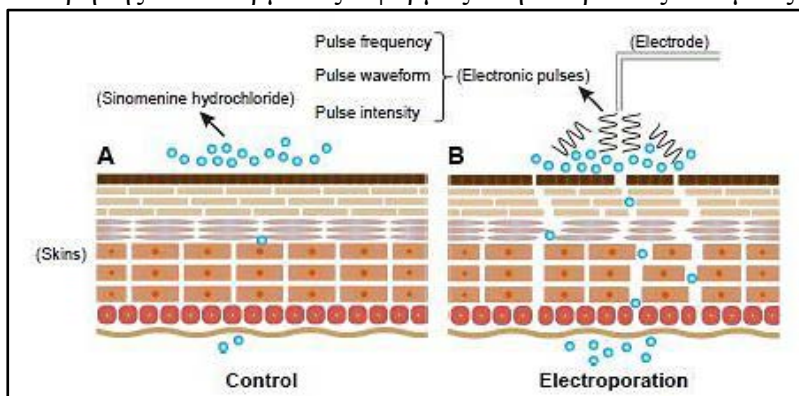
- *Ηλεκτρομετακίνηση (electric migration)*: όταν διαφορά δυναμικού εφαρμόζεται κατά μήκος μίας μεμβράνης, όπως το δέρμα, τα διαλελυμένα ιόντα μετακινούνται ανάλογα με το φορτίο τους. Δηλαδή, τα κατιόντα κινούνται από την άνοδο στην κάθοδο, ενώ τα ανιόντα προς την αντίθετη κατεύθυνση (Abla, 2006).
- Αύξηση διαπερατότητας του δέρματος με την επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος λόγω αποδιοργάνωσης των λιπιδικών στρωμάτων (Grice, 2012).
- *Ηλεκτρική όσμωση (electroosmosis)*: Μηχανισμός υπεύθυνος για την μεταφορά νερού από την άνοδο, καθώς και μη φορτισμένων σωματιδίων και μεγάλων πολικών πεπτιδίων. Σε φυσιολογικό pH, το δέρμα (με ισοηλεκτρικό σημείο γύρω στο 4 με 4,5) διαθέτει αρνητικό φορτίο. Κατ' επέκταση δρα σαν μία μεμβράνη ανταλλαγής ιόντων, με εκλεκτικότητα προς τα κατιόντα. Ως αποτέλεσμα, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, δημιουργείται συνεχής ροή διαλύτη από την άνοδο προς την κάθοδο. Κατά αυτόν τον τρόπο, ουδέτερα διαλυμένα μόρια στον διαλύτη μπορούν να μεταφερθούν από την άνοδο προς το σώμα και από το σώμα προς την κάθοδο.

Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς εξαρτάται κυρίως από την πολικότητα, το σθένος και την κινητικότητα των φορτισμένων μορίων, καθώς και από τους ηλεκτρικούς κύκλους λειτουργίας και τα συστατικά της μορφοποίησης.

Μία συσκευή λιδοκαΐνης-αδρεναλίνης για τοπική αναισθησία είναι τώρα διαθέσιμη (Vyteris) και γίνονται ερευνητικές μελέτες για την ανάπτυξη διαδερμικών συστημάτων που χρησιμοποιούν αυτή την τεχνική, όπως η τεχνολογία E-Trans® (Abla, 2006).

### 6.2.3 Ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης του δέρματος εφαρμόζει ηλεκτρικούς παλμούς τάσης περίπου 100 με 1000 V/cm για μικρά χρονικά διαστήματα (micro to millisecond), με απώτερο σκοπό την δημιουργία διαπερατών υδάτινων πόρων στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Αυτοί οι πόροι δημιουργούνται κατά μήκος της κεράτινης στιβάδας, παρέχοντας νέες διόδους για την απορρόφηση της ΦΔΟ. Μεταξύ των παλμών, η απλή διάχυση είναι υπεύθυνη για την επιπρόσθετη κινητικότητα των μορίων προς το εσωτερικό λόγω των σχετικά μόνιμων αλλαγών που συμβαίνουν και μειώνουν την διαπερατότητα της κεράτινης στιβάδας.



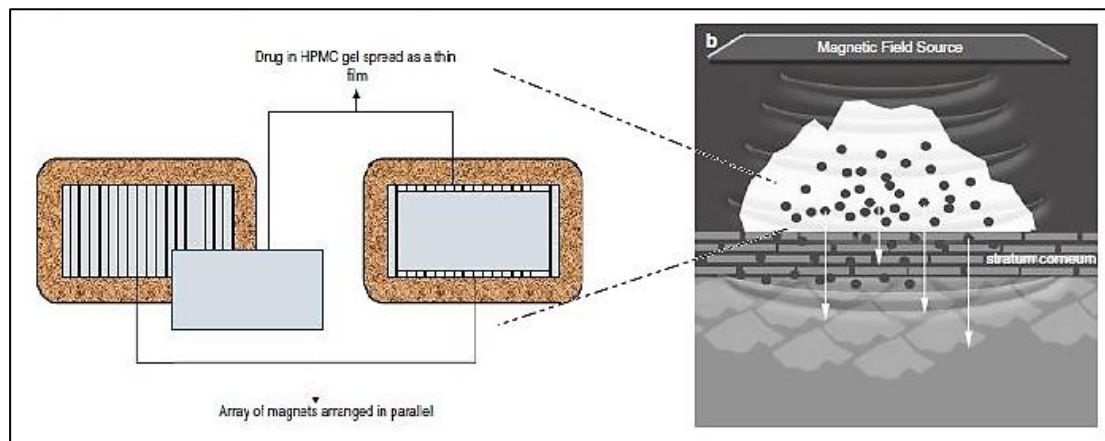
Εικόνα 19: Ενίσχυση διαπερατότητας μέσω ηλεκτροδιάτρησης (Feng, 2017)

Η αύξηση της ροής είναι της τάξης 10 έως και 10000 φορές πάνω για ουδέτερα και ιονισμένα μόρια μοριακού βάρους κάτω των 40kDa. Αποτελεί κατάλληλη τεχνική για την χορήγηση εμβολίων, λιποσωμάτων, νανοσωματιδίων και μικροσφαιριδίων. Τα μόρια που απορροφώνται σταθεροποιούν επίσης στερεοχημικά τους πόρους, ενισχύοντας κατά αυτόν τον τρόπο περαιτέρω την ροή.

Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί in vivo φαίνεται να είναι καλά αποδεκτή, αν και η όλη διαδικασία δείχνει να επάγει τις μυϊκές συσπάσεις (Barry, 2006).

### 6.2.4 Μαγνητοφόρηση

Η μέθοδος της μαγνητοφόρησης χρησιμοποιεί, για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης, μαγνητικό πεδίο (5 με 300 mT) στο οποίο διαμαγνητικές ΦΔΟ, όπως είναι η λιδοκαΐνη, απωθούνται από αυτό και διεισδύουν στο δέρμα. Η αύξηση της



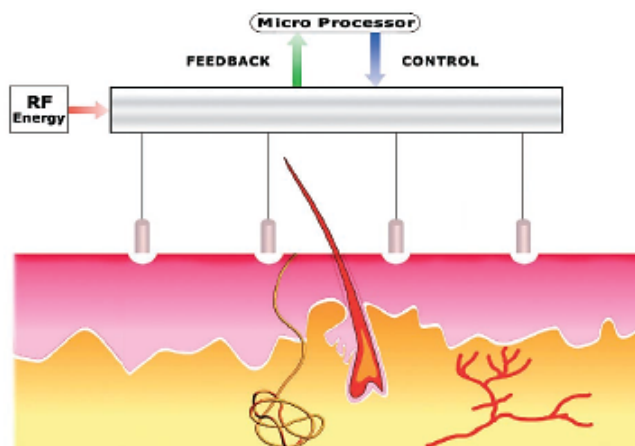
Εικόνα 20: Ενίσχυση διαπερατότητας μέσω μαγνητοφόρησης (Maurya, 2015)

δύναμης του μαγνητικού πεδίου είναι εκείνη που καθορίζει και την αύξηση της διαπερατότητας του εκάστοτε φαρμάκου.

Αντίθετα με την ιοντοφόρηση και τις υπόλοιπες ηλεκτρικά υποβοηθούμενες τεχνικές, η μαγνητοφόρηση βασίζεται στην μαγνητική κίνηση και όχι στην αλλαγή των ιδιοτήτων φραγμού της κεράτινης στιβάδας. Η μαγνητική κίνηση προωθεί την διείσδυση της ΦΔΟ μέσω δύο επιμέρους μηχανισμών: της μαγνητικής άπωσης (magnetic repulsion) και της μαγνητικής υδροκίνησης (magnetichydrokinesis). Η μαγνητική άπωση λαμβάνει χώρα όταν τα μόρια των διαμαγνητικών ΦΔΟ απωθούνται από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο προς τα βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Η μαγνητική υδροκίνηση μεσολαβεί στην μεταφορά φαρμάκων με την κίνηση νερού/διαλύτη διαμέσου του δερματικού φραγμού, παρομοίως με την ηλεκτρική όσμωση στην ιοντοφόρηση. Η τελευταία είναι πιο εμφανής όταν εφαρμόζεται μεγαλύτερη δύναμη μαγνητικού πεδίου ή το διάλυμα στο διαμέρισμα του δότη είναι μεγαλύτερης συγκεντρώσεως (Wong, 2014).

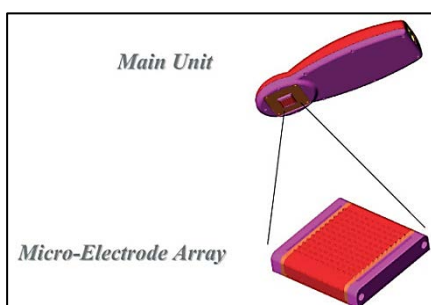
### 6.2.5 Ραδιοκύματα

Η μεθοδολογία των ραδιοκυμάτων βασίζεται στην δημιουργία μικροδιαύλων που εκτείνονται κατά μήκος της ζώσας επιδερμίδας μέσω απομάκρυνσης κυττάρων του δέρματος. Το υψηλής συχνότητας ηλεκτρικό ρεύμα που μεταδίδεται μέσω του υδατικού μέσου της κεράτινης στιβάδας εκλύει θερμότητα η οποία επιφέρει στιγμιαία αφαίρεση των κυττάρων κάτω από το ηλεκτρόδιο. Λόγω της μεγάλης ταχύτητας (1 ms ανά ηλεκτρόδιο), θεωρείται ότι μόνο η έκλυση θερμότητας είναι υπεύθυνη για την δημιουργία των διαύλων αυτών, ενώ άλλοι μηχανισμοί όπως ηλεκτροχημικές αντιδράσεις δεν λαμβάνουν χώρα.



Εικόνα 21: Ενίσχυση διαπερατότητας μέσω ραδιοκυμάτων (Sintova, 2003)

Η αρχή λειτουργίας της διάταξης των ραδιοκυμάτων που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης φαίνεται στην διπλανή εικόνα. Όπως απεικονίζεται, μία διάταξη από στενά διατεταγμένα ηλεκτρόδια μικρού μεγέθους τοποθετείται στην επιφάνεια του δέρματος καθώς εναλλασσόμενο ρεύμα ράδιο συχνότητας (100 – 500 kHz) εφαρμόζεται σε καθένα από τα μικροηλεκτρόδια. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μικροί διάυλοι στα



Εικόνα 22: Απεικόνιση συσκευής ViaDerm® (Sintova, 2003)

εξωτερικά στρώματα του δέρματος που δεν υπάρχουν αγγεία του αίματος ή νευρικές

απολήξεις, ελαχιστοποιώντας τους τραυματισμούς τους δέρματος και την διέγερση των νευρικών υποδοχέων (Sintova, 2003).

Η πρώτη συσκευή στην οποία εφαρμόστηκε αυτή η τεχνική για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης είναι η ViaDerm® Transpharma Ltd, Israel της οποίας η διάταξη αποδίδεται στην εικόνα (Sintova, 2003) :

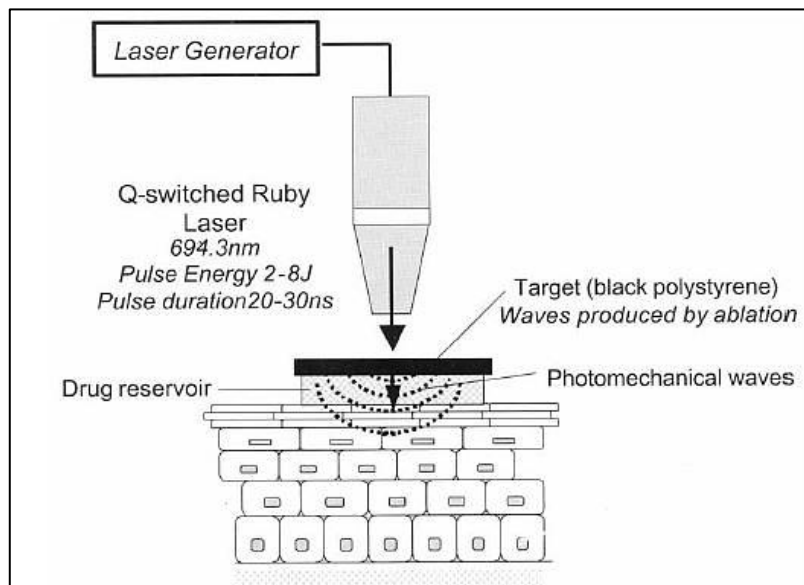
### 6.2.6 Φωτομηχανικά Κύματα

Τα φωτομηχανικά κύματα (επίσης γνωστά ως λέιζερ-επαγόμενα κύματα) είναι παλμοί πίεσης παραγόμενοι από την επίδραση δέσμης λέιζερ σε ένα υλικό στόχο (πχ πολυστυρένιο). Παρόλο που η συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν έχει λάβει ευρεία

αναγνώριση στην επιστημονική κοινότητα, μία ερευνητική ομάδα κατέγραψε την ικανότητα των φωτομηχανικών κυμάτων να καθιστούν την κεράτινη στιβάδα πιο διαπερατή σε μακρομόρια για μικρό χρονικό διάστημα (διάρκειας λεπτών). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυξάνεται η διαπερατότητα δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένος.

Μικροσκοπικές μελέτες έχουν υποδείξει ότι

διαφορές στο σύστημα lacunar (σύστημα κενών χώρων) είναι εμφανείς μετά την έκθεση της ανθρώπινης κεράτινης στιβάδας στα φωτομηχανικά κύματα καθώς και η επέκταση αυτού του συστήματος είναι υπεύθυνη για την δημιουργία διαπερατών καναλιών κατά μήκος της κεράτινης στιβάδας (Cross, 2004).



Εικόνα 23: Ενίσχυση διαπερατότητας μέσω φωτομηχανικών κυμάτων (Cross, 2004)

### 6.2.7 Εκτομή Κεράτινης Στιβάδας

Ο κύριος φραγμός που παρεμποδίζει την διαδερμική απορρόφηση, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, είναι η κεράτινη στιβάδα. Οπότε, ένας απλός τρόπος ενίσχυσης της διαπερατότητας θα μπορούσε να είναι η αφαίρεση της. Αυτό έχει επιτευχθεί με μία σειρά τεχνικών: τους χημικούς παράγοντες απολέπισης (chemical peels) που λειτουργούν σε διαφορετικά στρώματα του δέρματος ανάλογα με την δραστικότητα τους, την δερμοαπόξεση (dermabrasion) η οποία χρησιμοποιεί μία κυλινδρική συσκευή λείανσης και τέλος την μικροδερμοαπόξεση στην οποία γίνεται χρήση ρεύματος κρυστάλλων οξειδίου του αργιλίου. Μια νέα εξέλιξη της τελευταίας

τεχνικής (ορίζεται ως microscission) προωθεί τους κρυστάλλους οξειδίου του αργιλίου με την βοήθεια ρεύματος αζώτου προς την κεράτινη στιβάδα μέσω μίας μάσκας, προς σχηματισμό μικροκοιλοτήτων διαμέτρου 100 με 250  $\mu\text{m}$  και βάθους 50 με 200  $\mu\text{m}$ . Μια μάλλον διαφορετική προσέγγιση υιοθετεί υψηλής συχνότητας λέιζερ παλμούς για την εξάτμιση τμημάτων της κεράτινης στιβάδας, σχηματίζοντας διαπερατές περιοχές.

Η εφαρμογή κολλητικής ταινίας μπορεί να αφαιρέσει την κεράτινη στιβάδα πριν την εφαρμογή του φαρμάκου. Η ίδια μεθοδολογία χρησιμοποιείται πλέον ευρέως και για την αξιολόγηση της βιοδιαθεσιμότητας μέσω της μέτρησης της ποσότητας του φαρμάκου στο δέρμα (Barry, 2006).

#### 6.2.8 Διάταξη Μικροβελόνων

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία ενίσχυσης της διαπερατότητας έχει μελετηθεί στην παρούσα διπλωματική εργασία και θα αναλυθεί εκτεταμένα στο επόμενο κεφάλαιο.

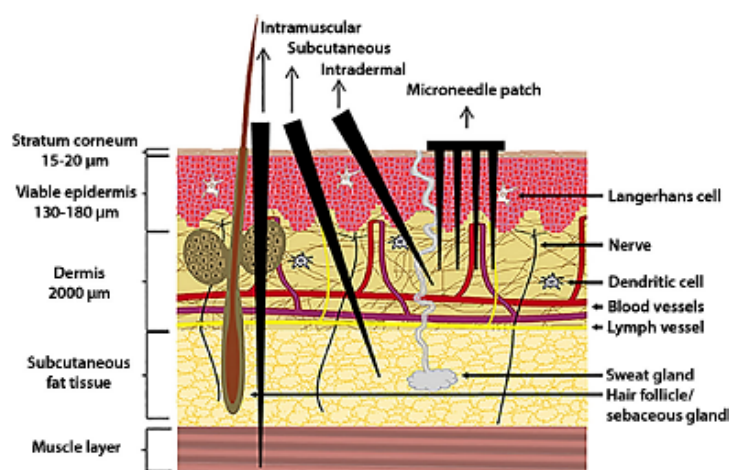


## 7. Μικροβελόνες Για Διαδερμική Χορήγηση

### 7.1 Εισαγωγή

Τα περισσότερα από τα εμβόλια και βιοφαρμακευτικά θεραπευτικά συστήματα εγχύονται στον οργανισμό με την χρήση υποδόριων βελόνων. Οι ενέσιμες μορφές παρέχουν μία χαμηλού κόστους, ταχεία και άμεση οδό για την χορήγηση σχεδόν οποιουδήποτε φαρμακευτικού μορίου στον οργανισμό. Παρόλ' αυτά, οι υποδόριες βελόνες δεν είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν από τους ίδιους τους ασθενείς και ως εκ τούτου η χρήση τους γίνεται είτε στο χώρο κάποιας κλινικής είτε στην οικία τους, αφού όμως έχουν λάβει προηγουμένως ειδική εκπαίδευση σχετικά με την σωστή εφαρμογή της εκάστοτε μορφής, την ασφαλή απόρριψη των βελόνων και την διαχείριση λοιπών ζητημάτων (Giudice, 2008). Η συμμόρφωση των ασθενών περιορίζεται ακόμα περισσότερο από τον πόνο και την φοβία των βελόνων (Nir, 2003). Ακόμα, η μετάδοση αιματογενώς μεταδιδόμενων νοσημάτων από την επαναχρησιμοποίηση των βελόνων αποτελεί ένα επιπλέον αντικείμενο ανησυχίας, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (Kermode, 2004). Η χορήγηση δια του στόματος υπερνικά τα περισσότερα από αυτά τα προβλήματα, αλλά πολλά φαρμακευτικά μόρια δεν μπορούν να χορηγηθούν μέσω αυτής της οδού λόγω φτωχής απορρόφησης και του μεταβολισμού στον γαστρεντερικό αυλό και το ήπαρ (Singh, 2008). Άλλες οδοί έχουν επίσης διερευνηθεί, αλλά καμία από αυτές δεν προσφέρει την ευρεία αποτελεσματικότητα της άμεσης έγχυσης του φαρμάκου με την χρήση βελόνας (Kim, 2012).

Οπότε αντί να αποφύγουμε την χρήση βελόνων, έχει προταθεί η σμίκρυνση τους στην κλίμακα μικρο (μm) με απώτερο στόχο την αξιοποίηση των ισχυρών δυνατοτήτων που εμφανίζουν στην διαδερμική χορήγηση, βελτιώνοντας όμως παράλληλα την συμμόρφωση των ασθενών στην θεραπεία και την ασφάλεια τους. Ως μια συσκευή μικροκλίμακας, η μικροβελόνα θα πρέπει να είναι επαρκώς μεγάλη για την χορήγηση



Εικόνα 25: Απεικόνιση εφαρμογής διαφόρων τύπων βελόνων και μικροβελόνων στο δέρμα (Leone, 2017)

οποιοδήποτε φαρμάκου ή μορφοποίησης με μικρό σωματιδιακό περιεχόμενο, αλλά ταυτοχρόνως να είναι αρκετά μικρή για την αποτροπή πρόκλησης πόνου, φόβου και την ανάγκη ειδικής εκπαίδευσης για την πραγματοποίηση της χορήγησης. Επιπροσθέτως, η μικροβελόνα επιτρέπει την ακριβή στόχευση του ιστού, όπως είναι το δέρμα, ο υπαμφιβληστροειδικός χώρος του οφθαλμού κλπ (Kim, 2012).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, εκτός από τις μικροβελόνες, υπάρχουν διάφορες άλλες μέθοδοι για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης. Οι περισσότερες όμως από αυτές δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την χορήγηση βιοφαρμακευτικών συστημάτων και εμβολίων. Όσες τώρα είναι κατάλληλες για την χορήγηση μακρομοριακών ενώσεων, περιλαμβάνουν στην πλειονότητα των περιπτώσεων την χρήση εξελιγμένων συσκευών οι οποίες είναι σχετικά ογκώδεις, υψηλού κόστους και απαιτούν κάποια ελάχιστη εκπαίδευση για την χρήση τους (Kim, 2012).

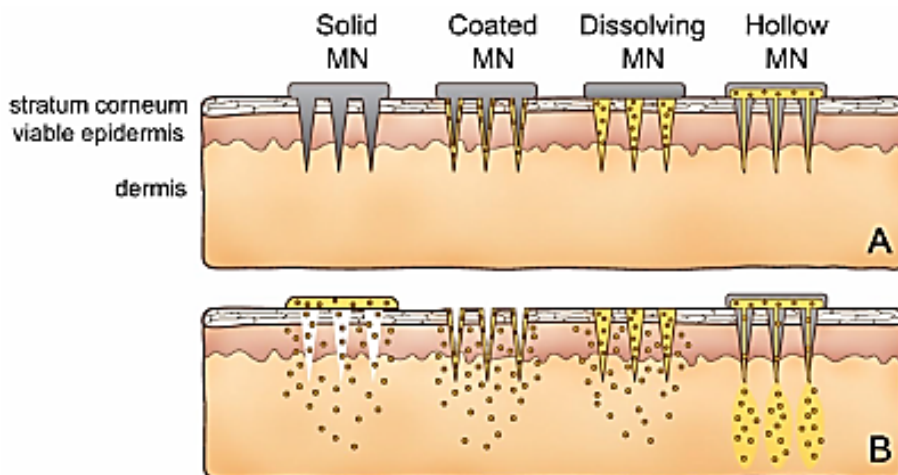
## 7.2 Ιστορικά Στοιχεία

Μεμονωμένες μικρές βελόνες κατασκευάστηκαν χειροποίητα επί πολλές δεκαετίες (Park, 2010) για ερευνητικούς σκοπούς και ήδη από την δεκαετία του 1970 προβλέφθηκε η χρήση διατάξεων μικροβελόνων ως μέσο διαδερμικής χορήγησης (Gerstel, 1976). Ωστόσο, μέχρι και τα μέσα της δεκαετίας του 1990 η βιομηχανία μικροηλεκτρονικής δεν είχε βρει τα απαιτούμενα εργαλεία κατασκευής σε μικρο κλίμακα ώστε να καταστήσει τις μικροβελόνες ικανές προς χρήση για εφαρμογές στον τομέα της φαρμακευτικής (Madou, 2011). Παρά τις προσπάθειες εκείνης της εποχής, κυρίως εκ μέρους τριών διαφορετικών οργανισμών (Becton Dickinson (BD), Alza Corporation και Georgia Institute of Technology), οι περισσότερες από τις μικροβελόνες που παρασκευάστηκαν δεν χρησιμοποιήθηκαν τελικά για την χορήγηση ΦΔΟ, αλλά μάλλον ως πρότυπα δείγματα για την βελτίωση των διεργασιών μικροκατασκευής. Επίσης, η επιστημονική κοινότητα με αντικείμενο την βελτίωση της χορήγησης ΦΔΟ εξοικειώθηκε με τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μικροσυσκευών μετά την είσοδο του νέου αιώνα, γεγονός που καθυστέρησε ακόμα περισσότερο την περαιτέρω ανάπτυξη τέτοιων θεραπευτικών συστημάτων.

Σήμερα, το συγκριμένο πεδίο βρίσκεται σε ένα σημαντικό μεταβατικό σημείο. Έχει ωριμάσει αρκετά ώστε να παρασκευάζονται συστήματα μικροβελόνων σε δεκάδες βιομηχανίες και ερευνητικά εργαστήρια. Παράλληλα πολυάριθμες εφαρμογές έχουν αναδειχθεί με *in vitro* μελέτες και *in vivo* πειράματα σε ζώα, ενώ κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους είναι υπό εξέλιξη (Kim, 2012).

### 7.3 Κατηγορίες Μικροβελόνων

Η κατάταξη των μικροβελόνων γίνεται βάσει του μηχανισμού με τον οποίον ενισχύουν την διαδερμική απορρόφηση και ανάλογα με αυτόν επιλέγεται και το υλικό από το οποίο θα κατασκευαστούν. Οπότε, διακρίνονται στις εξής τέσσερις κατηγορίες (Kim, 2012):



Εικόνα 26: Κατηγορίες μικροβελόνων (Kim, 2012)

- Στερεές μικροβελόνες (solid microneedles) για την προ-επεξεργασία του ιστού. Μετά την εισαγωγή και αφαίρεση τους προς δημιουργία πόρων μικροκλίμακας στην επιφάνεια του δέρματος, εφαρμόζεται η μορφοποίηση στην περιοχή αυτή και η ΦΔΟ διαχέεται με αργό ρυθμό μέσω των πόρων προς το εσωτερικό του δέρματος.
- Οι στερεές μικροβελόνες μπορούν επίσης να επικαλυφθούν με μια ΦΔΟ χρησιμοποιώντας συνήθως μία υδατοδιαλυτή μορφοποίηση (coated microneedles). Μετά την εισαγωγή τους στο δέρμα, η επικάλυψη διαλύεται από τις μικροβελόνες προς το δέρμα και μετέπειτα το όλο σύστημα αφαιρείται από την περιοχή.
- Εναλλακτικά, οι μικροβελόνες μπορεί να είναι κατασκευασμένες πλήρως από υδατοδιαλύτα ή βιοδιασπώμενα πολυμερή τα οποία ενκαψυλιώνουν την ΦΔΟ εσωτερικά της μήτρας του συστήματος των μικροβελόνων. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι μικροβελόνες διαλύονται πλήρως ή διασπώνται στο δέρμα, απελευθερώνοντας έτσι την φορτωμένη δόση ΦΔΟ χωρίς να αφήσουν πίσω υπολείμματα.
- Τέλος, οι κενές μικροβελόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγχυση υγρών μορφοποιήσεων στο δέρμα, ή εναλλακτικά, για την διάχυση μέσω της οπής κάθε βελόνας.

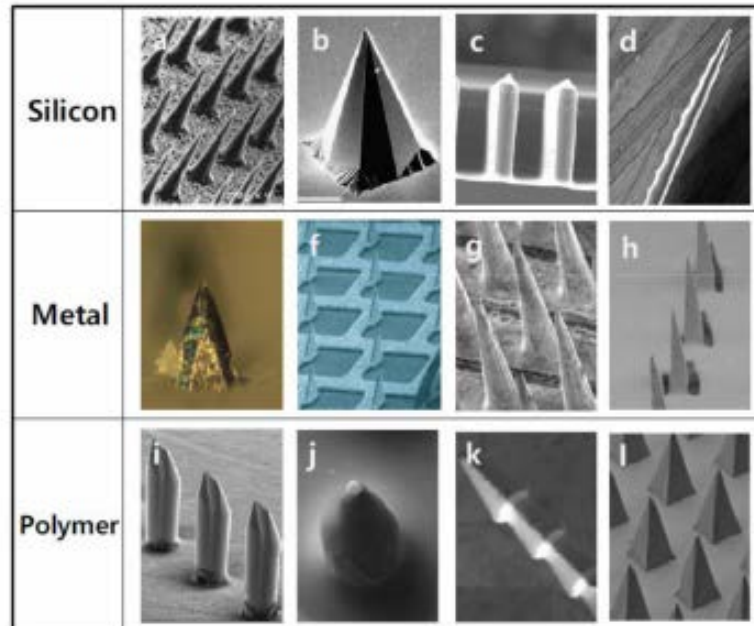
### 7.3.1 Στερεές Μικροβελόνες (Solid Microneedles)

Οι μικροβελόνες αυτής της κατηγορίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την δημιουργία πόρων στο δέρμα. Με το αιχμηρό τους άκρο διαπερνούν ή αποξέουν το δέρμα με απώτερο στόχο τον σχηματισμό οπών μέσω των οποίων οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες μπορούν να αποδεσμευθούν, είτε για τοπική δράση είτε για συστηματική χορήγηση μετά από πρόσληψη τους από το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων. Η εφαρμογή της δραστικής ουσίας στην επιφάνεια πάνω από τους πόρους μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση διαδερμικού θεραπευτικού συστήματος, όπως χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα στην παραδοσιακή διαδερμική χορήγηση, ή με κάποια τοπική ημιστερεή μορφή, όπως αλοιφή, κρέμα, γέλη ή διάλυμα (Williams, 2003).

#### Κατασκευή Στερεών Μικροβελόνων

Η κατασκευή στερεών μικροβελόνων έχει εστιάσει στην παροχή επαρκούς μηχανικής αντοχής, μέσω της επιλογής κατάλληλου υλικού και γεωμετρίας, ώστε να μειωθεί η απαιτούμενη δύναμη για την εισαγωγή τους στον ιστό. Πληθώρα υλικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή της συγκεκριμένης κατηγορίας μικροβελόνων, τα οποία ανάλογα με τις ιδιότητές τους διακρίνονται στα παρακάτω

- Μικροβελόνες Πυριτίου: Η διαδικασία που ακολουθείται για την κατασκευή των μικροβελόνων εξαρτάται από το υλικό και την γεωμετρία τους. Μικρού



Εικόνα 27: Τύποι στερεών μικροβελόνων (Kim, 2012)

ύψους μικροβελόνες πυριτίου έχουν παρασκευαστεί με την χρήση ξηρής χάραξης πυριτίου μέσω αντιδρώντων ιόντων και μάσκας χρωμίου (Yan, 2010) ή με ισότροπη χάραξη σε επαγωγικά συζευγμένο χαρακτή πλάσματος (Ji, 2006). Ανισότροπη υγρή χάραξη κρυσταλλικού πυριτίου με αλκαλικό διάλυμα

έχει επίσης εφαρμοστεί για την παραλαβή στερεών μικροβελόνων (Wei-Ze, 2012). Η υγρή χάραξη μπορεί να ελαττώσει το κόστος παραγωγής εν συγκρίσει με την ξηρή, αλλά υπάρχουν περιορισμοί όσον αφορά την γεωμετρία των μικροβελόνων (Chen, 2010). Για αυτό το λόγο, πολλές φορές γίνεται συνδυασμός των δύο μεθόδων χάραξης.

- Μεταλλικές Μικροβελόνες: Μεταλλικές μικροβελόνες έχουν παρασκευαστεί με τρισδιάστατη λέιζερ αφαίρεση (laser ablation), κοπή με λέιζερ, υγρή χάραξη και μεθόδους ηλεκτρολυτικής επιμετάλλωσης. Ορισμένα από τα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό είναι ανοξείδωτο ατσάλι, τιτάνιο, ταντάλιο, νικέλιο κλπ (Kim, 2012).
- Πολυμερικές Μικροβελόνες: Πολυμερικές μικροβελόνες έχουν δημιουργηθεί με την τεχνική της φωτολιθογραφίας χρησιμοποιώντας φωτο-σκληρυνόμενα πολυμερή, τα οποία στην συνέχεια χρησιμοποιούνται και ως μητρικές δομές για αντιγραφή μέσω χύτευσης (molding). Άλλες διαθέσιμες τεχνικές παρασκευής εκτός της φωτολιθογραφίας είναι η ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση και ο επαγόμενος από δύο φωτόνια πολυμερισμός. Στην τελευταία τεχνική, μία παλλόμενη υπερ-βραχεία δέσμη λέιζερ με μήκος κύματος κοντά στην περιοχή του υπέρυθρου εστιάζεται σε φωτο-σκληρυνόμενο πολυμερές προς σχηματισμό τρισδιάστατων μικροδομών μέσω της τεχνικής κατασκευής ‘‘layer-layer’’ (Lee, 2008).

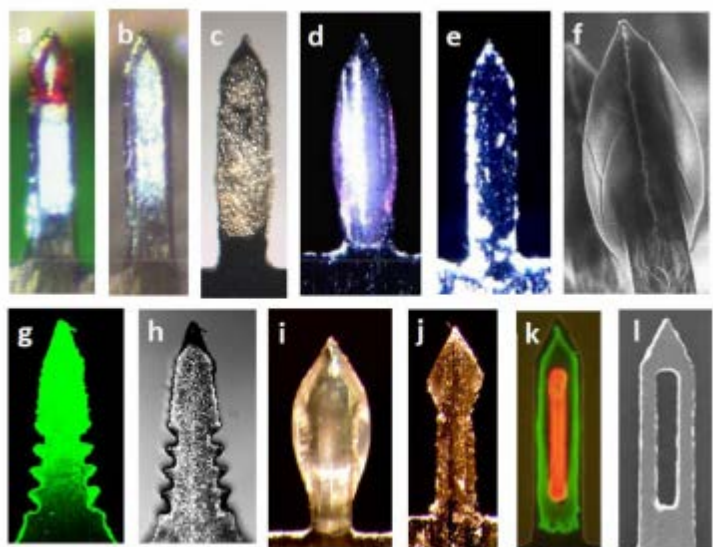
Τα υλικά που είναι διαθέσιμα για αυτόν τον σκοπό είναι βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως το συμπολυμερές μεθυλοβίνυλοαιθέρα και μαλεϊκού ανυδρίτη (methylvinylether and maleic anhydride- PMVE/MA), το πολυανθρακικό (polycarbonate) και το πολυμεθυλμεθακρυλικό (PMMA), βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως πολύ (γαλακτικό-γλυκολικό) οξύ (PLGA), το πολυγλυκολικό οξύ (PGA) και το πολυλακτικό οξύ (PLA) και τέλος υδατοδιαλυτά συστατικά όπως η μαλτόζη. Αρκετά από αυτά τα υλικά που αναφέρθηκαν δεν είναι φωτο-σκληρυνόμενα και μορφοποιούνται σε μικροβελόνες μέσω χύτευσης από μητρικές δομές. Οι τελευταίες, συνήθως, αποτελούνται από πολυμερές σιλικόνης (PDMS), πολυβίνυλαικόλη (PVA), πυρίτιο ή αργίλιο. Χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας στερεών μικροβελόνων είναι ότι εμφανίζουν μικρότερη μηχανική αντοχή από τις αντίστοιχες του πυριτίου και τις μεταλλικές (Kim, 2012).

- Κεραμικές Μικροβελόνες: Κεραμικές μικροβελόνες έχουν κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας τεχνικές μικροχύτευσης κεραμικού υλικού και σύντηξής του. Πιο αναλυτικά, αρχικά κατασκευάζονται μέσω φωτολιθογραφίας μικροβελόνες αργιλίου οι οποίες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ‘‘αρνητικών’’ από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Εν συνεχεία, γίνεται χύτευση των κεραμικών υλικών στα αρνητικά και ακολουθεί σύντηξη προς παραλαβή της τελικής διάταξης (Bystrova, 2011). Εναλλακτική μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί είναι ο επαγόμενος από δύο φωτόνια πολυμερισμός μέσω δύο φωτονίων σε υβριδικό μίγμα κεραμικών-πολυμερών (Doraiswamy, 2006).

- Κύλινδρος με Μικροβελόνες: Οι περισσότερες στερεές μικροβελόνες έχουν παρασκευαστεί σε επίπεδα υποστρώματα ώστε να εισέρχονται ταυτόχρονα στο δέρμα. Ορισμένες όμως, κατασκευάζονται σε κυλινδρικές επιφάνειες και εφαρμόζονται στο δέρμα ως roller. Οι κύλινδροι με μικροβελόνες (microneedle rollers) είναι εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία μεγάλων περιοχών του δέρματος ιδιαίτερα για κοσμητολογικούς σκοπούς. Αναλυτικότερα, ενισχύουν την αποκατάσταση του δέρματος, επάγουν την παραγωγή κολλαγόνου και αυξάνουν την διαπερατότητα των ΦΔΟ. Παραλαμβάνονται με την εφαρμογή επίπεδων υποστρωμάτων μικροβελόνων σε κυλινδρικές επιφάνειες ή με την κατασκευή μεμονωμένων μικροβελόνων/σειρών μικροβελόνων η οποία ακολουθείται από την συναρμολόγησή τους πάνω στον κύλινδρο. Γενικά χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο ύψος και για αυτόν τον λόγο προκαλούν αιμορραγίες και δεν θεωρούνται ανώδυνες (Kim, 2012).

### 7.3.2 Επικαλυμμένες Μικροβελόνες (Coated Microneedles)

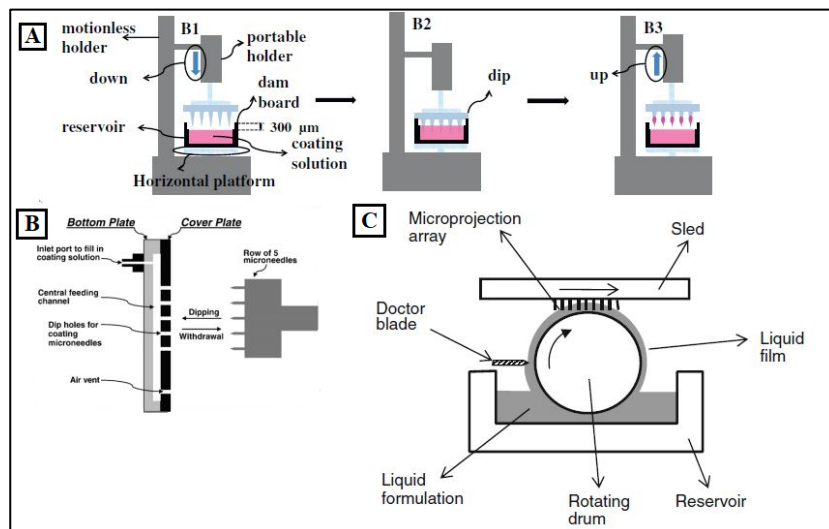
Οι στερεές μικροβελόνες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πέρα από την χρήση τους ως μέσο διάρρηξης του δερματικού φραγμού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως φορείς για την μεταφορά και αποδέσμευση ΦΔΟ εσωτερικά του δέρματος ή άλλου ιστού. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την επικάλυψη των μικροβελόνων με μορφοποίηση κατάλληλη προς επικάλυψη και μετέπειτα προς διάλυση στην περιοχή χορήγησης. Κατά αυτόν τον τρόπο, με την είσοδο των μικροβελόνων, η επιθυμητή δόση της ΦΔΟ αποδεσμεύεται ταχέως στον ιστό στόχο. Μειονέκτημα τους είναι ότι η ποσότητα της δραστικής που μπορεί να “φορτωθεί”, περιορίζεται από την δόση που μπορεί να επικαλυφθεί στο σώμα των μικροδομών αυτών λόγω γεωμετρίας (της τάξης του 1 mg) (Gill, 2007).



Εικόνα 28: Απεικόνιση επικαλυμμένων μικροβελόνων (Kim, 2012)

### Μέθοδοι Επικάλυσης

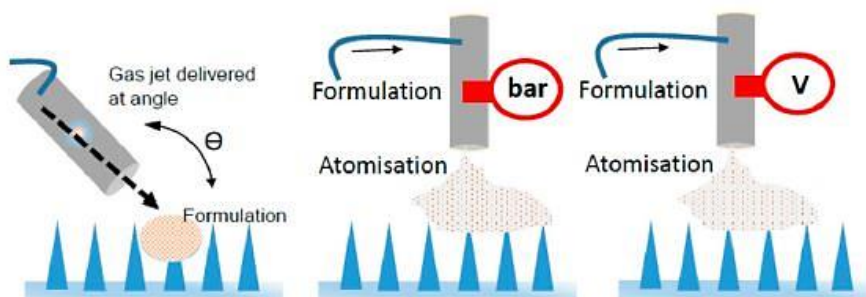
Οι μικροβελόνες είναι εφικτό να επικαλυφθούν μέσω μιας ποικιλίας μεθόδων, οι περισσότερες εκ των οποίων περιλαμβάνουν τον ψεκασμό ή την εμβάπτιση τους χρησιμοποιώντας υδατικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό μορφοποιείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχει αυξημένο ιξώδες με απώτερο στόχο την εξασφάλιση της παραμονής ενός μεγάλου ποσοστού της μορφοποίησης στις μικροβελόνες κατά την ξήρανση (Kim, 2012).



Εικόνα 29: Μέθοδοι επικάλυψης (Gill, 2007) (Chen, 2017) (Ameri, 2010) εμβάπτιση

πραγματοποιείται με την εισαγωγή της διάταξης των μικροβελόνων μία ή περισσότερες φορές σε ένα μεγάλο λουτρό πληρωμένο με το προς επικάλυψη διάλυμα (Stokes, 1997), ή σε μικρο-δεξαμενές για επικάλυψη κάθε μεμονωμένης μικροβελόνας (Gill, 2007) ή τέλος σε ένα λεπτό υμένιο του υλικού το οποίο σχηματίζεται στην επιφάνεια μιας κυλινδρικής διάταξης (Ameri, 2010). Οι δύο τελευταίες προσεγγίσεις έχουν διαμορφωθεί για την καλύτερη εντόπιση της επικάλυψης στο σώμα των μικροβελόνων ή στην μύτη τους χωρίς να γίνεται επιμόλυνση της βάσης-υπόστρωμα. Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζεται και η τεχνική επικάλυψης “στρώμα προς στρώμα” για βιολογικά υλικά, όπως DNA και πρωτεΐνες (Saurer, 2010).

Εναλλακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί και η επικάλυψη μέσω ψεκασμού. Πλεονέκτημα αυτή της μεθόδου είναι ότι αντιμετωπίζονται τυχόν προβλήματα από την



Εικόνα 30: Μέθοδος επικάλυψης μέσω ψεκασμού (Haj-Ahmad, 2015)

τρόπο την επιθυμητή δόση. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο επιμέρους τεχνικών: με ξήρανση μέσω προώθησης αέρα (gas jet drying) κατά την

επανατοποθέτηση της επικάλυψης λόγω της δυνατότητας του διαλύματος προς κίνηση, μέχρι την πλήρη ξήρανση του, μεταβάλλοντας κατά αυτόν τον

οποία πρώτα τοποθετείται το προς επικάλυψη διάλυμα και εν συνεχεία κατανέμεται και ξηραίνεται ταυτόχρονα μέσω ροής αέρα που προωθείται υπό συγκεκριμένη κλίση, από κατάλληλη συσκευή (I) καθώς και με ψεκαστήρα όπως και στις συμβατικές μεθόδους επικάλυψης δισκίων (II) (Kim, 2012).

#### Μορφοποίηση Διαλύματος Επικάλυψης

Το διάλυμα που χρησιμοποιείται προς επικάλυψη των μικροβελόνων πρέπει να διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά ώστε να είναι κατάλληλο προς χρήση (Gill, 2007). Αρχικά, η ελεγχόμενη διαβροχή και κατανομή του διαλύματος της ΦΔΟ στην επιφάνεια των μικροβελόνων είναι κρίσιμη ώστε να εξασφαλισθεί η ομοιογενής κατανομή στην τελική διάταξη. Για αυτόν τον λόγο απαιτείται το διάλυμα να έχει αυξημένο ιξώδες και μειωμένη γωνία επαφής με το υπόστρωμα προς επικάλυψη. Δεύτερον, πρέπει η επικάλυψη να είναι υδατοδιαλυτή ώστε να εξασφαλισθεί η επιτυχής διάλυσή της στο δέρμα. Τρίτον, η ξηρή επικάλυψη πρέπει να διαθέτει επαρκή μηχανική αντοχή ώστε να διασφαλισθεί η παραμονή της στην επιφάνεια των μικροβελόνων κατά την είσοδο στο δέρμα. Τέταρτον, τα έκδοχα που χρησιμοποιούνται να είναι μη τοξικά και συμβατά με την ΦΔΟ και τέλος, η όλη διαδικασία της επικάλυψης να είναι συμβατή προς την ΦΔΟ και σύμφωνη με τις αρχές καλής βιομηχανικής πρακτικής.

Τα έκδοχα που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι παράγοντες αύξηση του ιξώδους, επιφανειοδραστικά προς διευκόλυνση της διαβροχής των επιφανειών και παράγοντες σταθεροποίησης της δραστικής ουσίας κατά την ξήρανση και αποθήκευση (Kim, 2012).

### 7.3.3 Διαλυόμενες Μικροβελόνες (Dissolving Microneedles)

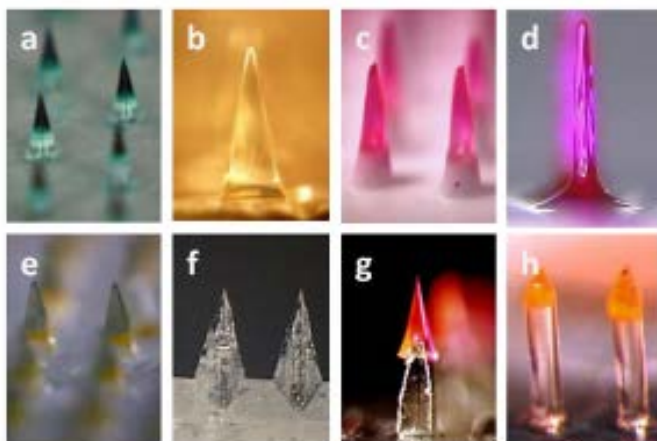
Εν αντιθέσει με τις επικαλυμμένες, οι πολυμερικές μικροβελόνες έχουν αναπτυχθεί ώστε να διαλύονται πλήρως στο δέρμα και κατ' επέκταση να μην αφήνουν

επικίνδυνα βιολογικά

απόβλητα στην περιοχή μετά την χρήση. Αυτές οι μικροβελόνες είναι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων,

κατασκευασμένες

αποκλειστικά από ασφαλή, αδρανή, υδατοδιαλυτά υλικά όπως πολυμερή και σάκχαρα τα οποία διαλύονται στο δέρμα μετά την είσοδο τους. Ενώ οι διαλυόμενες μικροβελόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν



**Εικόνα 31:** Απεικόνιση διαλυόμενων μικροβελόνων (Kim, 2012)

για την προ-επεξεργασία του δέρματος με στόχο την αύξηση της διαπερατότητας, οι ΦΔΟ συνήθως ενκαψυλιώνονται στο εσωτερικό των μικροβελόνων για αποδέσμευσή τους στο δέρμα παρομοίως με τις επικαλυμμένες μικροβελόνες (Kim, 2012).

#### Υλικά Διαλυόμενων Μικροβελόνων

Ευρύ φάσμα υλικών έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων. Ανάλογα με τον μηχανισμό της *in vivo* δράσης τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διαλυόμενα, διογκώμενα και βιοδιασπώμενα πολυμερή. Για την διαδερμική χορήγηση, οι μικροβελόνες μορφοποιούνται συνήθως με διαλυόμενα και διασπώμενα πολυμερή. Οι ΦΔΟ στην πλειονότητα των περιπτώσεων ενσωματώνονται στην πολυμερική μήτρα και αποδεσμεύονται με την διάλυση ή διάσπαση των μικροβελόνων όταν αυτές εισέρχονται στο δέρμα. Για την εξαγωγή δερματικού διάμεσου υγρού, οι μικροβελόνες παρασκευάζονται συνήθως από διογκώμενα πολυμερή τα οποία διογκώνονται σημαντικά όταν έρθουν σε επαφή με το νερό (Wang, 2017).

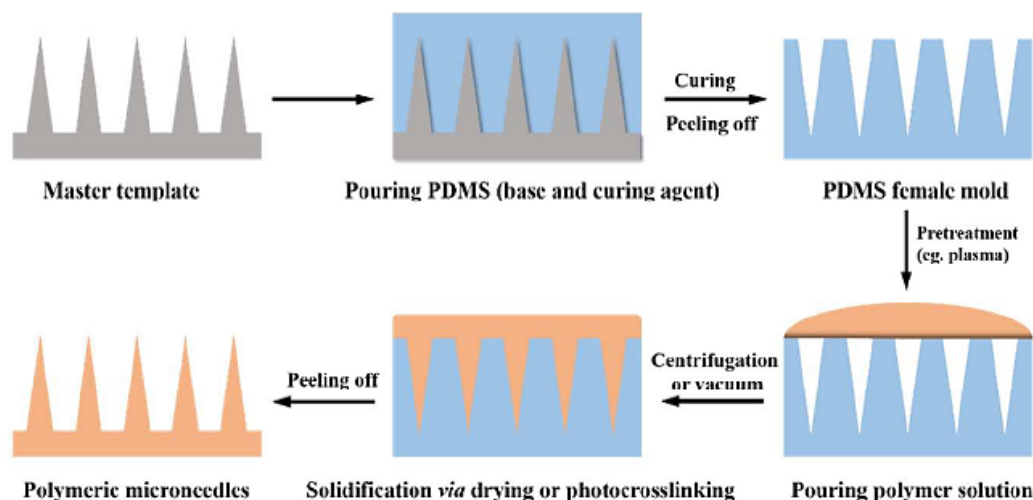
**Πίνακας 6:** Πολυμερή που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πολυμερικών μικροβελόνων (Wang, 2017)

| Τύπος Μικροβελόνων          |                | Πολυμερή                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Διαλυόμενες Μικροβελόνες    | Πολυσακχαρίτες | δεξτράνη, νατριούχο άλας θειικής χονδροϊτίνης, υδροξυπροπυλοκυτταρίνη (HPC), καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC), υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC), αλγινικό νάτριο, υαλουρονικό οξύ (HA), αμυλοπηκτίνη                                                    |
|                             | Άλλα           | ζελατίνη, πολύ-γ-γλουταμικό οξύ, πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), πολυ(μεθυλοβινυλοαιθέρας/μαλειακό ανυδρίτης)(PMVE/MA), πολυβινυλοπυρρολιδόνη-πολυβινυλαλκοόλη (PVP-PVA), πολυ(βινυλοπυρρολιδόνη-co-μεθακρυλικό οξύ)(PVP-MAA), PVP-κυκλοδεξτρίνη (PVP-CD) |
| Διογκώμενες Μικροβελόνες    |                | πολυ(μεθυλοβινυλοαιθέρας/μαλειακό ανυδρίτης)-πολυαιθυλενογλυκόλη (PMVE/MA-PEG), πολυ(2-υδροξυαιθυλο-μεθακρυλικό) (PHEMA), πολυ(στυρένιο)-block-πολυ(ακρυλικό οξύ (PS-b-PAA), Gantrez, ακρυλικό τροποποιημένο HA(m-HA), πολυβινυλαλκοόλη (PVA)          |
| Βιοδιασπώμενες Μικροβελόνες | Συνθετικά      | πολυλακτικό οξύ (PLA), πολυγλυκολικό οξύ (PLGA), πολυ(λακτικό-co-γλυκολικό οξύ) (PLGA), πολυκαρβονικά, πολυστυρένιο (PS), πολυκαπρολακτόνη (PCL)                                                                                                       |
|                             | Φυσικά         | χιτοζάνη, μετάξι, χιτίνη                                                                                                                                                                                                                               |

### Κατασκευή Διαλυόμενων Μικροβελόνων

Διάφορες μέθοδοι όπως είναι αυτή της μικρο-χύτευσης (micromoulding), της εκ σταγονιδίων γεννωμένης τεχνικής με παροχή αέρα (droplet-born air blowing-DAB), λιθογραφίας ολκής (drawing lithography), ήλεκτρο-ολκής (electro-drawing-ED), φωτολιθογραφίας, συνεχούς παραγωγής υγρών διεπαφών (CLIP), χύτευσης διαλύτη και εμβάπτισης έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων (Wang, 2017).

Η τεχνική της μικρο-χύτευσης (micromoulding) είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος λόγω χαμηλού κόστους, ικανοποιητικής επαναληψιμότητας και ευκολίας στην κλιμάκωση της παραγωγής (scale up). Η κατασκευή μικροβελόνων μέσω αυτής



**Εικόνα 33:** Μέθοδος μικροχύτευσης (Wang, 2017)

περιλαμβάνει έξι βασικά βήματα: 1)κατασκευή πρότυπων διατάξεων μικροβελόνων, 2)προετοιμασία καλουπιών μικροβελόνων βάσει των πρότυπων διατάξεων, 3)χύτευση πολυμερών στα καλούπια, 4)αφαίρεση φυσαλίδων και πλήρωση των κοιλοτήτων των καλουπιών με φυγοκέντρωση ή εφαρμογή κενού, 5)στερεοποίηση μέσω ξήρανσης ή φωτοπολυμερισμού, 6)αφαίρεση μικροβελόνων από τα καλούπια. Τα καλούπια που παρασκευάζονται στο δεύτερο στάδιο αναμένεται να ‘μεταγράφουν’ επακριβώς την δομή των αρχικών διατάξεων και μπορούν να κατασκευαστούν από πληθώρα υλικών όπως κεραμικά, PVA και πολυμέθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Το πολυμέθυλοσιλοξάνιο (PDMS) αποτελεί συνήθως υλικό επιλογής λόγω της ικανοποιητικής ικανότητας ‘μεταγραφής’, εξαιρετικής θερμο-σταθερότητας καθώς και λόγω της κακής πρόσφυσης που διευκολύνει την ακέραιη αφαίρεση των μικροβελόνων από τα καλούπια. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου, υπάρχουν ακόμα ορισμένες ανησυχίες για τις εφαρμογές της στην βιοιατρική. Αρχικά, τα περίπλοκα επιμέρους βήματα παρασκευής είναι χρονοβόρα και μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια ποσότητας της ενσωματωμένης ΦΔΟ. Επίσης, θέρμανση ή UV ακτινοβολία χρησιμοποιούνται συνήθως στο στάδιο στερεοποίησης των πολυμερών,

παρεμποδίζοντας την χρήση θερμοευαίσθητων φαρμάκων όπως είναι τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και τα εμβόλια (Wang, 2017).

Το 2010, (Lee, 2010) οι Lee et al, πρότειναν μία καινοτόμο μέθοδο λιθογραφίας ώστε να ξεπεραστούν οι

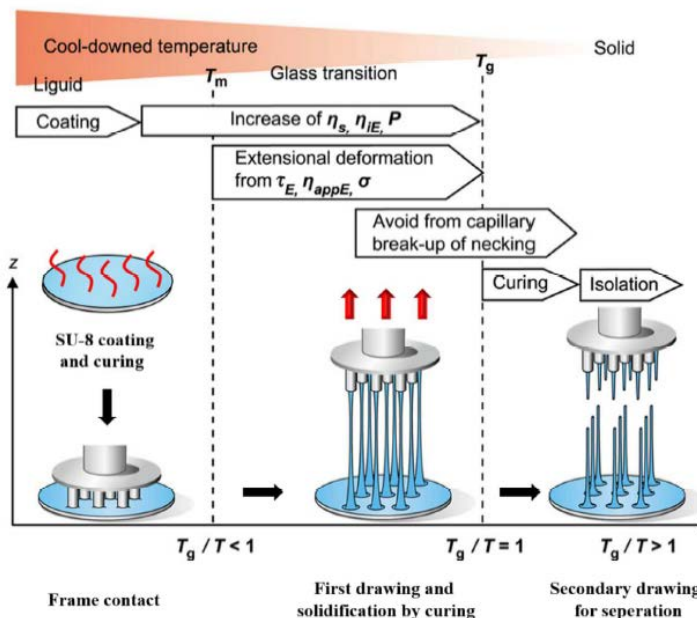
προαναφερθέντες

ανησυχίες.

Στην λιθογραφία ολκής, το ιξώδες των πολυμερών στο σημείο υαλώδους μετάπτωσης είναι η κύρια παράμετρος για την κατανόηση της τρισδιάστατη

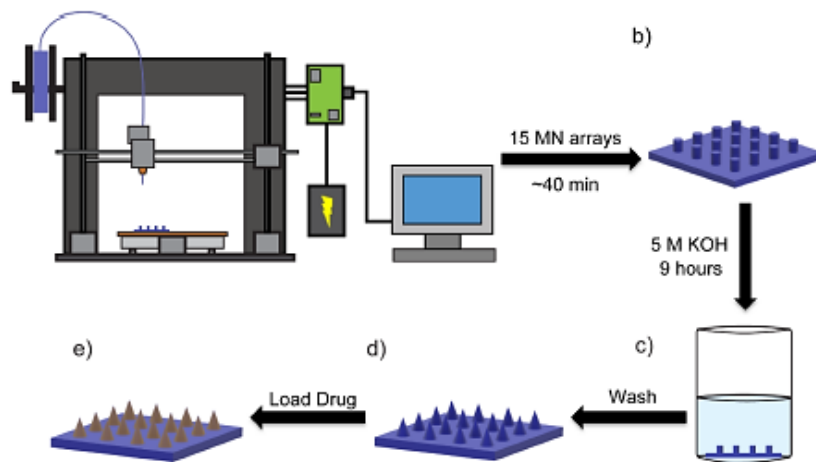
κατασκευής των μικροδομών. Η τυπική διεργασία παρασκευής περιλαμβάνει πέντε βήματα: 1)επικάλυψη υάλινου υποστρώματος με SU-8 και σκλήρυνση μέσω τήξης με πτώση

της θερμοκρασίας, 2)επαφή με πλαίσιο με στύλους, 3)το πλαίσιο με τους στύλους σύρεται πρώτη φορά προς τα άνω ώστε να σχηματιστούν μικροβελόνες κωνικού σχήματος, 4)στερεοποίηση μέσω πλήρους σκλήρυνσης, και 5)το πλαίσιο σύρεται προς τα άνω για δεύτερη φορά ώστε να γίνει ο διαχωρισμός των κωνικών μικροδομών από το πλαίσιο. Κατ' επέκταση η προτεινόμενη μέθοδος δεν απαιτεί την χρήση καλουπιών και οι τρισδιάστατες πολυμερικές μικροδομές εξάγονται απευθείας από πολυμερή υλικά χωρίς την έκθεση σε ακτινοβολίες. Παρά τα πλεονεκτήματά της, εν συγκρίσει με την τεχνική της μικρο-χύτευσης, η λιθογραφία ολκής εμφανίζει μη ικανοποιητική επαναληψιμότητα καθώς ο σχηματισμός των μικροβελόνων είναι άμεσα εξαρτώμενος από την δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμερικού υγρού και πλαισίου. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι και εκείνη ακατάλληλη για θερμοευαίσθητες ΦΔΟ λόγω της υψηλούς θερμοκρασίας που εφαρμόζεται (Wang, 2017).



Εικόνα 35: Παρασκευή μικροβελόνων μέσω λιθογραφίας (Lee, 2010)

Τα τελευταία χρόνια, οι Luzuriaga et al, ανέπτυξαν μία καινοτόμο μέθοδο παρασκευής μικροβελόνων κωνικού σχήματος με την χρήση τρισδιάστατης τεχνικής μοντελοποίησης



**Εικόνα 36:** Παρασκευή PLA μικροβελόνων μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης (Luzuriaga, 2018)

με εναπόθεση υλικού FDM. Η τεχνολογία FDM παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων έναντι των άλλων μεθόδων τρισδιάστατης εκτύπωσης διότι είναι πολύπλευρη,

χαμηλού

κόστους και

έχει την

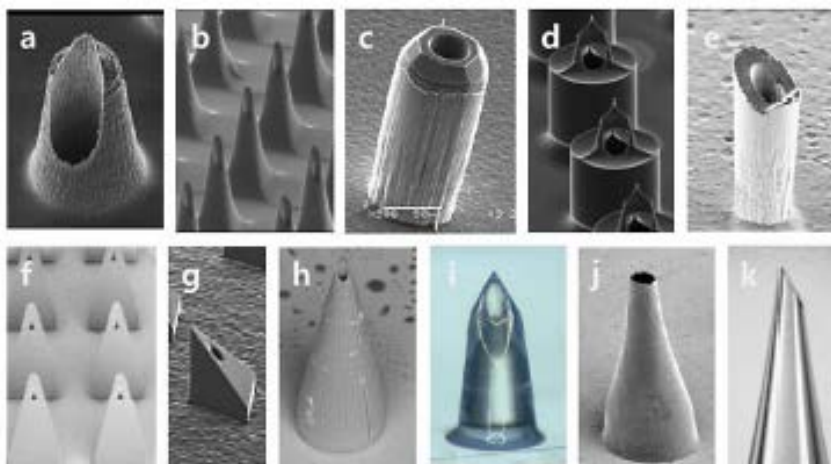
δυνατότητα παρασκευής πρωτοτύπων από βιοδιασπώμενα υλικά, όπως είναι το πολυλακτικό οξύ (PLA) και η πολυβινυλαλκοόλη (PVA), τα οποία έχουν εγκριθεί από αρμόδιους φορείς (FDA) για την χρήση τους ως διαλυόμενα ράμματα. Η διαδικασία παρασκευής που πρότειναν περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα: 1) εκτύπωση κυλινδρικών μικροδομών και της βάσης τους από PLA με εκτυπωτή FDM, 2)χημική χάραξη με εμβάπτιση σε αλκαλικό διάλυμα για την παραλαβή πυραμιδικών μικροβελόνων, 3) πλύση για την απομάκρυνση χημικών υπολειμμάτων και παραλαβή της διάταξης, και 4)επικάλυψη των παραληφθέντων μικροβελόνων με το διάλυμα της ΦΔΟ. Η εκτύπωση κυλινδρικών μικροδομών και η χάραξή τους έναντι της απευθείας εκτύπωσης των πυραμιδικών μικροβελόνων επιλέχθηκε διότι η τεχνολογία FDM έχει περιορισμένο εύρος ανάλυσης και είναι μη δυνάμενη να αποδώσει την μύτη των μικροβελόνων (Luzuriaga, 2018).

### 7.3.4 Κενές Μικροβελόνες (Hollow Microneedles)

Οι κενές μικροβελόνες παρέχουν μία καθορισμένη οδό για την χορήγηση ΦΔΟ στο δέρμα ή σε άλλον ιστό. Παρομοίως με την υποδόρια ένεση, επιτρέπουν την διέλευση υγρών μορφοποιήσεων από το εσωτερικό τους υπό συγκεκριμένη ροή, η οποία εξαρτάται από την πίεση που εφαρμόζεται. Η τελευταία ρυθμίζεται, ώστε ανάλογα με τον θεραπευτικό στόχο να επιτυγχάνεται ταχεία χορήγηση, αργή έγχυση ή χρονο-μεταβαλλόμενος ρυθμός αποδέσμευσης. Η τεχνολογία αυτή να μεν διευκολύνει την χορήγηση των ήδη υπαρχόντων ενέσιμων σκευασμάτων, αλλά υστερεί στην αποδέσμευση μορφοποιήσεων ξηρής κατάστασης με ανασύσταση που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της σταθερότητας της ΦΔΟ. Κενές μικροβελόνες

έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως διάλυος για την διάχυση ΦΔΟ στο δέρμα από μη πεπιεσμένη δεξαμενή φαρμάκων.

Οι κενές μικροβελόνες κατασκευάζονται απευθείας από το υλικό του υποστρώματος με την χρήση τεχνικών μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων, (microelectromechanical systems-MEMS) ορισμένες εκ των οποίων είναι η λέιζερ μικρομηχανική (laser micromachining), η χάραξη πυριτίου μέσω αντιδρώντων



Εικόνα 39: Απεικόνιση κενών μικροβελόνων (Kim, 2012)

ιόντων (deep reactive ion etching of silicon), η τεχνική λιθογραφικής χύτευσης, η φωτολιθογραφία ακτίνων-X, η υγρή χημική χάραξη και μικροδιαμόρφωση. Το υλικό υποστρώματος, μπορεί να είναι πυρίτιο, μέταλλο, ύαλος ή πολυμερές αναλόγως τις ανάγκες και οι διεργασίες που ακολουθούνται προσομοιάζουν αυτές που έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Kim, 2012).

## 7.4 Συμμόρφωση και ασφάλεια ασθενών

Σε ομαδικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την χαρτογράφηση της άποψης κοινού και επαγγελματιών υγείας, τα διαδερμικά συστήματα με μικροβελόνες είχαν λάβει θετικές κριτικές εν συγκρίσει με τις υποδόριες ενέσεις (Birchall, 2011). Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν είναι η μείωση του πόνου, της πιθανότητα βλάβης στους ιστούς και του κινδύνου εκδήλωσης μολύνσεων, παράλληλα με την δυνατότητα χρήσης από τον ίδιο τον ασθενή χωρίς να απαιτείται ιδιαίτερη εκπαίδευση. Όσες ανησυχίες έχουν εκφραστεί σχετίζονται με την καθυστερημένη έναρξη δράσης, το κόστος, την ακριβή και αξιόπιστη δοσολογία και το ενδεχόμενο λανθασμένης χρήσης. Σε ξεχωριστές έρευνες εμβολιασμού στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν κενές μικροβελόνες για την έγχυση του εμβολίου της γρίπης, τόσο το μεγαλύτερο ποσοστό των επαγγελματιών υγείας όσο και του κοινού, προτίμησε την διάταξη των μικροβελόνων έναντι των συμβατικών ενδομυϊκών βελόνων λόγω του μικρότερου μεγέθους της βελόνας, καθώς και της αυξημένης ανοσογονικότητας που παρατηρείται στην ενδοδερμική χορήγηση (Αηπου, 2011). Επαγγελματίες υγείας και ασθενείς θεωρούν από κοινού ότι ο εμβολιασμός επιτελούμενος με μικροβελόνες θα ήταν δυνατό να αυξήσει το ποσοστό των εμβολίων που λαμβάνουν χώρα.

#### 7.4.1 Μείωση πόνου

Οι ασθενείς ως επί το πλείστον βρίσκουν ελκυστική την χρήση μικροβελόνων λόγω του ελάχιστα επεμβατικού μηχανισμού χορήγησης. Για αυτόν τον λόγο έχει πραγματοποιηθεί σειρά μελετών ώστε να εξακριβωθεί η ένταση του πόνου που προκαλούν και πως αυτή σχετίζεται με την γεωμετρία τους. Παράμετροι όπως το μήκος, το πλάτος, το πάχος, η γωνία της μύτης και ο αριθμός των μικροβελόνων έχουν μελετηθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους, με τιμές που μεταβάλλονται εντός μεγάλου εύρους, ώστε να καθοριστεί η επίδραση τους στην αίσθηση του πόνου σε ανθρώπους. Η εισχώρηση 26G υποδόριας βελόνας (εξωτερικής διαμέτρου 460μm) σε βάθος 5mm χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου για την σύγκριση με τις διάφορες διατάξεις των μικροβελόνων. Το συγκεκριμένο βάθος επιλέχθηκε έναντι των 8 και 12mm που χρησιμοποιούνται συνήθως, για την μείωση της πιθανότητας εκδήλωσης αιμορραγίας, η οποία θα καθιστούσε την ανάλυση περίπλοκη. Για την αξιολόγηση του πόνου χρησιμοποιήθηκε κλίμακα VAS 100mm. Συγκεκριμένα για κάθε παράμετρο:

- Μήκος: Οι διαστάσεις που επιλέχθηκαν προς μελέτη ήταν τα 480, 700, 960 και 1450μm με την αρχική υπόθεση ότι η αύξηση του μήκους των μικροβελόνων θα προκαλούσε και αυξανόμενο πόνο, λόγω της διέγερσης μεγαλύτερου αριθμού υποδοχέων. Σε συμφωνία με αυτήν την υπόθεση, η μέση βαθμολογία πόνου αυξανόταν από τα  $2 \pm 2$ mm της κλίμακας για τα 480μm, στα  $15 \pm 17$  mm για τα 1450μm, με μέγιστη τιμή αυτής της υποδόριας ένεσης στα  $39 \pm 21$  mm. Επίσης, 30% των εθελοντών χαρακτήρισε ως απολύτως ανώδυνες τις μικροβελόνες μήκους 480 μm και 700 μm, ενώ μόλις το 0% και 10% τις αντίστοιχες διατάξεις μήκους 960 μm και 1450 μm.
- Αριθμός Μικροβελόνων: Ο αριθμός των μικροβελόνων που εξετάστηκε ήταν 5 και 50 διατεταγμένες στην ίδια επιφάνεια με τον αρχικό ισχυρισμό ότι η αύξηση του αριθμού τους θα προκαλούσε και ενεργοποίηση περισσότερων υποδοχέων. Όπως διαπιστώθηκε και από τα αποτελέσματα της μελέτης, η διάταξη των 5 μικροβελόνων σημείωσε βαθμολογία της τάξης του 10% της υποδόριας βελόνας έναντι του 25% που σημείωσε η διάταξη των 50. Οι διατάξεις των 5 και 50 αναφέρθηκαν ως ανώδυνες από το 40% και 20% των ασθενών αντιστοίχως.
- Γωνία Μύτης: Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κλίσεις 20°, 55° και 90° της μύτης των μικροβελόνων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην πρόκληση πόνου. Αυτό οφείλεται στο ότι, η αίσθηση του πόνου σχετίζεται μάλλον με την διάμετρο της μύτης και την αιχμηρότητά της παρά με την γωνία της.
- Πλάτος και Πάχος Μικροβελόνων: Για την εξέταση αυτών των παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές 30, 45 και 100μm για το πάχος και 160, 245 και 465μm για το πλάτος. Με την έναρξη της μελέτης, αναμενόταν η αύξηση αυτών των διαστάσεων, να προκαλεί και αντίστοιχη αύξηση του πόνου. Παρόλ' αυτά δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα εύρη

τιμών που εξετάστηκαν, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με βελόνες.

Ολοκληρώνοντας, από τα προαναφερθέντα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι όλες οι υπό εξέταση διατάξεις προκαλούσαν λιγότερο πόνο από μια 26G υποδόρια βελόνα σε διαφορετικό ποσοστό ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Επιπροσθέτως, οι διαστάσεις που φαίνεται να επηρεάζουν καθοριστικά την αίσθηση του πόνου είναι το μήκος και η διάμετρος της μύτης των μικροβελόνων (Gill, 2008).

#### 7.4.2 Ερεθισμός δέρματος

Οι μικροβελόνες με την εισαγωγή τους στο δέρμα μπορούν να προκαλέσουν δερματικό ερεθισμό. Οπτική παρατήρηση του δέρματος αμέσως μετά την εισχώρησή τους, απεκάλυψε ισχυρά εντοπισμένο, ήπιο ερύθημα υπό την μορφή ανοικτής ροζ κηλίδας μικρότερης του 1mm, η οποία ανιχνεύεται σε οποιαδήποτε διάταξη ανεξαρτήτως της γεωμετρίας των μικροβελόνων. Η ερυθρότητα, παρά την παρατήρησή της υπό άμεση εξέταση, δεν είχε εμφανές αισθητικό αποτέλεσμα κατά την εξέταση ατόμων από απόσταση. Ο ερεθισμός αυτός μειωνόταν σημαντικά κατά τις 2 πρώτες ώρες και οι ασθενείς δήλωσαν ότι σχεδόν είχε εξαφανιστεί με την πάροδο μιας μέρας από την εφαρμογή. Σημάδια οιδήματος δεν σημειώθηκαν μετά την εισαγωγή των διατάξεων των μικροβελόνων.

Η εμφάνιση μικρών σταγονιδίων αίματος (1μL) παρατηρήθηκε στο σημείο εισαγωγής, ειδικά εκείνων με μεγάλο μήκος γύρω στο 1mm. Οι μικροβελόνες μικρότερου ύψους (500 με 700μm) δεν προκάλεσαν αιμορραγία (Gill, 2008).

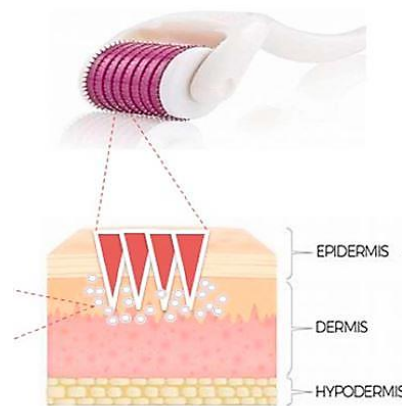
#### 7.4.3 Μόλυνση δέρματος

Είναι σημαντικό να αξιολογηθεί αν οι κοιλότητες που δημιουργούνται στο δέρμα από την εφαρμογή των μικροβελόνων μπορεί να αποτελέσουν εστίες μόλυνσης. Η κλινική εμπειρία από την χρήση των στείρων υποδόριων βελόνων υποδηλώνει ότι οι εναπομένουσες κοιλότητες που δημιουργούνται δεν είναι σημαντική πηγή κινδύνου για μολύνσεις, κυρίως λόγω του ότι το δέρμα διαθέτει πολλούς μηχανισμούς αντιμετώπισης των παθογόνων μικροοργανισμών. Παρομοίως, για τις μικροβελόνες η πιθανότητα πρόκλησης μολύνσεων είναι ελάχιστη και δεν έχουν αναφερθεί ανάλογα περιστατικά από τις δοκιμές τους.

Σε μελέτη η οποία εξέτασε το θέμα της μικροβιακής διαπέρασης μέσω των δημιουργούμενων οπών από τις μικροβελόνες σε δέρμα χοίρου *in vitro*, βρέθηκε ότι η φραγή του δέρματος που προκαλείται από τις μικροβελόνες οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερη βακτηριακή διαπέραση σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται κατά την εισαγωγή υποδόριων βελόνων. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε είσοδος μικροοργανισμών στην ζώσα επιδερμίδα. (Gill, 2008).

## 7.5 Εγκεκριμένα Προϊόντα Μικροβελόνων

Ένας αριθμός εγκεκριμένων ιατρικών και αισθητικών προϊόντων που χρησιμοποιούν μικροβελόνες είναι πλέον διαθέσιμα στην αγορά. Το πρώτο από αυτά ήταν το Dermalroller® -ένας κύλινδρος καλυμμένος στην επιφάνεια του από στερεές, μεταλλικές μικροβελόνες μήκους 0,2-2,5mm. Οι μικρότερου μήκους μικροβελόνες είναι ειδικά σχεδιασμένες για οικιακή χρήση από τους ασθενείς προς βελτίωση της υφής του δέρματος και οι μεγαλύτερου μήκους χρησιμοποιούνται σε κλινικές για την θεραπεία ουλών και υπερχρωματισμού. Εμπορικά διαθέσιμο έγινε πρώτη φορά το 1999 στην Ευρώπη.



**Εικόνα 40:** Απεικόνιση Dermalroller® (Ahmeda, 2019)

Πιο πρόσφατα, το MicroHyal® αναπτύχθηκε ως ένα διαδερμικό σύστημα καλυμμένο με διαλυόμενες μικροβελόνες, οι οποίες περιέχουν υαλουρονικό οξύ για την θεραπεία των ρυτίδων. Το προϊόν αυτό προτάθηκε το 2008 και αυτήν την στιγμή είναι διαθέσιμο στην Ιαπωνία. Το LiteClear®, από μικροβελόνες πυριτίου, χρησιμοποιείται στην Κίνα για την αντιμετώπιση της ακμής και παγκοσμίως για αισθητικές ατέλειες.



**Εικόνα 41:** Απεικόνιση Soluvia® (Medgadget, 2020)

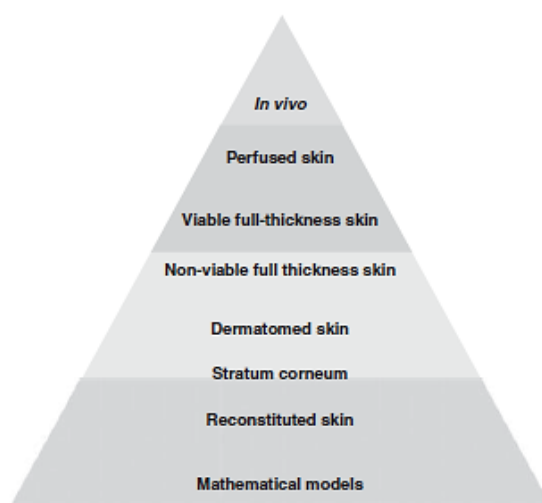
Το Soluvia® είναι μία μεμονωμένη κενή μικροβελόνα μήκους 1,5mm προσαρτημένη σε μία

σύριγγα. Διατίθεται στην παγκόσμια αγορά ως προγεμισμένη μορφή με το εμβόλιο της γρίπης. Τέλος, το MicronJet®, μία σειρά από τέσσερις κενές μικροβελόνες πυριτίου τοποθετημένες σε πλαστικό προσαρμογέα συμβατό με την τυπική σύριγγα, εγκρίθηκε πρόσφατα από τον FDA (Kim, 2012).

## 8. Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης Διαδερμικής Απορρόφησης

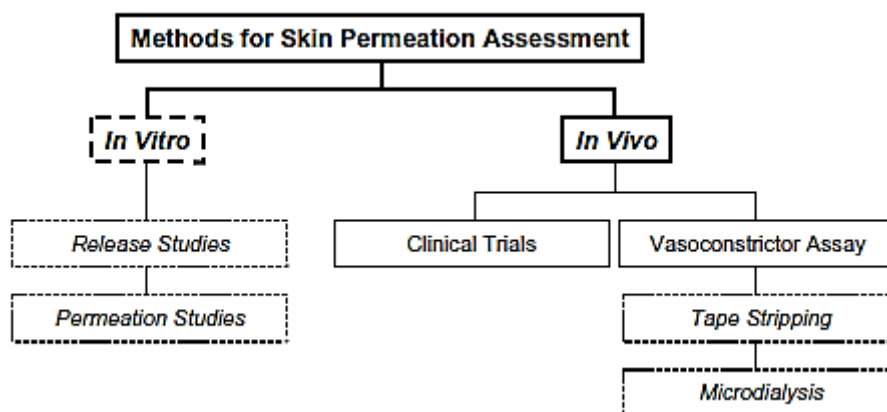
Η κατανόηση των διαδικασιών της διαδερμικής απορρόφησης είναι απαραίτητη για διάφορους λόγους, όπως είναι η αξιολόγηση της ασφάλειας μορφοποιήσεων και η εκμετάλλευση της συγκεκριμένης οδού για τοπική και συστηματική χορήγηση. Για αυτόν τον λόγο, αριθμός επίσημων οδηγιών, που παρέχονται από τις Ευρωπαϊκές αρμόδιες αρχές και τον FDA, είναι στην διάθεση των επιστημόνων στο πεδίο της ερευνητικής μελέτης του δέρματος. Αν μάλιστα αμφιβολίες ως προς την ερμηνεία αυτών παραμένουν, υπάρχουν διαθέσιμες συμβουλές σχετικά με την εφαρμογή τους σε πρωτόκολλα που ήδη χρησιμοποιούνται.

Μετρήσεις απορρόφησης από το δέρμα *in vivo* είναι σπάνιες, λόγω ηθικών, οικονομικών και αναλυτικών ανησυχιών. Κατ' επέκταση έχει δοθεί τεράστια έμφαση στην ανάπτυξη και επικύρωση εναλλακτικών *in vitro* μεθόδων. Μία ολοκληρωμένη συλλογή βιβλιογραφικών δεδομένων, στα οποία συγκρίνεται η διαπερατότητα χημικών μορίων διαμέσου ζωικού και ανθρωπίνου δέρματος *in vivo*, καθώς και *in vitro*, έχει εκδοθεί από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Οικοτοξικολογίας και Τοξικολογίας Χημικών (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals - ECETOC). Η ποικιλία των υπαρχόντων *in vitro* και *in vivo* τεχνικών αναδεικνύει την δυσκολία που χαρακτηρίζει την σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μεθόδων, ειδών, ηλικιών, καθώς και μεταξύ υγιούς και παθολογικού δέρματος. Οι Howes et al (Howes, 1996) πρότειναν μία ιεράρχηση των συχνά χρησιμοποιούμενων *in vitro* μεθόδων για την μέτρηση της διαδερμικής απορρόφησης ανάλογα με την ομοιότητά τους με την *in vivo* κατάσταση. Η κατοχή αυτής της γνώσης είναι ιδιαίτερος χρήσιμη κατά την σύγκριση διαφορετικών αποτελεσμάτων από μελέτες διαπερατότητας (Schaefer, 2008).



Εικόνα 42: Ιεράρχηση *in vitro* μεθόδων μελέτης (Howes, 1996)

Μετά την *per os* χορήγηση, οι συγκεντρώσεις της ΦΔΟ και των μεταβολιτών της στο αίμα, ούρα και κόπρανα μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν. Εν αντιθέσει, η τοπική εφαρμογή στο δέρμα συνήθως στοχεύει στην τοπική θεραπεία. Οπότε, το κύριο ενδιαφέρον επικεντρώνεται στον καθορισμό των επιπέδων της ΦΔΟ στο δέρμα, ώστε να είναι δυνατή η αξιολόγηση της δερματικής βιοδιαθεσιμότητας ή η εκτίμηση της βιοϊσοδυναμίας μεταξύ διαφορετικών μορφοποιήσεων. Παρακάτω, θα αναλυθούν κατάλληλες τεχνικές ανάλυσης.



Εικόνα 43: Διάκριση μεθόδων αξιολόγησης διαπερατότητας (Nicoli, 2012)

## 8.1 In Vivo Μελέτες

### 8.1.1 Αξιολόγηση Αγγειοσύσπασης

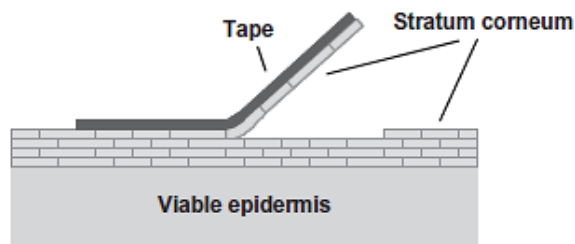
Μόνο ένας περιορισμένος αριθμός χημικών ουσιών προκαλεί μία τοπική μετρήσιμη φαρμακοδυναμική απόκριση, όπως είναι για παράδειγμα, η εξαρτώμενη από την συγκέντρωση αγγειοσυσπαστική δράση των κορτικοστεροειδών. Σε αυτά τα πειράματα, η προκαλούμενη λεύκανση του δέρματος βαθμολογείται οπτικά από έναν ή περισσότερους αναλυτές, χρησιμοποιώντας κανονική κλίμακα δεδομένων. Εκτός από την μέτρηση σε ένα μεμονωμένο χρονικό σημείο, η λεύκανση του δέρματος μπορεί να παραμένει για ένα παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Κατά αυτόν τον τρόπο, παρατηρείται η δημιουργία 'αποθηκών' της ΦΔΟ και η κινητική απομάκρυνσης της λόγω τοπικού μεταβολισμού ή συστηματικής κάθαρσης. Απεικονίζοντας το μέγεθος της απόκρισης σε σχέση με το χρόνο και υπολογίζοντας την επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUEC), διαφορετικές μορφοποιήσεις είναι δυνατόν να συγκριθούν. Αυτή είναι και η μέθοδος επιλογής για τον καθορισμό της βιοϊσοδυναμίας γενόσημων προϊόντων, όπως περιγράφεται από τις κανονιστικές οδηγίες του FDA για τις βιομηχανίες σχετικά με τα τοπικά δερματολογικά κορτικοστεροειδή σκευάσματα.

Η έλλειψη οργάνων σε αυτήν την μέθοδο αξιολόγησης έχει αποτελέσει αντικείμενο κριτικής, λόγω των πιθανών υποκείμενων λαθών. Παρόλ' αυτά, προσπάθειες που

έχουν γίνει με την χρήση συσκευής Chromameter, αν και προτείνεται από τον FDA, έχουν αποτύχει να αποδώσουν την επιθυμητή ακρίβεια (Schaefer, 2008).

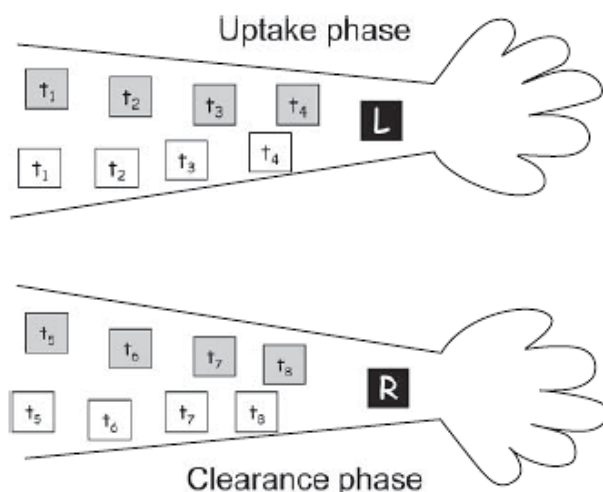
### 8.1.2 Μέθοδος Tape Stripping

Η μέθοδος Tape Stripping αποτελεί μία ελάχιστα επεμβατική διαδικασία δειγματοληψίας και αφαίρεσης κεράτινης στιβάδας. Περιλαμβάνει την διαδοχική



Εικόνα 45: Μέθοδος tape-stripping (Nicoli, 2012)

εφαρμογή και αφαίρεση μίας κολλητικής ταινίας στην επιφάνεια του δέρματος με απώτερο στόχο την συλλογή μικροσκοπικών στρωμάτων της κεράτινης στιβάδας



Εικόνα 44: Τρόπος δειγματοληψίας κεράτινης στιβάδας (Nicoli, 2012)

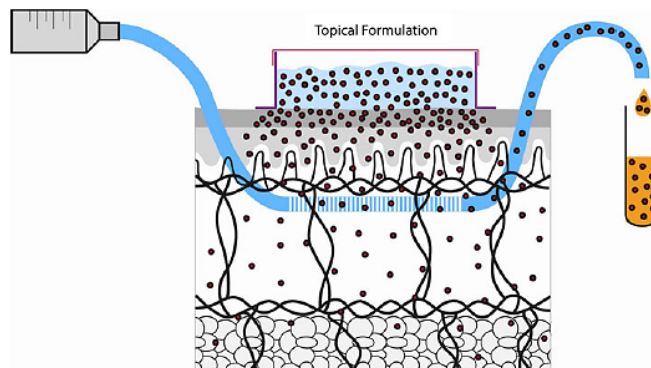
(0,2-1  $\mu\text{m}$ ). Συγκεκριμένα, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (τέσσερα χρονικά σημεία για την φάση πρόσληψης και τέσσερα για την φάση κάθαρσης), στρώματα της κεράτινης στιβάδας απομακρύνονται διαδοχικά από την περιοχή εφαρμογής με 12 κολλητικές ταινίες-οι πρώτες δύο απορρίπτονται και οι ταινίες 3 έως 12 συνδυάζονται και ποσοτικοποιούνται ως προς την ΦΔΟ. Οι πρώτες δύο απορρίπτονται λόγω της πιθανότητας ελλιπούς

απομάκρυνσης του προϊόντος από την επιφάνεια του δέρματος. Η όλη διαδικασία είναι σχετικά ανώδυνη και όχι ιδιαίτερα επεμβατική, καθώς μόνο νεκρά κύτταρα ενσωματωμένα στην λιπιδική μήτρα αφαιρούνται. Επιπλέον, ακόμα και αν διαταραχθεί ο φραγμός του δέρματος, μέσω ομοιοστατικών μηχανισμών, επανορθώνεται ταχέως στην αρχική του κατάσταση (Nicoli, 2012).

### 8.1.3 Μέθοδος Μικροδιάλυσης

Με τις βάσεις της στην νευροεπιστήμη, η τεχνική της μικροδιάλυσης έχει χρησιμοποιηθεί εδώ και αρκετά χρόνια για την παρακολούθηση της απορρόφησης και διάθεσης ΦΔΟ ή/και των επιπέδων ενδογενών ουσιών στον εξωκυττάριο χώρο διαφόρων οργάνων και υγρών όπως είναι τα κόκκαλα, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο εγκέφαλος και το αίμα.

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει έναν καθετήρα μικροδιάλυσης, δηλαδή ένα λεπτό κενό σωλήνα αποτελούμενο από μία ημιπερατή μεμβράνη με διάμετρο συνήθως γύρω στα 200-500μm, ο οποίος εμφυτεύεται μέσα στο δέρμα (Schaefer, 2008). Η αρχή της μπορεί να συγκριθεί με την λειτουργία ενός τεχνητού αγγείου. Ο καθετήρας, ο οποίος είναι διαπερατός στο νερό και σε μόρια μικρού μεγέθους, διαποτίζεται συνεχώς με



**Εικόνα 47:** Απεικόνιση μεθόδου μικροδιάλυσης (Holmgaard, 2012)

ρυθμιστικό φυσιολογικό διάλυμα υπό χαμηλή ροή. Ελεύθερα μόρια ουσιών, παρόντα στο εξωκυττάριο υγρό, μπορούν να διασχίσουν την ημιπερατή μεμβράνη και να εισέλθουν στο διάλυμα δέκτη με παθητική διάχυση, λόγω βαθμίδωσης της συγκέντρωσης στα δύο διαμερίσματα. Ο ρυθμός εισόδου των ουσιών στο εσωτερικό του καθετήρα είναι άμεσα εξαρτώμενος από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όπως είναι το μέγεθος, η διαλυτότητα στο μέσο καθώς και του φορτίου. Μόρια μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες και ένζυμα δεν μπορούν να διασχίσουν την μεμβράνη.

Βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την παρακολούθηση των επιπέδων των τοπικά εφαρμοζόμενων ουσιών σε πραγματικό χρόνο λόγω των διαδοχικών δειγματοληψιών. Πρόκληση παραμένει ακόμα το γεγονός ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ογκώδη χημικά μόρια ή σε μορφοποιήσεις με χαμηλή περιεκτικότητα της ΦΔΟ (Holmgaard, 2012).

## 8.2 In Vitro Μελέτες

Οι περισσότερες δημοσιεύσεις στο πεδίο της έρευνας της διαδερμικής απορρόφησης πραγματοποιούνται με την χρήση μίας μεγάλης ποικιλίας διατάξεων και πειραματικών πρωτοκόλλων, τα οποία διαφέρουν από εργαστήριο σε εργαστήριο. Για αυτό το λόγο, ο OECD εξέδωσε μία σειρά οδηγιών που καθορίζουν το σύνολο των πολυάριθμων ζητημάτων, τα οποία πρέπει να αντιμετωπιστούν σε ένα πειραματικό σχεδιασμό, ώστε να ληφθούν ουσιαστικά δεδομένα. Παρόλ' αυτά, οι οδηγίες αυτές επιτρέπουν σημαντικές παραλλαγές στο σχεδιασμό των πρωτοκόλλων, οι οποίες αν και ως ένα σημείο είναι επιθυμητές για να διασφαλισθεί ότι η συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόζει συνθήκες οι οποίες είναι σχετικές και κατάλληλες για την συλλογή των δεδομένων, ορισμένοι ειδικοί πιστεύουν ότι είναι πολύ ανακριβείς για να έχουμε επικύρωση της ακρίβειας και επαναληψιμότητας των δεδομένων. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο OECD έχει διατυπώσει οδηγίες και όχι ένα

καθορισμένο πρωτόκολλο, το οποίο μπορεί να εφαρμοσθεί απευθείας χωρίς να έχει προηγηθεί εκτεταμένη μελέτη της φύσης του υπό εξέταση υλικού, του ενδεχομένου έκθεσης και του απώτερου στόχου της μελέτης. Σύμφωνα λοιπόν με αυτές τις οδηγίες, πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων, είναι σημαντικό να αναλυθούν και να τεκμηριωθούν οι παρακάτω παράμετροι (Finnin, 2012).

### 8.2.1 Επιλογή Κυττάρου Διάχυσης

Η επιλογή του κυττάρου διάχυσης που θα χρησιμοποιηθεί καθορίζεται από το αντικείμενο του πειράματος και την προτίμηση του ερευνητή. Υπάρχουν διαθέσιμοι τρεις βασικοί τύποι: 1) Δι-διαμερισματικό (οριζόντιο), 2) Μονο-διαμερισματικό στατικό (κατακόρυφο), 3) Μονο-διαμερισματικό συνεχούς ροής (κατακόρυφο). Ανεξαρτήτως του τύπου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, είναι σημαντικό το υλικό από το οποίο το κύτταρο αποτελείται να μην αλληλεπιδρά με τις υπό εξέταση ουσίες. Για αυτόν τον λόγο είναι συνήθως υάλινα ή από Teflon (Finnin, 2012).

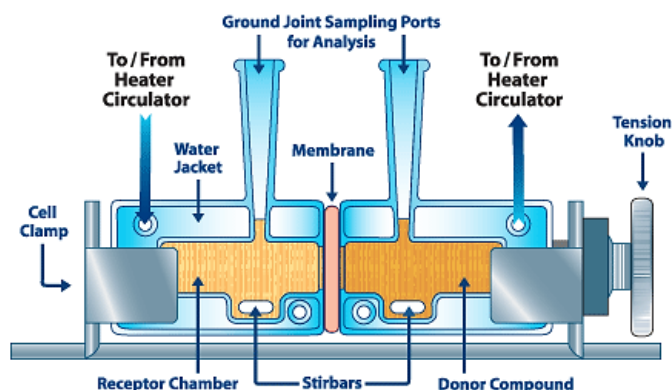
- Δι-διαμερισματικό Κύτταρο Διάχυσης (οριζόντιο)

Σε αυτήν την διάταξη η μεμβράνη επιλογής σταθεροποιείται μεταξύ δύο οριζόντια τοποθετημένων διαμερισμάτων, το καθένα πληρωμένο με μία “πεπερασμένη”

ποσότητα υδατικού (στις περισσότερες περιπτώσεις) διαλύματος και μετράται ο ρυθμός μετακίνησης της προς μελέτης ουσίας από το εξωτερικό προς το εσωτερικό. Δεν

προτιμάται ευρέως λόγω του ότι δεν προσομοιάζει

την ζώσα κατάσταση, καθώς το δέρμα φυσιολογικά είναι εκτεθειμένο στο ξηρό περιβάλλον του αέρα (Finnin, 2012).



Εικόνα 48: Δι-διαμερισματικό Κύτταρο Διάχυσης (PermeGear, 2020)

- Μονο-διαμερισματικό Στατικό Κύτταρο Διάχυσης (κατακόρυφο)

Το στατικό κύτταρο διάχυσης διαμορφώθηκε ειδικά για την μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης σε συνθήκες, οι οποίες προσομοιώνουν όσο το δυνατόν περισσότερο εκείνες που συναντώνται στην καθημερινή ζωή. Σε αυτήν την διάταξη, το δέρμα σταθεροποιείται μεταξύ ενός κατώτερου διαμερίσματος (διαμέρισμα δέκτη) πληρωμένου με το διάλυμα δέκτη και ενός ανώτερου τμήματος (διαμέρισμα δότη), στο οποίο τοποθετείται η μορφοποίηση και είναι εκτεθειμένο στις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το διαμέρισμα του δότη, είναι εύκολα προσβάσιμο για την απευθείας εφαρμογή υγρών μορφοποιήσεων ή, με προσωρινή αφαίρεση του, για την εφαρμογή ημιστερεών μορφών οι οποίες απαιτούν άπλωμα προς διασφάλιση ομοιογενούς κατανομής σε όλη την υπό μελέτη επιφάνεια,. Επιπλέον, επιτρέπει την διεξαγωγή επιφανειακών πλύσεων αν απαιτείται να γίνει προσομοίωση αυτού του είδους από τα *in vivo* δεδομένα.

Το διαμέρισμα του δέκτη πληρώνεται από κάποια μορφή υδατικού διαλύματος, με ισότονο φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα να είναι η πιο συνήθης επιλογή, και η θερμοκρασία του ρυθμίζεται από θερμοστατούμενο νερό που κυκλοφορεί στο εσωτερικό του μανδύα, ο οποίος περιβάλλει το διαμέρισμα, και διατηρεί σταθερή θερμοκρασία δέρματος στους 32° C. Σε κύτταρα που δεν διαθέτουν μανδύα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατόλουτρο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας. Ομοιογενής κατανομή της θερμοκρασίας στο διάλυμα υποδοχέα, διασφαλίζεται από ένα κινούμενο μαγνητικό αναδευτήρα καλυμμένο με Teflon. Αν και αρκετοί ερευνητές προτιμούν άντληση ενός μέρους από το διάλυμα υποδοχέα προς ανάλυση, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πιθανή απώλεια των συνθηκών δεξαμενής με την πάροδο του χρόνου και πιθανή υποεκτίμηση των επιπέδων της ΦΔΟ. Εναλλακτικά, προτείνεται η πλήρης απομάκρυνση του διαμερίσματος υποδοχέα σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας και η αντικατάστασή του με φρέσκο διάλυμα (Finnin, 2012).

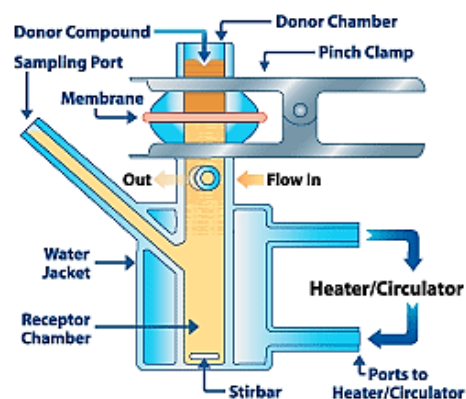
- Μονο-διαμερισματικό Κύτταρο Συνεχούς Ροής (κατακόρυφο)

Ο τρίτος τύπος κυττάρου διάχυσης προτάθηκε από τους Bronaugh and Stewart. Όπως και στο στατικό κύτταρο διάχυσης, ακολουθείται η βασική φιλοσοφία

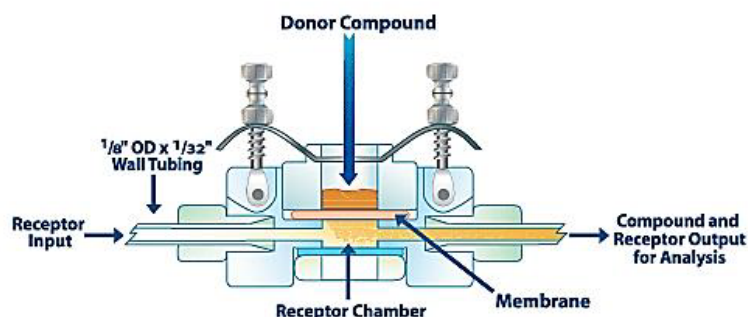
προσομοίωσης των *in vivo* συνθηκών, αλλά διαθέτει το επιπλέον

πλεονέκτημα της αυτοματοποίησης της δειγματοληπτικής

διαδικασίας με την συνεχόμενη άντληση διαλύματος



Εικόνα 49: Μονο-διαμερισματικό Στατικό Κύτταρο Διάχυσης (PermeGear, 2020)



Εικόνα 50: Μονο-διαμερισματικό Κύτταρο Συνεχούς Ροής (PermeGear, 2020)

υποδοχέα από το διαμέρισμα δέκτη. Μία παράμετρος, που πρέπει να ληφθεί υπόψη σε αυτόν τον τύπο είναι η σχέση μεταξύ όγκου διαλύματος υποδοχέα, ρυθμού ροής και ευαισθησίας αναλυτικής μεθόδου. Ωστε να επιτευχθεί η επιτυχής προσομοίωση των *in vivo* δεδομένων, ο ρυθμός ροής πρέπει να αντικαθιστά πλήρως τον όγκο του διαλύματος υποδοχέα πολλές φορές σε κάθε διάστημα δειγματοληψίας, χωρίς όμως να γίνεται μεγάλη αραίωση του διαλύματος και η ποσότητα του συστατικού βρεθεί εκτός του ορίου ποσοτικοποίησης (Finnin, 2012).

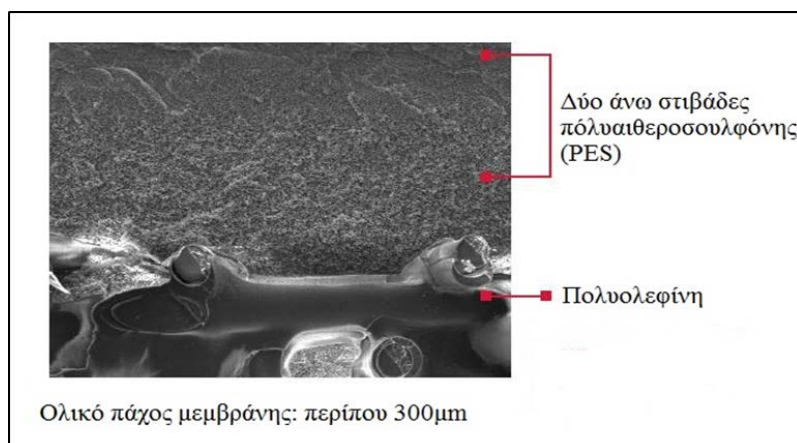
## 8.2.2 Επιλογή Μεμβράνης

Ένας βασικός παράγοντας μεταβλητότητας, κατά τον σχεδιασμό των *in vitro* πειραμάτων διαπερατότητας, είναι η φύση της μεμβράνης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Για όλα τα *in vitro* πειράματα το ανθρώπινο δέρμα θεωρείται ως η “χρυσή λύση” και παρέχεται από διάφορες πηγές, όπως η πλαστική χειρουργική και οι ακρωτηριασμοί, από περιοχές του σώματος όπως είναι η κοιλιακή χώρα, η πλάτη, ο μηρός και το στήθος. Αν και αποτελεί μεμβράνη επιλογής, μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική μεταβλητότητα στα εξαγόμενα αποτελέσματα, της τάξης του 45%, λόγω διαφορών στην λιπιδική σύσταση, στο πάχος κλπ. Μετά την εκτομή, το υποδόριο λίπος θα πρέπει να απομακρύνεται ταχέως και το δέρμα να αποθηκεύεται σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης στους  $-20^{\circ}\text{C}$  με  $-30^{\circ}\text{C}$  σε σφραγισμένες πλαστικές σακούλες. Υπό αυτήν την μορφή μπορεί να αποθηκευτεί για πολλούς μήνες χωρίς να καταστρέφεται ο δερματικός φραγμός, δεδομένου ότι αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη απόψυξη και ψύξη. Το δέρμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό τις παρακάτω μορφές:

- Πλήρους πάχους δέρμα (Full Thickness): Το δέρμα που διαθέτει όλα τα στρώματα και παραλαμβάνεται μετά την αφαίρεση του υποδόριου λίπους με νυστέρι. Τα λιπιδικά στρώματα που δεν μπορούν να απομακρυνθούν, καθαρίζονται με γάζα διαποτισμένη με αλκοόλη.
- Δερμοτομημένο δέρμα (Dermatomed Skin or Split Skin): Χρησιμοποιείται για την παραλαβή δέρματος σταθερού πάχους, συνήθως 200–400  $\mu\text{m}$ , με αφαίρεση ορισμένων εσωτερικών στρωμάτων.
- Επιδερμίδα: Συνήθως παραλαμβάνεται αποκολλώντας την από την δερμίδα, με προσεκτικές κινήσεις, μετά την θέρμανση του δέρματος πλήρους πάχους στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 30–120s, κατά την οποία σπάει η δερμο-επιδερμική σύζευξη. Η μεταχείριση αυτή έχει βρεθεί ότι δεν επηρεάζει τον φραγμό του δέρματος.
- Αναγεννημένα Ισοδύναμα Ανθρώπινης Επιδερμίδας (Reconstructed Human Epidermis Equivalents): Λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας του ανθρώπινου δέρματος, έχουν αναπτυχθεί ισοδύναμα της ανθρώπινης επιδερμίδας από ιστοκαλλιέργειες. Αυτή την στιγμή βρίσκονται υπό μελέτη για να διαπιστωθεί η καταλληλότητα χρήσης τους σε *in vitro* πειράματα.

Η περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα του ανθρωπίνου δέρματος, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ανάγκη για ελέγχους βιοδιαθεσιμότητας νέων δερματολογικών τοπικών προϊόντων, έχει προάγει την ανάγκη για εναλλακτικά μοντέλα. Οπότε η στρόφη σε ζωικά πρότυπα όπως τα ποντίκια, οι χοίροι κλπ φαίνεται προφανής. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το δέρμα των χοίρων είναι εκείνο που προσεγγίζει περισσότερο αυτό του ανθρωπίνου δέρματος, στα εξαγόμενα αποτελέσματα. Αν και η



**Εικόνα 51:** Δομή μεμβράνης Strat-M® (Sigmaaldrich, 2020)

εναλλακτική λύση στην χρήση μοντέλων ανθρωπίνου και ζωικού δέρματος, ήταν η ανάπτυξη συνθετικών μεμβρανών. Η χρήση τους παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των ζωντανών ιστών, ορισμένα από τα οποία είναι το καθορισμένο πάχος των μεμβρανών, ο μικρότερος χρόνος προετοιμασίας, ο μικρός χώρος αποθήκευσης, και το σχετικά χαμηλό κόστος. Όμως, η πλειονότητα των συνθετικών μοντέλων στερείται της βιολογικής σύνθεσης της ισχυρά οργανωμένης κεράτινης στιβάδας, των μεταβολικών διαδικασιών, και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που ανιχνεύονται στην ανθρώπινη επιδερμίδα. Για αυτό το λόγο, οι μεμβράνες Strat-M®, που αναπτύχθηκαν τελευταία, σχεδιάστηκαν ώστε να προσεγγίζουν τα δομικά και χημικά χαρακτηριστικά της επιδερμίδας, μιμούμενες την στρωματοειδή δομή και την λιπιδική φύση του ανθρωπίνου δέρματος. Το πάχος κάθε μεμβράνης Strat-M® κυμαίνεται γύρω στα 300 μm, αποτελούμενη από δύο στιβάδες πολυαιθεροσουλφόνης (μεγαλύτερης αντίστασης στη διάχυση) πάνω σε μία στιβάδα πολυολεφίνης (μικρότερης αντίστασης στη διαπερατότητα) με διάσπαρτες δομές συνθετικών λιπιδίων. Τα στρώματα της μεμβράνης, από το εξωτερικό προς το εσωτερικό της, είναι αυξανόμενου πορώδους και πάχους προς μίμηση των διαφορετικών δερματικών στρωμάτων. Κατά αυτόν τον τρόπο, προσφέρει ικανοποιητική προβλεψιμότητα σε σχέση με τις μετρήσεις που επιτελούνται σε δέρμα, χωρίς σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των μετρήσεων και περιορισμούς όσον αφορά την ασφάλεια και την αποθήκευσή της. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πληθώρα φαρμακευτικών ουσιών, σε όλες τις διαθέσιμες τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές, παρουσία ή όχι ενισχυτών διαπερατότητας (Haq, 2018)

χρήση τους αναφέρεται ακόμα από τις αρμόδιες αρχές, μόνο η εκτέλεση πειραμάτων με ανθρωπινό δέρμα είναι αποδεκτή για την αξιολόγηση της διαπερατότητας (Schaefer, 2008).

Μία από τις τελευταίες προσεγγίσεις που αναπτύχθηκαν ως

### 8.2.3 Επιλογή Διαλύματος Υποδοχέα

Το διάλυμα υποδοχέα πρέπει να έχει ικανή διαλυτότητα για το υπό μελέτη συστατικό, έτσι ώστε να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης, με τον ρυθμό της απορρόφησης να προσεγγίζει αυτόν που θα ανιχνευόταν *in vivo* παρουσία κυκλοφορικού συστήματος. Για υδατοδιαλυτά συστατικά, φυσιολογικό ορός ή ισοτονικό ρυθμιστικό διάλυμα ( $\text{pH} \sim 7.4$ ), θεωρούνται η λογική επιλογή για την διατήρηση ενός φυσιολογικού περιβάλλοντος. Οι διεθνείς ειδικοί στον τομέα της διαδερμικής απορρόφησης συναινούν στο ότι, διάλυμα υποδοχέα με διαλυτότητα του εξεταζόμενου συστατικού 10 φορές μεγαλύτερη από την συγκέντρωση του στις πειραματικές συνθήκες, είναι ικανό να διατηρήσει συνθήκες δεξαμενής και να ελαχιστοποιήσει την ροή προς το διαμέρισμα του δότη.

Συντηρητικά δεν είναι πάντα απαραίτητα, αλλά χρησιμοποιούνται πολλές φορές για την αποτροπή μικροβιακής επιμόλυνσης, λόγω της μεγάλης διάρκειας των πειραμάτων. Πριν την προσθήκη του, είναι σημαντικό να αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει την αξιολόγηση του υπό εξέταση συστατικού ή την λειτουργία φραγμού. Η χρήση οργανικών διαλυτών, όπως είναι η αιθανόλη, είναι καλό να αποφεύγονται διότι μπορεί να επηρεάσουν τον φραγμό του δέρματος. Αν είναι απαραίτητο να προστεθούν για αύξηση της διαλυτότητας του διαλύματος υποδοχέα, είναι επιβεβλημένο να δικαιολογηθεί η απουσία αλλαγών της ακεραιότητας του (Finnin, 2012).

### 8.2.4 Διεξαγωγή Πειράματος Διαπερατότητας

#### Ακεραιότητα Μεμβράνης

Όταν η μεμβράνη έχει επιλεγεί και τοποθετηθεί στην καθορισμένη-ανάλογα με την διάταξη-θέση, μπορεί να απαιτηθεί η αξιολόγηση της ακεραιότητά της για να διασφαλισθεί η εγκυρότητα των πειραματικών δεδομένων. Αν και τις περισσότερες φορές η απλή οπτική παρατήρηση αποτελεί ποιοτική ένδειξη της ύπαρξης ασυνέχειας, μπορεί να πραγματοποιηθεί και ποσοτική μέτρηση της διαδερμικής απώλειας ύδατος ή της ροής μίας πρότυπης ουσίας.

#### Εφαρμογή Της Εξεταζόμενης Μορφοποίησης

Για την εξεταζόμενη μορφοποίηση, μία κατάλληλη διαδικασία εφαρμογής πρέπει να ακολουθηθεί. Το σύνηθες σενάριο των πειραμάτων διαπερατότητας υποδηλώνει την εφαρμογή της υπό εξέτασης ΦΔΟ σε πεπερασμένη δόση, με αποτέλεσμα κατά την διάρκεια του πειράματος να ανιχνεύεται σημαντική μείωση της συγκέντρωσής της στο διαμέρισμα δότη. Η μείωση αυτή, όπως είναι λογικό, αντανakλάται και σε μείωση του ρυθμού διαπέρασης και τελικά στην δημιουργία πλατό στο αθροιστικό προφίλ απορρόφησης. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή ενός διαδερμικού

θεραπευτικού συστήματος μπορεί να δημιουργήσει συνθήκες άπειρης δόσης της ΦΔΟ, κατά τις οποίες υπάρχει ικανή ποσότητα της στο διαμέρισμα του δότη ώστε αλλαγές της συγκέντρωσης της στο τελευταίο να θεωρούνται αμελητέες.

#### Διάρκεια Πειράματος

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι για την διάρκεια των πειραμάτων διαπερατότητας, χρονικό διάστημα 24 ή 48 ωρών είναι ικανοποιητικό. Παρόλ' αυτά, για την αξιολόγηση της διαπερατότητας από μακροπρόθεσμα θεραπευτικά συστήματα, μπορεί να απαιτηθεί η επέκταση της δειγματοληψίας μέχρι τις 72 ώρες ή και περισσότερο. Σε αυτές τις περιπτώσεις προτείνεται η χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στο διάλυμα του υποδοχέα.

#### Συχνότητα Δειγματοληψίας

Τα χρονικά διαστήματα της δειγματοληψίας πρέπει να είναι αρκετά συχνά ώστε να επιτραπεί η εκτίμηση του χρόνου υστέρησης (lag – time), της σταθερής κατάστασης κλπ. Για ένα συστατικό με άγνωστο προφίλ διαπερατότητας, μπορεί να κριθεί απαραίτητη η πραγματοποίηση πιλοτικών δοκιμών με δειγματοληψίες ανά δύο ώρες καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Δειγματοληψίες στις πρώτες ώρες της μελέτης (1-4 ώρες) μπορεί να είναι σημαντικές για την ταυτοποίηση κυττάρων διάχυσης με κατεστραμμένες μεμβράνες δέρματος οι οποίες συχνά εμφανίζουν παράδοξα αποτελέσματα.

#### Αριθμός Επαναλήψεων

Λόγω της υψηλής μεταβλητότητας που χαρακτηρίζει το ανθρώπινο δέρμα και του κινδύνου απώλειας κυττάρων, ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε μορφοποίηση προτείνεται να είναι 5 στον αριθμό. Μικρότερος αριθμός επιτρέπεται σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται τεχνητές μεμβράνες, οι οποίες εμφανίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα και είναι σταθερότερες σε μια πειραματική διάταξη (Finnin, 2012).

## 9. Υδροβρωμική Γκαλανταμίνη

### 9.1 Εισαγωγή

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας, και εκτιμάται ότι γύρω στους 44 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως πάσχουν από αυτήν. Τα πρώτα συμπτώματά της συνήθως εμφανίζονται γύρω στα 60 έτη και καθώς ο μέσος όρος ηλικίας του πληθυσμού αυξάνεται, η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισής της έχει αρχίσει να αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας.

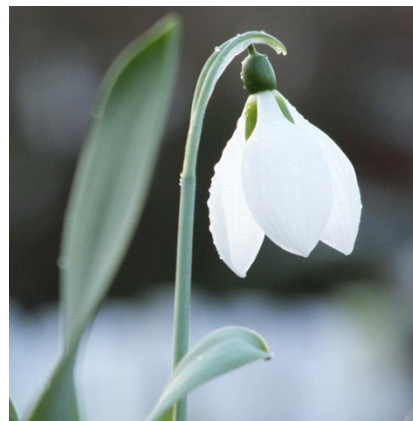
Παραδοσιακά, αντικείμενο των κλινικών μελετών για την θεραπεία του Αλτσχάιμερ είναι η συμπτωματική βελτίωση των γνωστικών ικανοτήτων. Χρησιμοποιώντας αυτό ως κύριο στόχο, σε συμφωνία με τις κανονιστικές αρχές, οι αναστολείς χολινεστεράσης έχουν παρουσιάσει τις καλύτερες ενδείξεις αποτελεσματικότητας στην νόσο. Παρόλ' αυτά, η αξιολόγηση άλλων λειτουργιών όπως είναι οι λειτουργικές ικανότητες και η συμπεριφορά, σε συνδυασμό με τις γνωστικές, απαιτείται για την πλήρη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της θεραπείας. Τελευταίες οδηγίες για την αντιμετώπιση του Αλτσχάιμερ στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, επεσήμαναν την αμφίβολη δράση τέτοιων ΦΔΟ στην βελτίωση των λειτουργικών ικανοτήτων και της συμπεριφοράς. Επιπροσθέτως, σε μια εξελισσόμενη νόσο, όπως είναι η συγκεκριμένη, η μακροπρόθεσμη καθυστέρηση της εκφύλισης αυτών των ικανοτήτων μπορεί να αποδειχθεί ως σημαντικότερο πλεονέκτημα, από την εκδήλωση παροδικής βελτίωσης. Δημοσιευμένα δεδομένα από μελέτες δύο εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων χολινεστεράσης, της δονεζεπίλης και ριβαστιγμίνης, υποδεικνύουν ότι οι γνωστικές ικανότητες, όπως αξιολογούνται από την κλίμακα Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog), πέφτουν υπό της γραμμής βάσης μετά από 38 και 40 εβδομάδες αντιστοίχως.

Ως αποτέλεσμα, λοιπόν, των περιορισμών των συμβατικών αναστολέων χολινεστεράσης, δόθηκε πλέον βάση στην ανάπτυξη παραγόντων με πρόσθετους στόχους δράσης ώστε να έχουν μεγαλύτερη και πιο μακροπρόθεσμη διάρκεια δράσης. Η Γκαλανταμίνη είναι ένα καινοτόμο θεραπευτικό μόριο, το οποίο τροποποιεί αλλοστερικά τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs) σε συνδυασμό με την αναστολή της ακέτυλοχολινεστεράσης. Σε μία εκτεταμένη κλινική μελέτη σε ασθενείς με Αλτσχάιμερ, έχει βρεθεί ότι η Γκαλανταμίνη παρουσιάζει ευρεία και μακροπρόθεσμη βελτίωση των γνωστικών και λειτουργικών ικανοτήτων για τουλάχιστον 52 εβδομάδες. Επιπλέον, καθυστερεί την εμφάνιση των συμπτωμάτων συμπεριφοράς. Τα αποτελέσματά της αυτά είναι συνεπή μεταξύ των διαφορετικών μελετών. Μάλιστα, οι αρμόδιες αρχές σε Αγγλία και Αμερική συμφωνούν ότι μόνο η γκαλανταμίνη έχει εμφανίσει δράση σε γνωστικές, λειτουργικές ικανότητες καθώς και στην συμπεριφορά.

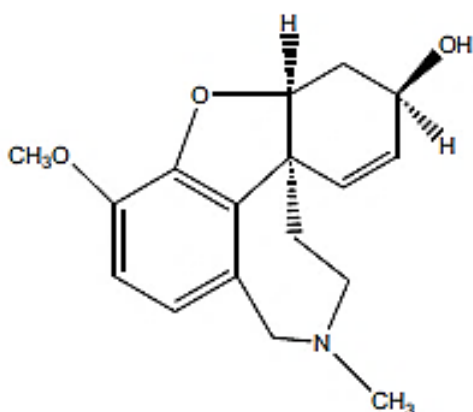
Αυτήν την στιγμή συνεχίζουν να πραγματοποιούνται μελέτες για την εκτίμηση της μακροπρόθεσμης δράσης της και μελετάται η αποτελεσματικότητά της σε άλλες μορφές άνοιας (Lilienfeld, 2002).

## 9.2 Χημική Δομή και Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά

Η Γκαλανταμίνη, ένα τριτοταγές αλκαλοειδές, έχει απομονωθεί από τους βολβούς των Καυκάσιων φυτών ‘snowdrops’, *Galanthus woronowi*. Έχει επίσης απομονωθεί από το κοινό ‘snowdrop’ και από μερικά φυτά *Amaryllidaceae*. Το χημικό όνομα της Γκαλανταμίνης είναι (4aS, 6R, 8aS)-4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-6H-benzofuro[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol με εμπειρικό τύπο  $C_{17}H_{21}NO_3$  και μοριακό βάρος 287,35.



Εικόνα 52: *Galanthus woronowi* (Ogden, 2020)



Εικόνα 53: Χημικό μόριο γκαλανταμίνης (Janssen Pharmaceuticals, 2013)

(Lilienfeld, 2002). Απ

στελεί μία ασθενή βάση με μία σταθερά ιονισμού λόγω της αζεπινικής ομάδας ( $pK_a=8,2$ ). Έχει ασθενώς λιπόφιλο χαρακτήρα όπως φαίνεται από τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης/ρυθμιστικού διαλύματος ( $pH$  12,0), ο οποίος ισούται με 1,1. Σύμφωνα με το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Κατάταξης (Biopharmaceutics Classification System- BCS) μπορεί να θεωρηθεί ως φάρμακο Κατηγορίας I

καθώς είναι μόριο υψηλής διαλυτότητας και διαπερατότητας. (Janssen, 2000)

Το υδροβρωμικό άλας της ουσίας είναι μία λευκή προς υπόλευκη κόνη μοριακού βάρους 368,27 και σημείου τήξεως  $246^{\circ}C-247^{\circ}C$ . (Janssen Pharmaceuticals, 2013). Η διαλυτότητά της στο νερό ( $25^{\circ}C$ ), σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, είναι ίση με 35mg/mL, και παραμένει σχετικά σταθερή σε εύρος  $pH$  5,0 με 7,5 (Alexis Kays Leonard, 2005). Σε άλλες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ρυθμιστικών φωσφορικών διαλυμάτων στους  $37^{\circ}C$ , έγινε εκτίμηση για διαλυτότητα της τάξης των 60 mg/mL (Khatavkar, 2013).

### 9.3 Φαρμακολογικές δράσεις και Ανεπιθύμητες Ενέργειες

#### Νόσος Αλτσχάιμερ

##### Παθοφυσιολογία της Νόσου

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μία πάθηση που προκαλείται από την εκφύλιση των νευρώνων ως αποτέλεσμα δράσης διαφόρων παραγόντων:

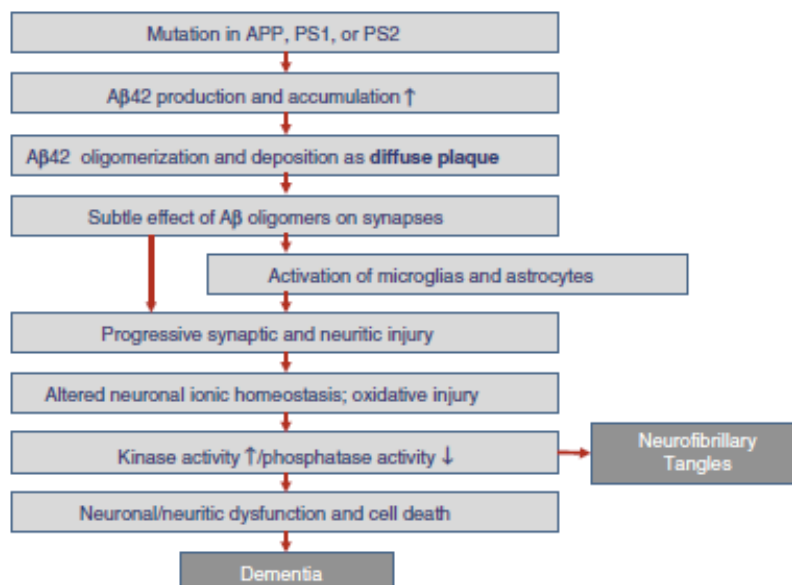
➤ Ακετυλοχολίνης:

Είναι ευρέως γνωστό ότι η νόσος Parkinson εκδηλώνεται λόγω της μείωσης των επιπέδων του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη. Οπότε, ορισμένοι ερευνητές υπέθεσαν ότι κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με το Αλτσχάιμερ και μελέτησαν τα επίπεδα της ακετυλοχολίνης-ενός νευροδιαβιβαστή που σχετίζεται με την μνήμη. Πράγματι, παρατήρησαν την δραστική μείωση της έκκρισης ακετυλοχολίνης, αποτέλεσμα της: 1)μειωμένης δραστικότητας του ενζύμου ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης, 2)εκφύλισης χολινεργικών νευρώνων, και 3)μείωσης των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (nAChRs). Ως εκ τούτου θεωρήθηκε ότι η μείωση της ακετυλοχολίνης είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της νόσου (“acetylcholine hypothesis”) και ότι η αποκατάσταση των επιπέδων της θα προκαλούσε και ανάσχεσή της.

➤ β-Αμυλοειδούς:

Το β-αμυλοειδές είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 4.000 kDa, η οποία δημιουργεί πλάκες και εγκεφαλοαγγειακά αμυλοειδή, αυξάνοντας παράλληλα την

δραστηριότητα των κινασών και προκαλώντας τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Σχηματίζεται από την ταυτόχρονη επίδραση των ενζύμων της β και γ σεκρετάσης στην διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, APP.



**Εικόνα 54:** Μηχανισμοί πρόκλησης νόσου Alzheimer (Kudo, 2016)

Οι πλάκες αμυλοειδούς

σχηματίζονται από την ενζυμική αποικοδόμηση του β-αμυλοειδούς, από την οποία τα τμήματα που προκύπτουν, σχηματίζουν ινίδια τα οποία τελικώς

καθιζάνουν. Αυτά είτε εναποτίθενται στον μεσοκυττάριο χώρο του εγκεφαλικού παρεγχύματος υπό μορφή πλακών ή στα τοιχώματα των αγγείων του εγκεφάλου προκαλώντας αγγειοπάθεια.

➤ Πρωτεΐνης Ταυ:

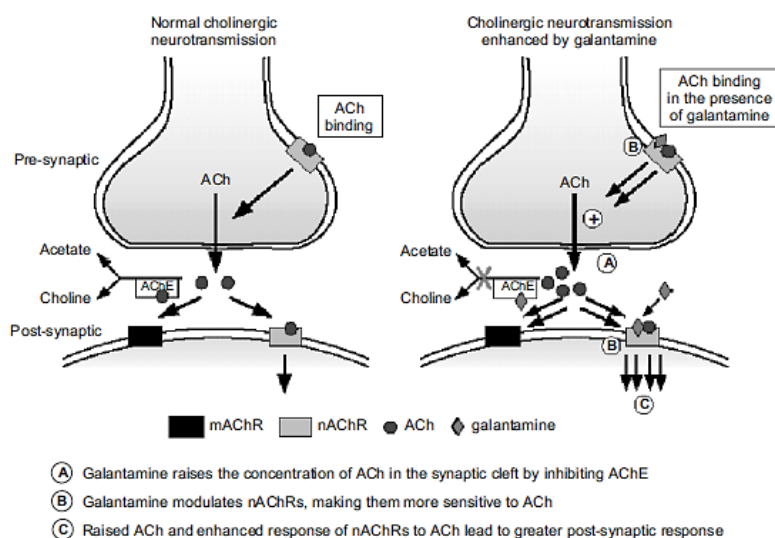
Στο εσωτερικό των νευρώνων, υπάρχουν πρωτεΐνες υπό μορφή μικροσωληνίσκων που αποτελούν τον κυτταροσκελετό. Η πρωτεΐνη Ταυ συνδέεται με αυτούς μέσω επαναλαμβανόμενων περιοχών της και τους σταθεροποιεί. Όταν η πρωτεΐνη αυτή φωσφορυλιώνεται εκτεταμένα από τις κινάσες (ενεργοποιούνται από το μονοπάτι του αμυλοειδούς), χάνει πλέον την ικανότητα σύνδεσης της. Κατά αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται η συγκέντρωση της ελεύθερης μορφής της σε υψηλές ενδοκυτταροπλασματικές τιμές και υφίσταται αυτό-πολυμερισμό προκαλώντας νευροϊνιδιακές αλλαγές (Kudo, 2016).

### Μηχανισμός Δράσης Γκαλανταμίνης

Η Γκαλανταμίνη διαθέτει έναν μοναδικό διπλό μηχανισμό δράσης, συνδυάζοντας την αναστρέψιμη, ανταγωνιστική αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) με την θετική αλλοστερική τροποποίηση των νικοτινικών υποδοχέων ακετυλοχολίνης (nAChRs). Είναι η μόνη εμπορικά εγκεκριμένη ΦΔΟ, για την θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ, η οποία έχει παρουσιάσει και τους δύο μηχανισμούς δράσης.

➤ Αναστολή Ενζύμου Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE):

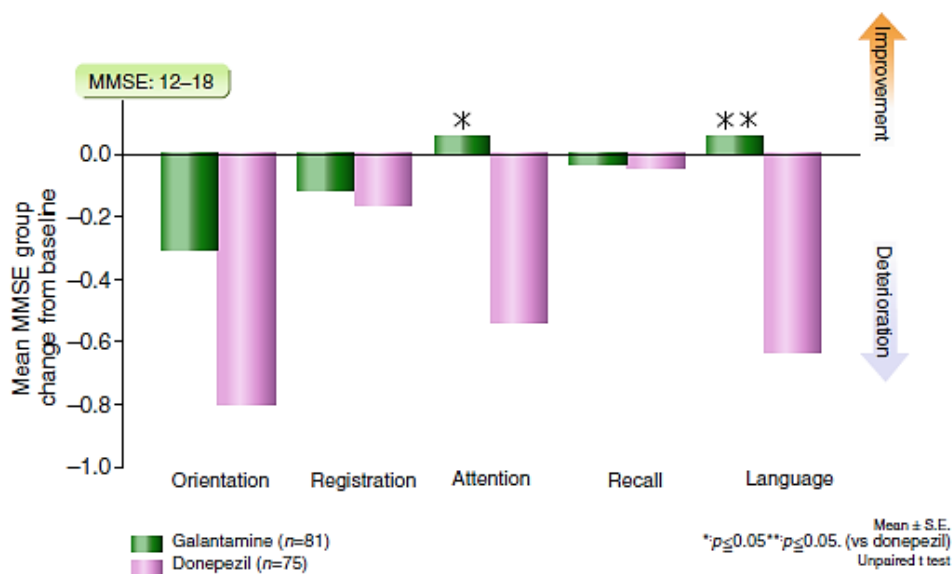
Η Γκαλανταμίνη αναστέλλει την αποικοδόμηση της ακετυλοχολίνης μέσω ανταγωνιστικής και αναστρέψιμης σύνδεσης στο ενεργό κέντρο της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), ενζύμου υπεύθυνου για τον μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ανασταλτική δράση της στις περιοχές του μετωπιαίου φλοιού και του ιππόκαμπου, οι οποίες φαίνεται ότι πλήττονται περισσότερο σε ασθενείς που εμφανίζουν την νόσο (Lilienfeld, 2002).



Εικόνα 55: Απεικόνιση συναπτικής σχισμής νευρώνων (Lilienfeld, 2002)

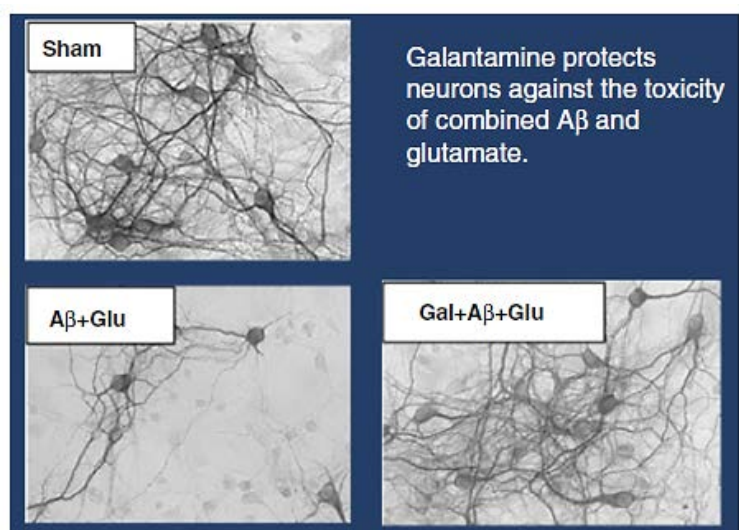
➤ Τροποποίηση Νικοτινικών Υποδοχέων Ακετυλοχολίνης (nAChRs):

Η γκαλανταμίνη συνδέεται αλλοστερικά με τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (ιδίως με τους  $\alpha_7$  και  $\alpha_4\beta_2$  υποτύπους) μέσω δευτερεύουσας θέσης πρόσδεσης, διαφορετικής από εκείνη που δρα η ακετυλοχολίνη. Οι αλλοστερικοί τροποποιητές δεν είναι ικανοί από μόνοι τους να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα, αλλά όταν συνδέονται ταυτοχρόνως με το κύριο υπόστρωμα, προκαλούν την αυξημένη ενεργοποίησή του. Η σύνδεση αυτή βελτιώνει το προφίλ γνωστικών ικανοτήτων σημαντικά σε σχέση με άλλα δραστικά μόρια που προορίζονται για αυτήν την νόσο, όπως φαίνεται και από το παρακάτω γράφημα (Lilienfeld, 2002):



**Εικόνα 56:** Επίδραση υδροβρωμικής γκαλανταμίνης στις γνωστικές ικανότητες (Davis, 2016)

Εκτός της χολινεργικής δράσεως που εμφανίζει η γκαλανταμίνη λόγω τροποποίησης των Νικοτινικών Υποδοχέων Ακετυλοχολίνης, αναφορές από μελέτες έχουν γίνει για προστασία των νευρώνων από την τοξικότητα του συνδυασμού γλουταμικού και  $\beta$ -αμυλοειδούς και ενίσχυση της κάθαρσης του  $\beta$ -αμυλοειδούς, η οποία λόγω της νόσου μπορεί να μειωθεί μέχρι και 30% (Davis, 2016).



**Εικόνα 57:** Απεικόνιση της προστατευτικής δράσης της γκαλανταμίνης στους νευρώνες (Davis, 2016)

### Ανεπιθύμητες Ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι αποτέλεσμα της χολινεργικής δράσης του μορίου σε άλλους ιστούς, πέραν του εγκεφάλου, οι κυριότερες εκ των οποίων συνοψίζονται παρακάτω:

- Δερματικές Αντιδράσεις Υπερευαισθησίας: Σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις, όπως το σύνδρομο Stevens-Johnson και η οξεία γενικευμένη εξανθηματική φλυκταίνωση, έχουν παρατηρηθεί κατά την χρήση προϊόντων που περιέχουν γκαλανταμίνη. Σε περίπτωση εμφάνισης εξανθήματος, θα πρέπει να γίνεται άμεσα διακοπή της θεραπείας και αντικατάστασή της, εκτός και αν αυτό οφείλεται ξεκάθαρα σε παράγοντες μη εξαρτώμενους από την ΦΔΟ.
- Αναισθητική Δράση: Η γκαλανταμίνη, ως αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης, είναι πιθανό να αυξάνει τα αποτελέσματα του νευρομυϊκού αποκλεισμού που προκαλείται από την σουκυνιλοχολίνη τύπου Ι και άλλους παράγοντες που προκαλούν αναισθησία.
- Καρδιαγγειακές παθήσεις: Εξαιτίας, της φαρμακολογικής τους δράσης, οι αναστολείς της AChE, ασκούν βαγοτονική επίδραση σε φλεβόκομβο και κολποκοιλιακό κόμβο, οδηγώντας στην εκδήλωση βραδυκαρδίας και κολποκοιλιακού αποκλεισμού. Βραδυκαρδία και άλλοι τύποι καρδιακού αποκλεισμού έχουν αναφερθεί σε ασθενείς ανεξαρτήτως του αν εμφάνιζαν ή όχι προηγουμένως υποκείμενο καρδιακό νόσημα.
- Γαστρεντερικές παθήσεις: Οι χολινομιμητικές ΦΔΟ αναμένεται να προκαλούν αύξηση του γαστρικού οξέος λόγω της αυξημένης χολινεργικής δραστηριότητας. Κατ' επέκταση, οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά για συμπτώματα αιμορραγίας του γαστρεντερικού, ιδίως εκείνοι με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ελκών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σύμφωνα με κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, η γκαλανταμίνη δεν φαίνεται να αυξάνει-σε σχέση με το placebo-την εκδήλωση πεπτικών ελκών ή την γαστρεντερική αιμορραγία. Έχει γίνει όμως εκτεταμένη αναφορά, από μεγάλη μερίδα ασθενών, για συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια, έμετοι, ανορεξία και απώλεια βάρους. Τα τελευταία αποτελούν και την κύρια αιτία για την αδυναμία συμμόρφωσης των ασθενών με την θεραπεία, η οποία οδηγεί τελικώς και στην αντικατάστασή της.
- Ουρογεννητικές παθήσεις: Αν και δεν έχουν αναφερθεί αντίστοιχα περιστατικά κατά τις κλινικές δοκιμές με γκαλανταμίνη, τα χολινομιμητικά είναι δυνατό να προκαλέσουν απόφραξη της ουροδόχου κύστεως.
- Νευρολογικές παθήσεις: Κατά την γενικευμένη χρήση της από τον πληθυσμό, έχουν γίνει αναφορές για εκδήλωση νευρολογικών παθήσεων όπως είναι οι σπασμοί, οι παραισθήσεις κλπ.
- Αναπνευστικές παθήσεις: Λόγω της χολινομιμητικής δράσης της, θα πρέπει να συνταγογραφείται με προσοχή σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα ή άλλη αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Janssen Pharmaceuticals, 2013).

## 9.4 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά

### 9.4.1 Απορρόφηση και Κατανομή

Η γκαλανταμίνη εμφανίζει γραμμικό προφίλ απορρόφησης στο εύρος της ημερήσιας συνιστώμενης δόσης των 8 με 24mg/ημέρα. Ο πίνακας που ακολουθεί συνοψίζει τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της γκαλανταμίνης, που έχουν προκύψει μετά την χορήγηση εφ' άπαξ per os δόσης (10mg) σε υγιείς ενήλικες άντρες, κατά την διάρκεια δύο μελετών Φάσης I. Η γκαλανταμίνη απορροφάται ταχέως με μικρό χρόνο εκδήλωσης μέγιστης συγκέντρωσης, εμφανίζει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, μικρό ποσοστό δέσμευσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (περίπου 18%) και χρόνο ημίσειας ζωής γύρω στις 7 ώρες.

Ακολουθώντας επαναλαμβανόμενη per os χορήγηση (12 και 16 mg/ ημέρα), η μέση μέγιστη συγκέντρωση πλάσματος κυμαίνεται στα 42 με 137 ng/mL και η ελάχιστη στα 29 με 97 ng/mL. Δεν παρατηρείται συσσώρευση της στον οργανισμό μετά από 2 με 6 μήνες θεραπείας.

**Πίνακας 7:** Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά γκαλανταμίνης (Lilienfeld, 2002)

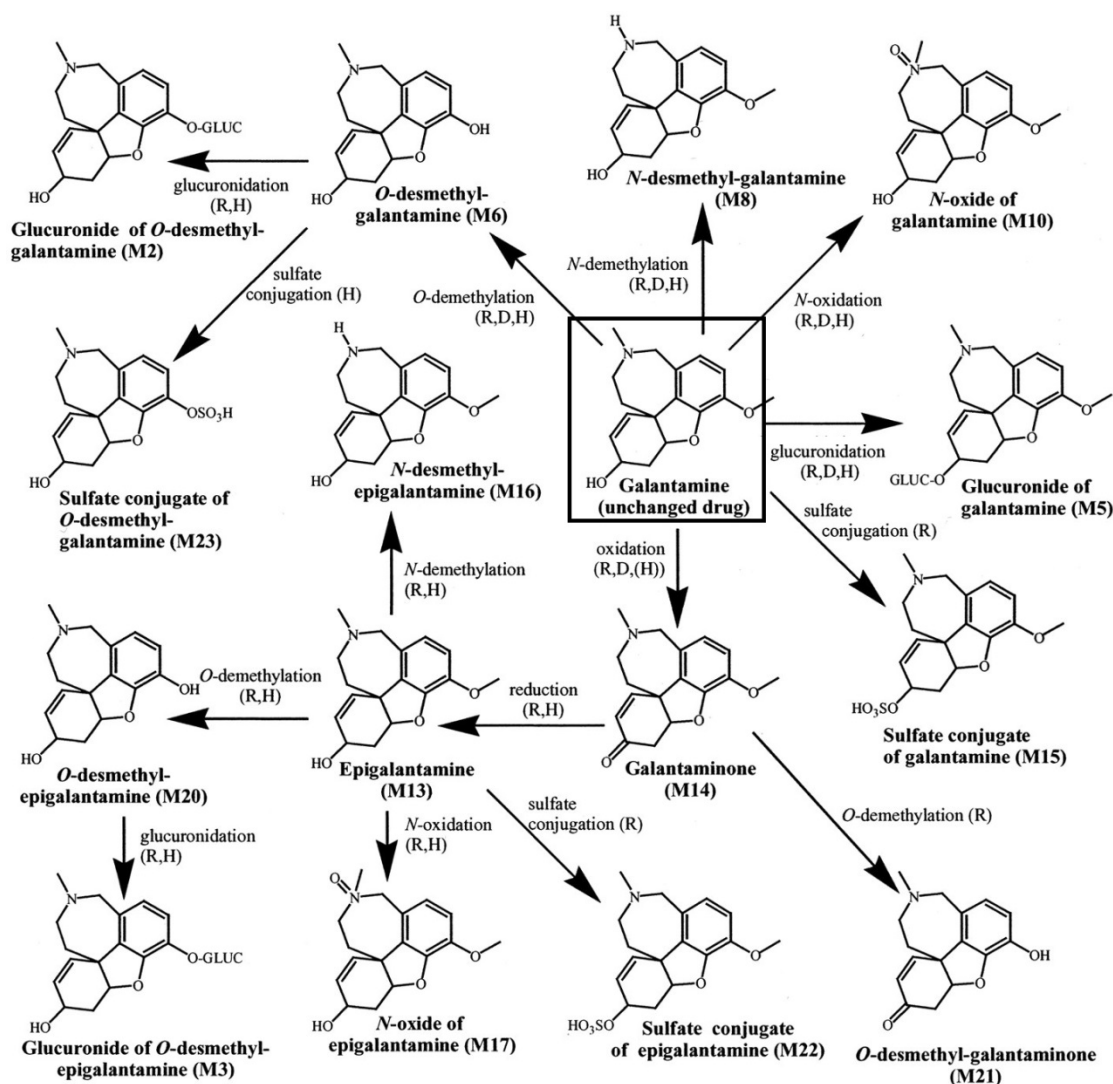
| Παράμετροι       | Μετρήσεις σε υγιείς άρρενες εθελοντές |
|------------------|---------------------------------------|
| $C_{max}$ (μg/L) | 49-1150                               |
| $t_{max}$ (h)    | 0,9-2,0                               |
| AUC (mg/L·h)     | 4,77                                  |
| F (%)            | 100                                   |
| $T_{1/2}$ (h)    | 5,3-5,7                               |
| CL (L/h/kg)      | 0,3                                   |
| $V_{ss}$ (L/kg)  | 2,6                                   |

Η χορήγησή της σε συνδυασμό με τροφή καθυστερεί τον ρυθμό αλλά όχι την έκταση της απορρόφησης στους υγιείς εθελοντές. Συγκεκριμένα, μετά την χορήγηση δισκίων 10mg, η μέση μέγιστη συγκέντρωση μειώθηκε κατά περίπου 25% και ο χρόνος εμφάνισης του μεγίστου σχεδόν διπλασιάστηκε. Παρόλ' αυτά, η τροφή δεν είχε καμία επίδραση στην ολική επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου ή στον χρόνο ημίσειας ζωής.

Η φαρμακοκινητική της γκαλανταμίνης δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη ήπιας ηπατικής βλάβης και μόνο μέτρια αύξηση (της τάξης του 30%) των τιμών της AUC και του χρόνου ημίσειας ζωής παρατηρείται σε ασθενείς με μέτριες ηπατικές βλάβες. Στην τελευταία περίπτωση, μία μείωση δόσης της τάξης των 8mg/ημέρα, κρίνεται σκόπιμο προς αξιολόγηση. Η χορήγησή της, σε ασθενείς με σοβαρή ηπατική βλάβη είναι καλό να αποφεύγεται (Lilienfeld, 2002).

### 9.4.2 Μεταβολισμός

Η γκαλανταμίνη μεταβολίζεται κυρίως από το κυτόχρωμα P450 (CYP) στο ήπαρ. Οι κύριοι μεταβολίτες της περιλαμβάνουν τα μόρια norgalantamine, *O*-desmethylgalantamine, *O*-desmethyl-norgalantamine, epigalantamine και galantaminone. Η ανασταλτική *in vivo* δράση των μεταβολιτών αυτών στο ένζυμο της AChE δεν θεωρείται κλινικά άξια αξιολόγησης, λόγω της περιορισμένης έκτασης μεταβολισμού της ουσίας. Οπότε, η χολινεργική της δράση αποδίδεται σχεδόν απολύτως στο αρχικό μόριο της γκαλανταμίνης.



Εικόνα 58: Μεταβολικές οδοί γκαλανταμίνης (G. Mannens, 2002)

Καθώς η γκαλανταμίνη μεταβολίζεται από τα ένζυμα CYP2D6 και CYP3A4, η ταυτόχρονη χορήγηση της με δραστικές ουσίες που αναστέλλουν αυτά τα ένζυμα, θα είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της χολινεργικής της δράσης και πιθανώς και των ανεπιθύμητων ενεργειών της (Lilienfeld, 2002).

### 9.4.3 Απέκκριση

Η νεφρική κάθαρση της γκαλανταμίνης σε υγιείς εθελοντές, μετά την per os χορήγηση αντιστοιχεί στο 20-25% της ολικής κάθαρσης στο πλάσμα. Η κάθαρση της μπορεί να είναι μέχρι και 20% χαμηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες. Παρόλ' αυτά, δεν έχουν εντοπιστεί κλινικά σημαντικές διαφορές σε πληθυσμούς με διαφορετική ηλικία, φύλο ή CYP2D6 φαινότυπο. Μείωση της κάθαρσης έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια και τροποποίηση της δόσης θα πρέπει να αξιολογηθεί. Η χορήγησή της, σε ασθενείς με σοβαρή νεφρική βλάβη δεν προτείνεται (Lilienfeld, 2002).



## 10. Τρισδιάστατη Εκτύπωση (3d Printing)

### 10.1 Ιστορικά Στοιχεία

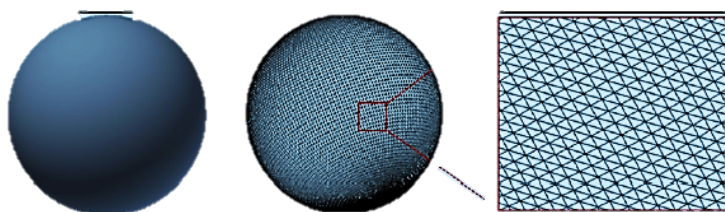
Η σύλληψη της τρισδιάστατης εκτύπωσης, η οποία αναφέρεται επίσης ως μέθοδος προσθετικής κατασκευής (Additive Manufacturing-AM), ταχείας παραγωγής πρωτοτύπων (Rapid Prototyping-RP), ή κατασκευής στερεού ελεύθερης μορφής (Solid-FreeForm Technology-SFF), αναπτύχθηκε από τον Charles Hull.

Με ειδίκευση στην μηχανική φυσική, ο Hull ξεκίνησε να εργάζεται στην κατασκευή πλαστικών συσκευών από φωτοπολυμερή στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στην Ultra Violet Products της Καλιφόρνια (SPIE-Professional, 2020). Η χρονοβόρος διαδικασία παραγωγής (1-2 μήνες) σε συνδυασμό με την μεγάλη πιθανότητα ύπαρξης ατελειών στον αρχικό σχεδιασμό, που κατ'επέκταση απαιτούσε πολλές επαναλήψεις για την απαιτούμενη βελτιστοποίηση, έδωσε στον Hull το κίνητρο για την βελτίωση των ήδη υπαρχόντων μεθόδων στην ανάπτυξη πρωτοτύπων. Το 1986, ο Hull κατέθεσε την πατέντα για την 'στερεολιθογραφία' (Hull, 1986), της οποίας ακολούθησαν πολλές στην πορεία. Το ίδιο έτος ίδρυσε την 3D Systems και ανέπτυξε την μορφή αρχείων .STL, η οποία λειτούργησε ως ηλεκτρονική 'χειραψία' συνδέοντας το λογισμικό σχεδιασμού στον υπολογιστή (Computer Aided Design-CAD) και τον τρισδιάστατο εκτυπωτή (3DSystems, 2020). Ο Hull και η 3D Systems συνέχισαν την ανάπτυξη του πρώτου τρισδιάστατου εκτυπωτή-Συσκευής Στερεολιθογραφίας (Stereolithography Apparatus)- καθώς και τον πρώτο εμπορικό εκτυπωτή για το ευρύ κοινό, τον SLA-250. Ο πρώτος εκτυπωτής μοντελοποίησης με εναπόθεση υλικού ( Fused Deposition Modelling-FDM) κατασκευάστηκε το 1990, από τον Scott Crump στην Stratasys (Crump, 1992).

Η τεχνολογία τρισδιάστατης εκτύπωσης έχει βρει εφαρμογές στην αυτοκινητοβιομηχανία και στην αεροδιαστημική για την εκτύπωση πρωτοτύπων τμημάτων αυτοκινήτων και αεροπλάνων, στην αρχιτεκτονική για την εκτύπωση δομικών μοντέλων καθώς και στην βιομηχανία καταναλωτικών αγαθών. Η συνεισφορά της στους τομείς της ιδιωτικής και κρατικής άμυνας είναι ευρέως αναγνωρισμένη. Οι ιατρικές εφαρμογές της χρονολογούνται ήδη από τις αρχές του 2000, με την κατασκευή οδοντικών εμφυτευμάτων και πρόσθετων μελών. Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει η χρήση της τόσο στον τομέα των τροφίμων όσο και της μόδας (Gross, 2014).

## 10.2 Επισκόπηση και αρχείο .STL

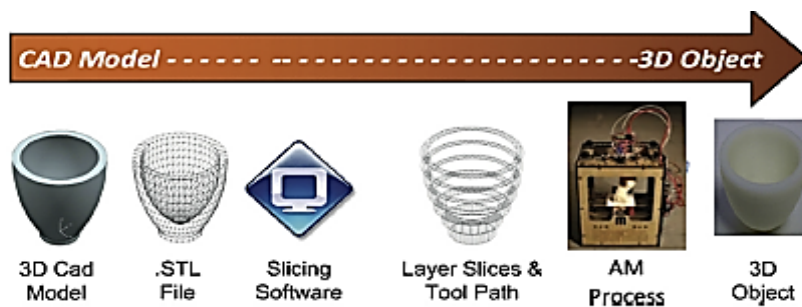
Η τρισδιάστατη εκτύπωση χρησιμοποιείται για την ταχεία δημιουργία πρωτοτύπων μοντέλων 3D που σχεδιάστηκαν αρχικά από προγράμματα CAD στον υπολογιστή π.χ. AutoCAD, OpenSCAD, AutoDesk κλπ. Το αρχικό σχέδιο στην συνέχεια μετατρέπεται σε αρχείο μορφής .STL (Standard Tessellation Language or STereo-Lithography), το οποίο αναγνωρίζεται από τον τρισδιάστατο εκτυπωτή. Το αρχείο .STL αποθηκεύει την πληροφορία για κάθε επιφάνεια του τρισδιάστατου μοντέλου υπό την μορφή τριγωνικών τμημάτων, όπου οι συντεταγμένες των κορυφών είναι γνωστές. Αυξάνοντας τον αριθμό των τριγώνων που ορίζουν μια επιφάνεια, αυξάνεται κατ' επέκταση και ο αριθμός των σημείων που την καθορίζουν χωρικά και για τα οποία διαθέτουμε δεδομένα. Αυτή η αύξηση λοιπόν οδηγεί σε αύξηση της ανάλυσης της εκτυπωμένης συσκευής. Ένα οπτικό παράδειγμα του πως ένα αρχείο .STL χωρίζει μία επιφάνεια σε τρίγωνα φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Dolenc, 1994):



Εικόνα 59: Ανάλυση επιφάνειας μοντέλου σε τριγωνικά τμήματα (Dolenc, 1994)

Η τρισδιάστατη επιφάνεια η οποία έχει ήδη οριστεί από το αρχείο .STL μετατρέπεται σε στρώματα δύο διαστάσεων μέσω ενός προγράμματος “τεμαχισμού”. Για κάθε μέθοδο διαμόρφωσης του μοτίβου εκτύπωσης, το κάθε στρώμα έχει μια αλγοριθμικά δημιουργούμενη “σειρά εντολών” η οποία προσδιορίζει τις συντεταγμένες των σημείων προς εκτύπωση καθώς και την σειρά με την οποία αυτά θα εκτυπωθούν. Επειδή οι συντεταγμένες αυτές προσδιορίζουν μόνο την γεωμετρία της εξωτερικής επιφάνειας, το μοτίβο καθώς και το ποσοστό πλήρωσης του εσωτερικού χώρου καθορίζεται από τον χειριστή. Επίσης στο ίδιο στάδιο επεξεργασίας γίνεται και η εισαγωγή στηριγμάτων, τμημάτων δηλαδή που αφαιρούνται μετά την ολοκλήρωση της εκτύπωσης, για την σταθεροποίηση στρωμάτων που είναι προς κατάρρευση λόγω βαρύτητας. Συνοψίζοντας, η τελική “σειρά εντολών” περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με την γεωμετρία του αντικειμένου, το μοτίβο πλήρωσης και τα απαραίτητα στηρίγματα.

Στην συνέχεια αυτή η σειρά εντολών μετατρέπεται σε μια αριθμητική γλώσσα προγραμματισμού, όπως ο G-κώδικας, που ελέγχει το κάθε στάδιο εκτύπωσης (Awad, 2018)



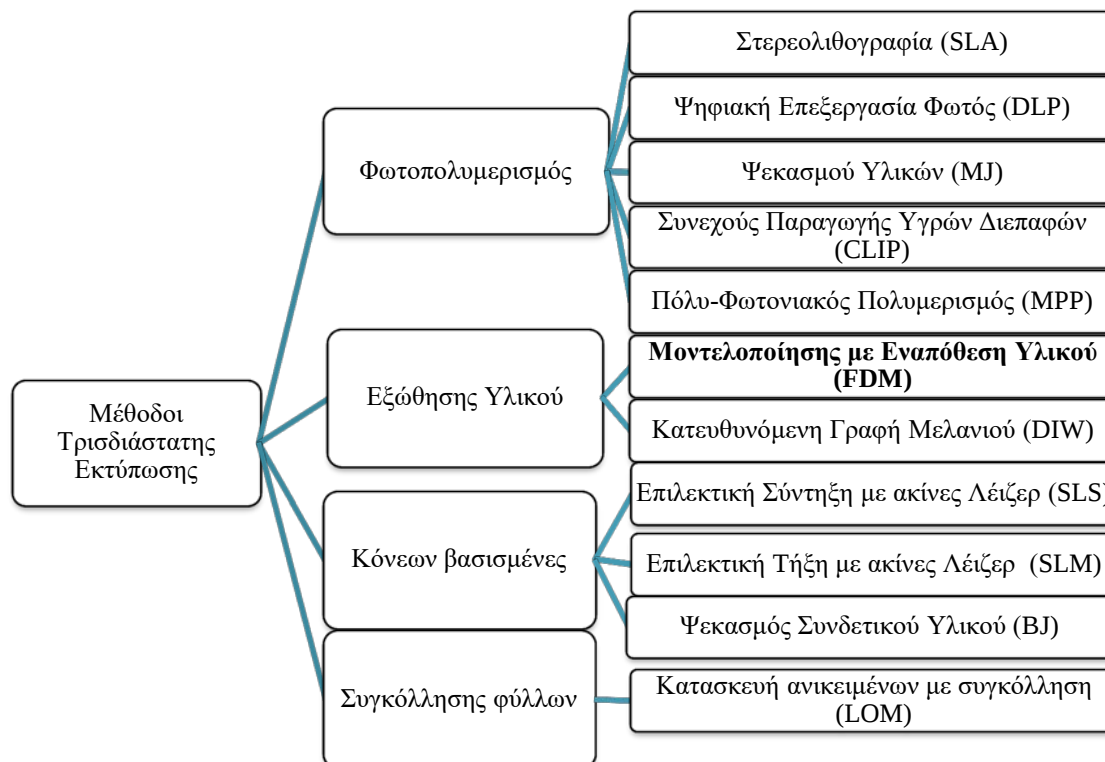
Εικόνα 60: Στάδια παρασκευής αντικειμένου μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης (Awad, 2018)

### 10.3 Μέθοδοι Τρισδιάστατης Εκτύπωσης

Η ραγδαία ανάπτυξη των τεχνικών της τρισδιάστατης εκτύπωσης έχει εισάγει πλήθος νέων μεθόδων, οι οποίες έδωσαν την δυνατότητα κατασκευής ταχύτερων, φθηνότερων και μικρότερων συστημάτων εκτύπωσης.

Ανάλογα με τον τρόπο που σχηματίζονται τα δυσδιάστατα στρώματα του υλικού, διακρίνονται τέσσερις βασικές κατηγορίες τρισδιάστατης εκτύπωσης, όπως φαίνονται και στον πίνακα:

**Πίνακας 8:** Μέθοδοι τρισδιάστατης εκτύπωσης (Guo, 2019)



- Φωτοπολυμερισμός:

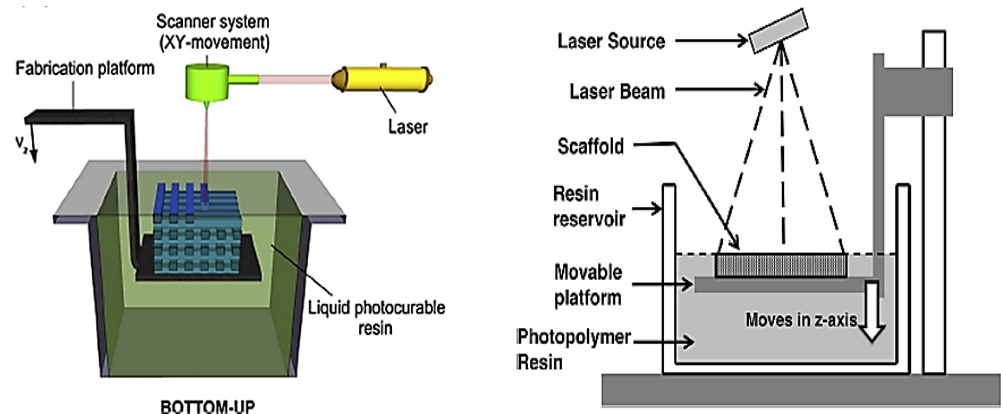
Ο Φωτοπολυμερισμός περιλαμβάνει την έκθεση υγρών ρητινών σε υπεριώδη ή σε άλλη υψηλής ενέργειας ακτινοβολία, προς επαγωγή των αντιδράσεων πολυμερισμού. Ο πρωταρχικός περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι η ανάγκη για υλικά που έχουν την ιδιότητα του φωτοπολυμερισμού, τα οποία χρησιμοποιούνται σπανίως στον τομέα της φαρμακευτικής. Επιπλέον, η εναπομένουσα ρητίνη μπορεί να αποτελέσει τοξικολογικό κίνδυνο επειδή το μη επεξεργασμένο υλικό είναι χημικά διαφορετικό από εκείνο που απαρτίζει το εκτυπωμένο αντικείμενο και είναι πιθανό να περιέχει λειτουργικές ομάδες δυνητικά υπεύθυνες για πρόκληση γονιδιοτοξικότητας. Όσον αφορά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, ο φωτοπολυμερισμός συγκαταλέγεται στις τεχνικές υψηλότερης ανάλυσης με τους μικρότερους χρόνους κατασκευής (Norman, 2017)

Επιμέρους διακρίνεται στις εξής παρακάτω κατηγορίες:

- i. Στερεολιθογραφία (Stereolithography-SLA):

Η Στερεολιθογραφία (SLA) είναι η πρώτη τεχνική τρισδιάστατης εκτύπωσης που αναπτύχθηκε. Η κλασική της προσέγγιση περιλαμβάνει ένα λουτρό γεμάτο με υγρό φωτο-πολυμερές το οποίο

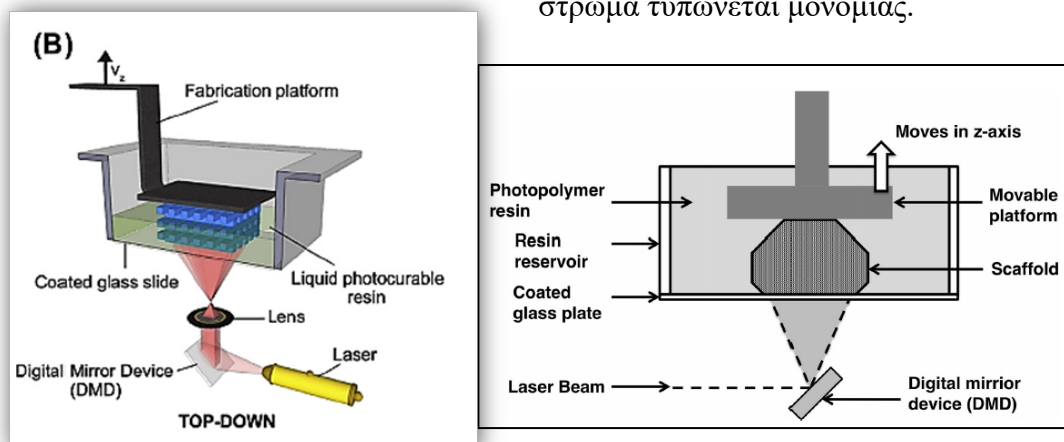
στερεοποιείται όταν εκτεθεί σε πηγή φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η πηγή αυτή φωτός (συνήθως ακτίνα λέιζερ) κατευθύνεται με την βοήθεια φακών και κατόπτρων στις επιθυμητές συντεταγμένες προς σχηματισμό των δυσδιάστατων στρωμάτων. Η πλατφόρμα στην συνέχεια που βρίσκεται εσωτερικά του λουτρού, κατεβαίνει τόσο, όσο το ύψος του επόμενου στρώματος προς εκτύπωση. Ένας κύλινδρος διασχίζει την επιφάνεια, “απλώνοντας” ομοιόμορφα το υγρό πολυμερές δημιουργώντας το κατάλληλο υπόστρωμα για το επόμενο στρώμα υλικού.



Εικόνα 61: Διάταξη στερεολιθογραφίας (Awad, 2018) (Wu, 2015)

ii. Ψηφιακή Επεξεργασία Φωτός (Digital Light Processing-DLP)

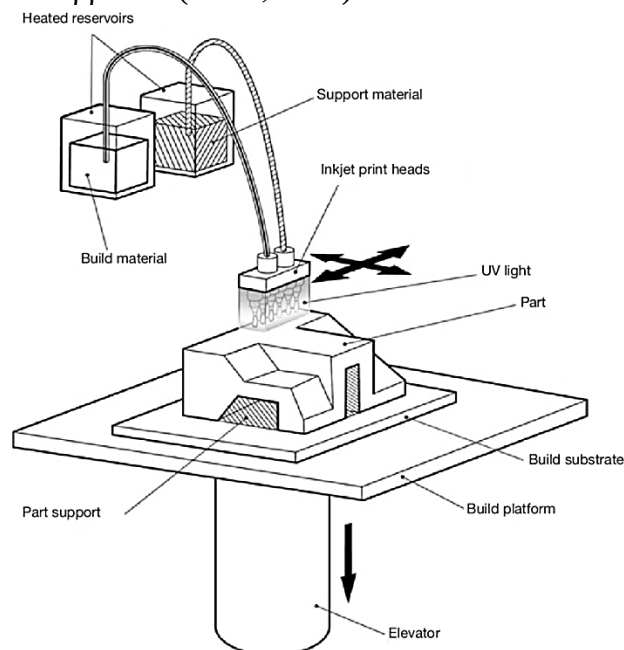
Η ψηφιακή επεξεργασία φωτός αντίθετα με την στερεολιθογραφία είναι μία διαδικασία κατασκευής αντικειμένων από την κορυφή προς την βάση και είναι σχετικά πιο γρήγορη. Κατά την διάρκεια της εκτύπωσης, μία συσκευή ψηφιακού καθρέφτη (DMD) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ακτίνας λέιζερ μέσω μιας σειράς μικρο-καθρεφτών. Οι τελευταίοι μπορούν να περιστρέφονται ανεξάρτητα, θέτοντας την πηγή φωτός σε κατάσταση ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης. Με αυτόν τον τρόπο προβάλλεται η εικόνα του τρισδιάστατου μοντέλου στο υγρό πολυμερές και κάθε στρώμα τυπώνεται μονομιάς.



Εικόνα 62: Διάταξη εκτύπωσης με Ψηφιακή Επεξεργασία Φωτός (Deshmukh, 2020) (Wu, 2015)

iii. Ψεκασμού Υλικών (Material Jetting-MJ):

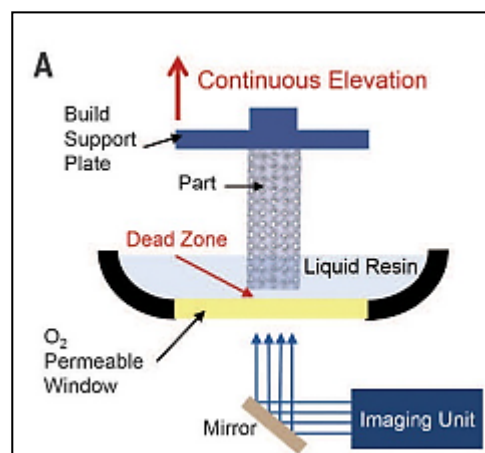
Ο ψεκασμός υλικών είναι μια διαδικασία 3D εκτύπωσης στην οποία μία κεφαλή εναποθέτει επιλεκτικά σταγονίδια ενός φωτοευαίσθητου υλικού που στερεοποιείται, κατασκευάζοντας στρώμα προς στρώμα το αντικείμενο με την επίδραση UV ακτινοβολίας. Παράλληλα, η συγκεκριμένη μέθοδος δημιουργεί μοντέλα με πολύ ομαλή επιφάνεια και υψηλή ακρίβεια. Για την συγκεκριμένη τεχνική μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλήθος υλικών όπως πολυμερή, κεραμικά, σύνθετα βιολογικά και υβριδικά (Otton, 2017).



Εικόνα 63: Διάταξη εκτύπωσης με ψεκασμό υλικών (Shahrubudin, 2019)

iv. Συνεχούς Παραγωγής Υγρών Διεπαφών (Continuous Liquid Interface Production-CLIP):

Η τεχνική παραγωγής υγρών διεπαφών αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια και αποτελεί μία μέθοδο ταχείας παραγωγής αντικειμένων με παράλληλη μείωση του κόστους διεργασίας. Η τεχνολογία CLIP εκτυπώνει το μοντέλο μέσω προβολής συνεχούς ακολουθίας UV εικόνων (τροφοδοτούμενη από μία ψηφιακή μονάδα απεικόνισης επεξεργασίας φωτός) διαμέσου ενός παραθύρου διαπερατού στο οξυγόνο και την UV ακτινοβολία, το οποίο βρίσκεται κάτω από το πληρωμένο με υγρό πολυμερές λουτρό. Η ροή οξυγόνου μέσα από



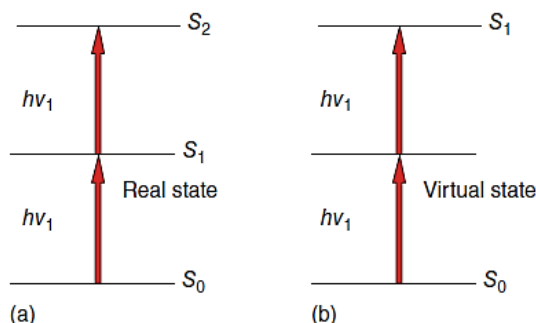
Εικόνα 64: Αποτύπωση διάταξης CLIP (Tumbleston, 2015)

το παράθυρο δημιουργεί μία “νεκρή ζώνη” υλικού κάτω του αναπτυσσόμενου μοντέλου, που δεν στερεοποιείται (υγρή διεπαφή). Πάνω από την “νεκρή ζώνη” το αντικείμενο εξάγεται συνεχώς από το λουτρό, δημιουργώντας δυνάμεις αναρρόφησης ανανεώνοντας συνεχώς το υγρό πολυμερές. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνονται λείες επιφάνειες με πολύ μικρό ύψος στρώματος και μεγάλες ταχύτητες (Tumbleston, 2015).

ν. Πόλυ-Φωτονιακός Πολυμερισμός (Multiphoton Polymerization-MPP)

Η μέθοδος MPP είναι από τα πλέον υποσχόμενα εργαλεία για την κατασκευή τρισδιάστατων μοντέλων από πολυμερή υλικά λόγω της πολυφωτονιακής απορρόφησης (MPA).

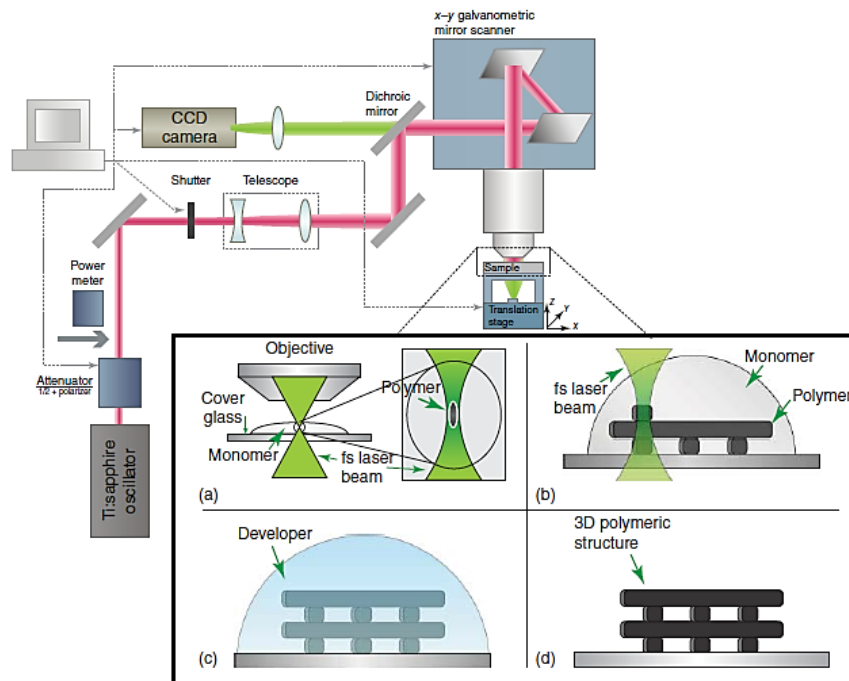
Υπάρχουν δύο τύποι φωτονιακής απορρόφησης: η διαδοχική και η ταυτόχρονη. Χάριν απλότητας, για την περιγραφή των φαινομένων θα χρησιμοποιηθεί παράδειγμα με δύο φωτόνια. Στην διαδοχική απορρόφηση, πραγματοποιείται διέγερση μέσω ενός φωτονίου σε μία πραγματική ενδιάμεση ενεργειακή κατάσταση και μετά απορροφάται το δεύτερο φωτόνιο. Η ύπαρξη της ενδιάμεσης αυτής κατάστασης υποδηλώνει ότι το υλικό απορροφά στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αντίθετα, στην ταυτόχρονη απορρόφηση, δεν υπάρχει η ενδιάμεση κατάσταση που αναφέρθηκε, οπότε και το υλικό είναι “διαπερατό” σε αυτό το μήκος κύματος. Αντί αυτού υπάρχει μία ενδιάμεση εικονική κατάσταση μετάπτωσης που γίνεται η μετάβαση λόγω της διαδοχικής απορρόφησης των φωτονίων ενέργειας  $h\nu/2$ , αντί ενός φωτονίου ενέργειας  $h\nu$  όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 65: Απεικόνιση τύπων φωτονιακής απορρόφησης (Farsari, 2017)

Η πειραματική διάταξη για την κατασκευή 3D μοντέλου με την τεχνική MPP περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Η δέσμη λέιζερ εστιάζεται στον όγκο του υλικού
- Είτε η δέσμη είτε το δείγμα κινείται ακολουθώντας ένα μοτίβο που δημιουργείται από υπολογιστή
- Μετά την ολοκλήρωση του σχεδίου, το μοντέλο καθαρίζεται από το εναπομένον μονομερές με κατάλληλο χημικό μέσο
- Λήψη τελικού αντικείμενου (Farsari, 2017)



Εικόνα 66: Απεικόνιση διάταξης πολυφωτονιακού πολυμερισμού (Farsari, 2017)

- Εξώθησης Υλικού:

Παγκοσμίως, η εξώθηση υλικού είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος παραγωγής τρισδιάστατων αντικειμένων με όλο και περισσότερες εφαρμογές στο πεδίο της φαρμακευτικής βιομηχανίας.

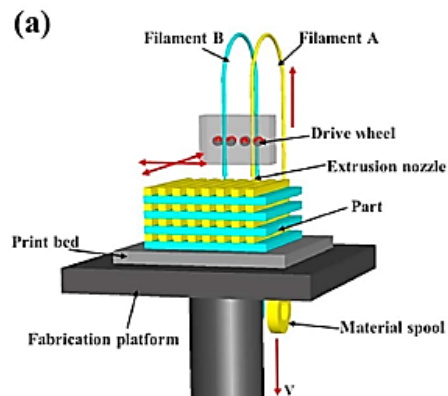
Κατά την διεργασία εξώθησης, το υλικό προωθείται μέσω ρομποτικά ελεγχόμενων ακροφυσίων. Σε αντίθεση με την εναπόθεση συνδετικού, η οποία απαιτεί υπόστρωμα κόνεως, η εξώθηση υλικού μπορεί να εκτυπώσει σε οποιαδήποτε επιφάνεια. Για τον ίδιο λόγο όμως απαιτείται και επιπλέον υλικό στήριξης: "σχεδίες" για να σχεδιάσουν την επιφάνεια εκτύπωσης ή "σκαλωσιές" για τμήματα του μοντέλου που είναι στον αέρα. Ποικιλία υλικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτήν την μέθοδο συμπεριλαμβανομένων των εξής: πολυμερή, πάστες, κολλοειδή ελαιωρήματα, σιλικόνες και άλλες ημιστερεές μορφές (πχ τρόφιμα) (Norman, 2017)

Επιμέρους διακρίνεται στις εξής παρακάτω κατηγορίες:

- vi. Μοντελοποίηση με Εναπόθεση Υλικού (FDM)

Στην μοντελοποίηση με εναπόθεση υλικού ένα συνεχές νήμα από θερμοπλαστικό υλικό χρησιμοποιείται για την τρισδιάστατη εκτύπωση των στρωμάτων. Το νήμα θερμαίνεται στο ακροφύσιο μέχρι να φτάσει σε ημι-υγρή κατάσταση και στην συνέχεια προωθείται στην επιφάνεια εκτύπωσης ή πάνω σε ήδη εκτυπωμένα στρώματα. Η θερμοπλαστικότητα των πολυμερών είναι βασική ιδιότητα για αυτήν την τεχνική, διότι επιτρέπει στα νήματα να συνενωθούν κατά την διάρκεια της εκτύπωσης και στην συνέχεια να στερεοποιηθούν με την ολοκλήρωσή της. Το χαμηλό κόστος, η υψηλή ταχύτητα και η απλότητα της διεργασίας είναι τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου.

Από την άλλη πλευρά, τα κύρια μειονεκτήματα της είναι η μικρή μηχανική αντοχή, η οπτική εμφάνιση των στρωμάτων, η φτωχή αποτύπωση της επιφάνειας και ο περιορισμένος αριθμός διαθέσιμων θερμοπλαστικών υλικών.

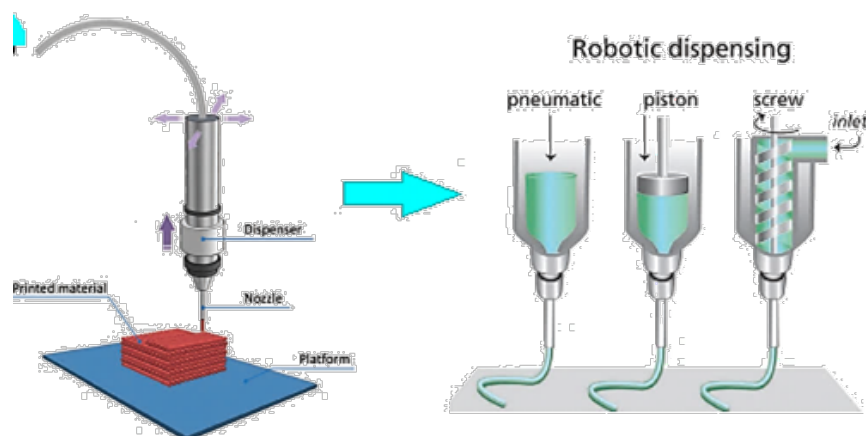


Εικόνα 68: Διάταξη τρισδιάστατης εκτύπωσης FDM (Ngo, 2018)

vii. Κατευθυνόμενη Γραφή Μελανιού (DIW)

Η κατευθυνόμενη γραφή μελανιού είναι μία μέθοδος βασισμένη στην εξώθηση, παρόμοια με την τεχνολογία μοντελοποίησης με εναπόθεση υλικού, στην οποία ένα συνεχές νήμα εξωθείται μέσα από το στόμιο ενός ακροφυσίου. Το υλικό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή των μοντέλων χαρακτηρίζεται ως ιζωδοελαστικό: δηλαδή εμφανίζει συμπεριφορά παρόμοια, είτε με αυτή των στερεών (ελαστικές ιδιότητες) είτε με αυτή των παχύρευστων υγρών υπό συνθήκες ηρεμίας και διάτμησης αντίστοιχα. Κατ' επέκταση, λόγω των δυνάμεων διάτμησης που ασκούνται στο υλικό κατά την εξώθηση, δεν απαιτείται θερμικά επαγόμενη αλλαγή φάσης.

Η διαδικασία μοντελοποίησης περιλαμβάνει την “φόρτωση” του υλικού εσωτερικά σύριγγας ή άλλης συσκευής δεξαμενής εφοδιασμένης με ακροφύσιο. Το όλο σύστημα τοποθετείται πάνω σε επίπεδο κινούμενο στον Καρτεσιανό άξονα ή σε ρομποτικό βραχίονα για την παραγωγή αντικειμένων στρώμα προς στρώμα μέσω της εξώθησης υλικού υπό κατάλληλη πίεση (Awad, 2018).



Εικόνα 69: Διάταξης τρισδιάστατης εκτύπωσης με κατευθυνόμενη γραφή μελανιού (Tian, 2017)

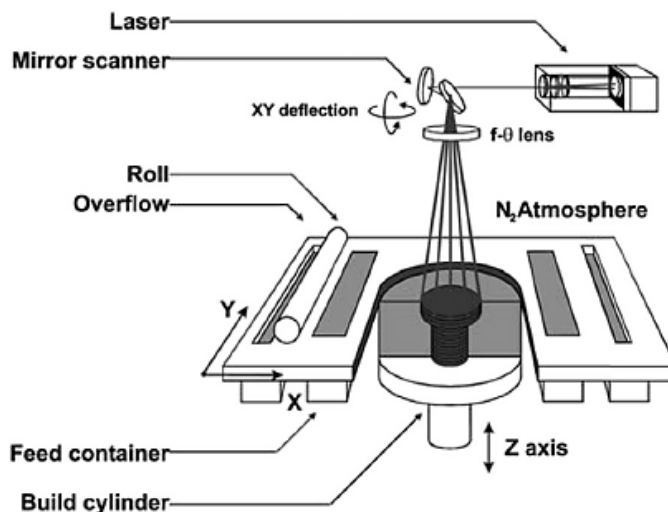
- Κόνεων Βασισμένες

Η τεχνολογία αυτή περιλαμβάνει μία δεξαμενή πληρωμένη με το υλικό κατασκευής υπό μορφή κόνεως (μέγεθος σωματιδίων 50μm με 100 μm). Τα σωματίδια της κόνεως συνενώνονται μεταξύ τους με τον ψεκασμό συνδετικού υλικού ή με την επίδραση πηγής ενέργειας (λείζερ) προς δημιουργία κάθε στρώματος. Όταν ολοκληρωθεί η δημιουργία του πρώτου στρώματος, η δεξαμενή κατεβαίνει σύμφωνα με προκαθορισμένη ρύθμιση, ακολουθεί εναπόθεση του επόμενου στρώματος κόνεως και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μέχρι την ολοκλήρωση του μοντέλου (Guo, 2019) (Sing, 2016).

Επιμέρους διακρίνεται στις εξής παρακάτω κατηγορίες:

- i. Επιλεκτική Σύντηξη με ακίνες Λείζερ (SLS)

Σε αυτήν την τεχνική η κόνη προς σύντηξη τοποθετείται σε μία θερμαινόμενη κλίνη και η επιφάνεια της λειαίνεται μέσω της κίνησης κυλίνδρου. Δέσμη λέιζερ κατευθύνεται μέσω φακών και κατόπτρων στο υλικό, προκαλώντας την σύντηξή του σε στερεό σώμα, “χτίζοντας” με αυτόν τον τρόπο το αντικείμενο στρώμα προς στρώμα. Η διαδρομή που ακολουθεί η ακτίνα λέιζερ ορίζεται από το αρχείο STL και συχνά βελτιστοποιείται από το ίδιο μηχάνημα για την επίτευξη ομοιόμορφης κατανομής της θερμοκρασίας και μειωμένων χρόνων εκτύπωσης. Με την δημιουργία κάθε στρώματος η κλίνη χαμηλώνει κατά ένα πάχος στρώματος και ταυτόχρονα υψώνεται ο τροφοδότης για την παροχή υλικού προς σύντηξη. Ο κύλινδρος στην συνέχεια, προωθεί την κόνη προς την πρόσφατα εκτεθειμένη επιφάνεια και την ομαλοποιεί. Επιπλέον στηρίγματα δεν απαιτούνται σε αυτήν την τεχνολογία, καθώς η κόνη που δεν έχει συντηχθεί υποστηρίζει τα δημιουργούμενα τμήματα (Awad, 2018).



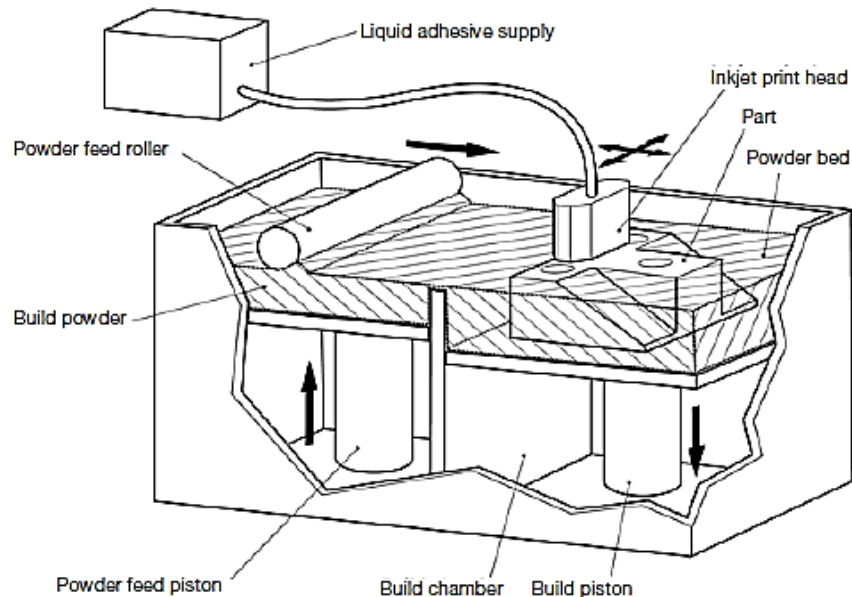
Εικόνα 70: Διάταξη επιλεκτικής σύντηξης με ακίνες λέιζερ (Awad, 2018)

ii. Επιλεκτική Τήξη με ακίνες Λείζερ (SLM)

Η τεχνολογία της επιλεκτικής τήξης με ακίνες λέιζερ είναι διεργασία παρεμφερούς λογικής με την SLS. Η βασική τους διαφορά είναι ότι σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται δέσμη λέιζερ υψηλής ενέργειας για την τήξη κόκκων μετάλλων. Επιπροσθέτως, κάθε στρώμα του αντικειμένου τυπώνεται σε δύο στάδια: πρώτα δημιουργείται το περίγραμμα του αντικειμένου και στην συνέχεια, τήκεται το υλικό εσωτερικά του περιγράμματος, για την ολοκλήρωση κάθε στρώματος (Sing, 2016).

iii. Ψεκασμός Συνδετικού Υλικού (BJ)

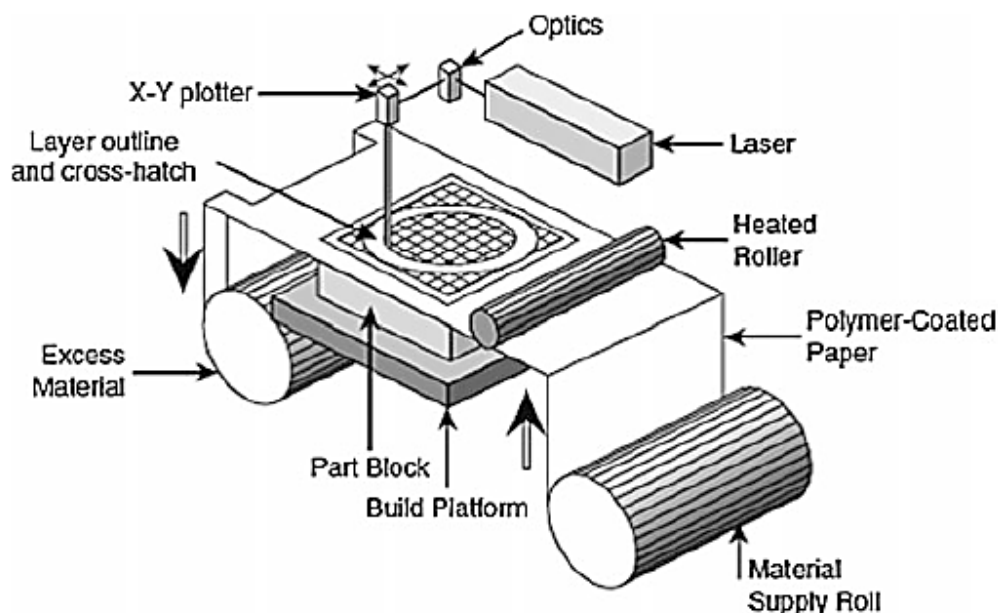
Οι εκτυπωτές αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούν συνδετικό υλικό (αντί του λέιζερ) για την συνένωση των σωματιδίων της κόκκωσης. Κατά αυτόν τον τρόπο προσφέρουν την δυνατότητα στον χρήστη κατασκευής έγχρωμων αντικειμένων τα οποία όμως είναι ιδιαιτέρως εύθραυστα και απαιτούν επεξεργασία μετά την ολοκλήρωση της εκτύπωσης. Στην τελευταία περιλαμβάνεται ο καθαρισμός σε ειδικό χώρο εργασίας για να αποφευχθεί η διασπορά της κόκκωσης καθώς και ο εμποτισμός του μοντέλου σε μίγματα υλικών για την σταθεροποίησή του (Otton, 2017). Παρόμοιας λογικής είναι και η τεχνολογία ZipDose βάσει της οποίας παρασκευάστηκε το πρώτο εκτυπωμένο δισκίο Spritam που πήρε έγκριση από τον FDA. Μόνη διαφορά είναι ότι τα στρώματα κόκκωσης-συνδετικού υλικού που προκύπτουν, συνενώνονται σε ένα ενιαίο σώμα κατόπιν συμπίεσης.



Εικόνα 71: Διάταξη εκτύπωσης με ψεκασμό συνδετικού υλικού (Otton, 2017)

- Κατασκευή Αντικειμένων με Συγκόλληση (LOM)

Η κατασκευή Αντικειμένων με Συγκόλληση αποτελεί μία από της πρώτες εμπορικά διαθέσιμες τεχνικές προσθετικής μοντελοποίησης (1991). Η διαδικασία της LOM περιλαμβάνει την στρώμα της στρώμα συγκόλληση φύλλων υλικού (κομμένων με λέιζερ CO<sub>2</sub>) με την κάθε στρώση του υλικού να αποτελεί ένα επίπεδο του μοντέλου CAD. Λόγω της αρχής λειτουργίας μόνο το εξωτερικό περίγραμμα μπορεί να κοπεί, και τα φύλλα μπορεί είτε πρώτα να κοπούν και μετά να συγκολληθούν (Form-Then-Bond Processes) είτε το ανάποδο (Bond-Then-Form Processes). Οι διεργασίες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν επιμέρους βάσει του μηχανισμού συγκόλλησης των στρώσεων της παρακάτω: α) Συγκόλληση με χρήση κόλλας ,β) Θερμική συγκόλληση ,γ) Σύσφιξη στρώσεων και δ) Συγκόλληση με την βοήθεια υπερήχων (Gibson, 2015). Η ανάλυση της μεθόδου κυμαίνεται εντός μεγάλου εύρους τιμών και καθορίζεται από το πάχος του κάθε φύλλου (Ngo, 2018).



Εικόνα 72: Διάταξη κατασκευής αντικειμένων με συγκόλληση (Gibson, 2015)

## 10.4 Υλικά & Εφαρμογές

Η ανάπτυξη της τρισδιάστατης εκτύπωσης έδωσε την δυνατότητα χρήσης όλο και περισσότερων υλικών, με διαφορετικές φυσικές ιδιότητες, για την μοντελοποίηση αντικειμένων. Τα υλικά αυτά διατίθενται υπό διάφορες μορφές ανάλογα με την μέθοδο στην οποία θα χρησιμοποιηθούν, πχ νήματος, σύρματος, κόνεως, φύλλων και μελανιών.

Πληροφορίες σχετικά με τα υλικά ,τις μεθόδους στις οποίες χρησιμοποιούνται και τις εφαρμογές τους συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

| Μέθοδοι                                                  | Υλικά                                                                                                    | Εφαρμογές                                                                                                  | Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                       | Μειονεκτήματα                                                                                              | Ανάλυση                                                               |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Μοντελοποίηση με Εναπόθεση Υλικού (FDM)                  | Συνεχή νήματα θερμοπλαστικών υλικών<br>Συνεχή νήματα πολυμερών ενισχυμένα με ίνες                        | Ταχεία Μοντελοποίηση Παιχνίδια Προηγμένα εξαρτήματα                                                        | Χαμηλό κόστος<br>Υψηλή Ταχύτητα<br>Απλότητα μεθόδου                                                                                                                 | Φτωχές μηχανικές ιδιότητες<br>Περιορισμένα υλικά (μόνο θερμοπλαστικά)<br>Εμφάνιση επιφάνειας στρώμα-στρώμα | 50-200 μm                                                             |
| Κόνεων Βασισμένες (SLS,SLM,BJ)                           | Συμπιεσμένες κόνεις μικρής διαμέτρου<br>Μέταλλα, κράματα και περιορισμένος αριθμός πολυμερών<br>Κεραμικά | Βιοϊατρική<br>Ηλεκτρονικά είδη<br>Αεροναυπηγική<br>Ελαφριές κατασκευές (πλέγματα)<br>Εναλλάκτες θερμότητας | Υψηλή ανάλυση<br>Υψηλή ποιότητα                                                                                                                                     | Μικρές ταχύτητες εκτύπωσης<br>Μεγάλο κόστος<br>Υψηλό πορώδες στην μέθοδο<br>ψεκασμού συνδετικού υλικού     | 80-250 μm                                                             |
| Εκτύπωση με ψεκασμό μελανιού και κατασκευή περιγράμματος | Συμπυκνωμένη διασπορά σωματιδίων σε ένα υγρό φορέα                                                       | Βιοϊατρική<br>Μεγάλες κατασκευές<br>Κτίρια                                                                 | Ικανότητα κατασκευής μεγάλων δομών<br>Μικροί χρόνοι εκτύπωσης                                                                                                       | Χαμηλή ανάλυση<br>Έλλειψη πρόσφυσης μεταξύ στρωμάτων<br>Εμφάνιση επιφάνειας στρώμα-στρώμα                  | 5-200 μm για ψεκασμό μελανιού<br>25-40 mm για κατασκευή περιγράμματος |
| Στερεολιθογραφία                                         | Ρητίνη από φωτο-ενεργά πολυμερή<br>Υβριδικά πολυμερή-κεραμικά                                            | Βιοϊατρική<br>Κατασκευή πρωτοτύπων                                                                         | Υψηλή ανάλυση<br>Υψηλή ποιότητα                                                                                                                                     | Μεγάλος περιορισμός υλικών<br>Μεγάλοι χρόνοι εκτύπωσης<br>Μεγάλο κόστος                                    | 10 μm                                                                 |
| Κατασκευή αντικειμένων με συγκόλληση (LOM)               | Σύνθετα πολυμερή<br>Κεραμικά<br>Χαρτί<br>Ταινίες πληρωμένες μετάλλων<br>Ρολλά μετάλλων                   | Παραγωγή χαρτιού<br>Βιομηχανίες χυτηρίων<br>Ηλεκτρονικά είδη<br>"Εξυπνες" συσκευές                         | Μειωμένος απαιτούμενος αριθμός εργαλείων & χρόνου κατασκευής<br>Μεγάλη ποικιλία υλικών<br>Χαμηλού κόστους<br>Εξαιρετικό για κατασκευή αντικειμένων μεγάλου μεγέθους | Χαμηλή ποιότητα επιφάνειας και ακρίβεια διαστάσεων<br>Περιορισμός στην κατασκευή πολύπλοκων δομών          | Εξαρτάται από το πάχος των φύλλων                                     |

**Πίνακας 9:** Σύνοψη μεθόδων τρισδιάστατης εκτύπωσης (Ngo, 2018)

Τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει και η χρήση βιολικών, τροφίμων και υφασμάτων για την δημιουργία ανθρωπίνων οργάνων, φαγητών και ενδυμάτων. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πολλές νέες εφαρμογές εμφανίζονται και στο πεδίο της φαρμακευτικής, με την εκτύπωση καψακίων, δισκίων και άλλων μορφών (Ngo, 2018).



## 11. Ο Πειραματικός Σχεδιασμός Στην Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων

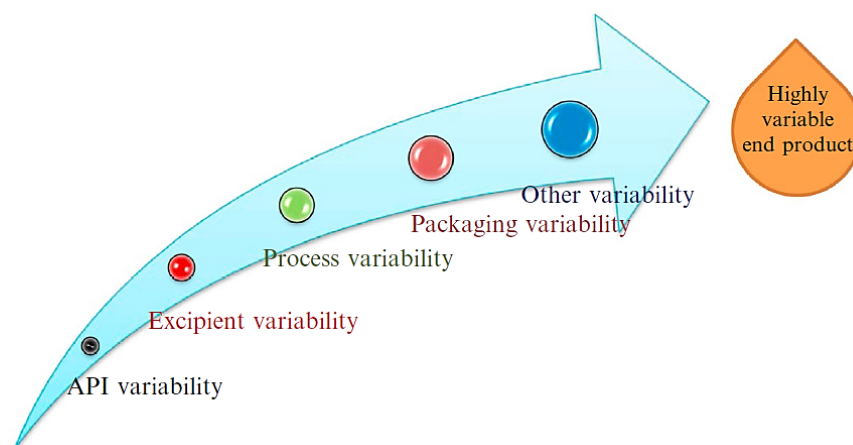
### 11.1 Εισαγωγή στην Ποιότητα

#### 11.1.1 Η Φαρμακευτική Βιομηχανία μέχρι σήμερα

Η διαδικασία παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνει πολυάριθμες επιμέρους διεργασίες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από το υψηλό τους κόστος. Το σύνολο των ερευνητικών εργασιών και δοκιμασιών, που πρέπει να πραγματοποιηθούν για την πρόσβαση των ασθενών σε ένα νέο φάρμακο, απαιτούν κατά μέσο όρο 10-15 χρόνια και κεφάλαιο που ξεπερνά τα 800 εκατομμύρια δολάρια. Επίσης επειδή τα φαρμακευτικά σκευάσματα πρέπει να παρασκευάζονται σε μεγάλη κλίμακα, υπό ασφαλείς συνθήκες και σύμφωνα με κατάλληλες προδιαγραφές, η ανάπτυξη τους είναι πολύ πιθανό να αποτύχει μετά την ανακάλυψη της δραστικής ουσίας. Κατ' επέκταση, μόνο το 20% των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών που ελέγχονται στις κλινικές δοκιμές λαμβάνουν τελικά έγκριση από τις αρμόδιες αρχές.

Ακόμα και μετά την ανάπτυξη του, οι νομοθετικές αρχές έχουν κατά διαστήματα σχεδόν 'παγώσει' τις διαδικασίες φαρμακευτικής παραγωγής. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μία μικρή αλλαγή της μεθόδου παραγωγής απαιτεί εξέταση και έγκριση από τις κανονιστικές αρχές, προκαλώντας χρονική καθυστέρηση της όλης διαδικασίας και τη συσσώρευση γραφειοκρατίας. Το γεγονός αυτό, αποτρέπει την εναρμόνιση των βιομηχανιών στα τελευταία δεδομένα λόγω της ανησυχίας τους για καθυστερήσεις στην παραγωγή, οι οποίες θα εκδηλωθούν τελικώς υπό την μορφή οικονομικών απωλειών (Aksu, 2019).

Επιπροσθέτως τις τελευταίες δεκαετίες, παρά την επένδυση χρόνου και κεφαλαίων, η φαρμακευτική βιομηχανία αδυνατεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις της εποχής, δηλαδή να παρασκευάζει φαρμακευτικά προϊόντα σύμφωνα με τα απαιτούμενα



Εικόνα 73: Παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταβλητότητα του τελικού προϊόντος (Beg, 2019)

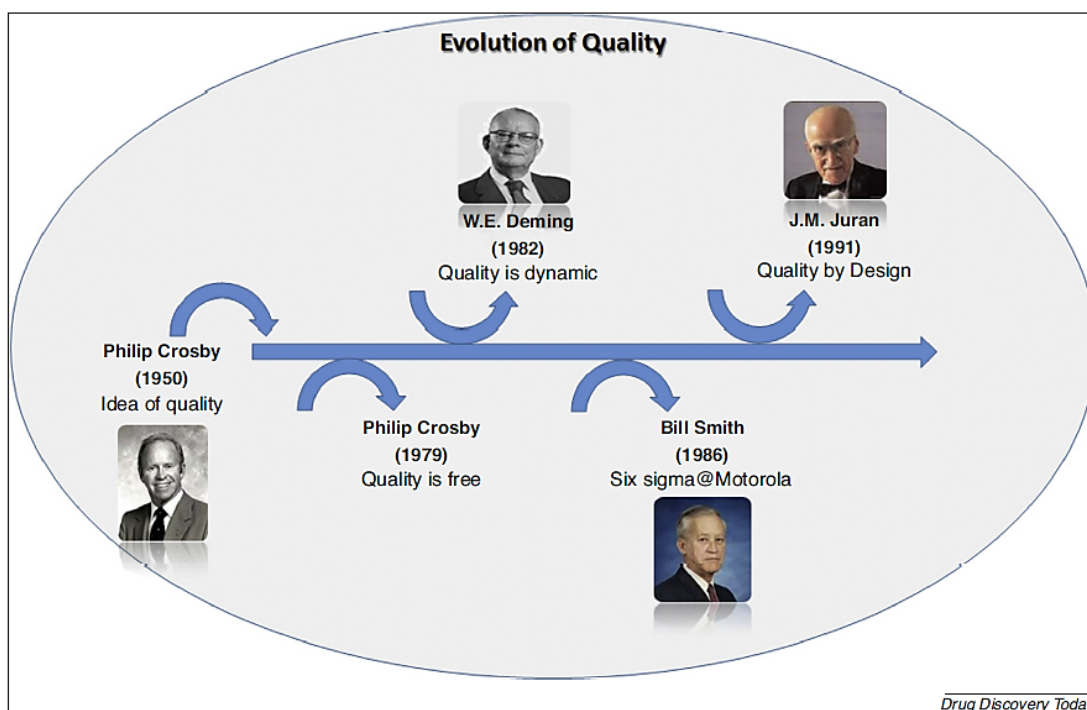
χαρακτηριστικά ποιότητας. Οι κύριοι παράγοντες που ευθύνονται για την μη ικανοποιητική ποιότητα των τελικών φαρμακευτικών σκευασμάτων,

μπορούν να αποδοθούν στην μεταβλητότητα των υλικών που χρησιμοποιούνται, στην ελλιπή αυτοματοποίηση των διεργασιών, στην απουσία επαρκών ελέγχων καθώς και στην μη ουσιαστική κατανόηση των παραμέτρων του προϊόντος και της διεργασίας. Το διπλανό σχεδιάγραμμα αποτυπώνει τις βασικές πηγές μεταβλητότητας, οι οποίες σχετίζονται με την διαδικασία ανάπτυξης φαρμακευτικών προϊόντων και ευθύνονται για την ανάκλησή τους στην πλειονότητα των περιπτώσεων (Beg, 2019).

Είναι φανερό από τα παραπάνω, ότι η ανάπτυξη του πεδίου της έγκρισης των φαρμακευτικών σκευασμάτων, μέσω της ενσωμάτωσης της φιλοσοφίας του “Σχεδιασμού Της Ποιότητας” (Quality by Design-QbD), δεν θα διασφαλίσει μόνο την ποιότητα του τελικού σκευάσματος, αλλά θα μειώσει ταυτόχρονα το κόστος ανάπτυξης και παρασκευής (Aksu, 2019). Κρίνεται λοιπόν σκόπιμο σε αυτό το σημείο να αποσαφηνιστεί η έννοια του όρου της ποιότητας και ποιά πλεονεκτήματα προσφέρει η ενσωμάτωσή της στην παραγωγική διαδικασία.

### 11.1.2 Ορισμός Της Ποιότητας

Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα αποτυπώνεται η εξέλιξη της έννοιας της ποιότητας όπως αυτή εκφράστηκε από τους μελετητές της (Beg, 2019):



Εικόνα 75: Ιδρυτές της έννοιας της Ποιότητας (Beg, 2019)

- I. Crosby: Η ιδέα της Ποιότητας διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Crosby, κατά την δεκαετία του 1950. Συνοψίζεται στο σλόγκαν ‘‘μηδενικά ελαττώματα’’ (‘‘zero defects’’) και εκφράζεται μέσω των τεσσάρων παρακάτω αρχών: (I) η Ποιότητα είναι σε συμφωνία με τις απαιτήσεις των καταναλωτών, (II) πρόληψη ελαττωμάτων αντί της αξιολόγησής τους όταν έχουν ήδη συμβεί, (III) πρότυπο απόδοσης για την Ποιότητα είναι η απαλοιφή των ελαττωματικών προϊόντων και (IV) η Ποιότητα αξιολογείται από την τιμή μη-προσαρμογής στις απαιτήσεις (Anastasiadou, 2015).

*‘‘Η ποιότητα είναι δωρεάν. Δεν είναι δώρο, όμως είναι δωρεάν’’*

- II. Deming: Ο Δρ. Deming έχει χαρακτηριστεί από πολλούς ερευνητές ως μια εμβληματική φυσιογνωμία και οι θεωρίες του είναι παγκοσμίως αποδεκτές, καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί στην Διαχείριση Ολικής Ποιότητας (Total Quality Management) από μεγάλο αριθμό μελετών. Παρ’ όλο που ίδιος δεν έχει διατυπώσει έναν ξεκάθαρο ορισμό της Ποιότητας, θεωρεί ότι η έννοια της ορίζεται και καθορίζεται από τις ανάγκες των καταναλωτών. Ο Deming εστιάζει ιδιαιτέρως στην ευθύνη των αρμοδίων διαχείρισης των επιχειρήσεων, οι οποίοι φαίνεται να είναι υπεύθυνοι κατά 94% για την βελτίωση της Ποιότητας των τελικών προϊόντων. Εισάγει και διαχωρίζει τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα από τους δευτερεύοντες, δίνει έμφαση στην διενέργεια ελέγχων κατά την παραγωγική διαδικασία και όχι μόνο στα τελικά προϊόντα, υιοθετεί τη συστηματική προσέγγιση επίλυσης προβλημάτων-γνωστή και ως κύκλος του Deming (PDCA) και τέλος προτείνει την χρήση τεχνικών στατιστικού ελέγχου των διεργασιών (SPC) στοχεύοντας στην μείωση της μεταβλητότητας. Η λογική του κύκλου του Deming, όπως φαίνεται και από τα αρχικά



Εικόνα 76: Κύκλος του Deming (McCabe, 1998)

των λέξεων Plan-Do-Check-Act βασίζεται στην πεποίθηση ότι τα πάντα ξεκινούν με τον σχεδιασμό (Plan), ακολουθεί η εφαρμογή του σχεδίου (Do), μετά έρχεται η διενέργεια των απαραίτητων ελέγχων και δοκιμασιών (Check) και τέλος ο κύκλος ολοκληρώνεται με τις ενέργειες που πραγματοποιούνται για την αλλαγή του αρχικού πλάνου (Action).

Επιπροσθέτως, ο Deming διατύπωσε μια σειρά 14 σημείων, των οποίων την εφαρμογή έκρινε απαραίτητη για την αλλαγή της εταιρικής κουλτούρας (Anastasiadou, 2015):

1. Η ηγεσία είναι υποχρεωμένη να δημιουργεί περιβάλλον σταθερότητας και συνεχούς βελτίωσης των υπηρεσιών και των προϊόντων που παρέχει, μέσω ενός μακροπρόθεσμου και ξεκάθολου οράματος
2. Η ηγεσία είναι υπεύθυνη για την υιοθέτηση της νέας φιλοσοφίας
3. Αντικατάσταση των μεθόδων διαχείρισης του παρελθόντος και κατάργηση της επιθεώρησης για την επίτευξη ποιότητας
4. Πρόταση για αποφυγή επιλογής πρώτων υλών και προμηθευτών με αποκλειστικό κριτήριο την τιμή. Καλύτερη η επιλογή ενός προμηθευτή, ως βάση για την ανάπτυξη αμοιβαίας σχέσης εμπιστοσύνης
5. Συνεχής βελτίωση του συστήματος παραγωγής και παροχής υπηρεσιών, με απώτερο στόχο την βελτίωση της ποιότητας και την μείωση του κόστους
6. Εγκαθίδρυση εκπαιδευτικών προγραμμάτων των εργαζομένων κατά την διάρκεια της εργασίας
7. Εφαρμογή νέων μεθόδων διαχείρισης ώστε οι διαχειριστές να μπορούν να ηγούνται, να καθοδηγούν και να υποστηρίζουν κατάλληλα το προσωπικό
8. Δημιουργία ασφαλούς περιβάλλοντος, απαλλαγμένου από το φόβο της τιμωρίας, όπου θα προωθείται η συνεργασία και η δημιουργικότητα
9. Κατάργηση εμποδίων μεταξύ των τμημάτων της επιχείρησης, ώστε όλοι οι εργαζόμενοι να επικοινωνούν και να δουλεύουν ομαδικά
10. Αποβολή συνθημάτων, παραινήσεων και στόχων προς το εργατικό δυναμικό που απαιτούν μηδέν σφάλματα με ταυτόχρονη εργασία στο 100% των δυνατοτήτων τους
11. Αποβολή αριθμητικών στόχων από τους εργαζομένους και την διοίκηση
12. Απαραίτητη η επιβράβευση των εργαζομένων ώστε να αισθάνονται υπερήφανοι για τα επιτεύγματά τους
13. Καθιέρωση εντατικού και συνεχούς προγράμματος εκπαίδευσης στις νέες πρακτικές και καινοτομίες
14. Μακροπρόθεσμη αφοσίωση εκ μέρους της διοίκησης στην εφαρμογή των παραπάνω βημάτων (ASQ, 2020)

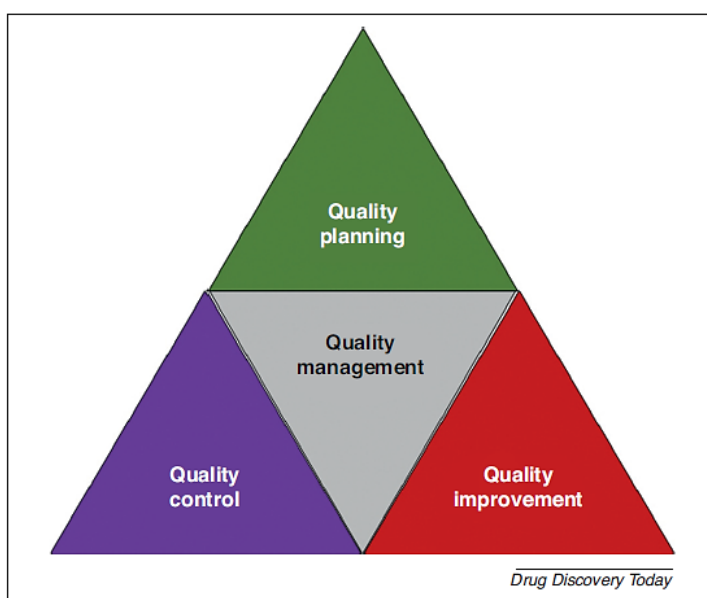
III. Juran: Στο βιβλίο του *Quality Control Handbook*, ο Juran δηλώνει ότι η ποιότητα μπορεί να ερμηνευτεί με δύο διακριτούς τρόπους. Συγκεκριμένα:

- I. “Ποιότητα” σημαίνει το προφίλ των χαρακτηριστικών του προϊόντος που ανταποκρίνεται στις ανάγκες του καταναλωτή και επιτυγχάνει κατ’ επέκταση την ικανοποίησή του. Κατά αυτή την έννοια, η ποιότητα σχετίζεται με το εισόδημα. Δηλαδή, στόχος για την επίτευξη υψηλής ποιότητας είναι η ικανοποίηση των καταναλωτών και μέσω

αυτών η αύξηση του εισοδήματος. Παρόλ ‘αυτά, μία τέτοια κίνηση απαιτεί αρχικά επένδυση κεφαλαίου και αυξάνει το ολικό κόστος

- II. ‘‘Ποιότητα’’ σημαίνει απαλλαγή από την εκτέλεση λαθών, τα οποία απαιτούν την επανάληψη της εργασίας και συντελούν στην μη ικανοποίηση των καταναλωτών. Κατά αυτή την έννοια, η ποιότητα σχετίζεται με το κόστος και συνήθως επίτευξη υψηλής ποιότητας σημαίνει μείωση του κόστους (Juran, 1999)

Περαιτέρω εξελίξεις της έννοιας της ποιότητας, βάση της αρχής Six Sigma,



οδήγησαν στην ανάπτυξη της ιδέας του ‘‘Σχεδιασμού της Ποιότητας’’ (QbD)- απόρροια του Quality Planning, η οποία αποτέλεσε καινοτόμο προσέγγιση στη ενσωμάτωση της επιθυμητής ποιότητας στα προϊόντα.

Ο Juran δημοσίευσε τις απόψεις του όσον αφορά την φιλοσοφία του ‘‘Σχεδιασμού της Ποιότητας’’ το 1991 και υπογράμμισε την

**Εικόνα 78:** Απεικόνιση τριλογίας της ποιότητας (Beg, 2019)

‘‘τριλογία της ποιότητας’’, η οποία περιέγραφε κυρίως τις βασικές αρχές και προοπτικές για την εφαρμογή πρακτικών ενσωμάτωσης ποιότητας στην ανάπτυξη προϊόντων. Επιπλέον, τόνισε ότι ‘‘η ποιότητα είναι ζήτημα συνειδητής πρόθεσης’’ (‘‘quality is a matter of conscious intent’’) και ότι πρέπει να ενσωματώνεται στο προϊόν, εν αντιθέσει με την μέχρι πρότινος ισχύουσα πεποίθηση ελέγχου της στο τελικό προϊόν. Από τότε, η έννοια του QbD έχει εφαρμοστεί σε ποικίλες επιχειρήσεις προς βελτίωση της παραγωγής ποιοτικών αγαθών με την παράλληλη μείωση του κόστους διεργασίας (Beg, 2019).

Ολοκληρώνοντας, ο ICH βασισμένος στις παραπάνω θεωρήσεις, όρισε στην οδηγία Q8 την ποιότητα για τα φαρμακευτικά προϊόντα ως εξής:

*‘‘Η καταλληλότητα της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας, ή του φαρμακευτικού προϊόντος ως προς την προορισμένη χρήση του. Αυτός ο όρος περιλαμβάνει χαρακτηριστικά του προϊόντος όπως η ταυτότητα, η ισχύς και η καθαρότητα.’’*

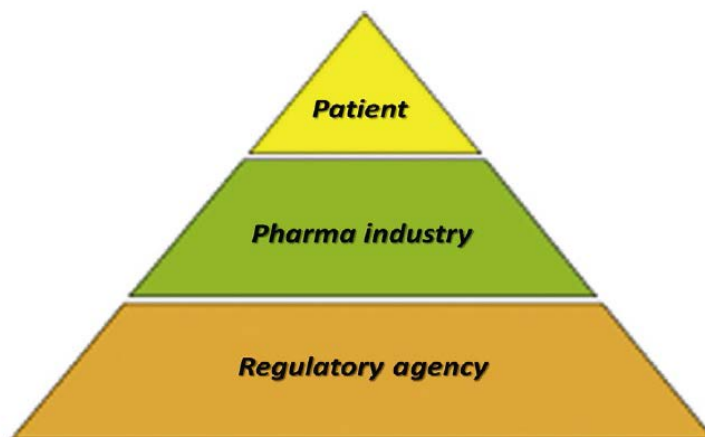
## 11.2 Σχεδιασμός της Ποιότητας-“Quality by Design”(QbD)

### 11.2.1 Βασικές Αρχές και Οφέλη του QbD

Οι ICH και FDA ορίζουν το QbD στο Q8 ως “μία συστηματική προσέγγιση της ανάπτυξης προϊόντων η οποία ξεκινά με προκαθορισμένους στόχους και δίνει έμφαση στην κατανόηση προϊόντος και διεργασιών και στον έλεγχο των διαδικασιών, βάση ορθών επιστημονικών πρακτικών και συστήματος διαχείρισης διακινδύνευσης της ποιότητας”. Στην οδηγία αυτή, επισημαίνεται επίσης, ότι η ανάπτυξη πρέπει να επικεντρώνεται στον σχεδιασμό προϊόντων και διαδικασιών παρασκευής σύμφωνα με τις απαιτήσεις ποιότητας με απώτερη πρόθεση την συνεχή παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων υψηλών προδιαγραφών. Με την ενσωμάτωση της επιστήμης και των αρχών της διακινδύνευσης, το QbD παρέχει μία προληπτική “πλατφόρμα” ελέγχου σε κάθε στάδιο ανάπτυξης από την αρχή μέχρι το τέλος, χωρίς να βασίζεται στην διενέργεια περιοδικών δοκιμών. Αντίθετα, η παραδοσιακή προσέγγιση της “Ποιότητας μέσω Δοκιμών” (Quality by Testing-QbT) θεωρείται ότι καταναλώνει χρόνο και εργασία, απαιτώντας πολλές δοκιμές ρουτίνας για την παρακολούθηση της ποιότητας καθ’ όλη την διάρκεια ανάπτυξης.

Η προσέγγιση του QbD εμφανίζει σημαντικά οφέλη όσον αφορά την κατανόηση του προϊόντος και των διεργασιών που σχετίζονται με αυτό, παρέχοντας μεγαλύτερη ευελιξία όσον αφορά την επικοινωνία με τις κανονιστικές αρχές και τους ελέγχους πορείας παρασκευής. Στοχεύει

στην βελτίωση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών παρασκευής και την ελαχιστοποίηση πιθανών κινδύνων. Επιπλέον, προωθεί τη συνεχή βελτίωση, διευκολύνει την εφαρμογή καινοτομιών και την αποτελεσματική εποπτεία των αρχών, μειώνει την αμφισβήτηση εκ μέρους των καταναλωτών και εξ’ όρθολογίζει αλλαγές που

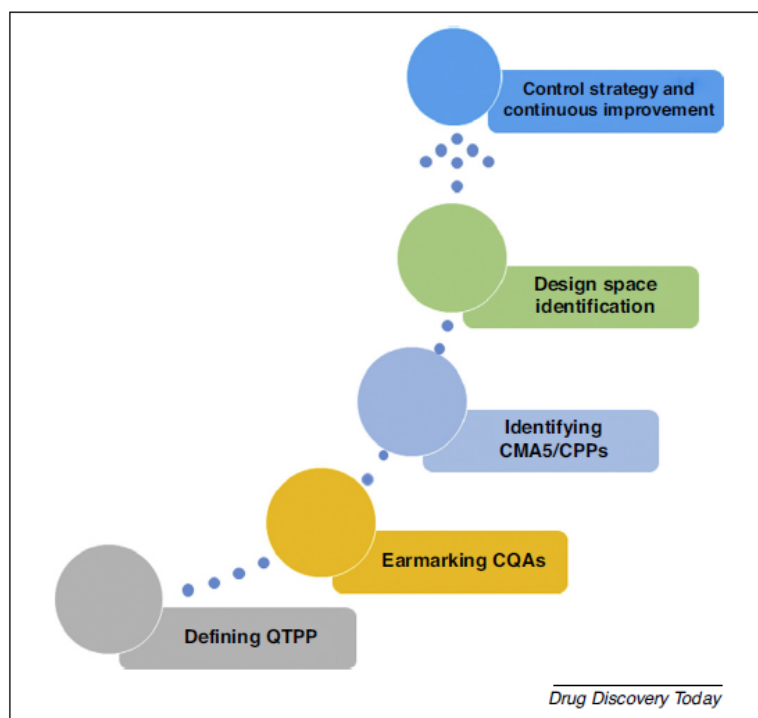


Εικόνα 79: Τρίγωνο απεικόνισης των τριών ενδιαφερόμενων (Beg, 2019)

μπορεί να πραγματοποιηθούν μετά την έγκριση, σε οποιοδήποτε στάδιο καθ’ όλη την διάρκεια ζωής του σκευάσματος. Ως εκ τούτου, η προσέγγιση αυτή προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα στους ενδιαφερόμενους φορείς, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται οι βιομηχανίες παρασκευής, οι κανονιστικές αρχές και οι ασθενείς (Beg, 2019).

### 11.2.2 Στάδια υλοποίησης του QbD

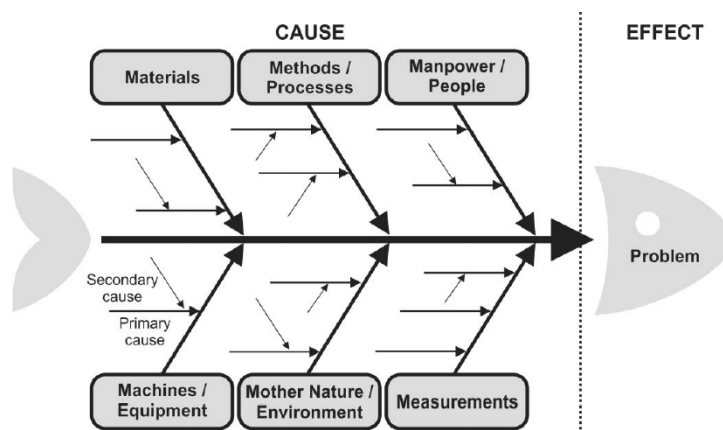
Σύμφωνα με τις οδηγίες ICH Q8-Q10, η ενσωμάτωση της μεθοδολογίας του QbD στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων, απαιτεί την κατανόηση των βασικών στοιχείων αυτής και λαμβάνει χώρα μέσω της εφαρμογής των παρακάτω σταδίων:



Εικόνα 80: Στάδια υλοποίησης του QbD (Beg, 2019)

- Ορισμός στόχων ανάπτυξης προϊόντος: Στην αρχή του κύκλου ανάπτυξης ενός φαρμακευτικού προϊόντος, οι βασικοί στόχοι παραγωγής διαμορφώνονται από τον χρηματοδότη ή τον κατασκευαστή στα πλαίσια κάλυψης μίας συγκεκριμένης μη ικανοποιημένης ανάγκης θεραπείας. Συνεπώς, σε αυτό το στάδιο καθορίζεται το προφίλ ποιότητας του προϊόντος στόχου ( Quality Target Product Profile-QTPP), το οποίο αποτελεί μία δυναμική περίληψη των χαρακτηριστικών ποιότητας του φαρμακευτικού σκευάσματος. Επιπλέον, τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του σκευάσματος (Critical Quality Attributes-CQAs), τα οποία συνδέονται άμεσα με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά του, ταυτοποιούνται από το QTPP με κέντρο αναφοράς τις ανάγκες του ασθενή. ( Quality-by-design approach as a)

- Ταυτοποίηση των CMAs/CPPs και συσχέτισή τους με CQAs: Εν συνεχεία ταυτοποιούνται τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας των υλικών (Critical Material Attributes- CMAs), τα οποία σχετίζονται με τις διεργασίες φαρμακευτικής ανάπτυξης. Προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι σχέσεις αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ των



Εικόνα 82: Διάγραμμα Ishikawa- “ψαροκόκαλο” (Hristoski, 2017)

CMAs/CPPs

(Κρίσιμες

Παράμετροι Διεργασίας-Critical Process Parameters) και των CQAs,

χρησιμοποιούνται

συνήθως τα

διαγράμματα

Ishikawa ή αλλιώς

“ψαροκόκαλο”.

Παράλληλα,

χρησιμοποιούνται

εργαλεία

Διαχείρισης

Διακινδύνευσης της

Ποιότητας (Quality

Risk Management-

QRM), όπως ο

Πίνακας Εκτίμησης

Κινδύνου (Risk

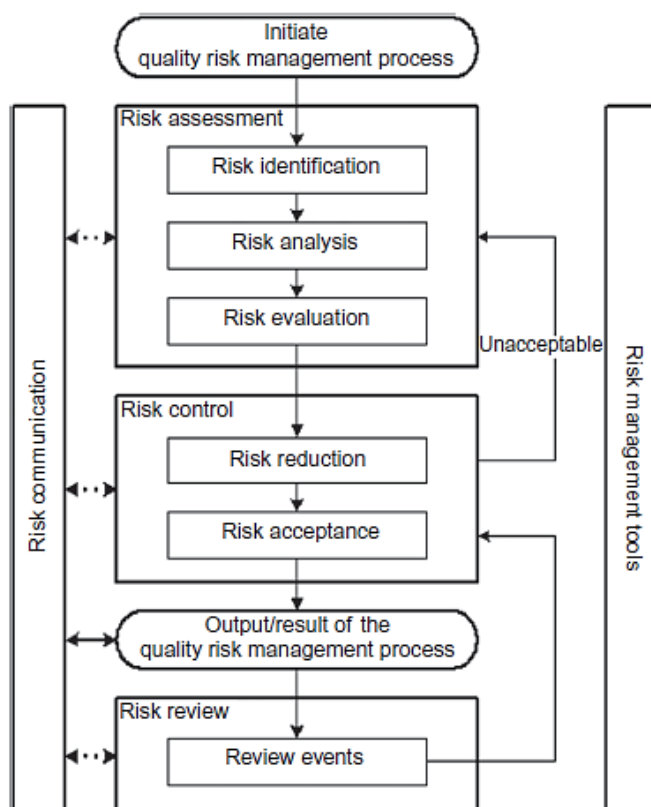
Estimation Matrix-

REM) και η

Ανάλυση Τύπων

Αστοχίας και

Αποτελεσμάτων



Εικόνα 81: Εφαρμογή Διαχείρισης Διακινδύνευσης της Ποιότητας (Beg, 2019)

(Failure Mode

Effect Analysis-

FMEA), καθώς

και πειραματικοί σχεδιασμοί σάρωσης παραγόντων

- Οριοθέτηση χώρων σχεδιασμού και ελέγχου: Μετά την ταυτοποίηση των CMAs και CPPs, ακολουθούν οι μελέτες βελτιστοποίησης των παραγόντων

με την χρήση κατάλληλων, υψηλής ανάλυσης, σχεδιασμών επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Designs-RSM) όπως είναι οι Central composite design (CCD), Box-Behnken design (BBD) κλπ. Η πραγματοποίηση του DoE περιλαμβάνει την βελτιστοποίηση των CMAs και CPPs με την διενέργεια ενός ή περισσότερων σχεδιασμών RSM, με στόχο την μοντελοποίηση των τιμών απόκρισης των CQAs βάσει πολυωνυμικών μαθηματικών εξισώσεων. Επιπλέον, ανάλογα με τους στόχους ανάπτυξης οριοθετείται ο κατάλληλος “χώρος σχεδιασμού” (design space). Ο τελευταίος είναι υψίστης σημασίας για τις κανονιστικές αρχές καθώς προσφέρει ευελιξία στην όλη διαδικασία έγκρισης και διευκολύνει την εποπτεία. Η αλλαγή εντός του χώρου αυτού είναι αποδεκτή επιστημονικά και κατ’ επέκταση δεν απαιτεί μετέπειτα επιπλέον έγκριση. Ο χώρος ελέγχου (control space) είναι ουσιαστικά υποσύνολο του χώρου σχεδιασμού, χωρίς νομοθετική αξία, ο οποίος χρησιμοποιείται ως εσωτερική οδηγία της επιχείρησης για λειτουργία υπό αυστηρότερο πλαίσιο

- Scale-up και επικύρωση του χώρου σχεδιασμού: Δεδομένου ότι οι κανονιστικές αρχές απαιτούν χώρο σχεδιασμού πλήρους κλίμακας για την ανάπτυξη του προϊόντος ή/και των διεργασιών παραγωγής, ο χώρος σχεδιασμού που διαμορφώνεται σε επίπεδο εργαστηρίου χρειάζεται συνήθως επέκταση των ορίων του ώστε να αποτυπωθεί η μεταβλητότητα λόγω διαφοράς στην κλίμακα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι χώροι που οριοθετούνται σε κλίμακα εργαστηρίου υπόκεινται σε μελέτες επικύρωσης μέσω καθορισμένων σημείων ελέγχου κατά την διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας πλήρους κλίμακας. Αυτή η προσέγγιση βοηθάει στην αξιολόγηση της “ανθεκτικότητας” του χώρου σχεδιασμού.
- Στρατηγική ελέγχου και συνεχής βελτίωση: Η στρατηγική ελέγχου καθορίζεται στο τέλος της ανάπτυξης του προϊόντος και είναι απαίτηση των αρχών για την χορήγηση έγκρισης. Αποτυπώνει τους κύριους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την μεταβλητότητα των CQAs του προϊόντος και συμβάλλει στην διατήρηση μιας συνεχούς παραγωγής προϊόντων σύμφωνων με τις προδιαγραφές ποιότητας (Beg, 2019).

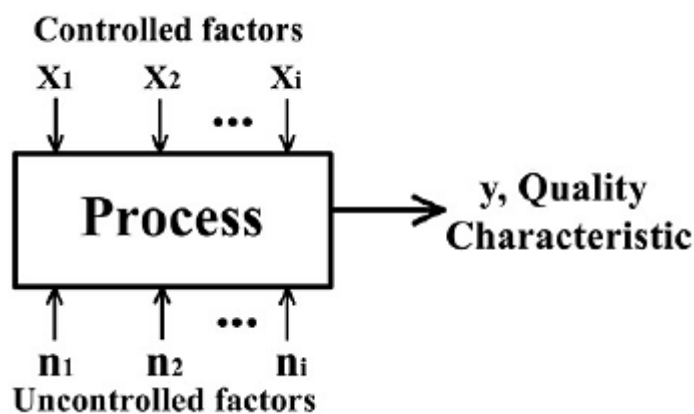
## 11.3 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments)

### 11.3.1 Ορισμός Πειραματικού Σχεδιασμού

Ο Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments-DoE) είναι μία προσέγγιση κατά την οποία οι ελεγχόμενοι εισερχόμενοι παράγοντες της διεργασίας μεταβάλλονται συστηματικά και ηθελημένα ώστε να καθοριστεί η επίδρασή τους στις αποκρίσεις. Ο απώτερος στόχος είναι η σύνδεση των CPPs ( $x_1, x_2, \dots, x_i$ ) με τα CQAs ( $y_i$ ) μέσω μαθηματικών εξισώσεων  $y=f(x)$ , όπως περιγράφεται από την παρακάτω εικόνα.

Η αποτυπωση τέτοιων σχέσεων επιτρέπει:

- τον καθορισμό των κύριων παραγόντων CPPs ανάμεσα στο σύνολο εκείνων που επηρεάζουν τα CQAs
- την ταυτοποίηση των βέλτιστων συνθηκών που οδηγούν σε ενίσχυση της απόδοσης του σκευάσματος και διασφαλίζουν ότι οι τιμές των CQAs κινούνται εντός των προδιαγραφών με ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας
- την εύρεση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων, το οποίο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα έναντι της συμβατικής φιλοσοφίας διεξαγωγής πειραμάτων, όπου κάθε παράγοντας μελετάται ξεχωριστά από τους υπολοίπους



Εικόνα 83: Σχηματική απεικόνιση διεργασίας (Politis, 2017)

Οι σχέσεις αυτές επιτρέπουν την χαρτογράφηση της συμπεριφοράς της διεργασίας σε διαφορετικά επίπεδα παραγόντων, γνωστή και ως χώρος σχεδιασμού, με στόχο την διασφαλισμένη παροχή προϊόντων ποιότητας (Politis, 2017).

### 11.3.2 Πλεονεκτήματα και στάδια Πειραματικού Σχεδιασμού

Η εφαρμογή του Πειραματικού Σχεδιασμού παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της μεθοδολογίας Ανάλυσης Ενός Παράγοντα την Φορά (One Factor At a Time-OFAT), η οποία είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι πρόσφατα:

- Μεγιστοποίηση γνώσης της διεργασίας, με την ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση κατανάλωσης πόρων

- Παρέχεται ακριβής πληροφορία, με τον πιο αποτελεσματικό δυνατό τρόπο
- Ταυτοποίηση αλληλεπιδράσεων παραγόντων
- Χαρακτηρισμός της σημαντικότητας κάθε παράγοντα
- Επιτρέπει την πρόβλεψη της συμπεριφοράς της διεργασίας εντός του χώρου σχεδιασμού
- Εγκαθίδρυση σθερής σχέσης αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ των CPPs και CQAs
- Επιτρέπει την βελτιστοποίηση των CQAs μέσω κατάλληλης επιλογής των CPPs επιπέδων, εγκαθιδρύοντας κατά αυτόν τον τρόπο ένα Αποδεκτό Αποδεδειγμένο Εύρος (Proven Acceptable Range-PAR), δηλαδή το εύρος τιμών ενός παράγοντα, για το οποίο η λειτουργία εντός αυτού-με τους υπόλοιπους παράγοντες σταθερούς-θα οδηγήσει σε ένα προϊόν το οποίο ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις ποιότητας
- Επιτρέπει την πολλαπλή βελτιστοποίηση παραγόντων. Ιδιαίτερα χρήσιμο για τα φαρμακευτικά σκευάσματα, που παρουσιάζουν έναν σημαντικό αριθμό CQAs
- Καθιστά το προϊόν ή/και την διεργασία πιο ανθεκτικά, δηλαδή με λίγα λόγια σχετικά μη ευαίσθητα σε εξωτερικές και μη ελεγχόμενες επιδράσεις
- Διασφαλίζει την προστασία από εξωκείμενες τιμές μέσω της αποτελεσματικής τους αναγνώρισης από τις πειραματικές μήτρες

Αντίθετα, η μέθοδος OFAT προσεγγίζει τον επιθυμητό στόχο μέσω της ταυτοποίησης υπο-περιοχών βασιμένη στην αλλαγή ενός παράγοντα την φορά. Αυτή η απαρχαιωμένη, χρονοβόρα τεχνική είναι ανίκανη να υποστηρίξει την ταυτόχρονη αλλαγή πολλών παραγόντων, ή να ανιχνεύσει αλληλεπιδράσεις. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν την μέθοδο OFAT ακατάλληλη προς χρήση στις QbD εφαρμογές (Politis, 2017).

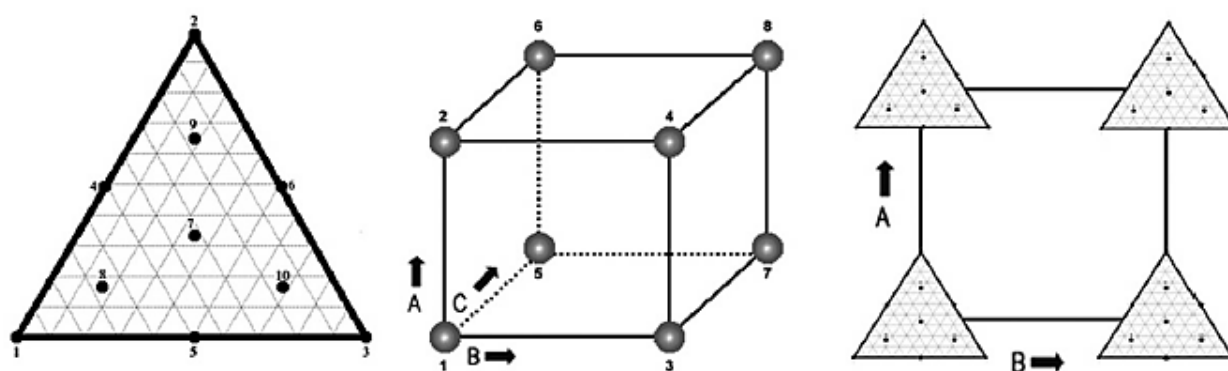
Για την εκτέλεση ενός πειραματικού σχεδιασμού, σύμφωνα με τους Montgomery (Montgomery, 2013) και NIST Handbook (Handbook, 2020), απαιτούνται επτά διακριτές φάσεις:

- Ορισμός στόχων ανάπτυξης: ξεκάθαρος ορισμός του QTPP, βάση βιβλιογραφικών δεδομένων και προηγούμενων γνώσεων
- Επιλογή παραγόντων διεργασίας και αποκρίσεων: η επιλογή δικαιολογείται βάσει των στόχων του DoE και θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι ο σχεδιασμός είναι εφαρμόσιμος και κατάλληλος για την ικανοποίηση του σκοπού του.
- Επιλογή πειραματικού σχεδιασμού: ανάλογα με τους στόχους του DoE επιλέγεται σχεδιασμός σάρωσης, χαρακτηρισμού ή βελτιστοποίησης παραγόντων
- Εκτέλεση πειραματικού σχεδιασμού: η παραγόμενη μήτρα του σχεδιασμού θα πρέπει να εκτελείται με ακρίβεια και οι παράμετροι που δεν συμπεριλαμβάνονται να διατηρούνται σταθερές.

- Έλεγχος συμφωνίας πειραματικών αποτελεσμάτων με τις θεωρητικές υποθέσεις
- Ανάλυση αποτελεσμάτων: η ανάλυση ANOVA και τα γραφήματα είναι ιδιαίτερος χρήσιμα στην εύρεση των κύριων επιδράσεων των στατιστικά σημαντικών παραγόντων και των αλληλεπιδράσεων.
- Εξαγωγή και ερμηνεία συμπερασμάτων: Αν αποδειχθεί η επάρκεια των πειραμάτων για ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων, κρίνεται επιθυμητή η εκτέλεση επιβεβαιωτικών δοκιμών (confirmatory runs) με τις οποίες επαληθεύεται η ορθότητα των συμπερασμάτων ή/και των προβλέψεων

### 11.3.2 Τύποι Πειραματικών Σχεδιασμών

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες πειραματικών σχεδιασμών, ανάλογα με τον τύπο των παραμέτρων υπό μελέτη: Σχεδιασμοί Μίγματος, Παραγοντικοί Σχεδιασμοί και Σχεδιασμοί Μίγματος-Διεργασίας



Εικόνα 84: Κύριες κατηγορίες DoE (Politis, 2017)

#### Σχεδιασμοί Μίγματος (Mixture Designs)

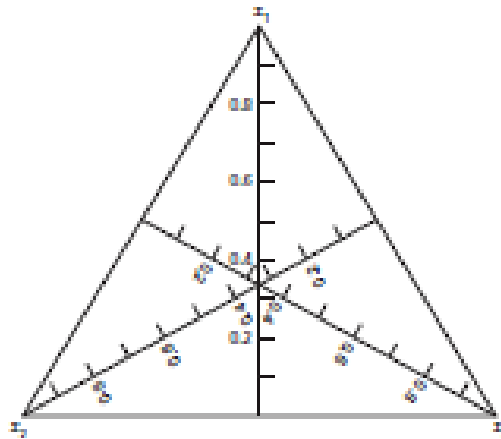
Χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό και τη βελτιστοποίηση μορφοποιήσεων, και εφαρμόζονται όταν η ολική ποσότητα της σύνθεσης είναι ορισμένη π.χ. δισκίο με σταθερή μάζα. Σκοπός της είναι ο εξορθολογισμός της χρήσης κάθε συστατικού και της ποσότητάς του στην μορφοποίηση. Τυπικές εφαρμογές στην φαρμακευτική τεχνολογία περιλαμβάνουν τον καθορισμό της ποσότητας των αραιωτικών στις στερεές φαρμακοτεχνικές μορφές, την επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλύτη-συνδιαλύτη στις υγρές μορφές κλπ. Είναι προφανές ότι οι ποσότητες των συστατικών της σύνθεσης σε αυτούς τους σχεδιασμούς δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Οπότε, αν η ποσότητα του ενός συστατικού αυξάνεται, οι ποσότητες των υπόλοιπων συστατικών πρέπει να μειώνονται (Politis, 2017).

$$\sum_{i=1}^p x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_p = 1$$

$$\text{με } 0 \leq x_i \leq 1, i = 1, 2, \dots, p$$

Η παρακάτω εξίσωση εκφράζει την σχέση μεταξύ των επιλεγμένων αποκρίσεων σε σχέση με τα συστατικά του μίγματος και η οποία γραφικά αποτυπώνεται ως εξής:

$$\text{Αποκρίσεις} = f(\text{ποσότητα συστατικών})$$



Εικόνα 85: Σχεδιασμός Μίγματος (Montgomery, 2013)

### Παραγοντικοί Σχεδιασμοί (Factorial Designs)

Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί αφορούν την ανάπτυξη διεργασιών. Στους σχεδιασμούς αυτού του τύπου οι παράμετροι της διεργασίας μεταβάλλονται ταυτόχρονα και συνειδητά σύμφωνα με μία προκαθορισμένη μήτρα συνδυασμού επιπέδων των παραγόντων. Η εξίσωση που αποδίδει την σχέση των αποκρίσεων με τους παράγοντες είναι η παρακάτω:

$$\text{Αποκρίσεις} = f(\text{επίπεδα παραγόντων})$$

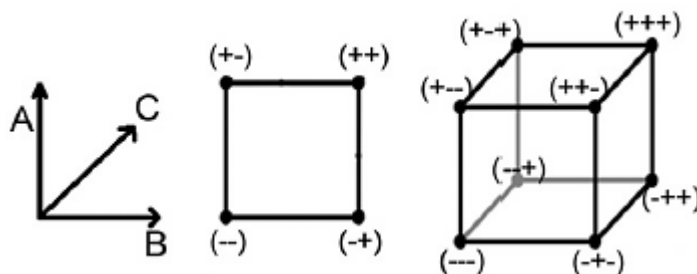
Οι παράγοντες αναπαριστώνται συνήθως με κεφαλαία γράμματα (A,B,C,...), ενώ το ελάχιστο και μέγιστο επίπεδό τους με (-) ή (-1) και (+) ή (+1) αντιστοίχως. Σε περίπτωση που υπάρχουν κεντρικές τιμές αυτές περιγράφονται ως (0). Αυτή είναι προφανώς μία κωδικοποιημένη αποτύπωση των επιπέδων, η οποία ωστόσο ανταποκρίνεται στις πραγματικές τιμές των παραμέτρων, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$X_{\text{coded}} = (X_{\text{actual}} - X_{\text{mean}}) / [(X_{\text{high}} - X_{\text{low}}) / 2]$$

Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί περιλαμβάνουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των επιπέδων των παραγόντων. Ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων εξάγεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\text{Αριθμός πειραμάτων} = \text{Επίπεδα}^{\text{Παράγοντες}}$$

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί αντιπροσωπεύουν ένα μέρος του χώρου του πλήρη παραγοντικού σχεδιασμού, συνήθως το  $\frac{1}{2}$  με  $\frac{1}{4}$ . Χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον όταν ο αριθμός των παραγόντων ξεπερνά τους 4-5, κυρίως σε σχεδιασμούς σάρωσης. Κύριος περιορισμός τους είναι η πιθανή απώλεια ανίχνευσης ορισμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων, λόγω του μικρότερου αριθμού πειραμάτων (Politis, 2017).



Εικόνα 86: Παραγοντικοί σχεδιασμοί (Politis, 2017)

## 12. Σκοπός Μελέτης

Η ανάπτυξη βελόνων σε micro-κλίμακα (μικροβελόνων) ξεκίνησε ως μία υβριδική προσέγγιση των υποδόριων βελόνων και των διαδερμικών συστημάτων, με απώτερο στόχο τη διαμόρφωση κατάλληλου προφίλ αποδέσμευσης φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, σε συνδυασμό με ελαχιστοποίηση της αίσθηση του πόνου. Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων μέσω της ανάπτυξης και εφαρμογής τροποποιημένης μεθόδου μικροχύτευσης. Αναλυτικότερα, έγινε προσπάθεια διαμόρφωσης μίας νέας τεχνικής απαλλαγμένης από την ανάγκη κατασκευής πρότυπων μητρικών δομών, μέσω απευθείας παραγωγής εκμαγείων PLA με εφαρμογή τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης. Προκειμένου να διασφαλισθεί η αξιοπιστία της καινοτόμου αυτής διεργασίας και να ταυτοποιηθούν οι ρυθμίσεις εκείνες στις οποίες η απόδοση της εκτύπωσης ήταν βέλτιστη-άρα και η αποτύπωση των διαστάσεων ακριβής, εφαρμόστηκαν οι αρχές του Πειραματικού Σχεδιασμού.

Εν συνεχεία, μορφοποιήθηκαν πολυμερικές μικροβελόνες από το συνδυασμό των πολυμερών PVA/PVP σε αναλογίες που προτάθηκαν από το λογισμικό Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA) και αξιολογήθηκαν, όσον αφορά το προφίλ αποδέσμευσης της ΦΔΟ, με την πραγματοποίηση πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας με χρήση τεχνητής μεμβράνης Strat-M® και την απώλεια ύδατος κατά την ξήρανση (LOD). Η ΦΔΟ που επιλέχθηκε να ενσωματωθεί ήταν η υδροβρωμική γκαλανταμίνη-για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer, η οποία όταν χορηγείται *per os* παρουσιάζει έντονες ανεπιθύμητες ενέργειες και ως άλας δεν διαθέτει την ικανότητα διαπέρασης του δερματικού φραγμού. Η σύνθεση που προέκυψε από τη βελτιστοποίηση των δύο εξεταζόμενων αποκρίσεων, χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση *in vitro* και *ex vivo* πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας, στο πλαίσιο ανίχνευσης πιθανής συσχέτισης μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M® και του δέρματος πλήρους πάχους. Επιπροσθέτως, η ίδια μορφοποίηση χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της διαφοράς που προκύπτει στην αθροιστική ποσότητα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπερνά το δέρμα πλήρους πάχους, από την ύπαρξη των μικροβελόνων. Ολοκληρώνοντας, για την αξιολόγηση της τελικής μορφής πραγματοποιήθηκαν ορισμένοι από τους βιβλιογραφικά προτεινόμενους ελέγχους όπως είναι η εκτίμηση της διαπέρασης του δέρματος, ο ποσοτικός προσδιορισμός της δόσης ανά επιφάνεια κλπ



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



## 13. Υλικά και εξοπλισμός

### 13.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης είναι τα ακόλουθα:

- Hydrobromide Galantamine, Batch No: 1811102787, Aurobindo
- PVA 26-88 Ph Eur USP, Lot: 4-027269-069100 (Merck, Germany)
- PVP K-30, Lot:0773945670, Kollidon<sup>®</sup>
- PLA filament, Lot: 014713-D, (PrimaValue<sup>™</sup> PLA - PrimaCreator)
- Μεθανόλη (Methanol – *MeOH*) καθαρότητας HPLC (Fisher, UK)
- Νερό (Water –  $H_2O$ ) καθαρότητας HPLC (Fisher, UK)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Isopropyl Alcohol – IPA) καθαρότητας LC-MS (Merck, USA)
- Απιονισμένο νερό (Στήλη Zalion Ionel AEBE)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) (Panreak, Spain)
- Sodium Dihydrogen Phosphate Dihydrate G.R. (Batch No: PP/2011/00057 Lach Ner, Chzech Republic)
- Μembrάνη υποστήριξης πολυαιθυλενίου CoTran<sup>™</sup> 9720 (3M, USA)
- Αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη πολυεστέρα Scotchpak<sup>™</sup> 1022 (3M, USA)
- Σιλικονούχο πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό DURO-TAK 387-2516, Lot: ZQ4000721 (Henkel)
- Διαλύματα βαθμονόμησης πεχαμέτρου pH 4 και 7 (WTW GmbH, Germany)
- Φίλτρα αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45  $\mu m$  (CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra RC-45/13, Germany)
- Τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup>, Lot No:K5KA9541
- Δέρμα πλήρους πάχους

### 13.2 Εξοπλισμός

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- ZMorph 2.0 SX FDM printer, Poland
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί:
  - i. Mettler Toledo AT 261, Delta Range<sup>®</sup> (Mettler, Switzerland)
  - ii. Kern ABJ 220-4M, No:WBO450004
- Υδατόλουτρο υπερήχων: Branson Sonicator 5200 (Branson, U.S.A.)
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης: Nuova II stir Plate (Barnstead, Thermolyne, U.S.A.) και Cimarec 3, (Thermolyne, U.S.A.)
- Μαγνήτες ανάδευσης
- Συσκευή διήθησης υπό κενό: Millipore

- Φίλτρα για την συσκευή διήθησης υπό κενό: Durapore<sup>®</sup> Membrane filters, 0,45 μm HV
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), που περιλαμβάνει:
  - i. Αντλία υψηλής πίεσεως Spectra System P1000 (Spectra Physics, U.S.A.)
  - ii. Αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler) Spectra System AS1000 (Spectra Physics U.S.A.)
  - iii. Στήλη 250 cm × 4,6 mm, 5μ, Hypersil<sup>®</sup> BDS C18 (ThermoQuest Hypersil Division, U.K.)
  - iv. Ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού Spectra System 2000 (Thermo Separation Products, U.S.A.) ρυθμισμένος σε δύο μήκη κύματος λ<sub>max</sub>=210nm και λ<sub>max</sub>=300nm
  - v. Μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
  - vi. Ηλεκτρονικό υπολογιστή (Thermo Quest, Inc., U.S.A.) με λογισμικό Chromquest<sup>®</sup>, Version 5.1 (Thermo Quest, U.K.)
- Τροποποιημένα κύτταρα του Franz (Crown Glass, Somerville, U.S.A.), με εμβαδόν ανοίγματος 0,636 cm<sup>2</sup> και όγκο διαμερίσματος δέκτη 6,275ml
- Υδατόλουτρο: Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany)
- pH μετρο: Lab 680, Schott
- Μικροσκόπιο Leica (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany) εξοπλισμένο με σύστημα ανάλυσης εικόνας (Leica Q500IW System, Leica Cambridge, England), αποτελούμενο από έγχρωμη συσκευή λήψης εικόνας (JVC Colour Digital Camera, TKC1381, Japan).
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού T90+ Double Beam UV Visible Spectrophotometer, PG Instruments Ltd, UK.
- Συσκευή περιδίνησης (Vortex), Code: 2240, Techno Kartell.
- Κυψελίδες χαλαζία, Type: 6030 – UV, Light Path: 10mm, Hellma, Hellma Analytics, Germany
- Συσκευή φυγοκέντρωσης: HERMLE Type Z 32 HK (Labortechnik GmbH Germany)
- Κλίβανος: WT binder (Binder, Germany)

## 14. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

### 14.1 Λήψη φάσματος UV

Σκοπός της πραγματοποίησης των πειραμάτων διαπερατότητας είναι η εκτίμηση των επιπέδων της ΦΔΟ η οποία διαπερνά την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη μεμβράνη. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η χρήση μεθόδου ανάλυσής δειγμάτων. Η τεχνική που επιλέχθηκε είναι εκείνη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή UV-Vis, λόγω των πλεονεκτημάτων εκλεκτικότητας και χαμηλού ορίου ανίχνευσης. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της, είναι η λήψη φάσματος της γκαλανταμίνης στο υπεριώδες-ορατό, με απώτερο στόχο την εύρεση του μήκους κύματος ( $\lambda_{max}$ ) που η ουσία παρουσιάζει την μέγιστη απορρόφηση. Η επιλογή του συγκεκριμένου μήκους κύματος βασίζεται στην επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας με την ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση των μεταβολών της απορρόφησης (άρα και της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης) οι οποίες οφείλονται στην μικρή διακύμανση των τιμών του μήκους κύματος. Αυτό συμβαίνει διότι στο  $\lambda_{max}$  παρατηρείται πλατό απορρόφησης.

Ζυγίστηκαν λοιπόν 10mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100mL και αραιώθηκαν μέχρι την χαραγή με νερό HPLC. Ακολούθησε ανακίνηση της φιάλης και τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 15min ώστε να διασφαλισθεί η διάλυση της. Από το πρότυπο αυτό διάλυμα, συγκέντρωσης 100μg/mL, λήφθηκε 1mL για την λήψη του φάσματος.

Η λήψη του φάσματος απορρόφησης της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης έγινε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, με σάρωση από τα 195 έως τα 300 nm και κυψελίδα χαλαζία πάχους 1 cm. Για την διόρθωση του σήματος υποβάθρου, χρησιμοποιήθηκε λευκό δείγμα (blank) με νερό HPLC.

### 14.2 Περιγραφή αναλυτικής μεθόδου HPLC

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για την ποσοτικοποίηση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης εφαρμόστηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσης (P1000, Spectra Physics, USA), έναν αυτόματο δειγματολήπτη (AS1000, Spectra Physics, USA), μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Spectra System SN 4000, Thermo Separation Products, U.S.A.) κι έναν ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Spectra System 2000 UV-Vis detector, Thermo Separation Products, USA).

Για την ανάλυση επιλέχθηκε η στήλη Hypersil® BDS C18 column (250 x 4.6mm, 5μm, Thermo Fischer Scientific). Οι συνθήκες ανάλυσης που εφαρμόστηκαν είναι αποτέλεσμα τροποποίησης μεθόδου που αναφέρεται στην βιβλιογραφία από τους Dina Ameen *et al* (Ameen, 2019). Συγκεκριμένα, ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε

μείγμα μεθανόλης:ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού οξέος 0,05M 40:60v/v, με ρύθμιση pH στην τιμή 5,2. Η ροή προώθησης της κινητής φάσης ορίστηκε στο 1mL/min με όγκο δείγματος 50μL και η ανάλυση εκτελέστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (~25°C). Το επιλεγμένο μήκος κύματος με βάση τα δεδομένα ανάλυσης φάσματος επιλέχθηκε να είναι 213nm, διότι δεν υπάρχουν παρεμποδίσσεις σε αυτό το μήκος κύματος και επιτυγχάνεται μικρότερη τιμή LOQ(όριο ποσοτικοποίησης).

**Πίνακας 10:** Χρωματογραφικές συνθήκες ανάλυσης

| Περίληψη Χρωματογραφικών Συνθηκών |                                                                               |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Χρωματογραφική Στήλη              | Hypersil® BDS C18 (250 x 4.6 mm, 5μm)                                         |
| Κινητή Φάση (% v/v)               | Μεθανόλη:Ρυθμιστικό Διάλυμα Δισόξινου<br>Φωσφορικού Οξέος 0,05M 40:60, pH 5,2 |
| Ταχύτητα ροής (mL/min)            | 1                                                                             |
| Μήκος Κύματος Ανίχνευσης (nm)     | 213                                                                           |
| Όγκος Δείγματος (μL)              | 50                                                                            |
| Χρόνος Έκλουσης (min)             | 2,5                                                                           |
| Θερμοκρασία (° C)                 | Θερμοκρασία Περιβάλλοντος                                                     |

### 14.3 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος & Κινητής Φάσης

Για την παρασκευή ενός λίτρου δισόξινου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,05M), ζυγίστηκαν σε χαρτί ζύγισης 7,8g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $\text{MB}=156,01\text{mol/gr}$ ) και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ποτήρι ζέσεως του 1L. Ακολούθησε προσθήκη νερού HPLC καθαρότητας κατά προσέγγιση μέχρι τα 900mL και ανάδευση σε μαγνητική πλάκα μέχρι πλήρους διάλυσης του στερεού. Στο διάλυμα που προκύπτει μετράται η τιμή pH, με την βοήθεια πεχαμέτρου, και ρυθμίζεται με την στάγδην και υπό ανάδευση προσθήκη διαλύματος NaOH 1M στην επιθυμητή τιμή 5,2. Το διάλυμα που παραλαμβάνεται, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1L και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό HPLC καθαρότητας μέχρι την χαραγή.

Για την παρασκευή ενός λίτρου κινητής φάσης μεθανόλης: ρυθμιστικού διαλύματος δισόξινου φωσφορικού οξέος 40:60, ογκομετρούνται σε ογκομετρικούς κυλίνδρους των 500mL και 1000mL, 400mL μεθανόλης και 600mL από το παρασκευασθέν ρυθμιστικό διάλυμα, αντίστοιχα. Τα περιεχόμενα των δύο κυλίνδρων αναμειγνύονται και το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 15min ώστε να απαερωθεί. Τέλος, ακολουθεί διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων (Millipore, UK) για την κατακράτηση τυχόν σωματιδίων.

#### 14.4 Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων

Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων άγνωστης συγκεντρώσεως από τα πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας, προαπαιτεί την κατασκευή καμπύλης αναφοράς από πρότυπα διαλύματα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης. Τα πρότυπα διαλύματα, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις από αρχικό διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) της δραστικής ουσίας, συγκεντρώσεως 100μg/mL. Για την παρασκευή του, ζυγίστηκαν 20mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης σε χαρτί ζυγίσεως και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη των 200mL. Ακολούθησε αραιώση με νερό HPLC καθαρότητας μέχρι την χαραγή, σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές (Galantamine, 2012). Η ογκομετρική φιάλη, ανακινείται και τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά. Σύμφωνα, με τις αραιώσεις του παρακάτω πίνακα, παραλήφθηκαν τα πρότυπα διαλύματα 1-10 μg/mL.

**Πίνακας 11:** Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 1-10 μg/mL

| Συγκέντρωση Πρότυπου<br>Διαλύματος<br>(μg/mL) | Όγκος Διαλύματος<br>Παρακαταθήκης- 100 μg/mL<br>(μL) | Όγκος Κινητής<br>Φάσης<br>(μL) |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1,0                                           | 10                                                   | 990                            |
| 3,0                                           | 30                                                   | 970                            |
| 5,0                                           | 50                                                   | 950                            |
| 7,0                                           | 70                                                   | 930                            |
| 10,0                                          | 100                                                  | 900                            |

Εν συνεχεία, χρησιμοποιώντας ως διάλυμα παρακαταθήκης το πρότυπο διάλυμα 10 μg/mL, παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα 0,3-1 μg/mL για την ποσοτικοποίηση χαμηλότερων τιμών συγκέντρωσης.

**Πίνακας 12:** Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 0,3-1 μg/mL

| Συγκέντρωση Πρότυπου<br>Διαλύματος<br>(μg/mL) | Όγκος Διαλύματος<br>Παρακαταθήκης- 10 μg/mL<br>(μL) | Όγκος Κινητής<br>Φάσης<br>(μL) |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------|
| 0,3                                           | 30                                                  | 930                            |
| 0,5                                           | 50                                                  | 950                            |
| 1,0                                           | 100                                                 | 900                            |

#### 14.5 Έλεγχος παρεμποδίσεων στην χρωματογραφική κορυφή

Το διάλυμα υποδοχέα (Receptor Solution) που κρίθηκε κατάλληλο για την διατήρηση συνθηκών δεξαμενής, κατά την διενέργεια των *in vitro* και *ex vivo* πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας, ελέγχθηκε για εκδήλωση παρεμπόδισης στην χρωματογραφική κορυφή της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης.

## 16. Μελέτη διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα υποδοχέα (Receptor Solution)

Στόχος της μελέτης αυτής ήταν ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (Woo, 2015) για να αξιολογηθεί η καταλληλότητα του τελευταίου ως διάλυμα υποδοχέα (Receptor Solution) στα πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας με τη διατήρηση συνθηκών δεξαμενής (sink conditions) αλλά και για την εκτίμηση της μέγιστης ποσότητας που μπορεί να “φορτωθεί” στα υμένα των μικροβελόνων. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας περίσσεια ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης σε υάλινα φιαλίδια ( $n=3$ ), τα οποία περιελάμβαναν 5 mL του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Τα υάλινα φιαλίδια, σφραγίστηκαν ερμητικά και τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο δίσκο για 24h σε θερμοκρασία 25° C. Μετά το πέρας των 24h, απομακρύνθηκαν από τον δίσκο και το περιεχόμενο των φιαλιδίων μεταφέρθηκε ποσοτικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές το λεπτό για 15 λεπτά στους 25° C. Εν συνεχεία, το περιεχόμενο κάθε ογκομετρικού σωλήνα διηθήθηκε μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0,45  $\mu\text{m}$  και κατάλληλοι όγκοι από το κάθε διήθημα αραιώθηκαν με κινητή φάση. Η συγκέντρωση της διαλελυμένης υδροβρωμικής γκαλανταμίνης προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και εκφράστηκε σε mg/mL.

## 17. Παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων

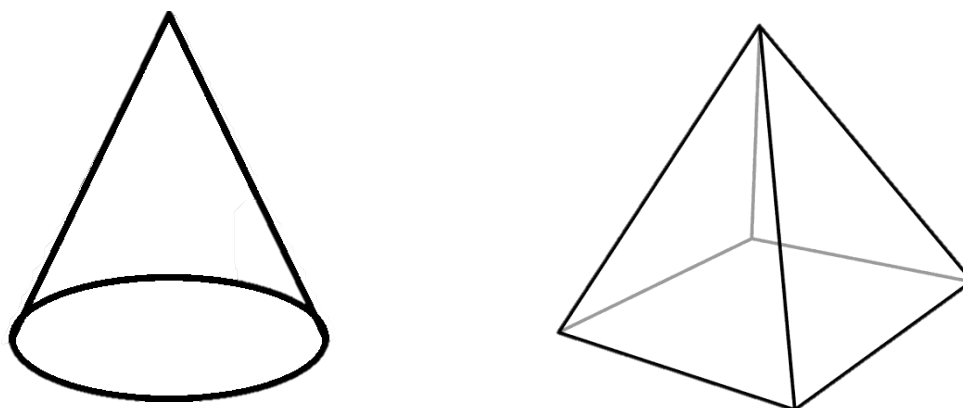
### 17.1 Επιλογή διαστάσεων πολυμερικών μικροβελόνων

Η ανάπτυξη βελόνων σε micro-κλίμακα (μικροβελόνων) ξεκίνησε ως μία υβριδική προσέγγιση των υποδόριων βελόνων και των διαδερμικών συστημάτων, με απώτερο στόχο τη διαμόρφωση κατάλληλου προφίλ αποδέσμευσης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας, σε συνδυασμό με ελαχιστοποίηση της αίσθηση του πόνου (Gill, 2008). Επομένως, πριν την αξιολόγηση της διαπέρασης με την πραγματοποίηση των πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας, είναι απαραίτητο να διασφαλισθεί η κατασκευή μικροβελόνων, οι οποίες θα διαπερνούν το δέρμα και θα είναι ανώδυνες κατά την εφαρμογή τους.

Αρχική υπόθεση κατά την μελέτη αυτή, ήταν ότι ο αριθμός των νευροϋποδοχέων που διεγείρονται, άρα και η αίσθηση του πόνου, είναι άμεσα σχετιζόμενη με την γεωμετρία των μικροβελόνων, διαπίστωση που επαληθεύεται και από προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές. Οπότε, είναι εφικτό μέσω του ελέγχου των διαστάσεων να παρασκευαστούν δομές πρακτικά ανώδυνες κατά την χορήγηση στους ασθενείς. Σύμφωνα με τους (Gill, 2008), παράμετροι όπως το ύψος, η διάμετρος της μύτης και ο αριθμός των μικροβελόνων αναδεικνύονται ως οι πλέον σημαντικοί ύστερα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε εθελοντές. Επομένως, πριν την μορφοποίηση τους ορίστηκαν οι θεωρητικά βέλτιστες διαστάσεις ώστε οι μικροβελόνες να διαπερνούν το δέρμα και να μην προκαλούν δυσφορία κατά την εφαρμογή τους:

#### 17.1.1 Σχήμα

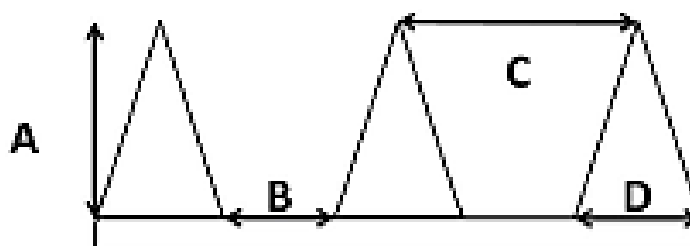
Η ικανότητα διαπέρασης του δέρματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σχήμα των πολυμερικών μικροβελόνων. Μέχρι πρόσφατα, οι περισσότερες παρασκευάζονται βάσει δύο πρότυπων σχημάτων, αυτών της πυραμίδας και του κώνου. Οι Lee *et al* ανακάλυψαν ότι οι μικροβελόνες πυραμιδικού σχήματος, παρουσιάζουν μεγαλύτερη μηχανική αντοχή σε σχέση με τις αντίστοιχες κωνικές, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας διατομής, που αντιστοιχεί σε βάση ίδιας διαμέτρου (Wang, 2017). Μάλιστα, οι πυραμιδικού σχήματος μικροβελόνες, κατά την μέτρηση της δύναμης θραύσης (fracture force) δεν εμφάνισαν ένα διακριτό σημείο μετάβασης (transition point) το οποίο να υποδηλώνει τη θραύση τους κάτω από τις εξεταζόμενες συνθήκες. Η μικροσκοπική παρατήρηση τους αποκάλυψε την σταδιακή παραμόρφωση τους, η οποία ξεκινά από την μύτη και αυξανόμενης της εφαρμοζόμενης δύναμης προχωράει προς την βάση (Chen, 2018). Επομένως, ορίστηκε το σχήμα τους να είναι πυραμιδικό.



### 17.1.2 Αριθμός Μικροβελόνων

Η χορήγηση φαρμακολογικά δραστικών ουσιών και εμβολίων απαιτεί για την επίτευξη των επιθυμητών θεραπευτικών επιπέδων, περισσότερες από μία μικροβελόνες. Επιφάνεια εφαρμογής με μεγάλο αριθμό μικροβελόνων, επιτρέπει την “φόρτωση” μεγαλύτερης ποσότητας της δραστικής ουσίας και την δημιουργία περισσότερων κοιλοτήτων στο δέρμα προς διάχυσή της. Αύξηση, όμως, του αριθμού των μικροβελόνων ανά ορισμένη επιφάνεια συνοδεύεται επίσης από αντίστοιχη αύξηση του προκαλούμενου πόνου καθώς και από μειωμένη ικανότητα διαπέρασης του δέρματος λόγω του φαινομένου “bed of nails” (Teo, 2005). Σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό, όταν τοποθετούνται βελόνες σε μία επιφάνεια με μικρές αποστάσεις μεταξύ τους (υψηλή πυκνότητα βελόνων), τότε αυτές αποτυγχάνουν να τρυπήσουν το δέρμα. Η σχέση αυτή μπορεί να αποτυπωθεί με την παράμετρο a-aspect ratio, η οποία ισούται με τον λόγο της απόστασης των κέντρων μεταξύ δύο γειτονικών μικροβελόνων προς την ακτίνα της βάσης (για τις πυραμιδικού σχήματος είναι το μισό της πλευράς της βάσης). Μικρές τιμές αυτής της παραμέτρου, αντιστοιχούν σε υψηλή πυκνότητα μικροβελόνων και κατ’ επέκταση σε ανεπαρκή διαπέραση του δερματικού φραγμού (Al-Qallaf, 2008).

$$\text{Λόγος Απεικόνισης (a)} = \frac{\text{Απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών κορυφών (C)}}{1/2 \text{ Πλευράς βάσης (D)}}$$



Εικόνα 87: Απεικόνιση διαστάσεων (Lee, 2015)

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω συνθήκες και το γεγονός ότι η πειραματική διάταξη των κυττάρων franz, που χρησιμοποιείται για τα *in vitro* και *ex vivo* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας διαθέτει επιφάνεια  $0,636\text{cm}^2$ , καταλήξαμε στα εξής:

- παρασκευή επιφάνειας μικροβελόνων τετραγωνικού σχήματος  $0,6\text{cm} \times 0,6\text{cm}$  κατόπιν προσαρμογής στις διαστάσεις των κυττάρων franz για τον ευκολότερο καθορισμό των διαστάσεων:

$$E_{franz} = \pi R^2$$

$$R = \sqrt{\frac{E_{franz}}{\pi}}$$

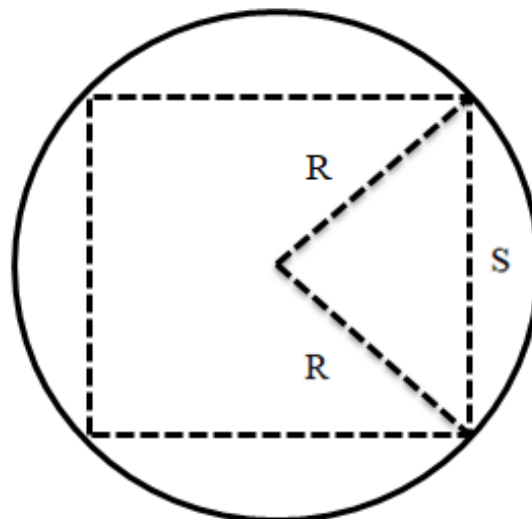
$$R = \sqrt{\frac{0,636}{3,14}}$$

$$R = 0,45\text{ cm}$$

$$S^2 = R^2 + R^2$$

$$S = R\sqrt{2}$$

$$S = 0,636\text{ cm} \approx 0,6\text{ cm}$$



Εικόνα 88: Διαστάσεις για προσαρμογή στο τροποποιημένο κύτταρο franz

- βάσει κλινικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν από τους Lee *et al*, η αύξηση του αριθμού των μικροβελόνων από 5 σε 50 αυξάνει σημαντικά την αίσθηση του πόνου. Οπότε αποφασίστηκε να παρασκευαστεί επιφάνεια μικροβελόνων  $7 \times 7$ , δηλαδή 49 μικροβελόνες που είναι στο όριο του υπό μελέτη εύρους
- η ικανότητα διαπέρασης του δέρματος εκτιμήθηκε με την παράμετρο a-aspect ratio, με επιτρεπόμενες από την βιβλιογραφία τις τιμές 2,7 με 12 και βέλτιστη την 4. Για τον αριθμό και την επιφάνεια των μικροβελόνων που ορίστηκε παραπάνω, ο λόγος a παίρνει την τιμή (Εικόνα 88)

$$\alpha = \frac{600(B) + 300(D)}{\frac{1}{2}300(D)}$$

$$a = 6$$

Η οποία είναι εντός του επιτρεπόμενου εύρους και πλησίον της βέλτιστης τιμής (Al-Qallaf, 2008)

### 17.1.3 Ύψος Μικροβελόνων

Νευρικές απολήξεις υπεύθυνες για την αίσθηση του πόνου, διαπερνούν τόσο τη δερμίδα όσο και την επιδερμίδα, οπότε είναι λογικό να υποτεθεί ότι η αύξηση του μήκους των μικροβελόνων συνεπάγεται και ανάλογη αύξηση των νευροϋποδοχέων. Πράγματι, μικροβελόνες ύψους κάτω των 700  $\mu\text{m}$  χαρακτηρίστηκαν ως ανώδυνες από ένα σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών, εν συγκρίσει με εκείνες που διαθέτουν ύψος άνω των 960  $\mu\text{m}$ . Αιτία για την επιλογή των 500  $\mu\text{m}$ , έναντι των χαμηλότερων μεγεθών, είναι τόσο ότι οι μεγαλύτερου μεγέθους μικροβελόνες είναι πιο ανθεκτικές όσο και ότι μπορούν να αποδεσμεύσουν μεγαλύτερα ποσά της ΦΔΟ (Gill, 2008).

### 17.1.4 Πλάτος Βάσης Μικροβελόνων

Αύξηση του πλάτους της βάσης των πυραμιδικών μικροβελόνων δεν φαίνεται να σχετίζεται με την πρόκληση μεγαλύτερου πόνου. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται τόσο από τις κλινικές μελέτες που πραγματοποίησαν οι Lee *et al* για τιμές πλάτους έως και 465  $\mu\text{m}$ , όσο και από αναφορές που έχουν γίνει ότι η εκδήλωση πόνου είναι ανεξάρτητη της διαμέτρου της βελόνας για στελέχη διαμέτρων 800  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$  και 300  $\mu\text{m}$  οι οποίες εισάγονται σε βάθος 900  $\mu\text{m}$  (Gill, 2008).

Όσον αφορά τη μηχανική τους αντοχή, είναι φανερό ότι αύξηση των διαστάσεων της βάσης, υπό σταθερό ύψος, συνεπάγεται αντίστοιχα και αύξηση της ανθεκτικότητάς τους στις μηχανικές καταπονήσεις λόγω εφαρμογής μικρότερης πίεσης (ασκούνται οι ίδιες δυνάμεις σε μεγαλύτερη επιφάνεια) (Gill, 2008).

Συμπεραίνοντας, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω σε συνδυασμό με περαιτέρω βιβλιογραφικές αναφορές (Lee, 2009), επιλέχθηκε η τιμή των 300  $\mu\text{m}$  για την κάθε πλευρά της βάσης, η οποία εμφανίζει ικανοποιητική μηχανική αντοχή και θεωρείται πρακτικά ανώδυνη κατά την εφαρμογή της διάταξης.

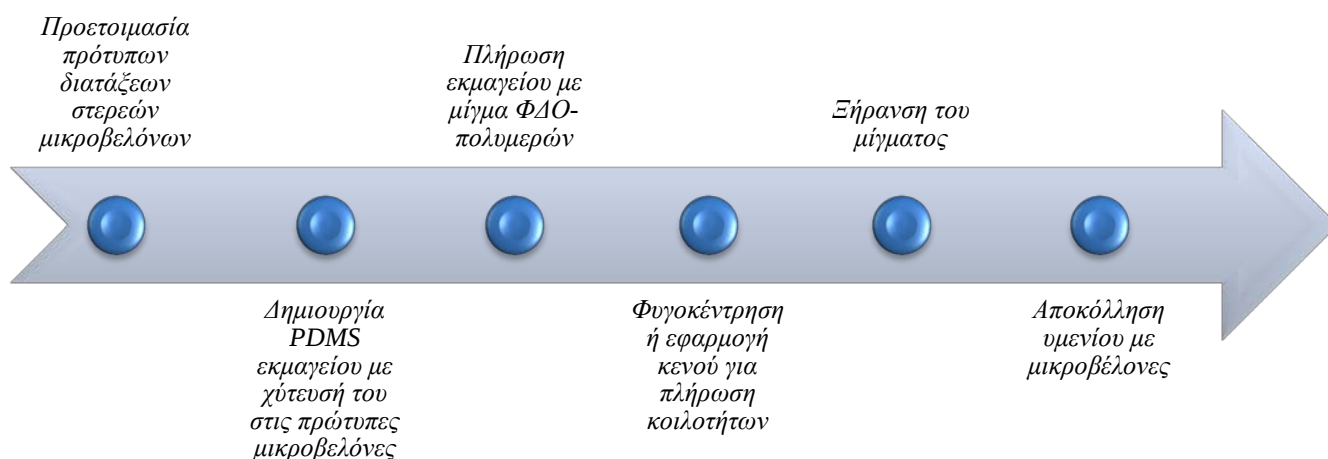
### 17.1.5 Διάμετρος μύτης

Σύμφωνα με κλινικές μελέτες (Gill, 2008), η πρόκληση πόνου εξαρτάται από την δύναμη που εφαρμόζεται για να επιτευχθεί διαπέραση του δέρματος. Πειραματικές μετρήσεις και θεωρητικά μοντέλα απέδειξαν ότι η δύναμη αυτή αυξάνει γραμμικά συναρτήσει της εγκάρσιας επιφάνειας της μύτης των μικροβελόνων, δηλαδή είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη διάμετρο της. Διάμετρος μύτης κάτω των 75  $\mu\text{m}$ , θεωρείται ικανοποιητική για την μη πρόκληση πόνου και την εξασφάλιση της δερματικής διαπέρασης.

## 17.2 Μέθοδος Μικροχύτευσης και τροποποίησή της

Ποικίλες τεχνικές παρασκευής πολυμερικών μικροβελόνων έχουν αναπτυχθεί, συμπεριλαμβανομένων της μικρο-χύτευσης (micromoulding), της εκ σταγονιδίων γεννωμένης τεχνικής με παροχή αέρα (droplet-born air blowing-DAB), λιθογραφίας ολκής (drawing lithography), ήλεκτρο-ολκής (electro-drawing-ED), φωτολιθογραφίας, συνεχούς παραγωγής υγρών διεπαφών (CLIP), χύτευσης διαλύτη και εμβάπτισης. Από αυτές τις τεχνολογίες, εκείνη της μικροχύτευσης είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη λόγω της απλής διεργασίας παρασκευής, της δυνατότητας scale up, υψηλής επαναληψιμότητας και οικονομίας πόρων. Η όλη διεργασία απαριθμεί έξι βασικά στάδια, η πορεία των οποίων απεικονίζεται στην εικόνα 89 (Chen, 2010):

Η προετοιμασία μίας υψηλούς ακρίβειας μητρικής δομής είναι το πρώτο και πλέον



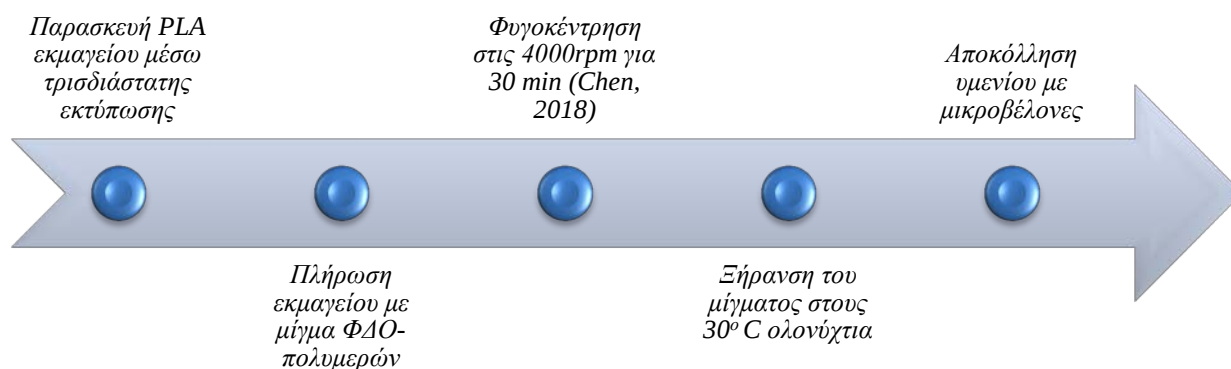
**Εικόνα 89:** Κλασική μέθοδος μικροχύτευσης (Chen, 2010)

σημαντικότερο στάδιο της διεργασίας κατασκευής πολυμερικών μικροβελόνων. Όμως, οι ήδη υπάρχουσες τεχνικές παρασκευής πρότυπων δομών, όπως είναι η χάραξη με λείζερ, η ξηρή χάραξη πυριτίου μέσω αντιδρώντων ιόντων (deep reactive ion etching), η ανισότροπη υγρή χάραξη (anisotropic wet etching) κλπ αποτελούν μία ιδιαίτερη πρόκληση διότι απαιτούν εκπαιδευμένο προσωπικό και υψηλού κόστους εγκαταστάσεις, όπως εξοπλισμό φωτοχάραξης και καθαρούς χώρους. Τις περισσότερες φορές η παραγωγή μίας και μόνο μητρικής δομής κοστολογείται ότι απαιτεί χιλιάδες δολαρίων. Επιπροσθέτως, οι δομές που παρασκευάζονται βάσει των παραδοσιακών προσεγγίσεων που αναφέρθηκαν, έχουν καθορισμένες διαστάσεις. Δηλαδή, νέες μητρικές δομές απαιτούνται κατά την πραγματοποίηση οποιασδήποτε αλλαγής στην γεωμετρία των μικροβελόνων, γεγονός που καθιστά την διαδικασία βελτιστοποίησής τους ιδιαίτερα χρονοβόρο και κοστοβόρο (Chen, 2010).

Για να αντιμετωπιστούν, επομένως, οι προαναφερθείσες προκλήσεις αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος παρασκευής πολυμερικών μικροβελόνων, κατά την οποία δεν απαιτείται η κατασκευή μητρικών δομών. Αναλυτικότερα, με την βοήθεια της τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης είναι δυνατή η απευθείας δημιουργία εκμαγείων, σε

μικρούς χρόνους και με την δυνατότητα άμεσης ρύθμισης παραμέτρων της γεωμετρίας μέσω κατάλληλων λογισμικών. Η νέα αυτή τεχνική απαρτίζεται από τα παρακάτω βήματα:

- Παρασκευή PLA εκμαγείου μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης
- Πλήρωση εκμαγείου με 200  $\mu\text{L}$  από το μίγμα ΦΔΟ-πολυμερών και μεταφορά στους δοκιμαστικούς σωλήνες προς φυγοκέντρωση
- Φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 30 min ( $25^{\circ}\text{C}$ )
- Αφαίρεση δοκιμαστικών από τη φυγόκεντρο, απομάκρυνση περίσσειας μίγματος από το εκμαγείο με γάζα και επαναπλήρωση με 500  $\mu\text{L}$  από το μίγμα
- Ξήρανση του μίγματος στους  $30^{\circ}\text{C}$  ολονύχτια
- Αποκόλληση υμενίου (film) με μικροβελόνες



**Εικόνα 90:** Τροποποιημένη μέθοδος μικροχύτευσης

### 17.3 Παρασκευή εκμαγείων με τεχνολογία FDM

Η τεχνολογία τρισδιάστατης εκτύπωσης (3D printing) είναι μία μέθοδος κατασκευής φυσικών αντικειμένων με την τοποθέτηση υλικού στρώμα προς στρώμα από ψηφιακά μοντέλα, τα οποία διαμορφώνονται μέσω ειδικών λογισμικών συστημάτων στον υπολογιστή. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι 3D εκτυπωτές για εκτύπωση με πλαστικά υλικά είναι οι SLS, SLA και FDM. Οι SLS και SLA εκτυπωτές έχουν την δυνατότητα αναπαραγωγής διαστάσεων μικρότερων των 100  $\mu\text{m}$ , παρουσιάζουν όμως δύο βασικά μειονεκτήματα, τα οποία είναι το υψηλό τους κόστος και η απουσία βιοσυμβατών υλικών.

Αντίθετα, οι FDM αποτελούν μία λύση χαμηλού κόστους με τους οποίους είναι δυνατή η εκτύπωση ανανεώσιμων και βιοδιασπώμενων υλικών, όπως το πολυλακτικό οξύ (PLA) και η πολυβινυλαλκοόλη (PVA), πολυμερή εγκεκριμένα από τον οργανισμό FDA (Food and Drug Administration) (Luzuriaga, 2018). Όμως, ο βασικός περιορισμός τους, που είναι αυτός της χαμηλότερης ανάλυσης εν συγκρίσει με άλλες μεθόδους εκτύπωσης, τους καθιστά μη κατάλληλους για την αναπαραγωγή δομών πολύ μικρών διαστάσεων, όπως είναι οι μικροβελόνες. Οι Luzuriaga *et al* αν και κατόρθωσαν να εκτυπώσουν μικροβελόνες με τη μεθοδολογία FDM, οι δομές χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο ύψος, με την δυνατότητα κατασκευής ενός μόνο σχήματος και ύστερα από κατάλληλη χημική επεξεργασία.

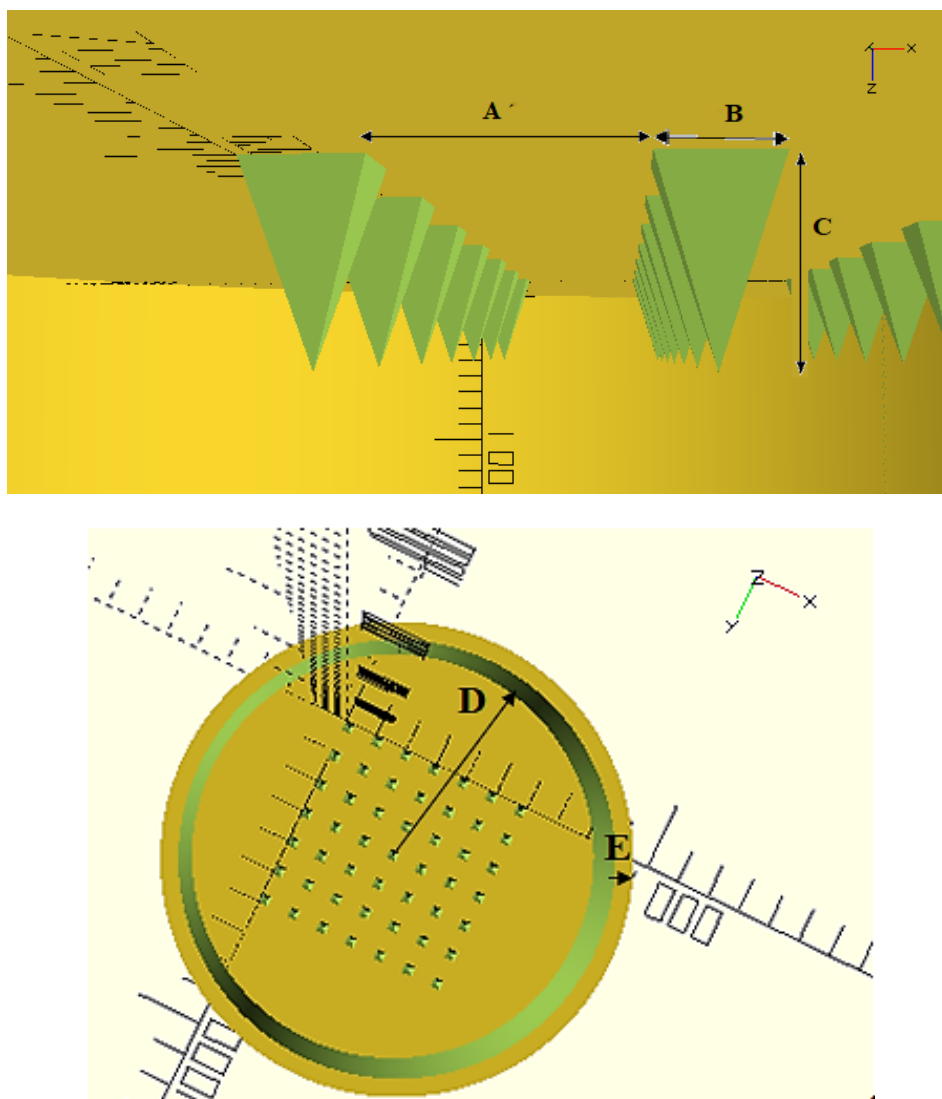
Προκειμένου να επιλυθούν τα προαναφερθέντα προβλήματα, αντί της απευθείας παραγωγής μικροβελόνων, προτάθηκε η κατασκευή εκμαγείων από PLA. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει σειρά πλεονεκτημάτων:

- εξοικονόμηση χρόνου και υλικών, μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο το ολικό κόστος παραγωγής
- ευκολή προσαρμογή παραμέτρων της γεωμετρίας των μικροβελόνων, απλοποιώντας κατ' επέκταση τις μελέτες βελτιστοποίησής τους
- απεξάρτηση από την ανάγκη χρήσης μητρικών δομών, των οποίων η κατασκευή προϋποθέτει την γνώση πολύπλοκων τεχνικών
- τα υλικά εκτύπωσης που χρησιμοποιούνται στους FDM εκτυπωτές με κυριότερο το πολυλακτικό οξύ (PLA), είναι βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και βρίσκουν πληθώρα ιατρικών εφαρμογών όπως είναι τα απορροφήσιμα ράμματα (Luzuriaga, 2018)
- δυνατή η επαναχρησιμοποίηση των παραγόμενων εκμαγείων ύστερα από κατάλληλο καθαρισμό τους. Επιπλέον, είναι ανθεκτικά στην εφαρμογή UV ακτινοβολίας και θέρμανσης

### 17.3.1 Καθορισμός γεωμετρίας εκμαγείου

Εκμαγείο, μήτρα ή καλούπι, όπως συναντάται στις διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές, είναι μία κενή και συμπληρωματική προς το τελικό αντικείμενο δομή, η οποία διαμορφώνει τη τρισδιάστατη μορφή των υλικών όταν αυτά στερεοποιούνται. Επομένως, ένα εκμαγείο για την παρασκευή των πολυμερικών μικροβελόνων αποτελείται από μία επιφάνεια με κενές κοιλότητες πυραμιδικού σχήματος, αντίστοιχης γεωμετρίας προς την επιθυμητή επιφάνεια των μικροβελόνων. Προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν διαρροές κατά την εισαγωγή του μίγματος ΦΔΟ-πολυμερών, σχεδιάζεται περίγραμμα κατάλληλου ύψους, τέτοιο ώστε το εκμαγείο να προσομοιάζει “πηγάδι”. Αν και η επιφάνεια των μικροβελόνων είναι

τετραγωνικού σχήματος όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το εκμαγείο σχεδιάστηκε ώστε το σχήμα του να προσεγγίζει αυτό ενός κυλίνδρου. Η επιλογή αυτή έγινε για την ευκολότερη εφαρμογή του όλου συστήματος στην φυγόκεντρο.



Εικόνα 91: Απεικόνιση διαστάσεων εκμαγείου

Πίνακας 13: Καταγραφή διαστάσεων PLA εκμαγείου

| Διαστάσεις εκμαγείων |                                |                                                                                                                     |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Κοιλότητες           | Πλευρά βάσης (A)               | 300 $\mu\text{m}$                                                                                                   |
|                      | Ύψος (C)                       | 500 $\mu\text{m}$                                                                                                   |
|                      | Διάστημα μεταξύ κοιλοτήτων (B) | 600 $\mu\text{m}$                                                                                                   |
| Εκμαγείο             | Ακτίνα επιφάνειας (D)          | 0,6 cm διότι η διάμετρος των δοκιμαστικών σωλήνων που εισάγονται στην φυγόκεντρο, μετρήθηκε με πεχάμετρο στα 1,4 cm |
|                      | Πάχος τοιχώματος (E)           | 0,5 mm                                                                                                              |
|                      | Ύψος τοιχώματος (H)            | 5 mm                                                                                                                |

Η ελάχιστη τιμή ύψους τοιχώματος καθορίζεται από τον όγκο του μίγματος που εισάγεται στο εκμαγείο προς ξήρανση. Ο όγκος αυτός αποφασίστηκε να είναι 500  $\mu\text{L}$ , ώστε να εξασφαλισθεί η παραλαβή υμενίων επαρκούς πάχους.

Αρα από τον τύπο του όγκου κυλίνδρου εξάγεται ότι:

$$V = \pi R^2 H$$

$$H = \frac{V}{\pi R^2}$$

$$H = \frac{500 \mu\text{L} (mm^3)}{3,14 \times (6 mm)^2}$$

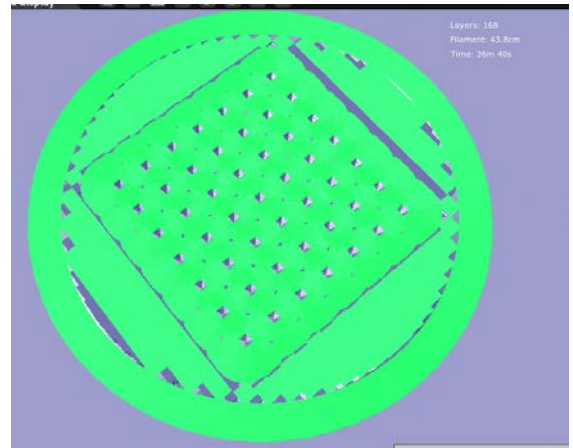
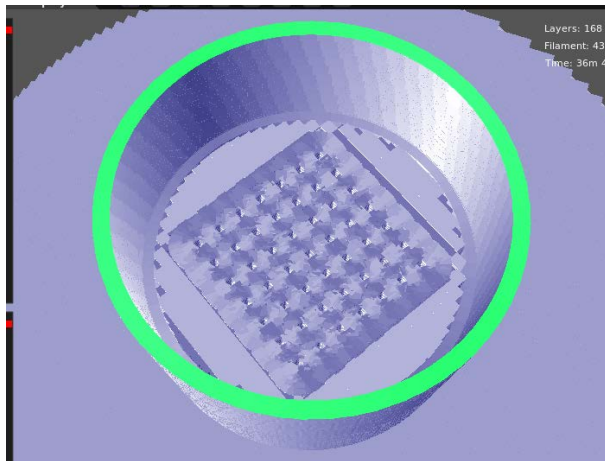
$$H = 4,42 mm$$

### 17.3.2 Ρύθμιση παραμέτρων εκτύπωσης και βελτιστοποίησή τους με την εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού (DoE)

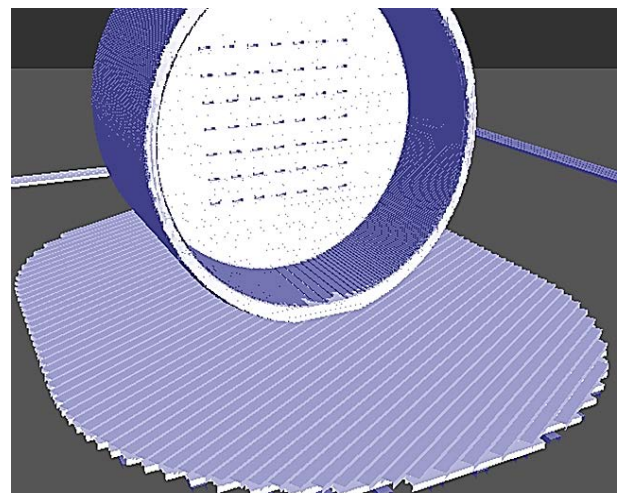
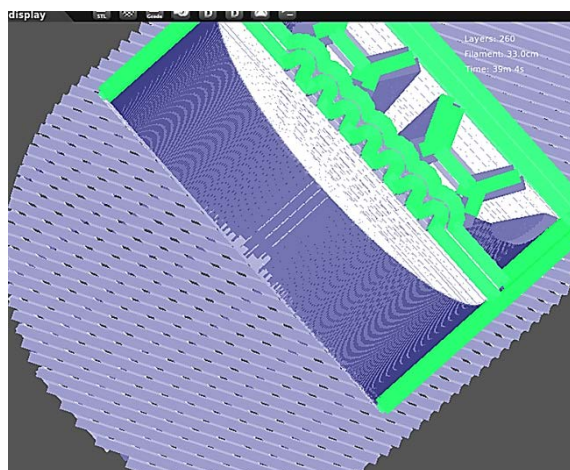
Η κατασκευή και ακριβής απόδοση ενός φυσικού αντικειμένου μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης, αποτελεί μία διεργασία η οποία διέπεται από ένα σημαντικό αριθμό παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία, η ταχύτητα κίνησης της κεφαλής και εξώθησης υλικού κλπ. Επομένως, για να διασφαλισθεί ότι κάθε εκμαγείο που παρασκευάζεται διαθέτει επαναλήψιμα τις διαστάσεις που έχουν ορισθεί κατά την σχεδιάσή του στο λογισμικό OpenSCAD, εφαρμόστηκαν οι αρχές του πειραματικού σχεδιασμού (DoE).

Σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκε αρχικά, ώστε να ταυτοποιηθούν οι κρίσιμοι παράγοντες διεργασίας (CPPs), οι οποίοι επηρεάζουν καθοριστικά τις διαστάσεις του τελικού αντικειμένου (CQAs). Εν συνεχεία, οι παράγοντες αυτοί εισήχθησαν στην πλατφόρμα του λογισμικού Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA) προς εξαγωγή μοντέλου ανάλυσης δεδομένων. Η ακρίβεια των διαστάσεων και κατ' επέκταση η απόδοση της εκτύπωσης, αξιολογήθηκε μέσω της λήψης φωτογραφιών της επιφάνειας των κοιλοτήτων με τη χρήση μικροσκοπίου Leica και ακολούθησε μέτρηση της επιφάνειας της βάσης των μεμονωμένων κοιλοτήτων με το λογισμικό ImageJ.

Αρχική σκέψη ήταν το εκμαγείο να εκτυπωθεί με τέτοια διεύθυνση, ώστε η επιφάνεια των κοιλοτήτων να βρίσκεται πάνω στους x, y άξονες, όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες:



Όμως, η ιδέα αυτή στη συνέχεια απορρίφθηκε διότι όπως μπορεί να παρατηρήσει κανείς από τις παραπάνω εικόνες, σχηματίζονται επιπλέον κενοί χώροι οι οποίοι οφείλονται στη κυκλική κίνηση της κεφαλής κατά την διαμόρφωση των κοιλοτήτων των μικροβελόνων. Ως, εναλλακτική λύση, προτάθηκε η εκτύπωση να πραγματοποιείται με την επιφάνεια των κοιλοτήτων να βρίσκεται πάνω στον z άξονα.

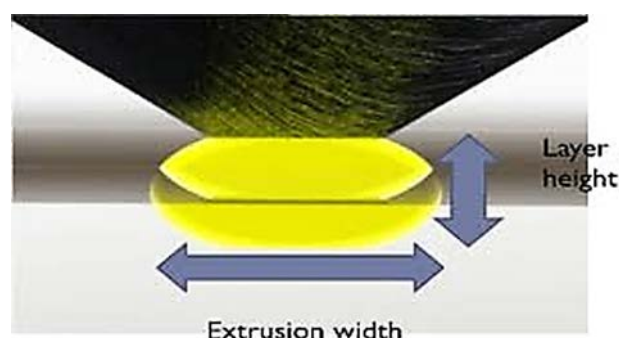


Η προσέγγιση αυτή παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, εν συγκρίσει με την προηγούμενη τα οποία είναι:

- η ακρίβεια κινήσεων της κεφαλής στον άξονα z είναι μεγαλύτερη από αυτήν στους άξονες x,y
- είναι δυνατή η παρασκευή μικροβελόνων με μυτερή άκρη των οποίων η διάμετρος ρυθμίζεται από το ύψος του κάθε στρώματος που εναποθέτει η κεφαλή

Βάσει της επιλεχθείσας διεύθυνσης εκτύπωσης, τα προκαταρκτικά πειράματα ανέδειξαν τρεις κρίσιμους παράγοντες, οι οποίοι είναι οι εξής:

- Layer Height: το ύψος κάθε στρώματος υλικού που εναποθέτει η κεφαλή
- Path Width: το πάχος κάθε στρώματος υλικού που εναποθέτει η κεφαλή
- Printing Speed: η ταχύτητα εξώθησης υλικού



Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις διατηρήθηκαν σταθερές κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων και καταγράφονται στο παρακάτω πίνακα 14. Από αυτές, είναι σημαντικό να γίνει μία μικρή αναφορά στις τιμές που επιλέχθηκαν για την θερμοκρασία (190° C) και την ταχύτητα κίνησης της κεφαλής (150%). Η θερμοκρασία ορίστηκε στο κατώτατο όριο τήξης (190° C-210° C) και σε συνδυασμό με υψηλότερη ταχύτητα κίνησης, με απώτερο στόχο την ελαχιστοποίηση της έκθεσης των ήδη εκτυπωμένων στρωμάτων στις υψηλές θερμοκρασίες της κεφαλής.

Πίνακας 14: Ρυθμίσεις εκτύπωσης

| Ρυθμίσεις εκτύπωσης   |                |
|-----------------------|----------------|
| Παράμετροι            | Τιμές          |
| Fan preset            | Fan PLA        |
| Infill Ratio          | 25%            |
| Infill Type           | Honeycomb      |
| Bottom Layer Base     | Power Raft PLA |
| Start Position        | Complex        |
| Bottom Layer Extruder | Extruder 1     |
| Temperature           | 190° C         |
| Head Move Speed       | 150%           |

Μετά τον καθορισμό των CPPs, προχωρήσαμε στην επιλογή σχεδιασμού για την εξαγωγή της μήτρας των πειραμάτων. Ο τύπος σχεδιασμού που επιλέχθηκε ήταν ο

Central Composite Design (CCD), ο οποίος ανήκει στους RSM (Response Surface Design) και έχει χρησιμοποιηθεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία επειδή δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων με μικρό αριθμό πειραμάτων (El Magri, 2020). Οι παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι τρεις που αναφέρθηκαν παραπάνω σε δύο επίπεδα:

- Layer Height: 25-75  $\mu\text{m}$ , ώστε η διάμετρος της μύτης να είναι κάτω των 75  $\mu\text{m}$  με κατώτατο όριο λειτουργίας του εκτυπωτή τα 25  $\mu\text{m}$
- Path Width: 300-600  $\mu\text{m}$ , από τις προδιαγραφές λειτουργίας του μηχανήματος
- Printing Speed: 30-70%, η ταχύτητα εξώθησης επιλέχθηκε να παίρνει τιμές κάτω του 100%, ώστε να επιτευχθεί μειωμένη ροή υλικού και κατ' επέκταση να αποφευχθεί τοπική συγκέντρωση PLA λόγω των μικρών διαστάσεων που τυπώνονται

Ο παράγοντας  $\alpha$  του σχεδιασμού CCD ορίστηκε ίσος με 1,00, διότι δεν υπάρχει ενδιαφέρον ανίχνευσης εκτός της περιοχής που ορίστηκε από τα επίπεδα των παραγόντων. Ολοκληρώνοντας, στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται η μήτρα 20 των πειραμάτων που προέκυψε με την εισαγωγή των παραπάνω δεδομένων στο λογισμικό Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA).

|  | Std | Run | Factor 1<br>A:Printing Speed<br>% | Factor 2<br>B:Layer Height<br>$\mu\text{m}$ | Factor 3<br>C:Path Width<br>$\mu\text{m}$ |
|--|-----|-----|-----------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
|  | 18  | 1   | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 11  | 2   | 50                                | 25                                          | 450                                       |
|  | 20  | 3   | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 10  | 4   | 70                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 1   | 5   | 30                                | 25                                          | 300                                       |
|  | 16  | 6   | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 13  | 7   | 50                                | 50                                          | 300                                       |
|  | 4   | 8   | 70                                | 75                                          | 300                                       |
|  | 12  | 9   | 50                                | 75                                          | 450                                       |
|  | 3   | 10  | 30                                | 75                                          | 300                                       |
|  | 17  | 11  | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 5   | 12  | 30                                | 25                                          | 600                                       |
|  | 7   | 13  | 30                                | 75                                          | 600                                       |
|  | 2   | 14  | 70                                | 25                                          | 300                                       |
|  | 15  | 15  | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 14  | 16  | 50                                | 50                                          | 600                                       |
|  | 9   | 17  | 30                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 6   | 18  | 70                                | 25                                          | 600                                       |
|  | 19  | 19  | 50                                | 50                                          | 450                                       |
|  | 8   | 20  | 70                                | 75                                          | 600                                       |

Εικόνα 93: Μήτρα πειραματικού σχεδιασμού για τη τρισδιάστατη εκτύπωση

## 17.4 Μορφοποίηση Μίγματος Υδροβρωμικής Γκαλανταμίνης-Πολυμερών

### 17.4.1 Επιλογή Πολυμερικών Υλικών

Την ολοκλήρωση της παρασκευής των εκμαγείων, ακολουθεί το στάδιο χύτευσης του μίγματος υδροβρωμικής γκαλανταμίνης-πολυμερών για την παραλαβή των πολυμερικών υμενίων με μικροβελόνες (Εικόνα 90). Όμως, παρά την μεγάλη ποικιλία εμπορικά διαθέσιμων πολυμερών, δεν είναι όλα κατάλληλα προς χρήση. Συγκεκριμένα, τα πολυμερή που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πρέπει να είναι υδατοδιαλυτά, μη τοξικά/ερεθιστικά και να διαθέτουν την ικανότητα δημιουργίας υμενίων. Από αυτά, τα πλέον χρησιμοποιούμενα αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα και αναλόγως μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή/και σε συνδυασμούς (Karki, 2016).

**Πίνακας 15:** Σύνηθη χρησιμοποιούμενα πολυμερή για την Παρασκευή υμενίων (Karki, 2016)

| Πολυμερή                            | Ιδιότητες                                                                                                                                                                                                                                    | Κύρια στοιχεία                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη (HPMC) | Λευκή, άοσμη, άγευστη κόνη<br>Mw 10000-1500000<br>Διαλυτή σε κρύο νερό, αλλά αδιάλυτη σε χλωροφόρμιο και αιθανόλη<br>Ιξώδες (η) 3-100000 mPa•s<br>Μη ιονικό πολυμερές με μέτριες προσκολλητικές ιδιότητες<br>Σταθερά διαλύματα σε pH 3 με 11 | Ικανότητα σχηματισμού υμενίων σε συγκεντρώσεις 2-20%<br>Γενικά χρησιμοποιείται σε ελεγχόμενη ή/και καθυστερημένη αποδέσμευση της ΦΔΟ                                                                                                                  |
| Καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (CMC)       | Λευκή, άοσμη κόνη<br>Mw 90000-700000<br>Εύκολη διασπορά στο νερό προς σχηματισμού διαγούς ή κολλοειδούς διαλύματος η 5-13000 mPa•s (υδατικό διάλυμα 1%)<br>Υψηλή ικανότητα διόγκωσης<br>Καλή βιοπροσκολλητική δύναμη                         | Βελτίωση του χρόνου παραμονής των υμενίων HPC και sodium alginate<br>Καλή συμβατότητα με άμυλο σχηματίζοντας πολυμερικό δίκτυο υμενίων με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες<br>Ενζυμικά τροποποιημένο CMC εμφανίζει καλές ιδιότητες σχηματισμού υμενίων |
| Υδροξυπροπυλο κυτταρίνη (HPC)       | Λευκή προς υποκίτρινη, άοσμη και άγευστη κόνη<br>Mw 50000-1250000<br>Διαλυτή σε κρύο και θερμό πολικό οργανικό διαλύτη όπως απόλυτη αιθανόλη, μεθανόλη κλπ<br>η 75-6500 mPa•s ανάλογα με τον βαθμό του πολυμερούς                            | Χρησιμοποιείται για την αντικατάσταση συνθετικών πολυμερών ή του HPMC σε μία πολυμερική μήτρα με τροποποιημένο άμυλο προς βελτίωση της διαλυτότητας<br>Διαθέτει ικανοποιητική ικανότητα σχηματισμού υμενίων και διαλύματα 5%                          |

| Πολυμερή                       | Ιδιότητες                                                                                                                                                                                                               | Κύρια στοιχεία                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | Μέτριες προσκολλητικές ιδιότητες                                                                                                                                                                                        | (% w/w) αυτού χρησιμοποιούνται γενικά για επικαλύψεις                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Πολύ (βινυλοπυρρολιδόνη) (PVP) | Μεγάλο εύρος διαλυτότητας<br>Μη ιονικά<br>Υψηλή ικανότητα διόγκωσης<br>Χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της προσκόλλησης                                                                                                | Ανάμειξη με PVA και HPMC βελτιώνει την ικανότητα σχηματισμού υμενίων<br>Ανάμειξη με ethyl cellulose και HPC παράγει υμένια με αυξημένη ευκαμπτότητα και ισχυρότερη μηχανική αντοχή<br>Διάφορες αναλογίες του μίγματος PVP-αλγινικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό ελεγχόμενης αποδέσμευσης ΦΔΟ |
| Πολύ (βινυλαλκοόλη) (PVA)      | Λευκή προς κρεμώδους χρώματος κόνη<br>Mw 20000-200000                                                                                                                                                                   | Πολύ εύκαμπτα υμένια<br>Συχνή χρήση σε οφθαλμικές μορφές σε συγκεντρώσεις 3-5%                                                                                                                                                                                                                              |
|                                | Υδατοδιαλυτό συνθετικό πολυμερές<br>Μη ιονικά πολυμερή<br>Μέτριες προσκολλητικές ιδιότητες                                                                                                                              | Μεγαλύτερη επιμήκυνση στις τιμές θραύσης                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Χιτοζάνη                       | Λευκή προς κρεμώδους χρώματος κόνη και άοσμη<br>Βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο<br>Ελαφρώς διαλυτό στο νερό, πρακτικά αδιάλυτη στην αιθανόλη                                                                               | Εξαιρετική ικανότητα σχηματισμού υμενίων<br>Διαθέτει ικανότητα κυτταρικής προσκόλλησης λόγω της κατιονικής δομής τους                                                                                                                                                                                       |
| Ζελατίνη                       | Κόνη με ελαφρύ χρώμα κεχριμπαριού προς ήπιο κίτρινο<br>Mw 15000-250000<br>Διαλυτή σε γλυκερίνη, οξέα, βάσεις και θερμό νερό<br>η 4,3-4,7 mPa·s 6,67%<br>υδατικό διάλυμα στους 60° C<br>Περιεχόμενο υγρασίας 9-11% (w/w) | Πολύ καλή ικανότητα σχηματισμού υμενίων<br>Χρησιμοποιείται για την προετοιμασία στεφρών και οφθαλμικών υμενίων                                                                                                                                                                                              |

Στη πλειονότητα των περιπτώσεων, το υμένιο στήριξης και οι μικροβελόνες προκύπτουν από τη ξήρανση του ίδιου μίγματος, χάριν απλούστευσης της διαδικασίας παρασκευής. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνουμε ότι τα πολυμερή, πέρα από τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν, πρέπει να δημιουργούν μικροβελόνες επαρκούς σκληρότητας ώστε να διασφαλίζεται η επιτυχής διαπέραση του φραγμού. Τρία εξ αυτών-HPMC, PVA και PVP- έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για την παρασκευή τέτοιων δομών και φαίνεται να πληρούν τις περισσότερες των παραπάνω προϋποθέσεων. Το HPMC όμως απορρίφθηκε εξ' αρχής ως επιλογή, διότι αν και κατά την παραγωγή απλών υμενίων δεν προκαλεί ερεθισμούς, δεν φαίνεται να ισχύει η ίδια συνθήκη όταν αποτελεί κύριο συστατικό μικροβελόνων, σύμφωνα με κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί (Demir, 2013). Επομένως, στην παρούσα διπλωματική εργασία, αποφασίστηκε η χρήση των PVA και PVP και συγκεκριμένα

των τύπων PVA 26-88 και PVP K-30, λόγω των ιδιοτήτων σκληρότητας και ευκαμπτότητας που εμφανίζουν. Αναλυτικότερα, το PVA αποτελεί πολυμερικό παράγοντα δημιουργίας εύκαμπτων ομοιογενών υμενίων, ενώ το PVP αν και προσδίδει σκληρότητα στη τελική μορφή, αδυνατεί να δημιουργήσει υμένια ως μεμονωμένο συστατικό λόγω μη επαρκούς συγκράτησης ύδατος. Επιπλέον, το PVA απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους διάλυσης εν συγκρίσει με το PVP, οπότε κρίνεται κατάλληλο για παρατεταμένη αποδέσμευση της ΦΔΟ. Επομένως, βάσει των παραπάνω αποφασίστηκε ο συνδυασμός αυτών των δύο πολυμερών και των ιδιοτήτων τους με εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού.

#### 17.4.2 Παρασκευή PVA/PVP μικροβελόνων με την εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού (DoE)

Στόχος σε αυτό το στάδιο είναι η εφαρμογή των αρχών του Πειραματικού Σχεδιασμού ώστε να ταυτοποιηθεί η σύνθεση με τη μέγιστη αθροιστική ποσότητα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) μέχρι και τις 24h. Ο τύπος σχεδιασμού που επιλέχθηκε ήταν ο Πλήρης Παραγοντικός Σχεδιασμός (Full Factorial) δύο επιπέδων για 3 παράγοντες- $2^3$ . Οι 3 παράγοντες που εισήχθησαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές στο λογισμικό Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA) ήταν οι παρακάτω:

- %w/v της αρχικής μορφοποίησης σε PVA/ 5-10%
- %w/v της αρχικής μορφοποίησης σε PVP/ 0-5%
- δόση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά επιφάνεια μελέτης κυττάρων Franz  $0,636 \text{ cm}^2/1-3 \text{ mg}$

Οπότε, προέκυψε η παρακάτω μήτρα (Εικόνα 94) 8 πειραμάτων και 3 επαναλήψεων στο κεντρικό σημείο για την ανίχνευση καμπύλωσης.

|  | Std | Run | Factor 1<br>A:PVA<br>%w/v | Factor 2<br>B:PVP<br>%w/v | Factor 3<br>C:GAL<br>mg/0,636 cm <sup>2</sup> |
|--|-----|-----|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|
|  | 5   | 9   | 5                         | 0                         | 3                                             |
|  | 7   | 7   | 5                         | 5                         | 3                                             |
|  | 6   | 11  | 10                        | 0                         | 3                                             |
|  | 8   | 10  | 10                        | 5                         | 3                                             |
|  | 9   | 3   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             |
|  | 11  | 1   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             |
|  | 10  | 8   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             |
|  | 1   | 4   | 5                         | 0                         | 1                                             |
|  | 3   | 5   | 5                         | 5                         | 1                                             |
|  | 2   | 2   | 10                        | 0                         | 1                                             |
|  | 4   | 6   | 10                        | 5                         | 1                                             |

Εικόνα 94: Μήτρα συνθέσεων για παρασκευή πολυμερικών μικροβελόνων

Τα επίπεδα για τους πολυμερικούς παράγοντες ορίστηκαν ύστερα από προκαταρκτικά πειράματα να είναι τέτοια, ώστε η αρχική σύνθεση να είναι διάλυμα ή πήκτωμα χαμηλού ιξώδους. Επιπροσθέτως, βάσει των παραπάνω ορίων είναι εφικτή η παρασκευή υμενίων αποκλειστικά από PVA, εν αντιθέσει με το PVP, το οποίο είναι πάντα σε συνδυασμό με το PVA. Όσον αφορά τη δόση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης το εύρος των 1-3 mg/0,636 cm<sup>2</sup> εξετάστηκε ώστε να διερευνηθεί αν με πολύ μικρότερες δόσεις από τις αντίστοιχες των per os χορηγούμενων σκευασμάτων (4-24 mg) μπορούν να επιτευχθούν αντίστοιχα θεραπευτικά επίπεδα. Τα 3mg τέθηκαν ως ανώτατο όριο, λόγω της καθίζησης κρυστάλλων δραστικής και για την χορήγηση μικρότερων δόσεων.

Η δόση στα 500 μL που εισάγονται στο εκμαγείο υπολογίζεται από το λόγο των επιφανειών:

$E_{franz} = 0,636 \text{ cm}^2$  και η επιφάνεια που καλύπτει ο όγκος του μίγματος είναι ίση με

$$E_{ολική} = \pi R_{βάσης}^2 + 2\pi R_{βάσης}H$$

$$E_{ολική} = 3,14 \times (0,6\text{cm})^2 + 2 \times 3,14 \times (0,6\text{cm}) \times (0,442\text{cm})$$

$$E_{ολική} = 2,7959 \text{ cm}^2$$

Άρα για 1mg/0,636 cm<sup>2</sup>, στα 500μL θα έχουμε:  $1\text{mg} \times \frac{2,7959 \text{ cm}^2}{0,636 \text{ cm}^2} = 4,4 \text{ mg}$

Εκτός, των παραπάνω συστατικών η αρχική μορφοποίηση αποτελείται από νερό μέχρι τα 100 mL και επιφανειοδραστικό Tween 80 (1,5%w/v). Η επιλογή του συγκεκριμένου επιφανειοδραστικού στην αναφερόμενη περιεκτικότητα βασίζεται στη συνταγή που διαμορφώθηκε από τους (Ronpander, 2018), οι οποίοι το πρόσθεσαν με απώτερο στόχο τη μείωση της επιφανειακής τάσης για την ευκολότερη πλήρωση των κοιλοτήτων αλλά και ως πλαστικοποιητή. Η γλυκερίνη, η οποία χρησιμοποιείται επίσης βιβλιογραφικά στη συνταγή ως πλαστικοποιητής, αποφασίσθηκε να αφαιρεθεί διότι αυξάνει την προσκολλητική ικανότητα του PVP στις επιφάνειες, δυσχεραίνοντας την αποκόλληση των υμενίων από το εκμαγείο.

**Πίνακας 16:** Σύσταση μιγμάτων προ ξήρανσης

| Σύνθεση πολυμερικών υμενίων μικροβελόνων |            |
|------------------------------------------|------------|
| Συστατικά                                |            |
| PVA 26-88                                | (5-10)g    |
| PVP K-30                                 | (0-5)g     |
| Hydrobromide Galantamine                 | 0,88-2,64g |
| Tween 80                                 | 1,5g       |
| Water                                    | 100 mL     |

#### 17.4.3 Διαδικασία Παρασκευής Μίγματος Υδροβρωμικής Γκαλανταμίνης-Πολυμερών

Για τη παρασκευή των μιγμάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Ζύγιση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης και των δύο πολυμερών (PVA & PVP) σε χαρτί ζυγίσσεως
- Ζύγιση των υάλινων φιαλιδίων, στα οποία θα πραγματοποιηθεί η παρασκευή των μιγμάτων, μαζί με τον μαγνήτη ανάδευσης
- Ογκομέτρηση του απαιτούμενου όγκου ύδατος και μεταφορά στα υάλινα φιαλίδια
- Απ' ευθείας προσθήκη του επιφανειοδραστικού Tween 80 στο νερό με ταυτόχρονη ζύγιση της ποσότητάς του στο ζυγό
- Θέρμανση του συστήματος μέχρι τους 90° C, παράλληλα με ανάδευση
- Προσθήκη της προζυγισμένης ποσότητας PVA και ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεώς της
- Απομάκρυνση του φιαλιδίου από τον θερμαινόμενο αναδευτήρα και φύλαξη μέχρι το περιεχόμενο να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Προσθήκη της προζυγισμένης ποσότητας PVP και ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεώς της
- Ζύγιση του συστήματος και προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας ύδατος η οποία εξατμίσθηκε λόγω θέρμανσης

- Προσθήκη της προζυγισμένης ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης και ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεως

#### 17.4.4 Βελτιστοποίηση σύνθεσης

Οι μορφοποιήσεις της μήτρας του πειραματικού σχεδιασμού που παρασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα για τη πραγματοποίηση πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας με χρήση τεχνητής μεμβράνης Strat-M® και η αθροιστική ποσότητα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), στις 24h χρησιμοποιήθηκε ως η μία απόκριση. Ως δεύτερη απόκριση, ορίστηκε η απώλεια ύδατος κατά τη ξήρανση (LOD-Loss on Drying), διότι όπως παρατηρήθηκε κατά τη παρασκευή των υμενίων, η σύνθεση με μέγιστη δόση υδροβρωμικής γκαλανταμίνης και ελάχιστο ποσοστό πολυμερούς εμφάνιζε καθίζηση κρυστάλλων της ουσίας, των οποίων η φυσική κατάσταση είναι άγνωστη. Ο υπολογισμός του LOD πραγματοποιήθηκε μεταφέροντας 500  $\mu\text{L}$  από κάθε σύνθεση σε σκαφίδιο, αφού έχει ληφθεί προηγουμένως το απόβαρό του. Ακολούθησε ζύγιση και ξήρανση σε κλίβανο στους 30° C για 2h. Όταν το υμένιο είχε ξηρανθεί λήφθηκε εκ νέου μέτρηση του βάρους. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε εις τριπλούν ( $n=3$ ) και η τιμή του % LOD υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

$$\%LOD = \frac{\text{Ζύγιση προ ξήρανσης} - \text{Ζύγιση μετά ξήρανσης}}{\text{Ζύγιση προ ξήρανσης} - \text{Απόβαρο}} \times 100$$

Εν συνεχεία, την εισαγωγή των αποκρίσεων, ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του λογισμικού Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA), προς εύρεση μαθηματικών μοντέλων ικανών να περιγράψουν και να προβλέψουν τα επίπεδα που αντιστοιχούν σε κάθε μορφοποίηση. Στόχος ήταν, βάσει αυτών, να βρεθεί η μορφοποίηση εκείνη η οποία συνδυάζει μέγιστη αθροιστική ποσότητα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη Strat-M® ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), μέχρι και τις 24h και ελάχιστη απώλεια ύδατος ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων δραστικής. Εν συνεχεία, η βέλτιστη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των παρακάτω πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας:

- επιβεβαιωτικού πειράματος των τιμών που προέκυψαν από το Πειραματικό Σχεδιασμό
- *ex vivo* πείραμα σε δέρμα πλήρους πάχους (full thickness) και συσχέτιση με τεχνητή μεμβράνη Strat-M®
- *ex vivo* πείραμα σε δέρμα πλήρους πάχους (full thickness) και συσχέτιση με υμένιο άνευ μικροβελόνων

## 17.5 Αξιολόγηση πολυμερικών μικροβελόνων

Με το ενδιαφέρον για τις μικροβελόνες, ως καινοτόμο σύστημα διαδερμικής χορήγησης, να αυξάνεται ραγδαίως από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, ποικιλία τέτοιων μορφών έχουν παρασκευαστεί με διαφορές στο σχήμα και τις διαστάσεις. Παρόλ' αυτά, ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων προϊόντων είναι περιορισμένος. Ένας παράγοντας που σε συνέβαλε σε αυτό είναι ότι ακόμα και μέχρι σήμερα, βασική πρόκληση σε σχέση με την κατασκευή μικροβελόνων σε βιομηχανική κλίμακα είναι η έλλειψη σαφώς ορισμένων προτύπων ποιότητας στο πλαίσιο των αρχών της Καλής Βιομηχανικής Πρακτικής (GMP). Ποικιλία μεθόδων για το χαρακτηρισμό των μηχανικών ιδιοτήτων και την ανάλυση της διαπέρασης του δέρματος, έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί από ερευνητές οι οποίοι εργάζονται στο συγκεκριμένο πεδίο για την αξιολόγηση του προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των διαφόρων σχεδίων. Όμως, η απουσία επικαιροποιημένων δοκιμασιών και κατάλληλου εξοπλισμού που θα καθιστά εφικτό τον έλεγχο των μικροβελόνων, δυσχεραίνει την αξιολόγηση και σύγκρισή τους (Lutton, 2016).

Βασική προϋπόθεση για την διαμόρφωση των δοκιμασιών ελέγχου ποιότητας (Quality Control) είναι η εγκαθίδρυση της ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των μικροβελόνων ως μέρος του συστήματος Διασφάλισης Ποιότητας, το οποίο λειτουργεί εντός περιβάλλοντος που διέπεται από τις αρχές της Καλής Βιομηχανικής Πρακτικής (GMP). Πώς όμως καθορίζεται η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα στο πλαίσιο αυτής της νέας μορφής;

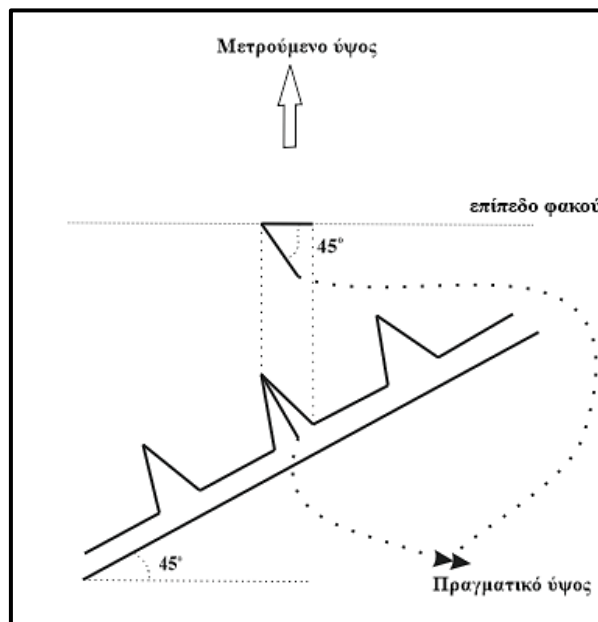
Όσον αφορά την ασφάλεια, σύμφωνα με τις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες, σχετίζεται με κριτήρια τα οποία αφορούν τη στεριότητα της τελικής μορφής όπως είναι τα όρια μικροβιακού φορτίου, περιεχόμενο σε συντηρητικά κλπ. Σε αυτό το σημείο κρίνεται επίσης σκόπιμο να συμπεριληφθούν λόγω της φύσης της μορφής, πέρα από τους μικροβιακούς ελέγχους, δοκιμασίες αξιολόγησης ερεθισμού του δέρματος με δερματοσκοπική παρατήρηση και ανάπλασης του δέρματος (skin recovery) με μέτρηση της άδηλης απώλειας ύδατος (TEWL).

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, ορισμένοι τρόποι εκτίμησής της παρατίθενται παρακάτω:

- Μικροσκοπική παρατήρηση για το χαρακτηρισμό της γεωμετρίας των μικροβελόνων:

Η αποτελεσματικότητα των μικροβελόνων διέπεται από ένα σημαντικό αριθμό αλληλοεξαρτώμενων παραγόντων στους οποίους περιλαμβάνονται τα υλικά κατασκευής, η διεργασία παρασκευής και παράμετροι όπως η σχεδίαση και αρχιτεκτονική των επιφανειών αυτών. Το μικρό μέγεθος των δομών αυτών καθιστά απαραίτητη την χρήση μικροσκοπίου, οπτικού ή ηλεκτρονικού, για την αξιολόγηση της αρχιτεκτονικής τους μέσω της οπτικοποίησης των διαστάσεων των μικροβελόνων, της μορφολογίας της επιφάνειας και της κατανομής των βελόνων πάνω σε αυτή. Στη παρούσα

μελέτη, χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Leica (μεγέθυνση x25) για τη λήψη φωτογραφιών των επιφανειών, οι οποίες στη συνέχεια αναλύθηκαν το λογισμικό ImageJ. Η αποτύπωση επαναλήψιμων και ομοιόμορφων δομών είναι μία καλή ένδειξη για την αξιοπιστία της διεργασίας παρασκευής (Sabria, 2020).



- Διαπέραση δέρματος:

Είναι γνωστό ότι, πλήρης είσοδος όλου του μήκος των μικροβελόνων είναι δύσκολο να επιτευχθεί λόγω των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του δέρματος. Επομένως, είναι απαραίτητη η εύρεση μιας μεθόδου εκτίμησης του βάθους της δερματικής διαπέρασης. Η δυσκολία πρόσβασης σε δείγματα ιστών (ζωικής ή ανθρώπινης προέλευσης), κατέστησε επιτακτική την ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών μεθόδων εκτίμησης, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση τεχνητών μεμβρανών. Ως εκ τούτου, η τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Larraneta *et al* και περιελάμβανε τη χρήση φύλλων Parafilm<sup>®</sup>, υιοθετήθηκε για την αξιολόγηση του βάθους διαπέρασης. Συγκεκριμένα, τα φύλλα Parafilm<sup>®</sup> αποτελούνται από πολυμερή τύπου ολεφίνης, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι προσομοιώνουν την ελαστικότητα και τις μηχανικές ιδιότητες του δέρματος. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται τοποθετώντας 8 φύλλα Parafilm<sup>®</sup> το ένα πάνω στο άλλο και πιέζοντας με τον αντίχειρα το υμένιο των μικροβελόνων πάνω στο πρώτο στρώμα. Το βάθος διαπέρασης προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των στρωμάτων που φαίνεται ότι έχουν διατηρηθεί μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x25) επί το πάχος κάθε στρώματος (127  $\mu\text{m}$ ) (Sabria, 2020) (Larrañeta, 2014).

- Ποσοτικός προσδιορισμός Υδροβρωμικής Γκαλανταμίνης:

Προκειμένου να αξιολογηθεί η αξιοπιστία της μεθόδου παρασκευής, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που αντιστοιχεί σε επιφάνεια 1,1304  $\text{cm}^2$  και συγκρίθηκε με τη θεωρητικά υπολογισμένη τιμή. Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε εις

τριπλούν για κάθε σύνθεση. Για το προσδιορισμό της πειραματικής τιμής της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ελήφθησαν υμένα μικροβελόνων επιφάνειας  $1,1304 \text{ cm}^2$  από κάθε σύνθεση και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ακολούθησε προσθήκη νερού HPLC καθαρότητας μέχρι τη χαραγή και διάλυσή τους με ανάδευση. Από το αρχικό αυτό διάλυμα ελήφθησαν δείγματα τα οποία ύστερα από κατάλληλες αραιώσεις με κινητή φάση αναλύθηκαν στην HPLC.

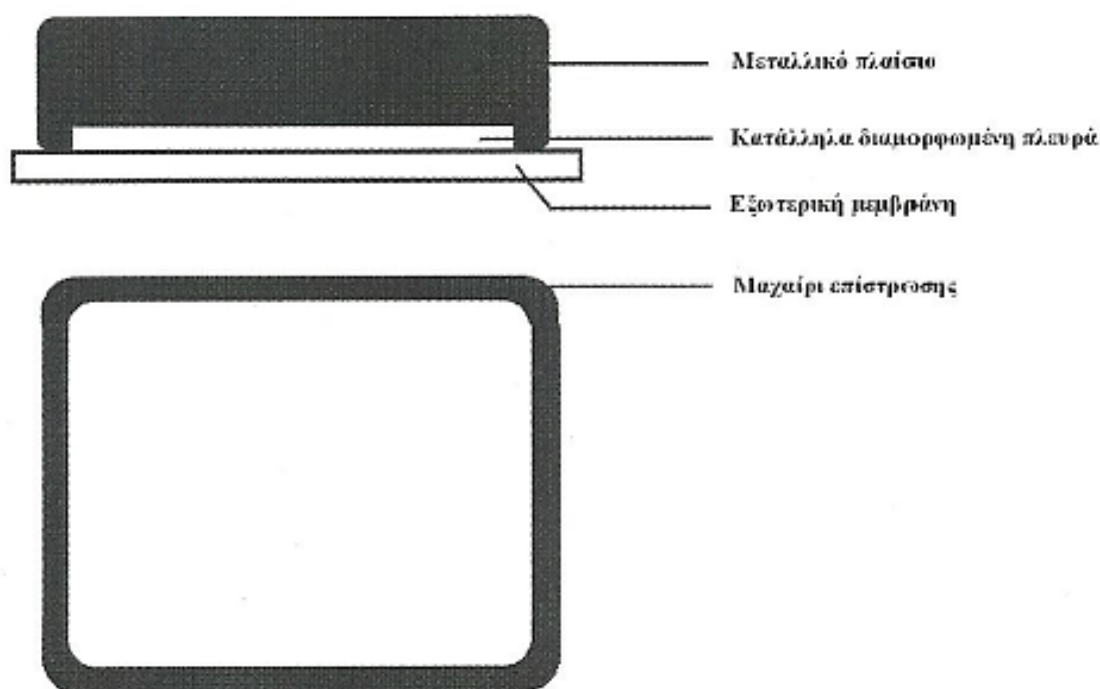


## 18. Εργαστηριακές Μέθοδοι Παρασκευής Διαδερμικών Συστημάτων (Patches)

### 18.1 Εκτέλεση Επιστρώσεων – Δημιουργία ΔΘΣ (Patches)

Το επόμενο στάδιο, που ακολουθεί την παρασκευή των μειγμάτων, είναι η ομοιόμορφη επίστρωσή τους με στόχο τη δημιουργία του τελικού ΔΘΣ (patch). Ο πιο απλός και σωστός τρόπος ομοιόμορφης επίστρωσης του μείγματος γίνεται με τη χρήση κατάλληλου εξαρτήματος που ονομάζεται μαχαίρι επίστρωσης. Το μαχαίρι επίστρωσης αποτελείται από ένα μεταλλικό πλαίσιο με κατάλληλα διαμορφωμένες πλευρές διαφορετικού πάχους ώστε να επιτυγχάνεται η δημιουργία υγρών φιλμ επίστρωσης επιθυμητού πάχους από 0,1 mil ως 250 mils, όπου  $1 \text{ mil} = 10^{-3} \text{ inch}$  και  $1 \text{ mil} = 25,4 \mu\text{m}$ . Η ποιότητα της επίστρωσης αυτής, εξαρτάται από τέσσερις κυρίως παράγοντες:

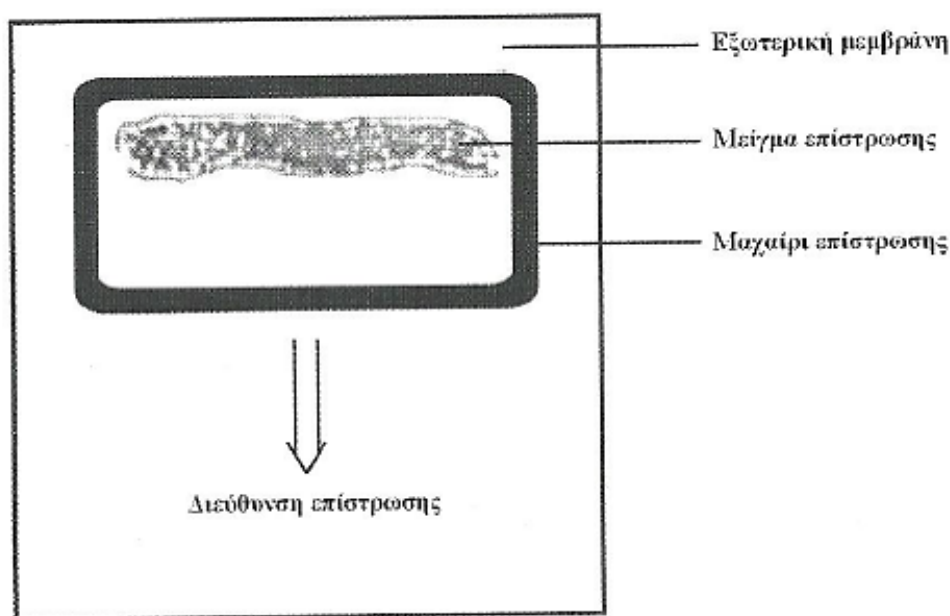
- το ιξώδες του μείγματος
- την ταχύτητα μετακίνησης του μαχαιριού
- την ομοιογένεια του μείγματος
- την ομαλότητα της επιφάνειας πάνω στην οποία πραγματοποιείται η επίστρωση



Στην παρούσα μελέτη, τα διαδερμικά συστήματα παρασκευάσθηκαν με τη τεχνική Regular Patch.

## 18.2 Τεχνική Regular Patch

- Κόβεται ένα τμήμα της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης, περίπου 33 x 12 cm ώστε να χωράει στον κλίβανο ξήρανσης, και τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια εργασίας κατά τέτοιο τρόπο ώστε η σιλικονούχος πλευρά, η πλευρά δηλαδή που δεν κολλάει, να βρίσκεται προς τα πάνω.
- Τοποθετείται το μαχαίρι επίστρωσης στην άκρη της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης, κατά τέτοιο τρόπο ώστε η πλευρά με το επιθυμητό πάχος επίστρωσης να βρίσκεται από την αντίθετη πλευρά από αυτή που θα μετακινηθεί.
- Ποσότητα, περίπου 5g, από το μείγμα επίστρωσης φέρεται σε όλη την μπροστινή πλευρά του μαχαίριού επίστρωσης.
- Αυτό με τη σειρά του μετακινείται αργά και σταθερά κατά μήκος της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης ώστε να αφήνεται πίσω του ομοιόμορφη επίστρωση.
- Αρκετά προσεκτικά, μεταφέρεται στον κλίβανο όπου ακολουθεί ξήρανση στους 70°C για 30 min.
- Απομακρύνεται από τον κλίβανο και αφήνεται έως ότου αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος, για περίπου 20 min.
- Τοποθετείται από πάνω ένα τμήμα μεμβράνης υποστήριξης (backing membrane) αντίστοιχου μεγέθους με τη βοήθεια κατάλληλου κυλινδρικού εργαλείου και με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα.
- Τέλος, τα διαδερμικά συστήματα κόβονται σε κατάλληλο μέγεθος ώστε να εφαρμοστεί το υμένιο των μικροβελόνων.

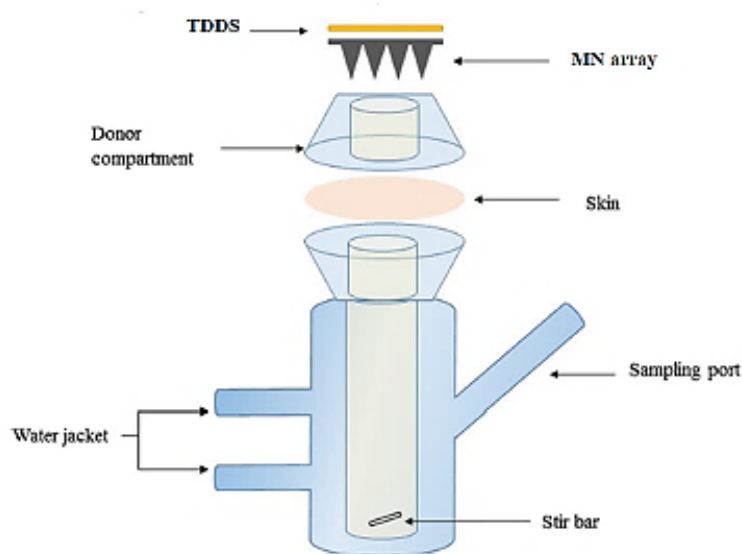


## 19. Πειράματα Διαδερμικής Διαπερατότητας

Για τα *in vitro* και *ex vivo* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα, κάθετα κύτταρα διάχυσης τύπου Franz (Crown Glass, USA), όπως φαίνεται στην εικόνα 95, με διαθέσιμη επιφάνεια διάχυσης  $0,636 \text{ cm}^2$  και όγκο  $6,275 \text{ mL}$ .

Τα κύτταρα διάχυσης Franz αποτελούνται από δυο διαμερίσματα, αυτό του δότη (donor compartment) και αυτό του δέκτη (receptor compartment). Μεταξύ των δύο διαμερισμάτων τοποθετείται η τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> ή το δέρμα πλήρους πάχους, αναλόγως τη μελέτη (Ameri, 2018), το υμένιο των μικροβελόνων και το διαδερμικό σύστημα χορήγησης (patch). Τα δυο διαμερίσματα, τέλος, συγκρατούνται με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα.

Η πειραματική διαδικασία αρχίζει με την ενεργοποίηση του υδατόλουτρου, έτσι ώστε όλα τα τροποποιημένα κύτταρα Franz να εξισορροπούνται στους  $32^\circ \text{C}$  (OECD, 2004). Η θερμοκρασία γύρω από τα κύτταρα διατηρείται σταθερή στους  $32^\circ \text{C}$ , για να προσομοιάζεται η θερμοκρασία επιφανείας του δέρματος (Itin, 2016). Το διάλυμα υποδοχέα, το οποίο έχει πρώτα απαερωθεί, τοποθετείται στο υδατόλουτρο προκειμένου να εξισορροπηθεί στους  $32^\circ \text{C}$ .



Εικόνα 95: Εφαρμογή μορφής σε τροποποιημένο κύτταρο franz (Kearney, 2016)

- Τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup>

Η μεμβράνη αυτή δεν απαιτεί καμία κατεργασία πριν τη χρήση της στα *in vitro* πειράματα διάχυσης. Οπότε η μεμβράνη που είναι σε σχήμα δίσκου, αφαιρέθηκε από την προστατευτική συσκευασία, τοποθετήθηκε σε πλάκα και τεμαχίστηκε σε κυκλικά τεμάχια μικρότερης διαμέτρου με τη χρήση κατάλληλου μεταλλικού εμβόλου. Τα κυκλικά αυτά τεμάχια είχαν μέγεθος τέτοιο που κάλυπτε ολόκληρη τη διαθέσιμη επιφάνεια του κυττάρου διάχυσης Franz και πριν την εφαρμογή της σύνθεσης διαβρέχονται στην γυαλιστερή τους επιφάνεια με μία σταγόνα νερό, προς προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών του δέρματος. Υμένια μικροβελόνων επιφανείας  $1,1304 \text{ cm}^2$  τοποθετήθηκαν πάνω στο συγκολλητικό των διαδερμικών συστημάτων και το όλο σύστημα εφαρμόστηκε στην γυαλιστερή επιφάνεια της Strat-M<sup>®</sup> μέσω

άσκησης πίεσης με τον αντίχειρα για 30s. Η ύπαρξη του placebo διαδερμικού συστήματος αποσκοπεί στην σταθεροποίηση του υμενίου πάνω στη μεμβράνη. Εν συνεχεία, το όλο σύστημα τοποθετήθηκε πάνω στο διαμέρισμα του δέκτη κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι μικροβελόνες να βρίσκονται πάνω από την επιφάνεια μελέτης και σταθεροποιήθηκε με την τοποθέτηση του διαμερίσματος δότη και τη προσαρμογή μεταλλικού σφιγκτήρα. Κάθε κύτταρο ( $n=3$ ) πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους  $32^{\circ}\text{C}$ , από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση και την διασφάλιση της ομοιογένειας του περιεχομένου.

- Δέρμα πλήρους πάχους (Full Thickness)

Το δέρμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προήλθε από το ίδιο ανατομικό μέρος, ειδικότερα το στομάχι, διαφορετικών δοτών θηλυκού φύλου. Η παραλαβή του δέρματος πλήρους πάχους πραγματοποιήθηκε με την αφαίρεση του υποδόριου λίπους με νυστέρι και απομάκρυνση του εναπομείναντος λίπους με γάζα εμβαπτισμένη σε ισοπροπυλική αλκοόλη. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκε σε αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Πριν την πραγματοποίηση πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας μετρήθηκε το πάχος του σε μικροσκόπιο και βρέθηκε ίσο με  $1,497 \pm 0,111\text{mm}$ .

Αρχικά, στα *ex vivo* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας το δέρμα απομακρύνεται από το ψυγείο, ελέγχεται η ακεραιότητά του και κόβεται με ψαλίδι σε τετράγωνα τεμάχια διαστάσεων περίπου  $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ , πριν φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου (λόγω ελαστικότητας η τομή θα καταστεί δύσκολη). Τα τετράγωνα αυτά τεμάχια τοποθετήθηκαν σε υάλινη επιφάνεια με την κεράτινη στοιβάδα να προσανατολίζεται προς πάνω και η επιφάνειά τους διαβρέχτηκε με μία σταγόνα νερό προς αποκατάσταση της υγρασίας. Υμένια μικροβελόνων επιφάνειας  $1,1304\text{ cm}^2$  τοποθετήθηκαν πάνω στο συγκολλητικό των διαδερμικών συστημάτων και το όλο σύστημα εφαρμόστηκε στην γυαλιστερή επιφάνεια της Strat-M<sup>®</sup> μέσω άσκησης πίεσης με τον αντίχειρα για 30s. Η ύπαρξη του placebo διαδερμικού συστήματος αποσκοπεί στην σταθεροποίηση του υμενίου πάνω στη μεμβράνη. Εν συνεχεία, το όλο σύστημα τοποθετήθηκε πάνω στο διαμέρισμα του δέκτη κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι μικροβελόνες να βρίσκονται πάνω από την επιφάνεια μελέτης και σταθεροποιήθηκε με την τοποθέτηση του διαμερίσματος δότη και τη προσαρμογή μεταλλικού σφιγκτήρα. Κάθε κύτταρο ( $n=5$ ) πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους  $32^{\circ}\text{C}$ , από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση και την διασφάλιση της ομοιογένειας του περιεχομένου.

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων επικρατούσαν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) (OECD, 2004) (Jones S.P., 1989). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, 1, 2, 4, 6, 12 και 24 ωρών (Kearney, 2016), γινόταν πλήρης λήψη του διαλύματος του υποδοχέα από τον πλευρικό βραχίονα. Σε κάθε δειγματοληψία των κυττάρων, γινόταν άμεση αντικατάσταση με ίσο όγκο φρέσκου και προθερμασμένου διαλύματος του υποδοχέα. Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων υδροβρωμικής γκαλανταμίνης.



## 20. Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού SPSS Statistics 24 (IBM, USA). Αναλύθηκαν οι μετρήσεις της ποσότητας της ΦΔΟ (Q) που διαπερνά την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων των *in vitro* πειραμάτων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων κάθε σύνθεσης για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Shapiro – Wilk, όπως προτείνεται από τους (Ghasemi, 2012). Ακολούθησε η σύγκριση των μεταβλητών, η οποία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One way ANOVA). Τέλος, οι συγκρίσεις κατά ζεύγη, με σκοπό να αξιολογηθεί η σημαντικότητα των μεταξύ τους διαφορών, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Tukey (Ng, 2010). Σημειώνεται πως το επίπεδο σημαντικότητας, σε κάθε περίπτωση, ήταν  $\alpha = 0.05$ . Επομένως, για τιμές  $p < 0.05$  απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση, της μη ύπαρξης δηλαδή στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Με άλλα λόγια, όταν η τιμή  $p$  είναι μικρότερη από 0.05 υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Σε περίπτωση που δεν ικανοποιούνταν οι προϋποθέσεις της κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων, θα χρησιμοποιούνταν οι μη παραμετρικές δοκιμές Kruskal – Wallis και Mann – Whitney για την ανάλυση των δεδομένων.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

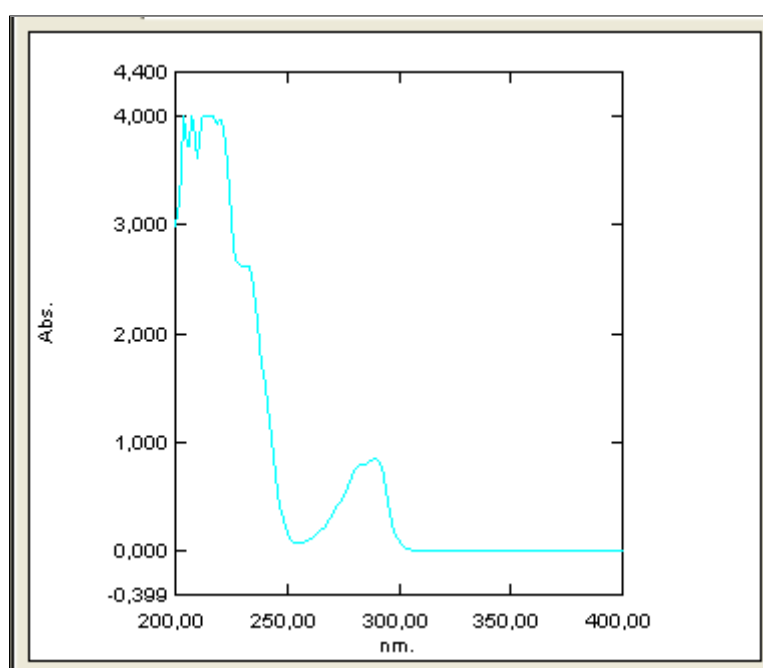
---



## 21. Φάσμα UV

Στην παράγραφο αυτή παρατίθενται τα αποτελέσματα από την λήψη φάσματος της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης, υπό μορφή πίνακα και γραφήματος απορρόφησης της ουσίας σε σχέση με το μήκος κύματος:

| Peak Pick |                                                                                   |                |       |             |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|-------------|
| No.       | P/V                                                                               | Wavelength nm. | Abs.  | Description |
| 1         |  | 289,00         | 0,853 |             |
| 2         |  | 213,00         | 4,000 |             |
| 3         |  | 255,00         | 0,075 |             |

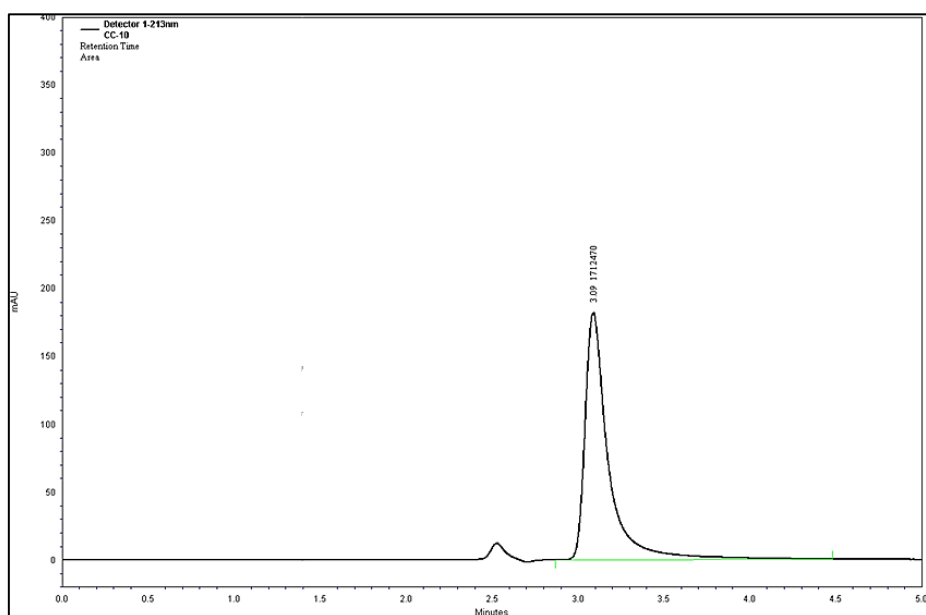


Εικόνα 96: Αποτύπωση φάσματος UV

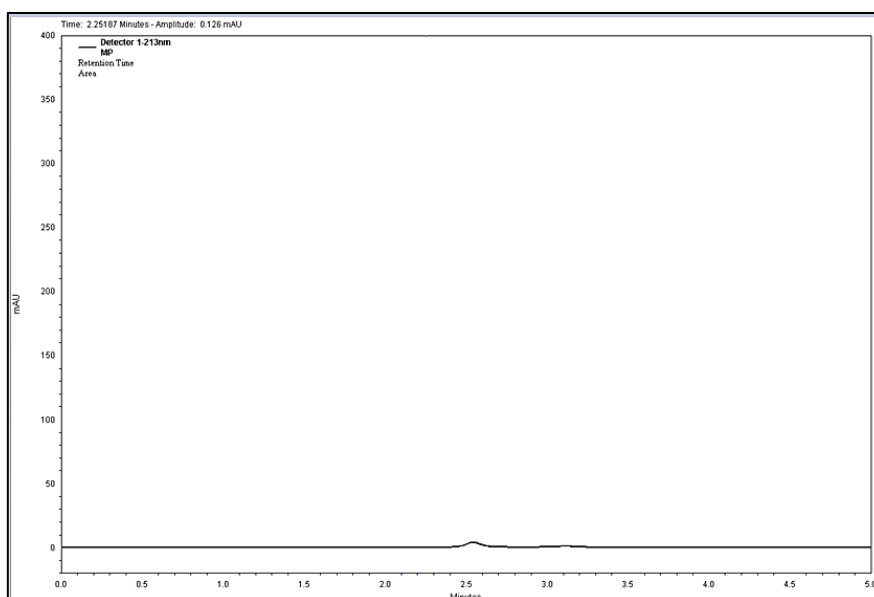
Όπως μπορεί να παρατηρήσει κανείς από τα παραπάνω δεδομένα, το φάσμα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης εμφανίζει δύο μέγιστα, ένα στα 213nm και ένα στα 289nm, τιμές οι οποίες είναι σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Nanaki, 2020). Η τιμή των 289nm απορρίφθηκε έναντι της πρώτης-η οποία και επιλέχθηκε, διότι αν και αποτελεί εκλεκτικότερη για την ανίχνευση της ουσίας (στην περιοχή των 210nm απορροφούν οι περισσότερες των ενώσεων που εμφανίζουν συζυγιακό φαινόμενο), παρουσιάζει αισθητά χαμηλότερη απορρόφηση. Το γεγονός αυτό, μπορεί να παρεμποδίσει στις μετέπειτα αναλύσεις την ποσοτικοποίηση χαμηλών συγκεντρώσεων της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας.

## 22. Αναλυτική μέθοδος HPLC

Η εικόνα 97 παρουσιάζει μία τυπική κορυφή ενός χρωματογραφήματος πρότυπου διαλύματος υδροβρωμικής γκαλανταμίνης συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$  σε νερό HPLC. Ο χρόνος έκλουσης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας είναι τα 3 λεπτά. Η κορυφή που εμφανίζεται από τα 2,4 μέχρι τα 2,8 λεπτά αντιστοιχεί στο σήμα της κινητής φάσης όπως αποτυπώνεται και από το χρωματογράφημα της εικόνας που προέκυψε ύστερα από έγχυση δείγματος με κινητή φάση άνευ φαρμακολογικά δραστικής ουσίας.

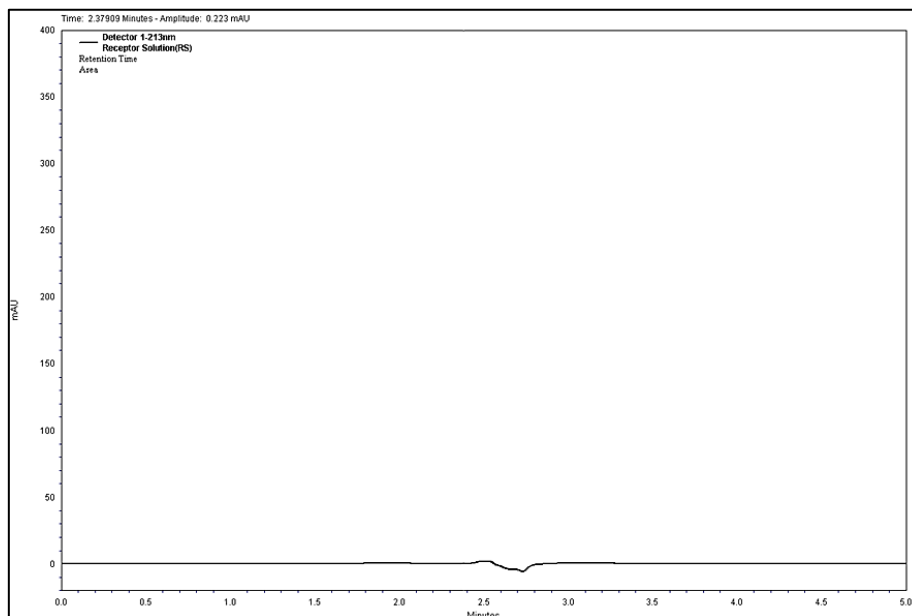


**Εικόνα 97:** Χρωματογράφημα 10  $\mu\text{g/mL}$  υδροβρωμικής γκαλανταμίνης



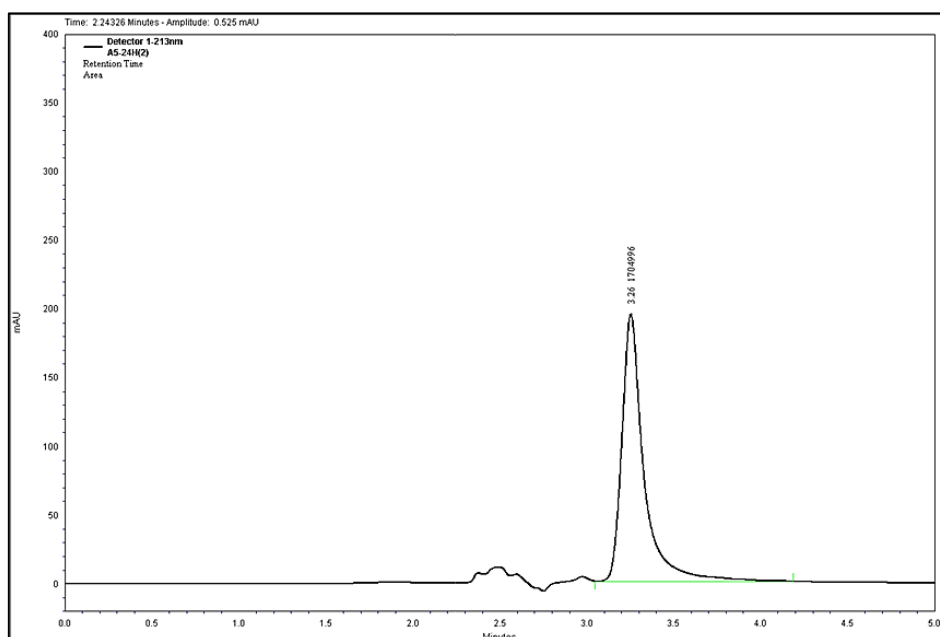
**Εικόνα 98:** Χρωματογράφημα κινητής φάσης

Το διάλυμα του υποδοχέα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων διαπερατότητας όπως φαίνεται στην εικόνα 99 δεν δημιουργεί παρεμποδίσεις στην ανίχνευση της ουσίας καθώς εμφανίζει απορρόφηση στους χρόνους 2,4 με 2,9.



**Εικόνα 99:** Χρωματογράφημα διαλύματος υποδοχέα

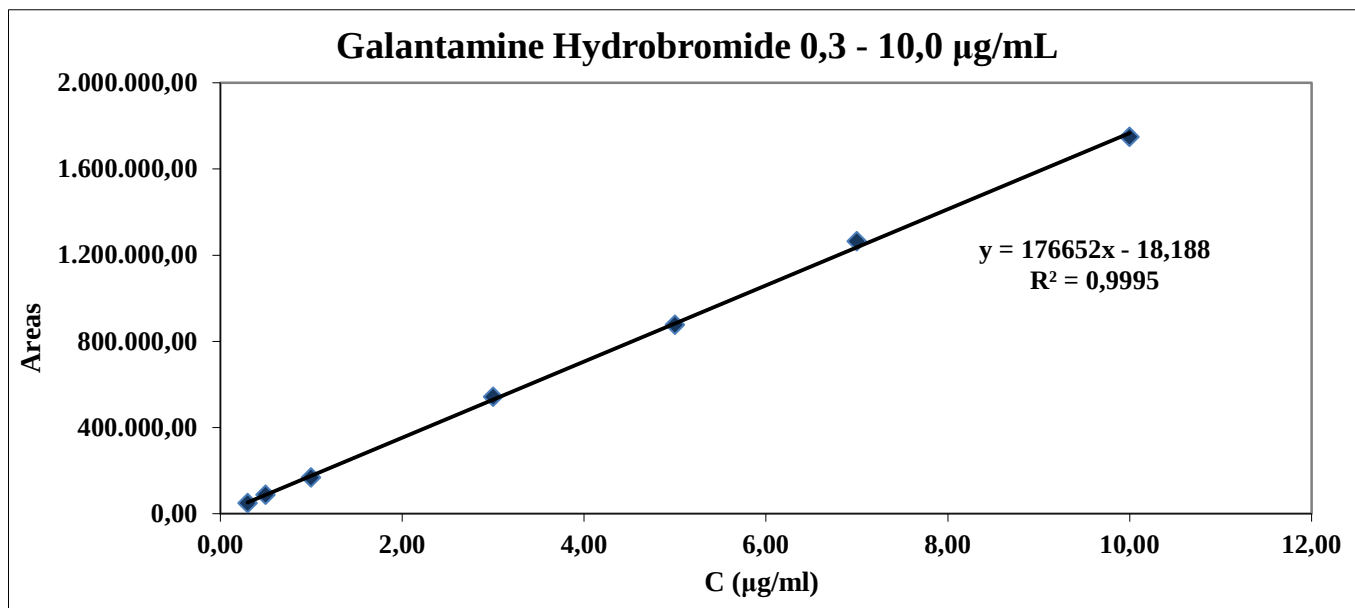
Τέλος, στην παρακάτω εικόνα 100 απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα του διαλύματος του υποδοχέα ενός αγνώστου δείγματος υδροβρωμικής γκαλανταμίνης από πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας με την χρήση ανθρώπινου δέρματος πλήρους πάχους ως φραγμού.



**Εικόνα 100:** Χρωματογράφημα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης σε δέρμα πλήρους πάχους

Ελεγχος γραμμικότητας (linearity) καμπύλης αναφοράς

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων υδροβρωμικής γκαλανταμίνης, των οποίων η μέθοδος παρασκευής περιγράφηκε στην παράγραφο 14.4, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την γραμμική μέθοδο προσαρμογής ελαχίστων τετραγώνων. Δηλαδή, η σχέση μεταξύ κάθε ζεύγους παρατηρήσεων (C, Areas) παριστάνεται ως  $y = ax + b$ , και το σήμα y-Areas συνίσταται από ένα καθορισμένο μέγεθος  $aC + b$  που προβλέπεται από το γραμμικό μοντέλο.



**Εικόνα 101:** Καμπύλη αναφοράς υδροβρωμικής γκαλανταμίνης

## 23. Μελέτη διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα (Receptor Solution)

Βασική προϋπόθεση για την πραγματοποίηση των πειραμάτων διαπερατότητας είναι η διατήρηση συνθηκών δεξαμενής (sink conditions) καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η συνεχής διαπέραση της ουσίας από το διαμέρισμα του δότη σε αυτό του δέκτη, όπως θα συνέβαινε και *in vivo*. Ως διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής ορίζεται η κατάσταση εκείνη κατά την οποία η συγκέντρωση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που διαπερνά τον φραγμό, δεν ξεπερνάει το 10% της διαλυτότητας κορεσμού στο επιλεγμένο διάλυμα υποδοχέα.

Η διαλυτότητα κορεσμού της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 στους 25° C βρέθηκε να είναι ίση με 35,80 mg/mL (τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων =0,6), τιμή η οποία είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Leonard et al (Leonard, 2005). Επομένως, ακόμα και αν όλη η ποσότητα της ουσίας διαπεράσει το φραγμό (3mg), θα ισχύουν οι συνθήκες δεξαμενής, καθώς αυτές διασφαλίζονται για συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες με 3,58 mg/mL.

## 24. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού για τις ρυθμίσεις εκτύπωσης των εκμαγείων

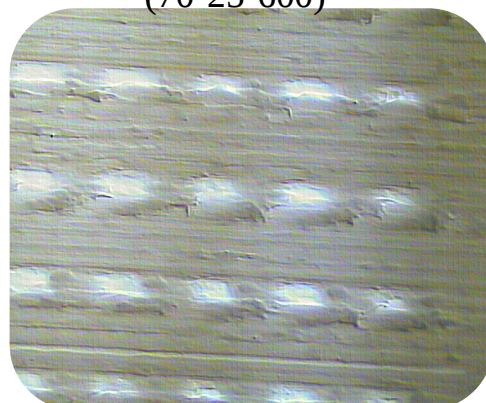
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA). Στην εικόνα 102 απεικονίζεται η μήτρα των πειραμάτων για τις ρυθμίσεις εκτύπωσης, συμπεριλαμβανομένων των τιμών των αποκρίσεων, δηλαδή του εμβαδού της βάσης των κοιλοτήτων ( $\mu\text{m}^2$ ) όπως αυτό μετρήθηκε από τις φωτογραφίες που λήφθηκαν από διάφορα σημεία της επιφάνειας με την βοήθεια του μικροσκοπίου Leica (1 pixel=6,67 $\mu\text{m}$ ). Στις περιπτώσεις όπου δεν εκτυπώθηκε εκμαγείο ή οι κοιλότητες δεν ήταν ευδιάκριτες λόγω μη ακριβούς αποτύπωσης των διαστάσεων η απόκριση ορίστηκε ως 1,00. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένες φωτογραφίες μικροσκοπίου:

(Printing Speed-Layer Height-Path Width)-(x25)

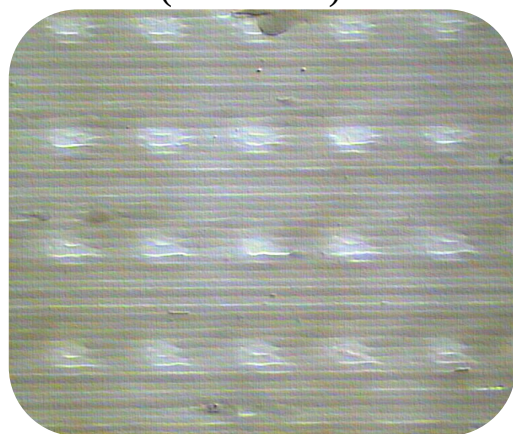
(50-50-450)



(70-25-600)



(70-75-300)



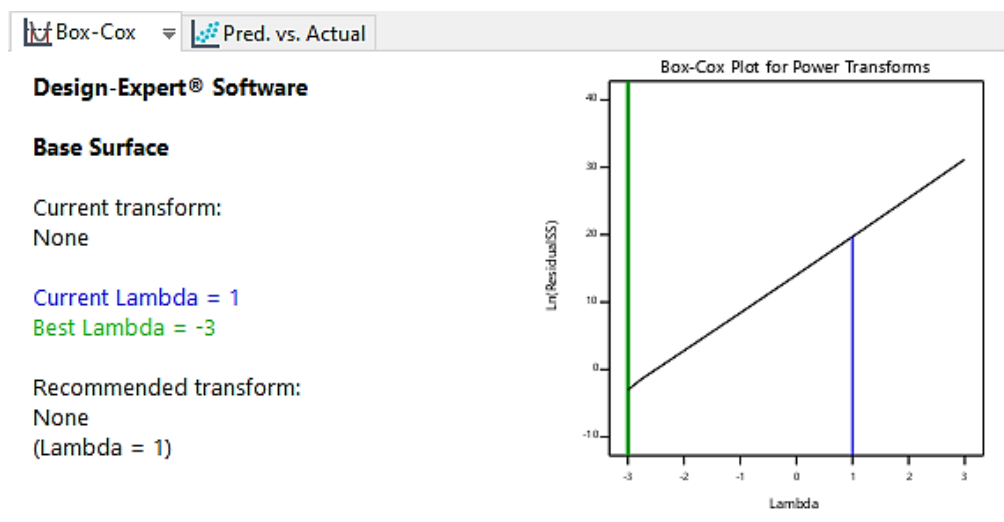
(50-50-600)



|  | Std | Run | Factor 1<br>A:Printing Speed<br>% | Factor 2<br>B:Layer Height<br>μm | Factor 3<br>C:Path Width<br>μm | Response 1<br>Base Surface<br>μm <sup>2</sup> |
|--|-----|-----|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------|
|  | 18  | 1   | 50                                | 50                               | 450                            | 91232,50                                      |
|  | 11  | 2   | 50                                | 25                               | 450                            | 103564,82                                     |
|  | 20  | 3   | 50                                | 50                               | 450                            | 95428,69                                      |
|  | 10  | 4   | 70                                | 50                               | 450                            | 86062,89                                      |
|  | 1   | 5   | 30                                | 25                               | 300                            | 1,00                                          |
|  | 16  | 6   | 50                                | 50                               | 450                            | 87242,73                                      |
|  | 13  | 7   | 50                                | 50                               | 300                            | 1,00                                          |
|  | 4   | 8   | 70                                | 75                               | 300                            | 1,00                                          |
|  | 12  | 9   | 50                                | 75                               | 450                            | 86831,66                                      |
|  | 3   | 10  | 30                                | 75                               | 300                            | 1,00                                          |
|  | 17  | 11  | 50                                | 50                               | 450                            | 85018,29                                      |
|  | 5   | 12  | 30                                | 25                               | 600                            | 107269,86                                     |
|  | 7   | 13  | 30                                | 75                               | 600                            | 74661,27                                      |
|  | 2   | 14  | 70                                | 25                               | 300                            | 1,00                                          |
|  | 15  | 15  | 50                                | 50                               | 450                            | 91202,24                                      |
|  | 14  | 16  | 50                                | 50                               | 600                            | 68649,93                                      |
|  | 9   | 17  | 30                                | 50                               | 450                            | 92581,40                                      |
|  | 6   | 18  | 70                                | 25                               | 600                            | 87002,49                                      |
|  | 19  | 19  | 50                                | 50                               | 450                            | 99655,14                                      |
|  | 8   | 20  | 70                                | 75                               | 600                            | 75435,38                                      |

**Εικόνα 102:** Αποτελέσματα για τις ρυθμίσεις εκτύπωσης της μήτρας του DoE

Όπως παρατηρείται από την στήλη των αποκρίσεων, ο λόγος της μέγιστης προς την ελάχιστη τιμή είναι μεγαλύτερος του 10, γεγονός που αναδεικνύει την πιθανή ανάγκη για εφαρμογή κάποιου μετασχηματισμού (transformation) στα δεδομένα, προς διευκόλυνση της ανάλυσής τους. Επομένως, πριν προχωρήσουμε στην ανάλυση των δεδομένων και την επιλογή του μοντέλου, διερευνήθηκε κατά πόσο είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί κάποιος μετασχηματισμός, και αν ναι ποιος θα είναι αυτός. Σε αυτή την απόφαση, χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο το γράφημα Box-Cox, το οποίο αποτελεί έναν οδηγό για την επιλογή του σωστού power transformation, στους οποίους περιλαμβάνονται οι σημαντικότερες και πλέον χρησιμοποιούμενες κατηγορίες μετασχηματισμών.



Εικόνα 103: Box-Cox γράφημα

Σύμφωνα με τη παραπάνω εικόνα δεν απαιτείται μετασχηματισμός των δεδομένων, οπότε εν συνεχεία προχωρήσαμε στην επιλογή κατάλληλου μοντέλου για την μετέπειτα ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στις στατιστικές παραμέτρους προσαρμογής (fit statistics) στα πειραματικά δεδομένα, οι οποίες υπολογίστηκαν για κάθε μοντέλο. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στις παρακάτω εικόνες όπως λήφθηκαν από το λογισμικό του προγράμματος.

## Fit Summary

### Response 1: Base Surface

| Source           | Sequential p-value | Lack of Fit p-value | Adjusted R <sup>2</sup> | Predicted R <sup>2</sup> |                  |
|------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Linear           | 0,0035             | 0,0003              | 0,4800                  | 0,2750                   |                  |
| 2FI              | 0,9509             | 0,0002              | 0,3763                  | -1,2744                  |                  |
| <b>Quadratic</b> | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>0,3298</b>       | <b>0,9782</b>           | <b>0,9155</b>            | <b>Suggested</b> |
| Cubic            | 0,2627             | 0,3977              | 0,9831                  | 0,0353                   | Aliased          |

Εικόνα 104: Απεικόνιση του Fit Summary για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert® – DX 11)

## Sequential Model Sum of Squares [Type I]

| Source                  | Sum of Squares   | df       | Mean Square      | F-value       | p-value            |                  |
|-------------------------|------------------|----------|------------------|---------------|--------------------|------------------|
| Mean vs Total           | 8,869E+10        | 1        | 8,869E+10        |               |                    |                  |
| Linear vs Mean          | 1,750E+10        | 3        | 5,832E+09        | 6,85          | 0,0035             |                  |
| 2FI vs Linear           | 3,468E+08        | 3        | 1,156E+08        | 0,1131        | 0,9509             |                  |
| <b>Quadratic vs 2FI</b> | <b>1,292E+10</b> | <b>3</b> | <b>4,308E+09</b> | <b>120,51</b> | <b>&lt; 0.0001</b> | <b>Suggested</b> |
| Cubic vs Quadratic      | 1,911E+08        | 4        | 4,777E+07        | 1,72          | 0,2627             | Aliased          |
| Residual                | 1,664E+08        | 6        | 2,774E+07        |               |                    |                  |
| Total                   | 1,198E+11        | 20       | 5,991E+09        |               |                    |                  |

Εικόνα 105: Απεικόνιση του Sequential Model Sum of Squares για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert® – DX 11)

Η τιμή  $p$  ορίζεται ως η πιθανότητα παρατήρησης ενός φαινομένου ίσου ή μεγαλύτερου από εκείνο που παρατηρείται (F-observed) όταν θεωρηθεί ότι η αρχική υπόθεση είναι αληθής. Η πιθανότητα αυτή ισούται με την επιφάνεια κάτω από την καμπύλη της κατανομής F για τιμές μεγαλύτερες της παρατηρούμενης (F-observed). Αν η τιμή  $p$  λαμβάνει μικρές τιμές ( $<0,05$  για διάστημα εμπιστοσύνης 95%), τότε η αρχική υπόθεση-η οποία είναι ότι η επίδραση του παράγοντα στην απόκριση δεν είναι στατιστικά σημαντική, απορρίπτεται. Δηλαδή, στατιστικά σημαντικοί παράγοντες πιθανότατα έχουν σημαντική επίδραση στην απόκριση και στατιστικά σημαντική έλλειψη προσαρμογής (lack of fit) του υπό εξέταση μοντέλου υποδεικνύει την αδυναμία του μοντέλου να προσαρμοστεί στα παρατηρούμενα δεδομένα.

Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω στοιχεία, το μοντέλο που προτείνει το λογισμικό του Πειραματικού Σχεδιασμού είναι το Quadratic. Βάσει αυτού στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η ανάλυση παλινδρόμησης (ANOVA) για την επεξεργασία των δεδομένων. Οπότε προέκυψαν τα εξής:

## ANOVA for Quadratic model

### Response 1: Base Surface

|  | Source           | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value  |                 |
|--|------------------|----------------|----|-------------|---------|----------|-----------------|
|  | <b>Model</b>     | 3,077E+10      | 9  | 3,419E+09   | 95,63   | < 0.0001 | significant     |
|  | A-Printing Speed | 6,766E+07      | 1  | 6,766E+07   | 1,89    | 0,1989   |                 |
|  | B-Layer Height   | 3,710E+08      | 1  | 3,710E+08   | 10,38   | 0,0092   |                 |
|  | C-Path Width     | 1,706E+10      | 1  | 1,706E+10   | 477,16  | < 0.0001 |                 |
|  | AB               | 5,534E+07      | 1  | 5,534E+07   | 1,55    | 0,2418   |                 |
|  | AC               | 4,750E+07      | 1  | 4,750E+07   | 1,33    | 0,2759   |                 |
|  | BC               | 2,439E+08      | 1  | 2,439E+08   | 6,82    | 0,0259   |                 |
|  | A <sup>2</sup>   | 4,515E+05      | 1  | 4,515E+05   | 0,0126  | 0,9127   |                 |
|  | B <sup>2</sup>   | 1,085E+08      | 1  | 1,085E+08   | 3,04    | 0,1121   |                 |
|  | C <sup>2</sup>   | 8,196E+09      | 1  | 8,196E+09   | 229,25  | < 0.0001 |                 |
|  | <b>Residual</b>  | 3,575E+08      | 10 | 3,575E+07   |         |          |                 |
|  | Lack of Fit      | 2,154E+08      | 5  | 4,307E+07   | 1,52    | 0,3298   | not significant |
|  | Pure Error       | 1,421E+08      | 5  | 2,843E+07   |         |          |                 |
|  | <b>Cor Total</b> | 3,113E+10      | 19 |             |         |          |                 |

**Εικόνα 106:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση διασποράς ANOVA (Design Expert® – DX 11)

Συμπεραίνεται ότι, εκτός του μοντέλου που επιλέχθηκε, στατιστικά σημαντικοί παράγοντες για την απόδοση της εκτύπωσης είναι το ύψος (B-Layer Height) καθώς και το πάχος (C-Path Width) του στρώματος εκτύπωσης, η αλληλεπίδρασή τους (BC) και το τετράγωνο του πάχους του στρώματος εκτύπωσης (C<sup>2</sup>), διότι η τιμή  $p$  είναι μικρότερη του 0,05 ( $p<0,05$ ).

## Fit Statistics

|                  |          |  |                                |         |
|------------------|----------|--|--------------------------------|---------|
|                  |          |  |                                |         |
| <b>Std. Dev.</b> | 5979,06  |  | <b>R<sup>2</sup></b>           | 0,9885  |
| <b>Mean</b>      | 66592,21 |  | <b>Adjusted R<sup>2</sup></b>  | 0,9782  |
| <b>C.V. %</b>    | 8,98     |  | <b>Predicted R<sup>2</sup></b> | 0,9155  |
|                  |          |  | <b>Adeq Precision</b>          | 25,6798 |

**Εικόνα 107:** Ανάλυση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων του Fit Statistics από το λογισμικό πρόγραμμα (Design Expert® – DX 11)

Η συσχέτιση  $R^2$  (R – squared) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοζόμενο σε αυτά μοντέλο. Όσο η τιμή του μεγέθους αυτού προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση,  $R^2=0,9885$ , τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προσαρμοσμένος συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  (adjusted  $R^2 - R^2_{adj}$ ) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοσμένο σε αυτά μοντέλο, λαμβάνοντας όμως υπόψη τους βαθμούς ελευθερίας που συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων του μοντέλου. Η τιμή του μεγέθους μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των όρων οι οποίοι υπάρχουν στο μοντέλο χωρίς να προσθέτουν αξία σε αυτό. Όσο η τιμή του  $R^2_{adj}$  προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Επομένως, η τιμή  $R^2_{adj}=0,9782$  υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  (predicted  $R^2 - R^2_{pred}$ ) Αποτελεί μέτρο της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγήσει το μοντέλο και σχετίζεται με τη δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Το  $R^2_{pred}$  λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν και μονάδας, ενώ όσο η τιμή του προσεγγίζει τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Στην περίπτωση αυτή,  $R^2_{pred}=0,9155$ , τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως θα πρέπει η διαφορά  $R^2_{adj} - R^2_{pred} < 0,2$ . Σε διαφορετική περίπτωση απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων καθώς και εξέταση μετασχηματισμού της απόκρισης ή χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 107, η διαφορά τους είναι μικρότερη του 0,2.

Η παράμετρος Adequate Precision συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης. Υπολογίζει δηλαδή την αναλογία "σήματος προς θόρυβο" (signal to noise ratio). Η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής για τιμές μεγαλύτερες του τέσσερα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, Adequate Precision=25,68, η οποία είναι μεγαλύτερη του τέσσερα.

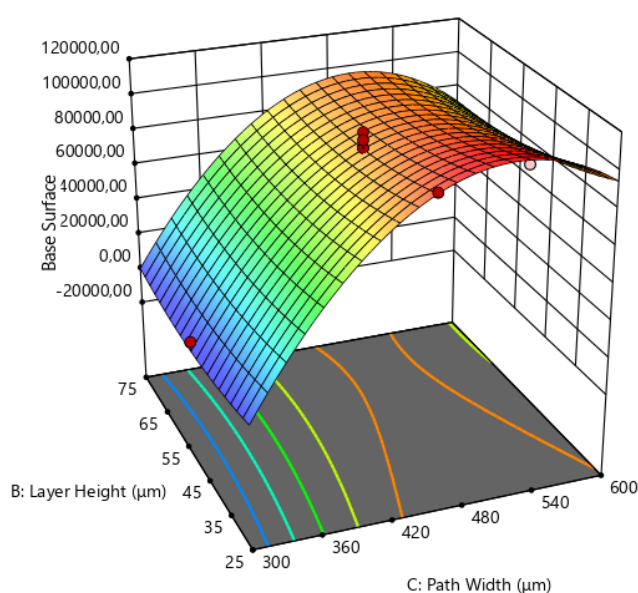
Συμπεραίνοντας, το μοντέλο κρίνεται κατάλληλο για την χαρτογράφηση των δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της απόδοσης εκτύπωσης. Παρακάτω παρατίθεται και η εξίσωση βάσει της οποίας προβλέπονται οι τιμές εμβαδού βάσης από τους παράγοντες, όταν αυτοί λαμβάνουν τιμές εντός της περιοχής που εξετάστηκε.

### Final Equation in Terms of Actual Factors

|              |                                 |
|--------------|---------------------------------|
| Base Surface | =                               |
| -5,16597E+05 |                                 |
| -128,87184   | * Printing Speed                |
| -849,02103   | * Layer Height                  |
| +2573,23997  | * Path Width                    |
| +5,26037     | * Printing Speed * Layer Height |
| -0,812219    | * Printing Speed * Path Width   |
| -1,47252     | * Layer Height * Path Width     |
| +1,01293     | * Printing Speed <sup>2</sup>   |
| +10,05003    | * Layer Height <sup>2</sup>     |
| -2,42629     | * Path Width <sup>2</sup>       |

Εικόνα 108: Τελική εξίσωση μοντέλου

Στην παρακάτω εικόνα 109 απεικονίζεται ο τρισδιάστατος χώρος σχεδιασμού (Design Space), ο οποίος προέκυψε από την συσχέτιση του εμβαδού βάσης των κοιλοτήτων με τις ρυθμίσεις εκτύπωσης, στα επίπεδα που ορίστηκαν. Οι περιοχές με το μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές του εμβαδού, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από τις μπλε και προσεγγίζονται οι κόκκινες, το εμβαδόν αυξάνεται.



Εικόνα 109: 3D Response Surface Counter plot (Design Expert® – DX 11)

Καθώς δεν υπήρχαν άλλα κριτήρια-περιορισμοί προς εφαρμογή στις ρυθμίσεις εκτύπωσης για την πραγματοποίηση της άσκησης βελτιστοποίησης, επιλέχθηκε ως τελικός συνδυασμός αυτός του κεντρικού σημείου, διότι αποτυπώνει πιστά τις διαστάσεις που ορίστηκαν αρχικά, με μικρή μεταβλητότητα ( $RSD=3$ ). Επιπλέον, η επιλογή του κεντρικού σημείου διευκολύνει την μελλοντική παρασκευή εκμαγείων με άλλες διαστάσεις. Αυτό συμβαίνει διότι, Layer Height ίσο με  $50\mu m$  είναι ακριβές υποπολλαπλάσιο των διαστάσεων που ορίζονται συνήθως για τις πλευρές της βάσης των μικροβελόνων, οπότε θα αποφευχθούν απώλειες προκαλούμενες από το ύψος του στρώματος.

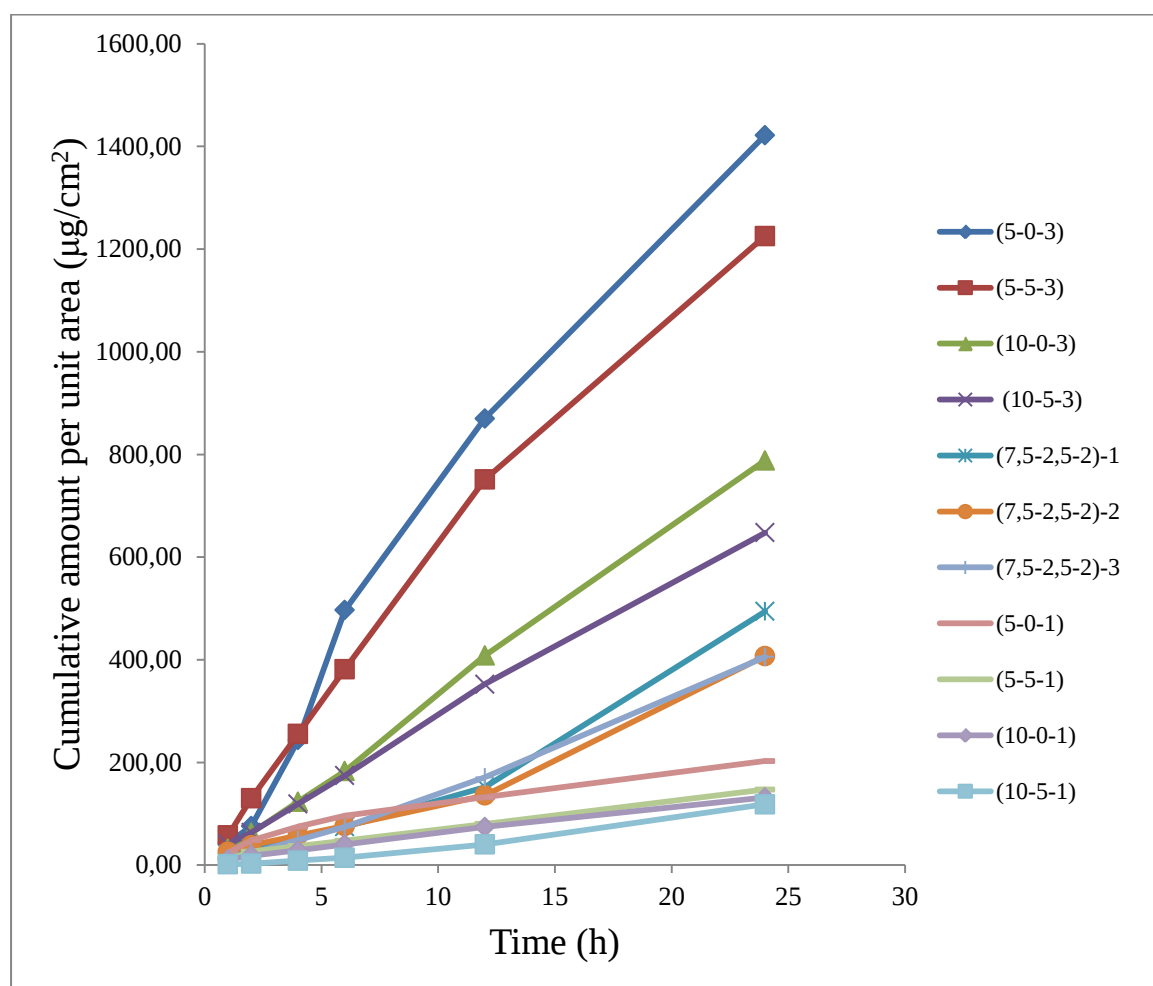
## 25. Ανάλυση αποτελεσμάτων πειραματικού σχεδιασμού για την μορφοποίηση των υμενίων των μικροβελόνων

Από τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση τεχνητής μεμβράνης Strat-M® και τις συνθέσεις του πειραματικού σχεδιασμού προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα απεικονιζόμενα υπό μορφή πίνακα και γραφήματος αθροιστικής ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), συναρτήσεως του χρόνου. Επιπλέον, παρατίθεται και ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$ , ο οποίος αποτυπώνει την γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών μεγεθών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφάνειας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux,  $J$ ,  $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ), διότι η θεώρηση αυτή προσεγγίζει περισσότερο τα επίπεδα που θα επιτευχθούν υπό πραγματικές συνθήκες. Κάθε μορφοποίηση/σύνθεση περιγράφεται από τον συνδυασμό τριών αριθμών οι οποίοι αντιστοιχούν κατά σειρά στις παραμέτρους (PVA-PVP-GAL) του πειραματικού σχεδιασμού.

**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας σε μεμβράνη Strat-M®

| Σύνθεση     | $Q_{0-1h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $Q_{0-2h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $Q_{0-4h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $Q_{0-6h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $Q_{0-12h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $Q_{0-24h}$<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )<br>± SD | $R^2$  |
|-------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------|
| (5-0-3)     | 42,35<br>± 6,23                                     | 76,11<br>± 6,84                                     | 243,51<br>± 50,08                                   | 496,84<br>± 115,90                                  | 896,93<br>± 118,54                                   | 1422,06<br>± 156,62                                  | 0,9991 |
| (5-5-3)     | 57,85<br>± 7,70                                     | 130,33<br>± 6,54                                    | 255,53<br>± 1,36                                    | 381,84<br>± 10,65                                   | 751,36<br>± 16,11                                    | 1225,51<br>± 48,47                                   | 0,9865 |
| (10-0-3)    | 31,68<br>± 4,35                                     | 62,87<br>± 4,12                                     | 123,66<br>± 4,34                                    | 183,12<br>± 2,63                                    | 408,34<br>± 22,02                                    | 788,44<br>± 124,03                                   | 0,9991 |
| (10-5-3)    | 40,37<br>± 2,82                                     | 63,63<br>± 1,58                                     | 119,05<br>± 5,32                                    | 174,52<br>± 7,13                                    | 352,43<br>± 81,19                                    | 647,82<br>± 86,76                                    | 0,9986 |
| (7,5-2,5-1) | 21,19<br>± 8,35                                     | 32,48<br>± 7,69                                     | 53,35<br>± 6,49                                     | 74,55<br>± 13,86                                    | 151,94<br>± 48,54                                    | 494,18<br>± 51,91                                    | 0,9578 |
| (7,5-2,5-2) | 25,83<br>± 2,26                                     | 38,74<br>± 3,82                                     | 57,85<br>± 8,67                                     | 76,04<br>± 14,74                                    | 135,76<br>± 29,68                                    | 407,42<br>± 111,79                                   | 0,962  |
| (7,5-2,5-3) | 11,92<br>± 0,00                                     | 23,42<br>± 0,42                                     | 48,83<br>± 2,46                                     | 74,24<br>± 4,50                                     | 170,90<br>± 27,60                                    | 405,81<br>± 137,45                                   | 0,9932 |

| Σύνθεση  | Q <sub>0-1h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-2h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-4h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-6h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-12h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-24h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | R <sup>2</sup> |
|----------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| (5-0-1)  | 24,85<br>± 3,62                                    | 48,42<br>± 5,81                                    | 74,95<br>± 10,67                                   | 95,97<br>± 18,17                                   | 132,29<br>± 22,69                                   | 202,91<br>± 21,44                                   | 0,9591         |
| (5-5-1)  | 12,30<br>± 2,53                                    | 26,12<br>± 9,54                                    | 37,05<br>± 10,59                                   | 47,51<br>± 11,46                                   | 80,24<br>± 14,54                                    | 147,35<br>± 27,04                                   | 0,9963         |
| (10-0-1) | 10,81<br>± 2,85                                    | 18,34<br>± 4,02                                    | 28,62<br>± 5,15                                    | 40,30<br>± 4,96                                    | 74,27<br>± 2,10                                     | 131,77<br>± 14,01                                   | 0,9979         |
| (10-5-1) | 1,53<br>± 0,32                                     | 3,04<br>± 0,56                                     | 8,75<br>± 2,07                                     | 14,37<br>± 3,89                                    | 40,43<br>± 5,15                                     | 118,69<br>± 8,00                                    | 0,9761         |



**Εικόνα 110:** Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της υδροβρωμικής γκαλνταμίνης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας (μg/cm<sup>2</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Οι τιμές RSD των πειραμάτων κυμαίνονται από 0,01% μέχρι και 36,54%. Τιμές RSD άνω του 10% δεν είναι ασυνήθιστες στα πειράματα διαπερατότητας, ενώ ακόμα και τιμές RSD 40% έχουν αναφερθεί σε βιβλιογραφικές αναφορές (Williams A.C., 1992).

Όπως αποτυπώνεται και στο παραπάνω γράφημα, μέχρι τις 4h, οι συνθέσεις παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα, εκτός των ζευγών 5-0-3/5-5-3 και 10-0-3/10-5-3, τα οποία εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τις υπόλοιπες μορφοποιήσεις ( $p < 0,05$ ), αλλά όχι και μεταξύ τους ( $p > 0,05$ ).

Στις 6h, τα επίπεδα της σύνθεσης 5-0-3 αυξάνονται αισθητά και εμφανίζει πλέον στατιστικά σημαντική διαφορά και με την 5-5-3 ( $p < 0,05$ ), η οποία κατά αυτό το τρόπο εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλες τις μορφοποιήσεις του σχεδιασμού. Το ζεύγος 10-0-3/10-5-3 συνεχίζει να εμφανίζει σχετικά παρόμοιο προφίλ. Οι συνθέσεις των κεντρικών σημείων εμφανίζονται στατιστικά ίδιες μεταξύ τους, ενώ το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τις μορφοποιήσεις με 1mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά  $0,636 \text{ cm}^2$ .

Στις 12h, τα επίπεδα της σύνθεσης 5-0-3 ομαλοποιούνται δεν και εμφανίζει πλέον στατιστικά σημαντική διαφορά με την 5-5-3 ( $p > 0,05$ ), ενώ και οι δύο εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλες τις υπόλοιπες μορφοποιήσεις του σχεδιασμού. Το ζεύγος 10-0-3/10-5-3 συνεχίζει να εμφανίζει σταθερό προφίλ. Οι συνθέσεις των κεντρικών σημείων εμφανίζονται στατιστικά ίδιες μεταξύ τους ( $p > 0,05$ ), ενώ το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τις μορφοποιήσεις με 1mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά  $0,636 \text{ cm}^2$  ( $p > 0,05$ ).

Στις 24h, η σύνθεση 5-0-3 και πάλι δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με την 5-5-3 ( $p > 0,05$ ), ενώ και οι δύο εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με όλες τις υπόλοιπες μορφοποιήσεις του σχεδιασμού. Το ζεύγος 10-0-3/10-5-3 συνεχίζει να εμφανίζει σταθερό προφίλ. Οι συνθέσεις των κεντρικών σημείων εμφανίζονται στατιστικά ίδιες μεταξύ τους ( $p > 0,05$ ), ενώ το ίδιο φαίνεται να ισχύει και για τις μορφοποιήσεις με 1mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά  $0,636 \text{ cm}^2$  ( $p > 0,05$ ).

Εν συνεχεία παρατίθενται και τα αποτελέσματα των μετρήσεων απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση για κάθε σύνθεση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η απώλεια ύδατος, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η πιθανότητα καθίζησης κρυστάλλων υδροβρωμικής γκαλανταμίνης στην τελική μορφή λόγω μικρότερης ποσότητας του διαλύτη (νερό).

**Πίνακας 18:** Αποτελέσματα μετρήσεων απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση

| Σύνθεση     | LOD $\pm$ SD     |
|-------------|------------------|
| (5-0-3)     | 91,53 $\pm$ 0,12 |
| (5-5-3)     | 85,36 $\pm$ 0,08 |
| (10-0-3)    | 86,52 $\pm$ 0,05 |
| (10-5-3)    | 84,81 $\pm$ 0,05 |
| (7,5-2,5-1) | 87,88 $\pm$ 0,98 |
| (7,5-2,5-2) | 86,08 $\pm$ 0,17 |
| (7,5-2,5-3) | 86,32 $\pm$ 1,27 |
| (5-0-1)     | 93,41 $\pm$ 0,04 |
| (5-5-1)     | 89,20 $\pm$ 0,22 |
| (10-0-1)    | 89,53 $\pm$ 0,04 |
| (10-5-1)    | 85,77 $\pm$ 0,14 |

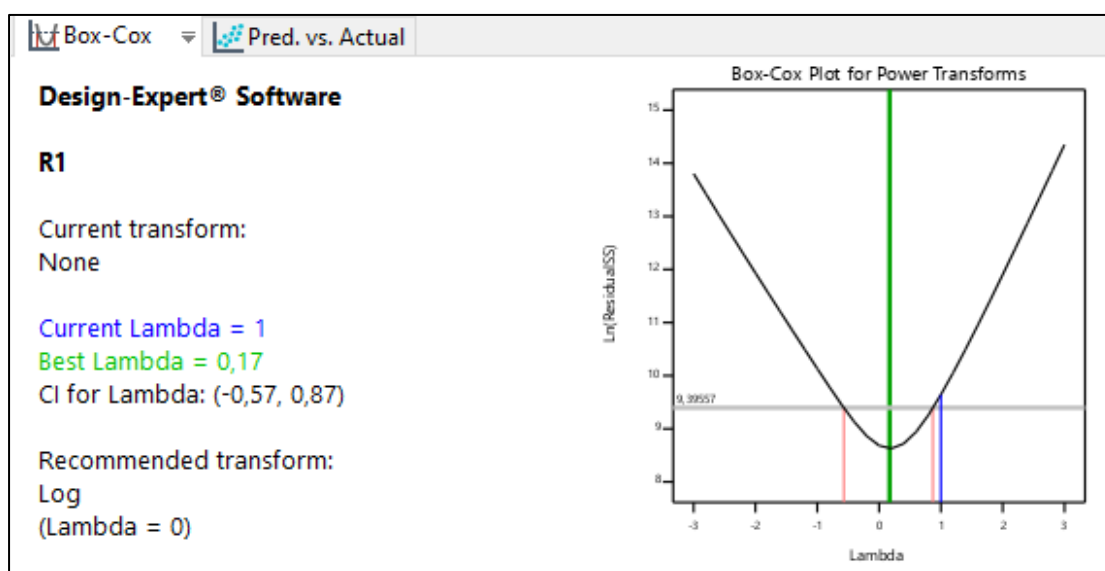
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA). Στην εικόνα 111 απεικονίζεται η μήτρα των πειραμάτων για τις ρυθμίσεις εκτύπωσης, συμπεριλαμβανομένων των τιμών των δύο αποκρίσεων, δηλαδή της αθροιστικής ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη Strat-M® ανά μονάδα επιφάνειας, Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), μέχρι και τις 24h καθώς και της επί τοις εκατό απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση.

|  | Std | Run | Factor 1<br>A:PVA<br>%w/v | Factor 2<br>B:PVP<br>%w/v | Factor 3<br>C:GAL<br>mg/0,636 cm <sup>2</sup> | Response 1<br>Cumulative amount per unit area<br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) | Response 2<br>Loss on Drying<br>% |
|--|-----|-----|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|  | 5   | 9   | 5                         | 0                         | 3                                             | 1422,06                                                                        | 91,53                             |
|  | 7   | 7   | 5                         | 5                         | 3                                             | 1225,44                                                                        | 85,36                             |
|  | 6   | 11  | 10                        | 0                         | 3                                             | 788,44                                                                         | 86,52                             |
|  | 8   | 10  | 10                        | 5                         | 3                                             | 647,82                                                                         | 84,81                             |
|  | 9   | 3   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             | 494,18                                                                         | 86,08                             |
|  | 11  | 1   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             | 407,42                                                                         | 87,88                             |
|  | 10  | 8   | 7,5                       | 2,5                       | 2                                             | 405,81                                                                         | 86,32                             |
|  | 1   | 4   | 5                         | 0                         | 1                                             | 202,91                                                                         | 93,41                             |
|  | 3   | 5   | 5                         | 5                         | 1                                             | 147,35                                                                         | 89,2                              |
|  | 2   | 2   | 10                        | 0                         | 1                                             | 131,77                                                                         | 89,53                             |
|  | 4   | 6   | 10                        | 5                         | 1                                             | 118,69                                                                         | 85,77                             |

**Εικόνα 111:** Απεικόνιση της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού με τα αποτελέσματα, δηλαδή με τις τιμές των αποκρίσεων (Design Expert® – DX 11)

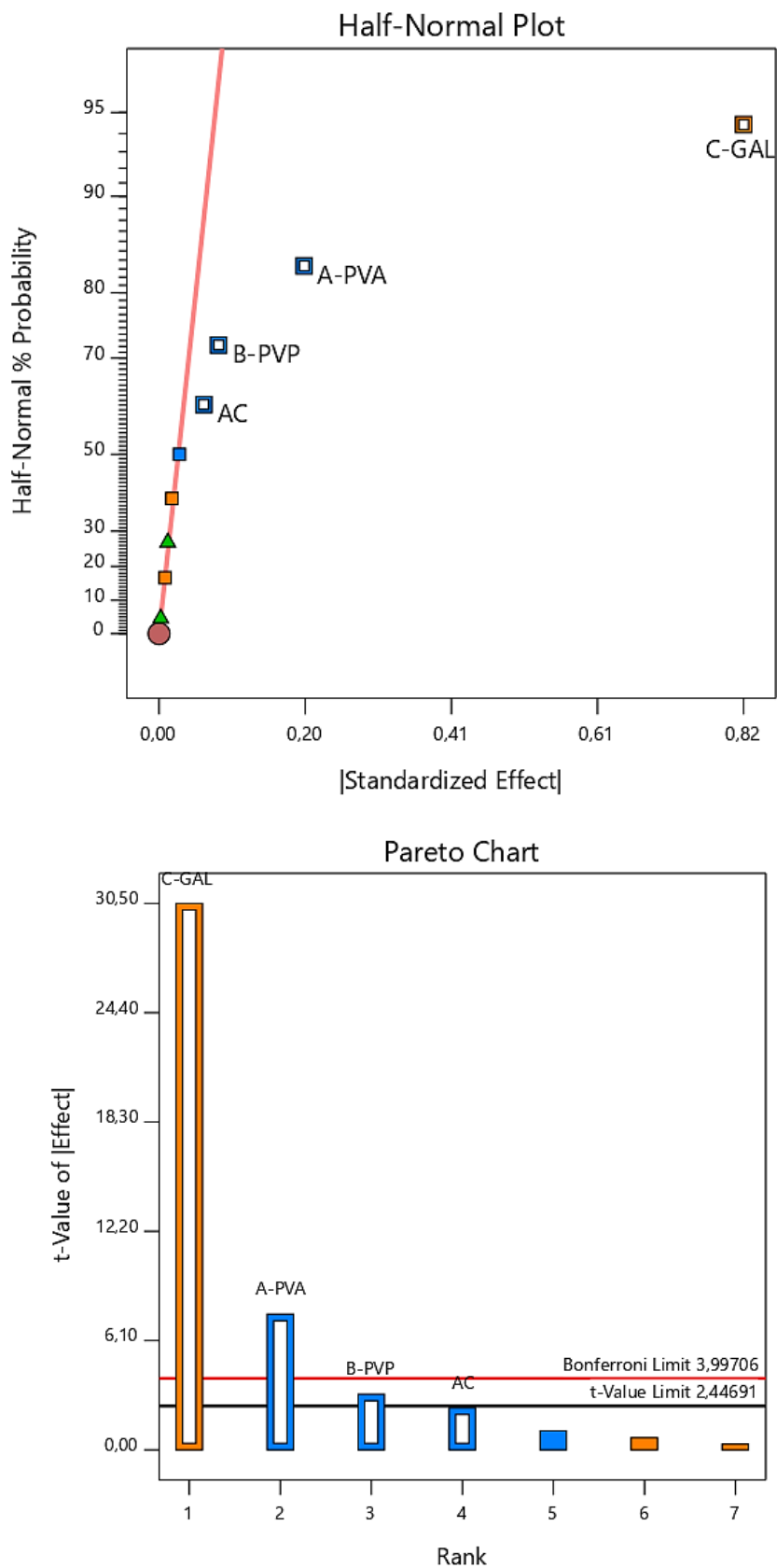
## 25.1 Ανάλυση απόκρισης αθροιστικής ποσότητας υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm<sup>2</sup>), μέχρι και τις 24h

Όπως παρατηρείται από την στήλη των αποκρίσεων, ο λόγος της μέγιστης προς την ελάχιστη τιμή είναι μεγαλύτερος του 10 (11,98), γεγονός που αναδεικνύει την πιθανή ανάγκη για εφαρμογή κάποιου μετασχηματισμού (transformation) στα δεδομένα, προς διευκόλυνση της ανάλυσής τους. Επομένως, πριν προχωρήσουμε στην ανάλυση των δεδομένων και την επιλογή του μοντέλου, διερευνήθηκε κατά πόσο είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί κάποιος μετασχηματισμός, και αν ναι ποιος θα είναι αυτός. Σε αυτή την απόφαση, χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο το γράφημα Box-Cox, το οποίο αποτελεί έναν οδηγό για την επιλογή του σωστού power transformation, στους οποίους περιλαμβάνονται οι σημαντικότερες και πλέον χρησιμοποιούμενες κατηγορίες μετασχηματισμών.



Εικόνα 112: Box-Cox γράφημα

Σύμφωνα με τη παραπάνω εικόνα απαιτείται μετασχηματισμός των δεδομένων και συγκεκριμένα ο λογαριθμικός. Επομένως, στην καρτέλα των μετασχηματισμών επιλέχθηκε ο Base 10 log. Εν συνεχεία, προχωρήσαμε στην επιλογή των στατιστικά σημαντικών παραγόντων με την βοήθεια των γραφημάτων Half Normal Plot και Pareto.



**Εικόνα 113:** Γραφήματα Half-Normal plot και Pareto για την επιλογή των παραγόντων

Με πορτοκαλί χρώμα αποτυπώνονται οι παράγοντες που έχουν θετική επίδραση στην απόκριση ενώ με μπλε χρώμα εκείνοι που έχουν αρνητική επίδραση στην απόκριση. Η διαδικασία επιλογής περιελάμβανε αρχικά την επιλογή των παραγόντων που είχαν σημαντικότερη επίδραση σε σχέση με τους υπόλοιπους (πχ GAL) από το γράφημα Half Normal Plot και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το γράφημα Pareto για να διευκρινιστεί αν οι υπόλοιποι παράγοντες επιδρούν πράγματι στην αθροιστική ποσότητα που διαπερνά.

Σε επόμενο στάδιο, πριν την ανάλυση των δεδομένων με την ανάλυση παλινδρόμησης (ANOVA), πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη καμπύλωσης στον πειραματικό χώρο μέσω των κεντρικών σημείων που προστέθηκαν αρχικά στην μήτρα του πειραματικού σχεδιασμού.

## Curvature Check

You have center points in your design, with a factorial model. These points are used to test whether there is curvature in the data. If curvature is detected, a factorial model may not be appropriate.

| Term        | Adjusted F-value | Model p-value |             |
|-------------|------------------|---------------|-------------|
| Model       | 250,64           | < 0.0001      | significant |
| Curvature   | 5,43             | 0,0671        |             |
| Lack of Fit | 0,3404           | 0,8035        |             |

**Εικόνα 114:** Έλεγχος για ύπαρξη καμπύλωσης

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, η παράμετρος της καμπύλωσης είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ) και δεν απαιτείται προσθήκη περαιτέρω πειραματικών σημείων για την απεικόνιση του πειραματικού χώρου. Συμπεραίνοντας, το μοντέλο που προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα δεδομένα είναι το γραμμικό (Linear) ( $p < 0,05$ ).

## ANOVA for selected factorial model

### Response 1: Cumulative amount per unit area

Transform: Base 10 Log

Constant: 0

| Source           | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value  |                 |
|------------------|----------------|----|-------------|---------|----------|-----------------|
| <b>Model</b>     | 1,45           | 4  | 0,3623      | 250,64  | < 0.0001 | significant     |
| A-PVA            | 0,0829         | 1  | 0,0829      | 57,36   | 0,0006   |                 |
| B-PVP            | 0,0140         | 1  | 0,0140      | 9,66    | 0,0266   |                 |
| C-GAL            | 1,34           | 1  | 1,34        | 930,08  | < 0.0001 |                 |
| AC               | 0,0079         | 1  | 0,0079      | 5,47    | 0,0664   |                 |
| Curvature        | 0,0079         | 1  | 0,0079      | 5,43    | 0,0671   |                 |
| <b>Residual</b>  | 0,0072         | 5  | 0,0014      |         |          |                 |
| Lack of Fit      | 0,0024         | 3  | 0,0008      | 0,3404  | 0,8035   | not significant |
| Pure Error       | 0,0048         | 2  | 0,0024      |         |          |                 |
| <b>Cor Total</b> | 1,46           | 10 |             |         |          |                 |

**Εικόνα 115:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση διασποράς ANOVA (Design Expert® – DX 11)

Συμπεραίνεται ότι, εκτός του μοντέλου που επιλέχθηκε, στατιστικά σημαντικοί παράγοντες για την ποσότητα που διαπέρασε είναι η %w/v περιεκτικότητα του PVA (A), η %w/v περιεκτικότητα του PVP (B) και η ποσότητα σε mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά 0,636cm<sup>2</sup> (C), διότι η τιμή p είναι μικρότερη του 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## Fit Statistics

| <b>Std. Dev.</b> | 0,0380 |  | <b>R<sup>2</sup></b>           | 0,9950  |
|------------------|--------|--|--------------------------------|---------|
| <b>Mean</b>      | 2,59   |  | <b>Adjusted R<sup>2</sup></b>  | 0,9911  |
| <b>C.V. %</b>    | 1,47   |  | <b>Predicted R<sup>2</sup></b> | 0,9807  |
|                  |        |  | <b>Adeq Precision</b>          | 39,4261 |

**Εικόνα 116:** Ανάλυση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων του Fit Statistics από το λογισμικό πρόγραμμα (Design Expert® – DX 11)

Η συσχέτιση R<sup>2</sup> (R – squared) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοζόμενο σε αυτά μοντέλο. Όσο η τιμή του μεγέθους αυτού προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, R<sup>2</sup>= 0,9950, τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προσαρμοσμένος συντελεστής συσχέτισης R<sup>2</sup> (adjusted R<sup>2</sup> - R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοσμένο σε αυτά μοντέλο, λαμβάνοντας όμως υπόψη τους βαθμούς

ελευθερίας που συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων του μοντέλου. Η τιμή του μεγέθους μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των όρων οι οποίοι υπάρχουν στο μοντέλο χωρίς να προσθέτουν αξία σε αυτό. Όσο η τιμή του  $R^2_{adj}$  προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Επομένως, η τιμή  $R^2_{adj}=0,9911$  υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  (predicted  $R^2 - R^2_{pred}$ ) Αποτελεί μέτρο της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγήσει το μοντέλο και σχετίζεται με τη δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Το  $R^2_{pred}$  λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν και μονάδας, ενώ όσο η τιμή του προσεγγίζει τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Στην περίπτωση αυτή,  $R^2_{pred}=0,9807$ , τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως θα πρέπει η διαφορά  $R^2_{adj} - R^2_{pred} < 0,2$ . Σε διαφορετική περίπτωση απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων καθώς και εξέταση μετασχηματισμού της απόκρισης ή χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 116, η διαφορά τους είναι μικρότερη του 0,2.

Η παράμετρος Adequate Precision συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης. Υπολογίζει δηλαδή την αναλογία "σήματος προς θόρυβο" (signal to noise ratio). Η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής για τιμές μεγαλύτερες του τέσσερα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, Adequate Precision=39,43, η οποία είναι μεγαλύτερη του τέσσερα.

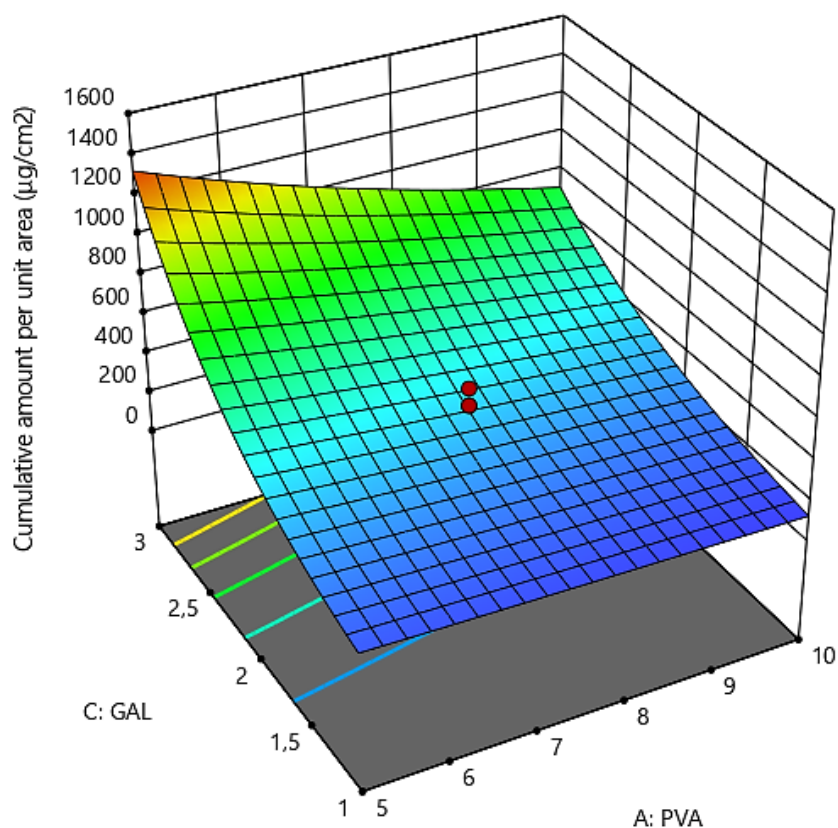
Συμπεραίνοντας, το μοντέλο κρίνεται κατάλληλο για την χαρτογράφηση των δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της αθροιστικής ποσότητας που διαπερνά την τεχνητή μεμβράνη. Παρακάτω παρατίθεται και η εξίσωση βάσει της οποίας προβλέπονται οι τιμές της αθροιστικής ποσότητας που διαπερνά ανά μονάδα επιφάνειας στις 24h από τους παράγοντες, όταν αυτοί λαμβάνουν τιμές εντός της περιοχής που εξετάστηκε.

## Final Equation in Terms of Actual Factors

|                 |             |  |
|-----------------|-------------|--|
|                 |             |  |
| $\log_{10}(R1)$ | =           |  |
| +1,91605        |             |  |
| -0,015564       | * PVA       |  |
| -0,016715       | * PVP       |  |
| +0,504280       | * GAL       |  |
| -0,012578       | * PVA * GAL |  |

Εικόνα 117: Εξίσωση μοντέλου για την υπό ανάλυση απόκριση

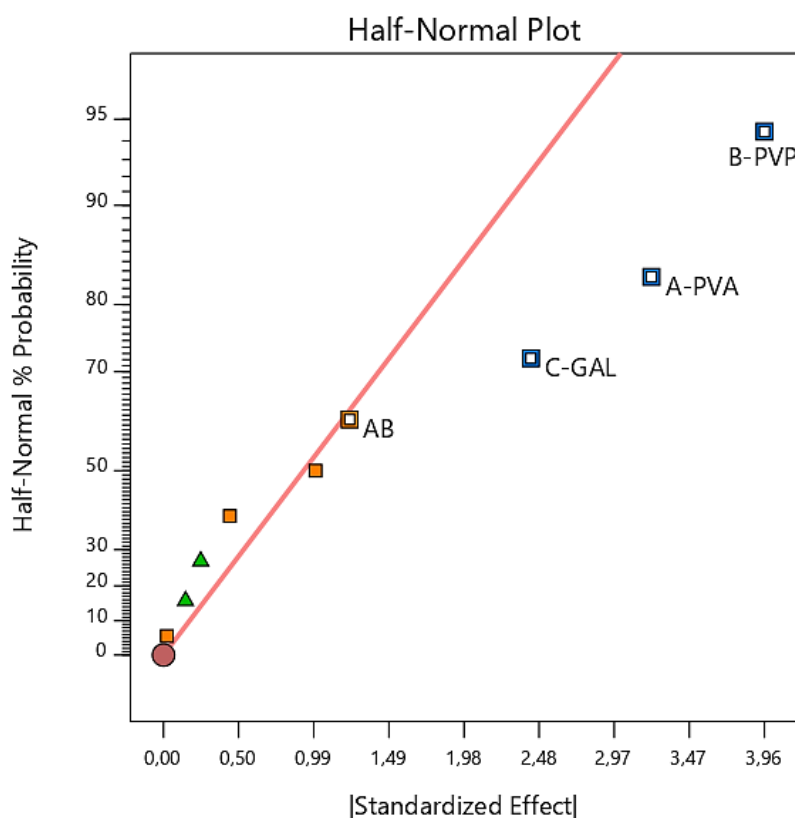
Στην παρακάτω εικόνα 118 απεικονίζεται ο τρισδιάστατος χώρος σχεδιασμού (Design Space), ο οποίος προέκυψε από την συσχέτιση της αθροιστικής ποσότητας που διαπέρασε σε σχέση με τις συνθέσεις, στα επίπεδα που ορίστηκαν. Οι περιοχές με το μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές διαπεράσεως, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από τις μπλε και προσεγγίζονται οι κόκκινες, η διαπερατότητα αυξάνεται.



**Εικόνα 118:** 3D Response Surface Counter plot (Design Expert® – DX 11)

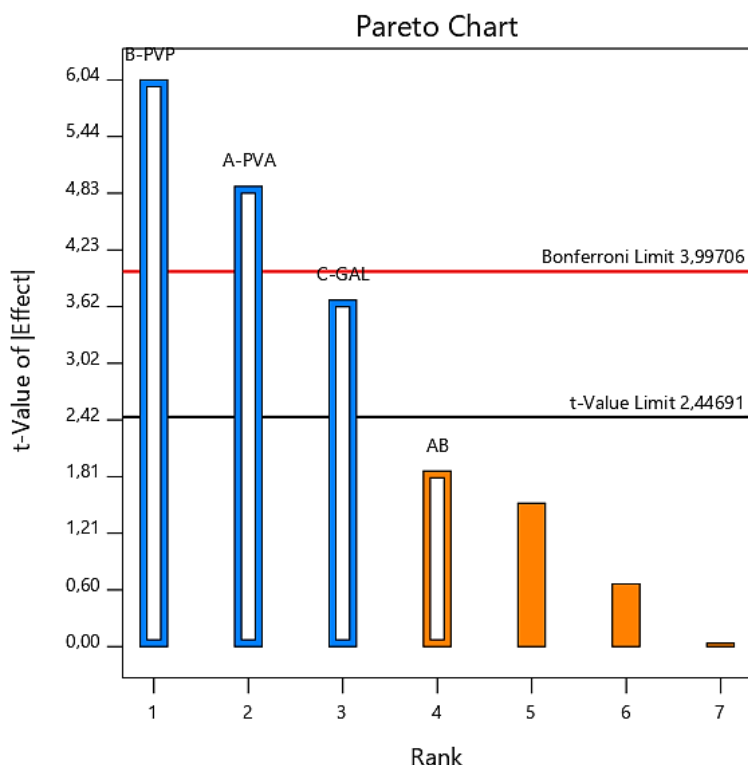
## 25.2 Ανάλυση απόκρισης επί τοις % απώλεια ύδατος κατά την ξήρανση (LOD)

Όπως παρατηρείται από την στήλη των αποκρίσεων (εικόνα 111), ο λόγος της μέγιστης προς την ελάχιστη τιμή είναι μικρότερος του 10 και ειδικά του 3 (1,10), οπότε η πραγματοποίηση μετασχηματισμών έχει ελάχιστη επίδραση στην προσαρμογή μοντέλου στα δεδομένα. Εν συνεχεία, προχωρήσαμε στην επιλογή των στατιστικά σημαντικών παραγόντων με την βοήθεια των γραφημάτων Half Normal Plot και Pareto.



**Εικόνα 119:** Γράφημα Half-Normal plot για την επιλογή των παραγόντων

Με πορτοκαλί χρώμα αποτυπώνονται οι παράγοντες που έχουν θετική επίδραση στην απόκριση ενώ με μπλε χρώμα εκείνοι που έχουν αρνητική επίδραση στην απόκριση. Η διαδικασία επιλογής περιελάμβανε αρχικά την επιλογή των παραγόντων που είχαν σημαντικότερη επίδραση σε σχέση με τους υπόλοιπους (πχ PVP) από το γράφημα Half Normal Plot και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το γράφημα Pareto για να διευκρινιστεί αν οι υπόλοιποι παράγοντες επιδρούν πράγματι στην αθροιστική ποσότητα που διαπερνά.



Εικόνα 120: Γράφημα Pareto για την επιλογή των παραγόντων

Σε επόμενο στάδιο, πριν την ανάλυση των δεδομένων με την ανάλυση παλινδρόμησης (ANOVA), πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ύπαρξη καμπύλωσης στον πειραματικό χώρο μέσω των κεντρικών σημείων που προστέθηκαν αρχικά στην μήτρα του πειραματικού σχεδιασμού.

## Curvature Check

You have center points in your design, with a factorial model. These points are used to test whether there is curvature in the data. If curvature is detected, a factorial model may not be appropriate.

|  | Term        | Adjusted F-value | Model p-value |             |
|--|-------------|------------------|---------------|-------------|
|  | Model       | 19,42            | 0,0030        | significant |
|  | Curvature   | 5,75             | 0,0618        |             |
|  | Lack of Fit | 0,8354           | 0,5852        |             |

Εικόνα 121: Box-Cox γράφημα

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, η παράμετρος της καμπύλωσης είναι στατιστικά μη σημαντική ( $p > 0,05$ ) και δεν απαιτείται προσθήκη περαιτέρω πειραματικών σημείων για την απεικόνιση του πειραματικού χώρου. Συμπεραίνοντας, το μοντέλο που προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα δεδομένα είναι το γραμμικό (Linear) ( $p < 0,05$ ).

## ANOVA for selected factorial model

### Response 2: Loss on Drying

|  | Source           | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value |                 |
|--|------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-----------------|
|  | <b>Model</b>     | 66,86          | 4  | 16,71       | 19,42   | 0,0030  | significant     |
|  | A-PVA            | 20,70          | 1  | 20,70       | 24,05   | 0,0045  |                 |
|  | B-PVP            | 31,40          | 1  | 31,40       | 36,48   | 0,0018  |                 |
|  | C-GAL            | 11,74          | 1  | 11,74       | 13,63   | 0,0141  |                 |
|  | AB               | 3,01           | 1  | 3,01        | 3,50    | 0,1203  |                 |
|  | Curvature        | 4,95           | 1  | 4,95        | 5,75    | 0,0618  |                 |
|  | <b>Residual</b>  | 4,30           | 5  | 0,8608      |         |         |                 |
|  | Lack of Fit      | 2,39           | 3  | 0,7979      | 0,8354  | 0,5852  | not significant |
|  | Pure Error       | 1,91           | 2  | 0,9552      |         |         |                 |
|  | <b>Cor Total</b> | 76,11          | 10 |             |         |         |                 |

**Εικόνα 122:** Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση διασποράς ANOVA (Design Expert® – DX 11)

Συμπεραίνεται ότι, εκτός του μοντέλου που επιλέχθηκε, στατιστικά σημαντικοί παράγοντες για την απώλεια ύδατος κατά την ξήρανση είναι η %w/v περιεκτικότητα του PVA (A), η %w/v περιεκτικότητα του PVP (B) και η ποσότητα σε mg υδροβρωμικής γκαλανταμίνης ανά 0,636cm<sup>2</sup> (C), διότι η τιμή p είναι μικρότερη του 0,05 (p<0,05).

## Fit Statistics

|  |                  |        |  |                                |         |
|--|------------------|--------|--|--------------------------------|---------|
|  |                  |        |  |                                |         |
|  | <b>Std. Dev.</b> | 0,9278 |  | <b>R<sup>2</sup></b>           | 0,9395  |
|  | <b>Mean</b>      | 87,86  |  | <b>Adjusted R<sup>2</sup></b>  | 0,8911  |
|  | <b>C.V. %</b>    | 1,06   |  | <b>Predicted R<sup>2</sup></b> | 0,7004  |
|  |                  |        |  | <b>Adeq Precision</b>          | 14,0133 |

**Εικόνα 123:** Απεικόνιση του Fit Summary για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert® – DX 11)

Η συσχέτιση R<sup>2</sup> (R – squared) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοζόμενο σε αυτά μοντέλο. Όσο η τιμή του μεγέθους αυτού προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, R<sup>2</sup>= 0,9395, τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προσαρμοσμένος συντελεστής συσχέτισης R<sup>2</sup> (adjusted R<sup>2</sup> - R<sup>2</sup><sub>adj</sub>) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από την μέση τιμή η οποία εξηγείται από το προσαρμοσμένο σε αυτά μοντέλο, λαμβάνοντας όμως υπόψη τους βαθμούς

ελευθερίας που συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων του μοντέλου. Η τιμή του μεγέθους μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των όρων οι οποίοι υπάρχουν στο μοντέλο χωρίς να προσθέτουν αξία σε αυτό. Όσο η τιμή του  $R^2_{adj}$  προσεγγίζει την μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Επομένως, η τιμή  $R^2_{adj}=0,8911$  υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  (predicted  $R^2 - R^2_{pred}$ ) Αποτελεί μέτρο της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγήσει το μοντέλο και σχετίζεται με τη δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Το  $R^2_{pred}$  λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν και μονάδας, ενώ όσο η τιμή του προσεγγίζει τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Στην περίπτωση αυτή,  $R^2_{pred}=0,7004$ , τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως θα πρέπει η διαφορά  $R^2_{adj} - R^2_{pred} < 0,2$ . Σε διαφορετική περίπτωση απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων καθώς και εξέταση μετασχηματισμού της απόκρισης ή χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 123 η διαφορά τους είναι μικρότερη του 0,2.

Η παράμετρος Adequate Precision συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης. Υπολογίζει δηλαδή την αναλογία "σήματος προς θόρυβο" (signal to noise ratio). Η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής για τιμές μεγαλύτερες του τέσσερα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, Adequate Precision=14,01, η οποία είναι μεγαλύτερη του τέσσερα.

Συμπεραίνοντας, το μοντέλο κρίνεται κατάλληλο για την χαρτογράφηση των δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη επί τοις % απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση. Παρακάτω παρατίθεται και η εξίσωση βάσει της οποίας προβλέπονται οι τιμές LOD από τους παράγοντες, όταν αυτοί λαμβάνουν τιμές εντός της περιοχής που εξετάστηκε.

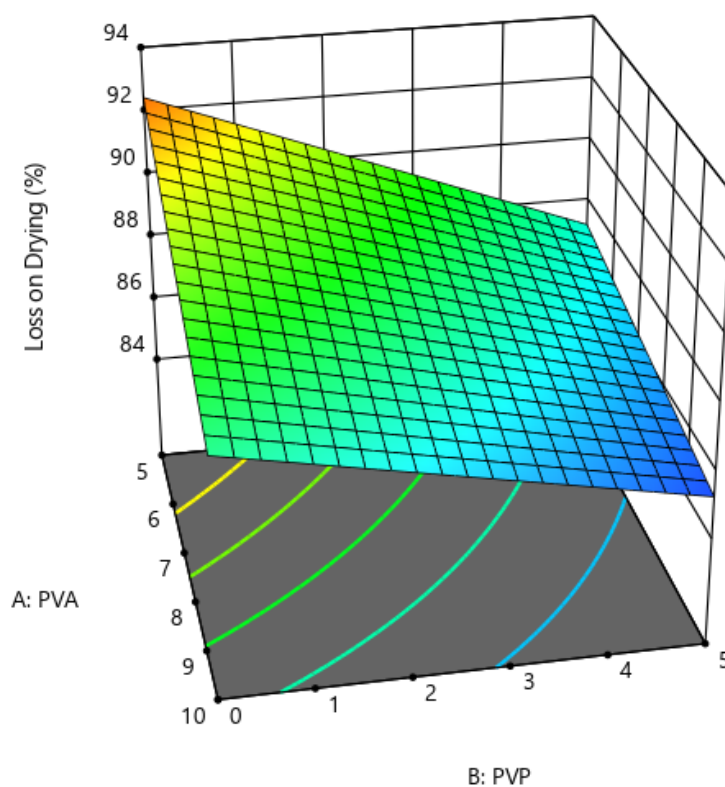
## Final Equation in Terms of Actual Factors

|                |             |
|----------------|-------------|
| Loss on Drying | =           |
| +99,33750      |             |
| -0,889000      | * PVA       |
| -1,52900       | * PVP       |
| -1,21125       | * GAL       |
| +0,098200      | * PVA * PVP |

Εικόνα 124: Εξίσωση μοντέλου για την απόκριση

Στην παρακάτω εικόνα **i** απεικονίζεται ο τρισδιάστατος χώρος σχεδιασμού (Design Space), ο οποίος προέκυψε από την συσχέτιση του LOD σε σχέση με τις συνθέσεις,

στα επίπεδα που ορίστηκαν. Οι περιοχές με το μπλε χρώμα αντιστοιχούν σε χαμηλές τιμές LOD, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από τις μπλε και προσεγγίζονται οι κόκκινες, η τιμή του LOD αυξάνεται.



**Εικόνα 125:** 3D Response Surface Counter plot (Design Expert® – DX 11)

## 25.3 Βελτιστοποίηση σύνθεσης (Optimization-Numerical)

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο, στόχος της άσκησης βελτιστοποίησης ήταν η εύρεση σύνθεσης με μέγιστη διαπέραση (maximize) και ελάχιστη απώλεια ύδατος κατά την ξήρανση (minimize), ώστε να διασφαλίζεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα ταυτόχρονα με την αποφυγή καθίζησης κρυστάλλων στο υμένιο των μικροβελόνων. Οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμειναν ως έχουν.

### Constraints

|  | Name                            | Goal        | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
|--|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
|  | A:PVA                           | is in range | 5           | 10          | 1            | 1            | 3          |
|  | B:PVP                           | is in range | 1           | 5           | 1            | 1            | 3          |
|  | C:GAL                           | is in range | 1           | 3           | 1            | 1            | 3          |
|  | Cumulative amount per unit area | maximize    | 2,07441     | 3,15292     | 1            | 1            | 3          |
|  | Loss on Drying                  | minimize    | 84,81       | 93,41       | 1            | 1            | 3          |

### Solutions

73 Solutions found

| Number | PVA   | PVP   | GAL   | Cumulative amount per unit area | Loss on Drying | Desirability |
|--------|-------|-------|-------|---------------------------------|----------------|--------------|
| 1      | 5,186 | 5,000 | 3,000 | 1171,933                        | 0,028          | 0,892        |
| 2      | 5,231 | 5,000 | 3,000 | 1165,507                        | 0,028          | 0,892        |
| 3      | 5,222 | 5,000 | 3,000 | 1166,821                        | 0,028          | 0,892        |
| 4      | 5,157 | 5,000 | 3,000 | 1176,163                        | 0,028          | 0,892        |
| 5      | 5,105 | 5,000 | 3,000 | 1183,613                        | 0,029          | 0,892        |
| 6      | 5,338 | 5,000 | 3,000 | 1150,256                        | 0,028          | 0,892        |
| 7      | 5,044 | 5,000 | 3,000 | 1192,601                        | 0,029          | 0,892        |
| 8      | 5,407 | 5,000 | 3,000 | 1140,539                        | 0,027          | 0,892        |
| 9      | 5,079 | 5,000 | 3,000 | 1187,320                        | 0,029          | 0,892        |
| 10     | 5,407 | 5,000 | 3,000 | 1140,629                        | 0,027          | 0,892        |
| 11     | 5,246 | 4,999 | 3,000 | 1163,195                        | 0,028          | 0,892        |
| 12     | 5,506 | 5,000 | 3,000 | 1126,787                        | 0,027          | 0,892        |
| 13     | 5,567 | 5,000 | 3,000 | 1118,348                        | 0,027          | 0,891        |
| 14     | 5,628 | 5,000 | 3,000 | 1109,998                        | 0,026          | 0,891        |
| 15     | 5,720 | 4,998 | 3,000 | 1097,617                        | 0,026          | 0,891        |
| 16     | 5,799 | 5,000 | 3,000 | 1087,001                        | 0,026          | 0,891        |
| 17     | 5,000 | 5,000 | 2,998 | 1196,983                        | 0,029          | 0,891        |
| 18     | 5,936 | 5,000 | 3,000 | 1068,906                        | 0,025          | 0,891        |
| 19     | 5,309 | 5,000 | 2,997 | 1151,035                        | 0,028          | 0,891        |
| 20     | 5,561 | 4,976 | 3,000 | 1120,296                        | 0,027          | 0,890        |
| 21     | 6,238 | 5,000 | 3,000 | 1029,934                        | 0,024          | 0,890        |

Εικόνα 126: Απεικόνιση των λύσεων του Πειραματικού Σχεδιασμού

Από τις λύσεις που πρότεινε το λογισμικό του προγράμματος επιλέχθηκε εκείνη με τον μεγαλύτερο παράγοντα επιθυμίας (desirability factor). Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι υπάρχουν περισσότερες της μίας λύσης με μέγιστο παράγοντα, οπότε επιλέχθηκε η 12<sup>η</sup> κατά σειρά, διότι, όπως παρατηρήθηκε κατά την διεργασία παρασκευής, η μεγαλύτερη ποσότητα PVA επιτρέπει την ευκολότερη αφαίρεση των υμενίων από τα εκμαγεία. Επομένως, η βέλτιστη μορφοποίηση ήταν αυτή με τις αναλογίες 5,5%w/v PVA-5%PVP-3mg GAL/0,636 cm<sup>2</sup>.

## Point Prediction

Two-sided Confidence = 95% Population = 99%

|  | Solution 12 of 73<br>Response     | Predicted<br>Mean | Predicted<br>Median* | Observed | Std Dev  | SE Mean  | 95% CI low<br>for Mean | 95% CI high<br>for Mean | 95% TI low<br>for 99% Pop | 95% TI high<br>for 99% Pop |
|--|-----------------------------------|-------------------|----------------------|----------|----------|----------|------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
|  | Cumulative amount per unit area†‡ | 1131,1            | 1126,79              |          | 98,8319  | N/A      | 964,717                | 1326,19                 | 620,965                   | 2044,64                    |
|  | Loss on Drying‡                   | 85,8673           | 85,8673              |          | 0,927819 | 0,656022 | 84,181                 | 87,5537                 | 79,5523                   | 92,1824                    |

**Εικόνα 127:** Προβλεπόμενες τιμές από τον Πειραματικό Σχεδιασμό

Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέβλεψε το λογισμικό του Πειραματικού Σχεδιασμού, παρασκευάστηκε η σύνθεση και πραγματοποιήθηκε πείραμα διαπερατότητας σε τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> και μέτρηση της απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση.

Από το πείραμα διαπερατότητας:

**Πίνακας 19:** Αποτελέσματα βέλτιστης μορφοποίησης από τα πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας σε Strat-M<sup>®</sup>

| Σύνθεση   | Q <sub>0-1h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-2h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-4h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-6h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-12h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-24h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | R <sup>2</sup> | % Απόκλιση<br>από την<br>προβλεπόμενη<br>τιμή |
|-----------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|
| (5,5-5-3) | 31,97<br>± 2,87                                    | 48,30<br>± 1,19                                    | 100,56<br>± 3,51                                   | 222,18<br>± 30,17                                  | 590,44<br>± 126,97                                  | 1095,76<br>± 231,70                                 | 0,9920         | -3,12%                                        |

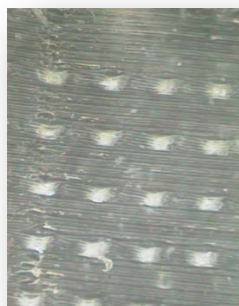
Οι τιμές RSD των πειραμάτων κυμαίνονται από 8,97% μέχρι και 21,51%. Τιμές RSD άνω του 10% δεν είναι ασυνήθιστες στα πειράματα διαπερατότητας, ενώ ακόμα και τιμές RSD 40% έχουν αναφερθεί σε βιβλιογραφικές αναφορές (Williams A.C., 1992). Όσον αφορά τη στατιστική ανάλυση μέχρι τις 6h φαίνεται να εμφανίζει παρόμοιο προφίλ με το ζεύγος 10-0-3/10-5-3 (p>0,05). Από τις 12h όμως και μετά φαίνεται να είναι στατιστικά ίδια με την 5-5-3 (p>0,05) αλλά όχι και με την 5-0-3 (p<0,05).

Από την μέτρηση LOD:

**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα βέλτιστης μορφοποίησης από τα πειράματα απώλειας ύδατος κατά την ξήρανση

| Σύνθεση   | LOD $\pm$ SD     | % Απόκλιση από<br>την προβλεπόμενη<br>τιμή |
|-----------|------------------|--------------------------------------------|
| (5,5-5-3) | 87,11 $\pm$ 0,24 | 1,44                                       |

Συμπεραίνοντας, η ικανότητα πρόβλεψης των αποκρίσεων με την χρήση των παραπάνω μοντέλων είναι πολύ καλή, όπως απεικονίζεται από τις τιμές απόκλισης των πραγματικών με τις προβλεπόμενες τιμές. Επιπλέον, η βέλτιστη σύνθεση ύστερα, από μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση (εικόνα 129), διαπιστώθηκε ότι πράγματι δεν εμφανίζει καθίζηση κρυστάλλων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση *ex vivo* πειραμάτων διαπερατότητας.



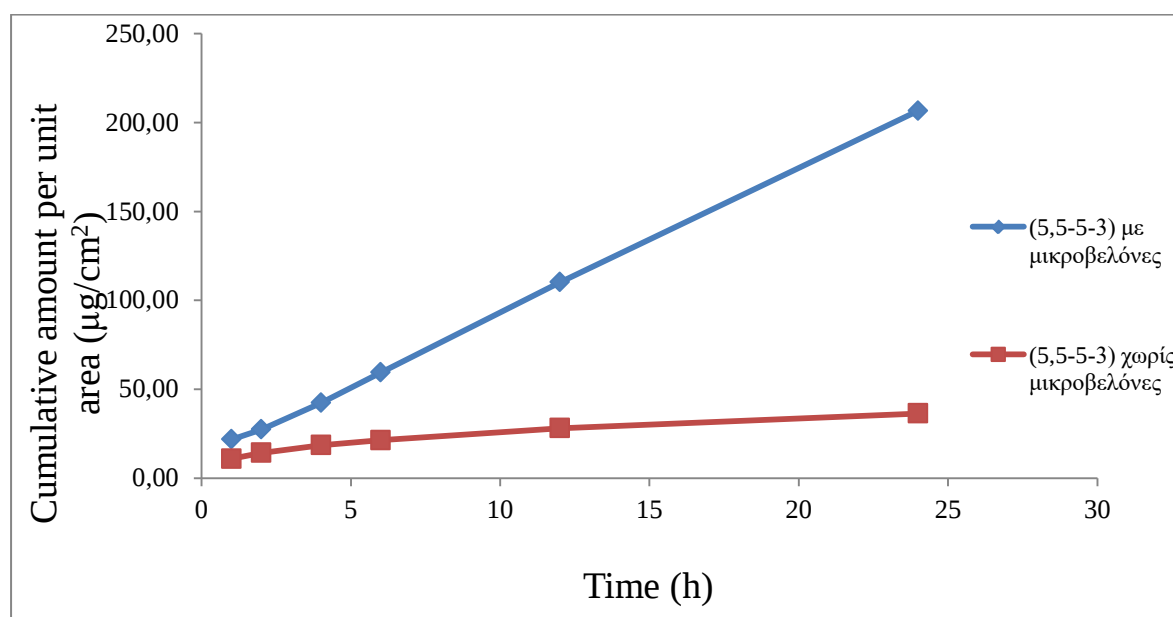
**Εικόνα 128:** Εικόνα βέλτιστης μορφοποίησης σε μικροσκόπιο (x25)

## 26. Ex vivo μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας πλήρους πάχους ανθρώπινο δέρμα

Ο πίνακας 21 και η εικόνα 130 απεικονίζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πραγματοποίηση πειραμάτων διαπερατότητας με την χρήση πλήρους πάχους ανθρώπινου δέρματος για την βέλτιστη σύνθεση που προέκυψε από τον Πειραματικό Σχεδιασμό με και χωρίς την ύπαρξη των μικροβελόνων.

**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα διαδερμικής διαπερατότητας σε δέρμα πλήρους πάχους

| Σύνθεση                            | Q <sub>0-1h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-2h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-4h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-6h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-12h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | Q <sub>0-24h</sub><br>(μg/cm <sup>2</sup> )<br>± SD | R <sup>2</sup> |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| (5,5-5-3) με<br>μικροβελόνες       | 21,80<br>± 5,55                                    | 27,41<br>± 6,29                                    | 42,28<br>± 10,38                                   | 59,47<br>± 9,41                                    | 110,21<br>± 9,69                                    | 206,64<br>± 9,40                                    | 0,9996         |
| (5,5-5-3)<br>χωρίς<br>μικροβελόνες | 10,88<br>± 3,20                                    | 14,21<br>± 3,75                                    | 18,54<br>± 4,33                                    | 21,35<br>± 4,04                                    | 28,13<br>± 4,63                                     | 36,38<br>± 4,19                                     | 0,9398         |



**Εικόνα 129:** Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας (μg/cm<sup>2</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

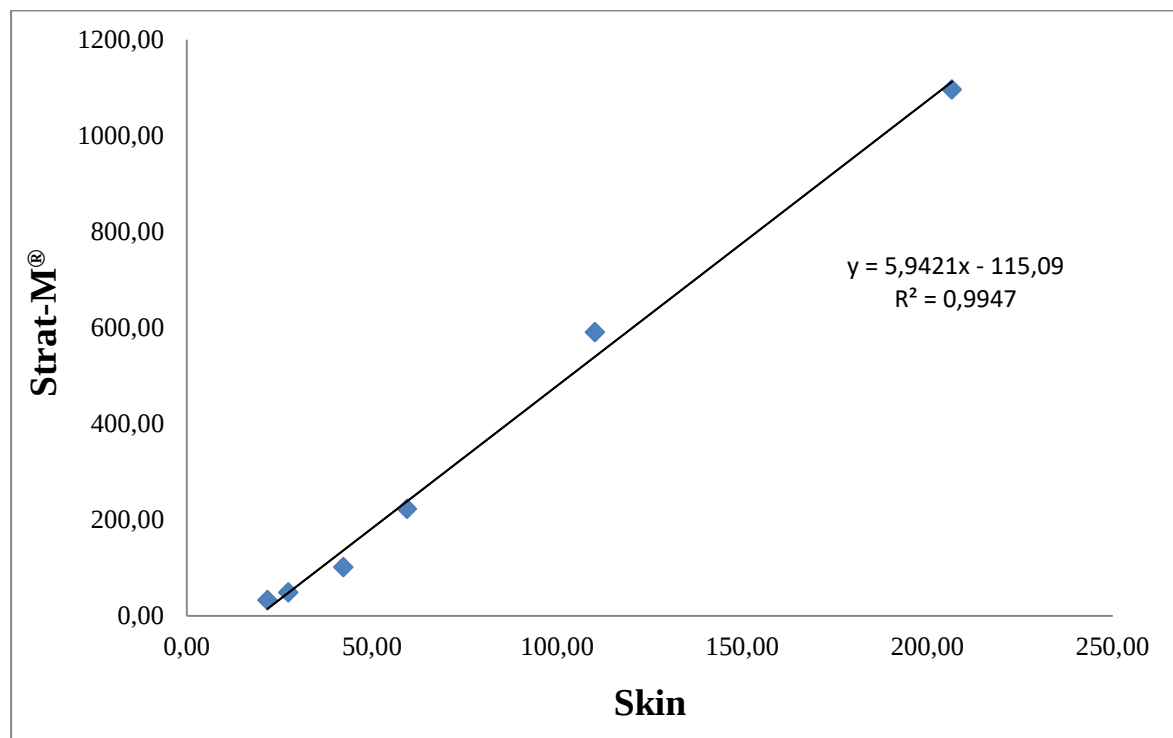
Οι τιμές RSD των πειραμάτων κυμαίνονται από 1,33% μέχρι και 29,37%. Τιμές RSD άνω του 10% δεν είναι ασυνήθιστες στα πειράματα διαπερατότητας, ενώ ακόμα και τιμές RSD 40% έχουν αναφερθεί σε βιβλιογραφικές αναφορές (Williams A.C., 1992).

Από τις καμπύλες των δύο συνθέσεων του γραφήματος μπορεί εύκολα να παρατηρήσει κανείς ότι η ύπαρξη των μικροβελόνων ενισχύει πράγματι την διαπέραση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης από το δέρμα, με τα επίπεδα των

μικροβελόνων να είναι σχεδόν έξι φορές μεγαλύτερα. Η διαφορά αυτή που ανιχνεύεται οπτικά, επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική ανάλυση, όπου για όλα τα σημεία της δειγματοληψίας ισχύει  $p < 0.05$ , δηλαδή υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τα επίπεδα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπερνούν το φραγμό μέχρι και τις 24h (206,64μg) προσεγγίζουν ήδη τις θεραπευτικές δόσεις που παρατηρούνται στα 5L αίματος ύστερα από κλινικές μελέτες, οπότε αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μορφή για μελλοντική χορήγηση. Οι τιμές αυτές, μάλιστα, αναμένεται να αυξηθούν περαιτέρω καθώς η καμπύλη των μικροβελόνων ακολουθεί γραμμική πορεία ( $R^2=0,9996$ ), σε σχέση με την μορφοποίηση άνευ μικροβελόνων η οποία ήδη από τις 24h εμφανίζει τάση σταθεροποίησης (πλατό).

## 27. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup> και του ανθρώπινου δέρματος

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η γραμμική συσχέτιση της *ex vivo* διαπέρασης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας μέσω του ανθρώπινου δέρματος και της τεχνητής μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup> για την βέλτιστη συνταγή του Πειραματικού Σχεδιασμού.



**Εικόνα 130:**Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ του ανθρώπινου δέρματος και της μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup>

Στην παρούσα μελέτη η συνθετική μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> παρουσίασε πολύ καλή συσχέτιση με το ανθρώπινο δέρμα πλήρους πάχους για την υδροβρωμική γκαλανταμίνη. Όπως φαίνεται από την εικόνα 131, η τιμή του συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  ανάμεσα στα χρονικά σημεία για τα αποτελέσματα της αθροιστικής ποσότητας της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), σε συνάρτηση με το χρόνο ( $t$ ), είναι ίση με 0,9947. Επομένως, υποδηλώνεται ότι οι μηχανισμοί αποδέσμευσης και μεταφοράς φαρμακολογικά δραστικών ουσιών από τις μικροβελόνες, προσομοιώνονται σε μεγάλο βαθμό από την τεχνητή μεμβράνη. Μία υπόθεση για την αιτία αυτού του φαινομένου είναι ότι λόγω της διάτρησης του δερματικού φραγμού, οι δραστικές ουσίες απλώς διαχέονται μέσα από τα διάφορα στρώματα της επιδερμίδας προς την κυκλοφορία.

Η αθροιστική ποσότητα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την τεχνητή μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> ανά μονάδα επιφάνειας σε σχέση με το χρόνο είναι, σύμφωνα με

το παραπάνω γράφημα, σχεδόν έξι φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που διαπέρασε το ανθρώπινο δέρμα. Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές. Η αθροιστική ποσότητα της Νικοτίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M® ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), σε συνάρτηση με το χρόνο ( $t$ ), χρησιμοποιώντας επιταχυντές διαβατότητας, όπως την αζόνη, την ευκαλυπτόλη και την επιφανειοδραστική ουσία Tween 80, ήταν 5-10 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα (Haq, 2018). Επίσης, η αθροιστική ποσότητα της Υδροκορτιζόνης, της Καφεΐνης και της Νατριούχου Δικλοφενάκης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M® ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), έχοντας μορφοποιηθεί σε φαρμακευτικές μορφές που εφαρμόζονται στο δέρμα (διαλύματα, γέλες, γαλακτώματα, ΔΘΣ), ήταν 4-12 φορές μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα (Haq, 2018).

## 28. Αξιολόγηση πολυμερικών μικροβελόνων

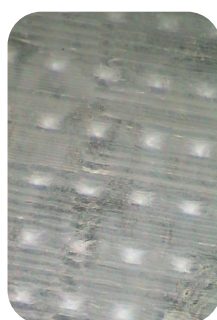
Στα παρακάτω υποκεφάλαια καταγράφονται τα αποτελέσματα ελέγχων μικροσκοπικής παρατήρησης για τον χαρακτηρισμό της γεωμετρίας των μικροβελόνων, εκτίμησης βάθους διαπέρασης δέρματος και ποσοτικού προσδιορισμού της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης για την αξιολόγηση της τελικής μορφής.

### 28.1 Αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης

Με χρήση του μικροσκοπίου Leica λήφθηκαν φωτογραφίες της επιφάνειας των μικροβελόνων, υπό γωνία  $45^\circ$  και  $90^\circ$  και μεγέθυνση x25, προς μέτρηση του εμβαδού της βάσης και του ύψους των μικροβελόνων. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό ImageJ προέκυψαν τα αποτελέσματα του Πίνακα 22.

(5-0-3)

(καθίζηση κρυστάλλων)

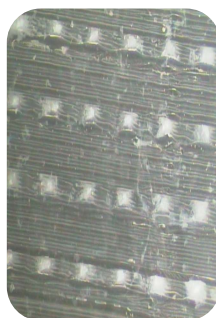


$90^\circ$



$45^\circ$

(5-5-3)

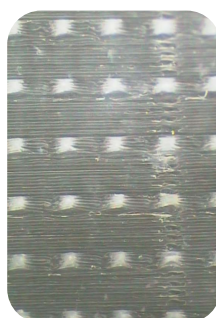


$90^\circ$



$45^\circ$

(10-0-3)

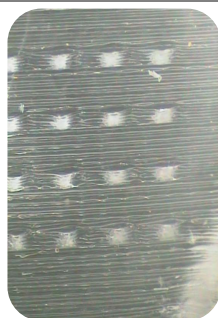


$90^\circ$



$45^\circ$

(10-5-3)

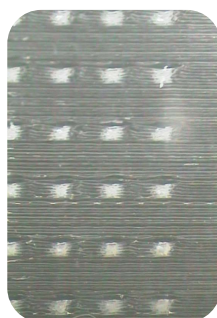


90°

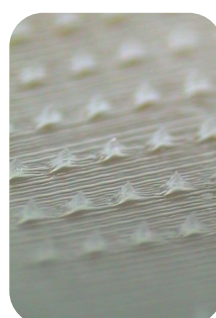


45°

(7,5-2,5-2)



90°

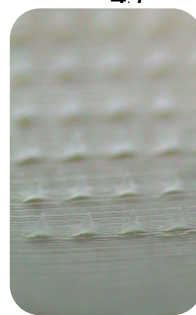


45°

(5-0-1)

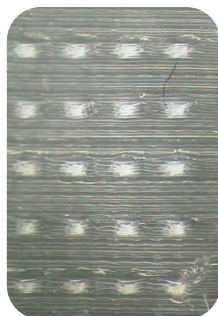


90°

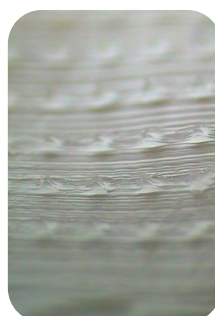


45°

(5-5-1)

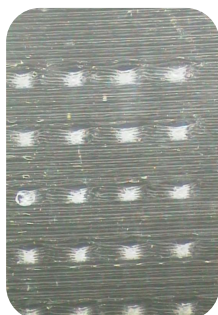


90°

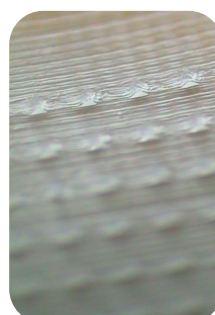


45°

(10-0-1)

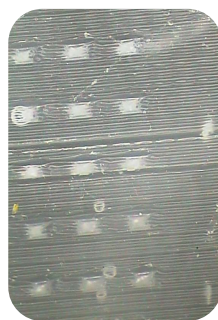


90°

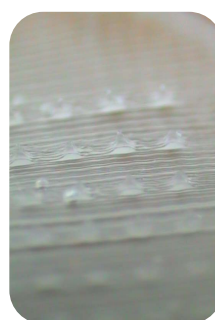


45°

(10-5-1)

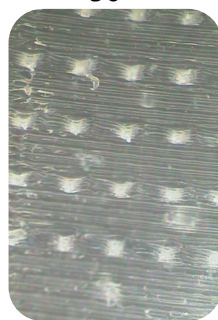


90°

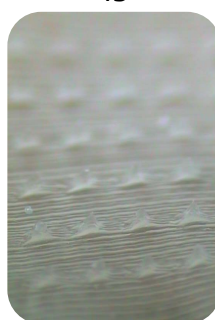


45°

(5,5-5-3)



90°



45°

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα μικροσκοπικής παρατήρησης μικροβελόνων

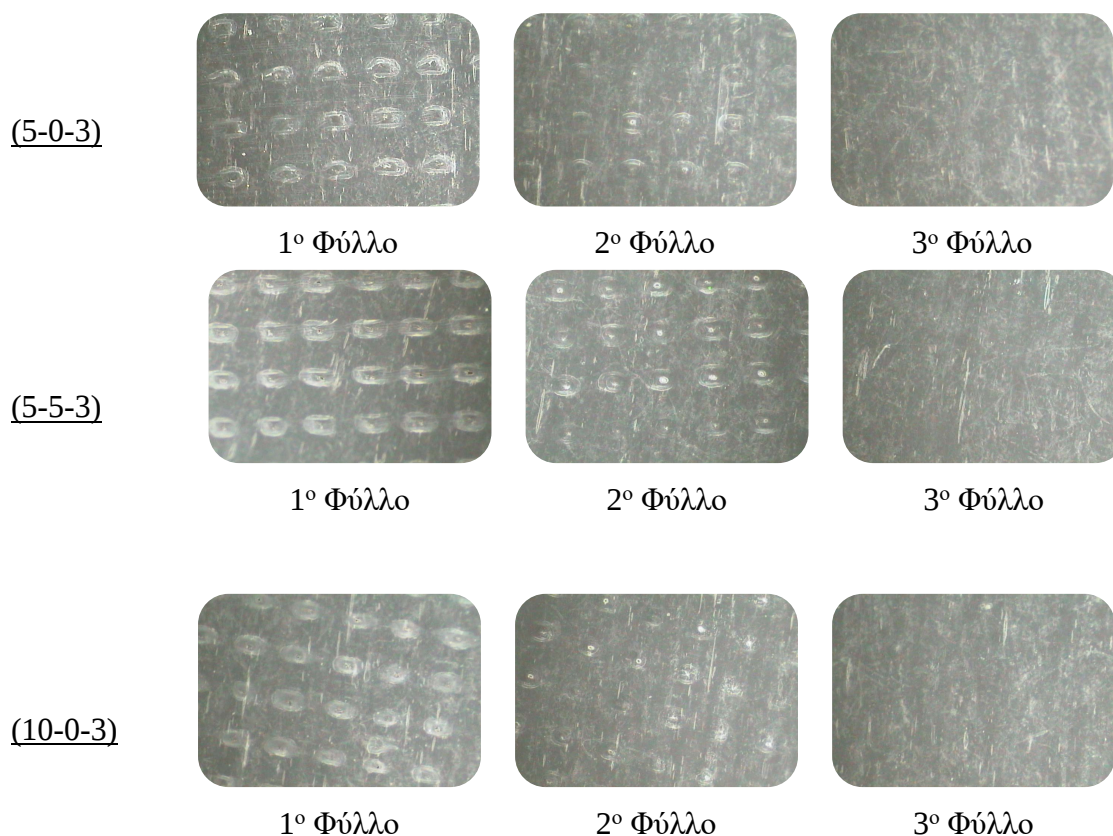
| Σύνθεση     | Επιφάνεια βάσης (μm <sup>2</sup> ) |                            | Ύψος μικροβελόνων (μm) |                            |
|-------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|
|             | Εμβαδόν<br>± SD                    | % Θεωρητικής<br>τιμής ± SD | Ύψος<br>± SD           | % Θεωρητικής<br>τιμής ± SD |
| (5-0-3)     | 91788,6<br>± 3754,7                | 101,99<br>± 4,17           | 485,42<br>± 7,3        | 97,08<br>± 1,46            |
| (5-5-3)     | 90967,3<br>± 5545,4                | 101,08<br>± 6,16           | 416,74<br>± 11,77      | 83,35<br>± 2,35            |
| (10-0-3)    | 90415,9<br>± 2890,7                | 100,46<br>± 3,21           | 495,79<br>± 43,18      | 99,16<br>± 8,6             |
| (10-5-3)    | 91003,4<br>± 2892                  | 101,12<br>± 3,21           | 442,08<br>± 29,88      | 88,42<br>± 5,98            |
| (7,5-2,5-1) | 92173,8<br>± 2724,7                | 102,42<br>± 3,03           | 485,55<br>± 7,75       | 97,11<br>± 1,55            |
| (5-0-1)     | 90951,7<br>± 2770                  | 101,06<br>± 3,08           | 487,54<br>± 5,72       | 97,51<br>± 1,14            |
| (5-5-1)     | 92338,8<br>± 3334,9                | 102,49<br>± 3,71           | 419,95<br>± 23,92      | 83,99<br>± 4,79            |
| (10-0-1)    | 89875,5<br>± 3108,4                | 99,86<br>± 3,45            | 477,92<br>± 11,57      | 95,59<br>± 2,31            |
| (10-5-1)    | 90570,2<br>± 3519,2                | 100,63<br>± 3,91           | 478,62<br>± 17,80      | 95,72<br>± 3,56            |
| (5,5-5-3)   | 91838,2<br>± 2103,8                | 102,04<br>± 2,34           | 480,39<br>± 10,67      | 96,08<br>± 2,13            |

Οι τιμές RSD των μετρήσεων κυμαίνονται από 1,51 έως 8,71, δηλαδή είναι μικρότερες του μέγιστου επιτρεπτού ορίου 10% που έχει οριστεί για την μεταβλητότητα.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από τα αποτελέσματα του πίνακα 22, η επιφάνεια της βάσης των μικροβελόνων, για όλες τις συνθέσεις που ελέγχθηκαν, εμφανίζει ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα εν συγκρίσει με την θεωρητικά ορισμένη τιμή. Η ίδια συνθήκη φαίνεται να ισχύει και για το ύψος των μικροβελόνων. Αναλυτικότερα, στην συντριπτική πλειονότητα των συνθέσεων το τελικό ύψος προσέγγιζε το θεωρητικά ορισμένο. Παρόμοιες μεταβολές έχουν καταγράψει προηγουμένως και οι (Lee, 2015), οι οποίοι χρησιμοποίησαν επίσης για την παρασκευή των μικροβελόνων μίγματα των πολυμερών PVA και PVP. Παρατηρείται ότι οι συνθέσεις με μεγάλη αναλογία PVP είναι πιο εύθρυπτες.

## 28.2 Αποτελέσματα εκτίμησης βάθους διαπέρασης

Η εκτίμηση του βάθους διαπέρασης των μικροβελόνων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 17.5, με τα φύλλα Parafilm®. Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία, τα φύλλα παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο και ανάλογα με τον αριθμό που έχουν διαπεράσει οι μικροβελόνες εκτιμήθηκε και το μέγιστο βάθος που έχουν τρυπήσει. Επισημαίνεται ότι κάθε φύλλο Parafilm® έχει πάχος 127μm.



(10-5-3)



1° Φύλλο



2° Φύλλο



3° Φύλλο

(7,5-2,5-2)



1° Φύλλο

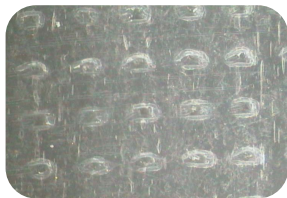


2° Φύλλο



3° Φύλλο

(5-0-1)



1° Φύλλο



2° Φύλλο



3° Φύλλο

(5-5-1)



1° Φύλλο



2° Φύλλο

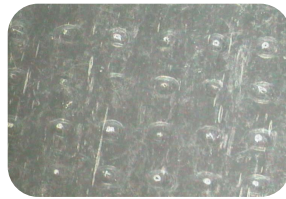


3° Φύλλο

(10-0-1)



1° Φύλλο

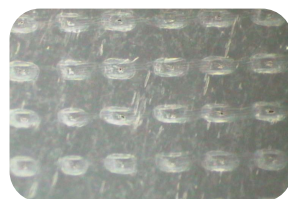


2° Φύλλο



3° Φύλλο

(10-5-1)



1° Φύλλο

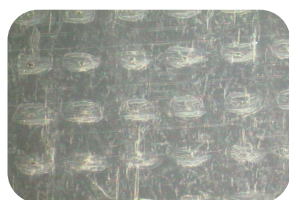


2° Φύλλο



3° Φύλλο

**(5,5-5-3)**



1<sup>ο</sup> Φύλλο



2<sup>ο</sup> Φύλλο



3<sup>ο</sup> Φύλλο

Από την παρατήρηση των φωτογραφιών των στρωμάτων, συμπεραίνουμε ότι σε όλες τις συνθέσεις παρατηρείται διαπέραση των φύλλων Parafilm<sup>®</sup> μέχρι και το δεύτερο φύλλο, ενώ δεν παρατηρούνται ασυνέχειες στο τρίτο στρώμα. Επομένως, οι μικροβελόνες θεωρητικά θα διαπεράσουν το δέρμα και θα φτάσουν σε βάθος 254μm. Η διαφορά αυτή με το ύψος των μικροβελόνων αποδίδεται στο φαινόμενο “bed of nails” που έχει αναφερθεί αναλυτικότερα σε προηγούμενο υποκεφάλαιο.

### 28.3 Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού υδροβρωμικής γκαλανταμίνης

Τα αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης στα υμένα μικροβελόνων επιφάνειας 1,13cm<sup>2</sup> για όλες τις συνθέσεις, όπου παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας φαίνονται στον πίνακα 23, στον οποίο αναφέρεται η επί τοις εκατό της θεωρητικής τιμής σε περιεκτικότητα της δραστικής ουσίας.

**Πίνακας 23:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού υδροβρωμικής γκαλανταμίνης

| Σύνθεση             | % Θεωρητική<br>περιεκτικότητα ± SD |
|---------------------|------------------------------------|
| (5-0-3)             | 93,83 ± 7,56                       |
| (5-5-3)             | 93,32 ± 3,99                       |
| (10-0-3)            | 94,02 ± 7,47                       |
| (10-5-3)            | 100,16 ± 9,35                      |
| (7,5-2,5-1)         | 101,76 ± 9,20                      |
| (5-0-1)             | 107,61 ± 7,21                      |
| (5-5-1)             | 97,30 ± 6,54                       |
| (10-0-1)            | 95,13 ± 6,32                       |
| (10-5-1)            | 92,68 ± 3,92                       |
| Βέλτιστη-(5,5,-5-3) | 93,22 ± 8,43                       |

Από τον πίνακα 23 είναι εμφανές πως η συγκέντρωση της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης κυμαινόταν μεταξύ 85 και 115% της θεωρητικής τιμής. Επομένως, τα υμένα πληρούσαν τις προδιαγραφές της Φαρμακοποιίας που ορίζουν τα αντίστοιχα όρια μεταξύ 85% και 115% της θεωρητικής τιμής, και έτσι κρίθηκαν κατάλληλα προς χρήση στα πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας.





# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

---



## Συμπεράσματα

- Είναι δυνατή η παρασκευή εκμαγείων μικροβελόνων από PLA, με την εφαρμογή της τεχνολογίας τρισδιάστατης εκτύπωσης FDM και κατ' επέκταση, η διαμόρφωση μίας νέας μεθόδου κατασκευής πολυμερικών μικροβελόνων η οποία χαρακτηρίζεται από οικονομία χρόνου και πόρων, ευκολία παραγωγής και ευελιξία στην τροποποίηση παραμέτρων σε σχέση με την αρχιτεκτονική των μικροδομών.
- Εφαρμόζοντας τις αρχές του Πειραματικού Σχεδιασμού στην διεργασία εκτύπωσης, το μοντέλο που συσχετίζει ικανοποιητικά την απόδοση της εκτύπωσης με τις ρυθμίσεις εκτύπωσης ήταν το Quadratic και οι συνθήκες εκτύπωσης που διασφαλίζουν την ακριβή αποτύπωση των διαστάσεων είναι αυτές του κεντρικού σημείου: Layer Height: 50 $\mu$ m, Printing Speed: 50%, Path Width: 450  $\mu$ m
- Είναι δυνατή η παρασκευή μικροβελόνων από τον συνδυασμό των πολυμερών PVA 26-88 και PVP K-30, στις αναλογίες που προτάθηκαν από τον Πειραματικό Σχεδιασμό, με ικανότητα διαπέρασης του δερματικού φραγμού μέχρι και τα 254  $\mu$ m σύμφωνα με τον έλεγχο που επιτελέστηκε με φύλλα Parafilm<sup>®</sup>
- Η ΦΔΟ, υδροβρωμική γκαλανταμίνη, η οποία χορηγείται για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer, χρησιμοποιήθηκε ως μόριο μελέτης των δομών που παρασκευάστηκαν, διότι στα per os χορηγούμενα σκευάσματα προκαλεί έντονες ανεπιθύμητες ενέργειες και ως άλας εμφανίζει χαμηλά επίπεδα κατά την μορφοποίηση της σε ΔΘΣ.
- Η αθροιστική ποσότητα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε την μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> ανά μονάδα επιφάνειας, Q ( $\mu$ g/cm<sup>2</sup>), μέχρι και τις 24h, ακολουθεί για τις συνθέσεις που προτάθηκαν από τον Πειραματικό Σχεδιασμό, γραμμικό μοντέλο, με την απόκριση να ελαττώνεται με αύξηση του ποσοστού των περιεχόμενων πολυμερών ή/και με την μείωση της περιεχόμενης ποσότητας της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης.
- Η σύνθεση 5-0-3, με την βέλτιστη διαπέραση εμφάνιζε καθίζηση κρυστάλλων κατά την παρασκευή της. Προκειμένου, να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο εισήχθη ως δεύτερη απόκριση, η απώλεια ύδατος κατά τη ξήρανση (LOD). Η απόκριση αυτή ακολουθεί εξίσου γραμμικό μοντέλο, με τη τιμή της να μικραίνει όσο αυξάνει το ποσοστό των πολυμερών, καθώς κατακρατούν μεγαλύτερα ποσά υγρασίας.
- Ως βέλτιστη σύνθεση επιλέχθηκε η 5,5-5-3, μέσω του λογισμικού Design-Expert<sup>®</sup> Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA), καθότι συνδυάζε βέλτιστη διαπέραση υδροβρωμικής γκαλανταμίνης με ελάχιστη απώλεια ύδατος κατά τη ξήρανση

- Η βέλτιστη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε σε επιβεβαιωτικό πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας σε μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup>, των θεωρητικών τιμών που προβλέφθηκαν από τον Πειραματικό Σχεδιασμό
- Η βέλτιστη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε επίσης σε *ex vivo* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας με δέρμα πλήρους πάχους ώστε
  - i. να διερευνηθεί αν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup> και του δέρματος πλήρους πάχους
  - ii. να εντοπιστεί η τάξη μεγέθους της διαφορά στα επίπεδα της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης από την ύπαρξη των μικροβελόνων
- Υπάρχει γραμμική συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος και της τεχνητής μεμβράνης ( $R^2=0.9947$ ) για την υδροβρωμική γκαλανταμίνη. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα *in vitro* πειράματα διαπερατότητας του δέρματος και της μεμβράνης Strat-M<sup>®</sup> ενδεχομένως να έχουν συγκριτικό χαρακτήρα
- Οι αθροιστικές ποσότητες της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M<sup>®</sup> ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), σε συνάρτηση με το χρόνο ( $t$ ) είναι περίπου 6 φορές μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες, όταν χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο δέρμα. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με αποτελέσματα βιβλιογραφικών μελετών.
- Στη βέλτιστη σύνθεση με μικροβελόνες, οι αθροιστικές ποσότητες της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης, που διαπέρασε το δέρμα πλήρους πάχους ανά μονάδα επιφάνειας,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), σε συνάρτηση με το χρόνο ( $t$ ) είναι περίπου 6 φορές μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες της βέλτιστης μορφοποίησης άνευ μικροβελόνων. Η διαφορά αυτή αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω με την πάροδο του χρόνου λόγω του πλατό που έχει ήδη αρχίσει να εμφανίζεται στην δεύτερη σύνθεση
- Τα επίπεδα υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που προκύπτουν από τα *ex vivo* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας με την βέλτιστη σύνθεση ανά επιφάνεια  $1\text{cm}^2$ , μέχρι και τις 24h, προσεγγίζουν τα επιθυμητά θεραπευτικά επίπεδα στο αίμα. Οπότε η μορφοποίηση αυτή, αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μορφή για μελέτη σε κλινικές δοκιμές
- Ο ποσοτικός προσδιορισμός της δόσης της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης στις διάφορες συνθέσεις είναι εντός των ορίων που ορίζονται από την Φαρμακοποιία οπότε κάθε μορφή κρίνεται αποδεκτή
- Όσον αφορά τις διαστάσεις των μικροβελόνων, η επιφάνεια της βάσης καθώς και το ύψος των μικροβελόνων αποδίδεται πιστά σε όλα τα πειράματα του Πειραματικού Σχεδιασμού. Οι μορφοποιήσεις που παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόκλιση είναι εκείνες με μεγάλη αναλογία PVP στη σύνθεση.

## Προτάσεις για μελλοντική μελέτη

- Αρχικά, προτείνεται να δοκιμαστεί in vivo σε πειραματόζωα η βέλτιστη σύνθεση που προσεγγίζει τα θεραπευτικά επίπεδα-ώστε να προκύψουν in vitro – in vivo συσχετίσεις καθώς και να γίνει εκτίμηση της ερεθιστικότητάς της.
- Συνίσταται επίσης, να μετρηθεί η σκληρότητά των συνθέσεων με χρήση εξοπλισμού Texture Analyzer
- Βασικό ζήτημα εν συνεχεία, είναι η εγκαθίδρυση προτύπων ποιότητας με τη διαμόρφωση κατάλληλων δοκιμασιών ελέγχου μικροβελόνων σε βιομηχανικό επίπεδο
- Επιπλέον, κρίνεται χρήσιμη η παρασκευή νέου νήματος (filament), κατάλληλο για FDM τρισδιάστατη εκτύπωση, το οποίο θα είναι εύκαμπτο και πορώδες ώστε να απλοποιηθεί περαιτέρω η διεργασία παρασκευής
- Σημαντική θα ήταν επίσης και η αναλυτική χαρτογράφηση του τρόπου με τον οποίο η αρχιτεκτονική των μικροβελόνων επιδρά στην διαπέραση
- Ενδιαφέρουσα πρόταση θα ήταν η χρήση νέων πολυμερών για την μορφοποίηση των πολυμερικών μικροβελόνων και να γίνει αξιολόγηση του προφίλ αποδέσμευσης που εμφανίζουν.
- Εκτός, από την ‘‘φόρτωση’’ ΦΔΟ στο υμένιο των μικροβελόνων μπορεί να εξεταστεί η προοπτική παρασκευής φαρμακοτεχνικών μορφών με ΦΔΟ μόνο στο ΔΘΣ (το οποίο σε αυτή την μελέτη ήταν placebo) ή η δραστική να βρίσκεται και στο υμένιο των μικροβελόνων και στο ΔΘΣ
- Ουσιαστικής σημασίας θεωρείται η ανάπτυξη συσκευής εφαρμογής της μορφής υπό σταθερή πίεση, διότι όπως παρατηρήθηκε κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας, η διαφορετική εφαρμοζόμενη πίεση μεταβάλλει σημαντικά τα επίπεδα της δραστικής που διαπερνούν
- Τέλος, προτείνεται να χρησιμοποιηθούν πρότυπα μόρια ΦΔΟ, ώστε ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και τους επιθυμητούς θεραπευτικούς στόχους, να επιλέγεται απευθείας η κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή



## Βιβλιογραφία

- 3DSystems, 2020. *30 Years of Innovation*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.3dsystems.com/>  
[Πρόσβαση 2020].
- Abla, A. N. R. H. G. a. Y. N. K., 2006. Iontophoresis: Clinical Applications and Future Challenges. Στο: *Percutaneous Penetration Enhancers*. s.l.:Taylor & Francis Group, LLC, pp. 177-219.
- Ahmeda, X. S. J. M. L. Q. J. C., 2019. Derma roller® microneedles-mediated transdermal delivery of doxorubicin and celecoxib co-loaded liposomes for enhancing the anticancer effect. *Materials Science & Engineering C*, p. 1448–1458.
- Aksu, G. Y., 2019. Global Regulatory Perspectives on Quality by Design in Pharma Manufacturing. Στο: *Pharmaceutical Quality by Design*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 19-41.
- Alexis Kays Leonard, A. P. M. A. F., 2005. Development of a Novel High-Concentration Galantamine Formulation Suitable for Intranasal Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 1736-1746.
- Al-Qallaf, D. B. D., 2008. Optimization of square microneedle arrays for increasing drug permeability in skin. *Chemical Engineering Science*, pp. 2523-2535.
- Ambrosi, M. P., 2016. 3D-printing technologies for electrochemical applications. *Chem. Soc. Rev*, p. 2740–2755.
- Ameen, B. M.-K., 2019. Development and in vitro evaluation of pressure sensitive adhesive patch for the transdermal delivery of galantamine: Effect of penetration enhancers and crystallization inhibition. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 262-271.
- Ameri, H. L. a. P. L., 2018. Effect of Skin Model on In Vitro Performance of an Adhesive Dermal Applied Microarray Coated with Zolmitriptan. *Journal of Pharmaceutics*, pp. 1-5.
- Ameri, S. F. Y.-F. M., 2010. Parathyroid hormone PTH(1–34) formulation that enables uniform coating on a novel transdermal microprojection delivery system. *Pharm. Res.*, pp. 303-313.
- Anastasiadou, 2015. The Roadmaps of Total Quality Management in the Greek education system according to Deming, Juran and Crosby in the light of the EFQM model. *Procedia Economics and Finance*, p. 562 – 572.

- Arnou, M. F. T. H. A. P., 2011. Willingness to vaccinate/get vaccinated with an intradermal seasonal influenza vaccine: a survey of general practitioners and the general public in France and Germany. *Adv. Ther.*, pp. 555-565.
- Arora, M. P. a. S. M., 2008. Micro-scale Devices for Transdermal Drug Delivery. *Int J Pharm*, 364(2), p. 227–236.
- ASQ, 2020. *Deming's 14 points: Total Quality Management Principles*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://asq.org/quality-resources/total-quality-management/deming-points>
- Awad, H. .. H., 2018. 3D Printing Methods. Στο: *3D Printing Applications in Cardiovascular Medicine*. s.l.:Elsevier Inc., pp. 11-32.
- Banerjee, P. C. ., A. G. ., D. V. V., 2014. Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, pp. 70-84.
- Barry, 1983. *Properties that influence percutaneous absorption*. s.l.:Marcel Dekker.
- Barry, 1987. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Cont Rel*, pp. 85-97.
- Barry, 1991. Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, pp. 237-248.
- Barry, 2006. Penetration Enhancer Classification. Στο: *Percutaneous Penetration Enhancers*. s.l.:Taylor & Francis Group, pp. 3-15.
- Beckett, G. ., T., 1972. Comparison of oral and percutaneous routes in man for the systemic administration of 'ephedrine'. *J Pharm Pharmacol*, p. 65P–70P.
- Beg, M. R. a. K. K., 2019. Quality-by-design approach as a systematic tool for the development of nanopharmaceutical products. *Drug Discovery Today*, pp. 717-725.
- Beg, M. S. H. M. R., 2019. Introduction to Quality by Design (QbD): Fundamentals, Principles and Applications. Στο: *Pharmaceutical Quality by Design*. s.l.:Elsevier Inc., pp. 1-17.
- Bender, T., 1966. *Great Moments in Medicine and Pharmacy: a History of Medicine and Pharmacy in Pictures*. s.l.:Northwood Institute Press.
- Benson, H. A., 2012. Skin Structure, Function, and Permeation. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Berardesca, d. R. ., L. ., M., 1991. In vivo biophysical characterization of skin physiological differences in races.. *Dermatologica*, pp. 89-93.

Birchall, R. C. A. A. D. J., 2011. Microneedles in clinical practice — an exploratory study into the opinions of healthcare professionals and the public. *Pharm. Res.*, pp. 95-106.

Brittanica, 2020. *Ebers papyrus*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://www.britannica.com/topic/Ebers-papyrus>

Brown, G. P. M. S. A. J. & F. K. A., 2006. Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery*, pp. 175–187,.

Bryan, 1930. *The Papyrus Ebers*. s.l.:Ares: Chicago, IL.

Bystrova, R. L., 2011. Micromolding for ceramic microneedle arrays. *Microelectron. Eng.*, pp. 1681-1684.

Cappetti, A. N. a. G. S., 2018. Influence of Control Parameters on Consumer FDM 3D Printing. *Transdisciplinary Engineering Methods for Social Innovation of Industry 4.0*, pp. 165-177.

Chen, B. Z. C. Q. L. W. X. J. X. D. G., 2017. Fabrication of coated polymer microneedles for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, pp. 14-21.

Chen, C. H. C. T. S. K., 2010. Fabrication of microneedles. *J. Mar. Sci. Technol*, pp. 243-248.

Chen, V. B.-H. S. a. C.-T. C., 2018. Dissolving Microneedle Patches for Transdermal Insulin Delivery in Diabetic Mice: Potential for Clinical Applications. *Materials*, pp. 1-10.

Chen, Y. X. A. J. C. B. Y., 2010. A simple and cost-effective approach to fabricate tunable length polymeric microneedle patches for controllable transdermal drug delivery. *RSC Advances*, p. 15541–15546.

Chien, 1987. Development of transdermal drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, p. 589–651.

Cross, R., 2004. Physical Enhancement of Transdermal Drug Application: Is Delivery Technology Keeping up with Pharmaceutical Development?. *Current Drug Deliver*, pp. 81-92.

Crumpp, 1992. *Apparatus and method for creating three-dimensional objects*. US Patent, Ευρεσιτεχνία Αρ. 5,121,329.

Dancik, O. G. J. a. M. S. R., 2008. Physiologically Based Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Skin. Στο: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. s.l.:Informa Healthcare USA, Inc, pp. 179-208.

- Davis, 2016. Galantamine for Alzheimer's Disease and Alzheimer's Disease with Cerebrovascular Disease. *Practical Pharmacology for Alzheimer's Disease*, pp. 35-61.
- Demir, Z. A. O. K., 2013. Characterization of Polymeric Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *PLOS ONE*, pp. 1-9.
- Deshmukh, A. M., 2020. Fundamentals and applications of 3D and 4D printing of polymers: Challenges in polymer processing and prospects of future research. Στο: *3D and 4D Printing of Polymer Nanocomposite Materials*. s.l.:Elsevier Inc., pp. 527-560.
- Dolenc, M., 1994. Slicing procedures for layered manufacturing techniques. *Comput Aided Des*, p. 119-126.
- Doraiswamy, C. J. R. N. P. M. P. M. R. M. R. A. D. C. A. O. B. C., 2006. Two photon induced polymerization of organic-inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices. *Acta Biomater.*, pp. 267-275.
- Dragicevic, J. P. A., 2015. Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. Στο: *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 11-27.
- El Magri, K. E. M. S. V. M. E. T., 2020. Experimental investigation and optimization of printing parameters of 3D printed polyphenylene sulfide through response surface methodology. *J Appl Polym Sci*, pp. 1-13.
- Elias, W., 2020. *What Are the Layers of Skin? Why are they important?*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://eliasandwilliams.com/layers-of-skin-why-important/>
- Elias, W., 2020. *What Are the Layers of Skin? Why are they important?*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://eliasandwilliams.com/layers-of-skin-why-important/>
- Evans, R. , H. , P., 1985. Percutaneous administration of theophylline in the preterm infant. *J Pediatr*, pp. 307-11.
- Farsari, 2017. 3D Printing via Multiphoton Polymerization. Στο: *Nanomaterials for 2D and 3D Printing*. s.l.:Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., pp. 83-105.
- Feng, L. Z. H. H. W. H. L. H. Z. L. L. Y. W. Z. L. L. L., 2017. Controlled release of optimized electroporation enhances the transdermal efficiency of sinomenine hydrochloride for treating arthritis in vitro and in clinic. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 1737-1752.
- Finnin, K. A. W. , a. T. J. F., 2012. In Vitro Skin Permeation Methodology. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Inc, pp. 85-108.

- Forbes, 1955. *Studies in Ancient Technology*. s.l.:EJ Brill:Leiden.
- Fore, 2006. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage*, pp. 24-35.
- G. Mannens, C. S. J. H. T. V. L. L. J. W. B. L. v. B. K. L. J. L. N. v. O. A. V. P. W. M., 2002. The metabolism and excretion of galantamine in rats, dogs, and humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, pp. 553-563.
- Galantamine, t., 2012. *Galantamine Tablets*. s.l.:The United States Pharmacopeial Convention.
- Gerstel, 1976. *Drug delivery device*. US Patent, Ευρεσιτεχνία Αρ. 3,964,482.
- Ghasemi, A. & Z. S., 2012. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, pp. 486-489..
- Giacomoni, M. , T., 2009. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci*, pp. 144-9.
- Gibson, D. R. , B. S., 2015. Sheet Lamination Processes. Στο: *Additive Manufacturing Technologies*. s.l.:Springer Science+Business, pp. 219-244.
- Gill, D. D. D. B. A. B. a. M. R., 2008. Effect of microneedle design on pain in human subjects. *Clin J Pain*, p. 585–594.
- Gill, M. P., 2007. Coating formulations for microneedles. *Pharm. Res.*, pp. 1369-1380.
- Gill, M. R. P., 2007. Coated microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release*, pp. 227-237.
- Giudice, J. C., 2008. Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv*, pp. 68-89.
- Grice, T. W. P. , M. A. K. , a. M. S. R., 2012. Electrical and Physical Methods of Skin Penetration Enhancement. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Inc., pp. 43-65.
- Gross, J. L. E. S. Y. L. C. C. a. D. M. S., 2014. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Anal. Chem*, p. 3240–3253.
- Guo, R. L. S. B., 2019. Recent advances on 3D printing graphene-based composites. *Nano Materials Science*, pp. 101-115.
- Habif, 2015. *Clinical Dermatology*. s.l.:Elsevier Inc..
- Hadgraft, 2004. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm*, pp. 291-9.

- Haj-Ahmad, H. K. , M. S. A. , M. R., 2015. Microneedle Coating Techniques for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, pp. 486-502.
- Handbook, N., 2020. *NIST Engineering statistics handbook*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>
- Haq, B. G. D. A. V. J. B. M.-K., 2018. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 432-437.
- Holmgaard, E. B. J. B. N. C. G. J. A. S. C. H. M. B. T. R. P. & F. S., 2012. Comparison of Open-Flow Microperfusion and Microdialysis Methodologies When Sampling Topically Applied Fentanyl and Benzoic Acid in Human Dermis Ex Vivo. *Pharmaceutical Research*, p. 1808–1820.
- Holmgaard, J. B. N. , a. E. B., 2012. Skin Permeation Assessment: Microdialysis. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, pp. 131-153.
- Hori, M. S. S. & M. H. I., 1990. Classification of penetration enhancers: a conceptual diagram. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 71-72.
- Hotchkiss, 1998. *Dermal metabolism*. s.l.:Marcel Dekker.
- Howes, R. G. J. H. J. H. U. H. F. K. H. M., 1996. Methods for assessing percutaneous absorption.. *Altern. Lab. Anim*, p. 81–106.
- Hristoski, O. K. Z. K. a. T. D., 2017. Causality of Factors Reducing Competitiveness of e-Commerce Firms. *Balkan and Near Eastern Journal of Social Sciences*, pp. 109-127.
- Hua, S., 2015. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, 6(219), pp. 1-5.
- Hull, 1986. *Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography*. US Patent, Ευρεσιτεχνία Αρ. 4,575,330.
- Ibrahim, S. M. O. G. J. S. C. T., 2005. The effects of different dressings on the skin temperature of the knee during cryotherapy.. *Knee*, pp. 21-3.
- Itin, J. G. A. T. N. J. B. E. a. H. R., 2016. *Skin Barrier Function. Current Problems in Dermatology*. 103-111 επιμ. s.l.:s.n.
- Jacobi, G. , S. , L., 2005. Gender-related differences in the physiology of the stratum corneum.. *J Dermatology*, pp. 312-7.
- Janssen Pharmaceuticals, I., 2013. *Razadyne*. s.l.
- Janssen, R. F., 2000. *Reminyl-Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review*. s.l.

- Ji, F. T. J. M. C. I., 2006. Microfabricated silicon microneedle array for transdermal drug delivery. *International Mems Conference*, pp. 1127-1131.
- Johnstone, 1948. *Occupational Medicine and Industrial*. s.l.:CV Mosby.
- Jones S.P., G. M. a. O. N., 1989. The influence of receptor fluid on in vitro percutaneous penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 43-46.
- Juran, G., 1999. *Juran's Quality Handbook*. s.l.:The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kalaria, S. D. , a. Y. N. K., 2012. Clinical Applications of Transdermal Iontophoresis. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Inc, pp. 67-83.
- Karki, H. K. , S.-J. N. , , 2016. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *asian journal of pharmaceutical s c i e n c e s* 11, p. 559–574.
- Kearney, E. C.-S. , S. J. F. , H. O. M. , R. F. D., 2016. Microneedle-mediated delivery of donepezil: Potential for improved treatment options in Alzheimer's disease. *Eur J Pharm Biopharm*, pp. 43-50.
- Keng Wooi Ng, a. W. M. L., 2015. Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. Στο: *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer Berlin Heidelberg New York Dordrecht London, pp. 3-11.
- Kermode, 2004. Unsafe injections in low-income country health settings: need for injection safety promotion to prevent the spread of blood-borne viruses. *Health Promot. Int.*, pp. 95-103.
- Khatavkar, S. K. D., 2013. Development and in vivo evaluation of novel monolithic controlled release compositions of galantamine hydrobromide as against reservoir technology. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(5), p. 1148–1158.
- Kim, J.-H. P. a. M. R. P., 2012. Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, p. 1547–1568.
- Kolarsick, B. M. A. K. M. A.-C., 2011. Anatomy and Physiology of the Skin . Στο: *Skin Cancer*. s.l.:s.n., pp. 1-11.
- Kramer, S., 1963. *The Sumerians: Their History, Culture, and*. s.l.:The University of Chicago Press: Chicago and London.
- Kudo, 2016. Basic Theory of Pharmacology for Alzheimer's Disease. *Practical Pharmacology for Alzheimer's Disease*, pp. 1-25.

- Lambert, W. J. K. R. J. H. J. M. & C. J. T., 1993. biodegradable transdermal penetration enhancer based on N-(2-hydroxyethyl)-2-pyrrolidone I. Synthesis and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 181-192..
- Lane, S. , A. C. W. , a. J. H., 2012. Passive Skin Permeation Enhancement. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Inc, pp. 23-42.
- Larrañeta, J. M. , E. M. V.-P. , P. G.-V. , R. L. , A. D. W. , R. F. D., 2014. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. *Int J Pharm*, pp. 65-73.
- LaWall, 1927. *Four Thousand Years of Pharmacy: an Outline*. s.l.:JB Lippincott Co.
- Lee, H. C. L. D.-S. L. a. H. J., 2010. Drawing Lithography: Three-Dimensional Fabrication of an Ultrahigh-Aspect-Ratio Microneedle. *Advanced Materials* , pp. 483-6.
- Lee, J.-S. H. M.-T. T. a. K.-C. L., 2015. Fabrication of a novel partially dissolving polymer microneedle patch for transdermal drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, p. 276–285.
- Lee, J.-H. P. a. M. R. P., 2009. Dissolving Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Biomaterials*, p. 2113–2124..
- Lee, R. K. D.-Y. Y. S. P., 2008. Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization. *Prog. Polym. Sci.*, pp. 631-681.
- Leonard, A. P. S. C. M. C. A. F., 2005. Development of a Novel High-Concentration Galantamine Formulation Suitable for Intranasal Delivery. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, pp. 1736-1746.
- Leone, M. K., 2017. Dissolving Microneedle Patches for Dermal Vaccination. *Pharm Res*, p. 2223–2240.
- Leopold, M., 1996. Effect of lipophilic vehicles on in vivo skin penetration of methyl nicotinate in different races. *Int J Pharm*, p. 161–7.
- Lilienfeld, S., 2002. Galantamine—a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer’s Disease. *CNS Drug Reviews*, pp. 159-176.
- Liu, H. , G. , G., 1994. Transport of beta-estradiol in freshly excised human skin in vitro: diffusion and metabolism in each skin layer. *Pharm Res*, pp. 1777-84.
- Lu CP, P. L. K. B. F. E., 2016. Spatiotemporal antagonism in mesenchymal-epithelial signaling in sweat versus hair fate decision. *Science*, December.

- Lutton, J. M. E. L. S. L. A. D. W. R., 2016. Microneedle characterisation: The need for universal acceptance criteria and GMP specifications when moving towards commercialisation. *Drug Delivery and Translational Research*, pp. 1-44.
- Luzuriaga, a. D. R. B. J. C. R. R. A. S. a. J. J., 2018. Biodegradable 3D Printed Polymer Microneedles for Transdermal Drug Delivery. *Lab on a Chip*, pp. 1-8.
- Madou, 2011. *Fundamentals of Microfabrication and Nanotechnology*. s.l.:CRC Press.
- Malkinson, R., 1963. Percutaneous absorption. Στο: *Jadassohn J (ed.). Handbuch der Haut und Geschlecht Skrauberten*,. s.l.:Springer, pp. 90-156.
- Maurya, C. L. a. S. N. M., 2015. Magnetophoresis and Electret-Mediated Transdermal Delivery of Drugs. Στο: *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd, pp. 147-162.
- McCabe, 1998. *Quality Improvement Techniques in Construction*. s.l.:Longman.
- Medgadget, 2020. *Soluvia Influenza Vaccine: Bright Future via Microinjection*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at:  
[https://www.medgadget.com/2008/02/microinjection\\_for\\_flu\\_vaccination.html](https://www.medgadget.com/2008/02/microinjection_for_flu_vaccination.html)  
[Πρόσβαση 2020].
- Montgomery, 2013. *Design and analysis of experiments*. s.l.:John Wiley Sons, Inc.
- Moore, L. , B., 1938. Cutaneous absorption of sex. *JAMA*, p. 11–14.
- Morris, S. a. A. P., 2011. Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. *Int J Pharm Investig*, p. 4–9..
- Moss, D. , W., 2015. Skin Structure and Physiology. Στο: 1-24, επιμ. *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*. s.l.:Springer-Verlag Berlin.
- Nanaki, K. S. , C. B. , P., 2020. Hierarchical Porous Carbon—PLLA and PLGA Hybrid Nanoparticles for Intranasal Delivery of Galantamine for Alzheimer’s Disease Therapy. *Pharmaceutics*, pp. 1-22.
- Ng, J. R. D. S. a. G. E., 2010. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*, p. 209–223..
- Ngo, A. K. G. I. K. T. N. D. H., 2018. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B*, pp. 172-196.

- Nicoli, W. a. S., 2012. Skin Permeation Assessment: Tape Stripping. Στο: *Transdermal and Topical Drug Delivery*. s.l.: John Wiley & Sons, Inc., pp. 109-130.
- Nir, A. P. E. S. I. P., 2003. Fear of injections in young adults: prevalence and associations. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, pp. 341-344.
- Norman, R. ., C. ., M. A., 2017. A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 39-50.
- Oberli, C. M. S. R. L. a. D. B., 2014. Ultrasound-enhanced transdermal delivery: recent advances and future challenges. *Ther Deliv*, 5(7), p. 843–857.
- OECD, 2004. *Guidance Document for the Conduct of SKin Absorption Studies*,. s.l.: OECD Environment Directorate, Environment, Health and Safety Division.
- Ogden, 2020. *galanthus elwesii greater snowdrop*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://www.gardenia.net/plant/galanthus-elwesii-greater-snowdrop>
- Ostrega, S. ., P., 1971. Significance of vehicle composition I: relationship between topical vehicle composition, skin penetrability and clinical efficacy. *J Pharm Sci*, p. 1175–1179.
- Otberg N, P. A. R. U. H. T. L. M. S. R. S. W. L. J., 2008. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *Br J Clin Pharmacol*, Apr, 65(4), p. 488–492.
- Otton, N. S. B. T. H. G. G. T. A. F. N. P., 2017. 3D printing from cardiovascular CT: a practical guide and review. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, pp. 507-526.
- Park, H. P. ., J. S. ., S. L., 2014. Sonophoresis in transdermal drug deliveries. *Ultrasonics*, Τόμος 54, p. 56–65.
- Park, S. R. S. K. C. S., 2010. Current technologies in single-cell microinjection and application to study signal transduction. *Methods in Redox Signaling*, pp. 71-77.
- Pastore, Y. N. K. M. H. a. M. S. R., 2015. Transdermal patches:history, development and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, p. 2179–2209.
- Patil, M., 1994. Effect of age and sex on the elicitation of irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, pp. 257-64.
- PermeGear, 2020. *PermeGear*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://permegear.com/in-line-cells/>
- PermeGear, 2020. *PermeGear*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://permegear.com/side-bi-side-cells/>
- PermeGear, 2020. *PermeGear*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <https://permegear.com/franz-cells/>  
[Πρόσβαση 2020].

- Pfister, W. R. a. H. D. S. T., 1990. Permeation enhancers compatible with transdermal drug delivery systems. *Pharm. Technol.*, p. 132–140.
- Politis, P. C. G. C. & D. M. R., 2017. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, p. 889–901.
- Reinertson, W., 1959. Studies on the chemical composition of human epidermal lipids. *J Invest Dermatol.*, pp. 49-59.
- Riegelman, 1974. Pharmacokinetic factors affecting epidermal penetration and percutaneous adsorption. *Clin Pharmacol Ther*, p. 873–883.
- Roberts, 2013. Solute-vehicle-skin interactions in percutaneous. *Skin Pharmacol Physiol*, p. 356–370.
- Roberts, C. , P., 2002. *Skin Transport*. s.l.:Markel Dekker.
- Roberts, W., 2008. Human Skin Morphology and Dermal Absorption. Στο: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. s.l.:Informa Healthcare USA, Inc..
- Ronnander, L. S. H. S. A. K. S. S., 2018. Dissolving polyvinylpyrrolidone-based microneedle systems for in-vitro delivery of sumatriptan succinate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 84-92.
- Roskos, M. , G., 1989. The effect of aging on percutaneous absorption in man.. *J Pharmacokinet Biopharm.*, pp. 617-30.
- Sabria, Y. K. M. D. J. S. A. K. L. K. J. B., 2020. Intradermal and transdermal drug delivery using microneedles – Fabrication, performance evaluation and application to lymphatic delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* , pp. 195-215.
- Saurer, R. F. S. S. M. P. D. L., 2010. Layer-by-layer assembly of DNA- and protein-containing films on microneedles for drug delivery to the skin. *Biomacromolecules*, pp. 3136-3143.
- Schaefer, S. H. M. S. J. L., 2008. Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. Στο: *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. s.l.:American Association of Pharmaceutical Scientists, pp. 3-33.
- Schwenkenbecker, 1904. Das absorptions verniogen der haut. *Arch Anat Physiol*, p. 121–165..
- Shahrubudin, T. L. R. R., 2019. An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, Printing Technology:. *Procedia Manufacturing*, p. 1286–1296.

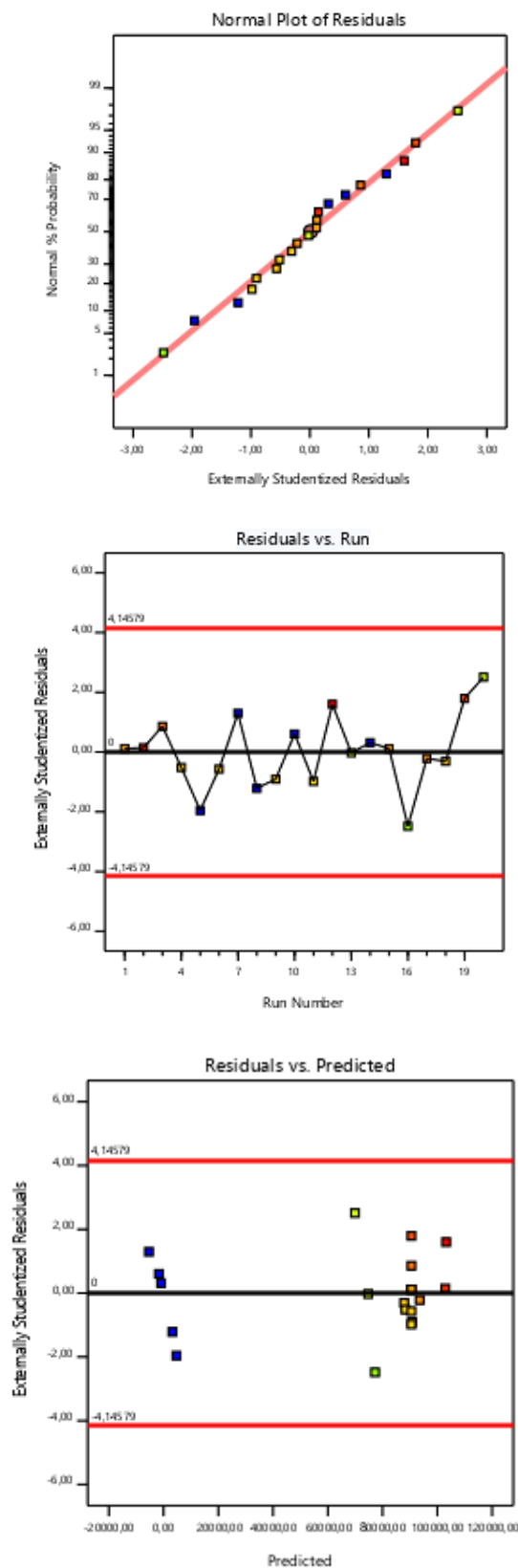
- Sigmaaldrich, 2020. *Strat-M Membrane -SigmaAldrich*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/1/content/commerce/pdfs/industries/cosmetics-and-personal-care/strat-m-membrane-MK\\_BR2545EN.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/1/content/commerce/pdfs/industries/cosmetics-and-personal-care/strat-m-membrane-MK_BR2545EN.pdf)
- Singh, S. S. J. L., 2008. Past, present, and future technologies for oral delivery of therapeutic proteins. *J. Pharm. Sci.*, pp. 2497-2523.
- Sing, J. A. W. Y. Y. F. E. W., 2016. Laser and Electron-Beam Powder-Bed Additive Manufacturing of Metallic Implants: A Review on Processes, Materials and Designs. *JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH*, pp. 369-385.
- Sintova, I. K. D. D. T. H. Z. S., 2003. R adiofrequency-driven skin microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, p. 311–320.
- SPIE-Professional, 2020. *Chuck Hull: Pioneer in Stereolithography*. [Ηλεκτρονικό]  
Available at: <http://spie.org/x91418.xml>
- Stokes, D. E. M. E., 1997. *Liquid Coating Processes*. s.l.:Wiley-VCH.
- Stoughton, 1969. *Pharmacology of the skin*. s.l.:Appleton Century Crofts.
- Sugibayashi, K., 2017. Skin Permeation of Chemicals. Στο: *Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds*. s.l.:Springer Japan, pp. 13-53.
- Teo, C. S. K. C. N. J. L. S. M., 2005. In vitro and in vivo characterization of MEMS microneedles. *Biomed Microdevices*, pp. 47-52.
- Tian, J. J. S. Y. C. K. C. S. B. T. a. K. Z., 2017. Emerging 3D-Printed Electrochemical Energy Storage Devices: A Critical Review. *Adv. Energy Mater*, pp. 1-17.
- Tumbleston, D. S. N. E. R., 2015. Continuous liquid interface production of 3D objects. *Scienceexpress*, pp. 1-7.
- Vaibhav Rastogi, P. Y., 2012. Transdermal drug delivery system: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*, July-September, Volume 3(Issue 3), pp. 161-170.
- Wang, L. H. a. C. X., 2017. Recent advances in the design of polymeric microneedles for transdermal drug delivery and biosensing. *Lab on a Chip*, pp. 1-31.
- Washington, W. . W., 2001. *Physiological pharmaceutics: Barriers to drug absorption*. s.l.:Taylor and Francis Group .
- Weigand, H. G., 1974. Cell layers and density of Negro and Caucasian stratum corneum. *J Invest Dermatol.*, pp. 563-8.

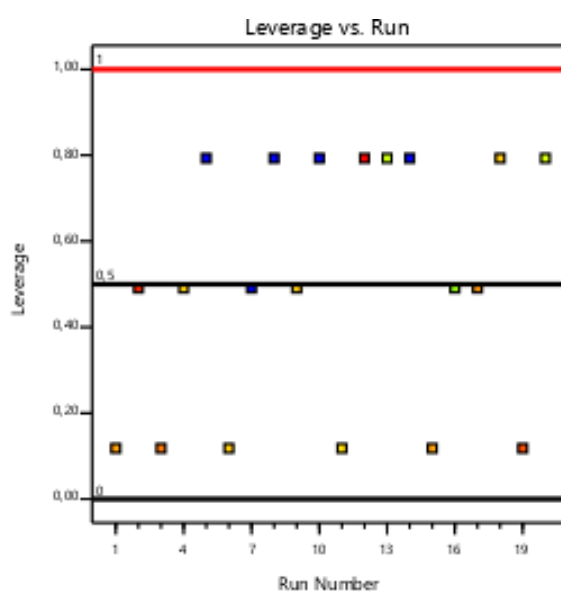
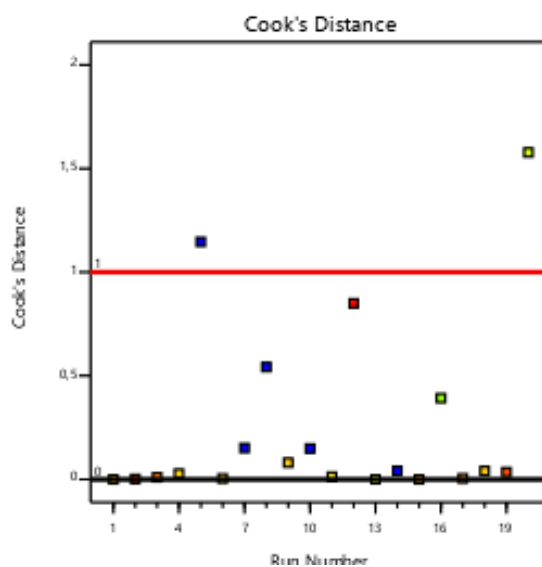
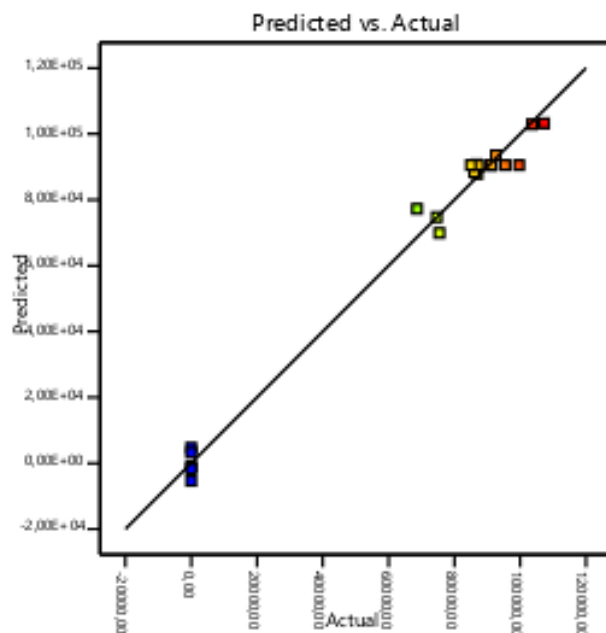
- Wei-Ze, H. M.-R. Z. J.-P. Z. Y.-Q. H. B.-H. L. T. Z. Y., 2012. Super-short solid silicon microneedles for transdermal drug delivery applications. *Int. J. Pharm*, pp. 122-129.
- Weller, H. M., 2015. *Clinical Dermatology*. s.l.:JohnWiley & Sons Ltd..
- Wester, M., 1989. *Regional variations in percutaneous absorption*. 111-120 επιμ. s.l.: Marcel Dekker.
- White, 1909. Poisoning from aniline black on shoes. *Lancet*, p. 349.
- Williams A.C., C. P. a. B. B., 1992. On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities.. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 69-77.
- Williams, 2003. *Transdermal and Topical Drug Delivery*. London: Pharmaceutical Press.
- Williams, 2003. *Transdermal and topical drug delivery: From theory to clinical practice*. s.l.:Pharmaceutical Press.
- Wong, 2014. Electrical, magnetic, photomechanical and cavitational waves to overcome skin barrier for transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, pp. 257-269.
- Woo, B. M. A., 2015. Formulation optimization of galantamine hydrobromide loaded gel drug reservoirs in transdermal patch for Alzheimer's disease. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 3879-3886.
- Wurster, K., 1961. Investigation of some factors influencing percutaneous absorption. *J Pharm Sc*, p. 288-293..
- Wu, S.-h. H., 2015. Review: Polymeric-Based 3D Printing for Tissue Engineering. *J. Med. Biol. Eng*, p. 285-292.
- Yan, K. W. J. Z. S. S. B. G., 2010. Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, pp. pp. 7-12.
- Zaffaroni, 1971. *Bandage for administering drugs*. US Patent, Ευρεσιτεχνία Αρ. 3,598,122.
- Zorec, P. M. P., 2013. Active enhancement methods for intra- and transdermal drug delivery: a review. *Zdrav Vestn*, pp. 339-356.
- Κατσάνος, 1993. *Φυσικοχημεία: Βασική θεώρηση*. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήσης.

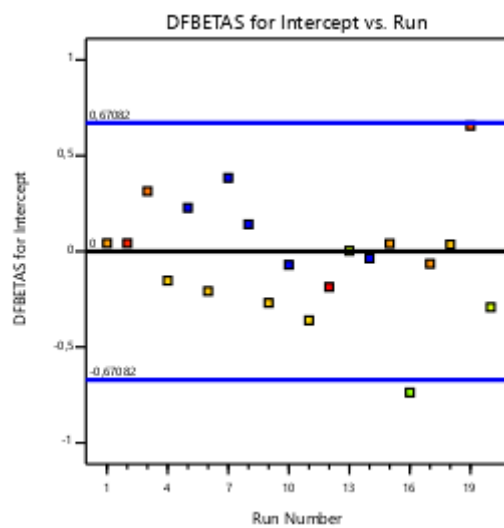
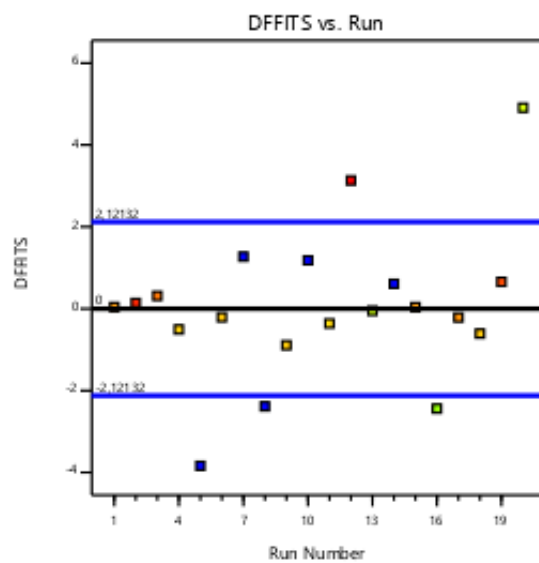


## Παράρτημα Ι

Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού για την ανάλυση της επιφάνειας βάσης





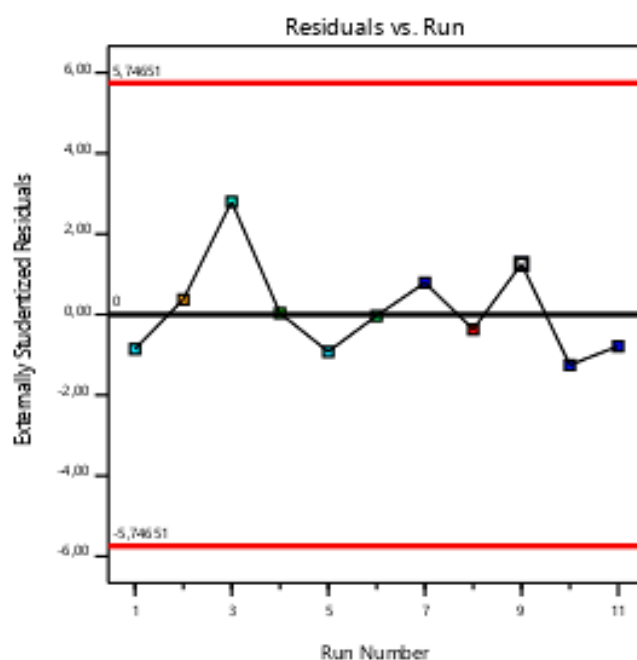
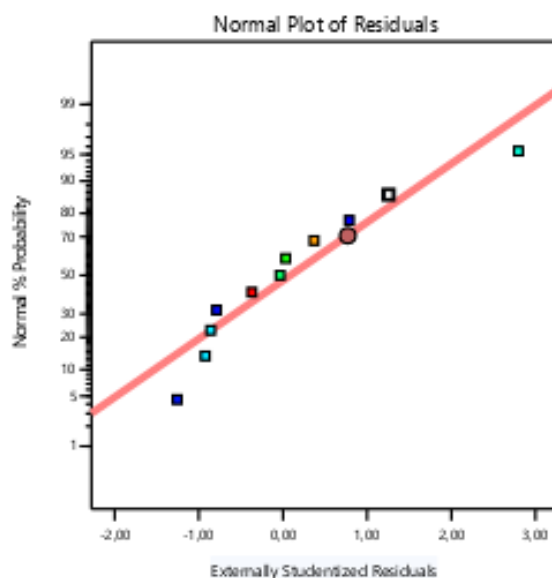


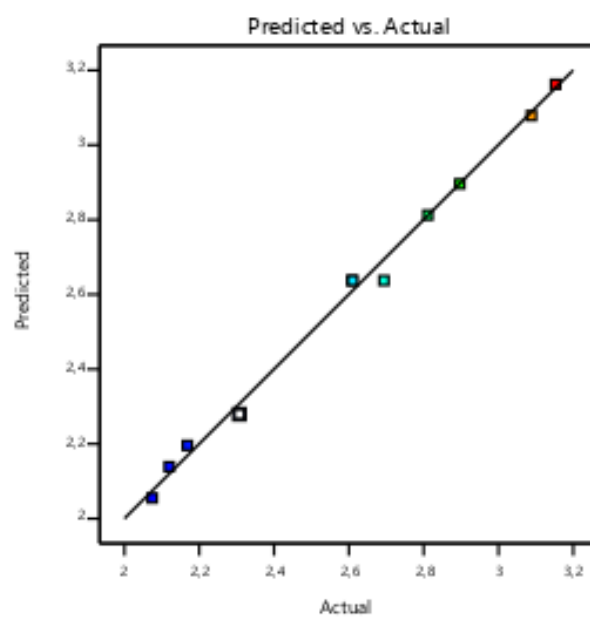
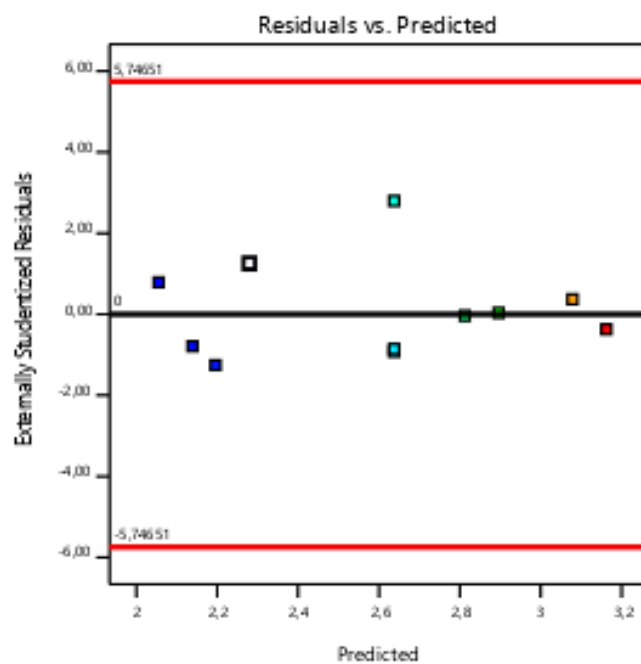
## Report

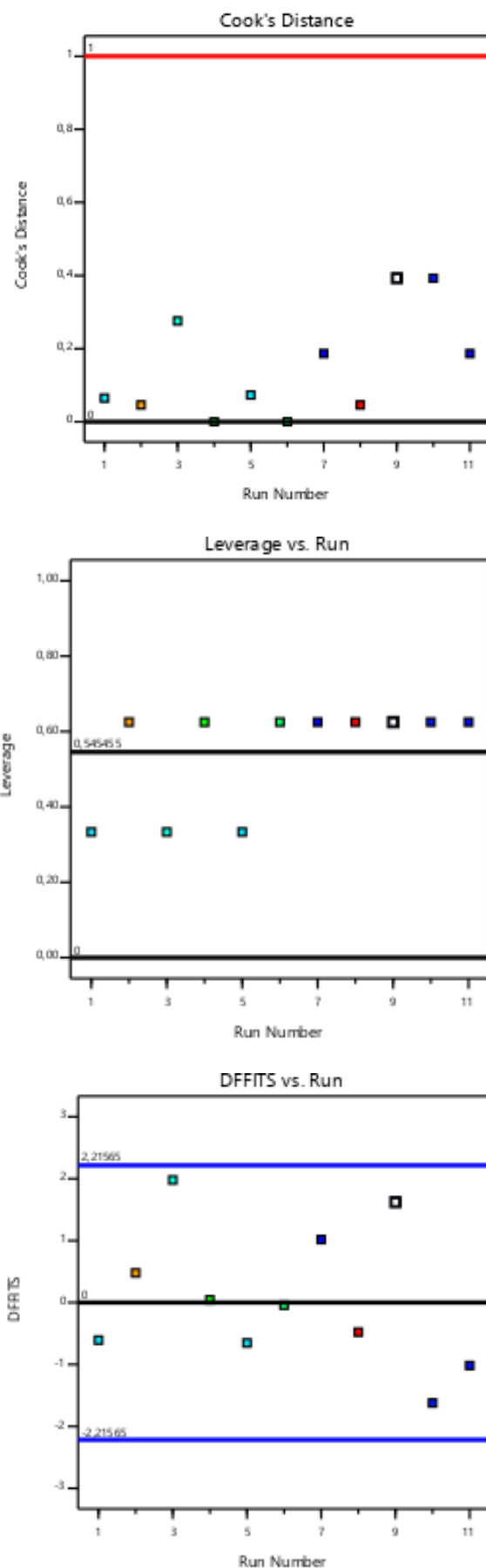
|  | Run<br>Order | Actual<br>Value | Predicted<br>Value | Residual | Leverage | Internally<br>Studentized<br>Residuals | Externally<br>Studentized<br>Residuals | Cook's<br>Distance   | Influence on<br>Fitted Value<br>DFFITS | Standard<br>Order |
|--|--------------|-----------------|--------------------|----------|----------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|----------------------------------------|-------------------|
|  | 1            | 91232,50        | 90544,75           | 687,75   | 0,118    | 0,122                                  | 0,116                                  | 0,000                | 0,043                                  | 18                |
|  | 2            | 1,036E+05       | 1,029E+05          | 647,92   | 0,491    | 0,152                                  | 0,144                                  | 0,002                | 0,142                                  | 11                |
|  | 3            | 95428,69        | 90544,75           | 4883,94  | 0,118    | 0,870                                  | 0,858                                  | 0,010                | 0,314                                  | 20                |
|  | 4            | 86062,89        | 88348,74           | -2285,86 | 0,491    | -0,536                                 | -0,516                                 | 0,028                | -0,506                                 | 10                |
|  | 5            | 1,0000          | 4701,92            | -4700,92 | 0,793    | -1,729                                 | -1,959                                 | 1,146 <sup>(*)</sup> | -3,836 <sup>(*)</sup>                  | 1                 |
|  | 6            | 87242,73        | 90544,75           | -3302,01 | 0,118    | -0,588                                 | -0,568                                 | 0,005                | -0,208                                 | 16                |
|  | 7            | 1,0000          | -5348,15           | 5349,15  | 0,491    | 1,254                                  | 1,296                                  | 0,152                | 1,272                                  | 13                |
|  | 8            | 1,0000          | 3235,03            | -3234,03 | 0,793    | -1,189                                 | -1,218                                 | 0,543                | -2,385 <sup>(*)</sup>                  | 4                 |
|  | 9            | 86831,66        | 90735,13           | -3903,47 | 0,491    | -0,915                                 | -0,907                                 | 0,081                | -0,890                                 | 12                |
|  | 10           | 1,0000          | -1696,30           | 1697,30  | 0,793    | 0,624                                  | 0,604                                  | 0,149                | 1,183                                  | 3                 |
|  | 11           | 85018,29        | 90544,75           | -5526,46 | 0,118    | -0,984                                 | -0,983                                 | 0,013                | -0,360                                 | 17                |
|  | 12           | 1,073E+05       | 1,032E+05          | 4047,92  | 0,793    | 1,489                                  | 1,601                                  | 0,850                | 3,135 <sup>(*)</sup>                   | 5                 |
|  | 13           | 74661,27        | 74735,88           | -74,60   | 0,793    | -0,027                                 | -0,026                                 | 0,000                | -0,051                                 | 7                 |
|  | 14           | 1,0000          | -887,49            | 888,49   | 0,793    | 0,327                                  | 0,312                                  | 0,041                | 0,610                                  | 2                 |
|  | 15           | 91202,24        | 90544,75           | 657,50   | 0,118    | 0,117                                  | 0,111                                  | 0,000                | 0,041                                  | 15                |
|  | 16           | 68649,93        | 77254,64           | -8604,70 | 0,491    | -2,017                                 | -2,484                                 | 0,392                | -2,440 <sup>(*)</sup>                  | 14                |
|  | 17           | 92581,40        | 93551,10           | -969,70  | 0,491    | -0,227                                 | -0,216                                 | 0,005                | -0,212                                 | 9                 |
|  | 18           | 87002,49        | 87885,91           | -883,41  | 0,793    | -0,325                                 | -0,310                                 | 0,040                | -0,607                                 | 6                 |
|  | 19           | 99655,14        | 90544,75           | 9110,39  | 0,118    | 1,623                                  | 1,793                                  | 0,035                | 0,657                                  | 19                |
|  | 20           | 75435,38        | 69920,57           | 5514,80  | 0,793    | 2,028                                  | 2,508                                  | 1,578 <sup>(*)</sup> | 4,911 <sup>(*)</sup>                   | 8                 |

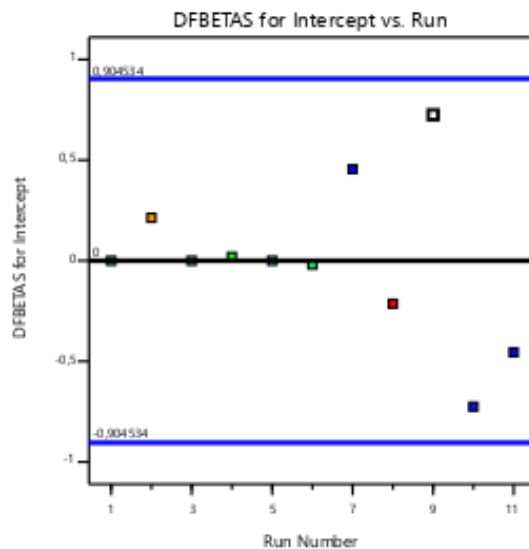
## Παράρτημα II

Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού για την ανάλυση της αθροιστικής ποσότητας της υδροβρωμικής γκαλανταμίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη, Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), στις 24h







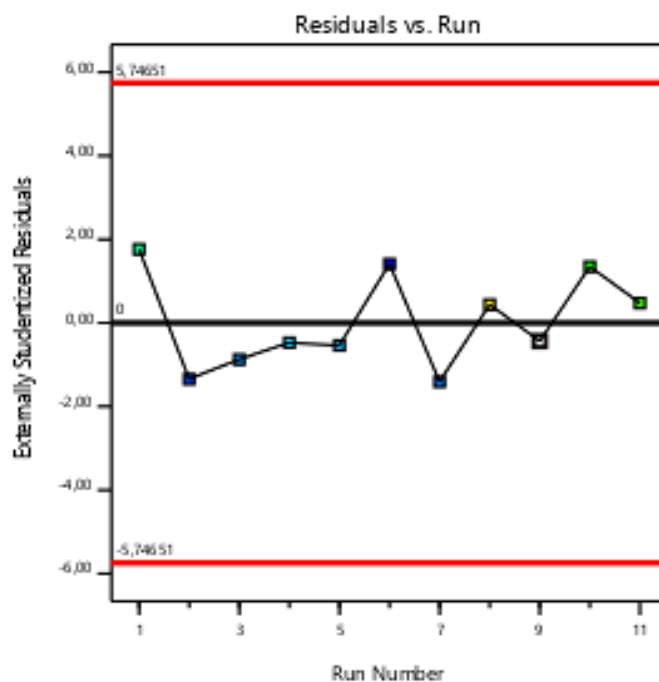
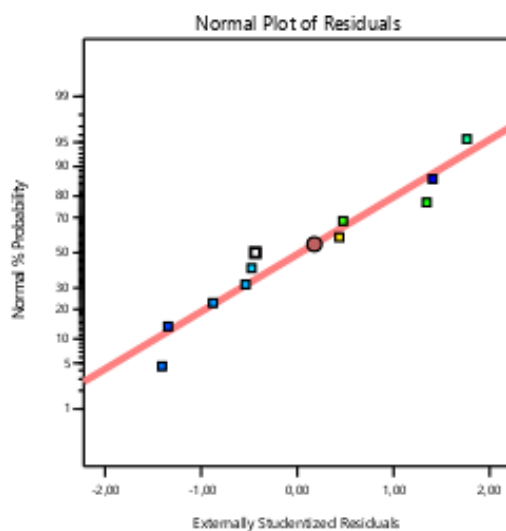


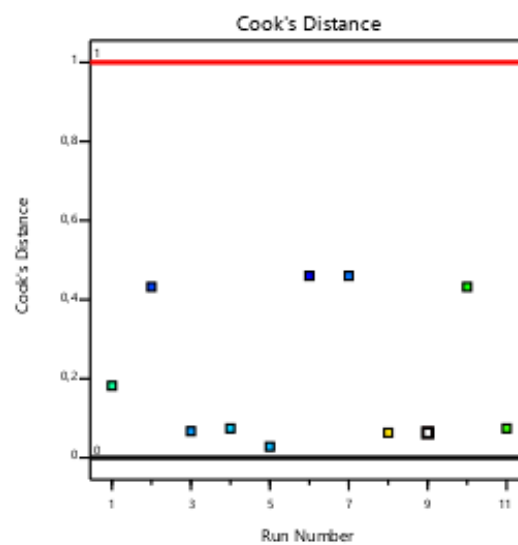
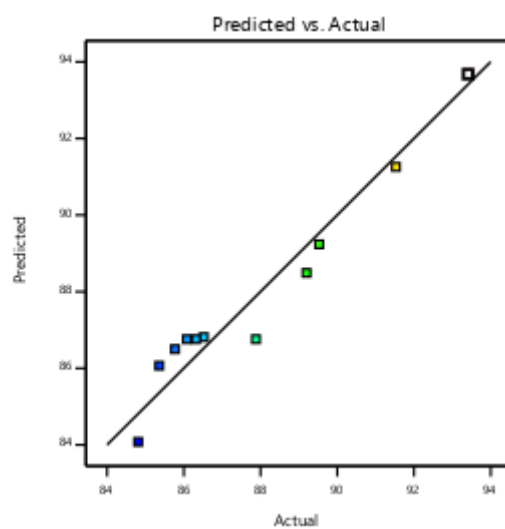
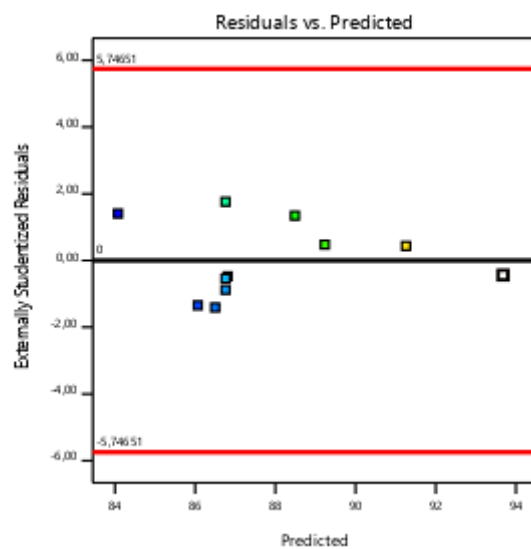
## Report

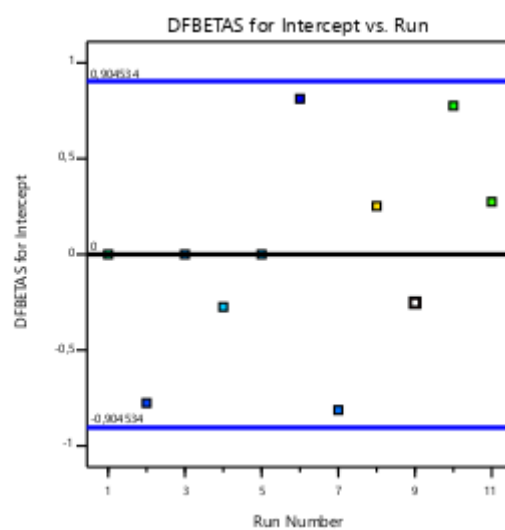
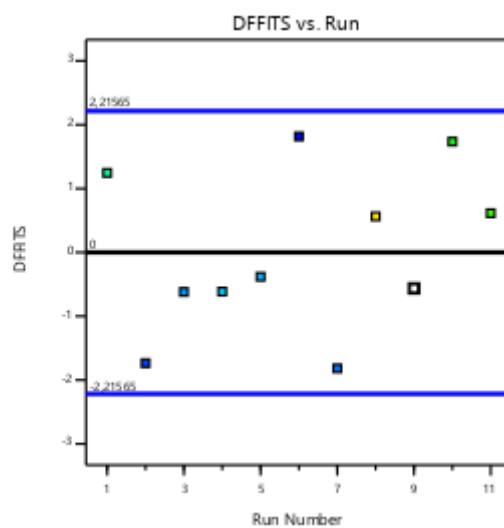
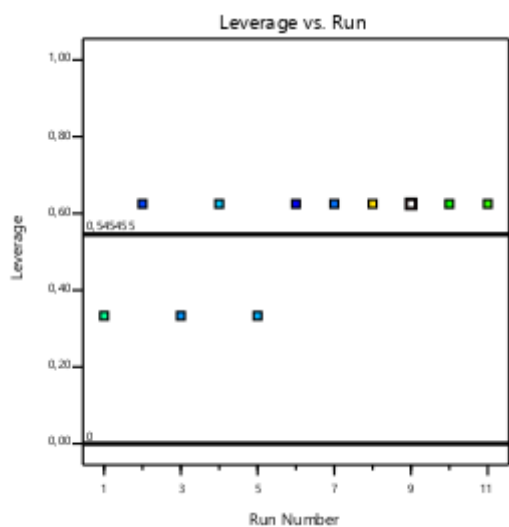
| Run Order | Actual Value | Predicted Value <sup>(1)</sup> | Residual | Leverage | Internally Studentized Residuals | Externally Studentized Residuals | Cook's Distance | Influence on Fitted Value DFFITS | Standard Order |
|-----------|--------------|--------------------------------|----------|----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------|
| 1         | 2,61         | 2,64                           | -0,0274  | 0,333    | -0,882                           | -0,858                           | 0,065           | -0,607                           | 11             |
| 2         | 3,09         | 3,08                           | 0,0095   | 0,625    | 0,407                            | 0,370                            | 0,046           | 0,478                            | 7              |
| 3         | 2,69         | 2,64                           | 0,0565   | 0,333    | 1,819                            | 2,798                            | 0,276           | 1,978                            | 10             |
| 4         | 2,90         | 2,90                           | 0,0009   | 0,625    | 0,037                            | 0,033                            | 0,000           | 0,043                            | 6              |
| 5         | 2,61         | 2,64                           | -0,0291  | 0,333    | -0,937                           | -0,923                           | 0,073           | -0,653                           | 9              |
| 6         | 2,81         | 2,81                           | -0,0009  | 0,625    | -0,037                           | -0,033                           | 0,000           | -0,043                           | 8              |
| 7         | 2,07         | 2,06                           | 0,0191   | 0,625    | 0,820                            | 0,788                            | 0,187           | 1,017                            | 4              |
| 8         | 3,15         | 3,16                           | -0,0095  | 0,625    | -0,407                           | -0,370                           | 0,046           | -0,478                           | 5              |
| 9         | 2,31         | 2,28                           | 0,0277   | 0,625    | 1,189                            | 1,256                            | 0,393           | 1,622                            | 1              |
| 10        | 2,17         | 2,20                           | -0,0277  | 0,625    | -1,189                           | -1,256                           | 0,393           | -1,622                           | 3              |
| 11        | 2,12         | 2,14                           | -0,0191  | 0,625    | -0,820                           | -0,788                           | 0,187           | -1,017                           | 2              |

## Παράρτημα III

Αποτελέσματα Πειραματικού Σχεδιασμού για την ανάλυση της απώλειας ύδατος  
κατά τη ξήρανση







## Report

|  | Run<br>Order | Actual<br>Value | Predicted<br>Value <sup>(1)</sup> | Residual | Leverage | Internally<br>Studentized<br>Residuals | Externally<br>Studentized<br>Residuals | Cook's<br>Distance | Influence on<br>Fitted Value<br>DFFITS | Standard<br>Order |
|--|--------------|-----------------|-----------------------------------|----------|----------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|-------------------|
|  | 1            | 87,88           | 86,76                             | 1,12     | 0,333    | 1,478                                  | 1,763                                  | 0,182              | 1,246                                  | 11                |
|  | 2            | 85,36           | 86,07                             | -0,7088  | 0,625    | -1,247                                 | -1,344                                 | 0,432              | -1,736                                 | 7                 |
|  | 3            | 86,08           | 86,76                             | -0,6800  | 0,333    | -0,898                                 | -0,877                                 | 0,067              | -0,620                                 | 10                |
|  | 4            | 86,52           | 86,81                             | -0,2938  | 0,625    | -0,517                                 | -0,475                                 | 0,074              | -0,614                                 | 6                 |
|  | 5            | 86,32           | 86,76                             | -0,4400  | 0,333    | -0,581                                 | -0,538                                 | 0,028              | -0,380                                 | 9                 |
|  | 6            | 84,81           | 84,08                             | 0,7313   | 0,625    | 1,287                                  | 1,408                                  | 0,460              | 1,817                                  | 8                 |
|  | 7            | 85,77           | 86,50                             | -0,7312  | 0,625    | -1,287                                 | -1,408                                 | 0,460              | -1,817                                 | 4                 |
|  | 8            | 91,53           | 91,26                             | 0,2712   | 0,625    | 0,477                                  | 0,437                                  | 0,063              | 0,564                                  | 5                 |
|  | 9            | 93,41           | 93,68                             | -0,2712  | 0,625    | -0,477                                 | -0,437                                 | 0,063              | -0,564                                 | 1                 |
|  | 10           | 89,20           | 88,49                             | 0,7088   | 0,625    | 1,247                                  | 1,344                                  | 0,432              | 1,736                                  | 3                 |
|  | 11           | 89,53           | 89,24                             | 0,2938   | 0,625    | 0,517                                  | 0,475                                  | 0,074              | 0,614                                  | 2                 |

## Παράρτημα IV

### Αποτελέσματα Στατιστικής Ανάλυσης

#### Strat-M®

**Πίνακας 24:** Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 5-0-3

| Tests of Normality |       |                                 |    |      |              |       |
|--------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|-------|
| Formulation        |       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |       |
|                    |       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 5-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 5-0-3 | ,376                            | 3  | .    | ,773         | ,052  |
| Cumulative_4h      | 5-0-3 | ,200                            | 3  | .    | ,995         | ,863  |
| Cumulative_6h      | 5-0-3 | ,181                            | 3  | .    | ,999         | ,941  |
| Cumulative_12h     | 5-0-3 | ,183                            | 3  | .    | ,999         | ,932  |
| Cumulative_24h     | 5-0-3 | ,194                            | 3  | .    | ,997         | ,888  |

**Πίνακας 25:** Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 5-5-3

| Tests of Normality |       |                                 |    |      |              |       |
|--------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|-------|
| Formulation        |       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |       |
|                    |       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_4h      | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | ,996  |
| Cumulative_6h      | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | ,999  |
| Cumulative_12h     | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_24h     | 5-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |

**Πίνακας 26:** Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 10-0-3

| Tests of Normality |        |                                 |    |      |              |       |
|--------------------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|-------|
| Formulation        |        | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |       |
|                    |        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | ,999  |
| Cumulative_4h      | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | ,998  |
| Cumulative_12h     | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |
| Cumulative_24h     | 10-0-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 1,000 |

**Πίνακας 27:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 10-5-3

| Tests of Normality |        |                                 |    |      |              |    |       |
|--------------------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation        |        | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                    |        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 10-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 10-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_4h      | 10-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 10-5-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,999  |
| Cumulative_12h     | 10-5-3 | ,382                            | 3  | .    | ,758         | 3  | ,017  |
| Cumulative_24h     | 10-5-3 | ,241                            | 3  | .    | ,974         | 3  | ,688  |

**Πίνακας 28:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 7,5-2,5-2(1)

| Tests of Normality |             |                                 |    |      |              |    |       |
|--------------------|-------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation        |             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                    |             | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_4h      | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,999  |
| Cumulative_12h     | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_24h     | 7,5-2,5-2-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |

**Πίνακας 29:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 7,5-2,5-2(2)

| Tests of Normality |             |                                 |    |      |              |    |      |
|--------------------|-------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Formulation        |             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                    |             | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| Cumulative_1h      | 7,5-2,5-2-2 | ,279                            | 3  | .    | ,939         | 3  | ,525 |
| Cumulative_2h      | 7,5-2,5-2-2 | ,295                            | 3  | .    | ,920         | 3  | ,451 |
| Cumulative_4h      | 7,5-2,5-2-2 | ,291                            | 3  | .    | ,925         | 3  | ,469 |
| Cumulative_6h      | 7,5-2,5-2-2 | ,285                            | 3  | .    | ,931         | 3  | ,494 |
| Cumulative_12h     | 7,5-2,5-2-2 | ,197                            | 3  | .    | ,996         | 3  | ,873 |
| Cumulative_24h     | 7,5-2,5-2-2 | ,207                            | 3  | .    | ,992         | 3  | ,833 |

**Πίνακας 30:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 7,5-2,5-2(3)

| Tests of Normality |             |                                 |    |      |              |    |      |
|--------------------|-------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Formulation        |             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                    |             | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| Cumulative_1h      | 7,5-2,5-2-3 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,998 |
| Cumulative_2h      | 7,5-2,5-2-3 | ,182                            | 3  | .    | ,999         | 3  | ,938 |
| Cumulative_4h      | 7,5-2,5-2-3 | ,292                            | 3  | .    | ,924         | 3  | ,466 |
| Cumulative_6h      | 7,5-2,5-2-3 | ,353                            | 3  | .    | ,823         | 3  | ,171 |
| Cumulative_12h     | 7,5-2,5-2-3 | ,351                            | 3  | .    | ,828         | 3  | ,183 |
| Cumulative_24h     | 7,5-2,5-2-3 | ,281                            | 3  | .    | ,937         | 3  | ,515 |

**Πίνακας 31:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 5-0-1

| Tests of Normality |       |                                 |    |      |              |    |       |
|--------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation        |       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                    |       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,998  |
| Cumulative_2h      | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,999  |
| Cumulative_4h      | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_12h     | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_24h     | 5-0-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |

**Πίνακας 32:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 5-5-1

| Tests of Normality |       |                                 |    |      |              |    |       |
|--------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation        |       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                    |       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_4h      | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_12h     | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_24h     | 5-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |

**Πίνακας 33:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 10-0-1

| Tests of Normality |        |                                 |    |      |              |    |      |
|--------------------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| Formulation        |        | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                    |        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| Cumulative_1h      | 10-0-1 | ,241                            | 3  | .    | ,973         | 3  | ,687 |
| Cumulative_2h      | 10-0-1 | ,277                            | 3  | .    | ,942         | 3  | ,534 |
| Cumulative_4h      | 10-0-1 | ,294                            | 3  | .    | ,921         | 3  | ,457 |
| Cumulative_6h      | 10-0-1 | ,338                            | 3  | .    | ,852         | 3  | ,247 |
| Cumulative_12h     | 10-0-1 | ,325                            | 3  | .    | ,875         | 3  | ,311 |
| Cumulative_24h     | 10-0-1 | ,260                            | 3  | .    | ,958         | 3  | ,608 |

**Πίνακας 34:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων 10-5-1

| Tests of Normality |        |                                 |    |      |              |    |       |
|--------------------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation        |        | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                    |        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h      | 10-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_2h      | 10-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,990  |
| Cumulative_4h      | 10-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_6h      | 10-5-1 | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_12h     | 10-5-1 | ,321                            | 3  | .    | ,882         | 3  | ,329  |
| Cumulative_24h     | 10-5-1 | ,325                            | 3  | .    | ,874         | 3  | ,308  |

**Πίνακας 35:** Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων βέλτιστη

| Tests of Normality     |                                 |    |      |              |    |       |
|------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| Formulation            | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |       |
|                        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig.  |
| Cumulative_1h optimum  | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_2h optimum  | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,995  |
| Cumulative_4h optimum  | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | ,998  |
| Cumulative_6h optimum  | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_12h optimum | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |
| Cumulative_24h optimum | ,175                            | 3  | .    | 1,000        | 3  | 1,000 |

**Πίνακας 36:** One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 1h

| Cumulative_1h          |   |                         |         |         |         |         |         |
|------------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tukey HSD <sup>a</sup> |   |                         |         |         |         |         |         |
| Formulation            | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |         |         |
|                        |   | 1                       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       |
| 10-5-1                 | 3 | 1,5300                  |         |         |         |         |         |
| 10-0-1                 | 3 | 10,8033                 | 10,8033 |         |         |         |         |
| 7,5-2,5-2-1            | 3 | 11,9200                 | 11,9200 | 11,9200 |         |         |         |
| 5-5-1                  | 3 | 12,3000                 | 12,3000 | 12,3000 |         |         |         |
| 7,5-2,5-2-2            | 3 |                         | 21,1967 | 21,1967 | 21,1967 |         |         |
| 5-0-1                  | 3 |                         |         | 24,8533 | 24,8533 |         |         |
| 7,5-2,5-2-3            | 3 |                         |         |         | 25,8333 |         |         |
| 10-0-3                 | 3 |                         |         |         | 31,6800 | 31,6800 |         |
| optimum                | 3 |                         |         |         | 31,9700 | 31,9700 |         |
| 10-5-3                 | 3 |                         |         |         |         | 40,3700 |         |
| 5-0-3                  | 3 |                         |         |         |         | 42,3500 |         |
| 5-5-3                  | 3 |                         |         |         |         |         | 57,8500 |
| Sig.                   |   | ,177                    | ,213    | ,054    | ,176    | ,186    | 1,000   |

**Πίνακας 37:** One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 2h

| Cumulative_2h          |   |                         |         |         |         |         |         |          |
|------------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Tukey HSD <sup>a</sup> |   |                         |         |         |         |         |         |          |
| Formulation            | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |         |         |          |
|                        |   | 1                       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7        |
| 10-5-1                 | 3 | 3,0367                  |         |         |         |         |         |          |
| 10-0-1                 | 3 | 18,3367                 | 18,3367 |         |         |         |         |          |
| 7,5-2,5-2-1            | 3 |                         | 23,4200 | 23,4200 |         |         |         |          |
| 5-5-1                  | 3 |                         | 26,1200 | 26,1200 |         |         |         |          |
| 7,5-2,5-2-2            | 3 |                         | 32,4800 | 32,4800 |         |         |         |          |
| 7,5-2,5-2-3            | 3 |                         |         | 38,7433 | 38,7433 |         |         |          |
| optimum                | 3 |                         |         |         | 48,3033 | 48,3033 |         |          |
| 5-0-1                  | 3 |                         |         |         | 48,4233 | 48,4233 |         |          |
| 10-0-3                 | 3 |                         |         |         |         | 62,8667 | 62,8667 |          |
| 10-5-3                 | 3 |                         |         |         |         | 63,6300 | 63,6300 |          |
| 5-0-3                  | 3 |                         |         |         |         |         | 76,1100 |          |
| 5-5-3                  | 3 |                         |         |         |         |         |         | 130,3300 |
| Sig.                   |   | ,051                    | ,090    | ,050    | ,517    | ,050    | ,137    | 1,000    |

**Πίνακας 38:**One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 4h

**Cumulative\_4h**

Tukey HSD<sup>a</sup>

| Formulation | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |          |          |          |          |
|-------------|---|-------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
|             |   | 1                       | 2       | 3       | 4        | 5        | 6        | 7        |
| 10-5-1      | 3 | 8,7500                  |         |         |          |          |          |          |
| 10-0-1      | 3 | 28,6200                 | 28,6200 |         |          |          |          |          |
| 5-5-1       | 3 | 37,0500                 | 37,0500 | 37,0500 |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-1 | 3 | 48,8300                 | 48,8300 | 48,8300 |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-2 | 3 | 53,3467                 | 53,3467 | 53,3467 |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-3 | 3 |                         | 57,8500 | 57,8500 | 57,8500  |          |          |          |
| 5-0-1       | 3 |                         |         | 74,9500 | 74,9500  | 74,9500  |          |          |
| optimum     | 3 |                         |         |         | 100,5633 | 100,5633 | 100,5633 |          |
| 10-5-3      | 3 |                         |         |         |          | 119,0500 | 119,0500 |          |
| 10-0-3      | 3 |                         |         |         |          |          | 123,6600 |          |
| 5-0-3       | 3 |                         |         |         |          |          |          | 243,5167 |
| 5-5-3       | 3 |                         |         |         |          |          |          | 255,5333 |
| Sig.        |   | ,065                    | ,512    | ,181    | ,088     | ,070     | ,801     | ,998     |

**Πίνακας 39:**One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 6h

**Cumulative\_6h**

Tukey HSD<sup>a</sup>

| Formulation | N | Subset for alpha = 0.05 |          |          |          |          |          |
|-------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|             |   | 1                       | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        |
| 10-5-1      | 3 | 14,3700                 |          |          |          |          |          |
| 10-0-1      | 3 | 40,3000                 |          |          |          |          |          |
| 5-5-1       | 3 | 47,5133                 |          |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-1 | 3 | 74,2367                 | 74,2367  |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-2 | 3 | 74,5500                 | 74,5500  |          |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-3 | 3 | 76,0333                 | 76,0333  |          |          |          |          |
| 5-0-1       | 3 | 95,9667                 | 95,9667  | 95,9667  |          |          |          |
| 10-5-3      | 3 |                         | 174,5233 | 174,5233 | 174,5233 |          |          |
| 10-0-3      | 3 |                         |          | 183,1167 | 183,1167 |          |          |
| optimum     | 3 |                         |          |          | 222,1800 |          |          |
| 5-5-3       | 3 |                         |          |          |          | 381,8367 |          |
| 5-0-3       | 3 |                         |          |          |          |          | 496,8433 |
| Sig.        |   | ,247                    | ,074     | ,177     | ,883     | 1,000    | 1,000    |

**Πίνακας 40:**One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 12h

**Cumulative\_12h**

Tukey HSD<sup>a</sup>

| Formulation | N | Subset for alpha = 0.05 |          |          |          |
|-------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|
|             |   | 1                       | 2        | 3        | 4        |
| 10-5-1      | 3 | 40,7633                 |          |          |          |
| 10-0-1      | 3 | 74,2667                 |          |          |          |
| 5-5-1       | 3 | 80,2367                 |          |          |          |
| 5-0-1       | 3 | 132,2867                |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-3 | 3 | 135,7567                |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-2 | 3 | 151,9367                |          |          |          |
| 7,5-2,5-2-1 | 3 | 170,9033                |          |          |          |
| 10-5-3      | 3 |                         | 352,4333 |          |          |
| 10-0-3      | 3 |                         | 408,3367 |          |          |
| optimum     | 3 |                         |          | 590,4367 |          |
| 5-5-3       | 3 |                         |          | 751,3567 | 751,3567 |
| 5-0-3       | 3 |                         |          |          | 869,9267 |
| Sig.        |   | ,291                    | ,988     | ,091     | ,415     |

**Πίνακας 41:**One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών 24h

**Cumulative\_24h**

Tukey HSD<sup>a</sup>

| Formulation | N | Subset for alpha = 0.05 |          |          |          |           |           |           |
|-------------|---|-------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
|             |   | 1                       | 2        | 3        | 4        | 5         | 6         | 7         |
| 10-5-1      | 3 | 118,6867                |          |          |          |           |           |           |
| 10-0-1      | 3 | 131,7633                |          |          |          |           |           |           |
| 5-5-1       | 3 | 147,3500                |          |          |          |           |           |           |
| 5-0-1       | 3 | 202,9100                | 202,9100 |          |          |           |           |           |
| 7,5-2,5-2-1 | 3 | 405,8100                | 405,8100 | 405,8100 |          |           |           |           |
| 7,5-2,5-2-3 | 3 | 407,4200                | 407,4200 | 407,4200 |          |           |           |           |
| 7,5-2,5-2-2 | 3 |                         | 494,1733 | 494,1733 | 494,1733 |           |           |           |
| 10-5-3      | 3 |                         |          | 647,8233 | 647,8233 |           |           |           |
| 10-0-3      | 3 |                         |          |          | 788,4433 | 788,4433  |           |           |
| optimum     | 3 |                         |          |          |          | 1095,7600 | 1095,7600 |           |
| 5-5-3       | 3 |                         |          |          |          |           | 1225,5133 | 1225,5133 |
| 5-0-3       | 3 |                         |          |          |          |           |           | 1422,0633 |
| Sig.        |   | ,097                    | ,092     | ,260     | ,086     | ,063      | ,933      | ,542      |

### Full Thickness Skin Results

**Πίνακας 42:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων βέλτιστης

| Tests of Normality  |                      |                                 |    |      |              |      |
|---------------------|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|------|
| Formulation_Skin    |                      | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |      |
|                     |                      | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | Sig. |
| Cumulative_1h_Skin  | Optimum microneedles | ,224                            | 3  | .    | ,984         | 3    |
| Cumulative_2h_Skin  | Optimum microneedles | ,371                            | 3  | .    | ,785         | 3    |
| Cumulative_4h_Skin  | Optimum microneedles | ,355                            | 3  | .    | ,819         | 3    |
| Cumulative_6h_Skin  | Optimum microneedles | ,343                            | 3  | .    | ,843         | 3    |
| Cumulative_12h_Skin | Optimum microneedles | ,306                            | 3  | .    | ,904         | 3    |
| Cumulative_24h_Skin | Optimum microneedles | ,357                            | 3  | .    | ,814         | 3    |

**Πίνακας 43:**Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων βέλτιστη χωρίς μικροβελόνες

| Tests of Normality  |                         |                                 |    |      |              |      |
|---------------------|-------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|------|
| Formulation_Skin    |                         | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |      |
|                     |                         | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | Sig. |
| Cumulative_1h_Skin  | Optimum no microneedles | ,185                            | 4  | .    | ,982         | 4    |
| Cumulative_2h_Skin  | Optimum no microneedles | ,203                            | 4  | .    | ,960         | 4    |
| Cumulative_4h_Skin  | Optimum no microneedles | ,219                            | 4  | .    | ,956         | 4    |
| Cumulative_6h_Skin  | Optimum no microneedles | ,231                            | 4  | .    | ,948         | 4    |
| Cumulative_12h_Skin | Optimum no microneedles | ,243                            | 4  | .    | ,886         | 4    |
| Cumulative_24h_Skin | Optimum no microneedles | ,189                            | 4  | .    | ,977         | 4    |

**Πίνακας 44:**One Way ANOVA

| ANOVA               |                |                |    |             |          |      |
|---------------------|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
|                     |                | Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
| Cumulative_1h_Skin  | Between Groups | 231,789        | 1  | 231,789     | 14,644   | ,012 |
|                     | Within Groups  | 79,133         | 5  | 15,827      |          |      |
|                     | Total          | 310,902        | 6  |             |          |      |
| Cumulative_2h_Skin  | Between Groups | 298,471        | 1  | 298,471     | 12,291   | ,017 |
|                     | Within Groups  | 121,421        | 5  | 24,284      |          |      |
|                     | Total          | 419,892        | 6  |             |          |      |
| Cumulative_4h_Skin  | Between Groups | 966,829        | 1  | 966,829     | 17,780   | ,008 |
|                     | Within Groups  | 271,883        | 5  | 54,377      |          |      |
|                     | Total          | 1238,712       | 6  |             |          |      |
| Cumulative_6h_Skin  | Between Groups | 2491,088       | 1  | 2491,088    | 55,081   | ,001 |
|                     | Within Groups  | 226,130        | 5  | 45,226      |          |      |
|                     | Total          | 2717,218       | 6  |             |          |      |
| Cumulative_12h_Skin | Between Groups | 11548,656      | 1  | 11548,656   | 229,271  | ,000 |
|                     | Within Groups  | 251,856        | 5  | 50,371      |          |      |
|                     | Total          | 11800,512      | 6  |             |          |      |
| Cumulative_24h_Skin | Between Groups | 49691,111      | 1  | 49691,111   | 1083,024 | ,000 |
|                     | Within Groups  | 229,409        | 5  | 45,882      |          |      |
|                     | Total          | 49920,520      | 6  |             |          |      |