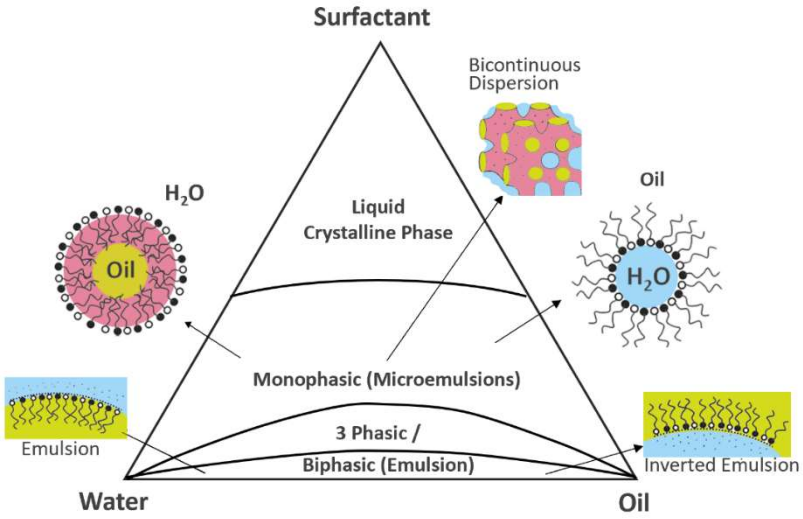
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ - ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ IN VITRO ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ IN VIVO ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ



ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΣΑΡΙΚΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κος Παρασκευάς Δάλλας, (Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

κος Μιχαήλ Ράλλης,

Αναπληρωτής Καθηγητής τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών

κα Μαριλένα Βλάχου,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιο Αθηνών



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών το ακαδημαϊκό έτος 2019 – 2020, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Κοσμητολογία – Δερματοφαρμακολογία».

Πρόκειται για το τρίτο βήμα σε μία σειρά διπλωματικών εργασιών που εκπονήθηκαν υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Παρασκευά Δάλλα, με στόχο τον σχεδιασμό και την αξιολόγηση τοπικών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης. Η πρώτη εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2017- 2018 από την συνάδελφο φαρμακοποιό Αριτζίδου Κωσταντίνα Μαρία και οδήγησε στην μορφοποίηση ενός πηκτώματος ρεσβερατρόλης, το οποίο αξιολογήθηκε In Vitro ως προς την διαδερμική διαπερατότητα και In Vivo ως προς την δράση σε φλεγμονή του δέρματος επαγόμενη από UV ακτινοβολία. Η δεύτερη εργασία εκπονήθηκε το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019 από τον συνάδελφο φαρμακοποιό Δημήτριο Σπανέα και οδήγησε στην μορφοποίηση κρέμας ρεσβερατρόλης που αξιολογήθηκε In Vitro, ως προς τη διαδερμική διαπέραση, με εξαιρετικά αποτελέσματα.

Η παρούσα εργασία έρχεται να συμπληρώσει τα παραπάνω έργα, ενσωματώνοντας την ρεσβερατρόλη σε μικρογαλάκτωμα τοπικής χορήγησης. Κλείνοντας ένα κύκλο εργασιών, έγινε συγκριτική In Vitro και In Vivo αξιολόγηση των τριών σκευασμάτων. Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώνουν την ποιότητα των σκευασμάτων που μορφοποιήθηκαν σε κάθε εργασία, ενώ θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για ενσωμάτωση στους παραπάνω φορείς ενός συνδυασμού της ρεσβερατρόλης με άλλα αντιοξειδωτικά μόρια, με στόχο την ενίσχυση της αντιφλεγμονώδους δράσης του σκευάσματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, Επίκουρο Καθηγητή Παρασκευά Δάλλα, που συνεχίζει να στέκεται ως πατέρας στην επιστημονική μου οικογένεια. Οι συμβουλές, οι γνώσεις και η υποστήριξή του είναι πολύτιμες σε κάθε μου βήμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη για την υποστήριξη και την συνεργασία σε όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος. Το όραμα του, που παίρνει μορφή σε αυτό το πρόγραμμα, με έφερε σε επαφή με αξιόλογους συναδέλφους και μας βοήθησε να εξελιχθούμε στην επιστήμη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαριλένα Βλάχου για την τιμή που έκανε με την παρουσία της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Κωσταντίνο Δεμέτζο για την φιλοξενία και την παροχή του απαραίτητου εξοπλισμού για τον χαρακτηρισμό των μορφοποιήσεων. Ακόμη, ευχαριστώ θερμά τον κ. Σφηνιαδάκη, Ιατρό-Ιστοπαθολόγο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών για την βοήθειά του στην ιστοπαθολογική εξέταση δειγμάτων

Σε αυτό το σημείο οφείλω να ευχαριστήσω και να συγχαρώ τους συναδέλφους Κωνσταντίνα Μαρία Αριτζίδου και Δημήτριο Σπανέα, για την αρτιότητα και την ποιότητα της δουλειάς τους. Χωρίς αυτές τις γερές βάσεις δεν θα ήταν δυνατή η παρούσα εργασία.

Για την επιστημονική της αρτιότητα, την πολύτιμη βοήθεια και την καθημερινή ενασχόληση της, οφείλω να ευχαριστήσω την Λευκοθέα Αντωνάρα. Δεν θα μπορούσα να έχω καλύτερο συνεργάτη στον πάγκο του εργαστηρίου.

Καθοριστική ήταν η συμβολή των συναδέλφων Μαρίας Χουντουλέση και Νικόλαου Ναζίρη. Οι γνώσεις και οι συμβουλές τους μου επέτρεψαν να κατανοήσω βαθύτερα το αντικείμενο της εργασίας.

Για τις πολύτιμες συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους Δημήτριο Σπανέα, Ζώη-Γεώργιο Γκωτσόπουλο, Παρασκευή Παπακυριακοπούλου και Αναστάση Μητσόπουλο, καθώς και τους συναδέλφους στο «Εργαστήριο Μικρών Πειραματοζώων», Γεώργιο Λαδόπουλο, Ελισάβετ Θεοδωράκη, Βάγια Ιωαννίδου και Μαρία Κωστάκη.

Τέλος να ευχαριστήσω τον Στέφανο -Αρχιμήδη Τσιμπουράκη για τη στήριξη, τη βοήθεια και την κατανόηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Αλεξάνδρα Σαρίκα

Αθήνα

Οκτώβριος 2020

Στην οικογένεια μου, εξ αίματος και μη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μορφοποίηση και βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης για χορήγηση από το δέρμα, με στόχο την αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας και της αντιφλεγμονώδους δράσης της, και η In Vitro και In Vivo αξιολόγησή του. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με In Vitro συγκριτική μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας και In Vivo συγκριτική μελέτη προληπτικής και θεραπευτικής αποτελεσματικότητας σε μοντέλο φλεγμονής επαγόμενης από UV ακτινοβολία.

Η UV ακτινοβολία προάγει την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου στο δέρμα, με άμεσες και χρόνιες επιπτώσεις, που συνδέονται με τη φλεγμονή. Η ρεσβερατρόλη είναι μία πολυφαινόλη φυτικής προέλευσης με καλά μελετημένες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. που εμφανίζει δυσκολίες στην μορφοποίηση λόγω χαμηλής διαλυτότητας στο νερό και ταχείας οξείδωσης από το ηλιακό φως. Εμφανίζει χαμηλή per os βιοδιαθεσιμότητα λόγω εκτεταμένου μεταβολισμού πρώτης διόδου και μικρού χρόνου ημιζωής της. Η μορφοποίηση της σε σκεύασμα τοπικής χορήγησης αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητά της.

Τα μικρογαλακτώματα διαθέτουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την ενσωμάτωση δυσδιάλυτων μορίων και την αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας τους. Η ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης σε από του δέρματος χορηγούμενα μικρογαλακτώματα φαίνεται να βελτιώνει την απόδοση κατά τη χορήγηση.

Η λιπαρή φάση των μικρογαλακτωμάτων ρεσβερατρόλης επιλέχθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού Formulating for Efficacy® και αποτελείται από Transcutol®: Labrasol (24:76). Η αναλογία των συστατικών του βέλτιστου μικρογαλακτώματος Έλαιο : Σύστημα επιφανειοδραστικών : Νερό (26: 7: 67), προέκυψε ύστερα από βελτιστοποίηση με την χρήση των τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού. Η βέλτιστη συνταγή περιείχε 1,9% ρεσβερατρόλη και εμφάνισε μέγιστη αθροιστική διαπέραση ρεσβερατρόλης στις 24 ώρες, μέγιστη ποσοστιαία αθροιστική διαπέραση, ως προς την εφαρμοζόμενη δόση και ικανοποιητική φυσικοχημική σταθερότητα σε βάθος 2 μηνών. Η αυξημένη απόδοση του δραστικού συστατικού, σε σχέση με συνταγές με μεγαλύτερο ποσοστό ρεσβερατρόλης, φαίνεται να οφείλεται στην μεταβολή του τύπου κατά Winsor του μικρογαλακτώματος από I (o/w) σε III (Bicontinuous Structures) με την αύξηση της θερμοκρασίας άνω των 25ºC . Η τεχνητή μεμβράνη StratM® χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην προκαταρκτική μελέτη διαπερατότητας των μικρογαλακτωμάτων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε In Vitro συγκριτική μελέτη διαπέρασης μεταξύ του βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9%, βελτιστοποιημένης κρέμας ρεσβερατρόλης 6% και πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5%, με τη χρήση τεχνητής μεμβράνης StratM® και ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας. Η τεχνητή μεμβράνη StratM® κρίθηκε ακατάλληλη για την σύγκριση μικρογαλακτωμάτων με άλλες μορφές καθώς εμφάνισε, για το μικρογαλάκτωμα

ρεσβερατρόλης 1,9%, 1000 φορές μεγαλύτερες τιμές αθροιστικής διαπέρασης σε σχέση με την κεράτινη στοιβάδα. Η μελέτη αθροιστικής κατακράτησης με τη χρήση ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας έδειξε 2,5 φορές μεγαλύτερς τιμές για το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης 1,9% σε σχέση με την κρέμα 6% και το πήκτωμα 5%. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στο συνδυασμό αλλαγής τύπου μικρογαλακτώματος κατά την αύξηση της θερμοκρασίας και στη χρήση του χημικού ενισχυτή διαδερμικής διαπερατότητας Transcutol®, που έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει την κατακράτηση της ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα.

Στην In Vivo συγκριτική μελέτη αντιφλεγμονώδους δράσης, προκλήθηκε φλεγμονή με UV ακτινοβολία σε άτριχους μύες τύπου SKH-1. Για την αξιολόγηση της προληπτικής και θεραπευτικής δράσης των σκευασμάτων μετρήθηκαν η άδηλη απώλεια νερού, η ενυδάτωση, η ερυθρότητα, το πάχος του δέρματος, το σμήγμα, η μελανίνη και το pH. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε κάμερα τρισδιάστατης απεικόνισης Antera 3D Miravex® για την εκτίμηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης και τραχύτητας του δέρματος. Φωτοτεκμηρίωση και ιστοπαθολογική εξέταση επιβεβαίωσαν τα παραπάνω ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης 1,9% εμφάνισε αποτελεσματική προληπτική και θεραπευτική δράση στην φλεγμονή επαγόμενη από UV ακτινοβολία. Η συσχέτιση των μελετών In Vivo και In Vitro επιβεβαιώνει την αξία της In Vitro μελέτης στην πρόβλεψη των αποτελεσμάτων των In Vivo μελετών.

ABSTRACT

The aim of the present study is the formulation and optimization of topical resveratrol microemulsions, and the assessment of In Vitro transdermal permeation and In Vivo preventive and therapeutic efficacy in UV induced skin inflammation.

UV radiation promotes Reactive Oxygen Species formation in dermis and epidermis, causing direct and indirect damage linked to inflammation. Resveratrol is a naturally occurring polyphenol with well-studied antioxidant and anti-inflammatory action. Resveratrol's sensitivity to sunlight oxidation and extensive per os first pass metabolism have hindered its wide use. Microemulsions are spontaneously forming thermodynamically stable colloidal formulations able to increase resveratrol's solubility and stability, as well as transdermal bioavailability.

Formulating for Efficacy® was used for the selection of optimal oily phase excipients. Design of Experiments was used for microemulsion optimization. With an oily phase consisting of Transcutol®: Labrasol (24:76), and an overall formulation of Oil: Surfactant System: Water (26: 7: 67), optimal microemulsion contained 1,9% resveratrol. It exhibited maximum cumulative permeation and maximum permeated dose as a percentage of applied dose, when compared to formulations with higher resveratrol concentration. This behavior was attributed to microemulsion's type, Winsor I, which was spontaneously converted to Winsor III when temperature raised over 25^{o}C. It showed acceptable physicochemical stability over two months. Preliminary In Vitro permeation study showed that StratM® membrane was a successful tool for microemulsion optimization.

A comparative In Vitro permeation study was performed, using optimal microemulsion 1.9% and an optimal resveratrol gel 5% and cream 6%, from earlier resveratrol formulation optimization studies. For the In Vitro study, vertical Franz cells and StratM® artificial membrane as well as human stratum corneum were used. StratM® membrane exhibited inadequate resistance to microemulsions resulting to a thousand times overestimation of cumulative permeation. Human stratum corneum retention study showed an 2.5fold increase in resveratrol retention for the microemulsion 1.9% compared to resveratrol cream 6% or gel 5%. This increased retention was attributed to the combination of Winsor type change and the use of chemical permeation enhancer Transcutol®, which has been reported to increase resveratrol retention in human stratum corneum.

In Vivo anti-inflammatory action of the compared formulations was performed on hairless mice type SKH-1. Inflammatory response was induced by UV radiation and was monitored through TEWL, hydration, redness, skin thickness, melanin sebum and pH measurements. Antera Miravex® was used to assess hemoglobin and skin roughness levels. Photographical documentation and histopathological observation were used to confirm In Vivo findings, as

resveratrol microemulsion 1.9% successfully hindered inflammatory culmination and enabled faster health reassurance. In Vivo In Vitro correlation performed confirmed in vivo findings and the predictive value of In vitro transdermal permeation studies in predicting In Vivo anti-inflammatory efficacy.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6

ABSTRACT 8

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 22

1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ 22
1.1. Εισαγωγή 22
1.2. Λειτουργίες του Δέρματος 22
1.3. Δομή του Δέρματος 23
1.3.1. Επιδερμίδα 24
1.3.2. Δερμίδα ή Χόριο 33
1.3.3. Υποδόριος Ιστός 34
1.3.4. Εξαρτήματα του δέρματος 35

2. UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑ 39
2.1. Υπεριώδης ακτινοβολία 39
2.2. Οξειδωτικό στρες επαγόμενο από UV ακτινοβολία 40
2.2.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες 40
2.2.2. Οξειδωτικές βλάβες από την UV ακτινοβολία 41
2.2.3. Φλεγμονή στο δέρμα από UV ακτινοβολία 42
2.3. Άλλες βλάβες του δέρματος από την UV ακτινοβολία 44
2.3.1. Οξείες Βλάβες 44
2.3.2. Χρόνιες Βλάβες 45
2.4. Αντιμετώπιση των βλαβών στο δέρμα από την UV ακτινοβολία 47
2.4.1. Αντιοξειδωτικά στο δέρμα 47
2.4.2. Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες 49
2.4.3. Αντιηλιακή προστασία 49

3. ΑΠΟ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ 50
3.1. Το δέρμα ως οδός χορήγησης φαρμάκων 50
3.1.1. Διεργασία από του δέρματος απορρόφησης 51
3.1.2. Μονοπάτια από του δέρματος απορρόφησης 52
3.1.3. Κινητική της από του δέρματος απορρόφησης - Νόμοι διάχυσης Fick 54
3.2. Περιορισμοί κατά την από του δέρματος χορήγηση 56
3.2.1. Φυσικοχημικοί παράγοντες 57
3.2.2. Βιολογικοί παράγοντες 59
3.3. Μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης 63
3.3.1. Συνθήκες Εγκλεισμού 64
3.3.2. Τροποποίηση Δραστικού Συστατικού 65
3.3.3. Τροποποίηση Φορέα 66
3.3.4. Φορείς τρίτης γενιάς 67
3.3.5. Χημικές Μέθοδοι Ενίσχυσης Διαπερατότητας 70
3.3.6. Φυσικές Μέθοδοι ενίσχυσης διαπερατότητας 74
3.4. Μέθοδοι μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης 80
3.4.1. In vitro – Ex vivo μελέτες διαδερμικής απορρόφησης 80
3.4.2. In vivo 88
3.4.3. In Silico 91

4. ΜΟΡΦΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ – FORMULATING FOR EFFICACY® 93
4.1. Στόχος του προγράμματος 93
4.2. Παράμετροι Διαλυτότητας Hansen 94
4.3. Δείκτης Σχετικής Πολικότητας – Relative Polarity Index 97
4.4. Σχεδιασμός Βέλτιστου Φορέα 100
4.4.1. Βελτιστοποίηση ως προς το δραστικό συστατικό 101
4.4.2. Βελτιστοποίηση ως προς το δέρμα 101
4.4.3. Βελτιστοποίηση προς συγκέντρωση – στόχο 102
4.4.4. Αξιολόγηση του βελτιστοποιημένου φορέα 102

5. ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ 104
5.1. Εισαγωγή 104

5.1.1. Χαρακτηριστικά Μικρογαλακτωμάτων ... 105
5.2. Αρχιτεκτονική Μικρογαλακτωμάτων ... 107
5.2.1. Τύποι Μικρογαλακτωμάτων ... 107
5.2.2. Διάκριση κατά Winsor ... 109
5.2.3. Θεωρεία Σχηματισμού – Ελεύθερη Ενέργεια Συστήματος ... 110
5.2.4. R – ratio ... 113
5.2.5. Critical Packing Parameter ... 114
5.2.6. Cloud Point ... 115
5.2.7. Διάκριση από τα Νανογαλακτώματα και τα Μακρογαλακτώματα ... 116
5.3. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων ... 118
5.3.1. Επιλογή υλικών ... 118
5.3.2. Διάγραμμα τριών φάσεων ... 120
5.3.3. Μέθοδοι Παρασκευής ... 121
5.4. Χαρακτηρισμός και Μελέτη Μικρογαλακτωμάτων ... 122
5.4.1. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) ... 122
5.4.2. Ηλεκτρική αγωγιμότητα ... 123
5.4.3. FT – NMR ... 123
5.4.4. Απεικονιστικές Τεχνικές ... 123
5.5. Εφαρμογές ... 124

6. ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ ... 126
6.1. Προέλευση της Ρεσβερατρόλης ... 126
6.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ... 126
6.3. Φαρμακοκινητική ... 127
6.4. Φαρμακολογικές δράσεις ... 129
6.4.1. Αντιοξειδωτική δράση ... 129
6.4.2. Αντιφλεγμονώδης δράση ... 131
6.4.3. Προστασία από την UV ακτινοβολία ... 131
6.4.4. Αντικαρκινική δράση ... 132
6.4.5. Άλλες φαρμακολογικές δράσεις ... 134

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – DESIGN OF EXPERIMENTS ... 135
7.1. Η Ποιότητα στην Φαρμακευτική ... 135
7.2. Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments ... 137
7.3. Στόχοι του Πειραματικού Σχεδιασμού ... 139
7.4. Πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού ... 140
7.5. Τα επτά βήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού ... 141
7.6. Κατηγορίες Πειραματικού Σχεδιασμού ... 142
7.6.1. Σχεδιασμοί Διεργασιών ... 142
7.6.2. Σχεδιασμοί Μειγμάτων – Mixture Designs ... 143
7.6.3. Παραγοντικοί Σχεδιασμοί – Factorial Designs ... 144

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ... 147

C. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ... 148

8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ ... 148
8.1. Υλικά ... 148
8.2. Εξοπλισμός ... 149

9. ΜΕΘΟΔΟΙ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ ... 151
9.1. Επιλογή Εκδόχων ... 151
9.2. Μορφοποίηση με τη βοήθεια του λογισμικού Formulating for Efficacy ... 152
9.2.1. Επιλογή Ποσοτικής Σύστασης Λιπαρής Φάσης ... 152
9.2.2. Επιλογή επιφανειοδραστικών ... 152
9.3. Διαγράμματα Τριών Φάσεων ... 152
9.3.1. Περιοχή ύπαρξης μικρογαλακτώματος ... 152
9.3.2. Επιλογή συστήματος επιφανειοδραστικών ... 153
9.4. Πειραματικός Σχεδιασμός Μιγμάτων ... 153
9.4.1. Περιορισμοί Σχεδιασμού ... 154
9.4.2. Μήτρα Πειραματικού Σχεδιασμού ... 155
9.4.3. Επιλογή αποκρίσεων ... 156
9.4.4. Βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης ... 156

9.5. Μέθοδοι παρασκευής μικρογαλακτωμάτων, γαλακτώματος και πηκτώματος ρεσβερατρόλης 157
9.5.1. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων Placebo 157
9.5.2. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων ρεσβερατρόλης 157
9.5.3. Παρασκευή γαλακτώματος ρεσβερατρόλης 158
9.5.4. Παρασκευή πηκτώματος ρεσβερατρόλης 158
9.6. Μέτρηση Μεγέθους Σταγονιδίων 159
9.6.1. Φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων 159
9.6.2. Προετοιμασία του δείγματος 160
9.7. Μελέτη Σταθερότητας 160
9.8. Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού 161
9.9. In Vitro πείραμα διάχυσης 162
9.9.1. Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα 162
9.9.2. In Vitro Πείραμα Διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη STRAT – M ® 162
9.9.3. Ex Vivo πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα 164
9.10. Ποσοτικός Προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο HPLC 166
9.10.1. Χρωματογραφικές συνθήκες 166
9.10.2. Παρασκευή της κινητής φάσης 166
9.10.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων 167
9.10.4. Έλεγχος γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης 167
9.10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης στα παρασκευάσματα 168
9.10.6. Ποσοτικός προσδιορισμός ρεσβερατρόλης στο διαμέρισμα του δότη 168
9.10.7. Ποσοτικός προσδιορισμός ρεσβερατρόλης στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα 168
9.11. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων 169
9.11.1. Έλεγχος κανονικότητας 169
9.11.2. ANOVA – Analysis of Variance 169
9.11.3. Post – hoc Analysis 170
9.11.4. Ζευγαρωτές συγκρίσεις 170

10. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 171
10.1. Υλικά και Όργανα In Vivo Πειράματος 171
10.1.1. Υλικά 171
10.1.2. Όργανα και Συσκευές 171
10.2. Μέθοδοι In Vivo Πειράματος 172
10.2.1. Πρωτόκολλο πρόκλησης φλεγμονής με UV ακτινοβόληση σε μύες 172
10.2.2. Πειραματική διεργασία 174
10.2.3. Μετρήσεις Εμβιομηχανικής 174

D. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ 179

11. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ 179
11.1. Επιλογή Ποσοτικής Σύστασης Λιπαρής Φάσης με το λογισμικό FFE® 179
11.2. Διαγράμματα τριών φάσεων 182
11.3. Διαλυτότητα Κορεσμού Ρεσβερατρόλης στα μικρογαλακτώματα 183
11.3.1. Μέθοδος HPLC 183
11.3.2. Υπολογισμός Διαλυτότητας Κορεσμού 185
11.4. Μέγεθος Σταγονιδίων 187
11.4.1. Μεταβολή κατά την ενσωμάτωση RSV και ύστερα από 30 ημέρες 188
11.5. Μέτρηση pH 190
11.6. In vitro πείραμα διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη Strat - M® 192
11.6.1. Αθροιστική Ποσότητα διαπέρασης 192
11.6.2. Αθροιστική διαπέραση ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης 194
11.6.3. Στατιστική Ανάλυση Αθροιστικής Διαπέρασης και Αθροιστικής %Δόσης 196
11.7. Βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος με το λογισμικό Design Expert® 197
11.7.1. Μέγεθος σταγονιδίων (24h από την παρασκευή) 198
11.7.2. Αθροιστική ποσότητα διαπέρασης 24h 202
11.7.3. Επί τις εκατό Δόση διαπέρασης 24h 205
11.7.4. Σταθερότητα Μικρογαλακτωμάτων 207
11.7.5. Αριθμητική Βελτιστοποίηση 209

12. IN VITRO ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ 212
12.1. In vitro πείραμα διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη Strat – M ® 212

12.1.1. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²) ... 212
12.1.2. %Αθροιστική Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ... 214
12.2. Ex vivo πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα ... 216
12.2.1. Αθροιστική διαπέραση Q ... 216
12.2.2. Κατακράτηση ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα ... 218
12.2.3. Βέλτιστη Συνταγής Μικρογαλακτώματος ... 222
Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ IN VIVO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ... 225
13. IN VIVO ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ ... 225
13.1. Άδηλη απώλεια νερού - TEWL ... 225
13.2. Ενυδάτωση ... 229
13.3. Ερυθρότητα ... 233
13.4. Μελανίνη ... 237
13.5. Πάχος Δέρματος ... 241
13.6. Σμήγμα ... 245
13.7. pH ... 249
13.8. Τρισδιάστατη απεικόνιση με κάμερα Antera ® ... 251
13.8.1. Τραχύτητα δέρματος ... 251
13.8.2. Αιμοσφαιρίνη ... 255
13.9. Φωτοτεκμηρίωση ... 259
13.10. Ιστοπαθολογική εξέταση ... 262
13.10.1. Μάρτυρες ... 262
13.10.2. Φορέας Κρέμας και Κρέμα RSV ... 263
13.10.3. Φορέας Πηκτώματος και Πήκτωμα RSV ... 264
13.10.4. Φορέας Μικρογαλακτώματος και Μικρογαλάκτωμα RSV ... 265
F. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ... 266
14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ ... 266
15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ 268
G. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ... 271
H. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ... 284
16. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ... 284
16.1. Προκαταρκτική Μελέτη Διαπερατότητας σε Strat M® ... 284
16.1.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 284
16.1.2. ANOVA – Post Hoc ... 287
16.2. Συγκριτική Μελέτη διαπερατότητα Strat M® ... 289
16.2.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 289
16.2.2. ANOVA – Post Hoc ... 291
16.3. Συγκριτική Μελέτη διαπερατότητα ανθρώπινη Κεράτινη Στοιβάδα ... 292
16.3.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 292
16.3.2. ANOVA – Post Hoc ... 293
16.4. Συγκριτική Μελέτη Κατακράτησης από ανθρώπινη Κεράτινη Στοιβάδα ... 294
16.4.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 294
16.4.2. ANOVA – Post Hoc ... 294
17. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ IN VIVO ... 295
17.1. TEWL ... 295
17.1.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 295
17.1.2. Two Way ANOVA ... 296
17.1.3. Uncorrected Fischer's LSD ... 296
17.2. Ενυδάτωση ... 299
17.2.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 299
17.2.2. Two Way ANOVA ... 300
17.2.3. Uncorrected Fischer's LSD ... 300
17.3. Ερυθρότητα ... 302
17.3.1. Έλεγχοι κανονικότητας ... 302
17.3.2. Two Way ANOVA ... 304
17.3.3. Uncorrected Fischer's LSD ... 304

17.4. Μελανίνη 305
17.4.1. Έλεγχοι κανονικότητας 305
17.4.2. Two Way ANOVA 306
17.4.3. Uncorrected Fischer's LSD 307
17.5. Πάχος Δέρματος 308
17.5.1. Έλεγχοι κανονικότητας 308
17.5.2. Two Way ANOVA 309
17.5.3. Uncorrected Fischer's LSD 310
17.6. Σμήγμα 312
17.6.1. Έλεγχοι κανονικότητας 312
17.6.2. Μη παραμετρικοί έλεγχοι 315
17.7. pH 316
17.7.1. Έλεγχοι κανονικότητας 316
17.7.2. One-way ANOVA 316
17.7.3. Uncorrected Fischer's LSD 317
17.8. Ερυθρότητα υπολογισμένη από την κάμερα Antera® 317
17.8.1. Έλεγχοι κανονικότητας 317
17.8.2. Two Way ANOVA 318
17.8.3. Uncorrected Fischer's LSD 318
17.9. Τραχύτητα του δέρματος υπολογισμένη από την κάμερα Antera® 320
17.9.1. Έλεγχοι κανονικότητας 320
17.9.2. Two Way ANOVA 321
17.9.3. Uncorrected Fischer's LSD 321

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Έκδοχα που χρησιμοποιούνται συχνά στην παρασκευή μικρογαλακτωμάτων 120
Πίνακας 2. Η συνταγή κρέμας ρεσβερατρόλης που επιλέχθηκε προς βελτιστοποίηση (Σπανέας, 2019) 151
Πίνακας 3. Συνταγή Βελτιστοποιημένου Πηκτώματος Ρεσβερατρόλης (Αριτζίδου, 2018)..... 159
Πίνακας 4. Συνθήκες πειραμάτων διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη και ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα... 164
Πίνακας 5. Οι χρωματογραφικές συνθήκες για τον αναλυτικό προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο HPLC..... 166
Πίνακας 6. Προδιαγραφές μορφοποίησης όπως εισήχθησαν στο λογισμικό FFE® 179
Πίνακας 7. Προτεινόμενη Σύσταση Λιπαρής Φάσης..... 179
Πίνακας 8. Τα προτεινόμενα επιφανειοδραστικά απο το λογισμικό είχαν κατάλληλες τιμές δ και ήταν υγρά 180
Πίνακας 9.Η σύσταση του μικρογαλακτώματος Placebo που χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της διαλυτότητας κορεσμού RSV 185
Πίνακας 10. Αποτελέσματα ανάλυσης για την συγκέντρωση κορεσμού της RSV στα μικρογαλακτώματα 186
Πίνακας 11. Μεγέθη Σταγονιδίων για τα μικρογαλακτώματα με και χωρίς ρεσβερατρόλη 187
Πίνακας 12. Επι τις εκατό μεταβολή μεγέθους σταγονιδίων και πολυδιασποράς κατά την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης στα Placebo και ύστερα από 30 ημέρες..... 188
Πίνακας 13. Μετρήσεις pH για τα μικρογαλακτώματα Placebo και RSV σε 24h και 30 ημέρες..... 190
Πίνακας 14. Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή (μg/cm2). Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (SD) για n=3 192
Πίνακας 15. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης ανα μονάδα επιφάνειας Q(μg/cm2)..... 193
Πίνακας 16.Αθροιστική ποσοστιαία Δόση διαπέρασης ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας..... 195
Πίνακας 17. Συνταγή βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 3% 211
Πίνακας 18. Συνταγή Βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9%..... 211
Πίνακας 19.Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q(μg/cm2), που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD 212
Πίνακας 20. Αθροιστική %Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD 214
Πίνακας 21.Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q(μg/cm2), που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD 216
Πίνακας 22. Αθροιστική κατακράτηση ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα στις 24h..... 218
Πίνακας 23. Άδηλη απώλεια νερού για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή (μέσος όρος και τυπική απόκλιση)..... 225
Πίνακας 24. Αποτελέσματα μετρήσεων ενυδάτωσης για κάθε ομάδα μυών σε κάθε ημέρα του πειράματος (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση..... 229
Πίνακας 25. Τα δεδομένα για την ερυθρότητα ανά ομάδα μυών ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος και τυπική απόκλιση ομάδας)..... 233
Πίνακας 26. Μετρήσεις μελανίνης ανά ομάδα σκευάσματος ανά ημέρα (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση) 237
Πίνακας 27. Οι μετρήσεις του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος στην πορεία του πειράματος (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση) 241
Πίνακας 28. Οι μετρήσεις του σμήγματος ανά ομάδα και ανά ημέρα πειράματος (μέσος όρος±τυπική απόκλιση)..... 245
Πίνακας 29. Τιμές pH ανά ομάδα σκευάσματος την ημέρα 8 του πειράματος..... 249
Πίνακας 30. Μετρήσεις τραχύτητας από την κάμερα Antera ανά ομάδα σκευάσματος και ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση) 251
Πίνακας 31. Μετρήσεις αιμοσφαρίνης από την κάμερα Antera ανά ομάδα σκευάσματος και ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση) 255
Πίνακας 32. Συνοπτική συγκριτική απεικόνιση της βελτιώσης κάθε παράγοντα εξέλιξης της φλεγμονής ανά ομάδα μυών 268

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Α 1. Η δομή του δέρματος (Igarashi et al., 2007)..... 24
Εικόνα Α 2. Διαγραμματική δομή της επιδερμίδας . Το Δέρμα και τα εξαρτήματα του (M. Sala & , A. Elaissari, 2018)..... 24
Εικόνα Α 3. Δομή της επιδερμίδας άνευ υαλώδους στοιβάδας (Baroni et al., 2012) και η επιδερμίδα στο μικροσκόπιο ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης (Igarashi et al., 2007) 25

Εικόνα Α 4. Σταδιακή κερατινοποίηση κερατινοκυττάρων και μορφολογικές αλλαγές από την Βασική προς την Κεράτινη στοιβάδα . Σημειώνεται ο ρόλος της προφιλαγγρίνης στην βιοσύνθεση των απαραίτητων λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας. (Houben et al., 2007)..... 27
Εικόνα Α 5. Οι χημική δομή των κεραμιδίων της κεράτινης στοιβάδας. Τα κεραμίδια 1, 4 και 9 είναι ω-ακυλιωμένα με ένα μόριο λινολεϊκού οξέος που προσφέρει ρευστότητα στις μεμβράνες που σχηματίζουν (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011). 27
Εικόνα Α 6. Από την θεώρηση του Micahels το 1975 στην επιβεβαίωση της με παρατήρηση στο μικροσκόπο (Michaels et al., 1975; Prausnitz et al., 2012)..... 28
Εικόνα Α 7. Εξέλιξη του μοντέλου τούβλα και κονίαμα στο πιο σύνθετο μοντέλο Sandwich (Rawlings, 2010) 29
Εικόνα Α 8. Ημιπερατές διπλοστοιβάδες λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας στο μοντέλο Sandwich των (Joke A. Bouwstra & Ponec, 2006). 29
Εικόνα Α 9. Σύντηξη του σωματίου Odland με την κυτταρική μεμβράνη και απέκκριση των λιπιδικών διπλοστοιβάδων του στον διακυττάριο χώρο της κεράτινης στοιβάδας (J. A. Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002,)(Prausnitz et al., 2012) 30
Εικόνα Α 10. Η βασική στοιβάδα και ο δερμοεπιδερμιδικός σύνδεσμος (Zaidi & Lanigan, 2010) 32
Εικόνα Α 11. Η δομή του δέρματος και τα εξαρτήματά του 35
Εικόνα Α 12. (Αριστερά) η δομή της τριχοσμηγματογόνου μονάδας με τον ορθωτήρα μύ (Zaidi & Lanigan, 2010).(Δεξιά) Εκκρινείς και αποκρινείς (ιδρωτοποιοί) αδένες σε σχέση με την τριχοσμηγματογόνο μονάδα (Hsu et al., 2017)..... 37
Εικόνα Α 13. Η δομή των ονύχων (Lai-Cheong & McGrath, 2013). 38
Εικόνα Α 14. Το φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας στο ηλιακό φως (Αριτζίδου, 2018) 39
Εικόνα Α 15. Το οξειδωτικό στρες επαγόμενο από UV ακτινοβολία ενεργοποιεί έναν πρόοξειδωτικό καταρράκτη που καταλήγει σε βλάβες σε δομικά συστατικά του κυττάρου (Halliday, 2005). 42
Εικόνα Α 16. Μηχανισμοί επαγωγής φωτογήρανσης από την υπεριώδη ακτινοβολία (Cavinato et al., 2017) 46
Εικόνα Α 17. Η υπεριώδης ακτινοβολία προωθεί την γένεση, την προώθηση και την ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος (Nishigori et al., 2004)..... 47
Εικόνα Α 18. Τα χρωμοφόρα, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά και τα καροτενοειδή αναστέλλουν σε πολλά επίπεδα τις οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο (Masaki, 2010) 49
Εικόνα Α 19. Τα στάδια κατανομής, διάχυσης, δέσμευσης και μεταβολισμού μίας ουσίας κατά την από του δέρματος απορρόφηση της (J. W. Wiechers et al., 2004a) 52
Εικόνα Α 20. Πιθανές οδοί διαπέρασης της κεράτινης στοιβάδας. 1Α) Μέσω της τριχοσμηγματογόνου μονάδος, 1Β) Μέσω των ιδρωτοποιών αδένων, 2Α) Παρακυττάρια οδός, 2Β)Διακυττάρια οδός (Mohammed et al., 2014) 53
Εικόνα Α 21. Ο τρόπος που μεταβάλλεται η αθροιστική μάζα της διαχεόμενης ουσίας στο διαμέρισμα του δέκτη προς το χρόνο. Η Ροή αντιστοιχεί στην κλίση της ευθείας. (Crank, 1975)..... 56
Εικόνα Α 22.Η τριγωνική αλληλεπίδραση δραστικού συστατικού - φορέα - δέρματος που καθορίζει την διαδερμική απορρόφηση (Otto et al., 2009)..... 63
Εικόνα Α 23. Κατηγοριοποίηση των μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής διαπερατότητας (Thong et al., 2007) 64
Εικόνα Α 24. Κατηγορίες Λιποσωμάτων που χρησιμοποιούνται στην διαδερμική χορήγηση (M. Sala & , A. Elaissari, 2018)..... 68
Εικόνα Α 25. Οι περιοχές δράσης των ΧΕΔ Α. Πολικές κεφαλές, Β. Ελεύθερο νερό, Γ. Υδρόφοβες ουρές (Αριτζίδου, 2018)..... 71
Εικόνα Α 26. Η αζόνη με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων των διπλοστοιβάδων και διαταράσσει την κρυσταλλική τους δομή (Willia & Barry, 1991) 72
Εικόνα Α 27. Η επίδραση των ΧΕΔ στα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας σύμφωνα με τούς (Adrian C. Williams & Barry, 2004)..... 74
Εικόνα Α 28. Βασική οργανολογία διαδερμικής χορήγησης με ιοντοφόρηση (Daniels, 2004)..... 75
Εικόνα Α 29. Βασική μεθοδολογία διαδερμικής χορήγησης με ηλεκτροφόρηση (Daniels, 2004) 76
Εικόνα Α 30. Βασική οργανολογία διαδερμικής χορήγησης με υπερήχους (Daniels, 2004)..... 76
Εικόνα Α 31. Μικροβελόνες από πυρίτιο στο μικροσκόπιο και οι πόροι που αφήνουν αυτές στο δέρμα για διαπέραση ουσιών (Donnelly et al., 2010)..... 78
Εικόνα Α 32. Διαφορετικά ήδη μικροβελόνων και ο τρόπος απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού από αυτά (Dragicevic & Maibach, 2017b) 78
Εικόνα Α 33. Κατασκευή μικροβελόνων πολλαπλών βιοδιασπώμενων πολυμερών με την μέθοδο των μικρο – εκμαγείων (Donnelly et al., 2014)..... 79

Εικόνα Α 34. Κάθετη τομή στο μικροσκόπιο με χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης Α)Δέρματος ολικού πάχους, Β)Δερμοτομημένου δέρματος, Γ)Επιδερμίδας ύστερα από θερμικό διαχωρισμό από το χώριο και Δ)Επιδερμίδα ύστερα από κατεργασία με θρυψίνη (Ehrhardt & Kim, 2008a) 81
Εικόνα Α 35. Η δομή της τεχνητής μεμβράνης Strat - M® σε σύγκριση με το ανθρώπινο δέρμα, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Σπανέας, 2019) 83
Εικόνα Α 36. Κάθετη τομή της Strat M ® σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, οπου είναι ορατά τα δύο στρώματα σουλφονικού πολυαιθέρα και το τρίτο στρώμα πολυολεφίνης (Uchida et al., 2015) 83
Εικόνα Α 37. Τα τμήματα των κυττάρων διάχυσης Franz (Gary P. Moss et al., 2015)..... 85
Εικόνα Α 38. Σχηματική διάταξη κυττάρων συνεχούς ροής Bronaugh (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011) 87
Εικόνα Α 39. Οριζόντια κύτταρα διάχυσης (Daniels, 2004)..... 88
Εικόνα Α 40. Η τεχνική αποχωρισμού στοιβάδων κερατινοκυττάρων από ζώσα επιδερμίδα με τη χρήση κολλητικών ταινιών (V. P. Shah et al., 2015)..... 89
Εικόνα Α 41. Φάσμα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ATR – FTIR) για δέρμα χοίρου μετά από χορήγηση Χημικών Ενισχυτών Διαπερατότητας που ανιχνεύονται στα φάσματα με το σύμβολο * (Binder et al., 2018) 89
Εικόνα Α 42. Η πειραματική διάταξη της Μικροδιάλυσης (Daniels, 2004) 90
Εικόνα Α 43. Το κομμάτι του δέρματος που μπορεί να ληφθεί με την μέθοδο της βιοψίας Punch (Dragicevic & Maibach, 2015)..... 91
Εικόνα Α 44. Η συσκευή INSIGHT, μελέτης διάχυσης υψηλής απόδοσης πολλών μορίων ΧΕΔ ταυτόχρονα (Wester & Maibach, 2005) 91
Εικόνα Α 45. Ο τρόπος λειτουργίας του FFE (https://www.jwsolutionssoftware.com)..... 94
Εικόνα Α 46. Η κεράτινη στοιβάδα στον τρισδιάστατο χώρο των παραμέτρων διαλυτότητας ως έκδοχο (ανοιχτό πράσινο) (FFE, https://www.jwsolutionssoftware.com/)..... 97
Εικόνα Α 47. Η απόσταση της πολικότητας της Ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα (παραλλαγή από Wiechers et al., 2004b) 98
Εικόνα Α 48. Οι δύο βέλτιστες τιμές πολικότητας του φορέα συναρτήσει της διαλυτότητας και της θερμοδυναμικής ενεργότητας (J. W. Wiechers et al., 2004b)..... 99
Εικόνα Α 49. Οι βέλτιστες τιμές πολικότητας του φορέα της ρεσβερατρόλης και πώς οι μεταβολές του επηρεάζουν την κινητήριο δύναμη διάχυσης και την διαλυτότητα του δραστικού συστατικού στο φορέα (J. W. Wiechers et al., 2004b)..... 99
Εικόνα Α 50. Το φαινόμενο έλξης- ώθησης (push - pull effect) κατά το οποίο η διαπέραση ενός συστατικού εξαρτάται από την κατανομή του από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα και από την πολική συγγένεια του με αυτήν (Walters, 2002) 100
Εικόνα Α 51. Δομή μικρογαλακτωμάτων λ/ν. Τα λιπόφιλα μόρια μπορούν να ενσωματωθούν είτε στον πυρήνα των σταγονιδίων είναι ανάμεσα στις λιπόφιλες ουρές των μορίων των επιφανειοδραστικών (McClements, 2012)..... 105
Εικόνα Α 52. Τα χαρακτηριστικά των μικρογαλακτωμάτων (Dragicevic & Maibach, 2017b)..... 106
Εικόνα Α 53. Τύποι μικρογαλακτωμάτων: ημισυνεχείς δομές, λ/ν, ν/λ (Thong et al., 2007)..... 108
Εικόνα Α 54. Δυναμικές μεταπτώσεις δύο κατευθύνσεων μεταξύ των διαμορφώσεων των μικρογαλακτωμάτων (Kreilgaard, 2002) 108
Εικόνα Α 55. Οι τύποι μικρογαλακτωμάτων κατά Winsor και οι μεταξύ τους μεταπτώσεις ανάλογα με τη θερμοκρασία και την αλατότητα (Nakama, 2017; Winsor, 1948)..... 110
Εικόνα Α 56.Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης της ελεύθερης ενέργειας των κολλοειδών συστημάτων σε σχέση σε την κατάσταση διαχωρισμού των φάσεων. Οι δύο καταστάσεις χωρίζονται από μια ενέργεια ενεργοποίησης ΔG*. Η ταχύτητα αποσταθεροποίησης των νανογαλακτωμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογη της προσφερθήσας ενέργειας ΔG* (McClements, 2012; προσαρμογή στα ελληνικά από Τζουανάκη, 2016) 112
Εικόνα Α 57. Επίδραση μεταβολών κρίσιμων μεταβλητών στον τύπο των μικρογαλακτωμάτων (Τζουανάκη, 2016)..... 113
Εικόνα Α 58. Οι διαμορφώσεις της μεμβράνης του επιφανειοδραστικού ανάλογα με την τιμή της CPP του (Israelachvili, 1994)..... 115
Εικόνα Α 59. Μεταβολή της διαμόρφωσης των μορίων των μη ιονικών επιφανειοδραστικών με την αύξηση της θερμοκρασίας, ανάλογα με τον αριθμό των αιθυλενοξειδίων, του μεγέθους δηλαδή της πολικής κεφαλής (Nakama, 2017)..... 116
Εικόνα Α 60. Σύγκριση μακρογαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων (Nastiti et al., 2017)..... 117
Εικόνα Α 61. Διάγραμμα τριών φάσεων που περιλαμβάνει όλες τις δυνατές διαμορφώσεις ανάλογα με την σχετική αναλογία των υλικών (Kreilgaard, 2002)..... 121

Εικόνα Α 62. Η χημική ονομασία, ο χημικός τύπος και ο σειριακός αριθμός της ρεσβερατρόλης (Αριτζίδου, 2018) 126
Εικόνα Α 63. Οι cis- και trans- διαμορφώσεις τις ρεσβερατρόλης (R. Neves et al., 2012)..... 127
Εικόνα Α 64. Οι κύριες μεταβολικές οδοί της ρεσβερατρόλη στον άνθρωπο (Lou et al., 2014) 128
Εικόνα Α 65. Ο μεταβολισμός και η κατανομή της ρεσβερατρόλης κατά την per os χορήγηση (Amri et al., 2012a) 129
Εικόνα Α 66. Η ρεσβερατρόλη αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες προς αδρανείς κινόνες και σταματά την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης (Αριτζίδου, 2018) 130
Εικόνα Α 67. Η ρεσβερατρόλη έχει πολλαπλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύει από παθήσεις σχετιζόμενες με αυτό (Truong et al., 2018) 130
Εικόνα Α 68. Τα μονοπάτια της φλεγμονής που επηρεάζει η ρεσβερατρόλη (Švajger & Jeras, 2012) ... 131
Εικόνα Α 69. Μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η ρεσβερατρόλη προστατεύει από την UV ακτινοβολία (Reagan-Shaw et al., 2008) 132
Εικόνα Α 70. Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου στα οποία παρεμβαίνει η ρεσβερατρόλη (Delmas et al., 2006) 133
Εικόνα Α 71. Η ρεσβερατρόλη εμποδίζει τα τρία στάδια του καρκίνου, την έναρξη της ανάπτυξη και την διαφοροποίηση (Delmas et al., 2006) 133
Εικόνα Α 72. Η δομική ομοιότητα της ρεσβερατρόλης με την διαιθυλ - στιλβεστρόλη ευθύνεται για την οιστρογονική της δράση 134
Εικόνα Α 73. Τα πέντε Μ και ένα Ε χαρακτηριστικά ποιότητας της διεργασίας παραγωγής ενός προϊόντος με στόχο την ποιότητα, τοποθετημένα σε διάγραμμα ψαροκόκαλο ή Ishikawa, ενός από τους μεγαλύτερους μελετητές της ποιότητας (Σπανέας, 2019) 135
Εικόνα Α 74. Η ενσωμάτωση της ποιότητας στο προϊόν μέσω του σχεδιασμού (C. M. V. Moore, 2012) 137
Εικόνα Α 75. Οι τύποι του πειραματικού σχεδιασμού (Karatzas et al., 2017) 142
Εικόνα Α 76. Σχεδιασμοί Simplex για δύο, τρία και τέσσερα συστατικά (Σπανέας, 2019) 144
Εικόνα Α 77. Από αριστερά προς τα δεξιά, περιορισμένοι σχεδιασμοί simplex με ένα, δύο και τρία όρια, και Optimal σχεδιασμός μειγμάτων (Politis et al., 2017) 144
Εικόνα Α 78. Σχηματική παράσταση πλήρων παραγοντικών σχεδιασμών όπου οι παράγοντες συμβολίζονται με γράμματα και τα επίπεδα τους με πρόσημο (Politis et al., 2017) 145
Εικόνα Α 79. Μισός κλασματικός Σχεδιασμός τεσσάρων παραγόντων σε δύο επίπεδα (Σπανέας, 2019) 146

Εικόνα C 1. Διάταξη τιτλοδότησης για κατασκευή διαγραμμάτων τριών φάσεων (Τζουανάκη, 2016) 153
Εικόνα C 2. Περιορισμοί Πειραματικού Σχεδιασμού Μίγματος 154
Εικόνα C 3. Η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού Μίγματος Design-Expert® - DX 11) 155
Εικόνα C 4. Η επιφάνεια του πειραματικού χώρου που μελετήθηκε ύστερα από τους περιορισμού που τέθηκαν (Design-Expert® - DX 11) 155
Εικόνα C 5. Όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων Malvern Zetasizer 3000HAS..... 159
Εικόνα C 6. Κύτταρο κάθετης διάχυσης Franz (Σπανέας, 2019)..... 162
Εικόνα C 7. Απεικόνιση της τεχνητής μεμβράνης Strat-M® (Διαθέσιμο σε: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892) 163
Εικόνα C 8. Συνοπτικό διάγραμμα της πειραματικής διεργασίας In Vivo 173

Εικόνα D 1. Η προσομοίωση του πειράματος διάχυσης από το λογισμικό FFE ® 180
Εικόνα D 2. Αριστερά (Διάγραμμα 1) τριών φάσεων για μείγμα επιφανειοδαστικών (Tween 80:Span 83 1:1) και δεξιά (Διάγραμμα 2) μόνο με Span 83 182
Εικόνα D 3. Η εικόνα του χρωματογραφήματος πρότυπου διαλύματος RSV συγκέντρωσης 1μg/mL σε διάλυμα υποδοχέα 183
Εικόνα D 4. Χρωματογράφημα Διαλύματος Υποδοχέα PG : H_2O (50:50) 183
Εικόνα D 5. Χρωματογράγημα άγνωστου δείγματος ρεσβερατρόλη από πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα 184
Εικόνα D 6. Χρωματογράφημα Κινητής Φάσης ACN : H_20 (35:65)..... 184
Εικόνα D 7. Καμπύλη αναφοράς Πρότυπων Διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα υποδοχέα 185
Εικόνα D 8. Η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού και οι τιμές των αποκρίσεων μέγεθος σωματιδίων, %Αθροιστική Δόση, Αθροιστική διαπέραση και Σταθερότητα. Οι συνταγές 8,10,15 δεν αναλύθηκαν λόγω διαχωρισμού φάσεων (Design Expert® – DX 11)..... 197
Εικόνα D 9. Το μοντέλο και η στατιστική σηματνικότητα που περιγράφουν καλύτερα την κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων των μικρογαλακτωμάτων (Design Expert® – DX 11)..... 198

Εικόνα D 10. ANOVA για το κυβικό μοντέλο που ακολουθούν τα μεγέθη των σταγονιδίων (Design Expert® – DX11) 200
Εικόνα D 11.Διάγραμμα Trace Cox που δείχνει πως μεταβάλλεται το μέγεθος των σταγονιδίων με τη μεταβολή του παράγοντα C (Water) και A (Oil) (Design Expert® – DX11) 200
Εικόνα D 12. Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11) 201
Εικόνα D 13. Σύνοψη της καταλληλότητας του γραμμικού μοντέλου και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης RSV στις 24h (Design Expert® – DX11) 203
Εικόνα D 14.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11) 203
Εικόνα D 15. Διάγραμμα Trace Piepel για την αθροιστική διαπέραση RSV στις 24h (Design Expert® – DX11) 204
Εικόνα D 16. Σύνοψη της καταλληλότητας του μοντέλου Quadratic και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης RSV ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης, στις 24h (Design Expert® – DX11) 205
Εικόνα D 17.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11) 206
Εικόνα D 18. Διάγραμμα Trace Piepel για την αθροιστική διαπέραση % RSV στις 24h (Design Expert® – DX11) 206
Εικόνα D 19.Σύνοψη της καταλληλότητας του Special Quartic μοντέλου και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της σταθερότητας μικρογαλάκτωματων RSV (Design Expert® – DX11) 207
Εικόνα D 20.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX1..... 208
Εικόνα D 21. Οι απαιτήσεις (Constraints) που τέθηκαν για την βελτιστοποίηση (Design Expert® – DX11) 209
Εικόνα D 22. Προτεινόμενες λύσεις του πειραματικού Σχεδιασμού (Design Expert® – DX11) 209
Εικόνα D 23. Διάγραμμα επιφάνειας συνάρτησης επιθυμητότητας (Design Expert® – DX11) 210
Εικόνα D 24. Διάγραμμα Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας 212
Εικόνα D 25.Αθροιστική %Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την μεμβράνη ανά μονάδα επιφάνειας 214
Εικόνα D 26.Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας RSV που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας (μg/cm^2) σε συνάρτηση με το χρόνο (t) 216
Εικόνα D 27. Γράφημα αθροιστικής κατακράτησης RSV στις 24h (Prism 8.4.3, GraphPad)..... 218
Εικόνα D 28. Το Transcutol προσδίδει κινητικότητα στα κεραμίδια της κεράτινης στοιβάδας (Αριτζίδου, 2018) 220
Εικόνα D 29. Τρόπος δράσης Χημικών Ενισχυτών Διαβατότητας. Το Transcutol φαίνεται να δρα στις περιοχές A και B (Αριτζίδου, 2018)..... 221

Εικόνα E 1. Μικροσκοπική εικόνα ολικού δέρματος από την ομάδα των μαρτύρων, ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης (x100) 262
Εικόνα E 2. Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα της κρέμας (Αριστερά) και της κρέμας Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100..... 263
Εικόνα E 3.Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα του πηκτώματος (Αριστερά) και του πηκτώματος Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100..... 264
Εικόνα E 4.Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα του μικρογαλακτώματος (Αριστερά) και του μικρογαλακτώματος Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100..... 265

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.

Γράφημα Ε 1. Η μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού ανά ημέρα και ανά σκεύασμα 226
Γράφημα Ε 2. Γραμμική μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού ανά σκεύασμα στην πορεία του πειράματος 226
Γράφημα Ε 3. Η κατάσταση της ενυδάτωσης του δέρματος των μυών κατά τη διάρκεια του πειράματος, ανά ομάδα σκευάσματος 230
Γράφημα Ε 4. Η πορεία της ενυδάτωσης ανά σκεύασμα στην διάρκεια του πειράματος 230
Γράφημα Ε 5. Η συνολική πορεία της ερυθρότητας ανά ομάδα θεραπείας, σε κάθε μέρα μετρήσεων ... 234
Γράφημα Ε 6. Εξέλιξη ερυθρότητας ανά σκεύασμα στις ημέρες του πειράματος 234
Γράφημα Ε 7. Η εξέλιξη της μελανίνης κατά τη διάρκεια του πειράματος ανά ομάδα 238
Γράφημα Ε 8. Τα επίπεδα μελανίνης ανά ομάδα σκευασμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος 238
Γράφημα Ε 9. Η εξέλιξη του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος κατά την διάρκεια του πειράματος 242
Γράφημα Ε 10. Σύγκριση διακύμανσης του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα 242
Γράφημα Ε 11. Συγκριτικόδιάγραμμα επιπέδων σμήγματος ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα πειράματος 246
Γράφημα Ε 12. Η εξέλιξη των επιπέδων του σμήγματος για κάθε ομάδα στην διάρκεια του πειράματος 246
Γράφημα Ε 13. Σύγκριση τιμών pH ανά ομάδα σκευάσματος την ημέρα 8 250
Γράφημα Ε 14. Διακύμανση των τιμών τραχύτητας στην πορεία του πειράματος 252
Γράφημα Ε 15.Διακύμανση τιμών τραχύτητας ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα 252
Γράφημα Ε 17. Πορεία επιπέδων αιμοσφαιρίνης ανά ομάδα σκευάσματος στην πορεία του πειράματος 256
Γράφημα Ε 16. Διακύμανση τιμών αιμοσφαιρίνης ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα 256

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο και βαρύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος καθώς αντιστοιχεί στο 15% περίπου του συνολικού βάρους ενός ενήλικα (Zaidi & Lanigan, 2010), με συνολική επιφάνεια από 1,7 έως 3cm² (Godin & Touitou, 2007). Ο ρόλος του δέρματος είναι κρίσιμος για την διατήρηση της ομοιόστασης του ανθρώπινου σώματος (Murphree, 2017).

Αποτελεί έναν ανθεκτικό και ταυτόχρονα ελαστικό, αυτοεπιδιορθούμενο φραγμό του σώματος προς το εν δυνάμει εχθρικό εξωτερικό περιβάλλον, ενώ προστατεύει τα εσωτερικά όργανα από εξωτερικούς κινδύνους, τοξικές ουσίες και παθογόνους μικροοργανισμούς (Gary P. Moss et al., 2015). Δέχεται συνεχώς το ένα τρίτο του συνολικού κυκλοφορόντος όγκου αίματος του σώματος, εμποδίζει την προς το εξωτερικό περιβάλλον απώλεια υγρών, ηλεκτρολυτών και απαραίτητων στοιχείων για την λειτουργία του οργανισμού (Elias, 1981). Ταυτόχρονα η πολύπλοκη δομή του συνθέτει την δυναμική διεπιφάνεια σύνδεσης του εσωτερικού του ανθρώπινου σώματος με το περιβάλλον του, με την βοήθεια των δομών πρόσληψης σημάτων που εδράζουν στις στοιβάδες του (Adone Baroni, 2012).

1.2. Λειτουργίες του Δέρματος

Αυτή η ιδιαίτερη διεπιφάνεια εμφανίζει πολύ σημαντικές λειτουργίες για την επιβίωση του οργανισμού, όπως: (Zaidi & Lanigan, 2010)(Igarashi et al., 2007)(Gary P. Moss et al., 2015)

Προστασία από το εξωτερικό περιβάλλον από διατμητικές δυνάμεις επί του σώματος που μπορούν να προκαλέσουν ηλεκτρικές και μηχανικές κακώσεις και κραδασμούς (κρούσης, τριβής).

Αδιαπέραστος φραγμός κατά την είσοδο βλαβερών χημικών ουσιών

Ομοιόσταση νερού και ηλεκτρολυτών με τη ρύθμιση της άδηλης απώλειας και της απορρόφησης νερού.

Πρώτη γραμμή ανοσολογικής απόκρισης *πριν* την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών με τη βοήθεια αντιμικροβιακών πεπτιδίων και πρωτεασών, αλλά και *κατά* την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, με την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, την χημειοταξία κυττάρων ειδικής ανοσίας και της αντιγονοπαρουσίασης σε αυτά (Elias, 2005)(Szöllősi, 2017)

Θερμορύθμιση του οργανισμού με την βοήθεια του αγγειακού δικτύου και των ιδρωτοποιών αδένων, αλλά και την μονωτική δράση του υποδόριου λίπους

Προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και την μεταλλαξογόνο δράση της επί των κυττάρων των ιστών του οργανισμού, με την παραγωγή μελανίνης από τα μελανινοκύτταρα.

Πρόσληψη ερεθισμάτων από το περιβάλλον με την βοήθεια του νευρικού δικτύου και των νευρικών εξαρτημάτων του δέρματος, όπως τα κύτταρα Merkel, οι θερμουποδοχείς και οι υποδοχείς πόνου, που συμβάλλουν στην αίσθηση της θερμότητας, της αφής, της πίεσης και του πόνου. Αποτελεί την **ψυχοαισθητική διεπιφάνεια** του σώματος με το περιβάλλον του. (Elias, 2005), (Murphree, 2017), (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Μεταβολισμός και απέκκριση ουσιών μέσω των μεταβολικών ενζύμων στην επιδερμίδα και την δερμίδα και με τη βοήθεια των αποκρινών και εκκρινών αδένων (Prausnitz et al., 2012).

Βιοσύνθεση δομικών πρωτεϊνών και λιπιδίων για τις δομές και τα εξαρτήματα του και συμμετοχή στην βιοσύνθεση της απαραίτητης για τον οργανισμό βιταμίνης D (Ehrhardt & Kim, 2008b).

1.3. Δομή του Δέρματος

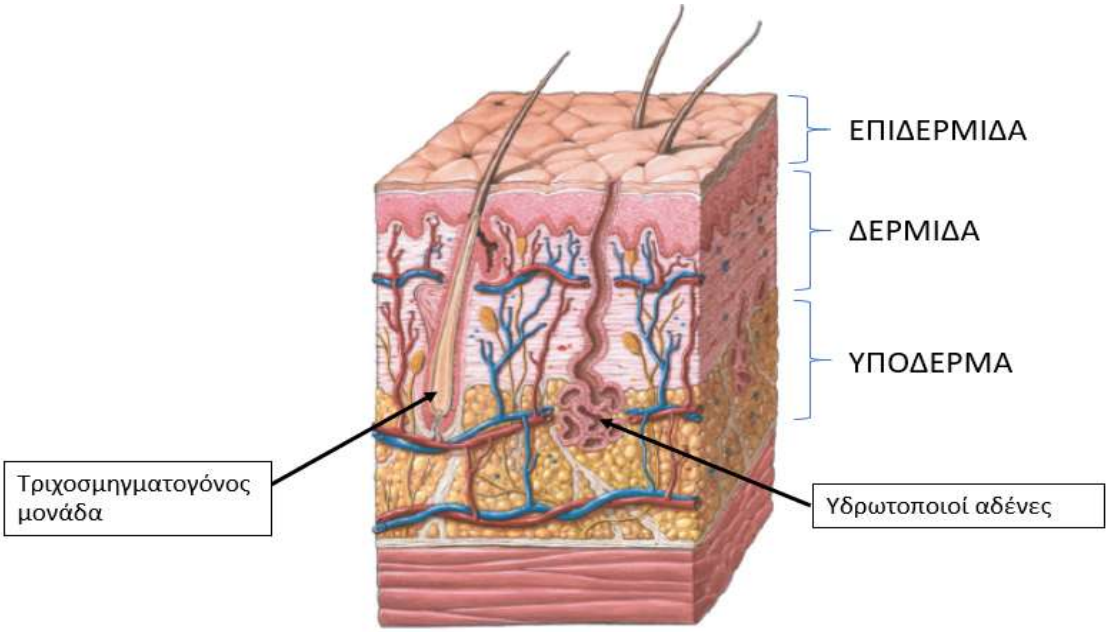
Οι παραπάνω αξιοσημείωτες λειτουργίες του δέρματος προκύπτουν από την ιδιαίτερη πολυστοιβαδική δομή του.

Το δέρμα αποτελείται από τρείς ευδιάκριτες και ετερογενείς περιοχές, κατά σειρά από την περιοχή που βρίσκεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον προς τις ενδότερες περιοχές:

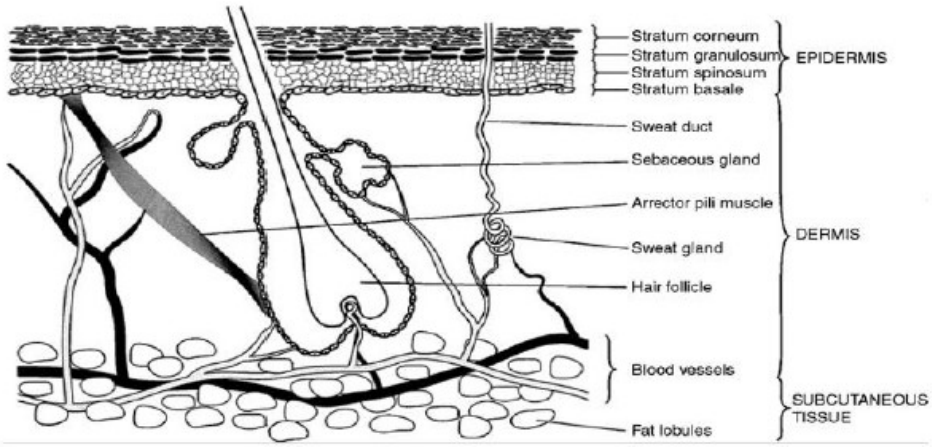
- Την επιδερμίδα (epidermis)
- Την δερμίδα ή χόριο (dermis)
- Το υπόδερμα ή υποδόριο ιστό (subcutaneous tissue)

Σε αυτές τις δομές εδράζουν και συνεπικουρούν εξαρτήματα όπως η τριχοσμηγματογόνος μονάδα, τα νύχια και οι ιδρωτοποιοί αδένες (Zaidi & Lanigan, 2010).

Για να κατανοήσουμε την λειτουργία του δέρματος θα πρέπει να δούμε την κάθε δομή και στοιβάδα ξεχωριστά.



Εικόνα Α 1. Η δομή του δέρματος (Igarashi et al., 2007)



Εικόνα Α 2. Διαγραμματική δομή της επιδερμίδας . Το Δέρμα και τα εξαρτήματα του (M. Sala & , A. Elaissari, 2018)

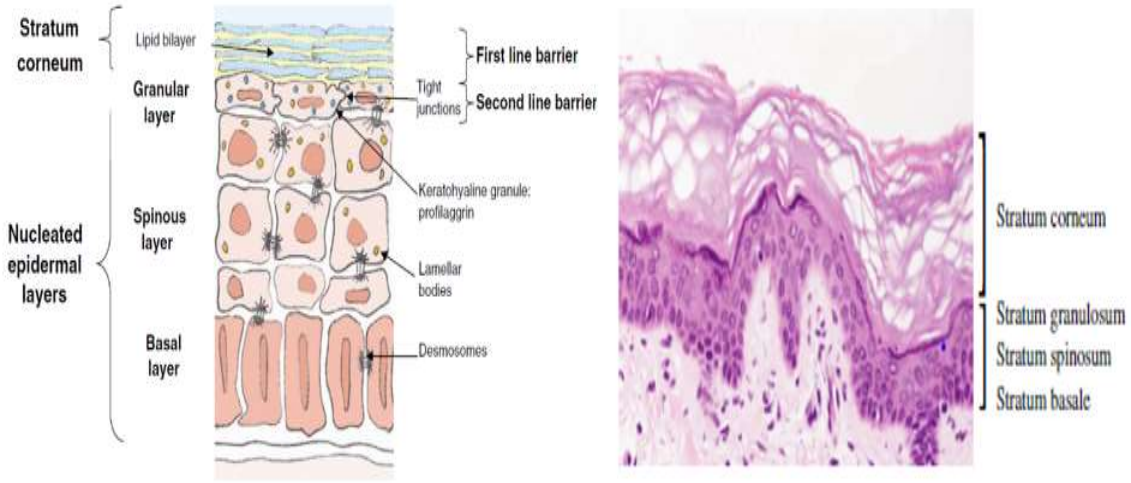
1.3.1. Επιδερμίδα

Η ανθρώπινη επιδερμίδα αποτελείται από 4 έως 5 στοιβάδες κυττάρων ανάλογα με την ανατομική περιοχή, που συντίθενται από 20 περίπου στρώματα κερατινοκυττάρων(Murphree, 2017). Το πάχος της κυμαίνεται από 0,06mm στο κινητό του βλεφάρου, έως 0,8mm στις παλάμες και τα πέλματα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Παρατηρώντας από την πλευρά που έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον προς τον δερμοεπιδερμιδικό σύνδεσμο συναντάμε (Ehrhardt & Kim, 2008a):

- Την κεράτινη στοιβάδα (Stratum corneum)
- Την υαλώδη ή διαυγή στοιβάδα (Stratum lucidum)
- Την κοκκιώδη στοιβάδα (Stratum granulosum)
- Την ακανθωτή στοιβάδα (Stratum spinosum)

- Την βασική στοιβάδα (Stratum Basale/ stratum germinatum)



Εικόνα Α 3. Δομή της επιδερμίδας άνευ υαλώδους στοιβάδας (Baroni et al., 2012) και η επιδερμίδα στο μικροσκόπιο ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης (Igarashi et al., 2007)

Η υαλώδης στοιβάδα απαντάται μόνο σε ανατομικές περιοχές που προορίζονται να δέχονται μεγάλη πίεση για την στήριξη και τη λειτουργία του σώματος, όπως οι παλάμες και τα πέλματα

Η επιδερμίδα δεν διαθέτει αγγεία αλλά δέχεται θρεπτικά συστατικά και από το χόριο, με το οποίο συνδέεται μέσω του **δερμοεπιδερμιδικού συνδέσμου**. (Zaidi & Lanigan, 2010)

Το 90% της επιδερμίδας αποτελείται από κερατινοκύτταρα. Απαντώνται ακόμη δενδριτικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας (Langerhans), κύτταρα Merkel που συνδέονται με την αίσθηση της αφής(H. A. E. Benson & Watkinson, 2011) και μελανινοκύτταρα που εδράζουν στην βασική στοιβάδα (Zaidi & Lanigan, 2010).

Ο κυτταρικός πληθυσμός της επιδερμίδας ανανεώνεται συνεχώς, καθώς τα ανώτερα στρώματα της κεράτινης στοιβάδας αποκολλώνται και αποπίπτουν από την επιφάνεια του σώματος, ενώ ταυτόχρονα αντικαθίστανται από νέα κύτταρα που ανέρχονται από τα κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας, ξεκινώντας από την βασική στοιβάδα. Αυτή είναι και η μόνη στοιβάδα της επιδερμίδας της οποίας τα κύτταρα υπόκεινται σε κυτταρική διαίρεση (Adone Baroni et al., 2012).Η περίσσεια κυττάρων στην βασική στοιβάδα ωθεί τα κύτταρα σε συνεχή μετανάστευση προς τις ανώτερες στοιβάδες (Houben et al., 2007)

Ανερχόμενα τα κύτταρα διαφοροποιούνται σταδιακά με την τελική διαφοροποίηση να επέρχεται φτάνοντας στην κεράτινη στοιβάδα οπού χάνουν τον πυρήνα τους. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι τέσσερις στοιβάδες της επιδερμίδας πλην της κεράτινης, καλώνται ζώσα επιδερμίδα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011)

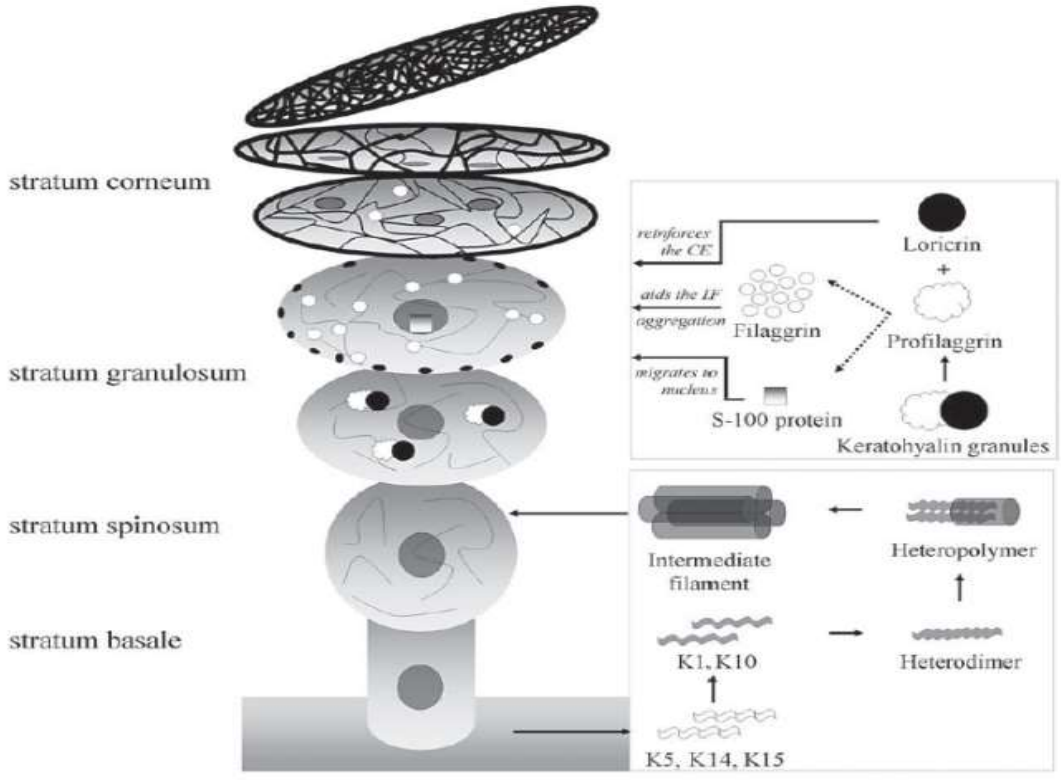
Η διαδικασία αυτή διαρκεί περί τις 29 ημέρες σε υγιές δέρμα, ενώ σε δέρμα με ψωρίαση ο χρόνος αυτός μειώνεται στις 8 ημέρες (Donnely & Singh, 2015). Αντίθετα, αύξηση του χρόνου μετάβασης και τελικής διαφοροποίησης παρατηρείται με την αύξηση της ηλικίας του οργανισμού (Murphree,

2017). Η μετακίνηση και διαφοροποίηση των κυττάρων από την βασική προς την κεράτινη στοιβάδα διαρκεί περίπου 14 ημέρες. Τις υπόλοιπες ημέρες τα κύτταρα τις περνούν στα εσωτερικά στρώματα της κεράτινης στοιβάδας (stratum compactum).

Τελευταίο βήμα για την απολέπιση και ανανέωση της εξωτερικής στοιβάδας της επιδερμίδας είναι, όπως θα δούμε παρακάτω, η πρωτεόλυση των **κορνεοδεσμοσωματίων**, των πρωτεϊνικών γεφυρών μεταξύ των κερατινοκυττάρων της κεράτινης στοιβάδας (stratum disjonctum) (Houben et al., 2007).

Κεράτινη στοιβάδα

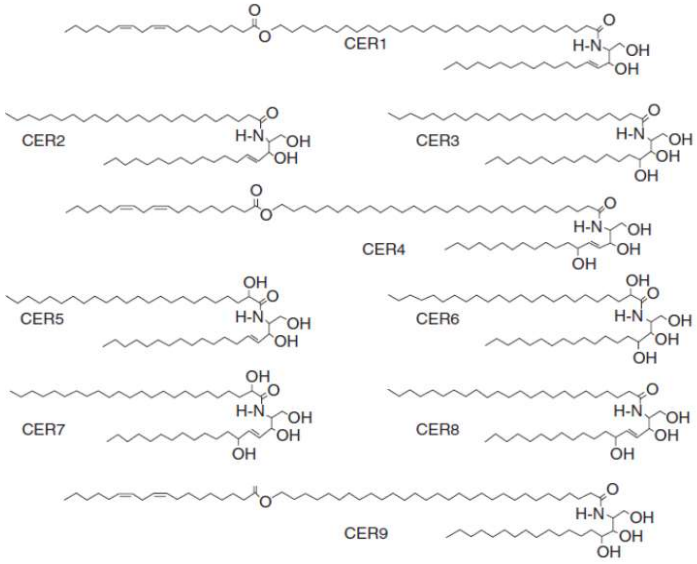
Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από συμπαγή πεπλατυσμένα κερατινοκύτταρα, πολυγωνικά έως εξαγωνικά, που αλληλεπικαλύπτονται και σχηματίζουν μία αδιαπέραστη δομή από αλλεπάλληλα 20 έως 25 στρώματα κερατινοκυττάρων (Hadgraft & Lane, 2011). Τα κερατινοκύτταρα συνδέονται στενά μεταξύ τους μέσω των **κορνεοδεσμοσωμάτων**, νηματία κορνεοδεσμοσίνης που αγκυρώνουν αμφίπλευρα στο κυτταρόπλασμα και τον πρωτεϊνικό φάκελο των κερατινοσωμάτων (Rawlings, 2010). Η πρωτεόλυση αυτών των νηματίων γίνεται από πρωτεάσες σερίνης που εκκρίνονται από τα ίδια τα κερατινοκύτταρα κατά την ωρίμανση τους από την συμπαγή κεράτινη στοιβάδα (stratum compactum), προς την αποπίπτουσα κεράτινη στοιβάδα (stratum disjonctum). Έτσι ελευθερώνονται τα γηρεότερα στρώματα κερατινοκυττάρων προς απολέπιση (Elias, 2005).Φυσιολογικός ρυθμός απολέπισης είναι περίπου 1 γραμμάριο μάζας κερατινοκυττάρων την ημέρα(Donnely & Singh, 2015).



Εικόνα Α 4. Σταδιακή κερατινοποίηση κερατινοκυττάρων και μορφολογικές αλλαγές από την Βασική προς την Κεράτινη στοιβάδα . Σημειώνεται ο ρόλος της προφιλαγγρίνης στην βιοσύνθεση των απαραίτητων λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας. (Houben et al., 2007)

Τα κερατινοκύτταρα της κεράτινης στοιβάδας έχουν απεκκρίνει τον πυρήνα τους και τα περιεχόμενα του στον μεσοκυττάριο χώρο, ενώ το κυτταρόπλασμά τους έχει γεμίσει πλήρως με υδρόφιλες πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα η κυτταρική μεμβράνη αυτών των κυττάρων έχει αντικατασταθεί από έναν φάκελο σταυρωτά συνδεδεμένων μορίων κερατίνης, λορικρίνης, μικρών πρωτεϊνών πλούσιων σε προλίνη, ελαφίνη και πρωτεΐνη δεσμοσωμάτων. Νημάτια κερατίνης και φιλαγκρίνης γεμίζουν το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υδρόφιλες, με δυνατότητα ενυδάτωσης που όμως διαταράσσει τον φραγμό, εάν υπερβεί το 15% όπως θα δούμε παρακάτω.

Η ενζυματική υδρόλυση της φιλαγκρίνης ελέγχει την ενυδάτωση της κεράτινης στοιβάδας, καθώς από αυτήν προκύπτουν τα συστατικά του Φυσικού Ενυδατικού Παράγοντα (Natural Moisturizing Factor) (Houben et al., 2007) Πρόκειται για υγροσκοπικά μόρια όπως ουρία, βασικά και ουδέτερα ελεύθερα αμινοξέα και παράγωγά τους όπως πυρολίδινοκαρβοξυλικό οξύ (PCA), γαλακτικό οξύ και ελεύθερα ιόντα.(Kwan et al., 2012) Τα τελευταία συνήθως έρχονται στην επιφάνεια της επιδερμίδας με την βοήθεια των εκκρινών ιδρωτοποιών αδένων (Hsu et al., 2017) Ο Φ.Ε.Π. κατακρατεί νερό από το εξωτερικό περιβάλλον και αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τον αρνητικά φορτισμένο πρωτεϊνικό φάκελο των κρατινοκυττάρων αλλά και τις διπλοστοιβάδες λιπιδίων που τα περιβάλλουν, προσφέροντας στην επιδερμίδα ελαστικότητα, σταθερή περιεκτικότητα νερού και ανθεκτικότητα (Kwan et al., 2012)



Εικόνα Α 5. Οι χημική δομή των κεραμιδίων της κεράτινης στοιβάδας. Τα κεραμίδια 1, 4 και 9 είναι ω-ακυλιωμένα με ένα μόριο λινολεϊκού οξέος που προσφέρει ρευστότητα στις μεμβράνες που σχηματίζουν (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

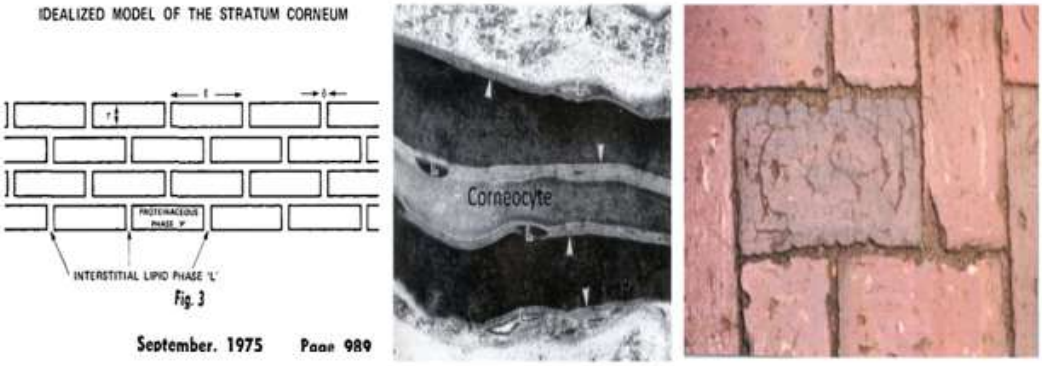
Στον μεσοκυττάριο χώρο των κερατινοκυττάρων βρίσκονται τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας, τα οποία έχουν προέλθει από την απέκκριση των περιεχομένων των μεμβρανωδών σωματίων (σωμάτια Odland) στον διακυττάριο χώρο. Αυτά είναι έντονα ενεργά στην κοκκιώδη στοιβάδα. Τα λιπίδια αυτά αποτελούνται κατά κύριο λόγο από κεραμίδια, χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Στην κεράτινη στοιβάδα απουσιάζουν πλήρως τα φωσφολιπίδια, σε αντίθεση με τους

υπόλοιπους ιστούς του σώματος. Τα κεραμίδια έχουν αντίστοιχη εστερική δομή με τα φωσφολιπίδια, αποτελούμενα από μία υδρόφοβη ουρά υδατανθρακικών αλυσίδων αποτελούμενες από 24 έως 36 άτομα άνθρακα, και μία υδρόφιλη κεφαλή λιπαρού οξέος (J. A. Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002a).

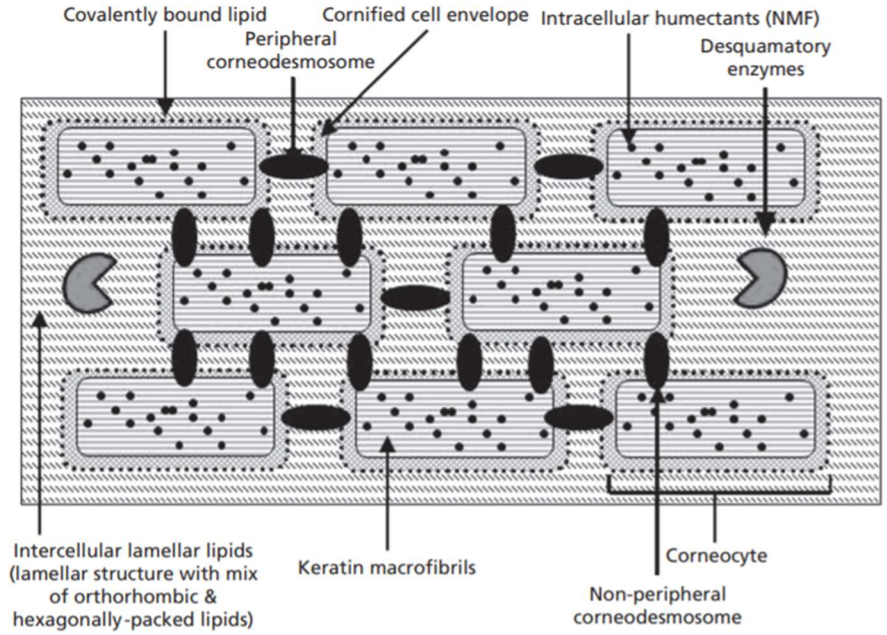
Όπως αναφέρθηκε, ο πρωτεϊνικός φάκελος των κερατινοκυττάρων φέρει αρνητικό φορτίο. Αυτό αποτελεί άριστο ικρίωμα για το σχηματισμό ενός υδρόφοβου λιπιδικού θετικά φορτισμένου φακέλου από N-ω-υδρόξυ-κεραμιδίων, γύρω από τα υδρόφιλα κερατινοκύτταρα. Ο τελικός σχηματισμός πρωτεϊνικού και λιπιδικού φακέλου αποτελεί τον σκελετό για τις διπλοστοιβάδες λιπιδίων του μεσοκυττάριου χώρου της κεράτινης στοιβάδας (Donnely & Singh, 2015).

Αυτό το μοντέλο περιγράφηκε πρώτα από το Michaels το 1975, ο οποίος παρομοίασε την κεράτινη στοιβάδα με τοίχο με τούβλα και κονίαμα (brick and mortar), οπού τα τούβλα είναι τα κερατινοκύτταρα και το κονίαμα τα λιπίδια του μεσοκυττάριου χώρου (Michaels & Shaw A. S. Chandrasekaran, 1975). Αργότερα έγινε κατανοητό πως τα λιπίδια του μεσοκυττάριου χώρου έχουν καλά οργανωμένη διάταξη ημιπερατών διπλοστοιβάδων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν νερό και σχηματίζουν μία μορφή sandwich (Joke A. Bouwstra & Ponec, 2006).

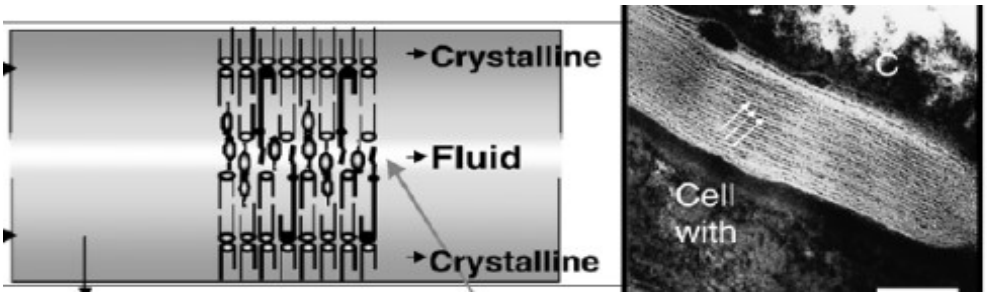
Πιο συγκεκριμένα, τα κεραμίδια της κεράτινης στοιβάδας προσανατολίζονται με τις μακριές κορεσμένες ουρές προς τη μία πλευρά και τις υδρόφιλες κεφαλές λιπαρών οξέων προς την αντίθετη και σχηματίζουν διπλοστοιβάδες. Στα κεραμίδια παρεμβάλλονται μόρια χοληστερόλης, ελεύθερα λιπαρά οξέα και θειική χοληστερόλη, αλλάζοντας την ρευστότητα των μεμβρανών. Παρατηρούνται έτσι αλλεπάλληλες περιοχές ορθορομβικής διάταξης λιπιδίων (συμπαγής φάση) και διάταξης λιπιδίων υπό μορφή υγρών κρυστάλλων (φάση πηκτώματος) (J. A. Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002)



Εικόνα Α 6. Από την θεώρηση του Micahels το 1975 στην επιβεβαίωση της με παρατήρηση στο μικροσκόπο (Michaels et al., 1975; Prausnitz et al., 2012)



Εικόνα Α 7. Εξέλιξη του μοντέλου τούβλα και κονίαμα στο πιο σύνθετο μοντέλο Sandwich (Rawlings, 2010)



Εικόνα Α 8. Ημιπερατές διπλοστοιβάδες λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας στο μοντέλο Sandwich των (Joke A. Bouwstra & Ponec, 2006).

Σχηματίζεται έτσι ένας σύνθετος και αδιαπέραστος φραγμός απαραίτητος για την επιβίωση του οργανισμού, που αποτελεί το περιοριστικό βήμα για την χορήγηση των περισσότερων ουσιών από το δέρμα (Godin & Touitou, 2007).

Υαλώδης ή διαυγής στοιβάδα

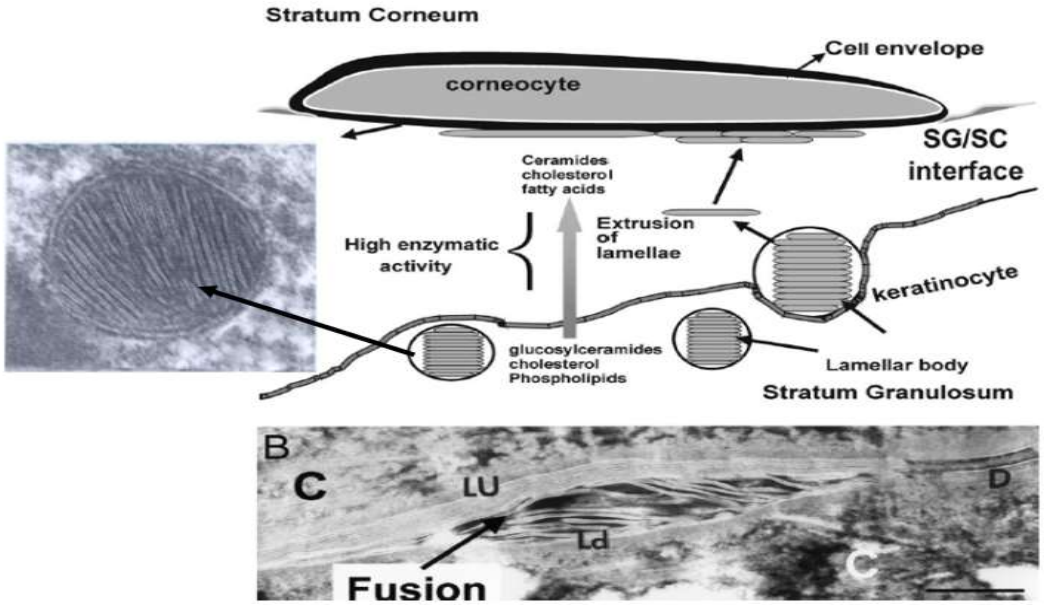
Η υαλώδης στοιβάδα απαντάται μόνο σε περιοχές που προορίζονται για να δεχθούν μεγάλη πίεση κατά την στήριξη του σώματος, όπως οι παλάμες και τα πέλματα, προσφέροντας μία ακόμη στοιβάδα στήριξης και προστασίας από της διατμητικές δυνάμεις (Zaidi & Lanigan, 2010).Βρίσκεται ακριβώς κάτω από την κεράτινη στοιβάδα και ακριβώς πάνω από την κοκκιώδη στοιβάδα.

Αποτελείται συνήθως από 7 σειρές πεπλατυσμένων και επιμηκών κερατινοκυττάρων, με πυκνό διαφανές κυτταρόπλασμα γεμάτο με κερατίνη. Ομοιάζουν αρκετά με τα κερατινοκύτταρα της κεράτινης στοιβάδας καθώς και αυτά αποτελούν προϊόν τελικής κυτταρικής διαφοροποίησης και έχουν χάσει τα οργανίδια και τον πυρήνα τους. Εμφανίζουν όμως μειωμένη αντοχή σε σχέση με

την κεράτινη στοιβάδα, με την οποία δρουν συνεργιστικά, ενώ απουσιάζουν οι διπλοστοιβάδες λιπιδίων του διακυττάριου χώρου. (Donnely & Singh, 2015).

Κοκκιώδης στοιβάδα

Η κοκκιώδης στοιβάδα βρίσκεται ακριβώς κάτω από την κεράτινη (ή την υαλώδη) στοιβάδα και ακριβώς πάνω από την ακανθωτή στοιβάδα. Αποτελείται από 3 με 4 στρώματα ζώντων ρομβοειδών κερατινοκυττάρων με πυκνό πυρήνα, οργανίδια και μεγάλο αριθμό μεμβρανωδών σωματίων ή αλλιώς **σωμάτια Odland** (Zaidi & Lanigan, 2010). Τα κοκκία αυτά δίνουν μία στικτή εικόνα στο μικροσκόπιο, εξ 'ου και η ονομασία κοκκιώδης στοιβάδα. Εκεί γίνεται η παραγωγή των λιπιδίων του εξωκυττάριου χώρου της κεράτινης στοιβάδας, όπου γλυκοσφιγγολιπίδια υδρολύονται και συνδυάζονται με ελεύθερα λιπαρά οξέα για να σχηματίζουν τα κεραμίδια. Μέσα στα σωμάτια Odland παρατηρείται ο πρώτος αυθόρμητος σχηματισμός λιπιδικών διπλοστοιβάδων (Baroni et al., 2012).



Εικόνα Α 9. Σύντηξη του σωματίου Odland με την κυτταρική μεμβράνη και απέκκριση των λιπιδικών διπλοστοιβάδων του στον διακυττάριο χώρο της κεράτινης στοιβάδας (J. A. Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002,)(Prausnitz et al., 2012)

Με αυτά συνυπάρχουν **κοκκία κερατοϋαλίνης**, πρόδρομου πρωτεΐνης της κερατίνης(H. A. E. Benson & Watkinson, 2011). Αυτά περιέχουν τα ένζυμα που θα συμμετάσχουν στον σχηματισμό του πρωτεϊνικού φακέλου των κερατινοκυττάρων της κεράτινης στοιβάδας και στην υδρόλυση της προφιλαγγρίνης σε φιλαγγρίνη. (Donnely & Singh, 2015) Στην διεπιφάνεια κεράτινης και κοκκιώδους στοιβάδας (**κερατινοκοκκιώδης διεπιφάνεια**) συμβαίνει η σύντηξη της μεμβράνης αυτών των σωματίων με την κυτταρική μεμβράνη των κερατινοκυττάρων και το περιεχόμενο τους απεκκρίνεται στον διακυττάριο χώρο. (Houben et al., 2007) Αυτό το φαινόμενο εκκινείται από την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου(Baroni et al., 2012).

Τα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας συνδέονται μεταξύ τους με του στενοσυνδέσμους (**tight junctions**). Αυτοί σχηματίζονται από τις πρωτεΐνες οκκλουδίνη και κλαουδίνη και σφραγίζουν την σύνδεση των γειτονικών κερατινοκυττάρων. Οι δομές αυτές ελέγχουν την άδηλη απώλεια νερού από την επιδερμίδα και σχηματίζουν ένα ακόμα αδιαπέραστο φραγμό στην διαπέραση ουσιών από το δέρμα (Baroni et al., 2012).

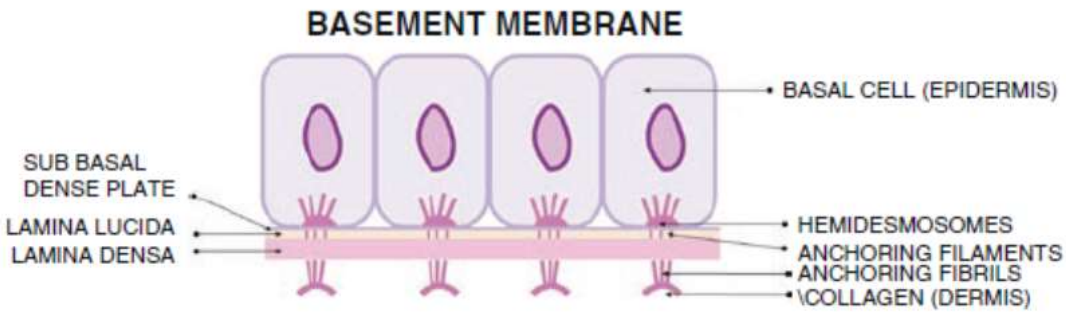
Ακανθωτή στοιβάδα

Η ακανθωτή στοιβάδα βρίσκεται ακριβώς κάτω από την κοκκιώδη στοιβάδα και ακριβώς πάνω από την βασική στοιβάδα. Αποτελείται από 8 με 10 στρώματα πολυεδρικών κερατινοκυττάρων με κεντρικό οβάλ πυρήνα. Σε αυτή την φάση διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων αρχίζουν και σχηματίζονται τα τονοϊνίδια κερατίνης (Zaidi & Lanigan, 2010). Χαρακτηριστικό αυτής της στοιβάδας είναι τα δεσμοσώματα, πρωτεϊνικές γέφυρες μεταξύ των κερατινοκυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, κάθε κερατινοκύτταρο συνδέεται με κάθε ένα γειτονικό του με τη βοήθεια επιμηκών πρωτεϊνικών δεματίων που ξεκινούν από την κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης των κερατινοκυττάρων. Τα δεσμοσώματα αποτελούνται από πλακογλωβίνη, δεσμοπλακίνη και πλακοφιλίνη στο κυττατοπλασματικό τμήμα και από καντχερίνες, όπως η δεσμογλεϊνη στο εξωκυττάριο σκέλος (Houben et al., 2007). Ο σχηματισμός αυτός δίνει μία εικόνα ακάνθων στο μικροσκόπιο, εξ ’ου και η ακανθωτή στοιβάδα (Murphree, 2017)(Walters, 2002)

Σε αυτήν την στοιβάδα συνυπάρχουν με τα κερατινοκύτταρα και τα **κύτταρα Langerhans**. Πρόκειται για αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα της ειδικής ανοσίας, που φέρουν αντιγόνο επιφάνειας MHC II. Έχουν αστεροειδές σχήμα και ανήκουν στα λευκά αιμοσφαίρια. Σε περίπτωση εισόδου πιθανού παθογόνου αντιγόνου σε αυτό το επίπεδο της επιδερμίδας, το φαγοκυτταρώνουν το παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους και στη συνέχεια μεταναστεύουν προς τους λεμφικούς κόμβους μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Ακόμη σε εκκρίνουν χημειοκίνες για την έναρξη της φλεγμονής (Valladeau & Saeland, 2005).

Βασική στοιβάδα

Η βασική στοιβάδα αποτελείται από μία σειρά κυλινδρικών κερατινοκυττάρων με βαθυχρωματικό πυρήνα, ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και τονοϊνίδια κυτταροπλασμίνης, τα οποία συνδέουν τα κύτταρα της επιδερμίδας μεταξύ τους. Βρίσκεται ακριβώς κάτω από την ακανθωτή στοιβάδα και ακριβώς πάνω από την δερμίδα. Με την τελευταία συνδέεται με τη βοήθεια **δερμοεπιδερμιδικού συνδέσμου (dermo-epidermal junction)**, μεμβρανώδους διάταξης μέσω της οποίας γίνεται η επικοινωνία από και προς την επιδερμίδα, με την δερμίδα και την αιματική κυκλοφορία. Σε αυτόν τον σχηματισμό τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας είναι αγκυρωμένα με την βοήθεια ημιδεσμοσωμάτων. Αυτά είναι παρόμοια με τα δεσμοσώματα της ακανθωτής στοιβάδας, με τη διαφορά ότι εδώ η κύρια πρωτείνη είναι η ημιδεσμοσωμίνη και στο ένα άκρο του νηματίου βρίσκεται ένα κερατινοκύτταρο και στο άλλο η μεμβράνη του συνδέσμου.



Εικόνα Α 10. Η βασική στοιβάδα και ο δερμοεπιδερμιδικός σύνδεσμος (Zaidi & Lanigan, 2010)

Ο **δερμοεπιδερμιδικός σύνδεσμος** φαίνεται να αποτελείται από δύο στοιβάδες, την διαυγή (lamina lucida) και την πυκνή (lamina densa). Η lamina lucida αποτελείται από την πρωτεΐνη λαμινίνη και βρίσκεται σε σύνδεση με την βασική στοιβάδα. Η lamina densa αποτελείται από ίνες κολλαγόνου τύπου 4 και έρχεται σε επαφή με την δερμίδα.(Zaidi & Lanigan, 2010)

Τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας χαρακτηρίζονται και ως βλαστικά κύτταρα, καθώς είναι τα μόνα που έχουν την δυνατότητα κυτταρικής διαίρεσης στην επιδερμίδα. Κατά την διαίρεσή τους ακολουθείται μοντέλο πληθυσμιακής ασυμμετρίας. Παρατηρείται ένας κύκλο 163 ωρών μεταξύ 2 επιτυχών μιτώσεων του ίδιου βλαστικού κυττάρου. Σε κάθε κύκλο μιτώσεων παράγονται οκτώ κερατινοκύτταρα έτοιμα προς κυτταρική διαίρεση και παραμένει πάντα ένα βλαστικό κύτταρο στην βασική μεμβράνη, έτοιμο για νέο κύκλο μιτώσεων. Στη συνέχεια αυτά προωθούνται προς τις ανώτερες στοιβάδες της επιδερμίδας (Houben et al., 2007).

Ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας συναντώνται ακόμη μελανινοκύτταρα και κύτταρα Merkel. Τα **κύτταρα Merkel** απαντώνται κοντά στην τριχοσμηγματογόνο μονάδα και συμμετέχουν στην αίσθηση της αφής. Φέρουν στο κυτταρόπλασμά τους νευροϊνίδια και κυστίδια με νευροπεπτίδια, αλλά και τονοϊνίδια κερατίνης. Φαίνεται να συνδέονται με προσαγωγές νευρικές απολήξεις (Valladeau & Saeland, 2005) .

Για κάθε 10 κερατινοκύτταρα απαντάται ένα **μελανινοκύτταρο** στη βασική μεμβράνη. Πρόκειται για δενδριτικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή την μελανίνης από το αμινοξύ τυροσίνη, με την βοήθεια του ενζύμου τυροσινάση. Η μελανίνη είναι ένα μεγάλο έγχρωμο μόριο που απορροφά στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας. Απαντάται σε δύο μορφές, την κόκκινη φαιομελανίνη και την μαύρη έως καφέ ευμελανίνη (D'Orazio et al., 2013). Καθώς τα μελανινοκύτταρα ανήκουν στα δενδριτικά κύτταρα εμφανίζουν εκτεταμένους δενρίτες, απολήξεις της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος τους, οι οποίοι εκτείνονται μέχρι την κοκκιώδη στοιβάδα. Στον μεσοκυττάριο χώρο αυτής εκκρίνουν την μελανίνη με τα κυστίδια στα οποία παράγεται, τα μελανοσώματα. Αυτά διατάσσονται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης των εμπύρηνων κερατινοκυττάρων με προσανατολισμό προς την εξωτερική

επιφάνεια του δέρματος, με στόχο την προστασία του γενετικού υλικού του πυρήνα, που είναι επιρρεπές σε οξειδωτικές βλάβες δεχόμενο ενέργεια από την υπεριώδη ακτινοβολία. Έτσι προλαμβάνονται βλάβες μεταλλάξεις που οδηγούν σε κυτταρική γήρανση και νεοπλασίες (Zaidi & Lanigan, 2010).

Ο αριθμός των μελανινοκυττάρων σε κάθε άτομο είναι σταθερός. Οι διαφορές στον φωτότυπο, αλλά και ασθένειες που χαρακτηρίζονται από απουσία μελανίνης όπως ο αλφισμός, εξαρτώνται από τον τύπο και την παραγούμενη ποσότητα μελανίνης, αλλά και από μεταλλάξεις στα ένζυμα που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης. Ο τύπος και η ποσότητα μελανίνης που θα παραχθεί εξαρτάται από τον άξονα MSH (Ορμόνης ενεργοποίησης μελανινοκυττάρων) – MC1R (Υποδοχεά μελανοκορτίνης), ο οποίος ρυθμίζεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα (D'Orazio et al., 2013).

1.3.2. Δερμίδα ή Χόριο

Η δερμίδα έχει πάχος 3 έως 5 mm, περίπου 20 φορές μεγαλύτερο από αυτό της επιδερμίδας(Donnely & Singh, 2015). Βρίσκεται ακριβώς κάτω από τον δερμοεπιδερμιδικό σύνδεσμο. Με τη βοήθεια αυτής της δομής σχηματίζει εσοχές της επιδερμίδας στην μάζα της και εξοχές δερμίδας στην μάζα της επιδερμίδας για να αυξηθεί η συνοχή των δύο δομών και η αντοχή σε οριζόντιες διατμητικές δυνάμεις. (Prost-Squarcioni, 2006)

Η σύσταση της δερμίδας είναι πολύ διαφορετική από αυτήν της επιδερμίδας, καθώς αποτελείται κυρίως από ινοβλάστες, χαλαρά συνδεδεμένους μεταξύ τους και την μήτρα του εξωκυττάριου χώρου. Οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ινών κολλαγόνου και ελαστίνης και των συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Η εξωκυττάρια μήτρα (Extracellular Matrix) αποτελείται από ένα δίκτυο ινών κολλαγόνου (κυρίως τύπου I και III) και ελαστίνης που αποτελεί τον σκελετό για μία μάζα υδρόφιλων γλυκοζαμινογλυκάνων και γλυκοπρωτεϊνών που κατακρατούν νερό και σχηματίζουν πήκτωμα, τη Θεμέλια Ουσία. (Lai-Cheong & McGrath, 2013) Οι ίνες κολλαγόνου είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές, μη ελαστικές και προσφέρουν αντοχή. Οι ίνες ελαστίνης έχουν την ικανότητα να εκτείνονται έως και 10 φορές κατά μήκος και να επανέρχονται άμεσα και χωρίς βλάβες στην αρχική τους κατάσταση. Αυτή τους ιδιότητα εξασφαλίζει την ελαστική επαναφορά του δέρματος ύστερα από μηχανική παραμόρφωση (Zaidi & Lanigan, 2010).

Η δερμίδα χωρίζεται περαιτέρω στο θηλώδες χόριο και το δικτυωτό χόριο. Το θηλώδες χόριο βρίσκεται σε επαφή με τον δερμοεπιδερμικδικό σύνδεσμο, οπου προσδένονται ινίδια αγκύρωσης κολλαγόνου τύπου VII και συνδέουν τη lamina densa με το χόριο, και την επιδερμίδα με την δερμίδα. Στο θηλώδες χόριο επικρατεί η εξωκυττάριος μήτρα ενώ απαντώνται και λίγες ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης (Murphree, 2017)

Το δικτυωτό χόριο βρίσκεται κάτω από το θηλώδες και πάνω από τον υποδόριο ιστό. Σε αυτό το δίκτυο ινών κολλαγόνου και ελαστίνης είναι αυστηρά οργανωμένο και συμπαγές(Lai-Cheong & McGrath, 2013).

Στο χόριο επίσης εδράζουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα δερματικά δενδριτικά κύτταρα, πλασματοκύτταρα τα ιστιοκύτταρα. αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα φυσικής ανοσίας. Τα ιστιοκύτταρα περιέχουν κοκκία χημειοκινών και παραγόντων φλεγμονής όπως η ισταμίνη και η ηπαρίνη, τους οποίους απεκκρίνουν μαζικά στον μεσοκυττάριο χώρο σε περίπτωση προσβολής του ιστού από εξωτερικό παθογόνο παράγοντα(Valladeau, Saeland, Krug, Szöllősi, Oláh, Bíró, Tóth, Newton, Dixit, Murphree, Houben, De Paepe, Rogiers, Hadgraft, Valenta, Elias, Walters, Bouwstra, Ponec, Honeywell-Nguyen, Marjukka Suhonen, A. Bouwstra, & Urtti, 2017).

Σε αυτήν την δομή εντοπίζονται και εξαρτήματα του δέρματος, όπως η τριχοσμηγματογόνος μονάδα, η μήτρα των νυχιών, οι ιδρωτοποιοί και οι εκκρινείς αδένες (Hsu et al., 2017). Η δερμίδα φιλοξενεί επίσης τις νευρικές απολήξεις του επιπολής νευρικού δικτύου αλλά και καψυλιωμένες δομές νευρικών κυττάρων όπως τα σωμάτια Parcini, που αντιλαμβάνονται δονήσεις, και τα σωμάτια Meisner, που σχετίζονται με την αφή και αντιλαμβάνονται αλλαγές στην πίεση επί του δέρματος (Lai-Cheong & McGrath, 2013). Άλλοι υποδοχείς νευρικής φύσεως στην δερμίδα είναι οι υποδοχείς πόνου (nociceptors) και οι θερμοϋποδοχείς, που προστατεύουν τον οργανισμό από μηχανικές και θερμικές βλάβες(Donnely & Singh, 2015).

Η δερμίδα περιέχει δίκτυο αιμοφόρων αγγείων που διακρίνεται σε επιπολής και εν τω βάθει δίκτυο, και συμμετέχει στην θερμορύθμιση και στην μεταφορά ουσιών από και προς το δέρμα. Το δίκτυο αυτό συνοδεύεται από το αντίστοιχο δίκτυο λεμφαγγείων για την απομάκρυνση ουσιών και την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε ερεθίσματα από το δέρμα (Zaidi & Lanigan, 2010).

1.3.3. Υποδόριος Ιστός

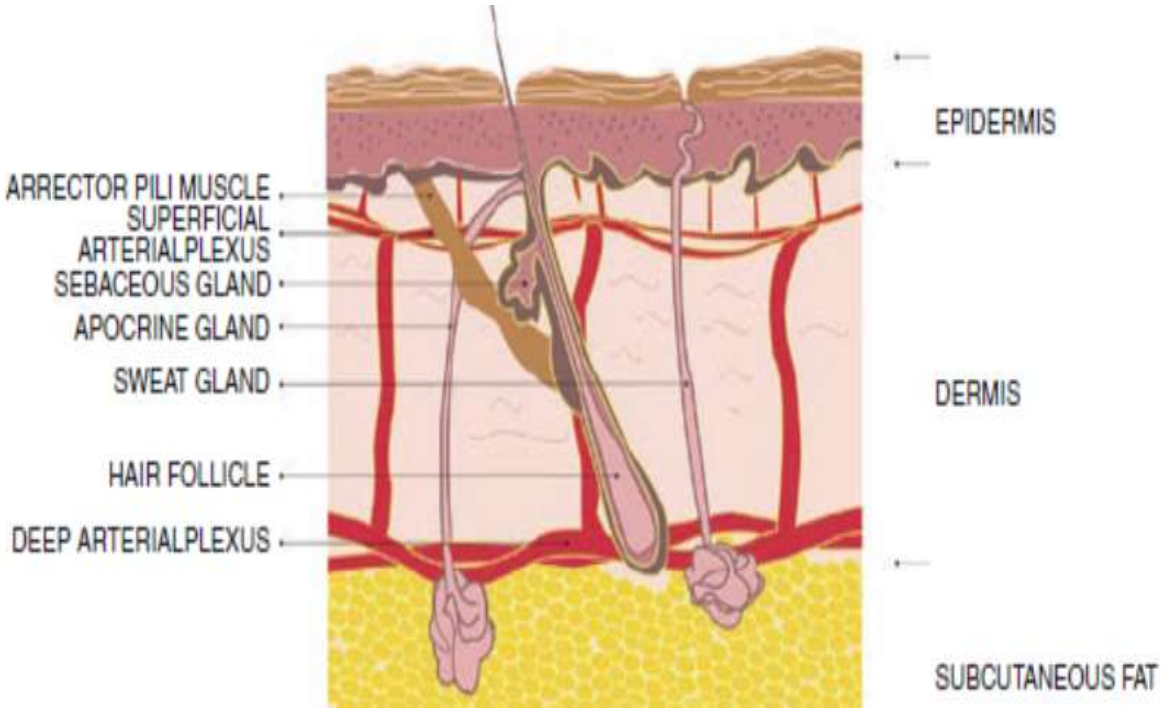
Ο υποδόριος ιστός αποτελείται κυρίως από αδιποκύτταρα και συνδετικό ιστό, ανάμεσα στα οποία οργανώνονται αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, αλλά και νευρικές απολήξεις παρόμοιες με αυτές που φιλοξενούνται στην δερμίδα (Murphree, 2017). Το πάχος του κυμαίνεται από 2 έως 30 mm, ανάλογα την ανατομική περιοχή του σώματος, την ηλικία και το φύλο. Εμφανίζει μέγιστο πάχος στους γλουτούς, τις παλάμες και τα πέλματα, ενώ στην περιοχή του όσχεου δεν υφίσταται.

Ο συνδετικός ιστός αποτελείται από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης όπως η δερμίδα. Εδώ όμως, έχει ρομβοειδή διάταξη πάνω στην οποία σχηματίζονται λοβοί λιποκυττάρων . Η διάταξη αυτή προσφέρει μηχανική υποστήριξη στο δέρμα απορροφώντας μηχανικές πιέσεις και κραδασμούς, συμμετέχει στη θερμομόνωση του οργανισμού, λόγω των θερμικών ιδιοτήτων των λιποκυττάρων και επιτρέπει στους υποκείμενους ιστούς να διολισθαίνουν κάτω από την επιδερμίδα Ο

υποδόριος ιστός λειτουργεί και ως αποθήκη ενέργειας με τη μορφή λίπους στα λιποκύτταρα που φιλοξενεί (Zaidi & Lanigan, 2010).

1.3.4. Εξαρτήματα του δέρματος

Στα εξαρτήματα του δέρματος συγκαταλέγονται η τριχοσμηγματογόνος μονάδα, οι εκκρινείς αδένες, οι αποκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες και τα νύχια.



Εικόνα Α 11. Η δομή του δέρματος και τα εξαρτήματά του

Τριχοσμηγματογόνος μονάδα

Η τριχοσμηγματογόνος μονάδα αποτελείται από το στέλεχος της τρίχας, το τριχικό θηλάκιο, τον σμηγματογόνο αδένα και τον ορθωτήρα μύ της τρίχας. Στο τριχικό θηλάκιο απορρέουν και οι αποκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες.

Ο μέσος ενήλικας φέρει περίπου πέντε εκατομμύρια τριχοσμηγματογόνους μονάδες, σε όλη την επιφάνεια του δέρματος, εκτός από τα πέλματα, τις παλάμες και την ονυχοφόρο πλάκα. Οι τρίχες είναι επιμήκεις κερατινοποιημένες δομές με σχήμα κυλινδρικό, που προβάλλουν στην επιφάνεια του δέρματος. Διακρίνονται σε :

- Λανούγκο τρίχες, που σχηματίζονται κατά την εμβρυακή ανάπτυξη και αποπίπτουν σύντομα μετά την γέννηση
- Λεπτές τρίχες που είναι κοντές, ελαφρώς χρωματισμένες και απαντώνται κυρίως στην επιφάνεια του σώματος
- Τελικές τρίχες, τραχείς, μακριές και έντονα χρωματισμένες που εδράζουν στο τριχωτό της κεφαλής (Donnely & Singh, 2015)

Στο τριχικό θηλάκιο παρατηρούμε δύο ενδιαφέρουσες περιοχές, τον βολβό της τρίχας και την περιοχή του bulge. Στο **βολβό της τρίχας** κερατινοκύτταρα της βασικής στοιβάδας απεκρίνουν τον πυρήνα τους και γεμίζουν με ίνες κερατίνης και μελανοσώματα που τη χρωματίζουν. Στην περιοχή αυτή παρατηρείται προεκβολή του χόριου με πλούσια αιμάτωση και νεύρωση για την θρέψη της τρίχας. Η τρίχα αποτελείται από τρείς διακριτές περιοχές από το κέντρο προς τα έξω, τον φλοιό, τον μυελό και το επιφανειακό κάλυμμα (περιτρίχιο), και από τον βολβό προς την επιφάνεια του δέρματος, την ρίζα και το στέλεχος. Ο μυελός της τρίχας ενδέχεται να απουσιάζει, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης της τρίχας. Στην ρίζα της τρίχας καταφύεται και ο ορθωτήρας μύς της τρίχας, που είναι υπεύθυνος για την ανόρθωση της τρίχας σε ψυχρό κλίμα, με στόχο τον σχηματισμό μονωτικού στρώματος αέρα στην επιφάνεια του σώματος (Zaidi & Lanigan, 2010).

Η **περιοχή του bulge**, βρίσκεται στο τοίχωμα του τριχικού θηλακίου, χαμηλότερα του σμηγματογόνου αδένα. Σε αυτήν βρίσκονται τα βλαστικά κύτταρα της τρίχας, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επιδιόρθωση και την ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων του τριχικού θηλακίου, αλλά και τον σχηματισμό νέων τριχών (Houben et al., 2007). Με αυτόν τον τρόπο, ο τριχικός θήλακας συμμετέχει και στην επούλωση του δέρματος ύστερα από βλάβη, με προσφορά νέων βλαστικών κυττάρων που μετακινούνται πλάγια προς την περιοχή της βλάβης (Lai-Cheong & McGrath, 2013)

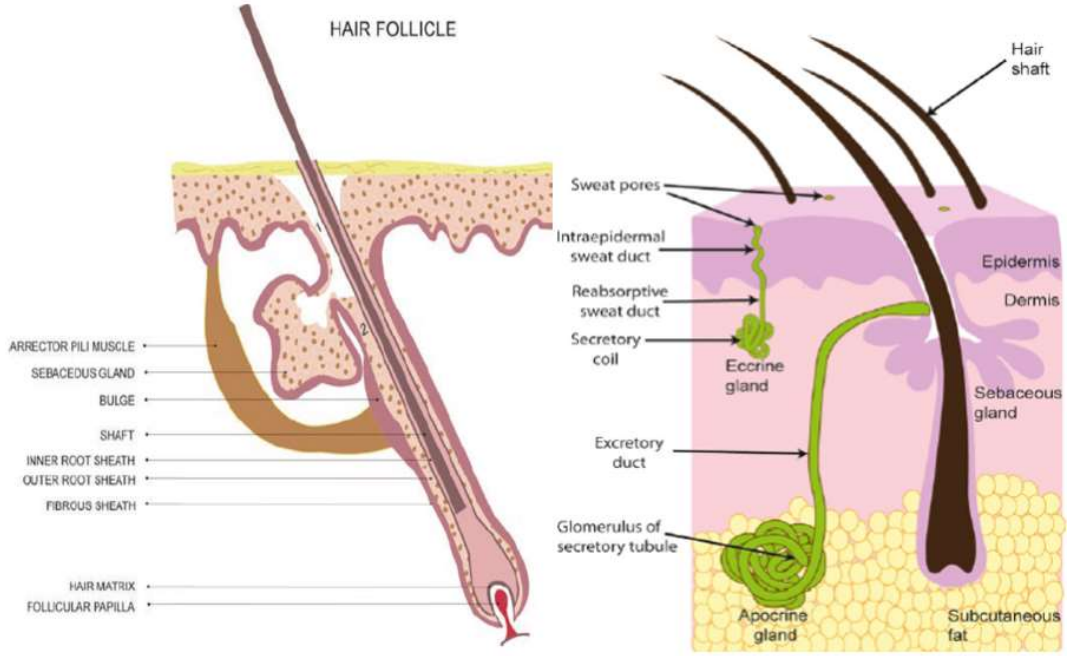
Σμηγματογόνοι αδένες παρατηρούνται πάντα συνοδεία τριχικού θυλακίου. Εμφανίζονται με μεγαλύτερη πυκνότητα ανά επιφάνεια δέρματος στο πρόσωπο, το τριχωτό της κεφαλής, την πλάτη και το στέρνο, ενώ απουσιάζουν από τα βλέφαρα και την περιγεννετική περιοχή.

Ο **σμηγματογόνος αδένας** είναι ένας αποκρινής αδένας καθώς εκκρίνει το περιεχόμενό του στο τριχικό θηλάκιο και όχι απευθείας στην επιφάνεια της επιδερμίδας. Αποτελεί μία εγκόλπωση της επιδερμίδας από όπου απουσιάζει η κεράτινη στοιβάδα, όπου διακρίνεται το αδενικό σώμα και ο εκφορητικός πόρος (Zaidi & Lanigan, 2010). Τα κερατινοκύτταρα του σμηγματογόνου αδένα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων, πρωτεολυτικών ενζύμων που συμμετέχουν στην απολέπιση και του μίγματος λιπιδίων που ονομάζεται σμήγμα.

Το σμήγμα αποτελείται από σκουαλένιο, εστέρες κηρών, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά(Donnely & Singh, 2015). Απεκκρίνεται με την λιπώδη εκφύλιση και διάρρηξη των κερατινοκυττάρων προς το τριχικό θυλάκιο. Από εκεί , μαζί με το έκκριμα των ιδρωτοποιών αδένων, προσέρχεται στην επιφάνεια του δέρματος όπου, συμβάλει στην αντιμικροβιακή προστασία με τα πεπτίδια, προσφέρει λίπανση, αδιαβροχοποίηση και ελαστικότητα, εμπλουτίζει το λιπιδικό φραγμό της κεράτινης στοιβάδας (Proksch et al., 2008).

Η παραγωγή του σμήγματος ελέγχεται από ορμόνες του φίλου, ανδρογόνα και κορτιζόλη, μέσω των PARR υποδοχέων, ενώ αποτελεί τροφή για μικροοργανισμούς όπως το Cutibacterium acnes.

Υπερβολική ή μειωμένη παραγωγή σμήγματος, μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για την υγεία του δέρματος (Feingold & Elias, 2014).



Εικόνα Α 12. (Αριστερά) η δομή της τριχοσμηγματογόνου μονάδας με τον ορθωτήρα μύ (Zaidi & Lanigan, 2010).(Δεξιά) Εκκρινείς και αποκρινείς (ιδρωτοποιοί) αδένες σε σχέση με την τριχοσμηγματογόνο μονάδα (Hsu et al., 2017)

Ιδρωτοποιοί αδένες

Οι ιδρωτοποιοί αδένες είναι εκκρινείς αδένες Εδράζουν στην δερμίδα και το έκκριμά τους απορρέει μέσω του εκφορητικού τους πόρου απευθείας στην επιφάνεια του δέρματος (Donnely & Singh, 2015).

Ο ιδρώτας είναι ένα γαλακτώδες και ελαφρώς όξινο υδατικό μίγμα που αποτελείται από ηλεκτρολύτες όπως χλώριο, νάτριο, κάλιο γαλακτικό οξύ, ουρία, αμμωνία και αμινοξέα. Συμμετέχει στην ρύθμιση του pH του ιστού, στην ενυδάτωση με την ουρία και κάποια αμινοξέα που είναι μέρος του ΦΕΠ (NMF), στην θερμορύθμιση του σώματος, ψύχοντας το δέρμα με την εξάτμισή του, και στην ρύθμιση των ηλεκτρολυτών. Ο ιδρώτας είναι άοσμος κατά την έκκριση του, ενώ αποκτά την χαρακτηριστική του οσμή αφού αλληλεπιδράσει με το μικροβίωμα του κάθε ατόμου (Proksch et al., 2008).

Στην επιφάνεια του δέρματος ο ιδρώτας αλληλεπιδρά με τα λιπίδια του εξωκυττάριου χώρου της κεράτινης στοιβάδας και σχηματίζει έναν «όξινο μανδύα». Ο μανδύας αυτός απαρτίζεται από ένα φυσικό γαλάκτωμα σμήγματος και ιδρώτα με ελαφρώς όξινο pH, που εμποδίζει την διείσδυση ουσιών στην επιδερμίδα. Κάθε ουσία για να διεισδύσει στην επιδερμίδα θα πρέπει πρώτα να κατανεμηθεί στο φυσικό αυτό γαλάκτωμα. Η παρουσία υδρόφιλων και λιπόφιλων στοιχείων σε αυτό, αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα για την κατανομή λιπόφιλων αλλά και υδρόφιλων ουσιών (M.E. Lane, 2013).

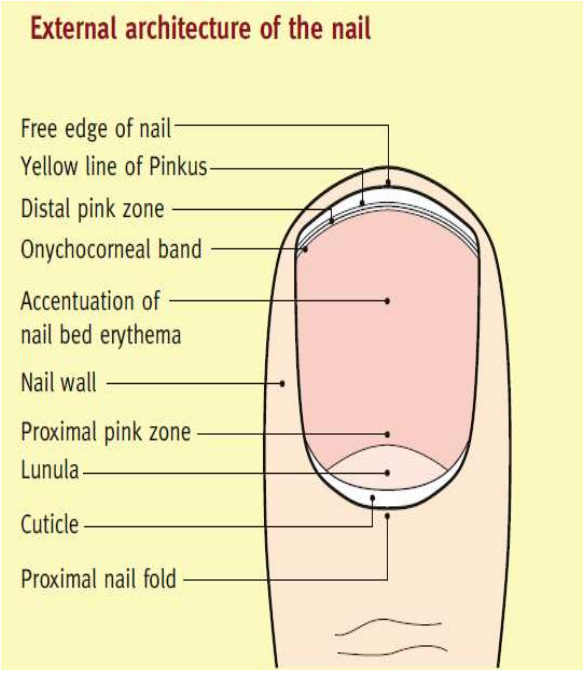
Η μεγαλύτερη εντόπιση ιδρωτοποιών αδένων βρίσκεται στις μασχάλες, στο μέτωπο και στα πέλματα. Η έκκριση του ιδρώτα ελέγχεται από το αυτόνομο νευρικό σύστημα με προσαγωγές χολινεργικές νευρικές ίνες. Απαντά σε ερεθίσματα θερμορυθμιστικά, συγκινησιακά αλλά και γευστικά, ενώ δρουν επικουρικά με το λεμφικό σύστημα για την απέκκριση ουσιών από το σώμα (Hsu et al., 2017).

Αποκρινείς αδένες

Οι Αποκρινείς αδένες εντοπίζονται κυρίως στην περιγεννετική περιοχή και τις μασχάλες. Εδράζουν στον υποδόριο ιστό και μέσω του εκφορητικού τους πόρου, εκκρίνουν τον ιδρώτα προς το τριχικό θυλάκιο. Από εκεί μαζί με το σμήγμα, το έκκριμα μεταφέρεται στην επιφάνεια του δέρματος (Donnely & Singh, 2015). Η έκκριση αυτή ελέγχεται από τις ορμόνες του φύλου και ενεργοποιείται κατά την εφηβεία. Εμφανίζουν περιοδικότητα στην έκκριση η οποία εξαρτάται από την σεξουαλική διέγερση και από το έντονο στρες. Το έκκριμά τους έχει έντονη οσμή και συνδέεται με την γενετήσια ορμή και έλξη (Hsu et al., 2017).

Νύχια

Όπως οι τρίχες έτσι και τα νύχια είναι κερατινοποιημένες επιθηλιακές δομές. Αποτελούνται από:



Εικόνα Α 13. Η δομή των ονύχων (Lai-Cheong & McGrath, 2013).

- Την μήτρα, ημισελινοειδή δομή που αποτελείται από εξειδικευμένα κερατινοκύτταρα που παράγουν την ονυχαία πλάκα.
- Την ονυχαία πλάκα, παραλληλόγραμμή δομή ονυχοκυττάρων, πλήρως κερατινο-ποιημένων κερατινοκυττάρων. που αναπτύσσεται από την μήτρα προς το άκρο της φάλαγγας του δακτύλου.
- Τις ονυχαίες επιθηλιακές πτυχώσεις, που προστατεύουν τα άκρα και την μήτρα του όνυχος
- Το ελεύθερο άκρο
- Το έδαφος του όνυχα, που βρίσκεται κάτω από την ονυχαία πλάκα και κερατινοποιείται συνεχώς για να στηρίζει και να διατηρεί συνοχή με την πλάκα.

Η κερατίνη των ονύχων διαφέρει από την κερατίνη της κεράτινης στοιβάδας καθώς είναι πλούσια σε κυστίνη, που την καθιστά αρκετά σκληρότερη. Το λιπιδικό περιεχόμενο των ονύχων κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 1%, ενώ το υδατικό τους περιεχόμενο από 7 έως 12% (Proksch et al., 2008).

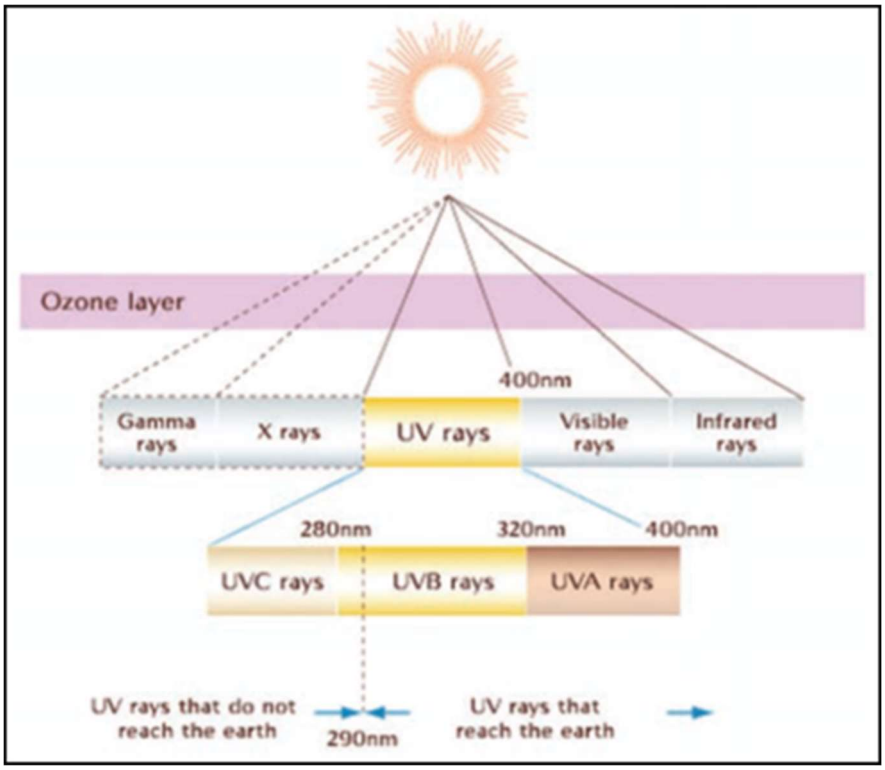
Τα νύχια προστατεύουν τις φάλαγγες των δακτύλων, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχουν και στην αίσθηση της αφής (Lai-Cheong & McGrath, 2013).

2. UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ ΚΑΙ ΔΕΡΜΑ

2.1. Υπεριώδης ακτινοβολία

Το ηλιακό φως αποτελείται από ένα συνεχές φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας το οποίο χωρίζεται σε τρεις κύριες περιοχές μήκους κύματος, υπεριώδης (UV), ορατή και υπέρυθρη. Η ακτινοβολία UV περιλαμβάνει τα μήκη κύματος από 200 έως 400 nm και εύρος μήκους κύματος μόλις μικρότερο από αυτό του ορατού φωτός (400-700 nm). Η υπεριώδης ακτινοβολία διαιρείται περαιτέρω σε τρία τμήματα, καθένα από τα οποία έχει ξεχωριστές βιολογικές επιδράσεις: Τα τμήματα αυτά είναι τα εξής (Nichols & Katiyar, 2010):

- UVA (320-400 nm)
- UVB (280-320 nm)
- UVC (200-280 nm)



Εικόνα Α 14. Το φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας στο ηλιακό φως (Αριτζίδου, 2018)

Η UVC ακτινοβολία εμποδίζεται να φθάσει στην επιφάνεια της γης από τη στιβάδα στρατοσφαιρικού όζοντος, αν και μπορεί να προκύψει τυχαία έκθεση από τεχνητές πηγές, όπως μικροβιοκτόνες λυχνίες. Η UVB και UVA, φθάνουν στην επιφάνεια της Γης σε ποσότητες επαρκείς ώστε να έχουν σημαντικές βιολογικές συνέπειες για το δέρμα και τα μάτια (Pillai et al., 2005).

2.2. Οξειδωτικό στρες επαγόμενο από UV ακτινοβολία

2.2.1. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται, οποιοδήποτε είδος έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, ένα εκ των οποίων καταλαμβάνει μόνο του ένα τροχιακό. Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει το άτομο του υδρογόνου, τα περισσότερα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, και το μόριο του οξυγόνου. Ο αυστηρός ορισμός των ελευθέρων ριζών θέλει το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε τροχιακό της εξωτερικής στοιβάδας των ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να αποκλείει πολλά ιόντα μετάλλων μετάπτωσης. Ωστόσο, δεδομένου του βιολογικού ρόλου των εν λόγω ιόντων, ο οποίος συχνά σχετίζεται με την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, προτιμάται ο λιγότερο περιοριστικός ορισμός (Masaki, 2010).

Το οξυγόνο της ατμόσφαιρας σχηματίζει ιδιαίτερα εύκολα ελεύθερες ρίζες καθώς φέρει στο εξωτερικό τροχιακό του δύο ηλεκτρόνια με παράλληλο σπιν. Η απόσπαση ηλεκτρονίων από αυτό το τροχιακό γίνεται κατά μόνας με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μορφές οξυγόνου με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στοιβάδα, έτοιμο να αποσπάσει ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια για να σχηματίσει ζεύγος. Οι μορφές αυτές ονομάζονται Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) και έχουν την τάση να γενούν νέες ελεύθερες ρίζες και να προκαλούν αντιδράσεις οξείδωσης στα γύρω μόρια. Εάν αυτά τα μόρια είναι δομικά συστατικά του κυττάρου, με την οξείδωσή τους μεταβάλλεται η λειτουργικότητά τους και άρα η υγεία του κυττάρου (Nishigori et al., 2004).

Μία ελεύθερη ρίζα γεννάται όταν κάποια μορφή εξωτερικής ενέργειας προσφέρει κβαντισμένη ενέργεια στα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας του μορίου και το εξαναγκάσει να διαφύγει αφήνοντας ένα μονήρες ηλεκτρόνιο πίσω του. Στη συνέχεια αυτή η ελεύθερη ρίζα θα δημιουργήσει αλυσιδωτές αντιδράσεις είτε μεταφέροντας το μονήρες ηλεκτρόνιο της σε ένα άλλο μόριο σύμφωνα με την εξίσωση 1, είτε συνδεόμενη με ένα άλλο μόριο και δημιουργώντας ένα νέο μόριο με μονήρες ηλεκτρόνιο, όπως στην εξίσωση 2.

$$R^{\cdot} + A \rightarrow R + A^{\cdot}$$

Εξίσωση 1. Ελεύθερη ρίζα δωρίζει το ασύζευτκο ηλεκτρόνιο της

$$R^{\cdot} + A \rightarrow RA^{\cdot}$$

Εξίσωση 2. Νέα ελεύθερη ρίζα σχηματίζεται με τη σύνδεση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα άλλο μόριο

Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να μεταφέρουν το μονήρες ηλεκτρόνιο επ'άπειρον, έως ότου βρει άλλο ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε μία άλλη ελεύθερη ρίζα, όπου και σταματά η αλυσιδωτή αντίδραση. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι άλλα μόρια της ίδιας ελεύθερης ρίζας με τα οποία σχηματίζει διμερή που διασπώνται εύκολα προς νέες ελεύθερες ρίζες, ή μεγαλύτερα μόρια που σχηματίζουν σταθερές δομές συντονισμού και απενεργοποιούν σταθερά τις ελεύθερες ρίζες. Τέτοια μόρια ονομάζονται αντιοξειδωτικά (Rigo et al., 1977).

$$A^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow AR$$

Εξίσωση 3. Αντίδραση τερματισμού δράσης της ελεύθερης ρίζας

Στο κύτταρο σχηματίζονται φυσιολογικά ελεύθερες ρίζες κατά τις μεταβολικές του αντιδράσεις, όπως είναι η αναπνευστική αλυσίδα. Στο τέλος της αναπνευστικής αλυσίδας λαμβάνει χώρα η πλήρης μείωση των τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου προς παραγωγή νερού στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Μερικές φορές όμως, μειώνεται ατελώς, με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, που οδηγούν σε δευτερογενείς οξειδώσεις (Masaki, 2010).

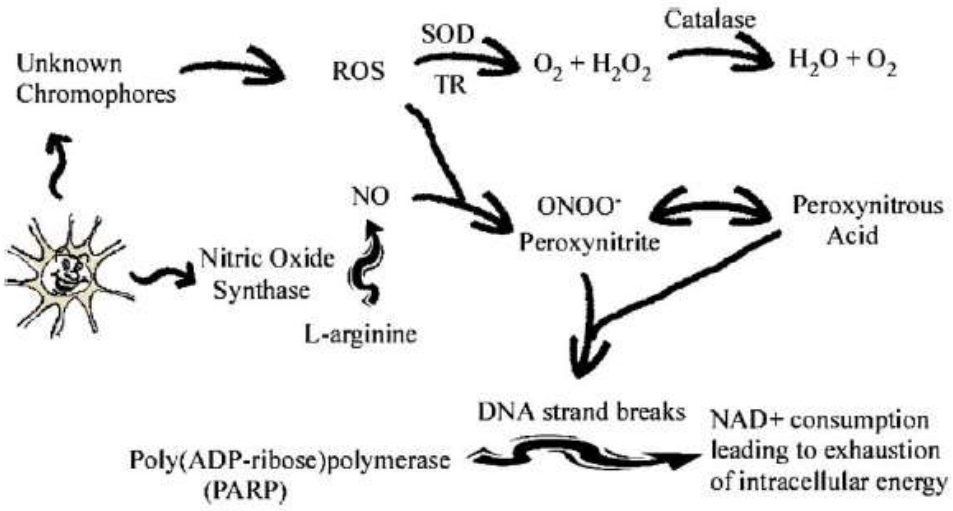
Στους οργανισμούς, με την βοήθεια ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων διατηρείται μία οξειδοαναγωγική ισορροπία. Η οξείδωση είναι απαραίτητη να υπάρχει στους οργανισμούς καθώς είναι εργαλείο άμυνας των κυττάρων του ανοσοποιητικού έναντι ξενοβιωτικών, αλλά και κομμάτι των φυσιολογικών διεργασιών απόπτωσης του κυττάρου. Ανισορροπία στο παραπάνω δυναμικό σύστημα αποτελεί αιτία βλάβης σε ιστούς του οργανισμού αλλά ανάπτυξης παθήσεων που σχετίζονται με την απώλεια ελέγχου των διεργασιών του κυττάρου όπως ο καρκίνος. Η συσσώρευση βλαβών στον οργανισμό οδηγεί στην έναρξη αμυντικών μηχανισμών όπως της φλεγμονής (Halliday, 2005).

2.2.2. Οξειδωτικές βλάβες από την UV ακτινοβολία

Η υπεριώδης ακτινοβολία σε μικρές ποσότητες έχει ευεργετική επίδραση στο δέρμα συμβάλλοντας στην άμυνά του έναντι της ίδιας, μέσω της αντανακλαστικής πάχυνσης της κεράτινης στιβάδας και της μελάγχρωσης του δέρματος. Επιπλέον η UVB ακτινοβολία είναι απαραίτητα για την μετατροπή των προβιταμινών της βιταμίνης D στην δραστική μορφή τους, απαραίτητη για την απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου από τον οργανισμό αλλά και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράλληλα η UV ακτινοβολία έχει θετική επίδραση στον οργανισμό καθώς συμβάλλει στην βελτίωση πολλών δερματικών παθήσεων όπως η ψωρίαση, η λέυκη, ο ομαλός λειχήνας (Halliday, 2005).

Εντούτοις, η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να έχει πολλαπλές αρνητικές συνέπειες για την υγεία και ιδιαιτέρως για το δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, η UVB αποτελεί το 0,1% της ηλιακής ακτινοβολίας, διαπερνά την κεράτινη στιβάδα και φθάνει μέχρι και την επιδερμίδα.

Η UVB εκκινεί αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, απευθείας το DNA και το RNA με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών, οδηγώντας στο σχηματισμό μιτογόνων φωτοπροιόντων όπως διμερή κυκλοπυριμιδινών (TT) και πυριμιδίνης-πυριμιδίνης (Ichihashi et al., 2003). Τέτοιες βλάβες στο DNA οδηγούν το κύτταρο σε εξαναγκασμένη απόπτωση, πρόωρη γήρανση ή και καρκινογένεση. Τα συστατικά του κυττάρου που απελευθερώνονται με την καταστροφή του στον μεσοκυττάριο χώρο αποτελούν ισχυρούς εκκινητές της διεργασίας της φλεγμονής (Cavinato et al., 2017).



Εικόνα Α 15. Το οξειδωτικό στρες επαγόμενο από UV ακτινοβολία ενεργοποιεί έναν πρόοξειδωτικό καταρράκτη που καταλήγει σε βλάβες σε δομικά συστατικά του κυττάρου (Halliday, 2005)

Η UVA αποτελεί το 4,9% της ηλιακής ακτινοβολίας και φθάνει μέχρι και το χόριο προκαλώντας πρόωρη γήρανση με καταστροφή του κολλαγόνου, απώλεια ελαστικότητας, άμεση μελάγχρωση και ανοσοκαταστολή. Επίσης είναι υπεύθυνη για φωτοκαρκινογένεση και φωτοδερματίδες. Έχει κατά 1000 φορές μικρότερη μεταλλαξογόνο δράση από τη UVB και οι βλάβες που προκαλεί στο DNA δεν είναι τόσο άμεσες όσο έμμεσες μέσω φωτο-οξειδωτικού στρες, παράγοντας δραστικές μορφές οξυγόνου- ROS (Magnus, 1976).

2.2.3. Φλεγμονή στο δέρμα από UV ακτινοβολία

Η φλεγμονή είναι η κυριότερη οξεία κλινική επίδραση της UV ακτινοβολίας στο φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα. Κατά την πρόσπτωσή της πάνω στον δέρμα, η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να σκεδαστεί, να ανακλαστεί ή να απορροφηθεί. Μόνο το απορροφούμενο φως μπορεί να προκαλέσει κάποια χημική μεταβολή στα απορροφόντα μόρια τα οποία ονομάζονται χρωμοφόρα. Το άθροισμα των φωτοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν όταν φως αλληλεπιδρά με τα

χρωμοφόρα που υπάρχουν στο δέρμα προκαλεί μία σειρά από βιοχημικές και ανοσολογικές διαταραχές που προκαλούν φλεγμονή. Επειδή διαφορετικά μήκη κύματος φωτός μπορεί να απορροφώνται από διαφορετικά χρωμοφόρα, η έκταση της φλεγμονής που εμφανίζεται μετά την έκθεση σε ακτινοβολία διαφορετικών μηκών κύματος αλλάζει. Πιο συγκεκριμένα τα μικρότερα μήκη κύματος (μικρότερα από 300 nm) δρουν στα νουκλεϊκά οξέα, αμινοξέα και στο ουροκανικό οξύ ενώ η μελανίνη είναι το χρωμοφόρο που επηρεάζεται από σε μεγαλύτερα μήκη κύματος(350-1200 nm). Επιπλέον, η ποσότητα και η θέση των χρωμοφόρων στο δέρμα, καθώς και οι μεταβολές του επιδερμικού πάχους, καθορίζουν το βαθμό απορρόφησης της UV ακτινοβολίας

Στο δέρμα εκτός από βλάβες στο DNA και σε δομικές πρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες, εκκινεί και δευτερογενείς οξειδωτικές αντιδράσεις με τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας και των κυτταρικών μεμβρανών. Παράγονται έτσι λιπιδικά υδροϋπεροξείδια, πρωτεϊνικά καρβονύλια ή 8-υδροξυδεοξυγουανοσίνη. Βλάβη στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να προκαλέσει κυτταρική βλάβη, διαρροή κυτταρικών συστατικών και τελικά θάνατο κυττάρων. Ακόμη οι αλδεΰδες λιπιδίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της υπεροξείδωσης αντιδρούν με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων και νουκλεϊκά οξέα για να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβες (Halliday, 2005).

Η καταστροφή των κυττάρων απελευθερώνει PAMPs, κυτταρικά στοιχεία που επάγουν την έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων. Ακόμη, η αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών και η αύξηση των ελευθέρων λιπιδίων ενεργοποιεί την φωσφολιπάση Α2 που είναι το κύριο ένζυμο για την εκκίνηση του καταρράκτη της σύνθεσης προφλεγμονωδών παραγόντων, λευκοτριενίων, προσταγλανδινών και ιντερλευκινών (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

Ακόμη η UV ακτινοβολία διεγείρει την παραγωγή μορίων προσκόλλησης και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής όπως ισταμίνη και λευκοτριένια καθώς και την επιφανειακή έκφραση μορίων προσκόλλησης. Οι προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές αυξάνουν τη διαπερατότητα των τριχοειδών που οδηγούν σε διείσδυση και ενεργοποίηση ουδετερόφιλων και άλλων φαγοκυτταρικών κυττάρων στο δέρμα (Masaki, 2010).

Ο καταρράκτης της φλεγμονής οδηγεί σε περαιτέρω απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου αλλά και πρόοξειδωτικών ιόντων σιδήρου. Συντηρείται έτσι ο φαύλος κύκλος της φλεγμονής και των βλαβών επαγόμενων από το οξειδωτικό στρες (Halliday, 2005).

Επειδή τα προϊόντα αυτά, δηλαδή οι ενεργές μορφές οξυγόνου παράγονται επίσης φυσιολογικά σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες το κύτταρο έχει αρκετούς μηχανισμούς για την απομάκρυνσή τους. Ωστόσο, σε περιπτώσεις εκτεταμένης έκθεση σε UV ακτινοβολία εκκινείται φλεγμονή, λόγω της εξάντλησης των ενδογενών αντιοξειδωτικών παραγόντων και της περιορισμένης κυτταρικής ικανότητας να καταστείλει τις ρίζες οξυγόνου (Nichols & Katiyar, 2010).

Οι ιστολογικές μεταβολές μετά από οξεία έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία περιλαμβάνουν πάχυνση της κεράτινης στιβάδας, της επιδερμίδας και της δερμίδας , διακυτταρικό και

περιαγγειακό οίδημα (edema) στο χόριο, ενδοθηλιακή διόγκωση, αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων καθώς επίσης και κυτταρική διήθηση από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα τόσο στην επιδερμίδα όσο και στη δερμίδα. Επιπλέον παρατηρείται βλάβη των επιδερμικών κερατινοκυττάρων και εξάντληση των κυττάρων Langerhans (Nishigori et al., 2004).

Μπορεί ακόμη να προκαλέσει ερυθρότητα, έγκαυμα, έμμεση μελάγχρωση, πρόωρη γήρανση και καρκίνο του δέρματος. Επίσης είναι υπεύθυνη για ανοσοκαταστολή, φωτοδυναμικές αντιδράσεις και φωτοδερματίδες (Pillai et al., 2005).

2.3. Άλλες βλάβες του δέρματος από την UV ακτινοβολία

2.3.1. Οξείες Βλάβες

Ηλιακό ερύθημα

Το ερύθημα που προκαλείται από την έκθεση του δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία είναι η πιο εμφανής και καλά αναγνωρισμένη οξεία δερματική απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, ιδιαίτερα σε άτομα με λευκό δέρμα. Η ενέργεια που μεταφέρεται στο δέρμα με την υπεριώδη ακτινοβολία μετατρέπεται εν μέρη σε θερμική με αποτέλεσμα την αγγειοδιαστολή και την αύξηση της αιματικής κυκλοφορίας στο επιπολής δίκτυο αιμοφόρων αγγείων (Rothman, 1954). Η απόκριση του δέρματος του κάθε ατόμου στην εμφάνιση ερυθήματος ποικίλει και μπορεί να προσδιοριστεί γενετικά. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν πως μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ενας πολυμορφισμός στον υποδοχέα της ορμόνης διέγερσης μελανοκυττάρων (MSM) (Υπεύθυνη για την εμφάνιση ερύθηματος είναι κυρίως η UVB ακτινοβολία (Smith et al., 1998)

Ηλιακό έγκαυμα

Όταν η θερμική ενέργεια από την προσπίπτουσα υπεριώδη ακτινοβολία απορροφάται πιο γρήγορα από ότι διαχέεται στους γύρω ιστούς, προκαλείται ηλιακό έγκαυμα. Πιο συγκεκριμένα, η θερμική αυτή ενέργεια αυξάνει την θερμοκρασία των κερατινοκυττάρων σε τέτοια επίπεδα ώστε τα λειτουργικά ένζυμα μετουσιώνονται και οι κυτταρικές τους μεμβράνες είναι τόσο ρευστές που αποσυντίθενται (Diffey, 1980).

Η καταστροφή αυτή των κυττάρων οδηγεί στην μαζική αποκόλληση τμημάτων της κεράτινης στοιβάδας που είναι εμφανής με της έντονη απολέπιση της επιδερμίδας. Οι κατώτερες στοιβάδες μένουν εκτεθειμένες στην ηλιακή ακτινοβολία και η λειτουργία του φραγμού μειώνεται σημαντικά (Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

Μεγαλύτερες δόσεις UVB ακτινοβολίας μπορεί να οδηγήσουν σε οίδημα, πόνο και φλύκταινες Το φυσικό ηλιακό έγκαυμα έχει λανθάνουσα περίοδο μερικών ωρών και εφόσον εμφανιστεί, μπορεί να παραμείνει για αρκετές ώρες ή ακόμα και για μέρες. Η έκταση του εγκαύματος που προκαλείται από τεχνητές πηγές εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μήκος κύματος της

ακτινοβολίας. Στα 300 nm η ελάχιστη ερυθηματώδης δόση (MED) σε λευκό δέρμα έγκειται περίπου στα 10-20mJ /cm² ενώ για την UVA ακτινοβολία το MED είναι περίπου χίλιες φορές υψηλότερο (Magnus, 1976).

Φωτοδερματοπάθειες

Έχει μελετηθεί η ιδιαίτερη ανοσολογικά απάντηση ορισμένων ατόμων κατά την επιδερμική απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Σε αυτά εκκινώνται φωτοχημικές ή φωτοβιολογικές αντιδράσεις που οδηγούν σε φωτοδερματοπάθειες.

Οι φωτοδερματοπάθειες διακρίνονται σε (Na & Ryu, 2018):

- Ιδιοπαθείς, αυτές που οφείλονται σε ιδιαίτερη ανοσολογική απάντηση στο ερέθισμα της υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως το πολύμορφο εξάνθημα (PLE), η ηλιακή κνίδωση, η χρόνια ακτινική δερματίτιδα
- Αντιδράσεις Φωτοευαισθητοποίησης, αυτές που οφείλονται σε υπερβολική αντίδραση του οργανισμού στην υπεριώδη ακτινοβολία λόγω λήψης φαρμάκων ή χημικών ουσιών που τροποποιούν την φυσιολογία του δέρματος, όπως είναι η φωτοτοξικότα και η φωτοαλλεργία. Τέτοια φάρμακα είναι οι τετρακυκλίνες, η ιμιπραμίνη, η γκριζεοφουλβίνη.

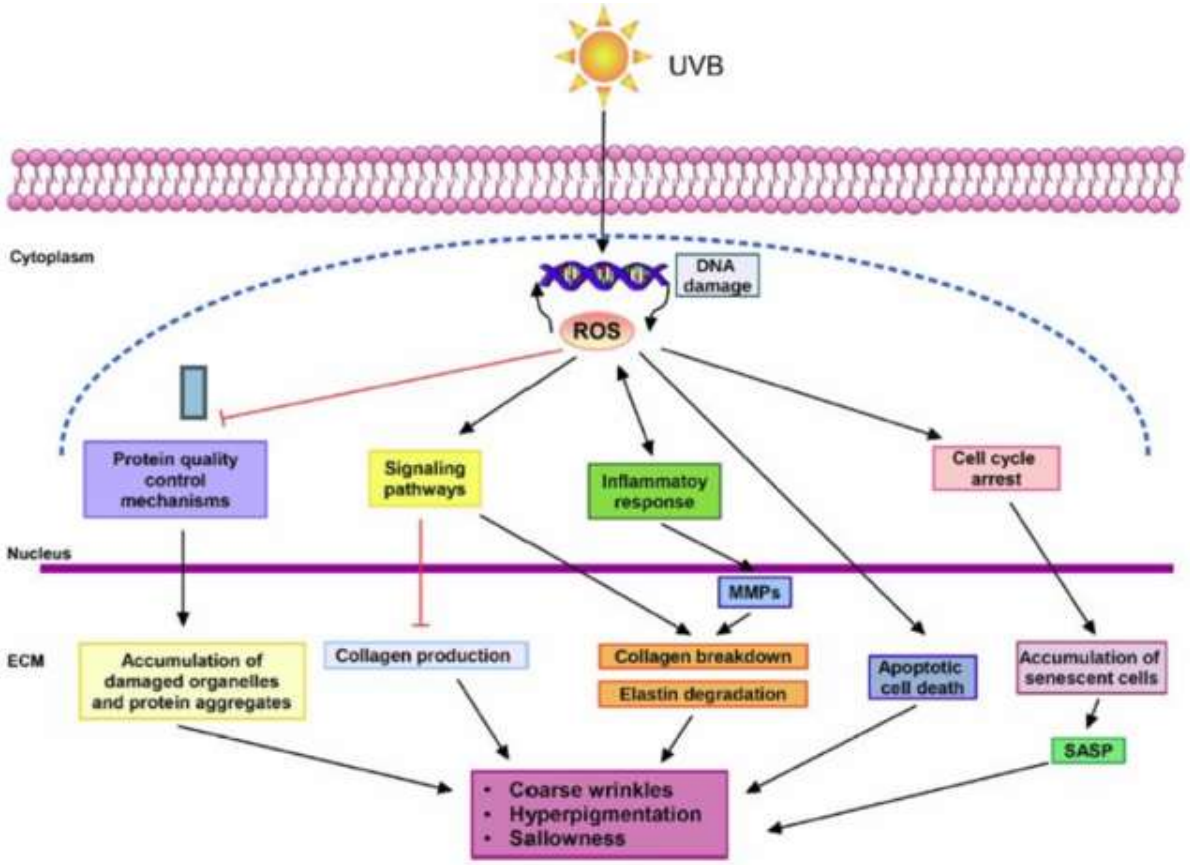
Η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί ακόμη να επιδεινώσει άλλα νοσήματα όπως είναι ο ερυθηματώδης λύκος, η ατοπική δερματίτιδα και το πολύμορφο ερύθημα.

2.3.2. Χρόνιες Βλάβες

Φωτογήρανση

Η χρόνια έκθεση στον ήλιο επιφέρει αλλαγές στην φυσιολογία του δέρματος που συνδέονται με πρόωρη γήρανση των στοιβάδων του και εμφάνιση χαρακτηριστικών σημείων γήρανσης, όπως ρυτίδωση, υπερμελάγχρωση, απώλεια ελαστικότητας, υπερκεράτωση, ξηροδερμία και τελαγγειεκτασίες (εμφανή επιδερμιδικά ερυθρά αιμοφόρα αγγεία). Τα σημεία αυτά είναι πιο έντονα σε φωτότυπο I – III, σε πρόσωπο, άνω άκρα και λαιμό (Cavinato et al., 2017).

Για την φωτογήρανση φαίνεται να είναι κύρια υπεύθυνη η UVA ακτινοβολία, παρά την χαμηλή ενέργεια των φωτωνίων της στα οποία αποδίδεται κυρίως η πρόκληση ερυθήματος. Η UVA επάγει τον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου στην επιδερμίδα που οδηγούν σε λιπιδική υπεροξείδωση και καταστροφή των λιπιδικών μεμβρανών της επιδερμίδας, του κολλαγόνου και της ελαστίνης του χόριου (Masaki, 2010).



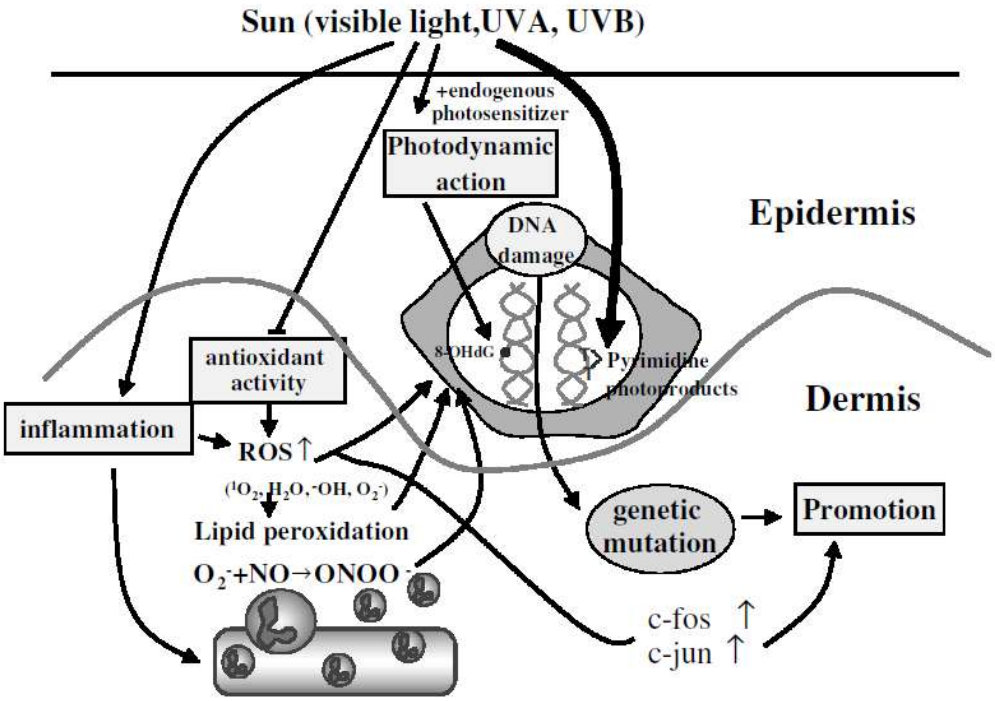
Εικόνα Α 16. Μηχανισμοί επαγωγής φωτογήρανσης από την υπεριώδη ακτινοβολία (Cavinato et al., 2017)

Φωτοκαρκινογένεση

Τόσο η UVA όσο και η UVB, όπως είδαμε παραπάνω έχουν μεταλλαξογόνο δράση επί των νουκλεϊκών οξέων των κυττάρων της επιδερμίδας. Η εμφάνιση μεταλλάξεων ενεργοποιεί μηχανισμούς επιδιόρθωσης των νουκλεϊκών οξέων και την αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Εάν η επιδιόρθωση σε αυτό το στάδιο γίνει λανθασμένα, προς ογκογόνες μεταλλάξεις, δημιουργείται ένα καρκινικό κύτταρο (Sample & He, 2018).

Με την επίδραση της UV ακτινοβολίας σχηματίζονται διμερή θυμίνης και διμερή κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης (CPD) που είναι το πρώτο βήμα για την επαγωγή ανοσοκαταστολής και την περαιτέρω πτώση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού ενάντια στην ανάπτυξη και διασπορά των καρκινικών κυττάρων (Pillai et al., 2005).

Στη συνέχεια η επαναλαμβανόμενη έκθεση στον ήλιο επάγει την αύξηση του πάχους της κεράτινης στοιβάδας, ώς αντανακλαστικό για την προστασία του οργανισμού από την ηλιακή ακτινοβολία. Αυτή η διεργασία επάγει την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κερατινοκυττάρων. Σε περίπτωση που έχει επέλθει η έναρξη του καρκίνου, το ερέθισμα αυτό συμβάλλει στην προώθηση και την εξέλιξη του. Έτσι η υπεριώδης ακτινοβολία είναι σε θέση να προκαλέσει καρκίνο του δέρματος χωρίς να υπάρχουν επιπρόσθετοι εκκινητές ή προαγωγοί και ονομάζεται «πλήρης καρκινογόνος ουσία» (Nishigori et al., 2004). .



Εικόνα Α 17. Η υπεριώδης ακτινοβολία προωθεί την γένεση, την προώθηση και την ανάπτυξη του καρκίνου του δέρματος (Nishigori et al., 2004)

2.4. Αντιμετώπιση των βλαβών στο δέρμα από την UV ακτινοβολία

2.4.1. Αντιοξειδωτικά στο δέρμα

Ώς αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιοδήποτε μόριο μπορεί να απορροφήσει την ενέργεια της υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να μην δημιουργήσει πρό - οξειδωτικά μόρια και ελεύθερες ρίζες ή μόριο το οποίο μπορεί να σταματήσει αλυσιδωτές αντιδράσεις ελυθέρων ριζών. Ακόμη ώς αντιοξειδωτικά λογίζονται και μόρια τα οποία ενισχύουν την έκφραση των ενδογενών αντιοξειδωτικών.

Τα αντιοξειδωτικά μόρια μπορούν να δράσουν με έμμεσο μηχανισμό μέσω σχηματισμού χηλικών παραγόντων με μέταλλά που συμμετέχουν σε αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών (Cu, Fe) και άμεσα ως δότες ηλεκτρονίων σε ελεύθερες ρίζες. Αν και τα αντιοξειδωτικά μόρια για να δράσουν πρέπει να είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τους οξειδωτικούς παράγοντες, έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι στα αντιοξειδωτικά ένζυμα λόγω μεγαλύτερης ικανότητας διείσδυσης, ευρέως φάσματος δράση.

Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Στο δέρμα εντοπίζονται ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια που διακρίνονται σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και αντιοξειδωτικά μόρια μικρού μοριακού βάρους. Αντιοξειδωτικά μόρια είναι η γλουταθειόνη (GSH), α-τοκοφερόλη ή βιταμίνη Ε, το ασκορβικό οξύ ή βιταμίνη C, και τα ένζυμα : η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η αναγωγάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της

γλουταθειόνης, (GSTs), η υπεροξειδική δισμουτάση (SODs), η καταλάση (CAT), και η αναγωγάση της κινόνης. Η γλουταθειόνη και το ασκορβικό οξύ ανήκουν στα υδατο-διαλυτά μόρια ενώ η βιταμίνη Ε συνδέεται με τις μεμβράνες και μπορεί να διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού και λειτουργούν σαν σαρωτές ελευθέρων ριζών (Ichihashi et al., 2003).

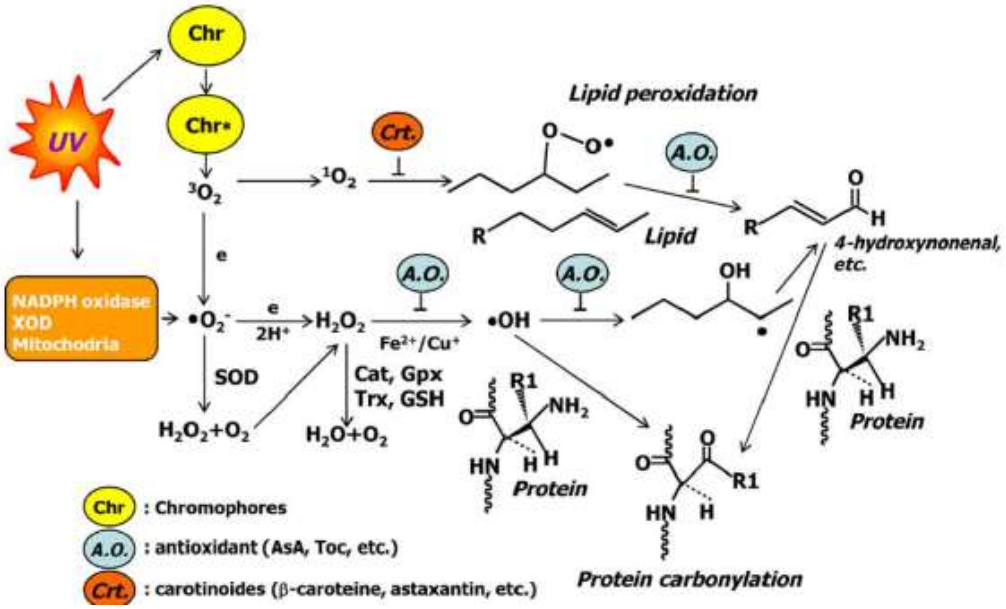
Μελέτες έχουν δείξει πως μικρή δόση οξειδωτικών παραγόντων όπως ή βραχεία έκθεση στον ήλιο αλλά και η ήπιας μορφής άσκηση, επάγουν την έκφραση των αντιοξειδωτικών αυτών ενζύμων αρκετά, ώστε να παραμένει μία περίσσεια του ενεργή στον οργανισμό, ακόμη και μετά την εξάλειψη του οξειδωτικού παράγοντα (Amstad et al., 1991).

Ωστόσο με την αύξηση της ηλικίας του οργανισμού, τα αποθέματα σε ενδογενή αντιοξειδωτικά και σε ένζυμα που τα αναγεννούν μειώνονται. Κρίνεται απαραίτητη η αναζήτηση αντιοξειδωτικής προστασίας εξωγενώς (Cavinato et al., 2017).

Αντιοξειδωτικοί Παράγοντες

Τα τοπικά αντιοξειδωτικά μπορούν να αποτρέψουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και συνεπώς και τις επακόλουθες φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

Βιολογικά σημαντικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες, όπως η βιταμίνη Ε, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή έχουν αποδειχθεί ότι παρέχουν φωτοπροστασία από φλεγμονή επαγόμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία (Mantena & Katiyar, 2006). Τέτοια μόρια έχουν συνήθως δακτυλίους στο μόριο τους που απορροφούν και στο ορατό, γι ’αυτό και ονομάζονται έγχρωμα. Έχει μελετηθεί εκτενώς η αντιοξειδωτική δράση φυσικής προέλευσης μορίων όπως τα πολυφαινολικά παράγωγα. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της τάξης είναι η ρεσβερατρόλη και άλλα παράγωγα στιλβενίων, η ασταξανθίνη, η γενιστεΐνη, η κατεχίνη και η συλιμαρίνη (Nichols & Katiyar, 2010).



Εικόνα Α 18. Τα χρωμοφόρα, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά και τα καροτενοειδή αναστέλλουν σε πολλά επίπεδα τις οξειδωτικές βλάβες στο κύτταρο (Masaki, 2010)

2.4.2. Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες

Τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, στεροειδή και μη, έχουν αποδεδειγμένα καλή δράση έναντι της φωτοεπαγόμενης φλεγμονής. Αυτά δρουν κυρίως καταστέλλοντας την παραγωγή διαμεσολαβητών της φλεγμονής, όπως των κυτοκίνων και των προσταγλανδινών. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα τοπικά αντιφλεγμονώδη είναι τα τοπικά ρετινοειδή, τα τοπικά κορτικοστεροειδή, η βιταμίνη D και νέοι ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες (tacrolimus, pimecrolimus), που πέραν της βασικής τους χρήσης σε φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος, φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην οξεία φάση της φλεγμονής (Matsumura & Ananthaswamy, 2004), (Ichihashi et al., 2003).

2.4.3. Αντιηλιακή προστασία

Άλλοι τρόποι πρόληψης και αντιμετώπισης των επιδράσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα είναι τα αντιηλιακά φίλτρα. Πρόκειται για μόρια τα οποία δεν επιτρέπουν στην υπεριώδη ακτινοβολία να φτάσει στις στοιβάδες του δέρματος και να προκαλέσει βλάβες. Διακρίνονται σε χημικά και φυσικά. Τα χημικά φίλτρα είναι μόρια με έναν ή περισσότερους φαινολικούς δακτυλίους που τους επιτρέπουν να απορροφούν έντονα στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας και να μην επιτρέπουν στην ενέργεια τη να διαχυθεί στις κατώτερες στοιβάδες του δέρματος. Τα φυσικά φίλτρα είναι συνήθως ορυκτά παράγωγα τα οποία επιτελούν την ίδια λειτουργία αντανακλώντας την υπεριώδη ακτινοβολία (Magnus, 1976).

3. ΑΠΟ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

3.1. Το δέρμα ως οδός χορήγησης φαρμάκων

Παρά την εξαιρετικά αποτελεσματική λειτουργία του ως φραγμού από και προς το εξωτερικό περιβάλλον, το δέρμα προτιμάται ως κύρια ή εναλλακτική οδός χορήγησης φαρμάκων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι ουσίες όπως, οιστραδιόλη, φαιντανύλη, νικοτίνη, τεστοστερόνη, νιτρογλυκερίνη και κλονιδίνη (Naik et al., 2000) (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011) Πρόσφατα εγκρίθηκε και το πρώτο διαδερμικό σκεύασμα φαρμακομορίου που σχεδιάστηκε εξ αρχής για χορήγηση από το δέρμα, για την νόσο του Parkinson (Zhou et al., 2013).

Το δέρμα ως οδός χορήγησης διαθέτει τα εξής **πλεονεκτήματα**:

Αυξάνει τη **συμμόρφωση** των ασθενών στη θεραπεία,

- καθώς ένα θεραπευτικό σχήμα με χορήγηση δύο φορές την ημέρα per os, μετατρέπεται σε μία φορά στις 24 ή 48 ώρες ή και μία φορά την εβδομάδα
- αποφεύγεται η δυσάρεστη για τον ασθενή πρακτική της ενδοφλέβιας, ενδομυϊκής ή υποδόριας χορήγησης (Naik et al., 2000)
- προλαμβάνονται στομαχικές ενοχλήσεις σχετιζόμενες με την per os χορήγηση
- συνήθως χρησιμοποιούνται φαρμακοτεχνικές μορφές που επιτρέπουν την χορήγηση από τον ίδιο τον ασθενή, ανώδυνα και ανεξάρτητα από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό
- είναι φιλική οδός χορήγησης και για ασθενείς με δυσκαταποσία ή αναίσθητους (Brown et al., 2006), (Banerjee et al., 2014)

Βελτιώνεται το **προφίλ ασφαλείας** της θεραπείας καθώς :

- η θεραπεία μπορεί να διακοπεί ανά πάσα στιγμή με απλή αφαίρεση του προϊόντος από την επιφάνεια του δέρματος
- παρέχεται η δυνατότητα τροποποίησης του ρυθμού απορρόφησης του δραστικού συστατικού, και ιδιαίτερα για φαρμακομόρια με μικρό χρόνο ημιζωής, με στόχο σταθερά επίπεδα αυτού στη συστηματική κυκλοφορία και αποφυγή φαινομένων υποθεραπείας ή τοξικότητας (Naik et al., 2000), (M. Sala & , A. Elaissari, 2018)

Μπορεί να μειωθεί η χορηγούμενη **δόση** για την επίτευξη του ίδιου φαρμακολογικού αποτελέσματος καθώς:

- αποφεύγεται το φαινόμενο πρώτης διόδου, στο οποίο οφείλεται απώλεια μεγάλου ποσοστού της χορηγούμενης δόσης κατά το μεταβολισμό της στο ήπαρ.
- παρέχεται η δυνατότητα ελεγχόμενης και καθυστερούμενης χορήγησης, με την μορφοποίηση του φαρμακομορίου σε κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή (Donnely & Singh, 2015)
- αποφεύγεται η συνύπαρξη του φαρμακομορίου με τροφή ή γαστρικά υγρά που ίσως μειώσουν την βιοδιαθεσιμότητα του (Brown et al., 2006)

- είναι η πλέον καταλληλότερη οδός για θεραπεία τοπικών δερματικών νοσημάτων αλλά και εξαιρετικά αποτελεσματική για παθήσεις των υποδερμικών ιστών, όπως η οστεοαρθρίτιδα (Prausnitz et al., 2012)

Μία ουσία που χορηγείται από του δέρματος μπορεί να προορίζεται για :

- **Επιφανειακή δράση** και προστασία του δέρματος από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011)
- **Τοπική θεραπεία**, όταν το νόσημα εντοπίζεται στις στοιβάδες του δέρματος ή τον υποδόριο ιστό.
- **Θεραπεία επιπολής ιστών**, όπως οι μύες, το επιπολής αγγειακό δίκτυο, οι αρθρώσεις κ.α.
- **Συστηματική θεραπεία**, εάν η ουσία βρίσκεται σε κατάλληλη μορφοποίηση που της επιτρέπει να φτάσει στην συστηματική κυκλοφορία (Mittal et al., 2008)

3.1.1. Διεργασία από του δέρματος απορρόφησης

Η από του δέρματος απορρόφηση ορίζεται ως η μεταφορά μίας ουσίας από την επιφάνεια του δέρματος στην επιδερμίδα, στη δερμίδα και τέλος στην αιματική κυκλοφορία (Barry, 2002). Για να απορροφηθεί μία ουσία λαμβάνουν χώρα τα εξής φαινόμενα κατανομής:

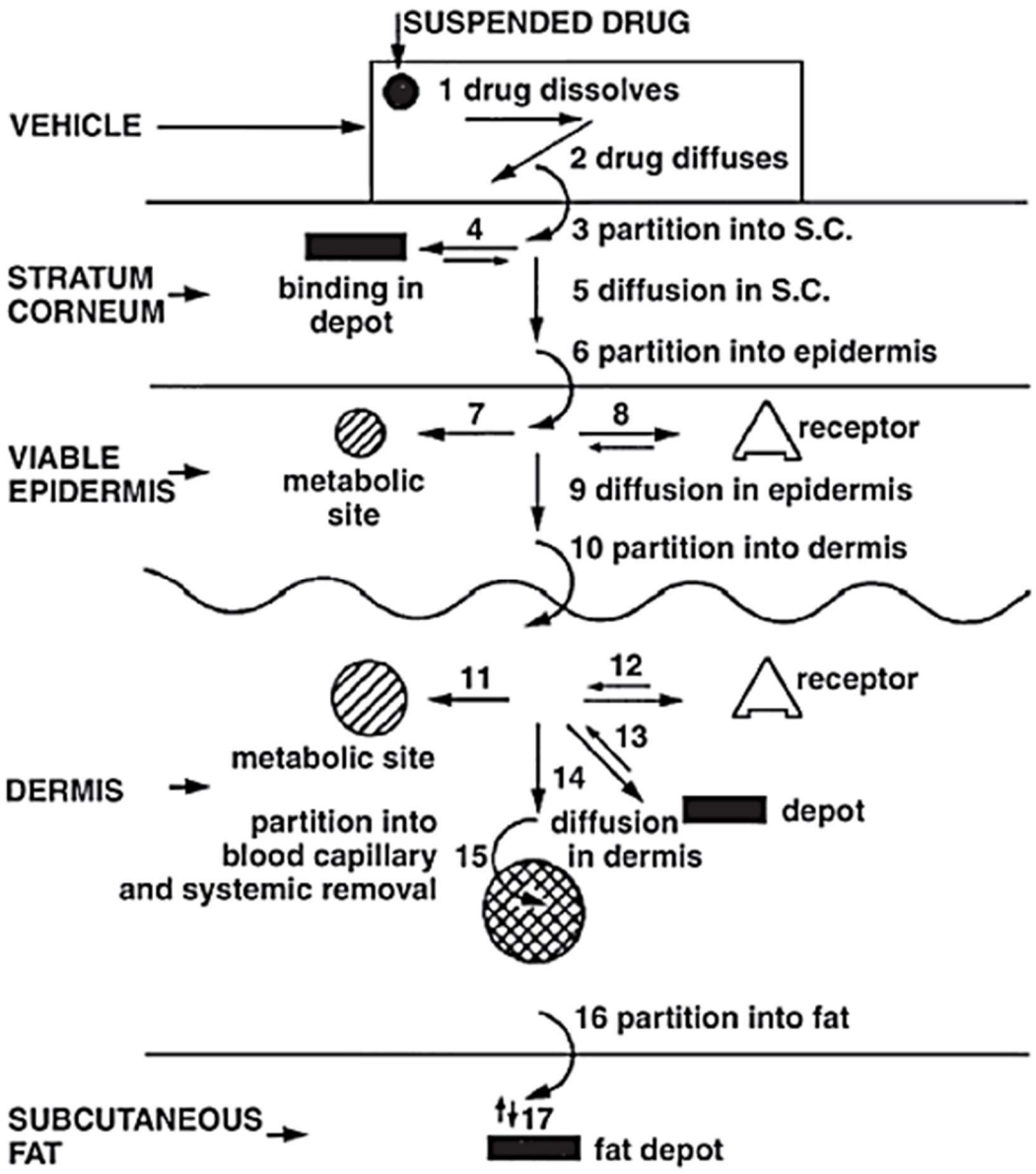
i. Το δραστικό συστατικό προς απορρόφηση θα πρέπει να βρίσκεται διαλυμένο στον φορέα – φαρμακοτεχνική μορφή. Από αυτόν αρχικά θα πρέπει να κατανεμηθεί στην κεράτινη στοιβάδα. αφού επέλθει ισορροπία σε αυτήν την κατανομή, θα διαχυθεί στην μάζα της κεράτινης στοιβάδας.

ii. Από την κεράτινη στοιβάδα κατανέμεται στην ζώσα επιδερμίδα. Αφού επέλθει ισορροπία ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα, η ουσία διαχέεται στην ζώσα επιδερμίδα. Εκεί ενδέχεται να κατακρατείται λόγω των φυσικοχημικών της χαρακτηριστικών και να σχηματίζει δεξαμενή (depot). Στην ζώσα επιδερμίδα εδράζουν μεταβολικά ένζυμα τα οποία μπορούν να μεταβολίσουν την ουσία πριν κατανεμηθεί σε κατώτερες στοιβάδες του δέρματος.

iii. Από την επιδερμίδα, η ουσία κατανέμεται στην δερμίδα, όπου στη συνέχεια διαχέεται στη μάζα της στοιβάδας. Εκεί ενδέχεται να μεταβολιστεί από τα μεταβολικά ένζυμα της δερμίδας ή να δεσμευθεί από πρωτείνες του ιστού.

iv. Εάν η ουσία δεν μεταβολιστεί ή δεσμευτεί, είναι ελεύθερη να κατανεμηθεί στον υποδόριο ιστό. Από εκεί θα διαχυθεί και θα κατανεμηθεί είτε στο επιπολής αρτηριακό δίκτυο, είτε στον υποδόριο λιπώδη ιστό. Από τις αρτηρίες η ουσία φτάνει στην συστηματική κυκλοφορία και μέσω αυτής σε άλλο όργανο στόχο. Εάν η ουσία κατακρατείται από τον λιπώδη ιστό, σχηματίζει δεξαμενή (depot). Από τη δεξαμενή αυτή μπορεί η ουσία να κατανέμεται παρατεταμένα και με σταθερό ρυθμό προς την συστηματική κυκλοφορία (J. W. Wiechers et al., 2004a).

Από τα παραπάνω φαίνεται πως καθοριστικό στάδιο του ρυθμού απορρόφησης μίας ουσίας είναι ο φραγμός της κεράτινης στοιβάδας. Εάν μία ουσία διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα και βρεθεί στην δερμίδα θεωρείται πως έχει απορροφηθεί, καθώς από εκεί κατανέμεται στην συστηματική κυκλοφορία χωρίς ιδιαίτερο εμπόδιο (S. Singh & Singh, 1993).



Εικόνα Α 19. Τα στάδια κατανομής, διάχυσης, δέσμευσης και μεταβολισμού μίας ουσίας κατά την από του δέρματος απορρόφηση της (J. W. Wiechers et al., 2004a)

3.1.2. Μονοπάτια από του δέρματος απορρόφησης

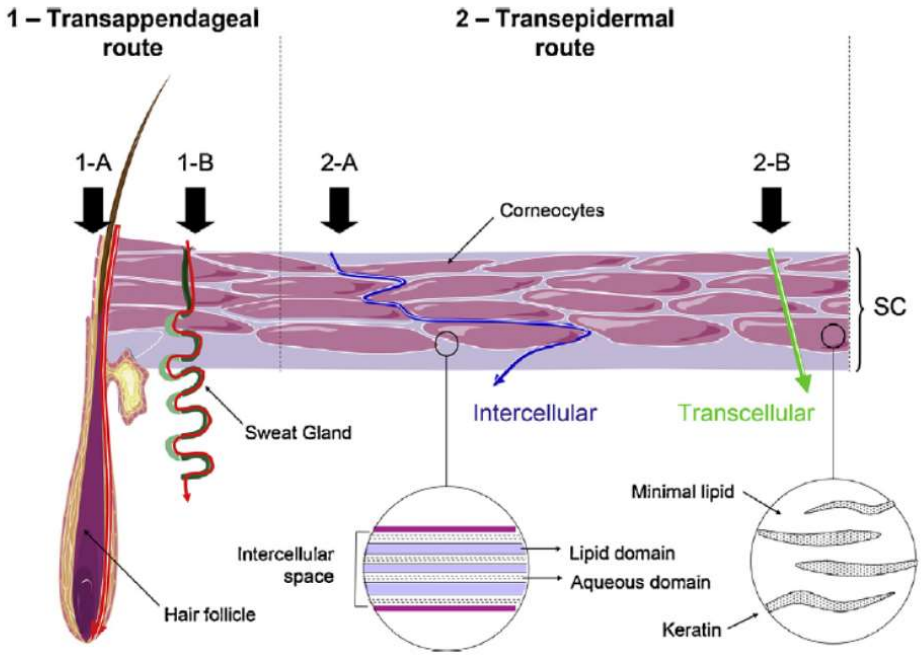
Μία ουσία χορηγούμενη επί του δέρματος για να φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία θα πρέπει να περάσει είτε από τα **εξαρτήματα του δέρματος**, όπως είναι η τριχοσμηγματογόνος μονάδα

και οι ιδρωτοποιοί αδένες, είτε από την **κεράτινη στοιβάδα.** Στην τελευταία διακρίνονται δύο οδοί, η **παρακυττάρια** και **η διακυττάρια**. (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011)

Παρά την χαμηλή αντίσταση στην διαπεράση που βρίσκουν ουσίες στις οδούς των εξαρτημάτων, μόνο το 1% της χορηγούμενης δόσης φαίνεται να διέρχεται από αυτές, λόγω της κατανομής των εξαρτημάτων στην επιφάνεια του δέρματος. Μεγαλύτερη πιθανότητα εμφανίζει μία ουσία να διέλθει από την κεράτινη στοιβάδα. και μάλιστα από την παρακυττάρια οδό (Mohammed et al., 2014).

Αυτό συμβαίνει γιατί στην διακυττάρια οδό, μία ουσία καλείται να κατανεμηθεί από το λιπόφιλο μεσοκυττάριο χώρο της κεράτινης στοιβάδας στο υδρόφιλο γεμάτο κυτταρίνη εσωτερικό των κερατινοκυττάρων τόσες φορές όσες και οι στοιβάδες των κερατινοκυττάρων στην περιοχή εφαρμογής. Αυτό προυποθέτει η υπό εξέταση ουσία να έχει μέτριο συντελεστή λιποφιλίας, όπως θα δούμε παρακάτω, και πρόκειται για μία εξαιρετικά αργή οδό απορρόφησης (Willia & Barry, 1991).

Αντίθετα, κατά την διάβαση από την διακυττάρια οδό αρκεί η ουσία να μπορεί να κατανεμηθεί στο λιπόφιλο περιβάλον των διπλοστοιβάδων των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας.(Barry, 2002)



Εικόνα Α 20. Πιθανές οδοί διαπέρασης της κεράτινης στοιβάδας. 1Α) Μέσω της τριχοσμηγματογόνου μονάδος, 1Β) Μέσω των ιδρωτοποιών αδένων, 2Α) Παρακυττάρια οδός, 2Β)Διακυττάρια οδός (Mohammed et al., 2014)

Ένας γενικός κανόνας που αξίζει να σημειωθεί είναι πως μόρια ή σταγονίδια φορέων μεγέθους:

- μ > 10μm, δεν μπορεί να διαπεράσει με παθητική διάχυση την κεράτινη στοιβάδα και θα παραμείνει στην επιφάνεια του δέρματος

- 3μm < μ < 10 μm, μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα από την οδό των εξαρτημάτων
- μ < 3μm, μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα από την παρακυττάρια οδό (G. W. Lu & Gao, 2010), (Schaefer et al., 1977).

3.1.3. Κινητική της από του δέρματος απορρόφησης - Νόμοι διάχυσης Fick

Η από του δέρματος απορρόφηση περιγράφεται από το φαινόμενο της **παθητικής διάχυσης**. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για μεταφορά μάζας από την μία πλευρά μίας μεμβράνης στην άλλη, με κινητήριο δύναμη την **διαφορά συγκέντρωσης της ουσίας ΔC** σε κάθε διαμέρισμα (Lane, 2013). Εξαιτίας της αυθόρμητης κίνησης των μορίων στο χώρο, τα μόρια τείνουν να κινούνται από την περιοχή με την μεγαλύτερη συγκέντρωση προς αυτή με την χαμηλότερη, έως ότου επέλθει ισορροπία (Barry, 2002).

Η κεράτινη στοιβάδα είναι μία πολύπλοκη μη ομοιογενής δομή, διαμέσου της οποίας λαμβάνει χώρα η διάχυση. Για να ορίσουμε το φαινόμενο θα τη θεωρήσουμε ομοιογενή και το πάχος της ως την **ελάχιστη μετατόπιση στο χώρο dx** (Crank, 1975).

Η κίνηση αυτή περιγράφεται μαθηματικά από τον **Πρώτο νόμο διάχυσης του Fick**:

$$\mathbf{J = -D \cdot \frac{dC}{dx}}$$

Εξίσωση 4. Ο Πρώτος Νόμος του Adolf Fick για την παθητική διάχυση σταθερής κατάστασης (Moss et al., 2002)

Όπου:

J ο **Ρυθμός Διάχυσης** σταθερής κατάστασης ή **Ροή** (g/cm^2*sec)

D η **σταθερά διάχυσης** ή συντελεστής διάχυσης (cm^2/sec)

dC η **διαφορά της συγκέντρωσης** στα δύο διαμερίσματα (g/cm^3)

dx η ελάχιστη **μετατόπιση στο χώρο** που αντιστοιχεί στο πάχος της μεμβράνης (cm)

Η σταθερά διάχυσης D εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας προς διαπέραση, της διαχωριστικής μεμβράνης και του περιεχομένου των διαμερισμάτων (Moss et al., 2015). Μπορεί να οριστεί ως:

$$\mathbf{D = K_D = Kp*h/Km}$$

Εξίσωση 5. Σταθερά Διάχυσης (Gary P. Moss et al., 2015)

Όπου:

Kp σταθερά διάχυσης μεμβράνης, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μεμβράνης

h το **πάχος** της μεμβράνης

Km συντελεστής κατανομής της διαχεόμενης ουσίας από το διαμέρισμα του δότη στην μεμβράνη, που εξαρτάται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας σε σύγκριση με αυτά της μεμβράνης (Dragicevic & Maibach, 2015).

Ο πρώτος νόμος του Fick ισχύει για σταθερές συνθήκες διάχυσης στο χώρο και στο χρόνο.

Ένας άλλος τρόπος να ορίσουμε τη **Ροή** είναι :

$$J=\frac{dM}{sdt}$$

Εξίσωση 6. Η ροή μάζας διαμέσου μεμβράνης στη μονάδα του χρόνου (Yamashita & Hashida, 2003)

Όπου:

dM η μεταβολή της μάζας στο διαμέρισμα του δότη (g)

s η σημειακή επιφάνεια της μεμβράνης διαμέσου της οποίας γίνεται η διάχυση (cm^2)

dt η ελάχιστη μεταβολή του χρόνου (sec)

Η ροή είναι λοιπόν η μεταβολή της μάζας **M** που διέρχεται κάθετα, από την μονάδα επιφάνειας μεμβράνης **s**, σε χρόνο **dt**

Το αρνητικό πρόσημο στην εξίσωση 1 βρίσκεται για να περιγράψει την αυθόρμητη κίνηση των μορίων από το διαμέρισμα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση προς αυτό με την μικρότερη (Barry, 2002). Καθώς η συγκέντρωση στο διαμέρισμα του δότη συνεχώς μειώνεται, η παρουσία του αρνητικού προσήμου εξασφαλίζει ότι η Ροή θα έχει πάντα θετικό πρόσημο.(Yamashita & Hashida, 2003) Έτσι η **εξίσωση 1** περιγράφει ικανοποιητικά τον ρυθμό μείωσης της ουσίας της συγκέντρωσης στο διαμέρισμα δότη.

Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα της κεράτινης στοιβάδας ως μεμβράνη και το γεγονός ότι η ροή μάζας δεν είναι πάντα σταθερή, αλλά μεταβάλλεται εώς ότου επέλθει ισορροπία, καταλαβαίνουμε πώς η ροή δεν είναι σταθερή στο χώρο και στο χρόνο.

Περιγράφουμε το φαινόμενο με τον **Δεύτερο νόμο του Fick**:

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

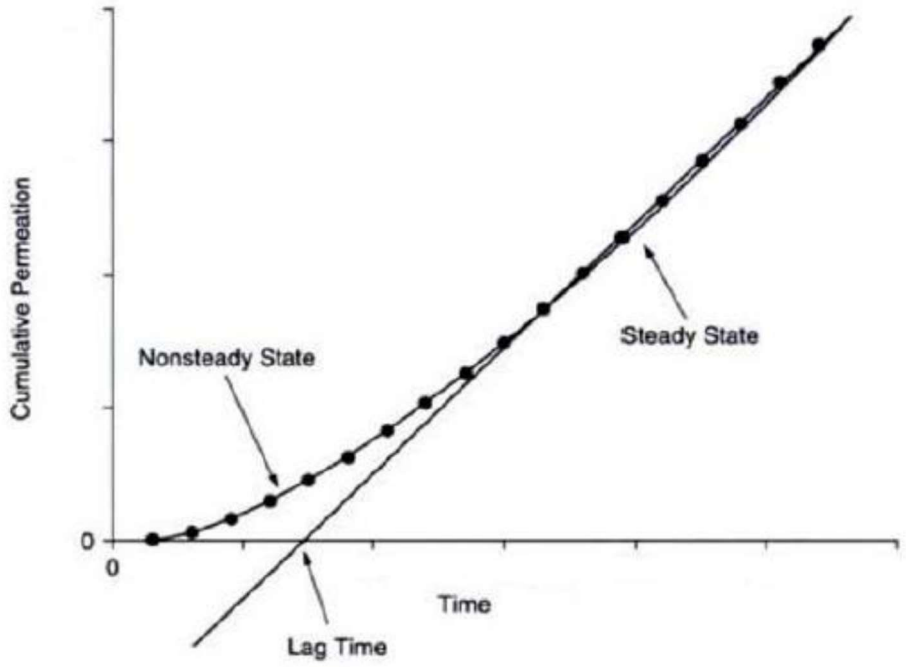
Εξίσωση 7. Ο Δεύτερος Νόμος του Fick για μεταβαλλόμενη ροή (Willia & Barry, 1991)

Όπου η μεταβολή του ρυθμού διάχυσης, δηλ της Ροής στο χώρο είναι ανάλογη της μεταβολής της συγκέντρωσης της διαχεόμενης ουσίας στο χρόνο. Η ροή σε κάθε σημείο της μεμβράνης μπορεί να είναι διαφορετική, σε κάθε μονάδα του χρόνου dt.

Η συγκέντρωση της ουσίας μειώνεται σταδιακά στο διαμέρισμα του δότη, και αντίστοιχα αυξάνεται η ροή από αυτό. Αυτό συμβαίνει έως ότου κορεστεί η μάζα της μεμβράνης με τη διαχεόμενη ουσία. Από το σημείο αυτό και μετά επέρχεται η ισορροπία και ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης dC/dt παραμένει σταθερός. Το χρονικό διάστημα για την επίτευξη της ισορροπίας ονομάζεται **χρόνος υστέρησης (Lag Time)** και απεικονίζεται στο παρακάτω γράφημα, και ορίζεται στην εξίσωση 5, ως το τετράγωνο του πάχους της μεμβράνης προς έξι φορές το συντελεστή διάχυσης (G. Oliveira et al., 2010) :

$$t_{Lag} = h^2/6D$$

Εξίσωση 8. Ο χρόνος υστέρησης εξαρτάται από τις ιδιότητες της μεμβράνης και της διαχεόμενης ουσίας (G. Oliveira et al., 2010)



Εικόνα Α 21. Ο τρόπος που μεταβάλλεται η αθροιστική μάζα της διαχεόμενης ουσίας στο διαμέρισμα του δέκτη προς το χρόνο. Η Ροή αντιστοιχεί στην κλίση της ευθείας. (Crank, 1975)

3.2. Περιορισμοί κατά την από του δέρματος χορήγηση

Από τα παραπάνω φαίνεται οι περιορισμοί του δέρματος ως οδού χορήγησης. Η βιοδιαθεσιμότητα μίας ουσίας που χορηγείται από το δέρμα εξαρτάται από φυσικοχημικούς και βιολογικούς παράγοντες.

3.2.1. Φυσικοχημικοί παράγοντες

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά διαχεόμενης ουσίας

Μία ουσία για να είναι κατάλληλη για χορήγηση από το δέρμα θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- **Μοριακό Βάρος ≤ 500 Da**, για να μπορεί να διέλθει από την παρακυττάρια και τη διακυττάρια οδό της κεράτινης στοιβάδας (Gary P. Moss et al., 2015)
- **Συντελεστή κατανομή οκτανόλης/νερού Ko/w ή Συντελεστή λιποφιλίας logP** με τιμές **από 1 έως 3**. Σε αυτό το εύρος παίρνουν τιμές ουσίες με μέτρια λιπόφιλο και υδρόφιλο χαρακτήρα. Αυτό τους επιτρέπει να μπορούν να κατανεμηθούν εύκολα και στις διπλοστοιβάδες λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας, και στις περιοχές ελεύθερου νερού, ώστε να περάσει από την παρακυττάρια οδό (Brown et al., 2006), (Chambers Fox S, 2014)
- **Σημείο τήξεως ≤ 200 °C,** που επιτρέπει στην ουσία να είναι καλά διαλυμένη στον φορέα στην θερμοκρασία του ανθρώπινου δέρματος (32 °C) και διαθέσιμη προς απορρόφηση (Daniels, 2004)
- **Σταθερά ιονισμού pKa** τέτοια ώστε στο pH 5.5 – 6, που είναι το φυσιολογικό pH του δέρματος να μην βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή, ώστε να μπορεί να κατανεμηθεί στα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας (Gary P. Moss et al., 2015)
- **Να μην είναι αλλεργιογόνος, ερεθιστική ή τοξική για το δέρμα** (Brown et al., 2006)
- **Η απαιτούμενη δόση** για να επιτευχθούν θεραπευτικά επίπεδα στην αιματική κυκλοφορία, να μπορεί να μορφοποιηθεί σε φαρμακοτεχνική μορφή κατάλληλη για διαδερμική χορήγηση (Donnely & Singh, 2015)

Φορέας

Ο ιδανικός φορέας για διαδερμική χορήγηση θα πρέπει να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Η ουσία προς απορρόφηση να βρίσκεται καλά διαλυμένη στην **συγκέντρωση** στόχο, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό **φαρμακολογικό αποτέλεσμα** και να εφαρμόζεται επαρκής κινητήριος δύναμη για την διάχυση της διαμέσου της κεράτινης στοιβάδας, σύμφωνα με τον Νόμο του Fick (Donnely & Singh, 2015)
- Η συγκέντρωση στην οποία βρίσκεται διαλυμένη η ουσία προς απορρόφηση να είναι η **συγκέντρωση κορεσμού** της στο συγκεκριμένο φορέα, ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη **θερμοδυναμική ενεργότητα α** (J. W. Wiechers et al., 2004b)**.** Περισσότερα για την επίτευξη αυτής της ισορροπίας θα αναπτυχθούν στο κεφάλαιο 3.
- Θα πρέπει να φέρει την ουσία προς διαπέραση διαλυμένη στην κατάλληλη φάση του και με τον κατάλληλο τρόπο ώστε να είναι διαθέσιμη προς κατανομή στην κεράτινη στοιβάδα
- Να είναι εύκολο στην εφαρμογή, με κατάλληλα **οργανοληπτικά χαρακτηριστικά** που να ευνοούν τη συμμόρφωση του ασθενή

- Να είναι **μη τοξικός**, μη ερεθιστικός, μη αλλεργιογόνος και φαρμακολογικά αδρανής
- Να είναι χημικά, μικροβιολογικά και φυσικοχημικά **σταθερός** (Ghosh* et al., 2004)
- Να έχει **pH 5,5 με 6**, κατάλληλο για χρήση στο δέρμα, στο οποίο η δραστική ουσία θα βρίσκεται σε μη ιονισμένη κατάσταση.
- Να χαρακτηρίζεται από κατάλληλο ιξώδες που να εξασφαλίζει την παραμονή της ουσίας προς διαπέραση στην επιφάνεια του δέρματος, ικανοποιητικό χρονικό διάστημα ώστε να απορροφηθεί (Williams, 2007)

pH

Το φυσιολογικό pH του δέρματος κυμαίνεται μεταξύ 5,50 και 6. Αντίθετα, ένα δέρμα που φλεγμαίνει, βρίσκεται σε κατάσταση ασθένειας ή έχει υποστεί λύση της συνέχειας του, εμφανίζει pH ελαφρώς όξινο. Αυτό έχει αντίκτυπο και στην σταθερά διάχυσης του δέρματος Km.

Μία ουσία σε ιονισμένη μορφή θα βρει μεγάλη αντίσταση στην διαπέραση από τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας, σε φυσιολογική κατάσταση. Ένα ποσοστό της μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα από τις οδούς των εξαρτημάτων (Mittal et al., 2008).

Ακόμη, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, η αντίσταση των λιπιδίων λόγω της διαφοράς πολικότητας μπορεί να καμφθεί με το σχηματισμό ζεύγους ιόντων του ιόντος της ουσίας με άλλα ιόντα που βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος, Το ζεύγος αυτό εμφανίζει διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να κατανεμηθεί στις διπλοστοιβάδες των λιπιδίων και εκεί να αποδεσμεύσει το ιονισμένο μόριο του δραστικού συστατικού (Barry, 2001).

Ενυδάτωση

Τα φυσιολογικά επίπεδα ενυδάτωσης της κεράτινης στοιβάδας κυμαίνονται από 10 έως 15%. Σε αυτά τα όρια σχηματίζονται οι διπλοστοιβάδες του μεσοκυττάριου χώρου και τα κερατινοκύτταρα διαθέτουν τέτοια μέγεθος και διάταξη ώστε να λειτουργεί αποτελεσματικά ο φραγμός. Μία αφυδατωμένη κεράτινη στοιβάδα είναι πιο εύθραυστή, που μπορεί να οδηγήσει σε ρήξη της συνέχειας της και αύξηση της διαπέρασης ή να την κάνει λιγότερο διαπερατή σε ουσίες, λόγω μείωσης της ελαστικότητας των διπλοστοιβάδων των κεραμιδίων (Williams, 2007)

Αντίθετα, αύξηση του περιεχομένου του νερού της κεράτινης στοιβάδας οδηγεί σε προσρόφηση της περίσσειας νερού στα κερατινοκύτταρα και αποδιάταξη τους. Ακόμη η περίσσεια νερού διαταράσσει και την αρχιτεκτονική των διπλοστοιβάδων των κεραμιδίων, λόγω της αύξησης του ελεύθερου νερού ανάμεσα τους. Σχηματίζονται έτσι κενά στην κεράτινη στοιβάδα που επιτρέπουν αυξημένη διαπέραση ουσιών .

Με τους παραπάνω τρόπους το υδατικό περιεχόμενο της κεράτινης στοιβάδας καθορίζει τον συντελεστή διάχυσης της μεμβράνης Km στο νόμο του Fick, και έτσι τροποποιεί τον ρυθμό της διαδερμικής απορρόφησης.

Θερμοκρασία

Η φυσιολογική θερμοκρασία του δέρματος στον ανθρώπινο οργανισμό είναι 32 °C. Με την αύξηση της θερμοκρασίας του δέρματος, είτε λόγω συστηματικής πάθησης είτε τοπικά, παραδείγματος χάριν λόγω φλεγμονής, αυξάνεται η ρευστότητα των λιπιδίων των διπλοστοιβάδων της κεράτινης στοιβάδας (Sartorelli et al., 2000).

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της αντίστασης της κεράτινης στοιβάδας στη διαπέραση και αντίστοιχη αύξηση στον συντελεστή διάχυσης της κεράτινης στοιβάδας, στον νόμο του Fick.

Ακόμη, ο συντελεστής διάχυσης D μπορεί να οριστεί και ως:

$$D = K\,T / 6\,\pi\,r\,\eta$$

Εξίσωση 9. Η σταθερά διάχυσης D εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Mittal et al., 2008)

Όπου :

K συντελεστής διάχυσης μεμβράνης

T θερμοκρασία

r μέγεθος ισοδύναμης σφαίρας το μορίου προς διάχυση

η το ιξώδες του μέσου διάχυσης

Έτσι εκφράζεται και μαθηματικά η εξάρτηση του φαινομένου της παθητικής διάχυσης από τη θερμοκρασία. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, αυξάνεται και ο ρυθμός της μεταφοράς μάζας από το ένα διαμέρισμα στο άλλο (Dragicevic & Maibach, 2017a).

3.2.2. Βιολογικοί παράγοντες

Ανατομική περιοχή

Στον άνθρωπο παρατηρούνται διαφορές στον ρυθμό διαδερμικής απορρόφησης από μία ανατομική περιοχή σε άλλη. Συνήθως η μεταβολή αυτή ακολουθεί το πάχος του δέρματος h, και έτσι επηρεάζει την ροή, σύμφωνα με το νόμο του Fick .

Το πάχος του δέρματος ανά ανατομική περιοχή κατατάσσεται από το μικρότερο προς το μεγαλύτερο ως εξής:

Επιφάνεια όπισθεν του αυτιού < όσχεο < τριχωτό κεφαλής< περιοχή ματιών < μέτωπο< πρόσωπο <λαιμός < κορμός < μηροί < άνω άκρα < παλάμες< πέλματα (Ghosh* et al., 2004).

Στις παλάμες και τα πέλματα η αντίσταση στη διαπέραση είναι μέγιστη καθώς εκεί εντοπίζεται μία ακόμη στοιβάδα ανάμεσα στην κεράτινη και την ακανθωτή, η υαλώδης. Στόχος αυτής της

στοιβάδας είναι η προστασία των περιοχών που δέχονται μεγαλύτερη επιφανειακή πίεση από εξωτερικούς παράγοντες (Mittal et al., 2008). Για περισσότερα βλ. Κεφάλαιο 1.

Φύλο

Το πάχος της κεράτινης στοιβάδας και η αγγείωση του δέρματος είναι συνήθως μεγαλύτερα στους άνδρες, ενώ το pH του δέρματος είναι ελαφρώς πιο όξινο.

Οι άνδρες εμφανίζουν περισσότερα τριχοθυλάκια και μεγαλύτερης διαμέτρου ιδρωτοποιούς αδένες, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα να διέλθει μία ουσία από την οδό των εξαρτημάτων (H. Benson, 2005).

Στις γυναίκες τώρα η θερμοκρασία, ανάλογα την φάση του έμμηνου κύκλου μπορεί να αυξάνεται, επηρεάζοντας όπως είδαμε παραπάνω τη σταθερά διάχυσης του νόμου του Fick (Ghosh* et al., 2004).

Παρόλ'αυτά μελέτες με συστήματα διαδερμικής χορήγησης νικοτίνης έδειξαν πως η άδηλη απώλεια νερού και ο ρυθμός διαδερμικής απορρόφησης δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα (I. Singh & Morris, 2011)

Ηλικία

Ο φραγμός του δέρματος και πιο συγκεκριμένα η δομή της κεράτινης στοιβάδας, φαίνεται να μην σχηματίζεται πλήρως μέχρι και το τρίτο έτος ζωής του ανθρώπου. Μέχρι τότε η διαπερατότητα του δέρματος είναι ιδιαίτερα αυξημένη.

Παράλληλα, τα νήπια εμφανίζουν αυξημένη άδηλη απώλεια νερού, μειωμένη ενυδάτωση, και αυξημένο δερματικό μεταβολισμό. Έτσι, ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται κατά τον υπολογισμό της δόσης για θεραπεία βρεφών και νηπίων, λόγω του υψηλού πηλίκου επιφάνειας δέρματος προς σωματικό βάρος και αντίστοιχα αυξημένου κινδύνου εμφάνισης τοξικότητας (Mittal et al., 2008).

Αντίστοιχη είναι και η κατάσταση του φραγμού με το πέρας της ηλικίας. Μετά τα σαράντα έτη μειώνεται η παραγωγή λιπιδίων στην κεράτινη στοιβάδα και η παραγωγή κολλαγόνου και ελαστίνης στο χόριο με συνέπεια να μειώνεται σταδιακά η ενυδάτωση του δέρματος. Στους γηραιότερους παρατηρούνται αλλαγές κατά την κερατινοποίηση, με μείωση του μεγέθους των κερατινοκυττάρων και αύξηση του μεσοκυττάριου χώρου. Τα παραπάνω οδηγούν σταδιακή μείωση της λειτουργίας του φραγμού (Ghosh* et al., 2004).

Φωτότυπος

Δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές που να αποδίδονται στην διαφορά συγκέντρωσης της μελανίνης.

Παρολ'αυτά οι φωτότυποι I έως III είναι περισσότερο επιρρεπείς σε βλάβες από την υπεριώδη ακτινοβολία, που με τη σειρά της μπορεί να επιφέρει αλλαγές στη δομή της κεράτινης στοιβάδας, ακόμη και φλεγμονώδεις καταστάσεις, που τροποποιούν τη σταθερά διαχυσης της κεράτινης

στοιβάδας. Ακόμη έχει παρατηρηθεί αύξηση της ενυδάτωσης και αντίστοιχα της αποτελεσματικότητας της λειτουργίας του φραγμού σε άτομα φωτότυπου III εώς IV. Είναι χρήσιμο να διερευνηθεί περαιτέρω (Mittal et al., 2008).

Κατάσταση του δέρματος

Το παθολογικό δέρμα εμφανίζει σημαντικές διαφορές στην διαπερατότητα σε σχέση με το υγιές. Ο ερεθισμός, η αυξημένη αιματική ροή και η αγγειοδιαστολή που συνοδεύουν την φλεγμονή αυξάνουν σημαντικά την από του δέρματος απορρόφηση. Σε περίπτωση τραυματισμού και λύσης συνέχειας του δέρματος η απορρόφηση αυξάνεται τόσο που δεν μιλάμε πιά για από του δέρματος απορρόφηση (Mittal et al., 2008).

Σε περίπτωση χρόνιων παθήσεων όπως ιχθύαση, ψωρίαση ή ατοπική δερματίτιδα, όπου αυξάνεται η άδηλη απώλεια νερού, διαταράσσεται η φυσιολογική ανανέωση των κερατινοκυττάρων της κεράτινης στοιβάδας και αλλοιώνεται το πρωτεϊνικό υπόβαθρο του φραγμού του δέρματος, παρατηρείται ραγδαία αύξηση της διαπερατότητας (Joke A. Bouwstra & Ponec, 2006), (Abd et al., 2016).

Άλλες παθολογικές καταστάσεις που μπορεί να επηρεάζουν την από του δέρματος διαπέραση είναι η ακμή, οι μυκητιάσεις και οι βλάβες από τον ιό του έρπητα, καθώς οδηγούν σε λύσεις συνέχειας του δέρματος και αυξάνουν τη διαπερατότητα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Μεταβολισμός στο δέρμα

Ο μεταβολισμός στο δέρμα δεν επηρεάζει απευθείας κάποιο από τα φυσικοχημικά μεγέθη που συμμετέχουν στον νόμο διάχυσης του Fick. Παίζει όμως καθοριστικό ρόλο για την βιοδιαθεσιμότητα μία ουσίας χορηγούμενης από το δέρμα. Έχοντας ορίσει ως πλεονέκτημα της χορήγησης από το δέρμα την αποφυγή του φαινομένου πρώτης διόδου, οφείλουμε να αναφέρουμε και το μικρό ποσοστό μεταβολισμού που λαμβάνει χώρα στο δέρμα

Πριν κατανεμηθεί μία ουσία προς απορρόφηση στην κεράτινη στοιβάδα, ενδέχεται να μεταβολιστεί από τα στελέχη μικροοργανισμών που ανήκουν στην φυσιολογική χλωρίδα της επιδερμίδας (K. K. Shah et al., 2012). . Ακόμη, σε συνθήκες εγκλεισμού κατά τη χορήγηση φαίνεται να αυξάνεται ο πληθυσμός των δερματόφυτων, τα οποία συμμετέχουν με τη σειρά τους στο μεταβολισμό ουσιών, ενώ αλλάζουν και το pH της επιδερμίδας με τα προϊόντα του μεταβολισμού τους (Dragicevic & Maibach, 2015).

Στη συνέχεια, τα κερατινοκύτταρα εκφράζουν μεταβολικά ένζυμα πρώτης φάσης όπως υδροξυλάσες, διαιθυλάσες, μονο-οξυγενάσες, εστεράσες, πεπτιδάσες και αμινοπεπτιδάσες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η από του δέρματος χορήγηση ταζαροτένης σε ψωριασικούς ασθενείς οδήγησε σε επίπεδα θεραπευτικά ταζαροτενικού οξέος στην αιματική κυκλοφορία, ενώ δεν ανιχνεύθησαν επίπεδα ταζαροτένης. (Ghosh* et al., 2004).

Τέλος κυτοχρώματα φαίνεται να εκφράζονται φυσιολογικά στην επιδερμίδα, αλλά η συνολική τους μεταβολική απόδοση είναι εξαιρετικά μειωμένη σε σχέση με το ήπαρ (I. Singh & Morris, 2011).

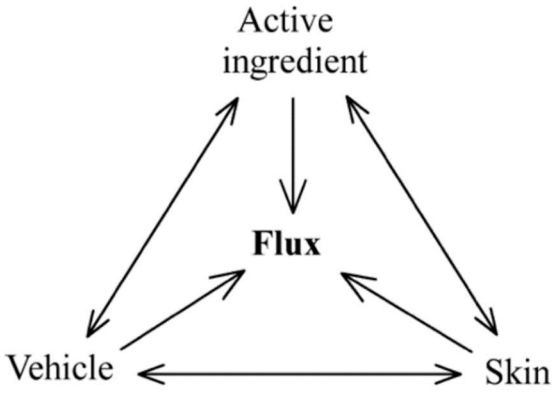
Εθνοτική ομάδα

Διαφορές στην διαπερατότητα παρατηρούνται ανάμεσα σε άτομα διαφορετικών εθνοτικών ομάδων. Σε άτομα αφρο-καραϊβικής καταγωγής παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κερατινοκυττάρων, αυξημένη συνοχή μεταξύ των κερατινοκυττάρων, αυξημένο λιπιδικό περιεχόμενο στην κεράτινη στοιβάδα και μειωμένη ενυδάτωση της. Έτσι, αυτά τα άτομα εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση στη διαπέραση σε σχέση με καυκάσιους (I. Singh & Morris, 2011).

3.3. Μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης

Μέχρι πρόσφατα το δέρμα φαινόταν να είναι μία οδός χορήγησης με ανώτατο όριο επιπέδων δραστικού συστατικού που μπορούμε να επιτύχουμε, με αυτό να βρίσκεται περί τα 10 έως 30 ng/mL (Brown et al., 2006). Τον τελευταίο αιώνα γίνονται προσπάθειες με **Φυσικές** και **Χημικές** μεθόδους αυτό το ανώφλι να ξεπεραστεί. Αυτό γίνεται :

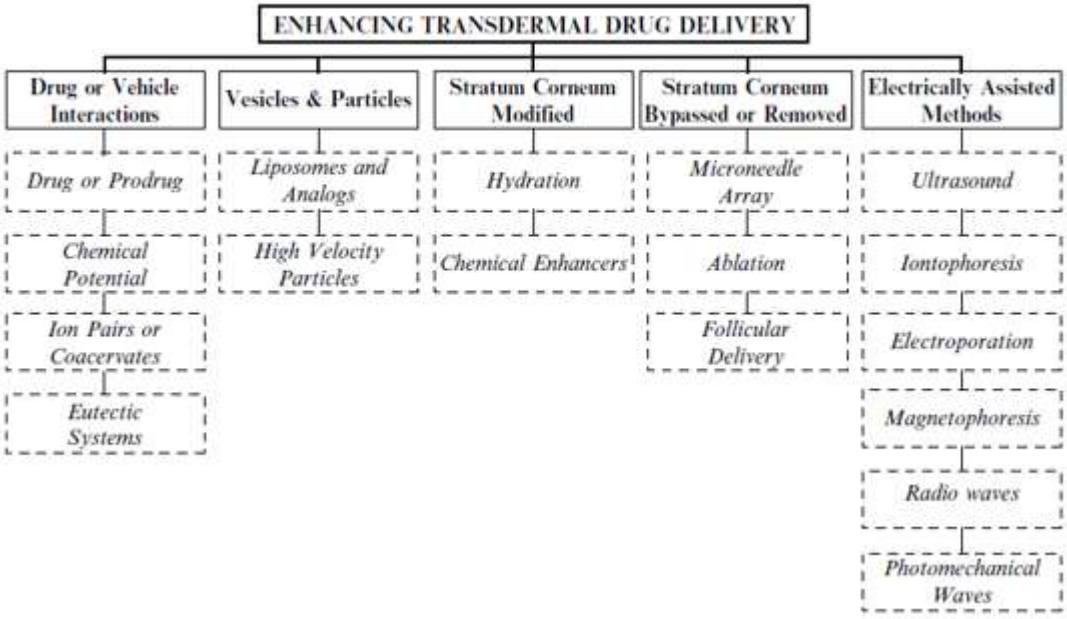
i. Αυξάνοντας την κινητήριο δύναμη του μορίου προς διάχυση, δηλ την συγκέντρωση του στο φορέα, **C** και την τάση του να φύγει από αυτόν (θερμοδυναμική ενεργοτητα, **α**)
ii. Μειώνοντας την αντίσταση του φραγμού του δέρματος στην παθητική διάχυση με χημικούς ενισχυτές διαβατότητα, με στόχο την αύξηση του **D, στον νόμο του Fick**.
iii. Με φυσικές μεθόδους που προσφέρουν ενέργεια για να διαταράξουν το φραγμό της κεράτινης στοιβάδας (Dragicevic & Maibach, 2017a)



Με άλλα λόγια, η διαδερμική χορήγηση είναι ένα δυναμικό φαινόμενο το οποίο εξαρτάται από την τριγωνική αλληλεπίδραση του δραστικού προς διαπέραση με τον φορέα του και με το δέρμα (Otto et al., 2009)

Εικόνα Α 22.Η τριγωνική αλληλεπίδραση δραστικού συστατικού - φορέα - δέρματος που καθορίζει την διαδερμική απορρόφηση (Otto et al., 2009)

Σύμφωνα με τους Maibach et al, οι μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε αυτές που εξαρτώνται από την ενυδάτωση του δέρματος (συνθήκες εγκλεισμού), σε αυτές που εξαρτώνται από το δραστικό συστατικό, σε αυτές που εξαρτώνται από τον φορέα και σε χημικές και φυσικές μεθόδους ενίσχυσης της διαπερατότητας της κεράτινης στοιβάδας. Κάποιες από αυτές εμφανίζονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Dragicevic & Maibach, 2015) .



Εικόνα Α 23. Κατηγοριοποίηση των μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής διαπερατότητας (Thong et al., 2007)

3.3.1. Συνθήκες Εγκλεισμού

Συστήματα διαδερμικής χορήγησης ουσιών που επιτυγχάνουν συνθήκες εγκλεισμού φέρουν συστατικά που εμποδίζουν την φυσιολογική άδηλη απώλεια νερού. Τέτοια μπορεί να είναι είτε ένα επιθέματα με αδιάβροχη επίστρωση είτε ημιστερεοί και υγροί φορείς με κηρούς, έλαια, σιλικόνες, άλλα υδρόφοβα συστατικά ή υδρόφιλα πολυμερή που σχηματίζουν υμένιο.

Εμποδίζοντας την άδηλη απώλεια νερού, η ποσότητα ύδατος που αποβάλλεται φυσιολογικά από τον οργανισμό εγκλωβίζεται στην κεράτινη στοιβάδα, οδηγώντας τα κερατινοκύτταρα αλλά και τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων σε διόγκωση. Τα αποδιατεταγμένα κερατινοκύτταρα και οι πλέον ρευστότερες διπλοστοιβάδες λιπιδίων επιτρέπουν τον σχηματισμό μονοπατιών διαπέρασης για περισσότερο υδρόφιλα μόρια αλλά και ταχύτερη διαπέραση των μορίων που διαπερνούσαν εύκολα τον φραγμό (Williams, 2007).

Παράλληλα, με την αύξηση του υδατικού περιεχομένου της κεράτινης στοιβάδας ενισχύεται και η διαπέραση των πολύ λιπόφιλων μορίων καθώς μειώνεται η συνάφειά τους με τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας, οπότε και μπορούν να συνεχίσουν να κατανέμονται σε βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος, πιο κοντά στην αιαμτική κυκλοφορία. Υπό συνθήκες φυσιολογικής ενυδάτωσης, εξαιρετικά λιπόφιλα μόρια εμφανίζουν μεγάλη συνάφεια με τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας και αφού κατανεμηθούν σε αυτή από τον φορέα τους, σχηματίζουν δεξαμενή στο επίπεδο της κεράτινης στοιβάδας (J. W. Wiechers, 1989)

3.3.2. Τροποποίηση Δραστικού Συστατικού

Ένας τρόπος να αυξηθεί η διαπέραση μίας ουσίας με χαμηλό συντελεστή διάχυσης είναι να τροποποιήσουμε με αντιστρεπτό τρόπο τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που την καθιστούν μη διαπερατή.

Προφάρμακα

Εάν το δραστικό συστατικό προς διαπέραση εμφανίζει χαμηλή διαπερατότητα λόγω ακραίας λιποφιλίας ή υδροφιλίας, επιλέγεται για χορήγηση το προφάρμακό του. Χορηγείται δηλαδή ένα μόριο – ανάλογο του δραστικού που φέρει τέτοιους υποκαταστάτες ώστε να διαθέτει πολικότητα, μέγεθος και σχήμα κατάλληλα για διαδερμική χορήγηση. Αυτό γίνεται με την προϋπόθεση ότι κατά την χορήγηση θα μεταβολιστεί από τα ένζυμα πρώτης φάσης που εδράζουν στην επιδερμίδα και θα αποδώσει το επιθυμητό δραστικό συστατικό στον ιστό στόχο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η 17 - βαλεριανική βηταμεθαζόνη (G. W. Lu & Gao, 2010).

Ζεύγη Ιόντων

Ένα η ουσία προς διαπέραση είναι ιόν μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα μόνο από την οδό των εξαρτημάτων. Για να αυξηθεί η πιθανότητα η ουσία να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα θα πρέπει να μπορεί να κατανεμηθεί και στην παρακυττάρια οδό, στην οποία κατανέμονται μόρια μετρίως λιπόφιλα. Αυτό είναι εφικτό με το σχηματισμό ενός ζεύγους ιόντων μεταξύ του ιόντος της ουσίας προς διαπέραση και ενός αντίθετα φορτισμένο βοηθητικού ιόντος, που προσφέρεται είτε από την επιφάνεια της επιδερμίδας είτε από το φορέα. Το ζεύγος αυτό είναι παροδικό και διασπάται ύστερα από την διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας, στο υδατικό περιβάλλον της δερμίδας (Barry, 2002; Hadgraft & Valenta, 2000).

Ευτηκτικά μίγματα

Ένας ακόμη τρόπος να αυξηθεί η κινητήριος δύναμη προς κατανομή από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα είναι να μειωθεί το σημείο τήξης του δραστικού συστατικού με το σχηματισμό ευτηκτικών μιγμάτων. Ως ευτηκτικό μίγμα ορίζεται η κρυσταλλική δομή που σχηματίζεται κατά την συγκρυστάλλωση συγκεκριμένης αναλογίας δύο μορίων με διαφορετικό σημείο τήξης μεταξύ τους, η οποία εμφανίζει με τη σειρά της σημείο τήξης μικρότερο αυτού των συστατικών της. Οι διαφορετικές ουσίες δεν αντιδρούν προς σχηματισμό μίας νέας.(H. Benson, 2005).

Το νέο χαμηλότερο σημείο τήξης, ιδανικά μικρότερο των 32^{o}C, καθιστά τον συνδυασμό αυτών των δύο μορίων περισσότερο ευκίνητο στην θερμοκρασία της επιφάνειας του δέρματος. Έτσι αυξάνει την θερμοδυναμική του ενεργότητα στον φορέα στον οποίο βρίσκεται και την κινητήριο δύναμη να φύγει από αυτόν και να κατανεμηθεί στην κεράτινη στοιβάδα.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ευτηκτικών μιγμάτων είναι οι συνδυασμοί λιδοκαΐνης-πριλοκαίνης, λιδοκαίνης – μενθόλης, ιπουμπροφένης – νικοτινικού μενθυλίου (G. W. Lu & Gao, 2010)

3.3.3. Τροποποίηση Φορέα

Θερμοδυναμική ενεργότητα

Ως θερμοδυναμική ενεργότητα ***α*** ορίζεται η τάση της διαχεόμενης ουσίας να διαφύγει του φορέα και να κατανεμηθεί στην μεμβράνη για να μεταφερθεί στο διαμέρισμα με την χαμηλότερη συγκέντρωση (Ghosh* et al., 2004).

Περιγράφεται μαθηματικά ως :

$$\alpha = \gamma * C$$

Εξίσωση 10. Η θερμοδυναμική ενεργότητα εξαρτάται από την συγκέντρωση στο φορέα και τον συντελεστή ενεργότητας (J. W. Wiechers, 1989)

Όπου:

γ ο συντελεστής ενεργότητας της ουσίας

C η συγκέντρωση της ουσίας στο φορέα

Σε συστήματα απείρως διαλυμένα (ιδεατά), η θερμοδυναμική ενεργότητας εξισώνεται με την συγκέντρωση. Σε μη ιδεατά συστήματα, όπου η συγκέντρωση αυξάνεται, η φυσική κίνηση των μορίων αρχίζει να επηρεάζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της διαλυμένης ουσίας μεταξύ τους και με αυτά του διαλύτη (J. W. Wiechers, 1989).

Ο συντελεστής ενεργότητας εξαρτάται από την **συγκέντρωση κορεσμού** στον εκάστοτε φορέα. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η συγκέντρωση της ουσίας στο φορέα στην συγκέντρωση κορεσμού της στο συγκεκριμένο περιβάλλον, τόσο μεγαλύτερο συντελεστή ενεργότητας Μία ουσία μπορεί να βρίσκεται στην ίδια συγκέντρωση σε δύο διαφορετικούς φορείς και να εμφανίζει διαφορετική θερμοδυναμική ενεργότητα άρα και διαφορετική κινητήριο δύναμη για την διάχυση (Mitragotri et al., 2011).

Είναι φανερό ότι η επιλογή του φορέα παίζει καθοριστικό ρόλο για την διάχυση της ουσίας.

Υπερκορεσμένος φορέας

Ένας απλός τρόπος η ουσία προς διάχυση να εμφανίσει υψηλή θερμοδυναμική ενεργότητα στο φορέα είναι η συγκέντρωση της να αλλάζει στο σημείο επαφής με την μεμβράνη. Αυτό είναι εφικτό σε έναν φορέα όπου το δραστικό συστατικό βρίσκεται διαλυμένο σε έναν καλό διαλύτη για αυτό, που όμως κατά την επαφή με την μεμβράνη ο διαλύτης αυτός διαφεύγει λόγω πτητικότητας. Έτσι στιγμιαία η ουσία βρίσκεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της συγκέντρωσης κορεσμού και έχει την μέγιστη θερμοδυναμική ενεργότητα και αντίστοιχα μέγιστη κινητήριο δύναμη για διάχυση.

Ο κίνδυνος αυτής της πρακτικής είναι είτε να διαφύγει νωρίτερα ο πτητικός διαλύτης, είτε η ουσία να καθιζάνει αδιάλυτη στην επιφάνεια της μεμβράνης λόγω πιθανών πυρήνων κρυστάλλωσης

από ανωμαλίες της επιφάνειας της μεμβράνης (H. Benson, 2005). Και στις δύο περιπτώσεις η ουσία δεν είναι πιά διαθέσιμη προς διάχυση (Walters, 2002).

Η κρυστάλλωση και καθίζηση του δραστικού συστατικού κατά την εξάτμιση του πτητικού διαλύτη μπορεί να αποφευχθεί με την ενσωμάτωση στο φορέα πηκτικών παραγόντων, , όπως είναι τα υδρόφιλα πολυμερή, που εμποδίζουν το σχηματισμό πυρήνων κρυστάλλωσης (Hadgraft & Lane, 2016).

Σύστημα διαλυτών

Ένας τρόπος να αυξηθεί η θερμοδυναμική ενεργότητα χωρίς τον κίνδυνο καθίζησης της ουσίας είναι η επιλογή συστήματος διαλυτών. Πρόκειται για έναν κύριο διαλύτη, στον οποίο είναι πολύ καλά διαλυτή η ουσία, και έναν δευτερεύοντα διαλύτη, στον οποίο η ουσία δεν είναι τόσο καλά διαλυτή.

Η επιλογή του πρώτου διαλύτη έχει σκοπό την διάλυση μέγιστη ποσότητας της ουσίας προς διαπέραση στον φορέα, ώστε να αυξάνεται η συγκέντρωση της στο φορέα, με στόχο την ύπαρξη επαρκούς δόσης για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος, όπως είδαμε στο νόμο του Fick *(εξίσωση 1,4).* Η επιλογή του δεύτερου διαλύτη έχει στόχο να χαμηλώσει την διαλυτότητα της ουσίας στο φορέα, με στόχο την εξίσωση της με τη συγκέντρωση κορεσμού και την επίτευξη μέγιστης θερμοδυναμικής ενεργότητας στο φορέα. Η επιλογή του είδους και του ποσοστού του κάθε διαλύτη γίνεται με βάση τον Δείκτη Σχετικής Πολικότητας (**Relative Polarity Index**) (J. W. Wiechers et al., 2004b).

Περισσότερα για την επιλογή συστήματος διαλυτών στο ***Κεφάλαιο 3 Μορφοποίηση με στόχο την αποτελεσματικότητα.***.

3.3.4. Φορείς τρίτης γενιάς

Ένας τρόπος να βελτιωθεί η διαπέραση μίας ουσίας με μη ευνοϊκά χαρακτηριστικά είναι ο εγκλωβισμός της σε φορείς που καλύπτουν τα χαρακτηριστικά αυτά, διαπερνούν την κεράτινη στοιβάδα και απελευθερώνουν την δραστική ουσία στον ιστό στόχο.

Κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι δακτύλιοι που σχηματίζονται από παράγωγα δεξτρόζης και χαρακτηρίζονται από λιπόφιλη εσωτερική επιφάνεια και υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια. Ο εγκλεισμός ενός δραστικού συστατικού χαμηλής διαπέρασης σε δακτυλίους κυκλοδεξτρινών μπορεί να αυξήσει την διαλυτότητα ενός λιπόφιλου δραστικού συστατικού και να το προστατέψει από αποσταθεροποίηση.

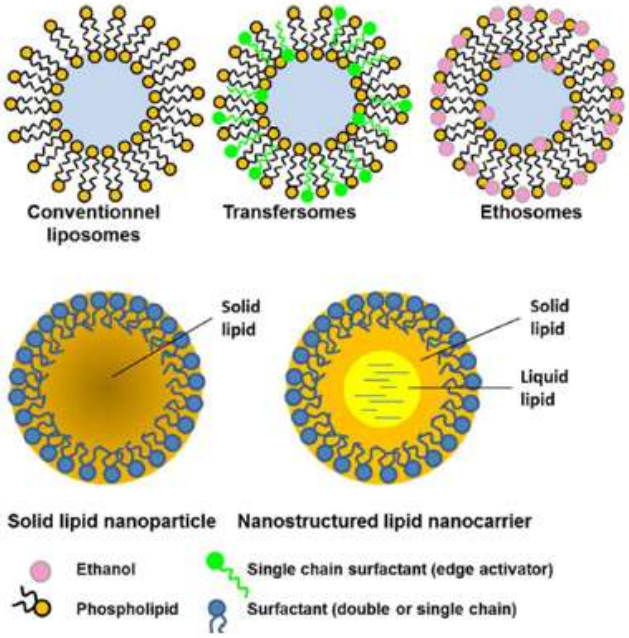
Ο μηχανισμός με τον οποίο ενισχύεται εδώ η διαπέραση είναι διττός. Αρχικά αυξάνεται η συγκέντρωση που μπορεί να ενσωματωθεί στο φορέα λόγω αύξησης διαλυτότητας του. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα της δραστικής με την κυκλοδεξτρίνη είναι μεγαλύτερο των 500 Da και άρα

δύσκολα διαπερνά την κεράτινη στοιβάδα. Αντίθετα, η ύπαρξη των κυκλοδεξτρινών στην επιφάνεια της επιδερμίδας επιτρέπει την εκχύλιση λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας. Έτσι αποσταθεροποιείται ο φραγμός των διπλοστοιβάδων λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας και αυξάνεται η διαπέραση (G. W. Lu & Gao, 2010).

Λιποσώματα

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή συστήματα διασποράς δύο η και περισσότερων φάσεων που σχηματίζονται με την οργάνωση φωσφολιπιδίων σε διπλοστοιβάδες. Αυτές σχηματίζουν σταγονίδια με υδρόφιλη επιφάνεια και πυρήνα και υδρόφοβες περιοχές στο εσωτερικό των διπλοστοιβάδων (Alexander T. Florence, 2001). Μπορούν να ενσωματώσουν μεγάλο εύρος ουσιών στον πυρήνα, στην διεπιφάνεια ή στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Τα μεγέθη των σταγονιδίων κυμαίνονται από μερικά νανόμετρα εώς και λίγα μικρόμετρα. Ανάλογα το μέγεθος των σταγονιδίων των μεμβρανών των φωσφολιπιδίων διακρίνονται σε SUV(Small.. Vesicles) , LUV (Large Vesicles) (J. A. Bouwstra & Honeywell-Nguyen, 2002b).

Με την ενσωμάτωση μίας ουσίας σε λιποσώματα, αυξάνεται η διαλυτότητα της στο φορέα και μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση και αντίστοιχα μεγαλύτερη κινητήριος δύναμη για διαπέραση στην επιφάνεια του δέρματος. Ακόμη, το μικρό μέγεθος των λιποσωμάτων μπορεί να αυξήσει την διαπέραση ουσιών με μη ιδανικά χαρακτηριστικά, επιτρέποντας την δίοδο τους από την παρακυττάρια οδό και καλύπτοντας τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ουσιών με αυτά των φωσφολιπιδίων και άλλων προσδεμάτων της επιφάνειας των φωσφολιπιδίων. Τέλος κατά την διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας, τα φωσφολιπίδια των λιποσωμάτων μπορούν να ενσωματωθούν στις διπλοστοιβάδες των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας και να αυξήσουν την ρευστότητα τους, μειώνοντας την αντίσταση στη διαπέραση μορίων (G. W. Lu & Gao, 2010).
Διάφορες μορφές που μπορούν να πάρουν τα λιποσώματα είναι τα νιοσώματα, τα αιθοσώματα, τα τρανσφεροσώματα, τα μικροσωματίδια στερεών λιπαρών συστατικών και τα μικροσωματίδια στερεών – υγρών λιπαρών συστατικών. Ως νιοσώματα ορίζονται τα κολλοειδή συστήματα που σχηματίζονται από διπλοστοιβάδες μη ιονικών επιφανειοδραστικών. Ως αιθοσώματα ορίζονται τα λιποσώματα που σχηματίζονται από αιθανόλη, φωσφολιπίδια και νερό. Αυτά πλεονεκτούν έναντι των



Εικόνα Α 24. Κατηγορίες Λιποσωμάτων που χρησιμοποιούνται στην διαδερμική χορήγηση (M. Sala & , A. Elaissari, 2018)

άλλων μορφών καθώς, πέρα από το μικρό τους μέγεθος, ευνοϊκές για την διαπέραση είναι και οι συνθήκες εγκλεισμού που σχηματίζουν. Κατά τη χορήγηση, η αιθανόλη ως πτητική απομακρύνεται γρήγορα και τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν υμένιο στην επιφάνεια του δέρματος. Τέλος τα τρανσφεροσώματα είναι μία κατηγορία λιποσωμάτων που σχηματίζεται από φωσφολιπίδια και επιφανειοδραστικά απλής αλύσου, που προσφέρουν μεγάλη ελαστικότητα στις διπλοστοιβάδες και αντίστοιχα μεγάλη ευκολία στην διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας (G. W. Lu & Gao, 2010), (Godin & Touitou, 2007).

Νανογαλακτώματα

Ως νανογαλακτώματα ορίζονται τα κολλοειδή συστήματα διασποράς που σχηματίζονται κατά την ανάμειξη λιπαρών και υδατικών συστατικών σε συνδυασμό με κατάλληλους επιφανειοδραστικούς παράγοντες και επαρκή προσφορά ενέργειας. Το μέγεθος των σταγονιδίων των κολλοειδών αυτών συστημάτων κυμαίνεται από 150 nm έως 1μm. Πρόκειται για θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα που βελτιώνουν την διαδερμική χορήγηση με παρόμοιο τρόπο όπως τα λιποσώματα. Εγκλωβίζοντας το δραστικό συστατικό στο λιπόφιλο πυρήνα των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης καλύπτουν τα χαρακτηριστικά που το εμποδίζουν να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα. Ταυτόχρονα με το μικρό μέγεθος των συστημάτων και την αύξηση της διαλυτότητας, άρα και της συγκέντρωσης που μπορεί να επιτευχθεί στο φορέα, αυξάνεται η κινητήριος δύναμη του φορέα για διαπέραση και η κινητικότητα του δραστικού συστατικού (Mittal et al., 2008).

Μικρογαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα είναι διαυγή και οπτικά ισότροπα, θερμοδυναμικά σταθερά, υγρά κολλοειδή συστήματα διασποράς που σχηματίζονται αυθόρμητα κατά την ανάμειξη κατάλληλων ποσοτήτων υδατικής φάσης, λιπαρής φάσης, επιφανειοδραστικών και συνεπιφανειδραστικών παραγόντων (G. W. Lu & Gao, 2010). Διακρίνονται σε μικρογαλακτώματα λάδι σε νερό (o/w), νερό σε λάδι (w/o) και ημισυνεχείς δομές (bicontinuous structures) που ακολουθούν την αρχιτεκτονική των υγρών κρυστάλλων με δυναμική εναλλαγή μεταξύ των δομών, ανάλογα τις συνθήκες περιβάλλοντος (Ghosh* et al., 2004). Χαρακτηρίζονται από χαμηλό ιξώδες και μέγεθος σταγονιδίων εσωτερικής φάσης μικρότερο ή ίσο με 150 nm (Kreilgaard, 2002).

Το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων αυξάνει δυνατότητα διάλυσης δραστικών συστατικών στο φορέα καθώς αυτά εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων ή στην διεπιφάνεια της μεμβράνης επιφανειοδραστικών που τα περιβάλλει. Η διαπέραση τελικά αυξάνεται λόγω του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων, της αυξημένης συγκέντρωσης του δραστικού στον φορέα και της χημικής επίδρασης των επιφανειοδραστικών και συνεπιφανειοδραστικών παραγόντων στην κεράτινη στοιβάδα (Paolino et al., 2002), (Kitagawa et al., 2011).

Περισσότερα στο ***Κεφάλαιο 4 Μικρογαλακτώματα***.

3.3.5. Χημικές Μέθοδοι Ενίσχυσης Διαπερατότητας

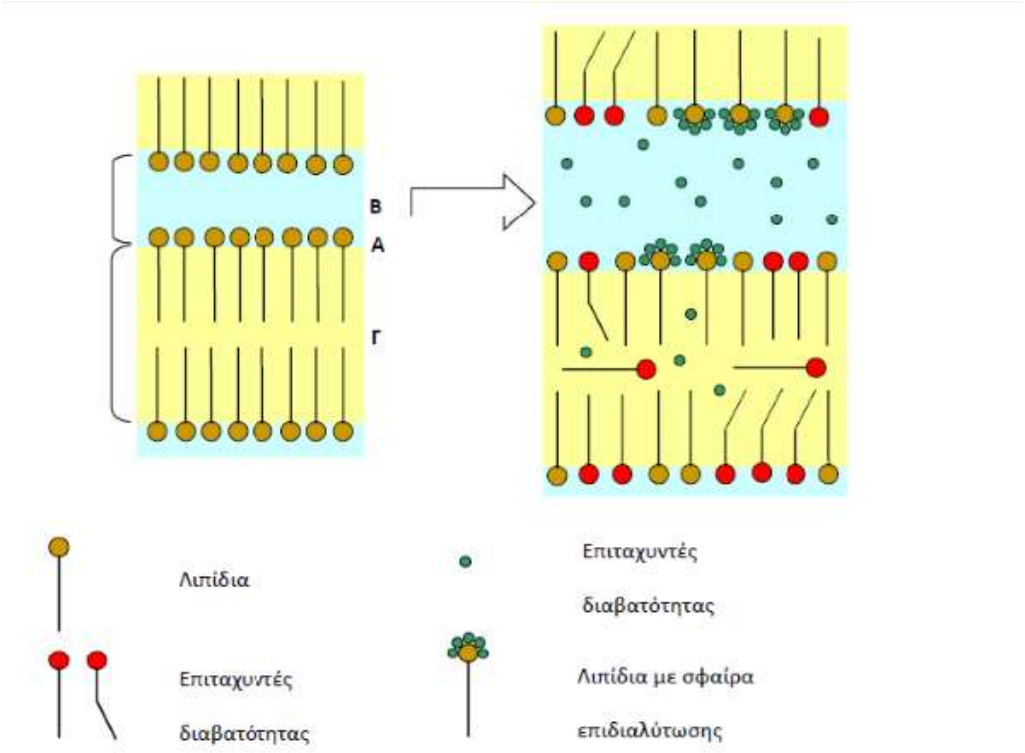
Ως χημικοί ενισχυτές διαπερατότητας (ΧΕΔ, **chemical penetration enhancers, CPE**) ορίζονται οι φαρμακολογικά αδρανείς χημικές ουσίες που μπορούν να διαχυθούν από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα και να αλληλεπιδράσουν με συστατικά της, με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την αντίστασή της στη διαπέραση ουσιών από την επιφάνεια της στο εσωτερικό του δέρματος (Tan & Pfister, 1999) (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Ο ιδανικός ΧΕΔ είναι:

- φαρμακολογικά αδρανής
- μη τοξικός
- μη ερεθιστικός
- μη αλλεργιογόνο
- άοσμος, άχρωμος
- οργανοληπτικά ανεκτός
- γρήγορος και προβλέψιμος στην δράση
- αντιστρέψιμος στο αποτέλεσμα του
- μονής κατεύθυνσης, (να μην επιτρέπει την έξοδο απαραίτητων συστατικών από το σώμα)
- χαμηλού κόστους
- δραστικός σε χαμηλή συγκέντρωση
- συμβατός με μεγάλο εύρος δραστικών συστατικών και εκδόχων (Adrian C. Williams & Barry, 2004), (Dragicevic & Maibach, 2015)

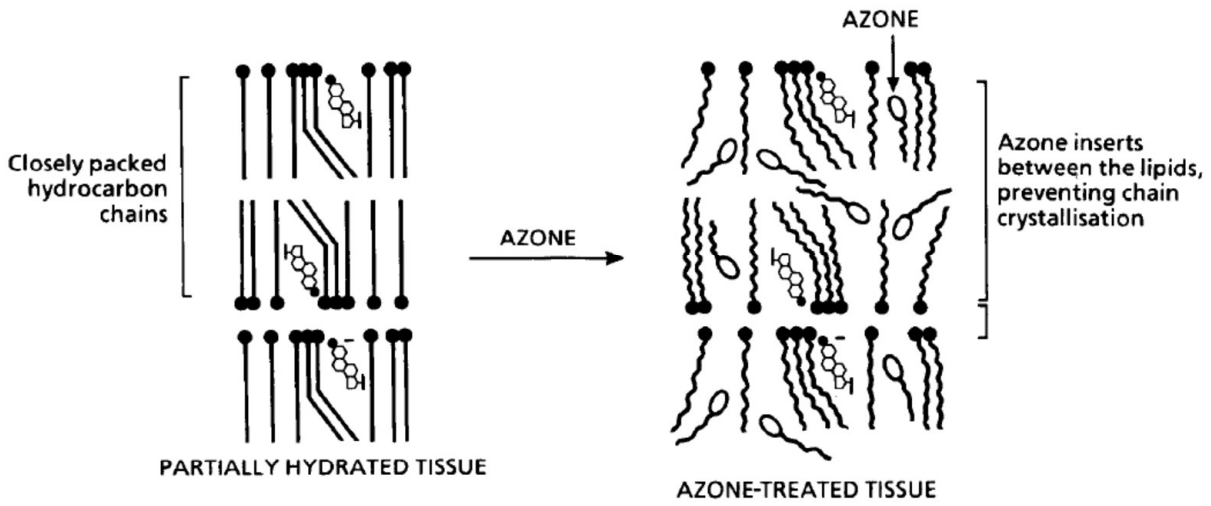
Σύμφωνα με τη θεωρία Λιπιδίων – Πρωτεϊνών – Κατανομής (LPP , Lipid Protein Partiotioning) που διατύπωσε ο (Barry, 1988), έχουν διακριθεί τρείς **περιοχές δράσης** χημικών ενισχυτών διαπερατότητας στην κεράτινη στοιβάδα (Thong et al., 2007):

A. Υδρόφιλες κεφαλές λιπιδίων διπλοστοιβάδων κεράτινης στοιβάδας
B. Ελεύθερο νερό ανάμεσα στις διπλοστοιβάδες των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας
C. Υδρόφοβες ουρές λιπιδίων διπλοστοιβάδων κεράτινης στοιβάδας



Εικόνα Α 25. Οι περιοχές δράσης των ΧΕΔ Α. Πολικές κεφαλές, Β. Ελεύθερο νερό, Γ. Υδρόφοβες ουρές (Αριτζίδου, 2018)

Οι ενισχυτές που αλληλεπιδρούν με τις **υδρόφοβες κεφαλές (Α)** είναι συνήθως υδρόφιλα μόρια τα οποία περιβάλλουν τις κεφαλές. Αλληλεπιδρούν με αυτές με δεσμούς υδρογόνου και ιοντικές δυνάμεις και σχηματίζουν σφαίρες ενυδάτωσης. Η αύξηση του όγκου τοπικά οδηγεί σε αποδιάταξη των διπλοστοιβάδων και αύξηση της ρευστότητας τους. Δημιουργούνται έτσι υδρόφιλοι δίαυλοι στη μάζα των υδρόφοβων διπλοστοιβάδων που μειώνουν την αντίσταση τους στη διαπέραση τόσο λιπόφιλων όσο κ υδρόφιλων μορίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η αζόνη, συνθετικό μόριο με υδρόφιλη κεφαλή και λιπόφιλη ουρά, που σχεδιάστηκε για να χρησιμοποιηθεί εξ αρχής ως ενισχυτής διαδερμικής διαπερατότητας και δρα ταυτόχρονα στην περιοχή Α και C (H. Benson, 2005) (Dragicevic & Maibach, 2015).



Εικόνα Α 26. Η αζόνη με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων των διπλοστοιβάδων και διαταράσσει την κρυσταλλική τους δομή (Willia & Barry, 1991)

Οι ενισχυτές που αλληλεπιδρούν με τις **περιοχές ελεύθερου νερού (B)** μεταξύ των διπλοστοιβάδων αντικαθιστούν τη μάζα του ελεύθερου νερού και , καθώς σε αυτούς είναι περισσότερο διαλυτή η δραστική προς διαπέραση, αλλάζουν τον συντελεστή διάχυσης D, αλλάζοντας το μέσω διάχυσης στο διαμέρισμα του δέκτη. Πρόκειται για διαλύτες που εμφανίζουν παράμετρο διαλυτότητας κατά Hansen (δ) αρκετά συγγενή με αυτήν της κεράτινης στοιβάδας (δsc = 20 MPa ^{½}) (H. Benson, 2005). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν (Ghosh* et al., 2004):

- η προπυλενογλυκόλη (δ_{PG} = 28.6 MPa ^{½})
- η αιθανόλη (δ_{ETOH} = 27.4 MPa ^{½})
- η αιθόξυ-διγλυκόλη (Transcutol®)

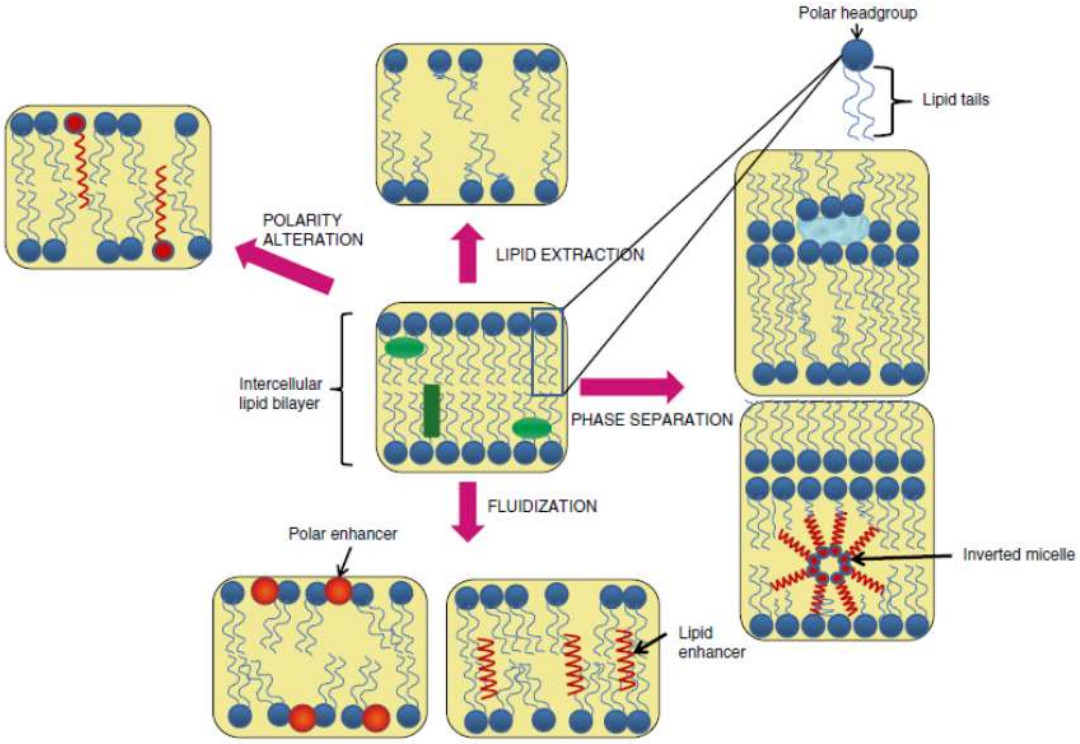
Οι ενισχυτές που αλληλεπιδρούν με τις **υδρόφοβες ουρές (C)** των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας είναι συνήθως υδρόφοβα γραμμικά μόρια που παρεμβάλλονται στις υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων και αλλάζουν την διάταξη τους στο χώρο, δημιουργώντας κενά στη συνοχή των διπλοστοιβάδων και αυξάνοντας τη διαπερατότητα τους (Dragicevic & Maibach, 2017a). Ιδανικό μήκος αλυσίδας για έναν ενισχυτή που δρα σε αυτήν την περιοχή είναι τα εννέα έως δεκατέσσερα άτομα άνθρακα, ενώ η ύπαρξη διπλού δεσμού στην αλυσίδα ενισχύει περαιτέρω την αποδιάταξη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα το cis – οκταδεκενοϊκό οξύ και το ολεϊκό οξύ (H. Benson, 2005). Εδώ ανήκουν:

- τερπένια όπως το λιμονένιο, η 1,8- κινεόλη, η L – μενθόλη
- λιπαρές αλκοόλες και εστέρες όπως, ο μυριστικός εστέρας ισοπροπυλικής αλκόολης (IPM)
- απαραίτητα ακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το ολεϊκό, το λινολεϊκό, το λινολενικό και το παλμιτικό οξύ, λόγω της ακορεστότητας τους και του κατάλληλου μήκους λιπαρής αλυσίδας (Dragicevic & Maibach, 2015), (Van Zyl et al., 2016) (Foldvari, 2000).

Πολλά μόρια ΧΕΔ δρουν σε παραπάνω από μία περιοχές ταυτόχρονα, όπως γίνεται και στην περίπτωση των εστέρων ισοπροπυλικής αλκοόλης, όπως ο παλμιτικός εστέρας ισοπροπυλικής αλκοόλης (IPM, isopropyl palmitate). Κατά την επαφή του με την κεράτινη στοιβάδα παρεμβάλλεται στις λιπόφιλες ουρές των λιπιδίων και αντικαθιστά κάποια από αυτά στις διπλοστοιβάδες (C), αυξάνοντας την ρευστότητα τους. Στη συνέχεια αντικαθιστά μία μάζα νερού στην περιοχή (B) αυξάνοντας την σταθερά διάχυσης για την προς διαπέραση ουσία. Τέλος αλληλεπιδρά με τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων, δημιουργώντας κενά στην διάταξή τους (A). Το σύνολο αυτών των επιδράσεων μειώνει την έκταση κατά την οποία τα λιπίδια διατάσσονται σε εξάγωνα και αυξάνει την έκταση της ορθορομβικής διάταξης, αυξάνοντας συνολικά την ρευστότητα των μεσοκυττάριων μεμβρανών της κεράτινης στοιβάδας (H. Benson, 2005), (G. W. Lu & Gao, 2010).

Διακρίνονται ακόμη λιγότερο σημαντικές περιοχές αλληλεπίδρασης των ενισχυτών με την κεράτινη στοιβάδα, όπως:

D. ο **κερατινοποιημένος φάκελος** που περιβάλλει τα κερατινοκύτταρα. Σε αυτήν την περιοχή δρά το διμεθυλοσουλφοξίδιο (DMSO), αλλάζοντας αντιστρεπτά την τριτοταγή δομή της κερατίνης, από άκαμπτη α - έλικα σε ευέλικτες β - πτυχώσεις. Εξωθεί έτσι το περιεχόμενο νερό στα κερατινοκύτταρα και σχηματίζει δεξαμενές ελεύθερου νερού ανάμεσα τους και πόρους που αυξάνουν την διαπέραση υδρόφιλων μορίων. Με τον ίδιο τρόπο δρα και το διμέθυλ – φορμαμίδιο(DMF) και το διμεθυλ – ισοσορβίδιο (DMI) αλλά είναι δραστικά σε τοξικές συγκεντρώσεις και η δράση τους είναι μη αντιστρεπτή (G. W. Lu & Gao, 2010). Σε αυτό το σημείο φαίνεται να δρα και η αζόνη και το λαουρικό οξύ (Dragicevic & Maibach, 2017a), (Mitragotri et al., 2011). Με αντίστοιχο τρόπο δρα και η ουρία, αυξάνοντας ταυτόχρονα το υδατικό περιεχόμενο των κερατινοκυττάρων και δημιουργώντας κενά στην διάταξή τους (Dragicevic & Maibach, 2015).
E. **οι γέφυρες** που συνδέουν τα κερατινοκύτταρα μεταξύ τους
F. η **δυνατότητα εκχύλισης λιπιδίων** από την κεράτινη στοιβάδα προς την επιφάνεια με κατάλληλο διαλύτη που θα σχηματίσει μυκίλλια (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011). Αυτή τη δράση εμφανίζουν αλκοόλες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, το DMSO και κάποια επιφανειοδραστικά όπως τα άλατα του λαουρικού οξέος (Daniels, 2004) αλλά και αμφοτερικές βεταΐνες (Majella E. Lane, 2013). Δημιουργούνται έτσι υδρόφιλοι πόροι στις διπλοστοιβάδες λιπιδίων που διαταράσσουν την λειτουργικότητα του φραγμού (Dragicevic & Maibach, 2017a).



Εικόνα Α 27. Η επίδραση των ΧΕΔ στα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας σύμφωνα με τούς (Adrian C. Williams & Barry, 2004)

Μειονεκτήματα των ΧΕΔ είναι η πιθανή ερεθιστικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, λόγω του τρόπου με τον οποίο δρουν επί της κεράτινης στοιβάδας, ενώ φαίνεται να μην μπορούν να επηρεάσουν την διαπερατότητα μορίων μεγαλύτερων των 500 Da. Σε αυτά τα μειονεκτήματα έρχονται να απαντήσουν οι φυσικές μέθοδοι ενίσχυσης της διαπερατότητας (Dragicevic & Maibach, 2015).

3.3.6. Φυσικές Μέθοδοι ενίσχυσης διαπερατότητας

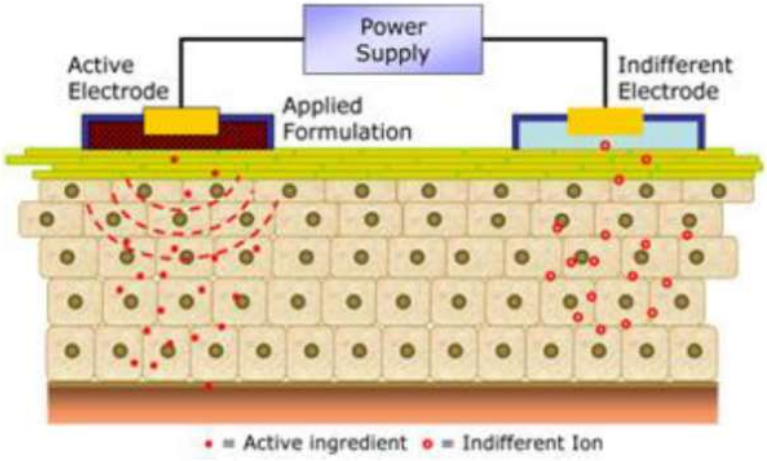
Στις φυσικές μεθόδους διαπερατότητας ανήκουν οι μέθοδοι που δεν ενισχύουν την παθητική διάχυση αλλά διαταράσσουν τον φραγμό της κεράτινης στοιβάδας προσφέροντας ενέργεια με φυσικά μέσα όπως χαμηλής έντασης ηλεκτρικό ρεύμα, υπέρηχοι και μικροβελόνες.

Πρόκειται για οικονομικές μεθόδους, εύκολες στη χρήση, με αντιστρεπτή επίδραση στη φυσιολογία του οργανισμού, αποτελεσματικές και ασφαλείς (Brown et al., 2006).

Ιοντοφόρηση

Κατά την ιοντοφόρηση, δύο ηλεκτρόδια εφαρμόζονται σε αντιδιαμετρικά σημεία της επιφάνειας του δέρματος όπου γίνεται η χορήγηση του φορέα του δραστικού συστατικού. Εφαρμόζεται χαμηλής έντασης συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα, περίπου 0,5mA/cm^2, που δημιουργεί μία ηλεκτρική ώθηση, ή αλλιώς μία κλήση ηλεκτρικού δυναμικού. Αυτή με τη σειρά της επιφέρει παροδικές αλλαγές στην κεράτινη στοιβάδα και ευνοεί την είσοδο νερού σε αυτή μέσω υδρόφιλων πόρων

(Santos et al., 2008). Η μέθοδος αυτή αυξάνει την διαπέραση ανιόντων που ακολουθούν την κίνηση των ιόντων που υπάρχουν φυσιολογικά στον ιστό, σύμφωνα με το φαινόμενο της ιοντοϋδροκίνησης ή ελεκτροόσμωσης, της κίνησης των ιόντων διαμέσου της κεράτινης στοιβάδας που ακολουθεί την κίνηση των μορίων του νερού (Daniels, 2004). Ακόμη αυξάνεται η διαπέραση μη φορτισμένων πολικών μορίων που ακολουθούν την κίνηση των μορίων νερού, στην ίδια κατεύθυνση με τα ανιόντα (Donnelly et al., 2014).

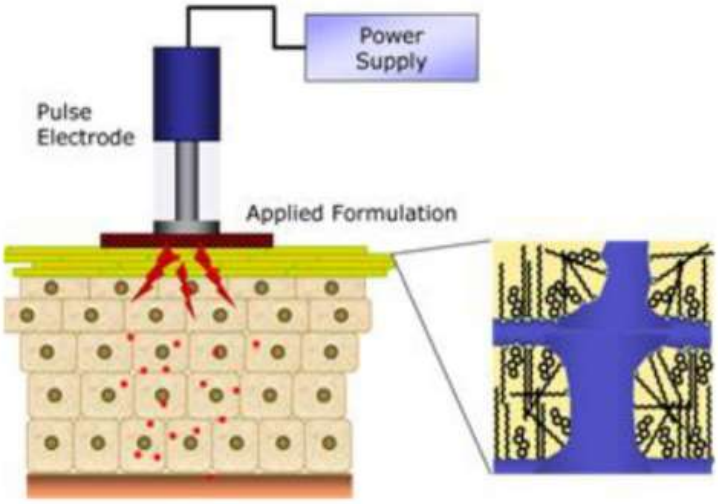


Εικόνα Α 28. Βασική οργανολογία διαδερμικής χορήγησης με ιοντοφόρηση (Daniels, 2004)

Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από τον τύπο του ηλεκτροδίου, το pH του φορέα και την συγκέντρωση του σε δραστικό συστατικό, την ένταση και τον τύπο του ρεύματος που εφαρμόζεται. Με τη μέθοδο αυτή, η διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας δεν εξαρτάται πιά από το μοριακό βάρος της ουσίας αλλά από το φορτίο και την πολικότητά της. Εμπόδια στην διαπέραση ιονισμένων μορίων μπορεί να είναι η ηλεκτρονιακή άπωση και η ηλεκτρόλυση, ενώ αποτρεπιτκός παράγον για τη χρήση της είναι το τοπικό αίσθημα καύσου (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011). Χρησιμοποιείται συνήθως για χορήγηση αντιφλεγμονώδων φαρμάκων και τοπική αναισθησία (Mittal et al., 2008).

Ηλεκτροφόριση

Κατά την διαδερμική χορήγηση ουσιών με τη βοήθεια της ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος, όπου έχει χορηγηθεί ο φορέας με το δραστικό συστατικό, ηλεκτρικό ρεύμα υψηλής τάσης, από 10 έως 1000V, για διάστημα από 10 μs έως 100 μs (Donnelly et al., 2014). Η κίνηση αυτή των ηλεκτρονίων εξαναγκάζει τα μόρια του νερού στην κεράτινη στοιβάδα να κινηθούν προς κατώτερες στοιβάδες δημιουργώντας παροδικούς υδρόφιλους πόρους, που αυξάνουν την παθητική διάχυση πολικών μη φορτισμένων μορίων. Παράλληλα λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της ηλεκτροόσμωσης κατά το οποίο ιονισμένα μόρια ακολουθούν την κλήση των φορτίων που δημιουργείται, από την επιφάνεια του δέρματος προς το εσωτερικό (Daniels, 2004).

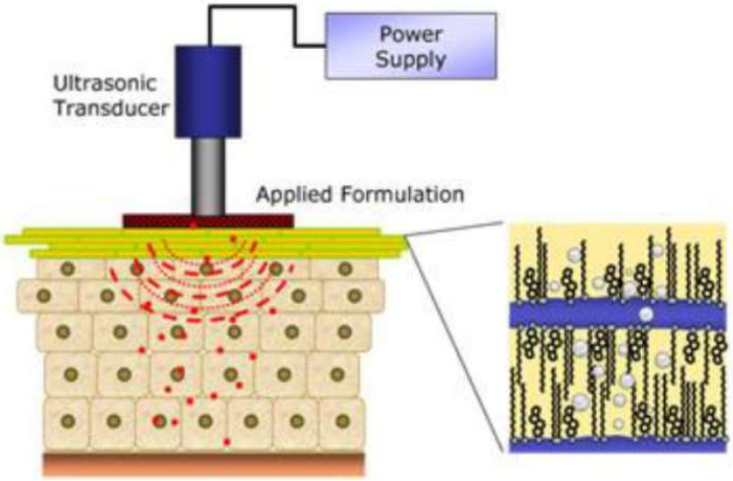


Εικόνα Α 29. Βασική μεθοδολογία διαδερμικής χορήγησης με ηλεκτροφόρηση (Daniels, 2004)

Έχει χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της διαπέρασης μικρών μορίων όπως η φαιντανύλη, η τιμολόλη η τετρακαΐνη και η μεθοτρεξάτη, αλλά και μεγαλύτερων μορίων όπως η μπλεομυκίνη, η cis- platin, DNA μόρια, αντιγόνα εμβολίων και ινσουλίνη (Ghosh* et al., 2004).

Υπέρηχοι

Κατά την ενίσχυση της διαπέρασης ουσιών με την βοήθεια των υπερήχων, χαμηλής συχνότητας υπέρηχοι, έως 20 KHz , με παλμούς διάρκειας περίπου πέντε δευτερολέπτων, εφαρμόζονται στην επιφάνεια του δέρματος όπου έχει χορηγηθεί ο φορέας του δραστικού συστατικού (Mittal et al., 2008). Η εφαρμογή των υπερήχων επάγει θερμικές, χημικές και φυσικές αλλαγές στη δομή του δέρματος που επιτρέπουν τελικά την δίοδο μικρών μορίων με μη ιδανικά χαρακτηριστικά για διαδερμική χορήγηση, όπως η δικλοφενάκη, η καφεΐνη, η οιστραδιόλη, η αλδοστερόνη, η λιδοκαΐνη και η τεστοστερόνη (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).



Εικόνα Α 30. Βασική οργανολογία διαδερμικής χορήγησης με υπερήχους (Daniels, 2004)

Ευοδώνεται με αυτόν τον τρόπο και η διαπέραση μεγάλων μορίων, όπως η ηπαρίνη και η ινσουλίνη, η ερυρθοποιητίνη και η γ – ιντερφερόνη (Daniels, 2004). Αποθαρυντικό παράγοντα για τη χρήση του αποτελεί ο ήπιος ερεθισμός που παρατηρείται, που συνοδεύεται συνήθως από εικόνα ήπιο εγκαύματος (Donnelly et al., 2014).

Εκτομή με λέϊζερ (Laser Ablation)

Στην μέθοδο αυτή εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος προς διαπέραση μονοχρωματική δέσμης κόκκινου φωτός με τη βοήθεια μικροσυστάδων πηγών φωτός. Η μεταφορά ενέργειας θερμαίνει στιγμιαία μικρή περιοχή του ιστού σε θερμοκρασία άνω των 100^{o} C και εξαναγκάζει το περιεχόμενο νερό σε εξάτμιση.

Ο όγκος αυτός του νερού εξωθείται προς την επιφάνεια, σχηματίζοντας παροδικά κενά στον φραγμό της κεράτινης στοιβάδας (Brown et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο αφαιρείται ο κύριος φραγμός της διαπέρασης και σχηματίζονται δίοδοι τόσο για υδρόφιλα όσο και για υδρόφοβα μόρια, αλλά και μόρια μεγάλου μοριακού βάρους (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Ριπή κόνεων

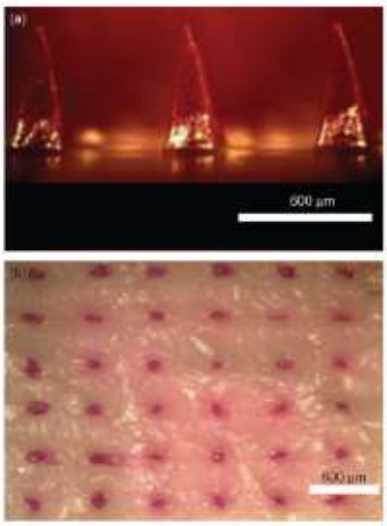
Με την μέθοδο της ριπής κόνεων (Powder Jet), στερεά σωματίδια σε λεπτό καταμερισμό που φέρουν κατάλληλη συγκέντρωση της προς διαπέραση ουσίας κατευθύνονται με μεγάλη πίεση προς την επιφάνεια του δέρματος. Η εφαρμοζόμενη πίεση εξαναγκάζει τα στερεά να διαπεράσουν την κεράτινη στοιβάδα. Στη συνέχεια το δραστικό συστατικό, έχοντας διαπεράσει το περιοριστικό βήμα της παθητικής διάχυσης, διαλυτοποιείται στο μικροπεριβάλλον της επιδερμίδας και του χόριου και κατανέμεται προς την αιματιική κυκλοφορία (Brown et al., 2006).

Παρόλο που πρόκειται για μία ανώδυνη τεχνική που ευνοεί την συμμόρφωση των ασθενών, δεν είναι ακόμη εμπορικά διαθέσιμη λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας της απόδοσης της, που οφείλεται στην διατομική μεταβλητότητα της φυσιολογίας και της κατάστασης της επιδερμίδας (Mittal et al., 2008).

Μικροβελόνες

Ως μικροβελόνες ορίζονται τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης που συντίθενται από βελόνες σε σειρές παράλληλες μεταξύ τους, αγκυρωμένες σε κατάλληλη βάση διαδερμικού συστήματος (Mathur et al., 2010). Το μέγεθος τους είναι τέτοιο, ώστε να διαπερνούν την κεράτινη στοιβάδα και μέρος της επιδερμίδας, αλλά να μην έρχονται σε επαφή με τις νευρικές απολήξεις ακρίβώς κάτω από τον δερμοεπιδερμιδικό σύνδεσμο και να μην γίνονται αντιληπτές από τον οργανισμό (Dragicevic & Maibach, 2017b). Το μήκος τους κυμαίνεται από 25μm έως 2000μm (Donnelly et al., 2014).

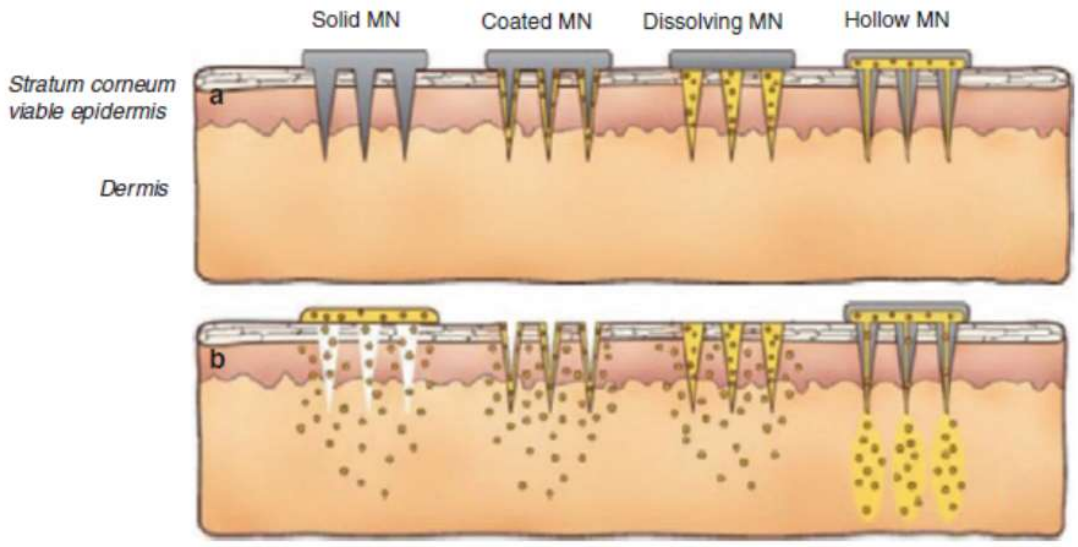
Πρόκειται για έναν ανώδυνο τρόπο χορήγησης ουσιών μεγάλου εύρους φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και μοριακού βάρους, καθώς πλέον η απορρόφηση δεν εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας (Nastiti et al., 2017). Σε αυτό οφείλεται και η μεγάλη συμμόρφωση των ασθενών στην θεραπεία με χρήση μικροβελόνων. Έχουν παρατηρηθεί όμως και ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη χρήση, όπως ερύθημα, ερεθισμός και σχηματισμός πόρων στην επιδερμίδα. Τα παραπάνω θα μπορούσαν να εξαλειφθούν με την επιλογή κατάλληλων υλικών κατασκευής, εκδόχων και γεωμετρίας (Donnelly et al., 2014).



Εικόνα Α 31. Μικροβελόνες από πυρίτιο στο μικροσκόπιο και οι πόροι που αφήνουν αυτές στο δέρμα για διαπέραση ουσιών (Donnelly et al., 2010)

Μπορούν να κατασκευαστούν σε πληθώρα σχημάτων και μεγεθών με τη βοήθεια συστημάτων μικρο – ηλεκτρομηχανικής. Χρησιμοποιούνται επίσης πληθώρα υλικών όπως βιοδιασπώμενα πολυμερή, γυαλί, χειρουργικό ατσάλι, σάκχαρα και πυρίτιο (Mathur et al., 2010), (Sugibayashi, 2017). Διακρίνονται σε :

i. Προ - επεξεργασμένες μεταλλικές
ii. Επικαλυμμένες
iii. Διαλυόμενες
iv. Κοίλες
v. Προσροφητικές – Σχηματισμού Πηκτής

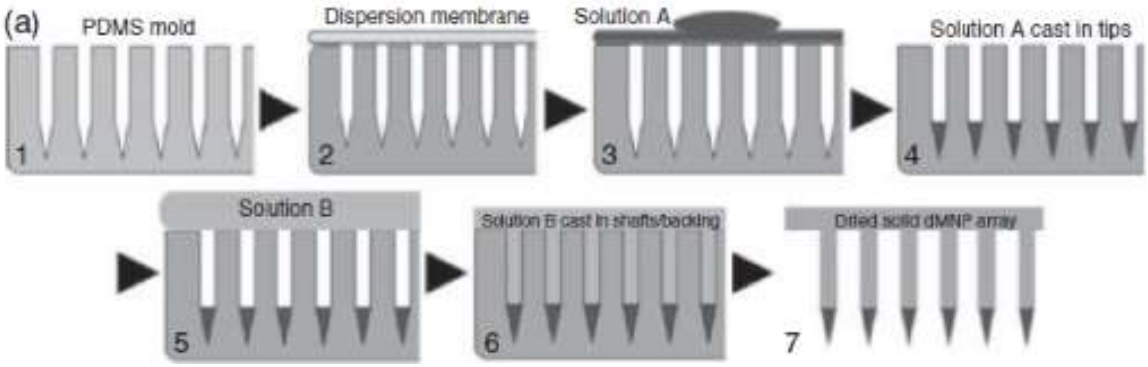


Εικόνα Α 32. Διαφορετικά ήδη μικροβελόνων και ο τρόπος απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού από αυτά (Dragicevic & Maibach, 2017b)

Ενώ οι μέθοδοι που επιτρέπουν την κατασκευή τους είναι:

i. Μικρο - εκμαγεία
ii. Κοπή laser
iii. Λιθογραφία

iv. Εγχάραξη υγρού – ξηρού



Εικόνα Α 33. Κατασκευή μικροβελόνων πολλαπλών βιοδιασπώμενων πολυμερών με την μέθοδο των μικρο – εκμαγείων (Donnelly et al., 2014)

Οι μικροβελόνες πλέον βρίσκουν εφαρμογή στην διαδερμική χορήγηση εμβολίων, μορίων μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες και βιολογικά μόρια, αλλά και στην κοσμητολογία και την θεραπευτική παρακολούθηση ασθενών(Dragicevic & Maibach, 2017b). Πιο συγκεκριμένα στην κοσμητολογία έχει χρησιμοποιηθεί στην επανόρθωση εσχάρων από ακμή, στην επανόρθωση ρυτίδων και στην ενδοδερμική χορήγηση συνδυασμού υαλουρονικού οξέος με ασκορβικό οξύ και εστέρες του ρετινοϊκού οξέος (Mittal et al., 2008). Θεωρούνται πλεονεκτική μέθοδος χορήγησης εμβολίων, καθώς ενδοδερμικά παρατηρείται μεγαλύτερη άνοσο - αντίδραση με μικρότερη δόση αντιγόνου και ταυτόχρονα μειωμένη δυσάρεστη φλεγμονώδη απόκριση (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Τέλος, έχουν κατασκευαστεί συνδυασμοί μικροβελόνων με συστήματα ιοντοφόρησης κ ηλεκτροφόρησης, για την αύξηση της ταχύτητας διαπέρασης μεγαλομορίων (Daniels, 2004). Η ευκολία χρήσης των μικροβελόνων από τους ασθενείς και η πληθώρα δραστικών συστατικών και εκδόχων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, τοποθετούν τις μικροβελόνες στο βέβαιο μέλλον της διαδερμικής χορήγησης (Brown et al., 2006).

3.4. Μέθοδοι μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης

Κατά την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παρασκευασμάτων χορηγούμενων από του δέρματος από την φαρμακευτική βιομηχανία απαιτούνται προκλινικές μελέτες αρχικά in vitro και στη συνέχεια In vivo, σε μικρά πειραματόζωα ή μικρές ομάδες εθελοντών, για τον υπολογισμό της δόσης που τελικά διαπερνά το δέρμα και φτάνει την αιματική κυκλοφορία, αλλά και πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη χορήγηση. Οι μελέτες αυτές συλλέγουν φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά δεδομένα που θα συνθέσουν τον φάκελο του νέου φαρμάκου πρός έγκριση από τις αρμόδιες κανονιστικές αρχές.

Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες μείωσης του αριθμού των εθελοντών σε προκλινικές μελέτες, αλλά και των ex vivo προϊόντων, είτε ζωικής είτε ανθρώπινης προέλευσης. Αυτό είναι δυνατόν χάρη στις In silico μελέτες που βασίζονται σε μαθηματικά μοντέλα. Χρηματοδοτούνται μάλιστα αρκετά προγράμματα με συνεργασία επιστημόνων από όλη την ακαδημαϊκή κοινότητα, για την ανάπτυξη νεών τέτοιων μοντέλων και προσομοιώσεων.

3.4.1. In vitro – Ex vivo μελέτες διαδερμικής απορρόφησης

Οι In vitro προκλινικές μελέτες είναι το πρώτο βήμα κατά την ανάπτυξη μίας νέας φαρμακοτεχνικής μορφής. Πρόκειται για γρήγορες και οικονομικές μελέτες, με επαναλήψιμα αποτελέσματα και δυνατότητα αυτοματοποίησης. Πολύ σημαντική είναι η τυποποίηση και η επικύρωση των in vitro μεθόδων από διεθνείς οργανισμούς, ώστε να μειωθεί και η διεργαστηριακή μεταβλητότητα ακολουθώντας τα εναρμονισμένα πρότυπα (Godin & Touitou, 2007), (Guth et al., 2015).

Πρώτο μέλημα είναι ο υπολογισμός της αθροιστικής δόσης που διαπερνά το δέρμα και φτάνει στην αιματική κυκλοφορία, δηλαδή της βιοδιαθέσιμης δόσης, με στόχο τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας του προϊόντος. Στη συνέχεια υπολογίζονται φυσικοχημικές παράμετροι που αφορούν τον ρυθμό απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού από τον φορέα, τον ρυθμό διαπέρασης της μεμβράνης και το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης που κατακρατείται από τον φορέα και από την μεμβράνη προς διαπέραση (Godin & Touitou, 2007),.

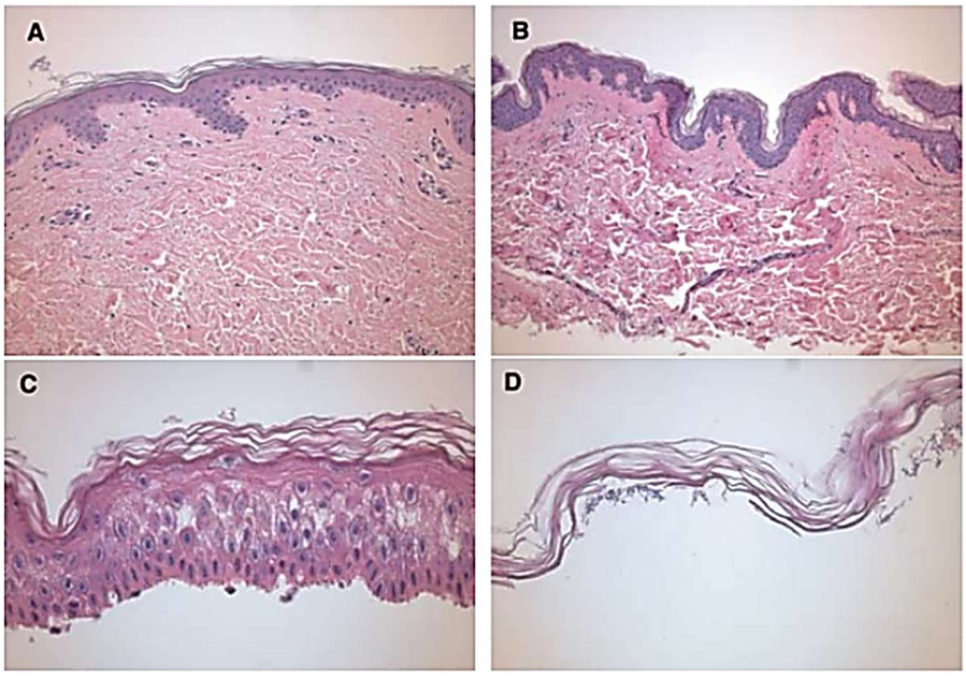
Ανθρώπινο δέρμα

Μία ιδανική πειραματική διάταξη θα ήταν με τη χρήση ανθρώπινου ιστού με αιματική κυκλοφορία και μεταβολισμό. Κάτι τέτοιο είναι αδύνατον, οπότε το πλησιέστερο σε αυτό είναι ex vivo ανθρώπινο δέρμα, που προέρχεται από διεθνείς τράπεζες ιστών. Αυτές συλλέγουν ιστούς που έχουν προέλθει από μειωτικές επεμβάσεις πλαστική χειρουργικής, από χειρουργική εκτομή άλλου αιτίου και από πτώματα (Guth et al., 2015). Χρησιμοποιείται συνήθως δέρμα από την κοιλιακή χώρα, τους μηρούς ή την πλάτη, καθώς στις περιοχές αυτές το δέρμα χαρακτηρίζεται από μέτρια

διαπερατότητα και μικρή σχετικά συγκέντρωση τριχοσμηγματογόνων μονάδων. Επίσης προτιμώνται γυναίκες δότες, καθώς εμφανίζουν μικρότερη πυκνότητα τριχοσμηγματογόνων μονάδων, που αποτελούν πέρασμα άνευ αντίστασης κατά την διαδερμική χορήγηση (Abd et al., 2016).

Ανάλογα το φαρμακοτεχνικό σκεύασμα και τον ιστό στόχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο η κεράτινη στοιβάδα, ολόκληρη η επιδερμίδα αλλά και ολικού πάχους δέρμα που περιλαμβάνει και το χόριο. Ακόμη, χρησιμοποιείται δερμοτομημένος ιστός, δηλ. δέρμα που έχει τεμαχιστεί κατά την οριζόντια διάσταση του με δερμοτόμο, ώστε να έχει ομοιόμορφα κατανεμημένο και απόλυτα ελεγχόμενο πάχος, συνήθως 200 έως 400μm. Κατά την δερμοτόμηση αφαιρείται συνήθως το χόριο και μέρος της επιδερμίδας (Wagner et al., 2001). Τέλος, μπορεί να γίνει αποχωρισμός των επιμέρους στοιβάδων του χόριου και της επιδερμίδας από την κεράτινη στοιβάδα με χημικό τρόπο, συνήθως χρησιμοποιώντας βρωμιούχο νάτριο, αμωνία, EDTA και άλλα ισχυρά οξέα ή βάσεις. Μειονέκτημα στην διεργασία αποτελεί ο ισχυρός χημικός χαρακτήρας των αντιδραστηρίων που μεταβάλλουν την λειτουργία του προς μελέτη φραγμού (Ehrhardt & Kim, 2008a).

Με θερμικό τρόπο ο διαχωρισμός διευκολύνεται με την εμβάπτιση του απαλλαγμένου από υποδόριο λίπος ιστού σε νερό στους 60 ° C, και καθαρισμός του ιστού με θρυψίνη, για την απομάκρυνση τυχών πρωτεϊνών που μπορεί να οδηγήσουν σε καθίζηση του δραστικού συστατικού (Kligman & Christophers, 1963).



Εικόνα Α 34. Κάθετη τομή στο μικροσκόπιο με χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης Α)Δέρματος ολικού πάχους, Β)Δερμοτομημένου δέρματος, Γ)Επιδερμίδας ύστερα από θερμικό διαχωρισμό από το χώριο και Δ)Επιδερμίδα ύστερα από κατεργασία με θρυψίνη (Ehrhardt & Kim, 2008a)

Κατά τη χρήση ανθρώπινού ιστού η πειραματική διάταξη πλησιάζει αρκετά την In vivo χορήγηση. Εκτίθεται ταυτόχρονα και σε πηγές μεταβλητότητας, όπως η διατομική μεταβλητότητα των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ιστού, όπως πάχος, σύσταση λιπιδίων, πυκνότητα τριχοσμηγματογόνων μονάδων και κατάσταση υγείας ιστού. Ακόμη, τέτοια δείγματα απαιτούν ιδιαίτερο χειρισμό και προετοιμασία, καθώς πρόκειται για βιολογικό ιστό (Van De Sandt et al., 2004).

Σημαντικό είναι να ελέγχεται η ακεραιότητα της κεράτινης στοιβάδας μετά τους διάφορους χειρισμούς και πριν την τοποθέτηση στην πειραματική διάταξη. Αυτό συνήθως γίνεται με την μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας της μεμβράνης, η οποία οφείλει να είναι χαμηλή σε μία ακέραιη μεμβράνη (York et al., 2001).

Ζωικό δέρμα

Στην συνέχεια, καθώς ανθρώπινος ιστός δεν είναι εύκολα διαθέσιμος χρησιμοποιούνται ex vivo ιστοί από ζωικούς οργανισμούς (Miki et al., 2010). Οι πιο κοινοί οργανισμοί δότες είναι τα φύδια, τα ινδικά χοιρίδια, οι μύες, οι χοίροι (κυρίως δέρμα από την περιοχή του αυτιού) , οι βάτραχοι, οι πίθηκοι. Οι ζωικοί ιστοί προτιμώνται σε σχέση με τον ανθρώπινο καθώς είναι πιο εύκολα διαθέσιμοι και πιο οικονομικοί (Herkenne et al., 2006).

Τίθενται όμως και εδώ ζητήματα βιοηθικής, ενώ δεν αναιρείται ο παράγον της διατομικής μεταβλητότητας. το είδος του ζώου που εξετάζουμε έχει μεγάλη επίδραση στην σταθερά διάχυσης. Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο είδος και την ποσότητα των λιπιδίων και των πρωτεϊνών που σχηματίζουν το φραγμό της κεράτινης στοιβάδας από είδος σε είδος. Παρατηρούνται επίσης σημαντικές διαφορές στο πάχος της κεράτινης στοιβάδας και στο pH του δέρματος ενώ σημαντικό ρόλο παίζει και η παρουσία και το πλήθος τριχοσμηγματογόνων μονάδων και ιδρωτοποιών αδένων (Pongjanyakul et al., 2002). Ακόμη, πρέπει να ληφθεί υπόψη η σημαντική υπερεκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας κατά τη χρήση ζωικών ιστών σε σχέση με τον ανθρώπινο ιστό (Simon et al., 2016).

Στην προσπάθεια μείωσης της διεργαστηριακής αλλά και ενδοεργαστηριακής μεταβλητότητας, έχουν αναπτυχθεί τεχνητές μεμβράνες για την μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας.

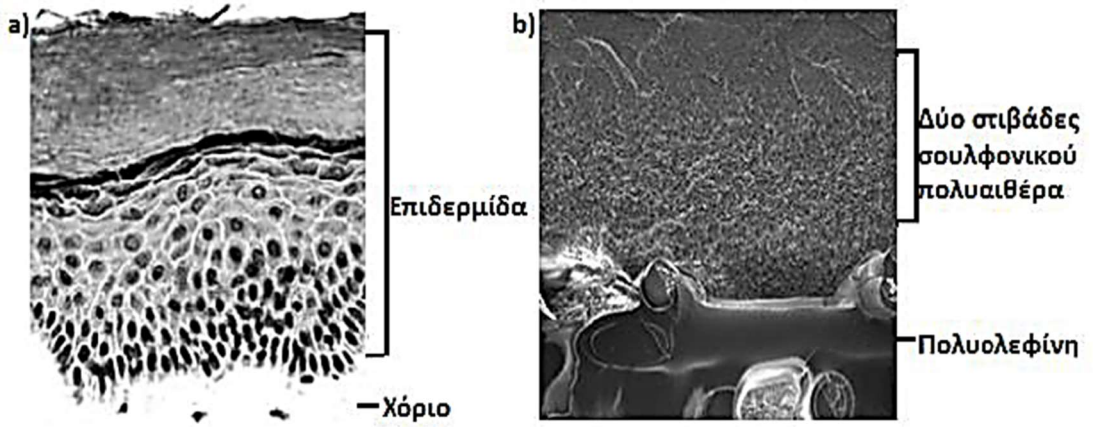
Τεχνητές μεμβράνες – Κυτταρίνη και Silastic®

Η πιο απλή και οικονομική μεμβράνη που χρησιμοποιείται σε μελέτες διαπερατότητας είναι η μεμβράνη κυτταρίνης ή Silastic®, αδρανείς και πορώδεις μεμβράνες που μπορούν να προσροφήσουν λιπαρά συστατικά. Απαντώνται συζευγμένες με πολυδιμεθυλοσιλοξάνη και πολυουρεθάνη. Η μάζα της μεμβράνης είναι εμποτισμένη με μείγμα συνθετικών λιπιδίων που προσομοιάζουν τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας, όπως ο μυριστικός και ο ισοπροπυλικός εστέρας. Πρόκειται για μεμβράνες εξαιρετικά χαμηλής αντίστασης στη διάχυση που χρησιμοποιούνται κυρίως για συγκριτική μελέτη μεταξύ δραστικών συστατικών και φορέων

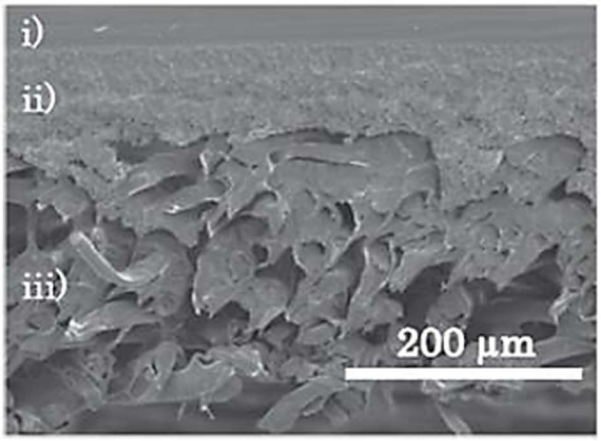
διαδερμικής χορήγησης. Εμφανίζουν μεγάλη ομοιογένεια στο σύνολο τους και μικρή μεταβλητότητα σε σχέση με τον ζωικό ιστό. Υστερεί όμως στην πολυπλοκότητα καθώς δεν διακρίνονται διαφορετικές στοιβάδες υλικών (Pellevoisin et al., 2018), (Ehrhardt & Kim, 2008b).

Τεχνητές μεμβράνες – Strat M ®

Η τεχνητή μεμβράνη Strat M ® είναι μία μεμβράνη δύο στοιβάδων που προσομοιάζει την λειτουργία του κύριου φραγμού κατά την διαδερμική χορήγηση, την κεράτινη στοιβάδα μαζί με το χόριο (Haq et al., 2018). Αποτελείται από δύο στρώματα σουλφονικού πολυαιθέρα με υδρόφοβο χαρακτήρα, ανθεκτικά στη διάχυση, και ένα στρώμα πολυολεφίνης με μικρότερη πυκνότητα και πάχος, που επιτρέπει περισσότερο την διάχυση ουσιών. Το σύνολο της μεμβράνης είναι εμποτισμένο με μείγμα συνθετικών λιπαρών συστατικών που προσομοιάζουν τα φωσφολιπίδια, τα κεραμίδια και την χοληστερόλη της κεράτινης στοιβάδας (Uchida et al., 2015).



Εικόνα Α 35. Η δομή της τεχνητής μεμβράνης Strat - M® σε σύγκριση με το ανθρώπινο δέρμα, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Σπανέας, 2019)



Εικόνα Α 36. Κάθετη τομή της Strat M ® σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, οπου είναι ορατά τα δύο στρώματα σουλφονικού πολυαιθέρα και το τρίτο στρώμα πολυολεφίνης (Uchida et al., 2015)

Το βασικό κριτήριο επιλογής είναι η διάχυση να είναι ο κύριος μηχανισμός διαπέρασης ουσιών διαμέσου αυτής. Η Strat M ® χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο σε προκλινικές In vitro μελέτες καθώς είναι οικονομική, εμπορικά διαθέσιμη, ομοιόμορφη σε όλη την επιφάνεια της, σταθερή στο χρόνο και εύκολη στην χρήση, καθώς είναι διαθέσιμη σε δίσκους αντίστοιχων διαστάσεων με τις πειραματικές διατάξεις (Ghafourian et al., 2004). Ακόμη, δεν εγείρει ζητήματα βιοηθικής, δεν απαιτεί ειδικό χειρισμό ή προετοιμασία, όπως

ενυδάτωση πριν την χρήση, και δεν εμφανίζει μεταβλητότητα από παρτίδα σε παρτίδα (Karadzovska & Riviere, 2013).

Παρόλ'αυτά, κατά τη χρήση της θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το αυξημένο πορώδες και η μειωμένη αντίσταση στη διάχυση σε σχέση με την κεράτινη στοιβάδα, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική υπερεκτίμηση την διαπέρασης. Στο πλαίσιο της μείωσης χρήσης ζωικών ιστών στις προκλινικές μελέτες, γίνονται προσπάθειες υπολογισμού σταθερών συσχέτισης αποτελεσμάτων διαπέρασης από μεμβράνη Strat M ® και από ζωικούς ή ανθρώπινους ιστούς για διάφορες κατηγορίες ουσιών (Ottaviani et al., 2006).

Τεχνητές μεμβράνες - Ανάλογα ανθρώπινου δέρματος

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί συνθετικά ανάλογα του ανθρώπινου δέρματος, με την χρήση κατάλληλων πολυμερικών ικριωμάτων και κυτταροκαλλιεργειών κερατινοκυττάρων και άλλων κυττάρων που απαντώνται στο δέρμα, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μελανινοκύτταρα (Sriram et al., 2018). Είναι δυνατός ο συνδυασμός χιτοζάνης, γλουκοζαμινογλυκάνης και κολλαγόνου, επί των οποίων αναπτύσσονται για 14 έως 21 ημέρες ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Σε αυτό το διάστημα λαμβάνει χώρα πλήρης διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και σχηματίζονται οι διαφορετικές στοιβάδες κυττάρων της επιδερμίδας (Dragicevic & Maibach, 2017b)

Αυτά τα ανάλογα πλησιάζουν αρκετά την αρχιτεκτονική πολυπλοκότητα του ανθρώπινου δέρματος σε κυτταρική σύνθεση και χρησιμοποιούνται περισσότερο για μελέτες τοξικότητας και αποτελεσματικότητας ουσιών στο δέρμα, με στόχο την μείωση χρήσης πειραματόζωών σε τέτοιες μελέτες. Έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας καθώς αποτελούν την καλύτερη διαθέσιμη προσομοίωση του δέρματος ολικού πάχους και της αντίστασης που εμφανίζει αυτό στην διαπέραση (Ehrhardt & Kim, 2008a).

Τέτοια συνθετικά ανάλογα είναι το Epiderm ®, που προσοποιάζει την ανθρώπινη επιδερμίδα, το Episkin ®, το SkinEthic®, το Apligraf® και το TestSkin® που προσομοιάζουν ολόκληρο το ανθρώπινο δέρμα (Ansari et al., 2006), (Dragicevic & Maibach, 2017b).

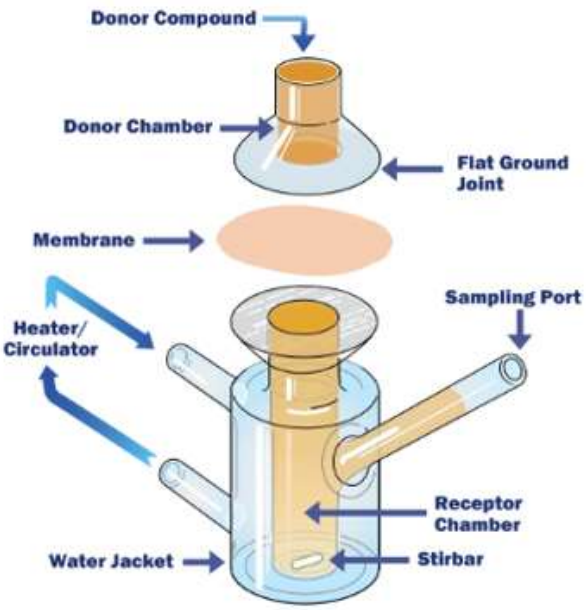
Τα ανάλογα αυτά εμφανίζουν καλή επαναληψιμότητα και μειωμένη διεργαστηριακή μεταβλητότητα, με σχεδόν σταθερό συντελεστή συσχέτισης με την ανθρώπινη επιδερμίδα. Παρόλ'αυτά φαίνεται να υπερεκτιμούν την διαδερμική διαπέραση των ουσιών που μελετώνται σε αυτά, κυρίως λόγω της έλλειψης διπλοστοιβάδων λιπιδίων στην εξωτερική στοιβάδα. Γίνονται προσπάθειες κατασκευής ενός ιδανικού μοντέλου με συντελεστή διάχυσης όμοιο με αυτό του ανθρώπινου δέρματος, ενώ εμφανίζουν παρόμοια αντίσταση στην διαπέραση με το βρεφικό δέρμα (Daniels, 2004),(Dragicevic & Maibach, 2016). Αποτρεπτικό παράγοντα στην χρήση τους αποτελεί το κόστος τους καθώς και η ειδική μεταχείριση κατά τη χρήση και φύλαξη τους, που πλησιάζουν αυτές του ζωικού ιστού (Abdallah et al., 2015).

Κύτταρα διάχυσης Franz και Bronaugh

Όλες οι παραπάνω μεμβράνες, συνθετικές ή ζωικές, χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της διαπέρασης με τη βοήθεια των κυττάρων διάχυσης. Οι συνηθέστεροι τύποι κυττάρων διάχυσης που χρησιμοποιούνται είναι τα κύτταρα Franz και τα κύτταρα Bronaugh. Διαφέρουν σε σημαντικά σημεία αλλά η αρχή λειτουργίας είναι κοινή.

Ένα κύτταρο διάχυσης αποτελείται από (Bronaugh & Stewart, 1985):

- ένα **διαμέρισμα δότη (donor)** στο οποίο τοποθετείται ο φορέας του δραστικού συστατικού προς διαπέραση σε συγκεκριμένη δόση
- ένα **διαμέρισμα δέκτη (receptor)** όπου τοποθετείται κατάλληλος διαλύτης που να προσομοιάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αίματος και να είναι κατάλληλος διαλύτης του δραστικού προς διαπέραση
- μία **μεμβράνη** που ακινητοποιείται υδατοστεγώς και αεροστεγώς ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα και προσομοιάζει την ανθρώπινη ζώσα επιδερμίδα



Εικόνα Α 37. Τα τμήματα των κυττάρων διάχυσης Franz (Gary P. Moss et al., 2015)

Σε συγκεκριμένα σημεία στη διάρκεια του πειράματος γίνονται δειγματοληψίες από το διαμέρισμα του δέκτη και υπολογίζεται με κατάλληλη αναλυτική τεχνική η αθροιστική ποσότητα του δραστικού συστατικού που διαπέρασε την μεμβράνη και ο ρυθμός αυτού του φαινομένου ή ροή, όπως περιγράφεται από την *εξίσωση 2,3 και 4* (OECD, 2008).

Η δόση που τοποθετείται στο διαμέρισμα του δότη μπορεί να είναι τέτοια ώστε να αντιστοιχεί σε άπειρη ή πεπερασμένη δόση. Στην άπειρη δόση (infinite dose) μελετάται η διαπέραση στην οποία καθοριστικό ρόλο παίζει η αντίσταση από την μεμβράνη και όχι η ταχύτητα μείωσης της συγκέντρωσης της ουσίας στο διαμέρισμα του δότη. Στην πεπερασμένη δόση (finite dose), η

δόση εφαρμογής είναι μικρότερη, ενώ στην διαπέραση και στον υπολογισμό των παραμέτρων διάχυσης λαμβάνεται υπόψη ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της ουσίας στο διαμέρισμα του δότη κατά την διάρκεια του πειράματος(Bronaugh, 1995). Το διαμέρισμα του δότη μπορεί να παραμένει ανοιχτό ή να καλύπτεται μερικώς ή πλήρως κατά τη διάρκεια του πειράματος, ώστε να προσομοιάζει τις συνθήκες εφαρμογής του φορέας από τον ασθενή (Gary P. Moss et al., 2015).

Παράλληλα, η δειγματοληψία από το διαμέρισμα του δέκτη μπορεί να γίνει είτε με αφαίρεση του συνόλου του περιεχομένου είτε με λήψη συγκεκριμένου όγκου, όχι μεγαλύτερου από το ένα πέμπτο του συνολικού όγκου. Σε κάθε περίπτωση, ο όγκος υγρού δέκτη (receptor fluid) που αφαιρέθηκε αναπληρώνεται με ίσο όγκο υγρού. Η επιλογή του υγρού δέκτη γίνεται με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου προς διάχυση. Συνήθως πρόκειται για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με pH 7,4 και ωσμοτικότητα 0,9%, τέτοια ώστε να προσομοιάζει τα χαρακτηριστικά του αίματος. Στη συνέχεια μπορούν να προστεθούν συντηρητικά, όπως φορμαλδεΰδη, αζίδιο του νατρίου και αντιβιοτικά όπως η γενταμυκίνη (Levintova et al., 2011).

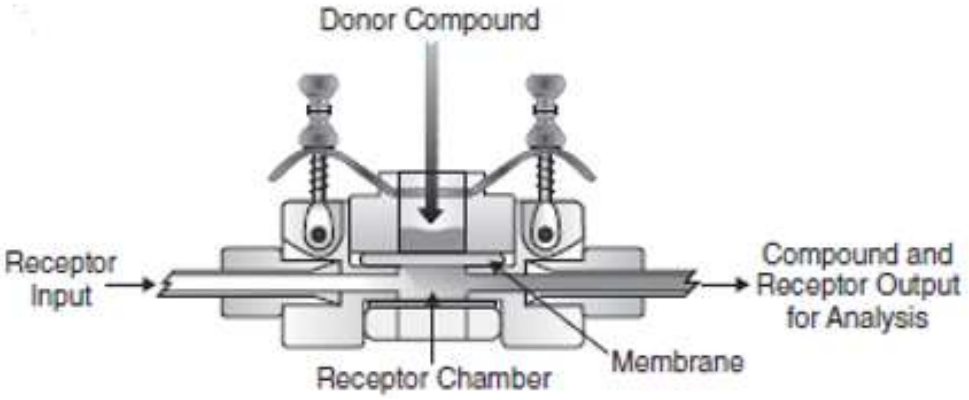
Γίνεται ακόμη προσθήκη συνδιαλυτών στο υγρό δέκτη, με στόχο την διατήρηση συνθηκών δεξαμενής καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Σύμφωνα με αυτές, σε κάθε χρονική στιγμή θα πρέπει η συγκέντρωση της ουσίας που μελετάται να μην υπερβαίνει το δέκα τις εκατό (10%) της συγκέντρωσης κορεσμού της στο διάλυμα του δέκτη. Εάν αυτή η συγκέντρωση ξεπεραστεί, η διάχυση της ουσίας αρχίζει και γίνεται αμφίδρομη, έως ότου επιτευχθεί ισορροπία ανάμεσα στα δύο διαμερίσματα. Αυτό αποφεύγεται προσθέτοντας έναν καλό διαλύτη της ουσίας στο διάλυμα δέκτη και αυξάνοντας έτσι την συγκέντρωση κορεσμού της ουσίας στο διάλυμα. Τέτοια πρόσθετα είναι αλκοόλες, όπως η αιθανόλη και η προπυλενογλυκόλη, επιφανειοδραστικά όπως polysorbate 80, αλλά και λευκώματα βόειου ορού. Η προσθήκη πρέπει να γίνεται σε τέτοιο ποσοστό ώστε να μην διακυβεύεται η ακεραιότητα του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας (Addicks et al., 1987).

Ολόκληρη η διάταξη θερμοστατείται στους 32° C, με την βοήθεια υδατόλουτρου, που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία της επιφάνειας του δέρματος του ανθρώπινου σώματος. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται διατάξεις με μεταβαλλόμενη θερμοκρασία από την εξωτερική επιφάνεια που είναι στους 32° C προς το διαμέρισμα του δέκτης που βρίσκεται στους 37° C, στην θερμοκρασία πυρήνα του ανθρώπινου σώματος (OECD, 2003), (Ehrhardt & Kim, 2008b).

Στην διάταξη τω κυττάρων Franz η δειγματοληψία γίνεται από το είδικά διαμορφωμένο άκρο, που κάνει την διάταξη να μοιάζει με το γράμμα «Y». Το διαμέρισμα του δέκτη οφείλει να βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση για την αποφυγή ανομοιομορφίας στην συγκέντρωση και άρα στη διάχυση (Gary P. Moss et al., 2015).

Τα κύτταρα Franz διακρίνονται σε στατικά (static) και συνεχούς ροής (flow through). Στα στατικά κύτταρα Franz το υγρό δέκτη ανανεώνεται χειροκίνητα, ενώ στα συνεχούς ροής η ανανέωση γίνεται από αυτόματο σύστημα αντλίας. Στα κύτταρα συνεχούς ροής προλαμβάνεται η

υποεκτίμηση της διαπέρασης λόγω εξάτμισης του υγρού δέκτη και εξασφαλίζονται οι συνθήκες δεξαμενής καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Είναι συνήθως αυτοματοποιημένα, και η συνεχής ανανέωση του υγρού δέκτη προσομοιάζει καλύτερα τις πραγματικές συνθήκες διαπέρασης. Παρολ'αυτά, εισάγονται πηγές σφαλμάτων στην διάταξη, καθώς η συνεχής ροή γυρού αποτελεί κίνδυνο σχηματισμού φυσαλίδων στην επιφάνεια της μεμβράνης, που εμποδίζουν την διάχυση, ενώ αυξάνει την πολυπλοκότητα και το κόστος του χειρισμού (Fotaki, 2011).



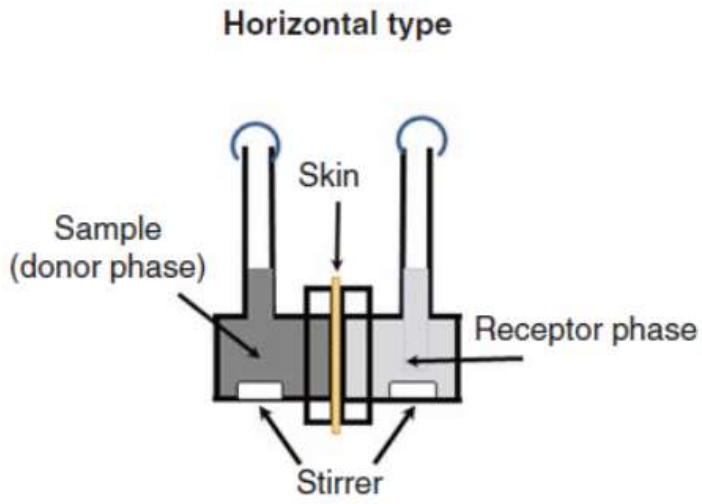
Εικόνα Α 38. Σχηματική διάταξη κυττάρων συνεχούς ροής Bronaugh (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011)

Στην διάταξη των κυττάρων Bronaugh ή συνεχούς ροής, η επιφάνεια της μεμβράνης είναι συνήθως μεγαλύτερη και η δειγματοληψία γίνεται αυτοματοποιημένα ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με την βοήθεια περισταλτικής αντλίας που ανανεώνει το σύνολο του υγρού δέκτη (Gary P. Moss et al., 2015). Σε κάποια συστήματα υπάρχει και η δυνατότητα διασύνδεσης με το αναλυτικό σύστημα, οπότε και το σύνολο της ανάλυσης αυτοματοποιείται πλήρως. Έτσι μειώνεται η ανθρώπινη παρέμβαση και η μεταβλητότητα που εισάγεται στο πείραμα από τον αναλυτή, αλλά και οι ανθρωποώρες που απαιτούνται για να ολοκληρωθεί μία ανάλυση (Bronaugh & Stewart, 1985).

Τα κύτταρα Bronaugh πλεονεκτούν στην διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, λόγω της συνεχούς εισροής νέου όγκου διαλύματος δέκτη, που βοηθά στον καλύτερο υπολογισμό διαπερατότητας δυσδιάλυτων ουσιών και προσομοιάζει καλύτερα την φυσική ροή του αίματος από και προς τον υποδόριο ιστό του σημείου εφαρμογής. Ακόμη, η ανάλυση δεν επηρεάζεται από την εξάτμιση που μειώνει τον όγκο του διαλύματος δέκτη στα κύτταρα Franz, καθώς πρόκειται για κλειστό σύστημα.(Gary P. Moss et al., 2015)

Μειονέκτημα των κυττάρων Bronaugh αποτελεί το υψηλό κόστος και η πολυπλοκότητα του αυτοματοποιημένου συστήματος. Τέλος, έχουν σημειωθεί απώλειες δόσης του δραστικού συστατικού στα εξαρτήματα του συστήματος κατά την μεταφορά του υγρού δέκτη από το κύτταρο στον ανιχνευτή (Fotaki, 2011). Για λόγους οικονομίας και απλότητας αλλά και ευελιξίας της πειραματικής διάταξης, προτιμώνται αρκετά τα στατικά κύτταρα Franz σε σχέση με τα Bronaugh (Gary P. Moss et al., 2015).

Αναφέρονται ακόμη τα κύτταρα οριζόντιας διάχυσης, όπου το διαμέρισμα το δότη βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με του δέκτη και χωρίζονται από την μεμβράνη. Η διάταξη αυτή περιορίζει τις μορφές που μπορούν να μελετηθούν, καθώς ο φορέας υπό μελέτη θα πρέπει να διαλύεται στο νερό ή άλλο διάλυμα δότη. Για αυτό οι συνθήκες μελέτης διαφέρουν αρκετά από τις πραγματικές συνθήκες χορήγησης, ενώ δεν μπορούν να μελετηθούν ημιστερεές και στερεές τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές.



Εικόνα Α 39. Οριζόντια κύτταρα διάχυσης (Daniels, 2004)

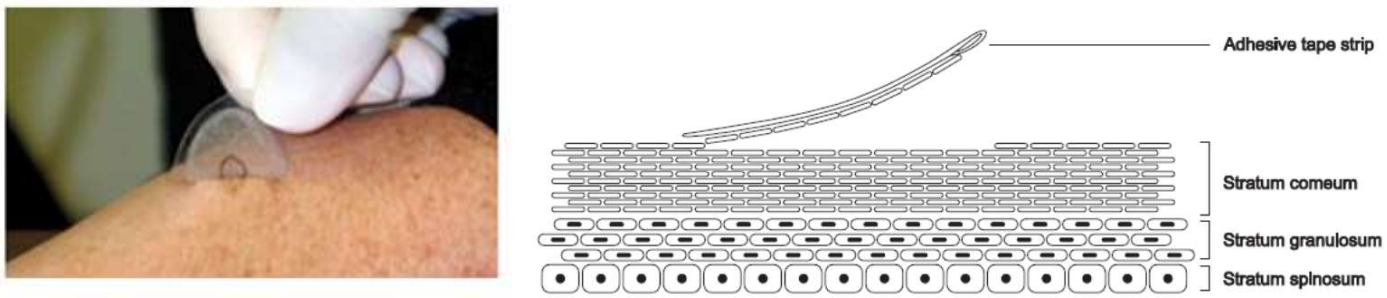
Ο τύπος αυτών των κυττάρων διάχυσης είναι ο πρώτος που χρησιμοποιήθηκε, ενώ πλέον χρησιμοποιείται μόνο για αρχικές τροχιοδεικτικές μελέτες μεγάλου όγκου νέων μορίων και ενισχυτών διαπέρασης ταυτόχρονα. Σε αυτές χρησιμοποιούνται συστάδες κυττάρων οριζόντιας διάχυσης, τα οποία είναι συνδεδεμένα με αυτόματο δειγματολήπτη σε σειρά με τον αναλυτή. Με την βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων γίνεται ταχεία συλλογή πληροφοριών για μεγάλο όγκο ουσιών, που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια και την σύνθεση νέων μορίων ενισχυτών διαπερατότητας, αλλά και φαρμακομορίων με κατάλληλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για χορήγηση από το δέρμα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

3.4.2. In vivo

Προχωρώντας σε in vivo μεθόδους υπολογισμού της διαδερμικής διαπερατότητας, ερχόμαστε πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες χορήγησης. Εισάγονται όμως και περισσότερες πηγές μεταβλητότητας στον πειραματισμό, λόγω της διατομικής μεταβλητότητας των ζώντων οργανισμών.

Τεχνική Tape Stripping

Είναι η διεργασία κατά την οποία κομμάτια συνθετικής μεμβράνης με κατάλληλο πολυμερές προσκολλητικό σύστημα, εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος για μερικά δευτερόλεπτα και αφαιρείται απότομα. Η μεμβράνη αυτή φέρει πλέον μία στοιβάδα κερατινοκυττάρων που μπορεί να εκχυλιστεί και να αναλυθεί προς μία ή περισσότερες ουσίες. Αυτή η διεργασία επαναλαμβάνεται από 10 έως 100 φορές, ανάλογα το βάθος του δέρματος που επιθυμούμε να εξετάσουμε (Dragicevic & Maibach, 2017b), (Wester & Maibach, 2005).

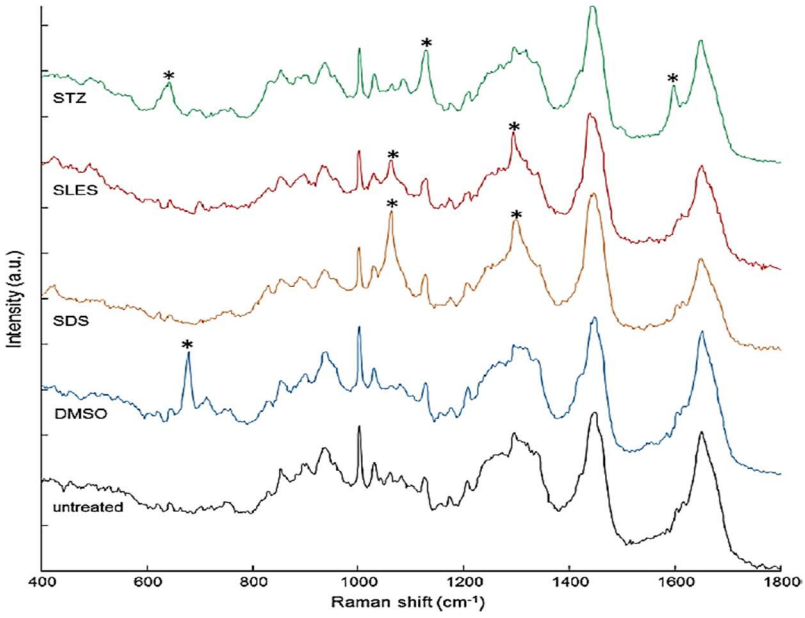


Εικόνα Α 40. Η τεχνική αποχωρισμού στοιβάδων κερατινοκυττάρων από ζώσα επιδερμίδα με τη χρήση κολλητικών ταινιών (V. P. Shah et al., 2015)

ATR- FTIR

Με την βοήθεια της φασματοσκοπίας υπέρυθρου και κατάλληλων μετατροπών Fourier στο φάσμα της, λαμβάνεται το φάσμα ATR – FTIR (Attenuated total reflection – Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Είναι η άμεση φασματοσκοπική παρατήρηση του δέρματος ενός ζώντος οργανισμού (in vivo), αλλά και ex vivo, ως προς την ποιοτική και ποσοτική του σύσταση. Η μέθοδος ανιχνεύει τις μοριακές δονήσεις των μορίων στο σύνολο του ιστού.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε την δεκαετία του 1980 για να αποσαφηνιστεί η σύσταση και ο ρόλος των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας στην διαπέραση ουσιών (Sugibayashi, 2017). Σήμερα, μελετώντας υγιές και ασθενές δέρμα εθελοντών δημιουργείται ένα φασματοσκοπικό προφίλ του δέρματος, στο οποίο παρατηρούνται διαφοροποιήσεις με την παρουσία ουσιών που δεν υπάρχουν φυσιολογικά στον ιστό. Με αυτή τη μέθοδο μελετάται η κατάσταση του δέρματος και μπορεί να προσδιοριστεί και να ποσοτικοποιηθεί η ύπαρξη ξένων ουσιών στον ιστό, σε βάθος έως 2μm, περίπου μιάμιση σειρά κερατινοκυττάρων. Σε συνδυασμό με την μέθοδο του stripping, μπορεί να υπολογιστεί εκτός από το πόση ουσία έχει διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα αλλά και σε τί βάθος έχει κατανεμηθεί.

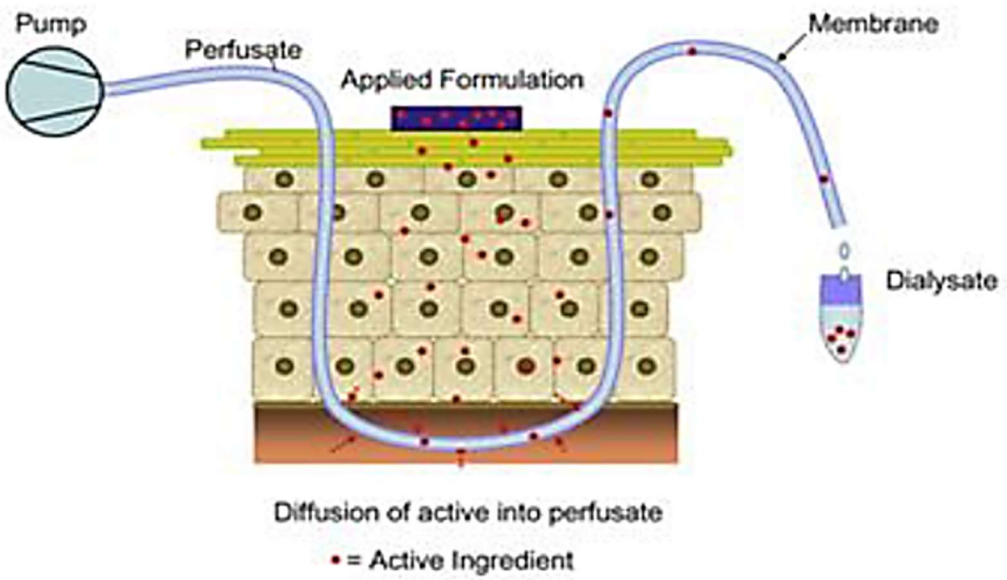


Εικόνα Α 41. Φάσμα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (ATR – FTIR) για δέρμα χοίρου μετά από χορήγηση Χημικών Ενισχυτών Διαπερατότητας που ανιχνεύονται στα φάσματα με το σύμβολο * (Binder et al., 2018)

Είναι μία οικονομική, γρήγορη μη επεμβατική και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος για την μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης αλλά και την αξιολόγηση της υγείας του δέρματος, της δομής του και της επίδρασης τοπικών μορφών σε αυτό, σε ζώντα οργανισμό και με τη μικρότερη δυνατή ενόχληση (Dragicevic & Maibach, 2017b)

Μικροδιάλυση (Microdialysis)

Λεπτός ημιπερατός σωληνίσκος εντίθεται ενδοδερμικά στο σημείο χορήγησης της διαδερμικής ή τοπικής μορφής. Η μέθοδος βασίζεται στην ανταλλαγή ουσιών μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος δέκτη με τον διακυττάριο χώρο του δέρματος. Αντλία εξασφαλίζει την συνεχή κίνηση ρυθμιστικού διαλύματος από το εσωτερικό του σωληνίσκου, το οποίο εξερχόμενο μεταφέρεται σε κατάλληλο αναλυτικό σύστημα, προς ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της μελετώμενης ουσίας. Η ροή του ρυθμιστικού ακολουθεί ρυθμό 5μL το λεπτό, ώστε να επαρκεί για να γίνεται κατανομή της ουσίας από την επιδερμίδα στο εσωτερικό του σωληνίσκου και η μάζα του διαλύτη να ανανεώνεται πριν την επίτευξη της ισορροπίας (Dragicevic & Maibach, 2017b).



Εικόνα Α 42. Η πειραματική διάταξη της Μικροδιάλυσης (Daniels, 2004)

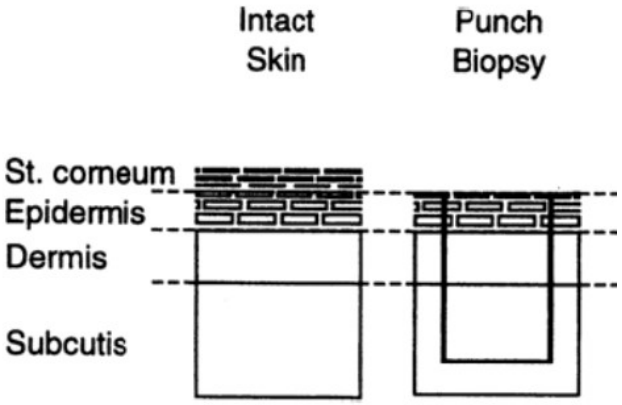
Η μέθοδος αυτή μιμείται τα τριχοειδή αγγεία του δέρματος και προσομοιάζει καλύτερα από κάθε άλλη μέθοδο την από του δέρματος απορρόφηση. Επιτρέπει ταυτόχρονο προσδιορισμό εξωγενών και ενδογενών μορίων, αλλά και την ταυτόχρονη μελέτη σκευάσματος αναφοράς και υπό μελέτη στο ίδιο άτομο, επιτρέποντας την παρατήρηση φυσιολογικών φαινομένων όπως η φλεγμονή και οι αλλεργικές αντιδράσεις και τον υπολογισμό φαρμακοδυναμικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων (K. K. Shah et al., 2012) (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Σημεία που απαιτούν προσοχή είναι ο εξαιρετικά μικρός όγκος δείγματος που απαιτεί αναλυτική μέθοδο με μεγάλη ευαισθησία και η μεταβλητότητα των δειγμάτων ανάλογα το βάθος και την ανατομική περιοχή που τοποθετείται ο σωληνίσκος (Dragicevic & Maibach, 2017a). Ακόμη δεν

είναι δυνατή η ανάλυση μορίων μεγαλύτερων των πόρων της μεμβράνης του σωληνίσκου, ενώ είναι αδύνατον να υπολογιστεί το ποσοστό της δεσμευμένης ουσίας σε πρωτεΐνες του αίματος και ιστούς (Gary P. Moss et al., 2015).

Βιοψία (Punch Biopsy)

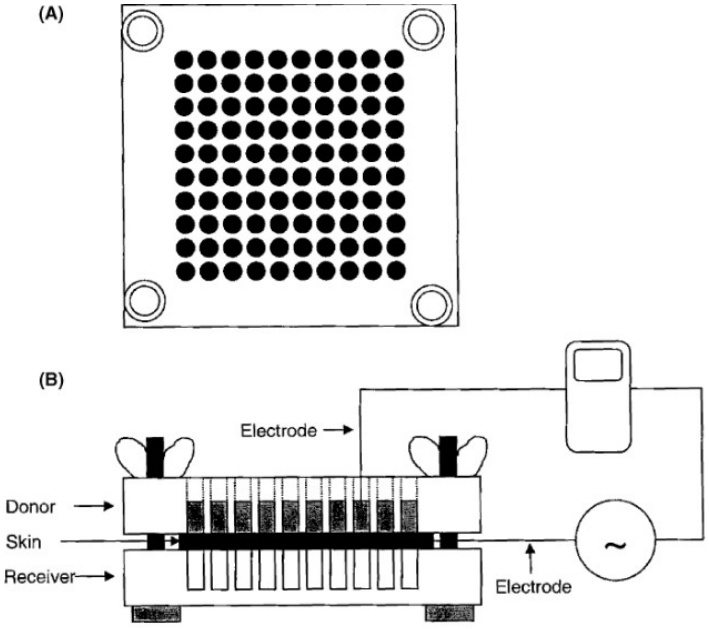
Γίνεται λήψη μικρού κυλινδρικού τμήματος του συνόλου της μάζας του δέρματος με ειδική κυλινδρική συσκευή. Αυτό στη συνέχεια υπόκειται σε κατάλληλη κατεργασία και εκχύλιση για να προσδιοριστεί η συνολική διαπέραση και δερματική κατακράτηση μίας ουσίας ύστερα από διαδερμική ή τοπική χορήγηση (Dragicevic & Maibach, 2017b), (Ghosh* et al., 2004).



Εικόνα Α 43. Το κομμάτι του δέρματος που μπορεί να ληφθεί με την μέθοδο της βιοψίας Punch (Dragicevic & Maibach, 2015)

3.4.3. In Silico

Όλες οι παραπάνω μέθοδοι μελέτης της διαδερμικής χορήγησης υστερούν στο γεγονός ότι απαιτούν συμμετοχή ανθρώπων ή/και ζώων. Στόχος της επιστημονικής κοινότητας είναι η σταδιακή μείωση του αριθμού των ζώντων οργανισμών που απασχολούνται σε αυτές τις μελέτες και κατάργηση όλων των ζωικών παραγόγων (Bernardo & Saraiva, 2008).



Εικόνα Α 44. Η συσκευή INSIGHT, μελέτης διάχυσης υψηλής απόδοσης πολλών μορίων ΧΕΔ ταυτόχρονα (Wester & Maibach, 2005)

Αυτό φαίνεται να είναι εφικτό με την ανάπτυξη κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων που βασίζονται στις συσχετίσεις in vivo – in vitro μελετών. Προγράμματα πειραματικών μελετών διαλογής, όπως το INSIGHT, που επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη ανάλυση πολύ μεγάλου πλήθους δειγμάτων, αποσκοπούν στην συλλογή μεγάλου όγκου πληροφοριών σε μικρό χρονικό διάστημα, με το μικρότερο δυνατό όγκο δειγμάτων. Στη συνέχεια, τα in vitro πειράματα βοηθούνται από την μεθοδολογία QSAR (Quantitative structure – activity relationship) και QSPR (Quantitative Structure Property Relationship) που επιτρέπει την πρόβλεψη της συμπεριφοράς φορέων και δραστικών συστατικών κατά την χορήγηση τους με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και την δομή του μορίου τους. Έτσι με μικρό αριθμό πειραμάτων μπορούμε να φτάσουμε πιο οικονομικά και πιο γρήγορα στον βέλτιστο φορέα (Karadzovska & Riviere, 2013).

Στη συνέχεια με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων και δεδομένων από μικρό αριθμό εθελοντών, αναπτύσσονται αξιόπιστα μαθηματικά μοντέλα που μπορούν να προβλέψουν την κατανομή και την διαπέραση ουσιών κατά την διαδερμική ή τοπική χορήγηση. Με την επικύρωση αυτών των μοντέλων καθίσταται πλέον περιττή η χρήση ζωικών παραγώγων ή ζωντανών οργανισμών, καθώς γνωρίζοντας τα φυσικοχημικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ουσιών προς διαπέραση, των εκδόχων του φορέα τους και των συστατικών του ανθρώπινου δέρματος, είμαστε σε θέση να προβλέψουμε επαναλήψιμα το φυσικό φαινόμενο της διαδερμικής χορήγησης (Degim, 2006).

4. ΜΟΡΦΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ – FORMULATING FOR EFFICACY®

Την υπολογιστική πρόβλεψη και χαρτογράφηση της διαδερμικής χορήγησης που αναφέρθηκε στην *παράγραφο 2.4.3 In Silico,* προσπαθεί να υλοποιήσει το υπολογιστικό πρόγραμμα Formulatig for Efficacy® (FFE). Το πρόγραμμα αυτό αναπτύχθηκε από τους ολλανδούς Johann Wiechers και Steven Abbott το 2011, με στόχο την μορφοποίηση του ιδανικού φορέα ενός δραστικού για την βελτιστοποίηση της διαδερμικής απορρόφησης και την πρόβλεψη της κατανομής του στο δέρμα και τη συστηματική κυκλοφορία (Majella E. Lane et al., 2012).

4.1. Στόχος του προγράμματος

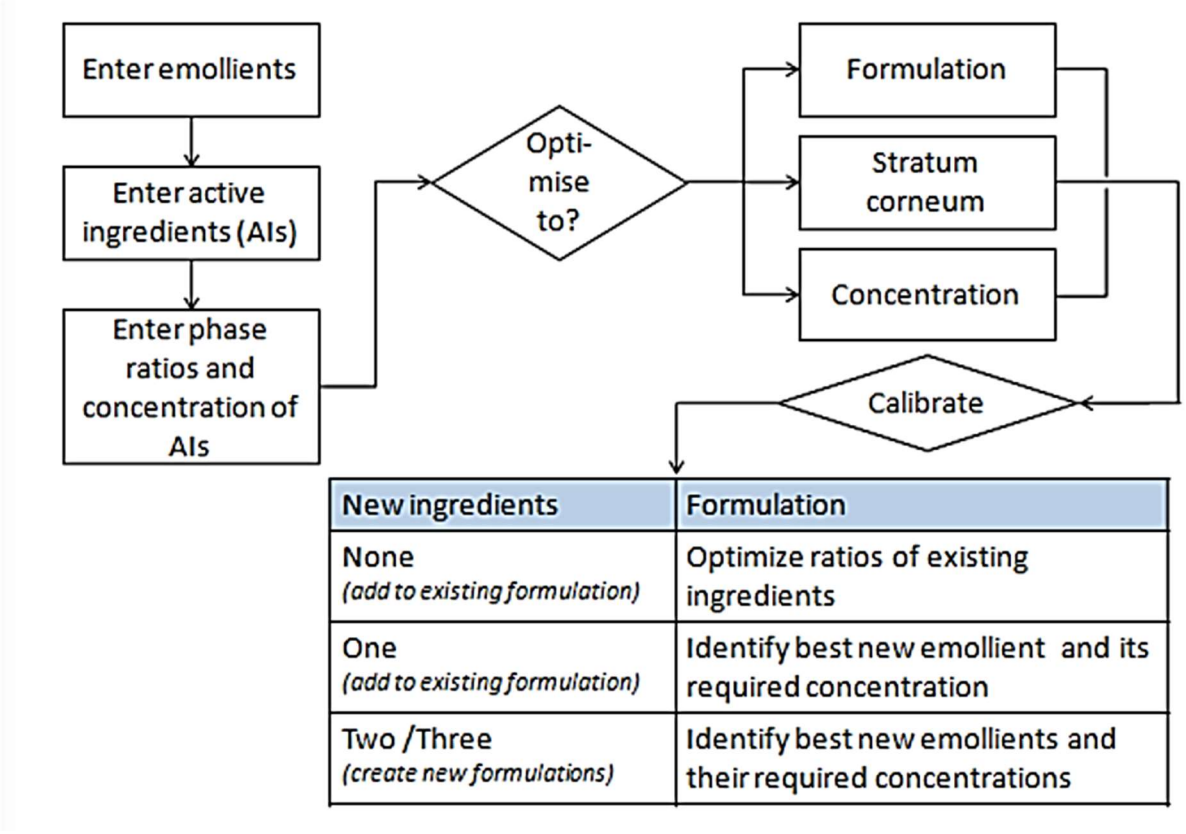
Σύμφωνα με την δημιουργό εταιρεία, το πρόγραμμα Formulating For Efficacy ® βοηθά τον επιστήμονα να επιλέξει τα κατάλληλα έκδοχα που θα διαλύσουν την ποσότητα του δραστικού του στον φορέα και θα εξασφαλίζουν την διαπέραση του από το δέρμα.

Αρχικά ορίζεται η συγκέντρωση στόχος του δραστικού συστατικού στο φορέα. Με την βοήθεια μία βιβλιοθήκης με τις παραμέτρους διαλυτότητας του δ του Hansen για μεγάλη ποικιλία εκδόχων, γίνεται η επιλογή του βέλτιστου συστήματος διαλυτών για το δραστικό συστατικό που μελετάται. Στόχος είναι η μέγιστη θερμοδυναμική ενεργότητα του δραστικού συστατικού στο φορέα, παράλληλα με την συγκέντρωση στόχο, ώστε να μεγιστοποιείται η κινητήριος δύναμη για διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας (Majella E. Lane et al., 2012).

Στην συνέχεια δίνεται η επιλογή στον σχεδιαστή της φαρμακοτεχνικής μορφής να επιλέξει να βελτιστοποιήσει την μορφή:

- Ως προς το δραστικό συστατικό
- Ως προς το δέρμα
- Ως προς την συγκέντρωση στόχο

Τέλος, το πρόγραμμα μπορεί να προσομοιώσει τα αποτελέσματα της μελέτης διάχυσης με ανθρώπινο δέρμα για το κάθε βέλτιστο της φαρμακοτεχνικής μορφής που μελετάται και να προβλέψει για το δραστικό συστατικό αλλά και κάθε έκδοχο του φορέα, τον ρυθμό διαπέρασης ανά μονάδα επιφάνειας σε βάθος εικοσιτετράωρου και την κατανομή στην κεράτινη στοιβάδα και στην αιματική κυκλοφορία.



Εικόνα Α 45. Ο τρόπος λειτουργίας του FFE (https://www.jwsolutionssoftware.com)

Το πρόγραμμα αυτό αναπτύχθηκε για να βοηθήσει τον επιστήμονα να συνδυάσει μεγάλο όγκο πληροφοριών για να επιτύχει τον στόχο της φαρμακοτεχνικής μορφής πιο γρήγορα και αποτελεσματικά, με μικρότερο αριθμό προκλινικών in vitro και in vivo μελετών. Η διεπιφάνεια του προγράμματος επιτρέπει στον επιστήμονα να παρέμβει και να αλλάξει την προτεινόμενη ποιοτική και ποσοτική σύσταση του φορέα, καθώς η επιστημονική εμπειρία είναι απαραίτητη. Με την βοήθεια της προσομοίωσης μπορεί να διαβλέψει την απόδοση των αλλαγών αυτών. Δίνεται έτσι στον επιστήμονα η δυνατότητα πρόβλεψης των αποτελεσμάτων μεγάλου αριθμού πειραμάτων και η ευκαιρία εξοικονόμησης πολλών πόρων και ανθρωποωρών (Burger et al., 2015).

4.2. Παράμετροι Διαλυτότητας Hansen

Το θεμέλιο φυσικό μέγεθος του προγράμματος είναι οι παράμετροι διαλυτότητας Hansen, που ορίστηκαν από τον δανό Charles M.Hansen το 1967, σε μία προσπάθειά του να προβλέψει τον τρόπο με τον οποίο συγκρατούνται οι διαλύτες σε λεπτά υμένια πολυμερών με βάση την μεταξύ τους συγγένεια. Η προσπάθεια του δεν ευόδωσε, αλλά μέσα από αυτήν αναπτύχθηκαν οι παράμετροι διαλυτότητας που χρησιμοποιούνται έκτοτε από την επιστημονική κοινότητα για την συστηματική μελέτη και συσχέτιση θερμοδυναμικής αλληλεπίδρασης διαλυτών και άλλων υλικών (Hansen, 1998).

Ως παράμετροι διαλυτότητας Hansen ορίζονται:

- **δ_D,** η ενέργεια που απορρέει τις δυνάμεις διασποράς που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων του διαλυόμενου συστατικού και του διαλύτη
- **δ_H**, η ενέργεια των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ μορίων διαλυόμενου συστατικού και διαλύτη
- **δ_P**, η πολική διαμοριακή δύναμη που αναπτύσσεται μεταξύ μορίων σε ένα διάλυμα

Η διάλυση ενός συστατικού σε ένα διαλύτη είναι μία διαδικασία κατά την οποία αυξάνεται η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Το άθροισμα των ενεργειών που χαρακτηρίζονται από τις παραπάνω σταθερές μας δίνει την μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια συστήματος που συμβαίνει κατά τη διάλυση ενός μορίου σε ένα διαλύτη (Hansen, 1998).

$$\Delta G = E_D + E_P + E_H$$

Εξίσωση 11. Το άθροισμα των παραμέτρων διαλυτότητας ισούται με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας συστήματος κατά τη διάλυση (Hansen, 1998)

Το 2009 οι Van Krevelen και Nijenhuis την τρισδιάστατη παράμετρο διαλυτότητας δ. Αυτή μετατρέπει την πληροφορία των τριών διαστάσεων (δ_D,δ_H, δ_P) που δεν είναι εύκολα επεξεργάσιμη από τον ανθρώπινο νου, σε δυσδιάστατη (δα , δν) πληροφορία και στη συνέχεια σε μονοδιάστατη (δ), επιτρέποντας στον ερευνητή να πραγματοποιεί συγκρίσεις πιο γρήγορα και εύκολα (Van Krevelen & Te Nijenhuis, 2009).

Αρχικά ορίζονται :

$$\delta_\alpha = \sqrt{\delta_P^2 + \delta_H^2}$$

Εξίσωση 12. Η παράμετρος που περιγράφει την συμπεριφορά του μορίου κατά τη διάλυση, που οφείλεται σε δεσμούς διπόλου - διπόλου και δεσμούς υδρογόνου, που αναπτύσσονται με τον διαλύτη (Hansen, 1998)

$$\delta_V = \sqrt{\delta_D^2 + \delta_P^2}$$

Εξίσωση 13. Η παράμετρος που περιγράφει την πυκνότητα ενέργειας συνοχής του συστήματος (Van Krevelen & Te Nijenhuis, 2009)

Πρόκειται για δύο σταθερές που επιτρέπουν στον επιστήμονα να πραγματοποιεί συγκρίσεις σε δύο διαστάσεις, χωρίς να χάνει μεγάλο μέρος της πληροφορίας που θα του έδιναν οι τρείς επιμέρους παράμετροι.

Στη συνέχεια ορίζεται η δ [$cal^{1/2}/cm^{3/2}$] ως:

$$\delta^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2$$

Εξίσωση 14. Η τρισδιάστατη παράμετρος διαλυτότητας (Van Krevelen & Te Nijenhuis, 2009)

Συνεπώς η τρισδιάστατη παράμετρος διαλυτότητας δ ισοδυναμεί με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τριών επιμέρους παραμέτρων διαλυτότητας. Ένα μέρος της πληροφορίας ενδέχεται να χαθεί κατά τη σύγκριση, αλλά είναι ένας τρόπος να επιταχυνθεί η σύγκριση μεταξύ διαλυτών και στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν οι επιμέρους παράμετροι για περαιτέρω σύγκριση.

Για μείγμα διαλυτών η δ υπολογίζεται ως:

$$\delta_{mixture} = \sum(\varphi_1 \times \delta_1) + \cdots + (\varphi_n \times \delta_n)$$

Εξίσωση 15. Η παράμετρος διαλυτότητας μείγματος διαλυτών (Duszyńska-Krupa, 2015)

Όπου :

φ_χ το κλάσμα του διαλύτη που συμμετέχει στο σύνολο του μείγματος

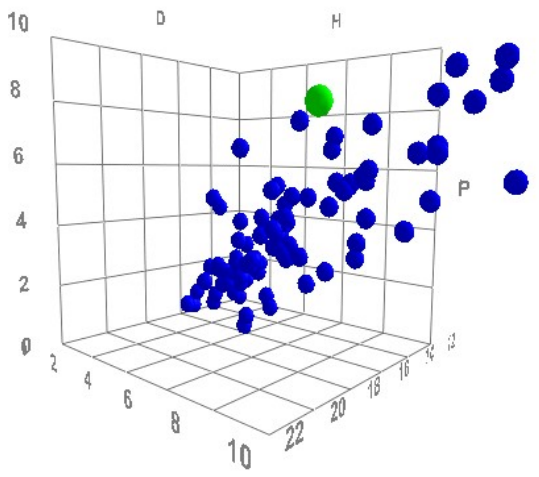
δ_χ η τρισδιάστατη παράμετρος διαλυτότητας του διαλύτη

Ένας άλλος τρόπος να μην χαθεί πληροφορία με τη χρήση της παραμέτρου δ, είναι η χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων όπως το FFE.

Οι δημιουργοί του προγράμματος, χρησιμοποιώντας μία βιβλιοθήκη δεδομένων διαλυτότητας για πληθώρα διαλυτών και δραστικών συστατικών, τοποθετούν σε χώρο τριών διαστάσεων το κάθε συστατικό ή μείγμα αυτών, ώστε να διευκολύνεται η σύγκριση τους.

Αυτό είναι εφικτό χάρη στην μελέτη του ….. που υπολόγισε πειραματικά τις παραμέτρους διαλυτότητας δ της κεράτινης στοιβάδας, μελετώντας τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με τους πιο κοινούς διαλύτες. Έτσι βρέθηκε ότι η κεράτινη στοιβάδα, που είναι ένα πολύπλοκο μείγμα συστατικών, συμπεριφέρεται κατά την επαφή της με άλλα μόρια σαν την 1 – βουτανόλη (Scheuplein & Blank, 1973).

Στον τρισδιάστατο χώρο φαίνεται ως εξής, μαζί με άλλα έκδοχα φαρμακοτεχνικών μορφών:



Εικόνα Α 46. Η κεράτινη στοιβάδα στον τρισδιάστατο χώρο των παραμέτρων διαλυτότητας ως έκδοχο (ανοιχτό πράσινο) (FFE, https://www.jwsolutionssoftware.com/)

Τοποθετώντας την κεράτινη στοιβάδα στον ίδιο χώρο με τα έκδοχα και τα δραστικά συστατικά προς διαπέραση, μπορούμε πλέον να ανιχνεύουμε πιο άμεσα τα κατάλληλα έκδοχα που θα αυξήσουν την διαδερμική απορρόφηση του δραστικού συστατικού.

Οι παράμετροι διαλυτότητας της κεράτινης στοιβάδας είναι : $\boldsymbol{\delta_h}$ **=** 8, $\boldsymbol{\delta_p}$ **=** 8, $\boldsymbol{\delta_d}$ **=** 17 , και ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/ νερού (δείκτης πολικότητας μορίου) είναι $\log K_{octanol/water}$ = 0,88 (Scheuplein & Blank, 1973).

4.3. Δείκτης Σχετικής Πολικότητας – Relative Polarity Index

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, σύμφωνα με τον πρώτο νόμο του Fick, κινητήριος δύναμη για την διαδερμική απορρόφηση μίας ουσίας είναι η διαφορά συγκέντρωσης στα δύο διαμερίσματα, άρα η συγκέντρωση του δραστικού στο φορέα. Καλούμαστε να επιλέξουμε έναν καλό διαλύτη του δραστικού συστατικού που θα μεγιστοποιήσει την συγκέντρωση του δραστικού στο φορέα, τον κύριο διαλύτη.

Στη συνέχεια βλέπουμε πώς αυξάνοντας την διαλυτότητα κορεσμού του δραστικού στον φορέα, μειώνεται η ο ρυθμός κατανομής του δραστικού από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα, καθώς η σταθερά κατανομής του δραστικού από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα είναι πολύ χαμηλή (Majella E. Lane et al., 2012).

Αυτό εξισορροπείται με την προσθήκη ενός δευτερεύοντος διαλύτη ο οποίος δεν είναι τόσο καλός διαλύτης του δραστικού συστατικού. Στόχος είναι η μείωση όχι της συγκέντρωσης του δραστικού στο φορέα, αλλά η μείωση της απόστασης της συγκέντρωσης αυτής από την διαλυτότητα κορεσμού της στο σύστημα διαλυτών του φορέα. Έτσι αυξάνεται η ενεργότητα του δραστικού στον φορέα, αυξάνεται δηλαδή η σταθερά κατανομής του δραστικού από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα και η τάση του δραστικού να φύγει από τον φορέα (J. W. Wiechers et al., 2004b).

Στη επιλογή αυτού του συστήματος διαλυτών χρησιμοποιείται ο δείκτης σχετικής πολικότητας (Relative Polarity Index, RPI). Ο δείκτης RPI αποτελεί έναν τρόπο σύγκρισης της πολικότητας του φορέα και των επιμέρους εκδόχων με αυτήν της κεράτινης στοιβάδας. Όπως ορίστηκε στην

προηγούμενη παράγραφο, η κεράτινη στοιβάδα μπορεί να θεωρηθεί ως έκδοχο με $logK_{octanol/water}$ = 0,88 (Majella E. Lane et al., 2012).

Για να υπολογιστεί ο RPI ενός φορέα υπό διερεύνηση απαιτούνται ο συντελεστής πολικότητας του δραστικού συστατικού, του φορέα και της κεράτινης στοιβάδας. Για διφασικά συστήματα διασποράς, ως φορέας λογίζεται η φάση του συστήματος στην οποία είναι διαλυμένο το δραστικό συστατικό (Johann W. Wiechers, 2005).

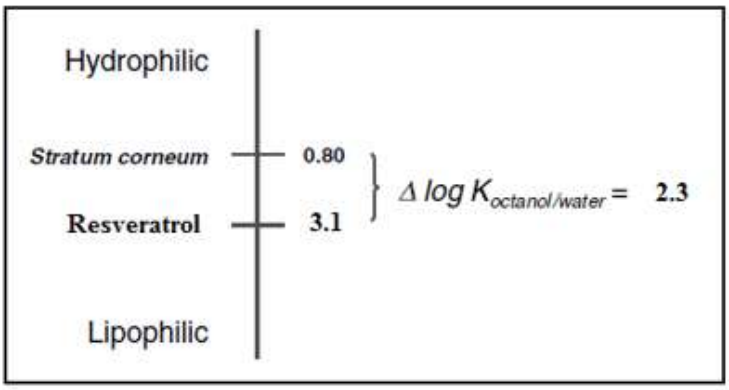
Το πρώτο βήμα για τον υπολογισμό του RPI είναι ο υπολογισμός της απόστασης της απόστασης ή διαφοράς πολικότητας του δραστικού συστατικού προς διαπέρασης από την κεράτινη στοιβάδα. Αυτή η διαφορά ονομάζεται Penetrant Polarity Gap (PPG) και ορίζεται ως:

$$PPG = Polarity\ Penetrant - Polarity\ Stratum\ Corneum$$

Εξίσωση 16.Υπολογισμός διαφοράς πολικότητας δραστικού συστατικού και κεράτινης στοιβάδας

Ας πάρουμε για παράδειγμα τη Ρεσβερατρόλη. Η ρεσβερατρόλη έχει ένα συντελεστή πολικότητας $logK_{octanol/water}$ = 3.1.

Άρα $PPG_{(RSV-SC)} = 3.1 - 0.8 = 2.3$



Εικόνα Α 47. Η απόσταση της πολικότητας της Ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα (παραλλαγή από Wiechers et al., 2004b)

Στη συνέχεια, σύμφωνα με τον Wiechers, η πολικότητα του φορέα του δραστικού συστατικού θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να διαφέρει από το δραστικό συστατικό κατά PPG για να μπορέσει τουλάχιστον το 50% της ποσότητας του δραστικού συστατικού να διαπεράσει την κεράτινη στοιβάδα (J. W. Wiechers et al., 2004a).

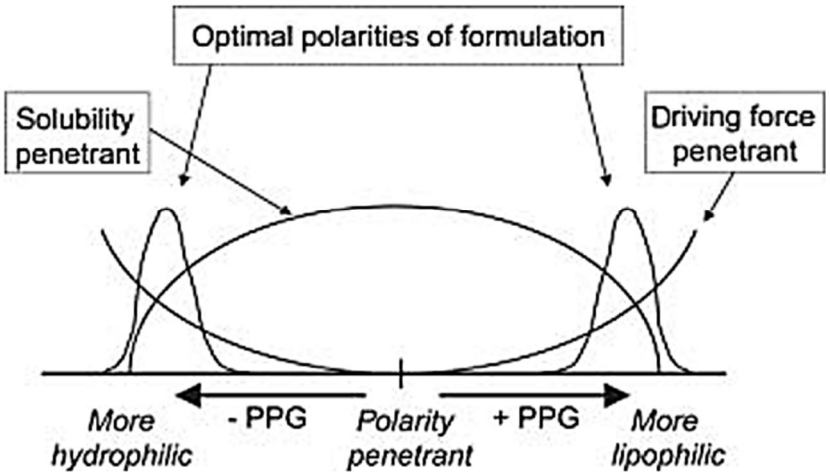
Δηλαδή, θα πρέπει :

FORMULATION POLARITY - PENETRANT POLARITY = PPG

ή

FORMULATION POLARITY + PENETRANT POLARITY = PPG

Διακρίνονται έτσι δύο μέγιστα διαπέρασης στο διαγράμμα διαπέρασης προς πολικότητα φορέα, όπως φαίνονται παρακάτω.



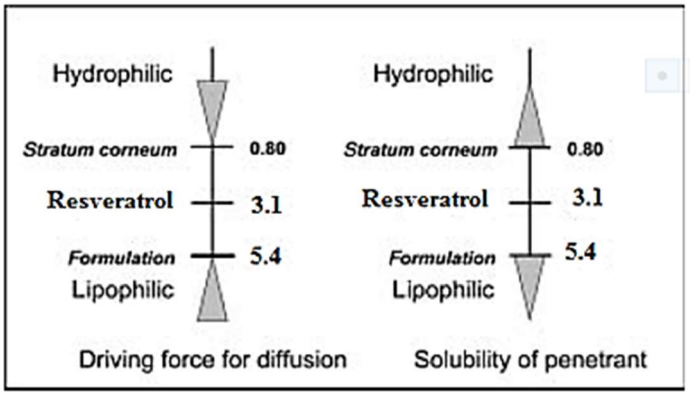
Εικόνα Α 48. Οι δύο βέλτιστες τιμές πολικότητας του φορέα συναρτήσει της διαλυτότητας και της θερμοδυναμικής ενεργότητας (J. W. Wiechers et al., 2004b)

Άρα για την Ρεσβερατρόλη, η πολικότητα του φορέα θα πρέπει να είναι είτε :

- FORMULATION POLARITY = 3.1+2.3 = 5.4

ή

- FORMULATION POLARITY = 3.1 - 2.3 = 0,8



Εικόνα Α 49. Οι βέλτιστες τιμές πολικότητας του φορέα της ρεσβερατρόλης και πώς οι μεταβολές του επηρεάζουν την κινητήριο δύναμη διάχυσης και την διαλυτότητα του δραστικού συστατικού στο φορέα (J. W. Wiechers et al., 2004b)

Σε αυτές τις τιμές ο φορέας επιτυγχάνει βέλτιστη διαλυτότητα του δραστικού συστατικού, σε συνδυασμό με τη βέλτιστη θερμοδυναμική ενεργότητα του μορίου. Εξασφαλίζεται έτσι η μέγιστη κινητήριος δύναμη διαπέρασης της κεράτινης στοιβάδας.

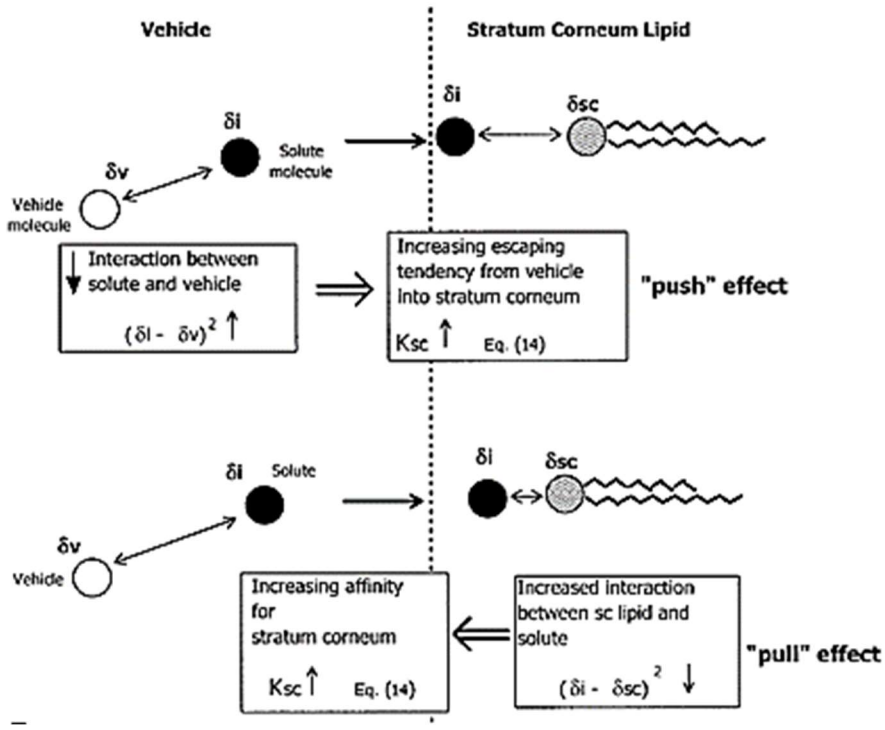
Όσο απομακρύνονται οι τιμές της πολικότητας του φορέα από αυτές τις τιμές και προς το +∞ ή -∞τόσο αυξάνεται η θερμοδυναμική ενεργότητα, εις βάρος όμως της συγκέντρωσης που μπορεί

πλέον να διαλυθεί στον φορέα, άρα εις βάρος της δόσης του δραστικού στον φορέα. Για τιμές πολικότητας του φορέας που ανήκουν στο διάστημα (0,8,5,4) η διαλυτότητα του δραστικού συστατικού στο φορέα είναι ικανοποιητική αλλά η θερμοδυναμική ενεργότητα πολύ μικρή για να μπορέσει το δραστικό να διαφύγει του φορέα.

4.4. Σχεδιασμός Βέλτιστου Φορέα

Προχωρώντας λοιπόν στην μορφοποίηση του βέλτιστου φορέα καλούμαστε να διαλέξουμε σύστημα διαλυτών για το δραστικό συστατικό.

Ο κύριος διαλύτης θα έχει συντελεστή πολικότητας $\log K_{octanol/water}$ σχεδόν όμοιο με του δραστικού συστατικού. Ο δευτερεύον διαλύτης θα πρέπει να είναι μειγνυόμενος με τον κύριο διαλύτη και να έχει συντελεστή πολικότητας όσο το δυνατόν πιο κοντά σε αυτόν της κεράτινης στοιβάδας. Η μεταξύ τους αναλογία θα πρέπει να δίνει ένα μείγμα τέτοιο ώστε η πολικότητα του φορέα να είναι σε ένα από τα δυο μέγιστα που περιγράφησαν στην προηγούμενη παράγραφο και η συγκέντρωση του δραστικού συστατικού να είναι ίση με το 90% της συγκέντρωσης κορεσμού στο συγκεκριμένο μείγμα διαλυτών. Έτσι επιτυγχάνεται βέλτιστη πολικότητα και βέλτιστη θερμοδυναμική ενεργότητα (Otto et al., 2009), (Abbott, 2012).



Εικόνα Α 50. Το φαινόμενο έλξης- ώθησης (push - pull effect) κατά το οποίο η διαπέραση ενός συστατικού εξαρτάται από την κατανομή του από τον φορέα στην κεράτινη στοιβάδα και από την πολική συγγένεια του με αυτήν (Walters, 2002)

Αυτή είναι κ η διεργασία που ακολουθεί ο αλγόριθμος του προγράμματος FFE. Το πρόγραμμα εξετάζοντας τη βιβλιοθήκη δεδομένων του, προτείνει συστήματα διαλυτών με κατάλληλη ποιοτική και ποσοτική σύσταση ανάλογα με το στόχο που έχει θέσει ο ερευνητής.

Ο στόχος που θέτει ο ερευνητής στο πρόγραμμα εξαρτάται από το περιοριστικό βήμα κατά την μορφοποίηση, τον δυσκολότερο δηλαδή παράγοντα να ενσωματωθεί στην διαδερμική χορήγηση (Johann W. Wiechers, 2005).

4.4.1. Βελτιστοποίηση ως προς το δραστικό συστατικό

Σε περιπτώσεις που μεγαλύτερη προτεραιότητα είναι να καταφέρουμε να ενσωματώσουμε το δραστικό συστατικό στον φορέα, για παράδειγμα εάν πρόκειται για ένα δυσδιάλυτο συστατικό, θέτουμε ως στόχο στο πρόγραμμα την βελτιστοποίηση ως προς το δραστικό συστατικό. Έτσι το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη του στην επιλογή της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του συστήματος διαλυτών την απόσταση της πολικότητας του φορέα από την πολικότητα του δραστικού συστατικού (Burger et al., 2015). Αυτό ορίζεται ως εξής:

$$\textbf{AFG (Active Formulation Gap)} = \log K_{octanol/water}\ \textbf{Active} - \log K_{octanol/water}\ \textbf{Formulation}$$

Ο δείκτης AFG λαμβάνει υπόψη του και τις HSP τιμές και δίνει μία τιμή αντίστοιχη με αυτή της τρισδιάστατης παραμέτρου διαλυτότητας δ. Σε αυτήν την περίπτωση, θέλουμε οι τιμές των παραμέτρων διαλυτότητας Hansen του φορέα να πλησιάζουν αυτές του δραστικού συστατικού.

Σε αυτήν την περίπτωση βελτιστοποίησης, σεβόμενοι τους προηγούμενους περιορισμούς πολικότητας για την μεγιστοποίηση της διαπέρασης, θέλουμε ο δείκτης AFG να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος και να τείνει στο μηδέν. Επισημαίνεται ότι όσο μικραίνει η τιμή του AFG τόσο το δραστικό συστατικό προτιμά να παραμείνει στον φορέα και να μην κατανεμηθεί στην κεράτινη στοιβάδα, γεγονός που εμποδίζει τη διάχυση.

4.4.2. Βελτιστοποίηση ως προς το δέρμα

Στην περίπτωση που έχουμε επιλέξει να μορφοποιήσουμε ένα συστατικό ή μία φαρμακοτεχνική μορφή η οποία δεν εμφανίζει καλή συγγένεια με την κεράτινη στοιβάδα, προτεραιότητα μας είναι να βελτιστοποιήσουμε ως προς το δέρμα (Burger et al., 2015). Χρησιμοποιείται εδώ από το πρόγραμμα ο δείκτης

$$\textbf{SFG (Skin Formulation Gap)} = \log K_{octanol/water}\ \textbf{Skin} - \log K_{octanol/water}\ \textbf{Formulation}$$

Πρόκειται για την απόλυτη διαφορά πολικότητας του φορέα από την κεράτινη στοιβάδα. Όσο μειώνεται αυτή η διαφορά, τόσο πιο εύκολα αλληλεπιδρά ο φορέας με την κεράτινη στοιβάδα και μπορεί να ανταλλάξει συστατικά με αυτή.

Ο δείκτης SFG λαμβάνει υπόψη του και τις HSP τιμές και δίνει μία τιμή αντίστοιχη με αυτή της τρισδιάστατης παραμέτρου διαλυτότητας δ. Σε αυτήν την περίπτωση, θέλουμε οι τιμές των παραμέτρων διαλυτότητας Hansen του φορέα να πλησιάζουν αυτές της κεράτινης στοιβάδας.

Σε αυτήν την λειτουργία, δίνεται η εντολή στο πρόγραμμα, τηρώντας τους προηγούμενους περιορισμούς από τις αρχικές βέλτιστες τιμές πολικότητας, να επιλέξει την κατάλληλη αναλογία ή

ποιοτική σύσταση του μείγματος των διαλυτών, ώστε ο δείκτης SFG της απόστασης του φορέα από το δέρμα να είναι όσο το δυνατόν μικρότερος και να τείνει στο μηδέν. Επισημαίνεται ότι όσο μειώνεται η τιμή του SFG, τόσο το αυξάνεται η πολική συγγένεια του φορέα με την κεράτινη στοιβάδα, με κίνδυνο να μειώνεται η διαλυτότητα του δραστικού συστατικού στο φορέα, εάν αυτό είναι πολικό.

4.4.3. Βελτιστοποίηση προς συγκέντρωση – στόχο

Η τρίτη επιλογή που δίνεται στον ερευνητή από το πρόγραμμα είναι η βελτιστοποίηση προς μία συγκέντρωση στόχο. Αυτή η εντολή δίνεται στο πρόγραμμα συνήθως αφού έχει υπολογιστεί η ποιοτική σύσταση το φορέα και αλλάζει την αναλογία μεταξύ των διαλυτών για να επιτρέψει την αύξηση της διαλυτότητας κορεσμού του δραστικού συστατικού σε αυτό το σύστημα ώστε να καταστεί δυνατή η διάλυση του στην συγκέντρωση που έχουμε θέσει ως στόχο.

Επισημαίνεται εδώ ότι η συγκέντρωση στόχος δεν συνιστάται να είναι μεγαλύτερη του 90% της συγκέντρωσης κορεσμού του συστήματος διαλυτών γιατί ενέχει ο κίνδυνος καθίζησης του δραστικού. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, μη διαλυμένο δραστικό συστατικό δεν είναι διαθέσιμο προς διαπέραση (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο ιδανικός φορέας θα πρέπει να παίρνει τέτοιες τιμές AFG και SFG, ώστε το πηλίκο του να είναι κοντά στη μονάδα. Αυτό σημαίνει ότι τα χαρακτηριστικά του φορέα που βελτιώνουν την διαλυτότητα του δραστικού συστατικού σε αυτόν είναι σε ισορροπία με αυτά που τον ωθούν να κατανεμηθεί στην κεράτινη στοιβάδα (Otto et al., 2009).

4.4.4. Αξιολόγηση του βελτιστοποιημένου φορέα

Ύστερα από όποια επιλογή βελτιστοποίησης ακολουθήσει ο ερευνητής, το πρόγραμμα παρέχει τη δυνατότητα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του φορέα που μόλις σχεδιάστηκε, προσομοιώνοντας τα αποτελέσματα ενός in vitro πειράματος διάχυσης. Παρουσιάζονται σε γράφημα επι τις εκατό περιεκτικότητας προς το χρόνο, η μείωση των εκδόχων και του δραστικού συστατικού στο διαμέρισμα του δότη, ενώ γίνεται πρόβλεψη και του ποσοστού του δραστικού συστατικού που θα παραμείνει στον φορέα, που θα κατακρατηθεί από την κεράτινη στοιβάδα και που θα την διαπεράσει με κατεύθυνση την συστηματική κυκλοφορία.

Ανάλογα με το σημείο δράσης της φαρμακοτεχνικής μορφής που σχεδιάζουμε μπορούμε να κρίνουμε αν η βελτιστοποίηση είναι επιτυχημένη ή όχι. Αν πρόκειται για τοπικό φάρμακο η κατακράτηση από την κεράτινη στοιβάδα είναι θεμιτή. Αν πρόκειται για διαδερμική φαρμακοτεχνική μορφή, στόχος είναι η μεγιστοποίηση της διαπέρασης με την ελάχιστη ποσότητα να παραμένει στον φορέα και στην κεράτινη στοιβάδα (H. A. E. Benson & Watkinson, 2011).

Το πρόγραμμα παρέχει την δυνατότητα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας του σχεδιαζόμενου φορέα, με την χρήση του δείκτη SDG (Skin Delivery Gap). Πρόκειται για την

διαφορά της υπολογισθείσας ποσότητας που διαπέρασε την κεράτινη στοιβάδα (LTC, Local Tissue Concentration) από την ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται στον ιστό για να επιτευχθεί φαρμακολογικό αποτέλεσμα (MEC, Minimum Effective Dose). Αυτός ο δείκτης θέλουμε να τείνει στο μηδέν (Burger et al., 2015).

5. ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

5.1. Εισαγωγή

Τα μικρογαλακτώματα εμφανίστηκαν πρώτη φόρα στη βιβλιογραφία το 1943 από τους Hoar και Schulman, οι οποίοι παρατήρησαν την μετατροπή ενός μακρογαλακτώματος από λευκό σε διαυγές με την προσθήκη ενός συνεπιφανειοδραστικού (Hoar & Schulman, 1943). Ορισμός σε αυτά τα συστήματα δόθηκα μία δεκαετία αργότερα από τον Winsor το 1954, ο οποίος τα κατέταξε σε τύπους ανάλογα με την σύσταση και την αρχιτεκτονική των δομών τους (Stubenrauch, 2009).

Ένας από τους πιο ακριβείς ορισμούς των μικρογαλακτωμάτων έχει δοθεί από τους Danielsson και Lindman: « Το μικρογαλάκτωμα είναι ένα σύστημα ελαίου, νερού και ενός αμφίφιλου μορίου το οποίο είναι ένα ενιαίο, οπτικά ισοτροπικό και θερμοδυναμικά σταθερό υγρό διάλυμα» (Lindman & Stubenrauch, 2009)

Ελλείψει κατάλληλων τεχνικών για τον χαρακτηρισμό και την πλήρη κατανόηση τους, δεν εμφανίζονται εκτενείς αναφορές στη βιβλιογραφία μέχρι την δεκαετία του 1980. Τότε με τη βοήθεια νέων για την εποχή τεχνικών φασματοσκοπίας και συστηματικής μελέτης, ξεκίνησε ο πλήρης χαρακτηρισμός τους και η σταδιακή αξιοποίηση τους (Fanun, 2009). Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί κατακόρυφα ο αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν την χρήση τους πλέον στην βιομηχανία καυσίμων, την απορρύπανση του περιβάλλοντος, την βιοτεχνολογία, την χημεία τροφίμων, την φαρμακευτική και την κοσμητολογία (McClements & Rao, 2011).

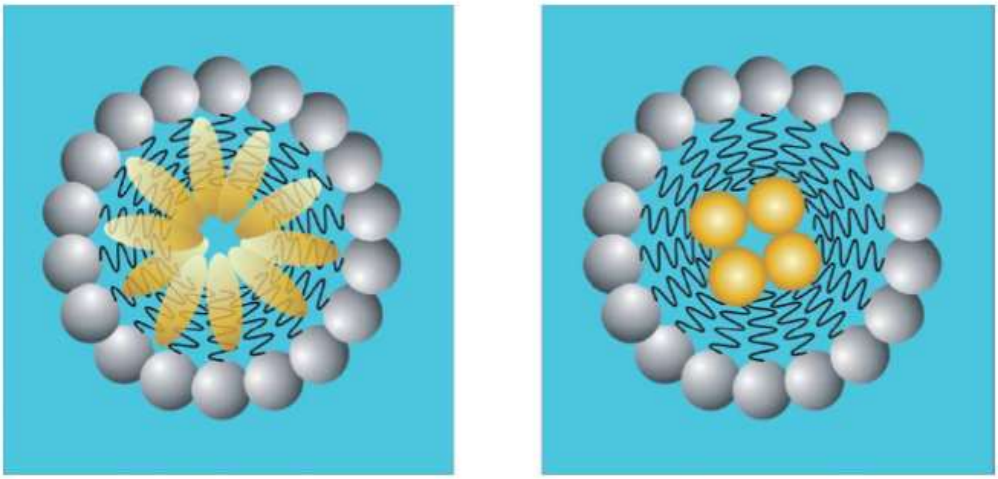
Ως μικρογαλακτώματα ορίζονται τα θερμοδυναμικά σταθερά, υγρά, ισότροπα και οπτικά διαυγή κολλοειδή συστήματα που σχηματίζονται αυθόρμητα από μία οργανική και μία υδατική φάση, μη μειγνυόμενες μεταξύ τους, με την βοήθεια κατάλληλου συστήματος επιφανειοδραστικών (επιφανειοδραστικό και συνεπιφανειοδραστικό) και στις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (McClements & Rao, 2011). Η βιβλιογραφία τα ονομάζει μικρογαλακτώματα, καθώς η πρώτη τους παρατήρηση έδειχνε να ανήκουν στα συστήματα διασποράς των γαλακτωμάτων. Στην πραγματικότητα πρόκειται για μία ξεχωριστή τάξη διαλυμάτων που φέρουν τις δομές που σχηματίζουν τα συστήματα επιφανειοδραστικών κατά την αυτοοργάνωσή τους (Donnely & Singh, 2015).

Πιο συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του είναι αυθόρμητος καθώς οφείλουν την ύπαρξη τους σε ένα κατώτατο ελεύθερης ενέργειας συστήματος στο οποίο η επιφανειακή τάση των δομών που σχηματίζονται από το σύστημα των επιφανειοδραστικών είναι μικρότερη από αυτήν των δύο διαχωρισμένων φάσεων. Αυτό συμβαίνει για συγκεκριμένη αναλογία οργανικής, υδατικής φάσης και συστήματος επιφανειοδραστικών, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η αναλογία των φάσεων είναι μοναδική για κάθε διαφορετική ποιοτική σύσταση συστήματος (McClements, 2012).

5.1.1. Χαρακτηριστικά Μικρογαλακτωμάτων

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί η χρήση των μικρογαλακτωμάτων στην φαρμακευτική και στην κοσμητολογία καθώς εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα:

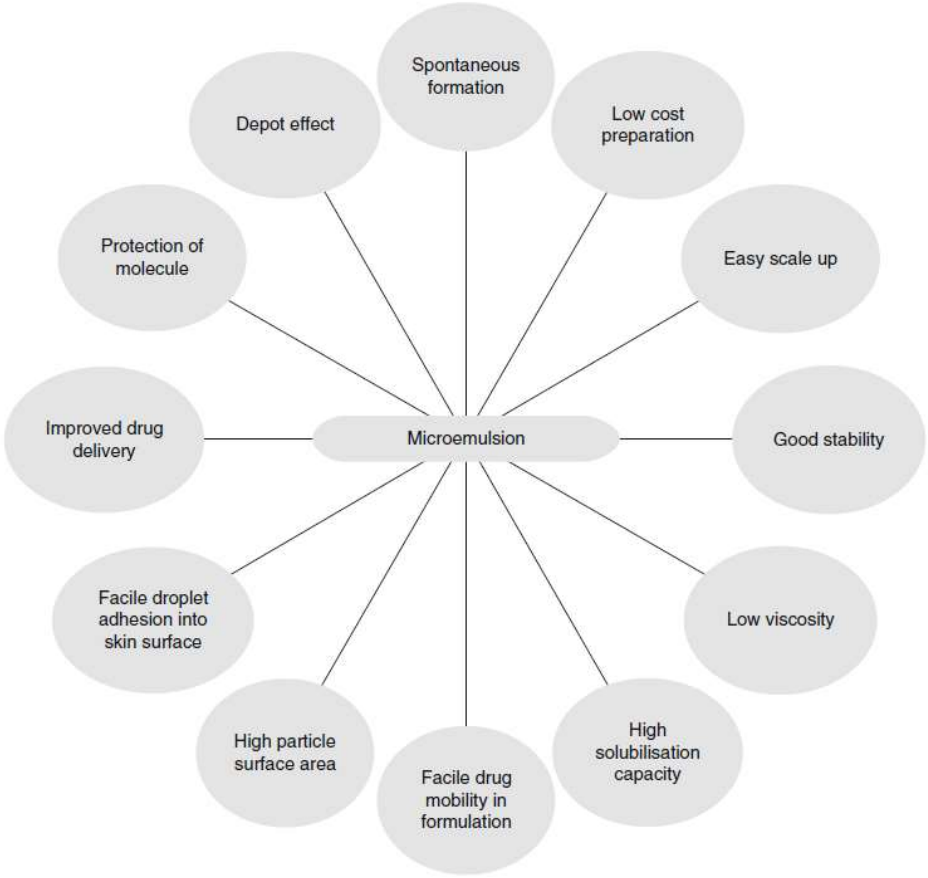
- Μπορούν να ενσωματώσουν τόσο λιπόφιλα όσο και υδρόφιλα συστατικά, με τα λιπόφιλα να ενσωματώνονται στην διεπιφάνεια των επιφανειοδραστικών ή στα σταγονίδια της οργανικής φάσης και τα υδρόφιλα στην υδατική φάση (Dragicevic & Maibach, 2016)



Εικόνα Α 51. Δομή μικρογαλακτωμάτων λ/ν. Τα λιπόφιλα μόρια μπορούν να ενσωματωθούν είτε στον πυρήνα των σταγονιδίων είναι ανάμεσα στις λιπόφιλες ουρές των μορίων των επιφανειοδραστικών (McClements, 2012)

- Αυξάνουν την διαλυτότητα δυσδιάλυτων δραστικών συστατικών με την ενσωμάτωση αυτή, αυξάνοντας και την παρεχόμενη δόση ανά φαρμακοτεχνική μορφή. Αυτό συμβαίνει λόγω της αύξηση της διαθέσιμης διεπιφάνειας για ενσωμάτωση του δραστικού συστατικού (Donnely & Singh, 2015).
- Αυξάνουν την βιοδιαθεσιμότητα δραστικών συστατικών, τόσο per os όσο και διαδερμικά, καθώς το μικρό μέγεθος και η ελαστικότητα των σταγονιδίων, και η υψηλή συγκέντρωση επιφανειοδραστικών τους επιτρέπει να διαπερνούν ταχύτερα και αποδοτικότερα τις μεμβράνες. Κατάλληλος σχεδιασμός τους μπορεί ακόμη να ξεπεράσει την μεταβλητότητα που προέρχεται από το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και να μειώσει την μεταβλητότητα κατά την χορήγηση (Fanun, 2009).
- Στην τοπική και διαδερμική χορήγηση εμφανίζουν επαυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, λόγω της αρχιτεκτονικής τους και του ιξώδους τους που τους επιτρέπει καλύτερη και αμεσότερη ενσωμάτωση στις μεμβράνες (Stubenrauch, 2009).
- Προσφέρουν σταθερότητα στην φαρμακοτεχνική μορφή, λόγω της θερμοδυναμικής σταθερότητας τους και της προστασίας που παρέχουν στο δραστικό συστατικό από χημική και οξειδωτική μεταβολή, με τον εγκλωβισμό του στα σταγονίδια (Stubenrauch, 2009).

- Ανάλογα τη σύσταση του συστήματος επιφανειοδραστικών και συνεπιφανειοδραστικών μπορεί να τροποποιηθεί η απελευθέρωση του δραστικού συστατικού από το μικρογαλάκτωμα, προσφέροντας πληθώρα επιλογών σχεδιασμού της φαρμακοτεχνικής μορφής παρατεταμένης ή ελεγχόμενης αποδέσμευσης, αλλά και στόχευσης του δραστικού συστατικού (Pentek et al., 2017). Καθώς χαρακτηρίζονται ως δυναμικά συστήματα, η μεταβλητότητα της δομής των μεμβρανών τους επιτρέπει την εύκολη απελευθέρωση του δραστικού συστατικού στον ιστό στόχο.
- Ο αυθόρμητος σχηματισμός τους και η χαμηλής ενέργειας παρασκευή τους, επιτρέπουν εξοικονόμηση πόρων και ευκολία στην μετάβαση σε μεγαλύτερη κλίμακα παραγωγής, στην φαρμακευτική βιομηχανία (McClements & Rao, 2011).



Εικόνα Α 52. Τα χαρακτηριστικά των μικρογαλακτωμάτων (Dragicevic & Maibach, 2017b)

Δεν θα πρέπει να ξεχνάμε όμως και τις δυσκολίες που εμφανίζουν μέχρι στιγμής στη χρήση τους τα μικρογαλακτώματα. Κυριότερα εξ αυτών είναι η ανάγκη για μεγάλη συγκέντρωση επιφανειοδραστικών στη σύστασή τους, που μπορεί να είναι ερεθιστική, αλλά και το στενό εύρος συνθηκών στις οποίες μπορούν να υπάρξουν ως θερμοδυναμικά σταθερά αυτά τα συστήματα (Lindman & Stubenrauch, 2009).

Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η πιθανότητα αλλαγής της δομής του συστήματος κατά την ενσωμάτωση δραστικών συστατικών, τα οποία μπορεί να εμφανίζουν συγγένεια με τα μόρια των

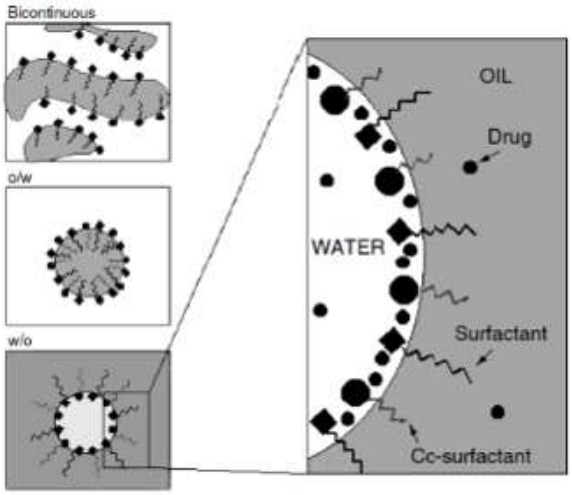
επιφανειοδραστικών και να ενσωματωθούν ανάμεσά τους στην διεπιφάνεια που σχηματίζουν, αλλάζοντας έτσι το μέγεθος των σωματιδίων και την περιοχή ύπαρξης του μικρογαλακτώματος (McClements, 2012).

5.2. Αρχιτεκτονική Μικρογαλακτωμάτων

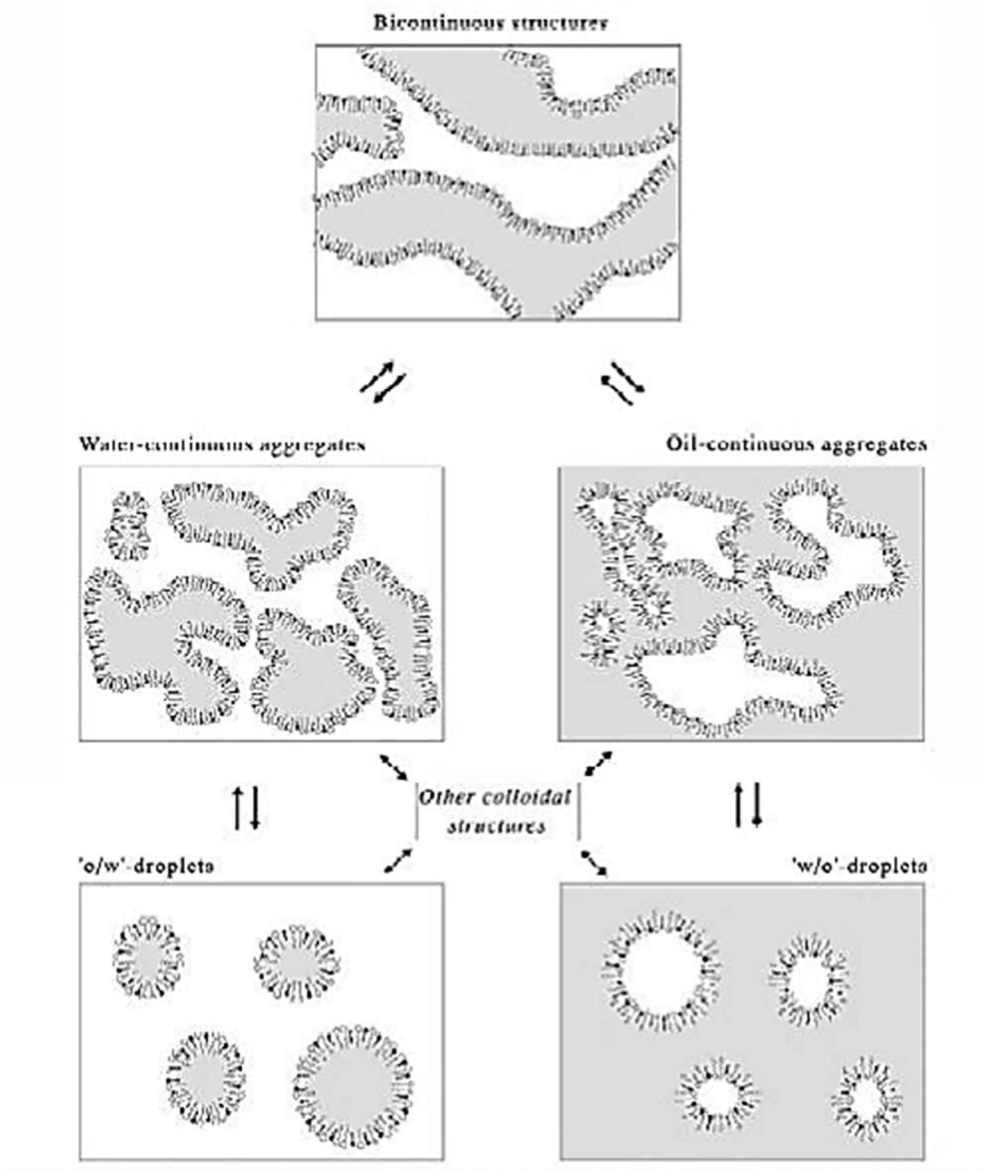
5.2.1. Τύποι Μικρογαλακτωμάτων

Ανάλογα με την αναλογία της οργανικής ως προς την υδατική φάση, του είδους των επιφανειοδραστικών και των συνεπιφανειοδραστικών και τις συνθήκες στις οποίες παρασκευάζονται, μπορούν να σχηματίσουν διαφορετικοί τύποι μικρογαλακτωμάτων:

- **Λάδι σε νερό (Oil/water)**, όπου η οργανική φάση με το σύστημα επιφανειοδραστικών σχηματίζει σταγονίδια και διασπείρεται στην συνεχή υδατική φάση. Οι πολικές κεφαλές των επιφανειοδραστικών προσανατολίζονται προς την υδατική συνεχή φάση και οι λιπόφιλες ουρές τους προς την οργανική φάση στο εσωτερικό των σταγονιδίων
- **Νερό σε λάδι (Water/oil)**, όπου η υδατική φάση με το σύστημα επιφανειοδραστικών σχηματίζει σταγονίδια και διασπείρεται στην συνεχή οργανική φάση. Ο προσανατολισμός των μορίων των επιφανειοδραστικών στην διεπιφάνεια είναι αντίστροφος από την προηγούμενη περίπτωση. Σε αυτή την περίπτωση η ελάχιστη διεπιφανειακή τάση και η ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια συστήματος αντιστοιχούν σε μία γωνία επαφής των σταγονιδίων τέτοια ώστε να σχηματίζουν σφαιρικές δομές. Το ίδιο συμβαίνει και στην προηγούμενη διαμόρφωση.
- **Ημισυνεχείς δομές (Bicontinuous structures)** που σχηματίζονται ανάμεσα στην μάζα της οργανική και της υδατικής φάσης. Για συγκεκριμένες συνθήκες και αναλογίες υλικών, τα επιφανειοδραστικά εμφανίζουν το τοπικό ελάχιστο ελεύθερης ενέργειας συστήματος σε μία διαμόρφωση διπλοστοιβάδων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν δομές υγρών κρυστάλλων και να εγκλωβίζουν τμήματα των δύο φάσεων στο εσωτερικό και στην διεπιφάνεια τους. Σε αυτή την ελάχιστη ενέργεια συστήματος η γωνία που αντιστοιχεί στην μικρότερη διεπιφανειακή τάση είναι τέτοια ώστε οι δομές που σχηματίζονται αυθόρμητα να μην είναι σφαιρικές αλλά σχεδόν επίπεδες (Tadros, 2013).



Εικόνα Α 53. Τύποι μικρογαλακτωμάτων: ημισυνεχείς δομές, λ/ν, ν/λ (Thong et al., 2007)



Εικόνα Α 54. Δυναμικές μεταπτώσεις δύο κατευθύνσεων μεταξύ των διαμορφώσεων των μικρογαλακτωμάτων (c)

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα

μικρογαλακτώματα είναι εξαιρετικά δυναμικές δομές. Με την αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών μεταβάλλονται τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας τους και παρατηρείται διακύμανση ανάμεσα στις διαφορετικές δομές. Μπορεί δηλαδή ένα μικρογαλάκτωμα να ανταλλάξει την διεσπαρμένη με την συνεχή φάση (από λ/ν σε ν/λ) ή να μετατραπεί σε ημισυνεχείς δομές. Το φαινόμενο αυτό είναι πλήρως αντιστρεπτό.

5.2.2. Διάκριση κατά Winsor

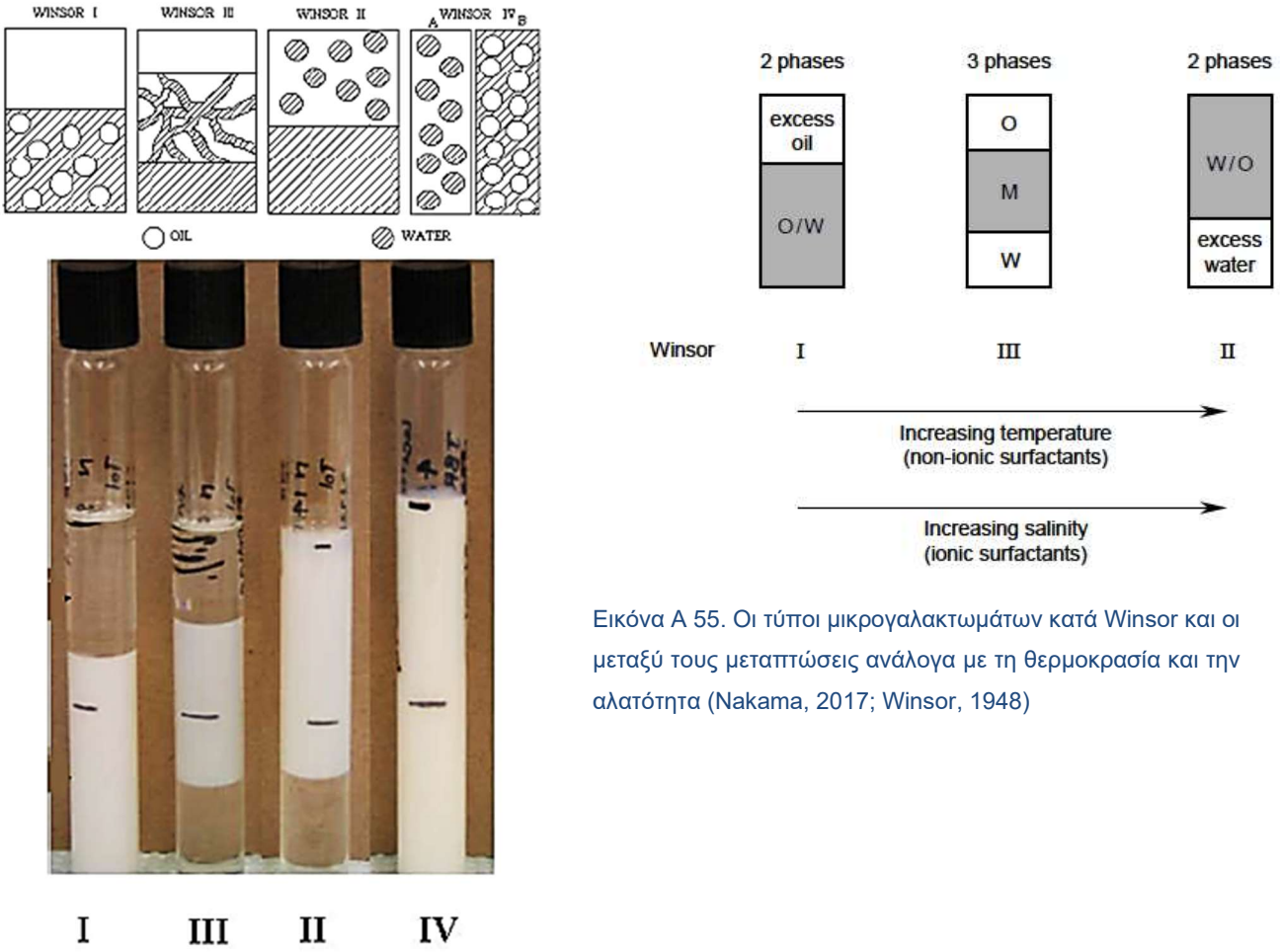
Ο Winsor το 1943 κατέταξε τα μικρογαλακτώματα σε τέσσερις γενικούς τύπους ισορροπίας φάσεων (Winsor, 1948):

I. Το επιφανειοδραστικό είναι υδατοδιαλυτό και σχηματίζεται λ/ν τύπος μικρογαλακτώματος (Winsor I). Η υδατική φάση είναι πλούσια σε επιφανειοδραστικό και συνυπάρχει με την ελαιώδη φάση όπου το επιφανειοδραστικό είναι παρόν μόνο ώς μονομερές σε μικρή συγκέντρωση

II. Το επιφανειοδραστικό είναι κυρίως διαλυτό στην ελαιώδη φάση και σχηματίζονται ν/λ μικρογαλακτώματα (Winsor II). Η ελαιώδης φάση είναι πλούσια σε επιφανειοδραστικό και συνυπάρχει με την υδατική φάση όπου το επιφανειοδραστικό υπάρχει μόνο ως μονομερές

III. Σύστημα τριών φάσεων όπου η μεσαία φάση είναι πλούσια σε επιφανειοδραστικό που σχηματίζει ημισυνεχείς δομές (Bicontinuous structures) (Winsor III). Η φάση αυτή συνυπάρχει με την υδατική και την λιπαρή φάση, οι οποίες είναι διακριτές μεταξύ τους και περιλαμβάνουν το επιφανειοδραστικό μόνο ως μονομερές

IV. Πρόκειται για μονοφασικό ισότροπο διάλυμα μικκυλίων που σχηματίζεται με την προσθήκη επαρκούς ποσότητας αμφίφιλου μορίου (αλκοόλη μικρού μεγέθους) που δρα ώς συνεπιφανειοδραστικό. Αυτό αλλάζει την ρευστότητα των μεμβρανών και τον τύπο του μικρογαλακτώματος. Τα σταγονίδια μεγαλώνουν σε μέγεθος, δεν είναι πιά μικρογαλάκτωμα αλλά διάλυμα μικκυλίων και δεν είναι πιά διαυγές (Winsor IV)



Εικόνα Α 55. Οι τύποι μικρογαλακτωμάτων κατά Winsor και οι μεταξύ τους μεταπτώσεις ανάλογα με τη θερμοκρασία και την αλατότητα (Nakama, 2017; Winsor, 1948)

5.2.3. Θεωρεία Σχηματισμού – Ελεύθερη Ενέργεια Συστήματος

Κάθε κολλοειδές σύστημα διασποράς δύο φάσεων οφείλει την ύπαρξη του στην διεπιφάνεια που σχηματίζουν τα μόρια του επιφανειοδραστικού συστήματος μεταξύ των δύο φάσεων. Η διεπιφάνεια αυτή στα περισσότερα συστήματα διασποράς εμφανίζει την μικρότερη ελεύθερη ενέργεια συστήματος όταν η γωνία επαφής των δύο φάσεων είναι 180 μοίρες και η καμπυλότητα της διεπιφάνειας είναι μηδενική. Με άλλα λόγια, στα περισσότερα συστήματα διασποράς η κατάσταση ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας συστήματος είναι αυτή στην οποία υπάρχουν δύο ξεχωριστές φάσεις και ανάμεσά τους η διεπιφάνεια των επιφανειοδραστικών (McClements & Rao, 2011).

Με εξωτερική προσφορά ενέργειας, θερμικής ή κινητικής, το σύστημα των επιφανειοδραστικών σχηματίζει σταγονίδια διαφόρων βαθμών καμπυλότητας. Τα συστήματα αυτά είναι ασταθή θερμοδυναμικά. Με το χρόνο τα σταγονίδια της διεσπαρμένης φάσης τείνουν να συσσωματωθούν και στη συνέχεια να συνενωθούν προς διαχωρισμό των δύο φάσεων, ακολουθώντας τις βαρυτικές δυνάμεις. Η φυσική σταθερότητα αυτών των συστημάτων εξαρτάται από τις συνθήκες παρασκευής τους, την ποσότητα ενέργειας και τον τρόπο που αυτή τους προσφέρθηκε. Αυτή

μαζί με το είδος των επιφανειοδραστικών θα καθορίσει το μέγεθος τον σωματιδίων και την καμπυλότητά τους, άρα και την γωνία επαφής των σταγονιδίων κατά την ελεύθερη κίνησή τους, άρα και το πόσο αργά θα επανέλθουν στην κατάσταση ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας συστήματος. Η επαναφορά αυτή είναι αναπόφευκτη για τα συστήματα αυτά. Τέτοια συστήματα είναι τα νανογαλακτώματα και τα μακρογαλακτώματα (Tadros, 2013).

Αντίθετα, η ύπαρξη των μικρογαλακτωμάτων οφείλεται σε ένα τοπικό ελάχιστο ελεύθερης ενέργειας συστήματος που εμφανίζουν τα μείγματα των συστατικών τους σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος και για συγκεκριμένο μείγμα επιφανειοδραστικών. Στις κατάλληλες συνθήκες, η καμπυλότητα των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης των μικρογαλακτωμάτων αντιστοιχεί στην ελάχιστη τιμή επιφανειακής τάσης και άρα ελάχιστη τιμή ελεύθερης ενέργειας συστήματος. Έτσι το σύστημα προτιμά να υπάρχει με αυτήν την αρχιτεκτονική, αντί για τις δύο διακεκριμένες φάσεις (Tadros et al., 2004).

Αυτό μπορεί να περιγραφεί και μαθηματικά, καθώς η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας συστήματος κατά τον σχηματισμό του συστήματος διασποράς εξαρτάται από την μείωση της επιφανειακής τάσης, από τα μόρια του επιφανειοδραστικού στην διεπιφάνεια, και από την αλλαγή στην εντροπία του συστήματος.

$$\Delta G_{form} = \gamma_{o/w} \Delta A - T\Delta S$$

Εξίσωση 17. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας συστήματος κατά την γαλακτωματοποίηση (Tadros, 2013)

ΔG_{form} , η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας συστήματος κατά τη διασπορά

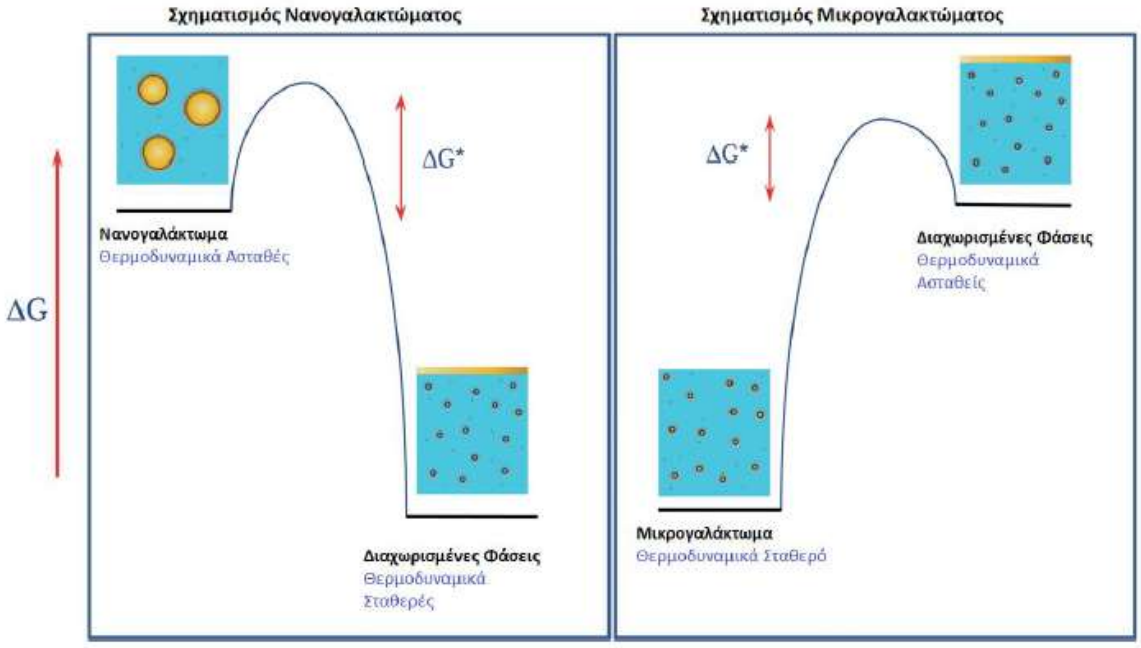
$\gamma_{o/w}$, η επιφανειακή τάση στην διεπιφάνεια ελαίου νερού

ΔA, η μεταβολή της επιφάνειας του συστήματος κατά τη διασπορά

T, θερμοκρασία συστήματος σε Kelvin

ΔS, μεταβολή της εντροπίας

Η αλλαγή στην εντροπία ($\Delta S > 0$) είναι πάντα θετική. Καθώς η μία φάση διασπείρεται στην άλλη και αυξάνεται ο αριθμός των σταγονιδίων, άρα και της επιφάνειας ($\Delta A > 0$). Εάν τώρα το σύστημα των επιφανειοδραστικών διατάσσεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνει αρκετά την διεπιφανειακή τάση $\gamma_{o/w}$, τότε η ΔG γαλακτωματοποίησης θα είναι θετική, οδηγώντας σε αυθόρμητο σχηματισμό (Tadros, 2013).



Εικόνα Α 56.Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης της ελεύθερης ενέργειας των κολλοειδών συστημάτων σε σχέση σε την κατάσταση διαχωρισμού των φάσεων. Οι δύο καταστάσεις χωρίζονται από μια ενέργεια ενεργοποίησης ΔG*. Η ταχύτητα αποσταθεροποίησης των νανογαλακτωμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογη της προσφερθήσας ενέργειας ΔG* (McClements, 2012; προσαρμογή στα ελληνικά από Τζουανάκη, 2016)

Καθοριστικός παράγοντας για το ποια αρχιτεκτονική θα προτιμήσει το σύστημα είναι το είδος του επιφανειοδραστικού ή του συστήματος αυτών. Έχουν παρατηρηθεί μικρογαλακτώματα διαφορετικού τύπου από αυτόν που δικαιολογεί η ποσοστιαία αναλογία των δύο φάσεων, καθώς η σταθερότητά τους εξαρτάται από διαφορετικού τύπου επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Αυτό μπορεί να προβλεφθεί εξετάζοντας τον δείκτη σχετικής λιποφιλίας υδροφιλίας (HLB) του επιφανειοδραστικού συστήματος (Sakamoto et al., 2017).

Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στην δομή των μικρογαλακτωμάτων ανάλογα με το pH και την αλατότητα της υδατικής φάσης. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν την ενυδάτωση των πολικών κεφαλών των επιφανειοδραστικών παραγόντων, με συνέπεια αλλαγές στην διαμόρφωση και την σταθερότητα της διεπιφάνειας (Fanun, 2009).

Ο Winsor μελέτησε την επίδραση των μεταβολών αυτών στην δομή των μικρογαλακτωμάτων. Οι πιθανές αλλαγές φαίνονται παρακάτω, στην εικόνα Α57.

Σημαντικός παράγον μεταβολής της αρχιτεκτονικής των μικρογαλακτωμάτων είναι η θερμοκρασία. Από αυτήν εξαρτώνται σημαντικοί παράγοντες της συμπεριφοράς των επιφανειοδραστικών μορίων, το R – ratio, η κρίσιμη παράμετρος συνοχής (Critical Packing Parameter, CPP), και το σημείο νέφωσης (Cloud Point) (Israelachvili, 1994).

Αύξηση Μεταβλητής	Μετάβαση
Αλατότητα (Salinity)	WI → WIII → WII
Έλαιο: αριθμός ατόμων άνθρακα	WII → WIII → WI
Αλκοόλη: με χαμηλό MW	WII → WIII → WI
με υψηλό MW	WI → WIII → WII
Επιφανειοδραστικό: μήκος λιπόφιλης αλυσίδας	WI → WIII → WII
Θερμοκρασία: για ανιονικά επιφανειοδραστικά	WII → WIII → WI
για μη ιονικά επιφανειοδραστικά	WI → WIII → WII

Εικόνα Α 57. Επίδραση μεταβολών κρίσιμων μεταβλητών στον τύπο των μικρογαλακτωμάτων (Τζουανάκη, 2016)

5.2.4. R – ratio

Η παράμετρος R ή πηλίκο R ορίζεται από τον Winsor ως το πηλίκο της ενέργειας συνοχής ενός επιφανειοδραστικού με την λιπαρή φάση (Aco) προς την ενέργεια συνοχής του με την υδατική φάση (Acw).

$$R = \frac{A_{CO}}{A_{cw}}$$

Εξίσωση 18.Το πηλίκο R της ενέργειας συνοχής του επιφανειοδραστικού με την λιπαρή πρός την υδατική φάση επηρεάζει την καμπυλότητα της διεπιφάνειας (Winsor, 1948)

Όσο μεγαλύτερη είναι η παράμετρος R τόσο μεγαλύτερη τάση έχει το αμφίφιλο μόριο να διασπαρεί στην λιπαρή φάση και αντίστροφα. Ανάλογα την συγγένεια του αμφίφιλου μορίου με την λιπαρή ή την υδατική φάση, ευνοείται ο σχηματισμός άλλου τύπου μικρογαλακτώματος κατά Winsor. Με άλλα λόγια, ο τύπος του μικρογαλακτώματος εξαρτάται από την σχετική λιποφιλία/υδροφιλία του επιφανειοδραστικού.

Αργότερα προτάθηκε η εκτεταμένη μορφή του πηλίκου R για να ληφθούν υπόψη η επίδραση της δομής του ελαίου και οι δυνάμεις συνοχής μεταξύ των μορίων του επιφανειοδραστικού στην διεπιφάνεια.

$$R = \frac{A_{CO} - A_{OO} - A_{LL}}{A_{cw} - A_{WW} - A_{HH}}$$

Εξίσωση 19. Η εκτεταμένη μορφή του πηλίκου R (Israelachvili, 1994)

Όπου :

Aoo η ενέργεια συνοχής μεταξύ μορίων ελαίου

A_{LL} η ενέργεια συνοχής των υδρόφοβων περιοχών του επιφανειοδραστικού

A_{WW} η ενέργεια συνοχής των μορίων της υδατικής φάσης

A_{HH} η ενέργεια συνοχής των υδρόφοβων περιοχών του επιφανειοδραστικού

Συνεπώς, μία θετική τιμή του πηλίκου R σημαίνει μεγαλύτερη συγγένεια του επιφανειοδραστικού με την λιπαρή φάση και μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής με αυτήν. Η διεπιφάνεια που θα σχηματιστεί θα έχει τέτοια καμπυλότητα ώστε το μικρογαλάκτωμα να κατατάσσεται ώς Winsor II (ν/λ). Αντίστοιχα, για R = 1 σχηματίζονται μικρογαλακτώματα Winsor III με ημισυνεχείς δομές (Nakama, 2017).

5.2.5. Critical Packing Parameter

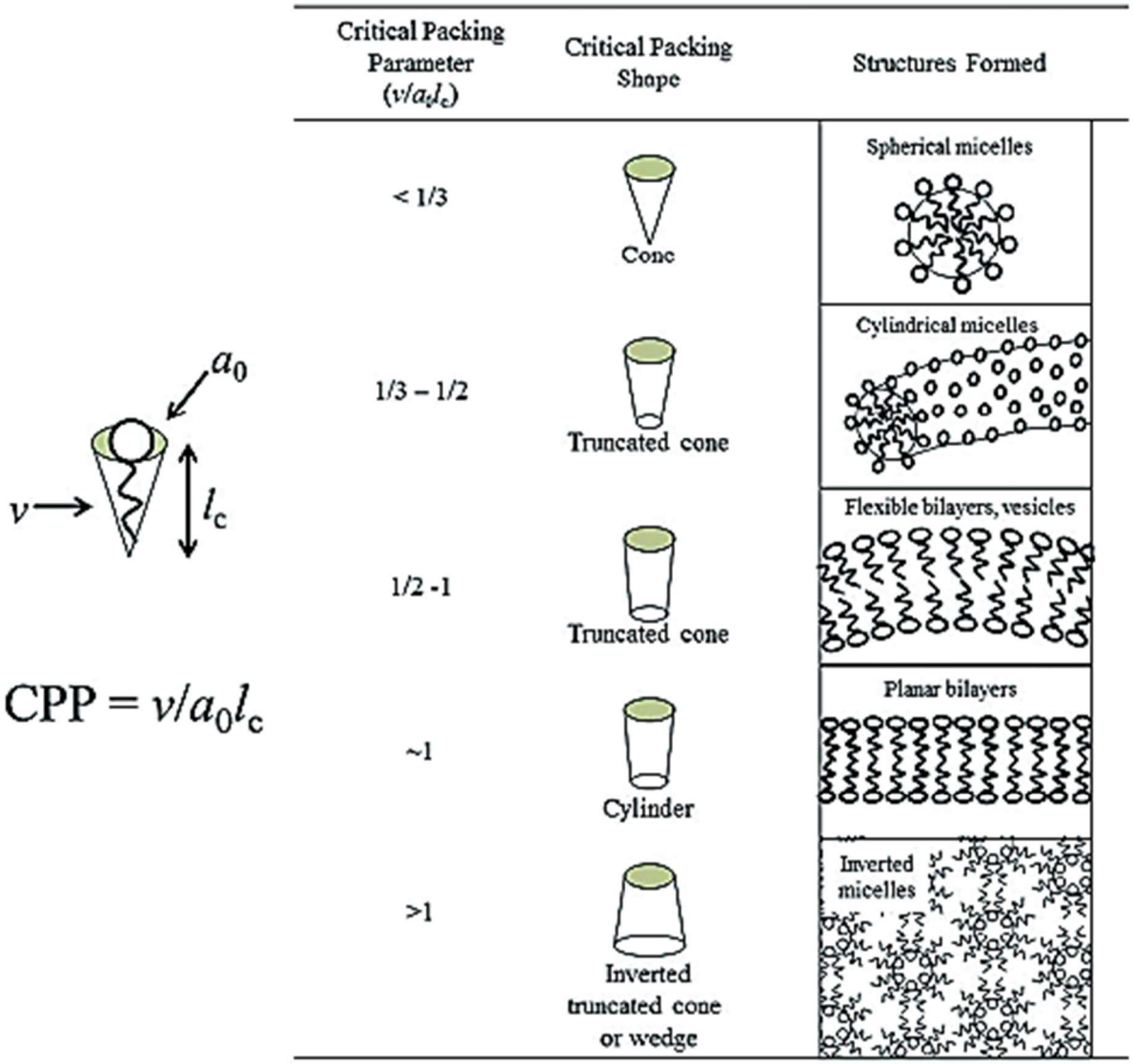
Η παράμετρος CPP ορίζεται ως το πηλίκο το μεγέθους της πολικής κεφαλής του επιφανειοδραστικού και της άπολης ουράς. Η μεταξύ τους σχέση καθορίζει την ιδανική καμπυλότητα για την διεπιφάνεια που θα σχηματίσει το επιφανειοδραστικό. Έτσι μπορούμε να προβλέψουμε με γεωμετρικούς όρους την διαμόρφωση του μικρογαλακτώματος (Nastiti et al., 2017).

Όσο μεταβάλλεται η παράμετρος CPP και αλλάζει η διαμόρφωση του επιφανειοδραστικού μορίου στην οποία εμφανίζει την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια συστήματος. Αυτό οδηγεί σε δομικές αλλαγές στο μικρογαλάκτωμα, από o/w σε w/o ή Bicontinuous, ακόμη και σε αλλαγή φάσης του συστήματος από μικρογαλάκτωμα σε δομή υγρών κρυστάλλων, μακρογαλάκτωμα, νανογαλάκτωμα ή και πλήρη διαχωρισμό φάσεων (Winsor, 1948).

Ορίζοντας το μέγεθος της πολικής κεφαλής a_o και της υδρόφοβης ουράς v/l_c (Nastiti et al., 2017) :

- Εάν $a_o > v/l_c$, τότε σχηματίζεται λ/ν μικρογαλάκτωμα
- Εάν $a_o < v/l_c$, τότε σχηματίζεται ν/λ μικρογαλάκτωμα
- Εάν $a_o \approx v/l_c$, τότε σχηματίζονται ημισυνεχείς δομές

Παρακάτω απεικονίζονται οι διαφορετικές διαμορφώσεις που λαμβάνει η μεμβράνη που σχηματίζει το επιφανειοδραστικό ανάλογα με την τιμή της CPP που το χαρακτηρίζει.

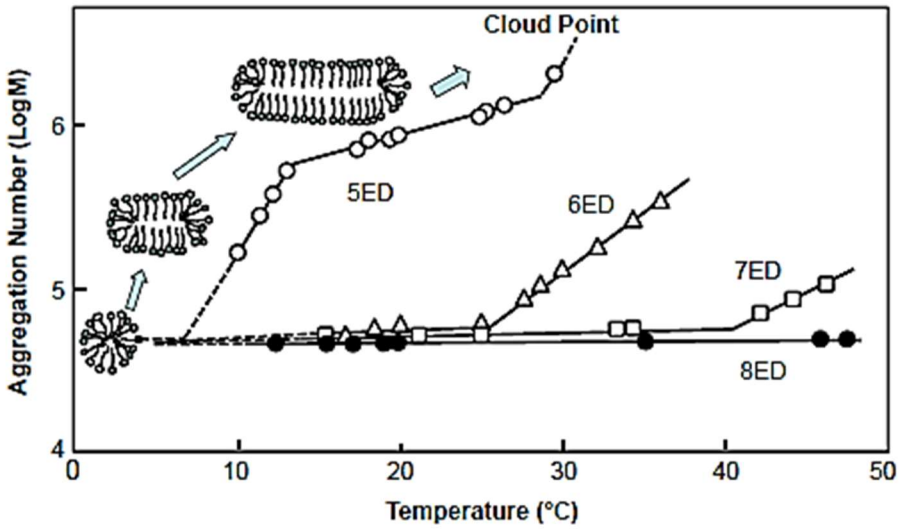


Εικόνα Α 58. Οι διαμορφώσεις της μεμβράνης του επιφανειοδραστικού ανάλογα με την τιμή της CPP του (Israelachvili, 1994)

5.2.6. Cloud Point

Το σημείο νέφωσης (Cloud Point, CP) είναι η θερμοκρασία στην οποία η διαλυτότητα στο νερό των μη ιονικών επιφανειοδραστικών μειώνεται τόσο ώστε να επέρχεται διαχωρισμός φάσεων. Αυτό συμβαίνει διότι με την άνοδο της θερμοκρασίας αυξάνεται η κινητικότητα των μορίων νερού το διάλυμα και διαταράσσεται η σφαίρα ενυδάτωσης των πολικών κεφαλών των μορίων των επιφανειοδραστικών. Όσο μεγαλύτερη είναι η πολική κεφαλή ενός επιφανειοδραστικού τόσο μεγαλύτερη αντοχή έχει στην αύξηση της θερμοκρασίας (Nakama, 2017).

Έτσι το σημείο νέφωσης χρησιμοποιείται και σαν δείκτης σχετικής υδροφιλίας του επιφανειοδραστικού. Με την αύξηση της θερμοκρασίας σε ένα μικρογαλάκτωμα πέρα από το σημείο νέφωσης του συστήματος των επιφανειοδραστικών η διαμόρφωση των σταγονιδίων μεταπίπτει σε διαμόρφωση Bicontinuous ή επέρχεται διαχωρισμός φάσεων (Israelachvili, 1994).



Εικόνα Α 59. Μεταβολή της διαμόρφωσης των μορίων των μη ιονικών επιφανειοδραστικών με την αύξηση της θερμοκρασίας, ανάλογα με τον αριθμό των αιθυλενοξειδίων, του μεγέθους δηλαδή της πολικής κεφαλής (Nakama, 2017)

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των μικρογαλακτωμάτων είναι η ικανότητα πλήρους επαναφοράς του συστήματος στην ιδανική του δομή κατά την επαναφορά της θερμοκρασίας και των υπόλοιπων κρίσιμων συνθηκών στις αρχικές. Με άλλα λόγια, ενώ τα θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα τείνουν προς αποσταθεροποίηση, τα μικρογαλακτώματα ύστερα από αποσταθεροποίηση τους τείνουν να επιστρέψουν στην πρότερη θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση (Lindman & Stubenrauch, 2009).

Η ιδιότητα αυτή δεν θα πρέπει να συγχέεται με την αντοχή στην διάλυση που εμφανίζουν τα λ/ν μακρογαλακτώματα. Στα μικρογαλακτώματα διάλυση σημαίνει αλλαγή στις αναλογίες των συστατικών και άρα στην αρχιτεκτονική τους (McClements, 2012).

5.2.7. Διάκριση από τα Νανογαλακτώματα και τα Μακρογαλακτώματα

Διάκριση από τα Νανογαλακτώματα

Σε αντίθεση με τα μικρογαλακτώματα που εμφανίζονται στην βιβλιογραφία το 1943, τα πρώτα νανογαλακτώματα εμφανίζονται το 1996 (McClements, 2012). Ως νανογαλακτώματα, ορίζονται τα κολλοειδή συστήματα διασποράς στα οποία η διεσπαρμένη φάση είναι οργανική και η συνεχής υδατική. Το ανώτατο όριο στο μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης είναι τα 20 μm (20000nm) (Daniels, 2004) .

Ο όρο μίκρο- αντιστοιχεί σε μεγέθη έως 10^{-9} m, και ο όρος νάνο σε μεγέθη 10^{-6} m. Αυτό θα σήμαινε ότι τα μικρογαλακτώματα αντιστοιχούν σε μεγέθη μεγαλύτερα αυτών των νανογαλακτωμάτων και αντίστροφα, κάτι που δεν ισχύει. Η σύγχυση μεταξύ των δύο κατηγοριών κολλοειδών συστημάτων οφείλεται στην ανακάλυψη των μικρογαλακτωμάτων και καθιέρωση του όρου αρκετές δεκαετίες πριν την πρώτη μορφοποίηση των νανογαλακτωμάτων (McClements, 2012).

Τα νανογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή, ευαίσθητα συστήματα τα οποία απαιτούν μεγάλη προσφορά ενέργειας για να μορφοποιηθούν. Φαίνεται να είναι ασταθή κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασίες από 0°C έως 40°C. Η διάρκεια ζωής τους δύναται να παραταθεί με μεθόδους όπως η επικάλυψη με συστήματα υδρόφιλων και λιπόφιλων πολυμερών (McClements, 2012).

Αντίθετα, τα μικρογαλακτώματα, παρά το πρόθεμα της ονομασίας τους, φτάνουν μέχρι τα 150nm περίπου και μπορούν να διαμορφωθούν σε συστήματα διασποράς λ/ν, ν/λ και ημισυνεχή (Bicontinuous). Το κυριότερο όμως χαρακτηριστικό που τα διακρίνει από τα νανογαλακτώματα είναι η θερμοδυναμική σταθερότητα σε βάθος χρόνου και η ελάχιστη ή καθόλου προσφορά ενέργειας που απαιτείται για την μορφοποίησή τους (McClements, 2012).

Τέλος, τα μικρογαλακτώματα είναι διαυγή καθώς το μέγεθος των σταγονιδίων τους είναι μικρότερο του μήκους κύματος του ορατού φωτός και η διασπορά των σταγονιδίων τους είναι αρκετά μεγάλη ώστε το ορατό φως να διαχέεται ελεύθερα μέσα από την μάζα τους. Τα νανογαλακτώματα χαρακτηρίζονται ως διαυγή έως ελαφρώς θολερά, όσο αυξάνεται το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης (McClements & Rao, 2011).

Διάκριση από τα Μακρογαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα διαφέρουν από τα μακρογαλακτώματα στην οπτική ισοτροπία, καθώς τα μακρογαλακτώματα είναι λευκά έως υπόλευκα, λόγω του μεγέθους των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης. Τα μακρογαλακτώματα είναι θερμοδυναμικά ασταθή συστήματα διασποράς και κατά την μορφοποίηση τους απαιτείται προσφορά ενέργειας. Τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται αυθόρμητα, με απλή ήπια ανάδευση. Διαφέρουν όμως στο αυξημένο ποσοστό των επιφανειοδραστικών που απαιτείται για τον σχηματισμό τους. Το ιξώδες των μακρογαλακτωμάτων κυμαίνεται από χαμηλό έως πολύ υψηλό, ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της οργανικής φάσης ενώ τα μικρογαλακτώματα χαρακτηρίζονται ως υγρά διαλύματα (Nastiti et al., 2017).

	Emulsion	Microemulsion	Nanoemulsion
Physical description	Coarse dispersion	Colloidal dispersion	Colloidal dispersion
Particle size range	>500 nm	<100 nm	<100 nm
Polydispersity	High	Low	Low
Thermodynamic stability	Unstable	Stable	Unstable
Preparation	High energy	Low energy	Low/high energy
Composition: surfactant to oil ratio	Low	High	Moderate
Physical appearance	Creamy	Transparent	Transparent
Texture	Semi-solid	Fluid	Fluid

Εικόνα Α 60. Σύγκριση μακρογαλακτωμάτων, μικρογαλακτωμάτων και νανογαλακτωμάτων (Nastiti et al., 2017)

5.3. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων

5.3.1. Επιλογή υλικών

Οργανική Φάση

Συνήθως πρόκειται για έλαια χαμηλού ιξώδους, με σημείο τήξεως μικρότερο των 25°C ώστε να είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επιλογή του ελαίου ή του μείγματος των οργανικών συστατικών εξαρτάται από το δραστικό συστατικό που επιθυμούμε να διαλυτοποιήσουμε και την στόχευση της φαρμακοτεχνικής μορφής. Πολλά συστατικά της λιπαρής φάσης των τοπικών και διαδερμικών μορφών λειτουργούν και ως ενισχυτές διαπερατότητας. Χαρακτηριστικά έλαια που έχουν χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά μικρογαλακτώματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Στην οργανική φάση μπορεί να είναι διαλυμένο και κάποιο αντιοξειδωτικό, σε περίπτωση που επιθυμούμε να ενσωματώσουμε ένα ευοξείδωτο συστατικό στο μικρογαλάκτωμα. Ακόμη προστίθενται και λιπόφιλα πολυμερή ή διοξείδιο του πυριτίου, που θα δράσουν ώς αυξητικά ιξώδους για το τελικό μικρογαλάκτωμα.

Υδατική Φάση

Η υδατική φάση αποτελείται συνήθως από κεκαθαρμένο ή απιονισμένο ύδωρ. Προστίθενται παράγοντες ρύθμισης αλατότητας ένα προορίζεται για ενδοφλέβια ή οφθαλμική χρήση και αντιμικροβιακοί παράγοντες στο ρόλο του συντηρητικού. Σε αυτή τη φάση προστίθενται και υδρόφιλα πολυμερή που θα δράσουν ώς αυξητικά ιξώδους του μικρογαλακτώματος.

Σημαντική είναι η ρύθμιση του pH με την χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Ανάλογα με την οδό χορήγησης απαιτείται ρύθμιση σε άλλες τιμές pH, όπως 5,5—6 για δερματική χορήγηση και 7,4 για οφθαλμική.

Επιφανειοδραστικά και Συνεπιφανειοδραστικά

Το σύστημα των επιφανειοδραστικών παραγόντων στα μικρογαλακτώματα αποτελείται από έναν κύριο επιφανειοδραστικό παράγοντα και ένα συνεπιφανειοδραστικό. Ο κύριος επιφανειοδραστικός παράγοντας μπορεί να είναι ένα o/w ή ένα w/o επιφανειοδραστικό ή συνδυασμός αυτών σε διάφορες αναλογίες. Τα επιφανειοδραστικά που χρησιμοποιούνται στην μορφοποίηση μικρογαλακτωμάτων είναι συνήθως μικρού μήκους υδρόφοβης αλύσου και συνολικά μικρού μοριακού βάρους, ώστε να μπορούν να δίνουν αυθόρμητα μικρή και θετική μεταβολή ελεύθερης ενέργειας συστήματος κατά τη μορφοποίηση. Θα πρέπει να είναι υγρά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και χαμηλού ιξώδους ώστε να είναι δυνατή η ήπια ανάδευση.

Συνήθως στα μικρογαλακτώματα απαιτείται χρήση αρκετά μεγάλων ποσοστών επιφανειοδραστικών παραγόντων. Έχουν μορφοποιηθεί μικρογαλακτώματα με ανιονικά και αμφοτερικά επιφανειοδραστικά, αλλά τείνουν να προτιμώνται τα μη ιονικά επιφανειοδραστικά για να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης τοξικότητας και ερεθισμών. Ο σχετικός δείκτης λιποφιλίας/

υδροφιλίας (HLB) του επιφανειοδραστικού θα καθορίσει συνήθως τον τύπο του μικρογαλακτώματος. Η χρήση συνδυασμού ενός υδρόφιλου και ενός λιπόφιλου γαλακτωματοποιητή ευνοεί τον σχηματισμό ημισυνεχών δομών (Winsor III).

Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στα χαρακτηριστικά του επιφανειοδραστικού και στην θερμοκρασία κατά την μορφοποίηση των μικρογαλακτωμάτων. Εάν το Cloud Point του επιφανειοδραστικού είναι κοντά στην θερμοκρασία παρασκευής, εισάγονται παράγοντες μεταβλητότητας και διακυβεύεται η σταθερότητα του συστήματος (McClements, 2012).

Ως συνεπιφανειοδραστικό ή συνδιαλύτης ορίζεται ο παράγοντας εκείνος που συνεπιφανειοδραστικού παρεμβάλλεται των μορίων του επιφανειοδραστικού στην διεπιφάνεια και αυξάνει την ρευστότητα της μεμβράνης των επιφανειοδραστικών με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η περιοχή ύπαρξης των μικρογαλακτωμάτων στο διάγραμμα φάσεων. Συνήθως αυτόν το ρόλο τον παίζουν λιπαρές αλκοόλες, αιθανόλη και άλλοι παράγοντες που μπορεί να δρουν και ώς ενισχυτές διαπερατότητας στα διαδερμικά προϊόντα. Η μάζα του συνδιαλύτη προστίθεται στην φάση στην οποία είναι περισσότερο διαλυτός, πριν την μορφοποίηση, συνήθως στην λιπαρή ή στη φάση των γαλακτωματοποιητών (Moulik & Paul, 1998).

Η ρευστότητα των δομών του μικρογαλακτώματος εξαρτάται από το είδος του ελαίου, του επιφανειοδραστικού και του συνεπιφανειοδραστικού και μπορεί να καθορίσει το εύρος της περιοχής ύπαρξης του μικρογαλακτώματος και τον τρόπο απελευθέρωσης του δραστικού συστατικού από αυτές (Juškaite et al., 2015a). Τα κυριότερα συνεπιφανειοδραστικά ή συνδιαλύτες αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Έλαια	Επιφανειοδραστικά	Συνεπιφανειοδραστικά	Πηγή
Isopropyl Myristate	Tween (20,80,60,85)		
Oleic acid	Span (20,80,83,60)		
Isopropyl Palmitate	Lecithin		(Kreilgaard, 2002)
	Glycerol monooleate		(Juškaite et al., 2015a)
Ethyl oleate	labrasol		
Cholesterol	polyglyceryl isostearate		
Poloxamer 101	Cremophor RH		
PEG 20			
olive oil			
capryol 90			(Said et al., 2017)
Long Chain Triglycerides		Transcutol	
Medium Chain Triglycerides	Cremophor EL	Ethanol	(Pund et al., 2014a)
Acrysol k150		PEG 400	(C. K. Singh et al., 2015)
Capmul MCM		Propylene Glycol	
Labrafac		Lauroglycol FCC	
Pomegranate seed oil			(L. Y. Lu et al., 2015)
	Sucrose laurate		(Yutani et al., 2014)
	Sucrose oleate		(Yutani et al., 2016)
Castor oil			
Capmul 30		Cremophor 70	(Bolko et al., 2014)

Πίνακας 1. Έκδοχα που χρησιμοποιούνται συχνά στην παρασκευή μικρογαλακτωμάτων

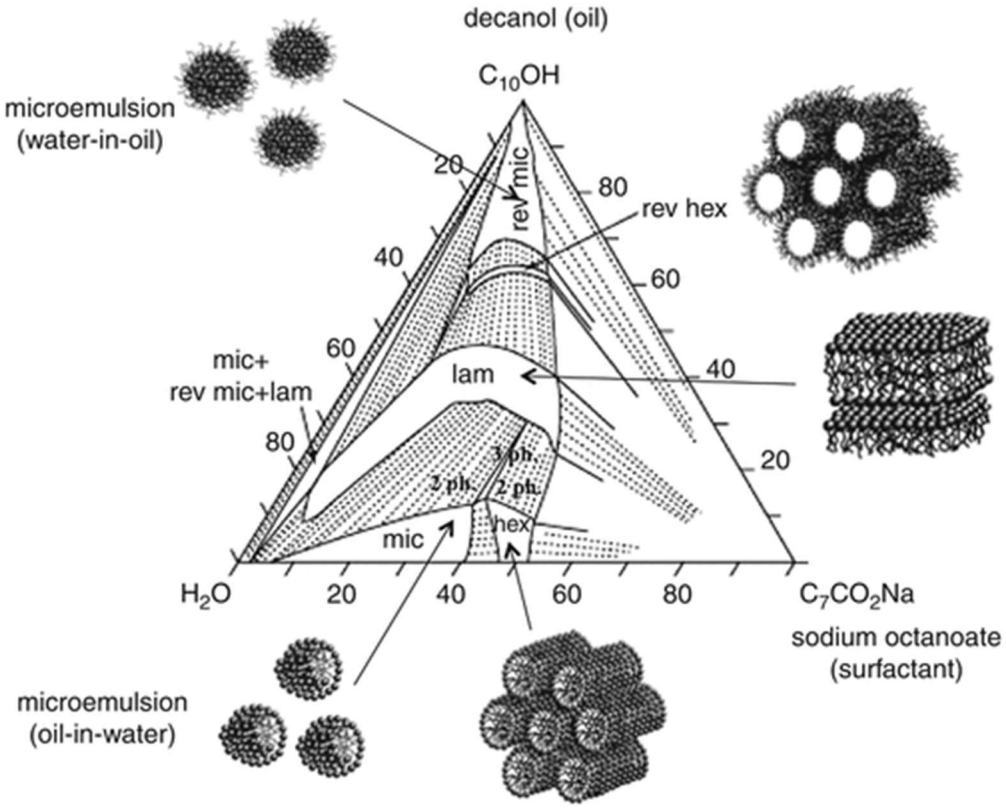
5.3.2. Διάγραμμα τριών φάσεων

Τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται αυθόρμητα υπό συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος και σε συγκεκριμένες αναλογίες συστατικών. Αυτές οι αναλογίες απεικονίζονται σε διαγράμματα τριών φάσεων ή τριαδικό (ternary diagram) . Στα διαγράμματα τριών φάσεων κάθε πλευρά αντιστοιχεί σε ένα συστατικό. Κάθε σημείο της επιφάνειας του τριγώνου αντιστοιχεί σε μία αναλογία των τριών συστατικών. Για κάθε σημείο ισχύει ότι το άθροισμα των ποσοστών των επιμέρους συστατικών είναι ίσο με 100% (ή με τη μονάδα αν εκφράζονται σε δεκαδική μορφή) (Azad et al., 2020).

Πιο συγκεκριμένα, η διερεύνηση για την περιοχή ύπαρξης τους γίνεται με τιτλοδότησης μειγμάτων οργανικής φάσης και επιφανειοδραστικών με την υδατική φάση, υπό ήπια ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα. Το τελικό σημείο της τιτλοδότησης ορίζεται από την πρώτη εμφάνιση θολερότητας, που αντιστοιχεί στην ύπαρξη σταγονιδίων ή δομών μεγαλύτερων από αυτές του εύρους των μικρογαλακτωμάτων (Tadros, 2013).

Τα μείγματα που μελετώνται συνήθως διαφέρουν κατά 10% στην σύσταση, ξεκινώντας από αναλογία οργανικής φάσης : επιφανειοδραστικών 1:9 έως 9:1. Τα τελικά σημεία των

τιτλοδοτήσεων απεικονίζονται σε ένα τριγωνικό διάγραμμα τριών φάσεων, όπου η κάθε πλευρά αντιστοιχεί σε ένα από τα τρία υλικά του μικρογαλακτώματος. Στις περιπτώσεις που κάποια από τις φάσεις είναι μείγμα συστατικών, το διάγραμμα ονομάζεται ψευδό – τριαδικό (pseudo – ternary diagram). Σε αυτά τα διαγράμματα απεικονίζονται όλες οι διαμορφώσεις που μπορεί να πάρει το σύστημα σε όλες τις αναλογίες των φάσεων, όπως το μακρογαλάκτωμα, το νανογαλάκτωμα, οι διαμόρφωση υγρών κρυστάλλων και ο διαχωρισμός φάσεων (Thong et al., 2007).



Εικόνα Α 61. Διάγραμμα τριών φάσεων που περιλαμβάνει όλες τις δυνατές διαμορφώσεις ανάλογα με την σχετική αναλογία των υλικών (Kreilgaard, 2002)

5.3.3. Μέθοδοι Παρασκευής

Αναφέρονται δύο μέθοδοι παρασκευής των μικρογαλακτωμάτων, η αυθόρμητη μέθοδος και η μέθοδος προμορφοποίησης.

Στην αυθόρμητη μέθοδο, αναμειγνύονται πρώτα τα συστατικά της λιπαρής φάσης με το σύστημα των επιφανειοδραστικών και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση η υδατική φάση. Κάποια συστήματα μορφοποιούνται αυθόρμητα και χωρίς καμία προσφορά ενέργειας υπό τη μορφή ανάδευσης, αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος αναμονής μέχρι το σύστημα να έρθει σε ισορροπία (Azad et al., 2020).

Η πάροδος χρόνου που απαιτείται για εξισορρόπηση αλλά και η ήπια ανάδευση απαιτούνται καθώς, παρά τον αυθόρμητο σχηματισμό τους υπάρχουν ενεργειακά εμπόδια στον σχηματισμό

τους, κυρίως ενέργεια που απαιτείται για την μεταφορά μάζας των συστατικών κατά την ανάμειξη (McClements, 2012).

Με τη μέθοδο της προμορφοποίησης, η λιπαρή φάση και το σύστημα των επιφανειοδραστικών αναμειγνύονται με μέρος της υδατικής φάσης υπό έντονη ανάδευση και σχηματίζουν το πρωτεύον γαλάκτωμα. Στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά η υπόλοιπη υδατική φάση. Αυτή η μέθοδος προτιμάται όταν επιθυμούμε να μειώσουμε το ποσοστό των επιφανειοδραστικών που θα χρησιμοποιηθούν, συνήθως για λόγους ερεθιστικότητας (Kreilgaard, 2002).

5.4. Χαρακτηρισμός και Μελέτη Μικρογαλακτωμάτων

5.4.1. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Μέγεθος Σωματιδίων

Το μέγεθος των σταγονιδίων είναι απαραίτητο για την κατάταξη των μικρογαλακτωμάτων. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Αυτή η μέθοδος μετρά τον τρόπο με τον οποίο σκεδάζεται μία μονοχρωματική δέσμη φωτός καθώς περνά μέσα από την μάζα του μικρογαλακτώματος. Η σκέδαση αυτή οφείλεται στην ελεύθερη τυχαία κίνηση κατά Brown των σταγονιδίων (Cadogan et al., 2017).

Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται η διάμετρος της σφαίρας που αντιστοιχεί στο επίπεδο σκέδασης που μετράται. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς ανάλογα με την πυκνότητα των σταγονιδίων το DLS υπολογίζει είτε την πραγματική διάμετρο των σταγονιδίων είτε την φαινόμενη (Shukla et al., 2003).

Η φαινόμενη διάμετρος διάχυσης είναι ένας τρόπος να προσομοιαστεί με σφαίρα μία δομή που δεν είναι σφαιρική, όπως οι ημισυνεχείς δομές των μικρογαλακτωμάτων. Στα πολύ πυκνά μικρογαλακτώματα το σφάλμα προέρχεται από την πολλαπλή σκέδαση του διερχόμενου φωτός ανάμεσα στα σταγονίδια (Nastiti et al., 2017).

Πολυδιασπορά

Η πολυδιασπορά του δείγματος είναι δείκτης του τρόπου κατανομής του μετρούμενου μεγέθους σωματιδίων στο δείγμα. Ένα μικρογαλάκτωμα λ/ν ή ν/λ δεν θα πρέπει να εμφανίζει πολυδιασπορά καθώς η διαμόρφωση με την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια είναι μία. Αντίθετα σε διαλύματα μικκυλίων ή σε Bicontinuous structures (Winsor III, IV) παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην πολυδιασπορά. Αυτό συμβαίνει καθώς τα μικκύλια μπορούν να σχηματίζουν σταγονίδια διαφόρων μεγεθών στο ίδιο διάλυμα, ενώ η έλλειψη σφαιρικότητας στις ημισυνεχείς δομές εισάγει σφάλμα στην μέτρηση (Nastiti et al., 2017).

ζ – Δυναμικό

Το ζ – δυναμικό ή δυναμικό επιφανείας είναι το ηλεκτρικό φορτίο στην επιφάνεια των σταγονιδίων και είναι δείκτης της σχετικής άπωσης μεταξύ τους κατά την τυχαία κίνησή τους και της φυσικής σταθερότητάς τους στο χρόνο. Σε ένα σταθερό σύστημα με καλή πρόβλεψη οφείλει να εμφανίζει υψηλές κατ' απόλυτη τιμή μετρήσεις. Το πρόσημο του εξαρτάται από τη φύση των επιφανειοδραστικών και το ιοντικό φορτίο της υδατικής φάσης (Nastiti et al., 2017).

5.4.2. Ηλεκτρική αγωγιμότητα

Η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της εξωτερικής φάσης του μικρογαλακτώματος και άρα του τύπου του. Ένα μικρογαλάκτωμα λ/ν θα εμφανίζει υψηλές τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ενώ ένα ν/λ χαμηλές. Τα μικρογαλακτώματα κατά Winsor III ή IV θα εμφανίζουν ενδιάμεσες τιμές (Moulik & Paul, 1998).

5.4.3. FT – NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και οι μετατροπές του φάσματος κατά Fourier χρησιμοποιούνται στον χαρακτηρισμό των μικρογαλακτωμάτων για να διαπιστωθεί ο τύπος κατά Winsor και η ρευστότητα των δυναμικών μεμβρανών τους.

Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα μόρια των επιφανειοδραστικών στις μεμβράνες που σχηματίζουν αντικατοπτρίζεται στο φάσμα NMR των συστατικών τους, προκαλώντας συγκεκριμένες μετατοπίσεις (Kreilgaard, 2002).

Από το φάσμα αυτό προκύπτει η σταθερά διάχυσης για κάθε φάση του μικρογαλακτώματος. Η εκάστοτε εξωτερική φάση διαχέεται στη μάζα του δείγματος περισσότερο ελεύθερα σε σχέση με την διεσπαρμένη. Άρα σε ένα λ/ν μικρογαλάκτωμα θα έχουμε σταθερά διάχυσης για τα συστατικά της υδατικής φάσης μεγαλύτερη από αυτών της λιπαρής και αντίστροφα σε ένα μικρογαλάκτωμα ν/λ. Σε ημισυνεχείς δομές μικρογαλακτώματος οι δύο σταθερές θα είναι περίπου ίσες και μικρότερη τους αυτή για τα μόρια του επιφανειοδραστικού, που βρίσκεται συζευγμένο στις διπλοστοιβάδες (Lindman & Stubenrauch, 2009).

5.4.4. Απεικονιστικές Τεχνικές

Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη απεικονιστική τεχνική για την διάκριση του τύπου των μικρογαλακτωμάτων και του μεγέθους των σταγονιδίων τους είναι η μικροσκοπία ηλεκτρονιακής εκπομπής συζευγμένη με σύστημα άμεσης ψύξης (CRYO – TEM) (Tadros, 2013).

Η τεχνική αυτή επιτρέπει την άμεση παρατήρηση με υψηλή ανάλυση δομών μικρότερων των 100nm (Nastiti et al., 2017).

5.5. Εφαρμογές

Χρησιμοποιούνται πλέον όλο και περισσότερο στην βιομηχανία καυσίμων, για τον καθαρισμό πρωτογενών καυσίμων από μέταλλα και ρύπους, αλλά και για τον εμπλουτισμό τους με συστήματα που αυξάνουν την απόδοση τους και μειώνουν τους περιβαλλοντικούς ρύπους (Lindman & Stubenrauch, 2009).

Ακόμη χρησιμοποιούνται στην απορρύπανση του περιβάλλοντος από περιβαλλοντικές καταστροφές, όπως διαφυγή καυσίμων στη θάλασσα, καθαρισμό υδάτινων πόρων και αντικατάσταση των τοξικών απορρυπαντικών παραγόντων για κατάλοιπα χημικών όπλων (Fanun, 2009).

Η ικανότητα θερμοδυναμικά σταθερής ενσωμάτωσης μίας οργανικής φάσης σε μία υδατική επιτρέπει την χρήση των μικρογαλακτωμάτων ως βιοτεχνολογικούς μικροαντιδραστήρες, όπου η μία φάση περιλαμβάνει τα ένζυμα και είναι ο κύριος χώρος της αντίδρασης, ενώ η άλλη λειτουργεί σαν πάροχος αντιδραστηρίων. Με παρόμοιο τρόπο χρησιμοποιούνται και σαν υπόστρωμα παρασκευής μεταλλικών νανοσωματιδίων (McClements & Rao, 2011).

Αυξανόμενη είναι και η ενσωμάτωση τους σε λειτουργικά τρόφιμα, για εμπλουτισμό της θρεπτικής τους αξίας σε μακροθρεπτικα συστατικά, υδρόφιλα αλλά και λιπόφιλα, όπως βιταμίνες, ω – 3 λιπαρά οξέα και συζευγμένο λινολεϊκό οξύ. Ακόμη μπορούν να βελτιώσουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από τα τρόφιμα, προλαμβάνοντας την διάσπαση τους στον εντερικό αυλό νωρίτερα από το σημείο απορρόφησής τους (McClements & Rao, 2011). Το χαμηλό ιξώδες τους και η διαύγειά τους τα καθιστά κατάλληλα για χρήση σε τρόφιμα με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλά και για την βελτίωση τους (Dragicevic & Maibach, 2016).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σε τρόφιμα, επαυξάνουν την ανάγκη ενσωμάτωσης τους στην φαρμακευτική βιομηχανία. Η πληθώρα εφαρμογών τους τα τελευταία χρόνια βασίζεται στα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν, όπως φαίνονται στην παράγραφο *4.1.1 Χαρακτηριστικά Μικρογαλακτωμάτων*

Οι κυριότερες εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων στην φαρμακευτική και την κοσμητολογία περιλαμβάνουν:

- Θεραπεία μελανώματος (Bhattacharya et al., 2011)
- Per os χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτικά όπως ή κουρκουμίνη και η ρεσβερατρόλη (Juškaite et al., 2015a)
- Τοπική χορήγηση αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως δικλοφενάκη, πιροξικάμη, ινδομεθακίνη, ιπουμπροφαίνη, ναπροξένη, κετοπροφένη, μελοξικάμη και λορνοξικάμη (Nastiti et al., 2017)

- Διαυγείς φορείς με καλύτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και αποτελεσματικότερη τοπική δράση για αντιηλιακά φίλτρα (Dragicevic & Maibach, 2017a)
- Τοπική χορήγηση αρκοβικού οξέος, λυκοπένιου, αρβουτίνης, α – τοκοφερόλης και Q10, δραστικά συστατικά ευαίσθητα στην οξείδωση, με χαμηλή τοπική βιοδιαθεσιμότητα μέχρι τώρα (Donnely & Singh, 2015), (Sintov & Shapiro, 2004)
- Τοπική χορήγηση ανταπαλένης για τη θεραπεία της ακμής με στόχο την αύξηση τοπικής βιοδιαθεσιμότητας (Lauterbach & Müller-Goymann, 2014)

6. ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

6.1. Προέλευση της Ρεσβερατρόλης

Η Ρεσβερατρόλη (3,5,4′-trihydroxystilbene) είναι μία πολυφαινόλη που ανήκει στην χημική οικογένεια των στιλβενίων. Η χημική αυτή ένωση απομονώθηκε αρχικά από τις ρίζες του φυτού Polygonum cuspidatum, Polygonaceae, ένα φυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στην Κινέζικη και Ιαπωνική παραδοσιακή ιατρική. Τα στιλβένια όπως η ρεσβερατρόλη, αποτελούν μία κατηγορία φυτοαλεξινών (phytoalexins) που επιτελούν προστατευτικό ρόλο στα φυτά από εξωτερικούς κινδύνους όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και παθογόνοι μικροοργανισμοί (H. Y. Tsai et al., 2017a).

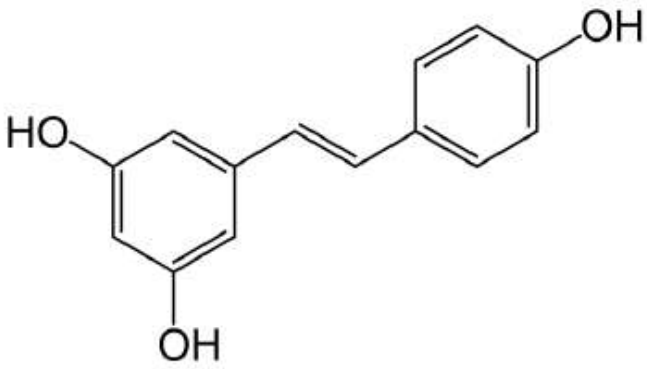
Απαντάται σε μία ευρεία ποικιλία διατροφικών πηγών, όπως είναι τα σταφύλια, τα μούρα, τα φυστίκια, το κρασί, καθώς και σε πολλά φαρμακευτικά φυτά. έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή και ενδιαφέρον. Βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο περικάρπιο των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων, σε περιεκτικότητα 50-100 μg/g, ενώ στο κόκκινο κρασί μπορεί να φτάσει συγκεντρώσεις 1,5-3 mg/L Απαντάται ακόμη στα φύλλα του ευκαλύπτου και του έλατου, σε ξηρούς καρπούς και σε 70 ακόμη φυσικά προϊόντα (Neves et al., 2012).

Είναι ένα πολλά υποσχόμενο φυτο - αντιοξειδωτικό μόριο, με όλο και περισσότερες αναφορές τις τελευταίες δεκαετίες, λόγω των πολλών βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων που φαίνεται να έχει (Pezzuto, 2019).

6.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

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

Συντακτικός τύπος:



CAS Registry: 501-36-0

Εικόνα Α 62. Η χημική ονομασία, ο χημικός τύπος και ο σειριακός αριθμός της ρεσβερατρόλης (Αριτζίδου, 2018)

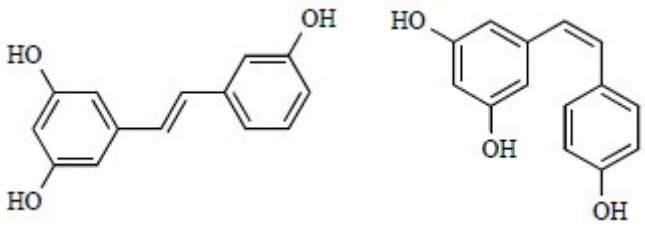
Η ρεσβερατρόλη είναι στερεή, υπόλευκη σκόνη με μοριακό βάρος 228.25 (g/mol) που γρήγορα αποκτά υποκίτρινο προς καφέ χρώμα υπό την επίδραση του ηλιακού φωτός. Εμφανίζει σημείο τήξης ανάμεσα στους 253-255° C. Η διαλυτότητα της στο ύδωρ είναι εξαιρετικά χαμηλή περίπου 0.03 mg/mL, γεγονός που την καθιστά πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (Vian et al., 2005). Ο δείκτης λιποφιλίας της LogP είναι 3,1, που την καθιστά μέτρια λιπόφιλη, αλλά καλά διαλυτή στην αιθανόλη (50mg/mL) και στο DMSO (16 mg/mL) (Amri et al., 2012a).

Παρά την χαμηλή υδατοδιαλυτότητά της φαίνεται να εμφανίζει υψηλή διαπερατότητα στις βιολογικές μεμβράνες, οπότε και κατατάσσεται ως φαρμακολογικά δραστική ουσία CLASS II σύμφωνα με το BCS (V. P. Shah & Amidon, 2014).

Το μόριο της ρεσβερατρόλης αποτελείται από δύο φαινολικούς δακτυλίους που συνδέονται με μία γέφυρα διπλού δεσμού. Απαντάται στη φύση σε δύο διαμορφώσεις, cis και trans.

Από τις δύο η trans- ρεσβερατρόλη φαίνεται να εμφανίζει πιο ισχυρή φαρμακολογική δράση, λόγω της μη επίπεδης δομής της στερεοχημικά (non – planar) (Vian et al., 2005).

Η trans ρεσβερατρόλη είναι εξαιρετικά φωτοευαίσθητη. Σε αιθανολικό διάλυμα , ύστερα από μία ώρα έκθεση στο ηλιακό φως, το 90 % ισομερίζεται προς τη μη δραστική cis – ρεσβερατρόλη. Προστατευμένη από το φως φαίνεται να παραμένει σταθερή για τουλάχιστον 28 ημέρες (Amri et al., 2012a).

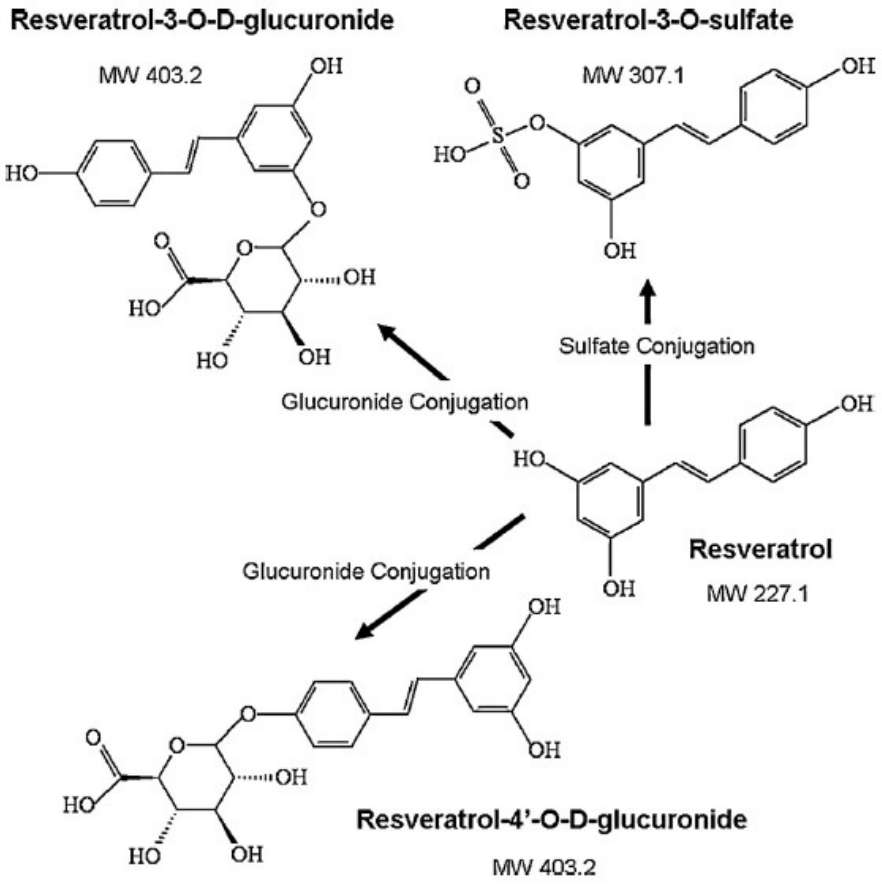


Εικόνα Α 63. Οι cis- και trans- διαμορφώσεις τις ρεσβερατρόλης (R. Neves et al., 2012).

6.3. Φαρμακοκινητική

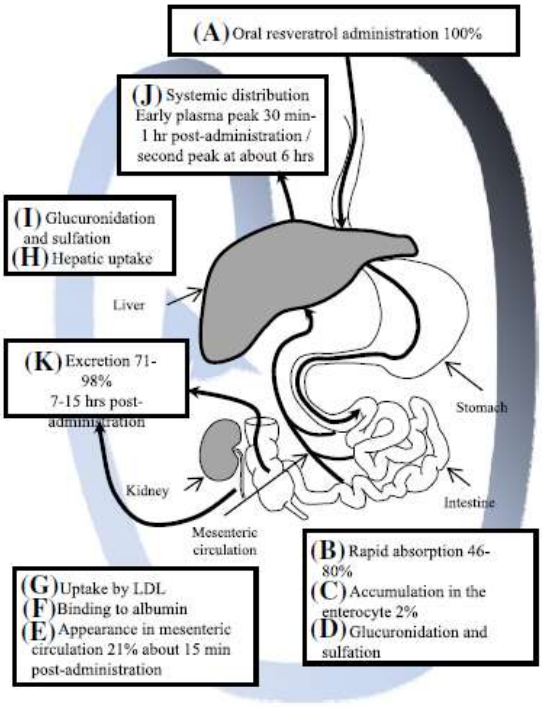
Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα κατά της per os χορήγηση (<1% της χορηγούμενης δόσης) οπότε και χαρακτηρίζεται από χαμηλή in vivo δραστικότητα. Στον άνθρωπο η Ρεσβερατρόλη απορροφάται ταχύτατα με τη μέγιστη συγκέντρωσή της στο πλάσμα να επιτυγχάνεται περίπου 30 λεπτά μετά την *per os* χορήγηση. Περίπου το 70-75% της απορρόφησης πραγματοποιείται μέσω μηχανισμών διάχυσης διαμέσου των επιθηλίων.

Για την χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα ευθύνεται το φαινόμενο πρώτης διόδου, ο άμεσος δηλαδή μεταβολισμός της από το ήπαρ πριν απορρόφηση της από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου Caco – 2. Τόσο κατά την πρώτη δίοδο όσο και κατά την ηπατική απορρόφηση ύστερα από την εντερική διέλευση, η γλυκουρονιδίωση και ή σουλφονιλίωση είναι οι κύριες μεταβολικές οδοί της ρεσβερατρόλης (Lou et al., 2014).



Εικόνα Α 64. Οι κύριες μεταβολικές οδοί της ρεσβερατρόλη στον άνθρωπο (Lou et al., 2014)

Για την χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα ευθύνονται επίσης ο μικρός χρόνος ημιζωής και η ευοξείδωτη φύση του μορίου της ρεσβερατρόλης, που οδηγούν σε ισομερίωση του μορίου πριν φτάσει στον ιστό στόχο. Παρακάτω φαίνεται η πλήρης διαδρομή της ρεσβερατρόλης στο ανθρώπινο σώμα (Amri et al., 2012b).



Εικόνα Α 65. Ο μεταβολισμός και η κατανομή της ρεσβερατρόλης κατά την per os χορήγηση (Amri et al., 2012a)

6.4. Φαρμακολογικές δράσεις

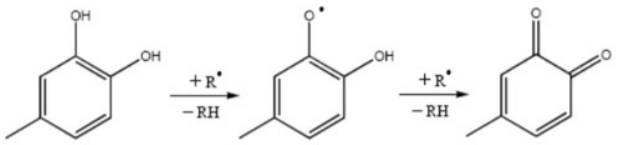
Η ρεσβερατρόλη οφείλει την ανακάλυψη της στο «Γαλλικό Παράδοξο», κατά το οποίο οι γάλλοι, παρά την παραδοσιακή δίατροφή τους πλούσια σε λιπαρά, εμφάνιζαν πολύ καλά επιδημιολογικά στοιχεία σε καρδιοπάθειες και υπερχοληστερολαιμία. Το φαινόμενο αυτό συσχετίστηκε με την αυξημένη κατανάλωση τους σε κρασί και ιδιαίτερα κόκκινο, και στην επακόλουθη αυξημένη πρόσληψη ρεσβερατρόλης (Dvorakova & Landa, 2017).

Η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί τόσο In vitro όσο και In vivo για πληθώρα φαρμακολογικών δράσεων όπως αντικαρκινική και αντικαρκινογόνος, αντιγηραντική, λευκαντική και επουλωτική του δέρματος, οιστρογονική και καρδιοπροστατευτική (Li et al., 2014). Οι περισσότερες από τις φαρμακολογικές της δράσεις οφείλονται στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση του μορίου της trans – ρεσβερατρόλης (Pezzuto, 2019).

6.4.1. Αντιοξειδωτική δράση

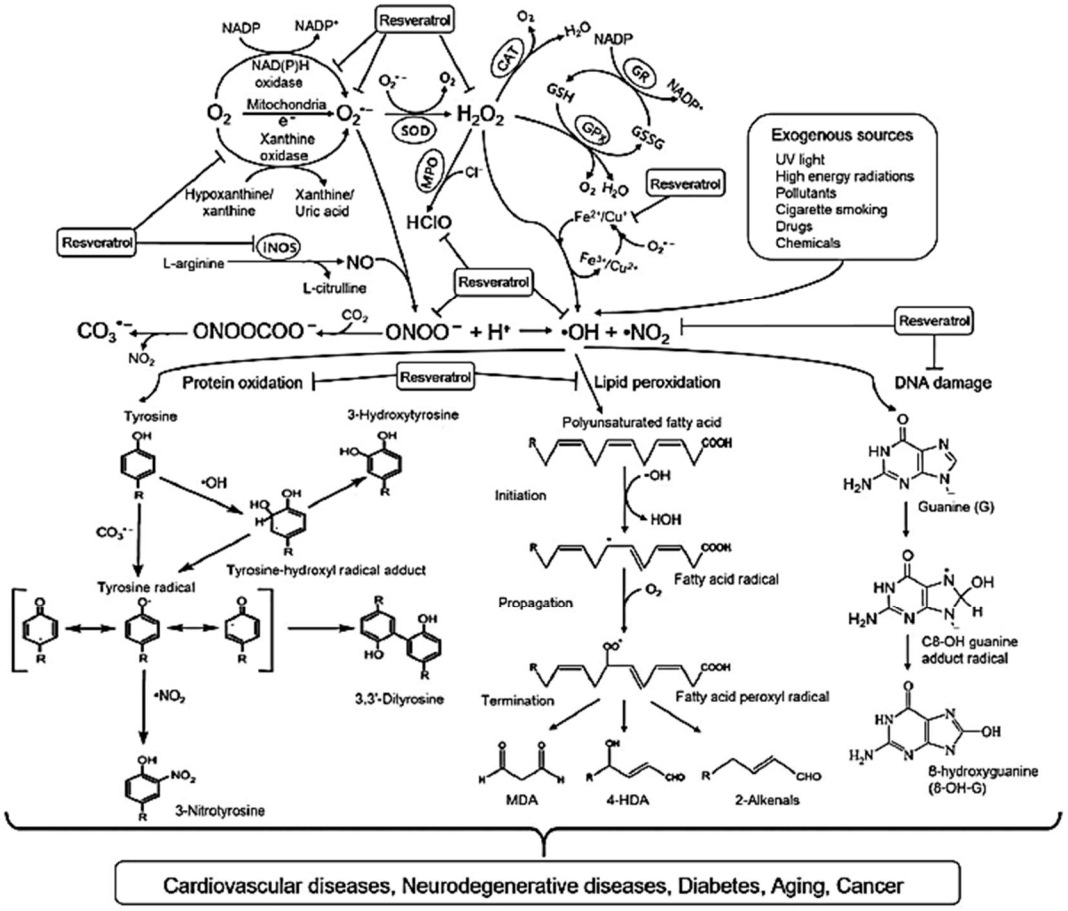
Η ρεσβερατρόλη χάρη στα φαινολικά υδροξύλια που φέρει στις θέσεις 3,4 και 5 και τον διπλό δεσμό στην συνδετική γέφυρα είναι καλός δέκτης ηλεκτρονίων και μπορεί και σχηματίζει δομές συντονισμού και μη δραστικές κινόνες, απενεργοποιώντας τα. Αυτό την καθιστά ένα εξαιρετικό απενεργοποιητή πρό – οξειδωτικών μορίων , όπως οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species). Το υδροξύλιο στη θέση 4 φαίνεται να είναι πιο σημαντικό στην σάρωση ελευθέρων ριζών αλλά δρα πάντα σε συνέργεια με τα άλλα δύο. Τα υδροξύλια στις θέσεις 3 και

5 δρουν αντιοξειδωτικά σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα με προοξειδωτικά σιδήρου και χαλκού που συμμετέχουν στις αντιδράσεις δημιουργίας ελευθέρων ριζών Fenton (Truong et al., 2018).



Εικόνα Α 66. Η ρεσβερατρόλη αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες προς αδρανείς κινόνες και σταματά την αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης (Αριτζίδου, 2018)

Η ρεσβερατρόλη εμφανίζει και έμμεση αντιοξειδωτική δράση επάγοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf 2 και να επαυξάνει έτσι την έκφραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων που ρυθμίζονται από αυτόν, όπως η γλουταθειόνη (GSH) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η καταλάση, (CAT) και η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) (Trush et al., 1994), (Abbas et al., 2018).

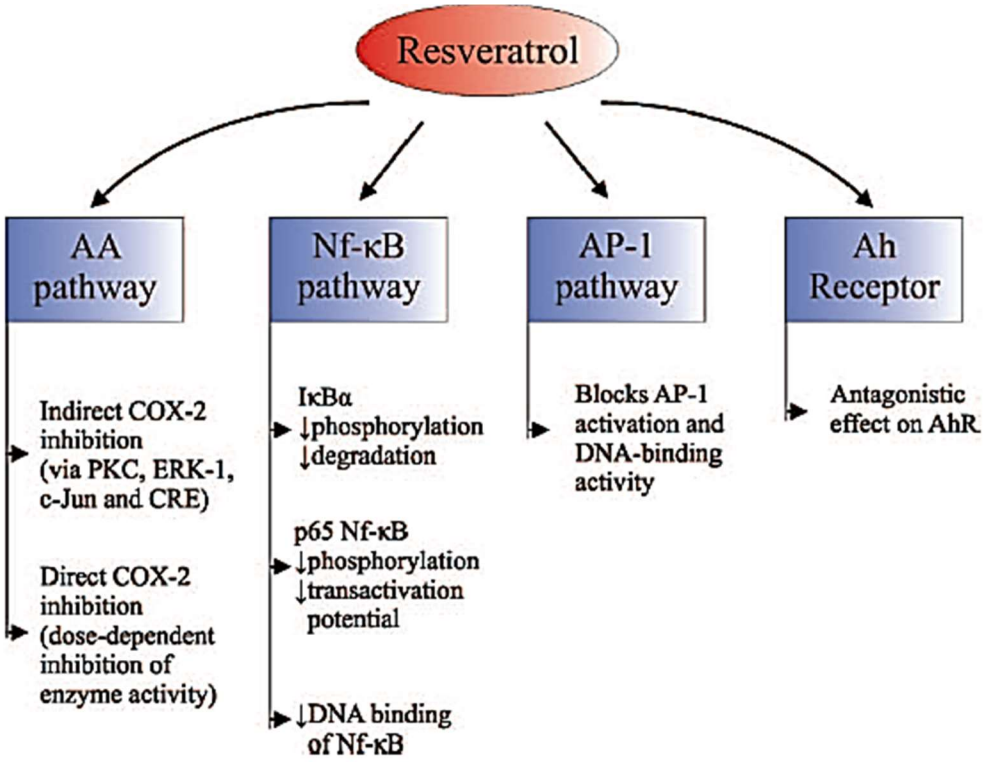


Εικόνα Α 67. Η ρεσβερατρόλη έχει πολλαπλή αντιοξειδωτική δράση και προστατεύει από παθήσεις σχετιζόμενες με αυτό (Truong et al., 2018)

6.4.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση οφείλεται αρχικά στην πρόληψη βλαβών από οξειδωτικό στρες και την υπεριώδη ακτινοβολία που μπορούν να οδηγήσουν σε εγκαθίδρυση οξείας και χρόνιας φλεγμονής (Truong et al., 2018).

Στην συνέχεια φαίνεται να δρα κατασταλτικά στην έκφραση ενζύμων που καθορίζουν την παραγωγή προφλεγμονωδών εικοσανοειδών όπως η κυκλοξυγενάση 1 και 2, η 5 – λιποξυγενάση και η iNOS. Επιδρά ακόμη ανασταλτικά στα μονοπάτια των μεταγραφικών παραγόντων Nfk- β και ο TNF- a (Švajger & Jeras, 2012), (Das & Das, 2007).



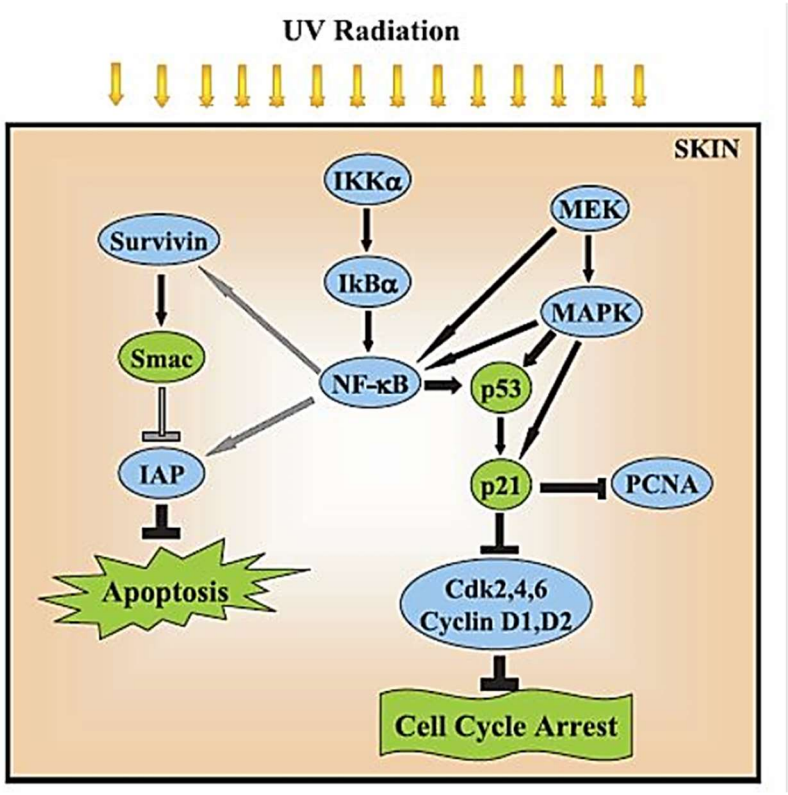
Εικόνα Α 68. Τα μονοπάτια της φλεγμονής που επηρεάζει η ρεσβερατρόλη (Švajger & Jeras, 2012)

6.4.3. Προστασία από την UV ακτινοβολία

Η ρεσβερατρόλη, χάρη στους φαινολικούς τους δακτυλίους απορροφά έντονα στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας και παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στο λ = 306nm. Μπορεί έτσι να απορροφήσει την της προσπίπτουσας υπεριώδους ακτινοβολίας σε έναν ιστό και να μην επιτρέψει την απορρόφηση της από δομές στις οποίες θα προκαλούσε βλάβη, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και άλλες δομικές πρωτεινες του οργανισμού (Sirerol et al., 2015).

Για την παραπάνω ιδιότητα της η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί ώς αντιηλιακό φίλτρο και ώς χημειοπροστατευτικό του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία (Baxter, 2008). Σε συνδυασμό με τις δράσεις της στα μονοπάτια της κυτταρικής γήρανσης, της φλεγμονής και της οξειδωτικής ισορροπίας, η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί in vivo και in vitro για την αντιγηραντική και

αντιφλεγμονώδη δράση της στο δέρμα και την επικουρική δράση στην πρόληψη και θεραπεία μελανώματος και άλλων καρκίνων του δέρματος (Ravikumar et al., 2019).

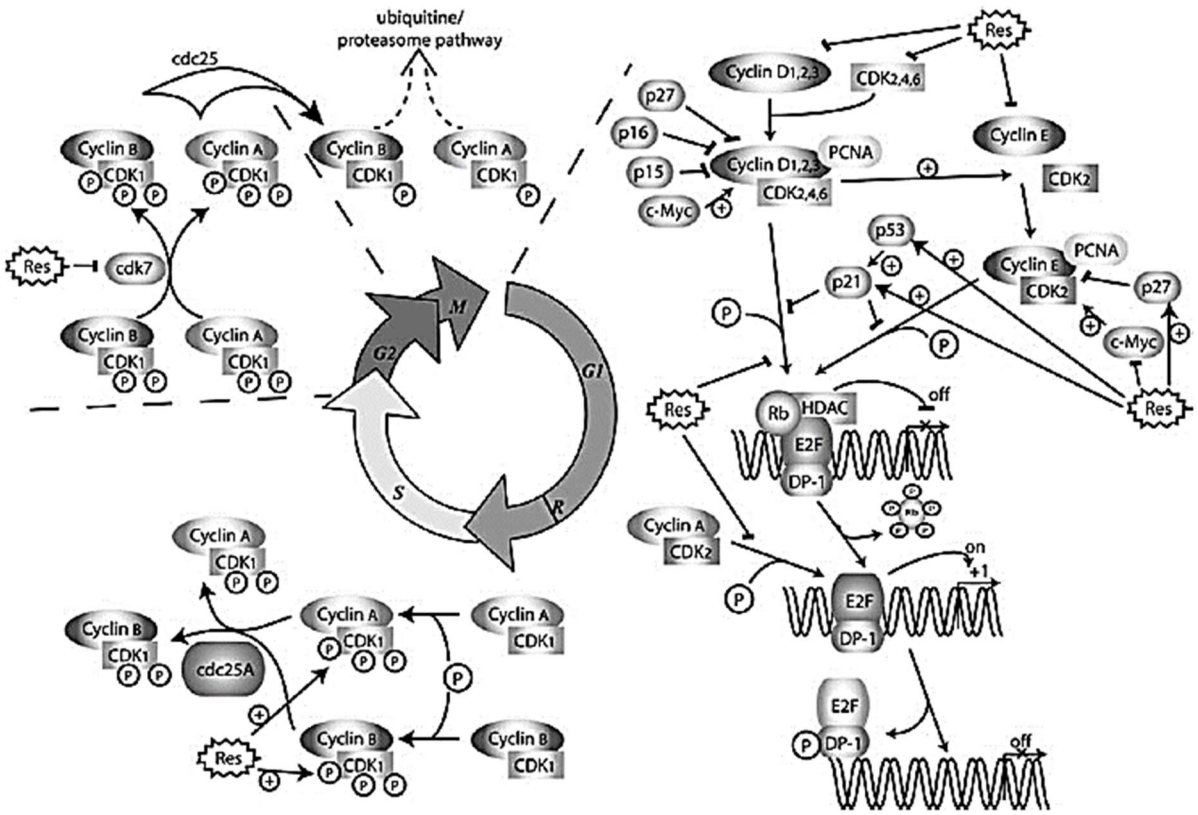


Εικόνα Α 69. Μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η ρεσβερατρόλη προστατεύει από την UV ακτινοβολία (Reagan-Shaw et al., 2008)

6.4.4. Αντικαρκινική δράση

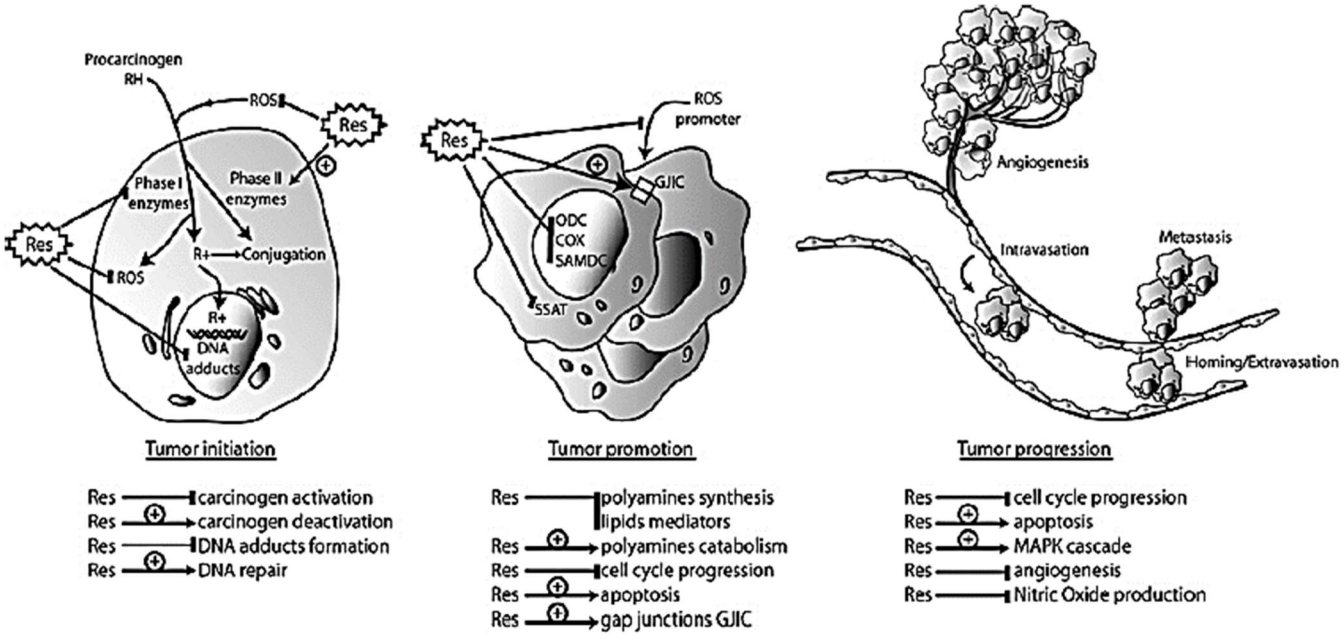
Έχει μελετηθεί σαν επικουρικός παράγοντας στην θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, του μαστού και του ορθού (H. Y. Tsai et al., 2017b). Ακόμη φαίνεται να έχει επικουρική δράση και στη θεραπεία του μελανώματος, καθυστερώντας την ανάπτυξη αντοχής του καρκινικού ιστού στη δοξορουβικίνη αλλά και αντικαρκινική δράση μειώνοντας την ταχύτητα αύξησης του μεγέθους του καρκινικού ιστού (Ravikumar et al., 2019).

Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να επηρεάζει πολλά στάδια της σηματοδότησης του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζοντας την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων όπως ογκοπρωτεΐνες, κυκλίνες και cdk κινάσες (Delmas et al., 2006).



Εικόνα Α 70. Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου στα οποία παρεμβαίνει η ρεσβερατρόλη (Delmas et al., 2006)

Ακόμη, εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με ρυθμιστικούς παράγοντες και στις τρείς φάσεις ανάπτυξης του καρκίνου στον οργανισμό, στην έναρξη του όγκου, την ανάπτυξη και την μετάσταση (Athar et al., 2007).

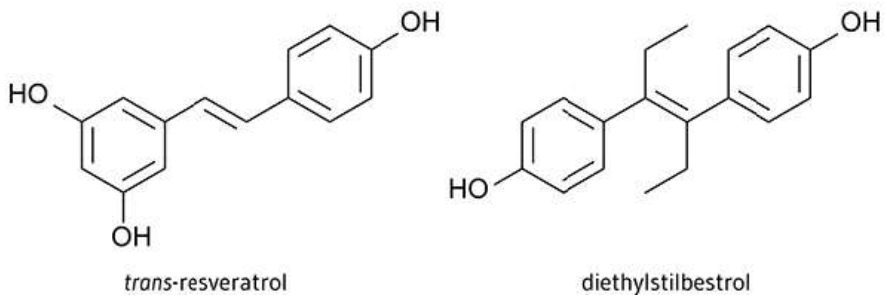


Εικόνα Α 71. Η ρεσβερατρόλη εμποδίζει τα τρία στάδια του καρκίνου, την έναρξη της ανάπτυξη και την διαφοροποίηση (Delmas et al., 2006)

6.4.5. Άλλες φαρμακολογικές δράσεις

Έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική της δράση στην ισχαιμία (Hung et al., 2008). Ακόμη έχει μελετηθεί η καρδιοπροστατευτική δράση της σαν αντιυπερλιπιδαιμικός παράγον και σαν αντιοξειδωτικό. Θετικά αποτελέσματα έδειξαν μελέτες που εξέτασαν ευεργετική δράση της ρεσβερατρόλης στην πορεία νευροεκφυλιστικών παθήσεων όπως το Alzheimer (Villaflores et al., 2012). Σημαντική φαίνεται να είναι και η αντιοξειδωτική της δράση στην θεραπεία αρθριτικών παθήσεων (Vitonyte et al., 2017).

Εμφανίζει σημαντική αντιγηραντική δράση καθώς ελέγχει την έκφραση των σιρτουϊνών και των μεταλοπρωτεϊνασών (Vastano et al., 2000). Εμφανίζει ακόμη σημαντική οιστρογονική δράση λόγω της δομικής ομοιότητάς της με την διαθυλστιλβεστρόλη (Hu et al., 2016).



Εικόνα Α 72. Η δομική ομοιότητα της ρεσβερατρόλης με την διαιθυλ - στιλβεστρόλη ευθύνεται για την οιστρογονική της δράση

Στο δέρμα έχει μελετηθεί ακόμη την επικουρική της δράση στην επούλωση ώς αντιοξειδωτικό και την δράση της ενάντια στο απλό ερπητοϊό ώς αντιμικροβιακός παράγοντας (Doppalapudi et al., 2017), (Valladeau, Saeland, Krug, Szöllősi, Oláh, Bíró, Tóth, Newton, Dixit, Murphree, Houben, De Paepe, Rogiers, Hadgraft, Valenta, Elias, Walters, Bouwstra, Ponec, Honeywell-Nguyen, Marjukka Suhonen, A. Bouwstra, Urtti, et al., 2017). Φαίνεται να εμπλέκεται και στη ρύθμιση του μονοπατιού της τυροσινάσης και της μελανινοσύνθεσης, οπότε και μελετήθηκε για την επικουρική της δράση στο μέλασμα και τη λεύκη (Das & Das, 2007).

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ – DESIGN OF EXPERIMENTS

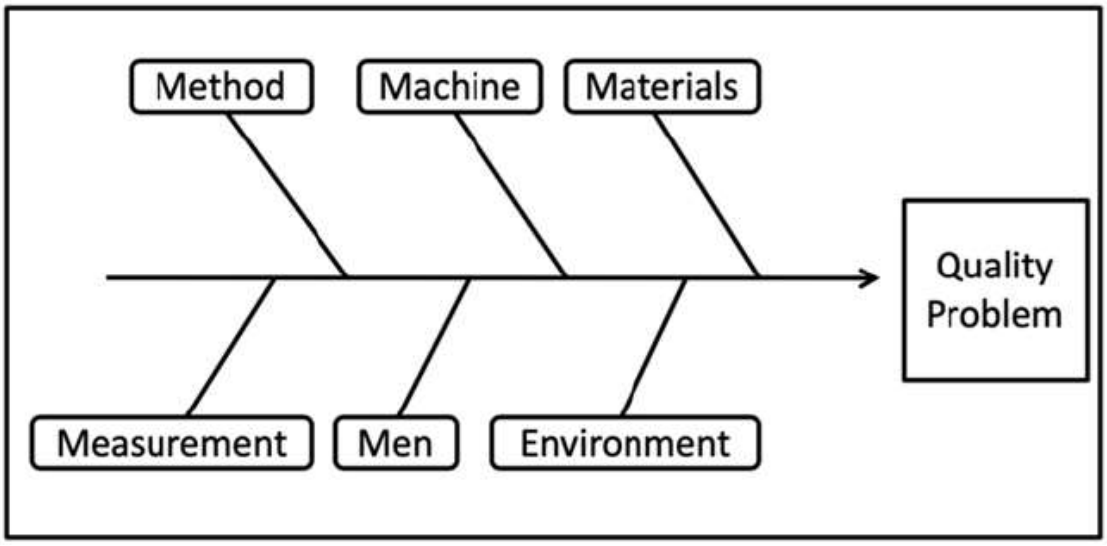
7.1. Η Ποιότητα στην Φαρμακευτική

Η ποιότητα ενός φαρμακευτικού και καλλυντικού προϊόντος πρέπει να είναι ενσωματωμένη στον σχεδιασμό του για να εξασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του για τον άνθρωπο.

Πρώτοι οι Deming, Shewhart και Juran μίλησαν για τη διεργασιοκεντρική προσέγγιση ως τον ορθολογικό τρόπο για την ενσωμάτωση της ποιότητας στα παραγόμενα προϊόντα ή τις προσφερόμενες υπηρεσίες.

Ο Juran πρώτος εισήγαγε την έννοια του σχεδιασμού στην επίτευξη της ποιότητας, ενώ παράλληλα πρότεινε μία διεργασία με πέντε βήματα. Αρχικά, αναγνωρίζεται ο τελικός χρήστης (end user) του προϊόντος, όπου στην περίπτωση των φαρμακευτικών προϊόντων είναι ο ασθενής. Έπειτα, προσδιορίζονται οι ανάγκες των ασθενών, οι οποίες με τη σειρά τους «μεταφράζονται» σε χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού προϊόντος. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η ανάπτυξη του προϊόντος και στο τέλος, πραγματοποιείται η βιομηχανική εφαρμογή της διεργασίας παραγωγής του (Politis et al., 2017).

Ο Deming μίλησε για την «Βαθιά Γνώση» της διεργασίας ώς τον τρόπο με τον οποίο μπορούμε να εξασφαλίζουμε την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος. Με την βοήθεια των εργασιών του δασκάλου του Shewhart, πάνω στην διαρκή βελτίωση στην διαρκή βελτίωση και το στατιστική έλεγχο των διεργασιών με τη χρήση των διαγραμμάτων ελέγχου, επεσήμανε πώς η ποιότητα ενός προϊόντος πρέπει να είναι σχεδιασμένη από πριν και να ενυπάρχει σε αυτό, καθώς δεν μπορεί να ελεγχθεί και να ενσωματωθεί εκ των υστέρων (Pyzdek, 2003).



Εικόνα Α 73. Τα πέντε Μ και ένα Ε χαρακτηριστικά ποιότητας της διεργασίας παραγωγής ενός προϊόντος με στόχο την ποιότητα, τοποθετημένα σε διάγραμμα ψαροκόκαλο ή Ishikawa, ενός από τους μεγαλύτερους μελετητές της ποιότητας (Σπανέας, 2019)

Οι νέες κανονιστικές αρχές στην φαρμακευτική ορίζουν πώς η ποιότητα μέσω ελέγχου (QbT, Quality by Testing) του τελικού προϊόντος είναι πλέον ανεπαρκής και κοστοβόρα πρακτική. Αντίθετα αναγνωρίζεται η αξία της ενσωμάτωσης της ποιότητας του τελικού προϊόντος μέσω του σχεδιασμού του (Quality by Design, QbD).

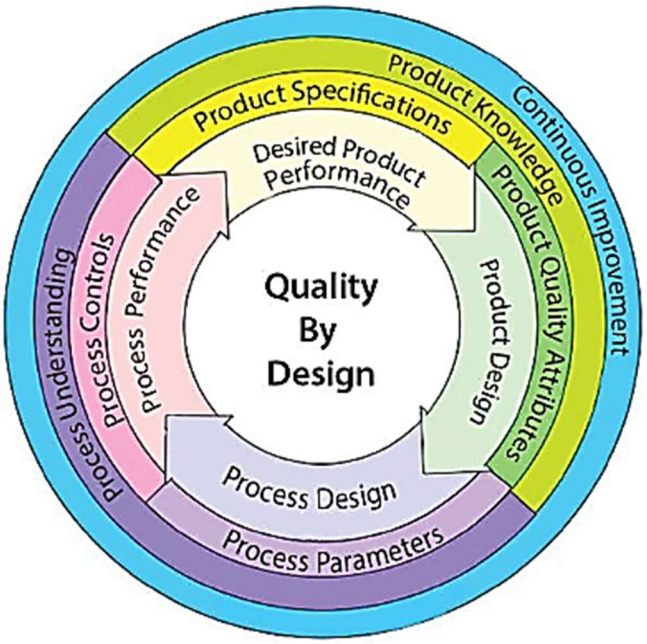
Ως Ποιότητα μέσω Σχεδιασμού ορίζεται η συστηματική προσέγγιση της ανάπτυξης, που ξεκινά με σαφείς και προκαθορισμένους στόχους, εστιάζει στη βαθιά γνώση των ιδιοτήτων του προϊόντος, της διεργασίας που το παράγει, καθώς και στον έλεγχο της τελευταίας, με βάση στέρεες επιστημονικές αρχές και γνώμονα την ορθή διαχείριση της διακινδύνευσης της ποιότητας (ICH Q8, 2009)

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα ορίζουν πώς η ποιότητα πρέπει να εξασφαλίζεται σε κάθε στάδιο της διεργασίας παραγωγής, προκειμένου το τελικό φαρμακευτικό προϊόν να πληρεί τις προκαθορισμένες προδιαγραφές του. Η κυρίαρχη αρχή αυτή διατυπώνεται τόσο στις κανονιστικές απαιτήσεις της ορθής βιομηχανικής παραγωγής (cGMPs) όσο και στα σύγχρονα φαρμακευτικά συστήματα ποιότητας (Pharmaceutical Quality Systems – PQS), των οποίων η υιοθέτηση ενθαρρύνεται τα τελευταία χρόνια από τον FDA (T. J. Moore et al., 2012).

Η γνώση για την εφαρμογή της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού για την ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων προκύπτει από τη συλλογή αξιόπιστων δεδομένων μέσω ορθολογικών, δηλαδή στατιστικά σχεδιασμένων, πειραμάτων για την επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας του τελικού προϊόντος. Προσδιορίζονται έτσι τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (Critical Quality Attributes – CQAs) του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος.

Έπειτα προσδιορίζονται οι κρίσιμοι παράγοντες της διεργασίας (Critical Process Parameters – CPPs) και οι κρίσιμες ιδιότητες των υλικών (Critical Material Attributes – CMAs) που έχουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο στα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος. Το επόμενο βήμα είναι η σύνδεσή τους με τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος, με στατιστικά σχεδιασμένα πειράματα, ώστε να διαμορφωθεί ο χώρος σχεδιασμού (Design Space), με βάση την αλληλεπίδραση των εισερχομένων και εξερχόμενων μεταβλητών (CMAs, CPPs) (ICH Q8, 2009).

Έτσι ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνιστά μια οργανωμένη μέθοδο προσδιορισμού της μαθηματικής σχέσης μεταξύ των εισερχόμενων και εξερχόμενων μιας διεργασίας με σκοπό την απόκτηση γνώσης σχετικά με αυτήν.



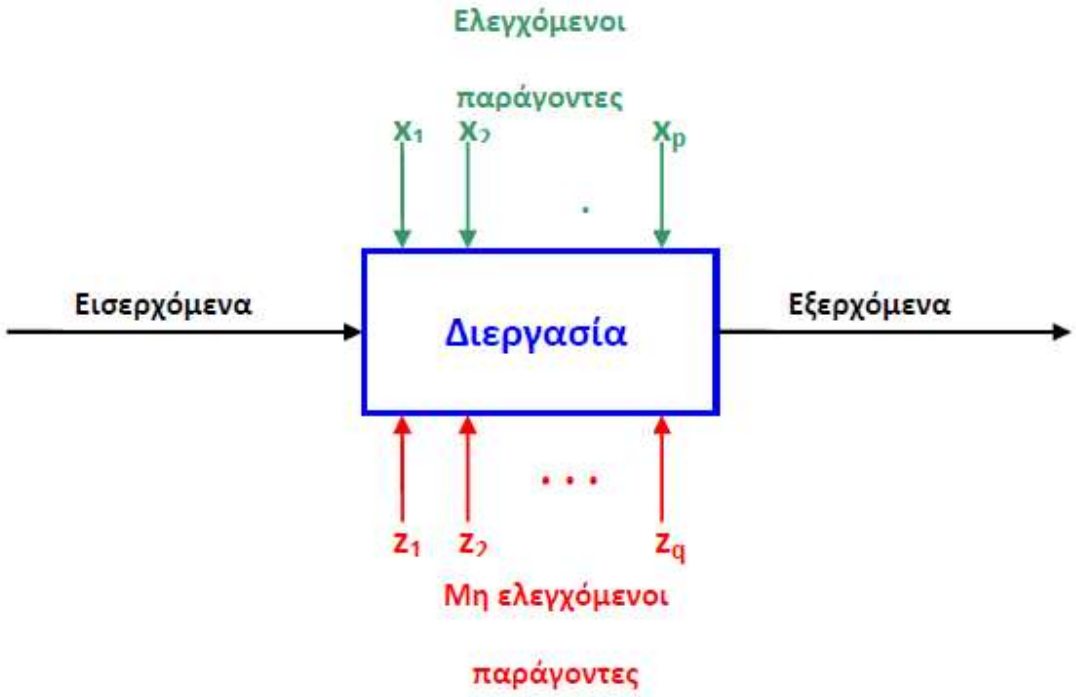
Εικόνα Α 74. Η ενσωμάτωση της ποιότητας στο προϊόν μέσω του σχεδιασμού (C. M. V. Moore, 2012)

7.2. Πειραματικός Σχεδιασμός – Design of Experiments

Ως Πειραματικός Σχεδιασμός (*Design of Experiments – DoE*) ορίζεται, η οργάνωση και ο σχεδιασμός πειραμάτων με τρόπο τέτοιο, ώστε να λαμβάνουμε με τον μικρότερο αριθμό πειραματικών δοκιμών, μέγιστο όγκο πληροφοριών που θα αναλυθούν και θα επιφέρουν έγκυρα και αμερόληπτα συμπεράσματα (Montgomery, 2013)

Ο Πειραματικός Σχεδιασμός αποτελεί μια στρατηγική ανάπτυξης ενός λεπτομερούς πειραματικού σχεδίου **πριν** την διεξαγωγή των πειραμάτων (Pyzdek, 2003).

Περιλαμβάνει σαφή ορισμό της πειραματικής μεθοδολογίας που θα ακολουθηθεί αλλά και της μεθόδου ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων. Ως στατιστικά σχεδιασμένο πείραμα ορίζεται μία ακολουθία δοκιμασιών που στοχεύουν στην εύρεση της αιτίας που συνδέει της εισερχόμενες – ανεξάρτητες μεταβλητές με την εξερχόμενες-εξαρτημένες μεταβλητές σε μία διεργασία. Η πειραματική μεθοδολογία περιγράφει τον τρόπο που θα μεταβληθεί κάθε εισερχόμενο και την μελέτη της μεταβολής που προκαλείται στην εξερχόμενη μεταβλητή. Στόχος είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του βαθμού στον οποίο κάθε εισερχόμενη μεταβλητή επηρεάζει τις εξερχόμενες μεταβλητές και την απόκριση της διεργασίας (Montgomery, 2013).



Εικόνα Α 75. Διεργασία και Μεταβλητές (Montgomery, 1997)

Βασικά εργαλεία του Πειραματικού Σχεδιασμού είναι το λογισμικό στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών δεδομένων και τα μαθηματικά μοντέλα που προκύπτουν από αυτό, με την αναπόσπαστη χρήση της υπάρχουσας τεχνολογίας. Με την βοήθεια των τελευταίων, έχοντας στην διάθεσή μας περιορισμένο όγκο πειραματικών δεδομένων, μπορούμε να προβλέψουμε την απόκριση άλλων πειραματικών συνδυασμών και συνθηκών.

Στόχος του πειραματικού σχεδιασμού δεν είναι να μειώσει την εργαστηριακή πρακτική του ερευνητή, αλλά να εμβαθύνει τις γνώσεις του για την διεργασία. Με αυτό τον τρόπο, ο ερευνητής, όσο καλύτερα γνωρίζει την διεργασία τόσο καλύτερα μπορεί να την ελέγξει και να την βελτιώσει (B. Singh et al., 2005).

Η επίδραση των ελεγχόμενων παραγόντων στα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού προϊόντος υπακούει στην αρχή Pareto, ή κανόνα 80:20, η οποία ορίζει πως περίπου το 20% των παραγόντων (εισερχόμενες μεταβλητές - αιτίες) επηρεάζει και διαμορφώνει το 80% περίπου του αποτελέσματος (εξερχόμενα- αποκρίσεις). Οι παράγοντες με την πιο σημαντική επίδραση στα εξερχόμενα ορίζονται στην οδηγία ICH Q8 ως κρίσιμοι παράγοντες της διεργασίας (Critical Process Parameters - CPPs), επειδή ακριβώς η μεταβλητότητά τους έχει σημαντική επίδραση στα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος. Αυτοί θα πρέπει να ελέγχονται και να παρακολουθούνται επαρκώς, ώστε να διασφαλίζεται η επιθυμητή ποιότητα, δηλαδή το σύνολο των χαρακτηριστικών του προϊόντος, οι τιμές των οποίων θα πρέπει να εμπίπτουν σταθερά εντός προκαθορισμένων ορίων που ονομάζονται προδιαγραφές (Politis et al., 2017).

7.3. Στόχοι του Πειραματικού Σχεδιασμού

Βασικοί στόχοι του Πειραματικού Σχεδιασμού είναι

- ο χαρακτηρισμός της διεργασίας
- η βελτιστοποίηση της

Ο χαρακτηρισμός της διεργασίας περιλαμβάνει την ανίχνευση και ταυτοποίηση των σημαντικών παραγόντων της διεργασίας και του τρόπου με τον οποίο επιδρούν στην απόκριση, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις του ερευνητή για την διεργασία(Screening Designs). Οι σχεδιασμοί αυτοί είναι συνήθως κλασματικοί και σπανιότερα πλήρεις παραγοντικοί, με τους πρώτους να προσφέρουν μειωμένη πληροφορία με μικρότερο αριθμό πειραμάτων, και τους δεύτερους να υπερτερούν στην ποιότητα της πληροφορίας, κοστίζοντας παραπάνω σε χρόνο και υλικά.

Η βελτιστοποίησή της περιλαμβάνει την ταυτοποίηση των τιμών των εξαρτημένων μεταβλητών που αντιστοιχούν στην βέλτιστη απόκριση της διεργασίας. Οι σχεδιασμοί αυτοί είναι τουλάχιστον τριών επιπέδων, ώστε να καθίσταται εφικτή η αναγνώριση συναρτήσεων δευτέρου η μεγαλύτερου βαθμού. Η μεθοδολογία των επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο υποστήριξης για τέτοιου είδους εφαρμογές.

Η βέλτιστη απόκριση ή βέλτιστο σημείο (Optimum) καθορίζεται από τα καθορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος , αλλά και από το απαιτούμενο αριθμό πειραμάτων και τους διαθέσιμους πόρους (ICH Q8, 2009), (Vanaja & Rani, 2007).

Με την επίτευξη των στόχων αυτών , ο Πειραματικός Σχεδιασμός επιτυγχάνει:

- την εύρεση των αιτίων μεταβλητότητας.
- τον διαχωρισμό των σημαντικών παραγόντων που θα πρέπει να ελεγχθούν από τους μη σημαντικούς παράγοντες της διεργασίας.
- τον καθορισμό του μαθηματικού μοντέλου που συνδέει της σημαντικές εισερχόμενες μεταβλητές με την απόκριση της διεργασίας.

Έτσι μορφοποιείται μία διεργασία σταθερή και ανθεκτική έναντι παραγόντων μεταβλητότητας (B. Singh et al., 2005)

7.4. Πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού

Έως και τα τελευταία χρόνια οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούσαν για την μορφοποίηση διεργασιών, την μέθοδο OVAT (One Variable At a Time) σύμφωνα με την οποία μεταβάλλεται μία μοναδική εισερχόμενη σε κάθε πειραματική δοκιμή, ενώ διατηρούνται όλες οι υπόλοιπες σταθερές. Σε πειραματικές συνθήκες κάτι τέτοιο είναι αδύνατο. Το βέλτιστο σημείο που προκύπτει από αυτή την τεχνική απέχει αρκετά από το πραγματικό βέλτιστο σημείο , καθώς αυτή η τεχνική δεν λαμβάνει υπόψη τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανεξάρτητων μεταβλητών, τις σύγχρονες μεταβολές παραπάνω από μίας μεταβλητών και το πειραματικό σφάλμα. Ακόμη, μικρός όγκος πληροφοριών προκύπτει από μεγάλο αριθμό πειραμάτων , γεγονός που την καθιστά χρονοβόρα και κοστοβόρα (Pyzdek, 2003).

Πρώτος ο Sir Ronald Fischer, το 1925 , μίλησε για στατιστικό σχεδιασμό πειραμάτων, θέτοντας τις βάσεις για τον Πειραματικό Σχεδιασμό. Ο Πειραματικός Σχεδιασμός υπερέχει της τεχνικής OVAT στα εξής σημεία :

- Επιτρέπει την συλλογή περισσότερων πληροφοριών με μικρότερο αριθμό πειραμάτων, σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με χρήση λιγότερων πόρων.
- Τα αποτελέσματα που εξάγονται δεν επηρεάζονται από την σειρά διεξαγωγής των πειραματικών δοκιμών , χάρη στην τυχαιοποίηση *(Randomization)*.
- Από μία απόκριση μπορούν να εκτιμηθούν παραπάνω από μία εισερχόμενες μεταβλητές. Διαφορετικοί παράγοντες διεργασίας μελετώνται ταυτόχρονα αλλά εκτιμώνται και υπολογίζονται ξεχωριστά.
- Το πειραματικό σφάλμα ποσοτικοποιείται και χρησιμοποιείται στον καθορισμό του επιπέδου εμπιστοσύνης στην στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων
- Αναγνωρίζονται οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες με το μεγαλύτερο αντίκτυπο στις εξερχόμενες μεταβλητές και οι αλληλεπιδράσεις τους. Με αυτές διαμορφώνεται ο Σχεδιαστικός Χώρος (Design Space), μέσω μαθηματικής συσχέτισης των CPs και CQAs και δύναται να προβλεφθεί η συμπεριφορά της διεργασίας εκτός του χώρου αυτού.
- Βελτιστοποιούνται ταυτόχρονα πολλές CQAs, μέσω της επιλογής κατάλληλων τιμών CPPs και διαμόρφωση του αποδεκτού έυρους τους (Proven acceptable Range, PAR), εντός του οποίου η διεργασία παράγει επαναλήψιμα προϊόν που θα ικανοποιεί τα κριτήρια ποιότητας του QTPP (Quality Target Product Profile)
- Στοχεύει την βελτιστοποίηση της διεργασίας, με την έγκαιρη ανίχνευση εξωκείμενων παρατηρήσεων, για την βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος της διεργασίας και την μορφοποίηση μίας διεργασίας ανθεκτικής στους παράγοντες μεταβλητότητας (Montgomery, 2013; B. Singh et al., 2005; Vanaja & Rani, 2007), (Politis et al., 2017).

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι ο Πειραματικός Σχεδιασμός είναι το άκρως κατάλληλο εργαλείο για να εξασφαλιστεί η ποιότητα των Φαρμακευτικών διεργασιών και των προϊόντων τους.

7.5. Τα επτά βήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού

Ο Πειραματικός Σχεδιασμός επιτυγχάνει τους στόχους του μέσα από επτά διακριτά βήματα σε όλες της τρείς φάσεις διεξαγωγής ενός **στατιστικά σχεδιασμένου πειράματος**. Οι τρείς φάσεις διεξαγωγής ενός πειράματος είναι (Montgomery, 2013):

- Φάση Σχεδιασμού

I. Ορισμός του QTPP και Διαχείριση της Διακινδύνευσης Ολικής Ποιότητας (Risk Assessment) (ICHQ9, 2014)

II. Διαλογή των παραγόντων (Screening). Εδώ είναι απαραίτητο να διασφαλισθεί ότι ο πειραματικός σχεδιασμός είναι εκτελέσιμος και στοχεύει στην αποτίμηση της αρχικής ιδέας που διαμορφώνεται ως QTPP.

III. Ανάπτυξη επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology). Εδώ γίνεται επιλογή του είδους του σχεδιασμού που εξυπηρετεί καλύτερα το σκοπό του QTPP και εξασφαλίζεται η τυχαιοποίηση των πειραμάτων και του αριθμού επαναλήψεων για τον ασφαλή προσδιορισμό του πειραματικού σφάλματος.

- Φάση Διεξαγωγής Πειραμάτων

IV. Μορφοποίηση και αξιολόγηση – Σύγκριση πειραματικών τιμών με αυτές της επιφάνειας απόκρισης (Formulation and Evaluation) και διάκριση των εξωξκείμενων παρατηρήσεων (Outliers). Εδώ γίνεται χρήση της στατιστικής επεξεργασίας ανάλυσης διασποράς (ANOVA), ενώ οι διάφοροι τύποι γραφημάτων χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των σημαντικών παραγόντων και των ενδεχόμενων αλληλεπιδράσεων τους. Με αυτόν τον τρόπο διαμορφώνεται η γνώση της υπό μελέτη διεργασίας.

V. Αναζήτηση Βέλτιστου σημείου – (Modeling, Search for Optimum)

- Φάση Ανάλυσης αποτελεσμάτων και Εξαγωγής Συμπερασμάτων

VI. Επικύρωση της μεθοδολογίας του Σχεδιασμού – (Validation) Αυτό γίνεται με σύγκριση των πειραματικών τιμών ενός τυχαίου σημείου του σχεδιαστικού χώρου, με τις τιμές που προκύπτουν από το μαθηματικό μοντέλο που προέκυψε.

VII. Μεταφορά σε μεγαλύτερη κλίμακα παραγωγής (Scale up)

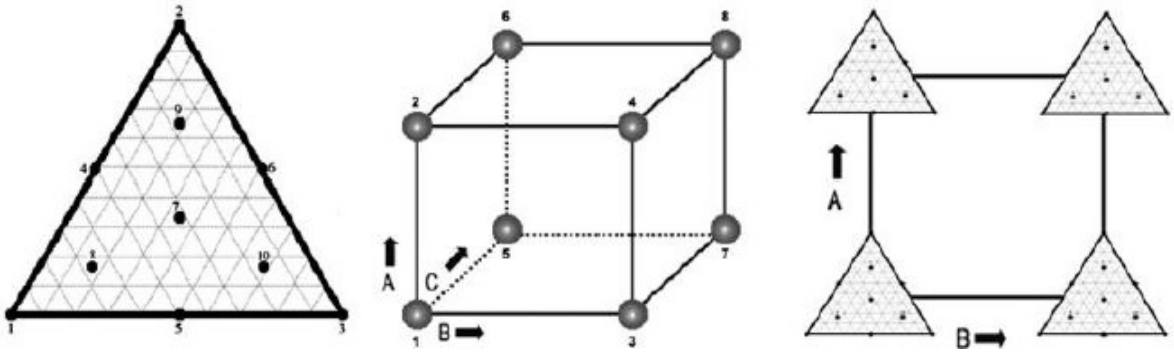
Τα παραπάνω βήματα για να αποφέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα του σχεδιασμού και της παραγωγής ενός ποιοτικού προϊόντος για τον άνθρωπο, προϋποθέτουν την διαμόρφωση κατάλληλου περιβάλλοντος με κεντρικό πυλώνα την στατιστική σκέψη και συνειδητή υποστήριξη του σχεδιασμού των πειραμάτων μέσα στο πλαίσιο λειτουργίας του .

Στην φαρμακευτική βιομηχανία αυτό καθίσταται δυνατό με την ενσωμάτωση κατάλληλου Φαρμακευτικού Συστήματος Ποιότητας (Pharmaceutical Quality System, PQS) με ενιαίο τρόπο, καθόλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Το σύστημα αυτό διασφαλίζει την σωστή λειτουργία του συστήματος διαχείρισης διακινδύνευσης της ποιότητας (ICHQ9, 2014) σε συνδυασμό με τη βαθιά γνώση της διεργασίας (ICH Q8, 2009).

7.6. Κατηγορίες Πειραματικού Σχεδιασμού

Οι Σχεδιασμοί χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- Σχεδιασμοί Διεργασιών (Process Designs)
- Σχεδιασμοί Συνταγών (Mixture Designs)
- Οι μεικτοί Σχεδιασμοί



Εικόνα Α 76. Οι τύποι του πειραματικού σχεδιασμού (Politis et al., 2017)

7.6.1. Σχεδιασμοί Διεργασιών

Πρόκειται για Σχεδιασμούς που εφαρμόζονται σε πειραματικές μελέτες βελτιστοποίησης διεργασιών.

Διακρίνονται οι εξής ιδιαίτερες μεθοδολογίες:

Σχεδιασμοί διαλογής παραγόντων (*Screening*) : Πρόκειται για μελέτες που πραγματοποιούνται στην πρώτη φάση του πειράματος, τη φάση του προγραμματισμού, με στόχο την ανίχνευση και ταυτοποίηση των σημαντικών παραγόντων της διεργασίας, και του τρόπου με τον οποίο επηρεάζουν την απόκριση, θετικά ή αρνητικά. ώστε αυτοί να μελετηθούν περαιτέρω ως προς την επίδραση τους στην μετρούμενη απόκριση (B. Singh et al., 2005). Οι μελέτες αυτές

βασίζονται στην αρχή Pareto, σύμφωνα με την οποία, μόνο το 20 % από όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν μία διεργασία , επηρεάζει το 80% της απόκρισης της.

Μελέτες επίδρασης παραγόντων (*Factor Influence Studies*) : πρόκειται για μελέτες που πραγματοποιούνται μετά την διαλογή των παραγόντων και έχουν στόχο την ποσοτικοποίηση της επιρροής των στατιστικά σημαντικών παραγόντων στην απόκριση της διεργασίας, και των αλληλεπιδράσεών τους. Μαζί με τις μελέτες διαλογής καλούνται Μελέτες Παραγόντων (*Factor Studies*) (Montgomery, 2013)

Μελέτες Βελτιστοποίησης *(Optimization methods)* : πρόκειται για μελέτες που αναζητούν τις τιμές και τα όρια των σημαντικών παραγόντων που αντιστοιχούν στο βέλτιστο σημείο, όπως αυτό έχει καθοριστεί από τον ερευνητή. Μπορεί να είναι είτε γραφικές μέθοδοι είτε αριθμητικές . Οι αριθμητικές μέθοδοι συνήθως χρησιμοποιούν μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης (RSM) που βασίζεται σε δευτεροβάθμιο ή τριτοβάθμιο μαθηματικό μοντέλο (B. Singh et al., 2005).

Οι σχεδιασμοί διεργασιών περιλαμβάνουν πολλά είδη σχεδιασμών :

- Factorial design – Παραγοντικοί σχεδιασμοί
- Fractional factorial design- κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί
- Plackett- Burman designs
- Star designs
- Central composite designs
- Center of gravity designs
- Equiradial designs
- Box-Behnken designs
- Taguchi designs
- Optimal designs
- Rechtschaffner designs
- Cotter designs

Το κάθε είδος εμφανίζει τα δικά του ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, ως προς την εξειδίκευση , τον αριθμό των πειραματικών δοκιμών, το πλήθος και τα επίπεδα των παραγόντων που μπορεί να αναλύσει, τον όγκο των πληροφοριών που μπορεί να αποδώσει, αλλά και την μελέτη στην οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

7.6.2. Σχεδιασμοί Μειγμάτων – Mixture Designs

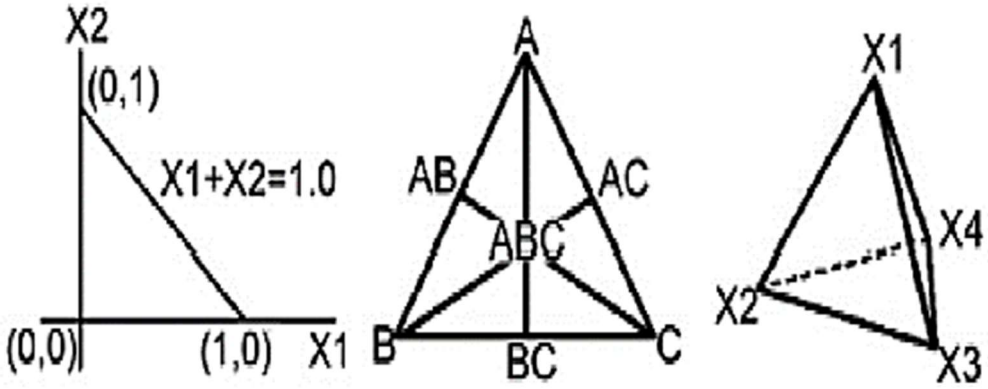
Πρόκειται για σχεδιασμούς που εφαρμόζονται σε μελέτες μορφοποίησης και βελτιστοποίησης συνταγών, δηλαδή των αναλογιών των διαφορετικών ενός προϊόντος. Ο σκοπός τους είναι ο εξορθολογισμός της χρήσης κάθε συστατικού και της αναλογίας του στη σύνθεση του προϊόντος (Piepel & Cornell, 1994). Αναφέρονται σε μίγματα με περισσότερες από 2 ανεξάρτητες μεταβλητές.

Οι σχεδιασμοί αυτοί χαρακτηρίζονται από τους εξής κοινούς περιορισμούς :

- Μία μεταβλητή μπορεί να πάρει τιμές από 0 έως και 1.
- Το άθροισμα των τιμών όλων των μεταβλητών είναι ίσο με την μονάδα

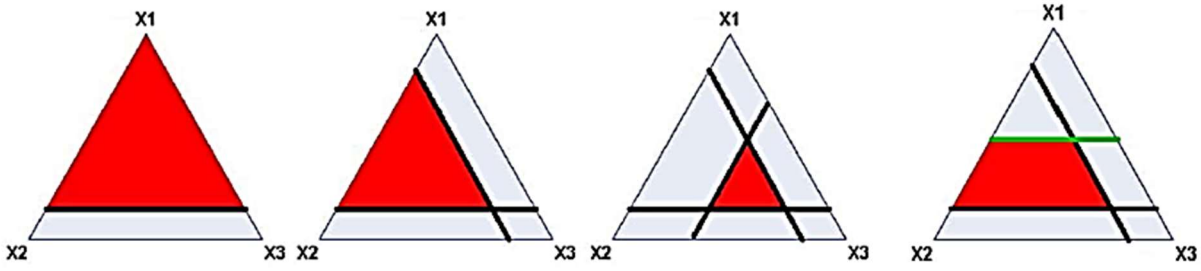
Οι μεταβλητές δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους καθώς η μεταβολή της μίας συνεπάγεται άμεση μεταβολή και των άλλων, ώστε το σύνολο τους να διατηρείται σταθερό.

Οι σχεδιασμοί Simplex είναι οι απλούστεροι και περιγράφουν μίγματα των οποίων οι αναλογίες κυμαίνονται μεταξύ του μηδενός και ενός μέγιστου ποσοστού συνήθως 100%. Στην παρακάτω Εικόνα Α42 παρουσιάζονται οι περιπτώσεις σχεδιασμών με δύο, τρία και τέσσερα συστατικά.



Εικόνα Α 77. Σχεδιασμοί Simplex για δύο, τρία και τέσσερα συστατικά (Σπανέας, 2019)

Στην περίπτωση που απαιτούνται κατώτατα όρια για ένα η περισσότερα συστατικά, ο χώρος σχεδιασμού διαμορφώνεται με κατάλληλα όρια. Στην περίπτωση που χρειαστεί ανώτατο όριο τουλάχιστον για ένα συστατικό, ο σχεδιασμός δεν είναι πλέον simplex, αλλά καθίσταται πιο σύνθετος και η κατασκευή και μελέτη του απαιτεί την υποστήριξη κατάλληλου αλγόριθμου (σχεδιασμοί optimal).



Εικόνα Α 78. Από αριστερά προς τα δεξιά, περιορισμένοι σχεδιασμοί simplex με ένα, δύο και τρία όρια, και Optimal σχεδιασμός μειγμάτων (Politis et al., 2017)

7.6.3. Παραγοντικοί Σχεδιασμοί – Factorial Designs

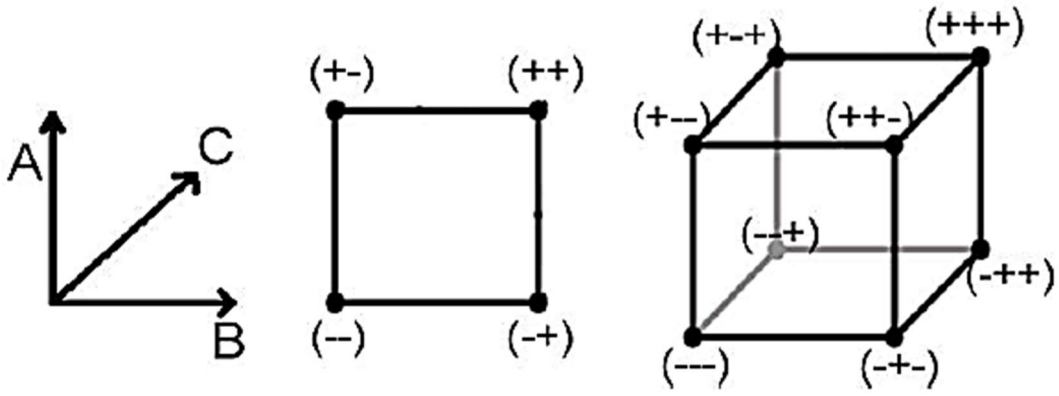
Παραγοντικοί ονομάζονται οι σχεδιασμοί όπου όλα τα επίπεδα ενός παράγοντα συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα **κάθε** άλλου παράγοντα. Συνήθως βασίζονται σε πρωτόφαγες μαθηματικό

μοντέλο. Παρέχουν την δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης όλων των παραγόντων που επηρεάζουν την διεργασία, ώστε να μελετηθεί η σχετική τους επίδραση στην απόκριση αλλά και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Διακρίνονται δύο είδη παραγοντικών σχεδιασμών , οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί (*Full Factorial Design- FD*) και οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί *(Fractional Factorial Design-fFD)*.

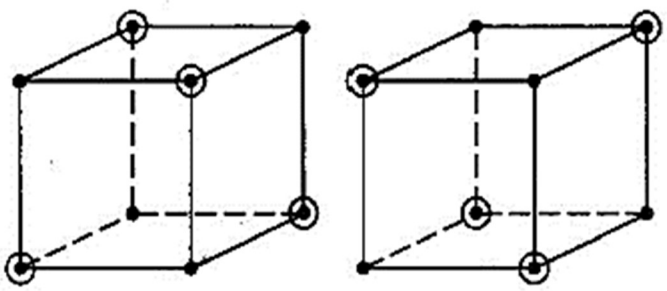
Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται συνήθως στην μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης και χαρακτηρίζονται από υψηλή ανάλυση και ορθογωνικότητα, η αλλιώς την ικανότητα μελέτης κάθε παράγοντα ξεχωριστά αλλά και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Περιλαμβάνουν την μελέτη όλων των παραγόντων σε διάφορα επίπεδα , μαζί με τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Ο συνολικός αριθμός πειραματικών δοκιμών προκύπτει από τον τύπο

$$\textbf{ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ} = \textbf{ΕΠΙΠΕΔΑ}^{\textbf{ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ}}.$$



Εικόνα Α 79. Σχηματική παράσταση πλήρων παραγοντικών σχεδιασμών όπου οι παράγοντες συμβολίζονται με γράμματα και τα επίπεδα τους με πρόσημο (Politis et al., 2017)

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί χρησιμοποιούνται συνήθως στις μεθοδολογίες Διαλογής παραγόντων καθώς έχουν μικρότερη αναλυτική ισχύ από τους πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς. Χρησιμοποιούνται ευρέως, όταν ο αριθμός των παραγόντων ξεπερνά τους 4-5, με σκοπό την επιλογή των πιο σημαντικών από αυτούς προς περαιτέρω διερεύνηση (screening designs).Αποτελούνται από ένα κλάσμα των πειραμάτων του πλήρους παραγοντικού σχεδιασμού από τον οποίο προέρχονται , οπότε και εμφανίζουν μικρότερο αριθμό πειραμάτων. Δεν μπορούν να μελετήσουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ παραγόντων, παρά μόνο τις κύριες επιδράσεις.



Εικόνα Α 80. Μισός κλασματικός Σχεδιασμός τεσσάρων παραγόντων σε δύο επίπεδα (Σπανέας, 2019)

Εάν το πλήθος το παραγόντων είναι όμοιο με αυτό των επιπέδων τους , τότε προκύπτει Συμμετρικός παραγοντικός σχεδιασμός. Σε διαφορετική περίπτωση προκύπτει ασύμμετρος *(asymmetrical)* παραγοντικός σχεδιασμός ή σχεδιασμός σε μικτά επίπεδα παραγόντων *(Mixed level designs)*. (B. Singh et al., 2005)

Ως κύρια επίδραση (Main effect) ενός παράγοντα ορίζεται η μέση αλλαγή πού παρατηρείται στην τιμή της απόκρισης, όταν ο παράγοντας αυτός μεταβαίνει από το χαμηλό στο υψηλό του επίπεδο. Δηλαδή, εκτιμάται ως η διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής της απόκρισης στο υψηλό επίπεδο του παράγοντα μείον τη μέση τιμή της απόκρισης με τον παράγοντα στο χαμηλό του επίπεδο. Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις, εκτός των κύριων αλληλεπιδράσεων, παρατηρούνται και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, οι οποίες πρέπει επίσης να μελετηθούν προσεκτικά. Η αλληλεπίδραση των παραγόντων Α και Β σημαίνει ότι η επίδραση του παράγοντα Α στην απόκριση είναι διαφορετική, όταν ο παράγοντας Β αλλάζει επίπεδο. Η αλληλεπίδραση υπολογίζεται ως το ήμισυ της διαφοράς της τιμής της απόκρισης του παράγοντα Α στο υψηλό και χαμηλό επίπεδο του Β.

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μορφοποίηση και βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης για χορήγηση από το δέρμα, με στόχο την αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας και της αντιφλεγμονώδους δράσης της, και η In Vitro και In Vivo αξιολόγησή του.

Η ρεσβερατρόλη, όπως αναλύεται στο *Κεφάλαιο 6*, είναι πολλά υποσχόμενο αντιοξειδωτικό μόριο, πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, με δυσκολίες στη μορφοποίηση και χαμηλή per os βιοδιαθεσιμότητα λόγω του εκτεταμένου μεταβολισμού και του μικρού χρόνου ημιζωής της. Το μοριακό βάρος (228.25 g/mol), και ο συντελεστής λιποφιλίας της ($\log P_{o/w}$ = 3.1), της επιτρέπουν να μορφοποιηθεί σε σκεύασμα τοπικής χρήσης, με στόχο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της.

Τα μικρογαλακτώματα, όπως αναλύεται στο *Κεφάλαιο 5*, διαθέτουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την ενσωμάτωση δυσδιάλυτων μορίων και την αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας τους. Η μορφοποίηση και βελτιστοποίηση του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης γίνεται με τη χρήση του προγράμματος Formulating for Efficacy και του Πειραματικού Σχεδιασμού, εργαλεία απαραίτητα για την ποιότητα και αποτελεσματικότητα του σκευάσματος.

Ερευνάται ο ρόλος του φορέα της ρεσβερατρόλης στην διαδερμική διαπερατότητα της και άρα στην βιοδιαθεσιμότητά της. Από αυτήν εξαρτάται η αποτελεσματική προστασία από το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή και τις βλάβες στα δομικά συστατικά του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά και η θεραπεία αυτών των επιδράσεων.

Η in vitro αξιολόγηση της διαπερατότητας του βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος γίνεται σε τεχνητή μεμβράνη StratM® και σε ανθρώπινη επιδερμίδα, σε σύγκριση με βελτιστοποιημένο πήκτωμα και γαλάκτωμα ρεσβερατρόλης που είχαν μελετηθεί τα προηγούμενα χρόνια στο εργαστήριο μας.

Η In Vivo αξιολόγηση της προληπτικής και θεραπευτικής δράσης του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης γίνεται σε σύγκριση με το πήκτωμα και το γαλάκτωμα ρεσβερατρόλης, σε μοντέλο φλεγμονής επαγόμενης από UV ακτινοβολία, σε άτριχους μύες τύπου SKH – 1.

C. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

8. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ

8.1. Υλικά

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Δερματοφαρμακολογία – Κοσμητολογία» χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πρώτες ύλες. Όλα τα υλικά ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού και γι' αυτό δεν χρειάστηκαν περαιτέρω επεξεργασία:

Δραστικό Συστατικό

- Resveratrol (Batch No: 18G25-H04-00726, Fagron, Greece)

Έκδοχα

- Macrogol 400 (Batch No: 18C20-H16-00203, Fagron, Greece)
- Cetyl Alcohol (Batch No: 17C22-H09-00122, Fagron, Greece)
- Phenoxyethanol (Batch No: 18B21-H05-00112, Fagron, Greece)
- Labrasol (Gattefosse, France)
- Isopropyl myristate (Lot: 17H01-B10-340281, Fagron, Greece)
- Liquid Satin Blend (Lot: 0008934694, Dow Corning, USA)
- Ethoxydiglycol (Batch No: 16G15-H01-00656, Fagron, Greece)
- BHT (Batch No: P1401865-000, Farmalabor, Italy)
- Gelot 64 (Batch No: 165240, France)
- Tefose 63 (Batch No: 157847, Gattefosse, France)
- EDTA (Batch No: 17D25-B08-341591, Fagron GmbH, Germany)
- Sepineo D.E.R.M. (Batch No: 80054N 160530011178, France)
- Sepineo P 600 (Batch No: 38406W 17011015660, France)
- Lipoid H 100-3 (Batch No: 511570-2150002-20/030, Lipoid GmbH, Germany)
- Γλυκερίνη (FAGRON, Greece)
- Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer (Aristoflex® AVC, CHEMCO, Greece)
- Tween 80 (Polysorbate 80, 14C24B07299420)
- Span 83 (Sorbitan Sesquioleate, 15C20B07, Fagron Hellas)
- Water deionized (Batch No: 19C06T10064843, Fagron Hellas)

Αντιδραστήρια και Διαλύτες

- Hydrochloric acid S.G. 1.18 ~ 37% (Lot: 1603524, Fischer Scientific, UK)
- Propylene Glycol (Batch No: 18C20-H03-00020, Fagron, Greece)

- Acetonitrile HPLC Gradient Grade (Lot: 1709890, Fischer Scientific UK)
- Water HPLC Gradient Grade (Lot: 1856602, Fischer Scientific UK)
- Methanol HPLC Gradient Grade (Lot: 1845285, Fischer Scientific, UK)
- Sodium Dihydrogen Phosphate Dihydrate G.R. (Batch No: PP/2011/00057 Lach Ner, Chzech Republic)
- Sodium Hydroxide Pearls G.R. (Batch No: PP/2017/12966, Lach Ner, Chzech Republic)

Μεμβράνη

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

8.2. Εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός ζυγός: Mettler Toledo AT261, Delta Range (Mettler, Switzerland)
- Υδατόλουτρο υπερήχων: Elmasonic S 100 H (Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
- Μαγνητικοί αναδευτήρες: Nuova II Stir Plate (Thermolyne, U.S.A.)
- Συσκευή φυγοκέντρησης: HERMLE Type Z 32 HK (Labortechnik GmhH Germany)
- Ομογενοποιητής: Virtis Tempest 302968 Blade-type Homogenizer (VirTis, USA)
- Vortex: Heidolph Reax top (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany)
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου: Finnpipette Digital (Thermo Scientific, Germany)
- Υάλινη Προχοϊδα, 50mL
- pHμετρο: Lab 860 (Schott® Instruments GmbH, Germany)
- Κλίβανος: WT binder (Binder, Germany)
- Κύτταρα διάχυσης: Τροποποιημένα κύτταρα Franz με όγκο 6.275 mL και διαθέσιμη επιφάνεια διάχυσης 0.636 cm^2 (Crown Glass, Somerville, U.S.A.)
- Θερμορρυθμιστής: Julabo (Seelbach, Germany).
- Υδατόλουτρο: Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany).
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης: Cimarec 3 (Thermolyne, U.S.A.)
- Malvern ZetasizerS
- Όργανο Φασματοσκοπίας Συσχετισμού Φωτονίων**:** Zetasizer Particle Size and Zeta Potential Analyzer 3000 (Malvern Instruments Ltd, UK)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό**:** Millipore
- Φίλτρα για τη συσκευή διήθησης υπό κενό Millipore**:** Durapore® Membrane filters, 0.45 μm HV
- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), που περιλαμβάνει**:**
  - Αντλία υψηλής πιέσεως Spectra System P1000 (Spectra Physics, U.S.A.)
  - Αυτόματο δειγματολήπτη (auto sampler) Spectra System AS1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)

- Στήλη, C18 Waters-Spherisorb ODS2 5.0μm, 250 × 4.6 mm (Bischoff, Germany)
- Φούρνος Στήλης: Eldex CH-150
- Ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού Spectra System 2000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή (Thermo Quest, Inc., U.S.A.)

Λογισμικά

- Formulating for Efficacy™, (JW Solutions, ACT Solutions Corp. 2016)
- Design Expert 11.0.0, Stat-Ease Inc. (Minneapolis, US.)
- Microsoft excel, Office 365, (Microsoft, US)
- Chromquest®, Version 5.1 (ThermoQuest, U.K.)
- Prism 8.4.3 (GraphPad, California)

9. ΜΕΘΟΔΟΙ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ

9.1. Επιλογή Εκδόχων

Ξεκινώντας από μορφοποίηση βελτιστοποιημένης κρέμας που μελετήθηκε το 2018 στο εργαστήριο μας (Σπανέας, 2019), με συνταγή :

ΦΑΣΗ Α	% w/w	ΦΑΣΗ Β	% w/w	ΦΑΣΗ Γ	% w/w	ΦΑΣΗ Δ	% w/w	ΦΑΣΗ Ε	% w/w
Gelot 64	4	**Water**	33.3	**Sepineo P 600**	2	**Phenoxy ethanol**	1	**RESV**	6
Tefose 63	4	**PEG 400**	28.3	**Sepineo DERM**	2.3	**Vitamin E**	1	**Transcutol P**	5
Labrasol	4	**EDTA**	0.1	**Satin Blend 3901**	5				
Cetyl Alcohol	2	**BHT**	0.01						
Isopropyl Myristate	2								

Πίνακας 2. Η συνταγή κρέμας ρεσβερατρόλης που επιλέχθηκε προς βελτιστοποίηση (Σπανέας, 2019)

Επιχειρήθηκε βελτιστοποίηση της λιπαρής φάσης. Για να μπορέσουν να μορφοποιηθούν σε μικρογαλάκτωμα χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα συστατικά που ήταν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου (25^{o}C):

- Labrasol
- Isopropyl Myristate
- Transcutol

Το Isopropyl Myristate δεν προχώρησε στην φάση της μορφοποίησης με το λογισμικό FFE, λόγω αναφορών ανάπτυξης τοξικότητας κατά την τοπική χορήγηση (Fitzgerald et al., 1968; Helman et al., 1986).

9.2. Μορφοποίηση με τη βοήθεια του λογισμικού Formulating for Efficacy

9.2.1. Επιλογή Ποσοτικής Σύστασης Λιπαρής Φάσης

Αρχικά ορίστηκε η επιθυμητή συγκέντρωση της ρεσβερατρόλης (RSV) σε 5 % w/w της συνολικής μορφοποίησης και η συνολική αναλογία της λιπαρής φάσης στην τελική μορφοποίηση σε 30% w/w.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν χειροκίνητα τα έκδοχα της λιπαρής φάσης και ζητήθηκε από το λογισμικό να βελτιστοποιήσει την αναλογία των συστατικών ως προς το δέρμα (Optimize to Skin).

Η αναλογία που προέκυψε αξιολογήθηκε με βάση τους δείκτες AFG, SFG. Ικανοποιητικές τιμές θεωρούνται οι όσο το δυνατόν μικρότερες, ενώ το πηλίκο τους θα πρέπει να τείνει στη μονάδα.

Τέλος αξιολογήθηκε η προτεινόμενη σύσταση με βάση τα αποτελέσματα της προσομοίωσης πειράματος διάχυσης που προσφέρει το λογισμικό, με κριτήριο την μεγιστοποίηση της αθροιστικής ποσότητας της RSV που εντοπίζεται στο διαμέρισμα του δέκτη (out) και την μεμβράνη διάχυσης (in), και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας RSV που παραμένει στο διαμέρισμα του δέκτη (on).

9.2.2. Επιλογή επιφανειοδραστικών

Μετά την μορφοποίηση της λιπαρής φάσης με το λογισμικό FFE, προστέθηκε ένα 5% w/w στην αναλογία της λιπαρής φάσης και ζητήθηκε από το λογισμικό να προσθέσει συστατικά στην μορφοποίηση με γνώμονα την βελτιστοποίηση ως προς το δέρμα και την αναμειξιμότητα μεταξύ των συστατικών. Επιλέχθηκαν τα επιφανειοδραστικά που ήταν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, ήταν αναμείξιμα με τα συστατικά της λιπαρής φάσης και απέδιδαν καλές τιμές στους δείκτες SFG, AFG , IN, ON, OUT.

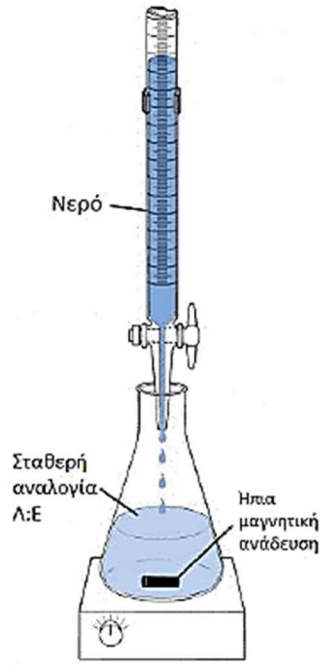
9.3. Διαγράμματα Τριών Φάσεων

9.3.1. Περιοχή ύπαρξης μικρογαλακτώματος

Τα διαγράμματα τριών φάσεων χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της περιοχής ύπαρξης του μικρογαλακτώματος και για την επιλογή του συστήματος γαλακτωματοποιητών.

Πρόκειται για τριγωνικά διαγράμματα όπου κάθε πλευρά τους αντιστοιχεί σε μία από τις τρείς φάσεις: λιπαρή φάση, σύστημα επιφανειοδραστικών και νερό. Κάθε σημείο της επιφάνειας τους αντιστοιχεί σε μοναδική αναλογία των τριών φάσεων. Κάθε σημείο έχει προκύψει από τιτλοδότηση μείγματος λιπαρής φάσης και επιφανειοδραστικού με στάγδην προσθήκη του νερού. Τα μείγματα προς τιτλοδότηση είχαν αναλογίες **λιπαρή φάση : σύστημα επιφανειοδραστικών** που μεταβάλλεται κατά 10%, δηλαδή 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 . Η περιοχή που

ορίζεται από αυτά τα σημεία είναι η περιοχή ύπαρξης του μικρογαλακτώματος (Juškaite et al., 2017).



Εικόνα C 1. Διάταξη τιτλοδότησης για κατασκευή διαγραμμάτων τριών φάσεων (Τζουανάκη, 2016)

9.3.2. Επιλογή συστήματος επιφανειοδραστικών

Κατασκευάστηκαν διαγράμματα τριών φάσεων για συστήματα επιφανειοδραστικών:

- Tween 80: Span 83 1:1
- Span 83

Επιλέχθηκε για την τελική μορφοποίηση το σύστημα που έδωσε την μεγαλύτερη επιφάνεια (περιοχή) ύπαρξης μικρογαλακτωμάτων (Juškaite et al., 2017).

9.4. Πειραματικός Σχεδιασμός Μιγμάτων

Για την εύρεση της βέλτιστης σύνθεσης μικρογαλακτώματος για την μεγιστοποίηση της διαδερμικής απορρόφησης της ρεσβερατρόλης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design Expert 11 για την εφαρμογή των αρχών του πειραματικού σχεδιασμού (Design of Experiments – DoE).

Επιλέχθηκε ο Σχεδιασμός Μιγμάτων, καθώς είναι σε συνέπεια με την τεχνική διερεύνησης της περιοχής ύπαρξης των μικρογαλακτωμάτων με τα διαγράμματα τριών φάσεων. Ξεκινώντας από το διάγραμμα που έδωσε την μεγαλύτερη περιοχή ύπαρξης μικρογαλακτωμάτων, ορίστηκαν ως παράγοντες του σχεδιασμού τα τρία συστήματα συστατικών, η λιπαρή φάση, το σύστημα των επιφανειοδραστικών και το νερό.

9.4.1. Περιορισμοί Σχεδιασμού

Επιλέχθηκε ο σχεδιασμός μιγμάτων I – Optimal, καθώς φαίνεται να μπορεί να πραγματοποιήσει προβλέψεις για τη βέλτιστη μορφοποίηση, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις πληροφορίες που προκύπτουν από τη διεξαγωγή των προτεινόμενων πειραμάτων.

Στη συνέχεια τέθηκαν οι εξής περιορισμοί:

Design Constraints

Mixture Coding: Actual

	Low Limit		Constraint		High Limit
	0.052	≤	A:OIL	≤	0.490
	0.010	≤	B:S	≤	0.167
	0.500	≤	C:W	≤	0.938
	0.826	≤	1.265 * A + 0.810 * C		
			A+B+C	=	**1.000**

Εικόνα C 2. Περιορισμοί Πειραματικού Σχεδιασμού Μίγματος

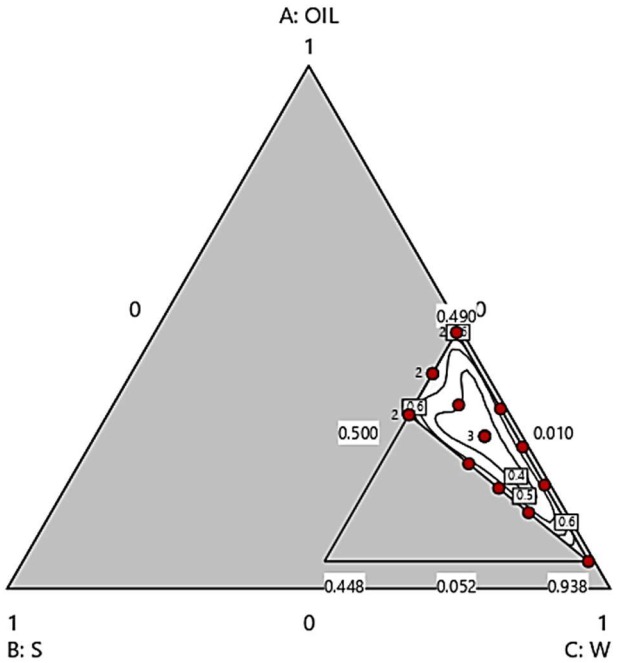
- Το αριστερό όριο της περιοχής που μελετήθηκε εκφράζεται ώς πολυώνυμο του ποσοστού του ελαίου και του νερού, όπως προέκυψε από την περιοχή ύπαρξης των μικρογαλακτωμάτων, στο διάγραμμα τριών φάσεων.
- Το κατώτατο όριο του **νερού** τέθηκε στο 50% w/w για να εξασφαλιστεί η αναλογία λιπαρής και υδατικής φάσης που θα δώσει μικρογαλάκτωμα λάδι σε νερό (o/w). Η επιλογή αυτή έγινε για την βελτιστοποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την μείωση τοξικότητας κατά τη χορήγηση από το δέρμα. Το ανώτατο όριο του νερού ήταν 93,5% όπως βρέθηκε από το διάγραμμα τριών φάσεων.
- Το ανώτατο όριο της **λιπαρής φάσης** τέθηκε στο 49% w/w για να εξασφαλιστεί ότι το μικρογαλάκτωμα θα είναι τύπου o/w, αλλά και για να αποφευχθούν φαινόμενα τοξικότητας στο δέρμα. Το Transcutol επιτρέπεται αν ενσωματωθεί σε σκευάσματα τοπικής χρήσης σε περιεκτικότητα έως και 20% w/w (Prasanthi & Lakshmi, 2012). Από τα αποτελέσματα του FFE προτείνεται να αποτελέσει το 24% w/w της λιπαρής φάσης. Έτσι αν η λιπαρή φάση είναι σε περιεκτικότητα μικρότερη η ίση με 49% w/w, η περιεκτικότητα του Transcutol στο τελικό προϊόν θα είναι μικρότερη ή ίση με 11,76% w/w. Το κατώτατο όριο της λιπαρής φάσης ορίστηκε στο 5,2% w/w, όπως προκύπτει από το διάγραμμα φάσεων.
- Το ανώτατο όριο του **συστήματος των επιφανειοδραστικών** ορίστηκε στο 16,7% w/w για αποφυγή τοξικότητας στο δέρμα, ενώ το κατώτατο ορίστηκε στο 1% w/w, όπως προκύπτει από το διάγραμμα φάσεων.

9.4.2. Μήτρα Πειραματικού Σχεδιασμού

Η επανάληψη του κεντρικού σημείου ορίστηκε στις τρείς επαναλήψεις και προέκυψε η παρακάτω μήτρα πειραμάτων: Πρώτα παρασκευάσθηκαν οι ακραίες συνταγές του πειραματικού σχεδιασμού για ελεγχθεί ότι σχηματίζεται γαλάκτωμα με τις οριακές τιμές των παραγόντων, και στη συνέχεια τα υπόλοιπα.

Run	Component 1 A:OIL	Componen... B:S	Component 3 C:W
1	0.29166	0.0624506	0.645889
2	0.411324	0.0886758	0.5
3	0.344111	0.01	0.645889
4	0.49	0.01	0.5
5	0.29166	0.0624506	0.645889
6	0.332648	0.167352	0.5
7	0.19249	0.0886758	0.718834
8	0.198221	0.01	0.791779
9	0.332648	0.167352	0.5
10	0.0523315	0.01	0.937668
11	0.29166	0.0624506	0.645889
12	0.239209	0.114901	0.645889
13	0.49	0.01	0.5
14	0.351492	0.0755632	0.572945
15	0.271166	0.01	0.718834
16	0.14577	0.0624506	0.791779
17	0.411324	0.0886758	0.5

Εικόνα C 3. Η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού Μίγματος Design-Expert® - DX 11)



Εικόνα C 4. Η επιφάνεια του πειραματικού χώρου που μελετήθηκε ύστερα από τους περιορισμού που τέθηκαν (Design-Expert® - DX 11)

9.4.3. Επιλογή αποκρίσεων

Στόχος της μορφοποίησης είναι η βελτιστοποίηση της διαδερμικής διαπερατότητας. Για το σκοπό αυτό τέθηκαν ώς σημαντικές αποκρίσεις η αθροιστική ποσότητα διαπέρασης της ρεσβερατρόλης από τεχνητή μεμβράνη STRAT – M ® στις 24 ώρες, το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης και η σταθερότητα σε χρονικό διάστημα 30 ημερών των μικρογαλακτωμάτων που προέκυψαν. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε η επί της εκατό ποσοστιαία αναλογία της δόσης που περιέχεται σε κάθε συνταγή που διαπέρασε την μεμβράνη στις 24 ώρες, καθώς δεν περιείχαν όλες οι συνταγές την ίδια δόση ρεσβερατρόλης, για να μπορέσει η σύγκριση της αποτελεσματικότητας του φορέα να γίνει επί ίσοις όροις.

Το μέγεθος των σταγονιδίων του μικρογαλακτώματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την διαπέραση καθώς όπως αναλύθηκε στο *Κεφάλαιο 3. Από του Δέρματος Χορήγηση*, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος των σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης τόσο πιο εύκολα διαπερνούν την κεράτινη στοιβάδα.

Η σταθερότητα καθώς είναι ποιοτικό μέγεθος, για να εκφραστεί αριθμητικά και να μπορέσει να ενσωματωθεί στο μοντέλο κωδικοποιήθηκε ως εξής:

- 0,1 = Ο συνταγές που είτε δεν έδωσαν μικρογαλάκτωμα με την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης, είτε άλλαξαν χρώμα μετά από την μέτρηση DLS, είτε άλλαξαν χρώμα ή έπαψαν να είναι διαυγή μετά από 30 ημέρες
- 0,5 = Τα μικρογαλακτώματα που ήταν διαυγή μόνο σε θερμοκρασία ≤ 25°C και σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες έπαιρναν γαλακτώδη αδιαφανή εμφάνιση. Το φαινόμενο αυτό ήταν αντιστρεπτό με ακόλουθη μείωση της θερμοκρασίας
- 1 = Τα μικρογαλακτώματα που παρέμειναν σταθερά σε χρώμα και διαύγεια καθόλη τη διάρκεια των 30 ημερών και σε όλες τις θερμοκρασίες

9.4.4. Βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των αποκρίσεων έγινε με Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) από το πρόγραμμα πειραματικού σχεδιασμού Design Expert ®.

Η εύρεση της σύνθεσης του μικρογαλακτώματος που αντιστοιχεί στη βέλτιστη διαδερμική διαπερατότητα έγινε με τη χρήση της αριθμητικής βελτιστοποίησης (Numerical Optimization). Σε αυτή την λειτουργία του λογισμικού τέθηκαν οι παρακάτω απαιτήσεις :

- Ελαχιστοποίηση Μεγέθους Σταγονιδίων
- Μεγιστοποίηση Αθροιστικής Διαπέρασης στο 24ωρο
- Μεγιστοποίηση επι τις εκατό Αθροιστικής Διαπέρασης στο 24ωρο
- Μεγιστοποίηση σταθερότητας στις 30 ημέρες

9.5. Μέθοδοι παρασκευής μικρογαλακτωμάτων, γαλακτώματος και πηκτώματος ρεσβερατρόλης

9.5.1. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων Placebo

Παρασκευάστηκαν τα μικρογαλακτώματα που ορίζει ο παραπάνω πίνακας αρχικά χωρίς προσθήκη δραστικού συστατικού (Placebo), για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα παρασκευής μικρογαλακτώματος σε αυτές τις αναλογίες κα στη συνέχεια να διαπιστωθεί η ικανότητα ενσωμάτωσης ρεσβερατρόλης σε συγκέντρωση ίση με τη διαλυτότητα κορεσμού. Όλες οι παρασκευές έγιναν με ζύγιση των υλικών και όχι με ογκομέτρηση.

Η παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων έγινε με τον εξής τρόπο:

i. Ζυγίζονται σε ποτήρι ζέσεως τα συστατικά της λιπαρής φάσης στην ορισμένη αναλογία
ii. Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για έξι (6) λεπτά στην ταχύτητα επτά (7), μέτριας ισχύος ανάδευση.
iii. Στο ίδιο ποτήρι ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα του συστήματος των επιφανειοδραστικών και ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 6 λεπτά σε ταχύτητα 7.
iv. Στο μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση προζυγισμένη ποσότητα απιονισμένου ύδατος. Η ανάδευση συνεχίζεται μέχρι το πέρας των 6 λεπτών.

Οι παραπάνω παρασκευές κρίθηκαν οπτικά ώς προς την διαύγεια και τη θολερότητά τους και βρέθηκαν όλες διαυγείς.

9.5.2. Παρασκευή Μικρογαλακτωμάτων ρεσβερατρόλης

Αφού προσδιορίστηκε η διαλυτότητα κορεσμού για κάθε συνταγή της μήτρας του πειραματικού σχεδιασμού, παρασκευάστηκαν μικρογαλακτώματα με συγκέντρωση ρεσβερατρόλης ίση με το 90 % της διαλυτότητας κορεσμού, για την αποφυγή φαινομένων καθίζησης. Στόχος είναι η μεγιστοποίηση της θερμοδυναμικής ενεργότητας της ρεσβερατρόλης στα παρασκευάσματα και η βελτιστοποίηση της διαδερμικής διαπερατότητας.

Η παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων ρεσβερατρόλης είναι όμοια με την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων Placebo, με τη διαφορά ότι εδώ προηγείται η ζύγιση της απαραίτητης ποσότητας ρεσβερατρόλης σε χαρτί ζύγισης και ποσοτική μεταφορά της στο ποτήρι ζέσεως που περιέχει την λιπαρή φάση ήδη αναμεμιγμένη με το σύστημα των επιφανειοδραστικών. Ακολουθεί ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 6 λεπτά ή έως ότου διαλυθεί πλήρως η ρεσβερατρόλη στο μείγμα. Στη συνέχεια προχωράμε στο **βήμα iv.**

Όλη η διεργασία γίνεται σε μαγνητικό αναδευτήρα σκιασμένο από το φως με σκοτεινόχρωμο χάρτινο κλωβό.

9.5.3. Παρασκευή γαλακτώματος ρεσβερατρόλης

Η συνταγή του γαλακτώματος ρεσβερατρόλης παρατίθεται στον *Πίνακα 1*. Το γαλάκτωμα ρεσβερατρόλης παρασκευάστηκε με την παρακάτω διεργασία:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται τα συστατικά της λιπαρής φάσης (ΦΑΣΗ Α), το οποίο τοποθετείται σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης. Ακολουθεί θέρμανση στους 70° C υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται τα συστατικά της υδατικής φάσης (ΦΑΣΗ Β), το οποίο τοποθετείται σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης. Ακολουθεί θέρμανση στους 70° C υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Όταν και οι δύο φάσεις έχουν φθάσει στη θερμοκρασία 70° C, η λιπαρή φάση προστίθεται στην υδατική και ακολουθεί ομογενοποίηση για 5 λεπτά. Στους 60° C προστίθεται το Sepineo P 600 και το Sepineo DERM (ΦΑΣΗ Γ) που είναι παράγοντες αύξησης του ιξώδους και σταθεροποιητές του γαλακτώματος. Στους 40° C προστίθεται η φαινοξυαιθανόλη (συντηρητικό), η βιταμίνη Ε (αντιοξειδωτική ουσία) και το Satin Blend 3901 (βελτιωτικό των ρεολογικών ιδιοτήτων). Η Ρεσβερατρόλη μπορεί να εισαχθεί είτε στην υδατική φάση είτε στη λιπαρή φάση είτε αφού έχει παραχθεί το γαλάκτωμα μέσω ενσωμάτωσης με την επιφανειοδραστική ουσία Transcutol P ((Σπανέας, 2019).

9.5.4. Παρασκευή πηκτώματος ρεσβερατρόλης

Το πήκτωμα ρεσβερατρόλης παρασκευάστηκε σύμφωνα με την παρακάτω συνταγή, με απευθείας ογκομέτρηση των αναλογιών των υγρών συστατικών με Transferpettor® 10mL, και προσθήκη τους σε φιαλίδιο. Στη συνέχεια αναδεύτηκαν τα συστατικά έως παραλαβής διαυγούς διαλύματος. Σε διαυγές διάλυμα προστέθηκε η ρεσβερατρόλη και ακολούθησε ανάδευση σε περιστρεφόμενο δίσκο εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 25°C όπου παρέμεινε 24 ώρες. Στη συνέχεια προστέθηκε ο παράγοντας σχηματισμού πηκτώματος (Aristoflex® AVC) στο φιαλίδιο το οποίο αφέθηκαν για επιπλέον ανάδευση για 24 ώρες προκειμένου να διασπαρεί πλήρως ο παράγοντας σχηματισμού πηκτώματος και να δημιουργηθεί το τελικό πήκτωμα.

Έκδοχο	**% vv**
PEG 400	27
Glycerin	27
Deionized Water	41
Transcutol	5
RSV	5.3 **w/v**
Aristoflex AVC	0.5 **w/w**

Πίνακας 3. Συνταγή Βελτιστοποιημένου Πηκτώματος Ρεσβερατρόλης (Αριτζίδου, 2018)

9.6. Μέτρηση Μεγέθους Σταγονιδίων

9.6.1. Φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων

Η μέτρηση μεγέθους σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης, τόσο για τα μικρογαλακτώματα Placebo όσο και για τα μικρογαλακτώματα με ρεσβερατρόλη έγινε με την χρήση της τεχνικής Ηλεκτρονιακής Σκέδασης Φωτός (DLS) με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Zetasizer 3000HAS, (Malvern Instruments, Malvern, UK). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο CONTIN (MALVERN software).

Σταγονίδα μεγέθους από 1-5000nm μπορούν να μετρηθούν με τη μέθοδο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων (photon correlation spectroscopy – PCS). Ένα από ταχαρακτηριστικά των σταγονιδίων είναι ότι βρίσκονται σε συνεχή τυχαία θερμική κίνηση (κίνηση Brown). Αυτή η κίνηση έχει ως αποτέλεσμα η ένταση του σκεδαζόμενου από τα σταγονίδια να σχηματίζει ένα μοντέλο κινούμενου στίγματος. Αυτή η κινητικότητα ανιχνεύεται ως αλλαγή της έντασης σε σχέση με το χρόνο, από έναν ανιχνευτή και έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Τα μεγάλα σωματίδια κινούνται πιο αργά από τα μικρά και συνεπώς ο ρυθμός της διακύμανσης του σκεδαζόμενου φωτός είναι πιο βραδύς. Η φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων χρησιμοποιεί το ρυθμό μεταβολής των διακυμάνσεων του φωτός για να προσδιορίσει την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων που προκαλούν το σκεδασμό του φωτός.



Εικόνα C 5. Όργανο φασματοσκοπίας συσχετισμού φωτονίων Malvern Zetasizer 3000HAS

Στο όργανο αυτό η παραγωγή της δέσμης του εκπεμπόμενου φωτός γίνεται από λυχνία He-Ne και το μήκος κύματος του φωτός είναι 633nm. Η ακτινοβολία προσπίπτει στα σταγονίδια, σκεδάζεται και στη συνέχεια, τα σκεδαζόμενα φωτόνια ανιχνεύονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή.

Στο λογισμικό του οργάνου υπάρχει πρόγραμμα αλγορίθμων που επεξεργάζεται τις μεταβολές της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός και καταλήγει στην κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων που περιέχονται στο δείγμα. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη μαθηματική ανάλυση, η οποία συνίσταται από την ISO 13321 διεθνή μέθοδο, προκύπτει και ο μέσος όρος των μεγεθών. Κατά τις μετρήσεις αυτές το μέγεθος ορίζεται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων – σταγονιδίων, ενώ ως δείκτης διασποράς το εύρος κατανομής.

Η μέτρηση αυτή στα παρασκευάσματα χωρίς ρεσβερατρόλη γίνεται για να επιβεβαιωθεί ότι πρόκειται για μικρογαλακτώματα. Τα μικρογαλακτώματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν μέγεθος σταγονιδίων ≤ 150 nm (McClements, 2012).

Η ίδια μέτρηση γίνεται στα μικρογαλακτώματα με ρεσβερατρόλη για τη συλλογή πληροφοριών με στόχο τη βελτιστοποίηση της μορφοποίησης.

9.6.2. Προετοιμασία του δείγματος

Τα μικρογαλακτώματα Placebo αραιώθηκαν μέχρι και 30 φορές με Water For Injection και μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα πολυστυρενίου μίας χρήσης, όγκου 3mL.

Τα μικρογαλακτώματα με ρεσβερατρόλη τοποθετήθηκαν αναραίωτα στη κυψελίδα, καθώς οποιαδήποτε προσθήκη ύδατος άλλαζε τον δείκτη διάθλασης τους. Απαραίτητα προϋπόθεση για τη μέτρηση του δείγματος είναι η οπτική διαύγεια του και η απουσία συσσωματωμάτων, που θα παρεμπόδιζαν την δίοδο της δέσμης τους φωτός.

Η κυψελίδα τοποθετείτε στην ειδική υποδοχή του οργάνου η οποία κλείνει με καπάκι ώστε να μην διαχέεται το σκεδαζόμενο φως. Δέσμη μονοχρωματικού φωτός μήκους κύματος 633 nm διέρχεται υπό γωνία 90° και οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 25° C.

9.7. Μελέτη Σταθερότητας

Στη διεθνή βιβλιογραφία προτείνεται πληθώρα μεθόδων αξιολόγησης της σταθερότητας των γαλακτωμάτων όπως η οπτική παρακολούθηση, το pH του γαλακτώματος, το ιξώδες, η πυκνότητα, το μέγεθος σταγονιδίων της εσωτερικής φάσης, το ζ-δυναμικό.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσθηκε η σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

i. Οπτική Παρακολούθηση για 30 ημέρες
ii. Προσδιορισμός του μεγέθους και της κατανομής των σταγονιδίων του μικρογαλακτώματος στις 30 ημέρες
iii. Η μέτρηση του pH

Η μέτρηση του pH χρησιμεύει στην διάκριση του τύπου του μικρογαλακτώματος σε χρόνο μηδέν. Η μεταβολή του pH με την πάροδο του χρόνου χρησιμεύει στην διαπίστωση φυσικοχημικών

μεταβολών στη δομή του μικρογαλακτώματος, στην μικροβιολογική σταθερότητα του και στην χημική σταθερότητα του δραστικού συστατικού (Juškaite et al., 2017).

9.8. Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού

Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού στα μικρογαλακτώματα έγινε σε υάλινα διαφανή φιαλίδια (n = 3), με σταδιακή ζύγιση και προσθήκη υπό ανάδευση ποσότητας ρεσβερατρόλης σε 3mL έτοιμου μικρογαλακτώματος placebo. Ύστερα από κάθε προσθήκη ακολούθησε ανάδευση για (3) τρία λεπτά. Μετά το πέρας αυτών εάν το προϊόν δεν ήταν διαυγές ακολουθούσε προσθήκη διπλάσιας ποσότητας από αυτήν που είχε ήδη προστεθεί για να εξασφαλιστεί ότι έχει προστεθεί περίσσεια ρεσβερατρόλης. Στη συνέχεια τα φιαλίδια στερεώθηκαν σε περιστροφικό δίσκο και όλη η διάταξη παρέμεινε σε θερμοστατούμενο κλίβανο στους 25°C για δώδεκα ώρες.

Το περιεχόμενο των φιαλιδίων μεταφέρθηκε σε κωνικούς ογκομετρικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο συσκευή, όπου και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα, το περιεχόμενο του κάθε ογκομετρικού σωλήνα διηθήθηκε μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45 μm (CHROMAFIL® Xtra RC-45/13, Germany). Στη συνέχεια, κατάλληλοι όγκοι του κάθε διηθήματος αραιώθηκαν με την κινητή φάση της ανάλυσης HPLC και η συγκέντρωση της Ρεσβερατρόλης προσδιορίσθηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η ίδια διαδικασία έγινε μόνο για μία συνταγή μικρογαλακτώματος και ταυτόχρονα για την υδατική φάση (νερό και υδατοδιαλυτά επιφανειοδραστικά), την λιπαρή φάση, και απιονισμένο νερό ξεχωριστά. Με αυτόν τον τρόπο μελετήθηκε η σχέση μεταξύ διαλυτότητας κορεσμού της ρεσβερατρόλης στις επιμέρους φάσεις του μικρογαλακτώματος και στο τελικό προϊόν. Έτσι κατέστει δυνατόν να προβλεφθεί η διαλυτότητα κορεσμού για κάθε συνταγή (σύσταση) μικρογαλακτώματος χωρίς να χρειάζεται να γίνει η παραπάνω διαδικασία για όλα τα πειραματικά σημεία.

9.9. In Vitro πείραμα διάχυσης

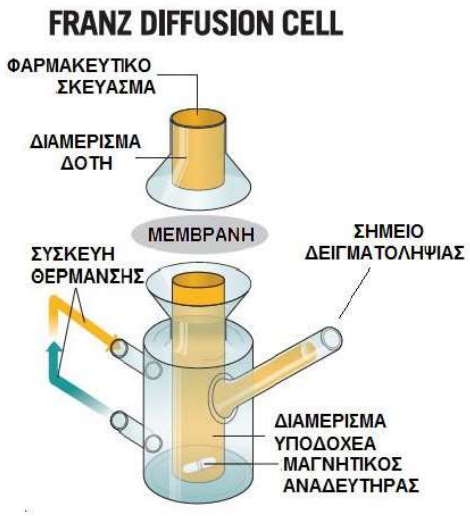
9.9.1. Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα

Το διάλυμα του υποδοχέα αποτελείται από ύδωρ και προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 50: 50 (H_2O:PG 50:50). Η προσθήκη συνδιαλυτών που είναι αναμίξιμοι με το ύδωρ, όπως η αιθανόλη, η προπυλενογλυκόλη και η πολυιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400), στο διάλυμα του υποδοχέα, το οποίο συνήθως αποτελείται είτε από ύδωρ είτε από PBS pH 7.4, είναι μία συχνή τακτική, προκειμένου να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διάχυσης (Tavano et al., 2014; M. J. Tsai et al., 2016)

Για την παρασκευή 500 mL διαλύματος αρχικά ογκομετρήθηκαν 250 mL προπυλενογλυκόλης (Propylene Glycol - PG) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου που μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL. Στη συνέχεια ογκομετρήθηκαν 250 mL H_2O μέσω ογκομετρικού κυλίνδρου και μεταφέρθηκαν στην ίδια ογκομετρική φιάλη. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε πλάκα και το περιεχόμενο αναδεύτηκε για περίπου 30 λεπτά με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Τέλος, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά, προκειμένου να απαερωθεί το διάλυμα

9.9.2. In Vitro Πείραμα Διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη STRAT – M ®

Για την διεξαγωγή των *in vitro* μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας της Ρεσβερατρόλης χρησιμοποιήθηκαν κάθετα στατικά υάλινα κύτταρα διάχυσης. Τα τροποποιημένα κύτταρα Franz (modified Franz Diffusion Cells), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν όγκου 6.275 mL και διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης 0.636 cm^2



Εικόνα C 6. Κύτταρο κάθετης διάχυσης Franz (Σπανέας, 2019)

Τα κύτταρα διάχυσης Franz αποτελούνται από δυο διαμερίσματα, αυτό του δότη (donor compartment) και αυτό του δέκτη (receptor compartment), όπως έχει αναφερθεί και στο *Κεφάλαιο*

3. Η πειραματική διαδικασία αρχίζει με την ενεργοποίηση του υδατόλουτρου, έτσι ώστε όλα τα τροποποιημένα κύτταρα Franz να εξισορροπούνται στους 32° C, ώστε να προσομοιάζεται η θερμοκρασία επιφανείας του δέρματος. Το διάλυμα υποδοχέα, το οποίο έχει πρώτα απαερωθεί, τοποθετείται στο υδατόλουτρο προκειμένου να εξισορροπηθεί στους 32° C. Μεταξύ του διαμερίσματος του δότη και του δέκτη παρεμβάλλεται η μεμβράνη.

Τα προκαταρκτικά πειράματα κατά τη βελτιστοποίηση του φορέα μικρογαλακτώματος έγιναν με την τεχνητή μεμβράνη Strat-M®. Η μεμβράνη αυτή δεν απαιτεί καμία κατεργασία πριν τη χρήση της στα *in vitro* πειράματα διάχυσης. Αφού αφαιρέθηκε το προστατευτικό της κάλυμμα, η μεμβράνη σε σχήμα δίσκου τοποθετήθηκε πάνω σε μία πλάκα και κόπηκαν κυκλικά τεμάχια με τη βοήθεια μεταλλικού εμβόλου. Τα κυκλικά αυτά τεμάχια είχαν μέγεθος τέτοιο που κάλυπτε ολόκληρη τη διαθέσιμη επιφάνεια του κυττάρου διάχυσης Franz. Τα κυκλικά τεμάχια τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμέρισμα του δέκτη με τη γυαλιστερή επιφάνεια προς το διαμέρισμα του δότη. Μετά την τοποθέτηση του θαλάμου του δότη, η όλη διάταξη σταθεροποιήθηκε με την προσαρμογή του μεταλλικού σφιγκτήρα. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους 32° C, από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου.



Εικόνα C 7. Απεικόνιση της τεχνητής μεμβράνης Strat-M® (Διαθέσιμο σε: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892)

Στη συνέχεια 100 μL από το κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα/σύνθεση (formulation) τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα του δότη πάνω στη γυαλιστερή επιφάνεια της μεμβράνης Strat-M®. Η μαγνητική ανάδευση εντός του θαλάμου του δέκτη ήταν σχετικά ήπια για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Η ομοιογένεια του διαλύματος εντός του διαμερίσματος του δέκτη εξασφαλίζεται με την παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα καθώς η όλη διάταξη βρίσκεται σταθεροποιημένη στην επιφάνεια συστήματος μαγνητικής ανάδευσης. Καθώς η Ρεσβερατρόλη είναι φωτοευαίσθητη, τα πειράματα διάχυσης έλαβαν χώρα σε σκοτεινό θάλαμο προστατευμένο από το ηλιακό φως.

Στον παρακάτω Πίνακα συνοψίζονται οι συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας:

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΥΣΗΣ	
Όγκος κυττάρου διάχυσης	6,275mL
Διαθέσιμη Επιφάνεια Διάχυσης	0.636 cm^2
Διάλυμα του Υποδοχέα	PG: H_2O (50:50)
Δειγματοληπτικό Σχήμα	3h, 6h, 12h, 24h
Θερμοκρασία	32 ± 0.5° C
Δόση Εφαρμογής	100 μL

Πίνακας 4. Συνθήκες πειραμάτων διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη και ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος επικρατούσαν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) (OECD, 2004). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, 3, 6, 12 και 24 ωρών, 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 Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα του υποδοχέα.

Για κάθε συνταγή, όταν χρησιμοποιήθηκε ως φραγμός η τεχνητή μεμβράνη Strat-M®, χρησιμοποιήθηκαν 3 κύτταρα διάχυσης Franz.

9.9.3. Ex Vivo πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

Προετοιμασία της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας

Πριν τη διεξαγωγή του πειράματος διάχυσης, είναι απαραίτητη η προετοιμασία της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας. Όπως έχει αναφερθεί και στο *Κεφάλαιο 3*, η διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας (stratum corneum) αποτελεί το περιοριστικό βήμα για τη διαδερμική απορρόφηση και συχνά υποτίθεται ότι η δερμίδα και το χόριο δεν επηρεάζουν τη μεταφορά της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας διαμέσου του δέρματος (Skelly et al., 1987).

Η κεράτινη στοιβάδα απομονώθηκε από ανθρώπινο δέρμα πλήρους πάχους (full thickness) χρησιμοποιώντας μία τεχνική θερμικού διαχωρισμού (OECD, 2004). Το ανθρώπινο δέρμα για τις παρούσες *in vitro* μελέτες λήφθηκε από την New York Firefighters Skin Bank (Presbyterian Hospital, Νέα Υόρκη). Αρχικά, το λίπος του υποδόριου ιστού κόβεται και αφαιρείται με τη βοήθεια νυστεριών. Στη συνέχεια, ολόκληρο το δέρμα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει απιονισμένο ύδωρ και θερμαίνεται στους 60° C για περίπου 1 λεπτό (heat separation technique). Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα και τη χαλάρωση των συνδέσεων μεταξύ των υποκείμενων στοιβάδων, η κεράτινη στοιβάδα μπορεί να αφαιρεθεί απαλά από τη δερμίδα χρησιμοποιώντας λαβίδες εργαστηρίου (Kligman & Christophers, 1963)

Η απομονωμένη κεράτινη στοιβάδα τοποθετείται σε τετράγωνο κομμάτι γυαλιού, προκειμένου να τεντωθεί. Επιπλέον, πρέπει να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα του φραγμού. Για το λόγο αυτό, η ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα παρατηρείται κάτω από το μεγεθυντικό φακό. Κομμάτι δέρματος με τρύπες, κρεατοελιές ή οποιοδήποτε άλλο ελάττωμα, όπως υπερβολικό πάχος, πρέπει να απορρίπτεται. Η απομονωμένη και ακέραια κεράτινη στοιβάδα, χωρίς ανωμαλίες, τοποθετείται σε φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται στους -20° C (OECD, 2004)

Για την διεξαγωγή του πειράματος η κεράτινη στοιβάδα αφέθηκε εκτός ψύξης 30 περίπου λεπτά ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια κόπηκε σε τετράγωνα τεμάχια διαστάσεων περίπου 1.5 cm x 1.5 cm. Τα τετράγωνα αυτά τεμάχια τοποθετήθηκαν στα κύτταρα διάχυσης με την κεράτινη στοιβάδα να προσανατολίζεται προς το διαμέρισμα του δότη. Πάνω από την κεράτινη στοιβάδα τοποθετείται πλαστικός δακτύλιος Teflon, προκειμένου να σταθεροποιηθεί καλύτερα η μεμβράνη και να είναι ευκολότερη η εφαρμογή του σκευάσματος. Μετά την τοποθέτηση του θαλάμου του δότη, η όλη διάταξη σταθεροποιήθηκε με την προσαρμογή του μεταλλικού σφιγκτήρα. Στη συνέχεια ακολουθείται η διεργασία που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο με την σημαντική διαφορά ότι πριν την εφαρμογή του υπό εξέταση παρασκευάσματος στο διαμέρισμα του δότη, τα κύτταρα αφήνονται για 24 ώρες, προκειμένου να εξισορροπηθεί η ενυδάτωση της κεράτινης στοιβάδας.

Για κάθε συνταγή, όταν χρησιμοποιήθηκε ως φραγμός η ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα, χρησιμοποιήθηκαν 5 κύτταρα διάχυσης Franz. Οι συνθήκες του πειράματος είναι ίδιες με αυτές που παρουσιάζονται στον *Πίνακα 3*. Η μόνη διαφορά είναι ο διαφορετικός φραγμός, καθώς στην αρχική περίπτωση χρησιμοποιείται τεχνητή μεμβράνη, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ανθρώπινο δέρμα.

Στο πείραμα διάχυσης μικρογαλακτωμάτων με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα δεν χρησιμοποιήθηκε δακτύλιος Teflon καθώς παρατηρήθηκαν φαινόμενα εκτεταμένης διαρροής από το διαμέρισμα του δότη. Αυτό οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό των επιφανειοδραστικών στη σύσταση του μικρογαλακτώματος που δημιούργησε πολύ χαμηλή επιφανειακή τάση στη διεπιφάνεια του με το υλικό Teflon. Έτσι μέσω τριχοειδών φαινομένων το μικρογαλάκτωμα διέρρεε στα έξω τοιχώματα του υάλινου κυττάρου Franz. Με την αφαίρεση του δακτυλίου Teflon έπαψε να συμβαίνει αυτό και η διάχυση λάμβανε χώρα κανονικά.

9.10. Ποσοτικός Προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο HPLC

9.10.1. Χρωματογραφικές συνθήκες

Προκειμένου να αναλυθεί και να ποσοτικοποιηθεί η Ρεσβερατρόλη στα άγνωστα δείγματα και στα πρότυπα διαλύματα, χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος αντίστροφής φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Polonini et al., 2014). Το σύστημα της HPLC 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).

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hypersil® BDS C18 column (250 x 4.6mm, 5μm, Thermo Fischer Scientific). Οι αναλύσεις των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ChromQuest Chromatography Data System, version 5.1 (ThermoQuest, USA). Η κινητή φάση αποτελούταν από ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.03 M pH ~ 4 σε αναλογία 35:65 αντίστοιχα. Η ροή ρυθμίστηκε στην τιμή 1mL/min, ενώ ο όγκος της ένεσης ήταν 50 μL. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι χρωματογραφικές συνθήκες συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	
Στήλη (Στατική Φάση)	Hypersil BDS C18 (250x4.6 mm, 5μm)
Κινητή φάση	ACN: Phosphate Buffer 0.03M pH 4 (35:65)
Όγκος ένεσης	1 mL/ min
Θερμοκρασία	Θερμοκρασία Περιβάλλοντος
λmax	306nm
Χρόνος Έκλουσης	5.5 min

Πίνακας 5. Οι χρωματογραφικές συνθήκες για τον αναλυτικό προσδιορισμό της ρεσβερατρόλης με τη μέθοδο HPLC

9.10.2. Παρασκευή της κινητής φάσης

Η κινητή φάση αποτελούνταν από ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.03 M pH ~ 4 σε αναλογία 35:65 αντίστοιχα. Για την παρασκευή δύο λίτρων (2 L) κινητής φάσης, αρχικά ζυγίζονται 9.36 g NaH2PO4.2H2O και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 2000 mL. Ακολουθεί προσθήκη H2O βαθμού καθαρότητας HPLC περίπου μέχρι τα 1800 mL και ανάδευση σε πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα, μέχρι να διαλυθεί πλήρως το άλας και να προκύψει διάλυμα. Μόλις

διαλυθεί το άλας, μετράται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται στην τιμή 4.0 με διάλυμα HCl κανονικότητας 1M. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 2000 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με H2O βαθμού καθαρότητας HPLC.

Έπειτα ογκομετρούνται 1300 mL του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος και 700 mL ACN (CH3CN) που αναμιγνύονται μεταξύ τους. Ακολουθεί καλή ανακίνηση και διήθηση υπό κενό μέσω αντλίας (Millipore, UK) χρησιμοποιώντας φίλτρα. Τέλος, η κινητή φάση τοποθετείται στο υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά με σκοπό την απαέρωσή της.

9.10.3. Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.02 g Ρεσβερατρόλης με 200 mL μεθανόλης (MeOH) σε σκοτεινόχρωμη (amber) ογκομετρική φιάλη των 200 mL, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση να είναι 100 μg/mL. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης με το διάλυμα του υποδοχέα (receptor solution) ή με την κινητή φάση, ανάλογα τη φύση της

9.10.4. Έλεγχος γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης

Τα πρότυπα διαλύματα της Ρεσβερατρόλης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης. Κάθε πρότυπο αναλύθηκε τρεις φορές (n=3). Τα αποτελέσματα, τα οποία προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των κορυφών των χρωματογραφημάτων, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους (y=ax +b), η κλίση (a, slope), η τεταγμένη επί την αρχή (b, intercept) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R_2).

Το διάλυμα του υποδοχέα αποτελείται από ύδωρ και προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 50: 50 (H2O:PG 50:50). Η προσθήκη συνδιαλυτών που είναι αναμίξιμοι με το ύδωρ, όπως η αιθανόλη, η προπυλενογλυκόλη και η πολυιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400), στο διάλυμα του υποδοχέα, το οποίο συνήθως αποτελείται είτε από ύδωρ είτε από PBS pH 7.4, είναι μία συχνή τακτική, προκειμένου να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διάχυσης (H. Y. Tsai et al., 2017b).

Για την παρασκευή 500 mL διαλύματος αρχικά ογκομετρήθηκαν 250 mL προπυλενογλυκόλης (Propylene Glycol - PG) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου που μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL. Στη συνέχεια ογκομετρήθηκαν 250 mL H2O με ογκομετρικό κύλινδρο και μεταφέρθηκαν στην ίδια ογκομετρική φιάλη. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε πλάκα και το περιεχόμενο αναδεύτηκε για περίπου 30 λεπτά με τη βοήθεια

μαγνητικού αναδευτήρα. Τέλος, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά, προκειμένου να απαερωθεί το διάλυμα.

9.10.5. Ποσοτικός προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης στα παρασκευάσματα

Αρχικά, 1 g από το παρασκεύασμα (πήκτωμα, γαλάκτωμα ή μικρογαλάκτωμα) ζυγίστηκε και μεταφέρθηκε ποσοτικά σε σκοτεινόχρωμη (amber) ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα η συμπληρώθηκε ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης μέχρι τη χαραγή με ACN (CH3CN). Η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 20 λεπτά.

Μετά το πέρας των 20 λεπτών η σκοτεινόχρωμη ογκομετρική φιάλη αφαιρέθηκε από το λουτρό υπερήχων και τοποθετείται σε πλάκα, όπου το περιεχόμενο αναδεύεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το περιεχόμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45 μm. Στη συνέχεια, κατάλληλοι όγκοι του κάθε διηθήματος αραιώθηκαν με την κινητή φάση και η συγκέντρωση της Ρεσβερατρόλης προσδιορίσθηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

9.10.6. Ποσοτικός προσδιορισμός ρεσβερατρόλης στο διαμέρισμα του δότη

Μετά το πέρας του πειράματος ex vivo, και αφού έχει αφαιρεθεί το υγρό δέκτη από το διαμέρισμα του δέκτη, το διαμέρισμα του δότη εκπλένεται με 1mL κινητή φάση της ανάλυσης HPLC που περιγράφηκε παραπάνω. Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται πέντε φορές. Από το συνολικό έκπλυμα λαμβάνεται όγκος 100μL και αραιώνεται με κινητή φάση μέχρι το 1mL. Στη συνέχεια αναλύεται με την παραπάνω μέθοδο.

9.10.7. Ποσοτικός προσδιορισμός ρεσβερατρόλης στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

Αφού εκπλυθεί το διαμέρισμα του δότη, παραλαμβάνεται κατά την αποσυναρμολόγηση των κυττάρων διάχυσης η κεράτινη στοιβάδα σε φιαλίδιο Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL. Σε αυτό προστίθενται 300μL διάλυμα φωσφορικών 0,03M pH 4, και γίνονται κυκλικές κινήσεις με τη χρήση μεταλλικής σπάτουλας με στόχο την ομογενοποίηση του ιστού. Ύστερα από 30 χειροκίνητες περιστροφές, αφαιρείται το υγρό υπερκείμενο με πιπέτα και συλλέγεται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές με 300μL διάλυμα φωσφορικών και άλλη μία φορά με 300μL κινητής φάσης της ανάλυσης που θα ακολουθήσει (Bortolotti et al., 2009; Δέδε, 2017)

Το συνολικό υπερκείμενο που έχει συλλεχθεί στην ογκομετρική φιάλη 10mL αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με την κινητή φάση. Το αραιωμένο δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000rpm για 5 λεπτά στους 20^{O}c. Ακολουθούν κατάλληλες αραιώσεις για να βρεθεί το δείγμα εντός καμπύλης αναφοράς της ανάλυσης.

Σε περίπτωση που έχουν μεταφερθεί υπολείμματα ιστού στο διάλυμα, γίνεται φυγοκέντρηση σε κυλινδρικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, στις 5000 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο φιλτράρεται από φίλτρα αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45 μm, και ύστερα αναλύεται.

9.11. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν τόσο από την in vitro όσο και από την in vivo πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικοί μέθοδοι ανάλυσης. Για την εύρεση του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το Excel® (Microsoft Office 365), ενώ για στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Prism 8.4.3 (GraphPad, San Diego, California). Παρακάτω επεξηγούνται λεπτομερώς τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

9.11.1. Έλεγχος κανονικότητας

Κατά την έναρξη της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων προκειμένου να αποφασιστεί αν θα χρησιμοποιηθούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Ο έλεγχος κανονικότητας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov, για δείγματα με n>15, και το κριτήριο Shapiro-Wilk για n<10, τα οποία αποτελούν μία μη παραμετρική στατιστική μέθοδο που ελέγχει αν η κατανομή του πληθυσμού, από τον οποίο προήλθε το τυχαίο δείγμα, ακολουθεί μία συγκεκριμένη κατανομή πιθανότητας (πχ. κανονική).

- ✓ **In Vitro Πείραμα**: Όσον αφορά το in vitro πείραμα στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωριστά για τα Franz κύτταρα που αντιστοιχούν σε κάθε συνταγή και ξεχωριστά για κάθε μια από τις χρονικές στιγμές που ελήφθησαν τα δείγματα.
- ✓ **In Vivo Πείραμα**: Όσον αφορά το in vivo πείραμα στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωριστά για καθεμία ομάδων μυών, ξεχωριστά κάθε χρονική στιγμή και ξεχωριστά για κάθε μία από τις εκτιμώμενες παραμέτρους (πχ ενυδάτωση, TEWL).

9.11.2. ANOVA – Analysis of Variance

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

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

9.11.3. Post – hoc Analysis

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ANOVA παρατηρήθηκε η τιμή σημαντικότητας αλλά εφαρμόστηκαν και κριτήρια post-hoc. Τα κριτήρια που εφαρμόστηκαν ήταν: το LSD (Least Significant Difference) και το Tukey για δεδομένα που ακολουθούν κανονική κατανομή.

Σε περίπτωση που τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, τότε εφαρμόζεται η μη παραμετρική την post hoc δοκιμασία Friedman, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, καθώς δεν επηρεάζεται από την ανομοιογένεια της διασποράς των δεδομένων και μπορεί να εφαρμοστεί σε δεδομένα μέτρησης της ίδιας μεταβλητής στο ίδιο πειραματόζωο (αντιστοιχισμένα δεδομένα) Στην περίπτωση αυτή αναφερόμαστε στις τιμές της ίδιας ποσοτικής μεταβλητής που παρατηρήθηκαν κάτω από δύο διαφορετικές καταστάσεις (π.χ. περίπτωση αρχικής και τελικής ημέρας πειράματος).

Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο σημαντικότητας ήταν α= 0.05. Επομένως, όταν η τιμή p (p value) είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$), είναι δυνατή η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Άρα, όταν η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

9.11.4. Ζευγαρωτές συγκρίσεις

Ζευγαρωτές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων των σκευασμάτων αλλά και μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ημερών της ίδιας ομάδας έγιναν με ANOVA δύο κατευθύνσεων.

10. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

10.1. Υλικά και Όργανα In Vivo Πειράματος

10.1.1. Υλικά

Δραστική ουσία

- Ρεσβερατρόλη (Batch no.18Γ25HO400726. FAGRON, Greece)

Σκευάσματα

- Βελτιστοποιημένο Πήκτωμα Ρεσβερατρόλη βλ *Πίνακας 2*
- Βελτιστοποιημένο Γαλάκτωμα Ρεσβερατρόλης βλ.*Πίνακας 1*
- Βελτιστοποιημένο Μικρογαλάκτωμα Ρεσβερατρόλης βλ. *Αποτελέσματα In vitro Αξιολόγησης*
- Φορέας πηκτώματος Ρεσβερατρόλης
- Φορέας Γαλακτώματος Ρεσβερατρόλης
- Φορέας Μικρογαλακτώματος Ρεσβερατρόλης

Αναλώσιμα

- Αυτοκόλλητη γάζα Aseptafix®, κομμένη σε μέγεθος 2x2cm^2
- Αυτοκόλλητος επίδεσμος Fixomull ®, κομμένος σε μέγεθος 3x5 cm^2

10.1.2. Όργανα και Συσκευές

- Universal Arc Lamp Housing 66021, Xenon Lamp 1000W, Oriel Instruments
- 68820 Universal Power Supply, Oriel Instruments
- TEWAMETER® TM 240 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)
- CORNEOMETER® CM 820 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany).
- MEXAMETER ® (Courage & Khazaka, Cologne, Germany)
- Cutometer MPA 580 (Courage & Khazaka, Cologne, Germany).
- Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF
- Antera 3D CS, (Miravex Limited, Dublin, Ireland)
- Skin pHmeter, (Courage & Khazaka, Cologne, Germany).
- Ψηφιακό παχύμετρο
- Ηλεκτρονικός ζυγός: Mettler Toledo AT261, Delta Range (Mettler, Switzerland)

10.2. Μέθοδοι In Vivo Πειράματος

10.2.1. Πρωτόκολλο πρόκλησης φλεγμονής με UV ακτινοβόληση σε μύες

Τα παραπάνω σκευάσματα επιλέχθηκαν για να διερευνηθεί η επίδραση του φορέα στην in vivo αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης. Και στα τρία σκευάσματα η ρεσβερατρόλη βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού, ενώ έχουν πρώτα μελετηθεί συγκριτικά και για την In vitro Διαπερατότητα τόσο τεχνητής μεμβράνης Strat – M ®, όσο και σε ex vivo ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών ήταν ικανοποιητικά ώστε να προχωρήσουμε σε In Vivo αξιολόγηση.

Τα πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας ήταν το **P46.Πιλοτική Μελέτη Αντιφλεγμονώδους Δράσεως Τοπικών Σκευασμάτων Ρεσβερατρόλης** (21/2/2020), σύμφωνα με το οποίο: Σαράντα εννέα (49) άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-1 χωρίστηκαν σε 7 ομάδες των 7. Σε όλους τους μύες προκλήθηκε φλεγμονή με άπαξ ακτινοβόληση (2,5 MED. Σε κάθε τρείς από τις ομάδες εφαρμόστηκε κάποιο από τα σκευάσματα Ρεσβερατρόλης ενώ σε άλλες τρείς εφαρμόστηκε θεραπεία με τους διαφορετικούς φορείς. Μία ομάδα δεν έλαβε καμία θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των μυών σε ομάδες φαίνεται παρακάτω:

Ομάδα 1: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή πηκτώματος RSV
Ομάδα 2: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή κρέμας RSV
Ομάδα 3: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή μικρογαλακτώματος RSV
Ομάδα 4: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή φορέα πηκτώματος (Μάρτυρες)
Ομάδα 5: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή φορέα κρέμας (Μάρτυρες)
Ομάδα 6: Μύες με φλεγμονή & εφαρμογή φορέα μικρογαλακτώματος (Μάρτυρες)
Ομάδα 7: Μύες με φλεγμονή & καμία εφαρμογή φορέα τοπικού σκευάσματος (Μάρτυρες)

Προκειμένου να προκληθεί φλεγμονή, η ράχη των μυών (εμβαδό 4 cm^2) ακτινοβολήθηκε άπαξ με υπεριώδη ακτινοβολία ισχύος στη UVA περιοχή του φάσματος ίση με 6 mW/cm^2 και στη UVB φάσματος ίση με 6,5 mW/cm^2. Ο χρόνος ακτινοβόλησης ήταν ίσος με 15s, έτσι ώστε τελικά η συνολική ενέργεια που δέχθηκε κάθε μυς ήταν ίση με 2,5 μέσες ερυθηματώδης δόσεις (2,5 MED). Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε με ειδική για δερματολογικές εφαρμογές λυχνία τύπου ξένον (Universal Arc Lamp Housing 66021, Xenon Lamp 1000W, Oriel Instruments) η οποία είναι συνδεδεμένη με κατάλληλο τροφοδοτικό (68820 Universal Power Supply, Oriel Instruments).

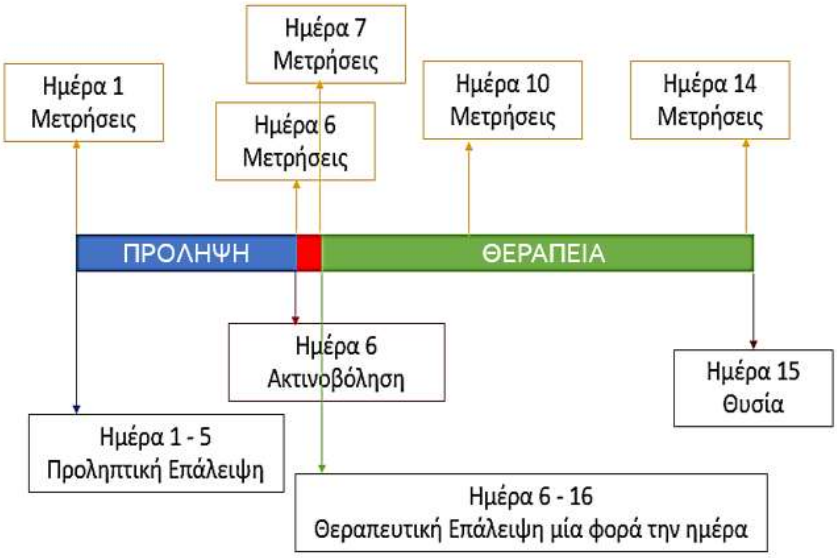
Το πρωτόκολλο διήρκησε συνολικά 16 ημέρες. Τις 5 πρώτες ημέρες γινόταν μία φορά την ημέρα επάλειψη των ομάδων με σκοπό να διερευνηθεί πιθανή προληπτική δράση των σκευασμάτων. Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε το πρωί της έκτης ημέρας και έπειτα ακολούθησε η επάλειψη η οποία συνεχίστηκε μέχρι και την τελευταία ημέρα. Για να βεβαιωθεί ότι τα σκευάσματα θα

παρέμεναν στην ακτινοβοληθείσα περιοχή , μετά από κάθε εφαρμογή, το σημείο επάλειψης καλυπτόταν με επίδεσμο επαρκούς μεγέθους.

Στην αρχή (πριν την έναρξη των επαλείψεων),κατά τη διάρκεια του πειράματος (κάθε τρεις μέρες) και στο τέλος του πειράματος ελήφθησαν οι ακόλουθες μετρήσεις:

- ✓ Μέτρηση του πάχους του δέρματος στην ακτινοβοληθείσα περιοχή με ψηφιακό παχύμετρο προκειμένου να μελετηθεί πιθανή υπερκεράτωση.
- ✓ Μέτρηση διαδερμικής άδηλης απώλειας νερού (TEWL) η οποία βοηθά στην εκτίμηση του φραγμού του δέρματος και της λειτουργίας αυτού.
- ✓ Μέτρηση της ενυδάτωσης του δέρματος.
- ✓ Μέτρηση της ερυθρότητας και τέλος
- ✓ Τρισδιάστες Φωτογραφίες με την Κάμερα Antera 3D (Miravex), η οποία παρέχει τη δυνατότητα αξιολόγησης της υφής, των ανυψώσεων και βυθίσεων, καθώς και της ερυθρότητας του δέρματος

Επιπλεόν μέτα την ακτινοβόληση, λαμβάνονταν ανά δύο ημέρες ψηφιακές εικόνες από τη ράχη των ζώων (ακτινοβοληθείσα περιοχή), οι οποίες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν μέσω ειδικού λογισμικού. Την τελευτάια ημέρα του πειράματος, μετά τις τελευταίες μετρήσεις τα ζώα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση και με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού και χειρουργικής λαβίδας ελήφθη τμήμα του δέρματος της ράχης σε διαστάσεις 2cm x 2cm το οποίο και αποθηκεύτηκε στους -20^{o}C μέχρι περαιτέρω χρήση. Παράλληλα επιλέχθηκαν 2 μύες από κάθε ομάδα, με επίπεδο φλεγμονής όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερο της κάθε ομάδας, ώστε τμήμα του δέρματός τους να δοθεί για περαιτέρω ιστοπαθολογική εξέταση.



Εικόνα C 8. Συνοπτικό διάγραμμα της πειραματικής διεργασίας In Vivo

10.2.2. Πειραματική διεργασία

Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μας ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-1, ηλικίας 3-5 μηνών. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Μικρών Πειραματοζώων της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μύες και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 22°C και 25°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 BIO 07).

Επίδραση UV ακτινοβολίας στο δέρμα

Όργανο: Λάμπα ξένον 1000W (Oriel)

Όπως αναφέρεται την περιγραφή του πρωτοκόλλου, κάθε μυς ακτινοβολήθηκε για 15sec (~2,5 M.E.D.) Η λάμπα ξένον είναι τοποθετημένη σε κατάλληλη διάταξη στήριξης, ψύξης και τροφοδοσίας και η ακτινοβολία UVA έχει ισχύ 6,5mW/cm2 και η UVB 6,5 mW/cm2. Η ισχύς της ακτινοβολίας ελέγχθηκε πριν την ακτινοβόληση με αντίστοιχο μετρητή (probe).

Επάλειψη σκευασμάτων

Η επάλειψη πραγματοποιούταν καθημερινά μία φορά την ημέρα σε κάθε μυ, με τη βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας στο άνω μέρος της ράχης τους όπου πραγματοποιήθηκε και η ακτινοβόληση. Μετά από κάθε επάλειψη, η επιληφθείσα περιοχή καλυπτόταν με επίδεσμο κατάλληλου μεγέθους προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι το σκεύασμα θα παρέμενε στην φλεγμαίνουσα περιοχή. Η ποσότητα του σκευάσματος που εφαρμόστηκε ήταν 0,5mg/cm^2 ακτινοβοληθείσας περιοχής. Η περιοχή που ακτινοβολήθηκε ήταν περίπου 4 cm^2 άρα συνολικά η εφαρμοζόμενη ποσότητα ήταν 2 mg ημερησίως. Τα σκευάσματα φυλάσσονταν σε σκοτεινό συρτάρι λόγω της φωτοευαισθησίας της δραστικής ουσίας. Το πήκτωμα και η κρέμα δεν διατηρήθηκαν σε ψυγείο διότι η δραστική ουσία βρισκόταν σε συγκέντρωση κορεσμού κι έτσι υπήρχε κίνδυνος δημιουργίας ιζήματος. Το μικρογαλάκτωμα διατηρήθηκε στο ψυγείο, λόγω υψηλών θερμοκρασιών κατά το μήνα διεξαγωγής του πειράματος που επέτρεπαν αυθόρμητη αλλαγή του τύπου του μικρογαλακτώματος (περισσότερα στα αποτελέσματα του πειράματος In Vitro).

10.2.3. Μετρήσεις Εμβιομηχανικής

Για να γίνει σωστή εκτίμηση του βαθμού φλεγμονής των μυών αλλά και της επίδρασης των σκευασμάτων ρεσβερατρόλης και του φορέα, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω μετρήσεις και ελήφθησαν φωτογραφίες τρισδιάστατες και απλές, στα σημεία των βλαβών στην αρχή, μέση και τέλος του πειράματος.

Άδηλη απώλεια νερού (TEWL)

Όργανο: MULTI PROBE ADAPTER MPA 6, TEWAMETER® TM 240 (Courage & Khazaka, Germany)

Σε φυσιολογικό δέρμα, υπάρχει συνεχής μετακίνηση νερού από τις κατώτερες προς τις ανώτερες στοιβάδες, όπου αυτό εξατμίζεται. Ο όρος που χρησιμοποιείται είναι η άδηλη απώλεια νερού. Περιγράφει το συνολικό ποσό ύδατος που εξατμίζεται από το δέρμα (g νερού /m^2 ανά ώρα), απώλεια που συμβαίνει συνεχώς με παθητική διάχυση δια μέσου της επιδερμίδας.

Τα κερατινοκύτταρα, ο παράγοντας NMF και τα λιπίδια της επιδερμίδας διατηρούν την άδηλη απώλεια νερού σε φυσιολογικά επίπεδα. Η άδηλη απώλεια νερού δεν είναι ορατή από γυμνό μάτι. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπολογίζεται ημερησίως εξάτμιση 300-400 ml νερού ημερησίως. Όταν συμβαίνει καταστροφή του δέρματος από φυσικούς ή χημικούς παράγοντες η λειτουργία του φραγμού επηρεάζεται και παρατηρείται αύξηση της άδηλης απώλειας νερού. Η απώλεια νερού μειώνει την ικανότητα του φραγμού ακόμα περισσότερο.

Η μέτρηση της άδηλης απώλεια νερού πραγματοποιήθηκε με το όργανο TEWAMETER® TM 240 (Courage-Khazaka, Germany). Η συγκεκριμένη παράμετρος μας δίνει την ικανότητα αξιολόγησης της λειτουργίας του φραγμού στο δέρμα. Μόλις εμφανιστεί η παραμικρή βλάβη, η τιμή της εξάτμισης αυξάνεται. Ο αισθητήρας μπορεί να μετρήσει τη διαφορά στην εξάτμιση του ύδατος μέσω ενός ζεύγους ανιχνευτών (ηλεκτροδίων), που διαθέτει (ένας για τη μέτρηση της θερμοκρασίας και ένας για τη μέτρηση της σχετικής υγρασίας). Η μέθοδος αυτή είναι μέθοδος ανοιχτού θαλάμου και είναι η μόνη μέθοδος για τη συνεχή αξιολόγηση της TEWL που δεν επηρεάζει το μικροπεριβάλλον του δέρματος. Ένας μικροεπεξεργαστής δίνει το ρυθμό εξάτμισης σε g/h/m^2.

Ενυδάτωση

Όργανο: MPA CT Plus CORNEOMETER® CM 820

Ως ενυδάτωση του δέρματος εκφράζεται η περιεκτικότητα της κεράτινης στοιβάδας σε νερό. Στην ρύθμιση αυτή σημαντικά συμβάλλουν οι υδρόφιλες ουσίες γνωστοί ως φυσικοί ενυδατικοί παράγοντες (Natural Moisturizing Factors, N.M.F.). Η ενυδάτωση του φυσιολογικού δέρματος κυμαίνεται μεταξύ 10-15 %, ενώ κάθε απόκλιση είναι αίτιο αλλά και ένδειξη αποσταθεροποίησης της λειτουργίας του φραγμού.

Η μέτρηση βασίζεται στην διηλεκτρική χωρητικότητα ενός μέσου. Το όργανο μετρά την μεταβολή στην διηλεκτρική σταθερά ενός μέσου λόγω της ενυδάτωσης της επιφάνειας του δέρματος, αλλάζοντας την χωρητικότητα ενός πυκνωτή ακριβείας. Με αυτό τον τρόπο η μέτρηση ανιχνεύει ακόμη και μικρές αλλαγές στο επίπεδο ενυδάτωσης του δέρματος.

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

Πάχος δέρματος

Όργανο: ψηφιακό παχύμετρο Powerfix Electronic Digital Caliper 150 nm

Το πάχος του δέρματος είναι σημαντική παράμετρος αξιολόγησης της φλεγμονής καθώς η αύξηση της αιμάτωσης στην περιοχή αλλά και η αντανακλαστική υπερκεράτωση αποτελούν κριτήρια εξέλιξης της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Το πάχος του δέρματος μετρήθηκε με τη χρήση του ψηφιακού παχύμετρου. Η ένδειξη του οργάνου ήταν σε mm.

Ερυθρότητα δέρματος

Όργανο: MEXAMETER® MX 18

Το ερύθημα είναι ένα από τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της φλεγμονής, καθώς κατά την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης τα αιμοφόρα αγγεία διαστέλλονται και αίμα που μεταφέρει προφλεγμονώδεις κυτοκίνες συρρέειι στην περιοχή.

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

Μελανίνη

Όργανο: MEXAMETER® MX 18

Η μελανίνη παράγεται φυσιολογικά στο δέρμα με στόχο την προστασία του από την υπεριώδη ακτινοβολία. Στο πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκαν άτριχοι αρσενικοί λευκοί μύες με χαρακτηριστικά χαμηλή έκφραση μελανίνης. Μετρήθηκαν τα επίπεδα μελανίνης στην αρχή και κατά τη διάρκεια του πειράματος για να αξιολογηθεί η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας αλλά και των σκευασμάτων ρεσβερατρόλης στην έκφραση της μελανίνης.

Η αρχή μεθόδου του οργάνου περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Η μελανίνη ανιχνεύεται σε διαφορετικό μήκος κύματος από την αιμοσφαιρίνη, που είναι ο δείκτης ερυθρότητας.

Σμήγμα

Όργανο: MPA CT Plus Sebumeter (Courage & Khazaka, Germany)

Το σμήγμα παράγεται φυσιολογικά στο δέρμα για να συμμετάσχει στον «όξινο μανδύα» προστασίας από εξωτερικές μολύνσεις και στην διατήρηση της ενυδάτωσης του δέρματος. Κατά την εμφάνιση φλεγμονής επαγόμενης από υπεριώδη ακτινοβολία, οι φυσιολογικές λειτουργίες του φραγμού διαταράσσονται. Το σμήγμα μετρήθηκε για την διερεύνηση της συσχέτισης της ανάπτυξης φλεγμονής με την φλεγμονώδη αντίδραση.

Μία ειδική προσροφητική ταινία έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δέρματος για 30 δευτερόλεπτα. Στην συνέχεια εισάγεται σε υποδοχή φωτόμετρου που μετρά την μεταβολή της απορρόφησης του φωτός σε σχέση με την ταινία που δεν έχει έρθει σε επαφή με το δέρμα, και ποσοτικοποιεί το σμήγμα που προσροφήθηκε.

pH δέρματος

Όργανο: CK MPA ANALYSIS pHmeter, (Courage & Khazaka, Germany)

Το pH του δέρματος είναι ενδεικτικό της κατάστασης της υγείας του. Το pH μετρήθηκε μόνο την τελευταία ημέρα λόγω της διαθεσιμότητας του οργάνου. Οι τιμές εκείνης της ημέρας συγκρίθηκαν με τιμές pH δέρματος υγιών άτριχων αρσενικών μυών τύπου SKH – 1 για την επιβεβαίωση της προόδου της θεραπείας κάθε ομάδας στο τέλος του πειράματος.

Φωτοτεκμηρίωση

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

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

Τρισδιάστατη απεικόνιση

Όργανο : Antera 3D CS, (Miravex Limited, Dublin, Ireland)

Η Antera 3D® είναι μία κάμερα υψηλής ανάλυσης τρισδιάστατης αποτύπωσης της επιφάνειας του δέρματος που χρησιμοποιεί LED φως σε επτά διαφορετικά μήκη κύματος. Το φως αυτό πηγάζει από διάφορες κατευθύνσεις και η κάμερα χρησιμοποιεί πολύπλοκους αλγόριθμους, που υπολογίζουν τη διαφορά μεταξύ των γωνιών ανάκλασης. Κατασκευάζει έτσι τρισδιάστατες εικόνες που επιτρέπουν τη μέτρηση παραμέτρων του δέρματος (βάθος και μήκος ρυτίδων, αριθμός, μέγεθος και βάθος πόρων κ.α.). Οι μετρήσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή αξιοπιστία (σφάλμα

±5%).. Αναλύοντας την ίδια εικόνα σε άλλα μήκη κύματος μπορεί και ποσοτικοποιεί και την μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη, κρίσιμες παράμετροι για τον χαρακτηρισμό της βλάβης του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Στο τέλος του πειράματος του πειράματος επιλέχθηκαν δύο μύες από κάθε ομάδα και το δέρμα τους στάλθηκε για ιστοπαθολογική εξέταση στο Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών. Πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης και παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά σε οπτικό μικροσκόπιο με σύστημα καταγραφής, τα σημεία της φλεγμονής, όπως: πυκνότητα και κατανομή μαστοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων κυττάρων του ανοσοποιητικού και ο βαθμός διήθησης του ιστού από αυτά, η πάχυνση και υπερπλασία της κεράτινης στοιβάδας (υπερκεράτωση

)

D. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ IN VITRO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

11. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΣ

11.1. Επιλογή Ποσοτικής Σύστασης Λιπαρής Φάσης με το λογισμικό FFE®

Στο λογισμικό FFE® ζητήθηκε να βελτιστοποιήσει την ποσοτική σύσταση της λιπαρής φάσης της κρέμας RSV που αναφέρεται στον *Πίνακα 1*.

Τα συστατικά της λιπαρής φάσης προς βελτιστοποίηση ήταν:

- Transcutol P (Ethoxydiglycol)
- Labrasol (PEG 8 Caprylic/ Capric Glycerides)

Οι προδιαγραφές της μορφοποίησης ήταν :

Προδιαγραφές βελτιστοποίησης	
Ποσοστό λιπαρής φάσης	30%
Ποσοστό RSV	5%
Ποσοστό επιφανειοδραστικών	5%
Βελτιστοποίηση ώς προς	Το δέρμα

Πίνακας 6. Προδιαγραφές μορφοποίησης όπως εισήχθησαν στο λογισμικό FFE®

Η προτεινόμενη σύσταση λιπαρής φάσης από το λογισμικό ήταν:

Σύσταση λιπαρής φάσης για 5% RSV	
Transcutol P	24%
Labrasol	76%

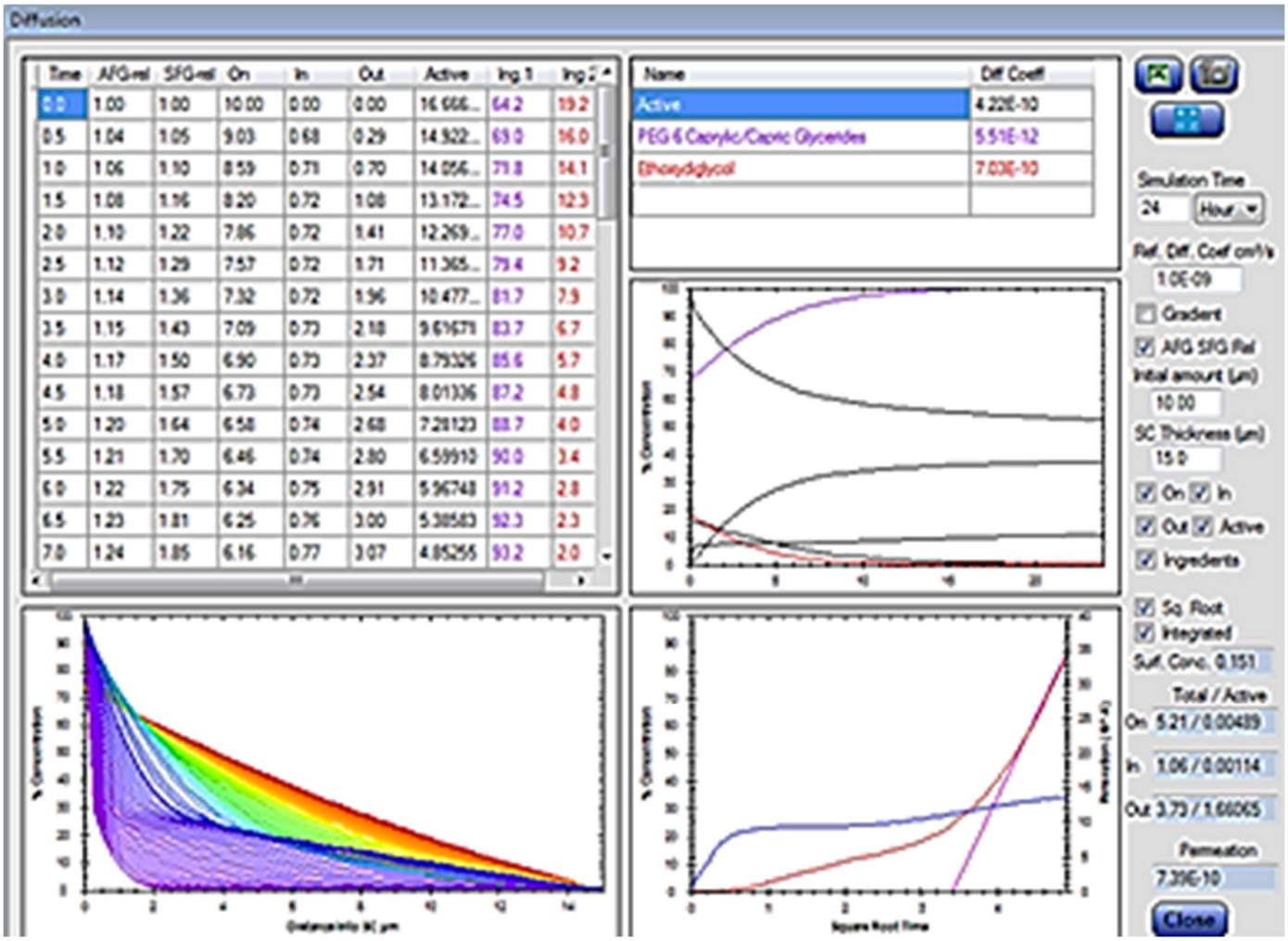
Πίνακας 7. Προτεινόμενη Σύσταση Λιπαρής Φάσης

Στη συνέχεια ζητήθηκε από το λογισμικό να προτείνει σύστημα επιφανειοδραστικών με τιμές παραμέτρων διαλυτότητας τέτοιες ώστε να διαλύουν καλά την RSV και να συμβάλλουν στην αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας με την βελτιστοποίηση των παραμέτρων δ της συνολικής μορφοποίησης προς αυτές της κεράτινης στοιβάδας

Προτεινόμενη Σύσταση Συστήματος Επιφανειοδραστικών	
Span 83	50%
Tween 80	50%

Πίνακας 8. Τα προτεινόμενα επιφανειοδραστικά απο το λογισμικό είχαν κατάλληλες τιμές δ και ήταν υγρά

Παρατίθεται και το διάγραμμα προσομοίωσης πειράματος διάχυσης για την βελτιστοποιημένη λιπαρή φάση.



Εικόνα D 1. Η προσομοίωση του πειράματος διάχυσης από το λογισμικό FFE ®

Οι τιμές των σημαντικών παραμέτρων βελτιστοποίησης για την προτεινόμενη μορφοποίηση φαίνονται παρακάτω:

Παράμετροι Βελτιστοποίησης Λιπαρής Φάσης	
AFG	12,2
SFG	10,9
AFG/SFG	1.1
ON	5,21/10
IN	1,06/10
OUT	3,73/10

Οι τιμές αυτές είναι ικανοποιητικές, καθώς το πηλίκο AFG/ SFG τείνει στην μονάδα, ενώ φαίνεται να διαπερνά την κεράτινη στοιβάδα περίπου το 50% της εφαρμοζόμενης δόσης.

Το πώς έχουμε ζητήσει από το λογισμικό να βελτιστοποιήσει την λιπαρή φάση φαίνεται από την αναλογία AFG > SFG, καθώς δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα στην μείωση της απόστασης της μορφοποίησης από το δέρμα, απ’ ότι από το δραστικό συστατικό .

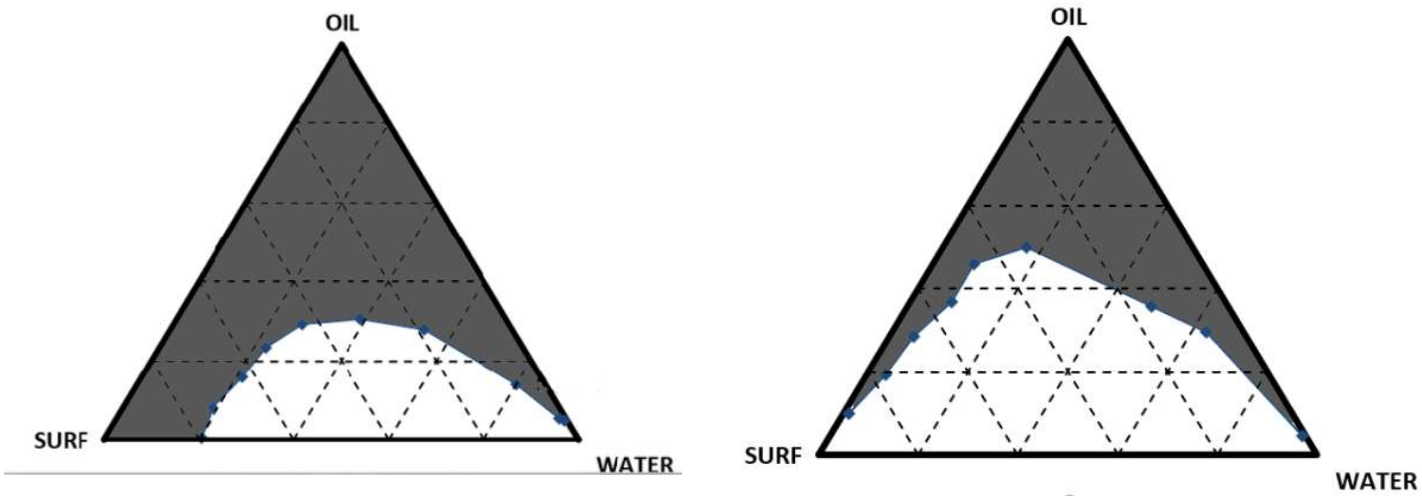
11.2. Διαγράμματα τριών φάσεων

Για την διερεύνηση της περιοχής ύπαρξης των μικρογαλακτωμάτων κατασκευάστηκαν διαγράμματα τριών φάσεων (pseudo – ternary phase diagrams) όπου :

S = Tween 80/ Span 83 (1:1) *(Διάγραμμα 1*) ή Span 83 (*Διάγραμμα 2)*

OIL = Transcutol P / Labrasol 24% / 76 %

WATER = Deionized Water



Εικόνα D 2. Αριστερά (Διάγραμμα 1) τριών φάσεων για μείγμα επιφανειοδαστικών (Tween 80:Span 83 1:1) και δεξιά (Διάγραμμα 2) μόνο με Span 83

Στα παραπάνω διαγράμματα η περιοχή ύπαρξης των μικρογαλακτωμάτων χρωματίζεται με γκρι. Είναι φανερό ότι η περιοχή ύπαρξης είναι μεγαλύτερη όταν γίνεται χρήση συστήματος επιφανειοδραστικών, ενός λιποδιαλυτού και ενός υδατοδιαλυτού, αντί για ένα μόνο λιποδιαλυτό επιφανειοδραστικό. Αυτό εξηγείται καθώς με τη χρήση δύο διαφορετικών επιφανειοδραστικών, η στοιβάδα που σχηματίζεται στην διεπιφάνεια των δύο φάσεων αποκτά μεγαλύτερη ρευστότητα και ευελιξία και αντιστέκεται περισσότερο στον διαχωρισμό (Tadros, 2013).

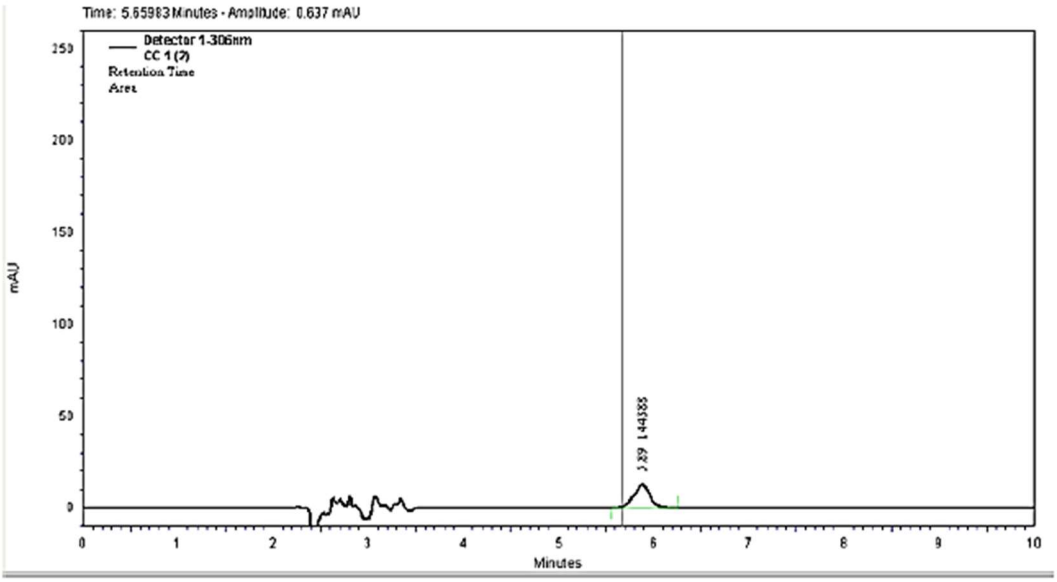
Έτσι επιλέχθηκε για την Παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων το σύστημα επιφανειοδραστικών **Tween 80 : Span 83 1:1.**

11.3. Διαλυτότητα Κορεσμού Ρεσβερατρόλης στα μικρογαλακτώματα

11.3.1. Μέθοδος HPLC

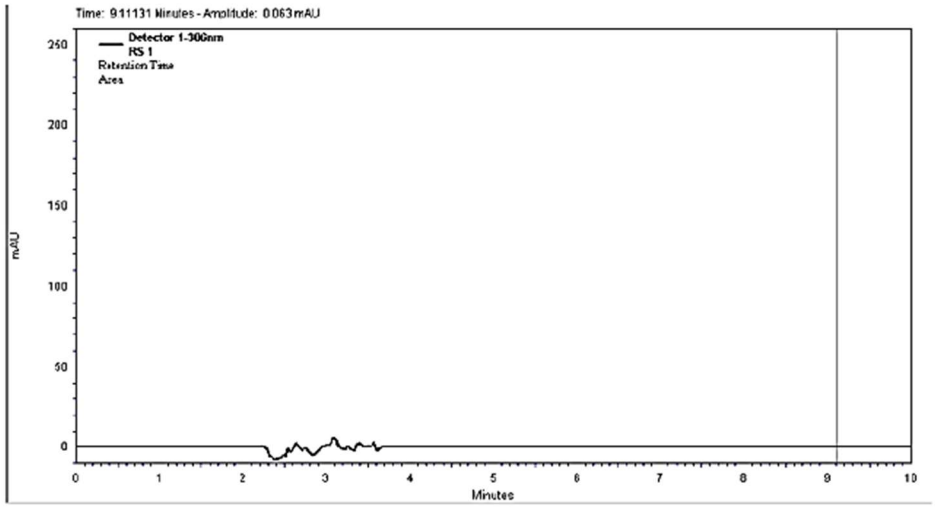
Εικόνα Χρωματογραφήματος

Στην εικόνα D3 φαίνεται μία τυπική κορυφή ενός χρωματογραφήματος πρότυπου διαλύματος της Ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 1 μg/mL σε διάλυμα του υποδοχέα. Η φαρμακολογικά δραστική ουσία εκλούεται στα 5.6 λεπτά.



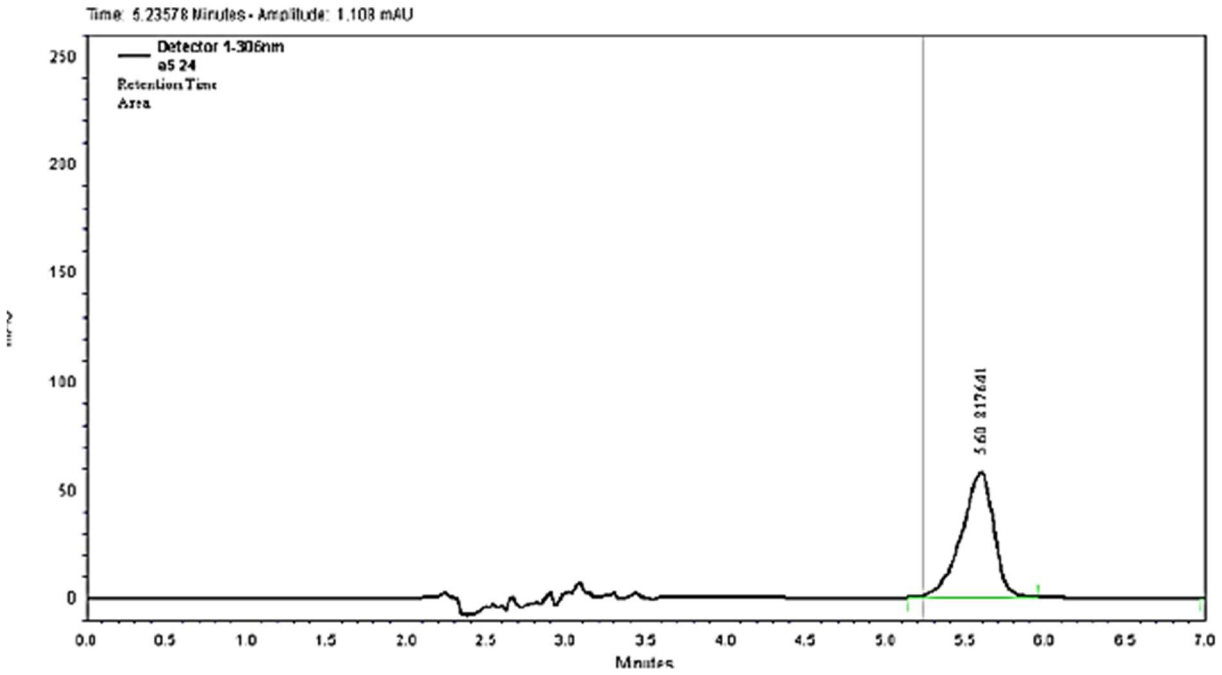
Εικόνα D 3. Η εικόνα του χρωματογραφήματος πρότυπου διαλύματος RSV συγκέντρωσης 1μg/mL σε διάλυμα υποδοχέα

Οι κορυφές, οι οποίες εμφανίζονται στο χρωματογράφημα της εικόνα D4, μεταξύ 2.5 και 3.5 λεπτών είναι αποτέλεσμα της σύστασης του διαλύματος του υποδοχέα.



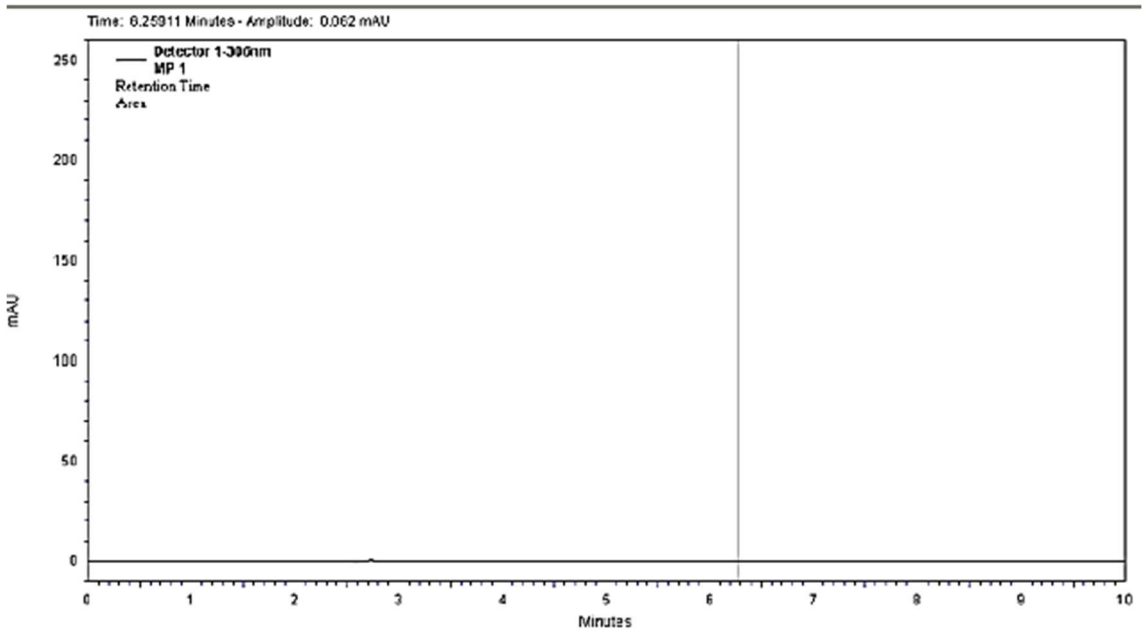
Εικόνα D 4. Χρωματογράφημα Διαλύματος Υποδοχέα PG : H_2O (50:50)

Παρακάτω απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα του διαλύματος του υποδοχέα ενός αγνώστου δείγματος Ρεσβερατρόλης από πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας με τη χρήση ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας ως φραγμό.



Εικόνα D 5. Χρωματογράγημα άγνωστου δείγματος ρεσβερατρόλη από πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

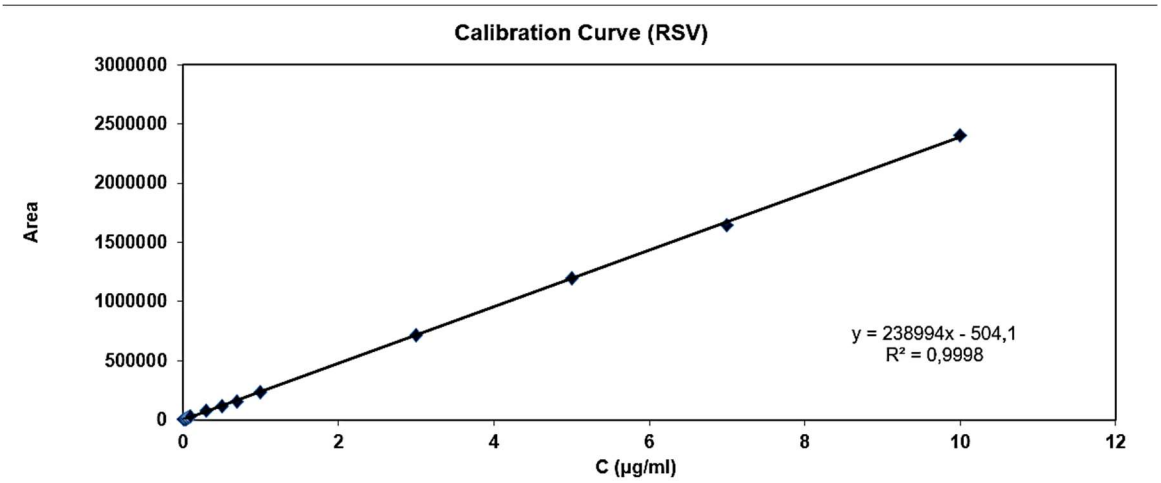
Τέλος φαίνεται παρακάτω πώς η κινητή φάση της ανάλυσης δεν επιφέρει καμία παρεμπόδιση στην ανάλυση.



Εικόνα D 6. Χρωματογράφημα Κινητής Φάσης ACN : H_20 (35:65)

Έλεγχος Γραμμικότητας

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων της Ρεσβερατρόλης, τα οποία παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3, χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους (y = ax + b), η κλίση (a, slope), η τεταγμένη επί την αρχή (b, intercept), καθώς και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R_2).



Εικόνα D 7. Καμπύλη αναφοράς Πρότυπων Διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα υποδοχέα

11.3.2. Υπολογισμός Διαλυτότητας Κορεσμού

Αποτελέσματα Ποσοτικοποίησης

Μικρογαλάκτωμα αναφοράς με σύσταση που φαίνεται παρακάτω δέχθηκε περίσσεια ρεσβερατρόλης (στερεό) και αφέθηκε 12 ώρες υπό ανάδευση για να διασφαλιστεί η περίσσεια Στη συνέχεια κατεργάστηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται στις μεθόδους της παρούσας μελέτης.

Με τον ίδιο τρόπο προετοιμάστηκαν τα δείγματα της υδατικής φάσης, της λιπαρής φάσης και του νερού. Κατά την φυγοκέντρηση παρατηρήθηκε διαχωρισμός του μικρογαλακτώματος και έτσι κατέστη δυνατή η ανάλυση της υδατικής και της λιπαρής φάσης ξεχωριστά.

Έκδοχο	%w/w
Oil Phase	29.17
Surfactant System	6.25
Water	64.59

Πίνακας 9.Η σύσταση του μικρογαλακτώματος Placebo που χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της διαλυτότητας κορεσμού RSV

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με HPLC είναι :

Έκδοχο	Συγκέντρωση κορεσμού RSV (g/g)
Oil Phase (μετά τον διαχωρισμό φάσεων)	7.067 ± 0.04
Oil Phase (πρίν τον διαχωρισμό φάσεων)	8,234 ± 0.32
Water (μετά τον διαχωρισμό φάσεων)	1.094 ± 0.055
Water (πριν τον διαχωρισμό φάσεων)	0,04 ±0.002

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ανάλυσης για την συγκέντρωση κορεσμού της RSV στα μικρογαλακτώματα

Υπολογισμοί

Η μεταβολή αυτή στην διαλυτότητα της ρεσβερατρόλη από την κάθε φάση ξεχωριστά στην αντίστοιχη φάση ύστερα από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση το σχηματισμένου μικρογαλακτώματος, δείχνει πως συμβαίνει μία ανακατανομή των εκδόχων κατά το σχηματισμό των μικρογαλακτωμάτων. Ακόμη φαίνεται πως μία ποσότητα ρεσβερατρόλης μπορεί να κατανεμηθεί και στην υδατική φάση, παρόλο που είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, καθώς χρησιμοποιείται σύστημα επιφανειοδραστικών, όπου το ένα από τα δύο είναι υδατοδιαλυτό. Τέλος για την διαλυτότητα της ρεσβερατρόλης στην υδατική φάση ενδέχεται να ευθύνεται και η μέτρια υδατοδιαλυτότητά του συνεπιφανειοδραστικού Transcutol. Το έκδοχο αυτό κατά τη μορφοποίηση βρίσκεται διαλυτοποιημένο στην λιπαρή φάση. Κατά το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος φαίνεται να κατανέμεται τόσο στην διεπιφάνεια των σταγονιδίων, όσο και στην υδατική φάση.

Από τα παραπάνω σχηματίστηκε ο παρακάτω τύπος που μας επέτρεψε να υπολογίσουμε την ποσότητα ρεσβερατρόλης που θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα μικρογαλάκτωμα για να βρίσκεται σε συγκέντρωση κορεσμού, σε κάθε συνταγή από τη μήτρα του σχεδιασμού, χωρίς να χρειαστεί να γίνει όλη η παραπάνω διεργασία για κάθε συνταγή.

$$msat_{RSV} = (W_{OIL\ PHASE} + W_{SPAN\ 83}) * 7.067 + (W_{TWEEN\ 80}) * 1.094$$

11.4. Μέγεθος Σταγονιδίων

Με βάση την μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού για το Σχεδιασμό Μειγμάτων που αναλύεται στις μεθόδους της μελέτης, παρασκευάστηκαν οι προτεινόμενες συνταγές χωρίς ρεσβερατρόλη, για να επιβεβαιωθεί ότι σε αυτές τις αναλογίες σχηματίζονται μικρογαλακτώματα. Σε αυτά μετρήθηκε το μέγεθος των σταγονιδίων με φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων με το όργανο Malvern Zetasizer. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα τα μεγέθη ήταν ικανοποιητικά (≤ 150 nm), με εξαίρεση 2 που εμφάνισαν ελαφριά θολερότητα και μέγεθος μεγαλύτερο από το αποδεκτό (Rum 3, Run 8).

Πίνακας 11. Μεγέθη Σταγονιδίων για τα μικρογαλακτώματα με και χωρίς ρεσβερατρόλη

ΜΕΓΕΘΟΣ ΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ

Run	Placebo		RSV t = 24 h		RSV t = 30d	
	μ (nm)	PDI	μ (nm)	PDI	μ (nm)	PDI
1	55.9	0.162	161.4	0.506	-	-
2	112.9	0.287	126	0.449	134.7	0.403
3	330.2	0.249	608	0.458	-	-
4	15.2	0.113	146.6	0.340	131.1	0.544
5	79.2	0.201	168	0.505	-	-
6	117	0.602	113.6	0.640	148.4	0.297
7	65.2	0.464	90.1	0.531	-	-
8	170.3	0.207	-	-	-	-
9	107.2	0.578	116.2	0.521	129.9	0.534
10	50.7	0.132	-	-	-	-
11	86.3	0.235	154.2	0.485	-	-
12	81.8	0.532	93.5	0.50	-	-
13	16.1	0.210	178.7	0.334	187.6	0.294
14	73	0.198	130.2	0.445	-	-
15	23.6	0..229	-	-	-	-
16	58	0.422	83.6	0.512	-	-
17	85.8	0.225	127.6	0.432	149.6	0.410

11.4.1. Μεταβολή κατά την ενσωμάτωση RSV και ύστερα από 30 ημέρες

Αφού υπολογίστηκε η απαραίτητη μάζα ρεσβερατρόλης ώστε σε κάθε συνταγή η ρεσβερατρόλη να βρίσκεται σε συγκέντρωση ίση με το 90% της συγκέντρωσης κορεσμού (για να αποφευχθεί η καθίζηση), παρασκευάστηκαν τα μικρογαλακτώματα ρεσβερατρόλης. Οι συνταγές 8, 10 και 15 δεν κατάφεραν να σχηματίσουν σταθερό σύστημα και επήλθε αμέσως διαχωρισμός φάσεων. Στη συνέχεια μετρήθηκε το μέγεθος των σταγονιδίων τους σε 24 ώρες από την παρασκευή για την διερεύνηση της επίδρασης της ενσωμάτωσης της ρεσβερατρόλης στα συστήματα. Τα μεγέθη των σταγονιδίων μετρήθηκαν και 30 ημέρες μετά, για την αξιολόγηση της σταθερότητάς τους.

Run	Δ (Placebo – RSV)		Δ (24h – 30d)	
	Δμ %	Δ(PDI)%	Δμ %	Δ(PDI)%
1	188,73	212,35	-	-
2	11,60	56,45	-6,9	10,24
3	20,95	83,94	-	-
4	897,28	128,19	10,37	-60
5	112,12	151,24	-	-
6	-2,91	6,31	-30.64	53,6
7	38,19	14,44	-	-
8	-	-	-	-
9	8,40	-9,86	-11,79	-2,5
10	-	-	-	-
11	78,68	106,38	-	-
12	14,3	3,38	-	-
13	1009,94	59,05	-4,99	12,0
14	78,36	124,75	-	-
15	-	-	-	-
16	44,14	21,33	-	-
17	48,72	92	-17,24	5,10

Πίνακας 12. Επι τις εκατό μεταβολή μεγέθους σταγονιδίων και πολυδιασποράς κατά την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης στα Placebo και ύστερα από 30 ημέρες

Όπου αναγράφεται (-) αντί για τιμή, δεν ήταν δυνατή η μέτρηση του μεγέθους των σταγονιδίων λόγω θολερότητας. Η θολερότητα είναι ένδειξη αύξησης του μεγέθους των σταγονιδίων του μικρογαλακτώματος προς άλλα συστήματα κολλοειδούς διασποράς, όπως μικκύλια μεγαλύτερου μεγέθους σταγονιδίων, ή ένδειξη διαχωρισμού φάσεων. Σε μερικές περιπτώσεις η θολερότητα εμφανίζεται σε σταθερά συστήματα με την αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από το σημείο νέφωσης του συστήματος των επιφανειοδραστικών. Μετά από αυτό το σημείο ένα μικρογαλάκτωμα λ/ν ή ν/λ μετατρέπεται σε σταθερές ημισυνεχείς δομές που σκεδάζουν το φως διαφορετικά και εμφανίζουν ελαφρώς υπογαλακτώδη χρώση και θολερότητα (Stubenrauch, 2009; Tadros, 2013).

Η τιμές της πολυδιασποράς αναλύονται καθώς είναι ένδειξη του τύπου μικρογαλακτώματος. Ένα μικρογαλάκτωμα λ/ν ή ν/λ θα έχει ομοιόμορφο μέγεθος σταγονιδίων και μικρή πολυδιασπορά. Ένα μικρογαλάκτωμα Winsor III (Bicontinuous Structures) δεν αποτελείται από σταγονίδια αλλά από διπλοστοιβάδες επιφανειοδραστικών διαφόρων μεγεθών και υψηλής ρευστότητας. Αυτές οι δομές σκεδάσουν το φως με διαφορετικό τρόπο, δίνοντας μεγαλύτερα των αποδεκτών μεγέθη σταγονιδίων και μεγάλη πολυδιασπορά.

Κατά την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του μεγέθους πολλών συνταγών. Αυτό εξηγείται με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ρεσβερατρόλης. Η ρεσβερατρόλη είναι ένα μόριο μέτριας πολικότητας. Ακόμη το σύστημα των επιφανειοδραστικών έχει επιλεγεί κατά το σχεδιασμό της μορφής ώστε να διαλυτοποιεί καλά τη ρεσβερατρόλη, με παραμέτρους διαλυτότητας κοντά σε αυτές του μορίου της. Κατά συνέπεια, φαίνεται λογικό το μόριο της ρεσβερατρόλης να παρεμβάλλεται των μορίων των επιφανειοδραστικών στην διεπιφάνεια και να μεταβάλλει τη ρευστότητα της μεμβράνης και το μέγεθος των σταγονιδίων ή το είδος των δομών που θα σχηματίσει.

Τέλος, μετά το πέρας 30 ημερών πολλά μικρογαλακτώματα είχαν εμφανίσει θολερότητα οπότε και δεν αναλύθηκαν, για να μην υπόκειται η μελέτη στο παραπάνω σφάλμα. Παρόλ' αυτά, τα συστήματα που μετρήθηκαν και στις 30 ημέρες φαίνεται να παραμένουν σταθερά, καθώς εμφανίζουν οριακά αρνητική % μεταβολή του μεγέθους των σταγονιδίων και της αντίστοιχης πολυδιασποράς.

Να σημειωθεί εδώ ότι κατά τις τελευταίες μέρες διεξαγωγής των μετρήσεων επικρατούσαν ακραίες περιβαλλοντικές θερμοκρασίες (>35^{o}C), οπότε και ενδέχεται η θολερότητα να οφείλεται σε μεταβολή του τύπου του μικρογαλακτώματος (από I,II σε III), όπου σε θερμοκρασίες πάνω από το σημείο νέφωσης των επιφανειοδραστικών εμφανίζεται αντιστρεπτή θολερότητα λόγω αύξησης του μεγέθους των Bicontinuous Structures (Israelachvili, 1994; Moulik & Paul, 1998; Tadros, 2013).

11.5. Μέτρηση pH

pH ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ			
Run	**Placebo**	**RSV t = 24 h**	**RSV t = 30d**
1	4,87	5,2	5
2	5,11	6,1	5,51
3	3,71	5.5	4,03
4	3,54	4,53	4,42
5	4,04	5.5	5,23
6	5,09	6,2	5,99
7	4,5	5.5	5
8	3,33	4	4,05
9	5,04	6,27	5,92
10	4,5	5.5	5,8
11	4	5	5,22
12	4,64	5.5	5,72
13	3,47	4,56	4,3
14	4,1	5.5	5,41
15	3,34	4.4	3,9
16	4,25	5.6	5,76
17	4,3	6,04	5,67

Πίνακας 13. Μετρήσεις pH για τα μικρογαλακτώματα Placebo και RSV σε 24h και 30 ημέρες

Το pH των μικρογαλακτωμάτων αντιστοιχεί σε τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας, οπότε και εξαρτάται από την φύση της εξωτερικής τους φάσης. Εν προκειμένω έχουν σχεδιαστεί ώστε να είναι o/w ενώ υπάρχει το ενδεχόμενο να σχηματίζονται και κάποιες Bicontinuous δομές. Σε κάθε περίπτωση το pH θα εξαρτάται από το τί βρίσκεται διαλυμένο στην υδατική φάση. Το εύρος των τιμών των μικρογαλακτωμάτων Placebo είναι [3,33 – 5,11]. Οι τιμές αυτές αυξάνονται συστηματικά κατά την ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης και το εύρος γίνεται [4,4-6,2] . Στα μικρογαλακτώματα με τιμές μικρότερες του 5 παρατηρήθηκε ελαφριά καφέ χρώση μετά την μέτρηση του μεγέθους των σταγονιδίων τους με DLS. Τα υπόλοιπα παρέμειναν κίτρινα. Να

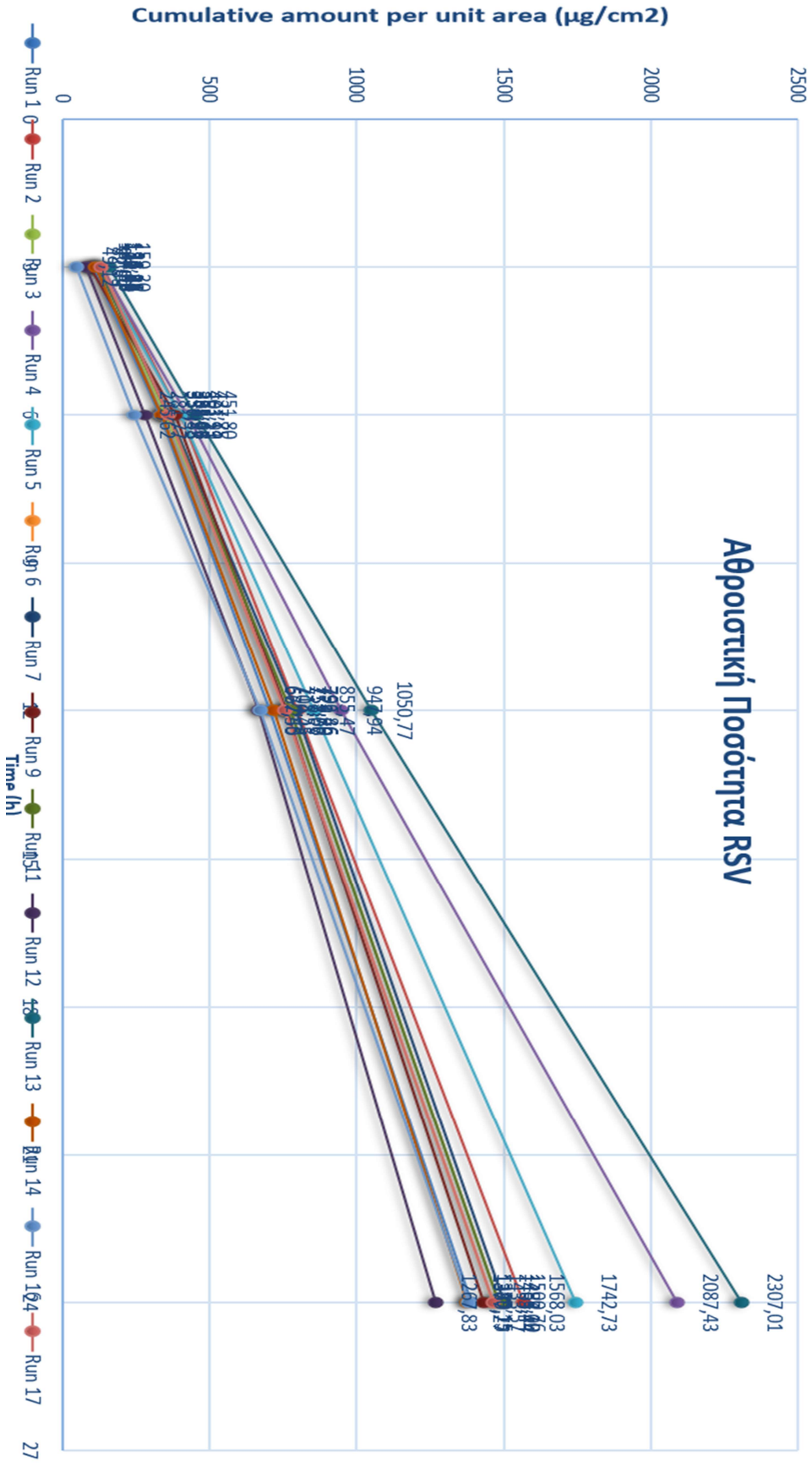
σημειωθεί ότι η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε μετά την μέτρηση του μεγέθους σταγονιδίων. Η καφέ χρώση είναι ένδειξη οξείδωσης της ρεσβερατρόλης από την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Έτσι συμπεραίνεται ότι μικρογαλακτώματα στα οποία η ρεσβερατρόλη οξειδώνεται εμφανίζουν πτώση στο pH από τιμές 5,5-6 προς 3,5-4,5 ελαφρώς πιο όξινες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και με την πάροδο του χρόνου των 30 ημερών, παρά την φύλαξη των μικρογαλακτωμάτων σε σκοτεινό ντουλάπι και την κάλυψη των φιαλιδίων με φύλλο αλουμινίου.

11.6. In vitro πείραμα διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη Strat - M®

11.6.1. Αθροιστική Ποσότητα διαπέρασης

Αθροιστική Ποσότητα Ρεσβερατρόλης				
	Χρονικά σημεία			
Run	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
1	104.358±28,02	330.476±67,61	704.455±134,95	1389.15±211,76
2	125.314 ± 27,11	371.267 ± 73,16	738.372± 143,37	1472.99±232,84
3	121.763±6,39	348.966±23,95	775.79±45,09	1484.09±50,68
4	134.106±5,17	427.75±15,48	947.941±75,17	2083.22±193,48
5	122.728±13,42	403.991±51,44	855.47±114,55	1742.73±391,81
6	133.815±16,99	358.465±30,99	757.058±50,45	1465.44±73,09
7	120.844±11,44	365.637±8,67	792.461±34,11	1500.76±51,81
8	-	-	-	-
9	96.9041±0,49	383.215±36,20	758.573±47,88	1433.57±33,61
10	-	-	-	-
11	127.329±15,56	362.051±22,93	774.759±45,98	1483.1±64,18
12	82.3259±7,10	281.77±10,50	667.498±19,99	1267.83±11,39
13	159.297±8,47	451.801±36,95	1050.77±73,86	2307.01±233,83
14	114.852±19,43	337.88±38,21	718.526±60,24	1377.27±120,47
15	-	-	-	-
16	49.1243±2,18	245.624±18,64	672.448±7,18	1380.75±37,20
17	133.815±18,65	358.465±34,64	757.058±56,41	1465.44±81,71

Πίνακας 14. Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή (μg/cm2). Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι ± τυπική απόκλιση (SD) για n=3

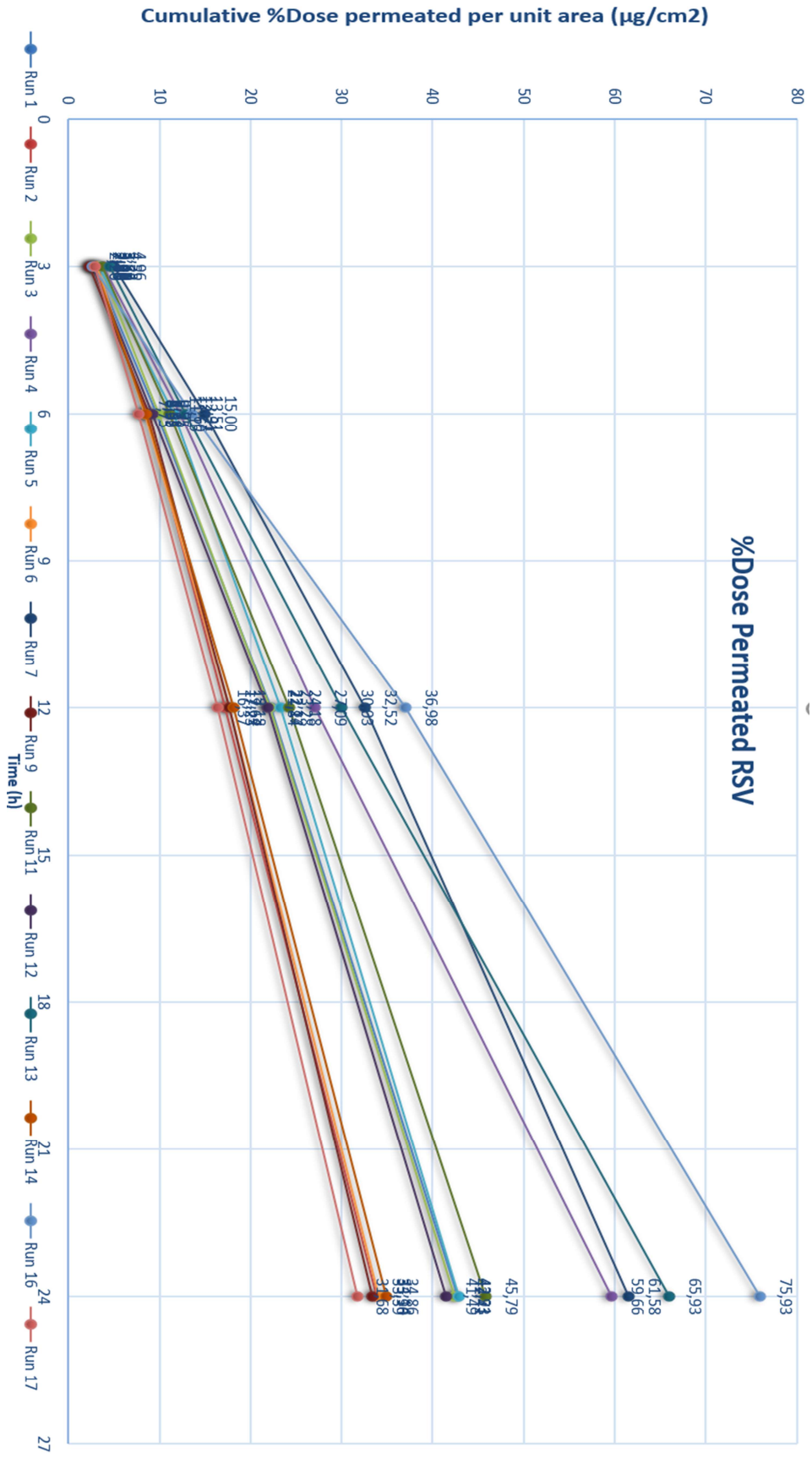


Πίνακας 15. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης ανα μονάδα επιφάνειας Q(µg/cm2)

11.6.2. Αθροιστική διαπέραση ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης

Όπως φάνηκε από τους υπολογισμούς για την συγκέντρωση κορεσμού για κάθε συνταγή, κάθε μικρογαλάκτωμα περιέχει διαφορετική απόλυτη ποσότητα και συγκέντρωση ρεσβερατρόλης. Για να μπορέσουν τα μικρογαλακτώματα να συγκριθούν μεταξύ τους ώς προς την απόδοση κατά τη διαπέραση με σωστό τρόπο θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε τον όρο %Δόση που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας.

% Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε				
	Χρονικά σημεία			
Run	**3h**	**6h**	**12h**	**24h**
1	2.88239±0,43	9.74962±0,59	22.2443±1,58	42.7277±1,76
2	2.94842±0,02	8.67182±0,07	17.2276±0,05	33.9±0,1
3	3.47989±0,18	9.97315±0,68	22.1714±1,29	42.414±1,45
4	3.83262±0,17	12.2247±0,49	27.0913±2,4	59.6568±6,33
5	3.39755±0,16	11.6018±2,07	23.2809±0,29	42.9138±0,12
6	3.1171±0,43	8.35013±0,81	17.635±1,31	34.1363±1,9
7	4.95851±0,47	15.0029±0,36	32.5165±1,40	61.5796±2,13
8	-	-	-	-
9	2.2573±0,01	8.92665±0,84	17.6703±1,12	33.3938±0,78
10	-	-	-	-
11	3.68724±0,35	11.1565±0,26	24.1799±1,04	45.7918±1,58
12	2.69421±0,23	9.22126±0,34	21.8446±0,65	41.4913±0,37
13	4.55257±0,24	12.9121±1,06	30.030±2,11	65.9324±6,68
14	2.90672±0,49	8.5512±0,97	18.1847±1,52	34.8565±3,05
15	-	-	-	-
16	2.70152±0,12	13.5077±1,03	36.9803±0,40	75.9321±2,05
17	2.893±0,40	7.7498±0,75	16.3671±1,22	31.682±1,77



Πίνακας 16.Αθροιστική ποσοστιαία Δόση διαπέρασης ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας

11.6.3. Στατιστική Ανάλυση Αθροιστικής Διαπέρασης και Αθροιστικής %Δόσης

Κρίνοντας από τη αθροιστική διαπέραση στις 24h, η βέλτιστη συνταγή φαίνεται να είναι η 13 με διαπέραση 2307,01 μg/cm^2. Στην %Δόση διαπέρασης βλέπουμε μία διαφορετική εικόνα, όπου η συνταγή 16 φαίνεται ώς βέλτιστη, καθώς διαπερνά την τεχνητή μεμβράνη 75% της δόσης ρεσβερατρόλης που εφαρμόστηκε στο διαμέρισμα του δότη (1818 μg/cm^2) . Αυτό αντιστοιχεί σε 1380μg/cm^2. Αντίστοιχα για τη συνταγή 13, φαίνεται να διαπέρασε το 65% της δόσης που εφαρμόστηκε στο διαμέρισμα του δότη.

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι

- Για την αθροιστική διαπέραση ρεσβερατρόλης ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας μεμβράνης, στις δειγματοληψίες των 3h,6h,12h,24h τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή και οι συνταγές εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την αθροιστική διαπέραση.
- Για την αθροιστική διαπέραση ρεσβερατρόλης ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας μεμβράνης, εκφρασμένη ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης ανά τετραγωνικό εκατοστό, στις δειγματοληψίες των 3h,6h,12h,24h τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή και οι συνταγές εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς την %Δόση που διαπέρασε..

11.7. Βελτιστοποίηση μικρογαλακτώματος με το λογισμικό Design Expert®

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA). Παρακάτω απεικονίζεται η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού συμπεριλαμβανομένων των τιμών των αποκρίσεων, δηλαδή η αθροιστική διαπέραση στις 24h (μg/cm^2), η αθροιστική %Δόση Διαπέρασης, το μέγεθος των σταγονιδίων και η σταθερότητα .

Run	Component 1 A:OIL	Componen... B:S	Component 3 C:W	Response 1 particle si... nm	Response 5 24h % Dose...	Response 9 24 h Cumulati... μg/cm2	Response 10 Stability t = 0
1	0.29166	0.0624506	0.645889	161.4	42.7277	1389.15	1
2	0.411324	0.0886758	0.5	126	33.9	1472.99	1
3	0.344111	0.01	0.645889	608	42.414	1484.09	0.1
4	0.49	0.01	0.5	146.6	59.6568	2083.22	0.1
5	0.29166	0.0624506	0.645889	168	42.9138	1742.73	1
6	0.332648	0.167352	0.5	113.6	34.1363	1465.44	1
7	0.19249	0.0886758	0.718834	90.1	61.5796	1500.76	0.5
8	0.198221	0.01	0.791779	~~1000~~	~~0.01~~	~~0.01~~	0.1
9	0.332648	0.167352	0.5	116.2	33.3938	1433.57	1
10	0.0523315	0.01	0.937668	~~1000~~	~~0.01~~	~~0.01~~	0.1
11	0.29166	0.0624506	0.645889	154.2	45.7918	1483.1	1
12	0.239209	0.114901	0.645889	93.5	41.4913	1267.83	1
13	0.49	0.01	0.5	178.7	65.9324	2307.01	0.1
14	0.351492	0.0755632	0.572945	130.2	34.8565	1377.27	1
15	0.271166	0.01	0.718834	~~1000~~	~~0.01~~	~~0.01~~	0.1
16	0.14577	0.0624506	0.791779	83.6	75.9321	1380.75	0.5
17	0.411324	0.0886758	0.5	127.6	31.682	1465.44	1

Εικόνα D 8. Η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού και οι τιμές των αποκρίσεων μέγεθος σωματιδίων, %Αθροιστική Δόση, Αθροιστική διαπέραση και Σταθερότητα. Οι συνταγές 8,10,15 δεν αναλύθηκαν λόγω διαχωρισμού φάσεων (Design Expert® – DX 11)

Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της ανάλυσης της διασποράς (ANOVA). Για κάθε απόκριση επιλέγεται το καταλληλότερο μοντέλο σύμφωνα με προτάσεις που κάνει το λογισμικό ύστερα από υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρους για την καταλληλότητα προσαρμογής του κάθε μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

11.7.1. Μέγεθος σταγονιδίων (24h από την παρασκευή)

Fit Summary

Response 1: particle size

Transform: Inverse

Mixture Component Coding is L_Pseudo.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0.0324	0.0004	0.3666	0.0260	
Quadratic	**< 0.0001**	**0.2827**	**0.9664**	**0.9157**	**Suggested**
Special Cubic	0.6473	0.1877	0.9628	0.8128	
Cubic	0.1877		0.9733		Aliased
Sp Quartic vs Quadratic	0.2827		0.9733		
Quartic vs Cubic					Aliased
Quartic vs Sp Quartic					Aliased

Fit Statistics

Std. Dev.	0.0005	**R^2**	0.9793
Mean	0.0077	**Adjusted R^2**	0.9664
C.V. %	6.27	**Predicted R^2**	0.9157
		Adeq Precision	32.2512

Εικόνα D 9. Το μοντέλο και η στατιστική σηματνικότητα που περιγράφουν καλύτερα την κατανομή του μεγέθους των σταγονιδίων των μικρογαλακτωμάτων (Design Expert® – DX 11)

Το μοντέλο που περιγράφει καλύτερα τα δεδομένα φαίνεται να είναι το Quadratic. Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στον έλεγχο της τιμής p, η οποία αντιστοιχεί στη πιθανότητα η τιμή F (λόγος διαδειγματικής προς ενδοδειγματική μεταβλητότητα) να είναι μεγαλύτερη από τη κρίσιμη τιμή F_{crit}, τιμή η οποία προκύπτει από κατάλληλους πίνακες. Στην περίπτωση κατά την οποία η τιμή p για το μοντέλο είναι μεγαλύτερη από 0.05, δηλαδή $F<F_{crit}$, τότε το επιλεγμένο μοντέλο δεν είναι στατιστικά σημαντικό σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% ή αλλιώς η διαδειγματική μεταβλητότητα είναι μικρότερη σε σχέση με την ενδοδειγματική (τυχαίο σφάλμα). Επίσης, αξιολογήθηκε η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) του μοντέλου στα δεδομένα (σύγκριση σφάλματος υπολοίπων – residuals – με το καθαρό σφάλμα) και η πιθανότητα αυτή να οφείλεται σε θόρυβο.

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 (R – squared) αποτελεί το μέτρο της διακύμανση των δεδομένων γύρω από τη μέση τιμή, η οποία εξηγείται από το προσαρμοζόμενο σε αυτά μοντέλο. Όσο η τιμή του συντελεστή αυτού προσεγγίζει τη μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου

στα δεδομένα. Στην προκειμένη περίπτωση η τιμή του R^2 ισούται με 0.9793, 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 τη μέση τιμή, η οποία εξηγείται από το προσαρμοσμένο σε αυτά μοντέλο, λαμβάνοντας όμως υπόψη τους βαθμούς ελευθερίας, οι οποίοι συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων του μοντέλου. Η τιμή του συντελεστή αυτού μειώνεται, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των όρων, οι οποίοι υπάρχουν στο μοντέλο, χωρίς να προσθέτουν αξία σε αυτό. Όσο η τιμή του R^2adj προσεγγίζει τη μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην παρούσα ανάλυση η τιμή του adjusted R^2 ισούται με 0.9664, γεγονός που δηλώνει 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. Ο συντελεστής R2pred λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν καιμονάδας, ενώ όσο η τιμή του προσεγγίζει τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Σε αυτήν την περίπτωση η τιμή του predicted R^2 ισούται με 0.9157.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως θα πρέπει η διαφορά μεταξύ του προσαρμοσμένου συντελεστή συσχέτισης και του προβλεπόμενου συντελεστή συσχέτισης να είναι μικρότερη του 0.2 [R^2adj – R^2pred < 0.2]. Σε διαφορετική περίπτωση απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων, καθώς και εξέταση μετασχηματισμού της απόκρισης ή χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Στην προκειμένη περίπτωση η διαφορά αυτή είναι μικρότερη από 0.2, όπως φαίνεται κι από την Εικόνα D9.

Το στατιστικό μέγεθος Adequate Precision (Adeq Precision) συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης, δηλαδή υπολογίζεται η αναλογία "σήματος προς θόρυβο" (signal to noise ratio). Η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής για τιμές μεγαλύτερες του τέσσερα. Το μοντέλο είναι κατάλληλο, προκειμένου να χαρτογραφηθεί ο χώρος σχεδιασμού.

Παρακάτω φαίνεται η ανάλυση διασποράς για το μοντέλο που επιλέχθηκε.

ANOVA for Quadratic model

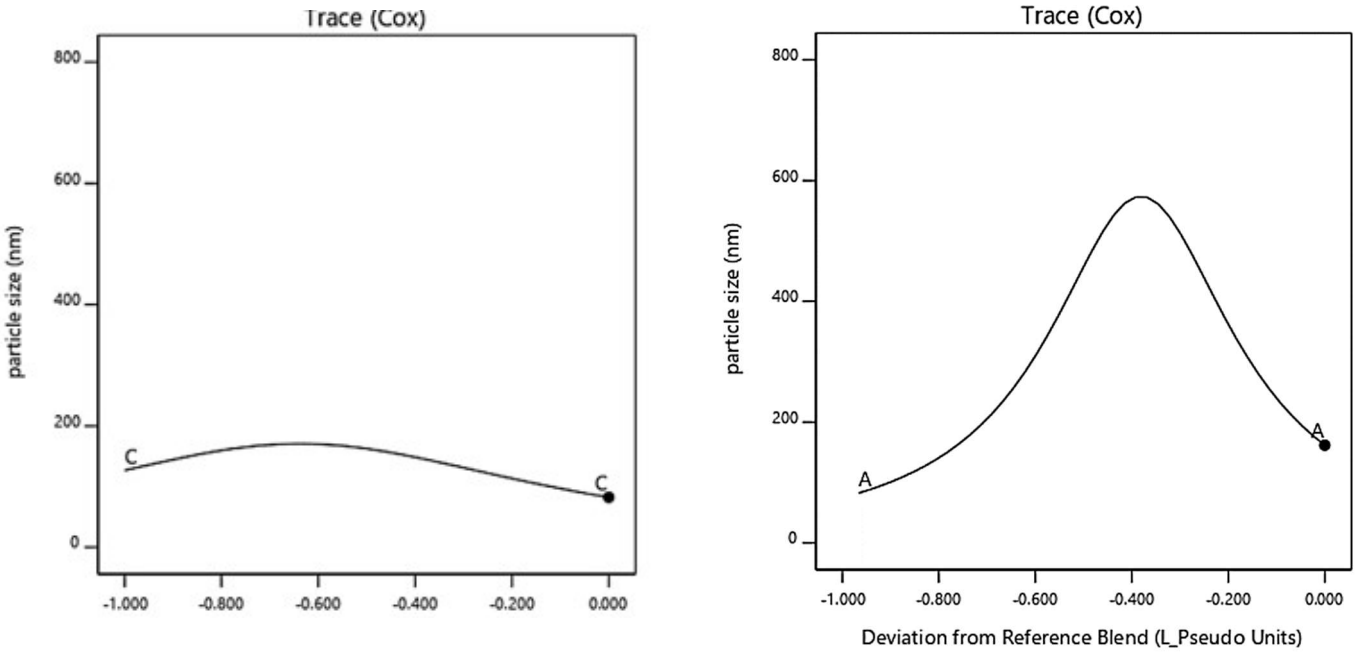
Response 1: particle size
Transform: Inverse

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.0001	5	0.0000	75.78	< 0.0001	significant
[1]Linear Mixture	0.0000	2	0.0000	89.76	< 0.0001	
AB	6.085E-07	1	6.085E-07	2.63	0.1434	
AC	0.0000	1	0.0000	96.07	< 0.0001	
BC	9.896E-06	1	9.896E-06	42.81	0.0002	
Residual	1.849E-06	8	2.312E-07			
Lack of Fit	9.321E-07	3	3.107E-07	1.69	0.2827	not significant
Pure Error	9.173E-07	5	1.835E-07			
Cor Total	0.0001	13				

Εικόνα D 10. ANOVA για το κυβικό μοντέλο που ακολουθούν τα μεγέθη των σταγονιδίων (Design Expert® – DX11)

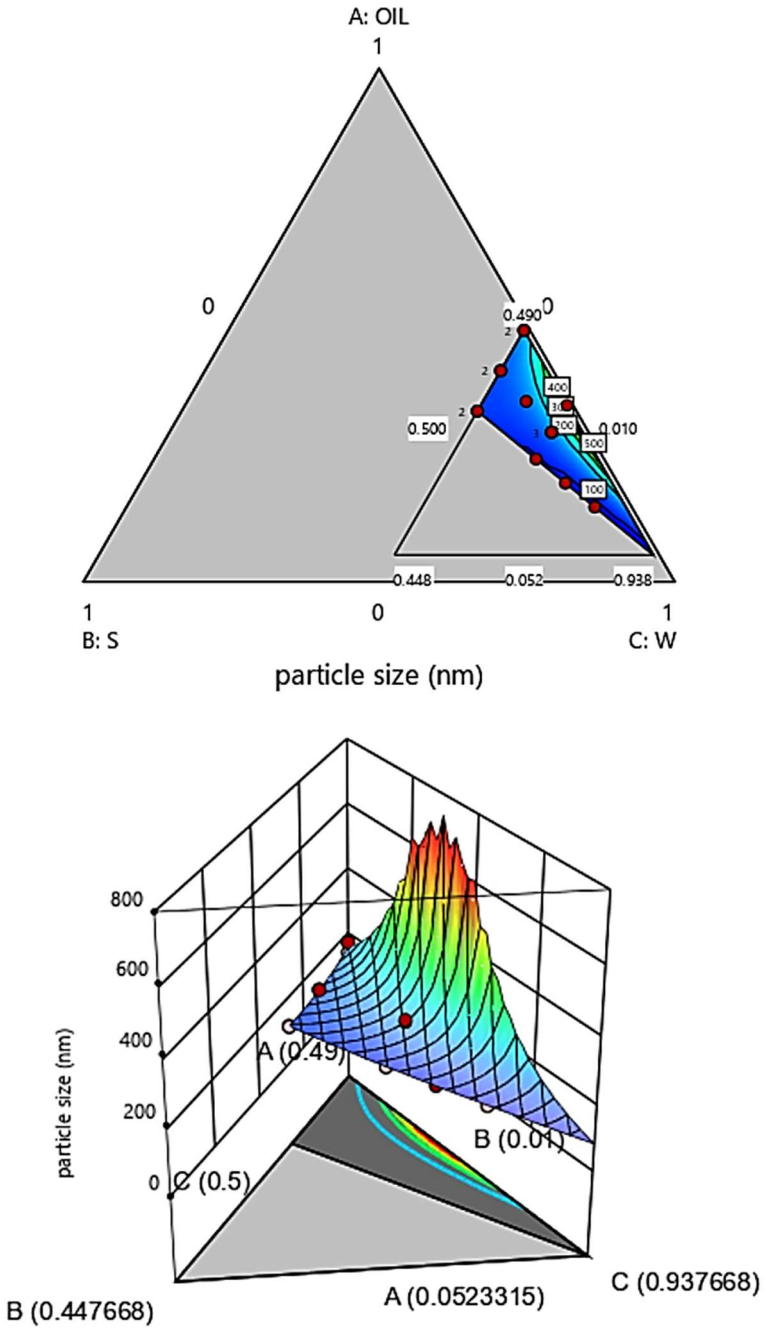
Συμπεραίνεται ότι εκτός από το μοντέλο, στατιστικά σημαντική είναι η αλληλεπίδραση AC (Oil - Water), καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα C (Water) και του παράγοντα B(Surfactant, καθώς η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$).

Σύμφωνα με το διάγραμμα Trace (Cox) της Εικόνας συμπεραίνεται ότι τα μεγαλύτερα μεγέθη σταγονιδίων σχηματίζονται για ενδιάμεσες τιμές του παράγοντα C (Water).



Εικόνα D 11.Διάγραμμα Trace Cox που δείχνει πως μεταβάλλεται το μέγεθος των σταγονιδίων με τη μεταβολή του παράγοντα C (Water) και A (Oil) (Design Expert® – DX11)

Στις παρακάτω Εικόνες απεικονίζεται ο χώρος σχεδιασμού (Design Space), ο οποίος προέκυψε με βάση τους περιορισμούς που τέθηκαν για τρία συστατικά σε δύο και τρεις διαστάσεις στο χώρο, αντίστοιχα. Οι περιοχές με το μπλε χρώμα αντιστοιχούν στις χαμηλές τιμές μεγεθών σταγονιδίων για τις διαφορετικές αναλογίες των τριών συστατικών, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από τις μπλε και προσεγγίζονται οι κόκκινες περιοχές, τα μεγέθη αυξάνονται. Αξίζει να αναφερθεί ότι το μικρότερο μέγεθος που παρατηρήθηκε είναι 83,6nm, ενώ το μεγαλύτερο προσεγγίζει τα 608 nm και φαίνεται να ανήκει σε σύστημα που αποσταθεροποιήθηκε ύστερα από την μέτρηση DLS



Εικόνα D 12. Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11)

11.7.2. Αθροιστική ποσότητα διαπέρασης 24h

Ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία αναλύθηκαν και οι υπόλοιπες σημαντικές αποκρίσεις για την βελτιστοποίηση του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης. Για την περιγραφή των δεδομένων της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης ρεσβερατρόλης φαίνεται να εφαρμόζεται καλύτερα το γραμμικό μοντέλο (p=0.007<0.05) ενώ το Lack of Fit δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Οι τιμές των R^2, AdjR^2, PredR^2, AdeqPrecision είναι ικανοποιητικές όπως φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Η διαφορά R^2Adj – R^2Pred < 0.2 είναι αποδεκτή.

Fit Summary

Response 9: 24 h CumulativeDose permeated

Transform: Natural Log
Constant: 0

Mixture Component Coding is L_Pseudo.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	**0.0070**	**0.1337**	**0.5206**	**0.3354**	**Suggested**
Quadratic	0.1680	0.1832	0.6375	0.0677	
Special Cubic	0.3889	0.1424	0.6303	-3.5719	
Cubic	0.1424		0.7627		Aliased
Sp Quartic vs Quadratic	0.1832		0.7627		
Quartic vs Cubic					Aliased
Quartic vs Sp Quartic					Aliased

Fit Statistics

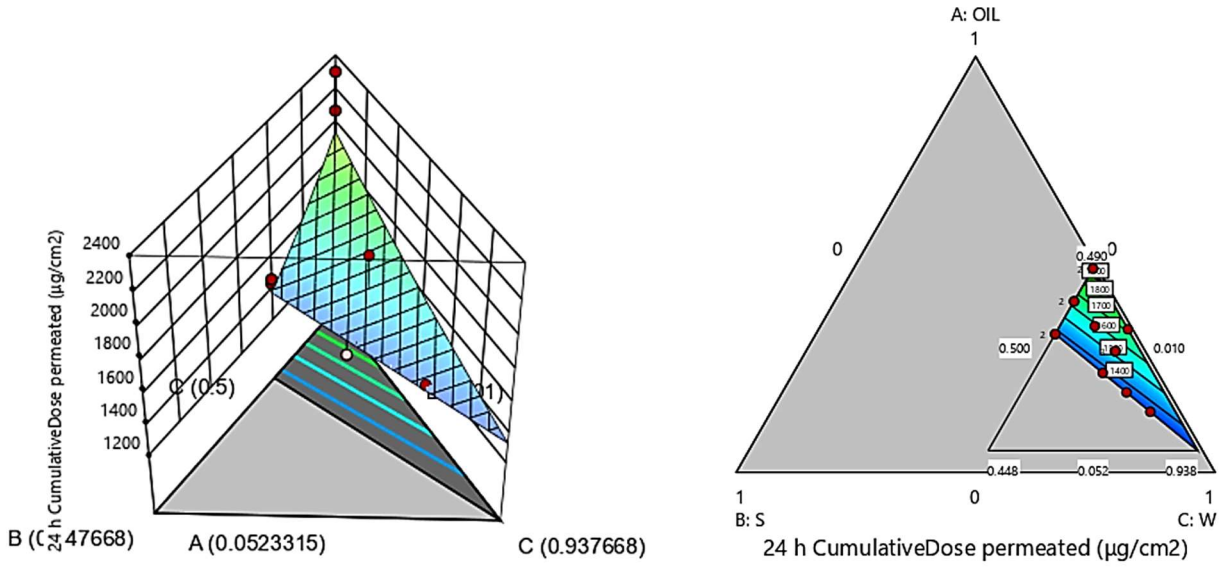
Std. Dev.	0.1149		**R^2**	0.5944
Mean	7.34		**Adjusted R^2**	0.5206
C.V. %	1.57		**Predicted R^2**	0.3354
			Adeq Precision	7.0815

ANOVA for Linear model

Response 9: 24 h CumulativeDose permeated
Transform: Natural Log
Constant: 0

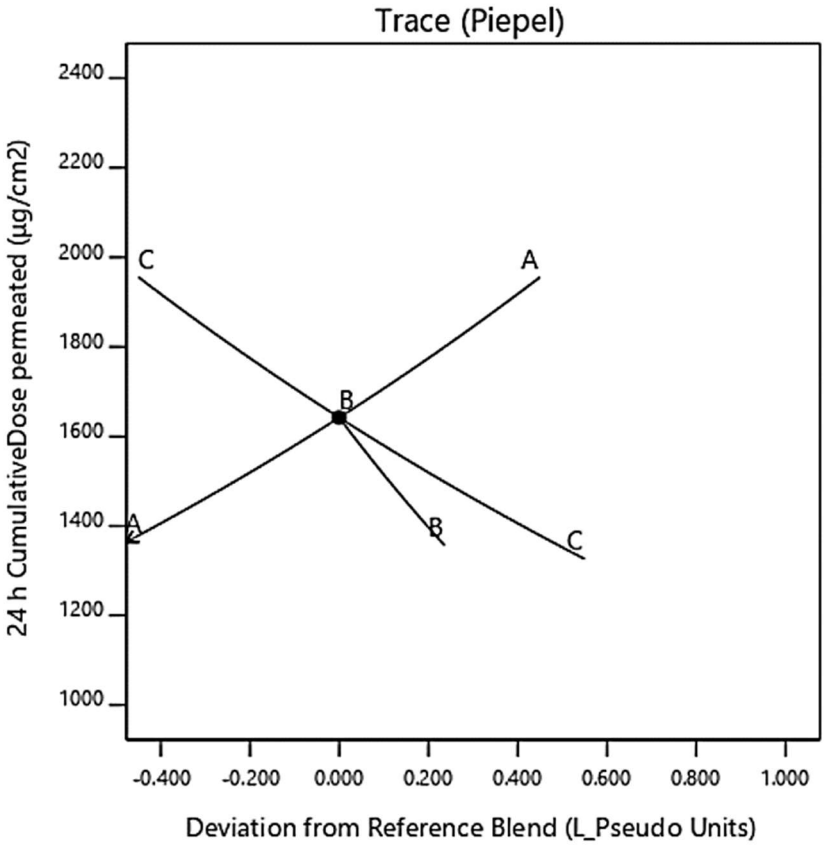
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0.2129	2	0.1065	8.06	0.0070	significant
[1]Linear Mixture	0.2129	2	0.1065	8.06	0.0070	
Residual	0.1453	11	0.0132			
Lack of Fit	0.1126	6	0.0188	2.87	0.1337	not significant
Pure Error	0.0327	5	0.0065			
Cor Total	0.3583	13				

Εικόνα D 13. Σύνοψη της καταλληλότητας του γραμμικού μοντέλου και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης RSV στις 24h (Design Expert® – DX11)



Εικόνα D 14.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11)

Από τα τρισδιάστατα διαγράμματα της επιφάνειας της απόκρισης φαίνεται πώς η διαπέραση αυξάνεται (πράσινη περιοχή) στην περιοχή με περισσότερο έλαιο (A) και λιγότερο νερό (C). Από το διάγραμμα Trace – Piepel φαίνεται πως όσο αυξάνεται το ποσοστό του ελαίου (A) και μειώνεται το ποσοστό του νερού (C) αυξάνεται και η διαπέραση .



Εικόνα D 15. Διάγραμμα Trace Piepel για την αθροιστική διαπέραση RSV στις 24h (Design Expert® – DX11)

11.7.3. Επί τις εκατό Δόση διαπέρασης 24h

Για την περιγραφή των δεδομένων της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης ρεσβερατρόλης εκφρασμένο ώς ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης (%Dose 24h) φαίνεται να εφαρμόζεται καλύτερα το Quadratic μοντέλο ($p<0.05$) ενώ το Lack of Fit δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Οι τιμές των R^2, $AdjR^2$, $PredR^2$, AdeqPrecision είναι ικανοποιητικές όπως φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Η διαφορά $R^2Adj - R^2Pred < 0.2$ είναι αποδεκτή.

Fit Summary

Response 5: 24h % Dose perm

Mixture Component Coding is L_Pseudo.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0.0349	0.0005	0.3579	-0.0449	
Quadratic	**< 0.0001**	**0.0605**	**0.9293**	**0.7821**	**Suggested**
Special Cubic	0.1838	0.0646	0.9383	0.0610	
Cubic	0.0646		0.9711		Aliased
Sp Quartic vs Quadratic	**0.0605**		**0.9711**		**Suggested**
Quartic vs Cubic					Aliased
Quartic vs Sp Quartic					Aliased

Fit Statistics

Std. Dev.	3.73		**R^2**	0.9565
Mean	46.17		**Adjusted R^2**	0.9293
C.V. %	8.07		**Predicted R^2**	0.7821
			Adeq Precision	17.9840

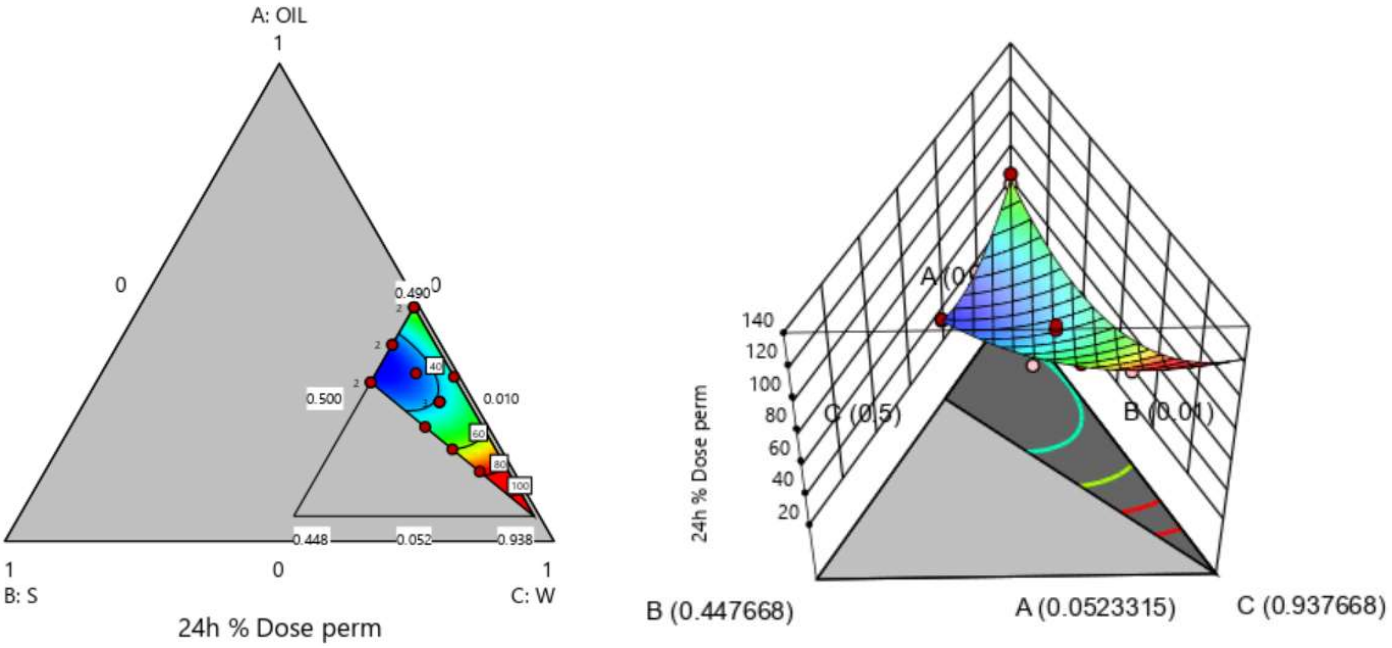
ANOVA for Quadratic model

Response 5: 24h % Dose perm

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	2439.71	5	487.94	35.15	< 0.0001	significant
[1]Linear Mixture	1164.90	2	582.45	41.96	< 0.0001	
AB	277.42	1	277.42	19.98	0.0021	
AC	644.98	1	644.98	46.46	0.0001	
BC	48.08	1	48.08	3.46	0.0998	
Residual	111.06	8	13.88			
Lack of Fit	82.73	3	27.58	4.87	0.0605	not significant
Pure Error	28.33	5	5.67			
Cor Total	2550.77	13				

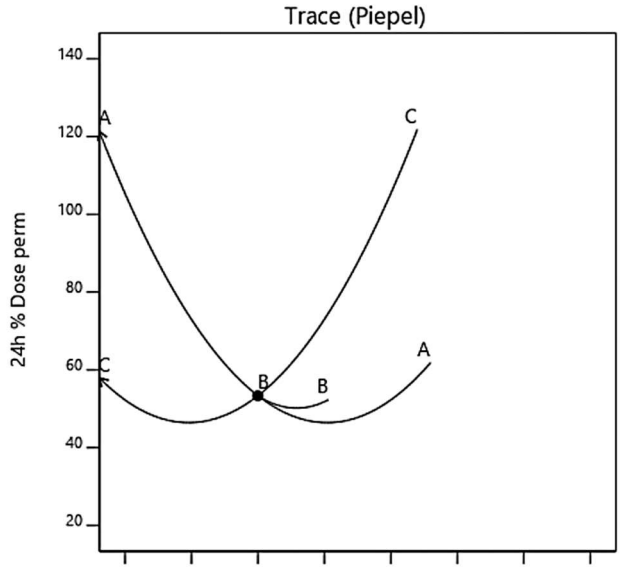
Εικόνα D 16. Σύνοψη της καταλληλότητας του μοντέλου Quadratic και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της αθροιστικής ποσότητας διαπέρασης RSV ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης, στις 24h (Design Expert® – DX11)

Από την παραπών ανάλυση φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά εκτός από το μοντέλο και η αλληλεπίδραση του ποσοστού του ελαίου (A) και με το ποσοστό του επιφανειοδραστικού (B) και αντίστοιχα η αλληλεπίδραση του ποσοστού του νερού (C) και με το ποσοστό του επιφανειοδραστικού (B).



Εικόνα D 17.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX11)

Από τα διαγράμματα της επιφάνειας απόκρισης διακρίνονται δύο περιοχές όπου μεγιστοποιείται το ποσοστό της Δόσης που διαπερνά (πράσινες περιοχές). Αυτό φαίνεται να συμβαίνει για συνταγές με μέτριο ποσοστό επιφανειοδραστικού και ελαίου αλλά και για συνταγές με ελάχιστο ποσοστό επιφανειοδραστικού, μικρό ποσοστό νερού και πολύ μεγάλο ποσοστό ελαίου.



Εικόνα D 18. Διάγραμμα Trace Piepel για την αθροιστική διαπέραση % RSV στις 24h (Design Expert® – DX11)

Τα συμπεράσματα αυτά είναι συμβατά με τις στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις της ανάλυσης διασποράς, και επιβεβαιώνονται από το διάγραμμα Trace – Piepel παρακάτω. Αυτό δείχνει πως διαμορφώνονται οι δύο περιοχές μέγιστης % διαπέρασης, μία για υψηλό ποσοστό ελαίου (A) και χαμηλό νερού (C), και μία για υψηλό ποσοστό νερού (C) και σχετικά όμοια επίπεδα ελαίου (A) και επιφανειοδραστικού (B).

11.7.4. Σταθερότητα Μικρογαλακτωμάτων

Η ποιοτική απόκριση της σταθερότητας των μικρογαλακτωμάτων στις 24 h μετά την Παρασκευή τους εκφράστηκε αριθμητικά όπως περιγράφεται στις μεθόδους της μελέτης, με τα σταθερά να παίρνουν την τιμή 1, αυτά που εμφάνισαν καφέ χρώση που αντιστοιχεί σην οξείδωση της ρεσβερατρόλης και αυτά που επήλθε διαχωρισμός φάσεων 0,1 και αυτά που εμφάνισαν θολερότητα με την αύξηση της θερμοκρασίας 0,5.

Για την περιγραφή των δεδομένων σταθερότητας των μικρογαλακτωμάτων φαίνεται να εφαρμόζεται καλύτερα το Special Quartic μοντέλο ($p<0.05$) ενώ το Lack of Fit δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Οι τιμές των R^2, $AdjR^2$, $PredR^2$, AdeqPrecision είναι ικανοποιητικές όπως φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Η διαφορά $R^2Adj - R^2Pred < 0.2$ είναι αποδεκτή.

ANOVA for Special Quartic model

Response 10: Stability t = 0
Transform: Inverse

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	302.14	8	37.77	217.40	< 0.0001	significant
(1)Linear Mixture	199.12	2	99.56	573.10	< 0.0001	
AB	26.38	1	26.38	151.84	< 0.0001	
AC	0.0005	1	0.0005	0.0029	0.9586	
BC	3.98	1	3.98	22.90	0.0014	
A^2BC	5.80	1	5.80	33.36	0.0004	
AB^2C	5.76	1	5.76	33.15	0.0004	
ABC^2	0.0073	1	0.0073	0.0421	0.8425	
Residual	1.39	8	0.1737			
Lack of Fit	1.39	3	0.4633			
Pure Error	0.0000	5	0.0000			
Cor Total	303.53	16				

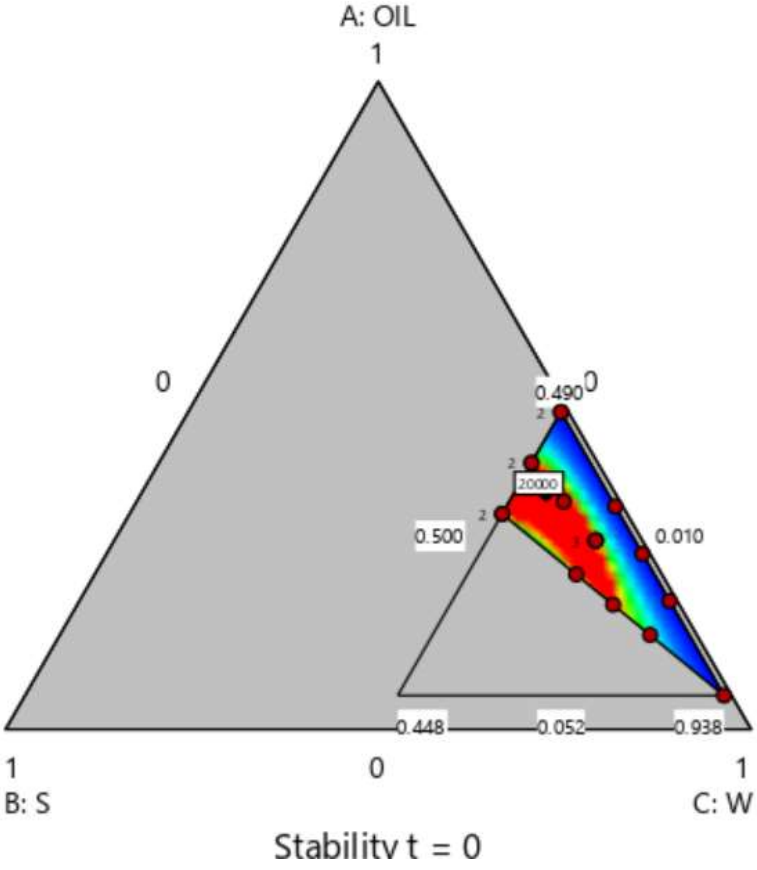
Fit Statistics

Std. Dev.	0.4168		**R^2**	0.9954
Mean	4.29		**Adjusted R^2**	0.9908
C.V. %	9.71		**Predicted R^2**	0.8877
			Adeq Precision	31.5703

Εικόνα D 19.Σύνοψη της καταλληλότητας του Special Quartic μοντέλου και των στατιστικών παραμέτρων του για την περιγραφή της σταθερότητας μικρογαλάκτωματων RSV (Design Expert® – DX11)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντικά, εκτός από το μοντέλο, και η αλληλεπίδραση ελαίου (A) – Επιφανειοδραστικου (B), και Επιφανειοδραστικού (B) – Νερού

(C). Αυτό φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα απόκρισης, όπου παρατηρείται μία περιοχή με βέλτιστη σταθερότητα (κόκκινη), στην οποία εντοπίζονται συνταγές με ισορροπημένη σύσταση ελαίου και επιφανειοδραστικού (πάνω αριστερά), αλλά και συνταγές με μειωμένο έλαιο, αυξημένο επιφανειοδραστικό και νερό (κάτω αριστερά).



Εικόνα D 20.Response Surface Contour Plot (Design Expert® – DX1

11.7.5. Αριθμητική Βελτιστοποίηση

Η αριθμητική βελτιστοποίηση είχε στόχο την εύρεση της βέλτιστης συνταγής μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης, η οποία θα ήταν σταθερή φυσικοχημικά, θα είχε ελάχιστο μέγεθος σταγονιδίων για να αυξάνεται η διαδερμική διαπερατότητα και θα είχε μέγιστη τιμή %δόσης διαπέρασης και αθροιστικής διαπέρασης στο 24h. Με αυτά τα κριτήρια τέθηκαν οι εξής απαιτήσεις στο λογισμικό:

	Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
	A:OIL	is in range	0.0523315	0.49	1	1	3
	B:S	is in range	0.01	0.167352	1	1	3
	C:W	is in range	0.5	0.937668	1	1	3
	particle size	minimize	0.00164474	0.0119617	1	1	5
	24h % Dose perm	maximize	31.682	75.9321	1	1	4
	24 h CumulativeDose permeated	maximize	7.14506	7.74371	1	1	3
	Stability t = 0	minimize	1	10	1	1	5

Εικόνα D 21. Οι απαιτήσεις (Constraints) που τέθηκαν για την βελτιστοποίηση (Design Expert® – DX11)

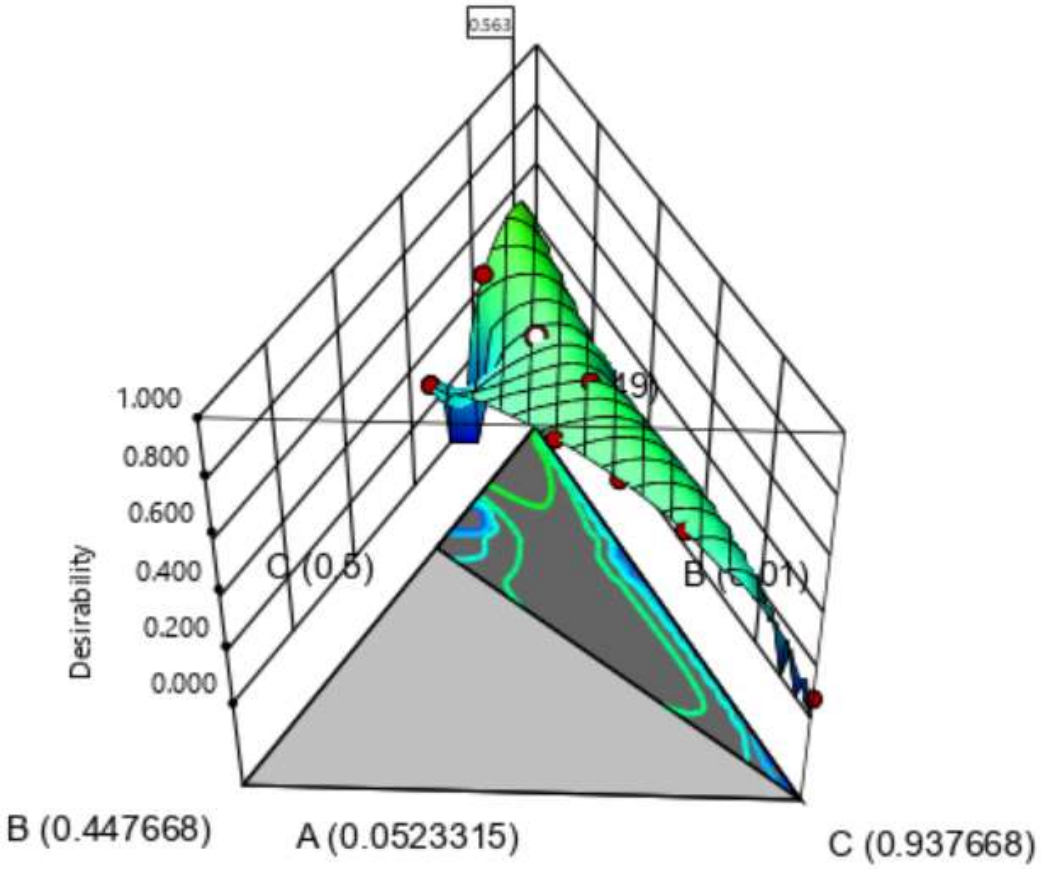
Number	OIL	S	W	particle size	24h % Dose perm	24 h CumulativeDose permeated	Stability t = 0	Desirability	
1	**0.457**	**0.043**	**0.500**	**140.106**	**47.216**	**1802.670**	**0.194**	**0.563**	**Selected**
2	0.253	0.070	0.678	129.498	46.418	1451.248	0.967	0.439	

Εικόνα D 22. Προτεινόμενες λύσεις του πειραματικού Σχεδιασμού (Design Expert® – DX11)

Όπως φαίνεται παραπάνω, από το λογισμικό προτάθηκαν δύο λύσεις – συνταγές. Από τη σύστασή τους φαίνεται η μία να αντιστοιχεί στην περιοχή όπου μεγιστοποιείται η αθροιστική διαπέραση, με μέγιστη συγκέντρωση ελαίου, και η δεύτερη στην περιοχή που εμφανίζεται κατά την ανάλυση της επί τις εκατό αθροιστικής διαπέρασης, όπου επικρατούν ισορροπημένες αναλογίες ελαίου και επιφανειοδραστικού.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εάν λάβουμε υπόψη τον συνεπιφανειοδραστικό χαρακτήρα του Transcutol καθώς και το γεγονός ότι σε πολλές παρασκευές μικρογαλακτωμάτων το Labrasol χρησιμοποιείται και ώς επιφανειοδραστικό. Φαίνεται λοιπόν το μείγμα συστατικών που αποτελεί την λιπαρή φάση να εμφανίζει επιφανειοδραστικό χαρακτήρα και να μπορεί να επηρεάζει τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα των μικρογαλακτωμάτων.

Οι παραπάνω περιοχές φαίνονται και στο διάγραμμα επιφάνειας συνάρτησης επιθυμητότητας.



Εικόνα D 23. Διάγραμμα επιφάνειας συνάρτησης επιθυμητότητας (Design Expert® – DX11)

Όπως φαίνεται από την πρόβλεψη που κάνει το λογισμικό για την σταθερότητα της βέλτιστης συνταγής 1, η συνταγή αυτή βρίσκεται σε περιοχή που χαρακτηρίζεται από χαμηλή σταθερότητα. Τα μικρογαλακτώματα που αντιστοιχούν σε αυτές τις συνθέσεις παρουσίασαν αλλαγή χρώματος, λόγω οξείδωσης της ρεσβερατρόλης.

Παρασκευάστηκαν και οι δύο προτεινόμενες βέλτιστες συνταγές, όπως φαίνονται παρακάτω, και συγκρίθηκαν In Vitro με τη βέλτιστη συνταγή κρέμας RSV και πηκτώματος RSV. Η βέλτιστη συνταγή μικρογαλακτώματος θα προκύψει ύστερα από την In vitro σύγκριση.

OPTIMIZED MICROEMULSION 1 (RSV 3%)	
Έκδοχο	**%w/w**
Labrasol	33.67
Transcutol	10,63
Tween 80	2.08
Span 83	2.08
Water	48.47
RSV	3.07

Πίνακας 17. Συνταγή βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 3%

OPTIMIZED MICROEMULSION 2 (RSV 1.9%)	
Έκδοχο	**%w/w**
Labrasol	19.6
Transcutol	6.19
Tween 80	3.48
Span 83	3.48
Water	65.41
RSV	1.93

Πίνακας 18. Συνταγή Βελτιστοποιημένου μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9%

12. IN VITRO ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

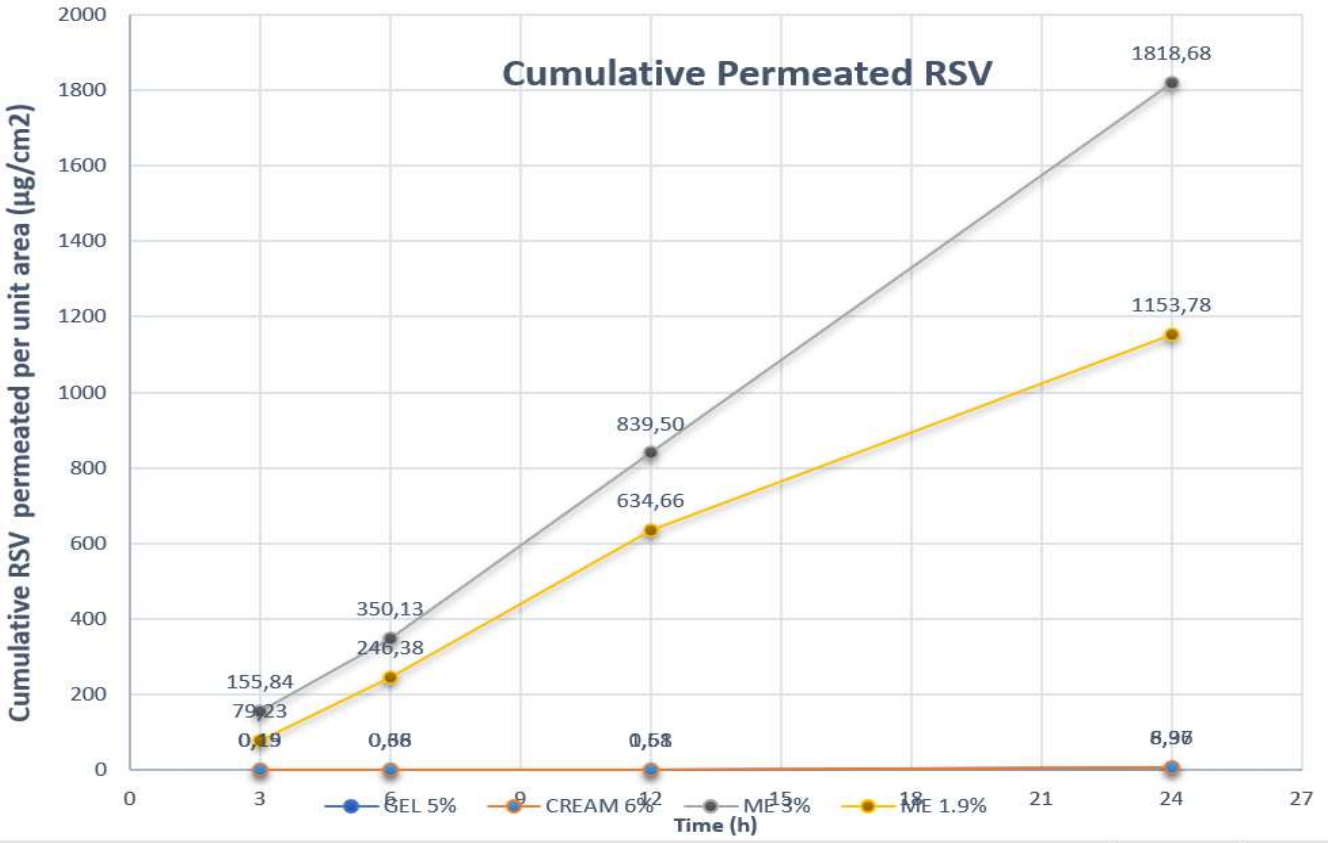
12.1. In vitro πείραμα διάχυσης με τεχνητή μεμβράνη Strat – M ®

12.1.1. Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q (μg/cm²)

Ο Πίνακας 14 και το διάγραμμα της Εικόνας D24 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, Q (μg/cm2), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations).

Time Points	ME RSV 1.9%	ME RSV 3%	CREAM RSV 6%	GEL RSV 5%
3h	79.23±18.51	155.84±11.56	0.19±0.02	0.15±0.01
6h	246.38±64.49	350.13±18.53	0.68±0.02	0.36 ± 0.02
12h	634.66±109.44	839.50±9.71	1.61±0.25	0.58±0.02
24h	1153,78±137.08	1818.68±18.88	8.36±3.03	6.97±1.62

Πίνακας 19.Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q(μg/cm2), που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD



Εικόνα D 24. Διάγραμμα Αθροιστικής ποσότητας ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφανείας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux, *J*, μgcm^{-2}h^{-1}), επειδή η ροή υπολογίζεται από το γραμμικό τμήμα των καμπυλών, το οποίο συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους (Barry, 2001).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για κάθε συνταγή για κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας έδειξε πως:

- Τα δεδομένα σε κάθε δειγματοληψία ακολουθούν κανονική κατανομή
- Η κρέμα RSV δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανένα χρονικό σημείο, από το πήκτωμα ρεσβερατρόλης ($p < 0.05$)
- Τα μικρογαλακτώματα RSV εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την κρέμα RSV και το πήκτωμα RSV, σε κάθε χρονική στιγμή
- Το μικρογαλάκτωμα RSV 3% εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το μικρογαλάκτωμα RSV 1.9% σε όλα τα χρονικά σημεία.

Είναι προφανές από το διάγραμμα ότι η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη από τα μικρογαλακτώματα 1,9% και 3% είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα που διαπέρασε από το πήκτωμα και το μικρογαλάκτωμα, παρόλο που η δόση που περιέχεται στα μικρογαλακτώματα είναι πολύ μικρότερη από τη δόση ρεσβερατρόλης που περιέχεται στο πήκτωμα και στην κρέμα

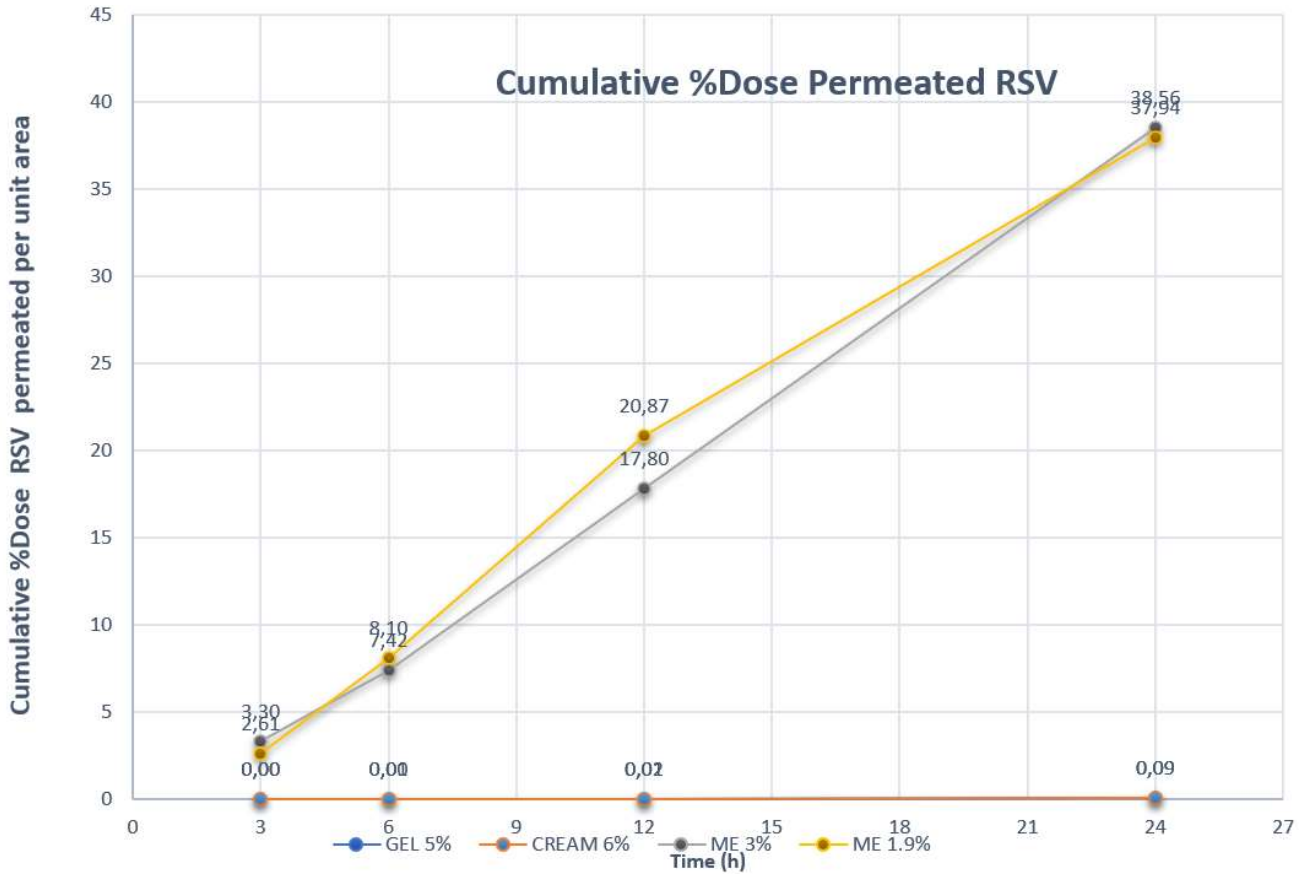
Φαίνεται να επιβεβαιώνεται η παρατήρηση και άλλων μελετών, πώς τα μικρογαλακτώματα αυξάνουν την διαπέραση δραστικών ουσιών από μεμβράνες, σε σχέση με φορείς άλλων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος σταγονιδίων τους, αλλά και στο αυξημένο ποσοστό του συνεπιφανειοδραστικού παράγοντα Transcutol (Bolko et al., 2014; Yutani et al., 2016).

12.1.2. %Αθροιστική Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε

Ο Πίνακας 15 και το διάγραμμα της Εικόνας D25 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, εκφρασμένη ως ποσοστό της εφαρμοζόμενης δόσης, σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations). Ο παράγον αυτός χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν τα σκευάσματα με βάση την απόδοση τους, το ποσοστό δηλαδή του δραστικού συστατικού που αποδίδουν σε σχέση με την απόλυτη ποσότητα φαρμάκου που περιέχουν.

Time Points	ME RSV 1.9%	ME RSV 3%	CREAM RSV 6%	GEL RSV 5%
3h	2.61±0.61	3.30±0.25	0.0020±0.0002	0.0019±0.0001
6h	8.1±2.12	7.42±0.39	0.0072±0.0003	0.0046 ± 0.0002
12h	20.87±3.6	17.80±0.21	0.0170±0.0027	0.0073±0.0002
24h	37.94±4.51	38.56±0.40	0.0886±0.0321	0.0887±0.0207

Πίνακας 20. Αθροιστική %Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD



Εικόνα D 25.Αθροιστική %Δόση ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την μεμβράνη ανά μονάδα επιφάνειας

Και σε αυτή την απόκριση παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην απόδοση των σκευασμάτων, με τα μικρογαλακτώματα να αποδίδουν το 40% περίπου της δόσης που περιέχουν, ενώ το πήκτωμα και η κρέμα φαίνεται να ταυτίζονται στο 0,08%.

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι :

- Όλα τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή
- Η κρέμα RSV και το πήκτωμα RSV δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην απόδοση του δραστικού συστατικού
- Το πήκτωμα RSV και η κρέμα RSV εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόδοση του δραστικού, τόσο με το μικρογαλάκτωμα RSV 1.9% , όσο και με το μικρογαλάκτωμα RSV 3%.
- Το μικρογαλάκτωμα RSV 1.9% και το μικρογαλάκτωμα RSV 3% δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους στην απόδοση του δραστικού συστατικού. Κατά συνέπεια φαίνεται να είναι όμοια από άποψη λειτουργικότητας παρόλο που φέρουν διαφορετική δόση ρεσβερατρόλης.

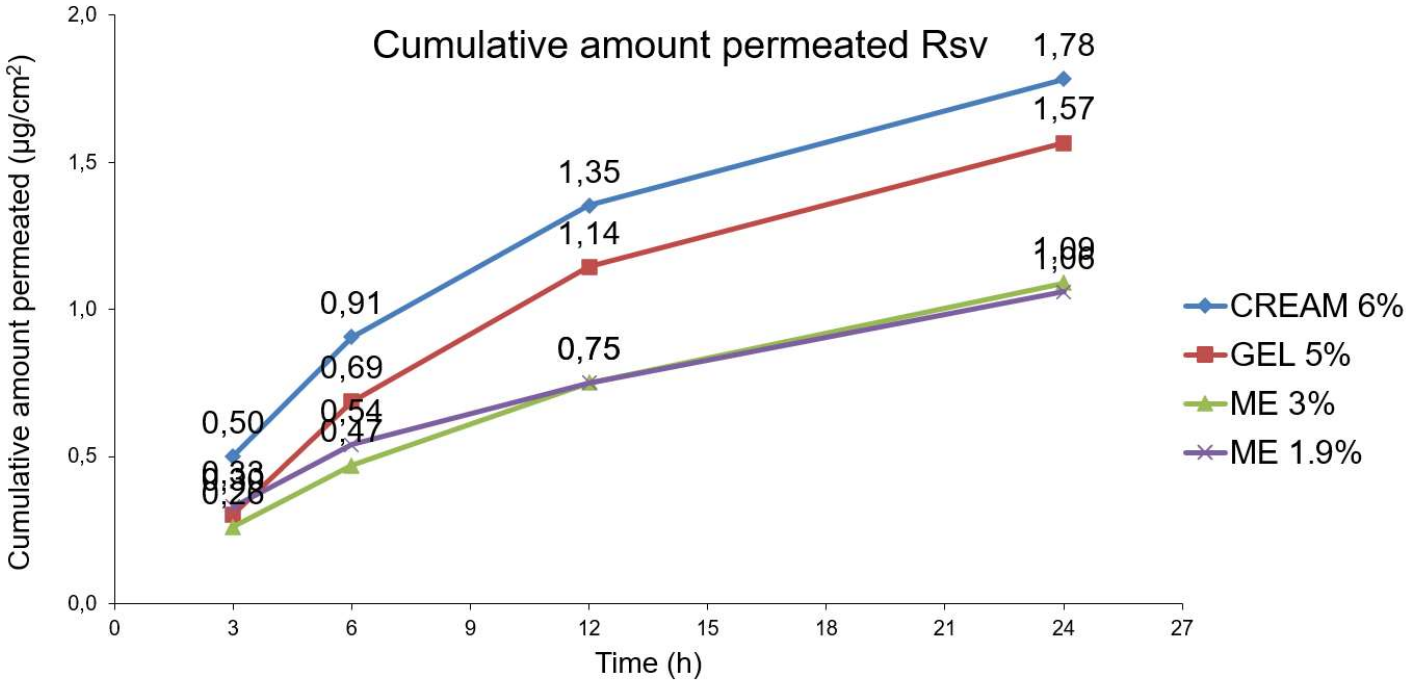
12.2. Ex vivo πείραμα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

12.2.1. Αθροιστική διαπέραση Q

Ο Πίνακας 17 και το διάγραμμα της Εικόνας D26 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας του δέρματος, Q (μg/cm2), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations).

Time Points	ME RSV 1.9%	ME RSV 3%	CREAM RSV 6%	GEL RSV 5%
3h	0,33±0,03	0.26±0.07	0.50±0.05	0.30±0.11
6h	0,54±0,04	0.47±0.08	0.91±0.03	0.69±0.11
12h	0,75±0,05	0.75±0.08	1.35±0.05	1.14±0.13
24h	1,06±0,03	1.09±0.21	1.78±0.05	1.57±0.13

Πίνακας 21.Αθροιστική ποσότητα ρεσβερατρόλης Q(μg/cm2), που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ± SD



Εικόνα D 26.Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας RSV που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας (μg/cm2) σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Οι αντίστοιχες τιμές RSD κυμαίνονται από 2.83% έως 26.73%. Τιμές RSD περίπου 30% δεν είναι ασυνήθιστες σε *in vitro* πειράματα διείσδυσης χρησιμοποιώντας βιολογικό φραγμό (ανθρώπινο δέρμα), ενώ ακόμη και τιμές RSD περίπου 40% έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Southwell et al., 1984; A. C. Williams et al., 1992)

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε πως:

- Σε όλα τα χρονικά σημεία, όλα τα δείγματα ακολουθούν κανονική κατανομή

Στις 3h, ισχύουν τα εξής:

- Τα δύο μικρογαλακτώματα RSV 1.9% και 3% δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Το πήκτωμα RSV 5% και η κρέμα 6% εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Το πήκτωμα RSV 5% με τα δύο μικρογαλακτώματα RSV 1.9% και 3%, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Η κρέμα RSV 6% με τα δύο μικρογαλακτώματα RSV 1.9% και 3%, εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Στις 6 h, ισχύουν τα εξής:

- Τα δύο μικρογαλακτώματα δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.
- Όλα τα υπόλοιπα σκευάσματα RSV διαφέρουν μεταξύ τους και η διαφορά είναι στατιστικα σημαντική ($p<0.05$)

Στις 12h, ισχύουν τα εξής:

- Κάθε σκεύασμα συμπεριφέρεται διαφορετικά από τα υπόλοιπα. Δηλαδή σε κάθε ζευγαρωτή σύγκριση που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με ($p<0.05$).

Στις 24h, ισχύουν τα εξής:

- Η εικόνα σε αυτό το χρονικό σημείο συμφωνεί με την εικόνα της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων από την μεμβράνη Strat M ®. Εδώ εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της κρέμας RSV 6%και των δύο μικρογαλακτωμάτων RSV 1.9% και 3%.
- Το πήκτωμα RSV 5% εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαπέραση από τα δύο μικρογαλακτώματα RSV 1.9% και 3%.
- Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μικρογαλακτωμάτων
- Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ πηκτώματος RSV 5 % και κρέμας RSV 6%.

Στο πείραμα In Vitro με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα βλέπουμε να αντιστρέφεται η εικόνα που είχαμε στο αντίστοιχο πείραμα με τεχνητή μεμβράνη Strat M ®. Πιο συγκεκριμένα, βλέπουμε την κρέμα RSV 6% να εμφανίζει καλύτερη διαπέραση από το πήκτωμα RSV 5%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ρεσβερατρόλης που περιέχει η κρέμα σε σχέση με το πήκτωμα.

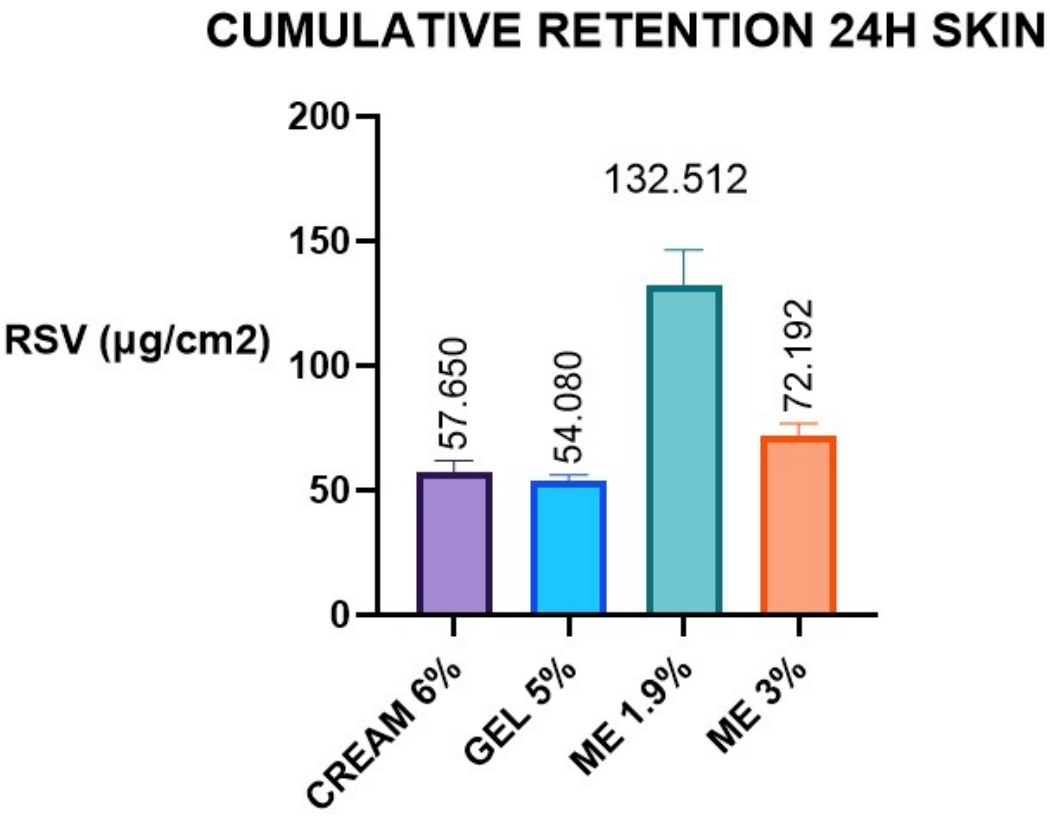
Ακόμη, ενώ στο προηγούμενο πείραμα είδαμε τα δύο μικρογαλακτώματα να έχουν πολύ μεγαλύτερη διαπέραση από την κρέμα και το πήκτωμα, εδώ βλέπουμε τα μικρογαλακτώματα να δίνουν λίγο μικρότερη διαπέραση από τα άλλα δύο σκευάσματα. Για να διερευνηθεί πλήρως το φαινόμενο αυτό έγινε ανάλυση της κατακράτησης της κεράτινης στοιβάδας σε ρεσβερατρόλη.

12.2.2. Κατακράτηση ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα

Η συνολική κατακράτηση της κεράτινης στοιβάδας στις 24h υπολογίστηκε και για τα τέσσερα σκευάσματα όπως φαίνεται στον πίνακα, σε αθροιστική ποσότητα που κατακρατήθηκε ανά επιφάνεια (μg/cm^2).

Time Point	ME RSV 1.9%	ME RSV 3%	CREAM RSV 6%	GEL RSV 5%
24h	132.51±13.89	72.19±4.71	57.65±4.23	54.08±2.2

Πίνακας 22. Αθροιστική κατακράτηση ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα στις 24h



Εικόνα D 27. Γράφημα αθροιστικής κατακράτησης RSV στις 24h (Prism 8.4.3, GraphPad)

Από τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται πώς η κατακράτηση της ρεσβερατρόλης είναι σχετικά μικρή για την κρέμα RSV 6% και το πήκτωμα RSV 5%. Λίγο μεγαλύτερη κατακράτηση εμφανίζει το μικρογαλάκτωμα RSV 3% και σχεδόν διπλάσια κατακράτηση εμφανίζει το μικρογαλάκτωμα RSV 1,9%.

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνονται και από την στατιστική ανάλυση. Από αυτήν προκύπτουν τα εξής:

- Όλα τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή
- Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τις κατακράτησης του πηκτώματος RSV 5% και της κρέμας RSV 6%
- Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της κρέμας RSV 6% και των μικρογαλακτωμάτων RSV 1,9% και 3%.
- Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του πηκτώματος RSV 5% και των μικρογαλακτωμάτων RSV 1,9% και 3%.
- Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μικρογαλακτωμάτων RSV 1,9% και 3%.

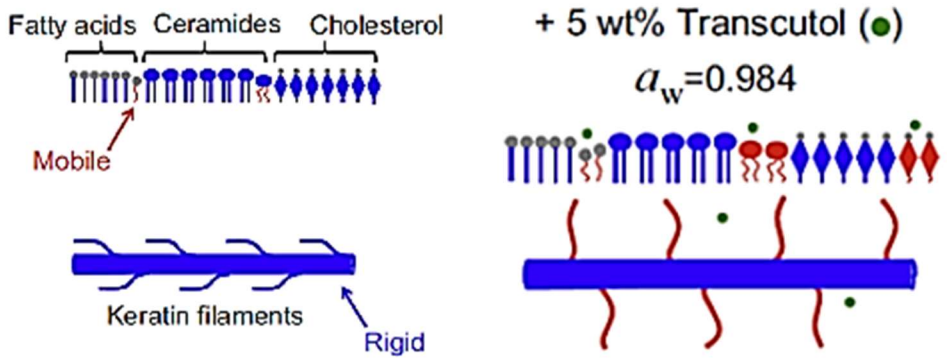
Λαμβάνοντας υπόψη την αναστροφή των αποτελεσμάτων διαπέρασης περνώντας από την μεμβράνη Strat M ® στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα, και τα αποτελέσματα της κατακράτησης RSV από αυτήν ανά σκεύασμα, μπορούμε να πούμε ότι:

- Η τεχνητή μεμβράνη Strat M® φαίνεται να εμφανίζει πολύ χαμηλή αντίσταση στη διαπέραση της RSV από τα μικρογαλακτώματα . Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε δυνάμεις συνοχής που αναπτύσσονται με τα υλικά της μεμβράνης και μειώνουν την αντίσταση της στη διαπέραση. Αυτό ίσως εξηγεί και το τεχνικό πρόβλημα διαρροής που εμφάνισαν τα μικρογαλακτώματα με τον δακτύλιο Teflon που χρησιμοποιείται συνήθως στα πειράματα διάχυσης με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα. Τα προβλήματα αυτά μας οδήγησαν να επαναλάβουμε το πείραμα χωρίς τον δακτύλιο, όπου και δεν επαναλήφθηκε η διαρροή.
- Η Strat M® έχει εμφανίσει εξαιρετικά μειωμένη αντίσταση στην διαπέραση σε κολλοειδή συστήματα με μέγεθος σταγονιδίων εσωτερικής φάσης στην κλίμακα των nm (Σπανέας, 2019)
- Η αυξημένη διαπέραση που εμφάνιζαν τα μικρογαλακτώματα στην μεμβράνη και όχι στην αθροιστική διαπέραση στην κεράτινη στοιβάδα, φαίνεται μεταφράζεται σε αυξημένη κατακράτηση από την κεράτινη στοιβάδα. Αυτό το φαινόμενο δεν είναι προωτοφανές στην βιβλιογραφία, και σχετίζεται κυρίως με την χρήση του συνεπιφανειοδραστικού Transcutol.

Η επίδραση του Transcutol P®

Το Transcutol σαν ενισχυτής διαπερατότητας δρα με δύο τρόπους. Αρχικά με τον επιφανειοδραστικό του χαρακτήρα επηρεάζει τη συνοχή των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας.

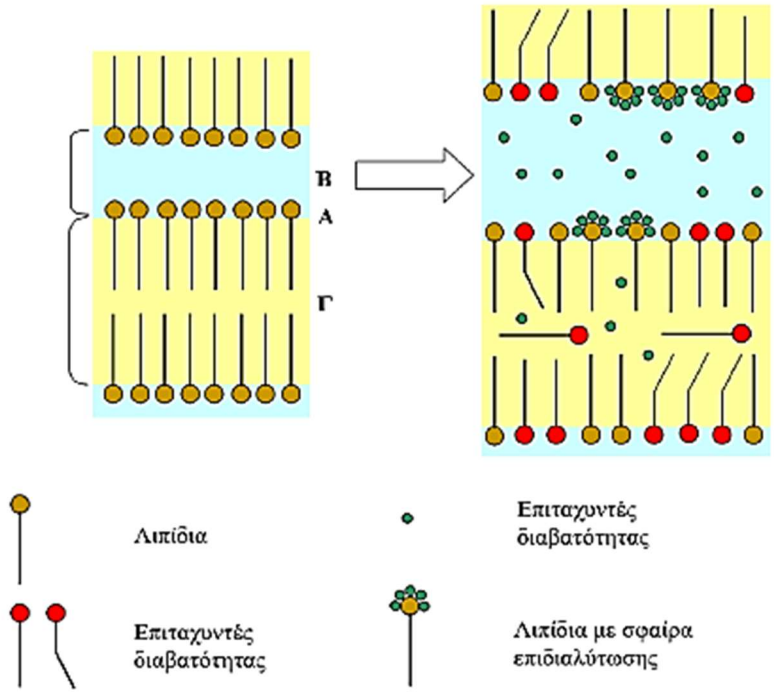
φαίνεται να αυξάνει την κινητικότητα των πολικών κεφαλών τω κεραμιδίων που βρίσκονται στην υδρόφιλη περιοχή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας Παρακάτω φαίνεται πως το Transcutol ® επηρεάζει την κινητικότητα των λιπιδίων Αριστερά βλέπουμε τα λιπίδια της διπλοστοιβάδας είναι σταθερά (το μπλε χρώμα στην εικόνα υποδεικνύει τη ακαμψία) ενώ δεξιά με την επίδραση του Transcutol ® αποκτούν κινητικότητα (το κόκκινο χρώμα υποδεικνύει κινητικότητα).



Εικόνα D 28. Το Transcutol προσδίδει κινητικότητα στα κεραμίδια της κεράτινης στοιβάδας (Αριτζίδου, 2018)

Στη συνέχεια ενσωματώνεται στην περιοχή ελεύθερου νερού ανάμεσα στις διπλοστοιβάδες των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας και το αντικαθιστά. Αλλάζει έτσι την σταθερά κατανομής των μέτρια λιπόφιλων δραστικών συστατικών, όπως η ρεσβερατρόλη, δημιουργώντας ένα περισσότερο φιλόξενο περιβάλλον για να διαχυθούν. Αυτό το περιβάλλον όμως μπορεί να εμποδίσει την κατανομή της ρεσβερατρόλης σε κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας και της δερμίδας. Ιδιαίτερα σε ένα περιβάλλον όπως είναι το κύτταρο διάχυσης Franz, όπου στο διαμέρισμα του δέκτη, ακριβώς κάτω από την κεράτινη στοιβάδα περιέχεται ένα υδατικό διάλυμα, είναι επόμενο η ρεσβερατρόλη να προτιμήσει να παραμείνει εντός της κεράτινης στοιβάδας (Dragicevic & Maibach, 2017a), (Dragicevic & Maibach, 2015) (Pund et al., 2014b).

Παραμένοντας εκεί μπορεί να εμφανίζει την φαρμακολογική της δράση In situ, όπως για παράδειγμα προστασία από βλάβη από προσπίπτουσα υπεριώδη ακτινοβολία. Μπορεί ακόμη να κατανέμεται προς τις κατώτερες στοιβάδες με αργό ρυθμό, τέτοιο που να μην είναι δυνατό να υπολογιστεί και να ανιχνευθεί στις 24h, δημιουργώντας ένα σύστημα παρατεταμένης αποδέσμευσης προς την αιματική κυκλοφορία (Juškaite et al., 2017). Όμοια συμπεριφορά φαίνεται να εμφανίζουν μικρογαλακτώματα αλλά και άλλα κολλοειδή συστήματα διασποράς λιπόφιλων δραστικών συστατικών που μορφοποιήθηκαν με Transcutol, όπως η μινοξιδίλη, η δικλοφενάκη, η ιμπούπροφαίνη (ibuprofen) και τακρόλιμους (tacrolimus) (Lee et al., 2016),(Manconi et al., 2011; Mura et al., 2011; Zhang et al., 2019)



Εικόνα D 29. Τρόπος δράσης Χημικών Ενισχυτών Διαβατότητας. Το Transcutol φαίνεται να δρα στις περιοχές Α και Β (Αριτζίδου, 2018)

Η αυξημένη κατακράτηση τώρα για τα μικρογαλακτώματα, είναι αποτέλεσμα συνδυαστικής δράσης του μικρού μεγέθους των σταγονιδίων τους με τη χρήση του Transcutol. Το μικρό μέγεθος σταγονιδίων τους επιτρέπει να διέρχονται των ανώτερων στρωμάτων της κεράτινης στοιβάδας πολύ εύκολα. Έτσι αυξάνεται η αθροιστική ποσότητα RSV που θα βρεθεί εντός της κεράτινης στοιβάδας. Στη συνέχεια το Transcutol κατανέμεται εντός της κεράτινης στοιβάδας και παρασύρει μαζί του τα μόρια RSV αποσταθεροποιώντας το σύστημα των μικρογαλακτωμάτων και κατακρατώντας την RSV εντός της κεράτινης στοιβάδας (Pund et al., 2014b).

Η επίδραση της δομής των μικρογαλακτωμάτων

Ακόμη η ενδοδερμική στόχευση και η αυξημένη κατακράτηση από την κεράτινη στοιβάδα είναι ένα φαινόμενο που έχει μελετηθεί αρκετά, και αποτελεί στόχο της μορφοποίησης όταν η προστατευτική και θεραπευτική του δράση εντοπίζεται στις ανώτερες στοιβάδες του δέρματος (Hu et al., 2016; Juškaite et al., 2015b; L. B. A. Oliveira et al., 2017; Panapisal et al., 2012; Yutani et al., 2014).

Με αυτόν τον τρόπο, η σχετική διαφορά στην κατακράτηση των δύο μικρογαλακτωμάτων μπορούμε να πούμε ότι αντιστοιχεί στην διαφορά στην διαπέραση των ανώτερων στρωμάτων της κεράτινης στοιβάδας.

12.2.3. Βέλτιστη Συνταγής Μικρογαλακτώματος

Επιλογή Βέλτιστης Συνταγής

Από τα παραπάνω δεδομένα παρατηρούμε ότι το μικρογαλάκτωμα με 3% RSV τόσο στην STRAT M όσο και στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα εμφάνισε παρόμοια ποσοστιαία αθροιστική διαπέραση ως προς τη δόση που περιέχει, σε σχέση με το μικρογαλάκτωμα RSV 1.9%. Ακόμη, ενώ στην τεχνητή μεμβράνη εμφάνισε υψηλότερη αθροιστική διαπέραση, στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα εμφάνισε όμοια αθροιστική διαπέραση και σχεδόν τη μισή αθροιστική κατακράτηση RSV.

Καθώς η ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα είναι το καλύτερο μέσο προσομοίωσης In Vitro της In vivo χορήγησης, ως βέλτιστη συνταγή από άποψη διαπέρασης προτιμάται το μικρογαλάκτωμα με RSV 1.9%.

Από άποψη σταθερότητας, συμφωνώντας με τις προβλέψεις του πειραματικού σχεδιασμού, το μικρογαλάκτωμα RSV 3% εμφάνισε καφέ χρώση ύστερα από 24h και μετά την μέτρηση του μεγέθους των σταγονιδίων του με τη μέθοδο DLS. Αυτό είναι ένδειξη οξείδωσης της ρεσβερατρόλης και δείκτης ότι η ρεσβερατρόλη δεν βρίσκεται ενσωματωμένη σε σταγονίδια ή σε διεπιφάνεια αυτών, άρα δεν είναι επιτυχής η ενσωμάτωση της στο μικρογαλάκτωμα.

Από άποψη οικονομίας τέλος, βλέπουμε ότι το μικρογαλάκτωμα RSV 1.9% με 20% λιγότερη δραστική ουσία εμφανίζει όμοια αποτελέσματα στην αθροιστική διαπέραση και καλύτερα αποτελέσματα στην κατακράτηση από το μικρογαλάκτωμα RSV 3%. Οπότε σαφώς προτιμάται η χρήση της σταθερής φυσικοχημικά συνταγής, που με μικρότερη δόση δραστικού συστατικού αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα διαπέρασης και κατακράτησης.

Όσων αφορά την κατακράτηση, το μικρογαλάκτωμα 1,9% είδαμε ότι υπερέχει ακόμη και της κρέμας RSV 6% και του πηκτώματος RSV 5%. Αυτή η υπεροχή αναμένεται να επιβεβαιωθεί στα In Vivo πειράματα.

Χαρακτηρισμός Βέλτιστης Συνταγής – Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά

Η βέλτιστη συνταγή μικρογαλακτώματος 1,9% RSV έδωσε διαυγές μικρογαλάκτωμα ηπίας κίτρινης χρώσης, το οποίο σε θερμοκρασία άνω των 25°C εμφάνιζε αντιστρεπτό θόλωμα, και διαύγαζε ξανά ύστερα από ολιγόλεπτη ψύξη.

Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να οφείλεται στο σημείο νέφωσης (Cloud Point) του μείγματος των επιφανειοδραστικών και συνεπιφανειοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν. Σε θερμοκρασία μεγαλύτερη του σημείου αυτού τα μόρια των επιφανειοδραστικών διατάσσονται με διαφορετικό τρόπο λόγω της διαφορετικής κινητικότητας που εμφανίζουν ανάλογα με τη θερμοκρασία. Έτσι ενώ σε θερμοκρασία κάτω των 25 °C έχουμε ένα μικρογαλάκτωμα Winsor I (oil in water), σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 25 °C μετατρέπεται σε ημισυνεχείς δομές

(Bicontinuous Structures) που αντιστοιχούν σε μικρογαλάκτωμα Winsor III και σκεδάζουν το φως με διαφορετικό τρόπο (Cadogan et al., 2017; Sakamoto et al., 2017; Tadros, 2013).

Αυτό φαίνεται να επιβεβαιώνεται από την μέτρηση του μεγέθους σταγονιδίων με τη μέθοδο DLS. Το μέγεθος βρέθηκε να είναι 190,9 nm με δείκτη πολυδιασποράς 0,559. Αρχικά παρατηρείται να έχει μη αποδεκτό μέγεθος σταγονιδίων (>150nm). Στη συνέχεια παρατηρώντας το μέγεθος της πολυδιασποράς βλέπουμε ότι η μέτρηση περιέχει σφάλμα λόγω φαινόμενης πυκνότητας του δείγματος. Κάτι τέτοιο δικαιολογείται από την ύπαρξη στο δείγμα όχι σφαιρικών σταγονιδίων αλλά ημισυνεχών δομών διπλοστοιβάδων επιφανειοδραστικών που δεν εμφανίζουν σφαιρική διάταξη. Ο τρόπος που σκεδάζουν το φως αυτές οι δομές οδηγεί σε εσφαλμένη μέτρηση μεγέθους σταγονιδίων, που το λογισμικό προσπαθεί να υπολογίσει (Cadogan et al., 2017).

Σε αυτήν την περίπτωση η διάμετρος σταγονιδίων που υπολογίζεται ονομάζεται φαινόμενη διάμετρος. Αυτή αξιολογείται πάντα σε συνδυασμό με την πολυδιασπορά. Για ένα δείγμα όπου τα σταγονίδια είναι σφαιρικά θα είχε νόημα να γίνουν οι μετατροπές για τον υπολογισμό της πραγματικής διαμέτρου. Εδώ όμως από τη συνολική συμπεριφορά του δείγματος φαίνεται να έχουμε μη σφαιρικές δομές, οπότε και δεν θα ήταν σωστή αυτή η μαθηματική μετατροπή.

Χαρακτηρισμός Βέλτιστης Συνταγής – Τρόπος Απελευθέρωσης Ρεσβερατρόλης

Σε κάθε κύκλο θέρμανσης ψύξης το χρώμα φαίνεται να τείνει προς πιο έντονο κίτρινο. Αυτό αποδίδεται στην απελευθέρωση μορίων ρεσβερατρόλης από τη διεπιφάνεια των σταγονιδίων κατά την δυναμική μεταβολή στην δομή του μικρογαλακτώματος προς ημισυνεχείς δομές, που εμφανίζουν και αυτές μεγαλύτερη κινητικότητα, άρα και μεγαλύτερη ταχύτητα διάχυσης των μορίων του δραστικού συστατικού.

Σύμφωνα με αυτό το φαινόμενο, κάθε φορά που το μικρογαλάκτωμα θερμαίνεται και ψύχεται απελευθερώνει και μία ποσότητα δραστικού το οποίο είναι διαθέσιμο προς διαπέραση. Έχει παρατηρηθεί επανειλημμένα σημαντική αύξηση της διαδερμικής διείσδυσης και διαπερατότητας από ημισυνεχείς δομές και δομές υγρών κρυστάλλων που σχηματίζονται από μόρια επιφανειοδραστικών. Θεωρείται ότι αυτές οι δομές εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις διπλοστοιβάδες των λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας, οπότε και ανταλλάσσουν λιπίδια και άλλα μόρια προς διαπέραση με αυτές, αυξάνοντας της ρευστότητα τους και μειώνοντας της αντίσταση τους στη διαδερμική χορήγηση (Hu et al., 2016; Juškaite et al., 2015b; L. B. A. Oliveira et al., 2017; Panapisal et al., 2012; Yutani et al., 2014).

Από τα παραπάνω, φαίνεται να εξηγείται η υπεροχή του μικρογαλακτώματος RSV 1.9% στην κατακράτηση της ρεσβερατρόλης στην κεράτινη στοιβάδα σε σχέση με το μικρογαλάκτωμα 3%, παρά την κατά 20% μειωμένη περιεκτικότητα σε ρεσβερατρόλη. Ακόμη φαίνεται να εξηγείται και η δέυτερη περιοχή βέλτιστης % διαπερατότητας στην συνάρτηση επιθυμητότητας του πειραματικού σχεδιασμού. Σε αυτήν την περιοχή αντιστοιχούν συνταγές με ισορροπημένη

αναλογία ελαίου και επιφανειοδραστικού συστήματος, που φαίνεται να είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των Bicontinuous Structures. Αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στην αυξημένη % απόδοση στην διαδερμική διαπέραση της ρεσβερατρόλης.

Ε. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ IN VIVO ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

13. IN VIVO ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗΣ

13.1. Άδηλη απώλεια νερού - TEWL

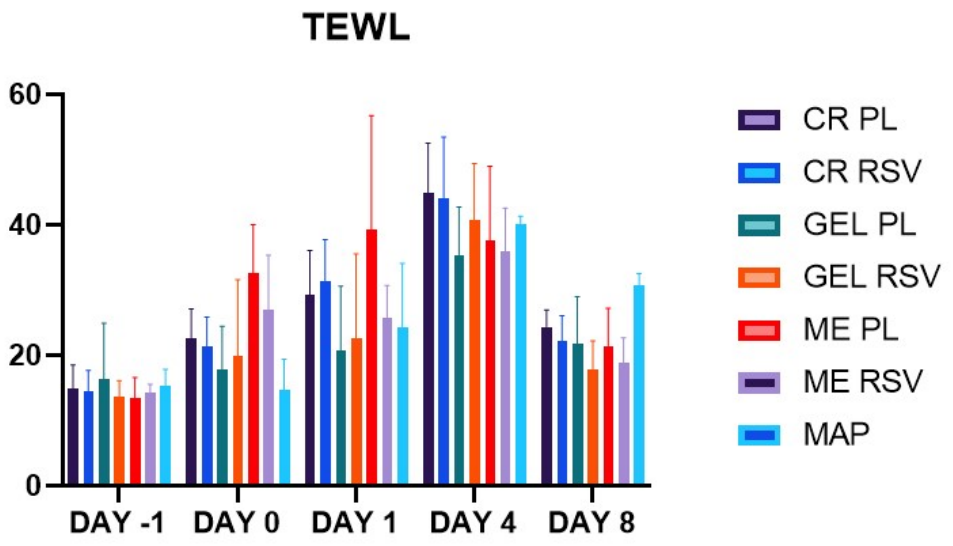
Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων άδηλης απώλειας νερού για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή.

ΑΔΗΛΗ ΑΠΩΛΕΙΑ ΝΕΡΟΥ (g/h*m2)						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	14,94	22,53	29,27	44,88	24,39
	SD	3,59	4,59	6,82	7,62	2,57
CR RSV	**MEAN**	14,46	21,37	31,34	44,09	22,22
	SD	3,23	4,48	6,42	9,39	3,83
GEL PL	**MEAN**	16,43	17,85	20,68	35,45	21,70
	SD	8,50	6,64	9,97	7,35	7,32
GEL RSV	**MEAN**	13,60	19,96	22,65	40,73	17,83
	SD	2,53	11,65	12,91	8,68	4,37
ME PL	**MEAN**	13,47	32,51	39,29	37,65	21,46
	SD	3,17	7,53	17,48	11,38	5,75
ME RSV	**MEAN**	14,28	26,99	25,72	35,99	18,95
	SD	1,29	8,37	5,02	6,58	3,71
MAP	**MEAN**	15,33	14,61	24,38	40,01	30,73
	SD	2,52	4,83	9,76	1,32	1,79

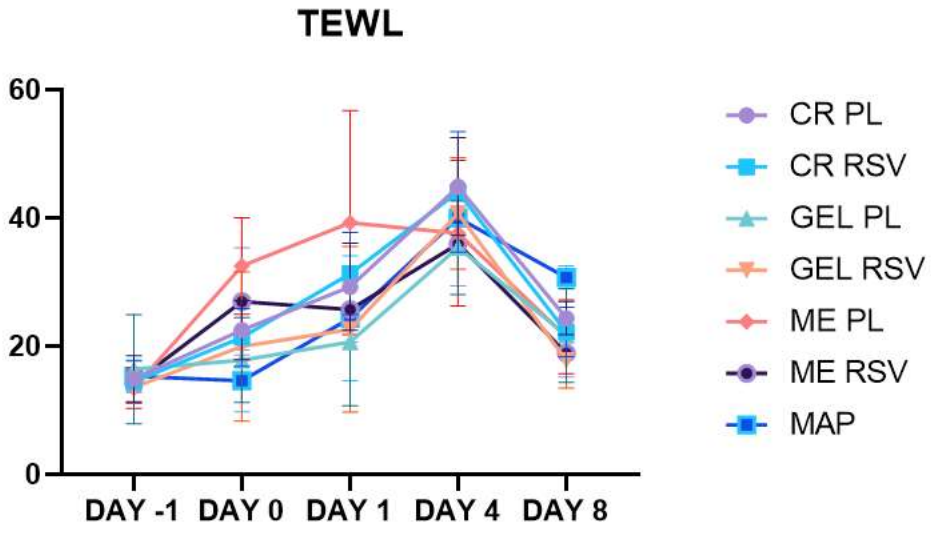
Πίνακας 23. Άδηλη απώλεια νερού για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή (μέσος όρος και τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο Παράρτημα.

Η ανάλυση μεταβλητότητας ύο διευθύνσεων (Two way ANOVA) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων και μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε post-hoc έλεγχος με το κριτήριο Fischer's LSD, καθώς τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή.



Γράφημα Ε 1. Η μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού ανά ημέρα και ανά σκεύασμα



Γράφημα Ε 2. Γραμμική μεταβολή της άδηλης απώλειας νερού ανά σκεύασμα στην πορεία του πειράματος

Ημέρα -1

Συγκρίνοντας τα σκευάσματα ανά ημέρα, την ημέρα -1, όπως αναμένεται δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των σκευασμάτων καθώς δεν έχει γίνει καμία επέμβαση στους μύες. Όλες οι τιμές φαίνονται να είναι εντός φυσιολογικών επιπέδων για έναν υγιή μυ.

Ημέρα 0

Στην ημέρα 0, σε συνέχεια πενθήμερης προληπτικής επάλειψης, εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση της άδηλης απώλειας στις ομάδες που δέχθηκαν την κρέμα RSV και τον φορέα RSV, αλλά και των ομάδων που δέχθηκαν το μικρογαλάκτωμα RSV και το φορέα του, σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε υπερενυδάτωση του δέρματος των μυών λόγω δημιουργίας συνθηκών εγκλεισμού, είτε σε διατάραξη του φραγμού του δέρματος από ερεθισμό από τους ενισχυτές διαβατότητας που χρησιμοποιούνται στα σκευάσματα. Η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι στατιστικά μεγαλύτερη για τις ομάδες που δέχθηκαν το μικρογαλάκτωμα RSV και το φορέα του σε σύγκριση με τις ομάδες του πηκτώματος και της κρέμας RSV και των αντίστοιχων φορέων τους.

Ημέρα 1

Στην ημέρα 1, μία ημέρα μετά την πρόκληση της φλεγμονής, δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Διακρίνεται όμως η στατιστικά σημαντική σύγκριση μεταξύ της αύξησης της άδηλης απώλειας νερού για την ομάδα κρέμας RSV που είναι μεγαλύτερη από αυτή του φορέα του πηκτώματος. Αντίστοιχα μεγαλύτερη είναι η αύξηση για τον φορέα του πηκτώματος σε σχέση με το φορέα του μικρογαλακτώματος.

Ημέρα 4

Στην ημέρα 4, δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σκευασμάτων, παρά μόνο μεταξύ της ομάδας του φορέα της κρέμας και των ομάδων φορέα πηκτώματος και μικρογαλακτώματος RSV. Ενδεχομένως αυτή η διαφορά να οφείλεται σε ένα επίπεδο προστασίας του φραγμού από τα δύο σκευάσματα.

Ημέρα 8

Στην ημέρα 8, παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές καθώς η άδηλη απώλεια νερού μειώνεται τείνοντας προς φυσιολογικά επίπεδα για τις ομάδες του πηκτώματος και του φορέα του και την ομάδα του μικρογαλακτώματος και του φορέα του, σε σύγκριση με τους μάρτυρες για τους οποίους συνεχίζει να αυξάνεται. Η όμοια συμπεριφορά φορέα και σκευάσματος με δραστικό συστατικό δείχνει ότι η επίδραση δεν οφείλεται στην διαπέραση του δραστικού συστατικού αλλά στον φορέα του. Τέλος σημαντική είναι και η συνέχεια της αύξησης της άδηλης απώλειας νερού για την ομάδα της κρέμας RSV που φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από των μαρτύρων.

Για την πορεία των σκευασμάτων στις ημέρες του πειράματος παρατηρούμε ότι:

- Οι μάρτυρες εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της άδηλης απώλειας νερού σε όλα τα στάδια του πειράματος από την ημέρα της πρόκλησης και μετά, ενώ δεν επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα.
- Για τον φορέα της κρέμας παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση από την ημέρα -1 στην ημέρα 0 και από την ημέρα 0 στην ημέρα 4 και 8. Όμοια συμπεριφορά εμφανίζει και η κρέμα RSV. Αυτό δείχνει ότι ούτε ο φορέας της κρέμας, ούτε η κρέμα RSV εμπόδισαν την εξέλιξη της φλεγμονής.
- Για το πήκτωμα RSV παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της άδηλης απώλειας νερού μέχρι την ημέρα 4, όπου και παρατηρείται η κορύφωση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Στην συνέχεια παρατηρείται στατιστικά σημαντική πτώση προς την τελευταία μέρα του πειράματος. Ακριβώς την ίδια συμπεριφορά εμφανίζει και ο φορέας του πηκτώματος, με τους μύες να επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα στο τέλος του πειράματος. Η όμοια συμπεριφορά φορέα και πηκτώματος με RSV δείχνει ότι η καλή εξέλιξη της φλεγμονής δεν οφείλεται στη αυξημένη διαπέραση της RSV αλλά στον φορέα του πηκτώματος.
- Για το φορέα του μικρογαλακτώματος παρατηρείται αύξηση της άδηλης απώλειας πριν κιόλας την ακτινοβόληση ίσως λόγω ερεθισμού, η οποία όμως δεν αυξάνεται περισσότερο ύστερα από την ακτινοβόληση αλλά φαίνεται να μειώνεται σταθερά από την ημέρα 4, της οξείας φάσης της φλεγμονής στην ημέρα 8. Για το μικρογαλάκτωμα RSV παρατηρούμε αρχικά στατιστικά σημαντική αύξηση της άδηλης απώλειας νερού κατά την προληπτική επάλειψη η οποία όμως δεν αυξάνεται περαιτέρω στο πρώτο 24ωρο από την ακτινοβόληση. Αυξάνεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο στην οξεία φάση της φλεγμονής και ύστερα μειώνεται χωρίς να επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα, στο τέλος του πειράματος. Εδώ το μικρογαλάκτωμα RSV, φαίνεται να καθυστερεί την αύξηση της άδηλης απώλειας κατά τέσσερις ημέρες σε σχέση με το φορέα του.

13.2. Ενυδάτωση

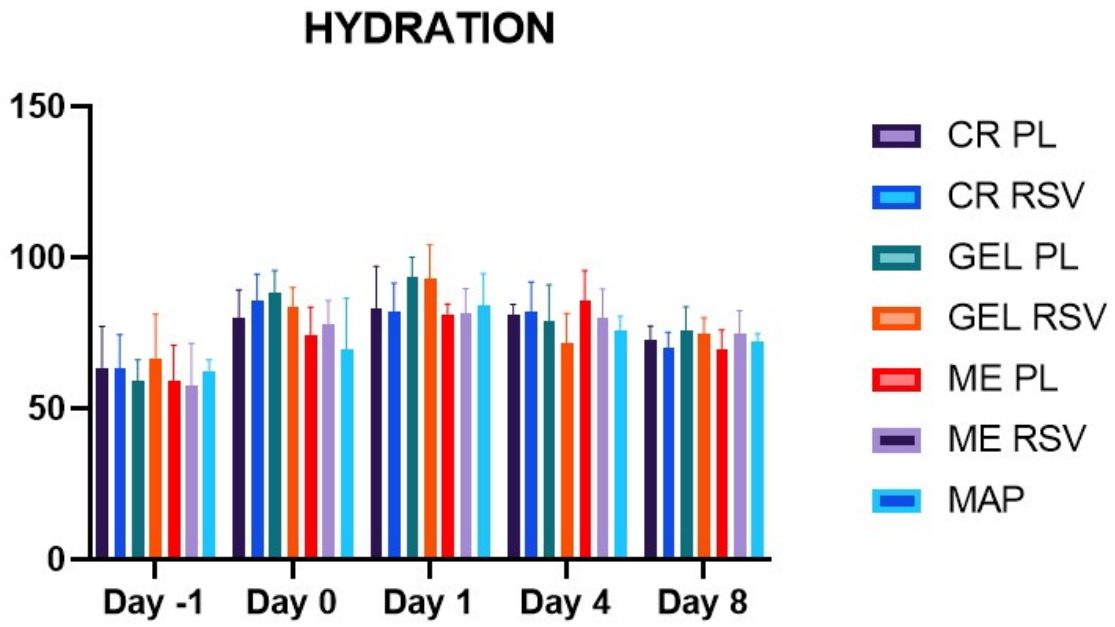
Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενυδάτωσης για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή.

ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	63,62	80,09	83,19	81,24	72,71
	SD	13,58	9,18	13,83	3,25	4,57
CR RSV	**MEAN**	63,43	85,72	82,05	82	70,19
	SD	11,06	8,88	9,46	9,94	5,03
GEL PL	**MEAN**	59	88,38	93,71	78,86	75,81
	SD	7,19	7,26	6,36	12,03	7,93
GEL RSV	**MEAN**	66,67	83,57	92,86	71,62	74,71
	SD	14,56	6,55	11,33	9,82	5,35
ME PL	**MEAN**	59,33	74,05	80,81	85,62	69,81
	SD	11,64	9,55	3,72	10,12	6,29
ME RSV	**MEAN**	57,57	77,76	81,33	80,19	74,52
	SD	13,94	8,01	8,29	9,39	7,88
MAP	**MEAN**	62,19	69,73	84,17	75,93	71,9
	SD	3,94	16,78	10,54	4,67	2,86

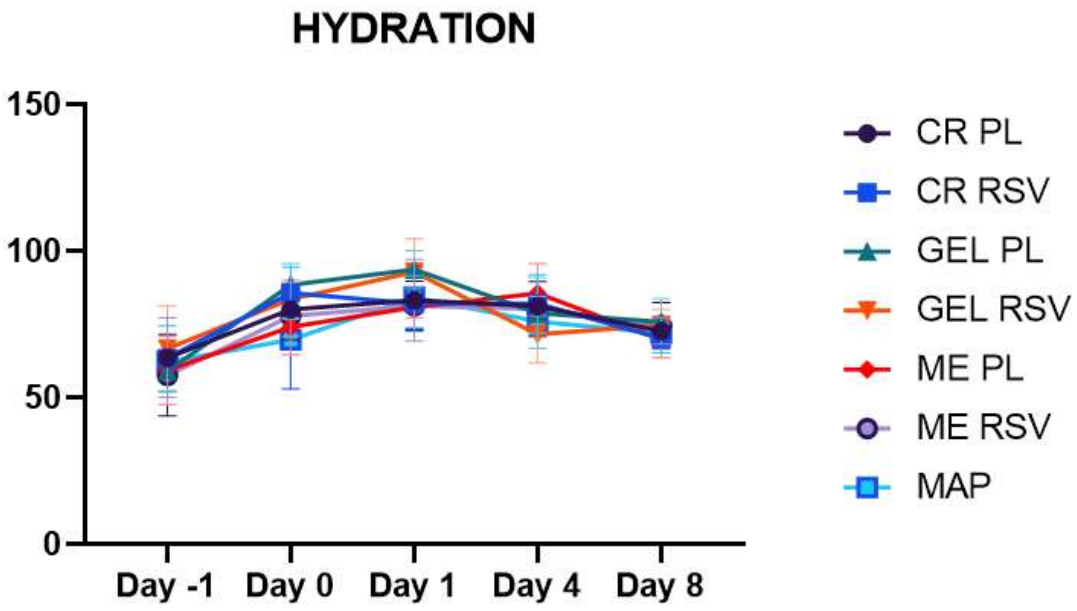
Πίνακας 24. Αποτελέσματα μετρήσεων ενυδάτωσης για κάθε ομάδα μυών σε κάθε ημέρα του πειράματος (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο Παράρτημα.

Η ανάλυση μεταβλητότητας δύο διευθύνσεων (Two way ANOVA) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων και μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε post-hoc έλεγχος με το κριτήριο Fischer's LSD, καθώς τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή.



Γράφημα Ε 3. Η κατάσταση της ενυδάτωσης του δέρματος των μυών κατά τη διάρκεια του πειράματος, ανά ομάδα σκευάσματος



Γράφημα Ε 4. Η πορεία της ενυδάτωσης ανά σκεύασμα στην διάρκεια του πειράματος

Ημέρα -1

Την ημέρα -1 δεν εμφανίζεται καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτό είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα καθώς την ημέρα εκείνη δεν έχει γίνει καμία παρέμβαση στους μύες.

Ημέρα 0

Στην ημέρα 0 έχει προηγηθεί πενθήμερη προληπτική επάλειψη των σκευασμάτων, η οποία φαίνεται να αυξάνει με στατιστικά σημαντικό τρόπο, την ενυδάτωση της ομάδας που έλαβε τον φορέα του πηκτώματος σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων, αλλά και με την ομάδα του φορέα του μικρογαλακτώματος και την ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV. Όμοια αύξηση εμφανίζει και η ομάδα της κρέμας RSV σε σχέση με το φορέα του μικρογαλακτώματος. Συνολικά φαίνεται στη περίοδο της πρόληψης φαίνεται ότι το πήκτωμα RSV και ο φορέας του να αύξησαν την ενυδάτωση των μυών. Κατά συνέπεια η αύξηση αυτή οφείλεται στον φορέα του πηκτώματος.

Ημέρα 1

Επαναλαμβάνονται οι συγκρίσεις που έγιναν για τη μέρα 0 με τη διαφορά ότι δεν εμφανίζεται πιά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας του φορέα του πηκτώματος και των μαρτύρων.

Ημέρα 4

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αναστροφή της καλής ενυδάτωσης από τον φορέα του πηκτώματος, ο οποίος τώρα εμφανίζει μικρότερη ενυδάτωση από το φορέα του μικρογαλακτώματος και της κρέμας. Ακόμη στατιστικά μικρότερη ενυδάτωση εμφανίζει η ομάδα των μαρτύρων από την ομάδα με το φορέα κρέμας και το φορέα μικρογαλακτώματος.

Ημέρα 8

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατάσταση της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων των διαφορετικών σκευασμάτων.

Σύγκριση Σκευασμάτων

Οι μάρτυρες εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της ενυδάτωσης κατά την φάση της πρόληψης (μέρες -1 -0), που ίσως αποδίδεται στις συνθήκες εγκλεισμού λόγω της διαπνέουσας περίδεσης του σημείου της ράχης όπου γίνονταν οι επεμβάσεις, ενώ εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση της ενυδάτωσης σε κάθε ημέρα ύστερα από την ακτινοβόληση.

Η κρέμα RSV καθώς και ο φορέας της αυξάνουν την ενυδάτωση με στατιστικά σημαντικό τρόπο μέχρι την ημέρα 4 όπου κορυφώνεται η φλεγμονή. Στη συνέχεια και για τις δύο ομάδες η ενυδάτωση μειώνεται σταδιακά με στατιστικά σημαντικό τρόπο, χωρίς να πέσει σε επίπεδα μικρότερα των αρχικών. Η δράση αυτή αποδίδεται στο φορέα του σκευάσματος.

Ό φορέας του πηκτώματος RSV αυξάνει αρχικά την ενυδάτωση κατά τη φάση πρόληψης. Η αύξηση αυτή αναστρέφεται ύστερα από την ημέρα 1 και μέχρι την ημέρα 8 πέφτει σε χαμηλότερα των αρχικών επίπεδα. Το πήκτωμα RSV εμφανίζει την ίδια πορεία μέχρι την ημέρα 1, ενώ παρατηρείται και για αυτό μία στατιστικά σημαντική μείωση στην ενυδάτωση στην ημέρα κορύφωσης της φλεγμονής. Η διαφορά έγκειται στο ότι ύστερα από την ημέρα 4 η ενυδάτωση

αυξάνεται προς την ημέρα 8, χωρίς όμως να επανέλθει στα επίπεδα πρό ακτινοβόλησης. Από αυτό φαίνεται μία εικόνα ταχύτερης βελτίωσης της ομάδας του πηκτώματος σε σχέση με την ομάδα του φορέα του.

Για τον φορέα του μικρογαλακτώματος παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της ενυδάτωσης από την ημέρα -1 στις ημέρες 0 και 1, ενώ η ενυδάτωση μειώνεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο από την ημέρα οξείας φλεγμονής και μετά, χωρίς να επανέλθει στα επίπεδα της πρώτης ημέρας και διατηρώντας άρα μία μικρή αύξηση. Για το μικρογαλάκτωμα RSV, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της ενυδάτωσης από την ημέρα -1 στην ημέρα 0. Στην συνέχεια η ενυδάτωση δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική μεταβολή παρά μόνο μία μικρή συνολική μείωση από την ημέρα 0 στην ημέρα 8, παραμένοντας υψηλότερη από τα αρχικά επίπεδα. Συνολικά στον φορέα του μικρογαλακτώματος μπορεί να αποδοθεί η αύξηση της ενυδάτωσης ενώ στο μικρογαλάκτωμα RSV και τον τρόπο που αποδίδει το δραστικό συστατικό μπορεί να αποδοθεί η μη μεταβολή της ενυδάτωσης κατά την οξεία φάση φλεγμονής

13.3. Ερυθρότητα

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα αποτελέσματα των μετρήσεων ερυθρότητας για κάθε ομάδα σε κάθε χρονική στιγμή.

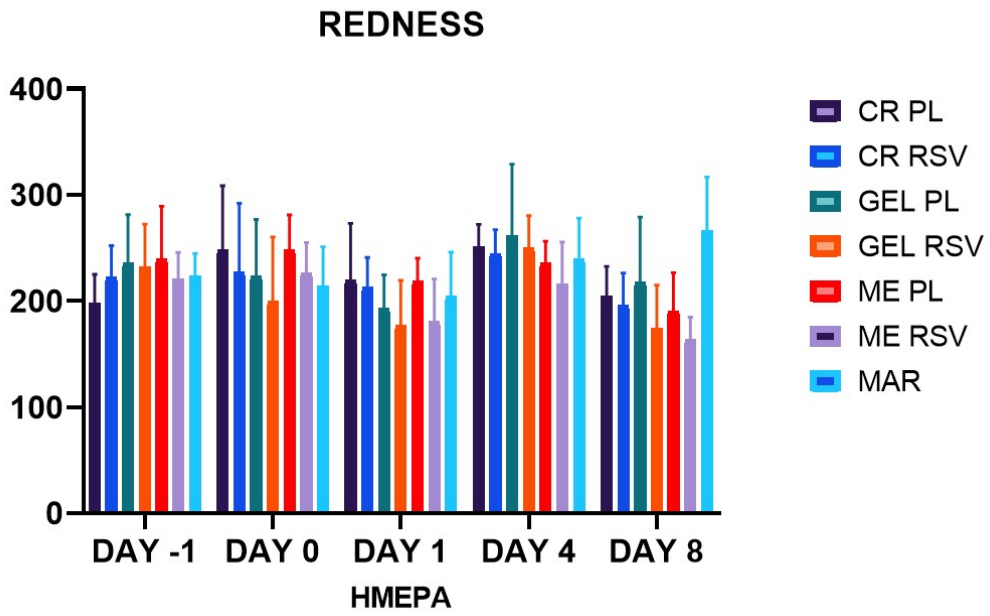
ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	198,19	247,86	219,24	250,91	204,71
	SD	26,66	60,77	53,86	21,3	27,81
CR RSV	**MEAN**	222,52	227,43	213	244,72	196,19
	SD	29,45	64,56	27,99	22,4	30,04
GEL PL	**MEAN**	235,9	223,24	193,29	261,24	217,95
	SD	45,34	53,37	31,24	67,66	61,03
GEL RSV	**MEAN**	231,71	200,14	176,81	249,95	174,38
	SD	40,64	60,14	42,33	30,29	40,52
ME PL	**MEAN**	239,71	248,05	219,05	235,62	190,52
	SD	49,37	33,02	21,15	20,65	36,06
ME RSV	**MEAN**	220,67	226,43	180,62	216,29	163,81
	SD	24,96	28,67	39,99	39,22	20,82
MAP	**MEAN**	223,2	214,2	204,6	240,07	265,93
	SD	21,34	36,65	41,29	37,99	50,92

Πίνακας 25. Τα δεδομένα για την ερυθρότητα ανά ομάδα μυών ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος και τυπική απόκλιση ομάδας)

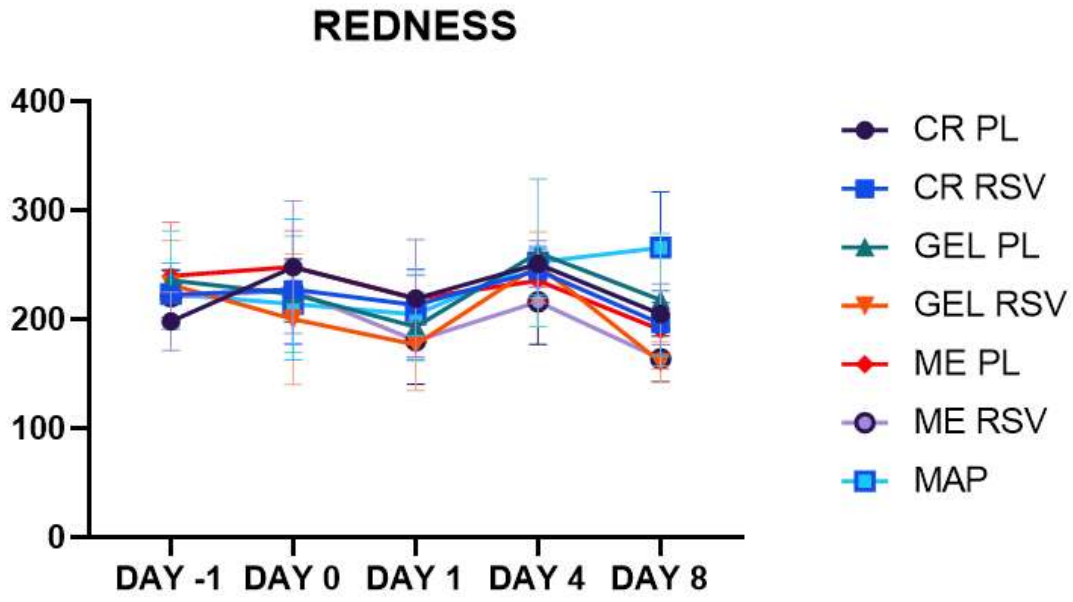
Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο Παράρτημα.

Η ανάλυση μεταβλητότητας δύο διευθύνσεων (Two way ANOVA) έδειξε ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων και μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε post-hoc έλεγχος με το κριτήριο Fischer's LSD, καθώς τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή.

Συνολικά παρατηρείται αύξηση της ερυθρότητας από την ημέρα 0 στην ημέρα 4, που είναι και η ημέρα κορύφωσης της φλεγμονής. Από την ημέρα 4 στην ημέρα 8 όλες οι ομάδες εκτός από την ομάδα των μαρτύρων εμφανίζουν μείωση των επιπέδων ερυθρότητας και επαναφορά στα αρχικά επίπεδα της ημέρας -1. Η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει αντίθετα περαιτέρω αύξηση από την ημέρα 4 στην ημέρα 8.



Γράφημα Ε 5. Η συνολική πορεία της ερυθρότητας ανά ομάδα θεραπείας, σε κάθε μέρα μετρήσεων



Γράφημα Ε 6. Εξέλιξη ερυθρότητας ανά σκεύασμα στις ημέρες του πειράματος

Ημέρα -1

Την ημέρα -1 δεν εμφανίζεται καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτό είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα καθώς την ημέρα εκείνη δεν έχει γίνει καμία παρέμβαση στους μύες.

Ημέρα 0

Την ημέρα 0 δεν εμφανίζεται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Ακόμη δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά εντός των ομάδων από την ημέρα -1 στην ημέρα 0. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι η προληπτική επάλειψη των σκευασμάτων δεν επηρέασε την φυσική ερυθρότητα των μυών .

Ημέρα 1

Την ημέρα 1, μία ημέρα μετά την ακτινοβόληση, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στην ερυθρότητα της ομάδας που έλαβε πήκτωμα RSV και την ομάδα που έλαβε φορέα μικρογαλακτώματος, ενώ όλες οι υπόλοιπες δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Όσων αφορά τη μεταβολή της ερυθρότητας με το χρόνο, στατιστικά σημαντική αύξηση στην ερυθρότητα του δέρματος της ράχης των μυών σε σχέση με την ημέρα -1 και όχι σε σχέση με την ημέρα 0 εμφανίζουν οι ομάδες που έλαβαν πήκτωμα RSV και φορέα μικρογαλακτώματος. Τα σκευάσματα αυτά φαίνεται να μην εμπόδισαν την αύξηση της ερυθρότητας ύστερα από την ακτινοβόληση.

Ημέρα 4

Την ημέρα 4, που θεωρείται η ημέρα κορύφωσης της φλεγμονώδους αντίδρασης, δεν παρατηρείται καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Φαίνεται όλες οι ομάδες να εμφανίζουν όμοια ερυθρότητα και να φλεγμαίνουν.

Όσων αφορά την μεταβολή στο χρόνο για κάθε ομάδα, στην ημέρα 4 η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση της ερυθρότητας. Ο φορέας της κρέμας εμφανίζει στατιστικά σημαντική μεταβολή της ερυθρότητας από την ημέρα -1 στην ημέρα 4 σε αντίθεση με RSV . Φαίνεται η κρέμα ρεσβερατρόλης να καθυστερεί την αύξηση της ερυθρότητας σε σχέση με το φορέα της. Ακόμη εμφανίζεται στατιστικά σημαντική η αύξηση της ερυθρότητας για την ομάδα με το πήκτωμα RSV από την ημέρα 1 στην ημέρα 4. Την ίδια αύξηση είχε εμφανίσει η ομάδα του φορέα πηκτώματος μία μέρα μετά την ακτινοβόληση. Συνεπώς, φαίνεται το πήκτωμα RSV να καθυστερεί την αύξηση της ερυθρότητας σε σχέση με το φορέα του.

Ημέρα 8

Στην ημέρα 8, για την κρέμα RSV παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά με τους μάρτυρες. Παράλληλα όμως, ο φορέας της κρέμας εμφανίζει κα αυτός στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες. Συνεπώς για την κρέμα RSV μπορούμε να πούμε ότι η μη αύξηση της ερυθρότητας δεν οφείλεται στο δραστικό συστατικό αλλά στο φορέα. Ακόμη στατιστικά σημαντικές

διαφορές σημειώνονται μεταξύ της κρέμα RSV και του μικρογαλακτώματος RSV, με την ομάδα του δεύτερου να έχει εμφανίζει μικρότερη ερυθρότητα από την κρέμα.

Σύγκριση ανά Σκεύασμα

Για την πορεία της ερυθρότητας στο χρόνο, βλέπουμε ότι την ημέρα 8 η ερυθρότητα για την ομάδα των μαρτύρων δεν έχει μειωθεί με τρόπο στατιστικά σημαντικό. Αντίθετα για την ομάδα που δέχθηκε πήκτωμα RSV εμφανίζεται στατιστικά σημαντική μείωση από την ημέρα 4 στην ημέρα 8, ενώ για την ομάδα με το φορέα του πηκτώματος δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση.

Για την ομάδα που δέχθηκε κρέμα RSV βλέπουμε ώς στατιστικά σημαντική περαιτέρω αύξηση της ερυθρότητας από την ημέρα 4 στην ημέρα 8, ένδειξη ότι το σκεύασμα δεν επιδρά με κάποιο τρόπο στην ερυθρότητα που οφείλεται στη φλεγμονή.

Για το πήκτωμα RSV παρατηρείται ότι η ομάδα που έλαβε το φορέα δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες, ενώ η ομάδα με το πήκτωμα με RSV εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες, όχι όμως από την ομάδα του φορέα της. Δεν μπορεί να αποδοθεί έτσι θεραπευτική δράση στο πήκτωμα RSV.

Για το μικρογαλάκτωμα RSV, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες. Η ίδια διαφορά παρατηρείται και για την ομάδα που έλαβε τον φορέα του μικρογαλακτώματος, ενώ δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας του φορέα και του μικρογαλακτώματος RSV. Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σκευάσματα παρατηρείται μόνο με την κρέμα RSV και όχι με το GEL RSV.

Για την ομάδα με το μικρογαλάκτωμα RSV παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ερυθρότητας από την ημέρα 0 και από την ημέρα 4 στην ημέρα 8, αλλά και από την ημέρα -1. Φαίνεται το σκεύασμα να μειώνει και την φυσική ερυθρότητα του δέρματος των μυών κατά τη χρήση και όχι μόνο την ερυθρότητα που οφείλεται στη φλεγμονή. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει όμως και η ομάδα με το φορέα του μικρογαλακτώματος, οπότε φαίνεται αυτή η δράση να αποδίδεται στον φορέα.

Από την συνολική στατιστική επεξεργασία σημαντική επίδραση στην πορεία της ερυθρότητας κατά τη διάρκεια του πειράματος φαίνεται να έχει μόνο το πήκτωμα RSV, καθώς η κρέμα RSV είχε αρνητική επίδραση και το μικρογαλάκτωμα είχε παρόμοια επίδραση με το φορέα του.

13.4. Μελανίνη

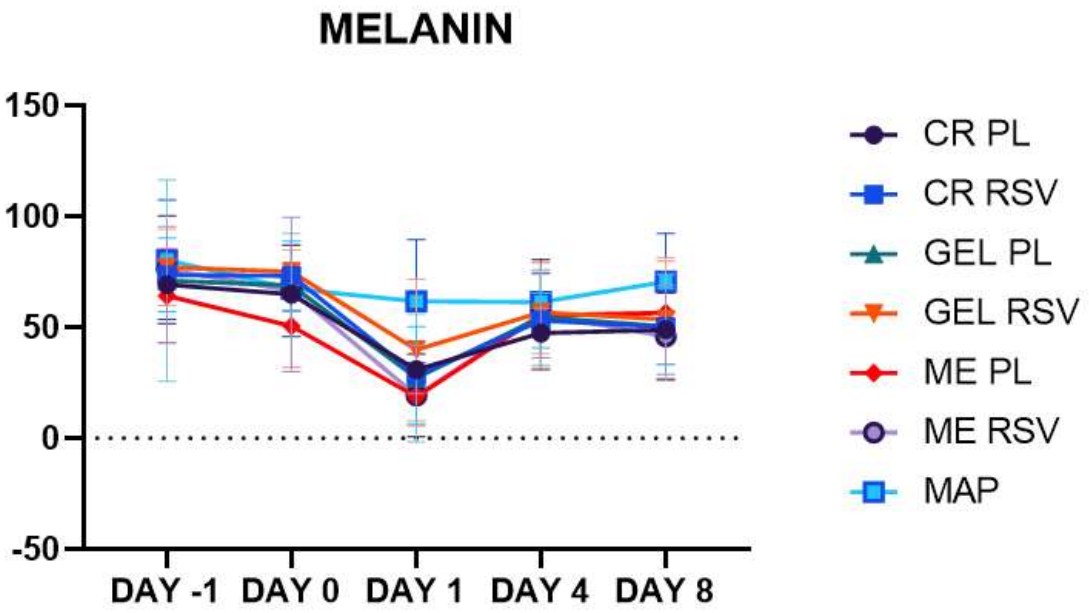
Η παραγωγή της μελανίνης αυξάνεται φυσιολογικά σε υγιές δέρμα, υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Καθώς η ρεσβερατρόλη εμφανίζει φαρμακολογική δράση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της μελανίνης, εξετάζεται η επίδραση των σκευασμάτων στην μελανίνη του δέρματος της ράχης των μυών. Στο παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι μετρήσεις για τη μελανίνη.

ΜΕΛΑΝΙΝΗ (mexameter units)						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	69,33	64,86	30,95	47,48	48,86
	SD	26,11	34,78	10,93	11,15	20,05
CR RSV	**MEAN**	73,67	73,24	28,38	53,10	50,24
	SD	16,58	15,64	21,84	12,29	16,93
GEL PL	**MEAN**	71,10	68,91	27,29	54,52	50,48
	SD	45,33	23,27	28,83	21,63	23,37
GEL RSV	**MEAN**	77,10	75,10	39,86	56,72	53,62
	SD	17,17	9,77	31,91	18,63	27,75
ME PL	**MEAN**	64,19	50,57	18,76	55,38	56,52
	SD	21,31	18,58	13,19	23,77	23,26
ME RSV	**MEAN**	76,00	66,52	19,33	55,86	45,95
	SD	24,22	20,53	18,63	24,78	19,58
MAP	**MEAN**	80,46	67,35	61,78	61,41	70,52
	SD	26,94	9,89	27,76	12,81	21,70

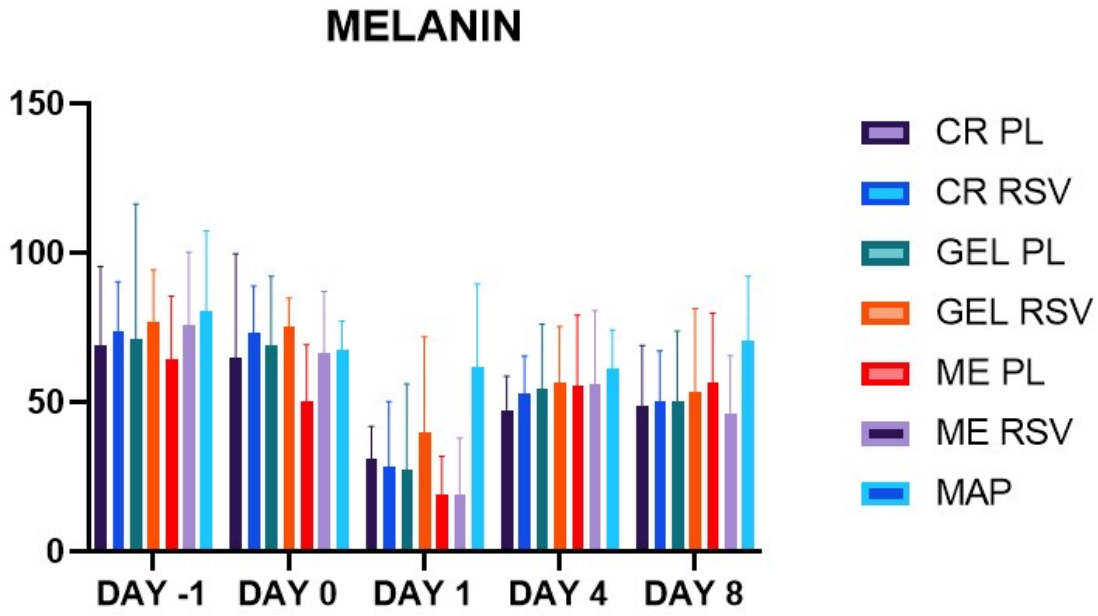
Πίνακας 26. Μετρήσεις μελανίνης ανά ομάδα σκευάσματος ανά ημέρα (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.

Η ανάλυση ANOVA έδειξε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά ημέρα και ανά ομάδα σκευάσματος ($p<0.05$).



Γράφημα Ε 7. Η εξέλιξη της μελανίνης κατά τη διάρκεια του πειράματος ανά ομάδα



Γράφημα Ε 8. Τα επίπεδα μελανίνης ανά ομάδα σκευασμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος

Συνολικά για την ομάδα των μαρτύρων τα επίπεδα μελανίνης παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ για όλες τις υπόλοιπες ομάδες εμφανίζεται ένα τοπικό ελάχιστο την ημέρα 4 που κορυφώνεται η φλεγμονή και ακολουθεί αύξηση των επιπέδων μέχρι την τελευταία ημέρα του πειράματος που επανέρχονται σε επίπεδα λίγο μικρότερα των αρχικών.

Ημέρα -1

Την ημέρα -1 δεν εμφανίζεται καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτό είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα καθώς την ημέρα εκείνη δεν έχει γίνει καμία παρέμβαση στους μύες.

Ημέρα 0

Παρατηρείται στατιστικά υψηλότερα επίπεδα μελανίνης στις ομάδες της κρέμας RSV και πηκτώματος RSV σε σχέση με την ομάδα που δέχθηκε τον φορέα του μικρογαλακτώματος.

Ημέρα 1

Την ημέρα 1, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση, οι ομάδες της κρέμας RSV και του φορέα της, του φορέα του πηκτώματος, του μικρογαλακτώματος RSV και του φορέα του , εμφανίζουν μικρότερη έκφραση μελανίνης σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Δεν συμβαίνει το ίδιο για το πήκτωμα RSV, δεν φαίνεται δηλαδή να διαφέρει από τα επίπεδα μελανίνης των μαρτύρων.

Ημέρα -4

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ των ομάδων.

Ημέρα -8

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης μελανίνης στην ομάδα που δέχτηκε το μικρογαλάκτωμα RSV σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Σύγκριση Σκευασμάτων

Οι μάρτυρες δεν εμφανίζουν καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα μελανίνης σε συνάρτηση με το χρόνο και την εξέλιξη της φλεγμονής.

Σύγκριση ανά σκεύασμα

Όλα τα σκευάσματα εμφάνισαν καθοδική πορεία στα επίπεδα μελανίνης από την έναρξη του πειράματος έως την ημέρα 1. Μία μικρή αύξηση παρατηρήθηκε στα επίπεδα μελανίνης, ίσως ως αντίδραση στην οξεία φάση φλεγμονής, τα οποία όμως φαίνεται να μειώνονται και πάλι μέχρι την ημέρα 8.

Ο φορέας της κρέμας και η κρέμα RSV εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της μελανίνης από την ημέρα -1 στις ημέρες 1, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση, και 4, την ημέρα εμφάνισης οξείας φλεγμονής. Η κρέμα RSV συνεχίζει αυτήν την μειούμενη πορεία στα επίπεδα μελανίνης μέχρι και την ημέρα 8, σε αντίθεση με την ομάδα του φορέα. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη διαπέραση της ρεσβερατρόλης.

Για την ομάδα που δέχθηκε το φορέα του πηκτώματος εμφανίζεται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων μελανίνης από την ημέρα 0 στην ημέρα 1. Αντίθετα, η ομάδα που δέχθηκε το πήκτωμα RSV εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων μελανίνης από την ημέρα

-1 στην ημέρα 1 και 4 και από την ημέρα 0 στην ημέρα 1. Αυτή η πρόωρη έναρξη μείωσης των επιπέδων μελανίνης ίσως ευθύνεται στην διαπέραση του δραστικού συστατικού.

Το μικρογαλάκτωμα RSV και ο φορέας του εμφανίζουν παρόμοια πορεία στα επίπεδα μελανίνης στο χρόνο, καθώς εμφανίζουν και οι δύο ομάδες στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων από την ημέρα -1 στην ημερα 1 και στατιστικά σημαντική αύξηση από την ημέρα 1 στην ημέρα 4 και 8. Στο σημείο που διαφέρουν το μικρογαλάκτωμα με το δραστικό συστατικό είναι στη σύγκριση των επιπέδων μελανίνης από την πρώτη μέρα του πειράματος στην τελευταία, όπου για την ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV τα επίπεδα μελανίνης παραμένουν χαμηλότερα από τα αρχικά στο τέλος του πειράματος, παρά την μικρή αύξηση ύστερα από την ημέρα 4. Συμπεραίνεται ότι το μικρογαλάκτωμα RSV φαίνεται στο σύνολο του πειράματος να μειώνει την έκφραση της μελανίνης, και αυτή η δράση αποδίδεται στην αυξημένη διαπέραση του δραστικού συστατικού.

13.5. Πάχος Δέρματος

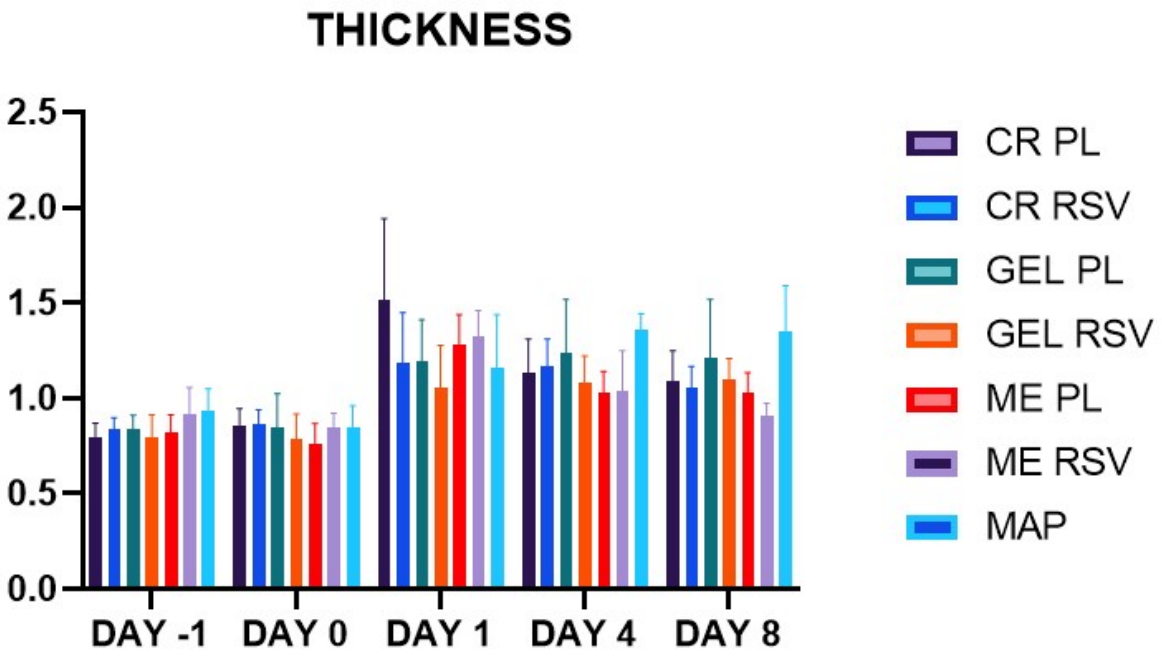
Η αύξηση του πάχους του δέρματος κατά την εξέλιξη της φλεγμονής εξαρτάται από την σχετική αιμάτωση του δέρματος που αυξάνεται σε φλεγμαίνοντα ιστό, και από την αντανακλαστική υπερκεράτωση που συμβαίνει σε περιπτώσεις λύσεις συνέχειας του δέρματος και διαταραχής του φραγμού. Η μείωση αντίστοιχα μπορεί να είναι δείκτης ατροφίας του δέρματος.

ΠΑΧΟΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ (cm)						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	0,79	0,86	1,51	1,14	1,09
	SD	0,07	0,09	0,43	0,17	0,16
CR RSV	**MEAN**	0,84	0,86	1,18	1,17	1,06
	SD	0,06	0,07	0,27	0,14	0,11
GEL PL	**MEAN**	0,84	0,84	1,19	1,24	1,21
	SD	0,07	0,18	0,22	0,28	0,31
GEL RSV	**MEAN**	0,8	0,79	1,06	1,08	1,1
	SD	0,12	0,13	0,22	0,14	0,11
ME PL	**MEAN**	0,82	0,76	1,28	1,03	1,03
	SD	0,09	0,1	0,16	0,11	0,11
ME RSV	**MEAN**	0,92	0,85	1,33	1,04	0,91
	SD	0,14	0,08	0,13	0,21	0,07
MAP	**MEAN**	0,93	0,85	1,16	1,36	1,35
	SD	0,12	0,11	0,28	0,08	0,24

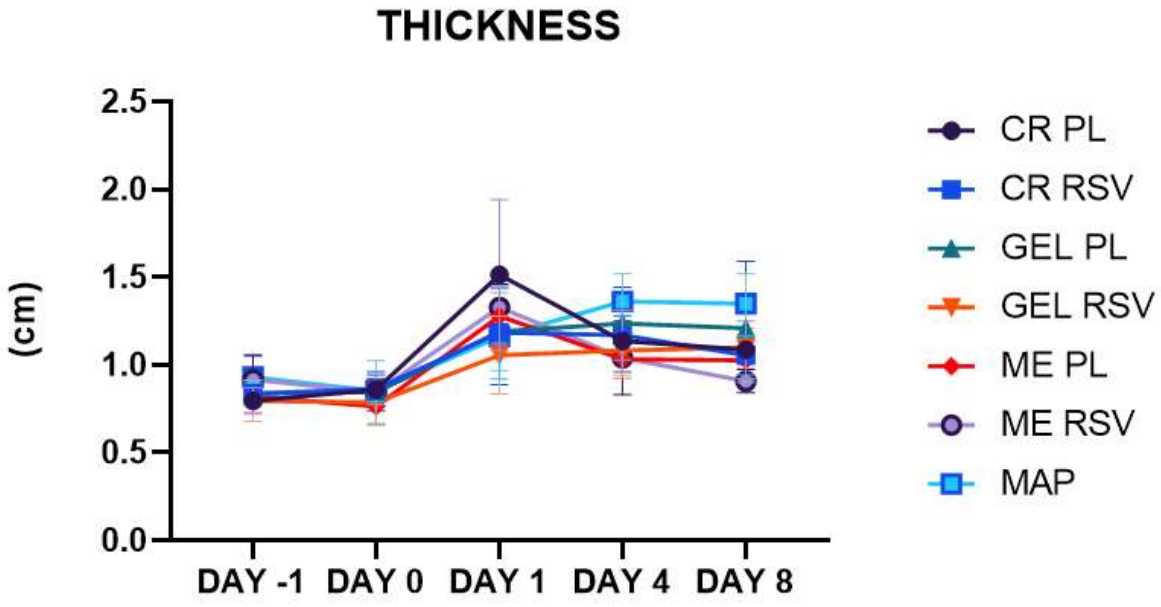
Πίνακας 27. Οι μετρήσεις του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος στην πορεία του πειράματος (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.

Η ανάλυση ANOVA έδειξε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά ημέρα και ανά ομάδα σκευάσματος ($p<0.05$).



Γράφημα Ε 9. Η εξέλιξη του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος κατά την διάρκεια του πειράματος



Γράφημα Ε 10. Σύγκριση διακύμανσης του πάχους του δέρματος ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα

Συνολικά, σε όλες τις ομάδες των σκευασμάτων παρατηρείται αύξηση στο πάχος του δέρματος από την ημέρα 0 στην ημέρα 1, μία ημέρα μετά την ακτινοβόληση και στη συνέχεια σταδιακή μείωση μέχρι την ημέρα 8 που επανέρχεται σε επίπεδα λίγο μεγαλύτερα ή ίσα με της πρώτης ημέρας του πειράματος. Για την ομάδα των μαρτύρων η αύξηση στο πάχος του δέρματος συνεχίζεται μέχρι και την ημέρα 8.

Ημέρα -1

Την πρώτη ημέρα του πειράματος, και κατά τυχαίο τρόπο, η ομάδα των μυών που δέχθηκε το φορέα της κρέμας εμφανίζει λεπτότερο δέρμα σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων, με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Το αναμενόμενο για αυτήν την ημέρα είναι όλοι οι μύες να εμφανίζουν το ίδιο πάχος δέρματος καθώς δεν έχει γίνει ακόμη καμία παρέμβαση.

Ημέρα 0

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Η προληπτική επάλειψη δεν επηρέασε το πάχος του δέρματος.

Ημέρα 1

Το δέρμα της ομάδας που δέχθηκε το μικρογαλάκτωμα RSV εμφανίζεται παχύτερο από το δέρμα της ομάδας που δέχθηκε την κρέμα RSV, με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Αυτό είναι ένδειξη εμφάνισης υπεραιμάτωσης στην ομάδα του μικρογαλακτώματος, που είναι δείκτης οξείας φλεγμονής. Αντίστοιχα παχύτερο εμφανίζεται και το δέρμα των μυών που δέχθηκαν τον φορέα της κρέμας, σε σχέση με το πήκτωμα RSV. .

Ημέρα 4

Στην ημέρα αυτή που αντιστοιχεί στην οξεία φάση της φλεγμονής, οι ομάδες που δέχθηκαν την κρέμα RSV και το φορέα της, το μικρογαλάκτωμα RSV και το φορέα του και το πήκτωμα RSV, εμφανίζουν μικρότερο πάχος του δέρματος σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Αυτό είναι δείκτης σχετικής εξέλιξης της φλεγμονής, όπου στους μάρτυρες φαίνεται να είναι εντονότερη από αυτές τις ομάδες. Στις περιπτώσεις που ο φορέας έχει την ίδια επίδραση με το σκεύασμα με δραστικό συστατικό, η δράση αποδίδεται στο φορέα. Από τα παραπάνω φαίνεται πως μόνο το πήκτωμα RSV οφείλει τη δράση του στην αυξημένη διαπέραση δραστικού συστατικού.

Ημέρα 8

Για την κρέμα RSV φαίνεται η ομάδα του φορέα αλλά και της κρέμας με δραστικό συστατικό να έχουν μικρότερο πάχος δέρματος από την ομάδα των μαρτύρων με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Αυτή η διαφορά αποδίδεται στο φορέα.

Για το πήκτωμα, μόνο η ομάδα με πήκτωμα RSV εμφανίζει στατιστικά μικρότερο πάχος δέρματος από τους μάρτυρες. Αυτή η δράση μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένη διαπέραση του δραστικού συστατικού.

Για το μικοργαλάκτωμα παρατηρείται τόσο για την ομάδα του φορέα όσο και για την όμάδα που δέχθηκε μικρογαλάκτωμα RSV να έχουν μικρότερο πάχος δέρματος από την ομάδα των μαρτύρων με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Ακόμη εμφανίζεται στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ το φορέα και του μικρογαλακτώματος RSV, με την ομάδα που δέχθηκε μικρογαλάκτωμα με δραστικό να εμφανίζει λεπτότερο δέρμα. Έτσι ναι μεν αποδίδεται μία προληπτική δράση στην

υπερκεράτωση του δέρματος επαγώμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία, στον φορέα του μικρογαλακτώματος, αλλά ακόμη μεγαλύτερη δράση αποδίδεται στη αύξηση της διαπέρασης του δραστικού συστατικού από αυτόν.

Σύγκριση σκευασμάτων

Για την ομάδα των μαρτύρων παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους του δέρματος καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, το οποίο δεν επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα.

Για την κρέμα, η κρέμα RSV και ο φορέας εμφανίζουν όμοια πορεία στο χρόνο, καθώς δεν φαίνεται να επηρεάζουν ο πάχος του δέρματος κατά τη φάση πρόληψης ενώ δεν προλαμβάνουν την πάχυνση του καθόλη την διάρκεια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους του δέρματος των μυών και των δύο ομάδων από την ημέρα 0 στην ημέρα 1,4 και 8. Την ημέρα 8 το πάχος παραμένει μεγαλύτερο από την πρώτη ημέρα.

Για το πήκτωμα RSV και για το φορέα του παρατηρείται όμοια συμπεριφορά, κατά την οποία το πάχος του δέρματος από την ημέρα 0 αυξάνεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο μέχρι την ημέρα 4. Από την ημέρα 4 στην ημέρα 8 παρατηρείται μία μικρή μείωση η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά το πάχος του δέρματος δεν επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα.

Για το μικρογαλάκτωμα σε ό,τι αφορά το φορέα, εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση στο πάχος του δέρματος από την ημέρα της ακτινοβόλησης μέχρι την ημέρα 4 κ στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι την ημέρα 8 όπου κ δεν επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα. Για το μικρογαλάκτωμα RSV, παρατηρείται όμοια συμπεριφορά ύστερα από την ακτινοβόληση με αύξηση μέχρι την ημέρα 1. Από την ημέρα 1 στην ημέρα 4 και από την ημέρα 4 στην ημέρα 8 παρατηρείται στατιστικά σημαντική σταδιακή μείωση του πάχους του δέρματος, τα επίπεδα της τελευταίας ημέρας να είναι μικρότερα των αρχικών με στατιστικά σημαντικό τρόπο.

Στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την πρόληψη της υπερκεράτωσης, σε σχέση με τους μάρτυρες και τον αντίστοιχο φορέα εμφάνισε μόνο το μικρογαλάκτωμα RSV.

13.6. Σμήγμα

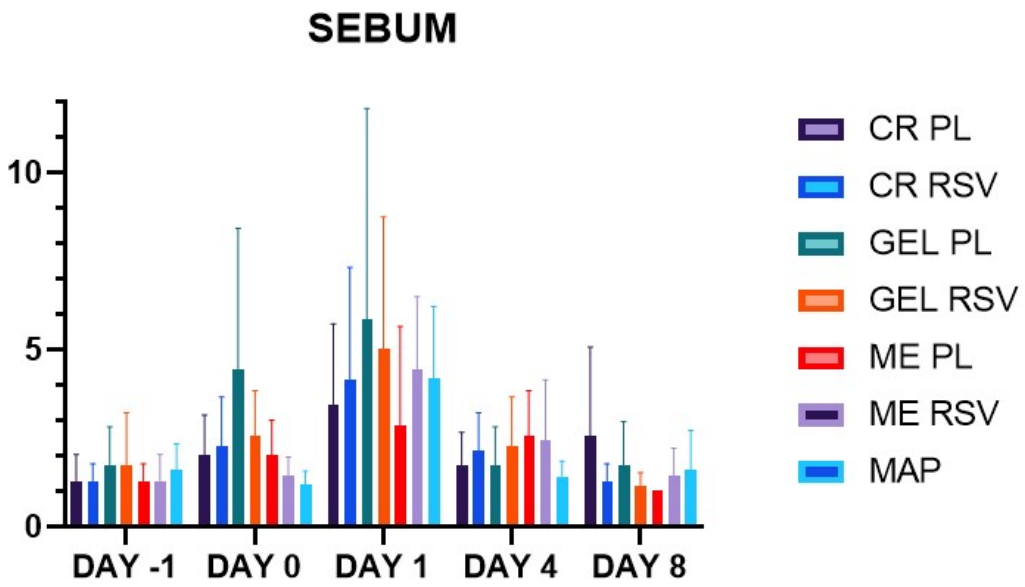
Το σμήγμα είναι σημαντικός δείκτης της εξέλιξης της φλεγμονής, καθώς η παραγωγή του μπορεί να αυξηθεί στο δέρμα που φλεγμαίνει, σαν προσπάθεια επαναφοράς της ενυδάτωσης και της φυσιολογικής λειτουργίας του φραγμού, χάρη στις συνθήκες εγκλεισμού που δημιουργεί το μίγμα λιπιδίων του σμήγματος.

ΣΜΗΓΜΑ						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	1,29	2,00	3,43	1,71	2,57
	SD	0,76	1,15	2,30	0,95	2,51
CR RSV	**MEAN**	1,29	2,29	4,14	2,14	1,29
	SD	0,49	1,38	3,18	1,07	0,49
GEL PL	**MEAN**	1,71	4,43	5,86	1,71	1,71
	SD	1,11	3,99	5,96	1,11	1,25
GEL RSV	**MEAN**	1,71	2,57	5,00	2,29	1,14
	SD	1,50	1,27	3,74	1,38	0,38
ME PL	**MEAN**	1,29	2,00	2,86	2,57	1,00
	SD	0,49	1,00	2,79	1,27	0,00
ME RSV	**MEAN**	1,29	1,43	4,43	2,43	1,43
	SD	0,76	0,53	2,07	1,72	0,79
MAP	**MEAN**	1,62	1,21	4,18	1,41	1,62
	SD	0,73	0,37	2,03	0,45	1,10

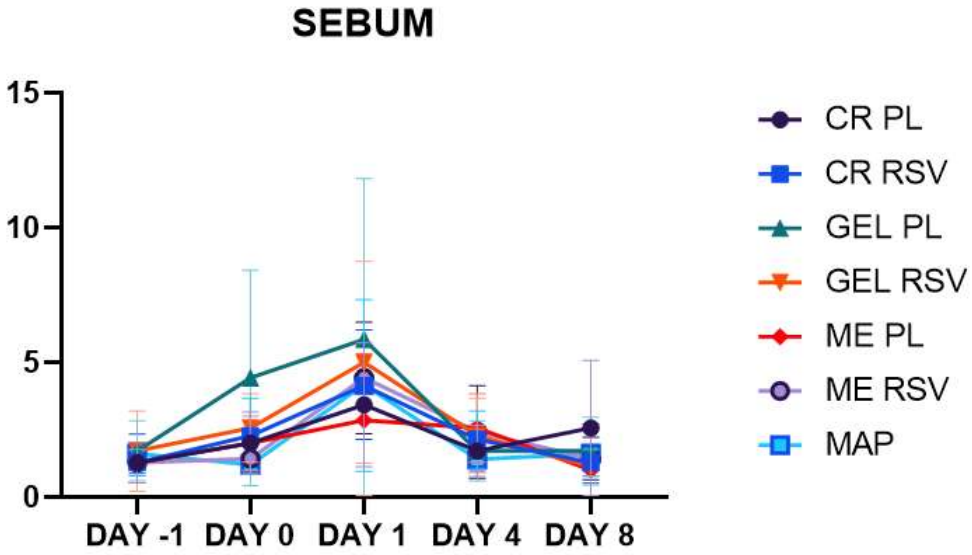
Πίνακας 28. Οι μετρήσεις του σμήγματος ανά ομάδα και ανά ημέρα πειράματος (μέσος όρος±τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή για κάποιες χρονικές στιγμές.

Στη συνέχεια έγινε μη παραμετρικός έλεγχος των τιμών ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα και μη παραμετρική σύγκριση των επιπέδων του σμήγματος ώς προς την ομάδα σκευάσματος και το χρονικό σημείο. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.



Γράφημα Ε 11. Συγκριτικόδιάγραμμα επιπέδων σμήγματος ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα πειράματος



Γράφημα Ε 12. Η εξέλιξη των επιπέδων του σμήγματος για κάθε ομάδα στην διάρκεια του πειράματος

Παρατηρήθηκαν οι εξής στατιστικά σημαντικές διαφορές:

Συνολικά, όλες οι ομάδες, μαζί με την ομάδα των μαρτύρων εμφάνισαν σημαντική αύξηση των επιπέδων του σμήγματος κατά την ημέρα 1, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Στην συνέχεια τα επίπεδα σμήγματος μειώνονται σταδιακά μέχρι την ημέρα 8 όπου και επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα , εκτός από τα επίπεδα της ομάδας του φορέα της κρέμας όπου παραμένουν αυξημένα σε σχέση με την πρώτη ημέρα του πειράματος.

Ημέρα -1

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων. Αυτό είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα καθώς την ημέρα εκείνη δεν έχει γίνει καμία παρέμβαση στους μύες.

Ημέρα 0

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του σμήγματος για την ομάδα που δέχθηκε το φορέα του πηκτώματος σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Φαίνεται ο φορέας του πηκτώματος να αύξησε τα επίπεδα των λιπιδίων στο δέρμα κατά τη φάση της πρόληψης.

Ημέρα 1

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, καθώς όλες εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα σμήγματος σε σχέση με τις προηγούμενες ημέρες. Η αύξηση αυτή ίσως οφείλεται στην ακτινοβόληση.

Ημέρα 4

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, καθώς όλες εμφανίζουν μικρή μείωση στα επίπεδα του σμήγματος σε σχέση με την ημέρα 1. Η μείωση αυτή ίσως σχετίζεται με την κορύφωση της φλεγμονής.

Ημέρα 8

Δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, καθώς όλες εμφανίζουν μικρή μείωση στα επίπεδα του σμήγματος σε σχέση με την ημέρα 4. Όλες οι ομάδες φαίνεται να επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα σμήγματος, εκτός από την ομάδα που δέχθηκε το φορέα της κρέμας που παρά τη μείωση εμφανίζει επίπεδα μεγαλύτερα από της ημέρας -1.

Σύγκριση ανά σκεύασμα

Η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του σμήγματος από την ημέρα -1 και 0 στην ημέρα 1, 24 ώρες μετά την ακτινοβόληση. Στη συνέχεια εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση από την ημέρα 1 στις ημέρες 4 και 8, επιστρέφοντας σε επίπεδα μικρότερα των αρχικών. Φαίνεται η ακτινοβόληση να εκκινεί έκκριση σμήγματος η οποία μειώνεται με την πρόοδο της φλεγμονής.

Η κρέμα RSV ακολουθεί όμοια πορεία με την ομάδα των μαρτύρων., καθώς παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του σμήγματος από την ημέρα -1 στην ημέρα 1 και στη συνέχεια στατιστικά σημαντική μείωση μέχρι την ημέρα 8. Για τον φορέα της, φαίνεται τα επίπεδα του σμήγματος να παραμένουν σταθερά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.

Για το πήκτωμα RSV και το φορέα του παρατηρείται όμοια συμπεριφορά μεταξύ τους και με την ομάδα των μαρτύρων, καθώς εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση από την ημέρα -1 στην ημέρα 1 και ύστερα στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του σμήγματος μέχρι την ημέρα 8.

Για το μικρογαλάκτωμα RSV και το φορέα του, παρατηρείται όμοια συμπεριφορά με ήπια αύξηση των επιπέδων του σμήγματος από την ημέρα -1 στην ημέρα 4, σε αντίθεση με την ομάδα των μαρτύρων. Στην συνέχεια παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του σμήγματος από την ημέρα 4 στην ημέρα 8 μόνο για την ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV, όπου και επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα. Παρατηρούμε ότι ο φορέας του μικρογαλακτώματος ευθύνεται για την πρόληψη της αντανακλαστικής αύξησης του σμήγματος ύστερα από την ακτινοβόληση, ενώ το μικρογαλάκτωμα RSV επιτρέπει αυτή την αύξηση επαναφέροντας όμως το δέρμα στα αρχικά επίπεδα.

Συνολικά δεν διακρίνεται κάποιο σκεύασμα να διαφέρει από την συμπεριφορά της ομάδας των μαρτύρων ώς προς την παραγωγή σμήγματος. κατά τη διάρκεια του πειράματος.

13.7. pH

Το pH του δέρματος μετρήθηκε την τελευταία ημέρα του πειράματος για να διαπιστωθεί η επαναφορά των περισσότερων μυών στην αρχική υγιή κατάσταση δέρματος. Οι μετρήσεις κάθε ομάδας συγκρίθηκαν με μία ομάδα 7 υγιών αρσενικών μυών SKH -1 στους οποίους δεν είχε γίνει καμία παρέμβαση.

pH		
ΟΜΑΔΑ	**Mean**	**SD**
CR PL	6,33	0,11
CR RSV	6,47	0,13
GEL PL	6,36	0,12
GEL RSV	6,29	0,15
ME PL	6,39	0,08
ME RSV	6,57	0,13
MAR	6,50	0,14
UNTREATED	6,17	0,11

Πίνακας 29. Τιμές pH ανά ομάδα σκευάσματος την ημέρα 8 του πειράματος

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.

Η ανάλυση ANOVA έδειξε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά ομάδα σκευάσματος ($p<0.05$).

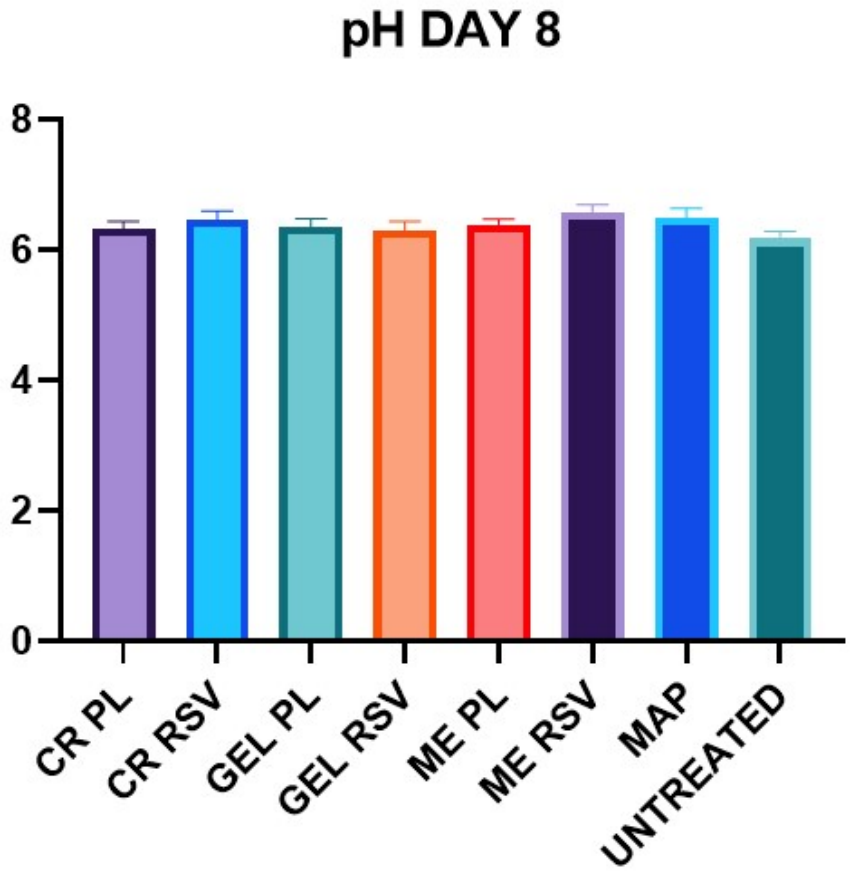
Οι μάρτυρες φαίνεται να διατηρούν μεγαλύτερο pH από την ομάδα ελέγχου που δεν είχε δεχθεί καμία παρέμβαση. Φαίνεται λοιπόν να διατηρείται ένα μικρό επίπεδο φλεγμονής στους μάρτυρες την τελευταία ημερά.

Η ομάδα που δέχθηκε τον φορέα της κρέμας RSV εμφανίζει μεγαλύτερο pH από την ομάδα ελέγχου αλλά μικρότερο από την ομάδα των μαρτύρων, με στατιστικά σημαντικό τρόπο. Η ομάδα που δέχθηκε την κρέμα RSV εμφανίζει μεγαλύτερο pH από την ομάδα ελέγχου, όμοιο με των μαρτύρων και μεγαλύτερο από την ομάδα που δέχθηκε το πήκτωμα RSV. Φαίνεται έτσι οι μύες που δέχθηκαν την κρέμα RSV ή τον φορέα της να μην έχουν επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα pH.

Η ομάδα που δέχθηκε το πήκτωμα RSV ή τον φορέα του εμφανίζει επίπεδα pH μικρότερα από της ομάδας των μαρτύρων αλλά μεγαλύτερα από της ομάδας ελέγχου. Ακόμη και οι δύο ομάδες εμφάνισαν μικρότερο pH και ίσως καλύτερη κατάσταση υγείας την τελευταία ημέρα, σε σχέση με το μικρογαλάκτωμα RSV. Από τα παραπάνω φαίνεται το πήκτωμα RSV και ο φορέας του να εμφάνισαν καλύτερες τιμές pH την τελευταία ημέρα του πειράματος σε σχέση με τους μάρτυρες και το μικρογαλάκτωμα RSV. Καθώς όμως ο φορέας με το σκεύασμα με δραστικό συστατικό έχουν την ίδια επίδραση, η δράση αποδίδεται στα συστατικά του φορέα.

Οι ομάδες που δέχθηκαν το μικρογαλάκτωμα RSV ή τον φορέα του εμφανίζουν μεγαλύτερο pH από την ομάδα ελέγχου αλλά καμία στατιστικά σημαντική διαφορά από τους μάρτυρες.

Συνολικά βλέπουμε πώς καμία ομάδα δεν είχε επανέλθει πλήρως σε απόλυτα υγιείς τιμές pH, παρόλο που οι τιμές είναι αρκετά κοντά στις φυσιολογικές. Παρόλα αυτά το πείραμα τερματίστηκε με βάση την μακροσκοπική εξέταση της ράχης των μυών, η πλειοψηφία των οποίων δεν έδειχνε πλέον σημάδια φλεγμονής.



Γράφημα Ε 13. Σύγκριση τιμών pH ανά ομάδα σκευάσματος την ημέρα 8

13.8. Τρισδιάστατη απεικόνιση με κάμερα Antera ®

13.8.1. Τραχύτητα δέρματος

Η κάμερα Antera® έχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιεί την τραχύτητα της επιφάνειας που φωτογραφίζει, μέσω μαθηματικής επεξεργασίας του τρόπου με τον οποίο αντανακλάται το φως της λυχνία της. Η τραχύτητα του δέρματος είναι δείκτης αξιολόγησης της φλεγμονής καθώς κατά την φλεγμονώδη αντίδραση εμφανίζονται παράγοντες που αλλοιώνουν την επιφάνεια του δέρματος, όπως η υπεραιμία, η λύση της συνέχειας του δέρματος και η αντανακλαστική σε τραυματισμό ή ακτινοβολία υπερκεράτωση ή πάχυνση της επιδερμίδας.

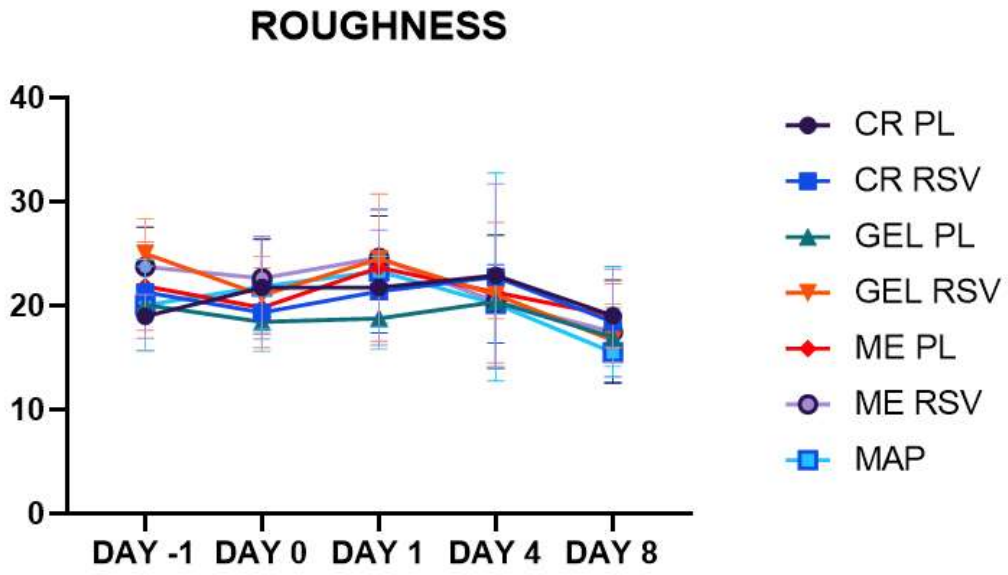
Τα δεδομένα για την τραχύτητα του δέρματος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

ΤΡΑΧΥΤΗΤΑ						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	18,99	21,75	21,75	22,92	19,06
	SD	2,11	4,93	5,52	8,81	4,47
CR RSV	**MEAN**	21,33	19,37	21,37	22,79	18,46
	SD	2,49	1,63	3,38	9,99	5,32
GEL PL	**MEAN**	20,08	18,45	18,78	20,37	16,98
	SD	4,36	2,82	2,97	6,31	2,85
GEL RSV	**MEAN**	25,03	21,02	24,52	21,04	16,69
	SD	3,33	3,74	6,2	2,27	3,49
ME PL	**MEAN**	21,88	19,8	23,68	21,27	19,06
	SD	4,27	3,85	7,08	6,74	3,06
ME RSV	**MEAN**	23,75	22,64	24,62	20,38	17,49
	SD	3,79	3,76	4,03	6,39	4,96
MAP	**MEAN**	20,04	21,86	23,33	20,19	15,51
	SD	4,34	4,59	5,93	3,77	2,88

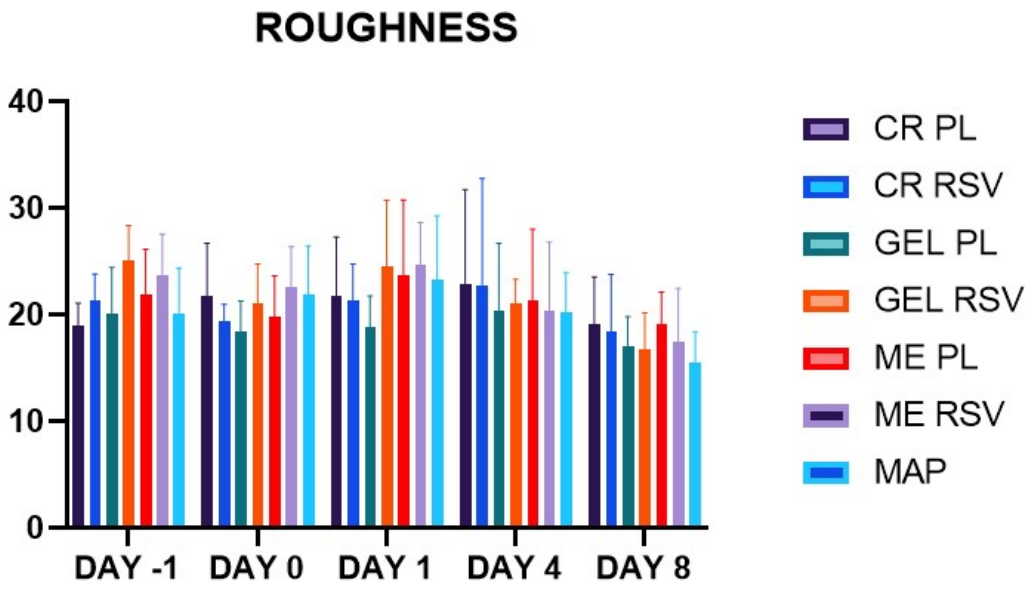
Πίνακας 30. Μετρήσεις τραχύτητας από την κάμερα Antera ανά ομάδα σκευάσματος και ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.

Η ανάλυση ANOVA έδειξε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά ημέρα και ανά ομάδα σκευάσματος ($p<0.05$). Παρακάτω φαίνεται και η διακύμανση των τιμών αιμοσφαιρίνης κάθε ομάδας μυών ανά ημέρα πειράματος.



Γράφημα Ε 14. Διακύμανση των τιμών τραχύτητας στην πορεία του πειράματος



Γράφημα Ε 15.Διακύμανση τιμών τραχύτητας ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα

Συνολικά παρατηρείται μία πτώση στην τραχύτητα ύστερα από τη φάση της πρόληψης, μία σημαντική ΄άνοδος την ημέρα 4 στην οξεία φάση της φλεγμονής και μία σημαντική μείωση των επιπέδων τραχύτητας στο τέλος του πειράματος, όπου όλες οι ομάδες εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα τραχύτητας από την φυσική τραχύτητα που διέθεταν την πρώτη ημέρα του πειράματος.

Ημέρα -1

Την πρώτη ημέρα παρατηρείται μία εγγενής τραχύτητα στο δέρμα των μυών όλων των ομάδων η οποία είναι υπεύθυνη για στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων :

- Του φορέα της κρέμας με του μικρογαλακτώματος RSV
- Του πηκτώματος RSV με της κρέμας RSV , του φορέα της κρέμας, του φορέα του πηκτώματος και των μαρτύρων.

Ημέρα 0

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν την πρώτη ημέρα του πειράματος έχουν εξομαλυνθεί και δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Ο κοινός παρονομαστής όλων των ομάδων στην φάση πρόληψης είναι η διαπνέουσα περίδεση που τους έγινε. Αυτή φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την εξομάλυνση της επιφάνειας του δέρματος, ίσως λόγω των συνθηκών εγκλεισμού που δημιουργεί και αυξάνει έτσι την ενυδάτωση του δέρματος.

Στην ημέρα 0 στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στην ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV και της ομάδας του φορέα του πηκτώματος. Η τελευταία εμφανίζει μικρότερη τραχύτητα από την ομάδα του μικρογαλακτώματος.

Ημέρα 1

Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των ομάδων πέρα από την διαφορά που παρατηρήθηκε ανάμεσα στην ομάδα του φορέα του πηκτώματος και του μικρογαλακτώματος RSV που διατηρείται και σε αυτό το χρονικό σημείο. Αυτή η σημαντική διαφορά οφείλεται λιγότερο στην διαφορετική συμπεριφορά των δύο σκευασμάτων στο χρόνο αλλά κυρίως στο γεγονός ότι η ομάδα του μικρογαλακτώματος εμφανίζει τη μεγαλύτερη τραχύτητα σε αυτά τα χρονικά σημεία και η ομάδα του φορέα του πηκτώματος την μικρότερη, με αποτέλεσμα να απέχουν σημαντικά οι τιμές τους.

Ημέρα 4

Στην ημέρα οξείας φλεγμονής δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα σκευάσματα, καθώς όλες οι ομάδες εμφανίζουν περίπου όμοια επίπεδα τραχύτητας και σχεδόν όμοια επίπεδα με την ημέρα 0.

Ημέρα 8

Την τελευταία ημέρα του πειράματος συνεχίζουν να μην παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα σκευάσματα, καθώς όλα έχουν εμφανίσει μείωση στην τραχύτητα και εμφανίζουν σχεδόν όμοιες τιμές τραχύτητας.

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι η διαφορά του φορέα του μικρογαλακτώματος από τους μάρτυρες, με την τραχύτητα του δέρματος των ζώων της ομάδας

του φορέας μικρογαλακτώματος να παραμένει σε υψηλά επίπεδα, σχεδόν όμοια με της ημέρας 4.

Σύγκριση ανά σκεύασμα

Η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει στατιστικά σημαντική αύξηση στην τραχύτητα από την ημέρα -1 στην ημέρα 1 και στη συνέχεια μέχρι και την ημέρα 8 εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων τραχύτητας.

Οι ομάδες της κρέμας RSV και του φορέα της φαίνεται να ακολουθούν την ίδια πορεία με τους μάρτυρες χωρίς να είναι καμία διακύμανση στατιστικά σημαντική. Δεν διακρίνεται στατιστικά σημαντική διαφορά της κρέμας RSV από τον φορέα της και τους μάρτυρες.

Η ομάδα του φορέα του πηκτώματος εμφανίζει μικρή αύξηση μέχρι την ημέρα 4 και ύστερα μειώνεται μέχρι την ημέρα 8, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική αυτή η παρατήρηση. Η ομάδα του πηκτώματος RSV αντίθετα ακολουθεί την ίδια πορεία με τους μάρτυρες και τον φορέα του πηκτώματος αλλά οι τιμές της τραχύτητας εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μείωση στη φάση πρόληψης, αύξηση μέχρι την ημέρα 4 και ύστερα μείωση μέχρι την ημέρα 8, σε επίπεδα χαμηλότερα των αρχικών. Το πήκτωμα φαίνεται να διαφέρει στην απόδοση του στην μείωση της τραχύτητας σε σχέση με το φορέα του και την ομάδα των μαρτύρων.

Η ομάδα του φορέα του μικρογαλακτώματος εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων τραχύτητας στη φάση πρόληψης αλλά και στην συνολική διάρκεια του πειράματος, ενώ φαίνεται να ακολουθεί την πορεία των μαρτύρων. Η ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων τραχύτητας στη φάση πρόληψης, αύξηση στις 24 ώρες από την ακτινοβόληση και στη συνέχεια στατιστικά σημαντική μείωση από την ημέρα 1 στην ημέρα 4 και 8. Στατιστικά σημαντική για την ομάδα αυτή εμφανίζεται και η συνολική μείωση της τραχύτητας στο σύνολο της διάρκειας του πειράματος η ομάδα του μικρογαλακτώματος διαφέρει από την ομάδα των μαρτύρων και του φορέα του μικρογαλακτώματος στην σημαντικότητα και στην απόδοση της μείωσης της τραχύτητας καθόλη τη διάρκεια του πειράματος..

13.8.2. Αιμοσφαιρίνη

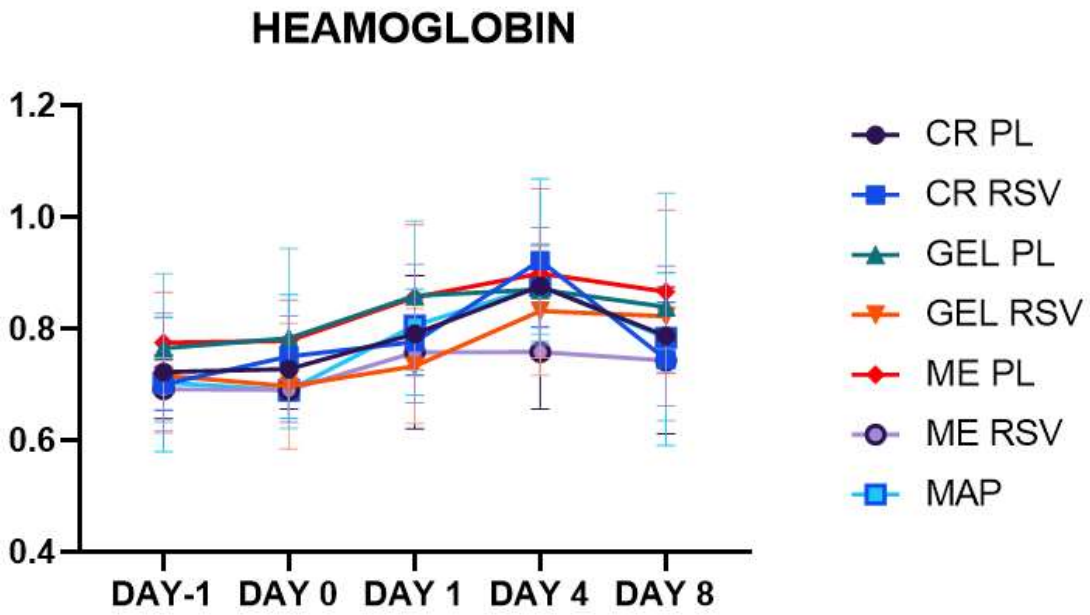
Η κάμερα Antera® έχει τη δυνατότητα να ποσοτικοποιεί την αντανάκλαση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος που αντιστοιχεί στην απορρόφηση του μορίου της αιμοσφαιρίνης. Η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο δέρμα ευθύνεται για την ερυθρότητα και η αύξηση της είναι δείκτης υπεραιμίας και φλεγμονώδους αντίδρασης. Οι τιμές που έδωσε η κάμερα για την αιμοσφαιρίνη παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ						
ΟΜΑΔΑ		**ΗΜΕΡΑ -1**	**ΗΜΕΡΑ 0**	**ΗΜΕΡΑ 1**	**ΗΜΕΡΑ 4**	**ΗΜΕΡΑ 8**
CR PL	**MEAN**	0,72	0,73	0,79	0,88	0,79
	SD	0,11	0,1	0,12	0,1	0,13
CR RSV	**MEAN**	0,7	0,75	0,78	0,92	0,75
	SD	0,12	0,11	0,1	0,15	0,15
GEL PL	**MEAN**	0,77	0,78	0,86	0,87	0,84
	SD	0,13	0,16	0,13	0,08	0,2
GEL RSV	**MEAN**	0,72	0,7	0,73	0,83	0,82
	SD	0,1	0,11	0,1	0,12	0,08
ME PL	**MEAN**	0,77	0,78	0,86	0,9	0,87
	SD	0,09	0,07	0,13	0,15	0,15
ME RSV	**MEAN**	0,69	0,69	0,76	0,76	0,74
	SD	0,05	0,03	0,14	0,1	0,13
MAP	**MEAN**	0,7	0,69	0,81	0,88	0,78
	SD	0,05	0,02	0,09	0,07	0,11

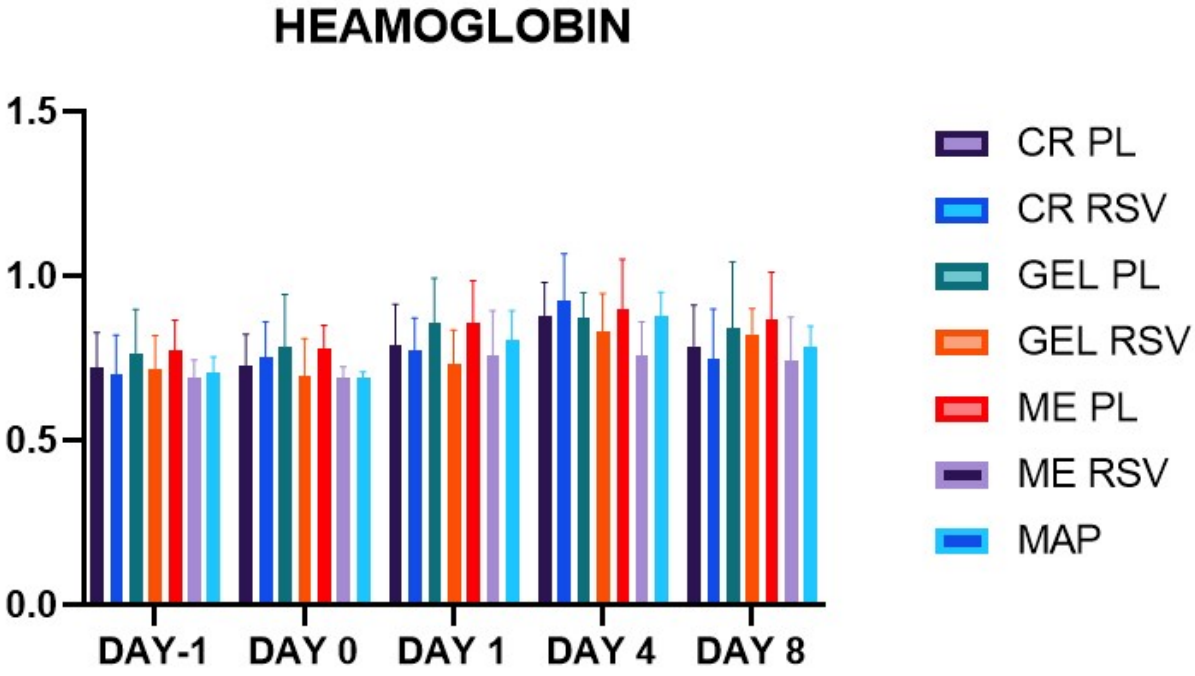
Πίνακας 31. Μετρήσεις αιμοσφαρίνης από την κάμερα Antera ανά ομάδα σκευάσματος και ανά χρονική στιγμή (μέσος όρος ±τυπική απόκλιση)

Από τη στατιστική επεξεργασία προκύπτει ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή σε όλες τις ομάδες, σε κάθε χρονική στιγμή. Οι πίνακες με τις τιμές των αντίστοιχων δοκιμασιών παρατίθενται στο παράρτημα.

Η ανάλυση διακύμανσης ANOVA έδειξε ότι εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανά ημέρα και ανά ομάδα σκευάσματος ($p<0.05$). Παρακάτω φαίνεται και η διακύμανση των τιμών αιμοσφαιρίνης κάθε ομάδας μυών ανά ημέρα πειράματος.



Γράφημα Ε 16. Διακύμανση τιμών αιμοσφαιρίνης ανά ομάδα σκευάσματος και ανά ημέρα



Γράφημα Ε 17. Πορεία επιπέδων αιμοσφαιρίνης ανά ομάδα σκευάσματος στην πορεία του πειράματος

Συνολικά παρατηρείται αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης την ημέρα 4 της κορύφωσης της φλεγμονής για όλες τις ομάδες εκτός από την ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV. Στην συνέχεια παρατηρείται μείωση των επιπέδων μέχρι την ημέρα 8 όπου και επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα.

Ημέρα -1

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται ανάμεσα στις ομάδες διαφορετικών σκευασμάτων, που είναι και αναμενόμενο καθώς δεν έχουν προηγηθεί παρεμβάσεις.

Ημέρα 0

Η ομάδα του φορέα μικρογαλακτώματος εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης από την ομάδα των μαρτύρων αλλά και από την ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV. Αυτό συμβαίνει γιατί ενδεχομένως να εμφανίστηκε ήπιος ερεθισμός κατά την προληπτική επάλειψη του φορέα του μικρογαλακτώματος. Η ερεθιστική δράση ενδεχομένως να οφείλεται στο ποσοστό επιφανειοδραστικών που περιέχει ο φορέας. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ερεθισμός αυτός δεν εμφανίστηκε στην ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV.

Ημέρα 1

Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται ανάμεσα στις ομάδες διαφορετικών σκευασμάτων, ενώ συνολικά εμφανίζουν μικρή αύξηση στις τιμές της αιμοσφαιρίνης από την ημέρα 0 στην ημέρα 1.

Ημέρα 4

Παρατηρείται επιπρόσθετη αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης καθώς η ημέρα 4 θεωρείται το σημείο οξείας φλεγμονής. Η ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV δεν εμφανίζει αύξηση από την ημέρα 0 στην ημέρα 4 ενώ εμφανίζει μικρότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης από τις ομάδες των ομάδων των μαρτύρων, της κρέμας RSV και του πηκτώματος RSV.

Ημέρα 8

Παρατηρείται μείωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης σε όλες τις ομάδες. Εμφανίζονται στατιστικά μικρότερα τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης των μαρτύρων από τα επίπεδα της ομάδας του πηκτώματος RSV και του φορέα του μικρογαλακτώματος., ένδειξη ότι αυτές οι ομάδες εμφανίζουν ακόμη σημάδια φλεγμονής σε αντίθεση με τους μάρτυρες.

Σύγκριση Σκευασμάτων

Η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει σταθερά επίπεδα αιμοσφαιρίνης στην φάση πρόληψης από την ημέρα -1 στην ημέρα 0, στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων από την ημέρα 0 στην ημέρα 1 και 4 και στατιστικά σημαντική μείωση από την ημέρα 4 στην ημέρα 8, όπου κ επανέρχονται στα αρχικά επίπεδα. Αυτό ήταν και το κριτήριο για τον τερματισμό του πειράματος.

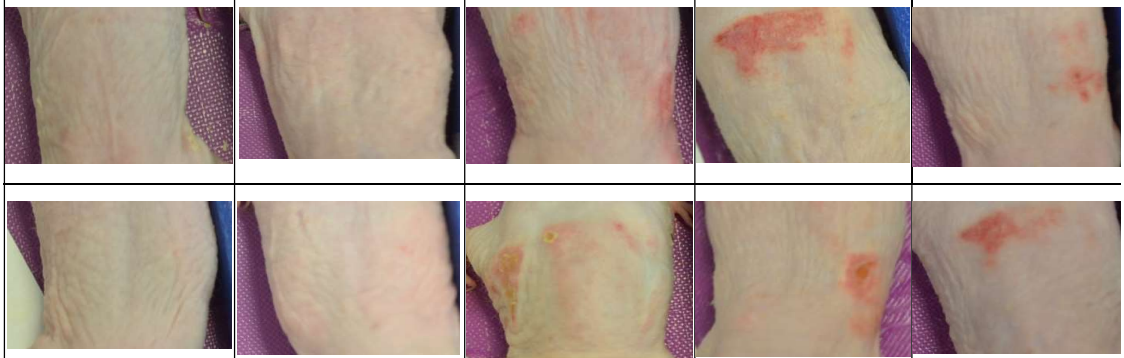
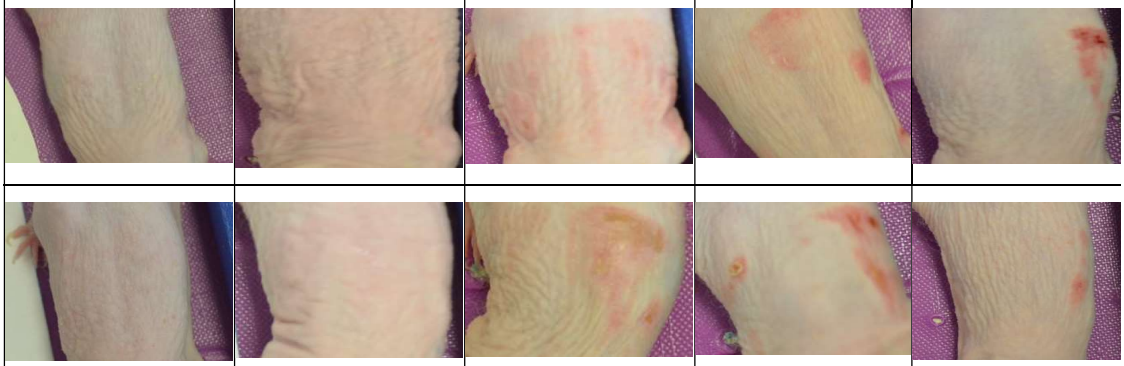
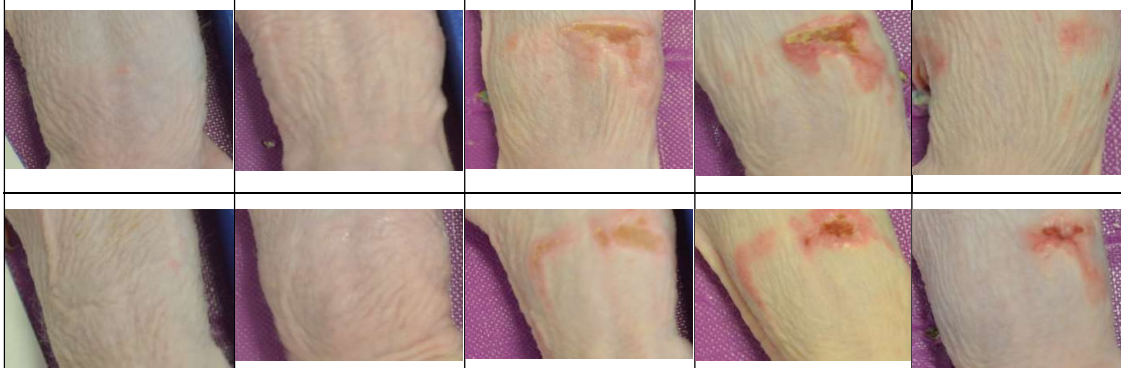
Για την ομάδα της κρέμας RSV και την ομάδα του φορέα της ορίζεται ως στατιστικά σημαντική ακριβώς η ίδια πορεία στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης με αυτή των μαρτύρων. Δεν φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στην πορεία της φλεγμονής, όπως διαγράφεται από τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

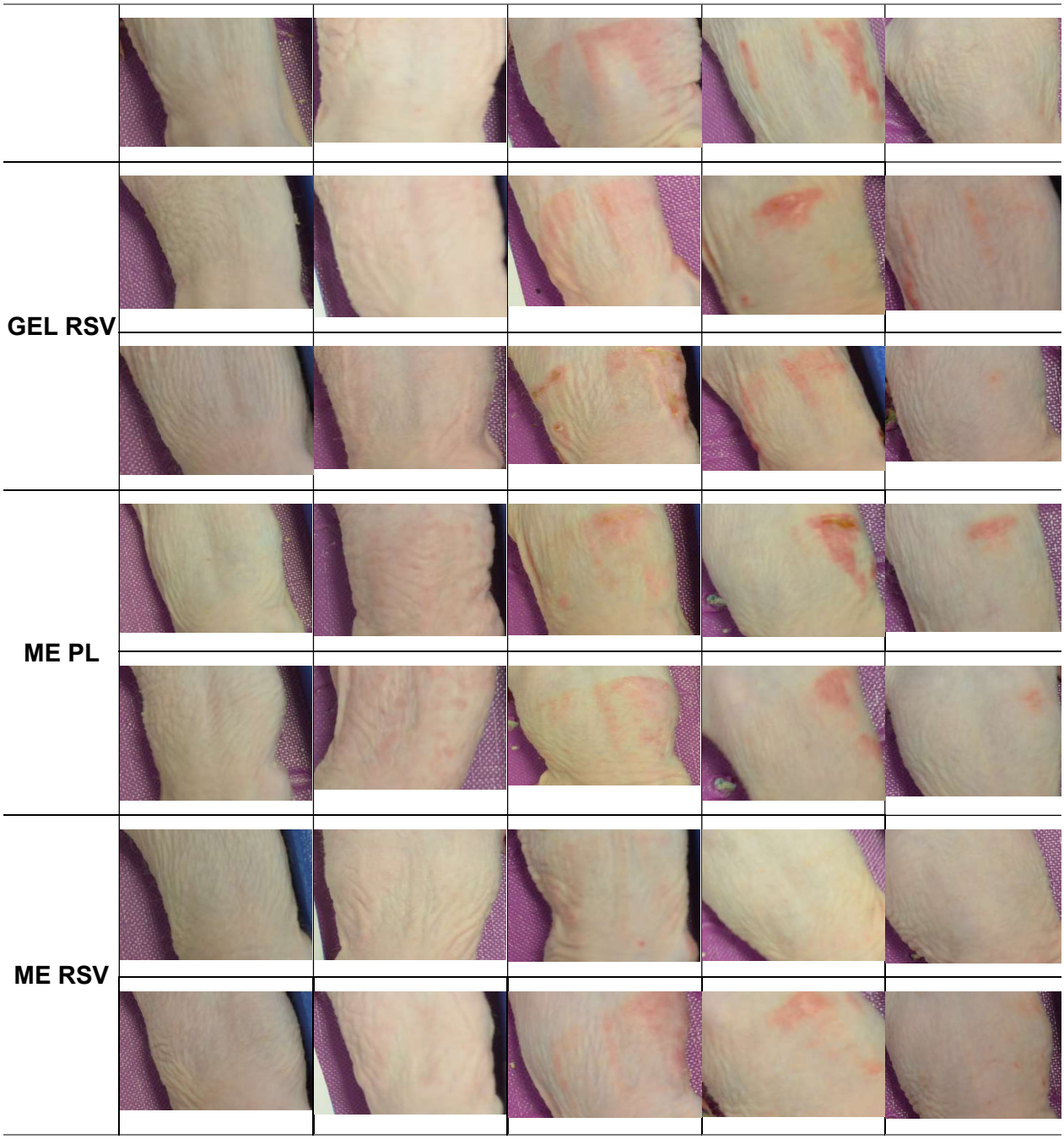
Για την ομάδα του φορέα του πηκτώματος εμφανίζεται στατιστικά σημαντική μόνο η αύξηση των επιπέδων από την ημέρα -1 στην ημέρα 4. Αντίθετα για την ομάδα του πηκτώματος RSV εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική η αύξηση από την ημέρα -1 στην ημέρα 4 και 8, που δείχνει πως στο τέλος του πειράματος οι μύες δεν επανέρχονται στα επίπεδα πρό ακτινοβόλησης. Ακόμη φαίνεται στατιστικά σημαντική η αύξηση των επιπέδων από την ημέρα 0 στην ημέρα 4 κ 8, που δείχνει μία συνεχή αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σε αυτήν την παράμετρο το πήκτωμα RSV φαίνεται να μην βοηθά στην εξέλιξη της φλεγμονής.

Για την ομάδα που έλαβε τον φορέα του μικρογαλακτώματος φαίνεται ώς στατιστικά σημαντική μόνο η αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης από την ημέρα -1 στην ημέρα 4, της οξείας φάσης της φλεγμονής. Για το μικρογαλάκτωμα RSV καμία μεταβολή στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης δεν σημειώνεται ώς στατιστικά σημαντική. Η επίδραση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της διαπέρασης της ρεσβερατρόλης χάρη στο φορέα του μικρογαλακτώματος, καθώς παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ του φορέα και του μικρογαλακτώματος με ρεσβερατρόλη.

13.9. Φωτοτεκμηρίωση

Για την αξιόπιστη τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων και των παρατηρήσεων του πειράματος, έγινε λήψη φωτογραφιών της ράχης των μυών κάθε ομάδας, την ημέρα πρόκλησης (ημέρα 0), ημέρα 4,6 και 8. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται ενδεικτικές φωτογραφίες για κάθε ομάδα, σε κάθε χρονική στιγμή.

ΟΜΑΔΑ	ΗΜΕΡΑ 0	ΗΜΕΡΑ 1	ΗΜΕΡΑ 4	ΗΜΕΡΑ 6	ΗΜΕΡΑ 8
MAP					
CR PL					
CR RSV					
GEL PL					



Παρατηρώντας τις φωτογραφίες της ράχης των μυών μπορούμε να πούμε πως:

- Στην ομάδα των μαρτύρων εμφανίζεται ερυθρότητα την ημέρα της ακτινοβόλησης (ημέρα 1), έντονη ερυθρότητα και εσχάρες την ημέρα 4 και διατήρηση τους μέχρι και την ημέρα 8.
- Η ομάδα της κρέμας RSV και του φορέα της ακολουθούν την ίδια πορεία με τους μάρτυρες. Η ομάδα της κρέμας RSV δεν φαίνεται να διαφέρει από το φορέα της και από τους μάρτυρες.
- Η ομάδα του πηκτώματος RSV και του φορέα του εμφανίζει ίδια πορεία με τους μάρτυρες μέχρι την ημέρα 4 με λιγότερο έντονες εσχάρες, οι οποίες μειώνονται σημαντικά σε

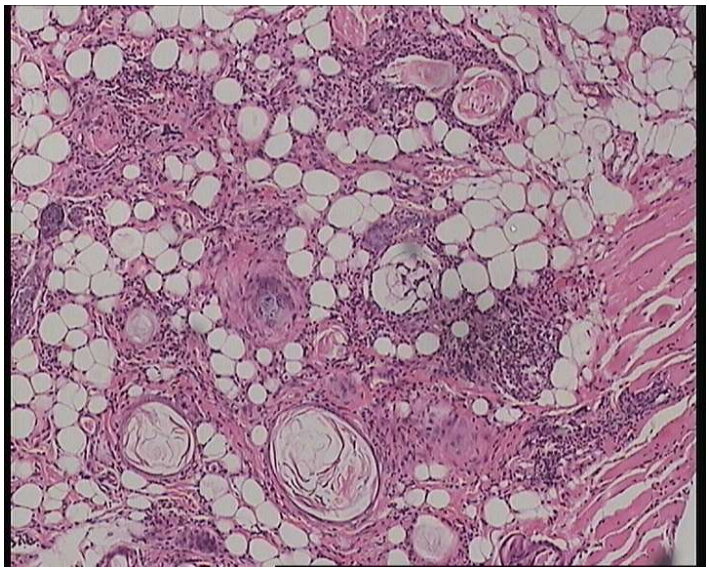
μέγεθος και σχεδόν δεν διακρίνονται την ημέρα 8. Η ομάδα του πηκτώματος RSV δεν φαίνεται να διαφέρει από το φορέα του.

- Η ομάδα του φορέα του μικρογαλακτώματος ακολουθεί όμοια πορεία με τους μάρτυρες και εμφανίζει εσχάρες την ημέρα 4 που φαίνεται να διατηρούνται σε ήπιο βαθμό την τελευταία ημέρα του πειράματος. Η ομάδα του μικρογαλακτώματος RSV, εμφανίζει ήπια ερυθρότητα την ημέρα 1, έντονο ερεθισμό την ημέρα 4 και ήπιες εσχάρες, οι οποίες είναι σημαντικά μικρότερες την ημέρα 6 και δεν διακρίνονται την ημέρα 8,όπου οι μύες έχουν υγιή εμφάνιση όμοια με της ημέρας 0. Το μικρογαλάκτωμα RSV φαίνεται να μείωσε την ένταση των σημείων της φλεγμονής την ημέρα της κορύφωσής της και να βελτίωσε τον χρόνο ανάρρωσης σε σχέση με το φορέα του και τα άλλα σκευάσματα.

13.10. Ιστοπαθολογική εξέταση

Για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των σκευασμάτων ρεσβερατρόλης στην πρόληψη και θεραπεία της φλεγμονής, την τελευταία ημέρα του πειράματος έγινε λήψη δειγμάτων δέρματος από κάθε ομάδα. Ακολούθησε ιστοπαθολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης και παρατήρηση των δειγμάτων με οπτικό μικροσκόπιο και φακό μεγέθυνσης x100. Η χρώση αυτή μας επιτρέπει να διακρίνουμε τα σημεία της φλεγμονής. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα πολυμορφοπύρηνα και τα λεμφοκύτταρα που επιστρατεύονται κατά την φλεγμονώδη αντίδραση χρωματίζονται ιώδη, ενώ τα φυσιολογικά συστατικά του δέρματος, όπως τα κερατινοκύτταρα τα κύτταρα της δερμίδας και των εξαρτημάτων χρωματίζονται ερυθρά. Έτσι παρατηρούμε την συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων, η παρουσία των οποίων δηλώνει φλεγμονή, και το μέγεθος και την ακεραιότητα των φυσιολογικών δομών.

13.10.1. Μάρτυρες



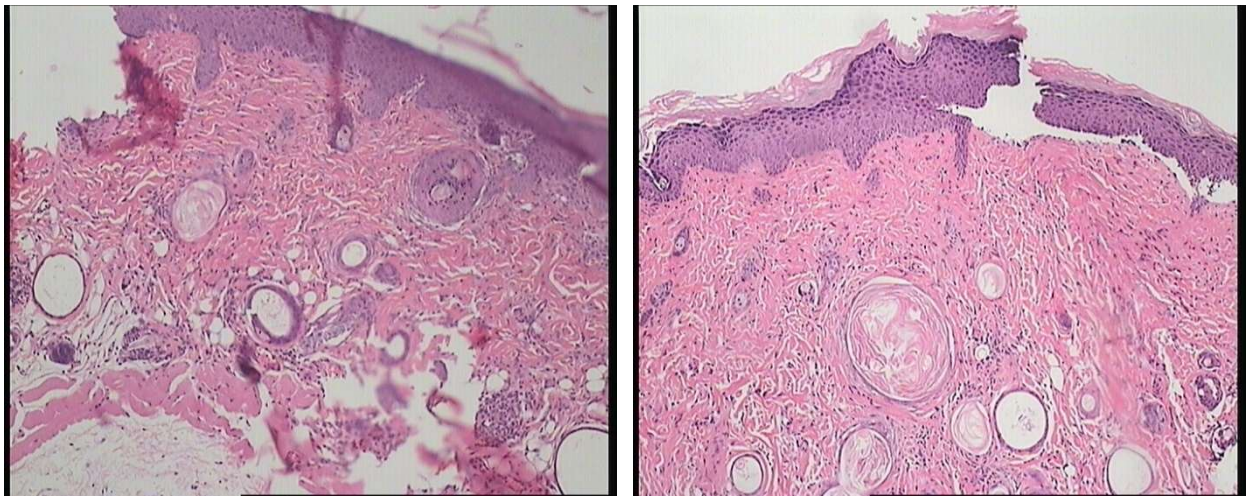
Εικόνα Ε 1. Μικροσκοπική εικόνα ολικού δέρματος από την ομάδα των μαρτύρων, ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης (x100)

Στο δείγμα ολικού δέρματος από την ομάδα των μαρτύρων παρατηρούμε διάσπαρτα έντονα σημεία φλεγμονής και υπερπλασία της επιδερμίδας που αντιστοχεί σε οξεία φάση φλεγμονής.

Παρατηρείται πυκνή φλεγμονώδης διήθηση της δερμίδας με πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα, τα οποία φαίνεται να συγκεντρώνονται έντονα γύρω από τα τριχοθηλάκια τους σμηγματογόνους και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Η φλεγμονώδης διήθηση, με πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα επεκτείνεται και στην επιδερμίδα.

Τα παραπάνω σημεία επιβεβαιώνουν την εικόνα της φωτοτεκμηρίωσης και την συμπεριφορά της ομάδας των μαρτύρων ώς προς τους παράγοντες της φλεγμονώδους αντίδρασης κατά τη διάρκεια του πειράματος.

13.10.2. Φορέας Κρέμας και Κρέμα RSV



Εικόνα Ε 2. Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα της κρέμας (Αριστερά) και της κρέμας Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100

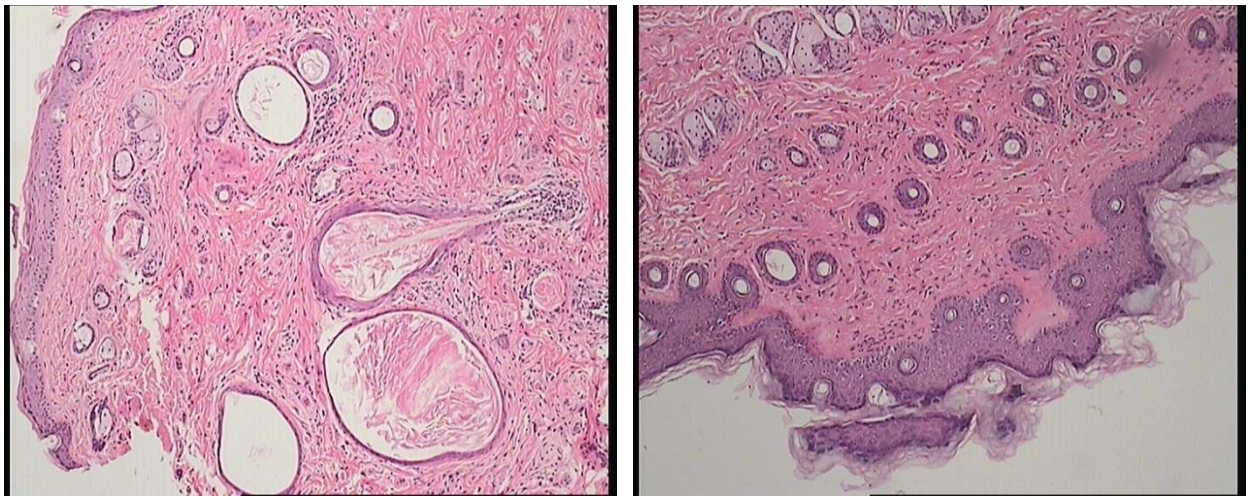
Στο δείγμα της ομάδας του φορέα της κρέμας (Αριστερά) παρατηρείται σημαντική υπερπλασία και πάχυνση της κεράτινης στοιβάδας και μέτρια πυκνή φλεγμονώδης διήθηση στο χόριο. Παρατηρούνται ακόμη διάσπαρτα φλεγμονώδη κύτταρα σε όλη τη μάζα της επιδερμίδας και του χόριου, με μεγαλύτερη εντόπιση γύρω από τα τριχοθηλάκια και τους ιδρωτοποιούς αδένες.

Στο δείγμα της ομάδας της κρέμας RSV (Δεξιά), παρατηρείται και εδώ σημαντική πάχυνση και υπερπλασία της κεράτινης στοιβάδας και αρκετά φυλλίδια κερατίνης. Παρατηρούνται και εδώ διάχυτα πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα με εντόπιση γύρω από τους σμηγματογόνους και τους ιδρωτοποιούς αδένες.

Η εικόνα του δείγματος της ομάδας της κρέμας με ρεσβερατρόλη δεν διαφέρει από την εικόνα του δείγματος της ομάδας του φορέα και των μαρτύρων. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν τα δεδομένα από την φωτοτεκμηρίωση και τις μετρήσεις εμβιομηχανικής.

Φαίνεται η κρέμα RSV και ο φορέας της να μην είχαν προληπτική ή θεραπευτική επίδραση στη φλεγμονώδη αντίδραση των μυών ύστερα από την ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία.

13.10.3. Φορέας Πηκτώματος και Πήκτωμα RSV



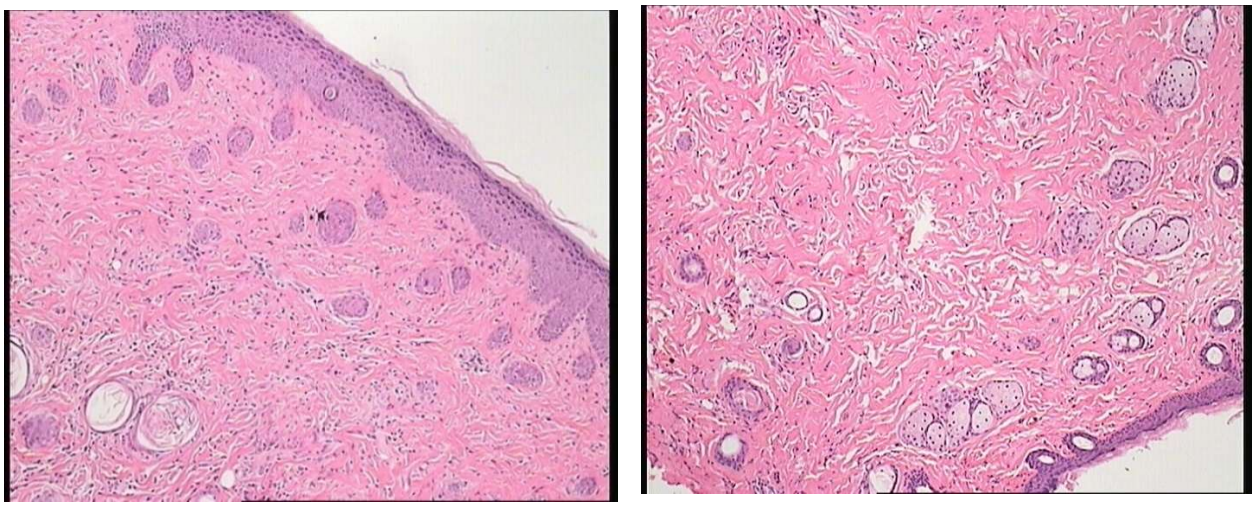
Εικόνα Ε 3.Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα του πηκτώματος (Αριστερά) και του πηκτώματος Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100

Στο δείγμα που προέχεται από την ομάδα του φορέα πηκτώματος (Αριστερά) παρατηρείται φλεγμονώδης αντίδραση που αντιστοιχεί σε οξεία φάση φλεγμονής, με ήπια πάχυνση και υπερπλασία της επιδερμίδας και αρκετά φυλλίδια κερατίνης. Παρατηρούνται αραιά διάχυτα πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη εντόπιση γύρω από τα τριχοθηλάκια. Η συνολική εικόνα είναι καλύτερη από αυτήν της ομάδας των μαρτύρων και των ομάδων της κρέμας.

Στο δείγμα της ομάδας πηκτώματος ρεσβερατρόλης (Δεξιά) εμφανίζεται επίσης σημαντική πάχυνση της επιδερμίδας και έντονα φυλλίδια κερατίνης. Το δείγμα διαφέρει από το δείγμα της ομάδας του φορέα στην εντόπιση των κυττάρων φλεγμονής, καθώς η διήθηση του χόριου από λεμφοκύτταρα είναι λιγότερο πυκνή και αυτά είναι συγκεντρωμένα γύρω από τα τριχοθηλάκια. Η εικόνα της φλεγμονής σε αυτό το δείγμα είναι λιγότερο έντονη από την ομάδα των μαρτύρων και την ομάδα του φορέα του πηκτώματος.

Για το πήκτωμα ρεσβερατρόλης μπορούμε να πούμε ότι μείωσε σε ένα επίπεδο την φλεγμονώδη αντίδραση. Καθώς όμως η ίδια μείωση σε μικρότερο βαθμό παρατηρείται και στο δείγμα της ομάδας του φορέα του, οφείλουμε να αναγνωρίσουμε ότι ένα μέρος της δράσης του αποδίδεται στα συστατικά του φορέα του πηκτώματος.

13.10.4. Φορέας Μικρογαλακτώματος και Μικρογαλάκτωμα RSV



Εικόνα Ε 4.Μικροσκοπική παρατήρηση ολικού δέρματος άτριχου αρσενικού μυ SKH-1 από την ομάδα του φορέα του μικρογαλακτώματος (Αριστερά) και του μικρογαλακτώματος Ρεσβερατρόλης (Δεξιά), ύστερα από χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης, σε μεγέθυνση x100

Στο δείγμα που προέχεται από την ομάδα του φορέα μικρογαλακτώματος (Αριστερά) παρατηρείται φλεγμονώδης αντίδραση με ήπια πάχυνση και υπερπλασία της επιδερμίδας και αρκετά φυλλίδια κερατίνης. Παρατηρούνται αραιά διάχυτα πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη εντόπιση γύρω από τα τριχοθηλάκια και τους ιδρωτοποιούς αδένες. Η συνολική εικόνα είναι καλύτερη από αυτήν της ομάδας των μαρτύρων καθώς εδώ τα σημεία φλεγμονής παραμένουν αλλά με μικρότερη πυκνότητα και ένταση.

Στο δείγμα που προέχεται από την ομάδα του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης (Δεξιά), δεν παρατηρείται πάχυνση της επιδερμίδας ενώ παρατηρούνται πολύ λίγα φλεγμονώδη κύτταρα που εντοπίζονται κυρίως γύρω από τους ιδρωτοποιούς αδένες. Η συνολική εικόνα του πάχους της επιδερμίδας και του χόριου αντιστοιχεί σε έναν ιστό που σχεδόν δεν φλεγμαίνει πλεόν.

Έτσι μπορούμε να πούμε ότι η ομάδα του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης διαφέρει από την ομάδα των μαρτύρων και από την ομάδα του φορέα μικρογαλακτώματος στην κατάσταση του δέρματος την τελευταία ημέρα του πειράματος. ακόμη φαίνεται να διαφέρει και από της ομάδες των υπολοίπων σκευασμάτων ρεσβερατρόλης καθώς τείνει προς την πλήρη ίασης.

Από τα παραπάνω φαίνεται το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης να ήταν αποτελεσματικό στην θεραπεία της φλεγμονώδους αντίδρασης επαγόμενης από υπεριώδη ακτινοβολία. Να σημειωθεί ότι μία σχετική βελτίωση σε σχέση με τους μάρτυρες εμφανίζει και η ομάδα με το φορέα μικρογαλακτώματος, αλλά σε αυτήν εντοπίζονται ακόμη αρκετά έντονα φλεγμονώδη στοιχεία. Συνεπώς η δράση αποδίδεται στην αύξηση της διαδερμικής διαπέρασης της ρεσβερατρόλης με την ενσωμάτωση της στο μικρογαλάκτωμα.

F. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ IN VITRO ΜΕΛΕΤΗΣ

Από την παρούσα μελέτη προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- ✓ Είναι δυνατή η βελτιστοποίηση διαδερμικών μορφοποιήσεων με τη χρήση του λογισμικού Formulating for Efficacy®.
- ✓ Είναι δυνατή η χρήση των δεδομένων βελτιστοποίησης του λογισμικού Formulating for Efficacy® για την μορφοποίηση μικρογαλακτωμάτων για διαδερμική χορήγηση
- ✓ Είναι δυνατή η ενσωμάτωση της ρεσβερατρόλης σε μικρογαλακτώματα για διαδερμική χορήγηση με την ρεσβερατρόλη να βρίσκεται σε μέγιστη θερμοδυναμική ενεργότητα, στο 90% της συγκέντρωσης κορεσμού.
- ✓ Είναι δυαντή η βελτιστοποίηση των διαδερμικών μικρογαλακτωμάτων ρεσβερατρόλης με τη χρήση των τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού
- ✓ Το μικρογαλάκρωμα ρεσβερατρόλης 1,9% εμφάνισε ικανοποιητική αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, (Q (μg/cm2) και την μεγαλύτερη ποσοστιαία αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, (Q (μg/cm2)/ Δόση εφαρμογής) σε συνάρτηση με το χρόνο (t), χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M®.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκριτική In Vitro μελέτη του βέλτιστου μικρογαλακτώματος με κρέμα ρεσβερατρόλης 6% και πήκτωμα ρεσβερατρόλης 5% που προέκυψαν από μελέτες βελτιστοποίησης προηγούμενων στο εργαστήριο μας.

Στην συγκριτική μελέτη διαπέρασης κρέμας ρεσβερατρόλης 6%, πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5% και μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9% με τεχνητή μεμβράνη Strat-M® παρατηρήθηκε ότι:

- Την μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, (Q (μg/cm2) απέδωσε το μικρογαλάκτωμα 1,9%. %, ενώ ακολουθούν με σειρά φθίνουσας διαπέρασης το πήκτωμα ρεσβερατόλης 5% και η κρέμα ρεσβερατρόλης 6%

Στην συγκριτική μελέτη διαπέρασης κρέμας ρεσβερατρόλης 6%, πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5% και μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9% με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα παρατηρήθηκε ότι:

- Την μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, (Q (μg/cm2) απέδωσε η κρέμα ρεσβερατρόλης 6%, ενώ ακολουθούν με

σειρά φθίνουσας διαπέρασης το πήκτωμα ρεσβερατόλης 5% και το μικρογαλάκτωμα 1,9%.

- Την μεγαλύτερη αθροιστική κατακράτηση ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας εμφάνισε το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης 1,9%, η οποία ήταν 230% μεγαλύτερη από την αντίστοιχη κατακράτηση της κρέμας ρεσβερατρόλης 6% και 245% μεγαλύτερη από την κατακράτηση του πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5%.
- Η αυξημένη απόδοση της ρεσβερατρόλης από το μικρογαλάκτωμα αποδόθηκε στην ιδιαίτερη φυσικοχημική δομή του, καθώς χαρακτηρίστηκε ως μικρογαλάκτωμα ημισυνεχών δομών (Bicontinuous Structures, Winsor III) που θερμαινόμενο άνω των 25^{o}C, αλλάζει διαμόρφωση και αποδίδει με βέλτιστο τρόπο το δραστικό συστατικό στην κεράτινη στοιβάδα.
- Από τις διαφορές του πειράματος με ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα με το αντίστοιχο με τεχνητή μεμβράνη Strat-M®.παρατηρείται ότι η τεχνητή μεμβράνη Strat-M® υπερεκτιμά κατά 1000 περίπου φορές την διαπέραση της ρεσβερατρόλης από το μικρογαλάκτωμα 1,9%. Αυτό οφείλεται στην μειωμένη αντίσταση που εμφανίζει η τεχνητή μεμβράνη σε μορφοποιήσεις με μεγέθη σταγονιδίων της κλίμακας των nm.
- Για την κρέμα ρεσβερατρόλης 6% και το πήκτωμα ρεσβερατρόλης 5% παρατηρείται κοινώς συντελεστής υπερεκτίμησης της αθροιστικής διαπέρασης ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm2) από την τεχνητή μεμβράνη μεμβράνη Strat-M®, σταθερός και ίσος με 4,5.

Τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα από την παραπάνω In Vitro συγκριτική μελέτη έδωσαν το έναυσμα για την συγκριτική In Vivo μελέτη τους ώς προς τη αποτελεσματικότητα τους στην πρόληψη και θεραπεία φλεγμονής επαγόμενης από υπεριώδη ακτινοβολία. Στόχο ήταν η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της In Vitro μελέτης και η σύνδεση τους με το φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Για να ενισχυθεί η αξιοπιστία της In Vivo συγκριτικής μελέτης, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο μελέτης της προληπτικής και θεραπευτικής αντιφλεγμονώδους δράσης σκευασμάτων ρεσβερατρόλης που αναπτύχθηκε το 2017, για την μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης του πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5% που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή τη μελέτη.

15. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ IN VIVO ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

Στον παρακάτω πίνακα συμψηφίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων εμβιομηχανικής καθώς και της φωτοτεκμηρίωσης και της ιστοπαθολογικής εξέτασης. Με το σύμβολο (✓) σημαίνονται τα σκευάσματα που βοήθησαν στην βελτίωση του κάθε παράγοντα στην εξέλιξη του πειράματος, ώς προς την πρόληψη εμφάνισης έντονων σημείων φλεγμονής ή/και την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη θεραπεία της φλεγμονώδους αντίδρασης. Με **X** συμβολίζονται τα σκευάσματα που δυσχέραναν την εξέλιξη των συμπτωμάτων της φλεγμονής. Οι συγκρίσεις έγιναν με βάση την ομάδα των μαρτύρων στην οποία εκδηλώθηκαν πλήρως τα σημεία της φλεγμονής.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

ΑΠΟΚΡΙΣΗ	MAP	CR PL	CR RSV	GEL PL	GEL RSV	ME PL	ME RSV
ΑΔΗΛΗ ΑΠΩΛΕΙΑ	-	✓	✓	✓	✓	-	✓
ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ	-	✓	✓	-	✓	-	✓
ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ	-	X	X	✓	✓	✓	✓
ΜΕΛΑΝΙΝΗ	-	-	✓	-	✓	-	✓
ΠΑΧΟΣ	-	-	-	-	-	-	✓
ΣΜΗΓΜΑ	-	✓	-	-	-	✓	-
pH	-	-	-	✓	✓	-	-
ΤΡΑΧΥΤΗΤΑ	-	-	-	-	✓	-	✓
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ	-	-	-	-	-	-	✓
ΦΩΤΟΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ	-	-	-	✓	✓	-	✓
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ	-	-	-	-	-	-	✓

Πίνακας 32. Συνοπτική συγκριτική απεικόνιση της βελτίωσης κάθε παράγοντα εξέλιξης της φλεγμονής ανά ομάδα μυών

Από τα παραπάνω φαίνεται πώς :

- ✓ Το μοντέλο πρόκλησης φλεγμονής από υπεριώδη ακτινοβολία ήταν επιτυχές καθώς όλοι οι μύες της ομάδας των μαρτύρων εμφάνισαν φλεγμονή, με κορύφωση 4 ημέρες μετά την ακτινοβόληση.
- ✓ Από τις μετρήσεις εμβιομηχανικής που έγιναν για την αξιολόγηση της προληπτιικής και θεραπευτικής δράσης των σκευασμάτων στην φλεγμονή επαγόμενη από υπεριώδη ακτινοβολία φαίνεται πώς το μόνο σκεύασμα με ικανοποιητική προληπτική ικανότητα ήταν το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης, η ομάδα του οποίου φαίνεται να εμφάνισε μειωμένη φλεγμονώδη αντίδραση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα εμφάνισε προληπτική δράση στην μείωση της άδηλης απώλειας νερού και εμφάνισε μειωμένη αύξηση επιπέδων αιμοσφαιρίνης, ερυθρότητας και άδηλης απώλειας κατά την κορύφωση της φλεγμονής και σταθερά επίπεδα ενυδάτωσης καθόλη τη διάρκεια του πειράματος.
- ✓ Στην φάση θεραπείας την καλύτερη θεραπευτική δράση εμφάνισαν το πήκτωμα ρεσβερατρόλης 5% και το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης 1,9%, με το μικρογαλάκτωμα να υπερέχει ελάχιστα καθώς καλή εικόνα σε κάποιες μετρήσεις εμφάνισε και ο φορέας του πηκτώματος. Αντίθετα ο φορέας της κρέμας και η κρέμα ρεσβερατρόλης αύξησαν την ερυθρότητα του δέρματος των μυών ακόμη περισσότερο σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.
- ✓ Κατά την φωτοτεκμηρίωση παρατηρήθηκε εξαιρετική βελτίωση από την οξεία φάση φλεγμονής ως την τελευταία ημέρα του πειράματος για την ομάδα του πηκτώματος ρεσβερατρόλης αλλά και την ομάδα του φορέα πηκτώματος. Η ομάδα του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης εμφάνισε την πιο ήπια εικόνα φλεγμονής στην οξεία φάση και ήταν η μόνη ομάδα που παρουσίασε πλήρη ίαση.
- ✓ Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση οι μακροσκοπικές παρατηρήσεις της φωτοτεκμηρίωσης επιβεβαιώθηκαν καθώς το δέρμα από την ομάδα μυών που δέχθηκε πήκτωμα ρεσβερατρόλης εμφάνισε μειωμένη φλεγμονή σε σχέση με τους μάρτυρες. Την ίδια βελτίωση εμφάνισε και η ομάδα με τον φορέα του πηκτώματος. Καμία από τις δυο ομάδες δεν εμφάνισε πλήρη ίαση. Η βελτίωση αυτή αποδίδεται έτσι στον φορέα του πηκτώματος και την ενυδατική του δράση, κα όχι στην αυξημένη διαδερμική διαπέραση της περιεχόμενης ρεσβερατρόλης, καθώς πρόκειται για ένα σκεύασμα με 41% νερό και 27% γλυκερίνη που είναι διϋγραντικοί παράγοντες.
- ✓ Η μόνη ομάδα που εμφάνισε εικόνα πολύ κοντά στην πλήρη ίαση στην ιστοπαθολογική εξέταση ήταν η ομάδα που δέχθηκε το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης. Καθώς η ομάδα που δέχθηκε τον φορέα του μικρογαλακτώματος δεν εμφάνισε ιδιαίτερη βελτίωση της φλεγμονής στο τέλος του πειράματος, είναι δυνατόν το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης

να χαρακτηριστεί αποτελεσματικό στην πρόληψη και την θεραπεία φλεγμονής επαγόμενης από υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα αποτελέσματα της In Vivo σύγκρισης των σκευασμάτων ως προς τη πρόληψη και θεραπεία φλεγμονής φαίνεται να επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των In Vitro μελετών. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση της In Vitro επιδερμιδικής κατακράτησης με το φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Η αυξημένη κατακράτηση της ρεσβερατρόλης από την κεράτινη στοιβάδα για το μικρογαλάκτωμα με 1,9% ρεσβερατρόλη φαίνεται να μπορεί να συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα του στην πρόληψη και την θεραπεία της φλεγμονής.

Τα αποτελέσματα της In Vivo συγκριτικής μελέτης αντιφλεγμονώδους δράσης της κρέμας ρεσβερατρόλης 6%, του πηκτώματος ρεσβερατρόλης 5% και του μικρογαλακτώματος ρεσβερατρόλης 1,9%, επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της συγκριτικής In Vitro και Ex Vivo μελέτης αθροιστικής διαπέρασης και αθροιστικής κατακράτησης της ρεσβερατρόλης ανά μονάδα επιφανείας. Παρατηρείται έτσι αξιόπιστη πρόβλεψη των In Vivo αποτελεσμάτων από τις In Vitro μελέτες και ικανοποιητική In Vitro – In Vivo συσχέτιση (In Vitro – In Vivo Correlation)

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το μικρογαλάκτωμα ρεσβερατρόλης 1,9% είναι αποτελεσματικό στην πρόληψη και θεραπεία φλεγμονής επαγόμενης από υπεριώδη ακτινοβολία, με σημαντικά καλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση από το πήκτωμα ρεσβερατρόλης 5% και την κρέμα ρεσβερατρόλης 6%. Η αυξημένη αποτελεσματικότητα συνοδεύεται από αυξημένη απόδοση της ρεσβερατρόλης κατά την διαδερμική χορήγηση, που μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε έως και 60% λιγότερο δραστικό συστατικό και να πετύχουμε βέλτιστο φαρμακολογικό αποτέλεσμα.

G. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas, H., Kamel, R., & El-Sayed, N. (2018). Dermal anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-aging effects of Compritol ATO-based Resveratrol colloidal carriers prepared using mixed surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, *541*(1–2), 37–47. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.054

Abbott, S. (2012). An integrated approach to optimizing skin delivery of cosmetic and pharmaceutical actives. *International Journal of Cosmetic Science*, *34*(3), 217–222. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00710.x

Abd, E., Yousef, S. A., Pastore, M. N., Telaprolu, K., Mohammed, Y. H., Namjoshi, S., Grice, J. E., & Roberts, M. S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, *8*, 163–176. https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788

Abdallah, M. A. E., Pawar, G., & Harrad, S. (2015). Evaluation of 3D-human skin equivalents for assessment of human dermal absorption of some brominated flame retardants. *Environment International*, *84*, 64–70. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.015

Addicks, W. J., Flynn, G. L., & Weiner, N. (1987). Validation of a Flow-Through Diffusion Cell for Use in Transdermal Research. In *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* (Vol. 4, Issue 4, pp. 337–341). https://doi.org/10.1023/A:1016405506028

Alexander T. Florence, J. S. (2001). Modern pharamaceutics : applications and advances. In *Informa* (Vol. 2, p. 43).

Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012a). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, *158*(2), 182–193. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083

Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012b). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, *158*(2), 182–193. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083

Amstad, P., Shah, G., Moret, R., Zbinden, I., Cerutti, P., Peskin, A., & Mirault, M. E. (1991). The Balance between Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Catalase Affects the Sensitivity of Mouse Epidermal Cells to Oxidative Stress. *Biochemistry*, *30*(38), 9305–9313. https://doi.org/10.1021/bi00102a024

Ansari, M., Kazemipour, M., & Aklamli, M. (2006). The study of drug permeation through natural membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, *327*(1–2), 6–11. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.034

Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *224*(3), 274–283. https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.025

Azad, S., Nagul Meeravali, S., Babu, C. p., Ravi Kumar, K., & Naik, V. V. (2020). Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. *World Journal Of Current Medical And Pharmaceutical Research*, *11*(11), 201–205.

Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Datta, P., & Veer, V. (2014). Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, *50*, 70–84. https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2014.01.001

Baroni, A., Buommino, E., Ruocco, V. De, Eleonora, G., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*.

Barry, B. W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(2), 101–114. https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00167-1

Barry, B. W. (2002). Drug delivery routes in skin: A novel approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(SUPPL.), 31–40. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00113-8

BARRY, B. W. (1988). Action of skin penetration enhancers—the Lipid Protein Partitioning theory. *International Journal of Cosmetic Science*, *10*(6), 281–293. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1988.tb00028.x

Baxter, R. A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *7*(1), 2–7. https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00354.x

Benson, H. (2005). Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, *2*(1), 23–33. https://doi.org/10.2174/1567201052772915

Benson, H. A. E., & Watkinson, A. C. (2011). Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice. In *Collective Dynamics of Nonlinear and Disordered Systems* (pp. 5–37). https://doi.org/10.1007/3-540-26869-3_2

Bernardo, F. P., & Saraiva, P. M. (2008). A theoretical model for transdermal drug delivery from emulsions and its dependence upon formulation. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 97, Issue 9, pp. 3781–3809). https://doi.org/10.1002/jps.21268

Bhattacharya, S., Darjatmoko, S. R., & Polans, A. S. (2011). Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Research*, *21*(3), 180–187. https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283456dfc

Binder, L., Kulovits, E. M., Petz, R., Ruthofer, J., Baurecht, D., Klang, V., & Valenta, C. (2018). Penetration monitoring of drugs and additives by ATR-FTIR spectroscopy/tape stripping and confocal Raman spectroscopy – A comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *130*(May), 214–223. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.007

Bolko, K., Zvonar, A., & Gašperlin, M. (2014). Mixed lipid phase SMEDDS as an innovative approach to enhance resveratrol solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *40*(1), 102–109. https://doi.org/10.3109/03639045.2012.749888

Bortolotti, F., Balducci, A. G., Sonvico, F., Russo, P., & Colombo, G. (2009). In vitro permeation of desmopressin across rabbit nasal mucosa from liquid nasal sprays: The enhancing effect of potassium sorbate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *37*(1), 36–42. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.12.015

Bouwstra, J. A., & Honeywell-Nguyen, P. L. (2002a). Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(SUPPL.), 41–55. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00114-X

Bouwstra, J. A., & Honeywell-Nguyen, P. L. (2002b). Skin structure and mode of action of vesicles. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 54, Issue SUPPL.). https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00114-X

Bouwstra, Joke A., & Ponec, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1758, Issue 12, pp. 2080–2095). https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.021

Bronaugh, R. L. (1995). Methods for in vitro percutaneous absorption. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *5*(4), 265–273. https://doi.org/10.3109/15376519509084030

Bronaugh, R. L., & Stewart, R. F. (1985). Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *74*(1), 64–67. https://doi.org/10.1002/jps.2600740117

Brown, M. B., Martin, G. P., Jones, S. A., & Akomeah, F. K. (2006). Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, *13*(3), 175–187. https://doi.org/10.1080/10717540500455975

Burger, C., Gerber, M., Du Preez, J. L., & Du Plessis, J. (2015). Optimised transdermal delivery of pravastatin. *International Journal of Pharmaceutics*, *496*(2), 518–525. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.034

Cadogan, S. P., Hahn, C. J., Rausch, M. H., & Fröba, A. P. (2017). Study on the applicability of dynamic light scattering (DLS) to microemulsions including supercritical carbon dioxide-swollen micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, *499*, 202–208. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.03.111

Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C. V. C., Stuppner, H., & Jansen-Dürr, P. (2017). Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*, *18*(4), 499–516. https://doi.org/10.1007/s10522-017-9715-7

Chambers Fox S. (2014). *Remington Education Pharmaceutics.* (pp. 1–539).

Crank. (1975). *Crank_1975_Diffusion.pdf*.

D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 6, pp. 12222–12248). https://doi.org/10.3390/ijms140612222

Daniels, R. (2004). Strategies for Skin Penetration Enhancement. *The Chemical Company*, *August*, 2–9.

Das, S., & Das, D. K. (2007). Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflammation and Allergy - Drug Targets*, *6*(3), 168–173. https://doi.org/10.2174/187152807781696464

Degim, I. T. (2006). New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discovery Today*, *11*(11–12), 517–523. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.04.006

Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B., & Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a Chemopreventive Agent: A Promising Molecule for Fighting Cancer. *Current Drug Targets*, *7*(4), 423–442. https://doi.org/10.2174/138945006776359331

Diffey, B. L. (1980). Ultraviolet radiation physics and the skin. *Physics in Medicine and Biology*, *25*(3), 405–426. https://doi.org/10.1088/0031-9155/25/3/001

Donnelly, R. F., Morrow, D. I. J., McCrudden, M. T. C., Alkilani, A. Z., Vicente-Pérez, E. M., O'Mahony, C., González-Vázquez, P., McCarron, P. A., & Woolfson, A. D. (2014). Hydrogel-forming and dissolving microneedles for enhanced delivery of photosensitizers and precursors. *Photochemistry and Photobiology*, *90*(3), 641–647. https://doi.org/10.1111/php.12209

Donnelly, R. F., Raghu, T., Singh, R., & Woolfson, D. (2010). UKPMC Funders Group drug delivery , and safety. *Drug Deliv*, *17*(4), 187–207. https://doi.org/10.3109/10717541003667798.Microneedle-based

Donnely, R., & Singh, T. R. R. (2015). *Novel Delivery Systems for Trandermal and Intradermal Drug Delivery*.

Doppalapudi, S., Mahira, S., & Khan, W. (2017). Development and in vitro assessment of psoralen and resveratrol co-loaded ultradeformable liposomes for the treatment of vitiligo. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *174*(April), 44–57. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.007

Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2015). Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: Modification of the stratum corneum. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, *January*, 1–411. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8

Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2016). Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: Nanocarriers. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers*, 1–384. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2

Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2017a). Percutaneous penetration enhancers drug penetration into/through the skin: Methodology and general considerations. *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations*, 1–414. https://doi.org/10.1007/978-3-662-53270-6

Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2017b). Percutaneous penetration enhancers physical methods in penetration enhancement. In *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 1–508). https://doi.org/10.1007/978-3-662-53273-7

Duszyńska-Krupa, A. M. (2015). *The rational design of topical formulations*. 21–39.

Dvorakova, M., & Landa, P. (2017). Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*, *124*, 126–145. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.002

Ehrhardt, C., & Kim, K.-J. (2008a). Drug Absorption Studies. In *Drug Absorption Studies*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3

Ehrhardt, C., & Kim, K.-J. (2008b). In Situ, In Vitro and In Silico Models. In *Drug Absorption Studies:*

Elias, P. M. (1981). Lipids and the epidermal permeability barrier. In *Archives of Dermatological Research* (Vol. 270, Issue 1, pp. 95–117). https://doi.org/10.1007/BF00417155
Elias, P. M. (2005). *Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View*.
Fanun, M. (2009). *Microemulsions: Properties and Applications*.
Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2014). *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier* (p. Biochimica et Biophysica Acta 1841 (2014) 280–294).
Fitzgerald, J. E., Kurtz, S. M., Schardein, J. L., & Kaump, D. H. (1968). Cutaneous and parenteral studies with vehicles containing isopropyl myristate and peanut oil. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *13*(3), 448–453. https://doi.org/10.1016/0041-008X(68)90121-X
Foldvari, M. (2000). Non-invasive administration of drugs through the skin: Challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, *3*(12), 417–425. https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00317-5
Fotaki, N. (2011). Flow-through cell apparatus (USP Apparatus 4): Operation and features. *Dissolution Technologies*, *18*(4), 46–49. https://doi.org/10.14227/DT180411P46
Ghafourian, T., Zandasrar, P., Hamishekar, H., & Nokhodchi, A. (2004). The effect of penetration enhancers on drug delivery through skin: A QSAR study. *Journal of Controlled Release*, *99*(1), 113–125. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.06.010
Ghosh*, T., Abraham, W., & Jasti, B. (2004). Transdermal and Topical Drug Delivery Systems. In *Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutics* (pp. 423–455). https://doi.org/10.1201/9780203644478.ch14
Godin, B., & Touitou, E. (2007). *Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*.
Guth, K., Schäfer-Korting, M., Fabian, E., Landsiedel, R., & van Ravenzwaay, B. (2015). Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicology in Vitro*, *29*(1), 113–123. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.007
Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2011). *Skin: the ultimate interface* (p. Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, 13, 5215–5222).
Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2016). Expert Opinion on Drug Delivery Drug crystallisation – implications for topical and transdermal delivery Drug crystallisation – implications for topical and transdermal delivery. In *Expert Opinion on Drug Delivery*. https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1140146
Hadgraft, J., & Valenta, C. (2000). pH, pK(a) and dermal delivery. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 200, Issue 2, pp. 243–247). https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00402-6
Halliday, G. M. (2005). Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *571*(1-2 SPEC. ISS.), 107–120. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013
Hansen, C. M. (1998). Hansen Solubility Parameters, A user's Handbook. In *CRC PRESS*. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004
Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., & Michniak-Kohn, B. (2018). Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, *547*(1–2), 432–437. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.012
Helman, R. G., Hall, J. W., & Kao, J. Y. (1986). Acute dermal toxicity: In vivo and in vitro comparisons in mice. *Toxicological Sciences*, *7*(1), 94–100. https://doi.org/10.1093/toxsci/7.1.94
Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y. N., Hadgraft, J., & Guy, R. H. (2006). Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharmaceutical Research*, *23*(8), 1850–1856. https://doi.org/10.1007/s11095-006-9011-8
Hoar, T. P., & Schulman, J. H. (1943). Transparent Water in Oil Dispersions : the Oleopathic Hydro - Micelle. *Nature Communications*, *152*, 102–104. https://doi.org/10.1089/bsp.2008.0034
Houben, E., De Paepe, K., & Rogiers, V. (2007). A keratinocyte's course of life. In *Skin Pharmacology and Physiology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 122–132). https://doi.org/10.1159/000098163

Hsu, W. H., Hu, Y., & Lyons, M. C. (2017). *Neural control of sweat secretion: A review* (p. British Journal of Dermatology).

Hu, C., Wang, Q., Ma, C., & Xia, Q. (2016). Non-aqueous self-double-emulsifying drug delivery system: A new approach to enhance resveratrol solubility for effective transdermal delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *489*, 360–369. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.11.017

Hung, C. F., Lin, Y. K., Huang, Z. R., & Fang, J. Y. (2008). Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(5), 955–962. https://doi.org/10.1248/bpb.31.955

ICH Q8. (2009). *EMEA/CHMP, 2009, ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development, Step 5: Note for Guidance on Pharmaceutical Development, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500059258.pdf (accessed Jul 24,2017)*. *8*(June). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., & Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, *189*(1–2), 21–39. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00150-1

ICHQ9. (2014). *ICH Guideline Q9 on quality risk management*. *44*(1), 1–20. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002873.pdf

Igarashi, T., Nishino, K., & Nayar, S. K. (2007). The appearance of human skin: A survey. In *Foundations and Trends in Computer Graphics and Vision* (Vol. 3, Issue 1, pp. 1–95). https://doi.org/10.1561/0600000013

Israelachvili, J. (1994). The science and applications of emulsions - an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *91*(C), 1–8. https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)02743-9

Juškaite, V., Ramanauskiene, K., & Briedis, V. (2015a). Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/540916

Juškaite, V., Ramanauskiene, K., & Briedis, V. (2015b). Design and formulation of optimized microemulsions for dermal delivery of resveratrol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/540916

Juškaite, V., Ramanauskiene, K., & Briedis, V. (2017). Testing of resveratrol microemulsion photostability and protective effect against UV induced oxidative stress. *Acta Pharmaceutica*, *67*(2), 247–256. https://doi.org/10.1515/acph-2017-0018

Karadzovska, D., & Riviere, J. E. (2013). Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *50*(5), 569–576. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.02.020

Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S. Y., & Teraoka, R. (2011). Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *59*(6), 793–796. https://doi.org/10.1248/cpb.59.793

Kligman, A. M., & Christophers, E. (1963). Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of Dermatology*, *88*(6), 702–705. https://doi.org/10.1001/archderm.1963.01590240026005

Kreilgaard, M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *54*(SUPPL.). https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00116-3

Kwan, P., Sills, G. J., & Brodie, M. J. (2012). Understanding the Role of NMF in Skin Hydration. In *Practical Dermatology: Vol. July* (Issue 1, pp. 21–34). https://doi.org/10.1016/S0887-8994(03)00406-5

Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2013). *Structure and function of skin, hair and nails* (p. Medicine (Abingdon. 1995, UK ed. Print), vol. 41,).

Lane, M.E. (2013). *Percutaneous Penetration Paradigms: The Contribution of Jonathan Hadgraft* (p. Skin Pharmacol Physiol 2013;26:277–285 DOI: 10.115).

Lane, Majella E. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, *447*(1–2), 12–21. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.040

Lane, Majella E., Hadgraft, J., Oliveira, G., Vieira, R., Mohammed, D., & Hirata, K. (2012). Rational formulation design. *International Journal of Cosmetic Science*, *34*(6), 496–501. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00747.x

Lauterbach, A., & Müller-Goymann, C. C. (2014). Comparison of rheological properties, follicular penetration, drug release, and permeation behavior of a novel topical drug delivery system and a conventional cream. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 88, Issue 3, pp. 614–624). https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.10.001

Lee, S. G., Kang, J. B., Kim, S. R., Kim, C. J., Yeom, D. W., Yoon, H. Y., Kwak, S. S., & Choi, Y. W. (2016). Enhanced topical delivery of tacrolimus by a carbomer hydrogel formulation with transcutol P. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *42*(10), 1636–1642. https://doi.org/10.3109/03639045.2016.1160107

Levintova, Y., Plakogiannis, F. M., & Bellantone, R. A. (2011). An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *International Journal of Pharmaceutics*, *419*(1–2), 96–106. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.025

Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2014). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(2), 81–98. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004

Lindman, B., & Stubenrauch, C. (2009). *Microemulsions*.

Lou, B. S., Wu, P. S., Hou, C. W., Cheng, F. yin, & Chen, J. K. (2014). Simultaneous quantification of trans-resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in rat tissues by stable isotope-dilution UPLC-MS/MS analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *94*, 99–105. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.039

Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. In *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* (pp. 59–94). https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4

Lu, L. Y., Liu, Y., Zhang, Z. F., Gou, X. J., Jiang, J. H., Zhang, J. Z., & Yao, Q. (2015). Pomegranate seed oil exerts synergistic effects with trans-resveratrol in a self-nanoemulsifying drug delivery system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *38*(10), 1658–1662. https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00371

M. Sala, R. D., & , A. Elaissari, H. F. (2018). *Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications*.

Magnus, I. A. (1976). Dermatological Photobiology. *British Medical Journal*, *July*, 1976.

Manconi, M., Caddeo, C., Sinico, C., Valenti, D., Mostallino, M. C., Biggio, G., & Fadda, A. M. (2011). Ex vivo skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *78*(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.010

Mantena, S. K., & Katiyar, S. K. (2006). Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-κB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(9), 1603–1614. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.032

Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, *58*(2), 85–90. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.03.003

Mathur, V., Satrawala, Y., & Rajput, M. S. (2010). Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics*, *4*(3), 173–183. https://doi.org/10.4103/0973-8398.72115

Matsumura, Y., & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *195*(3), 298–308. https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.08.019

McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, *8*(6), 1719–1729. https://doi.org/10.1039/c2sm06903b

McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *51*(4), 285–330. https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558

Michaels, & Shaw A. S. Chandrasekaran, S. K. (1975). *Drug Permeation Through Human Skin: Theory and in Vitro Experimental Measu rement* (p. AlChE Journal (Vol. 21, No. 5)).

Miki, R., Kimura, S., Ueda, H., Shimamura, T., Numajiri, S., Seki, T., Juni, K., Kitano, H., & Morimoto, Y. (2010). Suitability of Synthetic Copolymer Membranes as a Human Skin Alternative for In Vitro Skin Permeation Testing. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, *15*(1), 14–27. https://doi.org/10.11232/aatex.15.14

Mitragotri, S., Anissimov, Y. G., Bunge, A. L., Frasch, H. F., Guy, R. H., Hadgraft, J., Kasting, G. B., Lane, M. E., & Roberts, M. S. (2011). Mathematical models of skin permeability: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, *418*(1), 115–129. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.023

Mittal, A., Sara, U. V. S., Ali, A., & Aqil, M. (2008). The effect of penetration enhancers on permeation kinetics of nitrendipine in two different skin models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(9), 1766–1772. https://doi.org/10.1248/bpb.31.1766

Mohammed, D., Matts, P. J., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2014). In vitro-in vivo correlation in skin permeation. *Pharmaceutical Research*, *31*(2), 394–400. https://doi.org/10.1007/s11095-013-1169-2

Montgomery, D. C. (2013). Design and Analysis of Experiments. In *Catalysis from A to Z*. https://doi.org/10.1002/9783527809080.cataz11063

Moore, T. J., Singh, S., & Furberg, C. D. (2012). The FDA and new safety warnings. In *Archives of Internal Medicine* (Vol. 172, Issue 1, pp. 78–80). https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.618

Moore, C. M. V. (2012). Quality by Design – FDA Lessons Learned and Challenges for International Harmonization. *International Conference on Drug Development*, 28. https://www.fda.gov/media/85369/download

Moss, G P, Dearden, J. C., Patel, H., & Cronin, M. T. D. (2002). *Quantitative structure – permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption*. *16*, 299–317.

Moss, Gary P., Gullick, D. R., & Wilkinson, S. C. (2015). Predictive methods in percutaneous absorption. In *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47371-9

Moulik, S. P., & Paul, B. K. (1998). Structure, dynamics and transport properties of micro emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, *78*(2), 99–195. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00063-3

Mura, S., Manconi, M., Valenti, D., Sinico, C., Vila, A. O., & Fadda, A. M. (2011). Transcutol containing vesicles for topical delivery of minoxidil. *Journal of Drug Targeting*, *19*(3), 189–196. https://doi.org/10.3109/1061186X.2010.483516

Murphree, R. W. (2017). Impairments in Skin Integrity. In *Nursing Clinics of North America* (Vol. 52, Issue 3, pp. 405–417). https://doi.org/10.1016/j.cnur.2017.04.008

Na, E. J., & Ryu, J. Y. (2018). Anti-inflammatory effects of prunin on UVB-irradiated human keratinocytes. *Biomedical Dermatology*, *2*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s41702-018-0024-9

Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2000). Transdermal drug delivery: Overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, *3*(9), 318–326. https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00295-9

Nakama, Y. (2017). Surfactants. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X

Nastiti, C. M. R. R., Ponto, T., Abd, E., Grice, J. E., Benson, H. A. E., & Roberts, M. S. (2017). Topical nano and microemulsions for skin delivery. *Pharmaceutics*, *9*(4), 1–25. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040037

Neves, A. R., Lúcio, M., Lima, J. L. C., & Reis, S. (2012). *Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions*.

Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research*, *302*(2), 71–83. https://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3

Nishigori, C., Hattori, Y., & Toyokunf, S. (2004). Role of Reactive Oxygen Species in Skin Carcinogenesiw. *Antioxidants and Redox Signaling*, *6*(3), 561–570. https://doi.org/10.1111/j.1475-4959.2010.00371.x

OECD. (2003). *THE WORKING PARTY ON CHEMICALS , PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY ENV / JM / MONO (2003) 15 Unclassified*. *44*.

OECD. (2004). Test Guideline 427: Skin Absorption: in vivo Method. *OECD Guidelines for Testing of Chemicals*, *April*, 1–8. https://doi.org/10.1787/9789264071063-en

OECD. (2008). *OECD Environment , Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No XX Series on Pesticides No XX GUIDANCE NOTES FOR THE ESTIMATION OF DERMAL ABSORPTION Environmental Directorate Organisation for Economic Co-Operation and Development Par*. *Xx*, 1–44.

Oliveira, G., Beezer, A. E., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2010). Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, *393*(1–2), 61–67. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.03.062

Oliveira, L. B. A., de Oliveira, R. P., Oliveira, C., Raposo, N. R. B., Brandão, M. A. F., Ferreira, A. de O., & Polonini, H. (2017). Cosmetic potential of a liotropic liquid crystal emulsion containing resveratrol. *Cosmetics*, *4*(4), 2–13. https://doi.org/10.3390/cosmetics4040054

Ottaviani, G., Martel, S., & Carrupt, P. A. (2006). Parallel artificial membrane permeability assay: A new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, *49*(13), 3948–3954. https://doi.org/10.1021/jm060230+

Otto, A., Du Plessis, J., & Wiechers, J. W. (2009). *Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery* (Vol. 586, pp. 1–19).

Panapisal, V., Charoensri, S., & Tantituvanont, A. (2012). Formulation of microemulsion systems for dermal delivery of silymarin. *AAPS PharmSciTech*, *13*(2), 389–399. https://doi.org/10.1208/s12249-012-9762-y

Paolino, D., Ventura, C. A., Nisticò, S., Puglisi, G., & Fresta, M. (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: Percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics*, *244*(1–2), 21–31. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00295-8

Pellevoisin, C., Videau, C., Briotet, D., Grégoire, C., Tornier, C., Alonso, A., Rigaudeau, A. S., Bouez, C., & Seyler, N. (2018). SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology in Vitro*, *50*(October 2017), 418–425. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.008

Pentek, T., Newenhouse, E., O'Brien, B., & Singh Chauhan, A. (2017). Development of a Topical Resveratrol Formulation for Commercial Applications Using Dendrimer Nanotechnology. *Molecules*, *22*(1). https://doi.org/10.3390/molecules22010137

Pezzuto, J. M. (2019). Resveratrol: Twenty years of growth, development and controversy. *Biomolecules and Therapeutics*, *27*(1), 1–14. https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.176

Piepel, G. F., & Cornell, J. A. (1994). Mixture experiment approaches: examples, discussion, and recommendations. *Journal of Quality Technology*, *26*(3), 177–196. https://doi.org/10.1080/00224065.1994.11979525

Pillai, S., Oresajo, C., & Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: Roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - A review. *International Journal of Cosmetic Science*, *27*(1), 17–34. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x

Politis, S. N., Colombo, P., Colombo, G., & Rekkas, D. M. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *43*(6), 889–901. https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672

Polonini, H. C., Bastos, C. de A., Oliveira, M. A. L. de, Silva, C. G. A. da, Collins, C. H., Brandão, M. A. Ô. F., & Raposo, N. R. B. (2014). In vitro drug release and ex vivo percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase. *Journal*

of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, *947–948*, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.005

Pongjanyakul, T., Prakongpan, S., Panomsuk, S., Puttipipatkhachorn, S., & Priprem, A. (2002). Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *54*(10), 1345–1350. https://doi.org/10.1211/002235702760345419

Prasanthi, D., & Lakshmi, P. K. (2012). Effect of Chemical Enhancers in Transdermal Permeation of Alfuzosin Hydrochloride. *ISRN Pharmaceutics*, *2012*, 1–8. https://doi.org/10.5402/2012/965280

Prausnitz, M. R., Elias, P. M., Franz, T. J., Schmuth, M., Tsai, J.-C., Menon, G. K., Holleran, W. M., & Feingold, K. R. (2012). Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery STRUCTURE AND ORIGIN OF THE SKIN BARRIER Stratum Corneum Structure and Organization. In *Medical Therapy* (pp. 2065–2073). http://drugdelivery.chbe.gatech.edu/Papers/2012/Prausnitz Derm Book Chapter 2012.pdf

Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). *The skin: an indispensable barrier* (p. www.blackwellpublishing.com/EXD ADF).

Prost-Squarcioni, C. (2006). *Histologie pileux et des follicules de la peau* (p. MEDECINE/SCIENCES 2006; 22 : 131-7 >).

Pund, S., Thakur, R., More, U., & Joshi, A. (2014a). Lipid based nanoemulsifying resveratrol for improved physicochemical characteristics, in vitro cytotoxicity and in vivo antiangiogenic efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *120*, 110–117. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.016

Pund, S., Thakur, R., More, U., & Joshi, A. (2014b). Lipid based nanoemulsifying resveratrol for improved physicochemical characteristics, in vitro cytotoxicity and in vivo antiangiogenic efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *120*, 110–117. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.016

Pyzdek, T. (2003). The Six Sigma Handbook. In *Quality progress* (Vol. 35, Issue 9).

R. Neves, A., Lucio, M., L.C. Lima, J., & Reis, S. (2012). Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(11), 1663–1681. https://doi.org/10.2174/092986712799945085

Ravikumar, P., Katariya, M., Patil, S., Tatke, P., & Pillai, R. (2019). Skin delivery of resveratrol encapsulated lipidic formulation for melanoma chemoprevention. *Journal of Microencapsulation*, *0*(0), 1–17. https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1649481

Rawlings, A. V. (2010). *Recent advances in skin 'barrier' research Anthony* (p. JPP 2010, 62: 671–677).

Reagan-Shaw, S., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2008). Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(2), 415–421. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00279.x

Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro', A., & Rotilio, G. (1977). An attempt to evaluate the rate of the haber-weiss reaction by using ·OH radical scavengers. *FEBS Letters*, *80*(1), 130–132. https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80422-5

Rothman, S. (1954). *Physiology and Biochemistry of the skin*. *1*(1), 1–8.

Said, M., Elsayed, I., Aboelwafa, A. A., & Elshafeey, A. H. (2017). Transdermal agomelatine microemulsion gel: Pyramidal screening, statistical optimization and in vivo bioavailability. *Drug Delivery*, *24*(1), 1159–1169. https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1365392

Sakamoto, K., Lochhead, R. Y., Maibach, H. I., & Yamashita, Y. (2017). Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*.

Sample, A., & He, Y. Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, *34*(1), 13–24. https://doi.org/10.1111/phpp.12329

Santos, P., Watkinson, A. C., Hadgraft, J., & Lane, M. E. (2008). Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology*, *21*(5), 246–259. https://doi.org/10.1159/000140228

Sartorelli, P., Andersen, H. R., Angerer, J., Corish, J., Drexler, H., Göen, T., Griffin, P., Hotchkiss, S. A. M., Larese, F., Montomoli, L., Perkins, J., Schmelz, M., Van De Sandt, J., & Williams, F. (2000). Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *8*(2), 133–152. https://doi.org/10.1016/S1382-6689(00)00035-1

Schaefer, H., Zesch, A., & Stüttgen, G. (1977). Penetration, permeation, and absorption of triamcinolone acetonide in Normal and Psoriatic Skin. *Archives for Dermatological Research*, *258*(3), 241–249. https://doi.org/10.1007/BF00561126

Scheuplein, R. J., & Blank, I. H. (1973). Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids. *The Journal of Investigative Dermatology*, *60*(5), 286–296. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12723090

Shah, K. K., Patel, K. N., Patel, H. K., Patel, B. A., & Patel, P. A. (2012). Innovations in Transdermal Drug Delivery System - A Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, *1*(1), 1–10. https://doi.org/10.31638/ijprs.v1.i1.00011

Shah, V. P., & Amidon, G. L. (2014). G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm Res 12, 413-420, 1995-Backstory of BCS. *AAPS Journal*, *16*(5), 894–898. https://doi.org/10.1208/s12248-014-9620-9

Shah, V. P., Yacobi, A., Rədulescu, F. Ş., Miron, D. S., & Lane, M. E. (2015). A science based approach to topical drug classification system (TCS). In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 491, Issues 1–2, pp. 21–25). https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.011

Shukla, A., Janich, M., Jahn, K., & Neubert, R. H. H. (2003). Microemulsions for dermal drug delivery studied by dynamic light scattering: Effect of interparticle interactions in oil-in-water microemulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *92*(4), 730–738. https://doi.org/10.1002/jps.10333

Simon, A., Amaro, M. I., Healy, A. M., Cabral, L. M., & de Sousa, V. P. (2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *International Journal of Pharmaceutics*, *512*(1), 234–241. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.052

Singh, B., Kumar, R., & Ahuja, N. (2005). Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I: Fundamental aspects. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *22*(1), 27–105. https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v22.i1.20

Singh, C. K., Ndiaye, M. A., & Ahmad, N. (2015). Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1852*(6), 1178–1185. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.004

Singh, I., & Morris, A. (2011). Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, *1*(1), 4. https://doi.org/10.4103/2230-973x.76721

Singh, S., & Singh, J. (1993). Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: A review. *Medicinal Research Reviews*, *13*(5), 569–621. https://doi.org/10.1002/med.2610130504

Sintov, A. C., & Shapiro, L. (2004). New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release*, *95*(2), 173–183. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.11.004

Sirerol, J. A., Feddi, F., Mena, S., Rodriguez, M. L., Sirera, P., Aupí, M., Pérez, S., Asensi, M., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2015). Topical treatment with pterostilbene, a natural phytoalexin, effectively protects hairless mice against UVB radiation-induced skin damage and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, *85*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.027

Skelly, J. P., Shah, V. P., & Maibach, H. I. (1987). FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: Relevance to bioavailability and bioequivalence. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 4, Issue 3, pp. 265–267). https://doi.org/10.1023/a:1016428716506

Smith, R., Healy, E., Siddiqui, S., Flanagan, N., Steijlen, P. M., Rosdahl, I., Jacques, J. P., Rogers, S., Turner, R., Jackson, I. J., Birch-Machin, M. A., & Rees, J. L. (1998). Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *Journal of Investigative Dermatology*, *111*(1), 119–122. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00252.x

Southwell, D., Barry, B. W., & Woodford, R. (1984). Variations in permeability of human skin within and between specimens. *International Journal of Pharmaceutics*, *18*(3), 299–309. https://doi.org/10.1016/0378-5173(84)90145-5

Sriram, G., Alberti, M., Dancik, Y., Wu, B., Wu, R., Feng, Z., Ramasamy, S., Bigliardi, P. L., Bigliardi-Qi, M., & Wang, Z. (2018). Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function. *Materials Today*, *21*(4), 326–340. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.002

Stubenrauch, C. (2009). Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives. *Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives*, 1–375. https://doi.org/10.1002/9781444305524

Sugibayashi, K. (2017). Skin permeation and disposition of therapeutic and cosmeceutical compounds. In *Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds* (pp. 1–428). https://doi.org/10.1007/978-4-431-56526-0

Švajger, U., & Jeras, M. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *International Reviews of Immunology*, *31*(3), 202–222. https://doi.org/10.3109/08830185.2012.665108

Tadros, T. (2013). Encyclopedia of Colloid and Interface Science. In *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108–109*, 303–318. https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023

Tan, H. S., & Pfister, W. R. (1999). Pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery systems. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, *2*(2), 60–69. https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00119-4

Tavano, L., Muzzalupo, R., Picci, N., & De Cindio, B. (2014). Co-encapsulation of lipophilic antioxidants into niosomal carriers: Percutaneous permeation studies for cosmeceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *114*, 144–149. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.055

Thong, H. Y., Zhai, H., & Maibach, H. I. (2007). Percutaneous penetration enhancers: An overview. *Skin Pharmacology and Physiology*, *20*(6), 272–282. https://doi.org/10.1159/000107575

Truong, V. L., Jun, M., & Jeong, W. S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors*, *44*(1), 36–49. https://doi.org/10.1002/biof.1399

Trush, M. A., Egner, P. A., & Kensler, T. W. (1994). Myeloperoxidase as a biomarker of skin irritation and inflammation. *Food and Chemical Toxicology*, *32*(2), 143–147. https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90175-9

Tsai, H. Y., Ho, C. T., & Chen, Y. K. (2017a). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3′-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(1), 134–147. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.004

Tsai, H. Y., Ho, C. T., & Chen, Y. K. (2017b). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3′-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(1), 134–147. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.004

Tsai, M. J., Lu, I. J., Fu, Y. S., Fang, Y. P., Huang, Y. Bin, & Wu, P. C. (2016). Nanocarriers enhance the transdermal bioavailability of resveratrol: In-vitro and in-vivo study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *148*, 650–656. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.09.045

Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., & Sugibayashi, K. (2015). Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M^{TM}. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *67*, 113–118. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.11.002

Valladeau, J., & Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. In *Seminars in Immunology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 273–283). https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.009

Valladeau, J., Saeland, S., Krug, J., Szöllősi, A. G., Oláh, A., Bíró, T., Tóth, B. I., Newton, K., Dixit, V. M., Murphree, R. W., Houben, E., De Paepe, K., Rogiers, V., Hadgraft, J., Valenta, C., Elias, P. M., Walters, K. A., Bouwstra, J. A., Ponec, M., … Sakajiri, A. (2017). Dermatological and transdermal formulations. In *Seminars in Immunology* (Vol. 270, Issue 3). https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00402-6

Valladeau, J., Saeland, S., Krug, J., Szöllősi, A. G., Oláh, A., Bíró, T., Tóth, B. I., Newton, K., Dixit, V. M., Murphree, R. W., Houben, E., De Paepe, K., Rogiers, V., Hadgraft, J., Valenta, C., Elias, P. M., Walters, K. A., Bouwstra, J. A., Ponec, M., … Urtti, A. (2017). Cutaneous dendritic cells Jenny. In *Seminars in Immunology* (Vol. 270, Issue 3, pp. 273–283). https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00402-6

Van De Sandt, J. J. M., Van Burgsteden, J. A., Cage, S., Carmichael, P. L., Dick, I., Kenyon, S., Korinth, G., Larese, F., Limasset, J. C., Maas, W. J. M., Montomoli, L., Nielsen, J. B., Payan, J. P., Robinson, E., Sartorelli, P., Schaller, K. H., Wilkinson, S. C., & Williams, F. M. (2004). In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: A multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *39*(3), 271–281. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2004.02.004

Van Krevelen, D. W., & Te Nijenhuis, K. (2009). Properties of Polymers. In *Properties of Polymers*. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-054819-7.X0001-5

Van Zyl, L., Du Preez, J., Gerber, M., Du Plessis, J., & Viljoen, J. (2016). Essential Fatty Acids as Transdermal Penetration Enhancers. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 105, Issue 1, pp. 188–193). https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.032

Vanaja, K., & Rani, R. H. S. (2007). Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, *24*(1), 1–23. https://doi.org/10.1080/10601330701220520

Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C. T., Zhou, Z., & Rosen, R. T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of Polygonum cuspidatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 253–256. https://doi.org/10.1021/jf9909196

Vian, M. A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P. O., & Lacombe, J. M. (2005). Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A*, *1085*(2), 224–229. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.083

Villaflores, O. B., Chen, Y. J., Chen, C. P., Yeh, J. M., & Wu, T. Y. (2012). Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *51*(4), 515–525. https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.09.005

Vitonyte, J., Manca, M. L., Caddeo, C., Valenti, D., Peris, J. E., Usach, I., Nacher, A., Matos, M., Gutiérrez, G., Orrù, G., Fernàndez-Busquets, X., Fadda, A. M., & Manconi, M. (2017). Bifunctional viscous nanovesicles co-loaded with resveratrol and gallic acid for skin protection against microbial and oxidative injuries. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *114*, 278–287. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.02.004

Wagner, H., Kostka, K. H., Lehr, C. M., & Schaefer, U. F. (2001). Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. *Journal of Controlled Release*, *75*(3), 283–295. https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00396-0

Walters, K. A. (2002). Dermatological and transdermal formulations. In *Dermatological and Transdermal Formulations* (pp. 1–575). https://doi.org/10.1201/9780824743239.ch7

Wester, R. C., & Maibach, H. I. (2005). Regional Variation in Percutaneous Absorption: Principles and Applications to Human Risk Assessment. *Percutaneous Absorption Drugs - Cosmetics - Mechanisms - Methodology*, 85–93.

Wiechers, J. W. (1989). The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, *11*(6), 185–198. https://doi.org/10.1007/BF01959410

Wiechers, J. W., Kelly, C. L., Blease, T. G., & Dederen, J. C. (2004a). Formulating for efficacy. *International Journal of Cosmetic Science*, *26*(4), 173–182. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00211.x

Wiechers, J. W., Kelly, C. L., Blease, T. G., & Dederen, J. C. (2004b). Formulating for efficacy. *International Journal of Cosmetic Science*, *26*(4), 173–182. https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00211.x

Wiechers, Johann W. (2005). Optimizing Skin Delivery of Active Ingredients From Emulsions. From Theory To Practice. In *Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products: Technology, Applications and Formulations*. William Andrew Inc. https://doi.org/10.1016/B978-081551504-3.50025-0

Willia, A. C., & Barry, B. W. (1991). Terpenes and the Lipid–Protein–Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, *8*(1), 17–24. https://doi.org/10.1023/A:1015813803205

WILLIAMS, A. (2007). Pharmaceutical Solvents as Vehicles for Topical Dosage Forms. In *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (pp. 403–426). https://doi.org/10.1007/978-0-387-69154-1_13

Williams, A. C., Cornwell, P. A., & Barry, B. W. (1992). On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities. *International Journal of Pharmaceutics*, *86*(1), 69–77. https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90032-W

Williams, Adrian C., & Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(5), 603–618. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.025

Winsor, P. A. (1948). Hydrotropy, solubilisation and related Emulsification processes. Part I. *Transactions of the Faraday Society*, *44*(1942), 376–398. https://doi.org/10.1039/tf9484400376

Yamashita, F., & Hashida, M. (2003). Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 55, Issue 9, pp. 1185–1199). https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00118-2

York, N., Basel, •, Bronaugh, R. L., & Maibach, H. I. (2001). *Topical Absorption of Dermatological Products edited by*. http://www.dekker.com

Yutani, R., Kikuchi, T., Teraoka, R., & Kitagawa, S. (2014). Efficient delivery and distribution in skin of chlorogenic acid and resveratrol induced by microemulsion using sucrose laurate. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *62*(3), 274–280. https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00820

Yutani, R., Komori, Y., Takeuchi, A., Teraoka, R., & Kitagawa, S. (2016). Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *68*(1), 46–55. https://doi.org/10.1111/jphp.12497

Zaidi, Z., & Lanigan, S. W. (2010). *Dermatology in Clinical Practice*.

Zhang, S., Wan, Q., Xu, X., Xing, Y., Ding, J., Yang, S., Sun, W., Lu, M., & Pan, B. (2019). A novel oil-based suspension of a micro-environmental, pH-modifying solid dispersion for parenteral delivery: Formulation and stability evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *179*(April), 382–392. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.001

Zhou, C. Q., Li, S. S., Chen, Z. M., Li, F. Q., Lei, P., & Peng, G. G. (2013). Rotigotine Transdermal Patch in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069738

Αριτζίδου, Κ. Μ. (2018). *Μορφοποίηση ημιστερεών σκευασμάτων ρεσβερατρόλης, εκτίμηση In Vitro διαπερατότητας και In Vivo αντιφλεγονώδους δράσης τους*.

Δέδε, Ά. (2017). *In Vitro ρινική διαπέραση της κροκίνης και της σαφρανάλης ως συστατικά εκχυλισμάτων των στιγμάτων του φυτού Crocus Sativus*.

Σπανέας, Δ. (2019). *In vitro μελέτη διαπερατότητας της Ρεσβερατρόλης από γαλακτώματα o / w τοπικής χρήσης με τη χρήση τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού*.

Τζουανάκη, Σ. (2016). *Μορφοποίηση και in vitro Αξιολόγηση Γαλακτωμάτων Κυκλοσπορίνης Α με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού*.

Η. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

16. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

16.1. Προκαταρκτική Μελέτη Διαπερατότητας σε Strat M®

16.1.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Cumulative permeation 3h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11	J Run 12
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	1.000	0.9415	0.9546	0.9381	1.000	0.9706	1.000	0.9706	0.9334
P value	0.9933	0.5334	0.5901	0.5197	0.9879	0.6706	0.9886	0.6706	0.5017
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.9819	0.8931	0.8249	1.000
P value	0.7422	0.3639	0.1755	0.9879
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

Cumulative permeation 6h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9626	1.000	0.9745	0.8361	0.7596	0.9439	0.8663	0.9999	0.8663
P value	0.6283	0.9983	0.6937	0.2040	0.0213	0.5434	0.2850	0.9847	0.2850
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.7974	0.9469	0.9653	0.9064	0.9439
P value	0.1082	0.5558	0.6422	0.4061	0.5434
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

Cumulative permeation 12h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9999	1.000	0.9160	0.9762	0.9971	0.8442	0.8350	1.000	0.8350
P value	0.9810	>0.9999	0.4384	0.7044	0.8979	0.2252	0.2011	>0.9999	0.2011
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.9454	0.7923	0.9807	0.8538	0.8442
P value	0.5497	0.0964	0.7338	0.2505	0.2252
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

Cumulative permeation 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9996	1.000	0.7772	0.9987	0.9851	0.9172	0.8930	1.000	0.8930
P value	0.9620	0.9988	0.0613	0.9318	0.7665	0.4424	0.3635	>0.9999	0.3635
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.9392	0.7618	0.9736	0.9633	0.9172
P value	0.5240	0.0263	0.6883	0.6319	0.4424
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	*	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

%Dose permeated 3h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.8260	1.000	0.9423	0.9552	0.9446	1.000	0.9727	1.000	0.9700
P value	0.1783	>0.9999	0.5367	0.5928	0.5463	0.9873	0.6828	>0.9999	0.6678
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.9323	0.9857	0.8956	0.8176	0.9999
P value	0.4974	0.7714	0.3716	0.1572	0.9864
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

%Dose permeated 6h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9631	1.000	0.9756	0.8322	0.7604	0.9437	0.8710	1.000	0.8665
P value	0.6307	>0.9999	0.7003	0.1939	0.0230	0.5424	0.2983	0.9935	0.2855
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.7982	0.9913	0.9657	0.9088	0.9467
P value	0.1101	0.8220	0.6444	0.4141	0.5551
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

%Dose permeated 12h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9999	0.9959	0.9167	0.9760	0.9974	0.8447	0.8365	1.000	0.8351
P value	0.9825	0.8776	0.4407	0.7030	0.9034	0.2263	0.2051	>0.9999	0.2014
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.9451	0.9913	0.9804	0.8601	0.8449
P value	0.5484	0.8220	0.7316	0.2678	0.2268
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

%Dose permeated 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A Run 1	B Run 2	C Run 3	D Run 4	E Run 5	F Run 6	G Run 7	H Run 9	I Run 11
Test for normal distribution									
Shapiro-Wilk test									
W	0.9997	1.000	1.000	0.9987	0.9868	0.9167	0.8938	1.000	0.8916
P value	0.9654	>0.9999	0.9924	0.9312	0.7804	0.4410	0.3661	0.9930	0.3592
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Normality and Lognormality Tests Tabular results	J Run 12	K Run 13	L Run14	M Run 16	N Rub 17
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.9433	0.7584	0.9735	0.9633	0.9171
P value	0.5408	0.0186	0.6878	0.6316	0.4423
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	*	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3	3

16.1.2. ANOVA – Post Hoc

Cumulative permeation 3h

ANOVA summary	
F	17.50
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.8904

Cumulative permeation 6h

ANOVA summary	
F	6.277
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.7445

Cumulative permeation 12h

ANOVA summary	
F	13.40
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.8615

Cumulative permeation 24h

ANOVA summary	
F	5.509
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.7189

%Dose permeated 3h

ANOVA summary	
F	17.56
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.8907

%Dose permeated 6h

ANOVA summary	
F	19.33
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.8997

%Dose permeated 12h

ANOVA summary	
F	83.43
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9748

%Dose permeated 24h

ANOVA summary	
F	69.89
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9701

16.2. Συγκριτική Μελέτη διαπερατότητα Strat M®

16.2.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Cumulative permeation 3h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	1.000	0.9643	1.000	1.000
P value	>0.9999	0.6369	>0.9999	>0.9999
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

Cumulative permeation 6h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.7500	0.7500	1.000	0.9963
P value			>0.9999	0.8842
Passed normality test (alpha=0.05)?			Yes	Yes
P value summary			ns	ns
Number of values	3	3	3	3

Cumulative permeation 12h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.7500	0.9988	1.000	0.9867
P value		0.9352	>0.9999	0.7791
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	Yes	Yes
P value summary		ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

Cumulative permeation 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	1.000	1.000	1.000	0.9964
P value	0.9898	0.9927	>0.9999	0.8861
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

%Dose permeated 3h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.9643	0.7500	1.000	0.9999
P value	0.6369		0.9909	0.9775
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes		Yes	Yes
P value summary	ns		ns	ns

%Dose permeated 6h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.7500	0.7500	1.000	0.9974
P value			>0.9999	0.9024
Passed normality test (alpha=0.05)?			Yes	Yes
P value summary			ns	ns
Number of values	3	3	3	3

%Dose permeated 12h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.7500	0.9982	1.000	0.9842
P value		0.9184	>0.9999	0.7592
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	Yes	Yes
P value summary		ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

%Dose permeated 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL	B CREAM	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	1.000	1.000	1.000	0.9967
P value	0.9866	0.9931	>0.9999	0.8899
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	3	3	3	3

16.2.2. ANOVA – Post Hoc

Cumulative permeation 3h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-0.03667	-28.57 to 28.49	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-79.08	-107.6 to -50.55	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-155.7	-184.2 to -127.2	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-79.04	-107.6 to -50.51	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-155.7	-184.2 to -127.1	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-76.61	-105.1 to -48.08	Yes	***	0.0001

Cumulative permeation 6h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-0.3233	-88.04 to 87.39	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-246.0	-333.7 to -158.3	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-349.8	-437.5 to -262.1	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-245.7	-333.4 to -158.0	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-349.4	-437.2 to -261.7	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-103.8	-191.5 to -16.03	Yes	*	0.0222

Cumulative permeation 12h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-1.033	-144.7 to 142.6	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-634.1	-777.7 to -490.4	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-838.9	-982.6 to -695.3	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-633.1	-776.7 to -489.4	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-837.9	-981.5 to -694.3	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-204.8	-348.5 to -61.20	Yes	**	0.0079

Cumulative permeation 24h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-1.387	-182.4 to 179.6	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-1147	-1328 to -965.8	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-1812	-1993 to -1631	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-1145	-1326 to -964.5	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-1810	-1991 to -1629	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-664.9	-845.9 to -483.9	Yes	****	<0.0001

%Dose permeated 3h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-6.667e-005	-0.8534 to 0.8533	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-2.605	-3.458 to -1.751	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-3.301	-4.155 to -2.448	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-2.605	-3.458 to -1.751	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-3.301	-4.155 to -2.448	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-0.6967	-1.550 to 0.1567	No	ns	0.1146

%Dose permeated 6h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-0.002600	-2.822 to 2.817	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-8.095	-10.91 to -5.276	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-7.419	-10.24 to -4.599	Yes	***	0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-8.093	-10.91 to -5.273	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-7.416	-10.24 to -4.597	Yes	***	0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	0.6767	-2.143 to 3.496	No	ns	0.8664

%Dose permeated 12h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	-0.009767	-4.724 to 4.704	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-20.86	-25.58 to -16.15	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-17.79	-22.51 to -13.08	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-20.85	-25.57 to -16.14	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-17.78	-22.50 to -13.07	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	3.070	-1.644 to 7.784	No	ns	0.2362

%Dose permeated 24h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL vs. CREAM	0.0001000	-5.920 to 5.920	No	ns	>0.9999
GEL vs. ME 1.9%	-37.85	-43.77 to -31.93	Yes	****	<0.0001
GEL vs. ME 3%	-38.47	-44.39 to -32.55	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 1.9%	-37.85	-43.77 to -31.93	Yes	****	<0.0001
CREAM vs. ME 3%	-38.47	-44.39 to -32.55	Yes	****	<0.0001
ME 1.9% vs. ME 3%	-0.6167	-6.536 to 5.303	No	ns	0.9863

16.3. Συγκριτική Μελέτη διαπερατότητα ανθρώπινη Κεράτινη Στοιβάδα

16.3.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Cumulative permeation 3h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL 5%	B CREAM 6%	C ME 3%	D ME 1.9%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.8535	0.9580	0.9094	0.9430
P value	0.2059	0.7939	0.4642	0.6871
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

Cumulative permeation 6h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL 5%	B CREAM 6%	C ME 3%	D ME 1.9%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.8469	0.9229	0.9146	0.9653
P value	0.1848	0.5487	0.4958	0.8441
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

Cumulative permeation 12h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL 5%	B CREAM 6%	C ME 3%	D ME 1.9%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.9164	0.8156	0.8873	0.9653
P value	0.5067	0.1079	0.3438	0.8441
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

Cumulative permeation 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A GEL 5%	B CREAM 6%	C ME 3%	D ME 1.9%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.9210	0.8199	0.8708	0.8707
P value	0.5364	0.1166	0.2698	0.2693
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

16.3.2. ANOVA – Post Hoc

Cumulative permeation 3h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL 5% vs. CREAM 6%	-0.1960	-0.3228 to -0.06924	Yes	**	0.0022
GEL 5% vs. ME 3%	0.04000	-0.08676 to 0.1668	No	ns	0.8035
GEL 5% vs. ME 1.9%	-0.02400	-0.1508 to 0.1028	No	ns	0.9474
CREAM 6% vs. ME 3%	0.2360	0.1092 to 0.3628	Yes	***	0.0004
CREAM 6% vs. ME 1.9%	0.1720	0.04524 to 0.2988	Yes	**	0.0065
ME 3% vs. ME 1.9%	-0.06400	-0.1908 to 0.06276	No	ns	0.4916

Cumulative permeation 6h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL 5% vs. CREAM 6%	-0.2180	-0.3494 to -0.08658	Yes	**	0.0011
GEL 5% vs. ME 3%	0.2180	0.08658 to 0.3494	Yes	**	0.0011
GEL 5% vs. ME 1.9%	0.1480	0.01658 to 0.2794	Yes	*	0.0247
CREAM 6% vs. ME 3%	0.4360	0.3046 to 0.5674	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 1.9%	0.3660	0.2346 to 0.4974	Yes	****	<0.0001
ME 3% vs. ME 1.9%	-0.07000	-0.2014 to 0.06142	No	ns	0.4471

Cumulative permeation 12h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL 5% vs. CREAM 6%	-0.2080	-0.3533 to -0.06273	Yes	**	0.0042
GEL 5% vs. ME 3%	0.3940	0.2487 to 0.5393	Yes	****	<0.0001
GEL 5% vs. ME 1.9%	0.6060	0.4607 to 0.7513	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 3%	0.6020	0.4567 to 0.7473	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 1.9%	0.8140	0.6687 to 0.9593	Yes	****	<0.0001
ME 3% vs. ME 1.9%	0.2120	0.06673 to 0.3573	Yes	**	0.0036

Cumulative permeation 24h

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
GEL 5% vs. CREAM 6%	-0.2140	-0.4448 to 0.01684	No	ns	0.0742
GEL 5% vs. ME 3%	0.4820	0.2512 to 0.7128	Yes	***	0.0001
GEL 5% vs. ME 1.9%	0.5120	0.2812 to 0.7428	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 3%	0.6960	0.4652 to 0.9268	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 1.9%	0.7260	0.4952 to 0.9568	Yes	****	<0.0001
ME 3% vs. ME 1.9%	0.03000	-0.2008 to 0.2608	No	ns	0.9818

16.4. Συγκριτική Μελέτη Κατακράτησης από ανθρώπινη Κεράτινη Στοιβάδα

16.4.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Cumulative permeation 24h

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CREAM 6%	B GEL 5%	C ME 1.9%	D ME 3%
Test for normal distribution				
Shapiro-Wilk test				
W	0.8835	0.9078	0.9158	0.8794
P value	0.3254	0.4543	0.5034	0.3067
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns
Number of values	5	5	5	5

16.4.2. ANOVA – Post Hoc

ANOVA summary	
F	111.7
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9544

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CREAM 6% vs. GEL 5%	3.570	-10.39 to 17.53	No	ns	0.8829
CREAM 6% vs. ME 1.9%	-74.86	-88.82 to -60.91	Yes	****	<0.0001
CREAM 6% vs. ME 3%	-14.54	-28.50 to -0.5865	Yes	*	0.0396
GEL 5% vs. ME 1.9%	-78.43	-92.39 to -64.48	Yes	****	<0.0001
GEL 5% vs. ME 3%	-18.11	-32.07 to -4.156	Yes	**	0.0092
ME 1.9% vs. ME 3%	60.32	46.36 to 74.28	Yes	****	<0.0001

17. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ IN VIVO

17.1. TEWL

17.1.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8984	0.9047	0.8374	0.9114	0.9295	0.8826	0.8099
P value	0.3213	0.3601	0.0940	0.4059	0.5464	0.2383	0.0512
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9628	0.9113	0.9433	0.8201	0.9544	0.8354	0.9211
P value	0.8421	0.4052	0.6688	0.0643	0.7696	0.0900	0.4783
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9547	0.9652	0.9335	0.8671	0.9785	0.8513	0.9521
P value	0.7719	0.8622	0.5809	0.1751	0.9518	0.1264	0.7485
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8393	0.9761	0.9134	0.9260	0.9642	0.9270	0.9735
P value	0.0979	0.9383	0.4200	0.5172	0.8541	0.5259	0.9223
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8196	0.9030	0.8208	0.9449	0.9685	0.9332	0.9261
P value	0.0636	0.3495	0.0654	0.6831	0.8875	0.5782	0.5181
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.1.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	TEWL				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Gree**
Time x Column Factor	10.33	<0.0001	****	Yes	
Time	51.95	<0.0001	****	Yes	0.7387
Column Factor	3.532	0.0107	*	Yes	
Subject	7.666	0.2572	ns	No	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	3383	24	141.0	F (24, 168) = 2.728	P<0.0001
Time	17010	4	4252	F (2.955, 124.1) = 82.30	P<0.0001
Column Factor	1157	6	192.8	F (6, 42) = 3.225	P=0.0107
Subject	2510	42	59.76	F (42, 168) = 1.157	P=0.2572
Residual	8681	168	51.67		

17.1.3. Uncorrected Fischer's LSD

Ανά Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL				
DAY -1 vs. DAY 0	-7,589	-13,72 to -1,458	Yes	0,0231
DAY -1 vs. DAY 1	-14,33	-22,65 to -6,008	Yes	0,0056
DAY -1 vs. DAY 4	-29,94	-37,87 to -22,00	Yes	<0,0001
DAY -1 vs. DAY 8	-9,449	-13,85 to -5,047	Yes	0,0019
DAY 0 vs. DAY 4	-22,35	-28,24 to -16,45	Yes	<0,0001
DAY 1 vs. DAY 4	-15,61	-21,85 to -9,359	Yes	0,0009
DAY 4 vs. DAY 8	20,49	13,23 to 27,75	Yes	0,0005
CR RSV				
DAY -1 vs. DAY 0	-6,911	-12,90 to -0,9266	Yes	0,0301
DAY -1 vs. DAY 1	-16,88	-23,92 to -9,851	Yes	0,0011
DAY -1 vs. DAY 4	-29,63	-37,54 to -21,72	Yes	<0,0001
DAY -1 vs. DAY 8	-7,764	-13,21 to -2,322	Yes	0,013
DAY 0 vs. DAY 1	-9,973	-17,94 to -2,007	Yes	0,0221

DAY 0 vs. DAY 4	-22,72	-34,27 to -11,16	Yes	0,003
DAY 1 vs. DAY 4	-12,75	-21,87 to -3,620	Yes	0,0142
DAY 1 vs. DAY 8	9,12	0,9621 to 17,28	Yes	0,0339
DAY 4 vs. DAY 8	21,87	11,47 to 32,27	Yes	0,0021
GEL PL				
DAY -1 vs. DAY 4	-19,01	-31,63 to -6,394	Yes	0,0102
DAY 0 vs. DAY 4	-17,6	-25,06 to -10,14	Yes	0,0012
DAY 1 vs. DAY 4	-14,77	-25,75 to -3,788	Yes	0,0166
DAY 4 vs. DAY 8	13,74	6,767 to 20,72	Yes	0,0029
GEL RSV				
DAY -1 vs. DAY 4	-27,13	-35,63 to -18,63	Yes	0,0002
DAY 0 vs. DAY 4	-20,77	-35,32 to -6,223	Yes	0,0129
DAY 1 vs. DAY 4	-18,08	-34,48 to -1,690	Yes	0,0356
DAY 4 vs. DAY 8	22,9	17,25 to 28,54	Yes	<0,0001
ME PL				
DAY -1 vs. DAY 0	-19,04	-25,66 to -12,41	Yes	0,0004
DAY -1 vs. DAY 1	-25,81	-40,75 to -10,88	Yes	0,0055
DAY -1 vs. DAY 4	-24,17	-33,31 to -15,03	Yes	0,0006
DAY -1 vs. DAY 8	-7,987	-15,30 to -0,6737	Yes	0,0369
DAY 0 vs. DAY 8	11,05	0,5983 to 21,50	Yes	0,0414
DAY 4 vs. DAY 8	16,18	2,540 to 29,83	Yes	0,0272
ME RSV				
DAY -1 vs. DAY 0	-12,71	-19,84 to -5,574	Yes	0,0048
DAY -1 vs. DAY 1	-11,44	-15,49 to -7,393	Yes	0,0005
DAY -1 vs. DAY 4	-21,71	-28,28 to -15,13	Yes	0,0002
DAY -1 vs. DAY 8	-4,67	-8,624 to -0,7157	Yes	0,0277
DAY 0 vs. DAY 4	-9	-17,97 to -0,02844	Yes	0,0495
DAY 0 vs. DAY 8	8,036	0,9210 to 15,15	Yes	0,0327
DAY 1 vs. DAY 4	-10,26	-20,18 to -0,3502	Yes	0,0445
DAY 1 vs. DAY 8	6,771	1,866 to 11,68	Yes	0,0149
DAY 4 vs. DAY 8	17,04	9,951 to 24,12	Yes	0,0011
MAP				
DAY -1 vs. DAY 4	-24,68	-27,75 to -21,61	Yes	<0,0001
DAY -1 vs. DAY 8	-15,4	-17,68 to -13,13	Yes	<0,0001

DAY 0 vs. DAY 1	-9,77	-19,34 to -0,1993	Yes	0,0467
DAY 0 vs. DAY 4	-25,4	-30,53 to -20,27	Yes	<0,0001
DAY 0 vs. DAY 8	-16,12	-19,67 to -12,58	Yes	<0,0001
DAY 1 vs. DAY 4	-15,63	-23,83 to -7,426	Yes	0,0035
DAY 4 vs. DAY 8	9,276	6,698 to 11,85	Yes	0,0001

Ανά Ημέρα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY 0				
CR PL vs. ME PL	-9,979	-17,41 to -2,547	Yes	0,0136
CR PL vs. MAP	7,924	2,439 to 13,41	Yes	0,0084
CR RSV vs. ME PL	-11,14	-18,54 to -3,740	Yes	0,0074
CR RSV vs. MAP	6,763	1,335 to 12,19	Yes	0,0188
GEL PL vs. ME PL	-14,67	-22,95 to -6,385	Yes	0,0023
GEL PL vs. ME RSV	-9,14	-17,99 to -0,2906	Yes	0,044
GEL RSV vs. ME PL	-12,55	-24,19 to -0,9109	Yes	0,0371
ME PL vs. MAP	17,9	10,40 to 25,41	Yes	0,0003
ME RSV vs. MAP	12,38	4,195 to 20,56	Yes	0,0073
DAY 1				
CR RSV vs. GEL PL	10,66	0,7113 to 20,62	Yes	0,0381
GEL PL vs. ME PL	-18,61	-35,67 to -1,547	Yes	0,0356
DAY 4				
CR PL vs. GEL PL	9,433	0,7107 to 18,16	Yes	0,0363
CR PL vs. ME RSV	8,894	0,5847 to 17,20	Yes	0,038
DAY 8				
CR PL vs. GEL RSV	6,559	2,270 to 10,85	Yes	0,0068
CR PL vs. ME RSV	5,443	1,679 to 9,206	Yes	0,0088
CR PL vs. MAP	-6,34	-8,952 to -3,728	Yes	0,0003
CR RSV vs. MAP	-8,509	-12,16 to -4,857	Yes	0,0006
GEL PL vs. MAP	-9,03	-15,82 to -2,238	Yes	0,0166
GEL RSV vs. MAP	-12,9	-17,02 to -8,777	Yes	<0,0001
ME PL vs. MAP	-9,271	-14,63 to -3,908	Yes	0,0045
ME RSV vs. MAP	-11,78	-15,32 to -8,243	Yes	<0,0001

17.2. Ενυδάτωση

17.2.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9380	0.8254	0.9460	0.8312	0.9360	0.8781	0.9245
P value	0.6205	0.0724	0.6936	0.0821	0.6033	0.2180	0.5051
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9351	0.9490	0.9380	0.8430	0.9265	0.9117	0.9559
P value	0.5955	0.7209	0.6206	0.1060	0.5217	0.4074	0.7831
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8679	0.8471	0.9072	0.9785	0.8451	0.8332	0.9183
P value	0.1779	0.1156	0.3765	0.9521	0.1107	0.0858	0.4562
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9602	0.8772	0.9521	0.8888	0.8882	0.9584	0.8393
P value	0.8208	0.2144	0.7484	0.2686	0.2653	0.8052	0.0978
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8200	0.9637	0.9778	0.9090	0.9367	0.9326	0.8714
P value	0.0642	0.8494	0.9483	0.3893	0.6095	0.5731	0.1908
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.2.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	HYDRATION				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greenhouse's epsil**
Time x Column Factor	8.938	0.0084	**	Yes	
Time	41.33	<0.0001	****	Yes	0.8643
Column Factor	2.805	0.2605	ns	No	
Subject	14.63	0.0044	**	Yes	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	3503	24	146.0	F (24, 168) = 1.938	P=0.0084
Time	16199	4	4050	F (3.457, 145.2) = 53.76	P<0.0001
Column Factor	1099	6	183.2	F (6, 42) = 1.342	P=0.2605
Subject	5735	42	136.6	F (42, 168) = 1.813	P=0.0044
Residual	12654	168	75.32		

17.2.3. Uncorrected Fischer's LSD

Ανά Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL				
Day -1 vs. Day 0	-16,47	-30,47 to -2,478	Yes	0,0281
Day -1 vs. Day 4	-17,62	-28,21 to -7,028	Yes	0,0066
Day 4 vs. Day 8	8,524	4,067 to 12,98	Yes	0,0034
CR RSV				
Day -1 vs. Day 0	-22,29	-34,80 to -9,775	Yes	0,0048
Day -1 vs. Day 1	-18,62	-29,42 to -7,823	Yes	0,0056
Day -1 vs. Day 4	-18,57	-29,62 to -7,526	Yes	0,0063
Day 0 vs. Day 8	15,53	6,156 to 24,90	Yes	0,0067
Day 1 vs. Day 8	11,86	2,130 to 21,59	Yes	0,0246
Day 4 vs. Day 8	11,81	3,115 to 20,51	Yes	0,0159
GEL PL				
Day -1 vs. Day 0	-29,38	-35,71 to -23,05	Yes	<0,0001
Day -1 vs. Day 1	-34,71	-45,55 to -23,87	Yes	0,0002

Day -1 vs. Day 4	-19,86	-33,62 to -6,094	Yes	0,0124
Day -1 vs. Day 8	-16,81	-25,12 to -8,497	Yes	0,0026
Day 0 vs. Day 8	12,57	6,352 to 18,79	Yes	0,0026
Day 1 vs. Day 4	14,85	0,3593 to 29,35	Yes	0,0461
Day 1 vs. Day 8	17,9	6,548 to 29,26	Yes	0,0084
GEL RSV				
Day -1 vs. Day 0	-16,9	-32,35 to -1,458	Yes	0,0366
Day -1 vs. Day 1	-26,19	-43,07 to -9,305	Yes	0,009
Day 0 vs. Day 4	11,95	-0,1641 to 24,06	No	0,0523
Day 0 vs. Day 8	8,856	1,344 to 16,37	Yes	0,0279
Day 1 vs. Day 4	21,24	11,20 to 31,28	Yes	0,0021
Day 1 vs. Day 8	18,14	7,669 to 28,62	Yes	0,0054
ME PL				
Day -1 vs. Day 0	-14,72	-27,37 to -2,058	Yes	0,0294
Day -1 vs. Day 1	-21,48	-31,82 to -11,13	Yes	0,0023
Day -1 vs. Day 4	-26,29	-42,40 to -10,18	Yes	0,0072
Day 1 vs. Day 8	11	2,609 to 19,39	Yes	0,0184
Day 4 vs. Day 8	15,81	5,236 to 26,38	Yes	0,0106
ME RSV				
Day -1 vs. Day 0	-20,19	-35,63 to -4,749	Yes	0,0186
Day -1 vs. Day 1	-23,76	-36,17 to -11,36	Yes	0,0034
Day -1 vs. Day 4	-22,62	-36,76 to -8,478	Yes	0,0079
Day -1 vs. Day 8	-16,95	-33,54 to -0,3582	Yes	0,0465
Day 1 vs. Day 8	6,811	0,1073 to 13,52	Yes	0,0474
MAP				
Day -1 vs. Day 1	-21,98	-30,95 to -13,01	Yes	0,001
Day -1 vs. Day 4	-13,74	-17,58 to -9,895	Yes	0,0001
Day -1 vs. Day 8	-9,713	-12,63 to -6,795	Yes	0,0002
Day 0 vs. Day 1	-14,44	-21,33 to -7,557	Yes	0,0022
Day 1 vs. Day 4	8,247	1,836 to 14,66	Yes	0,0199
Day 1 vs. Day 8	12,27	2,437 to 22,10	Yes	0,0224

Ανά Ημέρα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
Day 0				
CR RSV vs. ME PL	11,67	0,9249 to 22,41	Yes	0,0356
GEL PL vs. ME PL	14,33	4,379 to 24,29	Yes	0,0089
GEL PL vs. ME RSV	10,62	1,708 to 19,53	Yes	0,0234
GEL PL vs. MAP	18,65	2,777 to 34,52	Yes	0,0266
Day 1				
CR RSV vs. GEL PL	-11,66	-21,20 to -2,123	Yes	0,0212
GEL PL vs. ME PL	12,9	6,668 to 19,14	Yes	0,001
GEL PL vs. ME RSV	12,38	3,707 to 21,05	Yes	0,0093
GEL RSV vs. ME PL	12,05	1,469 to 22,63	Yes	0,0308
Day 4				
CR PL vs. GEL RSV	9,619	0,4507 to 18,79	Yes	0,0421
CR PL vs. MAP	5,311	0,5645 to 10,06	Yes	0,0316
GEL RSV vs. ME PL	-14	-25,62 to -2,384	Yes	0,0221
ME PL vs. MAP	9,693	0,06291 to 19,32	Yes	0,0488

17.3. Ερυθρότητα

17.3.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9615	0.9707	0.8270	0.9295	0.9204	0.8693	0.8346
P value	0.8314	0.9038	0.0750	0.5462	0.4727	0.1829	0.0884
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9101	0.9391	0.9009	0.9029	0.9048	0.8996	0.9116
P value	0.3968	0.6310	0.3367	0.3492	0.3612	0.3286	0.4067
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8849	0.8338	0.9419	0.9026	0.8891	0.8822	0.9451
P value	0.2490	0.0869	0.6558	0.3470	0.2700	0.2362	0.6851
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9635	0.9416	0.9017	0.9732	0.9260	0.8362	0.8773
P value	0.8482	0.6532	0.3412	0.9203	0.5173	0.0916	0.2146
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8699	0.9526	0.8884	0.9383	0.9189	0.9247	0.9464
P value	0.1851	0.7533	0.2666	0.6233	0.4608	0.5070	0.6967
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.3.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greenhouse's epsilon**
Time x Column Factor	12.90	0.0215	*	Yes	
Time	12.48	<0.0001	****	Yes	0.9237
Column Factor	4.991	0.0996	ns	No	
Subject	18.18	0.0653	ns	No	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	64294	24	2679	F (24, 168) = 1.756	P=0.0215
Time	62173	4	15543	F (3.695, 155.2) = 10.19	P<0.0001
Column Factor	24865	6	4144	F (6, 42) = 1.921	P=0.0996
Subject	90586	42	2157	F (42, 168) = 1.414	P=0.0653
Residual	256312	168	1526		

17.3.3. Uncorrected Fischer's LSD

Για κάθε Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL				
DAY -1 vs. DAY 4	-52,72	-94,52 to -10,92	Yes	0,0215
DAY 4 vs. DAY 8	46,19	17,69 to 74,69	Yes	0,0074
CR RSV				
DAY -1 vs. DAY 8	26,33	13,60 to 39,07	Yes	0,0023
DAY 4 vs. DAY 8	48,52	5,777 to 91,27	Yes	0,0321
GEL PL				
DAY -1 vs. DAY 1	42,62	13,97 to 71,27	Yes	0,0108
GEL RSV				
DAY 1 vs. DAY 4	-73,14	-132,3 to -13,99	Yes	0,0232
DAY 4 vs. DAY 8	75,57	44,83 to 106,3	Yes	0,001
ME PL				
DAY -1 vs. DAY 8	49,19	6,648 to 91,73	Yes	0,03
DAY 0 vs. DAY 8	57,53	23,35 to 91,70	Yes	0,0062
DAY 4 vs. DAY 8	45,1	19,28 to 70,91	Yes	0,0052
ME RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	40,05	16,23 to 63,86	Yes	0,0063
DAY -1 vs. DAY 8	56,86	29,93 to 83,79	Yes	0,0021
DAY 0 vs. DAY 8	62,62	36,85 to 88,39	Yes	0,001
DAY 1 vs. DAY 4	-35,66	-60,10 to -11,23	Yes	0,0118

DAY 4 vs. DAY 8	52,48	13,60 to 91,36	Yes	0,0164
MAP				
DAY 1 vs. DAY 4	-35,47	-61,97 to -8,968	Yes	0,0169

Για κάθε Χρονική Στιγμή

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY 1				
GEL RSV vs. ME PL	-42,24	-82,82 to -1,652	Yes	0,043
DAY 8				
CR PL vs. ME RSV	40,91	12,04 to 69,77	Yes	0,0097
CR PL vs. MAP	-61,22	-110,6 to -11,84	Yes	0,0204
CR RSV vs. ME RSV	32,38	1,863 to 62,90	Yes	0,0395
CR RSV vs. MAP	-69,74	-119,7 to -19,76	Yes	0,0112
GEL RSV vs. MAP	-91,55	-145,4 to -37,66	Yes	0,0032
ME PL vs. MAP	-75,41	-127,4 to -23,39	Yes	0,0087
ME RSV vs. MAP	-102,1	-150,1 to -54,12	Yes	0,0012

17.4. Μελανίνη

17.4.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8283	0.9191	0.9346	0.9667	0.9439	0.8591	0.9114
P value	0.0770	0.4623	0.5905	0.8738	0.6740	0.1487	0.4059
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8787	0.8748	0.9439	0.8175	0.9794	0.9118	0.8606
P value	0.2208	0.2042	0.6741	0.0608	0.9565	0.4085	0.1531
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9280	0.8925	0.7641	0.8851	0.8568	0.8416	0.8158
P value	0.5340	0.2880	0.0178	0.2501	0.1417	0.1029	0.0585
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8499	0.8858	0.8641	0.9226	0.8421	0.9662	0.9677
P value	0.1227	0.2537	0.1648	0.4896	0.1040	0.8698	0.8810
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9326	0.9522	0.8747	0.9464	0.9621	0.9443	0.9251
P value	0.5733	0.7493	0.2038	0.6968	0.8361	0.6773	0.5099
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.4.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	MELANIN				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greenhouse's**
Time x Column Factor	4.740	0.7375	ns	No	
Time	28.05	<0.0001	****	Yes	0.8227
Column Factor	5.065	0.1377	ns	No	
Subject	20.49	0.0014	**	Yes	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	8055	24	335.6	F (24, 168) = 0.7966	P=0.7375
Time	47660	4	11915	F (3.291, 138.2) = 28.28	P<0.0001
Column Factor	8607	6	1435	F (6, 42) = 1.730	P=0.1377
Subject	34821	42	829.1	F (42, 168) = 1.968	P=0.0014
Residual	70780	168	421.3		

17.4.3. Uncorrected Fischer's LSD

Ανά Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL				
DAY -1 vs. DAY 1	38,38	5,821 to 70,94	Yes	0,0279
DAY -1 vs. DAY 4	21,86	6,482 to 37,23	Yes	0,0132
CR RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	45,29	16,06 to 74,51	Yes	0,0091
DAY -1 vs. DAY 4	20,57	5,129 to 36,01	Yes	0,0173
DAY -1 vs. DAY 8	23,43	4,054 to 42,80	Yes	0,0253
DAY 0 vs. DAY 1	44,86	13,14 to 76,58	Yes	0,0135
DAY 0 vs. DAY 4	20,14	3,609 to 36,67	Yes	0,0246
DAY 1 vs. DAY 8	-21,86	-36,03 to -7,685	Yes	0,0092
GEL PL				
DAY 0 vs. DAY 1	41,62	0,4350 to 82,81	Yes	0,0483
GEL RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	37,24	15,93 to 58,55	Yes	0,0052
DAY -1 vs. DAY 4	20,38	6,900 to 33,86	Yes	0,0101
DAY 0 vs. DAY 1	35,24	1,285 to 69,20	Yes	0,0441
ME PL				
DAY -1 vs. DAY 0	13,62	5,030 to 22,21	Yes	0,0082
DAY -1 vs. DAY 1	45,43	29,49 to 61,36	Yes	0,0004
DAY 0 vs. DAY 1	31,81	13,79 to 49,83	Yes	0,005
DAY 1 vs. DAY 4	-36,62	-60,16 to -13,07	Yes	0,0089
DAY 1 vs. DAY 8	-37,76	-57,59 to -17,93	Yes	0,0035
ME RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	56,67	36,32 to 77,01	Yes	0,0005
DAY -1 vs. DAY 8	30,05	9,284 to 50,81	Yes	0,0122
DAY 0 vs. DAY 1	47,19	17,84 to 76,54	Yes	0,0077
DAY 1 vs. DAY 4	-36,52	-65,07 to -7,973	Yes	0,0203
DAY 1 vs. DAY 8	-26,62	-35,86 to -17,38	Yes	0,0004

Ανά ημέρα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY 0				
CR RSV vs. ME PL	22,67	2,601 to 42,73	Yes	0,0301
GEL RSV vs. ME PL	24,52	6,602 to 42,45	Yes	0,0128
DAY 1				
CR PL vs. MAP	-30,82	-56,93 to -4,719	Yes	0,0262
CR RSV vs. MAP	-33,4	-62,66 to -4,133	Yes	0,0288
GEL PL vs. MAP	-34,49	-67,46 to -1,527	Yes	0,0417
ME PL vs. MAP	-43,01	-69,49 to -16,54	Yes	0,0053
ME RSV vs. MAP	-42,44	-70,42 to -14,47	Yes	0,0068
DAY 8				
ME RSV vs. MAP	-24,57	-48,67 to -0,4685	Yes	0,0463

17.5. Πάχος Δέρματος

17.5.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9376	0.9031	0.9111	0.8392	0.9361	0.9404	0.9371
P value	0.6171	0.3503	0.4038	0.0976	0.6035	0.6420	0.6128
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8738	0.9724	0.9622	0.8860	0.9031	0.9359	0.9251
P value	0.2003	0.9150	0.8372	0.2543	0.3504	0.6024	0.5101
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8312	0.9111	0.9532	0.8844	0.8977	0.9791	0.8938
P value	0.0822	0.4038	0.7591	0.2469	0.3174	0.9552	0.2949
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day -4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9275	0.8715	0.9283	0.8424	0.8889	0.8655	0.9148
P value	0.5299	0.1915	0.5369	0.1045	0.2691	0.1696	0.4301
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day -8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8402	0.8186	0.8352	0.8732	0.9319	0.9471	0.9382
P value	0.0998	0.0622	0.0895	0.1980	0.5673	0.7033	0.6228
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.5.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	THICKNESS				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greenh**
Time x Column Factor	11.38	<0.0001	****	Yes	
Time	43.29	<0.0001	****	Yes	0.4743
Column Factor	4.529	0.0339	*	Yes	
Subject	12.43	0.0068	**	Yes	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	1.794	24	0.07474	F (24, 168) = 2.809	P<0.0001
Time	6.821	4	1.705	F (1.897, 79.68) = 64.09	P<0.0001
Column Factor	0.7136	6	0.1189	F (6, 42) = 2.550	P=0.0339
Subject	1.959	42	0.04664	F (42, 168) = 1.753	P=0.0068
Residual	4.470	168	0.02661		

17.5.3. Uncorrected Fischer's LSD

Για κάθε Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL				
DAY -1 vs. DAY 1	-0,7186	-1,158 to -0,2794	Yes	0,0071
DAY -1 vs. DAY 4	-0,3429	-0,4712 to -0,2145	Yes	0,0006
DAY -1 vs. DAY 8	-0,2914	-0,4071 to -0,1757	Yes	0,0008
DAY 0 vs. DAY 1	-0,6529	-1,031 to -0,2748	Yes	0,0055
DAY 0 vs. DAY 4	-0,2771	-0,3970 to -0,1573	Yes	0,0013
DAY 0 vs. DAY 8	-0,2257	-0,3292 to -0,1222	Yes	0,0018
DAY 1 vs. DAY 8	0,4271	0,0005187 to 0,8538	Yes	0,0498
CR RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	-0,3486	-0,5788 to -0,1184	Yes	0,01
DAY -1 vs. DAY 4	-0,3343	-0,4716 to -0,1970	Yes	0,001
DAY -1 vs. DAY 8	-0,22	-0,3273 to -0,1127	Yes	0,0024
DAY 0 vs. DAY 1	-0,32	-0,5194 to -0,1206	Yes	0,0077
DAY 0 vs. DAY 4	-0,3057	-0,4681 to -0,1433	Yes	0,0037
DAY 0 vs. DAY 8	-0,1914	-0,3219 to -0,06092	Yes	0,0115
GEL PL				
DAY -1 vs. DAY 1	-0,3529	-0,5654 to -0,1404	Yes	0,0066
DAY -1 vs. DAY 4	-0,4	-0,6333 to -0,1667	Yes	0,0057
DAY -1 vs. DAY 8	-0,3729	-0,6378 to -0,1079	Yes	0,0137
DAY 0 vs. DAY 1	-0,3457	-0,6279 to -0,06353	Yes	0,0241
DAY 0 vs. DAY 4	-0,3929	-0,6309 to -0,1549	Yes	0,0068
DAY 0 vs. DAY 8	-0,3657	-0,5713 to -0,1601	Yes	0,0048
GEL RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	-0,26	-0,4595 to -0,06050	Yes	0,0189
DAY -1 vs. DAY 4	-0,2857	-0,4027 to -0,1687	Yes	0,001
DAY -1 vs. DAY 8	-0,3029	-0,3964 to -0,2093	Yes	0,0002
DAY 0 vs. DAY 1	-0,2686	-0,4865 to -0,05060	Yes	0,0236
DAY 0 vs. DAY 4	-0,2943	-0,4040 to -0,1846	Yes	0,0006
DAY 0 vs. DAY 8	-0,3114	-0,3652 to -0,2577	Yes	<0,0001
ME PL				

DAY -1 vs. DAY 1	-0,4586	-0,6014 to -0,3158	Yes	0,0002
DAY -1 vs. DAY 4	-0,2129	-0,3297 to -0,09603	Yes	0,0043
DAY -1 vs. DAY 8	-0,2057	-0,3085 to -0,1029	Yes	0,0027
DAY 0 vs. DAY 1	-0,5143	-0,7177 to -0,3109	Yes	0,0008
DAY 0 vs. DAY 4	-0,2686	-0,3901 to -0,1470	Yes	0,0017
DAY 0 vs. DAY 8	-0,2614	-0,3805 to -0,1423	Yes	0,0017
DAY 1 vs. DAY 4	0,2457	0,05454 to 0,4369	Yes	0,0199
DAY 1 vs. DAY 8	0,2529	0,1378 to 0,3680	Yes	0,0017
ME RSV				
DAY -1 vs. DAY 1	-0,4114	-0,5725 to -0,2504	Yes	0,0008
DAY 0 vs. DAY 1	-0,4814	-0,5565 to -0,4064	Yes	<0,0001
DAY 0 vs. DAY 4	-0,1943	-0,3721 to -0,01648	Yes	0,0368
DAY 1 vs. DAY 4	0,2871	0,06889 to 0,5054	Yes	0,0182
DAY 1 vs. DAY 8	0,42	0,2552 to 0,5848	Yes	0,0008
MAP				
DAY -1 vs. DAY 4	-0,4314	-0,5159 to -0,3469	Yes	<0,0001
DAY -1 vs. DAY 8	-0,4183	-0,5604 to -0,2762	Yes	0,0004
DAY 0 vs. DAY 1	-0,311	-0,6179 to -0,003999	Yes	0,0479
DAY 0 vs. DAY 4	-0,5109	-0,6447 to -0,3770	Yes	<0,0001
DAY 0 vs. DAY 8	-0,4978	-0,7415 to -0,2541	Yes	0,0025

Για κάθε Χρονική Στιγμή

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY -1				
CR PL vs. MAP	-0,1358	-0,2543 to -0,01736	Yes	0,0286
DAY 1				
CR PL vs. GEL RSV	0,4571	0,04296 to 0,8713	Yes	0,034
GEL RSV vs. ME RSV	-0,2714	-0,4896 to -0,05323	Yes	0,0198
DAY 4				
CR PL vs. MAP	-0,2244	-0,3905 to -0,05834	Yes	0,014
CR RSV vs. MAP	-0,1915	-0,3299 to -0,05320	Yes	0,0118
GEL RSV vs. MAP	-0,2801	-0,4178 to -0,1424	Yes	0,0012
ME PL vs. MAP	-0,3287	-0,4410 to -0,2164	Yes	<0,0001

ME RSV vs. MAP	-0,3215	-0,5177 to -0,1254	Yes	0,0056
DAY 8				
CR PL vs. ME RSV	0,1786	0,02400 to 0,3331	Yes	0,0287
CR PL vs. MAP	-0,2627	-0,5079 to -0,01758	Yes	0,038
CR RSV vs. ME RSV	0,1486	0,03780 to 0,2593	Yes	0,0138
CR RSV vs. MAP	-0,2927	-0,5239 to -0,06156	Yes	0,019
GEL PL vs. ME RSV	0,3029	0,01601 to 0,5897	Yes	0,0414
GEL RSV vs. ME RSV	0,1914	0,08215 to 0,3007	Yes	0,003
GEL RSV vs. MAP	-0,2499	-0,4807 to -0,01905	Yes	0,037
ME PL vs. ME RSV	0,1186	0,01169 to 0,2255	Yes	0,033
ME PL vs. MAP	-0,3227	-0,5531 to -0,09242	Yes	0,0118
ME RSV vs. MAP	-0,4413	-0,6671 to -0,2156	Yes	0,0025

17.6. Σμήγμα

17.6.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.4530	0.6644	0.8181	0.6462	0.6004	0.4530	0.8484
P value	<0.0001	0.0015	0.0616	0.0009	0.0003	<0.0001	0.1188
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	Yes	No	No	No	Yes
P value summary	****	**	ns	***	***	****	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8558	0.8400	0.8346	0.8774	0.7594	0.6644	0.6542
P value	0.1386	0.0995	0.0883	0.2153	0.0159	0.0015	0.0011
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No
P value summary	ns	ns	ns	ns	*	**	**
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9107	0.6934	0.6524	0.6060	0.6671	0.8982	0.8808
P value	0.4005	0.0031	0.0011	0.0003	0.0016	0.3202	0.2302
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No	No	Yes	Yes
P value summary	ns	**	**	***	**	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.7320	0.8936	0.7205	0.8400	0.8774	0.7819	0.8194
P value	0.0082	0.2939	0.0062	0.0995	0.2153	0.0270	0.0634
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
P value summary	**	ns	**	ns	ns	*	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.6921	0.6004	0.6499	0.4530	0.4530	0.6462	0.6542
P value	0.0030	0.0003	0.0010	<0.0001	<0.0001	0.0009	0.0011
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No	No
P value summary	**	***	**	****	****	***	**
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

CR PL

Tabular results

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.4530	0.8558	0.9107	0.7320	0.6921
P value	<0.0001	0.1386	0.4005	0.0082	0.0030
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes	No	No
P value summary	****	ns	ns	**	**
Number of values	7	7	7	7	7

CR RSV

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.6004	0.8400	0.6934	0.8936	0.6004
P value	0.0003	0.0995	0.0031	0.2939	0.0003
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	No	Yes	No
P value summary	***	ns	**	ns	***
Number of values	7	7	7	7	7

GEL PL

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.7205	0.8346	0.6524	0.7205	0.6499
P value	0.0062	0.0883	0.0011	0.0062	0.0010
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	No	No	No
P value summary	**	ns	**	**	**
Number of values	7	7	7	7	7

GEL RSV

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.5819	0.8774	0.7438	0.8400	0.4530
P value	0.0002	0.2153	0.0109	0.0995	<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	No	Yes	No
P value summary	***	ns	*	ns	****
Number of values	7	7	7	7	7

ME PL

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.6004	0.7594	0.6671	0.8774	0.4530
P value	0.0003	0.0159	0.0016	0.2153	<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	No
P value summary	***	*	**	ns	****
Number of values	7	7	7	7	7

ME RSV

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.4530	0.6644	0.8982	0.7819	0.6462
P value	<0.0001	0.0015	0.3202	0.0270	0.0009
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	Yes	No	No
P value summary	****	**	ns	*	***
Number of values	7	7	7	7	7

MAP

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A DAY -1	B DAY 0	C DAY 1	D DAY 4	E DAY 8
Test for normal distribution					
Shapiro-Wilk test					
W	0.8484	0.6542	0.8808	0.8194	0.6542
P value	0.1188	0.0011	0.2302	0.0634	0.0011
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	No
P value summary	ns	**	ns	ns	**
Number of values	7	7	7	7	7

17.6.2. Μη παραμετρικοί έλεγχοι

Friedman test

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	MAP
Friedman test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Friedman statistic	16.72

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	CR PL
Friedman test	
P value	0.1860
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
Friedman statistic	6.182

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	CR RSV
Friedman test	
P value	0.0171
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Friedman statistic	12.03

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	GEL PL
Friedman test	
P value	0.0157
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Friedman statistic	12.23

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	GEL RSV
Friedman test	
P value	0.0103
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Friedman statistic	13.22

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	ME PL
Friedman test	
P value	0.0855
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
Number of groups	5
Friedman statistic	8.172

Friedman test ANOVA results	
Table Analyzed	ME RSV
Friedman test	
P value	0.0119
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	5
Friedman statistic	12.88

Uncorrected Friedman

Uncorrected Dunn's test	Rank sum diff,	Significant?	Individual P Value
DAY 0			
GEL PL vs. MAP	18	Yes	0,026
MAP			
DAY -1 vs. DAY 1	-12,5	Yes	0,0346
DAY 0 vs. DAY 1	-20	Yes	0,0007
DAY 1 vs. DAY 4	17,5	Yes	0,0031
DAY 1 vs. DAY 8	15	Yes	0,0112
CR RSV			
DAY -1 vs. DAY 1	-16	Yes	0,0068
DAY 1 vs. DAY 8	15	Yes	0,0112

GEL PL			
DAY -1 vs. DAY 1	-15,5	Yes	0,0088
DAY 1 vs. DAY 4	15	Yes	0,0112
DAY 1 vs. DAY 8	15	Yes	0,0112
GEL RSV			
DAY -1 vs. DAY 1	-15	Yes	0,0112
DAY 1 vs. DAY 8	18,5	Yes	0,0018
ME PL			
DAY 4 vs. DAY 8	12	Yes	0,0425
ME RSV			
DAY -1 vs. DAY 1	-16	Yes	0,0068
DAY 0 vs. DAY 1	-14	Yes	0,018
DAY 1 vs. DAY 8	14	Yes	0,018

17.7. pH

17.7.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP	H UNTREATED
Test for normal distribution								
Shapiro-Wilk test								
W	0.8564	0.8700	0.9010	0.8776	0.8329	0.9511	0.9246	0.9216
P value	0.1405	0.1856	0.3373	0.2159	0.0853	0.7396	0.5063	0.4818
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7	7

17.7.2. One-way ANOVA

RM one-way ANOVA ANOVA results	
Table Analyzed	pH DAY 8
Repeated measures ANOVA summary	
Assume sphericity?	No
F	8.641
P value	0.0005
P value summary	***
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
Geisser-Greenhouse's epsilon	0.4868
R squared	0.5902

17.7.3. Uncorrected Fischer's LSD

Για κάθε Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
CR PL vs. ME RSV	-0,2429	-0,4300 to -0,05576	Yes	0,0192
CR PL vs. MAP	-0,1714	-0,3363 to -0,006554	Yes	0,0438
CR PL vs. UNTREATED	0,1557	0,03304 to 0,2784	Yes	0,021
CR RSV vs. GEL RSV	0,1786	0,05948 to 0,2977	Yes	0,0105
CR RSV vs. UNTREATED	0,2943	0,1876 to 0,4009	Yes	0,0005
GEL PL vs. ME RSV	-0,2129	-0,3539 to -0,07182	Yes	0,0102
GEL PL vs. UNTREATED	0,1857	0,1089 to 0,2625	Yes	0,001
GEL RSV vs. ME RSV	-0,2829	-0,5123 to -0,05340	Yes	0,0235
GEL RSV vs. MAP	-0,2114	-0,4128 to -0,01005	Yes	0,0424
ME PL vs. ME RSV	-0,1771	-0,2793 to -0,07503	Yes	0,0054
ME PL vs. UNTREATED	0,2214	0,1501 to 0,2928	Yes	0,0003
ME RSV vs. UNTREATED	0,3986	0,2407 to 0,5565	Yes	0,0008
MAP vs. UNTREATED	0,3271	0,1748 to 0,4795	Yes	0,0019

17.8. Ερυθρότητα υπολογισμένη από την κάμερα Antera®

17.8.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Day -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9037	0.9396	0.9632	0.8441	0.9184	0.9346	0.9586
P value	0.0568	0.6349	0.8459	0.1085	0.4572	0.5910	0.8064
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	19	7	7	7	7	7	7

Day 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8939	0.9230	0.8718	0.8967	0.9524	0.8866	0.8668
P value	0.2958	0.4929	0.1924	0.3117	0.7516	0.2573	0.1741
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8242	0.9540	0.9099	0.9205	0.9762	0.8802	0.9450
P value	0.0705	0.7664	0.3950	0.4732	0.9392	0.2272	0.6838
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9678	0.9907	0.8732	0.8974	0.8454	0.9444	0.9349
P value	0.8825	0.9944	0.1978	0.3153	0.1115	0.6784	0.5936
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Day 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9551	0.9457	0.9626	0.9197	0.9179	0.9083	0.8304
P value	0.7759	0.6905	0.8407	0.4667	0.4529	0.3844	0.0807
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.8.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	HEAMOGLOBIN				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greer**
Time x Column Factor	5.519	0.0602	ns	No	
Time	15.72	<0.0001	****	Yes	0.8049
Column Factor	8.087	0.3055	ns	No	
Subject	45.63	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	0.2151	24	0.008962	F (24, 168) = 1.543	P=0.0602
Time	0.6125	4	0.1531	F (3.220, 135.2) = 26.36	P<0.0001
Column Factor	0.3152	6	0.05253	F (6, 42) = 1.240	P=0.3055
Subject	1.779	42	0.04235	F (42, 168) = 7.289	P<0.0001
Residual	0.9760	168	0.005810		

17.8.3. Uncorrected Fischer's LSD

Για κάθε Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value

CR PL				
DAY-1 vs. DAY 4	-0,1546	-0,2552 to -0,05390	Yes	0,0094
DAY 0 vs. DAY 4	-0,1489	-0,2311 to -0,06658	Yes	0,0044
DAY 4 vs. DAY 8	0,08943	0,01641 to 0,1625	Yes	0,0241
CR RSV				
DAY-1 vs. DAY 1	-0,07571	-0,1392 to -0,01223	Yes	0,0267
DAY-1 vs. DAY 4	-0,2221	-0,2927 to -0,1515	Yes	0,0003
DAY 0 vs. DAY 4	-0,1723	-0,2314 to -0,1132	Yes	0,0004
DAY 0 vs. DAY 8	0,005	-0,1040 to 0,1140	No	0,9143
DAY 1 vs. DAY 4	-0,1464	-0,2082 to -0,08465	Yes	0,0012
DAY 4 vs. DAY 8	0,1773	0,06281 to 0,2918	Yes	0,0091
GEL PL				
DAY-1 vs. DAY 4	-0,1051	-0,2014 to -0,008926	Yes	0,0368
GEL RSV				
DAY-1 vs. DAY 4	-0,1159	-0,2022 to -0,02953	Yes	0,0167
DAY-1 vs. DAY 8	-0,1066	-0,1918 to -0,02139	Yes	0,0222
DAY 0 vs. DAY 4	-0,135	-0,2257 to -0,04433	Yes	0,0108
DAY 0 vs. DAY 8	-0,1257	-0,2119 to -0,03955	Yes	0,0118
ME PL				
DAY-1 vs. DAY 4	-0,1244	-0,2444 to -0,004490	Yes	0,0442
MAP				
DAY-1 vs. DAY 1	-0,1016	-0,1521 to -0,05099	Yes	0,0027
DAY-1 vs. DAY 4	-0,1729	-0,2234 to -0,1223	Yes	0,0002
DAY 0 vs. DAY 1	-0,1159	-0,1914 to -0,04036	Yes	0,0095
DAY 0 vs. DAY 4	-0,1871	-0,2443 to -0,1299	Yes	0,0002
DAY 1 vs. DAY 4	-0,07129	-0,1342 to -0,008390	Yes	0,0323
DAY 1 vs. DAY 8	0,1413	0,08085 to 0,2017	Yes	0,0012
DAY 4 vs. DAY 8	0,2126	0,1140 to 0,3112	Yes	0,0019

Για κάθε Χρονική Στιγμή

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY 0				
ME PL vs. ME RSV	0,08843	0,01931 to 0,1575	Yes	0,0181

ME PL vs. MAP	0,089	0,02166 to 0,1563	Yes	0,017
DAY 4				
CR RSV vs. ME RSV	0,1643	0,01605 to 0,3125	Yes	0,0329
GEL PL vs. ME RSV	0,112	0,004688 to 0,2193	Yes	0,0422
ME RSV vs. MAP	-0,1184	-0,2234 to -0,01341	Yes	0,0305
DAY 8				
GEL RSV vs. MAP	0,1584	0,04560 to 0,2713	Yes	0,0104
ME PL vs. MAP	0,2021	0,05012 to 0,3542	Yes	0,0137

17.9. Τραχύτητα του δέρματος υπολογισμένη από την κάμερα Antera®

17.9.1. Έλεγχοι κανονικότητας

Ημέρα -1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9482	0.9353	0.9609	0.9153	0.9546	0.9391	0.9571
P value	0.7132	0.5970	0.8261	0.4340	0.7711	0.6307	0.7939
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Ημέρα 0

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9416	0.8607	0.9709	0.9329	0.9573	0.8789	0.9642
P value	0.6533	0.1536	0.9052	0.5762	0.7956	0.2216	0.8537
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Ημέρα 1

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.9385	0.9203	0.9168	0.9803	0.8521	0.8806	0.9777
P value	0.6254	0.4718	0.4451	0.9609	0.1284	0.2289	0.9476
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Ημέρα 4

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8848	0.8159	0.9058	0.8967	0.8503	0.9305	0.9015
P value	0.2485	0.0587	0.3675	0.3114	0.1237	0.5552	0.3404
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

Ημέρα 8

Normality and Lognormality Tests Tabular results	A CR PL	B CR RSV	C GEL PL	D GEL RSV	E ME PL	F ME RSV	G MAP
Test for normal distribution							
Shapiro-Wilk test							
W	0.8501	0.9158	0.9645	0.9351	0.9517	0.8807	0.9650
P value	0.1233	0.4378	0.8566	0.5952	0.7451	0.2296	0.8600
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	7	7	7	7	7	7	7

17.9.2. Two Way ANOVA

2way ANOVA ANOVA results					
Table Analyzed	ROUGHNESS				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Assume sphericity?	No				
Alpha	0.05				
Source of Variation	**% of total variation**	**P value**	**P value summary**	**Significant?**	**Geisser-Greenhouse's eps**
Time x Column Factor	6.595	0.3962	ns	No	
Time	11.22	<0.0001	****	Yes	0.7045
Column Factor	3.210	0.7013	ns	No	
Subject	35.37	<0.0001	****	Yes	
ANOVA table	**SS**	**DF**	**MS**	**F (DFn, DFd)**	**P value**
Time x Column Factor	408.5	24	17.02	F (24, 168) = 1.059	P=0.3962
Time	695.1	4	173.8	F (2.818, 118.4) = 10.81	P<0.0001
Column Factor	198.9	6	33.14	F (6, 42) = 0.6352	P=0.7013
Subject	2191	42	52.17	F (42, 168) = 3.246	P<0.0001
Residual	2701	168	16.07		

17.9.3. Uncorrected Fischer's LSD

Για κάθε Σκεύασμα

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
GEL RSV				
DAY -1 vs. DAY 0	4,008	1,227 to 6,790	Yes	0,0124
DAY -1 vs. DAY 8	8,335	3,218 to 13,45	Yes	0,0072
DAY 1 vs. DAY 8	7,83	2,739 to 12,92	Yes	0,0094
DAY 4 vs. DAY 8	4,342	1,654 to 7,031	Yes	0,0075
ME PL				

DAY -1 vs. DAY 0	2,071	0,1390 to 4,003	Yes	0,0394
DAY -1 vs. DAY 8	2,82	0,3513 to 5,289	Yes	0,0314
ME RSV				
DAY -1 vs. DAY 8	6,254	2,231 to 10,28	Yes	0,0089
DAY 0 vs. DAY 1	-1,983	-3,903 to -0,06354	Yes	0,0448
DAY 0 vs. DAY 4	2,257	-2,418 to 6,931	No	0,2822
DAY 0 vs. DAY 8	5,142	1,614 to 8,670	Yes	0,0118
DAY 1 vs. DAY 8	7,125	2,990 to 11,26	Yes	0,0056
DAY 4 vs. DAY 8	2,885	0,9408 to 4,830	Yes	0,011
MAP				
DAY -1 vs. DAY 1	-3,297	-5,646 to -0,9481	Yes	0,0139
DAY -1 vs. DAY 8	4,524	2,237 to 6,810	Yes	0,0029
DAY 0 vs. DAY 8	6,35	2,206 to 10,49	Yes	0,0095
DAY 1 vs. DAY 4	3,146	0,6266 to 5,666	Yes	0,0224
DAY 1 vs. DAY 8	7,82	4,435 to 11,21	Yes	0,0013
DAY 4 vs. DAY 8	4,674	3,142 to 6,207	Yes	0,0003

Για κάθε Χρονική Στιγμή

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Individual P Value
DAY -1				
CR PL vs. GEL RSV	-6,04	-9,349 to -2,730	Yes	0,0022
CR PL vs. ME RSV	-4,758	-8,443 to -1,072	Yes	0,0168
CR RSV vs. GEL RSV	-3,703	-7,153 to -0,2536	Yes	0,0376
GEL PL vs. GEL RSV	-4,951	-9,505 to -0,3962	Yes	0,0357
GEL RSV vs. MAP	4,995	0,4566 to 9,533	Yes	0,0338
DAY 0				
GEL PL vs. ME RSV	-4,185	-8,088 to -0,2817	Yes	0,0378
DAY 1				
GEL PL vs. ME RSV	-5,837	-9,998 to -1,677	Yes	0,0103
DAY 8				
M PL vs. MAP	3,544	0,08474 to 7,003	Yes	0,0454