



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

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**“ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ”**

**Ανάπτυξη Συστημάτων Διαδερμικής Χορήγησης Φαρμακολογικά  
Δραστικών Ουσιών με Ασθενώς Βασικό Χαρακτήρα**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΣ**  
**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**  
**A.M. 160106**

**ΑΘΗΝΑ 2018**

### **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Παρασκευάς Δάλλας (Επιβλέπων)

Επικ. Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Μ. Ρέκκας

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

Μιχαήλ Ράλλης

Επικ. Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας,  
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης “Βιομηχανική Φαρμακευτική” του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μετά το πέρας της εργασίας αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παρασκευά Δάλλα για την ανάθεση του θέματος και την καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Οι πολύτιμες συμβουλές του σε επιστημονικά θέματα που προέκυψαν, όχι μόνο στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποτέλεσαν αποτελεσματικές λύσεις αλλά και αφετηρία για περαιτέρω διερεύνηση και αναζήτηση. Αυτό που αξίζει όμως το μεγαλύτερο ευχαριστώ είναι η εμπιστοσύνη και εκτίμηση που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Ρέκκα για την πολύπλευρη συμβολή του, το υποδειγματικό πνεύμα συνεργασίας, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την εμπιστοσύνη που μου δείχνει έπειτα και από τη συνεργασία μας στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη για το χρόνο που αφιέρωσε, τις πολύτιμες υποδείξεις του αλλά και τη συνεργασία μας στα πλαίσια των επιλογής μαθημάτων “Έλεγχος και Αξιολόγηση Καλλυντικών Προϊόντων” και “Τεχνολογία Καλλυντικών – Κοσμητολογία”.

Τον Καθηγητή κ. Χρήστο Ρέππα για την ανάθεση του θέματος, την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω ένα κομμάτι των μελετών στο εργαστήριο του καθώς και το συνεχές ενδιαφέρον σε όλα τα στάδια της παρούσας εργασίας.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Μαρία Βερτζώνη για τη συνεχή καθοδήγηση της καθώς και για τις εξαιρετικές συμβουλές και γνώσεις που μου προσέφερε σε θέματα ανάλυσης.

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Κωστάκη καθώς και την εργαστηριακή του ομάδα για τη συνεχή επίβλεψη και βοήθεια σε πρακτικά και θεωρητικά ζητήματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Επίσης, για τη βοήθεια στη λήψη και ερμηνεία των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δεμέτζο και τη Μεταδιδάκτωρ κ. Νατάσσα Πίππα για τη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.

Τον κ. Δρ. Αστέριο Πίσπα, Διευθυντή Ερευνών – Ερευνητή Α του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τη βοήθειά του στην πραγματοποίηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης.

Τη Φαρμακοβιομηχανία ELPEN για την ευγενική παροχή των δραστικών ουσιών Α και Β.

Την εταιρία ΥΠΟΛΕΙΨΗ για την οικονομική υποστήριξη κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες που συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια της παρουσίας μου στα εργαστήρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας για το κλίμα αλληλοβοήθειας.

Τέλος, προς τους γονείς μου, τον αδερφό μου Νίκο και τους φίλους μου που μου συμπαραστάθηκαν και με στήριξαν με κάθε μέσο, αποτελώντας πηγή δύναμης όλο αυτό τον καιρό, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου.

*Κωνσταντίνος Γιαννόπουλος  
Αθήνα, Ιούλιος 2018*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> : Εισαγωγή .....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> : Ιστορική Αναδρομή .....	4
2.1 Πριν τον 19 <sup>ο</sup> Αιώνα .....	4
2.2 19 <sup>ο</sup> ς Αιώνας.....	5
2.3 20 <sup>ο</sup> ς Αιώνας.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> : Δομή & Λειτουργία του Δέρματος .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> : Βασικές Αρχές Διαπέρασης Ουσιών από το Δέρμα .....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> : Κινητική Διαδερμικής Απορρόφησης .....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> : Εκτίμηση Ρυθμού Διαδερμικής Διαπερατότητας ΦΔΟ .....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 <sup>ο</sup> : Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Διαδερμική Απορρόφηση .....	19
7.1 Βιολογικοί Παράγοντες.....	19
7.1.1 Ανατομική Θέση .....	19
7.1.2 Ηλικία .....	19
7.1.3 Κατάσταση του Δέρματος – Λειτουργία Φραγμού.....	20
7.1.4 Δέρμα από διαφορετικό φύλο .....	20
7.1.5 Δέρμα από διαφορετικές φυλές.....	20
7.1.6 Δέρμα από διαφορετικά είδη .....	20
7.1.7 Μεταβολισμός .....	21
7.1.8 Ενυδάτωση του Δέρματος – Φαινόμενο Απόφραξης.....	21
7.1.9 Θερμοκρασία.....	21
7.2 Φυσικοχημικοί Παράγοντες .....	22
7.2.1 Μοριακό βάρος & Σχήμα .....	22
7.2.2 Συντελεστής Κατανομής (Partition Coefficient).....	23
7.2.3 Διαλυτότητα & Σημείο Τήξης.....	24
7.2.4 pH – Ιονισμός.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 <sup>ο</sup> : Μέθοδοι Ενίσχυσης της Διαδερμικής Απορρόφησης.....	25
8.1 Αλληλεπιδράσεις ΦΔΟ & Φορέων .....	26
8.1.1 Επιλογή Κατάλληλης ΦΔΟ ή Προφαρμάκου .....	26
8.1.2 Θερμοδυναμική Δραστηριότητα – Φαινόμενο Υπερκορεσμού .....	26
8.1.3 Ιονικά Ζεύγη.....	26
8.1.4 Ευτηκτικά Συστήματα .....	27

8.2 Φορείς & Σωματίδια .....	27
8.2.1 Λιποσώματα & Ανάλογα .....	27
8.2.2 Σωματίδια Υψηλής Ταχύτητας .....	29
8.3 Τροποποίηση Κεράτινης Στοιβάδας .....	30
8.3.1 Ενυδάτωση.....	30
8.3.2 Χημικοί Επιταχυντές Διαβατότητας (Chemical Penetration Enhancers – CPEs) ....	30
8.3.2.1 Τροποποίηση Λιπιδίων – Lipid Modification.....	31
8.3.2.2 Τροποποίηση Πρωτεϊνών – Protein Modification .....	32
8.3.2.3 Βελτίωση Κατανομής – Partitioning Promotion.....	32
8.4 Παράκαμψη ή Αφαίρεση της Κεράτινης Στοιβάδας.....	32
8.4.1 Διάταξη Μικροσκοπικών Βελόνων .....	32
8.4.2 Αφαίρεση Κεράτινης Στοιβάδας.....	33
8.5 Ηλεκτρικά Υποβοηθούμενες Τεχνικές .....	33
8.5.1 Υπέρηχοι (Ultrasound – Phonophoresis – Sonophoresis).....	33
8.5.2 Ιοντοφόρηση (Iontophoresis).....	34
8.5.3 Ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation).....	35
8.5.4 Μαγνητοφόρηση (Magnetophoresis – Magnetoporation) .....	36
8.5.5 Ραδιοκύματα (Radio Waves – Radiofrequency).....	37
8.5.6 Θερμική Απομάκρυνση (Thermal Ablation) .....	38
8.5.7 Φωτομηχανικά Κύματα (Photomechanical Waves – Laser).....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 <sup>ο</sup> : Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης της Διαδερμικής Απορρόφησης .....	40
9.1 Τεχνικές In Vivo .....	40
9.2 Τεχνικές In Vitro.....	42
9.2.1 Επιλογή Κυττάρου Διάχυσης.....	43
9.2.1.1 Στατικό Κύτταρο Διάχυσης (Static Diffusion Cell).....	43
9.2.1.2 Κύτταρο Συνεχόμενης Ροής (Flow-through Cell) .....	44
9.2.2 Επιλογή Μεμβράνης Διάχυσης .....	44
9.2.3 Προετοιμασία Μεμβράνης Διάχυσης.....	45
9.2.4 Επιλογή Διαλύματος Υποδοχέα (Receptor Solution) .....	46
9.2.5 Εφαρμογή Εξεταζόμενης ΦΔΟ .....	47
9.2.6 Επιλογή Χαρακτηριστικών & Συνθηκών Πειράματος .....	47
9.2.6.1 Θερμοκρασία.....	47
9.2.6.2 Χρονική Διάρκεια .....	47

9.2.6.3 Συχνότητα Δειγματοληψίας .....	47
9.2.6.4 Αριθμός Επαναλήψεων .....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 <sup>ο</sup> : Σχεδιασμός Διαδερμικών Θεραπευτικών Συστημάτων.....	49
10.1 Κατηγορίες .....	49
10.2 Βασικά Στοιχεία .....	51
10.2.1 Μεμβράνη Υποστήριξης (Backing Membrane).....	51
10.2.2 Αποσπώμενη Εξωτερική Μεμβράνη (Release Liner).....	51
10.2.3 Μεμβράνη Ελέγχου του Ρυθμού Αποδέσμευσης της ΦΔΟ (Rate-controlling Membrane) .....	51
10.2.4 Πλαστικοποιητής.....	52
10.2.5 Πολυμερή .....	52
10.2.6 Συγκολλητικά .....	52
10.2.6.1 Τύποι Συγκολλητικών .....	54
10.2.6.1.1 Φυσικά Κόμματα.....	54
10.2.6.1.2 Πολυισοβουτυλένια (PIBs) .....	54
10.2.6.1.3 Σιλικονούχα.....	55
10.2.6.1.4 Ακρυλικά .....	56
10.2.6.1.5 Θερμής Τήξης (hot melt PSAs – HMPSAs) .....	57
10.2.7 Αξιολόγηση Ιδιοτήτων Συγκολλητικών .....	57
10.2.7.1 Πρόσφυση (Tack).....	58
10.2.7.2 Αποκόλληση (Peel Adhesion) .....	59
10.2.7.3 Συνεκτική Ισχύς (Cohesive Strength) .....	60
10.3 Χαρακτηριστικά Ιδανικού ΔΘΣ .....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 <sup>ο</sup> : Σκοπός .....	62
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>63</b>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 <sup>ο</sup> : Υλικά, Όργανα & Συσκευές .....	64
12.1 Υλικά.....	64
12.2 Όργανα & Συσκευές.....	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 <sup>ο</sup> : Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης .....	66
13.1 Πειράματα Λήψης Φάσματος Απορρόφησης Δραστικής Ουσίας Β.....	66
13.2 Συνθήκες Ανάλυσης .....	66
13.2.1 Δραστική Ουσία Α .....	66
13.2.2 Δραστική Ουσία Β.....	67
13.3 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος & Κινητής Φάσης.....	67

13.3.1 Δραστική Ουσία Α.....	67
13.3.2 Δραστική Ουσία Β.....	68
13.4 Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων.....	68
13.4.1 Δραστική Ουσία Α.....	68
13.4.2 Δραστική Ουσία Β.....	69
13.5 Έλεγχος Πιθανών Παρεμποδίσεων στις Χρωματογραφικές Κορυφές.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 <sup>ο</sup> : Παρασκευή, Ταυτοποίηση & Αξιολόγηση Σταθερότητας Δραστικής Ουσίας Α.....	71
14.1 Μετατροπή Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α σε Βάση.....	71
14.2 Πειράματα Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	72
14.3 Πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης & Θερμοβαρυστρικής Ανάλυσης.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15 <sup>ο</sup> : Παρασκευή Δραστικής Ουσίας Β.....	74
15.1 Μετατροπή Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Β σε Βάση.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16 <sup>ο</sup> : Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών.....	76
16.1 Προσδιορισμός Κατάλληλου Φορέα.....	76
16.2 Προσδιορισμός Διαλυτότητας Κορεσμού.....	77
16.3 Παρασκευή Γελών.....	78
16.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας Β στις Γέλες.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17 <sup>ο</sup> : Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Drug-in-Adhesive ΔΘΣ Δραστικής Ουσίας Α.....	80
17.1 Προσδιορισμός Ολικών Στερεών Συγκολλητικών.....	80
17.2 Παρασκευή Μειγμάτων Επίστρωσης.....	80
17.3 Εκτέλεση Επιστρώσεων – Δημιουργία ΔΘΣ (Patches).....	81
17.3.1 Τεχνική Regular Patch.....	82
17.3.2 Τεχνική Sandwich Patch.....	83
17.4 Θεωρητικός Προσδιορισμός Μάζας ΔΘΣ.....	83
17.5 Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας Α σε ΔΘΣ.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18 <sup>ο</sup> : In Vitro Πειράματα Διαδερμικής Διαπερατότητας.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19 <sup>ο</sup> : Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας.....	87
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>88</b>
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20 <sup>ο</sup> : Δραστική Ουσία Α.....	89
20.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	89
20.1.1 Καμπύλη Αναφοράς.....	89



20.1.2	Αποτελέσματα Ελέγχου Παρεμποδίσεων στις Χρωματογραφικές Κορυφές.....	89
20.2	Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α .....	90
20.2.1	Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα & Διαλυτότητας Κορεσμού Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α .....	90
20.2.2	Παρασκευή Γελών Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α .....	91
20.2.3	Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α .....	91
20.2.4	Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων .....	92
20.3	Αποτελέσματα Μετατροπής Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α σε Βάση...	93
20.4	Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Δραστικής Ουσίας Α.....	95
20.4.1	Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Α .....	95
20.4.2	Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα Δραστικής Ουσίας Α .....	96
20.4.3	Παρασκευή Γελών Δραστικής Ουσίας Α.....	97
20.4.4	Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Α από Γέλες .....	98
20.4.5	Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων .....	99
20.5	Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Drug-in-Adhesive ΔΘΣ.....	101
20.5.1	Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Ολικών Στερεών Συγκολλητικού ..	101
20.5.2	Παρασκευή Μειγμάτων Επίστρωσης.....	101
20.5.3	Εκτέλεση Επίστρώσεων – Δημιουργία Regular Patches .....	102
20.5.4	Αποτελέσματα Θεωρητικού Προσδιορισμού Μάζας Regular Patches .....	102
20.5.5	Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Regular Patches .....	103
20.5.6	Αποτελέσματα Πειραμάτων Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού .....	103
20.5.7	Αποτελέσματα Πειραμάτων Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης & Θερμοβαρυστρικής Ανάλυσης .....	104
20.5.8	Εκτέλεση Επίστρώσεων – Δημιουργία Sandwich Patches .....	106
20.5.9	Αποτελέσματα Θεωρητικού Προσδιορισμού Μάζας Sandwich Patches.....	106
20.5.10	Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Sandwich Patches .....	107
20.5.11	Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Α από ΔΘΣ .....	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 21 <sup>ο</sup> :	Δραστική Ουσία Β.....	111
21.1	Αποτελέσματα Πειραμάτων Λήψης Φάσματος Απορρόφησης Δραστικής Ουσίας Β	111

21.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	111
21.2.1 Καμπύλη Αναφοράς.....	111
21.2.2 Αποτελέσματα Ελέγχου Παρεμποδίσεων στις Χρωματογραφικές Κορυφές .....	112
21.3 Αποτελέσματα Μετατροπής Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Β σε Βάση.	112
21.4 Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Δραστικής Ουσίας Β.....	113
21.4.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Β .....	113
21.4.2 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα Δραστικής Ουσίας Β .....	114
21.4.3 Παρασκευή Γελών Δραστικής Ουσίας Β.....	115
21.4.4 Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Δραστικής Ουσίας Β στις Γέλες .....	115
21.4.5 Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Β .....	116
21.4.6 Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων .....	117
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ &amp; ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ</b> .....	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 22 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα.....	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 23 <sup>ο</sup> : Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα.....	122
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	123
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	133
<b>ABSTRACT</b> .....	134
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι</b> .....	I.1

# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

---

Γεγονός είναι πως ορισμένες Φαρμακολογικά Δραστικές Ουσίες (ΦΔΟ) έχουν εγγενείς παρενέργειες, οι οποίες δεν μπορούν να εξαλειφθούν σε οποιαδήποτε φαρμακοτεχνική μορφή και αν τις τροποποιήσουμε. Ωστόσο, αρκετές ΦΔΟ παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη οδό χορήγησης. Μια πρόσφατη προσπάθεια εξάλειψης ορισμένων προβλημάτων των παραδοσιακών δοσολογικών μορφών αποτελεί η ανάπτυξη Διαδερμικών Θεραπευτικών Συστημάτων (ΔΘΣ) γνωστά και ως διαδερμικά ή φαρμακευτικά έμπλαστρα (patches).

Η τοπική εφαρμογή φαρμακευτικών σκευασμάτων έχει χρησιμοποιηθεί για αιώνες, κυρίως στη θεραπεία ασθενειών του δέρματος. Η τοπική θεραπεία απαιτεί μόνο η ΦΔΟ να διαπερνά τις εξωτερικές στοιβάδες του δέρματος, για να θεραπεύσει τη νόσο, με την ελπίδα ότι αυτό θα συμβεί με ελάχιστη ή καθόλου εμφάνιση στη συστηματική κυκλοφορία. Τα ΔΘΣ από την άλλη, είναι ειδικά σχεδιασμένα για να επιτυγχάνουν, συστηματικά, συγκέντρωση της ΦΔΟ στη συστηματική κυκλοφορία εντός των θεραπευτικών ορίων μέσω της τοπικής εφαρμογής στην άθικτη επιφάνεια του δέρματος. (Ranade & Cannon, 2011)

Η αποδοχή των ΔΘΣ οφείλεται στα ξεχωριστά πλεονεκτήματα που αυτά διαθέτουν έναντι των παραδοσιακών φαρμακοτεχνικών μορφών και αντίστοιχων οδών χορήγησης. Εκτός από την επιλογή μιας οδού ικανής να αποφύγει τον μεταβολισμό, εξαιτίας του φαινομένου πρώτης διόδου καθώς και το περιβάλλον του γαστρεντερικού (gastrointestinal – GI) συστήματος, τα συστήματα αυτά προσφέρουν το πλεονέκτημα, ότι είναι ευρύτερα αποδεκτά από τους ασθενείς λόγω της ευκολίας και της απλότητας στη χρήση τους, καθώς και της μειωμένης συχνότητας εφαρμογής τους. Η αποδοχή από τον ασθενή οδηγεί στη βελτίωση της συμμόρφωσής του ως προς την τήρηση της αγωγής αλλά και στην καλύτερη παρακολούθηση αυτής από την πλευρά του ιατρού. Επιπλέον, τα ΔΘΣ επιτρέπουν την αποτελεσματική χορήγηση ΦΔΟ τόσο με βραχύ χρόνο ημιζωής όσο και με στενό θεραπευτικό εύρος, ενώ δίνεται η δυνατότητα άμεσης διακοπής της χορήγησης, σε περίπτωση που παρουσιαστεί ερεθισμός ή ευαισθητοποίηση, με την αφαίρεσή τους. (González & Cleary, 2010)

Όπως κάθε φαρμακοτεχνική μορφή όμως που διαθέτει ιδιαίτερη θέση στην ιατρική, έτσι και τα ΔΘΣ παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Σημαντικότερο εξ' αυτών είναι πως δεν αποτελούν επιλογή προς ανάπτυξη για ΦΔΟ που απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις στη συστηματική κυκλοφορία για εμφάνιση θεραπευτικής δράσης. Επιπλέον, αρκετά συχνά παρατηρείται χρόνος υστέρησης (lag time) εμφάνισης της ΦΔΟ στη συστηματική κυκλοφορία εξαιτίας της δυσκολίας διαπέρασης του φραγμού του δέρματος, με αποτέλεσμα η δοσολογική αυτή μορφή να μην αποτελεί επιλογή για μόρια που απαιτείται ταχεία έναρξη δράσης. Έχει παρατηρηθεί επίσης αδυναμία προσκόλλησης ορισμένων ΔΘΣ σε όλους τους τύπους δέρματος, γεγονός που οδηγεί σε ανεπαρκή επίπεδα ΦΔΟ στο αίμα. Η δαπάνη τέλος αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα καθώς η ανάπτυξη ΔΘΣ απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και ακριβά έκδοχα. (Ranade & Cannon, 2011)

Σύμφωνα με τον Αμερικάνικο Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration – FDA) προτείνεται η ανάπτυξη ΔΘΣ ακολουθώντας τις επιταγές της προσέγγισης "Quality by Design – QbD", δηλαδή ποιότητα σε όλα τα στάδια σχεδιασμού και

ανάπτυξης. Τα στάδια αυτά μπορούμε να τα συνοψίσουμε σε ένα χάρτη παραγωγής, όπως φαίνεται ακολούθως: (Bandyopadhyay, 2017)

---

Επιλογή ΦΔΟ
Επιλογή Συγκολλητικού
Αξιολόγηση της δραστηριότητας του Επιταχυντή Διαβατότητας
Επιλογή τύπου ΔΘΣ
Αξιολόγηση Σταθερότητας ως προς Συμβατότητα και Κρυστάλλωση
Δοκιμασίες προσδιορισμού Μηχανικών και Συγκολλητικών
Ιδιοτήτων
Μελέτες Διαπερατότητας με Κύτταρα Διάχυσης και Προκλινικές
Μελέτες σε Ζώα
Μελέτες Εφαρμογής στα πλαίσια Βιοϊσοδυναμίας

---

**Πίνακας 1.1:** Στάδια ανάπτυξης ΔΘΣ (Bandyopadhyay, 2017)

Όπως είναι εμφανές και από τον πίνακα 1.1, κατά την ανάπτυξη ΔΘΣ πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, από επιστήμονες διαφορετικών κλάδων, μια σειρά αλληλένδετων στοιχείων. Αυτά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: τη βιοδραστηριότητα της ΦΔΟ, τα χαρακτηριστικά του δέρματος, τη σύνθεση και τον σχεδιασμό του ΔΘΣ και τέλος τις συγκολλητικές ιδιότητές του. (Poznansky & Juliano, 1984)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: Ιστορική Αναδρομή

---

### 2.1 Πριν τον 19<sup>ο</sup> Αιώνα

Οι τοπικές θεραπείες είναι πολύ πιθανό να έχουν χρησιμοποιηθεί από την απαρχή του ανθρώπινου είδους, ωστόσο η επίσημη εμφάνισή τους γίνεται με την ανακάλυψη γραπτών αρχείων των Σουμερίων (Kramer, 1963).

Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποίησαν έλαια (καστορέλαιο και ελαιόλαδο), ζωικό λίπος, αρώματα (μέντα και δεντρολίβανο), ορυκτά μεταλλεύματα (χαλκού και μολύβδου) και άλλα συστατικά για την παρασκευή καλλυντικών και δερματολογικών προϊόντων, όπως κρέμες, σκευάσματα για τα χείλη και το πρόσωπο και βαφές για τα μαλλιά και τα νύχια. Ο ιδιαίτερα γνωστός Πάπυρος Ebers (1550 π.Χ.), όπου περιγράφονται περισσότερες από 800 συνταγές και περίπου 700 ουσίες που χρησιμοποιούνταν στη θεραπευτική, φαίνεται να είναι το καλύτερο φαρμακευτικό εγχειρίδιο της αρχαιότητας. Ανάμεσα στις συνταγές περιλαμβάνονται ορισμένες για τη θεραπεία δερματικών παθήσεων, όπως εγκαύματα και πληγές, καθώς και για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του δέρματος και του τριχωτού της κεφαλής. Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως η έμφαση στις τοπικές θεραπείες την εποχή εκείνη είναι εμφανής και από την απεικόνιση μιας αίθουσας παρασκευής ημιστερεών φαρμακοτεχνικών μορφών σε μια αιγυπτιακή τοιχογραφία από το 1400 π.Χ.

Περίπου μιάμιση χιλιετία αργότερα, ο Γαληνός (129 – 199 μ.Χ.), Έλληνας γιατρός, εισήγαγε την παρασκευή δοσολογικών μορφών με χρήση βοτάνων και άλλων εκδόχων. Θεωρείται ευρέως ως ο «Πατέρας της Φαρμακευτικής» και οι πρακτικές του είναι γνωστές ως «Γαληνική Φαρμακευτική».

Τα φαρμακευτικά έμπλαστρα, τα οποία εφαρμόζονται στο δέρμα για θεραπεία τοπικών παθήσεων, μπορούν να αναχθούν στην Αρχαία Κίνα, περίπου το 2000 π.Χ., και αποτελούν τους προκατόχους των σημερινών ΔΘΣ. Τα πρώιμα αυτά έμπλαστρα περιείχαν γενικά πολυάριθμα θεραπευτικά βότανα διεσπαρμένα σε μια βάση κόλλας από φυσικό κόμμι, που εφαρμοζόταν σε ένα υπόστρωμα στήριξης κατασκευασμένο από ύφασμα ή χαρτί. Σε αντίθεση με αυτά, τα φαρμακευτικά έμπλαστρα δυτικού τύπου ήταν πολύ απλούστερες συνθέσεις δεδομένου ότι περιείχαν ένα μόνο δραστικό συστατικό. Παραδείγματα αυτών που αναφέρονταν στην Αμερικανική Φαρμακοποιία (United States Pharmacopeia – USP) σχεδόν 70 χρόνια πριν, περιλάμβαναν belladonna ως τοπικό αναλγητικό και σαλικυλικό οξύ ως κερατολυτικό παράγοντα. (Pastore, et al., 2015)

Η ιδέα ότι ορισμένες ΦΔΟ διαπερνούν τις στοιβάδες του δέρματος φαίνεται να αποδίδεται στον Ιμπν Σίνα (980 – 1037 μ.Χ.), Πέρσης ιατροφιλόσοφος γνωστός ως Αβικέννας στον Δυτικό Κόσμο. Στο βιβλίο του, *The Canon of Medicine* (1025 μ.Χ.), πρότεινε πως όταν τοπικά σκευάσματα εφαρμόζονται στο δέρμα, το μαλακό μέρος τους διαπερνά το δέρμα, ενώ το σκληρό μέρος όχι. Συνεχίζοντας τον ισχυρισμό του, τα σκευάσματα αυτά δεν έχουν μόνο τοπική δράση αλλά επηρεάζουν επίσης τους ιστούς που βρίσκονται κάτω από το δέρμα, συμπεριλαμβανομένων των αρθρώσεων (περιφερειακές επιδράσεις), καθώς και περισσότερο απομακρυσμένες περιοχές (συστηματικές επιδράσεις). Μία από τις κυριότερες θεραπείες του Αβικέννα ήταν η χρήση ενός σχηματισμού τύπου γύψου, στον οποίο το θείο αναμειγνυόταν με πίσσα και εφαρμοζόταν στο δέρμα για την αντιμετώπιση της ισχιαλγίας, με ένα κομμάτι χαρτιού ως υπόστρωμα για να διατηρείται στη θέση του. Άλλοι πρόδρομοι των σύγχρονων

τοπικών σκευασμάτων περιλαμβάνουν τις αλοιφές υδραργύρου (Unguentum Hydrargyri) που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία της σύφιλης στα τέλη του 15ου αιώνα (Cole, et al., 1930). Το Unguentum Hydrargyri Fortius L., που αποτελείται από υδράργυρο, λαρδί και χυλό είναι ένα παράδειγμα των παρασκευασμάτων αυτών.

## 2.2 19<sup>ος</sup> Αιώνας

Η πρώτη επίσημη Γερμανική Φαρμακοποιία του 1872 απαριθμεί 28 συνταγές φαρμακευτικών έμπλαστρων. Αυτά περιελάμβαναν κυρίως προϊόντα που προορίζονταν για συστηματική δράση όπως το Emplastrum aromaticum, το οποίο περιείχε μέντα και άλλα αρωματικά έλαια για τη θεραπεία στομαχικών διαταραχών, Emplastrum belladonnae από φύλλα του φυτού *Atropa belladonna* καθώς και Emplastrum conii που περιείχε *Conium maculatum* που χρησιμοποιούνταν στη θεραπεία της φυματίωσης και Emplastrum oriatum το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μείωση των περισταλτικών κινήσεων του στομάχου. Βέβαια, δεν έλειπαν και συνταγές προϊόντων τοπικής χρήσης όπως Emplastrum hydrargyri με υδράργυρο για την αντιμετώπιση τοπικών εξανθημάτων και λοιμώξεων καθώς επίσης Emplastrum picis irritans και Emplastrum fuscum για αντιμετώπιση τοπικών λοιμώξεων. Ωστόσο, αρκετά από αυτά εξαφανίστηκαν με αποτέλεσμα η Γερμανική Φαρμακοποιία II του 1883 να περιλαμβάνει 11 μόνο μονογραφίες φαρμακευτικών εμπλάστρων με κυριότερη αυτή του Leukoplast<sup>®</sup> [BSN Medical (formerly Beiersdorf) Hamburg, Germany], το οποίο εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και σήμερα. (Pastore, et al., 2015)

## 2.3 20<sup>ος</sup> Αιώνας

Ο (Schwenkenbecker, 1904) γενίκευσε τη θεωρία πως το δέρμα είναι σχετικά διαπερατό σε ουσίες διαλυτές σε λιπίδια αλλά όχι σε νερό και ηλεκτρολύτες. Διάφορες περιπτώσεις δηλητηριάσεων, με κυριότερη αυτή ορισμένων παιδιών στις αρχές του 1900 στη Γαλλία, μετά από τοπική εφαρμογή χρωμάτων ανιλίνης σε ρούχα και παπούτσια έθεσαν τις πρώτες βάσεις σχετικά με τη συστηματική απορρόφηση τοπικά εφαρμοζόμενων προϊόντων (The Lancet, 1902) (White, 1909). Στις αρχές του 20ου αιώνα, ακολούθησαν διάφορες in vivo μελέτες, οι οποίες επιβεβαίωσαν τη συστηματική απορρόφηση, μετά από τοπική εφαρμογή, με εκτίμηση των επιπέδων ΦΔΟ στο αίμα, τα ούρα και τα κόπρανα με χρήση αυστηρά ποιοτικών αναλυτικών μεθόδων. Σε άλλες μελέτες βέβαια, χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηριστικά φαρμακολογικά ή φυσιολογικά τελικά σημεία ως ένδειξη εμφάνισης συστατικών από σκευάσματα τοπικής χρήσης στη συστηματική κυκλοφορία (Gemmell & Morrison, 1957). Η εισαγωγή ραδιενεργών ιχνοστοιχείων αποτέλεσε επίσης μια προσέγγιση για τη μελέτη της συστηματικής απορρόφησης μέσω του δέρματος. Σε αντίθεση με τις μεθόδους που περιγράφηκαν νωρίτερα, οι μέθοδοι με ραδιενεργούς ιχνηθέτες επέτρεψαν την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων σε βιολογικά υλικά με τον Jonathan Hadgraft να αναφέρεται ως ένας από τους πρωτοπόρους (Hadgraft, et al., 1956).

Η πρώτη αναφορά κλινικής διαχείρισης μιας συστηματικής πάθησης με τοπική εφαρμογή φαίνεται να είναι το έργο του (Zondek, 1942), περίπου 70 χρόνια πριν. Ισχυρίστηκε λοιπόν πως η χλωροξυλενόλη, μια απολυμαντική ουσία που εξακολουθεί να υπάρχει ακόμη και σήμερα σε αντισηπτικά σαπούνια και διαλύματα (Dettol<sup>®</sup>, Reckitt Benckiser, Slough, Berkshire, UK), θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία ουρογεννητικών λοιμώξεων, όταν εφαρμόζεται τοπικά ως αλοιφή λανολίνης, σε συγκέντρωση 30%. Είναι

ενδιαφέρον ότι η πιθανή διαδερμική απορρόφηση ΦΔΟ που χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό σε διαδερμικά προϊόντα έχει αποδειχθεί πολύ νωρίτερα μέσω ακούσιας τοξικότητας είτε μετά από τοπική έκθεση κατά την παρασκευή ή χρήση των προϊόντων είτε από την ενασχόληση με τη γεωργία. Εξαιρετικό παράδειγμα είναι η νιτρογλυκερίνη, ΦΔΟ που χρησιμοποιείται σε ΔΘΣ για την πρόληψη και τη θεραπεία της στηθάγχης, η οποία πρωτοεμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1900 εξαιτίας σοβαρών πονοκεφάλων που προκαλούσε ως παρενέργεια στους εργαζομένους στην κατασκευή εκρηκτικών (Laws, 1898). Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η νικοτίνη, ΦΔΟ που χρησιμοποιείται για τη διακοπή του καπνίσματος, οι ανεπιθύμητες ενέργειες της οποίας έγιναν εμφανείς μετά από επαφή που σχετίζεται τόσο με τη χρήση του ως εντομοκτόνο όσο και μεταξύ των εργαζομένων που συλλέγουν τα φύλλα καπνού (Faulkner, 1933).

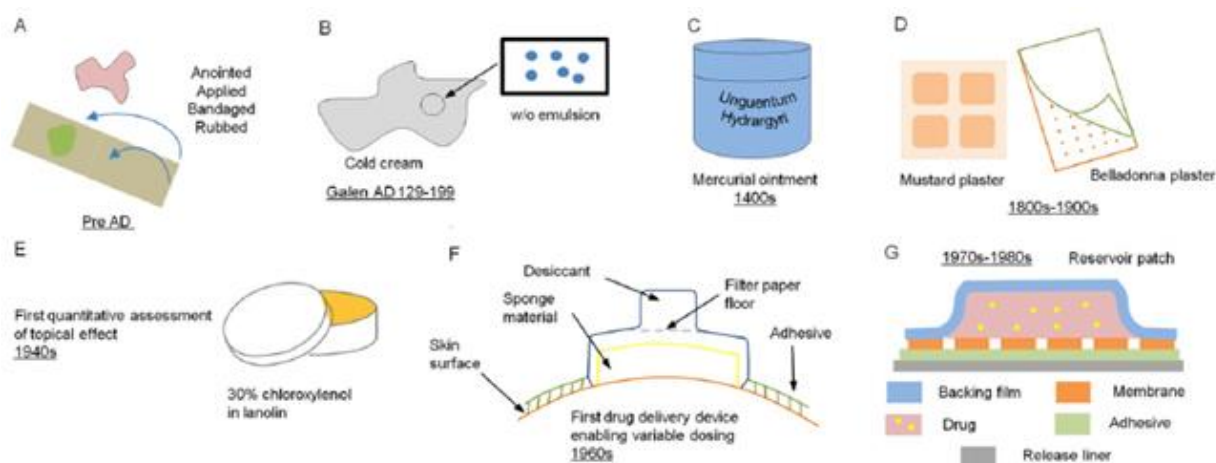
Στην ανάπτυξη σκευασμάτων διαδερμικής χορήγησης με συγκολλητικές ιδιότητες καθοριστική χαρακτηρίζεται η συμβολή του Dale Wurster. Οι έρευνές του συνδέονται άμεσα με καθορισμένο σύστημα χορήγησης ως προς τη δόση, την περιοχή εφαρμογής και το μέσο διασποράς της ΦΔΟ, την ποσοτικοποίηση στα ούρα της πορείας απορρόφησης και την εφαρμογή φαρμακοκινητικών αρχών για τον ποσοτικό προσδιορισμό της προκύπτουσας κινητικής απελευθέρωσης της ΦΔΟ. Στις πρώτες διαδερμικές μελέτες του Wurster, ο φοιτητής του Sherman Kramer κόλλησε ένα τύπο εμπλάστρου που περιείχε καθορισμένη δόση σαλικυλικών εστέρων στον βραχίονα των εθελοντών του και στη συνέχεια προσδιόρισε τη συστηματική τους απορρόφηση μέσω της αποβολής τους στα ούρα. Έφτασε λοιπόν στο συμπέρασμα πως η έκταση της απορρόφησης μπορεί να τροποποιηθεί μεταβάλλοντας την περιοχή εφαρμογής του σκευάσματος και το επίπεδο ενυδάτωσης του δέρματος (Wurster & Kramer, 1961). Το έμπλαστρο αυτό που σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη τους φαίνεται να είναι πρόδρομος αυτών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην έρευνα της διαδερμικής απορρόφησης και θα μπορούσε ακόμη να θεωρηθεί ως ένα πρωτότυπο των σημερινών εμπορικά διαθέσιμων ΔΘΣ. (Roberts, 2013)

Δέκα χρόνια μετά τις πρώτες μελέτες των Wurster και Kramer, κατατέθηκε το πρώτο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον επιχειρηματία βιοχημικό (Zaffaroni, 1971). Αφορούσε ένα ΔΘΣ με μεμβράνη ελέγχου του ρυθμού αποδέσμευσης της ΦΔΟ με στόχο την παρατεταμένη απορρόφηση μέσω του δέρματος και εμφάνιση στη συστηματική κυκλοφορία. Οι (Beckett, et al., 1972) σύγκριναν τη συστηματική απορρόφηση της εφεδρίνης και των αναλόγων αυτής μέσω του δέρματος με εκείνη που επιτυγχάνεται με *per os* χορήγηση. Οδηγήθηκαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση μέσω φαρμακευτικών εμπλάστρων είχε ως αποτέλεσμα μια ελεγχόμενη από την απορρόφηση τελική φάση απομάκρυνσης, το φαρμακοκινητικό φαινόμενο που αναφέρεται ως κινητική «flip-flop». Συνεπώς, παρατηρήθηκε ότι τα φαρμακευτικά έμπλαστρα προσέφεραν τη δυνατότητα διατήρησης σταθερών επιπέδων της ΦΔΟ στο αίμα μετά από τοπική εφαρμογή, με τα επίπεδα να μεταβάλλονται με κατάλληλη τροποποίηση της περιεχόμενης συγκέντρωσης, των συστατικών του σκευάσματος και της περιοχής εφαρμογής. Η ισχύς της ΦΔΟ χαρακτηρίστηκε επίσης ως σημαντικός θεραπευτικός δείκτης δεδομένου ότι θα πρέπει να επιτευχθούν θεραπευτικά επίπεδα στο αίμα για να υπάρξει ανάλογη φαρμακολογική δράση (Riegelman, 1974). Το επόμενο βήμα στην ανάπτυξη λειτουργικών διαδερμικών σκευασμάτων πραγματοποιήθηκε από τους (Michaels, et al., 1975). Χρησιμοποιώντας κύτταρα διάχυσης εφοδιασμένα με μεμβράνες νεκρού ανθρώπινου δέρματος παρουσίασαν δεδομένα *in vitro* ροών (flux) μιας σειράς από δέκα ΦΔΟ που θεωρούσαν ότι



έχουν τη δυνατότητα να χορηγηθούν διαδερμικά. Από τις ΦΔΟ αυτές, η σκοπολαμίνη, η νιτρογλυκερίνη, η οιστραδιόλη και η φαιντανύλη έχουν αναπτυχθεί σε ΔΘΣ που διατίθενται στο εμπόριο.

Η σκοπολαμίνη ήταν η πρώτη για την οποία μελετήθηκε ο μηχανισμός διαπέρασης της κεράτινης στοιβάδας. Η έρευνα αυτή κορυφώθηκε με την ανάπτυξη από την εταιρία Alza Corporation ενός ΔΘΣ με εφαρμογή στην περιοχή πίσω από το αυτί για την πρόληψη και τη θεραπεία της ναυτίας των ταξιδιωτών, σχεδιασμένο να παρέχει ελεγχόμενη χορήγηση σκοπολαμίνης μέσω του δέρματος (Shaw, et al., 1976). Το ΔΘΣ αυτό είχε δεξαμενή φαρμάκου και μικροπορώδη μεμβράνη, η οποία θα ήλεγχε τη χορήγηση της ΦΔΟ. Ακολούθησαν μελέτες αρχικά σε εργαζόμενους της εταιρίας και έπειτα σε ανθρώπους που συμμετείχαν σε αποστολές της American Spacelab, οι οποίες απέδειξαν την αποτελεσματικότητα του φαρμακευτικού εμπλάστρου. Το 1979 λοιπόν, ένα 2,5 cm<sup>2</sup> ΔΘΣ που ήταν προγραμματισμένο να παρέχει 1,5 mg σκοπολαμίνης σε διάστημα 3 ημερών (Transderm Scop<sup>®</sup>, Novartis Consumer Health, Parsippany, NJ, ΗΠΑ) αποτέλεσε το πρώτο patch που κυκλοφόρησε στην αμερικανική αγορά.



**Σχήμα 2.1:** Ιστορική εξέλιξη των ΔΘΣ (Pastore, et al., 2015) – A: Τύπος εμπλάστρου από την π.Χ. εποχή, B: Cold cream "Κρύα κρέμα" του Γαληνού, C: Αλοιφή υδραργύρου, D: Έμπλαστρα με μουστάρδες ή atropa belladonna, E: Αλοιφή χλωροξυλενόλης (30%) σε λανολίνη – Πρώτη συστηματική χορήγηση με τοπική εφαρμογή (Zondek, 1942), F: Τύπος εμπλάστρου των (Wurster & Kramer, 1961) – Πρόδρομος σημερινών ΔΘΣ, G: Πρώτο ΔΘΣ – Σύστημα δεξαμενής σκοπολαμίνης

Ακολούθησαν αρκετές βιομηχανίες, οι οποίες έδειξαν ενδιαφέρον για την αγορά των ΔΘΣ με αποτέλεσμα να μελετηθούν αρκετές ακόμη ΦΔΟ ως πιθανοί υποψήφιοι και να αναπτυχθούν πιο εξελιγμένοι τύποι συγκριτικά με τα πρόδρομα συστήματα δεξαμενής, οι οποίοι θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο. Έτσι, οδηγούμαστε στη σημερινή εποχή όπου περισσότερες από 20 διαφορετικές ΦΔΟ σε πάνω από 40 ξεχωριστά ΔΘΣ έχουν αδειοδοτηθεί και κυκλοφορούν στην αγορά. Παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων φαίνονται στον πίνακα 2.1.

Έτος	Δραστική Ουσία	Εμπορικό Προϊόν
1979	Σκοπολαμίνη	Transderm-Scop <sup>®</sup>
1981	Νιτρογλυκερίνη	Nitro-Dur <sup>®</sup>
1984	Κλονιδίνη	Catapres-TTS <sup>®</sup>
1986	Οιστραδιόλη	Estraderm <sup>®</sup>
1990	Φαιντανύλη	Durogesic <sup>®</sup>
1991	Νικοτίνη	Nicoderm <sup>®</sup>
1993	Τεστοστερόνη	Testoderm <sup>®</sup>
1996	Λιδοκαΐνη / Επινεφρίνη	Iontocaine <sup>®</sup>
1998	Οιστραδιόλη / Νοραιθινδρόνη	CombiPatch <sup>®</sup>
1999	Λιδοκαΐνη	Lidoderm <sup>®</sup>
2001	Αιθινυλοιστραδιόλη / Νορελγεστρομίνη	Ortho Evra <sup>®</sup>
2003	Οιστραδιόλη / Λεβονοργεστρέλη	Climara Pro <sup>®</sup>
2003	Οξυβουτυνίνη	Oxytrol <sup>®</sup>
2005	Λιδοκαΐνη / Τετρακαΐνη	Synera <sup>®</sup>
2006	Μεθυλφαινιδάτη	Daytrana <sup>®</sup>
2006	Σελεγγιλίνη	Emsam <sup>®</sup>
2007	Επολαμίνη δικλοφενάκης	Flector <sup>®</sup>
2007	Ριβαστιγμίνη	Exelon <sup>®</sup>
2008	Γρανισετρόνη	Sancuso <sup>®</sup>
2009	Καψαϊκίνη	Qutenza <sup>®</sup>
2010	Βουπρενορφίνη	Butrans <sup>®</sup>
2012	Ροτιγοτίνη	Neupro <sup>®</sup>
2013	Σουματριπτάνη	Zecuity <sup>®</sup>

Πίνακας 2.1: Εγκεκριμένες ΦΔΟ από τον FDA σε ΔΘΣ (Miller, 2012) (Watkinson, 2012)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>: Δομή & Λειτουργία του Δέρματος

Το ανθρώπινο δέρμα είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο όργανο που έχει σχεδιαστεί, για να "κρατάει το εξωτερικό έξω και τα εσωτερικά μέσα". Είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 10% της συνολικής μάζας και καλύπτει μια περιοχή περίπου 1,8 m<sup>2</sup>. Οι πιο σημαντικές λειτουργίες του είναι: (Hadgraft, 2004)

- Ελαχιστοποίηση της ακούσιας απώλειας νερού, σε επίπεδα περίπου 1 mg/cm<sup>2</sup>/h, και ηλεκτρολυτών
- Προστασία μέσω της χρωστικής του, της μελανίνης, από τη βλαπτική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας
- Ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος
- Προστασία, ως αδιαπέραστος φραγμός, έναντι εξωτερικών μικροβιακών, φυσικών και χημικών παραγόντων καθώς και παθογόνων

Το ανθρώπινο δέρμα είναι πολυεπίπεδο καθώς αποτελείται από την επιδερμίδα (epidermis) και το υποκείμενο χόριο συνδετικού ιστού, γνωστό και ως δερμίδα (dermis), με πάχος 1 – 3 mm κάτω από το οποίο βρίσκεται μια λιπαρή υποδόρια στοιβάδα. Η επιδερμίδα με τη σειρά της αποτελείται από πέντε ξεχωριστές και ευδιάκριτες στοιβάδες οι οποίες περιλαμβάνουν τέσσερα είδη κυττάρων (Langerhans, Merckel, Μελανοκύτταρα και Κερατινοκύτταρα), καθώς επίσης μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών και καταβολικών ενζύμων (εστεράσες, φωσφατάσες, πρωτεάσες, νουκλεοτιδάσες και λιπάσες). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.1, οι στοιβάδες είναι γνωστές ως: (Murthy & Shivakumar, 2010)

- Βασική (Stratum Basale)
- Ακανθωτή (Stratum Spinosum)
- Κοκκιώδης (Stratum Granulosum)
- Διαυγής (Stratum Lucidum)
- Κεράτινη (Stratum Corneum)

Στη βιβλιογραφία (Schaefer, et al., 2008) οι τέσσερις στοιβάδες, χωρίς την κεράτινη, αναφέρονται ως ζώσα επιδερμίδα (viable epidermis). Η διαυγής εντοπίζεται αποκλειστικά στα πέλαμα και τις παλάμες και συχνά θεωρείται ότι δεν είναι λειτουργικά και μορφολογικά ξεχωριστή από την κεράτινη στοιβάδα, αλλά πως αποτελεί ένα στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης. Σε φυσιολογικό δέρμα, χρειάζονται περίπου 14 ημέρες για ένα θυγατρικό κύτταρο της βασικής στοιβάδας, που περιέχει οργανίδια όπως μιτοχόνδρια και ριβοσώματα, να μεταναστεύσει και να διαφοροποιηθεί σε απύρηνο, πεπλατυσμένο κερατινοκύτταρο. Αυτό με τη σειρά του συγκρατείται στην κεράτινη στοιβάδα για ακόμη 2 εβδομάδες προτού υποστεί απόπτωση. Παρόλο που η διαδικασία της μίτωσης πραγματοποιείται αποκλειστικά στη βασική στοιβάδα, η ακανθωτή και η κοκκιώδης είναι και αυτές μεταβολικά ενεργές. Η κεράτινη στοιβάδα τυπικά περιλαμβάνει 10 έως 20 κυτταρικά στρώματα με συνολικό πάχος 10 – 25 μm, ενώ μπορεί να διογκωθεί σε μεγάλο βαθμό όταν ενυδατωθεί. Η δομή της μπορεί να περιγραφεί ως “ένας τοίχος που αποτελείται από τούβλα και λάσπη” (brick and mortar wall model). Στο μοντέλο αυτό τα “τούβλα” αντιστοιχούν στα κερατινοκύτταρα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με τα δεσμοσώματα και αποτελούν το 90% του βάρους της στοιβάδας, και η “λάσπη”

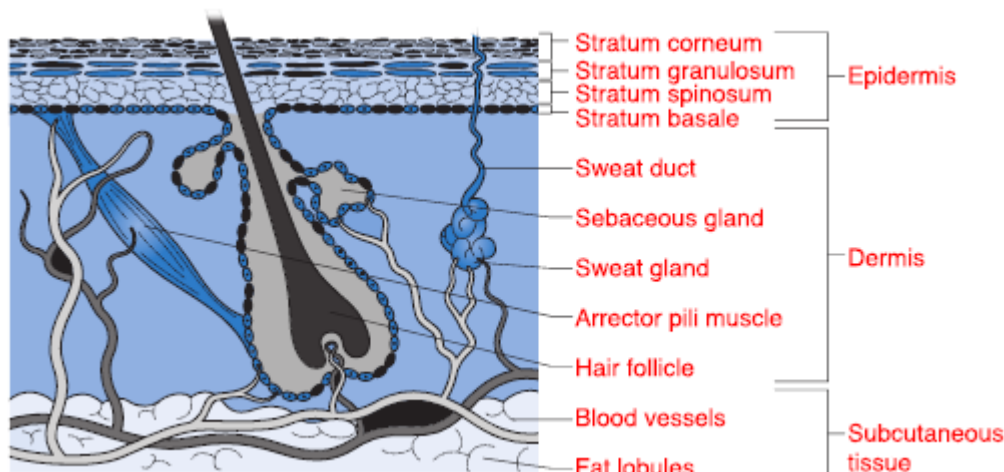
στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες που αποτελούνται από χοληστερόλη, κεραμίδια, λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια (Hadgraft & Lane, 2011).

Το χόριο από την πλευρά του βρίσκεται κάτω από τη δερμο-επιδερμική ένωση και αποτελείται από δυο στοιβάδες, τη θηλώδη και τη δικτυωτή στις οποίες περιέχονται κολλαγόνο, ελαστίνη, ρετικουλίνη, θεμέλια ουσία, ινοβλάστες, ιστοκύτταρα και μακροφάγα. Η αποβολή τοξινών και προϊόντων μεταβολισμού καθώς και η στήριξη και θρέψη της επιδερμίδας μέσω της σύνδεσής της με τον υποδόριο ιστό (subcutaneous tissue) αποτελούν τις λειτουργίες του χόριου, μέσα στο οποίο εντοπίζονται αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, νεύρα και αισθητήριες απολήξεις. (Moss, 2015)

Παρόλη όμως την πλούσια αυτή δομή και οργάνωση, η κεράτινη στοιβάδα αλλά και γενικότερα όλο το δέρμα μπορούν να καταστραφούν σχετικά εύκολα με μηχανική, χημική ή μικροβιολογική επίδραση καθώς και με ακτινοβολία, όπως συμβαίνει στα ηλιακά εγκαύματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, περιορίζεται η λειτουργία φραγμού με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας εξωτερικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων και ΦΔΟ. (Williams, 2013)

Ιδιαίτερα σημαντικούς ρόλους επίσης εξυπηρετούν τα εξαρτήματα του δέρματος, δηλαδή οι σμηγματογόνοι (sebaceous), αποκρινείς και εκκρινείς – ιδρωτοποιοί (sweat) αδένες καθώς επίσης οι τρίχες και οι όνυχες. Οι αποκρινείς αδένες βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις του σώματος, όπως οι μασχάλες και η ηβική περιοχή, ενώ οι ιδρωτοποιοί αδένες βρίσκονται στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του σώματος σε πυκνότητα 100 – 200 αδένων ανά  $cm^2$ . Όταν διεγείρονται, εξαιτίας θερμοκρασίας ή συναισθηματικού στρες, εκκρίνουν ιδρώτα ο οποίος είναι ένα αραιό διάλυμα άλατος με  $pH \approx 5$  που ευθύνεται για τη χαρακτηριστική μυρωδιά του σώματος μετά τον μεταβολισμό του από βακτήρια της επιφάνειας του δέρματος. (Williams, 2013)

Οι τρίχες με τους θύλακές τους (hair follicle), οι οποίες σχηματίζονται από συμπιεσμένες πλάκες κερατινοκυττάρων με τη μορφή επιδερμικών κοιλοτήτων, αποτελούν τα μεγαλύτερα εξαρτήματα του δέρματος, σε συνδυασμό με τους σμηγματογόνους αδένες. Αυτοί με τη σειρά τους εκκρίνουν σκουαλένιο, λιπαρά οξέα, κηρούς, τριγλυκερίδια και χοληστερόλη, συστατικά δηλαδή που συνθέτουν το σμήγμα. Λιπαίνουν με αυτό τον τρόπο την επιφάνεια του δέρματος και συμβάλλουν στη διατήρηση του φυσιολογικού pH. Το δέρμα έχει τυπικά 50 – 100 θύλακες τριχών ανά  $cm^2$  αλλά οι περιοχές που φέρουν τη διαυγή στοιβάδα, παλάμες και πέλματα δηλαδή, καθώς και τα χείλη είναι σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό απαλλαγμένες.



Σχήμα 3.1: Δομή και εξαρτήματα ανθρώπινου δέρματος (Williams, 2013)

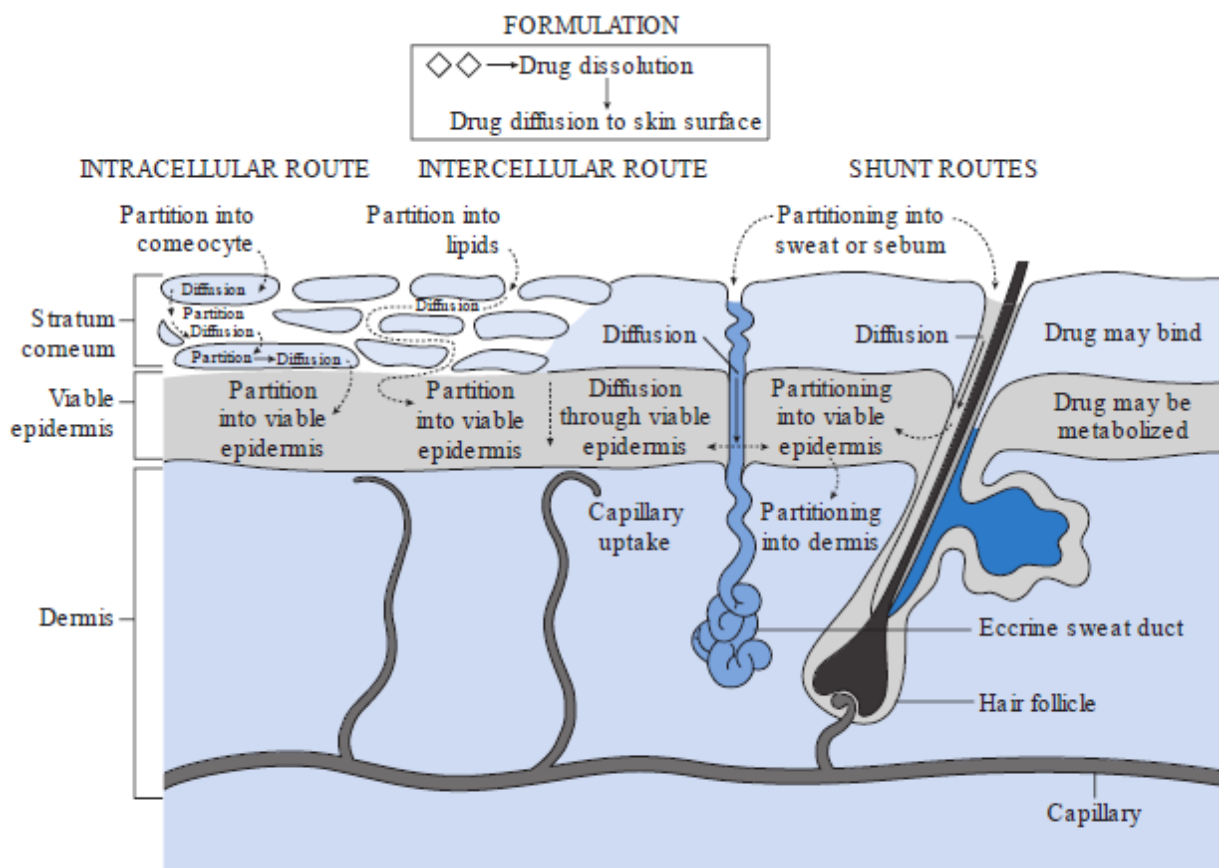
Τέλος, τα νύχια αποτελούνται από πεπλατυσμένα, κερατινοποιημένα κύτταρα συντηγμένα σε μια πυκνή και σκληρή, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας σε θείο με τη μορφή κυστίνης, αλλά ελαφρώς ελαστική πλάκα. Το πάχος τους κυμαίνεται από 0,5 έως 1,0 mm ενώ η συνολική περιεκτικότητα τους σε λιπίδια, σε αντίθεση με την κεράτινη στοιβάδα, κυμαίνεται μεταξύ 0,1 – 1%. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε νερό είναι μόνο 7 – 12%, σε σύγκριση με 25% στην κεράτινη στοιβάδα. (Schaefer, et al., 2008)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: Βασικές Αρχές Διαπέρασης Ουσιών από το Δέρμα

Σύμφωνα με τα όσα έχουν ήδη αναφερθεί η διαδερμική απορρόφηση, διαπέραση ή μεταφορά μπορεί να οριστεί ως το φαινόμενο της παθητικής διάχυσης μιας ουσίας από την επιφάνεια του δέρματος, μέσω των διάφορων στοιβάδων του ή των εξαρτημάτων του, στη συστηματική κυκλοφορία. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι η διεργασία αυτή είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη.

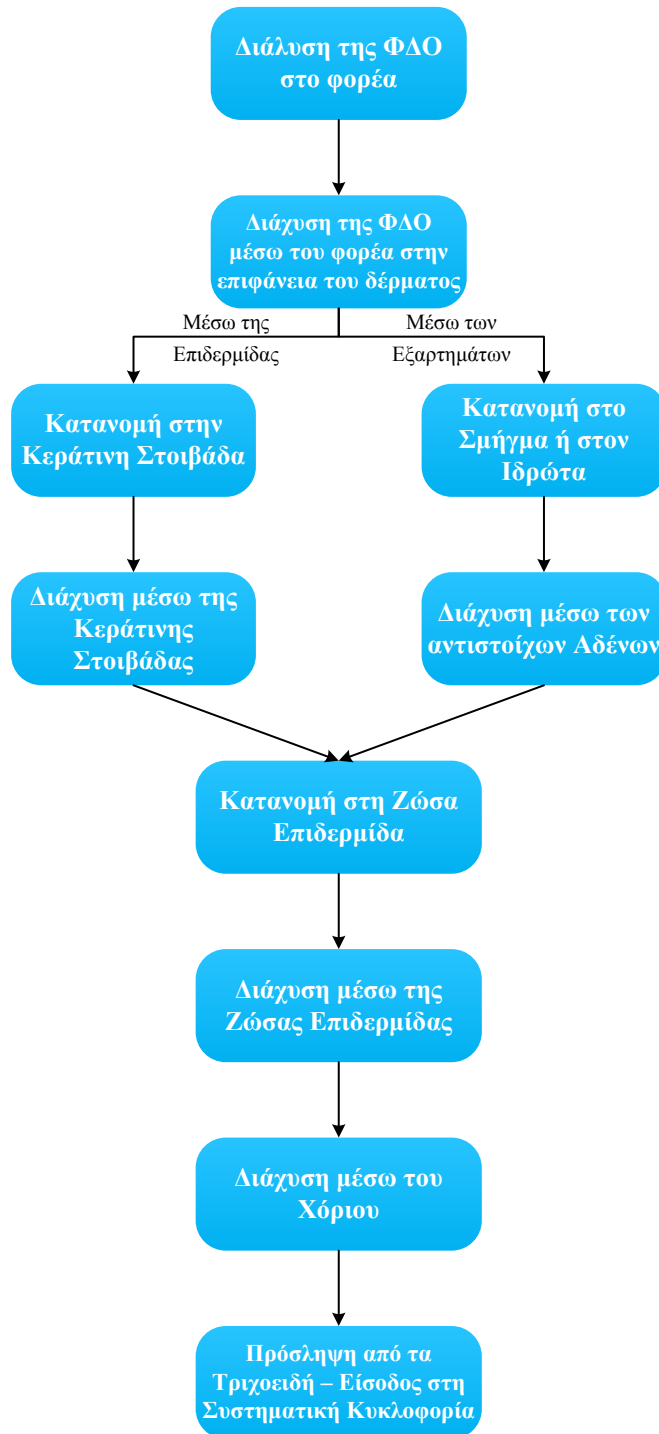
Οι μηχανισμοί μεταφοράς με τους οποίους οι διάφορες ουσίες, όπως οι φαρμακολογικά δραστικές, διασχίζουν το άθικτο δέρμα δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, έχει επιβεβαιωθεί πως η ενεργός μεταφορά εμφανίζει περιορισμένο ρόλο. Όσον αφορά τις πιθανές διαδρομές, αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν: (Barry, 2002)

- Τη διαδερμική οδό, όπου η ΦΔΟ αρχικά κατανέμεται στην επιφάνεια της επιδερμίδας, την κεράτινη στοιβάδα δηλαδή, και ακολουθεί διάχυση διαμέσου είτε του συμπλέγματος πρωτεϊνών – λιπιδίων (intracellular route) είτε των λιπιδικών διπλοστοιβάδων (intercellular route).
- Τους θύλακες των τριχών, τους σμηγματογόνους και ιδρωτοποιούς αδένες (εξαρτήματα του δέρματος – shunt routes), όπου η ΦΔΟ αρχικά κατανέμεται στο σμήγμα (sebum) ή στον ιδρώτα (sweat) και ακολουθεί διάχυση διαμέσου των αντίστοιχων αδένων (Otberg, et al., 2004).



Σχήμα 4.1: Μηχανισμοί και στάδια μεταφοράς ΦΔΟ μέσω του δέρματος (Williams, 2013)

Στη συνέχεια, και στις δύο πιθανές διαδρομές, η ΦΔΟ κατανέμεται στην περισσότερο υδρόφιλη ζώνσα επιδερμίδα και διαμέσου των κυττάρων αυτής και του χόριου εισέρχεται στα τριχοειδή που με τη σειρά τους θα τη μεταφέρουν στη συστηματική κυκλοφορία, όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 4.2. Βέβαια, υπάρχει το ενδεχόμενο είτε λόγω σύνδεσης με συστατικά της επιδερμίδας είτε εξαιτίας της μεταβολικής δραστηριότητας του δέρματος από τις περιεχόμενες εστεράσες, πεπτιδάσες και υδρολάσες, να μειωθεί η βιοδιαθεσιμότητα διαδερμικά χορηγούμενων ΦΔΟ. (Bolzinger, et al., 2012)



Σχήμα 4.2: Στάδια απορρόφησης ΦΔΟ μέσω του δέρματος (Flynn, 2002)

Λαμβάνοντας υπόψη τις διεργασίες που περιγράφηκαν, είναι προφανές πως οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ΦΔΟ θα καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό τη μεταφορά της μέσω του δέρματος. Σε όλες τις περιπτώσεις, για να καταλήξουν τα μόρια της ΦΔΟ στη συστηματική κυκλοφορία θα πρέπει να κατανεμηθούν και να διαχυθούν τόσο μέσω λιπόφιλου όσο και μέσω υδρόφιλου περιβάλλοντος. Παρόλο που οι λιπόφιλες ΦΔΟ θεωρούνται συνήθως ως καλύτεροι υποψήφιοι για διαδερμική χορήγηση συγκριτικά με τις υδρόφιλες, η υψηλή λιποφιλία αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την κάθαρση από τον οργανισμό. (Ramteke, et al., 2012)

Το μοριακό βάρος επηρεάζει επίσης δραματικά τη μεταφορά μέσω του δέρματος. Το δέρμα έχει σχεδιαστεί, για να λειτουργεί ως φραγμός στις εξωτερικές ουσίες και έτσι αποτρέπει την είσοδο μεγάλων μορίων, όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες. Δεν αποτελεί όμως μόνο το μοριακό βάρος σημαντικό παράγοντα, αλλά και η μοριακή δομή καθώς μπορεί να επηρεάσει την έκταση της σύνδεσης με τα συστατικά του δέρματος και επομένως τη βιοδιαθεσιμότητα.

Από όλα τα παραπάνω προκύπτει πως το εύρος των ΦΔΟ που μπορούν να χορηγηθούν διαδερμικά και να επιτύχουν θεραπευτικά επίπεδα στη συστηματική κυκλοφορία είναι αρκετά περιορισμένο. Μερικοί γενικοί κανόνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προβλεφθεί εάν η διαδερμική χορήγηση είναι βιώσιμη για μια ΦΔΟ, περιλαμβάνουν: (Williams, 2013)

- Το μοριακό βάρος, ιδανικά, θα πρέπει να είναι μικρότερο από 500 Da, αν και η αποτελεσματική χορήγηση μεγαλύτερων ουσιών μπορεί να είναι εφικτή στην περίπτωση που η θεραπευτική δόση είναι αρκετά χαμηλή
- Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού ( $\text{Log}P_{\text{Water}}^{\text{Octanol}}$ ) θα πρέπει να είναι 1 – 3
- Η θεραπευτική δόση θα πρέπει να είναι μικρότερη από 10 mg/ημέρα ώστε να επιτρέπει την κατασκευή ΔΘΣ κατάλληλων διαστάσεων (< 40 cm<sup>2</sup>)
- Το σημείο τήξης δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τους 200°C
- Ο χρόνος ημιζωής ( $t_{1/2}$ ) θα πρέπει να είναι μικρότερος από 10 h
- Δεν θα πρέπει να προκαλεί ερεθισμό ή ευαισθητοποίηση του δέρματος



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: Κινητική Διαδερμικής Απορρόφησης

Η διάχυση είναι μια διαδικασία μαζικής μεταφοράς μεμονωμένων μορίων μιας ουσίας, η οποία προκαλείται από τυχαία μοριακή κίνηση και συνδυάζεται με βαθμιδωτή συγκέντρωση. Η διέλευση μιας ουσίας διαμέσου ενός φραγμού, όπως είναι το δέρμα, συμβαίνει με απλή μοριακή διαπέραση ή με κίνηση μέσω πόρων και καναλιών. Στην περίπτωση του δέρματος, παρόλο που η ζώσα επιδερμίδα, το χόριο και ο υποδόριος ιστός έχουν ξεχωριστούς συντελεστές διάχυσης, αντιπροσωπεύονται από έναν και μόνο καθώς θεωρούνται αμελητέοι συγκριτικά με αυτόν της κεράτινης στοιβάδας. (Moss, et al., 2015)

Η συνολική αντίσταση λοιπόν του δέρματος στη διάχυση ΦΔΟ, αποκλειστικά παθητική καθώς στερείται φορέων ενεργού μεταφοράς, αποδίδεται στην κεράτινη στοιβάδα. Ως εκ τούτου, ο πρώτος νόμος διάχυσης του Fick μπορεί να εφαρμοστεί:

$$J = -D \times \frac{\delta C}{\delta x} \quad (\text{Εξίσωση 5.1})$$

όπου J είναι η ροή (flux), ο ρυθμός μεταφοράς δηλαδή ανά μονάδα εμβαδού της επιφάνειας ( $g/cm^2/sec$ ), C η συγκέντρωση της ΦΔΟ που διαχέεται ( $g/cm^3$ ), x η απόσταση της κίνησης κάθετα στην επιφάνεια του δέρματος (cm) και D ο συντελεστής διάχυσης της ΦΔΟ ( $cm^2/sec$ ). Το αρνητικό πρόσημο είναι ενδεικτικό πως η ροή των μορίων γίνεται προς την κατεύθυνση της μικρότερης συγκέντρωσης. Στην περίπτωση μιας τοπικά εφαρμοζόμενης ΦΔΟ, η κατεύθυνση της διάχυσης είναι από την εξωτερική επιφάνεια του δέρματος προς τις εσωτερικές στοιβάδες ή τη συστηματική κυκλοφορία.

Εφαρμόζοντας τον δεύτερο νόμο διάχυσης του Fick, γίνεται εμφανές πως ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης της ΦΔΟ με τον χρόνο σε ένα σημείο εντός του τμήματος, όπου πραγματοποιείται η διάχυση είναι ανάλογη με τον ρυθμό μεταβολής της κλίσης της συγκέντρωσης στο σημείο αυτό. (Sinko, 2011)

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \times \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad (\text{Εξίσωση 5.2})$$

Εάν τώρα η αθροιστική ποσότητα (Q) της ΦΔΟ ανά μονάδα εμβαδού επιφάνειας (A), που εφαρμόζεται σε άπειρη (infinite) δόση και διαπερνά το δέρμα, σχεδιαστεί συναρτήσει του χρόνου τότε λαμβάνεται το προφίλ διαπερατότητάς της, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.1 (Αριστερά). Παρατηρώντας το διάγραμμα, μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα η γραφική παράσταση προσεγγίζει ευθεία γραμμή και από την κλίση της βρίσκουμε την τιμή της ροής σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state flux –  $J_{ss}$ ), ενώ από την επέκτασή της στον οριζόντιο άξονα προκύπτει ο χρόνος υστέρησης (lag time – L). Αξίζει να σημειωθεί, ο χρόνος υστέρησης μπορεί να λάβει και αρνητική τιμή στις περιπτώσεις που η υπό μελέτη σύνθεση παρουσιάζει burst effect. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, η εξίσωση 5.2 του δεύτερου νόμου του Fick μπορεί να απλουστευθεί:

$$J_{ss} = \frac{Q}{A \times t} = D \times \frac{C_0}{h} \quad (\text{Εξίσωση 5.3})$$

όπου  $J_{ss}$  είναι η αθροιστική ποσότητα (Q) της ΦΔΟ που διαπερνά τη μεμβράνη ανά μονάδα εμβαδού (A) σε χρόνο t,  $C_0$  είναι η συγκέντρωση της ΦΔΟ στο πρώτο στρώμα της μεμβράνης, στην κεράτινη στοιβάδα δηλαδή που βρίσκεται σε επαφή με τη σύνθεση στο διαμέρισμα του δότη, και h το πάχος της μεμβράνης (cm). Επιπλέον, προκύπτει πως ο χρόνος υστέρησης

μπορεί να προσδιοριστεί πειραματικά και συνδέεται με τον συντελεστή διάχυσης με την εξίσωση: (Neumann, 2008)

$$L = \frac{h^2}{6D} \quad (\text{Εξίσωση 5.4})$$

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι δύσκολος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης  $C_0$  της ΦΔΟ. Αυτό όμως δεν αποτελεί πρόβλημα καθώς η συγκέντρωση στο διαμέρισμα του δότη, που ορίζεται ως  $C_v$ , μπορεί να προσδιοριστεί αρκετά εύκολα και συνδέεται με τη  $C_0$  μέσω της εξίσωσης:

$$P = \frac{C_0}{C_v} \rightarrow C_0 = P \times C_v \quad (\text{Εξίσωση 5.5})$$

όπου  $P$  είναι ο συντελεστής κατανομής της ΦΔΟ μεταξύ της σύνθεσης στο διαμέρισμα του δότη και της κεράτινης στοιβάδας. Από το συνδυασμό των εξισώσεων 5.3 και 5.5, προκύπτει:

$$J_{ss} = D \times P \times \frac{C_v}{h} \quad (\text{Εξίσωση 5.6})$$

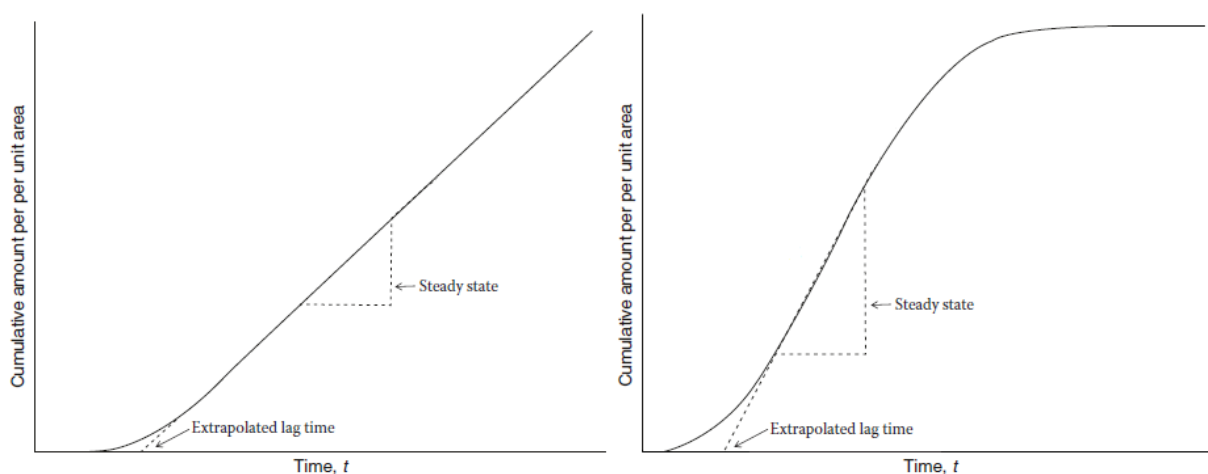
Ωστόσο, γεγονός αποτελεί πως η εκτίμηση του πάχους της μεμβράνης δεν είναι ιδιαίτερα εύκολη υπόθεση. Για να αρθεί λοιπόν η δυσκολία αυτή χρησιμοποιείται μια σύνθετη παράμετρος, ο συντελεστής διαπερατότητας  $k_p$ , που δίνεται από την εξίσωση:

$$k_p = P \times \frac{D}{h} \quad (\text{Εξίσωση 5.7})$$

Συνδυάζοντας λοιπόν τις εξισώσεις 5.6 και 5.7, λαμβάνεται μια νέα πιο απλουστευμένη: (Mitragotri, et al., 2011)

$$J_{ss} = K_p \times C_v \quad (\text{Εξίσωση 5.8})$$

Όπως ήδη αναφέρθηκε, όλα τα παραπάνω ισχύουν στην περίπτωση που η συγκέντρωση της ΦΔΟ στη σύνθεση στο διαμέρισμα του δότη παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια του πειράματος, εφαρμόζεται δηλαδή στο δέρμα σε άπειρη δόση. Στην περίπτωση όμως που η εφαρμογή της ΦΔΟ γίνεται σε πεπερασμένη (finite) δόση, όπως η εφαρμογή μικρής ποσότητας γέλης ή κρέμας, τότε η ΦΔΟ που έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του δέρματος μειώνεται με την εξέλιξη του χρόνου. Το προφίλ διαπερατότητας επομένως θα μοιάζει με αυτό που απεικονίζεται στο σχήμα 5.1 (Δεξιά), όπου η ροή αρχικά αυξάνεται μέχρι μια μέγιστη τιμή ( $J_{max}$ ) πέρα από την οποία είναι εμφανής η εξάντληση της ΦΔΟ στο διαμέρισμα του δότη με αποτέλεσμα τη μείωση της διάχυσης. Έτσι επιτυγχάνεται πλατό στην αθροιστική ποσότητα που διαπερνά το δέρμα. (Williams, 2013)



**Σχήμα 5.1:** Γραφική παράσταση αθροιστικής ποσότητας ΦΔΟ ανά μονάδα εμβαδού συναρτήσει του χρόνου (Lau & Ng, 2017) – Αριστερά: Προφίλ διαπερατότητας άπειρης δόσης, Δεξιά: Προφίλ διαπερατότητας πεπερασμένης δόσης

Τέλος, αξίζει να τονιστεί πως το προαναφερθέν μοντέλο είναι καταλληλότερο για *in vitro* συστήματα, καθώς είναι σχεδόν απίθανο να λειτουργήσει για *in vivo* μελέτες. Γι' αυτό ευθύνεται η χαμηλή διαπερατότητα της κεράτινης στοιβάδας, καθώς απαιτείται σημαντικό χρονικό διάστημα για να εδραιωθούν οι συνθήκες σταθεροποιημένης κατάστασης. (Moss, 2015)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: Εκτίμηση Ρυθμού Διαδερμικής Διαπερατότητας ΦΔΟ

Η εκτίμηση του ρυθμού διαπερατότητας (steady state Flux –  $J_{ss}$ ) για μια ΦΔΟ από ένα ΔΘΣ βασίζεται στον όγκο κατανομής (Volume of Distribution –  $V_D$ ), τη συνολική κάθαρση του οργανισμού (total body clearance –  $Cl_T$ ) και τη θεραπευτική συγκέντρωση υπό συνθήκες σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state concentration –  $C_{ss}$ ). Επιπλέον, ο ρυθμός αυτός εισόδου αναμένεται να είναι ίσος με το ρυθμό εξόδου της ΦΔΟ από τον οργανισμό. Η συσχέτιση λοιπόν αυτή μπορεί να εκφραστεί χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\text{Ρυθμός Εισόδου} = \text{Ρυθμός Δοσολόγησης} \times \text{Παράγοντας Βιοδιαθεσιμότητας (F)}$$

$$\text{Ρυθμός Εξόδου} = Cl_T \times C_{ss}$$

$$\text{Ρυθμός Εισόδου} = \text{Ρυθμός Εξόδου} \Leftrightarrow \text{Ρυθμός Δοσολόγησης} \times F = Cl_T \times C_{ss}$$

Δεδομένου όμως ότι η επιδερμίδα θεωρείται μεταβολικά αδρανής, ο παράγοντας Βιοδιαθεσιμότητας (F) θα είναι ίσος με τη μονάδα. Επίσης, για το σύνολο των ΦΔΟ ισχύει πως η συνολική κάθαρση ( $Cl_T$ ) του οργανισμού δίνεται από το γινόμενο του όγκου κατανομής ( $V_D$ ) ασθενή μέσου βάρους ( $\approx 70$  kg) και του συνολικού ρυθμού απομάκρυνσης (elimination rate –  $K_{el}$ ):

$$Cl_T = V_D \times K_{el} \quad (\text{Εξίσωση 6.1})$$

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα προαναφέρθηκαν και κανονικοποιώντας το ρυθμό δοσολόγησης με το εμβαδόν του ΔΘΣ ( $A$  σε  $cm^2$ ), η εκτίμηση του ρυθμού διαπερατότητας (steady state Flux –  $J_{ss}$ ) γίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$J_{ss} = \frac{Cl_T \times C_{ss}}{A} \quad (\text{Εξίσωση 6.2})$$

όπου, οι μονάδες μέτρησης είναι:

$$V_D = \frac{L}{kg}, Cl_T = \frac{mL}{min}, C_{ss} = \frac{mg}{mL}, K_{el} = min^{-1}, J_{ss} = mg/cm^2/min$$

Με την εκτίμηση του ρυθμού διαδερμικής διαπερατότητας λαμβάνεται σημαντική πληροφορία σχετικά με την καταλληλότητα ανάπτυξης ΔΘΣ για μια ΦΔΟ, βασιζόμενοι στις φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές της παραμέτρους. (Chandrashekar & Shobha Rani, 2008)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>: Παράγοντες που Επηρεάζουν τη Διαδερμική Απορρόφηση

---

Είναι γνωστό ότι πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση και δύνανται να διαχωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, βιολογικούς και φυσικοχημικούς.

### 7.1 Βιολογικοί Παράγοντες

#### 7.1.1 Ανατομική Θέση

Η περιοχή εφαρμογής του ΔΘΣ έχει αποδειχθεί σημαντικός παράγοντας για την απορρόφηση αρκετών ΦΔΟ και δεν υπάρχει ένα πρότυπο μεταβολής της απορρόφησης που να τις αντιπροσωπεύει όλες. Ωστόσο, υπάρχει ένα γενικό πρότυπο που παρουσιάζεται από τους (Feldman & Maibach, 1967) σε μια μελέτη διαδερμικής απορρόφησης της υδροκορτιζόνης. Η κατάταξη των διαφορετικών ανατομικών περιοχών που προέκυψε, με αυξανόμενο ρυθμό απορρόφησης, είχε ως εξής: πέλμα < παλάμη < κοιλιά < ράχη < τριχωτό κεφαλής < μασχάλη < μέτωπο < όσχεο. Αξιοσημείωτο είναι πως το όσχεο παρουσιάζει 42 φορές μεγαλύτερη διαπερατότητα σε σχέση με τα πέλματα. Η παρατήρηση αυτή εξηγείται από την εγγενή βιολογική παραλλαγή του δέρματος και ειδικότερα από τις διαφορές στον αριθμό των εξαρτημάτων του δέρματος, στο πάχος της κεράτινης στοιβάδας και γενικότερα της επιδερμίδας, στη σύνθεση του κατά περιοχής σμήγματος καθώς και στην απόσταση των τριχοειδών (Rouquier, et al., 2005). Οι περιοχές που εφαρμόζονται τα ΔΘΣ προκειμένου να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι η περιοχή πίσω από το αυτί, ο θώρακας και ο βραχίονας.

#### 7.1.2 Ηλικία

Η ηλικία έχει άμεση επίδραση στη δομή και την εμφάνιση του δέρματος και κατά συνέπεια στη διαπέραση ουσιών μέσω αυτού. Η κεράτινη στοιβάδα με το πέρασμα των ετών γίνεται ξηρότερη καθώς η δραστηριότητα των σμηγματογόνων αδένων περιορίζεται αλλά και τα επιφανειακά λιπίδια, το κολλαγόνο και η ελαστίνη μειώνονται (Rogers, et al., 1996). Ωστόσο, οι μεταβολές αυτές είναι πιθανό να μην επηρεάσουν την κατανομή στην κεράτινη στοιβάδα ή το σμήγμα ιδιαίτερα λιπόφιλων ΦΔΟ (Roskos, et al., 1989).

Γενικά, η ηλικία οδηγεί σε αυξημένη αναδίπλωση και μειωμένη αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με το νερό. Έτσι, αν και το ηλικιωμένο δέρμα διατηρεί αρκετά αυξημένα επίπεδα νερού, η πλειοψηφία των μορίων του συνδέονται μεταξύ τους σε τετραεδρική μορφή αντί να δεσμεύονται με πρωτεΐνες (Waller & Maibach, 2006). Επίσης, η παροχή αίματος μειώνεται καθώς το δίκτυο των τριχοειδών εκφυλίζεται. Συμπέρασμα όλων όσων αναφέρθηκαν είναι πως η διαπερατότητα του δέρματος μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας.

Από την άλλη πλευρά, στα νεογέννητα ο σχηματισμός του φραγμού δεν είναι πλήρης, η περιεκτικότητα σε νερό είναι υψηλότερη και οι μηχανισμοί μεταβολισμού μη επαρκώς αποτελεσματικοί με άμεση συνέπεια την ιδιαίτερα αυξημένη διαπερατότητα. (Μαχαίρας & Ρέππας, 1992)

### **7.1.3 Κατάσταση του Δέρματος – Λειτουργία Φραγμού**

Η λειτουργικότητα του φραγμού εξαρτάται κυρίως από την ακεραιότητα της κεράτινης στοιβάδας και οποιαδήποτε τροποποίηση ή βλάβη της δομής της αυξάνει τη διαπερατότητα. Η διαπερατότητα λοιπόν μπορεί να επηρεαστεί από χημικούς (απορρυπαντικά, διαλύτες), φυσικούς (καιρικές συνθήκες, ηλιακό φως) ή παθολογικούς (μηχανική βλάβη, ασθένεια) παράγοντες. (Holmgaard & Nielsen, 2009)

Επίσης, οι διάφορες καταστάσεις ασθένειας όπως ατοπική δερματίτιδα ή ψωρίαση, μπορούν είτε να διακόψουν τη συνέχεια του φραγμού είτε να τροποποιήσουν/αλλοιώσουν τη λιπιδική σύνθεση του δέρματος οδηγώντας σε μια σειρά μεταβολών στην οργάνωσή του με αποτέλεσμα αυξημένη διαπερατότητα (Pilgram, et al., 2001). Ακόμη και αν το δέρμα δεν παρουσιάζει λύση της συνέχειάς του, ο ερεθισμός και το ήπιο τραύμα μπορεί να μειώσουν τη λειτουργικότητά του ως φραγμό. Οι μηχανικές βλάβες, όπως κοψίματα και εκδορές ή χημικά εγκαύματα από οξέα, αλκάλια και φαινόλες μπορεί να μειώσουν εξίσου τις ιδιότητες φραγμού του δέρματος και να αυξήσουν τον ρυθμό διαπέρασης.

### **7.1.4 Δέρμα από διαφορετικό φύλο**

Λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση του δέρματος, στο μέγεθος της λιπαρής υποδόριας στοιβάδας καθώς και στην κατανομή των τριχικών θυλάκων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών, θα μπορούσε να υποτεθεί η παρουσία διαφορών στη λειτουργία φραγμού του δέρματος μεταξύ των δυο φύλων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες που να επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή. Επιπροσθέτως, η βιοδιαθεσιμότητα και η σύνδεση με πρωτεΐνες των διαφόρων ΦΔΟ δε φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από το διαφορετικό φύλο. (Farahmand & Maibach, 2009)

### **7.1.5 Δέρμα από διαφορετικές φυλές**

Οι λίγες μελέτες στις οποίες έχει εξεταστεί ο τρόπος με τον οποίο η φυλή μπορεί να επηρεάσει την απορρόφηση διαμέσου του δέρματος δεν έχουν επισημάνει ουσιαστικές διαφορές μεταξύ Αφρικής, Ασίας και Ευρώπης. Έχει προταθεί πως αυξημένη χρώση του δέρματος παρουσιάζει πιο ελαστικό φραγμό με συνέπεια να ανακτά την αρχική του κατάσταση ταχύτερα από το πιο ελαφρώς χρωματισμένο δέρμα. Έχουν παρατηρηθεί επίσης σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα νερού της κεράτινης στοιβάδας μεταξύ διαφορετικών φυλών. (Lotte, et al., 1993)

Τα περιορισμένα ωστόσο διαθέσιμα αποτελέσματα σε συνδυασμό με την εγγενή διακύμανση της διαπερατότητας του δέρματος που ήδη έχει περιγραφεί, καθιστούν δύσκολη την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων για την επίδραση του παράγοντα αυτού στον ρυθμό διαπέρασης του δέρματος.

### **7.1.6 Δέρμα από διαφορετικά είδη**

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφορές στη διαδερμική απορρόφηση ουσιών ανάμεσα στα ζώα και στους ανθρώπους. Οι διαφορές στα περιεχόμενα λιπίδια, η δομή και το πάχος της κεράτινης στοιβάδας καθώς και ο αριθμός των εξαρτημάτων του δέρματος αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που εξηγούν τις διαφορές αυτές (Walters & Roberts, 1993). Ωστόσο, αρκετά συχνά για τις *in vitro* μελέτες χρησιμοποιείται δέρμα από ζώα, συχνότερα άτριχων ποντικών ή ινδικών χοιριδίων, καθώς το ανθρώπινο δέρμα δεν είναι εύκολα διαθέσιμο. Τα

τελευταία χρόνια βέβαια, μεγάλο ποσοστό μελετών πραγματοποιείται με τεχνητές μεμβράνες, όπως η μεμβράνη Strat-M™, που δεν παρουσιάζουν μεταβλητότητα από παρτίδα σε παρτίδα αλλά ούτε και περιορισμούς ως προς τη χρήση και την αποθήκευσή τους (Uchida, et al., 2015).

### 7.1.7 Μεταβολισμός

Το κύριο μεταβολικό όργανο του ανθρώπου είναι το ήπαρ. Το δέρμα βέβαια, διατηρεί κάποια ήπια μεταβολική ικανότητα καθώς περιέχει ένζυμα, κυρίως εστεράσες, που μπορούν να είναι ιδιαίτερα δραστικές στην αποικοδόμηση ενδογενών (στεροειδή, ορμόνες) και ξеноβιοτικών (ΦΔΟ, χημικά) παραγόντων. Ο ρόλος λοιπόν των ενζύμων αυτών είναι να αποτοξινώνουν το δέρμα αυξάνοντας την πολικότητα των διαφόρων παραγόντων με αποτέλεσμα την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους, γεγονός που οδηγεί στην ευκολότερη εξάλειψή τους (Holmgaard & Nielsen, 2009). Ωστόσο, είναι πιθανό η δράση των ενζύμων αυτών να οδηγήσει σε αρνητικό αποτέλεσμα, στη δημιουργία δηλαδή τοξικών μεταβολιτών, όπως παρατηρήθηκε στη μελέτη των (Liu & Kim, 2003).

### 7.1.8 Ενυδάτωση του Δέρματος – Φαινόμενο Απόφραξης

Για να είναι αποτελεσματική η λειτουργία φραγμού του δέρματος, θα πρέπει η ενυδάτωσή του να είναι επαρκής. Αν τα επίπεδα ενυδάτωσης αυξηθούν, θα υπάρξει ανάλογη αύξηση της δυναμικής κίνησης του επιδερμικού ιστού με συνέπεια την άνοδο της τιμής του συντελεστή διάχυσης της κεράτινης στοιβάδας. Η αυξημένη ενυδάτωση του δέρματος λοιπόν τροποποιεί τις ρεολογικές του ιδιότητες, αλλάζοντας την ελαστικότητά του και επομένως την ευκαμψία του (Moss, 2015). Το ποσοστό ενυδάτωσης καθορίζεται από τη διαφορά της συγκέντρωσης του νερού ανάμεσα στο χόριο και την επιδερμίδα σε συνδυασμό με την ικανότητα της κεράτινης στοιβάδας να συγκρατεί νερό. Περιβαλλοντικοί και φυσιολογικοί παράγοντες όπως επίσης και δερματολογικές διαταραχές επηρεάζουν την ικανότητά της να συγκρατεί μόρια νερού.

Το φαινόμενο της απόφραξης του δέρματος μπορεί να αυξήσει την ενυδάτωση της κεράτινης στοιβάδας και συνεπώς να επηρεάσει τη διαδερμική απορρόφηση μιας ΦΔΟ. Αυτό επιτυγχάνεται μεταβάλλοντας την κατανομή της ΦΔΟ μεταξύ του φορέα της και του δέρματος, διογκώνοντας τα κερατινοκύτταρα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία της επιφάνειας του δέρματος όπως και την αιματική ροή και ενδεχομένως μεταβάλλοντας την οργάνωση των λιπιδίων (Zhai & Maibach, 2001). Συνήθως επιτυγχάνεται με τοποθέτηση αδιαπέραστων στο ύδωρ επιδέσμων στο δέρμα, συνδέεται όμως και με την εφαρμογή τοπικών σκευασμάτων, τα οποία είναι εγγενώς αποφρακτικά, εξαιτίας της λιπαρής σύνθεσης και του αυξημένου ιξώδους τους, όπως οι αλοιφές. Η επίδραση αυτή ορισμένων σκευασμάτων έχει οδηγήσει σε ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης για μια σειρά ΦΔΟ όπως η υδροκορτιζόνη και η καφεΐνη (Coldman, et al., 1971) (Treffel, et al., 1992).

### 7.1.9 Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη φυσιολογική δομή και τη δραστηριότητα του δέρματος είναι πολύπλοκη, επηρεάζοντας τόσο τη ροή του αίματος όσο και τον μεταβολισμό. Είναι γενικά αποδεκτό ότι αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση στον ρυθμό απορρόφησης και ότι μείωση αυτής μπορεί να οδηγήσει σε ανάλογα αποτελέσματα. Η απορρόφηση μέσω του δέρματος πραγματοποιείται στους 32°C, στη θερμοκρασία δηλαδή που

αντιστοιχεί στην επιφάνειά του, η οποία όμως μπορεί να παρουσιάσει άνοδο μέχρι τους 37°C εξαιτίας του φαινομένου της απόφραξης (Williams, 2013). Παρόλο που δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στον ρυθμό απορρόφησης, όταν η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι τους 60°C, πέρα από τη θερμοκρασία αυτή πραγματοποιούνται μη αναστρέψιμες δομικές αλλαγές στην κεράτινη στοιβάδα, που οδηγούν στη μείωση της λειτουργικότητας του δέρματος ως φραγμό (Allenby, et al., 1969). Η αυξημένη αγγειοδιαστολή είναι ένα κοινό φαινόμενο που σχετίζεται με την απορρόφηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Η παθητική μεταφορά ουσιών μέσω του δέρματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία, καθώς αποτελεί μια διαδικασία διάχυσης. Η σταθερά διάχυσης (D) σχετίζεται με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος (T), όπως φαίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (\text{Εξίσωση 7.1})$$

όπου το k αντιπροσωπεύει τη σταθερά Boltzmann, το r την υδροδυναμική ακτίνα του μορίου της ουσίας που, διαχέεται, και το η το ιξώδες. (Moss, 2015)

Βιολογικοί Παράγοντες	Φυσικοχημικοί Παράγοντες
Ανατομική Θέση	
Ηλικία	
Κατάσταση του Δέρματος – Λειτουργία Φραγμού	Μοριακό βάρος & Σχήμα
Δέρμα από διαφορετικό φύλο	Εφαρμοζόμενη συγκέντρωση/δόση
Δέρμα από διαφορετικές φυλές	Συντελεστής κατανομής
Δέρμα από διαφορετικά είδη	Διαλυτότητα & Σημείο Τήξης
Μεταβολισμός	pH – Ιονισμός
Ενυδάτωση του δέρματος – Φαινόμενο Απόφραξης	
Θερμοκρασία	

Πίνακας 7.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση ουσιών

## 7.2 Φυσικοχημικοί Παράγοντες

### 7.2.1 Μοριακό βάρος & Σχήμα

Το μέγεθος και το σχήμα μιας ΦΔΟ αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τον προσδιορισμό της ικανότητας της να διαπεράσει τον φραγμό του δέρματος. Το μοριακό βάρος χρησιμοποιείται λόγω της ευκολίας και της πρακτικότητας του και παρατηρείται αντίστροφη σχέση μεταξύ της τιμής του και της διάχυσης μέσω του δέρματος. Συγκεκριμένα, μικρά μόρια μπορούν να διαχέονται ταχύτερα μέσω αυτού, με τη χαρακτηριστική τιμή των 500 Da να αποτελεί όριο αποκοπής για τη διαπέραση. (Mitragotri, et al., 2011)

Οποιαδήποτε χημική τροποποίηση γίνεται σε μια ΦΔΟ μπορεί να οδηγήσει σε καθοριστικές μεταβολές στην ικανότητά της να απορροφηθεί μέσω του δέρματος. Για παράδειγμα, προσθήκη χαρακτηριστικών ομάδων όπως υδροξυλίων (-OH) θα οδηγήσει σε αύξηση της πολικότητας με αποτέλεσμα τη μείωση της διαπερατότητας. (Moss, 2015)

Εφαρμοζόμενη συγκέντρωση/δόση

Είναι φυσικό επακόλουθο πως αύξηση της συγκέντρωσης μια ΦΔΟ εντός του φορέα της αυξάνει την ποσότητα που τελικά απορροφάται, με τη μέγιστη ροή να επιτυγχάνεται, όταν η συγκέντρωση προσεγγίζει τη διαλυτότητα κορεσμού εντός του φορέα. Αυτό βέβαια προκύπτει και από τη μαθηματική έκφραση του 1<sup>ου</sup> νόμου του Fick, ο οποίος παρουσιάστηκε και αναλύθηκε εκτενώς στο 5<sup>ο</sup> κεφάλαιο.

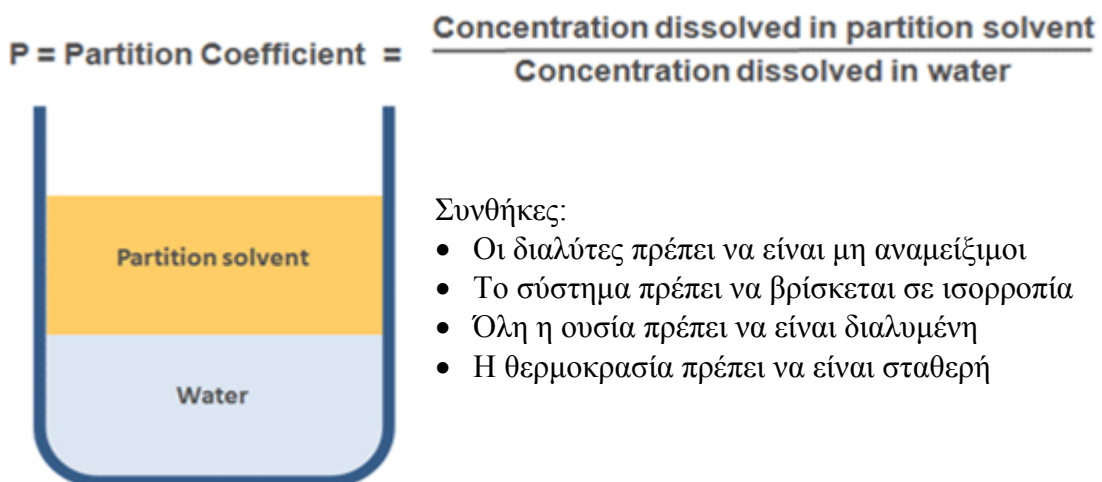


Προκύπτει λοιπόν πως αύξηση της διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης καθώς και της συχνότητας χορήγησης οδηγούν σε ανάλογη αύξηση της ποσότητας που θα απορροφηθεί από μια τοπικά εφαρμοζόμενη ΦΔΟ. Παρόλο που μια υψηλή χορηγούμενη δόση οδηγεί συνήθως σε μεγαλύτερα επίπεδα απορρόφησης, παρουσιάζει μεγαλύτερο τοξικολογικό δυναμικό σε σύγκριση με συχνές μικρότερες δόσεις (Wilson & Holland, 1982).

### 7.2.2 Συντελεστής Κατανομής (Partition Coefficient)

Η θεωρία της απορρόφησης, σύμφωνα με τους Meyer και Overton (Sandberg & Miller, 2003), δηλώνει πως οι λιποδιαλυτές ουσίες θα περάσουν μέσω της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της περιεκτικότητάς τους σε λιπίδια, ενώ οι υδατοδιαλυτές ουσίες περνούν μετά την ενυδάτωση του πρωτεϊνικού τμήματος του κυτταρικού τοιχώματος. Ο συντελεστής κατανομής, που συμβολίζεται ως  $\text{Log}P_{\text{Water}}^{\text{Octanol}}$  ή LogP ή  $\text{Log}K_{\text{ow}}$ , αναφέρεται στην ικανότητα μιας ουσίας να κατανεμηθεί μεταξύ δύο μη αναμειξιμων φάσεων, συνήθως οκτανόλης/νερού ή επτανίου/ρυθμιστικού διαλύματος. Ο υψηλότερος συντελεστής κατανομής λοιπόν αντιπροσωπεύει ένα περισσότερο λιπόφιλο μόριο και συνήθως συνδυάζεται πειραματικά με αυξημένη διαπερατότητα μέσω των λιπιδικών περιοχών της κεράτινης στοιβάδας.

Για να διασχίσει μια ΦΔΟ την κεράτινη στοιβάδα, πρέπει πρώτα να κατανεμηθεί σε αυτή και αυτό αποτελεί κατά κύριο λόγο το περιοριστικό βήμα στη διαδικασία της απορρόφησης. Στην πράξη, μια ΦΔΟ χαρακτηρίζεται ως ιδανική υποψήφια για διαδερμική χορήγηση, όταν διαθέτει τόσο λιπόφιλες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες (Sinko, 2011). Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι ουσίες με ενδιάμεσες ιδιότητες LogP, μεταξύ 1 και 3, θα διασχίσουν το φράγμα του δέρματος μέσω αμφοτέρων των λιπιδικών και των υδατικών διαδρομών, αλλά πιθανώς να επικρατεί η οδός των λιπιδικών διπλοστοιβάδων (Williams, 2013). Για τα λιπόφιλα μόρια βέβαια με LogP μεγαλύτερο από 3, η προηγούμενη οδός θα αποτελεί την κυρίαρχη επιλογή, αυτό όμως δεν εξασφαλίζει αυξημένη διαδερμική απορρόφηση καθώς παρουσιάζεται πρόβλημα κατά την κατανομή μεταξύ της λιπόφιλης κεράτινης στοιβάδας και της υδρόφιλης ζώσας επιδερμίδας.



Σχήμα 7.1: Συντελεστής Κατανομής (Sirius Analytical, 2018)

### 7.2.3 Διαλυτότητα & Σημείο Τήξης

Η διαδερμική διαπερατότητα μιας ΦΔΟ επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη διαλυτότητά της στο νερό και στον φορέα χορήγησής της. Η κατανομή της μεταξύ της κεράτινης στοιβάδας και του φορέα έχει μεγάλη σημασία στη διαδερμική χορήγηση. Εάν η ΦΔΟ είναι περισσότερο διαλυτή στην κεράτινη στοιβάδα από ό,τι στον φορέα, στην κατάσταση ισορροπίας η συγκέντρωσή της θα είναι μεγαλύτερη στη στοιβάδα του δέρματος. Επιπλέον, όταν η ΦΔΟ είναι πλήρως διαλυμένη στον φορέα ο ρυθμός διαπέρασης αυξάνεται, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη βελτιωμένη διάχυση μέσω του φορέα. (Moss, 2015)

Όσον αφορά το σημείο τήξης, αποτελεί ένα φυσικοχημικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαλυτότητα ουσιών στο νερό.

### 7.2.4 pH – Ιονισμός

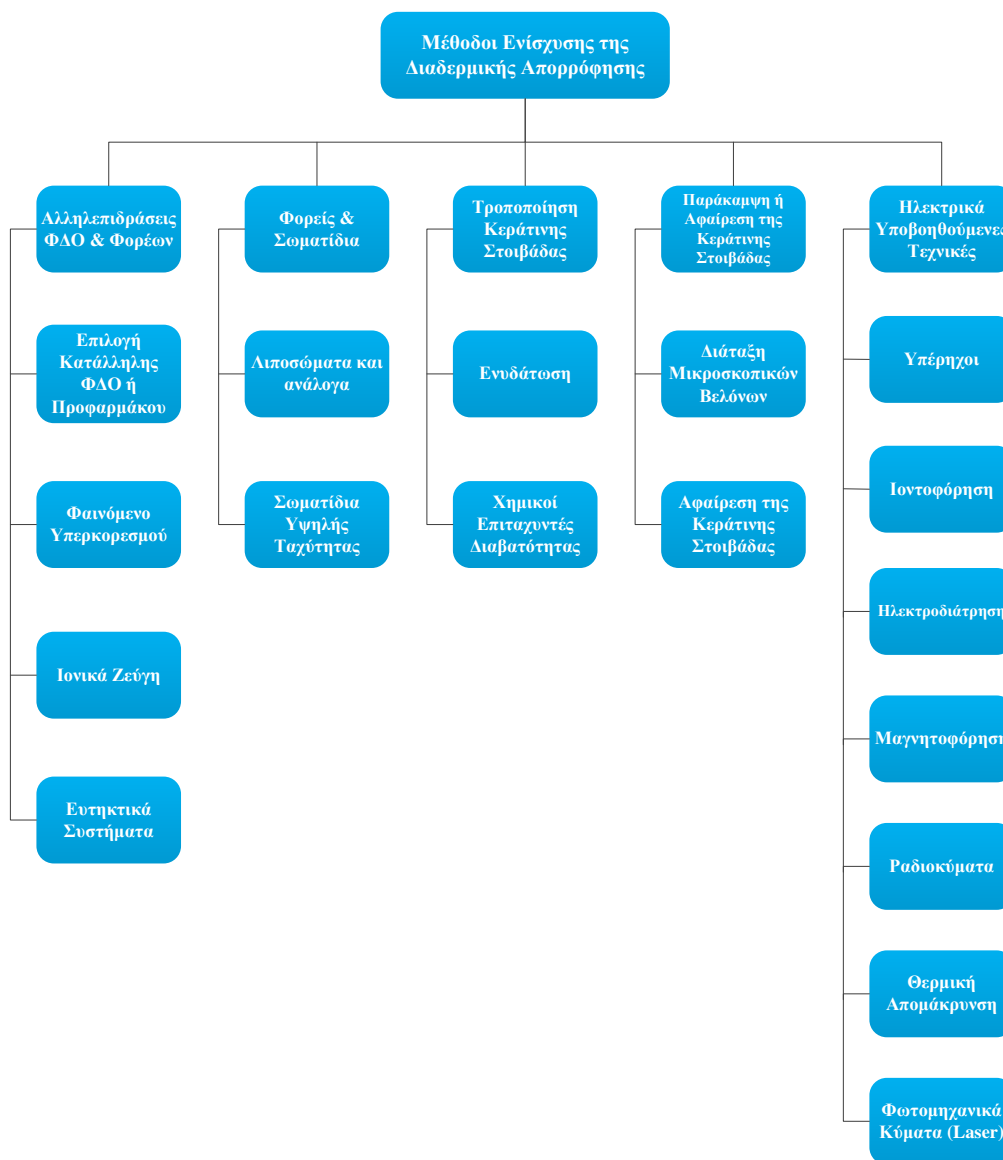
Λαμβάνοντας υπόψη τη λιπόφιλη φύση της κεράτινης στοιβάδας συμπεραίνουμε πως η ιονισμένη μορφή ενός μορίου είναι λιγότερο πιθανό να διαπεράσει το δέρμα συγκριτικά με τη μη ιονισμένη. Έτσι, ο βαθμός ιονισμού είναι καθοριστικός για τον προσδιορισμό του ποσοστού απορρόφησης φαρμάκων τόσο από τους παθητικούς όσο και από τους υποβοηθούμενους μηχανισμούς μεταφοράς. Σύμφωνα με τη θεωρία pH-μερισμού, αν ένα μόριο βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή τότε μπορεί εύκολα να διεισδύσει στην κεράτινη στοιβάδα μέσω της διακυτταρικής οδού (Hadgraft & Valenta, 2000). Η βάση αυτής της θεωρίας είναι ότι οι λιπόφιλες περιοχές του δέρματος δρουν ως εμπόδιο στα ιονισμένα μόρια, τα οποία με τη σειρά τους επιλέγουν να διέλθουν μέσω πόρων και εξαρτημάτων του δέρματος (Δήμας, et al., 2002).

Παρά τη θεωρία όμως αυτή, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι τόσο τα ιονισμένα όσο και τα μη ιονισμένα μόρια μπορούν να διεισδύσουν σε μία λιπόφιλη μεμβράνη, αν και οι ρυθμοί καθώς και οι οδοί μεταφοράς είναι ριζικά διαφορετικοί. Προτάθηκε πως ιόντα, ζεύγη ιόντων και ηλεκτρολύτες, όπως άλατα νατρίου και καλίου, μπορούν εύκολα να διασχίσουν το δέρμα ενώ μεγαλύτερες ιονισμένες ενώσεις μπορούν να διεισδύσουν με μηχανισμούς ζεύγους ή ανταλλαγής ιόντων. Έτσι λοιπόν, η κατάσταση ιονισμού ενός μορίου θα επηρεάσει σημαντικά τη διαπερατότητα μέσω του δέρματος (Moss, et al., 2006). Η ρύθμιση του pH θα μεταβάλλει επομένως την αναλογία της ουσίας που είναι διαθέσιμη ως ελεύθερη βάση (μη ιονισμένη) ή ως φορτισμένη μορφή (ιονισμένη), επηρεάζοντας κατά συνέπεια τη συγκέντρωση, τη διαλυτότητα και τελικά την ταχύτητα διαπέρασης του δέρματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>: Μέθοδοι Ενίσχυσης της Διαδερμικής Απορρόφησης

Σε σύγκριση με άλλες οδούς χορήγησης, η διαδερμική είναι περιορισμένη και αυτό αντικατοπτρίζεται στον αριθμό ΦΔΟ που διατίθενται υπό τη μορφή των ΔΘΣ στην αγορά. Αυτό, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οφείλεται στον ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο με τον οποίο η κεράτινη στοιβάδα λειτουργεί ως φραγμός. Εξαιτίας αυτού, πραγματοποιούνται συνεχώς έρευνες με στόχο τη βελτίωση της διαδερμικής διαπερατότητας και της επακόλουθης βιοδιαθεσιμότητας πολυάριθμων ΦΔΟ για τις οποίες η οδός αυτή προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα.

Οι κύριες στρατηγικές για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, τη χημική και τη φυσική, όπως παρουσιάζονται και στο σχήμα 8.1. (Moss, 2015)



Σχήμα 8.1: Μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης

## 8.1 Αλληλεπιδράσεις ΦΔΟ & Φορέων

### 8.1.1 Επιλογή Κατάλληλης ΦΔΟ ή Προφαρμάκου

Η απλούστερη προσέγγιση για την ανάπτυξη ΔΘΣ με ικανοποιητικά επίπεδα και ρυθμό διαδερμικής απορρόφησης στηρίζεται στην επιλογή ΦΔΟ που διαθέτουν ιδανικές φυσικοχημικές ιδιότητες, για να διαπεράσουν τον φραγμό του δέρματος. Όπως έχει ήδη αναφερθεί αυτές είναι το χαμηλό μοριακό βάρος, η ενδιάμεση τιμή συντελεστή κατανομής (LogP) και το χαμηλό σημείο ζέσεως. (Barry, 2001)

Στην περίπτωση που η ΦΔΟ δεν έχει τις επιθυμητές αυτές ιδιότητες, μια επιλογή αποτελεί η χρήση της τεχνικής του προφαρμάκου, με την οποία μπορούν να βελτιωθούν τα επίπεδα διαδερμικής απορρόφησης. Κατά τη χημική αυτή τροποποίηση λοιπόν, προσαρμόζεται μια λιπόφιλη χαρακτηριστική ομάδα με στόχο την αύξηση της διαπερατότητας της ΦΔΟ μέσω της κεράτινης στοιβάδας. Στη συνέχεια, στη ζώσα επιδερμίδα, το μητρικό φάρμακο απελευθερώνεται με υδρόλυση από τις εστεράσες. Παράδειγμα εφαρμογής της τεχνικής αυτής αποτελεί η μελέτη των (Sloan & Wasdo, 2003) για τη 5-φθοριοουρακίλη. (Subedi, et al., 2010)

### 8.1.2 Θερμοδυναμική Δραστηριότητα – Φαινόμενο Υπερκορεσμού

Η διαδερμική απορρόφηση μπορεί να ενισχυθεί με χρήση υπερκορεσμένων διαλυμάτων, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη θερμοδυναμική δραστηριότητα – χημικό δυναμικό από τα αντίστοιχα κορεσμένα. Ο υπερκορεσμός, που αποτελεί μια θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση, μπορεί να λάβει χώρα με δυο τρόπους. Είτε ύστερα από κατάλληλο σχεδιασμό, δηλαδή με αύξηση της συγκέντρωσης ή με μείωση της διαλυτότητας της ΦΔΟ στον φορέα του σκευάσματος, είτε εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του σκευάσματος με το δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, είναι δυνατή τόσο η ενυδάτωσή του σκευάσματος εξαιτίας της άδηλης απώλειας νερού του δέρματος όσο και η εξάτμιση πτητικών συστατικών της σύνθεσής του κατά την εφαρμογή. Το πρακτικό ωστόσο πρόβλημα της τεχνικής αυτής είναι, φυσικά, η περιορισμένη διάρκεια της μετασταθούς περιόδου. Μια αποτελεσματική μέθοδος παράτασής της αποτελεί η ενσωμάτωση πολυμερών, που έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της κρυστάλλωσης σε ασταθή υπερκορεσμένα σκευάσματα. Παράδειγμα εφαρμογής της τεχνικής αυτής αποτελεί η μελέτη των (Leichtnam, et al., 2006) για την τεστοστερόνη. (Murthy & Shivakumar, 2010)

### 8.1.3 Ιονικά Ζεύγη

Τα φορτισμένα μόρια δε διαπερνούν εύκολα τις λιπιδικές μεμβράνες εξαιτίας της περιορισμένης ικανότητας κατανομής τους σε αυτές. Μια προσέγγιση ενίσχυσης λοιπόν της διαδερμικής απορρόφησης τέτοιων περιπτώσεων, χρησιμοποιεί ένα αντίθετα φορτισμένο μόριο, ώστε να σχηματιστεί ένα ζεύγος ιόντων. Καθώς τα φορτία προσωρινά εξουδετερώνονται, το ιονικό ζεύγος κατανέμεται στα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας και ακολούθως διαχέεται στη ζώσα επιδερμίδα, όπου και διαχωρίζεται στα φορτισμένα τμήματά του. Αυτά με τη σειρά τους περνούν στη συστηματική κυκλοφορία μέσω του δικτύου των τριχοειδών. Οι (Padula, et al., 2007) πέτυχαν τη βελτίωση της διαδερμικής απορρόφησης της λιδοκαΐνης με σχηματισμό ιονικού ζεύγους με το λαουρικό οξύ. (Valenta, et al., 2000)

### 8.1.4 Ευτηκτικά Συστήματα

Το σημείο τήξης μιας ΦΔΟ επηρεάζει τη διαλυτότητά της και επομένως τη διαδερμική απορρόφησή της. Έχει αποδειχθεί πως όσο χαμηλότερο είναι το σημείο τήξης, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαλυτότητα σε έναν δεδομένο διαλύτη, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων του δέρματος, και άρα η θερμοδυναμική δραστηριότητα. Μία από τις μεθόδους λοιπόν με τις οποίες μπορεί να μειωθεί το σημείο τήξης μιας ΦΔΟ είναι ο σχηματισμός ενός ευτηκτικού συστήματος. Ένα ευτηκτικό σύστημα είναι ένα φυσικό μείγμα δύο συστατικών που δεν αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν μια νέα χημική ουσία, αλλά σε ορισμένες αναλογίες παρεμποδίζουν την κρυστάλλωση με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ουσίας με χαμηλότερο σημείο τήξης από οποιοδήποτε από τα συστατικά. (Mohammadi-Samani, et al., 2013)

Η κρέμα EMLA (Eutectic Mixture of Local Anesthetics) αποτελεί ένα εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα, που βασίζεται σε ένα ευτηκτικό μείγμα λιδοκαΐνης και πριλοκαΐνης σε αναλογία 1:1 το οποίο παρέχει αποτελεσματική τοπική αναισθησία. Άλλες μελέτες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και στις οποίες έχει εφαρμοστεί η τεχνική αυτή αποτελούν τα ευτηκτικά συστήματα προπρανολόλης με λιπαρά οξέα των (Stott, et al., 2001) και της κανναβιδιόλης με φωσφατιδύλοχολίνη των (Lodzki, et al., 2003). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, η ταπείνωση του σημείου τήξης σε τιμές είτε κοντά είτε χαμηλότερα από τη θερμοκρασία του δέρματος θεωρήθηκε υπεύθυνη για την αύξηση της διαλυτότητας των ΦΔΟ στα λιπίδια του δέρματος και ως εκ τούτου στην απορρόφηση. (Benson, 2005)

## 8.2 Φορείς & Σωματίδια

### 8.2.1 Λιποσώματα & Ανάλογα

Τα λιποσώματα (liposomes) είναι κολλοειδή σωματίδια, που αποτελούνται συνήθως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Σχηματίζουν ομόκεντρες διπλοστοιβάδες, που μπορούν να εγκλωβίσουν και να μεταφέρουν ΦΔΟ στην κεράτινη στοιβάδα και τη ζώσα επιδερμίδα. Οι υδρόφιλες ΦΔΟ συνήθως εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των σωματιδίων, ενώ οι λιπόφιλες ή αμφίφιλες και μερικές φορές φορτισμένες ΦΔΟ συνδέονται με τις διπλοστοιβάδες. Γενικά, τα λιποσώματα δεν αναμένεται να διεισδύσουν στη ζώσα επιδερμίδα παρόλο που υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές στη βιβλιογραφία. Δρουν ως ενισχυτές διαπερατότητας χάρη στα φωσφολιπίδια που διεισδύουν στην κεράτινη στοιβάδα και μεταβάλλουν τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες του δέρματος. Επίσης καθορίζουν τον ρυθμό και την έκταση της συστηματικής απορρόφησης των ΦΔΟ, μειώνουν το δυναμικό ερεθισμού και βελτιώνουν τη σταθερότητά τους. (Murthy & Shivakumar, 2010)

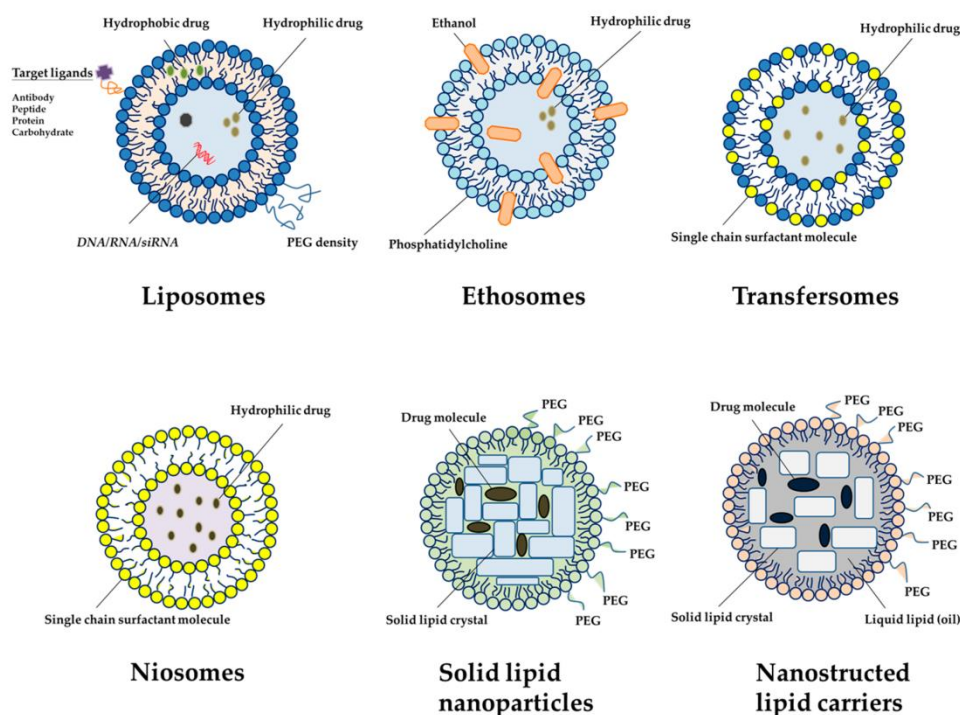
Εξέλιξη των λιποσωμάτων αποτελούν τα τρανσφεροσώματα (transfersomes), τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους ενεργοποιητές (edge activators), επιφανειοδραστικά μόρια δηλαδή όπως χολικό νάτριο, που αποσταθεροποιούν τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες του δέρματος. Οι εφευρέτες τους ισχυρίζονται ότι τα κυστίδια αυτά είναι ιδιαίτερα εύκαμπτα, ικανά να συμπιέζονται σε τέτοιο βαθμό που καταλήγουν έως και  $10^5$  φορές μικρότερα από ότι ένα λιπόσωμα (200 – 300 nm) και επομένως μπορούν να διαπεράσουν τον φραγμό του δέρματος. Άλλοι ερευνητές όμως οι οποίοι μελέτησαν τη μεταφορά ΦΔΟ μέσω του δέρματος με χρήση τρανσφεροσωμάτων, αύξησαν τη μέγιστη ροή (flux) σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς φορείς όχι όμως σε σπουδαίο βαθμό. (Cevc, 2004)

Τα αιθωσώματα (ethosomes) με τη σειρά τους είναι λιποσώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη (20 – 45%), η οποία διαταράσσει την οργάνωση της κεράτινης στοιβάδας και ρευστοποιεί τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Έπειτα, τα κυστίδια αυτά διαπερνούν το δέρμα, διαμέσου των αποδιοργανωμένων λιπιδίων του, και απελευθερώνουν τη ΦΔΟ στη ζώσα επιδερμίδα. (Touitou, et al., 2000)

Ξεχωριστή κατηγορία αποτελούν τα νιοσώματα (niosomes), καθώς χρησιμοποιούν μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, για να σχηματίσουν κυστίδια. Αποτελούνται από μείγμα ενός μορίου που σχηματίζει διπλοστοιβάδα (σταθεροποιητής) και ενός συστατικού που σχηματίζει μικκύλια (αποσταθεροποιητής) και έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στα βαθύτερα στρώματα της κεράτινης στοιβάδας. Χαρακτηρίζονται από καλύτερη χημική σταθερότητα συγκριτικά με τα λιποσώματα και είναι αρκετά πιο φθηνά στην παραγωγή τους. Παράδειγμα εφαρμογής τους αποτελεί η μελέτη των (Auda, et al., 2015) για τη σελεκοξίμπη.

Άλλοι τύποι λιποσωμάτων που αναπτύχθηκαν και ερευνήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να διεισδύσουν μέσω του δέρματος αποτελούν τα:

- Φαρμακοσώματα (Pharmacosomes), τα οποία είναι κolloειδείς διασπορές ΦΔΟ ομοιοπολικά συνδεδεμένες με φωσφολιπίδια και χρησιμοποιούνται κυρίως για την παγίδευση των πολικών ΦΔΟ. (Yellepeddi, 2015)
- Βεσοσώματα (Vesosomes), τα οποία αποτελούν κυστίδια συγχωνευμένα με άλλα κυστίδια και έχουν αποδειχθεί πολλά υποσχόμενα συστήματα διαδερμικής ανοσοποίησης. (Mishra, et al., 2006)
- Προλιποσώματα (Proliposomes) και Προνιοσώματα (Proniosomes), σκευάσματα δηλαδή που περιέχουν λιπίδιο ή νίωσωμα αντίστοιχα, σε ξηρή μορφή και ΦΔΟ. Σχηματίζουν λιποσωματική διασπορά αμέσως μετά την ενυδάτωσή τους και αναπτύχθηκαν εξαιτίας της βελτιωμένης φυσικής και χημικής σταθερότητάς τους. (Hiremath, et al., 2009)



Σχήμα 8.2: Επισκόπηση διαφόρων τύπων λιπιδικών σωματιδίων (Chuang, et al., 2018)

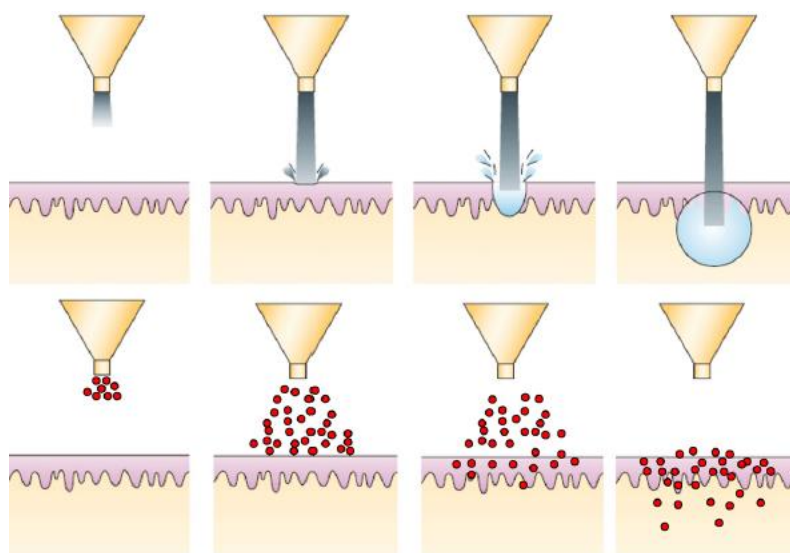
Τέλος, τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (Solid Lipid Nanoparticles – SLNs) και οι νανοδομημένοι λιπιδικοί φορείς (Nanostructured Lipid Carriers – NLCs) αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία φορέων και έχουν διερευνηθεί αρκετά για τη χρήση τους στην τοπική (Krishnan, et al., 2012) και τη διαδερμική (Müller, et al., 2002) χορήγηση. Τα SLNs, με μέγεθος 50 – 1000 nm, συνήθως κατασκευάζονται από ένα λιπίδιο που είναι σε στερεή μορφή στη θερμοκρασία του σώματος και χαρακτηρίζονται από μια τέλεια μήτρα κρυσταλλικού πλέγματος. Αντίθετα, τα NLCs είναι κατασκευασμένα από λιπίδια που βρίσκονται είτε σε στερεή είτε σε υγρή κατάσταση στους 37°C. Η μήτρα τους μπορεί να είναι είτε ένα παραμορφωμένο κρυσταλλικό πλέγμα είτε ένα άμορφο λιπιδικό μείγμα. Και στις δυο περιπτώσεις, η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται με επίστρωση της επιφάνειάς τους με επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Συνοψίζοντας, και οι δύο αυτοί φορείς σχηματίζουν μια αποφρακτική μεμβράνη (occlusion film) στην επιφάνεια του δέρματος με αποτέλεσμα την αυξημένη ενυδάτωσή του και επομένως την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης ΦΔΟ. (Baroli, 2010)

### 8.2.2 Σωματίδια Υψηλής Ταχύτητας

Τα συστήματα jet injectors εκτοξεύουν σωματίδια μεγέθους 20 – 100 μm τα οποία διαπερνούν την κεράτινη στοιβάδα και φτάνουν στις κατώτερες στοιβάδες του δέρματος χρησιμοποιώντας υπερηχητικά κύματα από αέριο ήλιο (He). Τα κυριότερα πλεονεκτήματά τους, είναι:

- Μεταφορά ΦΔΟ χωρίς πόνο καθώς τα σωματίδια είναι αρκετά μικρά με συνέπεια να αδυνατούν να πυροδοτήσουν τους υποδοχείς πόνου του δέρματος
- Βελτιωμένη αποτελεσματικότητα και βιοδιαθεσιμότητα των ΦΔΟ
- Δυνατότητα στόχευσης σε συγκεκριμένο ιστό
- Ελεγχόμενη αποδέσμευση
- Αποφυγή χρήσης βελονών
- Ακρίβεια ως προς τη δοσολογία

Παρόλα αυτά τα εξαιρετικά πλεονεκτήματα, υπάρχουν προβλήματα αρχικά με μώλωπες στους ασθενείς και κατά δεύτερον με ορισμένα σωματίδια που αναπηδούν στην επιφάνεια του δέρματος. Εξαιτίας αυτών υπάρχει μια ανησυχία στις ρυθμιστικές αρχές σχετικά με τη βλάβη που μπορεί να προκληθεί από τα σωματίδια υψηλής ταχύτητας που διαπερνούν το δέρμα και επιτρέπουν σε εξωτερικούς παράγοντες μόλυνσης, όπως βακτήρια, να εισχωρήσουν επίσης. (Barry, 2006)



**Σχήμα 8.3:** Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ΦΔΟ με χρήση συστημάτων jet injectors (Arora, et al., 2008) – Επάνω: Liquid jet injector, Κάτω: Powder injector

## 8.3 Τροποποίηση Κεράτινης Στοιβάδας

### 8.3.1 Ενυδάτωση

Το νερό αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη και ασφαλέστερη μέθοδο αύξησης της απορρόφησης τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων ΦΔΟ από το δέρμα. Η περιεκτικότητα σε νερό της κεράτινης στοιβάδας είναι περίπου 15 έως 20% του ξηρού βάρους της, τιμή όμως που μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα επίπεδα υγρασίας του περιβάλλοντος. Ενυδάτωση της κεράτινης στοιβάδας θα μπορούσε να μεταβάλει τη διαλυτότητα των ΦΔΟ και επομένως να τροποποιήσει την κατανομή μεταξύ του φορέα και του δέρματος. Επιπλέον, αυξημένη ενυδάτωση του δέρματος μπορεί να διαταράξει τη δομή της κεράτινης στοιβάδας οδηγώντας σε αύξηση της διαπερατότητας. (Benson, 2005)

### 8.3.2 Χημικοί Επιταχυντές Διαβατότητας (Chemical Penetration Enhancers – CPEs)

Οι χημικές ουσίες που ενσωματώνονται σε διαδερμικά ή τοπικά σκευάσματα, κατανέμονται και αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της κεράτινης στοιβάδας και βελτιώνουν τη διαπέραση ΦΔΟ μέσω του δέρματος με προσωρινό και αναστρέψιμο τρόπο είναι γνωστές ως ενισχυτές ή επιταχυντές απορρόφησης, διαβατότητας, διαπέρασης ή διείσδυσης.

Σύμφωνα με τους (Williams & Barry, 2004), για να χαρακτηριστεί μια χημική ουσία ως επιταχυντής διαβατότητας θα πρέπει να πληροί τα ακόλουθα επιθυμητά κριτήρια:

- Φαρμακολογικά αδρανής
- Μη τοξική, ερεθιστική ή αλλεργιογόνος
- Να μην προκαλεί απώλεια σωματικών υγρών, ηλεκτρολυτών και άλλων συστατικών του δέρματος
- Ικανή να παρέχει άμεση ενίσχυση της διαπερατότητας, με προβλέπιμη και επαναλήπιμη δραστηριότητα και διάρκεια δράσης
- Ικανή να επιτρέψει την άμεση και πλήρη λειτουργία φραγμού του δέρματος κατά την αφαίρεση
- Συμβατή με ένα ευρύ φάσμα ΦΔΟ και εκδόχων
- Εξαιρετικός διαλύτης για πληθώρα ΦΔΟ
- Κλινικά ασφαλής και αισθητικά αποδεκτή από τους ασθενείς

Όλες σχεδόν οι χημικές ουσίες που έχουν χαρακτηριστεί επιταχυντές διαβατότητας πληρούν ορισμένα από τα παραπάνω κριτήρια καθώς δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη κανένας που να τα ικανοποιεί στο σύνολό τους.

Εξαιτίας των ποικίλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων και των διαφορετικών μηχανισμών δράσης, είναι ιδιαίτερα δύσκολο να δημιουργηθεί ένα απλό σχήμα ταξινόμησης των επιταχυντών διαβατότητας. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει ορισμένες προσπάθειες, ώστε να δημιουργηθεί ένα τέτοιο σύστημα, κάθε φορά όμως στηρίζεται και σε διαφορετική προσέγγιση. Την αρχή λοιπόν έκαναν οι (Hori, et al., 1990), οι οποίοι πρότειναν ένα σύστημα ταξινόμησης βασισμένο στα οργανικά και ανόργανα χαρακτηριστικά τους, που οδήγησε σε μια διαγραμματική απεικόνιση με τρεις διακριτές περιοχές, τους διαλύτες (I), για υδρόφιλες ΦΔΟ (II) και για λιπόφιλες ΦΔΟ (III). Ακολούθησαν οι (Lambert, et al., 1993), οι οποίοι τους ταξινόμησαν επίσης σε τρεις κατηγορίες, διαλύτες και δέκτες δεσμού υδρογόνου (I), λιπαρά οξέα και αλκοόλες (II) και επιφανειοδραστικούς παράγοντες που περιέχουν μεσαίου μεγέθους πολικές ενώσεις (III). Αυτό όμως που τελικά επικράτησε, προκύπτει από τη μελέτη των

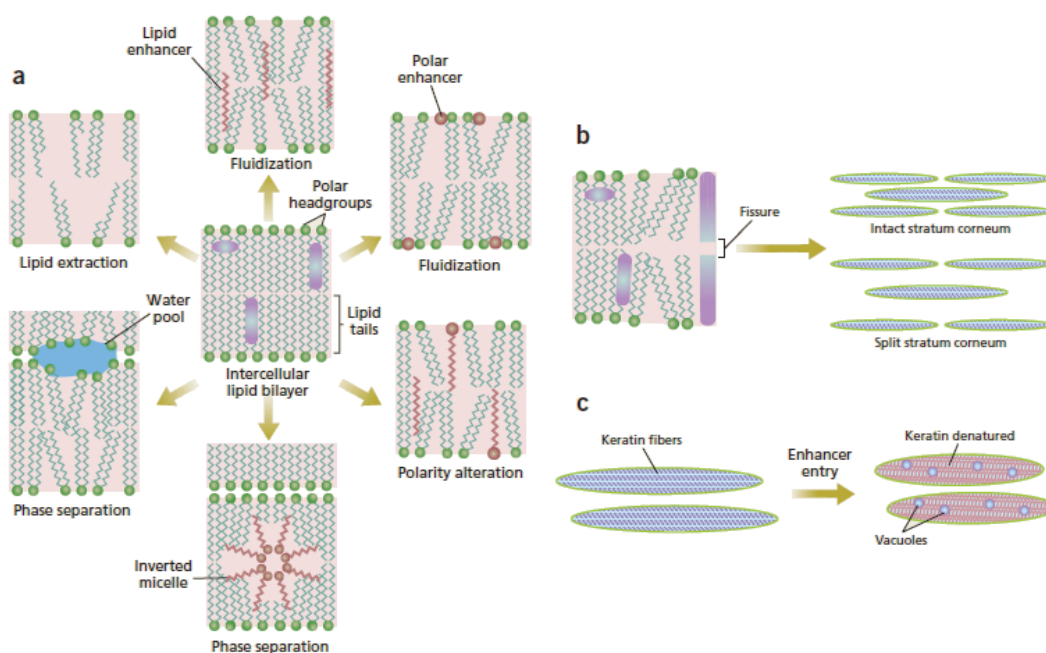


(Williams & Barry, 2004) και στηρίζεται στην ταξινόμησή τους σε ομάδες ανάλογα με τη δομική τους σχέση. (Murthy & Shivakumar, 2010)

Ξεχωριστή βέβαια θέση στη βιβλιογραφία κατέχει η ταξινόμηση των επιταχυντών διαβατότητας σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης τους, όπως καθορίστηκε πρώτη φορά από τον (Barry, 1991). Αυτός και οι συνεργάτες του λοιπόν δημιούργησαν τη θεωρία Lipid – Protein Partitioning (LLP), για να περιγράψουν πως οι διαφορετικοί επιταχυντές διαβατότητας τροποποιούν τη διαπερατότητα του δέρματος. Σύμφωνα με τη θεωρία, προτείνονται τρεις τρόποι με τους οποίους διευκολύνεται η διαδερμική απορρόφηση ΦΔΟ:

- Διαταραχή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας (Τροποποίηση Λιπιδίων – Lipid Modification)
- Αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες της κεράτινης στοιβάδας (Τροποποίηση Πρωτεϊνών – Protein Modification)
- Αύξηση της κατανομής της ΦΔΟ στην κεράτινη στοιβάδα (Ενίσχυση Κατανομής – Partitioning Promotion)

Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν αρκετοί επιταχυντές διαβατότητας που συνδυάζουν δύο ή ακόμη και όλους τους παραπάνω μηχανισμούς δράσης.



**Σχήμα 8.4:** Δυναμικοί μηχανισμοί δράσης χημικών επιταχυντών διαβατότητας (CPEs) (Barry, 2004) – a: Δράση στα διακυτταρικά λιπίδια, b: Δράση σε δεσμοσώματα και πρωτεΐνες κεράτινης στοιβάδας, c: Δράση μέσα στα κερατινοκύτταρα

### 8.3.2.1 Τροποποίηση Λιπιδίων – Lipid Modification

Σε αυτόν τον τρόπο δράσης, οι επιταχυντές τροποποιούν την οργάνωση των λιπιδικών διπλοστοιβάδων της κεράτινης στοιβάδας με αποτέλεσμα την αύξηση τόσο της διαπερατότητας του δέρματος όσο και του συντελεστή διάχυσης της ΦΔΟ. Οι επιταχυντές διαβατότητας πιστεύεται πως αλληλεπιδρούν με τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες σε τρία κύρια σημεία: (Lane, et al., 2012)

- Στις πολικές ομάδες των λιπιδίων (Λαουροκαπράμη – Azone<sup>®</sup>)
- Στις υδάτινους τομείς των λιπιδικών διπλοστοιβάδων (Προπυλενογλυκόλη, Transcutol<sup>®</sup>, N-methyl pyrrolidone – NMP)

- Στις αλκυλικές αλυσίδες των λιπιδίων (Ολεϊκό οξύ, Isopropyl Myristate – IPM)

### 8.3.2.2 Τροποποίηση Πρωτεϊνών – Protein Modification

Ένας άλλος τρόπος δράσης των επιταχυντών είναι η αλληλεπίδραση με την κερατίνη στα κερατινοκύτταρα. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στις πρωτεΐνες, διαταραχή στην οργάνωση των κερατινοκυττάρων, μετουσίωση ή τροποποίηση της κερατίνης και τέλος δημιουργία καναλιών. Άμεση συνέπεια είναι η αύξηση της διαπέρασης των ΦΔΟ διαμέσου της κερατίνης στοιβάδας. (Benson, 2005)

### 8.3.2.3 Βελτίωση Κατανομής – Partitioning Promotion

Ορισμένοι διαλύτες όπως η αιθανόλη, η προπυλενογλυκόλη και το Transcutol<sup>®</sup> μπορούν να διεισδύσουν στην κερατίνη στοιβάδα και να τροποποιήσουν τις χημικές της ιδιότητες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της κατανομής καθώς και της διαλυτότητας της ΦΔΟ στην κερατίνη στοιβάδα.

Εκτός από το ότι επηρεάζουν άμεσα το δέρμα με τους τρόπους δράσης που αναφέρθηκαν, και ενισχύουν τη διαδερμική απορρόφηση ΦΔΟ, οι επιταχυντές διαβατότητας μπορούν να τροποποιήσουν το φαρμακευτικό σκεύασμα και να δράσουν έμμεσα στην ενίσχυση της διαπερατότητα μέσω του δέρματος. Συγκεκριμένα, μπορούν να: (Dragicevic, et al., 2015)

- Τροποποιήσουν τη θερμοδυναμική δραστηριότητα του φορέα του σκευάσματος, γνωστό ως φαινόμενο ώθησης (push effect).
- Τραβήξουν τη ΦΔΟ μαζί τους κατά τη διαπέραση του δέρματος, γνωστό ως drag effect.
- Διαλυτοποιήσουν τη ΦΔΟ στο σκεύασμα μέσω του σχηματισμού μικκυλίων.

## 8.4 Παράκαμψη ή Αφαίρεση της Κερατίνης Στοιβάδας

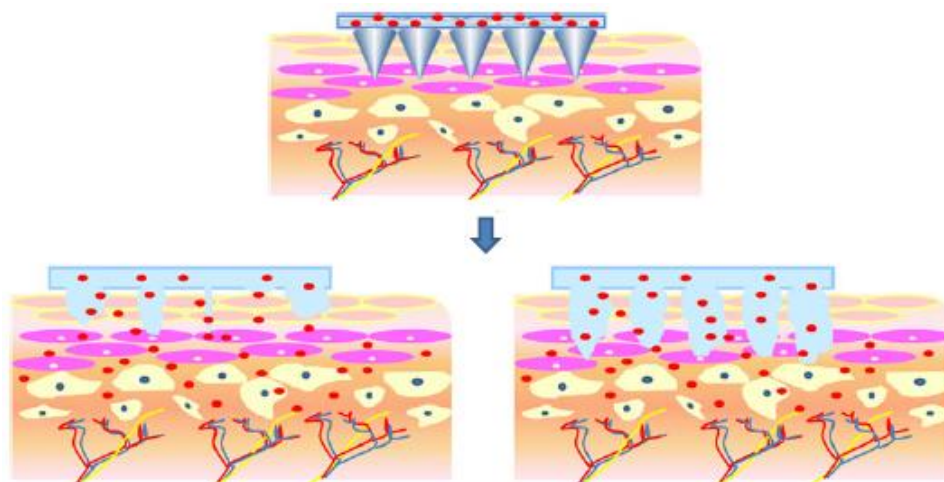
### 8.4.1 Διάταξη Μικροσκοπικών Βελόνων

Η σημαντικότερη πρόοδος στη διαδερμική χορήγηση ΦΔΟ τα τελευταία χρόνια είναι η ανάπτυξη της τεχνολογίας των συστημάτων μικροβελόνων. Οι μικροσκοπικές αυτές βελόνες επιτυγχάνουν την άνευ πόνου διάτρηση των επιφανειακών στοιβάδων του δέρματος, ώστε να αποφεύγεται η επαφή με τους υποδοχείς του πόνου που βρίσκονται στη δερμο-επιδερμική ένωση, προκειμένου να ενισχυθεί η διαπερατότητα θεραπευτικών παραγόντων.

Οι βελόνες ποικίλλουν σημαντικά στον σχεδιασμό τους. Τα πρωταρχικά συστήματα περιείχαν βελόνες οι οποίες, αφού είχαν διαπεράσει το δέρμα, απομακρύνονταν και ακολούθως εφαρμόζοταν ένα φαρμακευτικό σκεύασμα στην ίδια θέση. Νεότερα σχέδια αποτελούνται είτε από πορώδεις βελόνες μέσω των οποίων η ΦΔΟ μπορεί να διαχέεται μόλις διαπεραστεί ο φραγμός του δέρματος είτε από βελόνες που κατασκευάζονται από συνθετικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων και ΦΔΟ, που διαλύονται *in situ*, επιτυγχάνοντας ελεγχόμενη αποδέσμευση. (Moss, 2015)

Οι (Coulman, et al., 2006) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν μικροβελόνες σιλικόνης για γονιδιακή θεραπεία. Έπειτα, οι (Martin, et al., 2012) ανέφεραν την κατασκευή βιοαποικοδομήσιμων μικροβελόνων από έναν τύπο ζάχαρης, συγκεκριμένα "sugar glass", οι οποίες έδειξαν ότι ήταν σε θέση να διευκολύνουν τη διαδερμική διαπέραση ενός ευρέος φάσματος ΦΔΟ. Πιο πρόσφατα, οι (Donnelly, et al., 2014) κατασκεύασαν μικροβελόνες ικανές

είτε να διαλύονται (dissolving) είτε να σχηματίζουν υδρογέλες (hydrogel forming) μέσα στο δέρμα μετά την είσοδό τους, ώστε να απελευθερώνουν τις ΦΔΟ.



Σχήμα 8.5: Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού χορήγησης ΦΔΟ από συστήματα μικροβελονών (Donnelly, et al., 2014) – Αριστερά: Dissolving, Δεξιά: Hydrogel forming

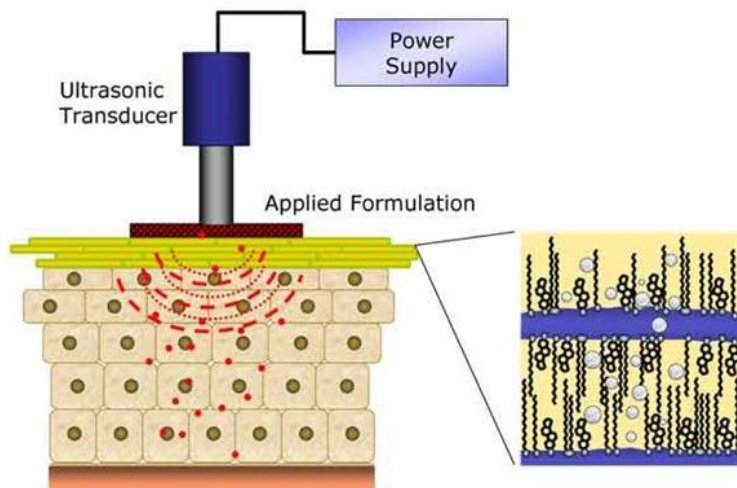
#### 8.4.2 Αφαίρεση Κεράτινης Στοιβάδας

Καθώς η κεράτινη στοιβάδα αποτελεί τον κυρίαρχο φραγμό του δέρματος, η απλούστερη μέθοδος υπέρβασής της είναι η αφαίρεσή της. Αυτό έχει επιτευχθεί με μια σειρά μεθόδων, τις αποκαλούμενες «χημικές φλούδες» που απομακρύνονται τα επιφανειακά στρώματα της επιδερμίδας, τη δερμοαπόξεση όπου το δέρμα αφαιρείται με μια κυλινδρική συσκευή λείανσης, τη μικροδερμοαπόξεση, η οποία χρησιμοποιεί ένα ρεύμα κρυστάλλων οξειδίου του αργιλίου και την αφαίρεση με λέιζερ. Η τελευταία αυτή μέθοδος χρησιμοποιεί λέιζερ υψηλής ισχύος για την απομάκρυνση της κεράτινης στοιβάδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας σε επίπεδα παρόμοια με αυτό που παρατηρείται με την τεχνική tape stripping. Ωστόσο, δεδομένης της φύσης των μεθόδων που περιγράφηκαν, γίνεται ελάχιστη χρήση τους σε κλινικό επίπεδο. (Moss, 2015)

### 8.5 Ηλεκτρικά Υποβοηθούμενες Τεχνικές

#### 8.5.1 Υπέρηχοι (Ultrasound – Phonophoresis – Sonophoresis)

Το 1954 έγινε η πρώτη αναφορά σε επιτυχή αντιμετώπιση ενός τύπου πολυαρθρίτιδας με τη χρήση υδροκορτιζόνης σε συνδυασμό με υπέρηχηση. Μισό αιώνα περίπου αργότερα, η τεχνική αυτή που είναι πλέον γνωστή με τους όρους sonophoresis ή phonophoresis, έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για τη διαδερμική χορήγηση. Οι υπέρηχοι, ειδικά στις συχνότητες μεταξύ 20 και 100 kHz, έχουν δείξει ότι ενισχύουν σημαντικά τη διαπέραση ΦΔΟ μέσω του δέρματος και για αυτό ευθύνονται οι απλές ταλαντώσεις που αποτελούν τα πρωταρχικά αποτελέσματα της καθώς και τα πιο σημαντικά δευτερεύοντα αποτελέσματα, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας και η δημιουργία ελεύθερων ριζών. (Mitragotri, 2005)



Σχήμα 8.6: Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ΦΔΟ με υπερήχηση (Patel, et al., 2010)

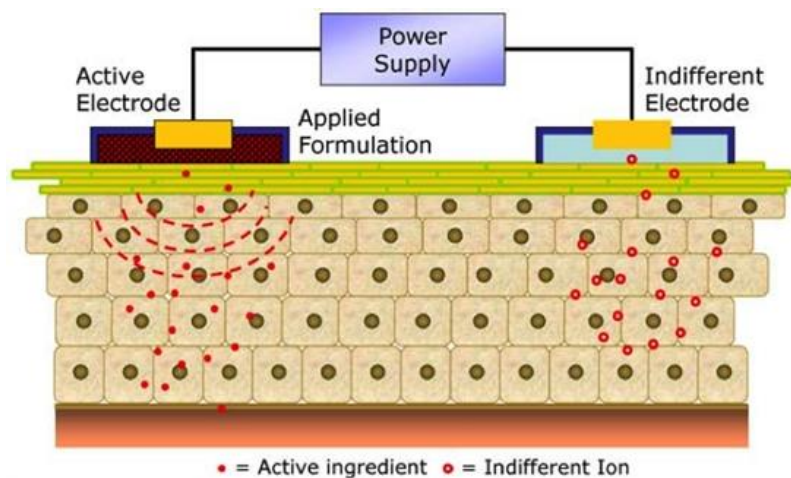
όπως αυτή των (Krishnan, et al., 2012) επιβεβαιώνουν την αξία της μεθόδου ενίσχυσης αυτής. (Ogura, et al., 2008)

Η υπερήχηση λοιπόν θα μπορούσε να γίνει είτε για σύντομο χρονικό διάστημα πριν την εφαρμογή της ΦΔΟ είτε με την ταυτόχρονη εφαρμογή τους, ΦΔΟ και υπερήχων, στο δέρμα. Ανεξάρτητα όμως από τη μέθοδο που θα ακολουθηθεί, η ενίσχυση της διαπερατότητας καθορίζεται από τέσσερις κύριες παραμέτρους της υπερήχησης, οι οποίες είναι η συχνότητα, η ένταση, ο κύκλος λειτουργίας και ο χρόνος εφαρμογής. Πρόσφατες μελέτες,

### 8.5.2 Ιοντοφόρηση (Iontophoresis)

Η ιοντοφόρηση επιτυγχάνεται με τη εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού μικρής έντασης ( $\approx 0,5 \text{ mA/cm}^2$ ) διαμέσου ενός ηλεκτροδίου που βρίσκεται σε συνεχή επαφή με το δέρμα και περιέχει τα φορτισμένα μόρια της ΦΔΟ. Τα θετικά φορτισμένα, συνήθως άλατα ασθενών οργανικών βάσεων, οδηγούνται στο θετικό ηλεκτρόδιο ή άνοδο, ενώ τα αρνητικά φορτισμένα, όπως τα άλατα οργανικών οξέων, μεταφέρονται από την αρνητικά φορτισμένη κάθοδο. Τέλος, ένα ακόμη ηλεκτρόδιο, σε διαφορετικό σημείο του δέρματος, χρησιμεύει για τη δημιουργία κλειστού κυκλώματος. (Moss, 2015)

Με την παρουσία ηλεκτρικού πεδίου, τα κατιόντα κινούνται από την άνοδο προς την επιφάνεια του δέρματος και τα ανιόντα αντίστοιχα από την κάθοδο. Ταυτόχρονα, ενδογενή ιόντα κινούνται από το δέρμα προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Αυτή η διαταγμένη κίνηση των ιόντων προς και από τα δύο ηλεκτρόδια ονομάζεται ηλεκτρομετακίνηση (electro migration) και είναι ο κύριος μηχανισμός μεταφοράς που είναι υπεύθυνος για τη βελτίωση της διαπέρασης ΦΔΟ. Ωστόσο, το δέρμα έχει ισοηλεκτρικό σημείο (pI) περίπου 4 pH, γεγονός που σημαίνει ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι αρνητικά φορτισμένο και ευνοεί τη μεταφορά κατιόντων και εξαιτίας αυτού λέγεται ότι δρα ως κατιο-εκλεκτική μεμβράνη. Αυτή η εκλεκτικότητα καταλήγει σε μια ροή μεταφοράς προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου καθόδου, η οποία δημιουργεί



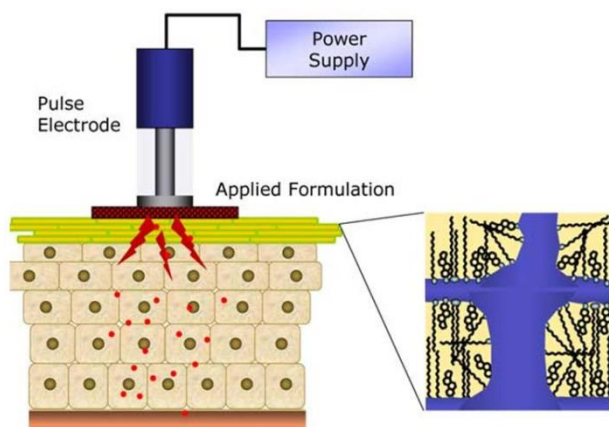
Σχήμα 8.7: Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ΦΔΟ με ιοντοφόρηση (Patel, et al., 2010)

ένα δεύτερο μηχανισμό, την ηλεκτρο-όσμωση (electro osmosis), που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για τη μεταφορά μη φορτισμένων μορίων και μεγάλων πολικών πεπτιδίων από την άνοδο είτε για την εξαγωγή ενδογενών μορίων, όπως η γλυκόζη, στην επιφάνεια του δέρματος (αντίστροφη ιοντοφόρηση). Τα κατιόντα λοιπόν από την άνοδο επωφελούνται και από τους δυο μηχανισμούς με τη σχετική συνεισφορά τους να εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ΦΔΟ και τη σύνθεση του σκευάσματος. Αντίθετα, τα ανιόντα από την κάθοδο αντιτίθεται στον μηχανισμό της ηλεκτρο-όσμωσης (Gratieri & Kalia, 2013). Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός μεταφοράς είναι αυτός της παθητικής διάχυσης που ενισχύεται από τις δομικές μεταβολές του δέρματος εξαιτίας του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, οι οποίες αντιστοιχούν στην αποδιοργάνωση πρωτεϊνών και λιπιδίων της κεράτινης στοιβάδας δημιουργώντας πόρους, και διευκολύνει τη μεταφορά ιόντων. (Gratieri & Kalia, 2017)

Εξαιρετικό πλεονέκτημα της ιοντοφόρησης αποτελεί η ικανότητα ελέγχου της κινητικής χορήγησης της ΦΔΟ. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα προσδιορίζονται από την ένταση και τη διάρκεια του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού δυναμικού και μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν. Όσον αφορά την ασφάλεια της τεχνικής αυτής όμως, αν και η φαινόμενη πυκνότητα του ρεύματος ανά μονάδα επιφάνειας είναι μικρή, η μεγαλύτερη ποσότητα ρεύματος διέρχεται διαμέσου οδών με μικρή αντίσταση, όπως οι θύλακες των τριχών. Αποτέλεσμα λοιπόν της συσσώρευσης του ρεύματος είναι η πιθανή καταστροφή της αναπτυσσόμενης τρίχας. Επιπλέον, εκφράζονται ανησυχίες για πιθανές μη αντιστρεπτές αλλαγές στο δέρμα. (Barry, 2001)

### 8.5.3 Ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation)

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια τεχνική ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης ΦΔΟ που συνεπάγεται την εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης (10 – 1000 V) για



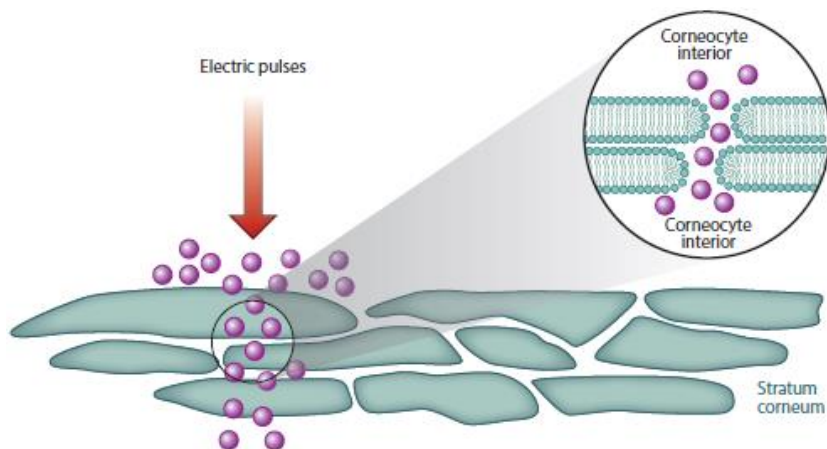
Σχήμα 8.8: Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ΦΔΟ με ηλεκτροδιάτρηση (Jijie, et al., 2017)

εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα. Η μέθοδος αυτή μπορεί να μην παρουσιάζει σημαντική διαφορά σε σχέση με τις άλλες μεθόδους ως προς τα επίπεδα ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης μικρών ιόντων ή μορίων, αλλά παρουσιάζει δραματικά υψηλότερη ροή (flux) μακρομορίων, όπως πεπτιδία και γονιδιακά φάρμακα, μετατρέποντάς τα σε υποψηφίους για διαδερμική χορήγηση όπως στη μελέτη των (McCoy, et al., 2014). Επίσης, όπως και στην περίπτωση της ιοντοφόρησης, είναι δυνατός ο έλεγχος της ποσότητας και της κινητικής

χορήγησης των διαφόρων ΦΔΟ καθορίζοντας της εφαρμοζόμενη τάση. (Medi, et al., 2017)

Παρόλο που ο λεπτομερής μηχανισμός της ηλεκτροδιάτρησης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, η εφαρμογή ισχυρών ηλεκτρικών παλμών στα κύτταρα και τους ιστούς είναι γνωστό ότι προκαλεί κάποιο είδος δομικής αναδιάταξης. Πιο συγκεκριμένα, σε σχετικά χαμηλές τάσεις (< 30 V), η ενίσχυση της διαδερμικής διαπερατότητας είναι περιορισμένη και μπορεί να αποδοθεί κυρίως στα εξαρτήματα του δέρματος. Η εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλότερης τάσης όμως έχει ως αποτέλεσμα μια δραματική αύξηση της διαδερμικής

διαπερατότητας που σχετίζεται με διαταραχή της ιδιότητας φραγμού, μέσω σχηματισμού υδάτινων πόρων μεταξύ των λιπιδικών διπλοστοιβάδων όπως φαίνεται στο σχήμα 8.9, και αύξηση της θερμοκρασίας της κεράτινης στοιβάδας. (Yarmush, et al., 2014)

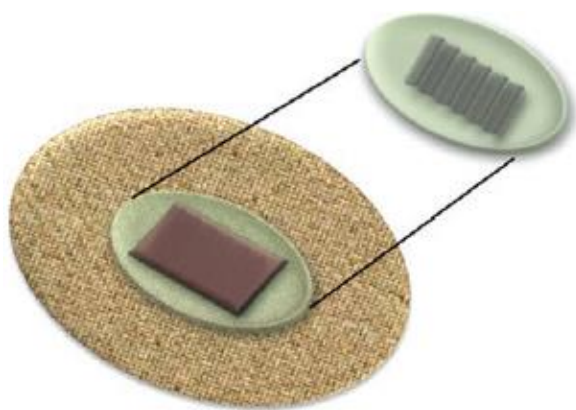


Σχήμα 8.9: Σχηματική απεικόνιση επίδρασης ηλεκτρικών παλμών στην κεράτινη στοιβάδα (Yarmush, et al., 2014)

#### 8.5.4 Μαγνητοφόρηση (Magnetophoresis – Magnetoporation)

Η εφαρμογή της μαγνητοφόρησης ως στρατηγική φυσικής ενίσχυσης για τη διαδερμική απορρόφηση ΦΔΟ αποτελεί μια νέα και ενδιαφέρουσα προοπτική. Ο Murthy και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που παρατήρησαν ότι εφαρμογή μαγνητικού πεδίου από μόνιμους μαγνήτες ισχύος περίπου 25 mT ενίσχυσε τη διαπέραση του βενζοϊκού οξέος μέσω της επιδερμίδας αρουραίων. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι η ενίσχυση οφειλόταν κυρίως στην αυξημένη διαμαγνητική ροή, καθώς το βενζοϊκό οξύ έχει υψηλή διαμαγνητική ευαισθησία ( $-70,3 \times 10^{-6}$  cgs). Είναι δηλαδή ιδιαίτερα πιθανό να απομακρυνθεί από τον μαγνήτη και να οδηγηθεί στο δέρμα κατά μήκος της κατεύθυνσης του μαγνητικού πεδίου. Παρόλο που η ενίσχυση της διαδερμικής διαπερατότητας είναι ευθέως ανάλογη της ισχύος του μαγνητικού πεδίου, υποδηλώνοντας ότι η διαμαγνητική ροή είναι ο πιθανός μηχανισμός της μαγνητοφόρησης, ο Murthy και οι συνεργάτες του δεν απέκλεισαν τη δυνατότητα ύπαρξης και άλλων μηχανισμών όπως τη μαγνητο-υδροκίνηση ή τη διαταραχή της λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στοιβάδας λόγω του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. (Maurya, et al., 2015)

Ακολούθησε μια σειρά εκτενέστερων μελετών για την υδροχλωρική λιδοκαΐνη με σκοπό την περαιτέρω αποσαφήνιση του μηχανισμού ενίσχυσης από τα στατικά μαγνητικά πεδία (Murthy, et al., 2010). Διεξήχθησαν in vitro μελέτες σε δέρμα χοίρου με κύτταρα διάχυσης τύπου Franz υπό την εφαρμογή μαγνητικών πεδίων ισχύος 30, 150 και 300 mT, όπου και επιβεβαιώθηκαν οι προηγούμενες αναφορές τους πως η ενίσχυση της διαδερμικής διαπερατότητας αυξήθηκε με την αύξηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Επιπλέον, δεν εντοπίστηκε καμία ένδειξη μεταβολής του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας, αλλά αποδείχθηκε η πρόταση πως η μαγνητο-



Σχήμα 8.10: ΔΘΣ μαγνητοφόρησης (Benson, et al., 2017)

υδροκίνηση συμβάλλει στην ενίσχυση από το εφαρμοζόμενο στατικό μαγνητικό πεδίο καθώς διευκολύνει τη μεταφορά υδατοδιαλυτών συστατικών μέσω της κίνηση μορίων νερού κατά μήκος του δέρματος. Τέλος, στην ίδια μελέτη, κατασκευάστηκε το ΔΘΣ που απεικονίζεται στο σχήμα 8.10, το οποίο δοκιμάστηκε σε αρουραίους με τη διαπερατότητα τόσο της λιδοκαΐνης βάσης όσο και της υδροχλωρικής να αυξάνονται ύστερα από αξιολόγηση με την τεχνική της μικροδιαπίδυσης σε κατάσταση ισορροπίας. (Benson, et al., 2017)

Σε αντίθεση με τις μελέτες που πραγματοποίησε ο Murthy με την ομάδα του, ο Benson και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν παλμικά ηλεκτρομαγνητικά πεδία (Pulsed Electromagnetic Fields – PEMFs) για την ενίσχυση της διαπερατότητας της ναλτρεξόνης μέσω του ανθρώπινου δέρματος. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι εναλλασσόμενα μαγνητικά πεδία βραχείας διάρκειας (400  $\mu$ s) και χαμηλής ισχύος ( $\approx$  5 mT) ενισχύουν τη διαδερμική απορρόφηση ΦΔΟ με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των στατικών μαγνητικών πεδίων. Ωστόσο, ως κυρίαρχο μηχανισμό ενίσχυσης αυτού του τύπου μαγνητικών πεδίων ανέφεραν τη διαταραχή της οργάνωσης των λιπιδίων της επιδερμίδας εξαιτίας της αύξησης της θερμοκρασίας κατά την εφαρμογή τους. (Krishnan, et al., 2012)

### 8.5.5 Ραδιοκύματα (Radio Waves – Radiofrequency)

Η εφαρμογή ραδιοσυχνοτήτων (Radiofrequency) για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης ΦΔΟ περιλαμβάνει την τοποθέτηση ενός λεπτού ηλεκτροδίου στην επιφάνεια του δέρματος και την εφαρμογή εναλλασσόμενου ρεύματος υψηλής συχνότητας (100 – 500



**Σχήμα 8.11:** Σύστημα διαδερμικής χορήγησης αποτελούμενο από τη συσκευή Viador™, τη συστοιχία ηλεκτροδίων μιας χρήσης και ένα patch (Levin, 2017)

kHz). Οι ιονικές δονήσεις εξαιτίας της έκθεσης στην ενέργεια των ραδιοσυχνοτήτων, έχουν ως αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της θερμοκρασίας, την εξάτμιση υγρών και τη λύση της συνέχειας της κεράτινης στοιβάδας. Άμεση συνέπεια είναι η δημιουργία υδάτινων καναλιών (RF-micro channels) κατά μήκος της κεράτινης στοιβάδας μέσω των οποίων μπορούν να διαπεράσουν φορτισμένες ή ουδέτερες ΦΔΟ υψηλού μοριακού βάρους. Εξαιρετικής σημασίας επίσης είναι το γεγονός πως τα κανάλια αυτά δεν φθάνουν στις υποκείμενες νευρικές απολήξεις και στα αιμοφόρα αγγεία ελαχιστοποιώντας έτσι τη νευρική διέγερση και τον κίνδυνο τραυματισμού του δέρματος. (Kim, et al., 2012)

Η δημιουργία των υδάτινων καναλιών ύστερα από έκθεση σε ενέργεια ραδιοσυχνοτήτων επιβεβαιώθηκε πρώτη φορά στη μελέτη των (Sinton, et al., 2003) για την

ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης υδρόφιλων ΦΔΟ. Η γεννήτρια των ραδιοσυχνοτήτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια ιατρική συσκευή, γνωστή ως ViaDerm™ που πλέον συναντάται ως ViaDor™, η οποία αναπτύχθηκε από την TransPharma Medical στο Ισραήλ.

Τη μελέτη αυτή ακολούθησαν και άλλες με αποκορύφωμα τις κλινικές δοκιμές φάσεις I για την παροχή αυξητικής ορμόνης σε ενήλικες με ανεπάρκεια και φάσης II για την παροχή παραθυρεοειδούς ορμόνης ως θεραπεία για την οστεοπόρωση μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών. (Banga, 2009)

### 8.5.6 Θερμική Απομάκρυνση (Thermal Ablation)

Η τεχνική της θερμικής απομάκρυνσης περιλαμβάνει την εφαρμογή θερμότητας στο δέρμα για εξαιρετικά μικρό χρονικό διάστημα προκαλώντας εντοπισμένη εξάτμιση της κεράτινης στοιβάδας, χωρίς να βλάπτονται τα βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Αποτέλεσμα της τοπικής απομάκρυνσης της κεράτινης στοιβάδας είναι η δημιουργία υδάτινων πόρων διαμέτρου 50 – 200 μm και βάθους 30 – 50 μm. (Zhou, et al., 2017)

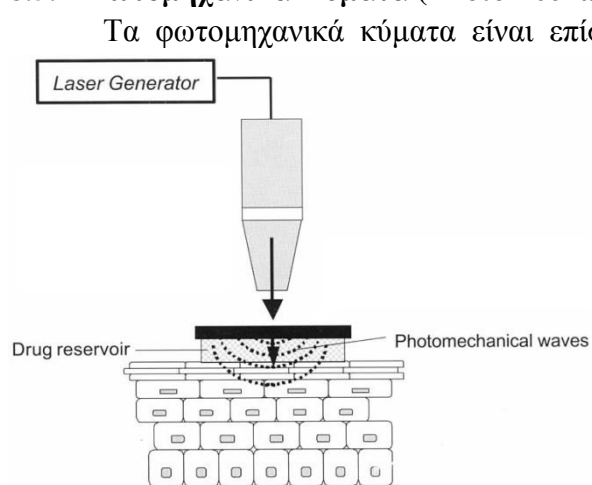
Το σύστημα Passport<sup>®</sup>, που αναπτύχθηκε από την εταιρία Altea Therapeutics και ανήκει πλέον στην εταιρία Nitto Denko, συνδυάζει την τεχνολογία θερμικής απομάκρυνσης με αυτήν των διαδερμικών εμπλάστρων. Η συσκευή θερμοφόρησης ή θερμικής αφαίρεσης αποτελείται από σύρματα τα οποία θερμαίνονται παροδικά με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και έπειτα έρχονται σε επαφή με το δέρμα. Ακολούθως, το έμπλαστρο που περιέχει τη ΦΔΟ εφαρμόζεται στην περιοχή και έτσι ενισχύεται η διαδερμική απορρόφησή της μέσω των παροδικά σχηματισμένων πόρων. (Levin, 2017)



Σχήμα 8.12: Σύστημα διαδερμικής χορήγησης Passport<sup>®</sup> (Nitto Denko Corporation, 2016)

Η τεχνική αυτή έχει μελετηθεί για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης διαφόρων ΦΔΟ και μακρομορίων όπως οι ιντερφερόνες (Badkar, et al., 2007), η ινσουλίνη (κλινικές δοκιμές φάσης I), η φαιντανύλη και η υδροχλωρική υδρομορφίνη. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί πως στη μελέτη των (Smith, et al., 1999) παρουσιάστηκε και η πιθανή της χρήση στη διάγνωση και συγκεκριμένα στην παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ασθενών. (Banga, 2009)

### 8.5.7 Φωτομηχανικά Κύματα (Photomechanical Waves – Laser)



Σχήμα 8.13: Σχηματική απεικόνιση χορήγησης ΦΔΟ με φωτομηχανικά κύματα (Cross & Roberts, 2004)

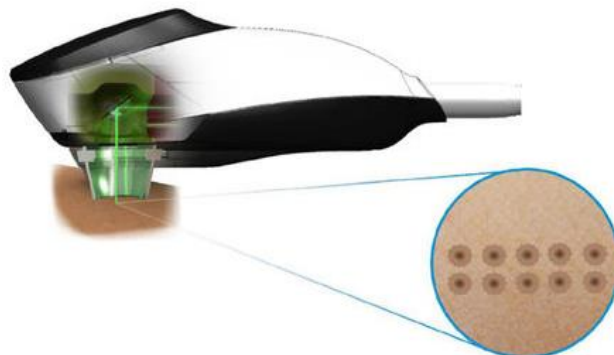
διαμέτρου 150 – 200 μm χωρίς να προκαλούν πόνο ή δυσφορία. Ο αριθμός και το μέγεθος των

λείζερ. Ένα μονό φωτομηχανικό κύμα είναι ικανό να διαταράξει τη λειτουργία φραγμού της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας μέσω αποδιοργάνωσης των λιπιδικών διπλοστοιβάδων της, χωρίς να επηρεάσει δυσμενώς τη βιωσιμότητα και τη δομή της επιδερμίδας και του χόριου. Τα φωτομηχανικά κύματα λοιπόν μπορούν να καταστήσουν την κεράτινη στοιβάδα περισσότερο διαπερατή σε ΦΔΟ και μακρομόρια προκαλώντας στιγμιαία εξάτμιση του περιεχόμενου νερού με αποτέλεσμα το σχηματισμό παροδικών κυλινδρικών διαύλων



διαύλων αυτών μπορεί να ελεγχθεί αποτελεσματικά ρυθμίζοντας το μήκος κύματος και τη χρονική διάρκεια εφαρμογής. (Patel, et al., 2010)

Η γερμανική εταιρία Pantec Biosolutions ανέπτυξε την τεχνολογία P.L.E.A.S.E.<sup>®</sup> (Painless Laser Epidermal System) η οποία χρησιμοποιεί λέιζερ που εκπέμπει στα 2940 nm, μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο κύριο μήκος κύματος απορρόφησης των μορίων του νερού. Ενσωμάτωσε λοιπόν την τεχνολογία αυτή σε δύο τύπους συσκευών, την Professional για χρήση στη συμβατική ή αισθητική δερματολογία εντός ιατρείου ή κλινικής και την Private που βρίσκεται σε εξέλιξη ως οικιακή συσκευή για χρήση σε συνδυασμό με διαδερμικά έμπλαστρα για χορήγηση ΦΔΟ μεγάλου μοριακού βάρους. Οι (Bachhav, et al., 2010) μελέτησαν την τεχνολογία αυτή και επιβεβαίωσαν τη λειτουργικότητά της ως μέθοδο ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης ΦΔΟ χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μόριο τη λιδοκαΐνη. (Levin, 2017)



**Σχήμα 8.14:** Σύστημα διαδερμικής χορήγησης P.L.E.A.S.E.<sup>®</sup>  
(Pantec Biosolutions AG, 2018)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9<sup>ο</sup>: Πειραματικές Μέθοδοι Μελέτης της Διαδερμικής Απορρόφησης

---

Κατά την τελευταία δεκαπενταετία ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στην τυποποίηση και επικύρωση των πειραματικών μοντέλων σχετικά με τη διαδερμική απορρόφηση εξαιτίας της ανάγκης για αξιόπιστα δεδομένα. Αδιαμφισβήτητα, τα πιο συναφή προέρχονται από *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους, τα οποία είναι απαραίτητα και για την αξιολόγηση *in vitro* δοκιμασιών και μαθηματικών μοντέλων ως εναλλακτικών μεθόδων. Ωστόσο, ο αριθμός τους είναι ιδιαίτερα περιορισμένος γεγονός που εξηγείται κατά κύριο λόγο από ηθικούς (απαραίτητη έγκριση από επιτροπή δεοντολογίας) και πρακτικούς περιορισμούς, καθώς παραδοσιακά οι *in vivo* μέθοδοι είναι είτε επεμβατικές είτε απαιτούν εκτεταμένο χρόνο προετοιμασίας και ανάλυσης των δειγμάτων. Οι δυσκολίες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη εξαιρετικών *in vitro* μεθόδων για την αξιολόγηση της διαπερατότητας του δέρματος. Το ερώτημα ποια μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση μπορεί να απαντηθεί λαμβάνοντας υπόψη τον σκοπό της εκάστοτε μελέτης καθώς όλες χαρακτηρίζονται από μια σειρά πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που τις καθιστούν ξεχωριστές. (Kezic, 2008)

### 9.1 Τεχνικές In Vivo

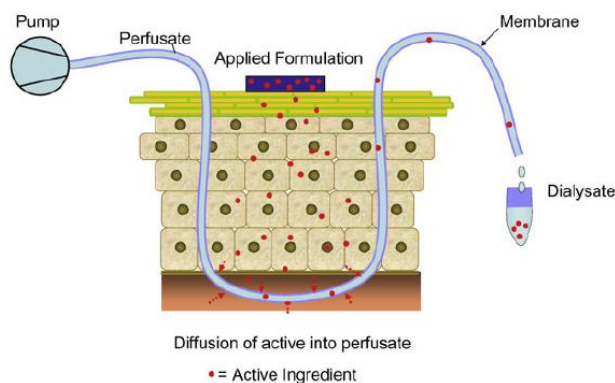
Οι *in vivo* τεχνικές βασίζονται σε ένα φυσιολογικά και μεταβολικά ενεργό σύστημα το οποίο μπορεί να είναι είτε ο άνθρωπος είτε κάποιο ζώο. Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ζώο είναι ο αρουραίος, αν και είναι γνωστό πως οι μελέτες αυτές γενικά υπερεκτιμούν την απορρόφηση του ανθρώπινου δέρματος (ECETOC, 1993). Άλλα ζώα εμφανίζουν αρκετά καλύτερη αντιστοιχία με τη διαδερμική απορρόφηση, αλλά το κόστος αυτών είναι σημαντικά υψηλότερο και εγείρονται σημαντικά ηθικά ζητήματα με τη χρήση τους. Οι μελέτες σε ανθρώπους είναι προτιμότερες προκειμένου να αποφευχθεί η επέκταση των δεδομένων μεταξύ των διαφορετικών ειδών, αλλά όπως ήδη αναφέρθηκε υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί.

Ο (OECD, 2004) εξέδωσε κατευθυντήρια οδηγία για τη δοκιμή χημικών ουσιών με μεθόδους *in vivo*. Οι βασικές αρχές που περιγράφηκαν ήταν η εφαρμογή της υπό δοκιμή ουσίας στο δέρμα σε κατάλληλη φαρμακοτεχνική μορφή και για καθορισμένο χρονικό διάστημα, η δειγματοληψία σωματικών υγρών, εκκρίσεων ή ιστών σε συγκεκριμένους χρόνους και η ποσοτικοποίηση της υπό δοκιμή ουσίας ή των μεταβολιτών της στα δείγματα με κατάλληλη και ταυτόχρονα αρκετά ευαίσθητη αναλυτική μέθοδο.

Ως η πιο κλασική τεχνική *in vivo* χαρακτηρίζεται ο προσδιορισμός των επιπέδων της ΦΔΟ ή των μεταβολιτών της στο πλάσμα/αίμα ή τα ούρα μετά από τη διαδερμική χορήγηση, επιτρέποντας τον προσδιορισμό τυπικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων, όπως  $C_{max}$  και AUC. Ωστόσο, για μελέτες στα αρχικά στάδια ανάπτυξης φαρμακευτικών σκευασμάτων μια τέτοια προσέγγιση είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα, δαπανηρή και ίσως να μην εξασφαλίσει την έγκριση των αρμόδιων επιτροπών. (Williams, 2013)

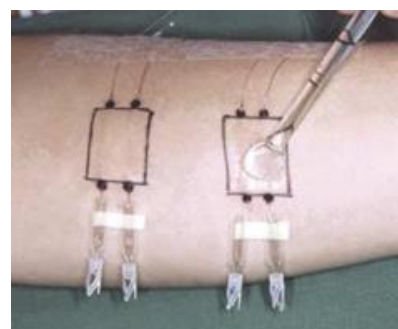
Η μικροδιαπίδυση σε κατάσταση ισορροπίας είναι η μοναδική μέχρι στιγμής *in vivo* τεχνική που παρέχει πληροφορίες από τον εξωκυττάριο χώρο ζωντανού ιστού, όπως το δέρμα, και επομένως έχει μεγάλη σημασία στη διερεύνηση των φαρμακολογικών και βιοχημικών διαδικασιών. Χρησιμοποιείται ευρέως τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε ανθρώπους, στην

ιατρική για τη δειγματοληψία και τον προσδιορισμό ενδογενών και εξωγενών ουσιών



**Σχήμα 9.1:** Σχηματική απεικόνιση μικροδιαπίδωσης σε κατάσταση ισορροπίας (Uchechi, et al., 2014)

Η τεχνική αυτή λοιπόν περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός ημιπερατού σωλήνα – καθετήρα στο δέρμα, παράλληλα στο σημείο εφαρμογής όπως φαίνεται και στο σχήμα 9.2, ο οποίος έχει ως σκοπό να μιμηθεί τη λειτουργία ενός μικρού αιμοφόρου αγγείου. Ακολούθως, η ΦΔΟ εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος και τα μόρια αυτής που θα το διαπεράσουν συλλέγονται εντός του σωλήνα καθώς αποτελείται από ημιπερατή δομή η οποία επιτρέπει στα μόρια να διέρχονται μέσω παθητικής διάχυσης. Το περιεχόμενο αυτό τέλος αντλείται συνεχώς και με σταθερό ρυθμό, συλλέγεται σε κατάλληλους περιέκτες και οδηγείται προς ανάλυση.



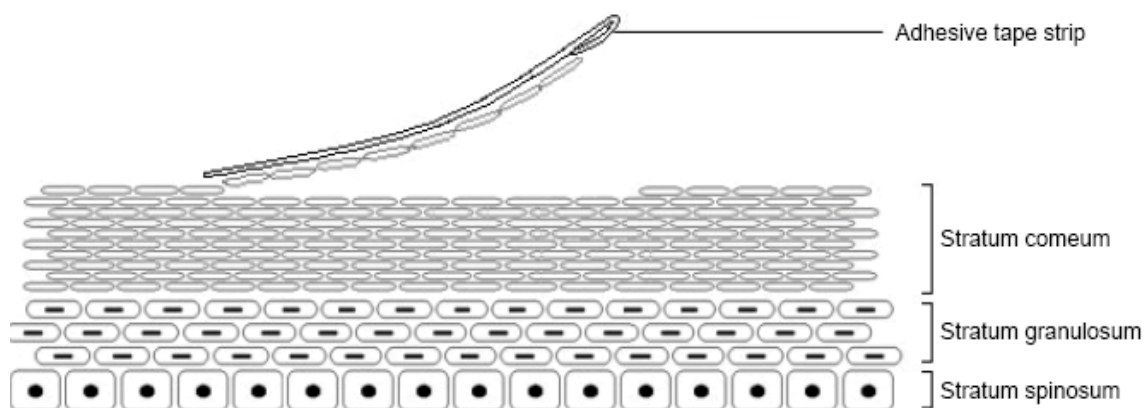
**Σχήμα 9.2:** In situ εφαρμογή (Benfeldt, et al., 2007)

Από τα πλεονεκτήματά της, ξεχωρίζει η δυνατότητα εκτίμησης μεταβολιτών ενώ από τα μειονεκτήματα, το υψηλό κόστος του εξοπλισμού καθώς και η ιδιαίτερα απαιτητική και εξειδικευμένη εκπαίδευση εισαγωγής του σωλήνα – καθετήρα. (Joukhadar & Müller, 2005)

Εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί το tape stripping του δέρματος, γνωστή και ως δερματοφαρμακοκινητική (Dermatopharmacokinetic – DPK) μέθοδος. Χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα χρήσιμη για την αξιολόγηση της τοπικής βιοδιαθεσιμότητας ΦΔΟ στην κεράτινη στοιβάδα ύστερα από δερματολογική θεραπεία, όπως στη μελέτη των (Lboutounne, et al., 2002) για την χλωρεξιδίνη. Ουσιαστικά, ένα σκεύασμα ΦΔΟ (συχνά ραδιενεργά επισημασμένης) εφαρμόζεται σε μια περιοχή του δέρματος για καθορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια, όσο δεν έχει απορροφηθεί, απομακρύνεται. Ακολούθως, η εκτεθειμένη κεράτινη στοιβάδα απομακρύνεται διαδοχικά χρησιμοποιώντας κολλητική ταινία και η περιεχόμενη ΦΔΟ σε κάθε λωρίδα της ταινίας προσδιορίζεται αναλυτικά με στόχο να χτιστεί ένα προφίλ. Έχει αποδειχθεί πως το 90% περίπου της συγκέντρωσης της ΦΔΟ βρίσκεται στις πρώτες δέκα λωρίδες, ενώ οι επόμενες δέκα συνεισφέρουν σε ποσοστό λιγότερο από 5%. Επειδή κάθε λωρίδα όμως μπορεί να απομακρύνει διαφορετικές ποσότητες κεράτινης στοιβάδας, τα επίπεδα της ΦΔΟ μπορούν να ομαλοποιηθούν σύμφωνα με την αντίστοιχη περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε κάθε λωρίδα. (Kezic, 2008)

Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί έναντι των υπόλοιπων in vivo καθώς είναι ιδιαίτερα φθηνή, απλή και ελάχιστα επεμβατική, δεδομένου ότι αφαιρούνται μόνο τα νεκρά κερατινοκύτταρα, ενώ όπως και η τεχνική της μικροδιαπίδωσης σε κατάσταση ισορροπίας μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και στον άνθρωπο. Βασικό μειονέκτημα όμως αποτελεί η

αυξημένη μεταβλητότητα εξαιτίας των διαφορετικών τύπων κολλητικής ταινίας, της εφαρμοζόμενης πίεσης, της χρονικής διάρκειας επαφής και της δύναμης αφαίρεσής της από το δέρμα. (Bashir, et al., 2001)



Σχήμα 9.3: Σχηματική απεικόνιση tape stripping (Au, et al., 2010)

Παρόλο όμως το πρόβλημα που μόλις αναφέρθηκε, η τεχνική αυτή έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο για συγκριτική έρευνα τόσο μεταξύ υγιούς και ασθενούς δέρματος (Jakasa, et al., 2007) όσο και μεταξύ *in vivo* και *in vitro* δεδομένων (Reddy, et al., 2002).

Τέλος, μπορεί να εφαρμοστεί μη επεμβατική ανάλυση της περιεχόμενης ΦΔΟ στις διαφορετικές στοιβάδες του δέρματος ύστερα από τοπική θεραπεία που προκαλεί φαρμακολογική ή φυσιολογική απόκριση. Χαρακτηριστικές αποκρίσεις μπορεί να είναι η αυξημένη έκκριση ιδρώτα, η αγγειοσυστολή, η αγγειοδιαστολή, οι μεταβολές στα όρια αίσθησης του πόνου ή η μεταβολή στην αρτηριακή πίεση. (Williams, 2013)

## 9.2 Τεχνικές In Vitro

Οι διαφορετικοί *in vitro* σχεδιασμοί που έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο με σκοπό την αξιολόγηση της διαπερατότητας ΦΔΟ μέσω μεμβρανών διάχυσης, οι οποίες μπορεί να είναι είτε δέρμα ζώων είτε ανθρώπινο δέρμα είτε τεχνητές μεμβράνες που αναπαριστούν το ανθρώπινο δέρμα.

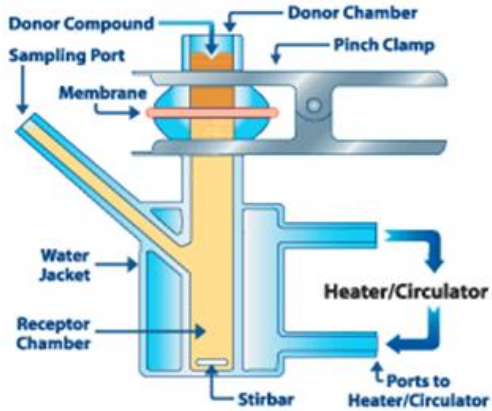
Ο (OECD, 2004) εξέδωσε κατευθυντήρια οδηγία για τη δοκιμή χημικών με τη χρήση είτε του στατικού κυττάρου διάχυσης (static diffusion cell) είτε του κυττάρου συνεχόμενης ροής (flow – through cell). Η υπό δοκιμή ΦΔΟ εφαρμόζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης, η οποία με τη σειρά της διαχωρίζει τα διαμερίσματα του δότη (donor chamber) και του υποδοχέα (receptor chamber). Η ποσότητα της ουσίας που διαπερνά μετράται στο διάλυμα του υποδοχέα (receptor solution), το οποίο διατηρείται ομοιογενές με συνεχή ανάδευση, ως συνάρτηση του χρόνου. Οι πειραματικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν άπειρη και πεπερασμένη δόση χορήγησης και μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν ρυθμίσεις, όπου η υπό δοκιμή ουσία παραμένει στο δέρμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και υπό καθορισμένες συνθήκες, πριν την αφαίρεση με κατάλληλη διαδικασία καθαρισμού.

Στην πράξη, κάθε στοιχείο που αναφέρθηκε στην παραπάνω κατευθυντήρια οδηγία πρέπει να ληφθεί υπόψη. Συγκεκριμένα, επιλογή του τύπου κυττάρου διάχυσης, της μεμβράνης διάχυσης, των χαρακτηριστικών και συνθηκών του πειράματος, της συγκέντρωσης της φαρμακοτεχνικής μορφής που μελετάται και του διαλύματος του υποδοχέα.

## 9.2.1 Επιλογή Κυττάρου Διάχυσης

### 9.2.1.1 Στατικό Κύτταρο Διάχυσης (Static Diffusion Cell)

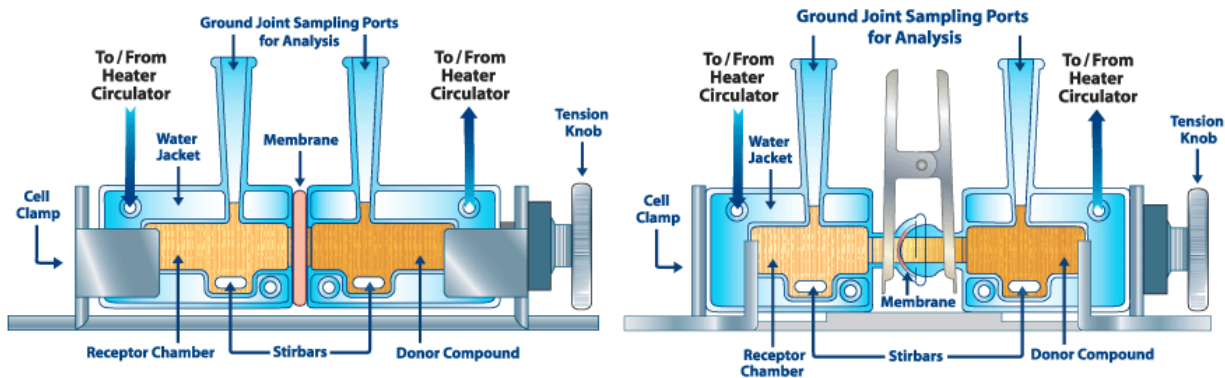
Το 1975 ο Thomas Franz ανέπτυξε ένα στατικό κύτταρο διάχυσης, το οποίο είναι



Σχήμα 9.4: Στατικό κύτταρο διάχυσης τύπου Franz (SES GmbH - Analytical Systems, 2018)

σήμερα ένα από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα in vitro συστήματα στην έρευνα της διαδερμικής διαπερατότητας. Το σύστημα έχει απλό σχεδιασμό και μικρό κόστος. Η μεμβράνη διάχυσης τοποθετείται στην επιφάνεια που διαιρεί τα διαμερίσματα του δότη και του υποδοχέα και σφραγίζεται με τη χρήση κατάλληλου πλέγματος για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ανθρώπινο δέρμα μπορεί να είναι είτε πλήρες σε πάχος και στοιβάδες, με το χόριο να βρίσκεται σε επαφή με το διάλυμα του υποδοχέα, είτε τμήμα αυτού όπως μόνο η κεράτινη στοιβάδα γεγονός που θα

εμφανίσει άμεση επίδραση στα πειραματικά αποτελέσματα (van de Sandt, et al., 2004). Το διαμέρισμα του υποδοχέα του κυττάρου τύπου Franz, στην περίπτωση που δεν περιβάλλεται από μανδύα μέσα στον οποίο κυκλοφορεί θερμοστατικά ελεγχόμενο ύδωρ (water jacket), τοποθετείται μέσα σε υδατόλουτρο (water bath) με θερμοκρασία συνήθως  $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , για να μιμηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες του δέρματος. Το διάλυμα του υποδοχέα διατηρείται ομοιογενές σε συγκέντρωση και θερμοκρασία με τη χρήση μαγνητικής ράβδου ανάδευσης (stirring bar). Η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα με τη λήψη δείγματος από το διαμέρισμα του υποδοχέα και ακολούθως αναπληρώνοντάς το. Με τον τρόπο αυτό βέβαια υπάρχει η πιθανότητα απώλειας των συνθηκών δεξαμενής (sink conditions) καθώς εξελίσσεται το πείραμα και υποεκτίμηση της ποσότητας της ΦΔΟ που απορροφάται. Εναλλακτικά, μπορεί το διάλυμα του υποδοχέα να αφαιρεθεί πλήρως και να αντικατασταθεί με φρέσκο. Τέλος, χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ευελιξία στην εφαρμογή πεπερασμένης ή άπειρης δόσης οποιασδήποτε φαρμακοτεχνικής μορφής (διάλυμα, γέλη, αλοιφή, κρέμα ή έμπλαστρο – patch) στη μεμβράνη διάχυσης. (Holmgaard & Nielsen, 2009)

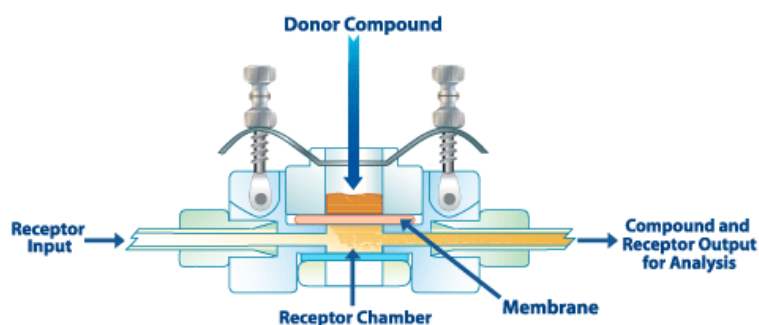


Σχήμα 9.5: Κύτταρα διάχυσης (PermeGear, 2018) – Αριστερά: Side by side, Δεξιά: Valia-Chien

Μια παραλλαγή των κυττάρων διάχυσης τύπου Franz είναι τα κύτταρα side-by-side και η εξέλιξη του, γνωστή ως κύτταρο Valia-Chien, τα οποία ακολουθούν την ίδια φιλοσοφία με δυο βασικές διαφορές. Η πρώτη, που αποτελεί και ξεχωριστό πλεονέκτημα, είναι η δυνατότητα ανάδευσης αμφοτέρων των διαμερισμάτων. Η δεύτερη όμως διαφορά που σχετίζεται με το σχεδιασμό τους αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα. Ειδικότερα, ο σχεδιασμός τους περιορίζει τις φαρμακοτεχνικές μορφές που δύνανται να εφαρμοστούν και άρα να μελετηθούν. (Moss, et al., 2015)

### 9.2.1.2 Κύτταρο Συνεχόμενης Ροής (Flow-through Cell)

Ένα άλλο *in vitro* μοντέλο είναι το κύτταρο συνεχόμενης ροής, το οποίο μπορεί να βρίσκεται και σε μορφή συστήματος, αποτελούμενο από πολλαπλά κύτταρα. Ο τύπος κυττάρου αυτός, αναπτύχθηκε από τους (Bronaugh & Stewart, 1985) και είναι εξαιρετικό για τον προσδιορισμό της επίδρασης του φαινομένου "δεξαμενής" του δέρματος. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζεται από συνεχή αντικατάσταση του διαλύματος του υποδοχέα σε μια προσπάθεια να μιμηθεί την κυκλοφορία του αίματος. Παρουσιάζει επίσης ιδιαίτερο πλεονέκτημα στη μελέτη ΦΔΟ με χαμηλή διαλυτότητα στο διάλυμα του υποδοχέα καθώς οι συνθήκες δεξαμενής διατηρούνται με τη συνεχή αντικατάστασή του (Roberts & Walters, 2008). Ωστόσο, σε γενικές γραμμές υστερούν συγκριτικά με τα στατικά κύτταρα διάχυσης εξαιτίας της πολυπλοκότητας και του υψηλού κόστους.



Σχήμα 9.6: Κύτταρο συνεχόμενης ροής (SES GmbH - Analytical Systems, 2018)

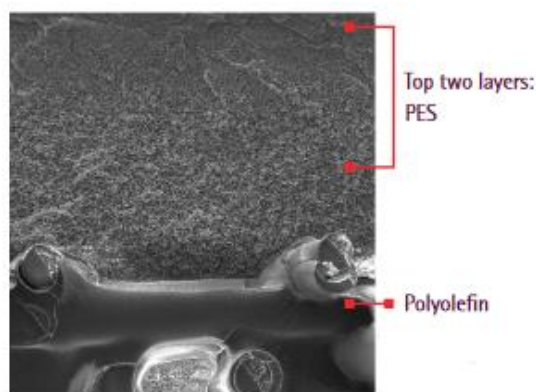
### 9.2.2 Επιλογή Μεμβράνης Διάχυσης

Το ανθρώπινο δέρμα από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένης της πλαστικής χειρουργικής και των ακρωτηριασμών, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για *in vitro* αξιολόγηση της διαδερμικής απορρόφησης ΦΔΟ. Επειδή όμως είναι εξαιρετικά δύσκολο να βρεθούν επαρκείς ποσότητες, ώστε να εξαχθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, η χρήση δέρματος από ένα ευρύ φάσμα ζωικών προτύπων συμπεριλαμβανομένων των χοίρων, των αρουραίων, των ινδικών χοιριδίων, των πιθήκων και των φιδιών έχει προταθεί ως κατάλληλη αντικατάστασή του. Γενικά, το δέρμα από χοίρους αποτελεί ένα πολύ καλό υποκατάστατο, καθώς προσφέρει παρόμοια δομή ως προς τη διάχυση με το ανθρώπινο δέρμα για ένα ευρύ φάσμα ΦΔΟ. Ωστόσο, το δέρμα των τρωκτικών είναι αυτό που εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως, παρά την υπερεκτίμηση έως και δέκα φορές των αποτελεσμάτων εξαιτίας της έλλειψης ομοιότητας ως προς τη δομή και επομένως στα χαρακτηριστικά διάχυσης, πιθανώς λόγω της χρήσης των ειδών αυτών ευρύτερα στη φαρμακευτική έρευνα. (Abd, et al., 2016) Αρκετοί ερευνητές έχουν αναπτύξει τεχνητά ισοδύναμα δέρματος, γνωστά

και ως ισοδύναμα ζωντανού δέρματος (living skin equivalents – LSEs), σε μια προσπάθεια αντιμετώπισης ορισμένων από τα ζητήματα που αναφέρθηκαν και συνδέονται με τη χρήση ζωικού στη θέση του ανθρώπινου δέρματος. Τα LSEs επιδιώκουν να αναπαράγουν την υδρόφιλη και υδρόφοβη ισορροπία της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας καθώς και την εμφάνιση της λειτουργίας φραγμού. Γενικά αποτελούνται από μεμβράνες ανθρώπινου δέρματος οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν επιδερμικά κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί σε ιστοκαλλιέργειες. Ως εναλλακτική λύση λοιπόν για *in vitro* μελέτες διαδερμικής απορρόφησης, δεν έχουν καταφέρει μέχρι σήμερα να αποκτήσουν ευρεία αποδοχή. Αυτό οφείλεται κυρίως στη δυσκολία και στο κόστος παραγωγής τους καθώς και στην αδυναμία αναπαραγωγής των χαρακτηριστικών διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος. (Godin & Touitou, 2007)

Εξέλιξη των LSEs αποτελούν οι τεχνητές μεμβράνες, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την αντικατάσταση τόσο ανθρώπινου όσο και ζωικού δέρματος εξαιτίας της υψηλής μεταβλητότητας και των ηθικών περιορισμών ως προς τη χρήση τους. Η εμπορική διαθεσιμότητα, η σταθερότητα, η ομοιομορφία μεταξύ των παρτίδων και η ευκολία στη χρήση τους τις καθιστούν ιδιαίτερα επιθυμητές. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι οι πολυμερικές, αποτελούμενες από αναγεννημένη κυτταρίνη ή από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), και η Strat-M™. Όσον αφορά τις πολυμερικές, όπως επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη των (Moss, et al., 2006), υπερεκτιμούν σημαντικά τη διαπέραση λιπόφιλων ΦΔΟ κατά μήκος του δέρματος για αυτό και η χρήση τους είναι σημαντικά περιορισμένη. Η Strat-M™ από την άλλη αποτελεί την πιο πρόσφατα εμπορικά διαθέσιμη συνθετική μεμβράνη διάχυσης.

Κατασκευάζεται από τη Merck Millipore, που αποτελεί τμήμα της Merck, και φέρει δύο στοιβάδες αρκετά ανθεκτικής στη διάχυση πολυαιθεροσουλφόνης (polyethersulfone – PES) πάνω από μια πιο δεκτική στη διάχυση στοιβάδα πολυολεφίνης, συνολικού πάχους 300 μm. Οι πολυμερικές αυτές στοιβάδες δημιουργούν μια πορώδη δομή, η οποία εμποτίζεται με ένα κατάλληλο μείγμα από συνθετικά λιπίδια, προσδίδοντας της επιπλέον ιδιότητες παρόμοιες με το δέρμα (Merck Millipore, 2012). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από την εταιρία παραγωγής για 14 ΦΔΟ με μεγάλο εύρος μοριακών βαρών (162 – 425 g/mol) και συντελεστών διάχυσης (-0,131 – 6,9), καθώς και η αυτή των (Uchida, et al., 2015) αποδεικνύουν πως η Strat-M™ παρουσιάζει καλύτερη αντιστοιχία με το ανθρώπινο δέρμα συγκριτικά με τα ζωικά πρότυπα.



Σχήμα 9.7: Δομή τεχνητής μεμβράνης Strat-M™ (Merck Millipore, 2012)

### 9.2.3 Προετοιμασία Μεμβράνης Διάχυσης

Εφόσον λοιπόν έχουμε καταλήξει στον τύπο της μεμβράνης διάχυσης που θα χρησιμοποιήσουμε, ακολουθεί η προετοιμασία αυτής. Σημαντικό πλεονέκτημα των τεχνητών μεμβρανών είναι πως δεν απαιτούν ιδιαίτερες συνθήκες φύλαξης αλλά ούτε και ιδιαίτερη επεξεργασία, όπως ενυδάτωση, πριν την τοποθέτηση στα κύτταρα διάχυσης και έναρξη του πειράματος. Αντίθετα, τόσο το ανθρώπινο όσο και το δέρμα ζωικών προτύπων πρέπει να καταψύχεται έως ότου χρησιμοποιηθεί, γεγονός που έχει αποτελέσει αιτία διαμάχης σχετικά με

την επίδραση των συνθηκών αυτών στις ιδιότητές τους. Συγκεκριμένα, στη μελέτη των (Wester, et al., 1998) κατέληξαν στο συμπέρασμα πως πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις συνθήκες φύλαξης του ανθρώπινου δέρματος σε περιπτώσεις που ο διαδερμικός μεταβολισμός αποτελεί καθοριστικό παράγοντα, ενώ η μελέτη των (Ahlstrom, et al., 2007) αποτελεί ένδειξη πως φύλαξη του δέρματος ζώων στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μπορεί να μειώσει τις ιδιότητες φραγμού του αυξάνοντας τη διαδερμική απορρόφηση.

Αν επιλεγεί δέρμα ζωικού πρότυπου, χρησιμοποιείται σε πλήρες πάχος και στοιβάδες επειδή είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομονωθεί η επιδερμίδα, πόσο μάλλον η κεράτινη στοιβάδα, λόγω της παρουσίας πολυάριθμων τριχικών θυλάκων. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιηθεί ανθρώπινο δέρμα για την αξιολόγηση της διαδερμικής απορρόφησης μιας ΦΔΟ, μπορεί να είναι είτε δέρμα πλήρους πάχους, που περιλαμβάνει την κεράτινη στοιβάδα, τη ζώσα επιδερμίδα και το χόριο, είτε τμήμα αυτού, το οποίο με τη σειρά του θα αποτελείται:

- Από την κεράτινη στοιβάδα, τη ζώσα επιδερμίδα και τμήμα της δερμίδας (χρήση δερμοτόμου)
- Από την κεράτινη στοιβάδα και τη ζώσα επιδερμίδα (διαχωρισμός με θέρμανση – heat separation)
- Αποκλειστικά από την κεράτινη στοιβάδα (heat separation και κατεργασία με ένζυμα)

Η επιλογή εξαρτάται, ως επί το πλείστον, από τα χαρακτηριστικά διαλυτότητάς της υπό μελέτη ΦΔΟ. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις μελέτης λιπόφιλων μορίων επιλέγεται δέρμα πλήρους πάχους, ενώ για υδρόφιλα μόρια καταφεύγουμε στις άλλες επιλογές.

Αν χρειαστεί, λοιπόν, να χρησιμοποιηθεί μόνο η επιδερμίδα, ο καλύτερος τρόπος διαχωρισμού της από το υπόλοιπο δέρμα βασίζεται στην τεχνική του διαχωρισμού με θέρμανση (heat separation technique) όπως αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Ιταλό βιολόγο Marcello Malpighi και τροποποιήθηκε από τους (Kligman & Christophers, 1963). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το υποδόριο λίπος απομακρύνεται με αμβλείες τομές από χειρουργικό νυστέρι. Το δέρμα πλήρους πάχους στη συνέχεια βυθίζεται σε απιονισμένο νερό στους  $60^{\circ}\text{C}$  για 45 sec έως και 2 min. Μετά την απομάκρυνση από το νερό, η επιδερμίδα αφαιρείται απαλά χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι αιχμηρές λαβίδες. Αν τώρα θέλουμε να απομονώσουμε την κεράτινη στοιβάδα, απαιτείται ενζυματική επεξεργασία της επιδερμίδας, τοποθέτηση δηλαδή σε διάλυμα θρυψίνης (0,0001%) όπου και επωάζεται στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 12 h. (Brain, et al., 2002)

#### 9.2.4 Επιλογή Διαλύματος Υποδοχέα (Receptor Solution)

Το διάλυμα του υποδοχέα πρέπει να διαθέτει επαρκή διαλυτότητα για την υπό μελέτη ΦΔΟ έτσι ώστε να διατηρούνται οι συνθήκες δεξαμενής κατά τη διάρκεια της μελέτης, επιτρέποντας τη συνεχή απορρόφηση όπως θα συνέβαινε κανονικά υπό συνθήκες in vivo με λειτουργικό κυκλοφορικό σύστημα. Ανά πάσα στιγμή δηλαδή η συγκέντρωση εντός του διαλύματος θα πρέπει να είναι λιγότερη από το 10% της διαλυτότητα κορεσμού σε αυτό. Για υδατοδιαλυτές ΦΔΟ, ρυθμισμένο ( $\text{pH} \approx 7,4$ ) ή μη ισοτονικό αλατούχο διάλυμα (φυσιολογικός ορός) θεωρείται ορθή επιλογή για τη διατήρηση φυσιολογικού περιβάλλοντος. Σε περιπτώσεις που είτε το πείραμα είναι μεγάλης διάρκειας είτε επιθυμούμε να αποκλείσουμε τη μικροβιακή συμβολή στον μεταβολισμό του δέρματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συντηρητικά για την πρόληψη της μικροβιακής ανάπτυξης. Ωστόσο, το χρησιμοποιούμενο συντηρητικό δε θα πρέπει να παρεμβάλλεται στον προσδιορισμό της ΦΔΟ. Επίσης, στις περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή η διατήρηση της βιωσιμότητας του δέρματος, ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η



μεταβολική δραστηριότητα απαιτείται η χρήση ιδιαίτερων διαλυμάτων, όπως τα MEM, HEPES, HNBSS και DMPBS. (Finnin, et al., 2012)

Επιπλέον, το διάλυμα του υποδοχέα δε θα πρέπει να επηρεάζει την ακεραιότητα του δέρματος. Γι' αυτό τον λόγο θα πρέπει να αποφεύγονται οι διαλύτες, όπως η αιθανόλη, σε υψηλές συγκεντρώσεις, ή οι επιφανειοδραστικοί παράγοντες, διότι θα μπορούσαν να διαχέονται και προς το περιεχόμενο του διαμερίσματος του δότη επηρεάζοντας τη σύστασή του. Τέλος, καθοριστικής σημασίας είναι η συνεχής και επαρκής ανάδευση του διαμερίσματος του υποδοχέα, ώστε να απομακρύνονται τα μόρια της ΦΔΟ από την περιοχή κάτω από το δέρμα. (Williams, 2013)

### **9.2.5 Εφαρμογή Εξεταζόμενης ΦΔΟ**

Το κυρίαρχο σενάριο στις μελέτες διαδερμικής απορρόφησης υποδηλώνει την εφαρμογή της υπό μελέτης ΦΔΟ σε πεπερασμένη δόση με αποτέλεσμα την πιθανή εξάντληση της συγκέντρωσης στο διαμέρισμα του δότη κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η εξάντληση αυτή θα οδηγήσει με τη σειρά της σε μείωση του ρυθμού διαπέρασης και την άφιξη στη μέγιστη τιμή αθροιστικής απορρόφησης. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή ενός ΔΘΣ σε άπειρη δόση μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες συνθήκες, στις οποίες υπάρχει αρκετή ποσότητα ΦΔΟ στο διαμέρισμα του δότη, ώστε να καθίστανται αμελητέες οποιεσδήποτε μεταβολές στη συγκέντρωσή του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. (Finnin, et al., 2012)

### **9.2.6 Επιλογή Χαρακτηριστικών & Συνθηκών Πειράματος**

#### **9.2.6.1 Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία στην οποία πρέπει να διεξάγεται ένα *in vitro* πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας είναι 37°C, ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή θερμοκρασία των 32°C στην επιφάνεια του δέρματος. Είναι επίσης σημαντικό να διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, καθώς η διαπερατότητα του δέρματος μπορεί να ποικίλει σημαντικά ακόμη και με μικρές μεταβολές αυτής. (Moss, et al., 2015)

#### **9.2.6.2 Χρονική Διάρκεια**

Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν πως 24 ή 48 h είναι επαρκείς για ένα πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας. Ωστόσο, σε περιπτώσεις αξιολόγησης της απορρόφησης από ΔΘΣ με παρατεταμένη διάρκεια δράσης, ίσως είναι απαραίτητο να επεκταθεί το πείραμα σε 72 h ή και περισσότερο.

#### **9.2.6.3 Συχνότητα Δειγματοληψίας**

Η συχνότητα της δειγματοληψίας καθορίζεται από τους στόχους του πειράματος. Σε περιπτώσεις μελετών ΦΔΟ χωρίς προηγούμενη γνώση σχετικά με τα επίπεδα διαδερμικής απορρόφησης, είναι συνετό να λαμβάνονται δείγματα αρκετά συχνά, περίπου ανά 1 – 2 h, για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να επιτευχθεί η αξιολόγηση του χρόνου υστέρησης και της ροής σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state flux). Επίσης, οι δειγματοληψίες στο αρχικό διάστημα της μελέτης είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγνώριση των ελαττωματικών κυττάρων διάχυσης που πρέπει να αφαιρεθούν από τη μελέτη. (PermeGear, 2018)

#### **9.2.6.4 Αριθμός Επαναλήψεων**

Εξαιτίας της πολύ υψηλής μεταβλητότητας του ανθρώπινου δέρματος και του κινδύνου απώλειας κυττάρων κατά τη διάρκεια του πειράματος, συνίσταται η χρήση τουλάχιστον πέντε κυττάρων διάχυσης για κάθε διαφορετική φαρμακοτεχνική μορφή – σύνθεση που μελετάται. Μικρότερος αριθμός επαναλήψεων επιτρέπεται μόνο σε περιπτώσεις χρήσης τεχνητών μεμβρανών, εξαιτίας της ομοιομορφίας και χαμηλής μεταβλητότητάς τους από παρτίδα σε παρτίδα, ή όταν συντρέχουν λόγοι κόστους, χρόνου ή διαθεσιμότητας δέρματος.

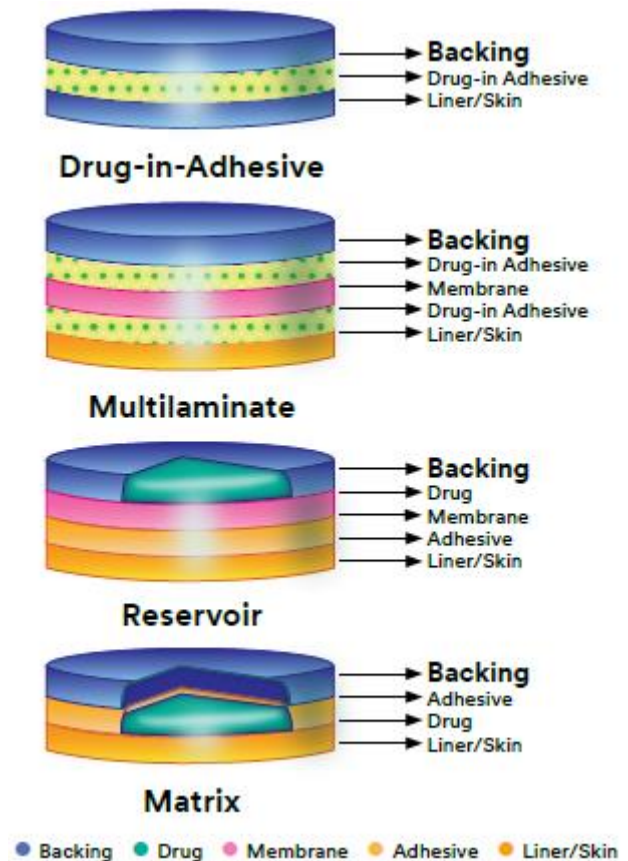
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10<sup>ο</sup>: Σχεδιασμός Διαδερμικών Θεραπευτικών Συστημάτων

## 10.1 Κατηγορίες

Διαφορετικές ταξινομήσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή εμπορικά διαθέσιμων ΔΘΣ με κυριότερη αυτή που βασίζεται στην τεχνολογία σχεδιασμού τους. Διακρίνονται με αυτόν τον τρόπο σε αερολύματα (aerosol spray), ημιστερεές μορφές και σε μορφές που προσκολλώνται στο δέρμα, γνωστές ως διαδερμικά ή φαρμακευτικά έμπλαστρα (patches). Τα διαδερμικά σπρέι και ημιστερεά τείνουν να είναι ορμονικά προϊόντα (οιστρογόνα και ανδρογόνα) που ψεκάζονται ή απλώνονται στο δέρμα. Μεγαλύτερο πλεονέκτημα και ταυτοχρόνως μειονέκτημά τους αποτελεί το γεγονός πως είναι αόρατα, με συνέπεια να είναι εξαιρετικά εύκολη η ακούσια μεταφορά τους σε κατοικίδια και άλλους ανθρώπους με την επαφή. Εφόσον όμως τα διαδερμικά αερολύματα είναι σχετικά νέα φαρμακοτεχνική μορφή και τα ημιστερεά είναι στενά συνδεδεμένα με σκευάσματα τοπικής χρήσης, το κεφάλαιο αυτό επικεντρώνεται στα φαρμακευτικά έμπλαστρα, τα οποία διαχωρίζονται σε: (Miller, 2012)

- Σύνθετα συστήματα στα οποία το φάρμακο ενσωματώνεται σε μία ή περισσότερες στοιβάδες συγκολλητικού (Drug-in-Adhesive)
- Συστήματα δεξαμενής (Reservoir)
- Συστήματα μήτρας (Matrix)
- Συστήματα μικρών δεξαμενών (Micro-Reservoir)

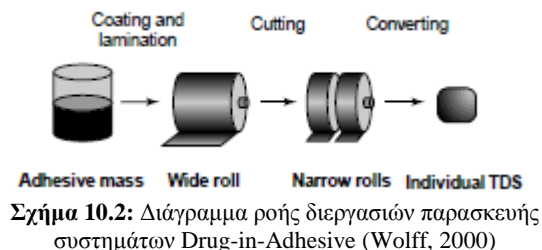
Τα συστήματα Drug-in-Adhesive (DIA), με βάση τον αριθμό των στοιβάδων συγκολλητικού διακρίνονται σε απλά (Monolithic) και σύνθετα (Multilaminate). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 10.1, αποτελούνται από τη μεμβράνη υποστήριξης (backing membrane) η οποία πρέπει να είναι αδιαπέραστη από το σύνολο των συστατικών, από ένα λεπτό στρώμα της ομοιογενούς διασποράς της ΦΔΟ σε ένα συγκολλητικό, και τέλος, την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη (release liner) η οποία αφαιρείται πριν την εφαρμογή στο δέρμα. Στα σύνθετα συστήματα περιέχονται επιπλέον πολυμερικές μεμβράνες άμεσης ή/και ελεγχόμενης αποδέσμευσης (rate-controlling membrane) μεταξύ των στοιβάδων του συγκολλητικού. Τα DIA συστήματα υπερτερούν συγκριτικά με τους άλλους τύπους καθώς είναι εξαιρετικά πιο λεπτά (50 – 300 μm), εύκαμπτα και οικονομικά στην ανάπτυξή τους. (Alexander, et al., 2012)



Σχήμα 10.1: Κατηγορίες ΔΘΣ (3M Science. Applied to Life.™, 2018)

Όσον αφορά τα στάδια παραγωγής τους, είναι δεδομένο πως όλα έχουν επίδραση στην ποιότητα του τελικού προϊόντος για αυτό και απαιτούνται διαδικασίες επικύρωσης και συνεχείς έλεγχοι. Συγκεκριμένα, ένα διάγραμμα ροής διεργασιών, τμήμα του οποίου φαίνεται και στο σχήμα 10.2, περιλαμβάνει: (Van Buskirk, et al., 1997)

- Ανάμειξη του συγκολλητικού με τη ΦΔΟ και τα υπόλοιπα συστατικά
- Επικάλυψη της μεμβράνης υποστήριξης με το μείγμα, δημιουργώντας στοιβάδα
- Ολοκλήρωση του συστήματος με την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη
- Κοπή του επιθυμητού μεγέθους
- Συσκευασία



Τα συστήματα δεξαμενής αποτελούνται από τη δεξαμενή (drug reservoir), που περιέχει τη ΦΔΟ και τα έκδοχα, η οποία βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης υποστήριξης και μιας μεμβράνης ελέγχου του ρυθμού αποδέσμευσης της ΦΔΟ που αποτελείται από πολυμερές και μπορεί να είναι μικρο-πορώδες ή μη πορώδες. Στην εξωτερική επιφάνεια της πολυμερικής αυτής μεμβράνης βρίσκεται ένα λεπτό στρώμα υποαλλεργικού συγκολλητικού, το οποίο μπορεί είτε να καλύπτει πλήρως (συνεχές συγκολλητικό) είτε να σχηματίζει περίμετρο (περιφερειακό συγκολλητικό) γύρω από την επιφάνεια απελευθέρωσης της ΦΔΟ. Στη δεξαμενή λοιπόν, η ΦΔΟ σε συνδυασμό με τα έκδοχα μπορούν να είναι σε μορφή διαλύματος, εναιωρήματος, γέλης ή διασποράς σε στερεό πολυμερές. Διεισδύει λοιπόν μέσω της μεμβράνης και του συγκολλητικού, για να φτάσει στο δέρμα ακολουθώντας μηδενοταξική κινητική. Πλεονέκτημα αυτού του τύπου ΔΘΣ είναι η ικανότητα να περιέχει αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις ΦΔΟ. (Benerjee, et al., 2014)

Τα συστήματα μήτρας αποτελούνται επίσης από τη μεμβράνη υποστήριξης, το συγκολλητικό που δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τη ΦΔΟ και την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη. Αυτό που τα κάνει ξεχωριστά είναι η μήτρα (drug matrix), η οποία παρασκευάζεται με διασπορά της ΦΔΟ σε υδρόφιλη ή λιπόφιλη πολυμερική μήτρα. Η διασπορά αυτή επιτυγχάνεται με ομοιογενή ανάμειξη των λεπτών σωματιδίων της ΦΔΟ είτε με υγρό πολυμερές ή πολυμερές υψηλού ιξώδους, που ακολουθείται από διασταυρούμενη σύνδεση των αλυσίδων του με ελαστικό πολυμερές σε αυξημένη θερμοκρασία ή/και υπό κενό. Πλεονέκτημα των συστημάτων αυτών είναι πως δεν κινδυνεύουν από καταστροφή και αποδέσμευση ολόκληρης της ποσότητας του φαρμάκου, όπως στην περίπτωση των συστημάτων δεξαμενής. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια πως το συγκολλητικό που χρησιμοποιείται σε αυτού του τύπου τα συστήματα θα πρέπει να έχει ισχυρότερες ιδιότητες προσκόλλησης λόγω της μικρότερης περιοχής επαφής με το δέρμα. (Tan & Pfister, 1999)

Τα συστήματα μικρών δεξαμενών αποτελούν υβρίδια των συστημάτων δεξαμενής (reservoir) και μήτρας (matrix). Η δεξαμενή σχηματίζεται αρχικά με επαιώρηση της ΦΔΟ σε υδατικό διάλυμα υδρόφιλου πολυμερούς και στη συνέχεια διασπορά του εναιωρήματος αυτού ομοιογενώς σε λιπόφιλο πολυμερές με τεχνική διασποράς υψηλής ενέργειας με μηχανική δύναμη διάτμησης, ώστε να σχηματιστούν χιλιάδες μικροσκοπικές δεξαμενές ΦΔΟ. Η θερμοδυναμικά ασταθής αυτή διασπορά σταθεροποιείται γρήγορα με άμεση διασταυρούμενη σύνδεση των αλυσίδων του πολυμερούς in situ. Η αποδέσμευση μια ΦΔΟ από ένα σύστημα

τύπου μικρής δεξαμενής μπορεί να ακολουθήσει διαδικασία ελεγχόμενη από την κατανομή ή τη διάχυση, ανάλογα με τη διαλυτότητά της στη μήτρα του πολυμερούς. (Chien, 1984)

## 10.2 Βασικά Στοιχεία

Μελετώντας τα διαφορετικά συστήματα παρατηρούνται αρκετά κοινά στοιχεία μεταξύ τους, τα οποία και αναλύονται ακολούθως.

### 10.2.1 Μεμβράνη Υποστήριξης (Backing Membrane)

Οι μεμβράνες υποστήριξης προστατεύουν και στηρίζουν το ΔΘΣ τόσο κατά την αποθήκευση όσο και για το διάστημα εφαρμογής του. Επιλέγονται για την εμφάνιση, την ευκαμψία και τη βιοσυμβατότητα του εμπλάστρου όπως και για την ανάγκη απόφραξης του σημείου εφαρμογής σε επίπεδα όμως που δε θα προκαλέσουν ερεθισμό του δέρματος. Σημαντικοί επίσης παράγοντες που καθορίζουν την επιλογή είναι η χρονική διάρκεια εφαρμογής του εμπλάστρου καθώς και τα χαρακτηριστικά της ΦΔΟ και των εκδόχων, επειδή δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν ή να διαχέονται δια μέσου αυτής. Πολλά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεμβράνες υποστήριξης ανάλογα με το σχέδιο, το μέγεθος και το μήκος της προβλεπόμενης χρήσης. Για σχετικά μικρής διάρκειας χρήση μπορεί να επιλεγεί μια αποφρακτική μεμβράνη υποστήριξης με βάση το πολυαιθυλένιο ή τον πολυεστέρα, με δυνατότητα ενυδάτωσης του δέρματος και αύξησης της διαπερατότητας. Για συστήματα με παρατεταμένη διάρκεια εφαρμογής προτιμώνται μεμβράνες που δεν εμφανίζουν τόσο έντονο φαινόμενο απόφραξης, όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο. (Benerjee, et al., 2014)

### 10.2.2 Αποσπώμενη Εξωτερική Μεμβράνη (Release Liner)

Κατά την αποθήκευσή του το ΔΘΣ καλύπτεται από μια προστατευτική μεμβράνη που αφαιρείται πριν την εφαρμογή του στο δέρμα. Για τον λόγο αυτό θεωρείται περισσότερο ως μέρος της πρωτογενούς συσκευασίας και όχι ως τμήμα της φαρμακοτεχνικής μορφής. Δεδομένου ότι η μεμβράνη αυτή βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη ΦΔΟ, θα πρέπει να είναι αδιαπέραστη και χημικά αδρανής. Επιπλέον, θα πρέπει να αποκολλάται εύκολα από το συγκολλητικό, αλλά και να προσκολλάται αρκετά σε αυτό, ώστε να αποφευχθεί άσκοπη απομάκρυνσή του. Η μεμβράνη αποτελείται από ένα στρώμα βάσης που μπορεί να είναι αποφρακτικό, όπως το πολυαιθυλένιο, ή μη αποφρακτικό και ένα σιλικονούχο στρώμα επικάλυψης. Άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι ο πολυεστέρας και το μεταλλοποιημένο έλασμα. (Kandavilli, et al., 2002)

### 10.2.3 Μεμβράνη Ελέγχου του Ρυθμού Αποδέσμευσης της ΦΔΟ (Rate-controlling Membrane)

Οι μεμβράνες αυτές χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό είτε της δεξαμενής από τη στοιβάδα του συγκολλητικού στα συστήματα τύπου δεξαμενής είτε των πολλαπλών στοιβάδων ΦΔΟ ενσωματωμένης σε συγκολλητικό στα σύνθετα συστήματα DIA. Διακρίνονται σε μη πορώδεις, όπου η ΦΔΟ διαχέεται μέσω αυτών με ρυθμό που εξαρτάται από τη διαλυτότητα στο υλικό κατασκευής τους και το πάχος τους, και στις μεμβράνες που φέρουν μικρούς πόρους, δημιουργώντας επιπλέον οδό διάχυσης συγκριτικά με την πρώτη κατηγορία. Ωστόσο, όπως και με τα υπόλοιπα στοιχεία των ΔΘΣ, οι μεμβράνες αυτές θα πρέπει να είναι συμβατές με τη ΦΔΟ, μη τοξικές, σταθερές και εύκαμπτες. (Williams, 2013)

#### 10.2.4 Πλαστικοποιητής

Οι πλαστικοποιητές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε πολλά φαρμακευτικά έμπλαστρα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5 – 20% w/w. Μαζί με την ευκαμπτότητα και την ελαστικότητα που προσδίδουν στη στοιβάδα του συγκολλητικού, είναι επίσης υπεύθυνοι για τη βελτίωση των συγκολλητικών ιδιοτήτων και της ανθεκτικότητάς του. Επομένως, η επιλογή του κατάλληλου πλαστικοποιητή καθώς και η συγκέντρωσή του έχουν ιδιαίτερη επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του ΔΘΣ και στη διαπερατότητα των ΦΔΟ. Παραδείγματα πλαστικοποιητών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαδερμικά έμπλαστρα είναι η γλυκερόλη, η σορβιτόλη και οι πολυαιθυλενογλυκόλες χαμηλού μοριακού βάρους (PEG 200 και PEG 400). (Alexander, et al., 2012)

#### 10.2.5 Πολυμερή

Το πολυμερές που επιλέγεται θα πρέπει να είναι σταθερό, να μην αλληλεπιδρά με τη ΦΔΟ, να παρουσιάζει βιολογική και χημική συμβατότητα με το δέρμα και τα υπόλοιπα συστατικά του ΔΘΣ, να κατασκευάζεται εύκολα και να είναι φθηνό. Οι ιδιότητές του (μοριακό βάρος, θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης – T<sub>g</sub> – και χημική λειτουργικότητα), ως μήτρα του συστήματος, θα πρέπει να είναι τέτοιες ώστε η εκάστοτε ΦΔΟ να διαχέεται σωστά και να αποδεσμεύεται με συνέπεια και αποτελεσματικά μέσω αυτού καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του φαρμακευτικού προϊόντος. Επιπλέον, τα μηχανικά χαρακτηριστικά του δε θα πρέπει να μεταβάλλονται σε εξαιρετικό βαθμό, όταν ενσωματώνεται σε αυτό μεγάλη συγκέντρωση ΦΔΟ. (Keith, 1983)

Ακρυλικά οξέα, όπως διάφοροι τύποι Eudragit (Minghetti, et al., 1999), μείγμα αιθυλοκυτταρίνης και πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP) σε συνδυασμό με πλαστικοποιητή (Rao & Diwan, 1998), υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνες (HPMC) (Guyot & Fawaz, 2000) και μη ιονικοί επιφανειοδραστικοί παράγοντες, όπως λεκιθίνη, tweens και spans (Bhatnagar & Vyas, 1994), έχουν χρησιμοποιηθεί σε επιστημονικές μελέτες ως παράγοντες σχηματισμού μήτρας.

#### 10.2.6 Συγκολλητικά

Το συγκολλητικό αποτελεί ένα ζωτικό συστατικό του ΔΘΣ. Η προσκόλληση του συστήματος στο δέρμα χαρακτηρίζεται ως θεμελιώδης παράγοντας για την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και την ποιότητα του φαρμακευτικού προϊόντος. Σχετίζεται με την αποδέσμευση της ΦΔΟ και τη θεραπευτική δράση, καθώς είτε βρίσκεται διαλυμένη ή διεσπαρμένη στη μήτρα του (matrix) είτε απαιτείται η διάχυση μέσω αυτού (reservoir), ώστε να φτάσει στο δέρμα. Η ποιότητα της σύνδεσης μεταξύ του εμπλάστρου και του δέρματος λοιπόν είναι σημαντική, καθώς αντικατοπτρίζει άμεσα τη συνέπεια στην αποδέσμευσή της ΦΔΟ. Ολόκληρη η επιφάνεια αποδέσμευσής του πρέπει να διατηρεί πλήρη επαφή με το δέρμα για την περίοδο εφαρμογής, ώστε να εξασφαλίζεται αποτελεσματική απορρόφηση της ΦΔΟ. Σε αντίθετη περίπτωση θα έχουμε ακατάλληλη και μη επαρκή δοσολόγηση των ασθενών, γεγονός που μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη συχνότερη αντικατάσταση του συστήματος από την πλευρά του ασθενή, το οποίο με τη σειρά του όμως θα επιφέρει ανάλογη αύξηση του κόστους. Επιπλέον, η έλλειψη προσκόλλησης αποτελεί ζήτημα ασφάλειας, καθώς υπάρχουν δυνητικοί κίνδυνοι από ακούσια έκθεση παιδιών σε επικίνδυνες ΦΔΟ για την υγεία τους, όπως η φαιτανύλη. (Wokovich, et al., 2006)

Ο FDA έχει δώσει κατευθυντήριες γραμμές για τον προσδιορισμό του ποσοστού επιβίωσης των διαδερμικών έμπλαστρων (patch survival rate), το οποίο αντικατοπτρίζει το ποσοστό του σκευάσματος που παραμένει σε επαφή με το δέρμα κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Συγκεκριμένα, στην οδηγία (FDA - CDER, 1999) καθορίζεται το ακόλουθο σύστημα βαθμολόγησης για την ποσοτικοποίηση της έκτασης της προσκόλλησης:

0	≥ 90%
1	≥ 75% & < 90%
2	≥ 50% & < 75%
3	< 50%
4	0%

**Πίνακας 10.1:** Σύστημα βαθμολόγησης προσκόλλησης ΔΘΣ

Για να προσκολληθεί βέβαια ένα συγκολλητικό σε ένα υπόστρωμα, στη συγκεκριμένη περίπτωση το δέρμα, πρέπει να ικανοποιηθεί μια θεμελιώδης θερμοδυναμική απαίτηση. Συγκεκριμένα, η μετρούμενη επιφανειακή ενέργεια του συγκολλητικού πρέπει να είναι ίση ή μικρότερη από εκείνη του υποστρώματος. Σύμφωνα με τους (Ginn, et al., 1968), η επιφανειακή ενέργεια καθαρού και στεγνού ανθρώπινου δέρματος είναι περίπου 27 dyn/cm, τιμή η οποία αυξάνεται in vivo με τη θερμοκρασία και την υγρασία (Kenney, et al., 1992).

Η προσκόλληση όλων σχεδόν των εμπορικά διαθέσιμων ΔΘΣ επιτυγχάνεται με τη χρήση ευαίσθητων στην πίεση συγκολλητικών ουσιών (πολυμερών), απλούστερα πιεσοευαίσθητα συγκολλητικά (Pressure Sensitive Adhesives – PSAs), οι οποίες δημιουργούν διατομικές και διαμοριακές ελκτικές δυνάμεις στη στενή επαφή. Προσκολλώνται με εφαρμογή ελαφριάς πίεσης, αντίστοιχης με την πίεση των δαχτύλων, και αφαιρούνται χωρίς να αφήνουν υπολείμματα. Αποτελούν την πρώτη επιλογή καθώς διαθέτουν χαρακτηριστικά, όπως δεν απαιτούν τη χρήση διαλυτών ή θέρμανσης για την προσκόλλησή τους, είναι σταθερά σε περιβαλλοντικές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας, είναι εύκολη η παρασκευή τους, τα οποία αποτελούν εξαιρετικά πλεονεκτήματα. Όσον αφορά τις συγκολλητικές ιδιότητες των PSAs, μπορούν να επηρεαστούν από τη σύνθεση και το πάχος της πολυμερικής μήτρας και επίσης από τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης υποστήριξης. Πράγματι, η ευκαμψία, η ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια, η τραχύτητα, καθώς και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της μεμβράνης υποστήριξης, επηρεάζουν σημαντικά την προσκόλληση του ΔΘΣ. (Repka & McGinity, 2001)

Η γενική σύνθεση ενός PSA περιλαμβάνει ένα ελαστομερές πολυμερές, μια ρητίνη προσκόλλησης, ένα απαραίτητο πληρωτικό, διάφορα αντιοξειδωτικά, σταθεροποιητές εάν απαιτείται και παράγοντες δημιουργίας σταυροειδών δεσμών (cross-linking agents). Κατά τη διαμόρφωση ενός PSA πρέπει να λαμβάνεται υπόψη μια ισορροπία τεσσάρων ιδιοτήτων: πρόσφυση (tack), αποκόλληση (peel adhesion), προσκόλληση στο δέρμα (skin adhesion) και συνεκτική ισχύς (cohesive strength). (Benedek, 2018)

Η επιλογή ενός PSA βασίζεται σε έναν αριθμό παραγόντων, με κυριότερους: (Kulichikhin, et al., 2009)

- Σχεδιασμό ΔΘΣ
- Αφαίρεση από το δέρμα χωρίς υπολείμματα ή δυσφορία
- Επιθυμητές συγκολλητικές ιδιότητες σε ποικίλους τύπους δέρματος
- Συμβατότητα με το δέρμα (όχι ερεθισμό ή ευαισθητοποίηση)

- Συμβατότητα με τη μεμβράνη υποστήριξης (backing membrane) και την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη (release liner)
- Χημική συμβατότητα με ΦΔΟ και έκδοχα
- Σταθερότητα σκευάσματος
- Διάρκεια εφαρμογής σκευάσματος
- Επιθυμητός ρυθμός αποδέσμευσης φαρμάκου
- Διαλυτότητα ΦΔΟ και εκδόχων

#### 10.2.6.1 Τύποι Συγκολλητικών

Οι διαφορετικές κατηγορίες PSAs που χρησιμοποιούνται ή έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε ΔΘΣ με βάση τη χημική τους σύσταση, περιλαμβάνουν τα πολυισοβουτυλένια (polyisobutylenes – PIBs), τα σιλικονούχα (silicones), τα πολυακρυλικά (acrylates), τα θερμής τήξης (hot melt PSAs – HMPSAs) και τα φυσικά κόμματα.

##### 10.2.6.1.1 Φυσικά Κόμματα

Τα φυσικά κόμματα χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα στο παρελθόν, καθώς με τη χρήση τους επιτυγχάνεται επαρκής βιοπροσκόλληση. Ωστόσο, σήμερα έχει περιοριστεί αρκετά η προσθήκη τους σε ΔΘΣ επειδή υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, σε περιπτώσεις παρατεταμένης επαφής με το δέρμα, να προκληθεί ερεθισμός. (Δήμας, et al., 2002)

##### 10.2.6.1.2 Πολυισοβουτυλένια (PIBs)

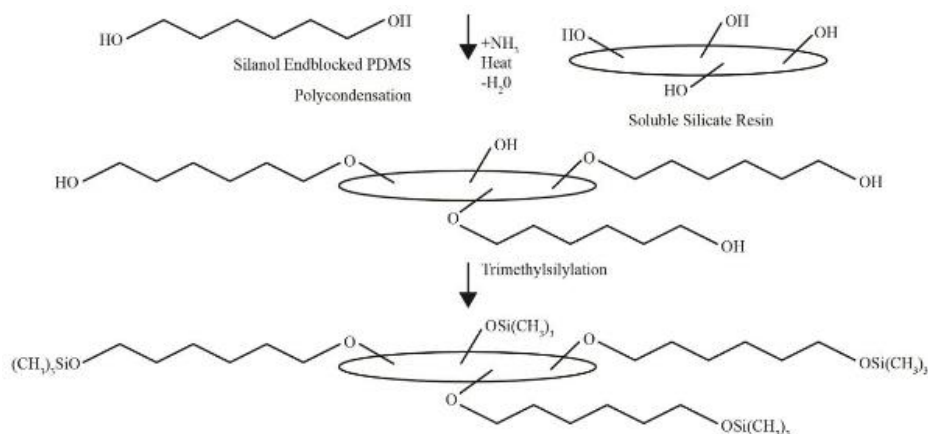
Τα πολυισοβουτυλένια (PIBs) είναι ομοπολυμερή ισοβουτυλενίου. Παράγονται με κατιονικό πολυμερισμό χαμηλής θερμοκρασίας, χωρίς να φέρουν τελικά ασύμμετρα άτομα άνθρακα, όπως φαίνεται στο σχήμα 10.4 (Α). Η  $T_g$  τους είναι  $-62^\circ\text{C}$ , γεγονός που τους προσδίδει χαρακτηριστική ευελιξία, και συνήθως βρίσκονται σε άμορφη κατάσταση. Οι φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς αλλάζουν βαθμιαία με αυξανόμενο μοριακό βάρος. Πολυμερή χαμηλού μοριακού βάρους είναι ιξώδη υγρά. Με αυξανόμενο μοριακό βάρος τα υγρά καθίστανται πιο ιξώδη, κατόπιν αλλάζουν σε κολλώδεις μάζες και τελικά σχηματίζουν ελαστομερή στερεά με χαρακτηριστική μείωση της διαπερατότητάς τους. Τα PSAs των πολυισοβουτυλενίων αποτελούνται από ένα μείγμα κλασμάτων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους, όπου τα υψηλού προσδίδουν εσωτερική αντοχή και αντίσταση στη ροή, ενώ τα χαμηλού τις συγκολλητικές ιδιότητες. Η ιδιαίτερα στενή αυτή δομή τους λοιπόν είναι υπεύθυνη για τη χαμηλή διαπερατότητα που εμφανίζουν απέναντι στην υγρασία και τον αέρα. Διαθέτουν επίσης χημικές ιδιότητες κορεσμένου υδρογονάνθρακα και εμφανίζουν αυξημένη διαλυτότητα σε μη πολικούς διαλύτες όπως κυκλοεξάνιο και επτάνιο. Εξαιτίας αυτών επιλέγονται για ΦΔΟ με χαμηλή παράμετρο διαλυτότητας και πολικότητα. Καθώς η χαμηλή πολικότητα προκαλεί ασθενή προσκόλληση στις περισσότερες επιφάνειες, απαιτείται η προσθήκη συγκολλητικών όπως πολυβουτένια χαμηλού μοριακού βάρους. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν ρητίνες, πληρωτικά όπως διοξείδιο του τιτανίου ( $\text{TiO}_2$ ) για την ελάττωση του ιξώδους και πλαστικοποιητές όπως ορυκτέλαιο. Αξίζει, τέλος, να αναφερθεί πως είναι χημικά αδρανή, ανθεκτικά στη θερμοκρασία και την οξείδωση. (Willenbacher & Lebedeva, 2009)



### 10.2.6.1.3 Σιλικονούχα

Τα PSAs σιλικόνης έχουν χρησιμοποιηθεί σε ιατρικές συσκευές από τη δεκαετία του 1950 και η εφαρμογή τους σε ΔΘΣ έχει διερευνηθεί εκτενώς. Στη σύνθεσή τους περιλαμβάνονται δύο συστατικά, ένα πολυμερές σιλικόνης και μια ρητίνη πυριτίου τα οποία διαλύονται από κοινού σε ένα μη πολικό οργανικό διαλύτη. Μια αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ των ομάδων σιλανόλης ( $SiOH$ ) του χαμηλού ιξώδους και υψηλού μοριακού βάρους πολυμερούς πολυδιμεθυλοσιλοξάνης και της ρητίνης πυριτίου, που έχει τρισδιάστατη δομή πυριτικού άλατος με τελικές ομάδες τριμεθυλοσιλοξάνης, χρησιμοποιείται για δημιουργία δεσμών σιλοξανίου ( $Si - O - Si$ ) και την παρασκευή τους, όπως φαίνεται στο σχήμα 10.4 (B). Τα συγκολλητικά αυτά είναι αρκετά σταθερά στη UV ακτινοβολία όπως και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (-73 έως 250°C), ενώ δεν απαιτούν την προσθήκη εκδόχων όπως αντιοξειδωτικά. Επιπλέον, η βιοσυμβατότητά τους έχει εδραιωθεί μέσω αρκετών ετών ασφαλούς χρήσης και η χαμηλή τους τιμή Tg (-127°C) τα καθιστά ξεχωριστά εξαιτίας της ευκολίας στην παρασκευή τους. Παρόλο που η χαμηλή τιμή αυτή σε συνδυασμό με τον υψηλό όγκο κενού της δομής τους, επιτρέπουν αυξημένα επίπεδα διάχυσης για τις περισσότερες ΦΔΟ, η διαλυτότητα καθώς και η αποδέσμευση της πλειοψηφίας αυτών είναι αρκετά χαμηλή.

Οι ιδιότητες της πρόσφυσης, αποκόλλησης, προσκόλλησης στο δέρμα και συνεκτικής ισχύος των PSAs σιλικόνης μπορούν να τροποποιηθούν μεταβάλλοντας την αναλογία πολυμερούς – ρητίνης ή τη λειτουργικότητα των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης. Συγκεκριμένα, αύξηση της περιεκτικότητας σε πολυμερές παρέχει πιο μαλακά και με μεγαλύτερη πρόσφυση συγκολλητικά, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα ρητίνης έχουν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συγκολλητικών με αυξημένη αντοχή στην αποκόλληση. (Benedek, 2004)



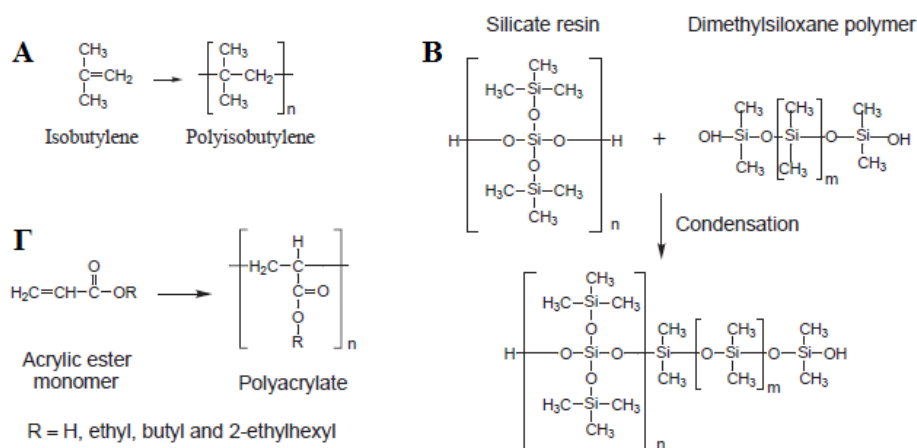
Σχήμα 10.3: Συνθετική πορεία σιλικονούχων συγκολλητικών συμβατών με αμινο-ομάδες (Dow Corning, 2016)

Καθώς τα PSAs σιλικόνης περιέχουν σε μεγάλο βαθμό ελεύθερες ομάδες λειτουργικής σιλανόλης, ορισμένες ΦΔΟ με αμινο-ομάδες μπορούν να δράσουν ως καταλύτες και να προκαλέσουν περαιτέρω δεσμούς μεταξύ των ομάδων αυτών. Η ανεπιθύμητη αυτή αντίδραση μπορεί να περιοριστεί και να επιτευχθεί συμβατότητα σιλικονούχων PSAs με ΦΔΟ που περιέχουν αμινο-ομάδες μέσω μια αντίδρασης τριμεθυλίωσης (Woodard & Metevia, 1987), όπου οι ελεύθερες ομάδες σιλανόλης "καλύπτονται" με μεθύλια, όπως φαίνεται στο σχήμα 10.3. (Dow Corning, 2015)

### 10.2.6.1.4 Ακρυλικά

Αν και οι ιδιότητες των πολυακρυλικών ή πολυακρυλικών εστέρων ανακαλύφθηκαν από το 1928, αυτή η κατηγορία των PSAs δε χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς μέχρι τη δεκαετία του 1950. Σε συνδυασμό με τη βιοσυμβατότητά τους, παρουσιάζουν αρκετά καλές συγκολλητικές ιδιότητες, ιδιαίτερη ευκολία στην επεξεργασία και είναι συμβατά με ευρύ φάσμα ΦΔΟ και εκδόχων. Όσον αφορά τις μηχανικές τους ιδιότητες, αυτές βελτιώνονται καθώς το μοριακό τους βάρος αυξάνεται. Παρόμοια με τις σιλικόνες, τα ακρυλικά δεν απαιτούν πρόσθετα όπως σταθεροποιητές ή πλαστικοποιητές. Παρασκευάζονται με πολυμερισμό ακρυλικών εστέρων, οξέων και άλλων μονομερών όπως φαίνεται στο σχήμα 10.4 (Γ). Ο γενικός τύπος για την απεικόνιση των ακρυλικών είναι το  $CH_2 = CHCOOR$ , όπου η ομάδα R αλλάζει με τα διαφορετικά μονομερή που χρησιμοποιούνται και καθορίζει τις μηχανικές και φυσικές ιδιότητές τους. Χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές Tg (-55 έως -15°C), ιδιαίτερα αυξημένη σταθερότητα, ενώ διακρίνονται από το διαυγές χρώμα και την άμορφη φύση τους.

Τα ακρυλικά περιλαμβάνουν κυρίως τρεις τύπους μονομερών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτογενών μονομερών, τροποποιητικών μονομερών και μονομερών με λειτουργικές ομάδες. Τα πρωτογενή μονομερή αποτελούν το 50 – 90% του συνόλου του PSA. Τα πρωτογενή μονομερή όπως τα αλκυλικά και τα μεθακρυλικά προσδίδουν πρόσφυση και ευκαμψία, ιδιότητες οι οποίες αυξάνονται με την αύξηση του μήκους της πλευρικής αλυσίδας των μονομερών αυτών. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μονομερή είναι οι ακρυλικοί 2-αιθυλεξυλεστέρας και βουτυλεστέρας. Τα τροποποιητικά μονομερή, σε συγκέντρωση 10 – 40%, χρησιμοποιούνται για να τροποποιήσουν και να βελτιώσουν τις μηχανικές και φυσικές ιδιότητες των ακρυλικών, κυρίως με την αύξηση της σκληρότητας. Το οξικό βινύλιο και το μεθακρυλικό οξύ είναι μερικά παραδείγματα αυτού του τύπου μονομερών. Τα ακρυλικά βινυλίου στα οποία χρησιμοποιείται οξικό βινύλιο ως τροποποιητικό μονομερές καθιστούν τα ακρυλικά πολυμερή λιγότερο πολικά και περισσότερο κολλώδη. Άλλα υδρόφιλα μονομερή όπως βινυλοπυρρολιδόνη χρησιμοποιούνται για να προσδώσουν υδροφιλία. Τα ακρυλικά μονομερή μπορούν επίσης να κατηγοριοποιηθούν σε μαλακά και σκληρά. Ο όρος μαλακά, αναφέρεται σε μονομερή των οποίων η τιμή Tg κυμαίνεται μεταξύ -70°C έως περίπου -10°C. Από την άλλη, ως σκληρά χαρακτηρίζονται τα μονομερή με Tg από 5°C έως περίπου 120°C. (Lobo, et al., 2016)



**Σχήμα 10.4:** Σύνθεση και πολυμερισμός πιεσοευαίσθητων συγκολλητικών (Tan & Pfister, 1999) – A: Πολυισοβουτυλένιο, B: Σιλικονούχα, Γ: Πολυακρυλικά

### 10.2.6.1.5 Θερμής Τήξης (hot melt PSAs – HMPSAs)

Τα PSAs θερμής τήξης είναι συγκολλητικά που δεν απαιτούν την προσθήκη οργανικών πτητικών διαλυτών, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα PSAs που περιγράφηκαν παραπάνω καθώς, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, διατηρούν ιδανικές ρεολογικές ιδιότητες. Ο οργανικός αυτός πτητικός διαλύτης είναι απαραίτητος, για να μειώσει το ιξώδες της σύνθεσης, ώστε να είναι εύκολη η επεξεργασία του και ακολούθως εξατμίζεται, ώστε να προκύψει το τελικό αποτέλεσμα (Subedi, et al., 2010). Τα HMPSAs λοιπόν πλεονεκτούν ιδιαίτερα καθώς:

- Δεν απαιτείται εξάτμιση οργανικών διαλυτών
- Δεν απαιτούνται ειδικές προφυλάξεις για την αποφυγή πυρκαγιάς
- Δεν απαιτείται εξειδικευμένη επεξεργασία
- Η κατανάλωση ενέργειας είναι εξαιρετικά χαμηλότερη συγκριτικά
- Είναι φιλικά προς το περιβάλλον
- Υπάρχει η δυνατότητα αυτοματοποιημένης και συνεχόμενης διεργασίας σε κλειστό σύστημα

Βασίζονται επίσης σε θερμοπλαστικά πολυμερή που μπορούν να συνδυαστούν, με τον οξικό αιθυλοβινυλεστέρα να χρησιμοποιείται πιο συχνά ως συγκολλητικό της κατηγορίας αυτής. Απαιτούν γενικότερα την προσθήκη πλαστικοποιητών, πληρωτικών και αντιοξειδωτικών για τη βελτίωση των μηχανικών και φυσικών ιδιοτήτων τους. Συγκεκριμένα οι πλαστικοποιητές, με συνηθέστερους τα πολυβουτένια και τις φθαλικές ενώσεις, βελτιώνουν τις θερμικές ιδιότητες και την αντοχή στις μηχανικές κρούσεις, ενώ τα πληρωτικά τροποποιούν τα χαρακτηριστικά ροής ελαττώνοντας το ιξώδες και μειώνουν την επιφανειακή τους τάση. (Wolff, 2000)

Στη βιβλιογραφία και συγκεκριμένα στις ευρεσιτεχνίες των (Sweet, et al., 1994) και (Pretzer & Sweet, 1999) περιγράφεται η μέθοδο παρασκευής HMPSAs με βάση τη σιλικόνη, στο οποίο το δυναμικό ιξώδες της συγκολλητικής διαμόρφωσης μειώνεται με την προσθήκη κηρών αλκυλομεθυλοσιλοξανίου και πολυμερούς πολυισοβουτυλενίου με χαρακτηριστική ομάδα σιλανόλης αντίστοιχα.

### 10.2.7 Αξιολόγηση Ιδιοτήτων Συγκολλητικών

Η συγκολλητική απόδοση των ΔΘΣ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι εξαιρετικά κρίσιμος παράγοντας για την αποτελεσματικότητά τους. Με το γενικό όρο λοιπόν συγκολλητική απόδοση αναφερόμαστε στις τρεις ακόλουθες ιδιότητες των PSAs: πρόσφυση (tack), αποκόλληση (peel & skin adhesion) και συνεκτική ισχύς (cohesive strength). Παρόλο που η αξιολόγηση τους γίνεται στα πλαίσια *in vitro* ελέγχων, αποτελούν κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας που πρέπει να προσδιορίζονται στην τελική μορφή του διαδερμικού εμπλάστρου, καθώς το σύνολο των συστατικών που το απαρτίζουν έχει άμεση επίδραση σε αυτές. Επιπλέον, καθώς οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από το υπόστρωμα εφαρμογής, τη μεμβράνη υποστήριξης και τις παραμέτρους του ελέγχου, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως πραγματικές ιδιότητες των συγκολλητικών. (Minghetti, et al., 2004)

Σύμφωνα με την οδηγία του (EMA - CHMP, 2014), οι έλεγχοι για το χαρακτηρισμό των συγκολλητικών μπορεί να περιλαμβάνουν δοκιμές απομάκρυνσης της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης από το διαδερμικό έμπλαστρο χωρίς να μένουν υπολείμματα (shear strength tests) όπως επίσης δοκιμές προσκόλλησης (tack tests) και

ακολουθώς αφαίρεσης (peel & skin adhesion tests) του σκευάσματος από καθορισμένη επιφάνεια – υπόστρωμα.

### 10.2.7.1 Πρόσφυση (Tack)

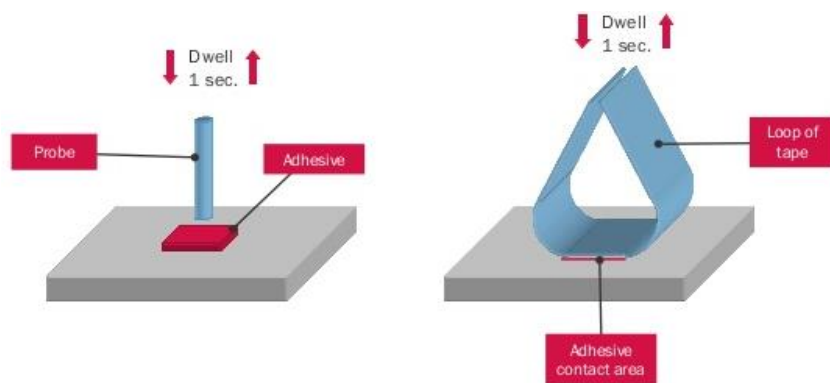
Το κρίσιμο αυτό χαρακτηριστικό των PSAs αποτελεί, σε όρους εφαρμοζόμενης πίεσης, μια μέτρηση της ευκολίας και της ταχύτητας εφαρμογής τους σε ένα επιλεγμένο υπόστρωμα. Δεδομένου ότι η ιδιότητα αυτή αποτελεί μέτρο της αλληλεπίδρασης συγκολλητικού/υποστρώματος, τα αποτελέσματα του ελέγχου επηρεάζονται από τη συνεκτική ισχύ και τις ρεολογικές ιδιότητες του PSA καθώς και από την ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια του υποστρώματος. Οι δοκιμές λοιπόν που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται σε διαφορετική αρχή λειτουργίας, όπως παρουσιάζεται ακολούθως και χαρακτηρίζονται ως: (Lobo, et al., 2016)

- Thumb tack test
- Probe tack test
- Loop test
- Rolling ball test

Ο έλεγχος Thumb tack αποτελεί μια εξαιρετικά απλή και εύκολη δοκιμή που προσφέρει μια ιδέα σχετικά με τη δύναμη που απαιτείται ώστε να απομακρυνθεί ο αντίχειρας μετά την αρχική επαφή με το συγκολλητικό. Μεταβάλλοντας την πίεση και τον χρόνο επαφής και παράλληλα σημειώνοντας τη δυσκολία στην αφαίρεση του από το συγκολλητικό, γίνεται αντιληπτό πόσο εύκολα, γρήγορα και έντονα το PSA και επομένως το ΔΘΣ μπορεί να σχηματίσει δεσμό με το δέρμα. Σημαντικά μειονεκτήματα της δοκιμής αυτής αποτελούν η υποκειμενικότητα των αποτελεσμάτων και το γεγονός ότι τα δεδομένα δεν μπορούν να ποσοτικοποιηθούν. (Wokovich, et al., 2006)

Ο έλεγχος Probe tack αναπτύχθηκε με σκοπό να προσομοιώσει και να βελτιώσει τον έλεγχο Thumb tack. Σύμφωνα λοιπόν με την (ASTM International, 2009), ένας ανιχνευτής (probe) έρχεται σε επαφή

με την επιφάνεια του συγκολλητικού και με την εφαρμογή μικρής πίεσης δημιουργείται δεσμός μεταξύ τους. Η δύναμη που απαιτείται για να απομακρυνθεί από το συγκολλητικό και να σπάσει ο δεσμός τους αποτελεί την τιμή της πρόσφυσης και

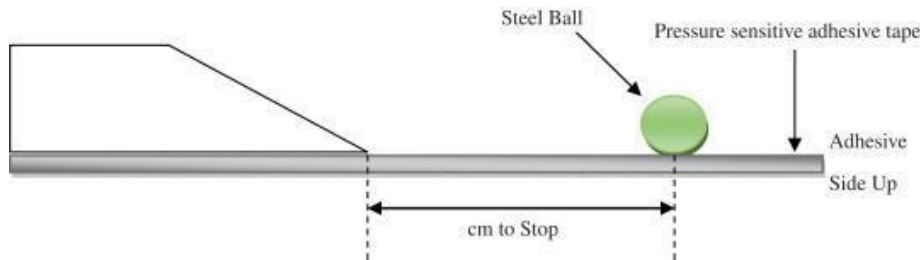


Σχήμα 10.5: Δοκιμές πρόσφυσης (Instron, 2018) – Αριστερά: Probe tack test, Δεξιά: Loop test

εκφράζεται σε Newton. Η δοκιμή αυτή έχει μελετηθεί αρκετά και για αυτό έχει προκύψει το συμπέρασμα πως η φύση του ανιχνευτή και η ελεύθερη επιφανειακή ενέργεια των διαφορετικών υλικών παίζουν καθοριστικό ρόλο. (Gutschke, et al., 2010)

Στον έλεγχο Loop ένα τμήμα του διαδερμικού εμπλάστρου δημιουργεί μια θηλιά, με τη συγκολλητική στοιβάδα προς την εξωτερική πλευρά. Έρχεται λοιπόν σε επαφή με ένα υπόστρωμα και εν συνεχεία απομακρύνεται με σταθερή ταχύτητα έως ότου σπάσει ο δεσμός που έχει δημιουργηθεί. Η μέγιστη αυτή δύναμη που απαιτείται, καταγράφεται ως τιμή πρόσφυσης. (Kowalski, et al., 2013)

Ο έλεγχος Rolling ball περιλαμβάνει την κίνηση μιας μεταλλικής σφαίρας πάνω από διαδερμικά έμπλαστρα, σε άμεση επαφή με τη συγκολλητική τους στοιβάδα. Η απόσταση λοιπόν που διανύει η σφαίρα λαμβάνεται ως μέτρο της πρόσφυσης. Όσο μεγαλύτερη η απόσταση, τόσο λιγότερη η συγκολλητική ικανότητα του PSA και επομένως του ΔΘΣ. Παρά την ευκολία και τη γενικότερη αποδοχή του ως ποιοτικού ελέγχου, δε χαρακτηρίζεται ως ο καταλληλότερος, καθώς τα ΔΘΣ χαρακτηρίζονται από χαμηλές τιμές πρόσφυσης. (Minghetti, et al., 1999)

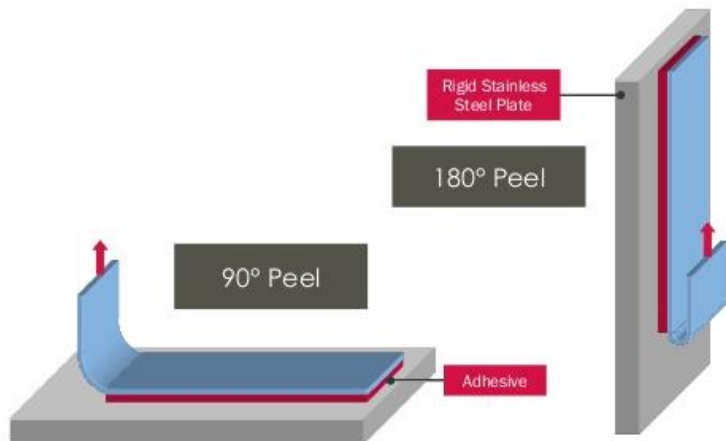


Σχήμα 10.6: Rolling ball test (Bhowmick, et al., 2014)

### 10.2.7.2 Αποκόλληση (Peel Adhesion)

Η ιδιότητα αυτή είναι μέτρο της δυσκολίας, της δύναμης δηλαδή που απαιτείται, για αφαίρεση του συγκολλητικού και επομένως του ΔΘΣ, αφού έχει δημιουργηθεί δεσμός με ένα υπόστρωμα. Και σε αυτή την περίπτωση σοβαρό μειονέκτημα αποτελεί ο μεγάλος αριθμός μεταβλητών, όπως η πίεση και ο χρόνος επαφής στο υπόστρωμα, η φύση του υποστρώματος και της μεμβράνης υποστήριξης, η γωνία και η ταχύτητα αποκόλλησης και το πάχος της στοιβάδας του συγκολλητικού στο ΔΘΣ. Καθώς αποτελεί ένδειξη της ευκολίας απομάκρυνσης βρίσκεται σε αντίθεση με την ιδιότητα πρόσφυσης που αναφέρεται στην ευκολία προσκόλλησης. (Venkatraman & Gale, 1998)

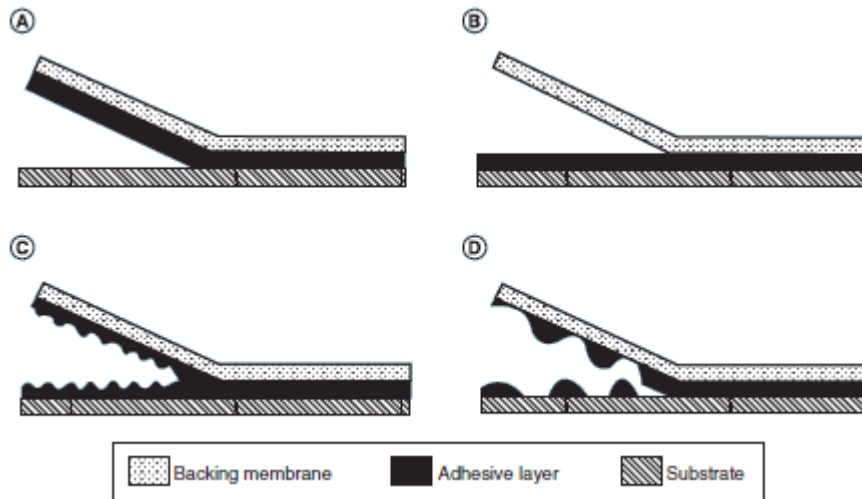
Οι περισσότερες σήμερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ελέγχου της αποκόλλησης βασίζονται στη χρήση ενός μεταλλικού υποστρώματος πάνω στο οποίο προσκολλάται τμήμα καθορισμένου μεγέθους του ΔΘΣ, συγκεκριμένα με πλάτος 0,5 ή 1 inch. Ακολουθώντας, απομακρύνεται με σταθερή ταχύτητα 300 mm/min και γωνία αποκόλλησης 90° ή 180°. Η τιμή επομένως της αποκόλλησης δίνεται σε μονάδες ισχύος ανά μονάδα πλάτους, δηλαδή N/mm. (Harmonized International Standard, 2007)



Σχήμα 10.7: Μέθοδοι ελέγχου αποκόλλησης (Instron, 2018) – Αριστερά: Γωνία αποκόλλησης 90°, Δεξιά: Γωνία αποκόλλησης 180°

Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί πως υπάρχουν ορισμένοι τρόποι αποτυχίας της αποκόλλησης είτε αυτή είναι από την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη είτε από ένα υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, η συγκολλητική στοιβάδα μπορεί να μην αφαιρεθεί μαζί με τη μεμβράνη υποστήριξης από το υπόστρωμα, αλλά να διαχωριστεί από αυτό (B). Σε άλλη περίπτωση, μπορεί να υπάρχει πρόβλημα με τη συνεκτική ισχύ του συγκολλητικού με

αποτέλεσμα τμήμα της στοιβάδας του να συγκρατείται, όχι μόνο στη μεμβράνη υποστήριξης, αλλά και στο υπόστρωμα (C). Τέλος, μπορεί να συμβεί συνδυασμός των δυο προηγούμενων (D). Οι τρόποι αυτοί αποτυχίας της αποκόλλησης σε συνδυασμό με το ευνοϊκό αποτέλεσμα αυτής (A), παρουσιάζονται στο σχήμα 10.8. (Lobo, et al., 2016)



Σχήμα 10.8: Τρόποι αποτυχίας αποκόλλησης ΔΘΣ τύπου Drug-in-Adhesive (Lobo, et al., 2016)

### 10.2.7.3 Συνεκτική Ισχύς (Cohesive Strength)

Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με την ικανότητα του συγκολλητικού να απομακρύνεται πλήρως από το υπόστρωμα χωρίς να αφήνει υπολείμματα. Αξιολόγησή της επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της δύναμης διατιμήσεως (shear strength), καθώς χαρακτηρίζεται ως μέτρο της συνεκτικής ισχύος και αντικατοπτρίζει την αντίσταση της ροής του συγκολλητικού υπό την επίδραση εφαπτομενικών τάσεων. Παρόλο που είναι επιθυμητή η χαμηλή τιμή, σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της πρόσφυσης του ΔΘΣ.

Ο έλεγχος της δύναμης διατιμήσεως πραγματοποιείται με δυο πειραματικές διατάξεις, τη στατική και τη δυναμική. Και οι δυο βασίζονται στην απομάκρυνση του συγκολλητικού σε μια διεύθυνση παράλληλη με το υπόστρωμα. Μεταβλητές όπως η ταχύτητα απομάκρυνσης, ο τύπος του υποστρώματος και το μέγεθος του δείγματος πρέπει να καθοριστούν καθώς επηρεάζουν άμεσα την τιμή, η οποία δίνεται σε μονάδες ισχύος ανά μονάδα πλάτους. (Wokovich, et al., 2006)

Οι βέλτιστες τιμές πρόσφυσης, αποκόλλησης και συνεκτικής ισχύος ενός ΔΘΣ απαιτούνται, για να επιτευχθεί ένα σύστημα με εύκολη και αποδοτική διεργασία κατασκευής καθώς και κλινική αποτελεσματικότητα.

## 10.3 Χαρακτηριστικά Ιδανικού ΔΘΣ

Ανεξαρτήτως του τύπου του ΔΘΣ, το ιδανικό τελικό προϊόν θα πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, ορισμένα από τα οποία έχουν αναφερθεί ήδη: (Jalwal, et al., 2010)

- Διάρκεια ζωής τουλάχιστον 2 έτη
- Κατάλληλο μέγεθος, μικρότερο των 40 cm<sup>2</sup>
- Επιθυμητή συχνότητα χορήγησης, από μια φορά την ημέρα έως μια φορά την εβδομάδα
- Να είναι αισθητικά αποδεκτό, είτε διαφανές είτε στο χρώμα του δέρματος

- Κατάλληλη συσκευασία, ώστε να απαιτούνται τα λιγότερα δυνατά βήματα με τη μικρότερη δυνατή δυσκολία για την εφαρμογή του από τον ασθενή
- Εύκολη απομάκρυνση της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης, εξαιρετικά σημαντικό για ηλικιωμένους ασθενείς
- Επαρκής προσκόλληση στο δέρμα καθ' όλη τη διάρκεια εφαρμογής
- Να μην αφήνει υπολείμματα στο δέρμα ούτε να προκαλεί πόνο ή δυσφορία κατά την αφαίρεση
- Να μην προκαλεί ανεπιθύμητες δερματικές αντιδράσεις, όπως δερματίτιδα εξ επαφής, ευαισθητοποίηση, φωτοτοξικότητα, φωτοευαισθητοποίηση και ερύθημα
- Σταθερή και συνεπής βιοφαρμακευτική απόδοση, με ελαχιστοποίηση της μεταβλητότητας, σε όλη τη διάρκεια εφαρμογής

Στην πραγματικότητα είναι δύσκολο να υπάρξει ΔΘΣ που να ικανοποιεί όλες τις παραπάνω απαιτήσεις, οι οποίες αποτελούν σύμφωνα με την προσέγγιση QbD το Quality Target Product Profile – QTPP. Γι' αυτό και είναι αποδεκτό να υπάρχει μια ισορροπία που να εξασφαλίζει αποτελεσματικότητα, ασφάλεια και αποδοχή από τους ασθενείς. (Bandyopadhyay, 2017)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11<sup>ο</sup>: Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η *in vitro* αξιολόγηση της διαπερατότητας ΦΔΟ με ασθενώς βασικό χαρακτήρα, δραστική ουσία Α και δραστική ουσία Β, μέσω της επιδερμίδας ως πρώτο βήμα για την ανάπτυξη διαδερμικών θεραπευτικών συστημάτων με επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων παραγόντων, όπως η χημική μορφή των ΦΔΟ, η σύσταση του φορέα διαδερμικής χορήγησης καθώς και το δέρμα από διαφορετικούς δότες.

Η επιλογή των δραστικών ουσιών Α και Β βασίστηκε στα φυσικοχημικά και φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά, όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 11.1, τα οποία αποτελούν ενδείξεις ότι υπάρχει δυνατότητα ανάπτυξης λειτουργικών ΔΘΣ. Η επίτευξη σταθερών επιπέδων των ΦΔΟ στο αίμα σε συνδυασμό με τη μείωση της συχνότητας χορήγησής τους ως αποτέλεσμα της διαδερμικής χορήγησης, θα διευκολύνει τη συμμόρφωση των ασθενών με την εκάστοτε θεραπεία.

Απαραίτητη προϋπόθεση, πριν την έναρξη των μελετών, αποτελεί η εκτίμηση του ρυθμού διαδερμικής διαπερατότητας των δραστικών ουσιών Α και Β που θα πρέπει να παρουσιάζεται στις *in vitro* δοκιμές ώστε να επιτυγχάνεται θεραπευτική δράση. Ο υπολογισμός λοιπόν, με βάση τα φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά, έδωσε τιμές  $1,12 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$  και  $2,93 \text{ mg/cm}^2/\text{h}$  αντίστοιχα (δεδομένα στο αρχείο).

Φυσικοχημικό Χαρακτηριστικό	Δραστική Ουσία Α	Δραστική Ουσία Β
Σταθερά Ιονισμού (pKa)	10,42	9,62
Συντελεστής Κατανομής (LogP)	3,28	4,05
Κάθαρση (Cl) για 70 kg, μέσο βάρος	170 mL/min	337 mL/min
Συγκέντρωση Σταθεροποιημένης Κατάστασης (C <sub>ss</sub> )	0,120 µg/mL	0,145 µg/mL
Μοριακό Βάρος (Mr)	< 500 g/mol	< 500 g/mol
Υδατοδιαλυτότητα (Υδροχλωρικού Άλατος)	35 mg/mL	14 mg/mL

Πίνακας 11.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δραστικών ουσιών Α & Β



# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12<sup>ο</sup>: Υλικά, Όργανα & Συσκευές

### 12.1 Υλικά

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

- Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile – *ACN*) καθαρότητας HPLC (Fisher, UK)
- Μεθανόλη (Methanol – *MeOH*) καθαρότητας HPLC (Fisher, UK)
- Νερό (Water –  $H_2O$ ) καθαρότητας HPLC (Fisher, UK)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Isopropyl Alcohol – *IPA*) καθαρότητας LC-MS (Merck, USA)
- Ακετονιτρίλιο (*ACN*) καθαρότητας LC-MS (Merck, USA)
- Νερό ( $H_2O$ ) καθαρότητας LC-MS (Merck, USA)
- Διυδρίτης δισόξινου φωσφορικού νατρίου ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ) (Lach-Ner, Czech Republic)
- Μυρμηκικό αμμώνιο ( $HCOONH_4$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- Μυρμηκικό οξύ ( $HCOOH$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- Τριαιθυλαμίνη ( $(CH_3CH_2)_3N$ ) (Acros Organics, USA)
- Ορθοφωσφορικό οξύ ( $H_3PO_4$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- Απιονισμένο νερό (Στήλη Zalion Ionel ABEE)
- Φυσιολογικό ορό (Sodium Chloride 0,9%, DEMO ABEE)
- Προπυλενογλυκόλη (Chemco by Syndesmos, Greece)
- Γλυκερίνη 85% Ph. Eur. (Fagron, Greece)
- Αιθανόλη 96° (Carlo Erba Reagents, Spain)
- Υδροξείδιο του νατρίου ( $NaOH$ ) (Panreak, Spain)
- Διχλωρομεθάνιο ( $CH_2Cl_2$ ) analytical reagent grade (Fisher, UK)
- Χλωριούχο νάτριο ( $NaCl$ ) (Panreak, Spain)
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $Na_2SO_4$ ) (Sigma-Aldrich, USA)
- Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$ ) (Deutero GmbH, Germany)
- Λιμονένιο (Sigma Chemical Co, USA)
- Μεμβράνη υποστήριξης πολυαιθυλενίου CoTran™ 9720 (3M, USA)
- Αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη πολυεστέρα Scotchpak™ 1022 (3M, USA)
- Σιλικονούχο πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό BIO-PSA 7-4301 (Dow Corning®, USA)
- Διαλύματα βαθμονόμησης πεχαμέτρου  $pH = 4, 7, 10$  (WTW GmbH, Germany)
- Klucel HF (Ashland Inc., USA)
- HPMC E4M (Colorcon, USA)
- HPMC K4M (Colorcon, USA)
- Aristoflex AVC (Clariant, Switzerland)
- Carbopol® Ultrez 10 (Lubrizol, USA)
- Aerosil 200 colloidal silicon dioxide (Fagron, Greece)
- Xanthan Gum (CP Kelco, USA)
- Natrosol 250 HX (Hercules, USA)
- Μεμβράνη δέρματος

## 12.2 Όργανα & Συσκευές

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- Ηλεκτρονικός ζυγός Mettler Toledo AT 261, Delta Range® (Mettler, Switzerland)
- Περιστροφικός εξατμιστήρας με υδατόλουτρο Büchi Rotavapor R-2000 (Büchi Labortechnik, Switzerland)
- Υδατόλουτρο υπερήχων Branson 5200 Ultrasonic Cleaner (Branson, USA)
- Κυψελίδες χαλαζία τύπου 6030-UV (Hellma GmbH & Co, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού UV-1700 PharmaSpec UV-Vis spectrophotometer με λογισμικό UV Probe version 2.10 (Shimadzu Corporation, Japan)
- Μαγνητικοί αναδευτήρες Nuova II stir plate και Cimarec 3 (Thermolyne, USA)
- Μαγνήτες ανάδευσης διάφορων μεγεθών (Fisher Scientific, USA)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό Millipore (Merck, USA)
- Φίλτρα διήθησης Durapore® Filter Membranes NYLON, pore size 0,45  $\mu\text{m}$ , diam. 47 mm
- Κλίβανος WTB binder (Binder GmbH, Germany)
- Φυγόκεντρος Hermle Z 32 HK (HERMLE Labortechnik GmbH, Germany)
- Περιστρεφόμενος αναδευτήρας: SBS - Roller (SBS, Spain)
- Τροποποιημένα κύτταρα τύπου Franz (Crown Glass, USA), με εμβαδόν ανοίγματος 0,636  $\text{cm}^2$  και όγκο διαμερίσματος δέκτη 6,275 mL
- Μεταλλικοί σφιγκτήρες (Thomas Scientific, USA)
- Θερμορυθμιστής Edmund Bühler 7400 (Edmund Bühler GmbH, Germany)
- Υδατόλουτρο Edmund Bühler D-7400 (Edmund Bühler GmbH, Germany)
- Φασματόμετρο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR Brüker DRX 600 (Brüker, Germany)
- Πεχάμετρο Schott Instruments pH-meter Lab 860 (SI Analytics, USA)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13<sup>ο</sup>: Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

### 13.1 Πειράματα Λήψης Φάσματος Απορρόφησης Δραστικής Ουσίας Β

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν ο προσδιορισμός του μήκους κύματος όπου η δραστική ουσία Β, η οποία διαθέτει χαρακτηριστικές χρωμοφόρες ομάδες, παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση ( $\lambda_{\max}$ ) ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας. Η τιμή αυτή θα χρησιμοποιηθεί κατά τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας Β με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης συνδεδεμένο με ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (UV-Vis). Οι βασικοί λόγοι για τους οποίους επιλέγεται το συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι η επίτευξη μέγιστης ευαισθησίας και η ελαχιστοποίηση της μεταβολής της προσδιοριζόμενης απορρόφησης εξαιτίας μικρών μεταβολών του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, καθώς στο  $\lambda_{\max}$  παρατηρείται πλατό στο φάσμα απορρόφησης.

Ζυγίστηκαν λοιπόν 10 mg υδροχλωρικού άλατος της δραστικής ουσίας Β ( $B - HCl$ ), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη ( $MeOH$ ). Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Από το διάλυμα αυτό, ελήφθη 1 mL, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και αραιώθηκε, πάλι, μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη. Ακολούθησε και σε αυτή την περίπτωση ανακίνηση και τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Το διάλυμα που προέκυψε, συγκέντρωσης 10  $\mu g/mL$ , χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη του φάσματος απορρόφησης.

Η λήψη του φάσματος απορρόφησης της δραστικής ουσίας Β έγινε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, με σάρωση από τα 195 έως τα 300 nm και κυψελίδα από χαλαζία πάχους 1 cm. Η ταχύτητα σάρωσης ήταν 60 nm/min, ενώ ως τυφλό, για τη διόρθωση του υποβάθρου, χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη.

### 13.2 Συνθήκες Ανάλυσης

#### 13.2.1 Δραστική Ουσία Α

Η ανάλυση των δειγμάτων της δραστικής ουσίας Α έγινε με τη βοήθεια στήλης χρωματογραφικής ανάλυσης Fortis C18 5  $\mu m$ , 150 x 3,0 mm (Fortis Technologies Ltd., UK). Ως κινητή φάση (mobile phase – MP) χρησιμοποιήθηκε μείγμα ακετονιτριλίου και ρυθμιστικού διαλύματος [ $HCOONH_4$  20 mM,  $HCOOH$  0,5%,  $(CH_3CH_2)_3N$  0,2% -  $pH = 3$ ] σε αναλογία 30:70, με ταχύτητα ροής 0,5 mL/min και όγκο του προς ανάλυση δείγματος 50  $\mu L$ .

Η δραστική ουσία Α δεν διαθέτει χρωμοφόρες ή φθορίζουσες ομάδες που να καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της με σύστημα HPLC – UV ή HPLC – FL. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P4000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος (Charged Aerosol Detector – CAD, ESA Corona<sup>®</sup>, ESA, Chelmsford, MA, USA), αυτόματο δειγματολήπτη AS3000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA) και λογισμικό EZChrom Agilent<sup>®</sup> version 3.2 (Agilent Technologies, Inc., Pleasanton, CA, USA).

Συνοπτικά, οι συνθήκες ανάλυσης της δραστικής ουσίας A παρουσιάζονται στον πίνακα 12.1.

<b>Χρωματογραφική Στήλη</b>	Fortis C18 (150 x 3,0 mm, 5μm)
<b>Κινητή Φάση (v/v)</b>	Ακετονιτρίλιο : Ρυθμιστικό Διάλυμα [ $HCOONH_4$ 20 mM, $HCOOH$ 0,5%, $(CH_3CH_2)_3N$ 0,2% - $pH = 3$ ] – 30 : 70
<b>Ταχύτητα Ροής (mL/min)</b>	0,5
<b>Ανίχνευση</b>	Corona CAD: αέριο άζωτο 35 psi Εύρος απόκρισης 100 pA πλήρους κλίμακας
<b>Όγκος Δείγματος (μL)</b>	50
<b>Χρόνος Έκλουσης (min)</b>	4

Πίνακας 12.1: Συνθήκες ανάλυσης δραστικής ουσίας A

### 13.2.2 Δραστική Ουσία B

Η ανάλυση των δειγμάτων της δραστικής ουσίας B έγινε με τη βοήθεια στήλης χρωματογραφικής ανάλυσης Hypersil BDS C18 5 μm, 250 x 4,6 mm (Thermo Fisher Scientific, USA). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μείγμα ακετονιτρίλιου και ρυθμιστικού διαλύματος [ $NaH_2PO_4$  25 mM,  $H_3PO_4$  0,1%,  $(CH_3CH_2)_3N$  0,2%] σε αναλογία 50:50, με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min και όγκο του προς ανάλυση δείγματος 50 μL.

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P1000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), αυτόματο δειγματολήπτη Spectra System AS1000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Spectra System UV2000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), μονάδα ελέγχου του συστήματος από H/Y Spectra System SN4000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA) και λογισμικό ChromQuest version 2.1 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Συνοπτικά, οι συνθήκες ανάλυσης της δραστικής ουσίας B παρουσιάζονται στον πίνακα 12.2.

<b>Χρωματογραφική Στήλη</b>	Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 mm, 5μm)
<b>Κινητή Φάση (v/v)</b>	Ακετονιτρίλιο : Ρυθμιστικό Διάλυμα [ $NaH_2PO_4$ 25 mM, $H_3PO_4$ 0,1%, $(CH_3CH_2)_3N$ 0,2%] – 50 : 50
<b>Ταχύτητα Ροής (mL/min)</b>	1,0
<b>Μήκος Κύματος Ανιχνευτή (nm)</b>	228
<b>Όγκος Δείγματος (μL)</b>	50
<b>Χρόνος Έκλουσης (min)</b>	6

Πίνακας 12.2: Συνθήκες ανάλυσης δραστικής ουσίας B

## 13.3 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος & Κινητής Φάσης

### 13.3.1 Δραστική Ουσία A

Για την παρασκευή ενός λίτρου ρυθμιστικού διαλύματος [ $HCOONH_4$  20 mM,  $HCOOH$  0,5%,  $(CH_3CH_2)_3N$  0,2% -  $pH = 3$ ], ζυγίστηκαν 1,15g  $HCOONH_4$  και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ακολούθησε προσθήκη 500 mL νερού, καθαρότητας LC-MS, και ανακίνηση έως ότου επέλθει πλήρης διάλυση του στερεού. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη μεταφέρθηκε στον απαγωγό και προστέθηκαν με αυτόματη πιπέτα 5 mL  $HCOOH$  και 2 mL  $(CH_3CH_2)_3N$ . Τέλος, η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με νερό αντίστοιχης καθαρότητας και ανακινήθηκε με ιδιαίτερη προσοχή.

Όσον αφορά την κινητή φάση, 700 mL του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml, στην οποία προστέθηκαν 300 ml ακετονιτριλίου καθαρότητας LC-MS. Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε καλά και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min ώστε να απαερωθεί.

### 13.3.2 Δραστική Ουσία Β

Για την παρασκευή ενός λίτρου ρυθμιστικού διαλύματος [ $NaH_2PO_4$  25 mM,  $H_3PO_4$  0,1%,  $(CH_3CH_2)_3N$  0,2%], ζυγίστηκαν 3,9g  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL. Ακολούθησε προσθήκη 500 mL νερού, καθαρότητας HPLC, και ανακίνηση έως ότου επέλθει πλήρης διάλυση του στερεού. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη μεταφέρθηκε στον απαγωγό και προστέθηκαν με αυτόματη πιπέτα 1 mL  $H_3PO_4$  και 2 mL  $(CH_3CH_2)_3N$ . Τέλος, η ογκομετρική φιάλη συμπληρώθηκε μέχρι τη χαραγή με νερό αντίστοιχης καθαρότητας και ανακινήθηκε με ιδιαίτερη προσοχή.

Όσον αφορά την κινητή φάση, 500 mL του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 1000 ml, στην οποία προστέθηκαν 500 ml ακετονιτριλίου καθαρότητας HPLC. Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε καλά και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min ώστε να απαερωθεί. Τέλος, η κινητή φάση διηθήθηκε υπό κενό μέσω κατάλληλων φίλτρων για απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων.

## 13.4 Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων

### 13.4.1 Δραστική Ουσία Α

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις από μητρικό διάλυμα (stock solution 1). Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος ζυγίστηκαν 10 mg υδροχλωρικού άλατος της δραστικής ουσίας Α ( $A - HCl$ ), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε, στάδιο κατά το οποίο δημιουργήθηκε αφρός, και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Η συγκέντρωση του διαλύματος που προέκυψε ήταν 100  $\mu\text{g/mL}$  και κατόπιν κατάλληλων αραιώσεων με κινητή φάση, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.3, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Συγκέντρωση Πρότυπου Διαλύματος ( $\mu\text{g/mL}$ )	Όγκος Διαλύματος Συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ – stock solution 1 ( $\mu\text{L}$ )	Όγκος Κινητής Φάσης ( $\mu\text{L}$ )
1,0	10	990
3,0	30	970
5,0	50	950
7,0	70	930
10,0	100	900

Πίνακας 12.3: Μεθοδολογία παρασκευής προτύπων διαλυμάτων A-HCl συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0  $\mu\text{g/mL}$

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως μητρικό διάλυμα (stock solution 2) το πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$  και κινητή φάση για τις απαραίτητες αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,1 – 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , όπως φαίνεται στον πίνακα 12.4.

Συγκέντρωση Πρότυπου Διαλύματος (μg/mL)	Όγκος Διαλύματος Συγκέντρωσης 10 μg/mL – stock solution 2 (μL)	Όγκος Κινητής Φάσης (μL)
0,1	10	990
0,3	30	970
0,5	50	950
0,7	70	930
1,0	100	900

Πίνακας 12.4: Μεθοδολογία παρασκευής προτύπων διαλυμάτων A-HCl συγκεντρώσεων 0,1 – 1,0 μg/mL

Επιπλέον, στα πλαίσια ενός *in vitro* πειράματος διαδερμικής διαπερατότητας παρασκευάστηκε μητρικό διάλυμα (stock solution 3) της A – HCl σε συγκέντρωση 100 μg/mL με την ιδιαιτερότητα ότι τα 10 mg της ΦΔΟ που ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με φυσιολογικό ορό (normal saline – NS), ισοτονικό διάλυμα δηλαδή συγκέντρωσης 0,9% w/v NaCl. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως, έπειτα από την ανακίνηση της ογκομετρικής φιάλης και πριν την τοποθέτησή της σε λουτρό υπερήχων για 10 min, δεν παρατηρήθηκε αφρός. Όσον αφορά τα πρότυπα διαλύματα σε NS συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0 μg/mL, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τόσο με κινητή φάση όσο και με φυσιολογικό ορό, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 12.5.

Συγκέντρωση Πρότυπου Διαλύματος σε NS (μg/mL)	Όγκος Διαλύματος Συγκέντρωσης 100 μg/mL σε NS – stock solution 3 (μL)	Όγκος Κινητής Φάσης (μL)	Όγκος Φυσιολογικού Ορού (μL)
1,0	10	500	490
3,0	30	500	470
5,0	50	500	450
7,0	70	500	430
10,0	100	500	400

Πίνακας 12.5: Μεθοδολογία παρασκευής προτύπων διαλυμάτων σε NS A-HCl συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0 μg/mL

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ως μητρικό διάλυμα (stock solution 4) το πρότυπο διάλυμα σε NS συγκέντρωσης 10 μg/mL σε συνδυασμό με κινητή φάση και φυσιολογικό ορό για τις απαραίτητες αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα σε NS συγκεντρώσεων 0,1 – 1,0 μg/mL, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 12.6.

Συγκέντρωση Πρότυπου Διαλύματος σε NS (μg/mL)	Όγκος Διαλύματος Συγκέντρωσης 10 μg/mL σε NS – stock solution 4 (μL)	Όγκος Κινητής Φάσης (μL)	Όγκος Φυσιολογικού Ορού (μL)
0,1	10	500	490
0,3	30	500	470
0,5	50	500	450
0,7	70	500	430
1,0	100	500	400

Πίνακας 12.6: Μεθοδολογία παρασκευής προτύπων διαλυμάτων σε NS A-HCl συγκεντρώσεων 0,1 – 1,0 μg/mL

### 13.4.2 Δραστική Ουσία B

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις από μητρικό διάλυμα (stock solution). Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος ζυγίστηκαν 10 mg της B – HCl, μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και

αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό. Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη ανακινήθηκε και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Η συγκέντρωση του διαλύματος που προέκυψε ήταν 100 µg/mL και κατόπιν κατάλληλων αραιώσεων με κινητή φάση, όπως φαίνεται στον πίνακα 12.7, παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0 µg/mL.

Συγκέντρωση Πρότυπου Διαλύματος (µg/mL)	Όγκος Διαλύματος Συγκέντρωσης 100 µg/mL – stock solution (µL)	Όγκος Κινητής Φάσης (µL)
1,0	10	990
3,0	30	970
5,0	50	950
7,0	70	930
10,0	100	900

Πίνακας 12.7: Μεθοδολογία παρασκευής προτύπων διαλυμάτων B-HCl συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0 µg/mL

### 13.5 Έλεγχος Πιθανών Παρεμποδίσεων στις Χρωματογραφικές Κορυφές

Το διάλυμα του υποδοχέα (receptor solution – RS) που χρησιμοποιήθηκε, κατά περίπτωση, στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας A, του υδροχλωρικού άλατος αυτής καθώς και της δραστικής ουσίας B αξιολογήθηκε ως προς την παρεμπόδιση στην εμφάνιση και επομένως στην ποσοτικοποίηση της χρωματογραφικής κορυφής της εκάστοτε ΦΔΟ. Αξιολογήθηκαν επίσης οι φορείς που εφαρμόστηκαν στο διαμέρισμα του δότη κατά τα *in vitro* πειράματα αυτά.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14<sup>ο</sup>: Παρασκευή, Ταυτοποίηση & Αξιολόγηση Σταθερότητας Δραστηκής Ουσίας Α

### 14.1 Μετατροπή Υδροχλωρικού Άλατος Δραστηκής Ουσίας Α σε Βάση

Στην παρούσα μελέτη, η δραστηκή ουσία Α υπό τη μορφή του υδροχλωρικού άλατος δεν διαθέτει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που θα την καθιστούσαν ιδανική υπονήφια για διαδερμική χορήγηση. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε αντίδραση μετατροπής, συγκεκριμένα εξουδετέρωσης, του υδροχλωρικού άλατος αυτής προς την αντίστοιχη ασθενής βάση επειδή η τελευταία δεν είναι εύκολα προσβάσιμη στο εμπόριο. Εξαιτίας της ελαιώδους και ταυτοχρόνως υγρής φύσεώς της, αναμένεται να παρουσιάζει καλύτερα χαρακτηριστικά διαπερατότητας.

Η διαδικασία εξουδετέρωσης της δραστηκής ουσίας Α υπό τη μορφή του υδροχλωρικού άλατος σε βάση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο: Ζυγίστηκε η επιθυμητή ποσότητα της  $A - HCl$  και διαλύθηκε σε νερό ( $\approx 200$  mL για 10g, με βάση τη διαλυτότητά της) με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθως προστέθηκε το υδροξείδιο του νατρίου ( $NaOH$ ), ποσότητα που αντιστοιχεί σε στοιχειομετρική αναλογία 1:4, διαλυμένο σε νερό ( $\approx 25$  mL για 7,5g) και το μείγμα αφέθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 3 h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σχηματίστηκε ποσοτικά η ασθενής βάση της δραστηκής ουσίας Α, εξαιτίας όμως της ελαιώδους και υγρής φύσεώς της δεν καθιζάνει με τη μορφή ιζήματος. Για την απομόνωσή της λοιπόν πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές εκχυλίσεις με διχλωρομεθάνιο ( $CH_2Cl_2$ ) σε συνολική ποσότητα ίση με αυτή του αρχικού υδατικού διαλύματος  $A - HCl$ , στάδιο κατά το οποίο δημιουργήθηκε γαλάκτωμα μεταξύ οργανικής και υδατικής στοιβάδας. Έπειτα, οι συνενωμένες οργανικές στοιβάδες που παραλήφθηκαν, εκπλύθηκαν αρκετές φορές με υδατικό διαλύτη για την απομάκρυνση του χλωριούχου νατρίου ( $NaCl$ ) που σχηματίστηκε καθώς και της  $A - HCl$  και της περίσσειας του υδροξειδίου του νατρίου που δεν αντέδρασαν. Ακολούθησε ξήρανση τους με άνυδρο θεικό νάτριο (anhydrous  $Na_2SO_4$ ), διήθηση μέσω ηθμού με διηθητικό χαρτί και έκπλυση του στερεού θεικού νατρίου με μικρή ποσότητα διχλωρομεθανίου, συλλογή σε γυάλινη σφαιρική φιάλη και εξάτμιση του οργανικού διαλύτη με τη βοήθεια περιστροφικού εξάτμιστήρα (rotary evaporator – rotavap). Η εξάτμιση πραγματοποιήθηκε υπό κενό και σε θερμοκρασία υδατόλουτρου  $33^\circ C$ . Τελικά, παραλήφθηκε ένα λεπτόρρευστο, κίτρινο, ελαιώδες, υγρό προϊόν, με χαρακτηριστική οσμή αμίνης και ιδιαίτερα πτητικό το οποίο αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία  $-20^\circ C$ . Η εκατοστιαία απόδοση της αντίδρασης εξουδετέρωσης, με στοιχειομετρική αναλογία 1:1, υπολογίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\alpha = \frac{\text{Ποσότητα Δραστηκής Ουσίας Α (πειραματική)}}{\text{Ποσότητα Δραστηκής Ουσίας Α (θεωρητική)}} * 100$$

όπου, η θεωρητική ποσότητα της δραστηκής ουσίας Α υπολογίζεται με τη σειρά της από την εξίσωση:

$$\text{Θεωρητική Ποσότητα} = \frac{Mr_A}{Mr_{A-HCl}} * m_{A-HCl}$$

Για την ταυτοποίηση της παραχθείσας δραστηκής ουσίας Α πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος  $^1H-NMR$  και προσδιορισμός του δείκτη διάθλασης (refractive index).

## 14.2 Πειράματα Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η τεχνική της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR) αξιοποιήθηκε κατά κύριο λόγο στην ταυτοποίηση της παραχθείσας δραστικής ουσίας A μέσω της αντίδρασης εξουδετέρωσης της  $A - HCl$ . Ωστόσο, αποτέλεσε και εργαλείο για την αξιολόγηση της σταθερότητάς της σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των φασμάτων ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $CDCl_3$ ). Για τη λήψη των φασμάτων πρωτονίου ( $^1H$ -NMR, 600 Hz) χρησιμοποιήθηκε συσκευή NMR Bruker DRX 600 (Bruker, Germany).

## 14.3 Πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης & Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης

Ο σκοπός των πειραμάτων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (differential scanning calorimetry – DSC) ήταν ο προσδιορισμός του σημείου ζέσεως της δραστικής ουσίας A. Σε επόμενο στάδιο όμως χρησιμοποιήθηκε και για την αξιολόγηση της σταθερότητάς της σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης.

Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης, το υπό μελέτη δείγμα καθώς και το δείγμα αναφοράς θερμαίνονται ταυτόχρονα, με τον ίδιο ρυθμό. Η θερμοκρασία αμφοτέρων αυξάνεται γραμμικά με το χρόνο και η διαφορά της μεταξύ τους θερμοκρασίας είναι ίση με μηδέν. Αν το υπό μελέτη δείγμα υπόκειται σε θερμικά φαινόμενα, το σύστημα ελέγχου ευαισθητοποιείται και του παρέχει μεγαλύτερη ή μικρότερη θερμότητα, προκειμένου να διατηρηθεί η θερμοκρασία του ισοδύναμη με την αντίστοιχη του δείγματος αναφοράς. Όταν συμβαίνει ένα θερμικό φαινόμενο, η διαφορική θερμότητα, η οποία καταγράφεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, παίρνει τη μορφή καμπύλης η οποία έχει στραμμένα τα κοίλα προς τα κάτω ή προς τα πάνω, ανάλογα αν το φαινόμενο είναι ενδόθερμο ή εξώθερμο αντίστοιχα. (Demetzos, 2016)

Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του οργάνου DSC 822<sup>e</sup> Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Switzerland), το οποίο βαθμονομήθηκε με ίνδιο ως πρότυπο ( $T_m = 156.6^\circ C$ ) πριν την έναρξή τους. Τρεις κύκλοι θέρμανσης – ψύξης διεξήχθησαν με σκοπό να εξασφαλιστεί η καλή επαναληψιμότητα των δεδομένων. Η μάζα που τοποθετήθηκε στο χωνευτήριο (crucible) ήταν περίπου 5 mg ενώ το εύρος των θερμοκρασιών από  $40^\circ C$  έως  $400^\circ C$ , με ρυθμό σάρωσης  $10^\circ C$  ανά min. Πριν από κάθε κύκλο τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μία σταθερή θερμοκρασία  $40^\circ C$  για 1 min ώστε να εξασφαλιστεί η εξισορρόπησή τους, ενώ ένα άδειο χωνευτήριο από αλουμίνιο χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς. Τα δεδομένα των μετρήσεων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Mettler-Toledo STAR<sup>e</sup> (Mettler-Toledo LLC, Columbus, OH).

Όσον αφορά την θερμοβαρυμετρική ή θερμοσταθμική ανάλυση (thermo gravimetric analysis – TGA), η εφαρμογή της μας έδωσε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στη μάζα της ελαιώδους και υγρής δραστικής ουσίας A. Η ανάλυση αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας ενός υλικού καθώς και του κλάσματος των πτητικών συστατικών του. Επιτυγχάνεται μέσω της παρακολούθησης της μεταβολής της μάζας του, η οποία μπορεί να οφείλεται σε αντιδράσεις διάσπασης ή οξείδωσης, σε αλλαγές στην κρυσταλλική δομή ή σε διάφορες φυσικές

διεργασίες. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας λοιπόν, η μάζα καταγράφεται συνεχώς, σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου όπως ήλιο ή αργό, καθώς η θερμοκρασία του υλικού αυξάνει, συνήθως γραμμικά με το χρόνο. Μερικές φορές, η ανάλυση εκτελείται σε ατμόσφαιρα αζώτου που περιέχει μέχρι 5% v/v οξυγόνο, με σκοπό την πραγματοποίηση οξείδωσης με αργό ρυθμό. Το θερμογράφημα που τελικά προκύπτει είναι μια κλιμακωτή γραμμή που συσχετίζει τη μάζα σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία του υλικού. Σε συνδυασμό με τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης δίνει πληροφορίες για τα διάφορα θερμικά φαινόμενα και αν αυτά συνοδεύεται από απώλεια μάζας. (Heal, 2002)

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση της δραστικής ουσίας A διενεργήθηκε σε μοντέλο Q500 του οίκου TA Instruments, σε συνεργασία με το Εθνικό ίδρυμα Ερευνών. Το μέγεθος του δείγματος ήταν περίπου 10 mg, το οποίο τοποθετήθηκε σε κατάλληλη κυψελίδα και ακολούθησε η καύση του. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 10°C ανά min και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με ροή αζώτου και οξυγόνου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 15<sup>ο</sup>: Παρασκευή Δραστικής Ουσίας Β

### 15.1 Μετατροπή Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Β σε Βάση

Στην παρούσα μελέτη, η δραστική ουσία Β υπό τη μορφή του υδροχλωρικού άλατος δεν διαθέτει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που θα την καθιστούσαν ιδανική υποψήφια για διαδερμική χορήγηση. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με την διαδερμική διαπερατότητα της και δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να μην αξιολογήσουμε τη διαπερατότητα της Β – HCl μέσω του δέρματος αλλά προχωρήσαμε σε αντίδραση μετατροπής, συγκεκριμένα εξουδετέρωσης, της προς την αντίστοιχη ασθενής βάση επειδή η τελευταία δεν είναι εύκολα προσβάσιμη στο εμπόριο. Εξαιτίας της ελαιώδους και ταυτοχρόνως υγρής φύσεως της τελευταίας, αναμένεται να παρουσιάζει καλύτερα χαρακτηριστικά διαπερατότητας.

Η διαδικασία εξουδετέρωσης της δραστικής ουσίας Β υπό τη μορφή του υδροχλωρικού άλατος σε βάση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την ακόλουθη μέθοδο: Ζυγίστηκε η επιθυμητή ποσότητα της Β – HCl και διαλύθηκε σε νερό ( $\approx$  650 mL για 10g, με βάση τη διαλυτότητα της) με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθως προστέθηκε στάγδην το υδροξείδιο του νατρίου, ποσότητα που αντιστοιχεί σε στοιχειομετρική αναλογία 1:2, διαλυμένο σε νερό και το μείγμα αφέθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα για 1 h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ολοκλήρωσης της αντίδρασης με προσδιορισμό του pH, έχοντας ως ένδειξη τη διατήρησή του σε αλκαλικές τιμές (pH  $\approx$  11) για τουλάχιστον 10 min. Σχηματίστηκε ποσοτικά η ασθενής βάση της δραστικής ουσίας Β, εξαιτίας όμως της ελαιώδους και υγρής φύσεώς της δεν καθιζάνει με τη μορφή ιζήματος. Για την απομόνωσή της λοιπόν πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές εκχυλίσεις με οργανικό διαλύτη σε συνολική ποσότητα ίση με αυτή του αρχικού υδατικού διαλύματος Β – HCl, στάδιο κατά το οποίο δημιουργήθηκε γαλάκτωμα μεταξύ οργανικής και υδατικής στοιβάδας. Έπειτα, οι συνενωμένες οργανικές στοιβάδες που παραλήφθηκαν, εκπλύθηκαν αρκετές φορές με υδατικό διαλύτη για την απομάκρυνση του χλωριούχου νατρίου που σχηματίστηκε καθώς και της Β – HCl και της περίσσειας του υδροξειδίου του νατρίου που δεν αντέδρασαν. Ακολούθησε ξήρανση τους με άνυδρο θειικό νάτριο, διήθηση μέσω ηθμού με διηθητικό χαρτί και έκπλυση του στερεού θειικού νατρίου με μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη, συλλογή σε γυάλινη σφαιρική φιάλη και εξάτμιση του οργανικού διαλύτη με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Η εξάτμιση πραγματοποιήθηκε υπό κενό και σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 33°C. Παραλήφθηκε ένα παχύρρευστο, υποκίτρινο, ελαιώδες, υγρό προϊόν, με χαρακτηριστική οσμή αμίνης. Πριν την αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C, πραγματοποιήθηκε έλεγχος καθαρότητας του προϊόντος, ως προς την παρουσία άλλων αρωματικών ενώσεων, με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatograph – TLC) σε σύστημα 10% v/v διχλωρομεθάνιο σε μεθανόλη. Η εκατοστιαία απόδοση της αντίδρασης εξουδετέρωσης, με στοιχειομετρική αναλογία 1:1, υπολογίστηκε από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\alpha = \frac{\text{Ποσότητα Δραστικής Ουσίας Β (πειραματική)}}{\text{Ποσότητα Δραστικής Ουσίας Β (θεωρητική)}} * 100$$

όπου, η θεωρητική ποσότητα της δραστικής ουσίας Β υπολογίζεται με τη σειρά της από την εξίσωση:

$$\text{Θεωρητική Ποσότητα} = \frac{Mr_B}{Mr_{B-HCl}} * m_{B-HCl}$$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 16<sup>ο</sup>: Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών

### 16.1 Προσδιορισμός Κατάλληλου Φορέα

Την παρασκευή των φορέων της  $A - HCl$ , οι οποίοι ήταν υδατοαλκοολικές γέλες (gels), προηγήθηκε στάδιο εκτίμησης και επιλογής του κατάλληλου φορέα. Απαραίτητο χαρακτηριστικό ήταν η ικανότητα διαλυτοποίησης του λιμονένιου, επιταχυντή διαβατότητας της κατηγορίας των τερπενίων, σε συγκέντρωση 5% v/v.

Για το σκοπό αυτό, σε φιαλίδια σπινθηρισμού (scintillation vials) των 20 mL έγινε προσθήκη των συστατικών του εκάστοτε φορέα, όπως αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 15.1, σε διάφορες αναλογίες (v/v/v) και συνολικό όγκο 4,75 mL. Ακολούθησε η προσθήκη 0,25 mL λιμονένιου, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 5% v/v, με αυτόματη πιπέτα και ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προκειμένου να εξακριβωθεί η πλήρης ή μη διάλυση του.

Φορέας με βάση την Αιθανόλη (EtOH)	Φορέας με βάση την Ισοπροπυλική Αλκοόλη (IPA)
Αιθανόλη (EtOH) 96° Γλυκερόλη Απιονισμένο Νερό	Ισοπροπυλική Αλκοόλη – 2-Προπανάλη (IPA) Απιονισμένο Νερό

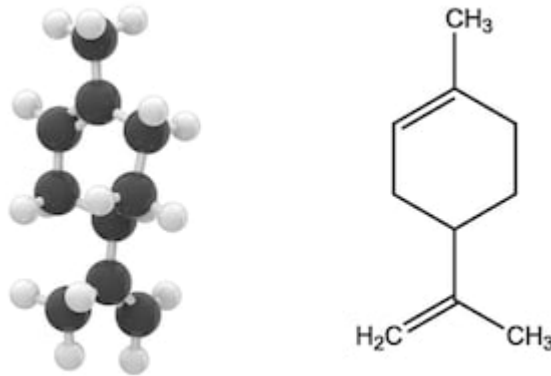
Πίνακας 15.1: Συστατικά φορέων A-HCl

Αντίστοιχο στάδιο εκτίμησης και επιλογής του κατάλληλου φορέα πραγματοποιήθηκε και πριν την παρασκευή των φορέων, υδατοαλκοολικών γελών επίσης, των δραστικών ουσιών A και B. Έγινε λοιπόν προσθήκη των συστατικών του φορέα με βάση την αιθανόλη (EtOH) που χρησιμοποιήθηκε και για την  $A - HCl$ , σε αντίστοιχα φιαλίδια, σε διάφορες αναλογίες (v/v/v) και συνολικό όγκο 5,0 mL. Ακολούθως, προστέθηκε ο εκάστοτε παράγοντας σχηματισμού γέλης υπό έντονη ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και τα φιαλίδια αφέθηκαν για 24 h σε ήπια ανάδευση στον περιστρεφόμενο αναδευτήρα, στους 25°C. Τέλος, αφού αφαιρέθηκαν από τον αναδευτήρα και αφέθηκαν σε ηρεμία για 2 h, η εκάστοτε ΦΔΟ ενσωματώθηκε σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού στον επιθυμητό φορέα με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα και εξακριβώθηκε η δημιουργία ή όχι ομοιογενούς μείγματος των συστατικών.

Η επιλογή των συστατικών των φορέων καθώς και των αναλογιών τους που μελετήθηκαν, δεν έγινε τυχαία. Η ισοπροπυλική αλκοόλη δεν χαρακτηρίζεται καλός διαλύτης της  $A - HCl$ . Με τη χρήση της λοιπόν επιτυγχάνεται μείωση της διαλυτότητας της ΦΔΟ στο φορέα με συνέπεια την επίτευξη διαλυτότητας κορεσμού και άρα ενίσχυση της διαδερμικής διαπερατότητας. Επιπλέον, εξαιτίας της οργανικής του φύσης, αποτελεί διαλύτη του λιμονένιου. Σκοπός χρήσης της αιθανόλης από την άλλη είναι η αύξηση της διαλυτότητας των εξαιρετικά λιπόφιλων δραστικών ουσιών A και B στον φορέα καθώς και η βελτίωση της διαδερμικής τους διαπερατότητας μέσω της αύξησης του συντελεστή κατανομής μεταξύ φορέα και δέρματος (Trommer & Neubert, 2006). Όπως παρουσιάζεται και στα αποτελέσματα της μελέτης των (Megrab, et al., 1995), σε συγκεντρώσεις μέχρι 60%, η δράση της ως επιταχυντή διαβατότητας είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της. Δεν ισχύει όμως το ίδιο και για

συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 60% όπου μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στη διαδερμική διαπερατότητα, ιδιαίτερα λιπόφιλων ΦΔΟ, και αίτια είναι η εκτεταμένη μείωση της ενυδάτωσης του δέρματος. Ο συνδυασμός της όμως με την γλυκερόλη μπορεί να άρει την ερεθιστική της δράση, όπως αναφέρεται και στην ευρεσιτεχνία των (Patel & Ebert, 1989).

Επίσης, η επιλογή του λιμονένιου ως επιταχυντή διαβατότητας για τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας βασίστηκε στη μελέτη των (Takayama & Nagai, 1994) όπου παρατήρησαν συνεργιστική δράση μεταξύ λιμονένιου και αιθανόλης στην ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης καθώς και στα αποτελέσματα αντίστοιχης μελέτης μιας ομάδας Ισπανών ερευνητών. Αυτοί, με τη σειρά τους, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως το λιμονένιο αυξάνει σε σημαντικό βαθμό τη διαδερμική απορρόφηση της  $A - HCl$  (δεδομένα στο αρχείο).



Σχήμα 16.1: Δομή Λιμονένιου

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το λιμονένιο ανήκει στην κατηγορία των τερπενίων και ειδικότερα στα κυκλικά μονοτερπένια. Είναι εύκολα διαθέσιμο καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των εσπεριδοειδών και η τοξικότητά του στο δέρμα θεωρείται ιδιαίτερα χαμηλή. Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στην αναστρέψιμη διαταραχή των λιπιδικών διπλοστοιβάδων της κεράτινης στοιβάδας αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό το συντελεστή διάχυσης των ΦΔΟ. Ωστόσο, τα τερπένια δεν αυξάνουν την κατανομή των ΦΔΟ στην κεράτινη στοιβάδα ούτε τροποποιούν σημαντικά τις πρωτεΐνες της. (Williams & Barry, 1991)

## 16.2 Προσδιορισμός Διαλυτότητας Κορεσμού

Σκοπός των μελετών αυτών ήταν ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού της δραστικής ουσίας A, του υδροχλωρικού άλατος αυτής καθώς και της δραστικής ουσίας B σε πιθανούς φορείς που θα αξιολογηθούν σε *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας καθώς και σε ορισμένα διαλύματα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διάλυμα υποδοχέα στα πειράματα αυτά.

Και στις δυο περιπτώσεις που θα εξεταστούν, ο προσδιορισμός αυτός είναι καθοριστικής σημασίας. Σχετικά με τους φορείς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μέγιστη διαδερμική απορρόφηση επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση μιας ΦΔΟ στον φορέα της προσεγγίζει τη διαλυτότητα κορεσμού σε αυτόν, συμπέρασμα που προκύπτει από την μαθηματική έκφραση του 1<sup>ου</sup> νόμου του Fick. Όσον αφορά τα διαλύματα υποδοχέα, όπως επίσης έχει αναφερθεί, πρέπει να διαθέτουν επαρκή διαλυτότητα για την υπό μελέτη ΦΔΟ έτσι

ώστε να διατηρούνται οι συνθήκες δεξαμενής κατά τη διάρκεια του πειράματος, επιτρέποντας τη συνεχή απορρόφηση, όπως θα συνέβαινε *in vivo*.

Για τον προσδιορισμό της διαλυτότητας κορεσμού λοιπόν, επιλέχθηκε αρχικά να προστεθεί περίσσεια δραστικής ουσίας A, υδροχλωρικού άλατος (δημιουργία ιζήματος) ή ασθενούς βάσης (δημιουργία θολώματος), και δραστικής ουσίας B (δημιουργία θολώματος) σε 5 mL του εκάστοτε φορέα, χωρίς τον παράγοντα σχηματισμού γέλης, ή διαλύματος υποδοχέα σε φιαλίδιο σπινθηρισμού. Τα φιαλίδια εν συνεχεία κλείστηκαν ερμητικά και τοποθετήθηκαν στον περιστρεφόμενο αναδευτήρα για 24 h, εντός κλιβάνου στους 25°C. Μετά το πέρας των 24 h, απομακρύνθηκαν από τον αναδευτήρα και αφέθηκαν σε ηρεμία για 2 h. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων μεταφέρθηκε ποσοτικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 5000 στροφές ανά λεπτό (rounds per minute – rpm) για 15 min στους 25°C. Σημειώνεται, πως όλοι οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν από τρεις φορές και οι συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σε μονάδες % w/v.

### 16.3 Παρασκευή Γελών

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η παρασκευή των γελών δραστικής ουσίας A, υδροχλωρικού άλατος αυτής, και δραστικής ουσίας B που θα χρησιμοποιούνταν στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας.

Όπως και στην περίπτωση των πειραμάτων προσδιορισμού του κατάλληλου φορέα καθώς και της διαλυτότητας κορεσμού, την ανάμειξη των συστατικών του εκάστοτε φορέα σε φιαλίδια σπινθηρισμού ακολούθησε η προσθήκη, κατά περίπτωση, του επιταχυντή διαβατότητας και του παράγοντα σχηματισμού γέλης, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Έπειτα, τα φιαλίδια, με συνολικό περιεχόμενο όγκο 5 mL, τοποθετήθηκαν στον περιστρεφόμενο αναδευτήρα για 24 h στους 25°C. Αφού απομακρύνθηκαν από τον αναδευτήρα και αφέθηκαν σε ηρεμία για 2 h, προστέθηκε η ΦΔΟ σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού της στον αντίστοιχο φορέα. Τέλος, αναδευτήκαν, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, έως ότου σχηματιστούν ομοιογενείς γέλες οι οποίες φυλάσσονταν σε δροσερό και σκιερό μέρος. Υπενθυμίζεται πως το περιεχόμενο των γελών σε επιταχυντή διαβατότητας, ειδικότερα λιμονένιο, καθορίστηκε από την αντίστοιχη ποσότητα στη μελέτη των Ισπανών ερευνητών (δεδομένα στο αρχείο).

Αξίζει να σημειωθεί επίσης πως η προσθήκη της ΦΔΟ γίνεται σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού της ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα διαχωρισμού ή καθίζησης της στη γέλη κατά τη διάρκεια του *in vitro* πειράματος διαδερμικής διαπερατότητας.

### 16.4 Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας B στις Γέλες

Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας B στις γέλες που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το υποκεφάλαιο 16.3. Για το λόγο αυτό, καθορισμένη ποσότητα από κάθε γέλη, που αντιστοιχεί σε 100 µL, μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώθηκε μέχρι τη χαραγή με κινητή φάση. Ακολούθησε ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για 24 h. Από το διάλυμα αυτό, ελήφθησαν δείγματα τα οποία αραιώθηκαν εκ νέου με κινητή φάση πρώτου προσδιοριστεί η δραστική ουσία B σε αυτά με σύστημα HPLC-UV. Τέλος, έγινε σύγκριση της συγκέντρωσης



που προσδιορίστηκε σε κάθε περίπτωση με την αντίστοιχη θεωρητική. Αξίζει να σημειωθεί πως και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις για κάθε γέλη.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 17<sup>ο</sup>: Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Drug-in-Adhesive ΔΘΣ Δραστικής Ουσίας Α

---

## 17.1 Προσδιορισμός Ολικών Στερεών Συγκολλητικών

Τα ολικά στερεά (solids) αντιπροσωπεύουν το σύνολο των μη πτητικών συστατικών ενός δείγματος συγκολλητικού. Είναι επομένως απαραίτητος ο επί τοις εκατό προσδιορισμός αυτών για τους υπολογισμούς που απαιτούνται κατά την παρασκευή των μειγμάτων επίστρωσης.

Για τον προσδιορισμό των ολικών στερεών λοιπόν ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Αρχικά, ο κλίβανος ξήρανσης ρυθμίζεται στους 70°C και η θερμοκρασία ελέγχεται πριν τη χρήση.
- Κόβεται ένα τμήμα της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης (release liner), εμβαδού περίπου 10 cm<sup>2</sup>, και ζυγίζεται στον αναλυτικό ζυγό προκειμένου να προσδιοριστεί το απόβάρό της.
- Ανοίγεται με προσοχή το σκεύος φύλαξης του πιεσοευαίσθητου συγκολλητικού και λαμβάνεται, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα, ποσότητα αυτού η οποία μεταφέρεται στο τμήμα της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης κατά τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εκτεθειμένη η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνειά του.
- Αμέσως, ζυγίζεται η αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη μαζί με το δείγμα του πιεσοευαίσθητου συγκολλητικού και λαμβάνεται το μεικτό βάρος πριν την ξήρανση που αντιστοιχεί στο αρχικό μεικτό βάρος.
- Τοποθετείται στον κλίβανο και ακολουθεί ξήρανση στους 70°C μέχρι σταθερού βάρους, περίπου 30 min.
- Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, απομακρύνεται από τον κλίβανο και αφήνεται έως ότου αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Λαμβάνεται το μεικτό βάρος μετά την ξήρανση που αντιστοιχεί στο τελικό μεικτό βάρος.

Το ποσοστό των ολικών στερεών δίνεται από την εξίσωση:

$$\% \text{ Ολικά Στερεά} = \frac{\text{Τελικό Μεικτό Βάρος} - \text{Απόβαρο}}{\text{Αρχικό Μεικτό Βάρος} - \text{Απόβαρο}} * 100$$

Η παραπάνω διεργασία εκτελείται για τουλάχιστον τρία δείγματα του πιεσοευαίσθητου συγκολλητικού.

## 17.2 Παρασκευή Μειγμάτων Επίστρωσης

Μετά τον προσδιορισμό των ολικών στερεών, παρασκευάζονται τα μείγματα επίστρωσης. Η παρασκευή τους πραγματοποιείται σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:

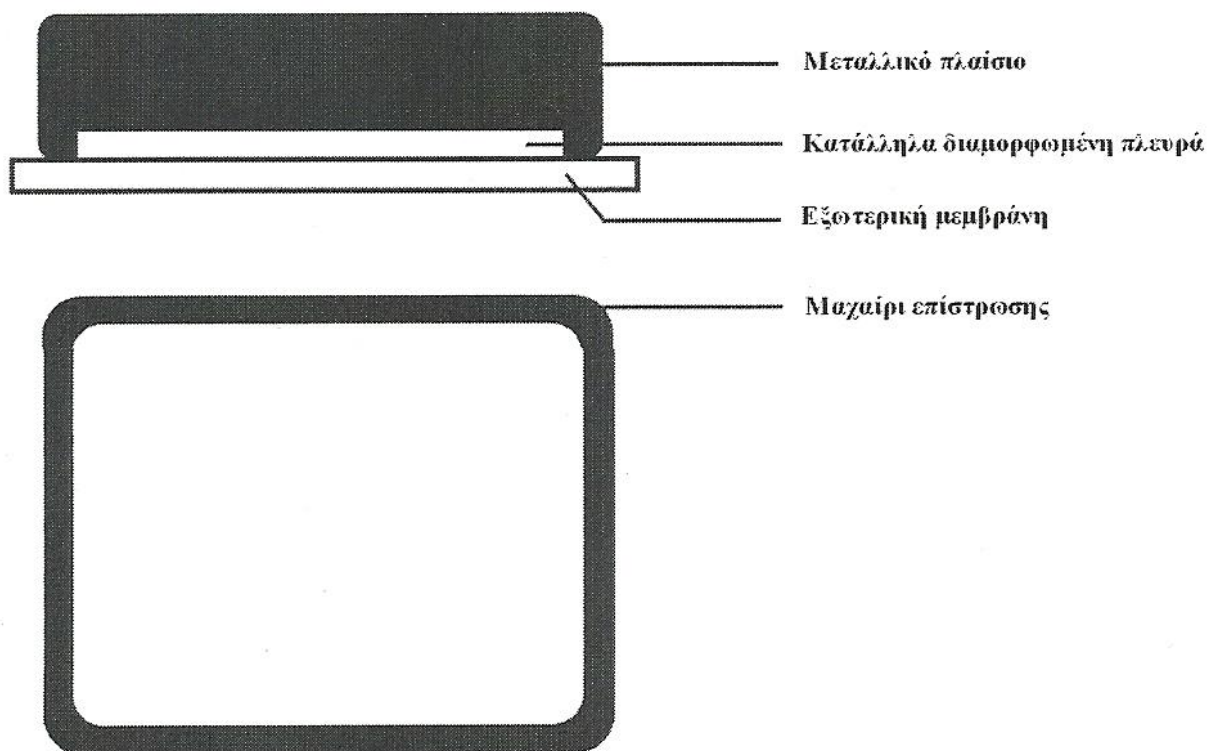
- Αρχικά αναμειγνύεται επιθυμητή ποσότητα της δραστικής ουσίας Α με το πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό, σε κατάλληλο περιέκτη.

- Ο περιέκτης κλείνεται ερμητικά και τοποθετείται σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα όπου αφήνεται για 24 h ώστε να προκύψει ομοιόμορφο και ομοιογενές μείγμα.
- Μετά την ολοκλήρωση της ανάδευσης, αφαιρείται από τον αναδευτήρα και αφήνεται σε ηρεμία για 24 h ώστε να απομακρυνθούν οι φυσαλίδες αέρα που πιθανόν να έχουν δημιουργηθεί στο εσωτερικό του.

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

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

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



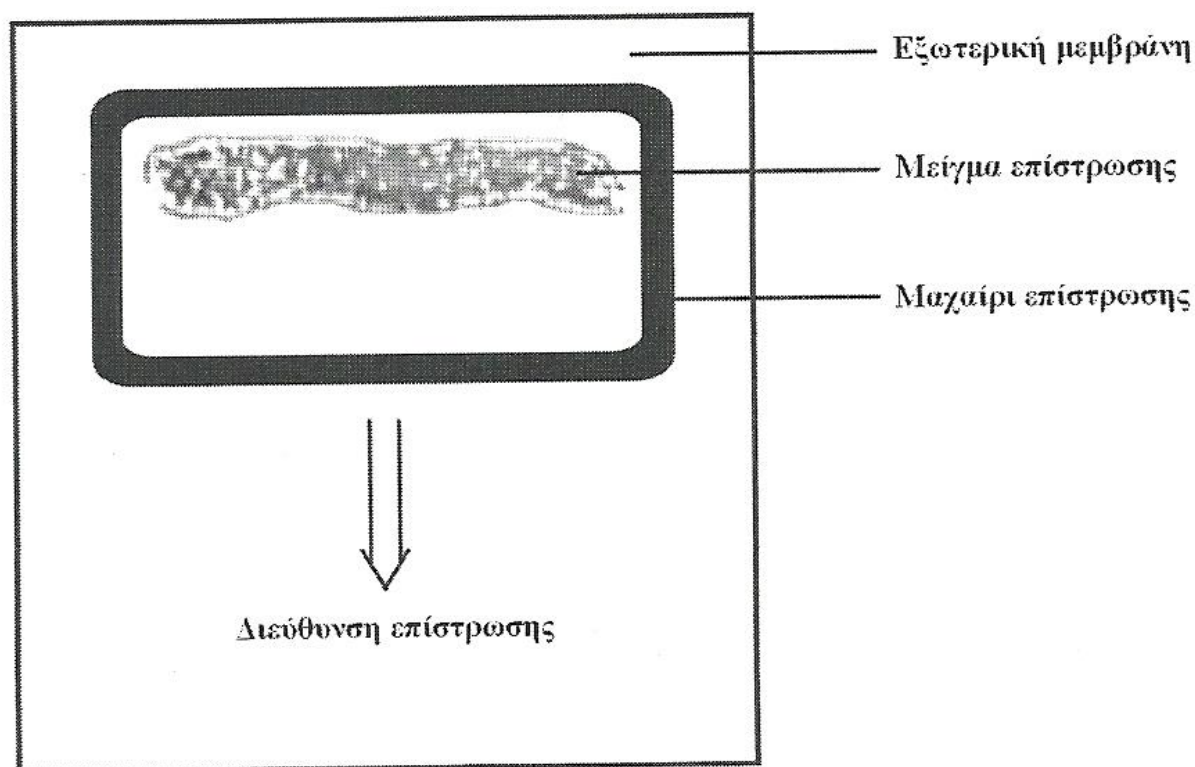
Σχήμα 17.1: Μαχαίρι επίστρωσης

Στην παρούσα μελέτη, τα ΔΘΣ δημιουργήθηκαν με δυο διαφορετικές τεχνικές, με τη μια εκ των οποίων να αξιοποιεί τα μείγματα επίστρωσης που ήδη παρασκευάστηκαν. Εξαιτίας της βασικής διαφοράς τους στον αριθμό των επιστρώσεων του μείγματος επίστρωσης ή του

συγκολλητικού, μπορούν να διαχωριστούν αξιοποιώντας τους όρους: Monolithic – Regular Patch και Multilaminate – Sandwich Patch.

### 17.3.1 Τεχνική Regular Patch

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



Σχήμα 17.2: Σχηματική απεικόνιση επίστρωσης

### 17.3.2 Τεχνική Sandwich Patch

Η διαφορά της τεχνικής αυτής συγκριτικά με την τεχνική regular patch παρατηρείται μετά το στάδιο όπου η αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη μαζί με την επίστρωση αφήνονται έως ότου αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, καθώς στα προηγούμενα η διεργασία που ακολουθείται είναι ίδια. Βέβαια, χρησιμοποιείται συγκολλητικό κατά την επίστρωση και όχι μείγμα επίστρωσης. Οπότε, τα μετέπειτα στάδια έχουν ως εξής:

- Κόβεται ένα τμήμα της μεμβράνης υποστήριξης αντίστοιχου μεγέθους και τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια εργασίας, κατά τέτοιο τρόπο ώστε η εσωτερική του πλευρά να βρίσκεται προς τα πάνω.
- Πραγματοποιείται η ίδια διεργασία επίστρωσης για τη μεμβράνη υποστήριξη όπως και για την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη. Ιδιαίτερης σημασίας είναι το γεγονός πως οι δυο επιστρώσεις στις διαφορετικές μεμβράνες θα πρέπει να έχουν αθροιστικά το επιθυμητό πάχος.
- Κόβονται, με τη βοήθεια κοπτικής μήτρας, τμήματα των 10 cm<sup>2</sup> και από τις δυο μεμβράνες και ζυγίζονται ώστε να προσδιοριστεί το καθαρό βάρος του πιεσοευαίσθητου συγκολλητικού, αφού έχει ήδη προσδιοριστεί το απόβάρό τους.
- Με βάση τις ζυγίσεις αυτές, προσδιορίζεται η απαραίτητη ποσότητα της δραστηκής ουσίας Α που πρέπει να προστεθεί.
- Ζυγίζεται και τοποθετείται στην επίστρωση της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης και απλώνεται, αν αυτό είναι δυνατόν, σε όλη τη διαθέσιμη επιφάνεια.
- Τοποθετείται από πάνω αντίστοιχο τμήμα της μεμβράνης υποστήριξης, με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες αέρα.

Σημειώνεται, πως επειδή η κοπή του τμήματος της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης με την επίστρωση του συγκολλητικού μπορεί να είναι εξαιρετικά δύσκολη, τοποθετείται σε επαφή με την επίστρωση ένα τμήμα αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης, με τη σιλικονούχο πλευρά, το οποίο αφαιρείται αμέσως μετά.

Πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής αποτελεί η προστασία της ΦΔΟ από την έκθεση στις υψηλές θερμοκρασίες εξάτμισης που εκτίθενται τα μείγματα επίστρωσης εξαιτίας των συγκολλητικών. Επιπλέον, καθώς η ποσότητα της δραστηκής ουσίας Α που πρέπει να προστεθεί στα ΔΘΣ, κατά περίπτωση, παρατηρήθηκε πως είναι εξαιρετικά μικρή, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται ομοιόμορφη διασπορά του στο συγκολλητικό, δημιουργήθηκαν διαλύματά της σε απόλυτη αιθανόλη και λήφθηκε από αυτά ο απαιτούμενος όγκος με αυτόματη πιπέτα.

Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλα τα ΔΘΣ το πάχος της επίστρωσης του συγκολλητικού ή του μείγματος επίστρωσης, μετά την ξήρανση του, πρέπει να είναι περίπου 3 mils. Με βάση την τιμή των ολικών στερεών του συγκολλητικού καθορίζεται το πάχος του υγρού φιλμ επίστρωσης που θα αφήσει το μαχαίρι επίστρωσης. Τέλος, σε κάθε περίπτωση, τα ΔΘΣ φυλάσσονται σε δροσερό και σκιερό μέρος έως ότου αξιοποιηθούν σε πειράματα.

### 17.4 Θεωρητικός Προσδιορισμός Μάζας ΔΘΣ

Της παραγωγής των ΔΘΣ έπεται ο προσδιορισμός της μάζας τους. Η διεργασία ξεκινά με τον προσδιορισμό του απόβαρου τμημάτων της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης και της μεμβράνης υποστήριξης εμβαδού 1,27 cm<sup>2</sup>. Έπειτα ζυγίζονται τουλάχιστον τρία δείγματα από κάθε ΔΘΣ αντίστοιχου εμβαδού. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τις ζυγίσεις που

αναφέρθηκαν, το εμβαδό των εξεταζόμενων ΔΘΣ καθώς και τη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας Α σε καθένα από αυτά, προσδιορίζονται:

- η μάζα της επίστρωσης ανά ΔΘΣ και ανά  $\text{cm}^2$
- η μάζα της δραστικής ουσίας Α ανά ΔΘΣ και ανά  $\text{cm}^2$

### 17.5 Ποσοτικός Προσδιορισμός Δραστικής Ουσίας Α σε ΔΘΣ

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ΔΘΣ πραγματοποιήθηκε σε δείγματα εμβαδού  $1,27 \text{ cm}^2$ , αντίστοιχα με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μάζας τους και στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας. Μεγαλύτερη πρόκληση της μελέτης αυτής είναι η επιτυχής εκχύλιση της δραστικής ουσίας Α από το ΔΘΣ. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τον περιεχόμενο διαλύτη του συγκολλητικού καθώς και ύστερα από προκαταρκτική μελέτη σχετικά με τη διαλυτότητά του σε κοινούς διαλύτες όπως η μεθανόλη, καταλήξαμε στον επιλεγόμενο.

Σχετικά με τη διεργασία, αρχικά ζυγίστηκαν τα υπό μελέτη ΔΘΣ. Έπειτα, αφαιρέθηκε η αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη και προστέθηκε το υπόλοιπο σύστημα σε φιαλίδιο σπινθηρισμού με 15 mL από τον επιλεγόμενο διαλύτη. Με το πέρας 15 min, προστέθηκε μαγνήτης εντός του φιαλιδίου και αναδεύτηκε για 12 h, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Μετά τις 12 h, τα τμήματα της μεμβράνης υποστήριξης αφαιρέθηκαν από τα φιαλίδια και αφέθηκαν ώστε να εξατμιστεί ο οργανικός διαλύτης πριν τη ζύγισή τους. Η ζύγιση αυτή, συγκρινόμενη με το απόβαρο αντίστοιχου τμήματος της μεμβράνης υποστήριξης, αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς εκχύλισης της ΦΔΟ από το σύστημα. Αφού το περιεχόμενο διάλυμα μεταφερθεί ποσοτικά, με τη βοήθεια χωνιού, σε ογκομετρική φιάλη των 20 mL, τα φιαλίδια με τους μαγνήτες ξεπλένονται με διαλύτη ο οποίος συμπληρώνεται στην ογκομετρική φιάλη μέχρι τη χαραγή. Ύστερα από επαρκή ανάδευση σε συσκευή vortex και κατάλληλες αραιώσεις με κινητή φάση, προσδιορίστηκε η δραστική ουσία Α σε σύστημα HPLC-CAD. Για κάθε ΔΘΣ πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις.

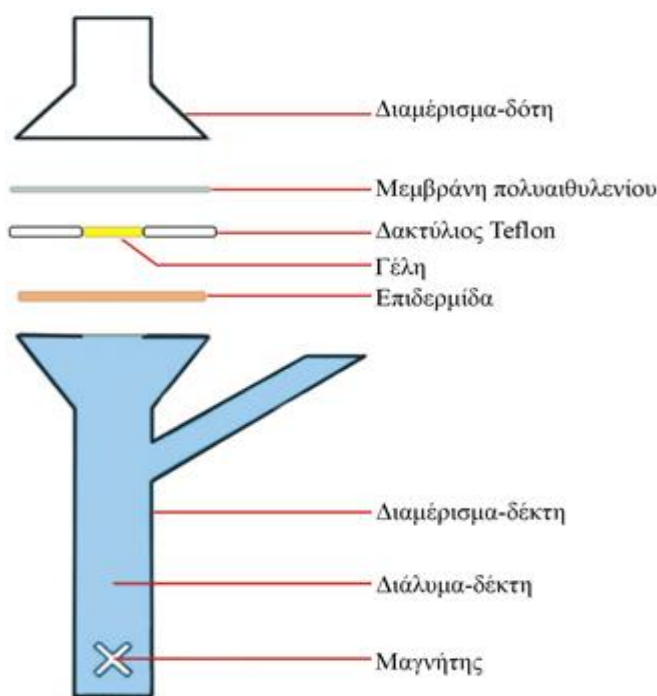
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 18<sup>ο</sup>: In Vitro Πειράματα Διαδερμικής Διαπερατότητας

Για τα in vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα, κάθετα κύτταρα διάχυσης τύπου Franz (Crown Glass, USA), όπως φαίνεται στο σχήμα 18.1, με διαθέσιμη επιφάνεια διάχυσης  $0,636 \text{ cm}^2$  και όγκο  $6,275 \text{ mL}$ . Τα κύτταρα διάχυσης είναι κατασκευασμένα από σκοτεινόχρωμη ύαλο (amber glass) για την προστασία των δραστικών ουσιών A και B καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με τη φωτοευαισθησία τους. Αποτελούνται από δύο μέρη διαφορετικού όγκου, το διαμέρισμα του δότη (donor) και το διαμέρισμα του δέκτη, αλλιώς υποδοχέα (receptor). Μεταξύ των δυο διαμερισμάτων τοποθετούνται η επιδερμίδα, ένας δακτύλιος από Teflon και είτε η προς εξέταση γέλη και μια λεπτή μεμβράνη πολυαιθυλενίου CoTran™ 9720 (3M Drug Delivery Systems, 2004) είτε το προς εξέταση ΔΘΣ. Τα δυο διαμερίσματα, τέλος, συγκρατούνται με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα.

Το δέρμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προήλθε από το ίδιο ανατομικό μέρος, ειδικότερα το στομάχι, διαφορετικών δοτών θηλυκού φύλου. Ο διαχωρισμός της επιδερμίδας από το χόριο γινόταν αμέσως μετά την παραλαβή του δέρματος, με την τεχνική διαχωρισμού με θέρμανση (heat separation technique) όπως αυτή τροποποιήθηκε από τους (Kligman & Christophers, 1963) και παρουσιάστηκε στο υποκεφάλαιο 9.2.3. Στη συνέχεια, η επιδερμίδα απλωνόταν σε φύλλο αλουμινίου, και μέχρι να χρησιμοποιηθεί φυλασσόταν σε καταψύκτη στους  $-20^\circ\text{C}$ , ενώ 30 min πριν την εφαρμογή του στην επιφάνεια του διαμερίσματος του υποδοχέα, αφαιρούταν για να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ο δακτύλιος από Teflon χρησιμοποιείται μόνο στην περίπτωση αξιολόγησης της διαδερμικής διαπερατότητας γελών. Τοποθετείται μεταξύ της επιδερμίδας και του διαμερίσματος του δότη για να συγκρατεί τη γέλη στη θέση διάχυσης. Το υλικό αυτό έχει επιλεγεί εξαιτίας της σκληρότητας και της χημικής του αδράνειας, χαρακτηριστικά εξαιρετικά σημαντικά για το σκοπό χρήσης του.

Για κάθε σύνθεση, γέλη ή ΔΘΣ, χρησιμοποιήθηκαν πέντε κύτταρα διάχυσης ώστε να περιοριστεί το σφάλμα εξαιτίας της μεταβλητότητας του ερευνητή. Στην περίπτωση μελέτης γελών, δεν εφαρμόστηκαν από την πρώτη στιγμή στα κύτταρα διάχυσης αλλά 12 h αργότερα, ώστε να εξισορροπήσει το δέρμα στις συνθήκες περιβάλλοντος. Στην περίπτωση όμως των



Σχήμα 18.1: Τροποποιημένο κύτταρο διάχυσης τύπου Franz

ΔΘΣ, η εφαρμογή τους στην επιφάνεια της κεράτινης στοιβάδας γινόταν ταυτόχρονα με την τοποθέτηση του δέρματος στο διαμέρισμα του υποδοχέα.

Σε κάθε κύτταρο χρησιμοποιούταν 100  $\mu\text{L}$  από την εξεταζόμενη γέλη και καλυπτόταν από λεπτή μεμβράνη πολυαιθυλενίου CoTran™ 9720 προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμιση των πτητικών συστατικών της. Πιθανή απώλεια των πτητικών συστατικών εξαιτίας της μεγάλης χρονικής διάρκειας του πειράματος και της εκτιθέμενης θερμοκρασίας, των 32°C, θα είχε ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της σύστασης των γελών, γεγονός που θα οδηγούσε σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Στην περίπτωση των ΔΘΣ, χρησιμοποιούταν τμήμα εμβαδού 1,27  $\text{cm}^2$ .

Το διαμέρισμα του υποδοχέα περιείχε το, κατά περίπτωση, επιλεγόμενο, ώστε να διατηρούνται οι συνθήκες δεξαμενής, διάλυμα το οποίο διατηρούνταν στους 32°C με τη βοήθεια υδατόλουτρου προκειμένου να προσομοιώνεται η θερμοκρασία του δέρματος *in vivo*. Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί ομοιογενής κατανομή της ΦΔΟ στο διάλυμα του υποδοχέα, χρησιμοποιούνταν μαγνήτες κατάλληλου μεγέθους που περιστρέφονταν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.

Τα δείγματα από κάθε κύτταρο διάχυσης λαμβάνονταν σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στις 12, 24, 36, 48 h, από την έναρξη του πειράματος. Ως έναρξη του πειράματος χαρακτηρίζεται η χρονική στιγμή εφαρμογής της υπό εξέταση φαρμακοτεχνικής μορφής στην επιφάνεια της κεράτινης στοιβάδας. Κατά τη δειγματοληψία αφαιρούνταν όλο το περιεχόμενο από το διαμέρισμα του υποδοχέα των κυττάρων διάχυσης και στη συνέχεια αναπληρώνονταν με φρέσκο αντίστοιχο διάλυμα, που διατηρούνταν στους 32°C.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 19<sup>ο</sup>: Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας

---

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού SPSS Statistics 24 (IBM, USA). Αναλύθηκαν οι μετρήσεις της ποσότητας της ΦΔΟ (Q) που διαπερνά την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων των in vitro πειραμάτων στις διαφορετικές χρονικές στιγμές δειγματοληψίας. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων κάθε σύνθεσης για κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Shapiro – Wilk, όπως προτείνεται από τους (Ghasemi & Zahediasl, 2012). Ακολούθησε η σύγκριση των μεταβλητών, η οποία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One way ANOVA). Τέλος, οι συγκρίσεις κατά ζεύγη, με σκοπό να αξιολογηθεί η σημαντικότητα των μεταξύ τους διαφορών, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Tukey. Σημειώνεται πως το επίπεδο σημαντικότητας, σε κάθε περίπτωση, ήταν  $\alpha = 0,05$ . Επομένως, για τιμές  $p - value < 0,05$  απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση, της μη ύπαρξης δηλαδή στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Με άλλα λόγια, για τιμές  $p - value < 0,05$  υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

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

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

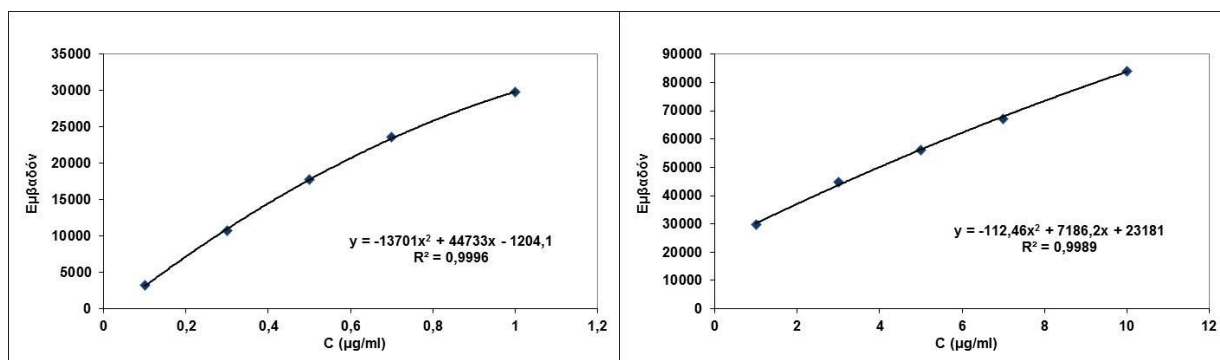
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 20<sup>ο</sup>: Δραστική Ουσία Α

### 20.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

#### 20.1.1 Καμπύλη Αναφοράς

Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της  $A - HCl$  έναντι του εμβαδού της κορυφής της βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Vertzoni, et al., 2008) καθώς το σύστημα HPLC συνδεδεμένο με ανιχνευτή CAD παράγει μη γραμμική απόκριση για την περιοχή συγκεντρώσεων 0,1 – 10,0  $\mu\text{g/mL}$ . Ειδικότερα, το μη γραμμικό μοντέλο που εφαρμόζει καλύτερα είναι το τετραγωνικό ( $y = ax^2 + bx + c$ ).

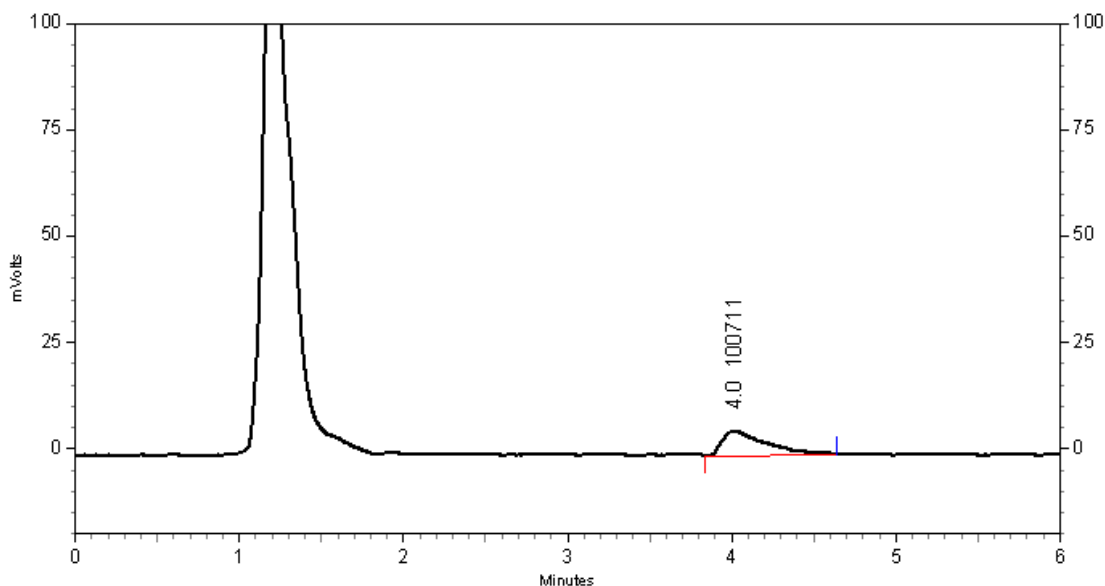
Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζονται ενδεικτικές καμπύλες αναφοράς της δραστικής ουσίας Α σε κινητή φάση, αντιπροσωπευτικές και αυτών που πραγματοποιήθηκαν σε φυσιολογικό ορό. Ο λόγος που γίνεται χρήση δυο ξεχωριστών καμπυλών, συγκεντρώσεων 0,1 – 1,0  $\mu\text{g/mL}$  και 1,0 – 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , είναι επειδή ο συνδυασμός τους δίνει γραφική παράσταση που χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά χαμηλό συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination –  $R^2$ ) σε αντίθεση με τους επιμέρους. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί πως και στην περίπτωση των μελετών της δραστικής ουσίας Α, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων βασίστηκε σε καμπύλη αναφοράς του υδροχλωρικού άλατος αυτής, με κατάλληλη μετέπειτα τροποποίηση λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά βάρη, εξαιτίας της δυσκολίας στη ζύγιση και επομένως στη δημιουργία μητρικού διαλύματος της ελαιώδους και υγρής δραστικής ουσίας Α.



Διάγραμμα 20.1: Καμπύλη αναφοράς A-HCl – Αριστερά: 0,1 – 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , Δεξιά: 1,0 – 10,0  $\mu\text{g/mL}$

#### 20.1.2 Αποτελέσματα Ελέγχου Παρεμπόδισων στις Χρωματογραφικές Κορυφές

Σε όλα τα διαφορετικά διαλύματα υποδοχέα και τους φορείς των συνθέσεων που χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν, αντίστοιχα, σε *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο σχήμα, επομένως και στην ποσοτικοποίηση, της δραστικής ουσίας Α. Ενδεικτικό χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο διάγραμμα 20.2.



Διάγραμμα 20.2: Χρωματογράφημα δραστικής ουσίας Α συγκέντρωσης 10,0 µg/mL

## 20.2 Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α

### 20.2.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα & Διαλυτότητας Κορεσμού Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α

Δεδομένης της εξαιρετικά λιπόφιλης φύσης του λιμονένιου ( $\text{Log}P_{\text{Water}}^{\text{Octanol}} = 3,4$ ), χρειαστήκαν αρκετές δοκιμές, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην αύξηση της αιθανόλης σε βάρος του νερού, έως ότου καταλήξουμε στην επιθυμητή αναλογία. Η εξέλιξη των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζεται στον πίνακα 20.1.

Δοκιμή	Αιθανόλη (% v/v)	Γλυκερόλη (% v/v)	Νερό (% v/v)	Αποτέλεσμα Προσθήκης Λιμονένιου (5% v/v)
1 <sup>η</sup>	50	20	25	Θόλωμα
2 <sup>η</sup>	60	20	15	Θόλωμα
3 <sup>η</sup>	60	30	5	Θόλωμα
4 <sup>η</sup>	60	35	0	Διαυγές

Πίνακας 20.1: Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού αναλογίας φορέα αιθανόλης

Η αναλογία λοιπόν του φορέα με βάση την αιθανόλη που προέκυψε και η οποία εν τέλει είναι πλήρως απαλλαγμένη από νερό, είναι:

*EtOH*: *Γλυκερόλη (Glyc)*: *Λιμονένιο (Lim)* – 60:35:5

Ωστόσο, συνέπεια της αυξημένης περιεκτικότητας σε αιθανόλη αποτελεί η εξαιρετικά μεγάλη διαλυτότητα της ΦΔΟ στο φορέα αυτό, συγκέντρωση δηλαδή που ξεπερνάει τη 15% w/v. Επομένως, όπως αιτιολογήθηκε στο υποκεφάλαιο 16.1, επιλέχθηκε και ένας δεύτερος προς αξιολόγηση φορέας με συνδυασμό ισοπροπυλικής αλκοόλης – νερού. Στην περίπτωση αυτή βέβαια δεν χρειάστηκαν δοκιμές καθώς είναι γνωστή, από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, η αναλογία των συστατικών που αναμειγνύεται πλήρως με 5% v/v λιμονένιο. Συγκεκριμένα, η τελική αναλογία του φορέα με βάση την ισοπροπυλική αλκοόλη που εμφανίζει διαλυτότητα κορεσμού περίπου 11% w/v για τη ΦΔΟ, είναι:

IPA: H<sub>2</sub>O: Λιμονένιο – 90: 5: 5

Σημειώνεται πως παρόλο που, κατά τον προσδιορισμό της διαλυτότητας κορεσμού στον φορέα αυτό, το υπερκείμενο ύστερα από τη φυγοκέντριση ήταν διαυγές, ο προσδιορισμός έγινε ποιοτικά. Αιτία της επιλογής αυτής ήταν πως τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας για τους φορείς με την A – HCl ήταν τροχιοδεικτικά επειδή οι πιθανότητες να διαπεράσει το δέρμα ήταν περιορισμένες.

### 20.2.2 Παρασκευή Γελών Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α

Οι γέλες παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 16.3 και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό κατάλληλου φορέα και διαλυτότητας κορεσμού. Στην περίπτωση του φορέα αιθανόλης, που δεν προσδιορίστηκε με ακρίβεια η διαλυτότητα κορεσμού, χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε κατά τις προκαταρκτικές μελέτες. Όσον αφορά το φορέα ισοπροπυλικής αλκοόλης, χρησιμοποιήθηκε το 90% της διαλυτότητας κορεσμού που προσδιορίστηκε ποιοτικά. Σε κάθε περίπτωση προέκυψαν ομοιογενείς διαυγείς γέλες, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 20.2.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Σύσταση και Αναλογία Φορέα (v/v/v)	Συγκέντρωση Παράγοντα Σχηματισμού Γέλης (Klucel HF – % w/v)	Συγκέντρωση A – HCl (% w/v)
F1	<i>EtOH/Glyc/Lim</i> 60/35/5	1,25	15
F2	<i>IPA/H<sub>2</sub>O/Lim</i> 90/5/5	1,25	10

Πίνακας 20.2: Συνθέσεις γελών A-HCl

### 20.2.3 Αποτελέσματα *In Vitro* Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α

Για τη διερεύνηση της διαδερμικής διαπερατότητας της A – HCl αξιολογήθηκαν δυο γέλες σε δυο διαφορετικούς δότες δέρματος. Ο συνολικός αριθμός λοιπόν των πειραμάτων που διενεργήθηκαν ήταν τέσσερα. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε κύτταρα διάχυσης για κάθε πείραμα και το διάλυμα του υποδοχέα που επιλέχθηκε ήταν ο φυσιολογικός ορός καθώς παρομοιάζει το αίμα ως προς την ωσμωτικότητα και η ΦΔΟ εμφανίζει επαρκή διαλυτότητα σε αυτό (3,5 mg/mL > 0,24 mg/mL), ώστε να διατηρούνται οι συνθήκες δεξαμενής.

Η εξαρτημένη μεταβλητή που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η ποσότητα της A – HCl (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας, σε μονάδες mg/cm<sup>2</sup>, στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος καθώς και ανά 24 h. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, για τους δυο διαφορετικούς δότες, απεικονίζονται στους πίνακες 20.3 και 20.4.

Επιπλέον, στο διάγραμμα 20.3 παριστάνεται γραφικά η αθροιστική ποσότητα της A – HCl (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Από το διάγραμμα αυτό, υπολογίστηκε η ροή στη σταθεροποιημένη κατάσταση (*J<sub>ss</sub>*) σε μονάδες mg/cm<sup>2</sup>/h και ο χρόνος υστέρησης (L) σε μονάδες h, σύμφωνα με το κεφάλαιο 5. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη ροή (J), στις ίδιες μονάδες, ανά 24 h παρουσιάζονται στον πίνακα 20.5.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης) – Δότης	$Q_{0-12}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-36}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD
F1 – 16/11/16	117,84 $\pm$ 101,35	172,22 $\pm$ 118,63	229,89 $\pm$ 173,23	290,51 $\pm$ 223,73
F1 – 19/04/17	55,58 $\pm$ 55,45	134,01 $\pm$ 101,40	182,26 $\pm$ 111,81	272,00 $\pm$ 123,68
F2 – 16/11/16	5,34 $\pm$ 3,25	13,82 $\pm$ 6,96	22,05 $\pm$ 11,70	40,91 $\pm$ 19,71
F2 – 19/04/17	38,04 $\pm$ 43,62	131,08 $\pm$ 100,12	235,77 $\pm$ 147,41	363,47 $\pm$ 199,52

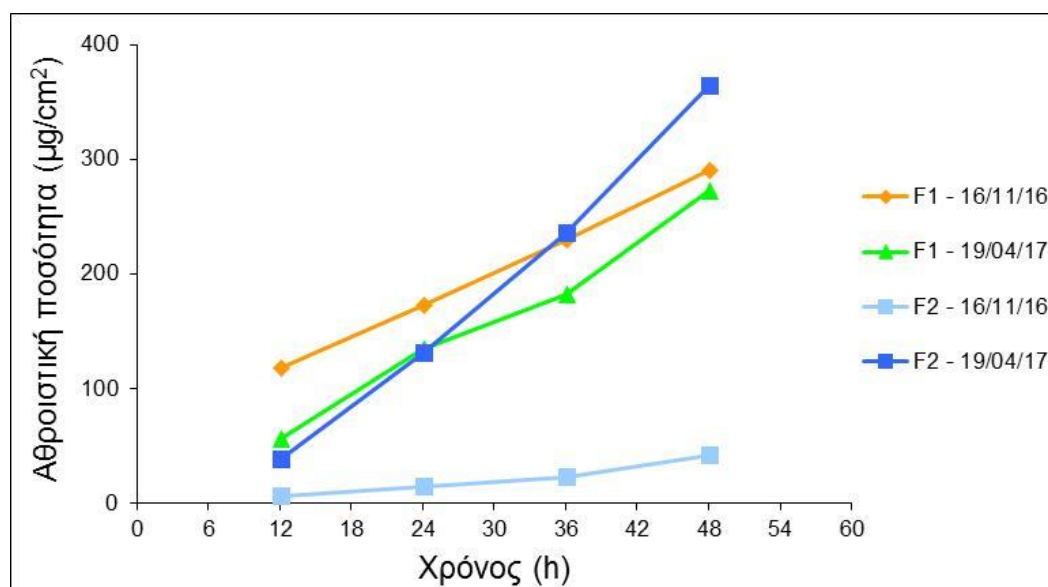
Πίνακας 20.3: Αθροιστική ποσότητα της Α–HCl που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης) – Δότης	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD
F1 – 16/11/16	172,22 $\pm$ 118,63	118,30 $\pm$ 108,41
F1 – 19/04/17	134,01 $\pm$ 101,40	137,99 $\pm$ 65,26
F2 – 16/11/16	13,82 $\pm$ 6,96	27,09 $\pm$ 13,60
F2 – 19/04/17	131,08 $\pm$ 100,12	232,39 $\pm$ 147,82

Πίνακας 20.4: Αθροιστική ποσότητα της Α–HCl που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας, ανά 24 h

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης) – Δότης	$J_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	L (h)
F1 – 16/11/16	7,18 $\pm$ 4,94	4,93 $\pm$ 4,52	4,80	-12,23
F1 – 19/04/17	5,58 $\pm$ 4,23	5,75 $\pm$ 2,72	5,81	2,31
F2 – 16/11/16	0,58 $\pm$ 0,29	1,13 $\pm$ 0,57	0,96	8,57
F2 – 19/04/17	5,46 $\pm$ 4,17	9,68 $\pm$ 6,16	9,01	8,68

Πίνακας 20.5: Ροή της Α–HCl, από τις γέλες, ανά 24 h, σε σταθεροποιημένη κατάσταση και χρόνος υστέρησης



Διάγραμμα 20.3: Αθροιστική ποσότητα της Α–HCl που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο

## 20.2.4 Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής Shapiro – Wilk, τα δεδομένα όλων των συνθέσεων, με τον αντίστοιχο δότη δέρματος, σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας ακολουθούν κανονική κατανομή. Από την ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA) που ακολούθησε, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 20.6, προέκυψε πως

δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων στα διαφορετικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας.

		Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F	<i>p</i> – value
$Q_{0-12}$	Between Groups	27728,119	3	9242,706	2,032	0,159
	Within Groups	59131,229	13	4548,556		
	Total	86859,348	16			
$Q_{0-24}$	Between Groups	50809,398	3	16936,466	2,056	0,156
	Within Groups	107107,320	13	8239,025		
	Total	157916,718	16			
$Q_{0-36}$	Between Groups	94436,280	3	31478,760	2,257	0,130
	Within Groups	181279,185	13	13944,553		
	Total	275715,464	16			
$Q_{0-48}$	Between Groups	163593,926	3	54531,309	2,440	0,111
	Within Groups	290595,168	13	22353,474		
	Total	454189,094	16			

Πίνακας 20.6: Ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας A-HCl, από τις γέλες

Με βάση τα αποτελέσματα και τη στατιστική τους ανάλυση προκύπτει αρχικά πως η διαδερμική διαπερατότητα της  $A - HCl$  είναι εξαρτώμενη από το δόση του δέρματος, όχι όμως σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Επιπλέον, παρόλο που φαίνεται πως περνάει το φραγμό του δέρματος, η ποσότητα που ανιχνεύεται στο διάλυμα του υποδοχέα απέχει εξαιρετικά από τις θεραπευτικές συγκεντρώσεις. Ούτε η παρουσία του επιταχυντή διαβατότητας, της κατηγορίας των τερπενίων, αλλά ούτε και η δράση των οργανικών διαλυτών, αιθανόλη και ισοπροπυλική αλκοόλη, στην επιδερμίδα δεν ενίσχυσαν αρκετά τη διαπερατότητα. Η ροή λοιπόν από τις φαρμακευτικές γέλες χαρακτηρίζεται ανεπαρκής, χωρίς να δύναται να ξεχωρίσει μια από αυτές, συγκριτικά με τον επιθυμητό ρυθμό διαδερμικής διαπερατότητας για επίτευξη θεραπευτικής δράσης ( $1120 \mu g/cm^2/h$ ).

### 20.3 Αποτελέσματα Μετατροπής Υδροχλωρικού Άλατος Δραστικής Ουσίας Α σε Βάση

Η ελαιώδης και υγρή φύση της δραστικής ουσίας Α καθώς και η απουσία βιβλιογραφίας σχετικά με την ταυτοποίηση, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη σταθερότητά της δημιούργησαν εξαιρετικά προβλήματα στην εξέλιξη των μελετών. Ωστόσο, αυτό που ξεχωρίζει είναι η αδυναμία επαναλήψιμης εξουδετέρωσης της  $A - HCl$ , μια διεργασία που μοιάζει ιδιαίτερα εύκολη και αποτελεί ρουτίνα για συνθετικούς χημικούς, με αποτέλεσμα την παραλαβή προϊόντων με διαφορετικές ιδιότητες κάθε φορά. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αντιδράσεις εξουδετέρωσης της  $A - HCl$  σύμφωνα με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 14.1. Οι διαφορές μεταξύ των σταδίων των διεργασιών καθώς και των αντίστοιχων χαρακτηριστικών των παρτίδων δραστικής ουσίας Α παρουσιάζονται στον πίνακα:

Αντίδραση	Πρώτη (1 <sup>η</sup> )	Δεύτερη (2 <sup>η</sup> )	Τρίτη (3 <sup>η</sup> )	Τέταρτη (4 <sup>η</sup> )
<b>Ποσότητα Α – HCl</b>	10 g	30 g	40 g	40 g
<b>Προσθήκη NaOH</b>	Ακαριαία	Ακαριαία	Στάγδην	Στάγδην
<b>Χρήση Brine σε Έκπλυση Οργανικών Στοιβάδων</b>	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
<b>Χρονική Διάρκεια Εξάτμισης σε Rotavap</b>	30 min	30 min	3 h	3 h
<b>Κατάσταση στις Συνθήκες Αποθήκευσης (-20°C)</b>	Στερεή (Παγωμένο)	Υγρή	Στερεή (Παγωμένο)	Στερεή (Παγωμένο)
<b>Ικανότητα Ροής (Συγκριτικά)</b>	Λεπτόρρευστο	Περισσότερο Λεπτόρρευστο	Λεπτόρρευστο	Λεπτόρρευστο
<b>Χρώμα (Συγκριτικά)</b>	Κίτρινο	Υποκίτρινο	Κίτρινο	Κίτρινο
<b>Διαλυτότητα σε υπό Μελέτη Φορείς</b>	Χαμηλή	Αυξημένη	Χαμηλή	Χαμηλή
<b>Απόδοση (α)</b>	94%	95%	96%	93%
<b>Δείκτης Διάθλασης</b>	-	1,4860	1,4869	1,4869

Πίνακας 20.7: Διαφορές σταδίων διεργασιών και χαρακτηριστικών των παρτίδων δραστικής ουσίας Α

Αρχικά, είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως το Brine είναι κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε στις πρώτες δυο αντιδράσεις για να διευκολύνει τη διάσπαση του γαλακτώματος που δημιουργήθηκε μεταξύ οργανικής και υδατικής στοιβάδας. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν ήταν απαραίτητο όπως επιβεβαιώθηκε από τις επόμενες δυο αντιδράσεις που επετεύχθη η διάσπασή του αποκλειστικά και μόνο με επαναλαμβανόμενες εκπλύσεις των συνενωμένων οργανικών στοιβάδων με νερό. Επίσης, η χρήση του είχε αδιαμφισβήτητα ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας της οργανικής στοιβάδας σε ιόντα  $Na^+$  και  $Cl^-$ . Σχετικά με τη χρονική διάρκεια της εξάτμισης του οργανικού διαλύτη με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα, αυξήθηκε στις τελευταίες δυο αντιδράσεις με σκοπό να διασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση του διχλωρομεθανίου.

Συνεχίζοντας, τόσο η κατάσταση στους  $-20^\circ C$  όσο και το χρώμα προέκυψαν από οπτική παρατήρηση. Αντίθετα, η συγκριτική ικανότητα ροής από την υάλινη πιπέτα κατά τη ζύγιση καθώς και η διαλυτότητα στους ίδιους φορείς προέκυψε πειραματικά, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διαλυτότητας κορεσμού. Σχετικά με την εκατοστιαία απόδοση, οι παρατηρούμενες τιμές που προκύπτουν από τους υπολογισμούς, όπως παρουσιάστηκαν στο υποκεφάλαιο 14.1 κρίνονται ικανοποιητικές αν ληφθούν υπόψη οι επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις και εκπλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Σχετικά με τα φάσματα  $^1H-NMR$  των προϊόντων των τεσσάρων διαφορετικών αντιδράσεων εξουδετέρωσης, ταυτίζονται απόλυτα οδηγώντας μας στο συμπέρασμα πως η αιτία που προκάλεσε αυτή τη διαφοροποίηση στην 2<sup>η</sup> παρτίδα, κάποιο παραπροϊόν ή προϊόν διάσπασης ίσως, δεν είναι οργανικής φύσεως και πιο συγκεκριμένα δεν φέρει άτομο υδρογόνου ( $H^+$ ).

Τέλος, όσον αφορά το δείκτη διάθλασης, αποτελεί τη μόνη φυσικοχημική παράμετρο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία και υπάρχει επομένως ένα μέτρο σύγκρισης (δεδομένα στο αρχείο). Με βάση λοιπόν τα δεδομένα του πίνακα 20.7, δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τις διαφορετικές παρτίδες της δραστικής ουσίας Α.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά των παρτίδων της δραστικής ουσίας Α και τις διαφορές μεταξύ των αντιδράσεων εξουδετέρωσης προκύπτει πως



η 2<sup>η</sup> αντίδραση δεν έδωσε το ίδιο προϊόν συγκριτικά με τις άλλες τρεις γι' αυτό και απορρίφθηκε. Εν συνεχεία, η 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> παρτίδα συνενώθηκαν, καθώς η 1<sup>η</sup> τελείωσε κατά τη διάρκεια προκαταρκτικών μελετών, και αποτέλεσαν τη ΦΔΟ προς μελέτη.

## 20.4 Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Δραστικής Ουσίας Α

### 20.4.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Α

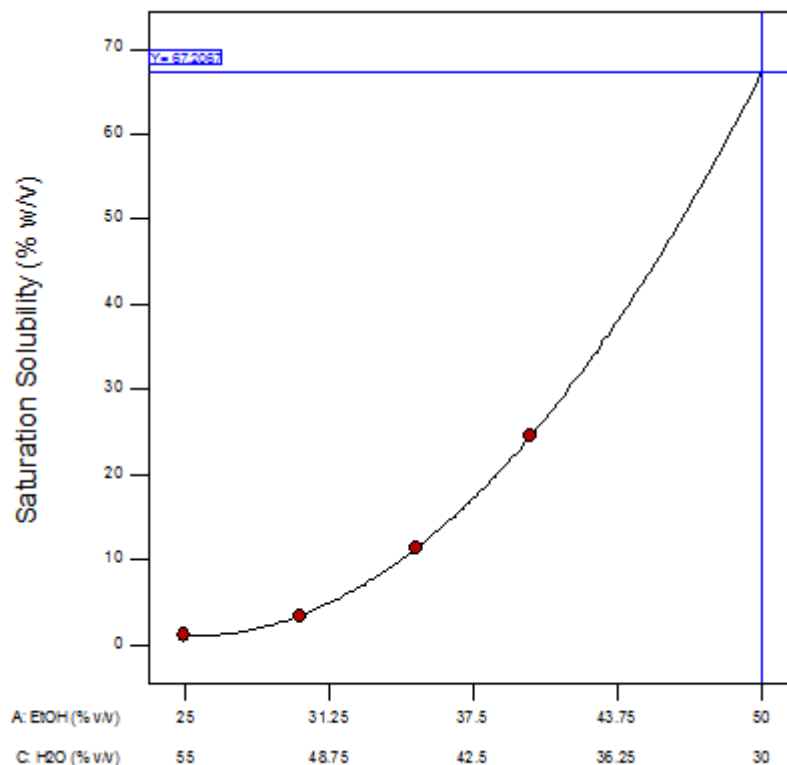
Μετά την εκτέλεση των πειραμάτων αυτών, όπως περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 16.2, τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν ήταν τα επιθυμητά καθώς δεν είχε επέλθει ξεκάθαρος διαχωρισμός, ακόμη και ύστερα από εκ νέου φυγοκέντριση για 15 min. Αντίθετα, ήταν εμφανείς δυο φάσεις περίπου ίδιου όγκου, με χαρακτηριστικό θόλωμα, η σύσταση των οποίων δεν ήταν γνωστή. Προέκυψε λοιπόν το συμπέρασμα πως πιθανότατα επήλθε διαχωρισμός των συστατικών του φορέα. Για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού έγινε ποιοτικά με στάγδην προσθήκη της υγρής δραστικής ουσίας Α και ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα έως ότου το διαυγές μείγμα μετατραπεί σε θολό και παραμείνει έτσι για τουλάχιστον 24 h. Τα ποιοτικά λοιπόν αυτά αποτελέσματα που προέκυψαν για τη διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας Α, στους υποψήφιους φορείς και σε δυο προτεινόμενα διαλύματα υποδοχέα, απεικονίζονται στον πίνακα 20.8.

Σύνθεση Φορέα – Διαλύματος Υποδοχέα	Αναλογία (v/v/v)	Διαλυτότητα Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Α (% w/v)
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i>	20/20/60	< 0,8
	25/20/55	1,1
	30/20/50	3,4
	35/20/45	11,4
	40/20/40	24,5
	50/20/30	> 31,2
<i>EtOH/PG/H<sub>2</sub>O</i>	30/20/50	18,0
<i>IPA/PG/H<sub>2</sub>O</i>	30/20/50	21,0
Φυσιολογικός Όρος (NS)	-	< 0,8
<i>PG/H<sub>2</sub>O</i>	50/50	8,6

**Πίνακας 20.8:** Διαλυτότητα κορεσμού δραστικής ουσίας Α σε υποψήφιους φορείς και προτεινόμενα διαλύματα υποδοχέα

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα, αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης σε βάρος του νερού προκαλεί ανάλογη αύξηση στη διαλυτότητα κορεσμού της ελαιώδους δραστικής ουσίας Α. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του φορέα με 50% v/v αιθανόλη, δεν κατέστη δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού εξαιτίας της εξαιρετικά υψηλής τιμής του. Ωστόσο, μέσω διαγραμματικής απεικόνισης της διαλυτότητας κορεσμού σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα του φορέα, ταυτόχρονα, σε νερό και αιθανόλη δίνεται η δυνατότητα πρόβλεψης της τιμής, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 20.4. Επιπλέον, είναι εμφανής η εξαιρετικά μεγαλύτερη διαλυτότητα της ΦΔΟ στην προπυλενογλυκόλη (propylene glycol – PG) συγκριτικά με τη γλυκερόλη, το οποίο βεβαία δικαιολογείται από τις τιμές των συντελεστών κατανομής  $\text{Log}P_{\text{Water}}^{\text{Octanol}}$  -0,9 και -1,8, αντίστοιχα. Από την άλλη, η ισοπροπυλική αλκοόλη φαίνεται να διαθέτει την ίδια ικανότητα διάλυσης της δραστικής

ουσίας Α με την αιθανόλη. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, καταλήξαμε στην επιλογή τεσσάρων αναλογιών ώστε να αξιολογήσουμε εκτός από την ικανότητα της ΦΔΟ να διαπεράσει το φραγμό του δέρματος, την επίδραση της συγκέντρωσης της αιθανόλης αλλά και της ΦΔΟ στη διαδερμική της διαπερατότητα.



**Διάγραμμα 20.4:** Διαγραμματικής απεικόνισης διαλυτότητας κορεσμού δραστικής ουσίας Α σε συνάρτηση με περιεκτικότητα του φορέα, ταυτόχρονα, σε νερό και αιθανόλη

#### 20.4.2 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα Δραστικής Ουσίας Α

Η μεγαλύτερη πρόκληση με την οποία ήρθαμε αντιμέτωποι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών ήταν η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα σχηματισμού γέλης, καθώς θα πρέπει να είναι συμβατός όχι μόνο με την αναλογία των συστατικών του φορέα αλλά και με τη συγκέντρωση της ελαιώδους και υγρής δραστικής ουσίας Α. Σύμφωνα λοιπόν με το υποκεφάλαιο 16.1, όπου παρουσιάζεται η μέθοδος διενέργειας των πειραμάτων αυτών και αναφέρεται πως η ΦΔΟ προστίθεται σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού στον εκάστοτε φορέα, προκύπτουν τα αποτελέσματα όπου απεικονίζονται στον πίνακα 20.9. Σημειώνεται πως η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση των παραγόντων σχηματισμού γέλης ήταν ενδεικτική και η τελική με βάση τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ροής των γελών, καθορίστηκε κατά το στάδιο παρασκευής των γελών για τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας.

Σύνθεση Φορέα Αναλογία (v/v/v)	Τύπος και Συγκέντρωση Παράγοντα Σχηματισμού Γέλης	Αποτέλεσμα Προσθήκης Δραστικής Ουσίας Α
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 30/20/50	Klucel HF (1,25% w/v)	Θόλωμα
	HPMC E4M (2,00% w/v)	Θόλωμα
	HPMC K4M (2,00% w/v)	Θόλωμα
	Aristoflex AVC (0,4% w/v)	Θόλωμα
	Carbopol <sup>®</sup> Ultrez 10 (0,15% w/v)	Θόλωμα
	Aerosil 200 (1,5% w/v)	Θόλωμα
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 35/20/45	Xanthan Gum (0,5% w/v)	Θόλωμα
	Natrosol 250 HX (3,00% w/v)	Διαυγές
	Klucel HF (1,25% w/v)	Θόλωμα
	Natrosol 250 HX (2,25% w/v)	Θόλωμα
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 40/20/40	HPMC K4M (2,00% w/v)	Διαυγές
	Klucel HF (1,25% w/v)	Θόλωμα
	Natrosol 250 HX (2,25% w/v)	Θόλωμα
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 50/20/30	HPMC K4M (2,00% w/v)	Διαυγές
	Klucel HF (1,25% w/v)	Διαυγές

**Πίνακας 20.9:** Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού κατάλληλου φορέα δραστικής ουσίας Α

Αξιοποιώντας βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούμε να αιτιολογήσουμε ορισμένα από τα αποτελέσματα. Ειδικότερα, σύμφωνα με τη μελέτη των (Gonzales, et al., 1990) σχετικά με τη διαλυτότητα που παρουσιάζει το κόμμι ξανθάνης (xanthan gum) σε υδατοαλκοολικά διαλύματα, προκύπτει πως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης μεγαλύτερες από 30% v/v επέρχεται κατακρήμνιση αυτού. Σχετικά με το χρησιμοποιούμενο aerosil 200, ανήκει στους υδρόφιλους εκπρόσωπους της κατηγορίας του, γι' αυτό και παρουσιάζει ασυμβασία με την εξαιρετικά λιπόφιλη δραστική ουσία Α. Όσον αφορά το aristoflex AVC, παρόλο που είναι ευδιάλυτο στο νερό και συμβατό με την αιθανόλη σε συγκέντρωση έως και 70%, έχει ιδιότητες γαλακτωματοποιητή. Στην περίπτωση του klucel HF (υδροξυπροπυλοκυτταρίνη), ενώ είναι πλήρως ευδιάλυτο στην αιθανόλη, στη γλυκερόλη συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο. Σε συνδυασμό και με την κατακρήμνιση του σε συγκέντρωση νερού μεγαλύτερη ή ίση με 50%, τα αποτελέσματα είναι δικαιολογημένα. Τέλος, το Natrosol 250 HX (υδροξυαιθυλοκυτταρίνη) έχει ιδιότητες σχεδόν αντίστροφες με το klucel HF, καθώς είναι ευδιάλυτο στο νερό αλλά κατακρήμνίζεται σε συγκεντρώσεις αιθανόλης που ξεπερνάνε το 40% v/v.

#### 20.4.3 Παρασκευή Γελών Δραστικής Ουσίας Α

Οι συγκεκριμένες γέλες, όπως και οι αντίστοιχες με την Α – HCl, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το υποκεφάλαιο 16.3 και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό κατάλληλου φορέα και διαλυτότητας κορεσμού. Σε κάθε περίπτωση προέκυψαν ομοιογενείς διαυγείς γέλες, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 20.10. Σημειώνεται πως είναι επιθυμητό η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας Α να αντιστοιχεί στο 90% της προσδιοριζόμενης κατά τη μελέτη διαλυτότητας κορεσμού. Ωστόσο, καθώς η ακριβής ζύγιση της ΦΔΟ είναι εξαιρετικά δύσκολη, εξαιτίας της ελαιώδους και υγρής φύσης της, παρουσιάζονται μικρές αποκλίσεις.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Σύσταση Φορέα Αναλογία (v/v/v)	Τύπος και Συγκέντρωση Παράγοντα Σχηματισμού Γέλης	Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (% w/v)
F3	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 30/20/50	Natrosol 250 HX 3,00% w/v	3,03
F4	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 35/20/45	HPMC K4M 2,00% w/v	10,02
F5	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 40/20/40	HPMC K4M 2,00% w/v	21,68
F6	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 50/20/30	Klucel HF 1,50% w/v	30,98

Πίνακας 20.10: Συνθέσεις γελών δραστικής ουσίας Α

#### 20.4.4 Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Α από Γέλες

Για τη διερεύνηση της διαδερμικής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας Α αξιολογήθηκαν τέσσερις γέλες σε ένα δότη δέρματος, συγκεκριμένα στον 19/04/17. Επομένως, ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων που διενεργήθηκαν ήταν και σε αυτή την περίπτωση τέσσερα. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε κύτταρα διάχυσης για κάθε πείραμα και το διάλυμα του υποδοχέα που επιλέχθηκε βασίστηκε στα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού της διαλυτότητας κορεσμού καθώς και στη μέγιστη τιμή της ΦΔΟ που εμπεριέχεται στις υπό αξιολόγηση συνθέσεις. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε μείγμα *PG/H<sub>2</sub>O* σε αναλογία 50/50 καθώς σύμφωνα με τους απαραίτητους υπολογισμούς, διασφαλίζεται η διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής ( $8,6 \text{ mg/mL} > 0,49 \text{ mg/mL}$ ).

Η εξαρτημένη μεταβλητή που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η ποσότητα της δραστικής ουσίας Α (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας, σε μονάδες  $\mu\text{g/cm}^2$ , στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος καθώς και ανά 24 h. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στους πίνακες 20.11 και 20.12.

Επιπλέον, στο διάγραμμα 20.5 παριστάνεται γραφικά η αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Από το διάγραμμα αυτό, υπολογίστηκε η ροή στη σταθεροποιημένη κατάσταση ( $J_{ss}$ ) σε μονάδες  $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$  και ο χρόνος υστέρησης (L) σε μονάδες h σύμφωνα με το κεφάλαιο 5. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη ροή (J), στις ίδιες μονάδες, ανά 24 h παρουσιάζονται στον πίνακα 20.13.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$Q_{0-12}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-36}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-48}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD
F3	1113,70 $\pm$ 312,31	2275,01 $\pm$ 371,37	2494,50 $\pm$ 408,08	2577,02 $\pm$ 403,60
F4	1252,43 $\pm$ 337,10	2924,66 $\pm$ 744,14	4151,94 $\pm$ 882,30	5197,04 $\pm$ 1069,38
F5	1369,40 $\pm$ 199,97	3184,52 $\pm$ 280,05	4833,30 $\pm$ 390,70	6822,00 $\pm$ 449,20
F6	1205,35 $\pm$ 88,76	3931,15 $\pm$ 402,49	6878,29 $\pm$ 982,13	9900,55 $\pm$ 1292,14

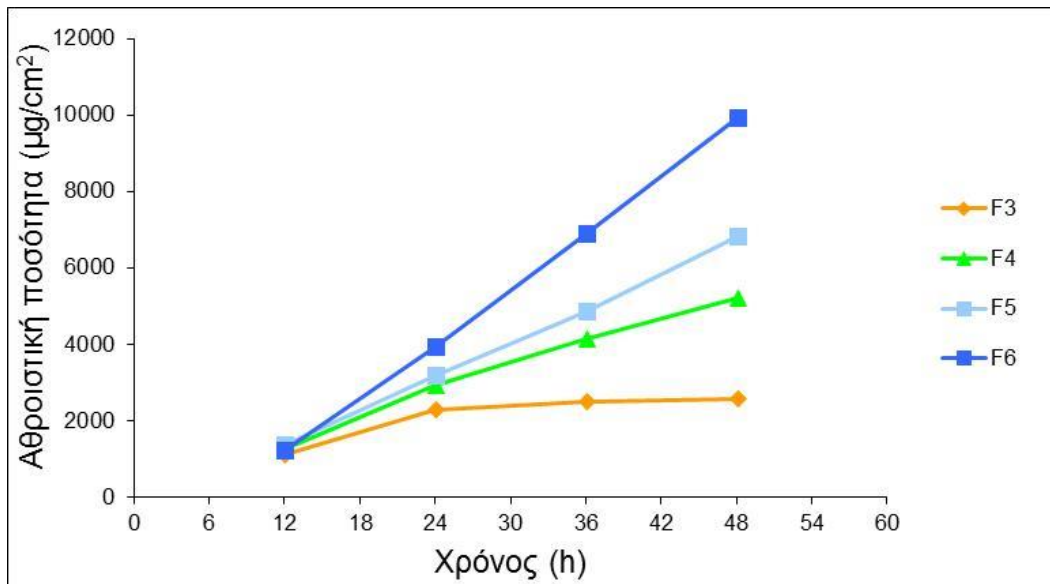
Πίνακας 20.11: Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD
F3	2275,01 $\pm$ 371,37	302,01 $\pm$ 116,02
F4	2924,66 $\pm$ 744,14	2272,38 $\pm$ 414,23
F5	3184,52 $\pm$ 280,05	3637,48 $\pm$ 341,33
F6	3931,15 $\pm$ 402,49	5969,40 $\pm$ 916,12

**Πίνακας 20.12:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας, ανά 24 h

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$J_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	L (h)
F3	94,79 $\pm$ 15,47	12,58 $\pm$ 4,83	38,41	-25,06
F4	121,86 $\pm$ 31,01	94,68 $\pm$ 17,26	108,84	-1,07
F5	132,69 $\pm$ 11,67	151,56 $\pm$ 14,22	150,05	2,99
F6	163,80 $\pm$ 16,77	248,73 $\pm$ 38,17	241,94	7,35

**Πίνακας 20.13:** Ροή της δραστικής ουσίας Α, από τις γέλες, ανά 24 h, σε σταθεροποιημένη κατάσταση και χρόνος υστέρησης



**Διάγραμμα 20.5:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο

#### 20.4.5 Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής Shapiro – Wilk, τα δεδομένα όλων των συνθέσεων σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας ακολουθούν κανονική κατανομή. Από την ανάλυση διακύμανσης που ακολούθησε, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 20.14, προέκυψε πως παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων στα διαφορετικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε δοκιμή Tukey για τον έλεγχο της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ όλων των δυνατών ζευγών, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 20.15.

		Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F	p – value
$Q_{0-12}$	Between Groups	136126,079	3	45375,360	0,662	0,590
	Within Groups	890778,250	13	68521,404		
	Total	1026904,329	16			
$Q_{0-24}$	Between Groups	5652432,584	3	1884144,195	7,312	<b>0,004</b>
	Within Groups	3350018,428	13	257693,725		
	Total	9002451,012	16			
$Q_{0-36}$	Between Groups	39694111,060	3	13231370,350	24,696	<b>&lt; 0,001</b>
	Within Groups	6965047,754	13	535772,904		
	Total	46659158,820	16			
$Q_{0-48}$	Between Groups	113568382,200	3	37856127,400	46,092	<b>&lt; 0,001</b>
	Within Groups	10677178,980	13	821321,460		
	Total	124245561,200	16			

Πίνακας 20.14: Ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Α, από τις γέλες

Ζεύγος Συνθέσεων	p – value			
	$Q_{0-12}$	$Q_{0-24}$	$Q_{0-36}$	$Q_{0-48}$
F3 – F4	0,858	0,272	<b>0,023</b>	<b>0,004</b>
F3 – F5	0,532	0,101	<b>0,003</b>	<b>&lt; 0,001</b>
F3 – F6	0,959	<b>0,002</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
F4 – F5	0,908	0,869	0,528	0,079
F4 – F6	0,993	<b>0,048</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
F5 – F6	0,812	0,210	<b>0,008</b>	<b>0,002</b>

Πίνακας 20.15: Δοκιμή Tukey αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Α, από τις γέλες

Με βάση τα αποτελέσματα και τη στατιστική τους ανάλυση προκύπτει, όπως ήταν αναμενόμενο, πως η διαδερμική διαπερατότητα της δραστικής ουσίας Α είναι εξαιρετικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του υδροχλωρικού αλάτος της. Επιπλέον, η αυξανόμενη περιεκτικότητα σε αιθανόλη σε συνδυασμό με την αντίστοιχη μεταβολή της συγκέντρωσης της ΦΔΟ στις φαρμακευτικές γέλες παρουσιάζει και ανάλογα αποτελέσματα στη ροή μέσω του δέρματος. Παρόλο που στη δειγματοληψία των πρώτων 12 h δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των συνθέσεων, από τις 24 h και ειδικότερα στις 36 και 48 h παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές φορές μεταξύ όλων των συνθέσεων εκτός από το ζεύγος F4 και F5.

Μελετώντας το διάγραμμα 20.5, προκύπτει πως στην περίπτωση της σύνθεσης F3 μετά τις πρώτες 24 h και πιθανότατα της F4 μετά τις 48 h, παρατηρείται πλατό στην ποσότητα της ουσίας που διαπερνά το φραγμό του δέρματος. Αντίθετα, στην περίπτωση των συνθέσεων F5 και F6, η ροή της δραστικής ουσίας Α διατηρεί ανοδική πορεία ακόμη και μετά τις 48 h.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα αποτελέσματα της ροής σταθεροποιημένης κατάστασης για κάθε φαρμακευτική γέλη σε συνδυασμό με τον επιθυμητό ρυθμό διαδερμικής διαπερατότητας για επίτευξη θεραπευτικής δράσης ( $1120 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), καταλήγουμε εύκολα στο συμπέρασμα πως σε κάθε περίπτωση επιτυγχάνονται θεραπευτικά επίπεδα στη συστηματική κυκλοφορία ύστερα από χορήγηση ΔΘΣ τύπου δεξαμενής με μέγεθος μικρότερο από  $12 \text{ cm}^2$ . Συγκεκριμένα, στον πίνακα 20.16 παρουσιάζεται το ελάχιστο μέγεθος του ΔΘΣ, κατά περίπτωση, καθώς και μια εκτίμηση σχετικά με τη διάρκεια δράσης του. Σημειώνεται

πως στην περίπτωση της σύνθεσης F3, για τον υπολογισμό του μεγέθους χρησιμοποιείται η ροή για το χρονικό διάστημα των πρώτων 24 h καθώς έπειτα παρατηρείται σημαντική μείωση.

Κωδικός Σύνθεσης	Μέγεθος ΔΘΣ (cm <sup>2</sup> )	Διάρκεια Δράσης (h)
F3	11,82	24
F4	10,29	48
F5	7,46	> 48
F6	4,63	> 48

Πίνακας 20.16: Ελάχιστο μέγεθος ΔΘΣ τύπου δεξαμενής και εκτίμηση διάρκειας δράσης

## 20.5 Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Drug-in-Adhesive ΔΘΣ

### 20.5.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Ολικών Στερεών Συγκολλητικού

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον προσδιορισμό των επί τοις εκατό ολικών στερεών του συγκολλητικού ανά δείγμα, σύμφωνα με τα στάδια και την εξίσωση που παρουσιάζονται στο υποκεφάλαιο 17.1, παρατίθενται στον πίνακα 20.17.

Το πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό που ήταν διαθέσιμο ανήκει στην κατηγορία των σιλικονούχων και συγκεκριμένα είναι το BIO-PSA 7-4301 (Dow Corning<sup>®</sup>, USA) το οποίο είναι συμβατό με ΦΔΟ που διαθέτουν χαρακτηριστικές αμινο-ομάδες, όπως και η δραστική ουσία Α. Στον πίνακα 20.18 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του συγκολλητικού.

Δείγμα	Απόβαρο (g)	Αρχικό Μεικτό Βάρος (g)	Τελικό Μεικτό Βάρος (g)	% Ολικά Στερεά
1 <sup>ο</sup>	2,5323	3,3874	3,1532	72,61
2 <sup>ο</sup>	2,5340	3,5746	3,2989	73,51
3 <sup>ο</sup>	2,5347	4,1865	3,7396	72,94
4 <sup>ο</sup>	2,5295	4,5792	4,0252	72,97

Πίνακας 20.17: Προσδιορισμός ολικών στερεών πιεσοευαίσθητου συγκολλητικού BIO-PSA 7-4301

Πιεσοευαίσθητο Συγκολλητικό (PSA)	% Ολικά Στερεά	Τυπική Απόκλιση	% Συντελεστής Μεταβλητότητας
BIO-PSA 7-4301	73,01	0,37	0,51

Πίνακας 20.18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού των επί τοις εκατό ολικών στερεών

### 20.5.2 Παρασκευή Μειγμάτων Επίστρωσης

Αφού επιβεβαιώθηκε η αναμειξιμότητα της δραστικής ουσίας Α με το πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό ύστερα από προκαταρκτικά πειράματα, προχωρήσαμε στη δημιουργία μειγμάτων επίστρωσης έχοντας ως στόχο την ανάπτυξη ΔΘΣ σε συγκεντρώσεις 2,00, 4,00 και 6,00% w/w. Σύμφωνα λοιπόν με τα βήματα του υποκεφαλαίου 17.2 παρασκευάστηκαν τρία μείγματα, περίπου 15 g το κάθε ένα, με το σιλικονούχο συγκολλητικό. Οι υπολογισμοί καθώς και οι ακριβείς ποσότητες των συστατικών των μειγμάτων επίστρωσης απεικονίζονται στον πίνακα 20.19. Σημειώνεται πως ο όρος προ ξήρανσης (ΠΞ) αναφέρεται σε μείγμα που περιλαμβάνει το διαλύτη του συγκολλητικού, ενώ ο αντίστοιχος μετά ξήρανσης (ΜΞ) σε μείγμα που έχει απομακρυνθεί ο διαλύτης και απομένουν μόνο τα στερεά συστατικά του.

Μείγμα (% w/w)	Υλικά	Θεωρητική Σύσταση (%) – ΜΞ	Θεωρητική Ζύγιση (g) – ΠΞ	Σύσταση Θεωρητικής Ζύγισης (g) – ΜΞ	Πραγματική Ζύγιση (g) – ΠΞ	Σύσταση Πραγματικής Ζύγισης (g) – ΜΞ (%)
2,00	BIO-PSA 7-4301	98,00	15,0000	10,9513	15,1672	11,0733 97,99
	Δραστική Ουσία Α	2,00	-	0,2235	0,2275	0,2275 2,01
4,00	BIO-PSA 7-4301	96,00	15,0000	10,9513	16,4365	12,0000 95,96
	Δραστική Ουσία Α	4,00	-	0,4563	0,5051	0,5051 4,04
6,00	BIO-PSA 7-4301	94,00	15,0000	10,9513	15,0790	11,0089 93,96
	Δραστική Ουσία Α	6,00	-	0,6990	0,7074	0,7074 6,04

Πίνακας 20.19: Σύσταση μειγμάτων επίστρωσης δραστικής ουσίας Α

### 20.5.3 Εκτέλεση Επιστρώσεων – Δημιουργία Regular Patches

Την παρασκευή των μειγμάτων επίστρωσης ακολούθησε η εκτέλεση των επιστρώσεων, η δημιουργία δηλαδή των ΔΘΣ. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρουσιάζονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 17.3.1, παρασκευάστηκαν regular patches με τα μείγματα επίστρωσης του σιλικονούχου συγκολλητικού. Χρησιμοποιήθηκε αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη από πολυεστέρα, ειδικότερα το Scotchpak™ 1022 (3M Drug Delivery Systems, 2004) και μεμβράνη υποστήριξης από πολυαιθυλένιο, ειδικότερα η CoTran™ 9720 (3M Drug Delivery Systems, 2004). Όσον αφορά την πλευρά του μαχαιριού επίστρωσης που επιλέγεται για τη δημιουργία των υγρών φιλμ επίστρωσης είναι 5 mils, το οποίο αντιστοιχεί σε πάχος επίστρωσης μετά την ξήρανση περίπου 3,65 mils.

### 20.5.4 Αποτελέσματα Θεωρητικού Προσδιορισμού Μάζας Regular Patches

Τον ποσοτικό προσδιορισμό των ΔΘΣ προηγείται ο προσδιορισμός της μάζας του συνόλου της επίστρωσης και ειδικότερα της δραστικής ουσίας Α. Σύμφωνα με τη διεργασία που παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 17.4 και με κατάλληλους υπολογισμούς, δεδομένου ότι η μάζα της μεμβράνης υποστήριξης και της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης είναι 0,0079 g και 0,0135 g αντίστοιχα, προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 20.20.

Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (% w/w)	Μάζα Επίστρωσης / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Επίστρωσης / cm <sup>2</sup> (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / cm <sup>2</sup> (mg)
2,00	6,163	4,853	0,123	0,097
4,00	7,510	5,913	0,300	0,237
6,00	6,260	4,929	0,376	0,296

Πίνακας 20.20: Αποτελέσματα θεωρητικού προσδιορισμού μάζας Regular Patches



### 20.5.5 Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Regular Patches

Τελευταίο βήμα πριν την αξιολόγηση των ΔΘΣ σε in vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας αποτελεί ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Σύμφωνα λοιπόν με τη διεργασία που παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 17.5 προέκυψαν εξαιρετικά απογοητευτικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της δραστικής ουσίας Α από τα regular patches.

Για να βρεθεί λοιπόν η αιτία του αποτελέσματος αυτού πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της σταθερότητας της δραστικής ουσίας Α σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης και αξιολόγηση μέσω πειραμάτων φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και διαφορικής θερμιδομετρίας σύρωσης σε συνδυασμό με θερμοβαρυσμετρική ανάλυση.

### 20.5.6 Αποτελέσματα Πειραμάτων Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Αρχικά είναι εξαιρετικά σημαντικό να αναφερθεί πως δεν υπάρχει διαθέσιμο στη βιβλιογραφία φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της δραστικής ουσίας Α ώστε να μπορεί να γίνει αντιπαραβολή. Ωστόσο, καθώς είναι διαθέσιμο αντίστοιχο φάσμα της  $A - \text{HCl}$  γνωρίζουμε τι πρέπει να αναμένουμε σχετικά με τις κορυφές και τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων, καθώς η διαφορά μεταξύ του υδροχλωρικού άλατος και της ασθενούς βάσης βρίσκεται αποκλειστικά στο υδρογόνο ( $\text{H}^+$ ) του υδροχλωρίου.

Με σκοπό λοιπόν την αξιολόγηση της σταθερότητας της δραστικής ουσίας Α, δείγμα από το μείγμα των, συνενωμένων, τελευταίων δυο παρτίδων, περίπου επτά μήνες μετά τις αντιδράσεις εξουδετέρωσης και αφού έκτοτε διατηρούνται στους  $-20^\circ\text{C}$ , τοποθετήθηκε σε vial και αφέθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος για 14 ημέρες. Με το πέρας των δυο εβδομάδων, το δείγμα αυτό σε συνδυασμό με ένα δείγμα του ίδιου μείγματος που μόλις είχε αφαιρεθεί από τους  $-20^\circ\text{C}$  χρησιμοποιήθηκαν για την παραλαβή φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$ . Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στην περίπτωση των προϊόντων των τεσσάρων αντιδράσεων εξουδετέρωσης, τα φάσματα ήταν ταυτόσημα μεταξύ τους καθώς και με όλα τα προηγούμενα.

Ακολούθως, παρουσιάζονται φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  της  $A - \text{HCl}$  σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) καθώς και ένα ενδεικτικό της δραστικής ουσίας Α σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (δεδομένα στο αρχείο).

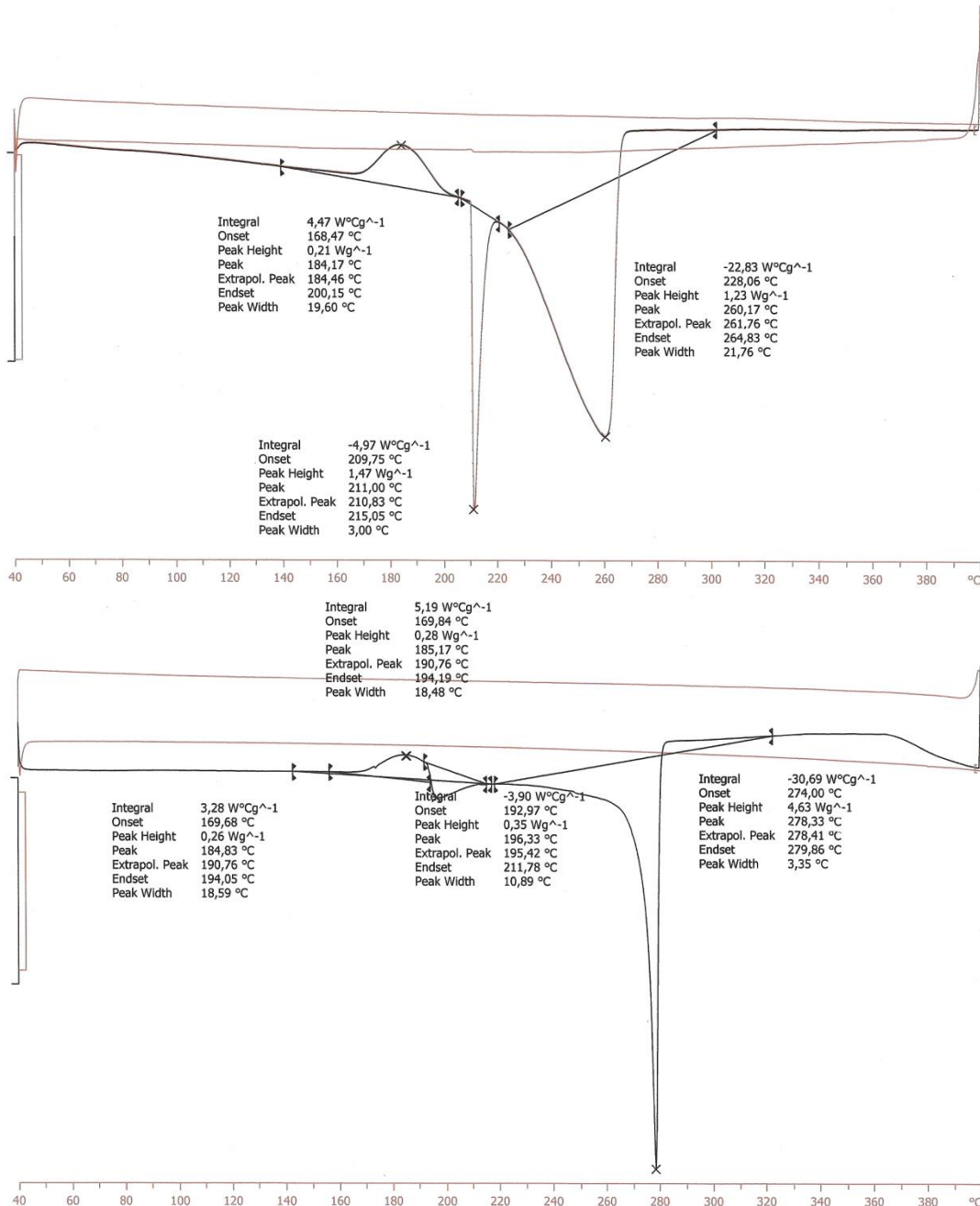


Διάγραμμα 20.6: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR – Επάνω: Α-HCl σε DMSO, Κάτω: Δραστικής ουσίας Α σε CHCl<sub>3</sub>

### 20.5.7 Αποτελέσματα Πειραμάτων Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης & Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης

Απώτερος σκοπός, μετά και τις διαφορές μεταξύ των παρτίδων της δραστικής ουσίας Α, ήταν να βρεθεί μια φυσικοχημική παράμετρος που να μπορεί να προσδιορίζεται εύκολα και με ακρίβεια. Μια εξαιρετική σκέψη ήταν το σημείο ζέσεως, που μπορεί να προσδιοριστεί με την τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Στο χρονικό σημείο που δόθηκε η ευκαιρία να πραγματοποιηθούν τα πειράματα αυτά, χρησιμοποιούταν ως ΦΔΟ το μείγμα της

3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> παρτίδας. Οπότε, έχοντας ως σκοπό να αξιοποιηθεί το όργανο και για αξιολόγηση της σταθερότητας της δραστικής ουσίας Α, έγιναν δυο προσδιορισμοί σε δείγματα αντίστοιχα με αυτά που έγιναν και τα τελικά φάσματα <sup>1</sup>H-NMR. Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν εξίσου ταυτόσημα, καθώς όπως είναι ορατό και από το διάγραμμα 20.7 υπάρχουν σημαντικές διαφορές.

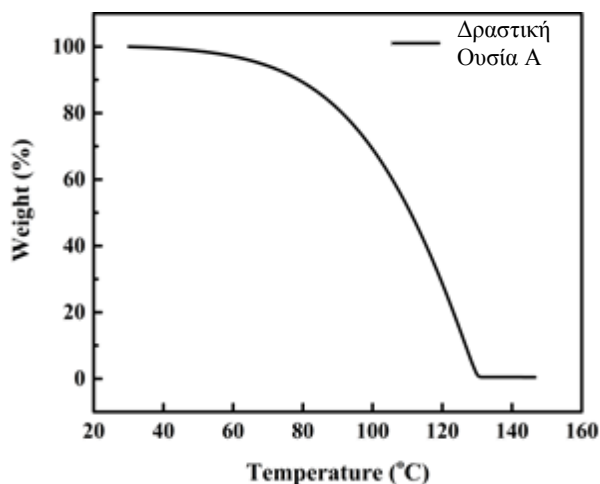


**Διάγραμμα 20.7:** Θερμογράφημα DSC δραστικής ουσίας Α – Επάνω: -20°C, Κάτω: -20°C και 14 ημέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος

Στο διάγραμμα 20.7 (Επάνω) που απεικονίζεται το θερμογράφημα του δείγματος που βρισκόταν στους -20°C απεικονίζονται δυο κορυφές, μια οξεία ενδόθερμη κορυφή στους 211°C και μια αρκετά φαρδιά, επίσης ενδόθερμη, στους 260°C. Επιπλέον, παρατηρείται ένα θερμικό φαινόμενο μεταξύ 168°C και 200°C. Από την άλλη, στο θερμογράφημα του

διαγράμματος 20.7 (Κάτω), του δείγματος δηλαδή που βρισκόταν και επιπλέον για 14 ημέρες σε συνθήκες περιβάλλοντος, απεικονίζεται πέρα από ένα παρόμοιο θερμικό φαινόμενο μεταξύ 170°C και 195°C μια μόνο οξεία, ενδόθερμη κορυφή στους 278°C. Οι μεταπτώσεις φάσεων που παρατηρούνται και στις δύο περιπτώσεις καθώς και η αδυναμία προσδιορισμού του σημείου ζέσεως αποτελούν ένδειξη αστάθειας της δραστικής ουσίας Α, πιθανότατα και στις δυο συνθήκες διατήρησης.

Ωστόσο, μια δεύτερη αιτία που μας οδήγησε στα πειράματα αυτά, όπως ήδη αναφέρθηκε, ήταν η σχεδόν πλήρης απώλεια της δραστικής ουσίας Α από τα regular patches, η τεχνική παρασκευής των οποίων περιλαμβάνει έκθεση της ΦΔΟ σε θερμοκρασία 70°C. Για να εξακριβωθεί λοιπόν η αιτία πίσω από το συμβάν αυτό, πήγαμε ένα βήμα παρακάτω καθώς δεν εξήχθη κάποιο ουσιαστικό αποτέλεσμα από τα πειράματα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε πείραμα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης το οποίο, όπως ήδη αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 14.3, θα έδειχνε την επίδραση της θερμοκρασίας στη μάζα της δραστικής ουσίας Α. Έτσι λοιπόν, δείγμα από τους -20°C αναλύθηκε με την τεχνική αυτή σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την πρόταση πως η ΦΔΟ εξατμίστηκε κατά τη ξήρανση των ΔΘΣ στον κλίβανο. Όπως είναι εμφανές από το διάγραμμα 20.8, η δραστική ουσία Α είναι εξαιρετικά πτητική με την εξάτμισή της να ξεκινάει περίπου από τους 35°C και να ολοκληρώνεται μέχρι τους 130°C.



Διάγραμμα 20.8: Θερμογράφημα TGA δείγματος δραστικής ουσίας Α από τους -20°C

Επομένως, αφού δόθηκε η εξήγηση για την απώλεια της ΦΔΟ από τα regular patches, δόθηκε και το έναυσμα για τη δημιουργία sandwich patches, όπως ήδη ορίστηκε, με τεχνική η οποία είναι απαλλαγμένη από το στάδιο έκθεσης της ΦΔΟ σε θερμοκρασίες εξάτμισης.

### 20.5.8 Εκτέλεση Επιστρώσεων – Δημιουργία Sandwich Patches

Την αξιολόγηση της σταθερότητας λοιπόν ακολούθησε η δημιουργία sandwich patches. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρουσιάζονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 17.3.2, παρασκευάστηκαν ΔΘΣ αρχικά με την προσθήκη της δραστικής ουσίας Α αδιάλυτη και εν συνεχεία με τη μορφή αιθανολικού διαλύματος. Όσον αφορά την αποσπώμενη εξωτερική μεμβράνη, τη μεμβράνη υποστήριξης καθώς και το συνολικό πάχος της επίστρωσης, ήταν ίδια με τα αντίστοιχα των regular patches.

### 20.5.9 Αποτελέσματα Θεωρητικού Προσδιορισμού Μάζας Sandwich Patches

Όπως και στην περίπτωση των regular patches, τον ποσοτικό προσδιορισμό των sandwich patches προηγείται ο προσδιορισμός της μάζας του συνόλου της επίστρωσης και ειδικότερα της δραστικής ουσίας Α. Σύμφωνα με τη διεργασία που παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 17.4 και με κατάλληλους υπολογισμούς, δεδομένου ότι η μάζα της μεμβράνης

υποστήριξης και της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης είναι 0,0079 g και 0,0135 g αντίστοιχα, προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 20.21 και 20.22.

Σημειώνεται πως στην περίπτωση των ΔΘΣ που παρασκευάστηκαν με την τεχνική sandwich patch και η δραστική ουσία Α προστέθηκε σε αδιάλυτη μορφή, ήταν αδύνατη η επίτευξη με μεγάλη ακρίβεια των επιθυμητών συγκεντρώσεων.

Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (% w/w)	Μάζα Επίστρωσης / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Επίστρωσης / cm <sup>2</sup> (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / cm <sup>2</sup> (mg)
2,60	8,050	6,339	0,209	0,165
5,20	6,100	4,803	0,317	0,250
6,00	5,625	4,429	0,338	0,266

**Πίνακας 20.21:** Αποτελέσματα θεωρητικού προσδιορισμού μάζας Sandwich Patches με αδιάλυτη δραστική ουσία Α

Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (% w/w)	Μάζα Επίστρωσης / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Επίστρωσης / cm <sup>2</sup> (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / ΔΘΣ (1,27 cm <sup>2</sup> ) (mg)	Μάζα Δραστικής Ουσίας Α / cm <sup>2</sup> (mg)
2,00	6,050	4,764	0,122	0,096
4,00	5,917	4,659	0,238	0,188
6,00	5,750	4,528	0,344	0,271

**Πίνακας 20.22:** Αποτελέσματα θεωρητικού προσδιορισμού μάζας Sandwich Patches με αιθανολικό διάλυμα δραστικής ουσίας Α

Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, τόσο των regular όσο και των sandwich patches, παρατηρείται μια ανομοιομορφία μεταξύ των προσδιοριζόμενων μαζών της δραστικής ουσίας Α ως προς τα ΔΘΣ διαφορετικών συγκεντρώσεων. Ειδικότερα, δεν παρατηρείται ανάλογη αύξηση της μάζας της ΦΔΟ με την αύξηση της συγκέντρωσής της στα ΔΘΣ. Γι' αυτό ευθύνεται αποκλειστικά η πειραματική διάταξη καθώς είναι μη αυτοματοποιημένη και εργαστηριακής κλίμακας. Δεν εξασφαλίζεται λοιπόν ομοιόμορφη επίστρωση κατά μήκος των μεμβρανών με αποτέλεσμα να παρατηρείται η μεταβλητότητα αυτή.

#### 20.5.10 Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Sandwich Patches

Τελευταίο βήμα πριν την αξιολόγηση των ΔΘΣ σε in vitro πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας αποτελεί ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Σύμφωνα λοιπόν με τη διεργασία που παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 17.5 προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 20.23 και 20.24.

Θεωρητική Περιεκτικότητα (% w/w)	Πειραματική Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (μg/mL) ± SD	Θεωρητική Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (μg/mL)	Απόδοση (%)
2,60	9,29 ± 0,86	10,47	88,77 ± 8,17
5,20	9,41 ± 1,19	15,86	59,30 ± 7,53
6,00	8,98 ± 1,93	16,88	53,21 ± 11,42

**Πίνακας 20.23:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού Sandwich Patches με αδιάλυτη δραστική ουσία Α

Θεωρητική Περιεκτικότητα (% w/w)	Πειραματική Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (μg/mL) ± SD	Θεωρητική Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (μg/mL)	Απόδοση (%)
2,00	1,68 ± 0,14	6,10	27,53 ± 1,98
4,00	2,56 ± 1,07	11,90	21,53 ± 9,33
6,00	3,54 ± 2,00	17,20	20,67 ± 11,81

**Πίνακας 20.24:** Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού Sandwich Patches με αιθανολικό διάλυμα δραστικής ουσίας Α

Αρχικά, αξίζει να σημειωθεί πως στην περίπτωση των sandwich patches με αδιάλυτη δραστική ουσία Α, στο σημείο προσθήκης της ΦΔΟ είχε επέλθει πλαστικοποίηση του συγκολλητικού με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο διαχωρισμός της αποσπώμενης εξωτερικής μεμβράνης από τη στοιβάδα του συγκολλητικού.

Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα προκύπτει πως, στην περίπτωση της αδιάλυτης δραστικής ουσίας Α, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ΦΔΟ που προστέθηκε στο εκάστοτε ΔΘΣ τόσο μειώνεται η συγκέντρωση που τελικά προσδιορίστηκε σε αυτό. Επειδή μια πιθανή αιτία είναι η μη επαρκής διασπορά της ΦΔΟ στο συγκολλητικό εξαιτίας της περιορισμένης ποσότητάς της, ακολούθησε η δημιουργία των sandwich patches με αιθανολικό διάλυμα της δραστικής ουσίας Α. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση η πειραματική συγκέντρωση απείχε εξαιρετικά από την θεωρητική, γεγονός που μας οδηγεί σε ορισμένα πιθανά συμπεράσματα. Πρώτον, ίσως παρατηρείται ασυμβασία μεταξύ της ΦΔΟ και του συγκεκριμένου συγκολλητικού, δεν αναμειγνύονται δηλαδή επαρκώς, και δεύτερον ίσως η μεμβράνη υποστήριξης από πολυαιθυλένιο να είναι διαπερατή για τα συστατικά της σύνθεσης του ΔΘΣ. Το δεύτερο πιθανό συμπέρασμα ενισχύεται από το γεγονός πως η ασθενής βάση της δραστικής ουσίας Α είναι εξαιρετικά πτητική και παρουσία της αιθανόλης, που είναι εξίσου πτητική, παρατηρούνται χαμηλότερες πειραματικές συγκεντρώσεις συγκριτικά με την αδιάλυτη.

### 20.5.11 Αποτελέσματα In Vitro Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Α από ΔΘΣ

Για τη διερεύνηση της διαδερμικής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας Α αξιολογήθηκαν οι τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ΔΘΣ που παρασκευάστηκαν με την τεχνική sandwich patch με επιστρώσεις σιλικονούχου συγκολλητικού και αιθανολικό διάλυμα δραστικής ουσίας Α, στον δότη δέρματος 19/04/17. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε κύτταρα διάχυσης για κάθε πείραμα και το διάλυμα του υποδοχέα που επιλέχθηκε ήταν όμοιο με αυτό των αντίστοιχων μελετών για τις γέλες, δηλαδή μείγμα  $PG/H_2O$  σε αναλογία 50/50.

Η εξαρτημένη μεταβλητή που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η ποσότητα της δραστικής ουσίας Α (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας, σε μονάδες  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος καθώς και ανά 24 h. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στους πίνακες 20.25 και 20.26.

Επιπλέον, στο διάγραμμα 20.9 παριστάνεται γραφικά η αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Από το διάγραμμα αυτό, υπολογίστηκε η ροή στη σταθεροποιημένη κατάσταση ( $J_{ss}$ ) σε μονάδες  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  και ο χρόνος υστέρησης (L) σε μονάδες h σύμφωνα με το κεφάλαιο 5. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη ροή (J), στις ίδιες μονάδες, ανά 24 h παρουσιάζονται στον πίνακα 20.27.

Κωδικός ΔΘΣ – Συγκέντρωση ΦΔΟ (% w/w)	$Q_{0-12}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-36}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD
F7 – 2,00	4,08 $\pm$ 1,28	8,43 $\pm$ 2,47	15,72 $\pm$ 4,10	23,94 $\pm$ 5,93
F8 – 4,00	6,75 $\pm$ 2,78	14,31 $\pm$ 6,76	20,80 $\pm$ 8,35	26,93 $\pm$ 10,83
F9 – 6,00	8,74 $\pm$ 1,74	17,31 $\pm$ 3,27	29,74 $\pm$ 5,84	36,62 $\pm$ 7,34

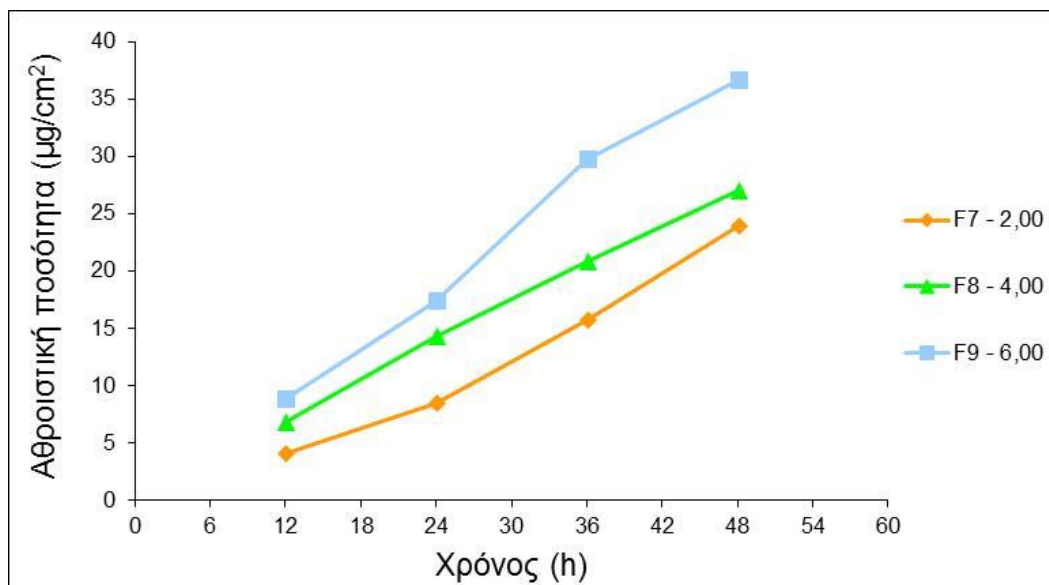
**Πίνακας 20.25:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τα ΔΘΣ, ανά μονάδα επιφάνειας στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος

Κωδικός ΔΘΣ – Συγκέντρωση ΦΔΟ (% w/w)	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) $\pm$ SD
F7 – 2,00	8,43 $\pm$ 2,47	15,51 $\pm$ 3,48
F8 – 4,00	14,31 $\pm$ 6,76	12,63 $\pm$ 4,21
F9 – 6,00	17,31 $\pm$ 3,27	19,31 $\pm$ 4,25

**Πίνακας 20.26:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τα ΔΘΣ, ανά μονάδα επιφάνειας, ανά 24 h

Κωδικός ΔΘΣ – Συγκέντρωση ΦΔΟ (% w/w)	$J_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	L (h)
F7 – 2,00	0,35 $\pm$ 0,10	0,65 $\pm$ 0,15	0,56	6,59
F8 – 4,00	0,60 $\pm$ 0,28	0,53 $\pm$ 0,18	0,56	-0,79
F9 – 6,00	0,72 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,18	0,80	1,14

**Πίνακας 20.27:** Ροή της δραστικής ουσίας Α, από τα ΔΘΣ, ανά 24 h, σε σταθεροποιημένη κατάσταση και χρόνος υστέρησης



**Διάγραμμα 20.9:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Α που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τα ΔΘΣ, ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής Shapiro – Wilk, τα δεδομένα όλων των συνθέσεων σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας ακολουθούν κανονική κατανομή. Από την ανάλυση διακύμανσης που ακολούθησε, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 20.28, προέκυψε πως παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων στα διαφορετικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε δοκιμή Tukey για τον έλεγχο της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ όλων των δυνατών ζευγών, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 20.29.

		Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F	p – value
$Q_{0-12}$	Between Groups	40,872	2	20,436	4,427	<b>0,042</b>
	Within Groups	46,158	10	4,616		
	Total	87,030	12			
$Q_{0-24}$	Between Groups	148,115	2	74,057	3,110	0,089
	Within Groups	238,125	10	23,813		
	Total	386,240	12			
$Q_{0-36}$	Between Groups	410,600	2	205,300	4,573	<b>0,039</b>
	Within Groups	448,920	10	44,892		
	Total	859,519	12			
$Q_{0-48}$	Between Groups	375,895	2	187,948	2,489	0,133
	Within Groups	755,188	10	75,519		
	Total	1131,083	12			

Πίνακας 20.28: Ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Α, από τα ΔΘΣ

Ζεύγος Συνθέσεων	p – value			
	$Q_{0-12}$	$Q_{0-24}$	$Q_{0-36}$	$Q_{0-48}$
F7 – F8	0,252	0,271	0,570	0,886
F7 – F9	<b>0,034</b>	0,075	<b>0,041</b>	0,163
F8 – F9	0,348	0,609	0,137	0,231

Πίνακας 20.29: Δοκιμή Tukey αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Α, από τα ΔΘΣ

Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει πως η διαδερμική διαπερατότητα της δραστικής ουσίας Α από τα συγκεκριμένα ΔΘΣ είναι ανεπαρκής για επίτευξη θεραπευτικής δράσης. Επιπλέον, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, προκύπτει πως μόνο μεταξύ των συνθέσεων F7 και F9 παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές και συγκεκριμένα στις 12 h και στις 36 h. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό μπορεί να αναιρεθεί σχετικά εύκολα δεδομένου του γεγονότος πως ο ποσοτικός προσδιορισμός αντίστοιχων ΔΘΣ έδωσε εξαιρετικά χαμηλότερα αποτελέσματα από τα αναμενόμενα. Επομένως, προκύπτει με απόλυτη βεβαιότητα πως τα αποτελέσματα αυτά δεν είναι αντιπροσωπευτικά των θεωρητικών συγκεντρώσεων των ΔΘΣ.

Αν τώρα γίνει μια προσπάθεια εκτίμησης της πραγματικής συγκέντρωσης των ΔΘΣ με βάση τις πειραματικές συγκεντρώσεις τους, θα προκύψουν τα δεδομένα του πίνακα 20.30.

Κωδικός ΔΘΣ	Θεωρητική Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Α (% w/w)	Εκτίμηση Πραγματικής Συγκέντρωσης Δραστικής Ουσίας Α (% w/w)
F7	2,00	0,55
F8	4,00	0,86
F9	6,00	1,23

Πίνακας 20.30: Εκτίμηση πραγματικής συγκέντρωσης δραστικής ουσίας Α σε ΔΘΣ

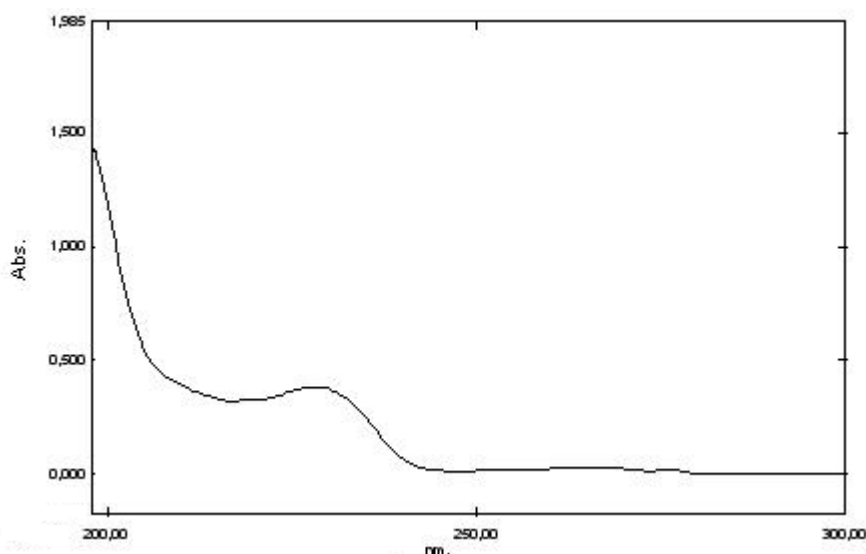
Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, αν συγκριθούν με τις αντίστοιχες τιμές των εξεταζόμενων γελών, θα παρατηρηθεί εξαιρετική διαφορά. Η διαφορά αυτή θα ενισχύσει ακόμη μια φορά την καθοριστική σημασία της παρουσίας της αιθανόλης ως επιταχυντή διαβατότητας και παράγοντα αύξησης της διαλυτότητας της δραστικής ουσίας Α. Ωστόσο, υπενθυμίζεται πως το συμπέρασμα αυτό βασίζεται σε μια εκτίμηση επομένως δεν πρέπει να κριθεί απόλυτα αξιόπιστο.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 21<sup>ο</sup>: Δραστική Ουσία Β

### 21.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Λήψης Φάσματος Απορρόφησης Δραστικής Ουσίας Β

Στο διάγραμμα 21.1, όπου απεικονίζεται η απορρόφηση (absorbance – Abs) συναρτήσει του μήκους κύματος, σε μονάδες nm, παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση στα 228 nm. Είναι ξεκάθαρο λοιπόν πως η δραστική ουσία Β απορροφά επαρκώς στην χρησιμοποιούμενη περιοχή ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και δεν απαιτείται η μετατροπή της σε παράγωγο, μέσω κατάλληλων αντιδράσεων, με στόχο την εμφάνιση χρωμοφόρων ή φθορίζουσών ομάδων.

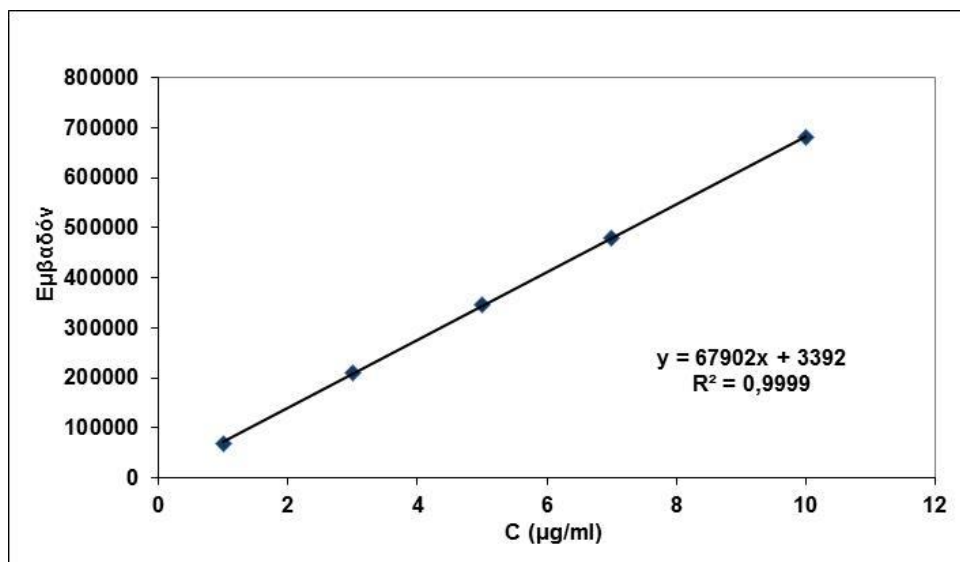


Διάγραμμα 21.1: Φάσμα απορρόφησης δείγματος δραστικής ουσίας Β συγκέντρωσης 10 µg/mL

### 21.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

#### 21.2.1 Καμπύλη Αναφοράς

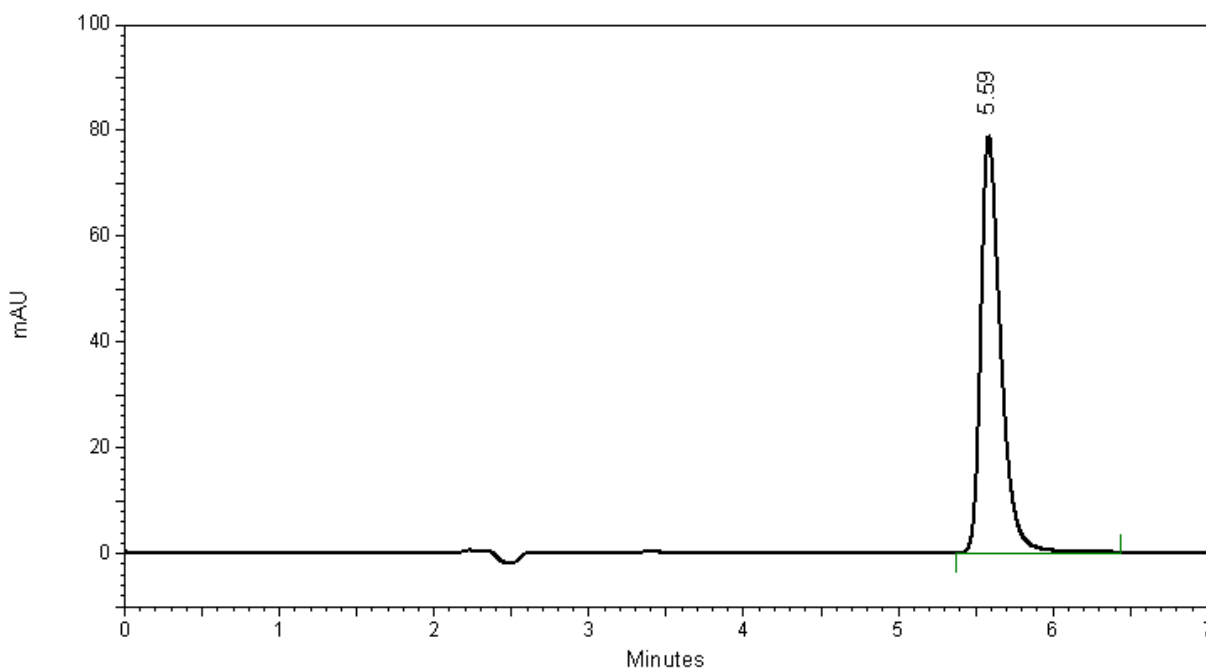
Η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης της  $B - HCl$  έναντι του εμβαδού της κορυφής είναι ευθεία γραμμή επιβεβαιώνοντας την αναμενόμενη γραμμική απόκριση ( $y = ax + b$ ) του ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού με τον οποίο είναι συνδεδεμένο το σύστημα HPLC. Στο διάγραμμα 21.2 παρουσιάζεται ενδεικτική καμπύλη αναφοράς της δραστικής ουσίας Β σε κινητή φάση. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί πως, αντίστοιχα με τη δραστική ουσία Α, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της δραστικής ουσίας Β βασίστηκε σε καμπύλη αναφοράς του υδροχλωρικού άλατος αυτής, με κατάλληλη μετέπειτα τροποποίηση λαμβάνοντας υπόψη τα μοριακά βάρη, εξαιτίας της δυσκολίας στη ζύγιση και επομένως στη δημιουργία μητρικού διαλύματος της ελαιώδους, παχύρευστης και υγρής δραστικής ουσίας Β.



Διάγραμμα 21.2: Καμπύλη αναφοράς Β-HCl συγκεντρώσεων 1,0 – 10,0 µg/mL

### 21.2.2 Αποτελέσματα Ελέγχου Παρεμπόδισεων στις Χρωματογραφικές Κορυφές

Σε όλα τα διαφορετικά διαλύματα υποδοχέα και τους φορείς των συνθέσεων που χρησιμοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν, αντίστοιχα, σε *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στο σχήμα, επομένως και στην ποσοτικοποίηση, της δραστικής ουσίας Β. Ενδεικτικό χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο διάγραμμα 21.3.



Διάγραμμα 21.3: Χρωματογράφημα δραστικής ουσίας Β συγκέντρωσης 10,0 µg/mL

### 21.3 Αποτελέσματα Μετατροπής Υδροχλωρικού Αλατος Δραστικής Ουσίας Β σε Βάση

Η ελαιώδης και υγρή φύση της δραστικής ουσίας Β καθώς και η απουσία βιβλιογραφίας σχετικά με την ταυτοποίηση, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη

σταθερότητά της δημιούργησαν ορισμένα προβλήματα στην εξέλιξη των μελετών. Ωστόσο, σε αντίθεση με τη δραστική ουσία Α, υπήρξε αρκετά μικρότερη μεταβλητότητα μεταξύ των προϊόντων των πέντε διαφορετικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, οι δυο πρώτες αντιδράσεις εξουδετέρωσης ήταν τροχοδεικτικές, τα προϊόντα των οποίων δεν αξιοποιήθηκαν σε περαιτέρω μελέτες αλλά αξιολογήθηκαν συγκριτικά, με σκοπό να καθοριστούν τα στάδια και οι συνθήκες των διεργασιών για τις επόμενες. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε η συγκέντρωση του διαλύματος του υδροξειδίου του νατρίου που προστέθηκε στάγδην καθώς και ο οργανικός διαλύτης για την εκχύλιση της ΦΔΟ.

Παρατηρήθηκε πως μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος, υψηλής συγκέντρωσης, υδροξειδίου του νατρίου είχε σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία κολλώδους ιζήματος, το οποίο αποτελεί ένδειξη βίαιης αντίδρασης, εντός του ποτηριού ζέσεως που λάμβανε χώρα η εξουδετέρωση. Αντίθετα, με αύξηση του όγκου και ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσής του, δεν παρατηρήθηκε καθόλου ιζημα με το πέρας της αντίδρασης, γεγονός που διευκόλυνε σε μεγάλο βαθμό τα στάδια εκχύλισης της ΦΔΟ και έκπλυσης των συνενωμένων οργανικών στοιβάδων. Όσον αφορά τον οργανικό διαλύτη εκχύλισης, έγινε δοκιμή με τον οξικό αιθυλεστέρα ( $CH_3COOCH_2CH_3$ ), αφού πρώτα είχε επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα του διχλωρομεθανίου με το μειονέκτημα της δημιουργίας γαλακτώματος μεταξύ οργανικής και υδατικής στοιβάδας. Και σε αυτή την περίπτωση όμως επικράτησε η επιλογή του διχλωρομεθανίου καθώς με τον οξικό αιθυλεστέρα απαιτούνταν αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα διατήρησης σε ηρεμία της διαχωριστικής χοάνης μετά από κάθε ανακίνηση, ώστε να είναι ευδιάκριτες οι δυο στοιβάδες.

Με βάση λοιπόν τις παρατηρήσεις αυτές, οι επόμενες τρεις αντιδράσεις εξουδετέρωσης πραγματοποιήθηκαν με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης περίπου 4,00% w/v και διαλύτη εκχύλισης το διχλωρομεθάνιο. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10 g από την Β – HCl και η μέση απόδοση ήταν 90%. Τέλος, τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών συνενώθηκαν και αποτέλεσαν τη ΦΔΟ προς μελέτη.

## 21.4 Εργαστηριακές Μέθοδοι Προετοιμασίας Γελών Δραστικής Ουσίας Β

### 21.4.1 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Διαλυτότητας Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Β

Η εξέλιξη των πειραμάτων αυτών, όπως περιγράφονται στο υποκεφάλαιο 16.2, ήταν εξαιρετικά καλύτερη συγκριτικά με την αντίστοιχη για τη δραστική ουσία Α. Συγκεκριμένα, η φυγοκέντριση είχε ως αποτέλεσμα ξεκάθαρο διαχωρισμό του υπερκείμενου διαλύματος των συστατικών από την περίσσεια της ελαιώδους και υγρής δραστικής ουσίας Β, η οποία συγκεντρωνόταν στον πυθμένα των δοκιμαστικών σωλήνων. Σε ορισμένες περιπτώσεις βέβαια κρίθηκε αναγκαία η εκ νέου φυγοκέντριση του υπερκείμενου διαλύματος ώστε να επέλθει πλήρης διαύγασή του. Στο κορεσμένο διάλυμα που προέκυψε σε κάθε περίπτωση, μετά από κατάλληλες αραιώσεις, έγινε προσδιορισμός της δραστικής ουσίας Β με σύστημα HPLC-UV.

Στους παρακάτω πίνακες λοιπόν απεικονίζεται η διαλυτότητα κορεσμού της δραστικής ουσίας Β, σε μονάδες % w/v, στους υποψήφιους φορείς και στα προτεινόμενα διαλύματα υποδοχέα.

Αναλογία Σύνθεσης Φορέα EtOH/Glyc/H <sub>2</sub> O (v/v/v)	Διαλυτότητα Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Β (% w/v) ± SD
30/20/50	0,269 ± 0,009
35/20/45	0,619 ± 0,006
40/20/40	1,670 ± 0,017
45/20/35	3,922 ± 0,012
50/20/30	8,515 ± 0,030

Πίνακας 21.1: Διαλυτότητα κορεσμού δραστικής ουσίας Β σε υποψήφιους φορείς

Σύνθεση Διαλύματος Υποδοχέα	Διαλυτότητα Κορεσμού Δραστικής Ουσίας Α (% w/v) ± SD
Φυσιολογικός Όρος (NS)	0,012 ± 0,001
Phosphate Buffer 0,01 M	0,084 ± 0,001
Phosphate Buffer 0,05 M	0,091 ± 0,006
PG/H <sub>2</sub> O – 10/90	0,022 ± 0,001
PG/H <sub>2</sub> O – 20/80	0,028 ± 0,001
PG/H <sub>2</sub> O – 30/70	0,042 ± 0,001
PG/H <sub>2</sub> O – 40/60	0,074 ± 0,002
PG/H <sub>2</sub> O – 50/50	0,224 ± 0,010
PG/H <sub>2</sub> O – 60/40	0,298 ± 0,013

Πίνακας 21.2: Διαλυτότητα κορεσμού δραστικής ουσίας Β σε προτεινόμενα διαλύματα υποδοχέα

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα, αύξηση της περιεκτικότητας της αιθανόλης σε βάρος του νερού προκαλεί ανάλογη αύξηση στη διαλυτότητα κορεσμού της ελαιώδους δραστικής ουσίας Β. Επιπλέον, οι μεγάλες διαφορές που παρουσιάζονται στις διαλυτότητες κορεσμού των δραστικών ουσιών Α και Β για τους ίδιους φορείς, αιτιολογούνται με βάση τη μεγαλύτερη λιποφιλία της δεύτερης. Με βάση λοιπόν τις τιμές που προσδιορίστηκαν, καταλήξαμε στην επιλογή τριών αναλογιών ώστε να αξιολογήσουμε εκτός από την ικανότητα της ΦΔΟ να διαπεράσει το φραγμό του δέρματος, την επίδραση της συγκέντρωσης της αιθανόλης αλλά και της ΦΔΟ στη διαδερμική διαπερατότητα.

#### 21.4.2 Αποτελέσματα Πειραμάτων Προσδιορισμού Κατάλληλου Φορέα Δραστικής Ουσίας Β

Η μεγαλύτερη πρόκληση με την οποία ήρθαμε αντιμέτωποι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών, όπως και στα αντίστοιχα της δραστικής ουσίας Α, ήταν η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα σχηματισμού γέλης, καθώς θα πρέπει να είναι συμβατός όχι μόνο με την αναλογία των συστατικών του φορέα αλλά και με τη συγκέντρωση της ελαιώδους και υγρής δραστικής ουσίας Β. Ωστόσο, τα αντίστοιχα πειράματα για τη δραστική ουσία Α προσέφεραν αρκετές πληροφορίες σχετικά με τους διαφορετικούς παράγοντες σχηματισμού γέλης. Σύμφωνα λοιπόν με το υποκεφάλαιο 16.1, όπου παρουσιάζεται η μέθοδος διενέργειας των πειραμάτων αυτών και αναφέρεται πως η ΦΔΟ προστίθεται σε συγκέντρωση ίση με το 90% της διαλυτότητας κορεσμού στον εκάστοτε φορέα, προκύπτουν τα αποτελέσματα όπου απεικονίζονται στον πίνακα 21.3. Σημειώνεται πως η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση των παραγόντων σχηματισμού γέλης ήταν ενδεικτική και η τελική με βάση τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ροής των γελών, καθορίστηκε κατά το στάδιο παρασκευής των γελών για τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας.

Σύνθεση Φορέα Αναλογία (v/v/v)	Τύπος και Συγκέντρωση Παράγοντα Σχηματισμού Γέλης	Αποτέλεσμα Προσθήκης Δραστικής Ουσίας Β
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 40/20/40	Klucel HF (1,25% w/v)	Θόλωμα
	Natrosol 250 HX (3,00% w/v)	Θόλωμα
	HPMC K4M (2,00% w/v)	Διαυγές
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 45/20/35	Klucel HF (1,25% w/v)	Θόλωμα
	HPMC K4M (2,00% w/v)	Διαυγές
<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 50/20/30	Klucel HF (1,25% w/v)	Διαυγές

Πίνακας 21.3: Αποτελέσματα πειραμάτων προσδιορισμού κατάλληλου φορέα δραστικής ουσίας Β

### 21.4.3 Παρασκευή Γελών Δραστικής Ουσίας Β

Οι συγκεκριμένες γέλες, όπως και οι αντίστοιχες με τη δραστική ουσία Α, παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το υποκεφάλαιο 16.3 και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό κατάλληλου φορέα και διαλυτότητας κορεσμού. Σε κάθε περίπτωση προέκυψαν ομοιογενείς διαυγείς γέλες, η σύσταση των οποίων παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 21.4. Σημειώνεται πως είναι επιθυμητό η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας Β να αντιστοιχεί στο 90% της προσδιοριζόμενης κατά τη μελέτη διαλυτότητας κορεσμού. Ωστόσο, καθώς η ακριβής ζύγιση της ΦΔΟ είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της ελαιώδους και υγρής φύσης της, παρουσιάζονται μικρές αποκλίσεις.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Σύσταση Φορέα Αναλογία (v/v/v)	Τύπος και Συγκέντρωση Παράγοντα Σχηματισμού Γέλης	Συγκέντρωση Δραστικής Ουσίας Β (% w/v)
F10	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 40/20/40	HPMC K4M 2,00% w/v	1,40
F11	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 45/20/35	HPMC K4M 2,00% w/v	3,36
F12	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 50/20/30	Klucel HF 1,25% w/v	7,45

Πίνακας 21.4: Συνθέσεις γελών δραστικής ουσίας Β

### 21.4.4 Αποτελέσματα Ποσοτικού Προσδιορισμού Δραστικής Ουσίας Β στις Γέλες

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού της δραστικής ουσίας Β στις γέλες όπου παρασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας φαίνονται στον πίνακα 21.5, στον οποίο αναφέρεται η επί τοις εκατό της θεωρητικής τιμής περιεκτικότητα σε δραστική ουσία Β.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Σύσταση Φορέα Αναλογία (v/v/v)	% της Θεωρητικής Τιμής Περιεκτικότητας ± SD
F10	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 40/20/40	99,28 ± 1,13
F11	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 45/20/35	99,43 ± 1,04
F12	<i>EtOH/Glyc/H<sub>2</sub>O</i> 50/20/30	99,05 ± 0,41

Πίνακας 21.5: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού δραστικής ουσίας Β στις γέλες

Από τον πίνακα 21.5 είναι εμφανές πως η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας Β κυμαινόταν μεταξύ 97 και 103% της θεωρητικής τιμής. Επομένως, οι γέλες πληρούσαν τις προδιαγραφές της Φαρμακοποιίας που ορίζουν τα αντίστοιχα όρια μεταξύ 85% και 115% της θεωρητικής τιμής, και έτσι κρίθηκαν κατάλληλες για να χρησιμοποιηθούν στα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας.

#### 21.4.5 Αποτελέσματα *In Vitro* Πειραμάτων Διαδερμικής Διαπερατότητας Δραστικής Ουσίας Β

Για τη διερεύνηση της διαδερμικής διαπερατότητας της δραστικής ουσίας Β αξιολογήθηκαν τρεις γέλες σε ένα δότη δέρματος, συγκεκριμένα στον 21/11/17. Επομένως, ο συνολικός αριθμός των πειραμάτων που διενεργήθηκαν ήταν τρία. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε κύτταρα διάχυσης για κάθε πείραμα και το διάλυμα του υποδοχέα που επιλέχθηκε βασίστηκε στα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού της διαλυτότητας κορεσμού καθώς και στη μέγιστη τιμή της ΦΔΟ που εμπεριέχεται στις συνθέσεις. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε μείγμα *PG/H<sub>2</sub>O* σε αναλογία 50/50 καθώς σύμφωνα με τους απαραίτητους υπολογισμούς, διασφαλίζεται η διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής ( $0,22 \text{ mg/mL} > 0,12 \text{ mg/mL}$ ).

Η εξαρτημένη μεταβλητή που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν η ποσότητα της δραστικής ουσίας Β (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας, σε μονάδες  $\mu\text{g/cm}^2$ , στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος καθώς και ανά 24 h. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απεικονίζονται στους πίνακες 21.6 και 21.7.

Επιπλέον, στο διάγραμμα 21.4 παριστάνεται γραφικά η αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Β (Q) που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο. Από το διάγραμμα αυτό, υπολογίστηκε η ροή στη σταθεροποιημένη κατάσταση ( $J_{ss}$ ) σε μονάδες  $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$  και ο χρόνος υστέρησης (L) σε μονάδες h σύμφωνα με το κεφάλαιο 5. Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη ροή (J), στις ίδιες μονάδες, ανά 24 h παρουσιάζονται στον πίνακα 21.8.

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$Q_{0-12}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-36}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{0-48}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD
F10	171,05 $\pm$ 47,32	365,41 $\pm$ 95,65	541,12 $\pm$ 153,37	684,45 $\pm$ 211,45
F11	157,57 $\pm$ 16,94	362,13 $\pm$ 33,74	560,34 $\pm$ 50,48	734,05 $\pm$ 62,34
F12	174,30 $\pm$ 38,43	389,86 $\pm$ 76,99	590,21 $\pm$ 100,72	772,63 $\pm$ 104,76

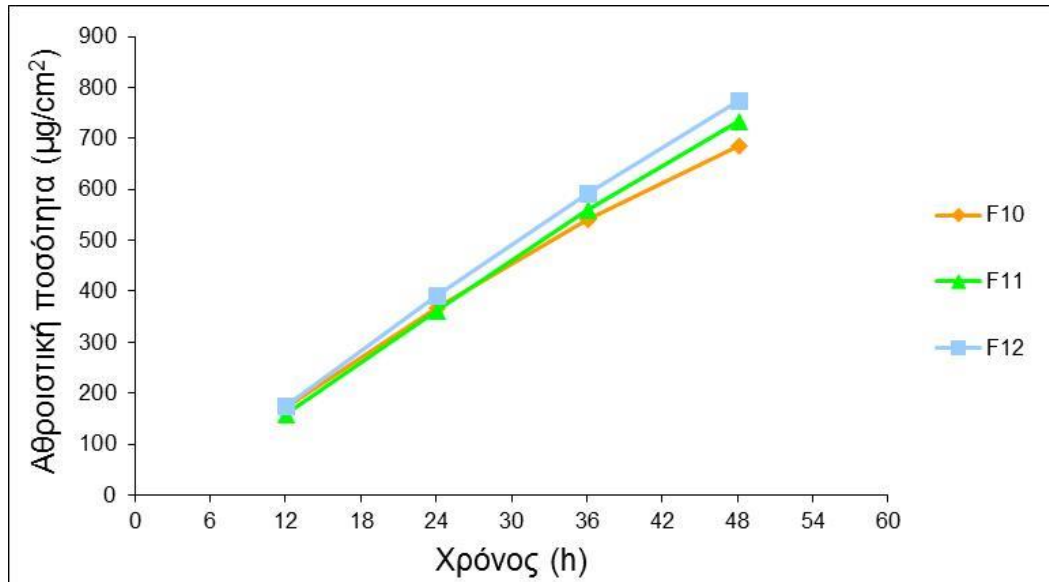
**Πίνακας 21.6:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Β που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$Q_{0-24}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD	$Q_{24-48}$ ( $\mu\text{g/cm}^2$ ) $\pm$ SD
F10	365,41 $\pm$ 95,65	319,04 $\pm$ 117,60
F11	362,13 $\pm$ 33,74	371,91 $\pm$ 40,35
F12	389,86 $\pm$ 76,99	382,77 $\pm$ 47,33

**Πίνακας 21.7:** Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Β που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας, ανά 24 h

Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	$J_{0-24}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{24-48}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) $\pm$ SD	$J_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ )	L (h)
F10	15,23 $\pm$ 3,99	13,29 $\pm$ 4,90	14,30	-0,81
F11	15,09 $\pm$ 1,41	15,50 $\pm$ 1,68	16,06	1,77
F12	16,24 $\pm$ 3,21	15,95 $\pm$ 1,97	16,63	1,03

Πίνακας 21.8: Ροή της δραστικής ουσίας Β, από τις γέλες, ανά 24 h, σε σταθεροποιημένη κατάσταση και χρόνος υστέρησης



Διάγραμμα 21.4: Αθροιστική ποσότητα της δραστικής ουσίας Β που διαπερνούσε την επιδερμίδα, από τις γέλες, ανά μονάδα επιφάνειας σε συνάρτηση με τον χρόνο

#### 21.4.6 Στατιστική Ανάλυση & Αξιολόγηση Αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής Shapiro – Wilk, τα δεδομένα όλων των συνθέσεων σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας ακολουθούν κανονική κατανομή. Από την ανάλυση διακύμανσης που ακολούθησε, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στον πίνακα 21.9, προέκυψε πως δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθέσεων στα διαφορετικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας.

		Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F	p – value
$Q_{0-12}$	Between Groups	786,810	2	393,405	0,295	0,750
	Within Groups	16011,093	12	1334,258		
	Total	16797,903	14			
$Q_{0-24}$	Between Groups	2295,584	2	1147,792	0,212	0,812
	Within Groups	64857,285	10	5404,774		
	Total	67152,870	12			
$Q_{0-36}$	Between Groups	6118,563	2	3059,281	0,253	0,780
	Within Groups	144854,456	10	12071,205		
	Total	150973,019	12			
$Q_{0-48}$	Between Groups	19542,025	2	9771,012	0,492	0,623
	Within Groups	238283,176	10	19856,931		
	Total	257825,200	12			

Πίνακας 21.9: Ανάλυση διακύμανσης αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας Β, από τις γέλες

Με βάση τους παραπάνω πίνακες και διαγράμματα προκύπτει πως η διαδερμική διαπερατότητα της δραστικής ουσίας Β μέσω των συγκεκριμένων γελών είναι αισθητά χαμηλή. Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη πως ο επιθυμητός ρυθμός διαδερμικής διαπερατότητας για επίτευξη θεραπευτικής δράσης είναι  $2930 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  γίνεται άμεσα αντιληπτό πως δεν μπορεί να επιτευχθεί με ΔΘΣ αποδεκτού εμβαδού, μικρότερο δηλαδή από  $100 \text{ cm}^2$ .

Όσον αφορά τα αποτελέσματα, όπως προκύπτει και από την στατιστική ανάλυση, η αυξανόμενη περιεκτικότητα σε αιθανόλη σε συνδυασμό με την αντίστοιχη μεταβολή της συγκέντρωσης της ΦΔΟ στις φαρμακευτικές γέλες δεν φαίνεται να παρουσιάζει ανάλογα αποτελέσματα στη ροή μέσω του δέρματος.



**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ &  
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 22<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα

---

- Η  $A - HCl$  φαίνεται να περνάει το φραγμό του δέρματος όχι όμως με τον απαιτούμενο ρυθμό για επίτευξη θεραπευτικής δράσης.
- Η εξαιρετικά μεγάλη συγκέντρωση σε συνδυασμό με την αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα σε αιθανόλη ή ισοπροπυλική αλκοόλη και την παρουσία λιμονένιου στις φαρμακευτικές γέλες, δεν ήταν αρκετά για να ενισχύσουν τη διαπερατότητα της  $A - HCl$  και να επιτύχουν θεραπευτικά επίπεδα ροής.
- Η εξουδετέρωση των  $A - HCl$  και  $B - HCl$  προς τις αντίστοιχες ασθενείς βάσεις αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση εξαιτίας της ελαιώδους και υγρής φύσεως των τελευταίων.
- Η περιορισμένη διαθέσιμη βιβλιογραφία σε συνδυασμό με την περιορισμένη γνώση σχετικά με τη σταθερότητα των δραστικών ουσιών A και B δημιουργούν σημαντικά προβλήματα κατά την αξιολόγηση της διαδερμικής τους διαπερατότητας.
- Η προπυλενογλυκόλη είναι αρκετά καλύτερος διαλύτης της δραστικής ουσίας A συγκριτικά με την γλυκερόλη. Αντίθετα, η αιθανόλη με την ισοπροπυλική αλκοόλη εμφανίζουν σχεδόν την ίδια ικανότητα διάλυσης.
- Η ελαιώδης και υγρή φύση της δραστικής ουσίας A δημιούργησε αρκετά προβλήματα όσον αφορά της συμβατότητα της με παράγοντες σχηματισμού γέλης.
- Η δραστική ουσία A παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη διαδερμική διαπερατότητα συγκριτικά με το υδροχλωρικό άλας αυτής.
- Για την επίτευξη θεραπευτικών επιπέδων στη συστηματική κυκλοφορία, απαιτείται  $\Delta\Theta S$  τύπου δεξαμενής με εμβαδόν μικρότερο από  $12 \text{ cm}^2$ .
- Η αυξανόμενη περιεκτικότητα της αιθανόλης στις υπό εξέταση φαρμακευτικές γέλες προκάλεσε αντίστοιχα αποτελέσματα στη ροή της δραστικής ουσίας A μέσω του δέρματος.
- Με τις συνθέσεις F5 και F6 που αντιστοιχούν σε φαρμακευτικές γέλες με συγκέντρωση 21,68% w/v και 30,98% w/v, επιτυγχάνονται θεραπευτικά επίπεδα της δραστικής ουσίας A για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 48 h.
- Η ομοιότητα μεταξύ των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  των προϊόντων των διαφορετικών αντιδράσεων εξουδετέρωσης καθώς και των δειγμάτων που διατηρήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες για την αξιολόγηση της σταθερότητας της δραστικής ουσίας A, αποτελεί σημαντική ένδειξη απουσίας κάποιας μορφής διάσπασης ή δημιουργίας παραπροϊόντος οργανικής φύσεως.
- Ο προσδιορισμός του σημείου ζέσεως της δραστικής ουσίας A δεν κατέστη εφικτός και η αξιολόγηση της σταθερότητάς της δεν έδωσε ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως προέκυψε μέσω των πειραμάτων διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.
- Σύμφωνα με τα δεδομένα της θερμοβαρυστρικής ανάλυσης, η οποία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, η δραστική ουσία A είναι εξαιρετικά πτητική και ξεκινάει να εξατμίζεται από τη θερμοκρασία των  $35^\circ\text{C}$ , ενώ στους  $130^\circ\text{C}$  έχει εξατμιστεί πλήρως.

- Η παρασκευή Drug-in-Adhesive ΔΘΣ της δραστικής ουσίας A με την κλασική μέθοδο των μειγμάτων επίστρωσης (Regular Patches) δεν ήταν εφικτή λόγω της εξαιρετικής πτητικότητάς της, ιδιαίτερα κατά την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Η ανάπτυξη Sandwich Patches, ώστε να αποφευχθεί η έκθεση της δραστικής ουσίας A στις υψηλές θερμοκρασίες εξάτμισης των πιεσοευαίσθητων συγκολλητικών αποτελεί λειτουργική λύση για την ανάπτυξη lab scale Drug-in-Adhesive ΔΘΣ.
- Η δημιουργία αιθανολικών διαλυμάτων της δραστικής ουσίας A αποτελεί μια πρακτική λύση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων ζύγισής της, ωστόσο πιθανότατα η αιθανόλη να ενισχύει την πτητικότητα της ΦΔΟ.
- Η μεγάλη απόκλιση των πειραματικών τιμών από τις θεωρητικές κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των sandwich patches πιθανότατα οφείλεται είτε σε ασυμβασία μεταξύ της δραστικής ουσίας A και του συγκολλητικού είτε στη διαπερατότητα της μεμβράνης υποστήριξης στα συστατικά της σύνθεσης των ΔΘΣ.
- Οι γέλες της δραστικής ουσίας B, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού τους, πληρούν τις προδιαγραφές της φαρμακοποιίας.
- Η διαδερμική διαπερατότητα της δραστικής ουσίας B από τις συγκεκριμένες γέλες είναι αισθητά χαμηλή, λαμβάνοντας υπόψη τον επιθυμητό ρυθμό για επίτευξη θεραπευτικής δράσης.
- Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γελών της δραστικής ουσίας B στα διαφορετικά χρονικά σημεία δειγματοληψίας.
- Συνοψίζοντας, τα επίπεδα των δραστικών ουσιών A και B στο πλάσμα, ύστερα από διαδερμική χορήγηση των ασθενών βάσεων, είναι αρκετά υψηλότερα συγκριτικά με τη χορήγηση των αντίστοιχων αλάτων.
- Τέλος, η χορήγηση της δραστικής ουσίας A κατέστη εφικτή από ΔΘΣ τύπου δεξαμενής ενώ η δραστική ουσία B απαιτεί περαιτέρω μελέτη για αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητας της.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 23<sup>ο</sup>: Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

---

- Αρχικά, κρίνεται επιβεβλημένη μια μελέτη με σκοπό την ανάπτυξη αντίδρασης εξουδετέρωσης για την παραλαβή των δραστικών ουσιών A και B από τα αντίστοιχα υδροχλωρικά άλατα με σταθερότητα και επαναληψιμότητα ως προς την καθαρότητα και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους.
- Επιπλέον, προτείνεται να δοκιμαστούν *in vivo* σε πειραματόζωα ορισμένες από τις συνθέσεις της δραστικής ουσίας A με τις οποίες επετεύχθησαν θεραπευτικά επίπεδα της ΦΔΟ στο αίμα ώστε να προκύψουν *in vitro* – *in vivo* συσχετίσεις καθώς και να γίνει εκτίμηση της ερεθιστικότητάς τους.
- Ενδιαφέρουσα πρόταση αποτελεί η ανάπτυξη ΔΘΣ με διαφορετικά πιεσοευαίσθητα συγκολλητικά (ακρυλικά) καθώς και μεμβράνη υποστήριξης (πολυεστέρα). Σε δεύτερη φάση μπορούν να δοκιμαστούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας A και/ή προσθήκη χημικών επιταχυντών διαβατότητας, με σκοπό να επιτευχθεί η επιθυμητή ροή για θεραπευτική δράση.
- Καθοριστική σημασία επίσης για την κυκλοφορία ενός ΔΘΣ αποτελούν η σταθερότητα του καθώς και οι συγκολλητικές του ιδιότητες. Για το λόγο αυτό προτείνεται να αξιολογηθούν οι ιδιότητες αυτές μέσω των ελέγχων πρόσφυσης (*tack test*), αποκόλλησης (*peel adhesion tests*) και συνεκτικής ισχύος (*shear strength tests*) όπως επίσης να πραγματοποιηθούν μελέτες σταθερότητας με βάση καθορισμένο πρωτόκολλο.
- Όσον αφορά τη δραστική ουσία B, προτείνεται να αξιολογηθούν σε πρώτη φάση ορισμένοι χημικοί επιταχυντές διαβατότητας ως προς τη δυνατότητα βελτίωσης των επιπέδων ροής μέσω του δέρματος. Σε δεύτερη φάση θα μπορούσαν να αξιολογηθούν και ηλεκτρικά υποβοηθούμενες τεχνικές για την ενίσχυση της διαδερμικής της απορρόφησης, όπως η ιοντοφόρηση και η υπερήχηση.

---

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 3M Drug Delivery Systems, 2004. *3M™ CoTran™ 9720 Backing*, USA: 3M Drug Delivery Systems.
- 3M Drug Delivery Systems, 2004. *3M™ Scotchpak™ 1022 Release Liner*, USA: 3M Drug Delivery Systems.
- 3M Science. Applied to Life.™, 2018. *Transdermal Components – Delivering more than just medicine*, USA: 3M.
- Abd, E. et al., 2016. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, pp. 163-176.
- Ahlstrom, L. A., Cross, S. E. & Mills, P. C., 2007. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, pp. 456-463.
- Alexander, A. et al., 2012. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, pp. 26-40.
- Allenby, A. C. et al., 1969. Mechanism of action of accelerants on skin penetration. *British Journal of Dermatology*, pp. 47-55.
- Arora, A., Prausnitz, M. R. & Mitragotri, S., 2008. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 227-236.
- ASTM International, 2009. *Standard Test Method for Pressure-Sensitive Tack of Adhesives Using an Inverted Probe Machine*, s.l.: ASTM International.
- Auda, S. H. et al., 2015. Niosomes as transdermal drug delivery system for celecoxib: in vitro and in vivo studies. *Polymer Bulletin*.
- Au, W. L., Skinner, M. & Kanfer, I., 2010. Comparison of Tape Stripping with the Human Skin Blanching Assay for the Bioequivalence Assessment of Topical Clobetasol Propionate Formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, pp. 11-20.
- Bachhav, Y. G. et al., 2010. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin. *Journal of Controlled Release*, pp. 31-36.
- Badkar, A. V., Smith, A. M., Eppstein, J. A. & Banga, A. K., 2007. Transdermal Delivery of Interferon Alpha-2B using Microporation and Iontophoresis in Hairless Rats. *Pharmaceutical Research*, pp. 1389-1395.
- Bandyopadhyay, A., 2017. Transdermal Drug Delivery System - Quality by Design Approach. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, pp. 217-219.
- Banga, A. K., 2009. Microporation applications for enhancing drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, pp. 343-354.
- Baroli, B., 2010. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality?. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 21-50.
- Barry, B. W., 1991. Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, pp. 237-248.
- Barry, B. W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 101-114.
- Barry, B. W., 2002. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. S31-S40.
- Barry, B. W., 2004. Breaching the skin's barrier to drugs. *Nature Biotechnology*, pp. 165-167.
- Barry, B. W., 2006. Penetration Enhancer Classification. In: E. W. Smith & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers*. 2η ed. s.l.:Taylor & Francis Group, LLC, pp. 3-15.
- Bashir, S. J. et al., 2001. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Research and Technology*, pp. 40-48.

- Beckett, A., Gorrod, J. & Taylor, D., 1972. Comparison of oral and percutaneous routes in man for the systemic administration of 'ephedrine'. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 65-70.
- Benedek, I., ed., 2004. Chemical Composition of PSAs. In: *Pressure-Sensitive Adhesives and Applications*. 2η ed. s.l.:Marcel Dekker, pp. 161-233.
- Benedek, I., 2018. Pressure-Sensitive Adhesives. In: A. Pizzi & K. L. Mittal, eds. *Handbook of Adhesive Technology*. 3η ed. s.l.:Taylor & Francis Group, pp. 471-508.
- Benerjee, S. et al., 2014. Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, pp. 70-84.
- Benfeldt, E. et al., 2007. Bioequivalence of Topical Formulations in Humans: Evaluation by Dermal Microdialysis Sampling and the Dermatopharmacokinetic Method. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 170-178.
- Benson, H. A. E., McIldowie, M. & Prow, T., 2017. Magnetophoresis: Skin Penetration Enhancement by a Magnetic Field. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 195-206.
- Benson, H. A. E., 2005. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, pp. 23-33.
- Bhatnagar, S. & Vyas, S. P., 1994. Organogel-based system for transdermal delivery of propranolol. *Journal of Microencapsulation*, pp. 431-438.
- Bhowmick, M., Sengodan, T. & Thangavel, S., 2014. Evaluation and characterization of transdermal therapeutic systems: An exhaustive pictorial and figurative review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, pp. 9-22.
- Bolzinger, M.-A., Briançon, S., Pelletier, J. & Chevalier, Y., 2012. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, pp. 156-165.
- Brain, K. R., Walters, k. A. & Watkinson, A. C., 2002. Methods for Studying Percutaneous Absorption. In: K. A. Walters, ed. *Dermatological and Transdermal Formulations*. s.l.:Marcel Dekker, pp. 197-270.
- Bronaugh, R. L. & Stewart, R. F., 1985. Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 64-67.
- Cevc, G., 2004. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 675-711.
- Chandrashekar, N. S. & Shobha Rani, R. H., 2008. Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters in Drug Selection and Loading for Transdermal Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 94-96.
- Chien, Y. W., 1984. Microsealed drug delivery system: theoretical aspects and biomedical assessments. In: J. M. Anderson & S. W. Kim, eds. *Recent Advances in Drug Delivery Systems*. s.l.:Plenum Press, pp. 367-387.
- Chuang, S.-Y., Lin, C.-H., Huang, T.-H. & Fang, J.-Y., 2018. Lipid-Based Nanoparticles as a Potential Delivery Approach in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Nanomaterials*, pp. 1-16.
- Coldman, M. F., Lockerbie, L. & Laws, E. A., 1971. The evaluation of several topical preparations in the blanching test. *British Journal of Dermatology*, pp. 381-387.
- Cole, H. N., Schreiber, N. & Sollmann, T., 1930. Mercurial ointments in the treatment of syphilis: their absorption as measured by studies on excretion. *Archives of Dermatology and Syphilology*, pp. 372-393.
- Coulman, S. A. et al., 2006. Minimally invasive cutaneous delivery of macromolecules and plasmid DNA via microneedles. *Current Drug Delivery*, pp. 65-75.

- Cross, S. E. & Roberts, M. S., 2004. Physical Enhancement of Transdermal Drug Application: Is Delivery Technology Keeping up with Pharmaceutical Development?. *Current Drug Delivery*, pp. 81-92.
- Demetzos, C., ed., 2016. Fundamentals of Physical Pharmacy: The Biophysics of Nanosystems. In: *Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications*. s.l.:Springer STM, pp. 17-61.
- Donnelly, R. F. et al., 2014. Hydrogel-Forming and Dissolving Microneedles for Enhanced Delivery of Photosensitizers and Precursors. *Photochemistry and Photobiology*, pp. 641-647.
- Dow Corning, 2015. *Silicone Adhesives for Transdermal Drug Delivery Systems*, s.l.: Dow Corning Corporation.
- Dow Corning, 2016. *BIO-PSA Amine-Compatible Silicone Adhesives*, s.l.: Dow Corning Corporation.
- Dragicevic, N., Atkinson, J. P. & Maibach, H. I., 2015. Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 11-28.
- ECETOC, 1993. *Percutaneous Absorption*, s.l.: ECETOC Scientific Committee.
- EMA - CHMP, 2014. *Guideline on quality of transdermal patches*, s.l.: European Medicines Agency.
- Farahmand, S. & Maibach, H. I., 2009. Transdermal drug pharmacokinetics in man: Interindividual variability and partial prediction. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 1-15.
- Faulkner, J. M., 1933. Nicotine poisoning by absorption through the skin. *Journal of the American Medical Association*, pp. 1664-1165.
- FDA - CDER, 1999. *Skin Irritation and Sensitization Testing of Generic Transdermal Drug Products*, s.l.: U.S. Department of Health and Human Services.
- Feldman, R. J. & Maibach, H. I., 1967. Regional variation in percutaneous penetration of <sup>14</sup>C cortisol in man. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 181-183.
- Finnin, B., Walters, K. A. & Franz, T. J., 2012. In Vitro Skin Permeation Methodology. In: H. A. E. Benson & A. C. Watkinson, eds. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. s.l.:John Wiley & Sons, pp. 85-108.
- Flynn, G. L., 2002. Cutaneous and Transdermal Delivery - Processes and Systems of Delivery. In: G. S. Banker & C. T. Rhodes, eds. *Modern Pharmaceutics*. 4η ed. s.l.:Marcel Dekker, pp. 193-241.
- Gemmell, D. H. O. & Morrison, J. C., 1957. The release of medicinal substances from topical applications and their passage through the skin. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, pp. 641-656.
- Ghasemi, A. & Zahediasl, S., 2012. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, pp. 486-489.
- Ginn, M. E., Noyes, C. M. & Jungermann, E., 1968. The Contact Angle of Water on Viable Human Skin. *Journal of Colloid and Interface Science*, pp. 146-151.
- Godin, B. & Touitou, E., 2007. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 1152-1161.
- Gonzales, R., Johns, M. R., Greenfield, P. F. & Pace, G. W., 1990. Phase Equilibria for Xanthan Gum in Ethanol-Water Solutions. *Carbohydrate Polymers*, pp. 317-333.
- González, M. A. & Cleary, G. W., 2010. Transdermal Dosage Forms. In: L. Shargel & I. Kanfer, eds. *Generic Drug Product Development Specialty Dosage Forms*. s.l.:Informa Healthcare USA, pp. 218-236.

- Gratieri, T. & Kalia, Y. N., 2013. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 315-329.
- Gratieri, T. & Kalia, Y. N., 2017. Iontophoresis: Basic Principles. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 61-66.
- Gutschke, E., Bracht, S., Nagel, S. & Weitschies, W., 2010. Adhesion testing of transdermal matrix patches with a probe tack test – In vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 399-404.
- Guyot, M. & Fawaz, F., 2000. Design and in vitro evaluation of adhesive matrix for transdermal delivery of propranolol. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 171-182.
- Hadgraft, J., 2004. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 291-299.
- Hadgraft, J. & Lane, M. E., 2011. Skin: the ultimate interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, pp. 5215-5222.
- Hadgraft, J. & Valenta, C., 2000. pH, pKa and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 243-247.
- Hadgraft, J. W., Somers, G. F. & Williams, H. S., 1956. Percutaneous absorption using diiodofluorescein 131I. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, pp. 1027-1033.
- Harmonized International Standard, 2007. *Peel Adhesion of Pressure Sensitive Tape*, s.l.: Pressure Sensitive Adhesive Council.
- Heal, G. R., 2002. Thermogravimetry and Derivative Thermogravimetry. In: P. Haines, ed. *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*. s.l.:The Royal Society of Chemistry, pp. 10-54.
- Hiremath, P. S., Soppimath, K. S. & Betageri, G. V., 2009. Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: Formulation and in vitro evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 96-104.
- Holmgaard, R. & Nielsen, J. B., 2009. *Dermal absorption of pesticides - evaluation of variability and prevention*. s.l.:s.n.
- Hori, M., Satoh, S. & Maibach, H. I., 1990. Classification of penetration enhancers: a conceptual diagram. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 71-72.
- Instron, 2018. *Instron*. [Online]  
Available at: <http://www.instron.us/en-us>  
[Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- Jakasa, I. et al., 2007. Altered Penetration of Polyethylene Glycols into Uninvolved Skin of Atopic Dermatitis Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 129-134.
- Jalwal, P. et al., 2010. A Review on Transdermal Patches. *The Pharma Research*, pp. 139-149.
- Jijie, R., Barras, A., Boukherroub, R. & Szunerits, S., 2017. Nanomaterials for transdermal drug delivery: beyond the state of the art of liposomal structures. *The Royal Society of Chemistry*, pp. 8653-8675.
- Joukhadar, C. & Müller, M., 2005. Microdialysis - Current Applications in Clinical Pharmacokinetic Studies and its Potential Role in the Future. *Clinical Pharmacokinetics*, pp. 895-913.
- Kandavilli, S., Nair, V. & Panchagnula, R., 2002. *Polymers in transdermal drug delivery systems*, s.l.: Pharmaceutical Technology.
- Keith, A. D., 1983. Polymer matrix considerations for transdermal devices. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 605-625.
- Kenney, J. F., Haddock, T. H., Sun, R. L. & Parreira, H. C., 1992. Medical-Grade Acrylic Adhesives for Skin Contact. *Journal of Applied Polymer Science*, pp. 355-361.



- Kezic, S., 2008. Methods for measuring in-vivo percutaneous absorption in humans. *Human & Experimental Toxicology*, pp. 289-295.
- Kim, J. et al., 2012. Enhanced Topical Delivery of Small Hydrophilic or Lipophilic Active Agents and Epidermal Growth Factor by Fractional Radiofrequency Microporation. *Pharmaceutical Research*, pp. 2017-2029.
- Kligman, A. M. & Christophers, E., 1963. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Archives of Dermatology*, pp. 702-705.
- Kowalski, A., Czech, Z. & Byczyński, Ł., 2013. How does the surface free energy influence the tack of acrylic pressure-sensitive adhesives (PSAs)?. *Journal of Coatings Technology and Research*, pp. 879-885.
- Kramer, S. N., 1963. *The Sumerians: Their History, Culture, and Character*. s.l.:The University of Chicago.
- Krishnan, G. et al., 2012. Enhanced sonophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid: preliminary human ex vivo permeation data. *Skin Research and Technology*, pp. 1-7.
- Kulichikhin, V. G., Antonov, S. V. & Zadymova, N. M., 2009. Skin Contact Pressure-Sensitive Adhesives. In: I. Benedek & M. M. Feldstein, eds. *Applications of Pressure-Sensitive Products*. s.l.:Taylor & Francis Group, pp. (5) 1-32.
- Lambert, W. J., Kudla, R. J., Holland, J. M. & Curry, J. T., 1993. A biodegradable transdermal penetration enhancer based on N-(2-hydroxyethyl)-2-pyrrolidone I. Synthesis and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 181-192.
- Lane, M. E., Santos, P., Watkinson, A. C. & Hadgraft, J., 2012. Passive Skin Permeation Enhancement. In: H. A. E. Benson & A. C. Watkinson, eds. *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice*. s.l.:John Wiley & Sons, pp. 23-42.
- Lau, W. M. & Ng, K. W., 2017. Finite and Infinite Dosing. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 35-44.
- Laws, G. C., 1898. The effects of nitroglycerin upon those who manufacture it. *Journal of the American Medical Association*, pp. 793-794.
- Lboutounne, H. et al., 2002. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *Journal of Controlled Release*, pp. 319-334.
- Leichtnam, M.-L., Rolland, H., Wüthrich, P. & Guy, R. H., 2006. Enhancement of Transdermal Testosterone Delivery By Supersaturation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 2373-2379.
- Levin, G., 2017. Skin Ablation Methods for Transdermal Drug Delivery. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 233-242.
- Liu, K.-H. & Kim, J.-H., 2003. In vitro dermal penetration study of carbofuran, carbosulfan, and furathiocarb. *Archives of Toxicology*, pp. 255-260.
- Lobo, S., Sachdeva, S. & Goswami, T., 2016. Role of pressure-sensitive adhesives in transdermal drug delivery systems. *Therapeutic Delivery*, pp. 33-48.
- Lodzki, M. et al., 2003. Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release*, pp. 377-387.
- Lotte, C., Wester, R. C., Rougier, A. & Maibach, H. I., 1993. Racial differences in the in vivo percutaneous absorption of some organic compounds: a comparison between black, Caucasian and Asian subjects. *Archives of Dermatological Research*, pp. 456-459.
- Martin, C. J. et al., 2012. Low temperature fabrication of biodegradable sugar glass microneedles for transdermal drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, pp. 93-101.

- Maurya, A., Lili, C. & Murthy, N. S., 2015. Magnetophoresis and Electret-Mediated Transdermal Delivery of Drugs. In: R. F. Donnelly & T. R. R. Singh, eds. *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd, pp. 147-162.
- McCoy, J. R. et al., 2014. A multi-head intradermal electroporation device allows for tailored and increased dose DNA vaccine delivery to the skin. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, pp. 3039-3047.
- Medi, B. M., Layek, B. & Singh, J., 2017. Electroporation for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 105-122.
- Megrab, N. A., Williams, A. C. & Barry, B. W., 1995. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems. *International Journal of Pharmaceutic*, pp. 101-112.
- Merck Millipore, 2012. *Test without Limits! Overcome the barriers to predicting diffusion in human skin*, s.l.: Merck KGaA.
- Michaels, A. S., Chandrasekaran, S. K. & Shaw, J. E., 1975. Drug Permeation Through Human Skin: Theory and in Vitro Experimental Measurement. *Journal of the American Institute of Chemical Engineers*, pp. 985-996.
- Miller, K. J., 2012. Transdermal Product Formulation Development. In: H. A. E. Benson & A. C. Watkinson, eds. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. s.l.:John Wiley & Sons, pp. 287-308.
- Minghetti, P., Cilurzo, F. & Casiraghi, A., 2004. Measuring Adhesive Performance in Transdermal Delivery Systems. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, pp. 193-206.
- Minghetti, P. et al., 1999. Dermal Patches for the Controlled Release of Miconazole: Influence of the Drug Concentration on the Technological Characteristics. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 679-684.
- Minghetti, P., Cilurzo, F. & Montanari, L., 1999. Evaluation of Adhesive Properties of Patches Based on Acrylic Matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 1-6.
- Mishra, V. et al., 2006. Development of novel fusogenic vesosomes for transcutaneous immunization. *Vaccine*, pp. 5559-5570.
- Mitragotri, S., 2005. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nature Reviews*, pp. 255-260.
- Mitragotri, S. et al., 2011. Mathematical models of skin permeability: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 115-129.
- Mohammadi-Samani, S., Yousefi, G., Mohammadi, F. & Ahmadi, F., 2013. Meloxicam transdermal delivery: effect of eutectic point on the rate and extent of skin permeation. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, pp. 112-118.
- Moss, G. P. et al., 2006. Design, synthesis and characterization of captopril prodrugs for enhanced percutaneous absorption. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 167-177.
- Moss, G. P., Gullick, D. R. & Wilkinson, S. C. eds., 2015. Methods for the Measurement of Percutaneous Absorption. In: *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 25-42.
- Moss, G. P., Gullick, D. R. & Wilkinson, S. C. eds., 2015. Skin Structure and Physiology. In: *Predictive Methods in Percutaneous Absorption*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 1-24.
- Moss, G. P., Gullick, D. R., Woolfson, A. D. & McCafferty, D. F., 2006. Mechanical Characterization and Drug Permeation Properties of Tetracaine-loaded Bioadhesive Films for Percutaneous Local Anesthesia. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 163-174.
- Moss, G. P. J., 2015. Introduction. In: R. F. Donnelly & T. R. R. Singh, eds. *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1-40.

- Müller, M., 2002. Science, medicine, and the future - Microdialysis. *British Medical Journal*, pp. 588-591.
- Müller, R. H., Radtke, M. & Wissing, S. A., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. S131-S155.
- Murthy, N., Sammeta, S. M. & Bowers, C., 2010. Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design. *Journal of Controlled Release*, pp. 197-203.
- Murthy, N. S. & Shivakumar, H. N., 2010. Topical and Transdermal Drug Delivery. In: V. S. Kulkarni, ed. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 1-36.
- Neumann, D., 2008. Modeling Transdermal Absorption. In: C. Ehrhardt & K. Kim, eds. *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*. s.l.:American Association of Pharmaceutical Scientists, pp. 459-485.
- Nitto Denko Corporation , 2016. *Nitto Denko Technical Corporation*. [Online] Available at: <http://www.ndtcorp.com/passport-technology.php> [Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- OECD, 2004. *Guidance Document for the Conduct of SKin Absorption Studies*, s.l.: OECD Environment Directorate, Environment, Health and Safety Division.
- Ogura, M., Paliwal, S. & Mitragotri, S., 2008. Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 1218-1223.
- Otberg, N. et al., 2004. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 14-19.
- Padula, C., Nicoli, S., Colombo, P. & Santi, P., 2007. Single-layer transdermal film containing lidocaine: Modulation of drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 422-428.
- Pantec Biosolutions AG, 2018. *Pantec Biosolutions*. [Online] Available at: <https://www.pantec-biosolutions.com/en/products> [Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- Pastore, M. N., Kalia, Y. N., Horstmann, M. & Roberts, M. S., 2015. Transdermal patches: history, development and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, pp. 2179-2209.
- Patel, D. C. & Ebert, C. D., 1989. *Method for reducing skin irritation associated with drug/penetration enhancer compositions*. US, Patent No. 4855294.
- Patel, M. N., Bharadia, P. D. & Patel, M. M., 2010. Skin Penetration Enhancement Techniques – Physical Approaches. *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, pp. 62-72.
- PermeGear, 2018. *Diffusion Testing Fundamentals*. [Online] Available at: <http://permegear.com/wp-content/uploads/2015/08/primer.pdf> [Accessed 23 Μάιος 2018].
- PermeGear, 2018. *PermeGear*. [Online] Available at: <http://permegear.com/side-bi-side-cells/> [Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- Pilgram, G. S. K. et al., 2001. Aberrant Lipid Organization in Stratum Corneum of Patients with Atopic Dermatitis and Lamellar Ichthyosis. *The Journal of Investigative Dermatology*, pp. 710-717.
- Poznansky, M. J. & Juliano, R. L., 1984. Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review. *Pharmacological Reviews*, pp. 277-336.
- Pretzer, P. W. & Sweet, R. P., 1999. *Silicone Pressure Sensitive Adhesive Composition Containing Functionalized Polyisobutylene*. US, Patent No. 5939477.
- Ramteke, K. H., Dhole, S. N. & Patil, S. V., 2012. Transdermal drug delivery system: A review. *Journal of Advanced Scientific Research*, pp. 22-35.

- Ranade, V. V. & Cannon, J. B. eds., 2011. Transdermal Drug Delivery. In: *Drug Delivery Systems*. 3η ed. s.l.:Taylor and Francis Group, LLC, pp. 243-304.
- Rao, R. P. & Diwan, P. V., 1998. Formulation and In Vitro Evaluation of Polymeric Films of Diltiazem Hydrochloride and Indomethacin for transdermal Administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 327-336.
- Reddy, M. B., Stinchcomb, A. L., Guy, R. H. & Bunge, A. L., 2002. Determining Dermal Absorption Parameters in Vivo from Tape Strip Data. *Pharmaceutical Research*, pp. 292-298.
- Repka, M. A. & McGinity, J. W., 2001. Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. *Journal of Controlled Release*, pp. 341-351.
- Riegelman, S., 1974. Pharmacokinetics: Pharmacokinetic factors affecting epidermal penetration and percutaneous adsorption. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, pp. 873-883.
- Roberts, M. S., 2013. Solute-Vehicle-Skin Interactions in Percutaneous Absorption: the Principles and the People. *Skin Pharmacology and Physiology*, pp. 356-370.
- Roberts, M. S. & Walters, K. A., 2008. *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. 2nd ed. s.l.:Informa Healthcare.
- Rogers, J. et al., 1996. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Archives of Dermatological Research*, pp. 765-770.
- Roskos, K. V., Maibach, H. I. & Guy, R. H., 1989. The effect of ageing on percutaneous absorption in man. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, pp. 617-630.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C. & Maibach, H. I., 2005. Stripping method for measuring percutaneous absorption in vivo. In: R. L. Bronaugh & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Absorption Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. 4η ed. s.l.:Taylor & Francis Group, pp. 383-398.
- Sandberg, W. S. & Miller, K. W., 2003. The Meyer-Overton Relationship and Its Exceptions. In: J. F. Antognini, E. E. Carstens & D. E. Raines, eds. *Neural Mechanisms of Anesthesia*. s.l.:Humana Press, pp. 371-394.
- Schaefer, U. F. et al., 2008. Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. In: C. Ehrhardt & K. Kim, eds. *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*. s.l.:American Association of Pharmaceutical Scientists, pp. 3-33.
- Schwenkenbecker, A., 1904. Das absorptions verniogen der haut. *Archives of Anatomy and Physiology*, pp. 121-165.
- SES GmbH - Analytical Systems, 2018. *SES GmbH*. [Online]  
Available at: [http://www.ses-analysesysteme.de/PG\\_SES-Franz\\_Cell\\_Flow\\_Type\\_uk.htm](http://www.ses-analysesysteme.de/PG_SES-Franz_Cell_Flow_Type_uk.htm)  
[Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- SES GmbH - Analytical Systems, 2018. *SES GmbH*. [Online]  
Available at: [http://www.ses-analysesysteme.de/PG\\_SES-Franz\\_Cell\\_inline\\_uk.htm](http://www.ses-analysesysteme.de/PG_SES-Franz_Cell_inline_uk.htm)  
[Accessed 17 Ιούνιος 2018].
- Shaw, J. E., Chandrasekaran, S. K. & Campbell, P., 1976. Percutaneous absorption: controlled drug delivery for topical or systemic therapy. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 677-678.
- Sinko, P. J. ed., 2011. Diffusion. In: *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6η ed. s.l.:Lippincott Williams & Wilkins, pp. 223-257.
- Sintov, A. C. et al., 2003. Radiofrequency-driven skin microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, pp. 311-320.
- Sirius Analytical, 2018. *Sirius Analytical*. [Online]  
Available at: <http://www.sirius-analytical.com/science/log-p/log-p-definitions>  
[Accessed 5 Μάιος 2018].

- Sloan, K. B. & Wasdo, S., 2003. Designing for Topical Delivery: Prodrugs Can Make the Difference. *Medicinal Research Reviews*, pp. 763-793.
- Smith, A. et al., 1999. Fluorescein Kinetics in Interstitial Fluid Harvested from Diabetic Skin during Fluorescein Angiography: Implications for Glucose Monitoring. *Diabetes Technology & Therapeutics*, pp. 21-27.
- Stott, P. W., Williams, A. C. & Barry, B. W., 2001. Mechanistic study into the enhanced transdermal permeation of a model  $\beta$ -blocker, propranolol, by fatty acids: a melting point depression effect. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 161-176.
- Subedi, R. K., Oh, S. Y., Chun, M.-K. & Choi, H.-K., 2010. Recent Advances in Transdermal Drug Delivery. *Archives of Pharmacal Research*, pp. 339-351.
- Sweet, R. P., Durfee, L., Ulman, K. L. & Noel, R. A., 1994. *Silicone Pressure Sensitive Adhesive Containing Alkylmethylsiloxane Wax and Related Methods*. US, Patent No. 5352722.
- Takayama, K. & Nagai, T., 1994. Limonene and related compounds as potential skin penetration promoters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 677-684.
- Tan, H. S. & Pfister, W. R., 1999. Pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery systems. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, pp. 60-69.
- The Lancet, 1902. Poisoning by cutaneous absorption of aniline. *The Lancet*, pp. 463-464.
- Touitou, E., Godin, B. & Weiss, C., 2000. Enhanced Delivery of Drugs Into and Across the Skin by Ethosomal Carriers. *Drug Development Research*, pp. 406-415.
- Treffel, P. et al., 1992. Effect of occlusion on in vitro percutaneous absorption of two compounds with different physicochemical properties. *Skin Pharmacology*, pp. 108-113.
- Trommer, H. & Neubert, R. H. H., 2006. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration, A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, pp. 106-121.
- Uchechi, O., Ogbonna, J. D. N. & Attama, A. A., 2014. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: A. D. Sezer, ed. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. s.l.:IntechOpen, pp. 193-235.
- Uchida, T. et al., 2015. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 113-118.
- Valenta, C., Siman, U., Kratzel, M. & Hadgraft, J., 2000. The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 77-85.
- Van Buskirk, G. A. et al., 1997. Scale-up Adhesive Transdermal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutical Research*, pp. 848-852.
- van de Sandt, J. J. M. et al., 2004. In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, pp. 271-281.
- Venkatraman, S. & Gale, R., 1998. Skin adhesives and skin adhesion 1. Transdermal drug delivery systems. *Biomaterials*, pp. 1119-1136.
- Vertzoni, M., Archontaki, H. & Reppas, C., 2008. Determination of intralumenal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *Journal of Lipid Research*, pp. 2690-2695.
- Waller, J. M. & Maibach, H. I., 2006. Age of skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Research and Technology*, pp. 145-154.
- Walters, K. A. & Roberts, M. S., 1993. Veterinary applications of skin penetration enhancers. In: K. A. Walters & J. Hadgraft, eds. *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*. s.l.:Marcel Dekker, pp. 345-364.
- Watkinson, A. C., 2012. Transdermal and Topical Drug Delivery Today. In: H. A. E. Benson & A. C. Watkinson, eds. *Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice*. s.l.:John Wiley & Sons, pp. 357-366.

- Wester, R. C. et al., 1998. Human Cadaver Skin Viability for In Vitro percutaneous Absorption: Storage and Detrimental Effects of heat-Separation and Freezing. *Pharmaceutical Research*, pp. 82-84.
- White, P. R., 1909. Poisoning from aniline black on shoes. *The Lancet*, p. 349.
- Willenbacher, N. & Lebedeva, O. V., 2009. Polyisobutene-Based Pressure-Sensitive Adhesives. In: I. Benedek & M. M. Feldstein, eds. *Technology of Pressure-Sensitive Adhesives and products*. s.l.:Taylor & Francis Group, pp. (4) 1-18.
- Williams, A. C., 2013. Topical and Transdermal Drug Delivery. In: M. E. Aulton & K. M. G. Taylor, eds. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 4<sup>η</sup> ed. s.l.:Elsevier Ltd, pp. 675-697.
- Williams, A. C. & Barry, B. W., 1991. Terpenes and the Lipid-Protein-Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Pharmaceutical Research*, pp. 17-24.
- Williams, A. C. & Barry, B. W., 2004. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 603-618.
- Wilson, J. S. & Holland, L. M., 1982. The effect of application frequency on epidermal carcinogenesis assays. *Toxicology*, pp. 45-54.
- Wokovich, A. M. et al., 2006. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 1-8.
- Wolff, H.-M., 2000. Optimal process design for the manufacture of transdermal drug delivery systems. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, pp. 173-181.
- Woodard, J. T. & Metevia, V. L., 1987. *Transdermal Drug Delivery Devices with Amine-Resistant Silicone Adhesives*. US, Patent No. 4655767.
- Wurster, D. E. & Kramer, S. F., 1961. Investigation of Some Factors Influencing Percutaneous Absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 288-293.
- Yarmush, M. L. et al., 2014. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications and Challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering*, pp. 295-320.
- Yellepeddi, V. K., 2015. Nanotechnology-Based Applications for Transdermal Delivery of Therapeutics. In: R. F. Donnelly & T. R. R. Singh, eds. *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. s.l.:John Wiley & Sons, Ltd, pp. 125-146.
- Zaffaroni, A., 1971. *Bandage for Administering Drug*. US, Patent No. 3598122.
- Zhai, H. B. & Maibach, H. I., 2001. Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, pp. 1-10.
- Zhou, Y., Kumar, V., Herwadkar, A. & Banga, A. K., 2017. Transdermal Delivery of Peptides and Proteins by Physical Methods. In: N. Dragicevic & H. I. Maibach, eds. *Percutaneous Penetration Enhancers Physical Methods in Penetration Enhancement*. s.l.:Springer-Verlag GmbH, pp. 423-437.
- Zondek, B., 1942. The excretion of halogenated phenols and their use in the treatment of urogenital infections. *Journal of Urology*, pp. 747-758.
- Δήμας, Δ., Δάλλας, Π. Π., Ρέκκας, Δ. Μ. & Χούλης, Ν., 2002. Διαδερμικά θεραπευτικά συστήματα: Παράγοντες που επηρεάζουν την διαδερμική θεραπευτική απορρόφηση. In: *Τιμητικός Τόμος Καθηγητού Χ. Προυκάκη*. s.l.:Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., pp. 117-127.
- Μαχαίρας, Π. & Ρέππας, Χ., 1992. *Βιοφαρμακευτική*. s.l.:Φωτοσυν ΑΒΕΕ.

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Η διαδερμική χορήγηση φαρμακολογικά δραστικών ουσιών (ΦΔΟ), εάν είναι δυνατόν να επιτευχθεί, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές οδούς χορήγησης, δηλαδή την από του στόματος και την ενδοφλέβια οδό, όπως αποφυγή του φαινομένου πρώτης διόδου, επίτευξη σταθερών επιπέδων στο πλάσμα και βελτίωση της συμμόρφωσης των ασθενών.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας μελέτης ήταν η *in vitro* αξιολόγηση της διαπερατότητας ΦΔΟ με ασθενώς βασικό χαρακτήρα, δραστική ουσία Α και δραστική ουσία Β, μέσω της επιδερμίδας ως πρώτο βήμα για την ανάπτυξη διαδερμικών θεραπευτικών συστημάτων (ΔΘΣ) με επιθυμητό ρυθμό αποδέσμευσης. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων παραγόντων, όπως η χημική μορφή των ΦΔΟ, η σύσταση του φορέα διαδερμικής χορήγησης καθώς και το δέρμα από διαφορετικούς δότες.

Για τα *in vitro* πειράματα διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα, κάθετα κύτταρα διάχυσης τύπου Franz και ανθρώπινη επιδερμίδα από δέρμα διαφορετικών δοτών, θηλυκού φύλου.

Οι συνθέσεις που περιείχαν τη δραστική ουσία Α με τη μορφή υδροχλωρικού άλατος ( $A - HCl$ ) εμφάνισαν εξαιρετικά χαμηλές τιμές  $Q$ , ποσότητα δηλαδή της  $A - HCl$  που διαπερνούσε την επιδερμίδα ανά μονάδα επιφανείας σε μονάδες  $\mu g/cm^2$ , στις 12, 24, 36 και 48 h από την έναρξη του πειράματος. Ούτε ο διαφορετικός οργανικός διαλύτης της σύνθεσης αλλά ούτε και το δέρμα από διαφορετικό δότη επηρέασαν στατιστικά σημαντικά την απορρόφησή της, με συνέπεια η ροή να χαρακτηρίζεται σε κάθε περίπτωση ανεπαρκής.

Οι συνθέσεις που περιείχαν τη δραστική ουσία Α με τη μορφή ασθενούς βάσης εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές  $Q$  σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας, επιτυγχάνοντας θεραπευτικά επίπεδα για περισσότερο από 48 h ύστερα από χορήγηση ΔΘΣ τύπου δεξαμενής με μέγεθος μικρότερο από  $12\text{ cm}^2$ . Όσον αφορά τα ΔΘΣ τύπου Drug-in-Adhesive (DIA), η κλασική μέθοδος (regular patches) δεν ήταν λειτουργική εξαιτίας της πτητικότητας της ΦΔΟ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από  $35^\circ C$  για αυτό και δοκιμάστηκε η τεχνική sandwich patches. Ωστόσο, παρόλο που το αρχικό πρόβλημα αντιμετωπίστηκε, παρατηρούνταν μεγάλη απόκλιση στη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας Α από τη θεωρητική γεγονός που πιθανότατα οφείλεται είτε στη μεμβράνη υποστήριξης (backing membrane) είτε στο πιεσοευαίσθητο συγκολλητικό (pressure sensitive adhesive – PSA).

Τέλος, σχετικά με τις συνθέσεις που περιείχαν την ασθενή βάση της δραστικής ουσίας Β, δεν εμφάνισαν επαρκείς τιμές  $Q$  ώστε να επιτυγχάνονται θεραπευτικά επίπεδα στο πλάσμα από ΔΘΣ αποδεκτού εμβαδού. Επιπλέον, η αυξανόμενη περιεκτικότητα σε αιθανόλη και η αντίστοιχη μεταβολή της συγκέντρωσης της ΦΔΟ δεν εμφάνισαν ανάλογα αποτέλεσμα στη ροή μέσω του δέρματος.

Συμπεραίνεται λοιπόν πως τα επίπεδα των ΦΔΟ στο πλάσμα ύστερα από διαδερμική χορήγηση των ασθενών βάσεων είναι αρκετά υψηλότερα συγκριτικά με τη χορήγηση των αντίστοιχων αλάτων. Επιπλέον, η χορήγηση της δραστικής ουσίας Α είναι εφικτή από ΔΘΣ τύπου δεξαμενής ενώ η δραστική ουσία Β απαιτεί περαιτέρω μελέτη για αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητάς της.

## ABSTRACT

---

Transdermal administration of active pharmaceutical ingredients (APIs), if achievable, presents considerable advantages compared to conventional routes of administration, i.e. oral and intravenous routes, such as avoiding the first-pass metabolism, provide sustained and constant plasma levels and improving patient compliance.

Aim of the present study was to assess the in vitro permeation of APIs with weakly basic character, active substance A and active substance B, through human cadaver epidermis as a preliminary step towards the development of transdermal therapeutic systems (TTSs) with desired release rate. In this context, the effect of some factors, specifically chemical form of APIs, composition of transdermal delivery vehicle and skin from different donors, has been studied.

The in vitro transdermal permeation experiments were conducted using modified, vertical Franz type diffusion cells and human epidermis of different donors, female sex.

Gels containing active substance A in the form of hydrochloric acid (*A – HCl*) showed extremely low Q values, the amount of *A – HCl* penetrating the epidermis per unit area in units of  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , at 12, 24, 36 and 48 h since the beginning of the experiment. Neither the different organic solvent of the delivery vehicle nor the skin from different donor affected statistically significant its absorption, with the consequence that the flow is in any case insufficient.

Gels containing active substance in the form of weak base showed higher Q values at all sampling times, achieving therapeutic levels for more than 48 h following administration of a reservoir-type TTS of less than  $12 \text{ cm}^2$ . Concerning Drug-in-Adhesive (DIA) type TTSs, regular patches were not functional due to the volatility of the API at temperature above  $35^\circ\text{C}$  and that was the reason why sandwich patches were tested. However, although the original problem was encountered, there was large deviation in the concentration of active substance A from the theoretical value, possibly due to either the backing membrane or the pressure sensitive adhesive (PSA).

Finally, regarding gels containing active substance B in the form of weak base, they did not show sufficient Q values to achieve therapeutic plasma levels from TTSs of acceptable area. In addition, the increasing ethanol content and the corresponding change in API concentration did not show similar effect on the flow rate through the skin.

It is concluded, therefore, that plasma levels of APIs following transdermal administration of weak bases are significantly higher compared to the administration of corresponding salts. Furthermore, the administration of active substance A is feasible from reservoir-type TTSs whereas active substance B requires further study to assess its percutaneous permeation.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## Έλεγχος Κανονικότητας με Στατιστική Δοκιμή Shapiro – Wilk

	Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης) – Δότης	Statistic	Degrees of Freedom	<i>p – value</i>
$Q_{0-12}$	F1 – 16/11/16	0,864	5	0,242
	F1 – 19/04/17	0,913	5	0,489
	F2 – 16/11/16	0,829	3	0,186
	F2 – 19/04/17	0,870	4	0,296
$Q_{0-24}$	F1 – 16/11/16	0,892	5	0,369
	F1 – 19/04/17	0,966	5	0,849
	F2 – 16/11/16	0,879	3	0,323
	F2 – 19/04/17	0,887	4	0,368
$Q_{0-36}$	F1 – 16/11/16	0,876	5	0,291
	F1 – 19/04/17	0,884	5	0,330
	F2 – 16/11/16	0,793	3	0,097
	F2 – 19/04/17	0,963	4	0,800
$Q_{0-48}$	F1 – 16/11/16	0,909	5	0,462
	F1 – 19/04/17	0,770	5	0,055
	F2 – 16/11/16	0,921	3	0,455
	F2 – 19/04/17	0,855	4	0,241

**Πίνακας I.1:** Έλεγχος κανονικότητας αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας A – HCl, από τις γέλες

	Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Statistic	Degrees of Freedom	<i>p – value</i>
$Q_{0-12}$	F3	0,972	4	0,851
	F4	0,903	5	0,427
	F5	0,870	4	0,299
	F6	0,990	4	0,959
$Q_{0-24}$	F3	0,999	4	0,996
	F4	0,934	5	0,627
	F5	0,821	4	0,147
	F6	0,811	4	0,123
$Q_{0-36}$	F3	0,952	4	0,728
	F4	0,901	5	0,414
	F5	0,953	4	0,736
	F6	0,949	4	0,709
$Q_{0-48}$	F3	0,973	4	0,859
	F4	0,888	5	0,345
	F5	0,845	4	0,683
	F6	0,966	4	0,818

**Πίνακας I.2:** Έλεγχος κανονικότητας αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας A, από τις γέλες

	Κωδικός ΔΘΣ – Συγκέντρωση ΦΔΟ	Statistic	Degrees of Freedom	<i>p – value</i>
$Q_{0-12}$	F7 – 2,00	0,809	3	0,135
	F8 – 4,00	0,857	5	0,217
	F9 – 6,00	0,988	5	0,972
$Q_{0-24}$	F7 – 2,00	0,834	3	0,198
	F8 – 4,00	0,859	5	0,224
	F9 – 6,00	0,961	5	0,814
$Q_{0-36}$	F7 – 2,00	0,854	3	0,252
	F8 – 4,00	0,889	5	0,354
	F9 – 6,00	0,919	5	0,526
$Q_{0-48}$	F7 – 2,00	0,902	3	0,391
	F8 – 4,00	0,905	5	0,439
	F9 – 6,00	0,905	5	0,437

**Πίνακας I.3:** Έλεγχος κανονικότητας αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας A, από τα ΔΘΣ

	Κωδικός Σύνθεσης (Γέλης)	Statistic	Degrees of Freedom	<i>p – value</i>
$Q_{0-12}$	F10	0,938	5	0,649
	F11	0,972	5	0,888
	F12	0,932	5	0,613
$Q_{0-24}$	F10	0,889	5	0,352
	F11	0,802	5	0,084
	F12	0,968	5	0,863
$Q_{0-36}$	F10	0,904	5	0,430
	F11	0,829	5	0,137
	F12	0,968	5	0,864
$Q_{0-48}$	F10	0,904	5	0,434
	F11	0,924	5	0,556
	F12	0,912	5	0,480

**Πίνακας I.4:** Έλεγχος κανονικότητας αποτελεσμάτων in vitro πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας δραστικής ουσίας B, από τις γέλες