



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

**In vitro μελέτη διαπερατότητας της
Ρεσβερατρόλης από γαλακτώματα ο/ω τοπικής
χρήσης με τη χρήση τεχνικών του
Πειραματικού Σχεδιασμού**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΣΠΑΝΕΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

κος Δάλλας Παρασκευάς, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ (**Επιβλέπων**)

κος Ρέκκας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

κος Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος, Καθηγητής ΕΚΠΑ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών το ακαδημαϊκό έτος 2018 – 2019 στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) με τίτλο: «Βιομηχανική Φαρμακευτική».

Μετά την ολοκλήρωση της εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Παρασκευά Δάλλα, για την πολύτιμη καθοδήγησή του, το χρόνο που αφιέρωσε και το συνεχές ενδιαφέρον του σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για όλες τις συμβουλές και τις επιστημονικές γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος κ. Δημήτριο Ρέκκα για τις καθοριστικής και καίριας σημασίας συμβουλές στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού, αλλά και για το ενδιαφέρον του και για τις προτάσεις του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μιχαήλ Ράλλη για τη συνεργασία κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και την τιμή που μου έκανε με την παρουσία του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Τσινταβή Ελένη, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Αντωνάρα Λευκοθέα, καθώς και τις φοιτήτριες Παρασκευή Παπακυριακοπούλου και Μαντά Κωνσταντίνα για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την κατανόηση και την αλληλοβοήθεια.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την Κιορπελίδη Ειρήνη για όλη τη στήριξη, τη βοήθεια και την κατανόηση σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΣΠΑΝΕΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 10 |
| 1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ..... | 10 |
| 1.1.1 Εισαγωγή..... | 10 |
| 1.1.2 Λειτουργία του δέρματος..... | 10 |
| 1.1.3 Δομή του δέρματος..... | 11 |
| 1.1.4 Δομή της επιδερμίδας..... | 12 |
| 1.1.5 Δομή της δερμίδας..... | 17 |
| 1.1.6 Δομή του υποδόριου ιστού..... | 18 |
| 1.1.7 Εξαρτήματα του δέρματος..... | 18 |
| 1.2 ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΤΟ ΔΕΡΜΑ ΩΣ ΟΔΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ..... | 21 |
| 1.2.1 Εισαγωγή στη διαδερμική απορρόφηση..... | 21 |
| 1.2.2 Βασικές αρχές διαπερατότητας φαρμακολογικά δραστικών ουσιών δια μέσου του δέρματος..... | 22 |
| 1.2.3 Κινητική της διαδερμικής απορρόφησης..... | 24 |
| 1.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση..... | 28 |
| 1.2.5 Διαδερμικά φαρμακευτικά προϊόντα..... | 32 |
| 1.2.6 Βελτιστοποίηση και ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης..... | 33 |
| 1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ..... | 36 |
| 1.3.1 Εισαγωγή στις πειραματικές τεχνικές μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης..... | 36 |
| 1.3.2 Κύτταρα διάχυσης (Diffusion Cells)..... | 37 |
| 1.3.3 Μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στις <i>in vitro</i> μελέτες..... | 40 |
| 1.3.4 Τεχνική του Tape – Stripping..... | 45 |
| 1.4 ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ..... | 47 |
| 1.4.1 Προέλευση και πηγές της Ρεσβερατρόλης..... | 47 |
| 1.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημική δομή της Ρεσβερατρόλης..... | 47 |
| 1.4.3 Φαρμακολογική δράση και πιθανές θεραπευτικές χρήσεις της Ρεσβερατρόλης..... | 49 |
| 1.4.4 Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά της Ρεσβερατρόλης..... | 55 |
| 1.5 Ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ..... | 58 |
| 1.5.1 Εισαγωγή στην Ποιότητα..... | 58 |
| 1.5.2 Ποιότητα μέσω Σχεδιασμού (Quality by Design – QbD)..... | 59 |
| 1.5.3 Εισαγωγή στο Σχεδιασμό των Πειραμάτων (Design of Experiments – DoE)..... | 61 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5.4 Πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού | 63 |
| 1.5.5 Φάσεις του Πειραματικού Σχεδιασμού | 64 |
| 1.5.6 Στόχοι του Πειραματικού Σχεδιασμού | 66 |
| 1.5.7 Τύποι του Πειραματικού Σχεδιασμού | 66 |
| 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ | 71 |
| B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 72 |
| 2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ..... | 72 |
| 2.1.1 Υλικά..... | 72 |
| 2.1.2 Εξοπλισμός..... | 73 |
| 2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 74 |
| 2.2.1 Λήψη φάσματος UV..... | 74 |
| 2.2.2 Αναλυτική Μέθοδος HPLC | 74 |
| 2.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων..... | 75 |
| 2.2.4 Έλεγχος γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης..... | 76 |
| 2.2.5 Παρασκευή του διαλύματος του υποδοχέα..... | 76 |
| 2.2.6 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα..... | 76 |
| 2.2.7 Αρχικές συνταγές (συνθέσεις) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία | 77 |
| 2.2.8 Παρασκευή των γαλακτωμάτων..... | 80 |
| 2.2.9 Αρχικές <i>in vitro</i> μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M [®] (Strat-M [®] Membrane for Transdermal Diffusion Testing) | 80 |
| 2.2.10 Χρησιμοποίηση των τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments – DoE)..... | 83 |
| 2.2.11 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού για τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού (Mixture Design – DoE) | 85 |
| 2.2.12 <i>In vitro</i> μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα | 85 |
| 2.2.13 Ποσοτικός προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης στα γαλακτώματα..... | 87 |
| 2.2.14 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων | 88 |
| Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 89 |
| 3.1 Φάσμα UV..... | 89 |
| 3.2 Μέθοδος HPLC..... | 89 |
| 3.3 Έλεγχος Γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης | 91 |
| 3.4 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα (Receptor Solution) | 92 |
| 3.5 Αρχικές <i>in vitro</i> μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M [®] | 92 |

| | |
|---|-----|
| 3.6 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments – DoE)..... | 94 |
| 3.6.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού | 94 |
| 3.6.2 Βελτιστοποίηση (Optimization – Numerical)..... | 101 |
| 3.7 <i>In vitro</i> μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας τη τεχνητή μεμβράνη Strat-M [®] | 105 |
| 3.8 <i>In vitro</i> μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα..... | 107 |
| 3.9 Συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M [®] και του ανθρώπινου δέρματος..... | 110 |
| 3.10 Ποσοτικός προσδιορισμός..... | 113 |
| Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 114 |
| Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 115 |
| ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 139 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα σtilβένια αποτελούν μια κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων, τα οποία απαντώνται φυσικά σε μια μεγάλη ποικιλία διατροφικών πηγών και σε ορισμένα φαρμακευτικά φυτά. Πρόσφατα, τα σtilβένια έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή και ενδιαφέρον λόγω του ευρέως φάσματος φαρμακολογικών τους δράσεων, όπως αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η Ρεσβερατρόλη είναι το πιο μελετημένο σtilβένιο και βρίσκεται σε αφθονία στο φλοιό των σταφυλιών, στο κρασί και στα μούρα. Εκατοντάδες μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαρμακολογικές δράσεις της Ρεσβερατρόλης αποδίδονται στις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της. Ωστόσο, οι θεραπευτικές εφαρμογές αυτών των ευεργετικών για την υγεία βιολογικών ιδιοτήτων της παραμένουν πολύ περιορισμένες λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημίσειας ζωής, καθώς και του εκτεταμένου μεταβολισμού. Τα αποτελέσματα φαρμακοκινητικών μελετών δείχνουν ότι η από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της Ρεσβερατρόλης είναι πολύ χαμηλή περιορίζοντας αισθητά την *in vivo* αποτελεσματικότητα.

Έτσι, το δέρμα θα μπορούσε να αποτελέσει μία εναλλακτική μορφή χορήγησης της Ρεσβερατρόλης. Προκειμένου να μελετηθεί και να εκτιμηθεί η διαδερμική απορρόφηση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο μοντέλα *in vivo* όσο και *in vitro*. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την *in vitro* εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας, η οποία ταυτόχρονα συνιστάται κι από τις ρυθμιστικές αρχές, είναι τα κύτταρα διάχυσης Franz. Διαφορετικές μεμβράνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μελέτες διαπερατότητας συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου δέρματος, του δέρματος ζωικής προέλευσης, καθώς και των τεχνητών μεμβρανών. Μεταξύ των μεμβρανών αυτών, τα ανθρώπινα και ζωικά δέρματα είναι τα πλέον προτιμώμενα λόγω του γεγονότος ότι προσομοιάζουν καλύτερα τις *in vivo* συνθήκες. Ωστόσο, αυτά τα μοντέλα έχουν περιορισμούς, όπως το κόστος, τη διαθεσιμότητα, καθώς και ηθικούς περιορισμούς. Έτσι, υπάρχει ανάγκη για μια συνθετική μεμβράνη που θα μπορούσε να προσομοιάσει τόσο το φραγμό του δέρματος όσο και τα διάφορα μονοπάτια που ακολουθούν οι χημικές ενώσεις κατά τη διαδερμική απορρόφηση. Η τεχνητή μεμβράνη Strat-M® προσομοιάζει αρκετά καλά τη δομή του ανθρώπινου δέρματος εμφανίζοντας καλή συσχέτιση με αυτό.

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη ημιστερεών γαλακτωμάτων ο/w τοπικής χρήσης που περιέχουν Ρεσβερατρόλη χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του Σχεδιασμού των Πειραμάτων και ειδικότερα το σχεδιασμό μείγματος. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων (DoE) χρησιμοποιείται ευρέως για την εφαρμογή της σύγχρονης προσέγγισης της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού (QbD). Στο πλαίσιο του QbD η κατανόηση των χαρακτηριστικών των φαρμακευτικών προϊόντων και των διεργασιών παραγωγής τους είναι ο βασικός παράγοντας διασφάλισης ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η γνώση επιτυγχάνεται μέσω

της εγκαθίδρυσης μαθηματικών σχέσεων που συνδέουν τους κρίσιμους παράγοντες της διεργασίας (CPPs) και των κρίσιμων ιδιοτήτων των υλικών (CMAs) με τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (CQAs) του τελικού προϊόντος, με αποτέλεσμα τον καθορισμό του χώρου σχεδιασμού.

Τρεις βελτιστοποιημένες συνθέσεις (ημιστερεά γαλακτώματα o/w) που περιέχουν 2% w/w, 4% w/w και 6% w/w Ρεσβερατρόλη διαλυμένη στην υδατική φάση αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητας της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας χρησιμοποιώντας ως φραγμό τόσο ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα όσο και την τεχνητή μεμβράνη Strat-M[®]. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων *in vitro* διάχυσης συγκρίθηκαν και επιχειρήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στην τεχνητή μεμβράνη και το ανθρώπινο δέρμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αθροιστικές ποσότητες της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε μέσω της τεχνητής μεμβράνης ανά cm² (μgcm⁻²) μετά από 24 ώρες ήταν υψηλότερες και στατιστικά σημαντικά διαφορετικές ($p < 0.05$) από τη σύνθεση που περιείχε 6% w/w Ρεσβερατρόλη. Τα ίδια αποτελέσματα ελήφθησαν από τις *in vitro* μελέτες διάχυσης χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα. Επιπλέον, η διαπερατότητα της τεχνητής μεμβράνης Strat-M[®] ήταν 4 έως 10 φορές υψηλότερη από την ανθρώπινη επιδερμίδα και για τις τρεις συνθέσεις. Σε αυτή τη μελέτη, η συνθετική μεμβράνη Strat-M[®] έδειξε σχετικά καλή συσχέτιση με το ανθρώπινο δέρμα για τη Ρεσβερατρόλη. Ο συντελεστής συσχέτισης R² που προέκυψαν από τα *in vitro* δεδομένα διαπερατότητας κυμαίνονταν από 0.95 έως 0.99, με αποτέλεσμα να μπορεί να πιθανολογηθεί ο συγκριτικός χαρακτήρας της τεχνητής μεμβράνης για τη Ρεσβερατρόλη.

ABSTRACT

Stilbenes are a class of polyphenolic compounds naturally found in a wide variety of dietary sources and some medicinal plants. Recently, stilbenes have attracted extensive attention and interest due to their wide range of health-beneficial effects such as anti-inflammation and antioxidant properties. Resveratrol is the most extensively studied stilbene abundant in grape skin, wine and berries. Hundreds of studies have shown that resveratrol possesses diverse biological and pharmacological actions, which are attributed to antioxidant and anti-inflammatory effects. However, therapeutic applications of these beneficial biological effects of resveratrol remain very limited due to its short biological half-life, rapid metabolism and elimination. Results from pharmacokinetic studies indicate that the oral bioavailability of resveratrol is very low leading to an irrelevant *in vivo* pharmacological effect.

Skin, as the largest organ in human body, provides an attractive route for drug delivery and has an important advantage over oral administration, as it avoids first pass metabolism. In order to assess rate and extent of absorption of drugs for dermal delivery, both *in vivo* and *in vitro* models can be utilized. For *in vitro* studies of drug permeation, the Franz diffusion cells are often used and simultaneously are recommended by international guidelines to measure drug release and permeation rate for topical and transdermal dosage forms. Different membranes can be used in the Franz diffusion cells including human skin, animal skin, as well as artificial membranes. One recently introduced synthetic membrane that may predict both lipophilic and hydrophilic drug permeation with better correlation to human skin is Strat M[®] artificial membrane.

The objective of this study was to develop emulsions oil in water (o/w) for topical use containing Resveratrol using Design of Experiments techniques and especially mixture design. Design of Experiments (DoE) is extensively used for the implementation of Quality by Design (QbD) approach. In QbD framework, product and process understanding is the key enabler of assuring quality in the final product. Knowledge is achieved by establishing models correlating the inputs with the outputs of the process. The mathematical relationships of the Critical Process Parameters (CPPs) and Material Attributes (CMAs) with the Critical Quality Attributes (CQAs) define the design space.

Three optimized formulations containing 2% w/w, 4% w/w and 6% w/w Resveratrol in aqueous phase, respectively, were used for evaluating drug permeation. *In vitro* permeation studies across synthetic membrane Strat-M[®] and human skin were performed and the results were compared.

Results showed that the cumulative amounts of Resveratrol permeated through the artificial membrane per cm² (μgcm^{-2}) after 24h experiment were higher and statistically different ($p < 0.05$) from the formulation containing 6%w/w Resveratrol. The same results were

obtained from *in vitro* permeation studies using human skin. In addition, the permeability of artificial membrane Strat-M[®] was 4 to 10 fold higher than human skin for all three formulations. In this study, Strat-M[®] synthetic membrane demonstrated a relatively good correlation to human cadaver skin for Resveratrol. The time point correlations obtained from *in vitro* permeability data were in range from 0.95 to 0.99 ($0.95 < R^2 < 0.99$).

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1.1.1 Εισαγωγή

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο και βαρύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος (Sanders et al., 1999) αντιπροσωπεύοντας περίπου το 15% του συνολικού σωματικού βάρους ενός ενήλικου ανθρώπου έχοντας βάρος περίπου 5 kg (Godin & Touitou, 2007) και καλύπτοντας επιφάνεια 1.8 – 2.0 m² (Kolarsick et al., 2011). Το ανθρώπινο δέρμα αποτελεί ένα εξαιρετικά πολύπλοκο όργανο, το οποίο έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να παρεμποδίζεται η υπερβολική απώλεια ύδατος και ταυτόχρονα να παρέχεται προστασία από το εξωτερικό περιβάλλον μας αποτελώντας μια «ειδική διεπιφάνεια» ανάμεσα στο σώμα μας, τον αέρα, το ύδωρ και τις διάφορες στερεές ουσίες (Hadgraft and Lane, 2011).

Η κύρια λειτουργία του δέρματος είναι να σχηματίσει ένα εμπόδιο μεταξύ του εσωτερικού ανθρώπινου περιβάλλοντος και του «εχθρικού» εξωτερικού περιβάλλοντος αποτελώντας ένα φραγμό διαπερατότητας (permeability barrier), ο οποίος αποτρέπει την απώλεια ύδατος και ηλεκτρολυτών, γεγονός που είναι απαραίτητο για τη συνέχεια της ζωής στη γη (Feingold and Elias, 2014).

1.1.2 Λειτουργία του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί πολύτιμο όργανο, το οποίο επιτελεί πολλές και σημαντικές λειτουργίες, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω (Zouboulis, 2000, Elias, 2005, Williams, 2013):

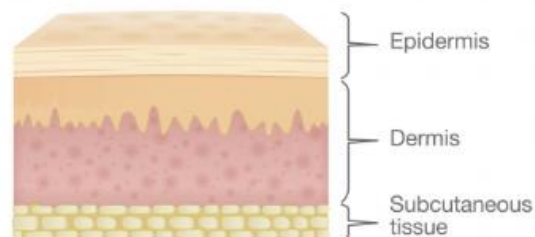
- Προσπαστική λειτουργία, καθώς το δέρμα προστατεύει έναντι μηχανικών και ηλεκτρικών κακώσεων, θερμικών επιδράσεων, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιεί την άδηλη απώλεια νερού και ηλεκτρολυτών.
- Προστασία, ως αδιαπέραστος φραγμός, έναντι εξωτερικών μικροβιακών και χημικών ουσιών.
- Παραγωγή μελανίνης στα κύτταρα της επιδερμίδας, η οποία προφυλάσσει από τη βλαπτική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας.
- Θερμορυθμιστική λειτουργία, καθώς παράγεται ο ιδρώτας από τους ιδρωτοποιούς αδένες του δέρματος και μέσω διέγερσης των αιμοφόρων αγγείων ρυθμίζεται η θερμοκρασία του σώματος και η διατήρηση αυτής σε σταθερά επίπεδα.
- Αισθητήρια λειτουργία, καθώς το δέρμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως υποδεκτικό όργανο, διότι βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον και μεταβιβάζει ερεθίσματα από και προς αυτό.

- Ανοσοποιητική λειτουργία, καθώς η επιδερμίδα θεωρείται ως η πρώτη «γραμμή άμυνας» του οργανισμού. Τα πλασματοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε αυτήν, συμβάλλουν στη λειτουργία της χημικής ανοσίας μέσω της παραγωγής αντισωμάτων.
- Απεκκριτική λειτουργία, καθώς παράγονται και αποβάλλονται ουσίες, όπως το σμήγμα και ο ιδρώτας, οι οποίες συμβάλλουν στην προστασία του δέρματος.
- Κερατινοποίηση. Η επιδερμίδα είναι ο φραγμός του δέρματος. Η διαφοροποίηση των κυττάρων από τη βασική προς την κεράτινη στοιβάδα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κερατίνης, η οποία σε συνδυασμό με τα λιπίδια, την καθιστούν στερεή και ελαστική.

Προκειμένου να κατανοηθούν αυτές οι ιδιότητες και η λειτουργία του φραγμού του δέρματος, κρίνεται αναγκαίο και απαραίτητο να προσδιορισθεί η δομή του σε διάφορα επίπεδα, τόσο μακροσκοπικά όσο και σε μοριακό επίπεδο.

1.1.3 Δομή του δέρματος

Όπως γίνεται εύκολα κατανοητό από τα παραπάνω, η πρωταρχική λειτουργία του ανθρώπινου δέρματος είναι να παρέχει ένα φραγμό μεταξύ του ανθρώπινου σώματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος αναστέλλοντας τη διαδερμική απορρόφηση των εξωτερικών τοξινών και παθογόνων μικροοργανισμών και περιορίζοντας τις αρνητικές συνέπειες από τις εξωτερικές προσβολές, όπως η UV ακτινοβολία, και αποτρέποντας την απώλεια του ύδατος. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτό, το ανθρώπινο δέρμα έχει εξελιχθεί σε μία σύνθετη και **πολυστοιβαδική** δομή, η οποία αποτελείται από τρεις ευδιάκριτες και ετερογενείς περιοχές, την **επιδερμίδα** (epidermis), τη **δερμίδα** ή υποκείμενο χόριο συνδετικού ιστού (dermis) και το λιπαρό **υποδόριο ιστό** (subcutaneous tissue) (Pailler-Mattei et al., 2008, Yan et al., 2018). Η επιδερμίδα συνιστά την εξωτερική, επιθηλιακή στοιβάδα, ενώ η δερμίδα αποτελεί την εσωτερική στοιβάδα. Ο υποδόριος ιστός βρίσκεται κάτω από τη δερμίδα περιέχοντας μεγάλες ποσότητες λίπος. Επίσης, το δέρμα διαθέτει εξαρτήματα όπως τρίχες (hair), νύχια, ιδρωτοποιούς (sweat glands) και σμηγματογόνους (sebaceous glands) αδένες, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω (Schaefer, 2008).



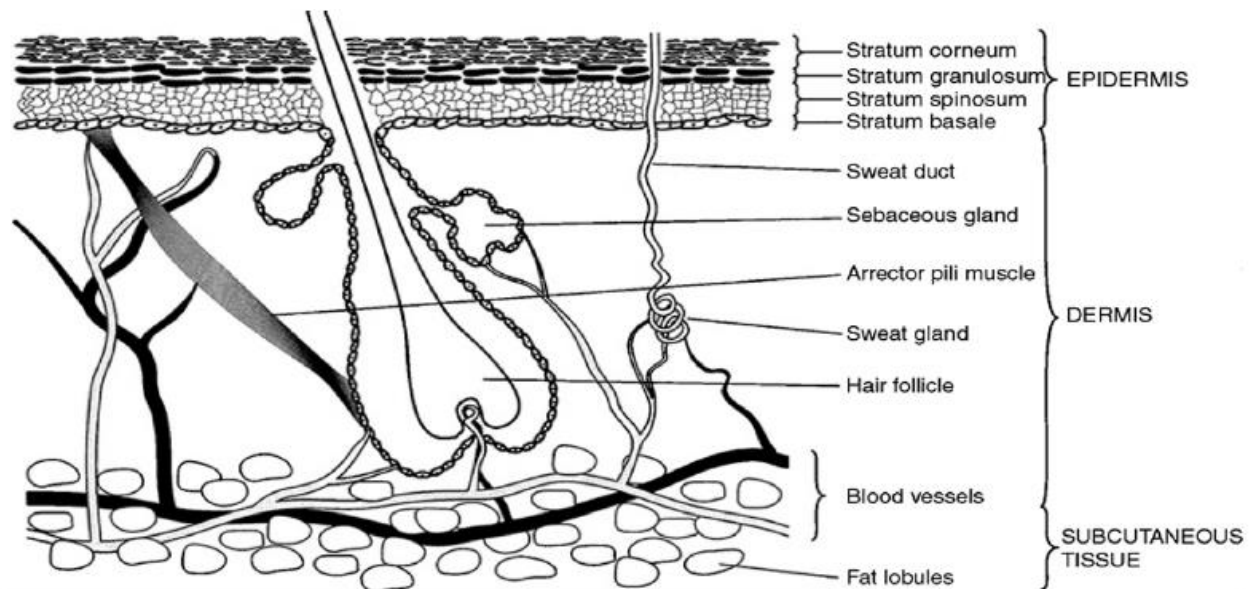
Εικόνα A1: Οι τρεις στοιβάδες του ανθρώπινου δέρματος (Newman, 2018)

1.1.4 Δομή της επιδερμίδας

Η επιδερμίδα αποτελεί μία περιοχή του δέρματος, η οποία δεν διαθέτει αγγεία, αλλά ουσιαστικά τρέφεται από τα αγγεία που βρίσκονται στη δερμίδα (χόριο). Η επιδερμίδα υποβάλλεται σε ένα τακτικό μοτίβο πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κερατινοποίησης (Schaefer, 2008). Η επιδερμίδα αποτελείται με τη σειρά της από πέντε ξεχωριστές και ευδιάκριτες στοιβάδες, οι οποίες περιλαμβάνουν τέσσερα είδη κυττάρων, τα κύτταρα Langerhans, τα κύτταρα Merkel, τα μελανοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα. Ακόμα, η επιδερμίδα χαρακτηρίζεται από τη μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών και διάφορων καταβολικών ενζύμων όπως, εστεράσες, φωσφατάσες, πρωτεάσες, νουκλεοτιδάσες και λιπάσες. Αυτές οι στοιβάδες είναι γνωστές ως (Murphree, 2017):

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

Οι τέσσερις στοιβάδες, χωρίς την κεράτινη, αναφέρονται ως ζώσα επιδερμίδα (viable epidermis), ενώ η διαυγής χαρακτηρίζεται ως σπάνια, καθώς εντοπίζεται μόνο στα πέλματα και τις παλάμες (Schaefer, 2008). Στην επόμενη εικόνα παρουσιάζονται η δομή και τα κύρια εξαρτήματα του δέρματος.



Εικόνα Α2: Δομή και εξαρτήματα του δέρματος (Sala et al., 2018)

1.1.4.1 Κεράτινη στοιβάδα

Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται από νεκρά, κερατινοποιημένα, απύρρηνα, σχεδόν αδιαπέραστα κύτταρα, τα λεγόμενα κερατινοκύτταρα, των οποίων το κυτταρόπλασμα έχει

αντικατασταθεί από πρωτεΐνες, όπως η κερατίνη, η φιλαγκρίνη και η ινβολουκρίνη. Κατά τη διάρκεια 28 ημερών τα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τη βασική στοιβάδα, μεταναστεύουν στην επιφάνεια του δέρματος, υποβάλλονται σε διάφορες καταστάσεις διαφοροποίησης και συμμετέχουν στη διαδικασία της κερατινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα χάνουν τους πυρήνες τους, γίνονται επίπεδα, απορρίπτουν τα λιπίδια στο μεσοκυττάριο χώρο (κοκκιώδης στοιβάδα) και κερατινοποιούνται δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο τη δομή της κεράτινης στοιβάδας. Τα κύτταρα πεθαίνουν, όταν φτάσουν στο ανώτερο επίπεδο της επιδερμίδας, φαινόμενο που είναι γνωστό ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Schaefer, 2008, Houben et al., 2006).

Η κερατινοποίηση (keratinization) αποτελεί τη διαδικασία τερματικής διαφοροποίησης, η οποία πραγματοποιείται, καθώς τα κερατινοκύτταρα μετακινούνται από τη βασική στοιβάδα προς την επιφάνεια της επιδερμίδας και τελικά καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο. Η κερατινοποίηση περιλαμβάνει μια συνθετική και έπειτα μια αποικοδομητική φάση (Chu, 2008).

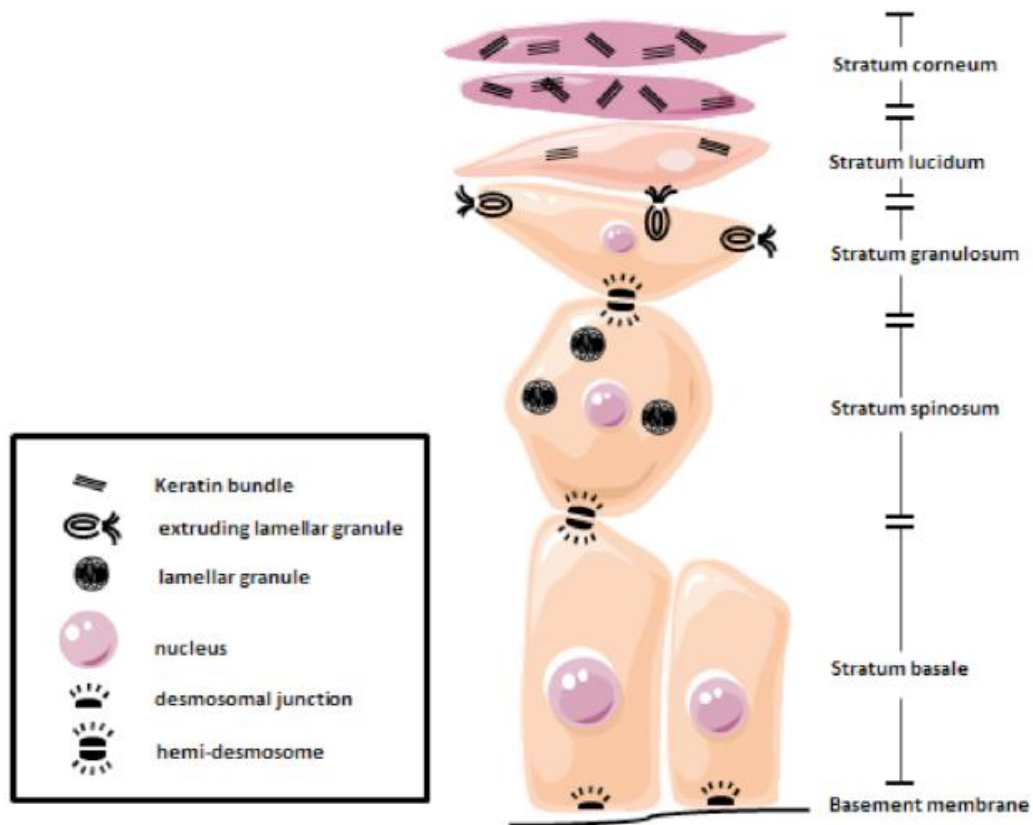
Κατά τη συνθετική φάση, τα κερατινοκύτταρα συσσωρεύουν ένα κυτταροπλασματικό απόθεμα κερατίνης, μιας ινώδους ενδιάμεσης νηματοειδούς πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί μέρος του σκελετού του κυττάρου. Δέσμες αυτών των νηματίων κερατίνης συγκλίνουν και καταλήγουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σχηματίζοντας τις διακυτταρικές συνδέσεις των δεσμοσωμάτων. Στη συνέχεια, κατά την αποικοδομητική φάση, παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη δομή των κερατινοκυττάρων, καταλήγοντας στο μετασχηματισμό τους στα επίπεδα και απύρρηνα κύτταρα της κεράτινης στοιβάδας, τα οποία πλέον καλούνται κερατινοποιημένα κύτταρα και αποτελούνται κυρίως από νημάτια κερατίνης, περιβαλλόμενα από έναν κυτταρικό «φάκελο», ο οποίος συνίσταται από διασταυρούμενα συνδεδεμένες πρωτεΐνες, καθώς και από έναν ομοιοπολικά ενωμένο λιπιδικό φάκελο (Walters, 2002).

Τα τελικά προϊόντα της διαδικασίας αυτής, δηλαδή η ενδοκυτταρική πρωτεϊνική μήτρα και οι μεσοκυττάριας λιπιδικές στοιβάδες, σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία του φραγμού του δέρματος. Στο τέλος, τα κερατινοποιημένα κύτταρα αποπίπτουν από την επιδερμίδα μέσω μίας διαδικασίας, η οποία είναι γνωστή ως αποφολίδωση (Walters, 2002).

Σε φυσιολογικό δέρμα χρειάζονται περίπου 14 ημέρες για ένα κύτταρο στη βασική στοιβάδα να μεταναστεύσει και να διαφοροποιηθεί σε απύρρηνο κερατινοκύτταρο, το οποίο στην συνέχεια συγκρατείται στην κεράτινη στοιβάδα για ακόμη 2 εβδομάδες προτού υποστεί απόπτωση (Donnelly and Singh, 2015). Στην υγιή επιδερμίδα υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της αποφολίδωσης, με αποτέλεσμα την πλήρη ανανέωση της επιδερμίδας περίπου κάθε 28 ημέρες (Baroni, 2012).

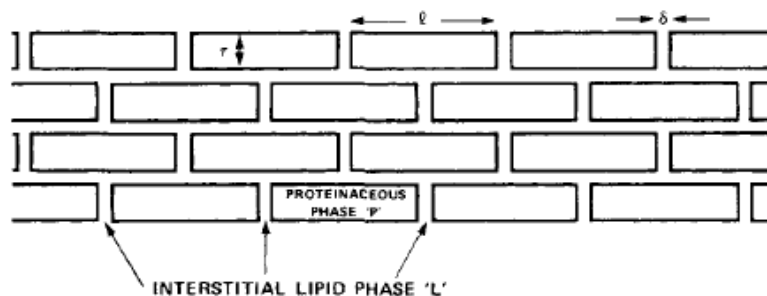
Στην παρακάτω Εικόνα A3 παρουσιάζεται σχηματικά η διαφοροποίηση των κυττάρων της επιδερμίδας. Χαρακτηριστικά γεγονότα που απεικονίζονται η απώλεια των πυρήνων και η

συσώρευση κερατίνης στην κεράτινη στοιβάδα, καθώς τα κύτταρα μετακινούνται από τη βασική προς την κεράτινη στοιβάδα.

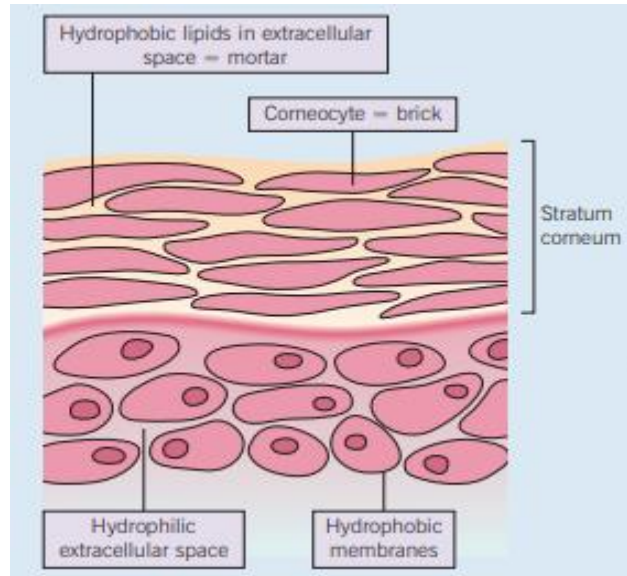


Εικόνα A3: Σχηματική απεικόνιση της επιδερμικής διαφοροποίησης (Vitorino et al., 2015)

Τα κερατινοκύτταρα είναι ενσωματωμένα σε μία συνεχή λιπιδική μήτρα διαφόρων λιπιδίων, όπως είναι η χοληστερόλη, τα κεραμίδια, καθώς και μονοακόρεστα και κορεσμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να αποτελούνται από 24 μέχρι και 36 άτομα άνθρακα (Bouwstra et al., 2003). Έτσι, η δομή της κεράτινης στοιβάδας μπορεί να περιγραφεί ως «ένας τοίχος που αποτελείται από τούβλα και λάσπη» (brick and mortar wall model, Michaels, 1975). Στο μοντέλο αυτό τα «τούβλα» αντιστοιχούν στα κερατινοκύτταρα, ενώ η «λάσπη» στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες που αποτελούνται από χοληστερόλη, κεραμίδια και λιπαρά οξέα (Elias, 1981, Elias, 1983). Το μοντέλο «brick and mortar wall» για τη δομή της κεράτινης στοιβάδας παρουσιάζεται στις επόμενες Εικόνες A4, A5 και A6.



Εικόνα A4: Το μοντέλο για τη δομή της κεράτινης στοιβάδας όπως προτάθηκε αρχικά από τους Michael et al., 1975



Εικόνα Α5: Απεικόνιση του μοντέλου «Brick and mortar wall» για τη δομή της κεράτινης στοιβάδας (Prausnitz et al., 2012)



Εικόνα Α6: Το μοντέλο «Brick and mortar wall» για τη δομή της κεράτινης στοιβάδας: τα κερατινοκύτταρα ως «τούβλα» και τα λιπίδια ως «κονίαμα» (Menon et al., 2012)

Η διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας αναγνωρίζεται ως το περιοριστικό βήμα για τη διαδερμική απορρόφηση (Itin, 2016) αποτελώντας το φραγμό για τη διάχυση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών (Bouwstra and Honeywell-Nguyen, 2002). Ταυτόχρονα, θεωρείται ότι η δερμίδα ότι δεν επηρεάζει τη διαδερμική διαπερατότητα (Shah, 2014).

1.1.4.2 Κοκκιώδης στοιβάδα

Η πιο επιφανειακή στοιβάδα της επιδερμίδας, η οποία αποτελείται από ζωντανά και εμπύρηννα κύτταρα, είναι η κοκκιώδης στοιβάδα. Το πάχος της κοκκιώδους στοιβάδας υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι ανάλογο του πάχους της κεράτινης στοιβάδας. Έτσι, σε περιοχές, όπου υπάρχει λεπτό στρώμα κεράτινης στοιβάδας, το πάχος της κοκκιώδους στοιβάδας κυμαίνεται μεταξύ μίας έως και τριών στοιβάδων κυττάρων, αλλά υπάρχει

περίπτωση να είναι έως και δέκα φορές μεγαλύτερο σε περιοχές, όπου υπάρχει παχιά κεράτινη στοιβάδα, όπως στις παλάμες και τα πέλματα (Murphy, 1997).

Η διαδικασία της κερατινοποίησης αρχίζει από την κοκκιώδη στοιβάδα, η οποία αποτελείται από 2 με 3 σειρές ατρακτοειδών αποπεπλατυσμένων κερατινοκυττάρων, τα οποία περιέχουν κοκκία κερατοϋαλίνης που είναι πρόδρομη ουσία της κερατίνης. Επιπλέον, στην κοκκιώδη στοιβάδα υπάρχουν τα σωμάτια του Odland. Τα σωμάτια του Odland ή αλλιώς κερατινοσώματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, όπως κεραμίδια, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, ελεύθερα λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια, τα οποία αποβάλλονται στο μεσοκυττάριο χώρο, συμβάλλοντας, έτσι, στη λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στοιβάδας (Walters, 2002, Forslind, 2004).

Τα κοκκιώδη κύτταρα είναι πεπλατυσμένα περιέχοντας άφθονα κερατινοσώματα και κοκκία κερατοϋαλίνης στο κυτταρόπλασμά τους. Η κοκκιώδης στοιβάδα αποτελεί τη «κερατογόνο ζώνη» της επιδερμίδας, αφού τα κύτταρά της είναι υπεύθυνα για την περαιτέρω σύνθεση και τροποποίηση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κερατινοποίηση (Chu, 2008). Συγκεκριμένα, στα βασεόφιλα κοκκία κερατοϋαλίνης συντίθεται η προφίλαγκρίνη, μια πρόδρομη πρωτεΐνη της φιλαγκρίνης, η οποία αλληλεπιδρά με τα νημάτια κερατίνης και τα συσσωματώνει σε σφιχτές δέσμες, οπότε και προάγεται η κατάρρευση του κυττάρου σε ένα πεπλατυσμένο σχήμα χαρακτηριστικό των κερατινοποιημένων κυττάρων (Baroni, 2012). Τέλος, τα λυσοσωμικά ένζυμα που, σε αντίθεση με τη βασική και την ακανθωτή στοιβάδα, απαντώνται σε μεγάλα ποσοστά στην κοκκιώδη στοιβάδα, προετοιμάζουν τη διάλυση του πυρήνα και των κυτταρικών οργανιδίων καθώς τα κύτταρα υφίστανται την τερματική διαφοροποίηση προς τα κερατινοποιημένα κύτταρα της κεράτινης στοιβάδας (Chu, 2008).

1.1.4.3 Ακανθωτή στοιβάδα

Η ακανθωτή στοιβάδα βρίσκεται κάτω από την κοκκιώδη και πάνω από τη βασική στοιβάδα αποτελούμενη από 2 έως 10 σειρές κερατινοκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά διαφέρουν ως προς το σχήμα και την υποκεντρική δομή ανάλογα με τη θέση τους. Για παράδειγμα, τα κύτταρα που γεινιάζουν με τη βασική στοιβάδα έχουν σχήμα πολυεδρικό, με κεντρικό στρογγυλό πυρήνα, ενώ στις ανώτερες σειρές αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος, πεπλατυσμένο σχήμα και περιέχουν μικρά στρογγυλά κερατινοσώματα, τα προαναφερθέντα σωμάτια And (Murphy, 1997).

Το κυτταρόπλασμα των ακανθωτών κυττάρων περιέχει πολλά ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης, γνωστά κι ως τονοϊνίδια, τα οποία συγκεντρώνονται στις κυτταροπλασματικές αποφυάδες. Τα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάρια γέφυρες, τα δεσμοσωμάτια. Έτσι, προέκυψε το όνομα αυτής της στοιβάδας, το οποίο οφείλεται στις «άκανθες», δηλαδή στις χαρακτηριστικές αυτές μεσοκυττάρια γέφυρες μέσω των δεσμοσωματικών συνδέσεων (Walters, 2002, Chu, 2008).

Μεταξύ των κυττάρων της ακανθωτής στιβάδας υπάρχουν και τα κύτταρα του Langerhans, τα οποία είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα κύτταρα του Langerhans διαθέτουν επίσης απολήξεις με τις οποίες διακλαδίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος τους είναι να δεσμεύουν αντιγόνα και να συμμετέχουν ενεργά στην ανοσολογική λειτουργία (Valladeau & Saeland, 2005).

1.1.4.4 Βασική στοιβάδα

Η βασική στιβάδα, η βαθύτερη και κατώτερη στοιβάδα της επιδερμίδας, αποτελείται από μια σειρά επιθηλιακών κυττάρων κυλινδρικού σχήματος, τα οποία διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο. Στην πραγματικότητα, όλα τα συστατικά της κεράτινης στοιβάδας προέρχονται από την βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα, λοιπόν, ξεκινάνε από τη βασική στιβάδα, στην οποία υφίστανται μιτώσεις, οδηγούνται σταδιακά από την ακανθωτή στην κοκκιώδη, καταλήγοντας στην κεράτινη στοιβάδα, από την οποία πέφτουν σαν κεράτινα πετάλια. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ένα μεγάλο βαθυχρωματικό πυρήνα με έναν ή περισσότερους πυρηνίσκους, ενώ το κυτταρόπλασμα τους περιέχει ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και τονοϊνίδια, τα οποία συνδέουν τα κύτταρα της επιδερμίδας μεταξύ τους. Τα κερατινοκύτταρα, συνδέονται μεταξύ τους μέσω των τονοϊνιδίων, σχηματίζοντας τα δεσμοσώματα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Murphy, 1997).

Επίσης, στη βασική στοιβάδα υπάρχουν τα μελανοκύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα, τα οποία παράγουν τη χρωστική ουσία που μας προστατεύει από τις υπεριώδεις ακτίνες του ηλίου, τη μελανίνη. Για κάθε μελανοκύτταρο αντιστοιχούν πέντε επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδας. Τα μελανοκύτταρα διαθέτουν απολήξεις, τους δενδρίτες, με τους οποίους διακλαδίζονται γύρω από τα κερατινοκύτταρα και, ως εκ τούτου, μεταναστεύουν μαζί τους στην κεράτινη στιβάδα. Οι δενδρίτες περιέχουν μελανοσώματα. Τα μελανοσώματα διαθέτουν κοκκία μελανίνης, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μελανίνης. Τέλος, στη βασική στοιβάδα εμπεριέχονται και τα κύτταρα Merkel μέσω των οποίων γίνονται αντιληπτά τα ερεθίσματα του δέρματος, καθώς συνδέονται με τις νευρικές απολήξεις (Murphy, 1997).

1.1.5 Δομή της δερμίδας

Η δερμίδα αποτελεί έναν πυκνό, ανθεκτικό και ελαστικό ιστό με πάχος 3 έως 5 mm, ο οποίος στηρίζει την επιδερμίδα και ταυτόχρονα τη συνδέει με τον υποδόριο ιστό. Ανάμεσα στην επιδερμίδα και στη δερμίδα υπάρχει ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος. Ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος έχει διπλό ρόλο, τη μηχανική στήριξη της επιδερμίδας και την επικοινωνία με αυτήν, δηλαδή την ανταλλαγή ουσιών (Lai-Cheong and McGrath, 2009).

Η δερμίδα αποτελείται από δύο στοιβάδες, τη θηλώδη, η οποία βρίσκεται κοντά στο δερμοεπιδερμικό σύνδεσμο, και τη δικτυωτή, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στη θηλώδη στοιβάδα και τον υποδόριο ιστό. Η δερμίδα αποτελείται κυρίως από τη μεσοκυττάρια ουσία,

δηλαδή από ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Οι ίνες αυτές περιβάλλονται από μία άμορφη γέλη, τη θεμέλια ουσία, η οποία που περιέχει γλυκοζαμινογλυκάνες. Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός της δερμίδας αποτελείται από ινοβλάστες, κύτταρα που παράγουν τις ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης, πλασματοκύτταρα, φαγοκύτταρα και ιστιοκύτταρα (Walters, 2002).

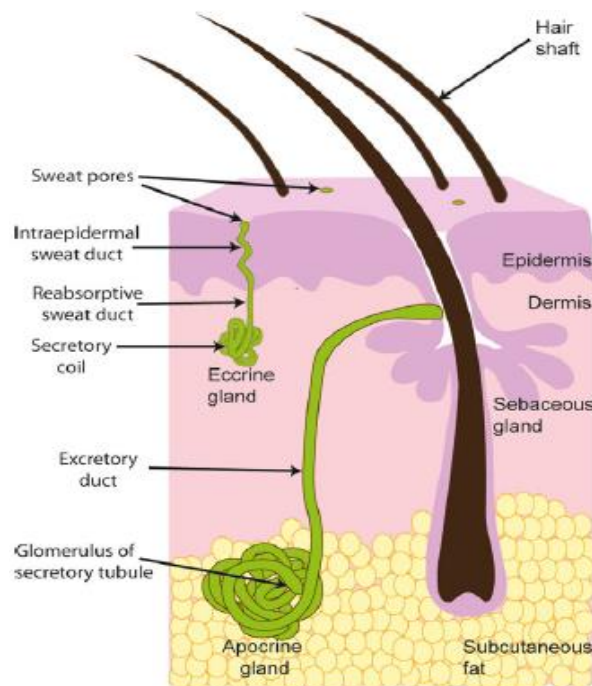
Επιπλέον, στο χόριο, εντοπίζονται εξαρτήματα του δέρματος, διάφορα νεύρα και αιμοφόρα αγγεία, τα οποία προέρχονται από τα μεγαλύτερα αγγεία του υποδορίου ιστού και παρέχουν θρεπτικές ουσίες στη ζώσα επιδερμίδα. Η στήριξη της επιδερμίδας και η σύνδεσή της με τον υποδόριο ιστό αποτελούν τις κύριες λειτουργίες της δερμίδας. Επίσης, η δερμίδα λόγω της δομής της έχει την ικανότητα ανίχνευσης αλλαγών της πίεσης και της θερμοκρασίας μέσω αισθητήριων υποδοχέων (Katz & Poulsen, 1971).

1.1.6 Δομή του υποδορίου ιστού

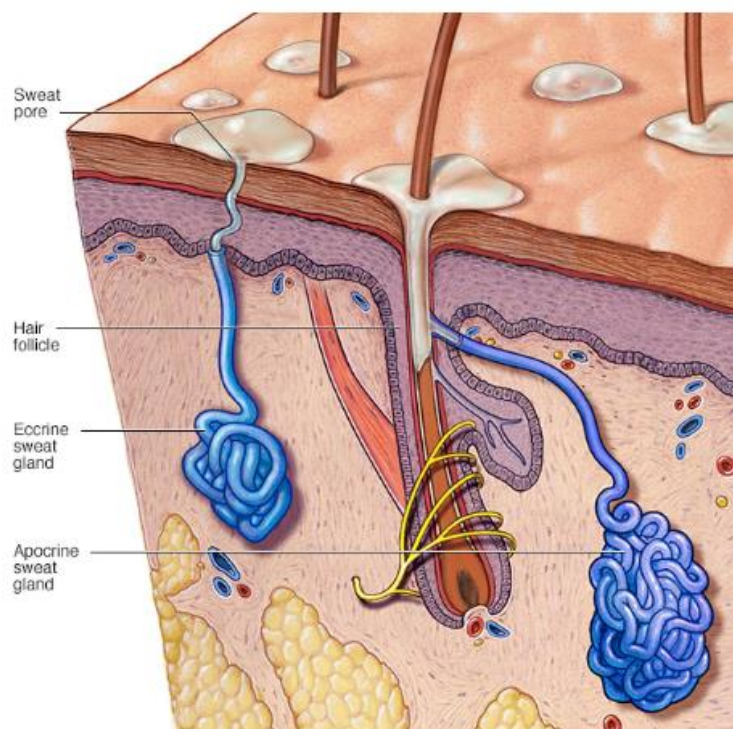
Ο υποδόριος ιστός είναι το κατώτερο στρώμα του δέρματος και απαρτίζεται από λιποκύτταρα, εξαρτήματα του δέρματος, αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Ο υποδόριος ιστός συμβάλλει στην απορρόφηση των δονήσεων, στην αποθήκευση θρεπτικών ουσιών και στη θερμική μόνωση (O’Rahilly, 2004, Walters, 2002)

1.1.7 Εξαρτήματα του δέρματος

Εξαρτήματα του δέρματος αποτελούν οι τρίχες, τα νύχια, οι σμηγματογόνοι αδένες, οι εκκρινείς ιδρωτοποιοί και οι αποκρινείς αδένες. Τα εξαρτήματα του δέρματος παρουσιάζονται στις παρακάτω Εικόνες Α7 και Α8.



Εικόνα Α7: Απεικόνιση των εξαρτημάτων του δέρματος (Hu et al., 2018)



Εικόνα Α8: Απεικόνιση των ιδρωτοποιών αδένων του δέρματος (Διαθέσιμο σε: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hyperhidrosis/multimedia/sweat-glands/img-20007980>)

1.1.7.1 Τρίχες

Η τριχοσηγηματογόνος συσκευή αποτελείται από το τριχοθυλάκιο, το στέλεχος της τρίχας, τους σηγηματογόνους αδένες και τον ορθωτήρα μυ της τρίχας. Τα τριχικά θυλάκια βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος με εξαίρεση τα χείλη, τις παλάμες και τα πέλματα. Στο κατώτερο άκρο του τριχοθηλακίου σχηματίζεται ο βολβός της τρίχας, ο οποίος συνδέεται με απολήξεις νεύρων και με αιμοφόρα αγγεία. Τα αιμοφόρα αγγεία συντελούν στον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων, τα οποία βρίσκονται στο βολβό της τρίχας, και στην παραγωγή του στελέχους της. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι παρόμοιος με αυτόν των επιδερμικών κυττάρων, αλλά ταχύτερος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαφοροποιούνται και σχηματίζουν το στέλεχος της τρίχας, το οποίο είναι κατασκευασμένο από σκληρή κερατίνη (Zaidi & Lanigan, 2010).

1.1.7.2 Σμηγηματογόνοι αδένες

Οι σμηγηματογόνοι αδένες, οι οποίοι θεωρούνταν εξελικτικά κατάλοιπα με λίγη έως και καθόλου φυσιολογική σημασία στους ανθρώπους, πλέον εμφανίζονται ως βασικοί παράγοντες της φυσιολογικής λειτουργίας του δέρματος. Αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από την ενίσχυση της λειτουργίας του φραγμού του δέρματος, οι σμηγηματογόνοι αδένες σχετίζονται με τη νευροανοσοποιητική ρύθμιση μέσω της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας και των μονοπατιών σηματοδότησης (Szollosi et al., 2018).

Όσον αφορά στις λειτουργίες του δέρματος, οι σμηγματογόνοι αδένες παράγουν το σμήγμα, ένα μίγμα από σκουαλένιο, εστέρες κηρών, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, το οποίο εκκρίνεται στο τριχοθυλάκιο. Το σμήγμα φθάνει στην επιφάνεια του δέρματος και δημιουργείται ένα λιπιδικό υμένιο, το οποίο λιπαίνει και προστατεύει το δέρμα ενώ παράλληλα βοηθά στη ρύθμιση του pH του δέρματος (Schaefer, 2008).

1.1.7.3 Ιδρωτοποιοί αδένες

Στο ανθρώπινο δέρμα υπάρχουν δύο τύποι ιδρωτοποιών αδένων. Οι εκκριτικοί αδένες εμφανίζονται στο μεγαλύτερο μέρος του σώματός και ανοίγουν απευθείας στην επιφάνεια του δέρματός σας. Οι αποκριτικοί αδένες ανοίγουν στο θυλάκιο των τριχών οδηγώντας στην επιφάνεια του δέρματος. Οι αποκριτικοί αδένες αναπτύσσονται σε περιοχές άφθονες σε θύλακες τριχών, όπως στο τριχωτό της κεφαλής, τις μασχάλες και τη βουβωνική χώρα (Hu et al., 2018).

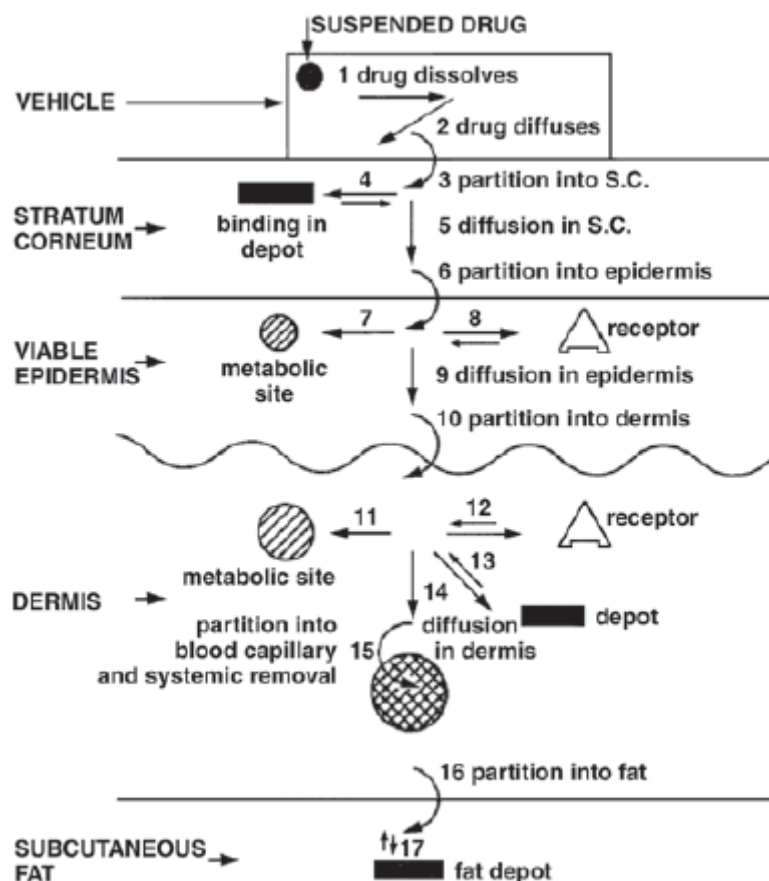
Οι ιδρωτοποιοί αδένες βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια τα δέρματος και εκκρίνουν τον ιδρώτα ελεγχόμενοι από το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Ο ιδρώτας είναι υποτονικό υδατικό διάλυμα με ουδέτερο ή ελαφρά όξινο pH. Η σύνθεση του ιδρώτα ποικίλει και αποτελείται κυρίως από ιόντα Na^+ , K^+ και Cl^- , ουρία, αμινοξέα και μικρές ποσότητες σακχάρου. Οι ιδρωτοποιοί αδένες σχετίζονται με τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (η εξάτμιση του ιδρώτα προκαλεί ψύξη του δέρματος) ένα ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο διάλυμα ιονικής φύσεως (Schaefer, 2008).

1.2 ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ: ΤΟ ΔΕΡΜΑ ΩΣ ΟΔΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

1.2.1 Εισαγωγή στη διαδερμική απορρόφηση

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.1, όσον αφορά στη διαδερμική διαπερατότητα των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών και κατά συνέπεια στην επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος, η κεράτινη στοιβάδα (*stratum corneum*) είναι αυτή που συνιστά τον πραγματικό φραγμό και η διαπέρασή της αποτελεί το περιοριστικό βήμα για τη διαδερμική απορρόφηση (Skelly et al. 1987).

Ως διαδερμική απορρόφηση ορίζεται το φαινόμενο της παθητικής διάχυσης διαμέσου του δέρματος χημικών και φαρμακολογικά δραστικών ουσιών (Shah, 2014). Η διαδερμική απορρόφηση περιλαμβάνει αρκετά στάδια (Barry, 1983). Τα στάδια αυτά απεικονίζονται στην παρακάτω Εικόνα Α9.



Εικόνα Α9: Απεικόνιση των σταδίων της διαδερμικής διαπερατότητας και απορρόφησης των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών (Wiechers et al., 2004)

Αρχικά, η δραστική ουσία θα πρέπει να διαχυθεί μέσα από το φαρμακευτικό σκεύασμα (formulation) στην επιφάνεια του δέρματος. Έπειτα, κατανέμεται στο δέρμα, διαχέεται μέσω

της κεράτινης στοιβάδας και κατανέμεται στη ζώσα επιδερμίδα (viable epidermis). Στη συνέχεια, διαχέεται μέσω της ζώσας επιδερμίδας και κατανέμεται στη δερμίδα στην οποία κατανέμεται και από εκεί διαχέεται και κατανέμεται στις λιπώδεις περιοχές του υποδόριου ιστού είτε ανακατανέμεται μέσω των τριχοειδών αγγείων στο δερμοεπιδερμικό ιστό. Επίσης, μέσω της δερμίδας μπορεί να παραλειφθεί από τα αιμοφόρα αγγεία και με αυτόν τον τρόπο να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία. Έτσι, συμπεραίνεται ότι τόσο η διάχυση όσο και η κατανομή αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για τη διαδερμική διαπερατότητα και απορρόφηση (Wiechers et al., 2004).

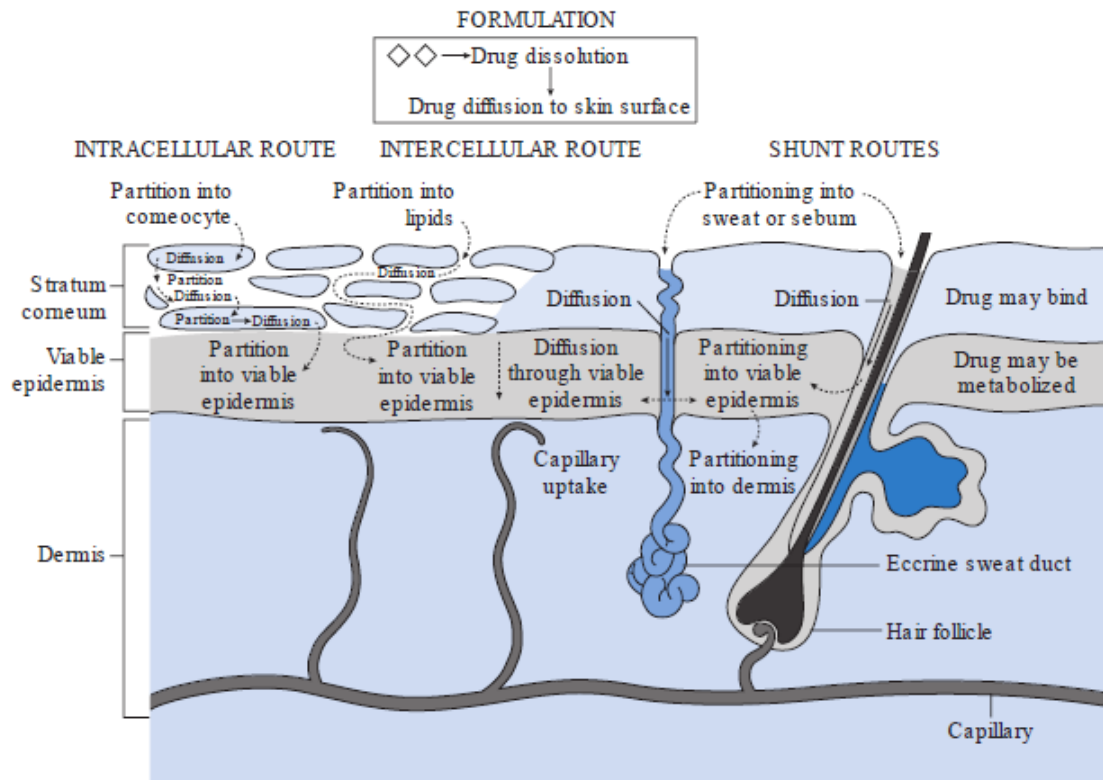
1.2.2 Βασικές αρχές διαπερατότητας φαρμακολογικά δραστικών ουσιών δια μέσου του δέρματος

Σύμφωνα με τα όσα έχουν ήδη αναφερθεί, η διαδερμική απορρόφηση μπορεί να οριστεί ως το φαινόμενο της παθητικής διάχυσης μιας χημικής ουσίας, όπως μίας φαρμακολογικά δραστικής ουσίας, από την εξωτερική επιφάνεια του δέρματος μέσω των διαφόρων στοιβάδων της στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Εύκολα γίνεται αντιληπτό ότι το φαινόμενο αυτό της παθητικής διάχυσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο.

Οι μηχανισμοί μεταφοράς με τους οποίους οι ΦΔΟ διαπερνούν το άθικτο δέρμα δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Η ενεργός μεταφορά φαίνεται πως έχει περιορισμένο ρόλο και οι πιθανές διαδρομές (οδοί) είναι πιθανό να περιλαμβάνουν (Otberg et al., 2004, Dayan, 2005):

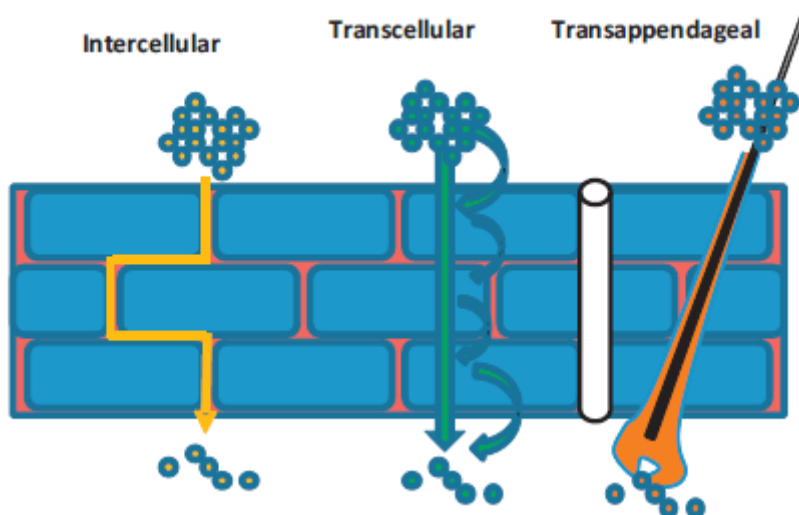
- Τη διαδερμική οδό κατά την οποία η φαρμακολογικά δραστική κατανέμεται αρχικά στην πιο λιπόφιλη κεράτινη στοιβάδα και ακολουθεί παθητική διάχυση (α) είτε διαμέσου του συμπλέγματος των πρωτεϊνών με τα κύτταρα της κεράτινης στοιβάδας (διακυττάρια ή ενδοκυττάρια οδός - intracellular or transcellular pathway) (β) είτε διαμέσου των λιπιδικών διπλοστοιβάδων (παρακυττάρια ή εξωκυττάρια οδός - intercellular or paracellular or extracellular pathway).
- Τα τριχοειδή θυλάκια και τους ιδρωτοποιούς αδένες, δηλαδή τα εξαρτήματα της επιδερμίδας (shunt routes) με τη φαρμακολογικά δραστική ουσία να κατανέμεται στο σμήγμα και να ακολουθεί παθητική διάχυση διαμέσου των λιπιδίων του σμηγματογόνου πόρου

Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις το δραστικό συστατικό κατανέμεται στην περισσότερο υδρόφιλη ζώσα επιδερμίδα και διαμέσου των κυττάρων αυτής και του χόριου εισέρχεται στα τριχοειδή που με τη σειρά τους θα το μεταφέρουν στη συστηματική κυκλοφορία (Nakashima et al., 1987). Στην παρακάτω Εικόνα A10 παρουσιάζονται οι μηχανισμοί με τους οποίους είναι πιθανό μία φαρμακολογικά δραστική ουσία να διαπεράσει το φραγμό του δέρματος και να εισέλθει τελικά στη γενική κυκλοφορία.

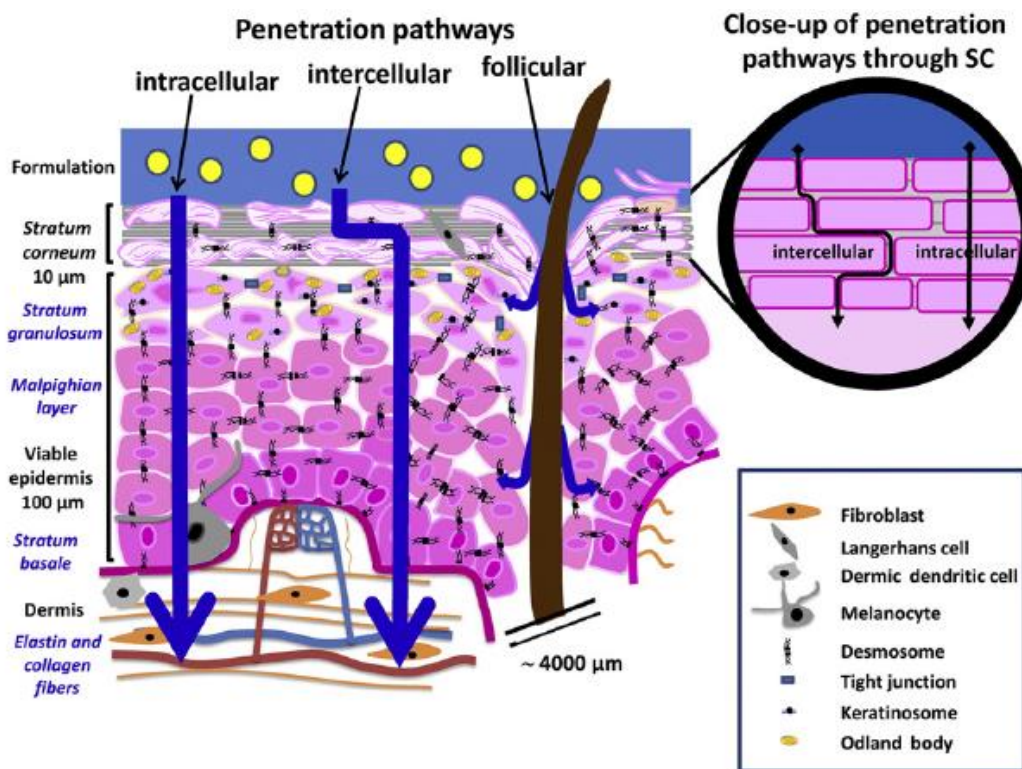


Εικόνα Α10: Απεικόνιση των μηχανισμών διαπέρασης των ΦΔΟ διαμέσου του δέρματος (Williams, 2013)

Η διείσδυση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών διαμέσου των κερατινοκυττάρων και των λιπιδικών περιοχών που παρεμβάλλονται, δηλαδή μέσω της ενδοκυττάριας οδού, περιλαμβάνει τη μεσολάβηση φορέα της ουσίας και μηχανισμούς ενεργούς μεταφοράς. Η παρακυττάρια οδός θεωρείται ότι είναι η κύρια διαδρομή διείσδυσης των χημικών ουσιών διαμέσου του δέρματος και πραγματοποιείται διαμέσου των λιπιδικών στοιβάδων που βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων, επιτρέποντας τη διαπέραση των μορίων. Η παρακυττάρια διαδρομή αποδίδει πολύ ταχύτερη απορρόφηση λόγω του υψηλού συντελεστή διάχυσης των περισσότερων φαρμακολογικά δραστικών ουσιών. Ο φυσικός φραγμός της διακυττάριας οδού είναι η λιπιδική μήτρα των μεμβρανών, ενώ της παρακυττάριας οδού είναι οι ενδοκυτταρικές συνδέσεις (Pagliara et al., 1999). Επιπλέον, στην απορρόφηση ουσιών από το δέρμα, συμβάλλουν, σε μικρότερο βαθμό, τα εξαρτήματα του δέρματος, όπως τα τριχοθηλάκια με τους σμηγματογόνους αδένες και οι ιδρωτοποιοί αδένες (Lademann et al., 2006). Στις επόμενες Εικόνες Α11 και Α12 παρουσιάζονται οι μηχανισμοί διαδερμικής απορρόφησης των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών.



Εικόνα A11: Απεικόνιση των τριών μηχανισμών διαπέρασης της κεράτινης στοιβάδας από μία φαρμακολογικά δραστική ουσία (Lane, 2013)



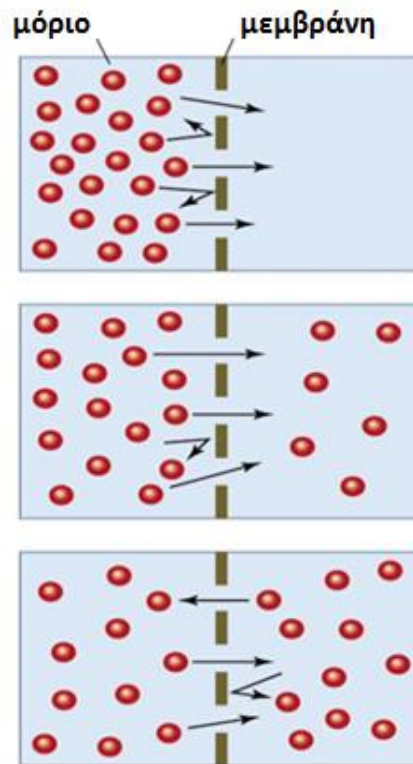
Εικόνα A12: Απεικόνιση των τριών μηχανισμών/μονοπατιών διαδερμικής διαπέρασης: ενδοκυττάρια οδός, παρακυττάρια οδός και μέσω των τριχοθυλακίων (Bolzinger et al., 2012)

1.2.3 Κινητική της διαδερμικής απορρόφησης

1.2.3.1 Θεωρία της παθητικής διάχυσης

Η μεταφορά των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών διαμέσου του δέρματος διέπεται από τους νόμους της διάχυσης, και πιο συγκεκριμένα, της παθητικής διάχυσης (Singh & Singh, 1993). Παθητική διάχυση είναι η διαδικασία μεταφοράς της μάζας από μία περιοχή

υψηλότερης συγκέντρωσης ενός συστήματος σε μία άλλη χαμηλότερης συγκέντρωσης εξαιτίας της αυθόρμητης μοριακής κίνησης (Lane, 2013).



Εικόνα A13: Σχηματική απεικόνιση της παθητικής διάχυσης των μορίων (Διαθέσιμο σε: <https://www.yourdictionary.com/diffusion>)

1.2.3.2 Νόμοι της διάχυσης

Η διάχυση των μη ιονισμένων χημικών ενώσεων διαμέσου μιας μεμβράνης ή οποιουδήποτε ομοιογενούς φραγμού, η οποία πραγματοποιείται μέσω απλής μοριακής διαπέρασης ή κίνησης μέσω πόρων ή διαύλων, διέπεται και εκφράζεται από τον πρώτο και δεύτερο νόμο του Adolf Fick (Lane, 2013).

Πρώτος Νόμος του Fick

Μελετώντας διάλυμα της χημικής ουσίας, η οποία διαχέεται αυθόρμητα από χώρο υψηλής συγκέντρωσής της προς το χώρο της χαμηλότερης συγκέντρωσής της, παρατηρείται μετακίνηση της διαλυμένης ουσίας αντίθετη με τη μεταβολή της συγκέντρωσής της. Η ποσότητα της ύλης που μετακινείται, είναι ανάλογη με τη διαφορά των συγκεντρώσεών της. Η σχέση που συνδέει τη ροή, J , της ύλης προς τη διαβαθμισμένη συγκέντρωση (dC/dx) μπορεί να εκφρασθεί και να περιγραφεί χρησιμοποιώντας τον πρώτο νόμο του Fick. Ο πρώτος νόμος του Fick δηλώνει ότι η ροή είναι ανάλογη με τη διαφορά της συγκέντρωσης των μορίων της χημικής ουσίας που περνούν διαμέσου της μεμβράνης ή του φραγμού. Ο πρώτος νόμος του Fick παρουσιάζεται μέσω της παρακάτω Εξίσωσης 1 (Moss et al., 2002):

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

Εξίσωση 1: 1^{ος} Νόμος του Fick που εκφράζει την παθητική διάχυση

Όπου:

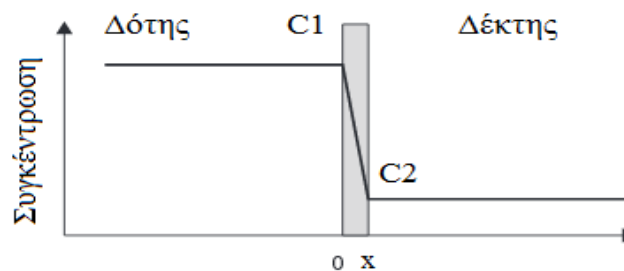
J είναι η ροή (g/cm²sec),

D είναι ο συντελεστής διάχυσης (σταθερά διάχυσης) του παράγοντα διεύθυνσης (cm²/sec),

C είναι η συγκέντρωση των μορίων της ουσίας (g/cm³) και

x η απόσταση που διανύει η ουσία κάθετα προς την επιφάνεια του φραγμού (cm).

Ο παράγοντας dC/dx εκφράζει την ανομοιομορφία της κατανομής της χημικής ουσίας στο συγκεκριμένο σημείο. Το αρνητικό πρόσημο της Εξίσωσης 1 εκφράζει ότι η ροή της μετακινούμενης ύλης είναι αντίθετη από την κατεύθυνση της διάχυσης που αυξάνει τη συγκέντρωσή της. Δηλαδή, η διαχεόμενη ύλη προχωράει προς τις περιοχές, όπου ελαττώνεται η συγκέντρωσή της. Έτσι, η ροή αποτελεί πάντα μια θετική ποσότητα.

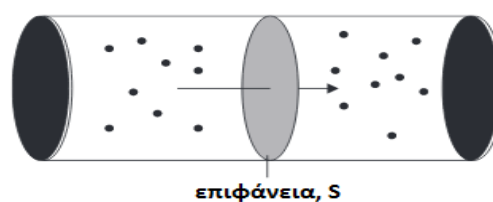


Εικόνα A14: Απεικόνιση της κατεύθυνσης της παθητικής διάχυσης, όπου C1>C2 (Steffansen, 2010)

Η ροή, J, είναι η ποσότητα της ύλης, M, η οποία διαχέεται κάθετα από τη μονάδα επιφάνειας του φραγμού, S, στη μονάδα του χρόνου, t, και ορίζεται σύμφωνα με την παρακάτω Εξίσωση 2.

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

Εξίσωση 2: Η ροή, J (g/cm²sec)



Εικόνα A15: Απεικόνιση της ροής, δηλαδή της κίνησης των μορίων μέσω της εγκάρσιας διατομής της μεμβράνης σε μία δεδομένη χρονική στιγμή (Steffansen, 2010)

Η κίνηση της μάζας, M , θα σταματήσει, όταν ο όρος dC/dx προσεγγίζει την τιμή μηδέν. Η κατάσταση, κατά την οποία η συγκέντρωση της διαχεόμενης ένωσης δεν μεταβάλλεται με το χρόνο, ονομάζεται σταθεροποιημένη κατάσταση (steady state).

Δεύτερος Νόμος του Fick

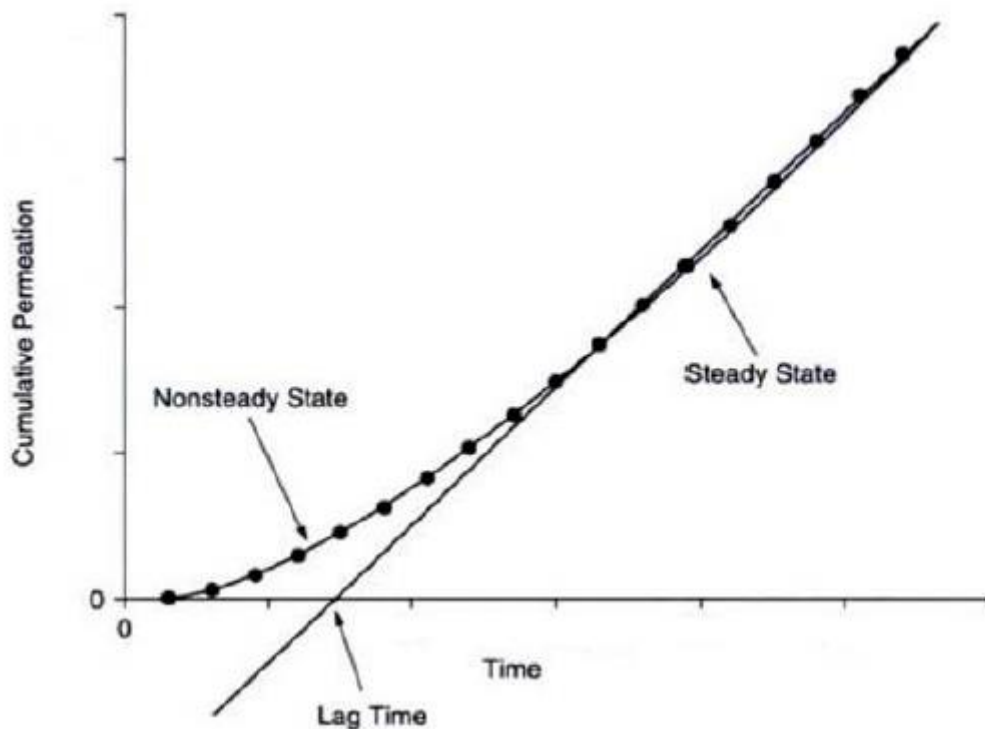
Όταν οι συνθήκες είναι σταθερές με το χρόνο, ισχύει ο πρώτος νόμος του Fick. Όμως, σε περιπτώσεις που η συγκέντρωση της χημικής ουσίας μεταβάλλεται με την απόσταση, αλλά και με το χρόνο, ισχύει ο δεύτερος νόμος του Fick. Μελετώντας ένα σύστημα σταθερού όγκου, όπου υπάρχει μία διαλυμένη ουσία με διαβαθμισμένη συγκέντρωση, παρατηρείται πως η μεταβολή της συγκέντρωσης της χημικής ουσίας μέσα στο σύστημα σε σχέση με το χρόνο ($\Delta C/\Delta t$) είναι αποτέλεσμα της διαφοράς της εισερχόμενης από την εξερχόμενη ποσότητα της ουσίας.

Όμως, αυτή η διαφορά είναι συνάρτηση της μεταβολής της ροής της χημικής ουσίας με την απόσταση ($\Delta J/\Delta x$). Επομένως, η μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας με το χρόνο ισούται με τη μεταβολή της ροής της διαχεόμενης ουσίας με την απόσταση. Ο δεύτερος νόμος του Fick, ο οποίος περιγράφεται από την παρακάτω Εξίσωση 3, εκφράζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της διαχεόμενης ένωσης σε οποιοδήποτε σημείο, και μόνο όχι σε μια μονάδα επιφάνειας του φραγμού, στη μονάδα του χρόνου, δηλαδή την τρισδιάστατη διάχυση υπό μεταβαλλόμενο χρόνο (Mitragotri et al., 2011, Crank, 1975).

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

Εξίσωση 3: 2^{ος} Νόμος του Fick

Κάθε σημείο του χώρου μπορεί να έχει μια διαφορετική τιμή ροής. Ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης είναι ανάλογος της διαφοράς της ροής από το ένα μέρος του χώρου στο άλλο. Η συγκέντρωση της ουσίας μειώνεται με το χρόνο, καθώς αυτή διαχέεται στη μεμβράνη, και ταυτόχρονα αυξάνεται, καθώς εισέρχεται σε αυτή έως ότου επιτευχθεί ισορροπία, δηλαδή όταν ο όρος dC/dt γίνει μηδέν. Η συγκέντρωση, όμως, δεν σταθεροποιείται άμεσα, αλλά διαφέρει ελαφρώς με το χρόνο και η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως ημισταθερή κατάσταση (quasistationary state). Ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη ομοιόμορφης συγκέντρωσης της ουσίας μέσα στη μεμβράνη είναι γνωστός ως χρόνος υστέρησης, t_L (Lag Time).



Εικόνα A16: Ένα τυπικό διάγραμμα μίας μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας (Alkilani et al., 2015)

1.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, οι οποίοι μπορούν να διακριθούν στους βιολογικούς και στους φυσικοχημικούς. Το πάχος της μεμβράνης (κεράτινη στοιβάδα) έχει γενικά αναγνωριστεί να είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη ροή, αν και έχει προταθεί ότι το περιεχόμενο και η σύσταση των λιπιδίων έχουν επίδραση στη διαδερμική απορρόφηση (Elias et al., 1981).

Επίσης, είναι γνωστό ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας επηρεάζουν την ικανότητά της να διεισδύει διαμέσου του δέρματος (Moss, 2015). Σε αυτήν την παράγραφο του Κεφαλαίου 1.2 θα αναλυθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του δραστικού συστατικού, οι οποίες επιδρούν και έχουν αντίκτυπο στη διαδερμική απορρόφηση.

Αμέσως παρακάτω θα αναλυθούν οι βιολογικοί παράγοντες.

1.2.4.1 Ανατομική θέση

Η περιοχή εφαρμογής του διαδερμικού φαρμακευτικού προϊόντος έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει την απορρόφηση πολλών φαρμακολογικά δραστικών ουσιών. Γενικά, θεωρείται ότι το δέρμα στο όσχεο και η περιοχή πίσω από το αυτί έχουν την υψηλότερη διαπερατότητα, ενώ το δέρμα στα πέλματα, στις παλάμες και στους μηρούς εμφανίζει τη χαμηλότερη διαπερατότητα. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από την εγγενή βιολογική παραλλαγή του δέρματος και ειδικότερα από

τις διαφορές στον αριθμό των ωθυλακίων, στο πάχος της κεράτινης στοιβάδας, και γενικότερα της επιδερμίδας, στη σύσταση του σμήγματος, καθώς και στην απόσταση των τριχοθυλακίων και των εξαρτημάτων του δέρματος (Feldman & Gibaldi 1967).

1.2.4.2 Ηλικία του δέρματος

Η ηλικία δέρματος έχει άμεση επίδραση στη δομή και την εμφάνιση του δέρματος και κατά συνέπεια στη διαπεράση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών διαμέσου αυτού. Η κεράτινη στοιβάδα με το πέρασμα των ετών γίνεται ξηρότερη, καθώς η δραστηριότητα των σμηγματογόνων αδένων, τα λιπίδια της κεράτινης στοιβάδας, το κολλαγόνο, καθώς και η ελαστίνη μειώνονται. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η διαπερατότητα του δέρματος μειώνεται, καθώς η ηλικία αυξάνεται (Waller & Maibach, 2006). Αντίθετα, στα νεογέννητα ο σχηματισμός του φραγμού δεν είναι πλήρης, η περιεκτικότητα σε νερό είναι υψηλότερη και οι μηχανισμοί μεταβολισμού είναι μη επαρκώς αποτελεσματικοί, με συνέπεια την ιδιαίτερα αυξημένη διαπερατότητα (Rogers et al., 1996).

1.2.4.3 Κατάσταση του δέρματος

Η κατάσταση του δέρματος σχετίζεται άμεσα με την ακεραιότητα της κεράτινης στοιβάδας και συνεπώς, με τη λειτουργικότητα του φραγμού. Η ακεραιότητα του δέρματος επηρεάζεται από οποιαδήποτε αλλαγή ή βλάβη της δομής της κεράτινης στοιβάδας, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας. Επίσης, διάφορες δερματικές παθήσεις, όπως η ατοπική δερματίτιδα και η ψωρίαση, οδηγούν σε διακοπή της συνέχειας του φραγμού ή/και σε τροποποίηση της λιπιδικής σύνθεσης της κεράτινης στοιβάδας, με αποτέλεσμα την αυξημένη διαπερατότητα (Yamamoto et al., 1991).

1.2.4.4 Δέρμα από διαφορετικά είδη

Είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφορές στην απορρόφηση των χημικών ουσιών ανάμεσα στο ανθρώπινο δέρμα και στο δέρμα ζωικής προέλευσης. Οι διαφορές στη σύνθεση των λιπιδίων, στη δομή και στο πάχος της κεράτινης στοιβάδας, καθώς και ο αριθμός των εξαρτημάτων της επιδερμίδας αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που μπορούν να εξηγήσουν τις διαφορές στη διαδερμική διαπερατότητα. Παρόλο που η διαπεράση μεταξύ των ειδών διαφοροποιείται, αρκετά συχνά για τις *in vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιείται δέρμα από ζώα, συχνότερα άτριχων ποντικών ή ινδικών χοιριδίων, καθώς το ανθρώπινο δέρμα δεν είναι εύκολα διαθέσιμο. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, αρκετά μεγάλο ποσοστό μελετών πραγματοποιείται με τεχνητές μεμβράνες, όπως π.χ. η Strat-M® Transdermal Diffusion Membrane, που δεν παρουσιάζουν μεταβλητότητα από παρτίδα σε παρτίδα, αλλά ούτε και περιορισμούς ως προς τη χρήση και την αποθήκευση (Uchida et al., 2015, Haq et al., 2018).

1.2.4.5 Μεταβολισμός από το δέρμα

Το κύριο μεταβολικό όργανο του ανθρώπου είναι το ήπαρ. Το δέρμα διατηρεί κάποια ήπια μεταβολική ικανότητα, καθώς περιέχει ένζυμα, κυρίως εστεράσες, που μπορούν να είναι πολύ δραστικά στην αποικοδόμηση ενδογενών και ξενοβιοτικών παραγόντων (Denyer et al. 1985).

1.2.4.6 Βαθμός ενυδάτωση του δέρματος

Προκειμένου να είναι αποτελεσματική η λειτουργία φραγμού της κεράτινης στοιβάδας, θα πρέπει η ενυδάτωση του δέρματος να είναι επαρκής. Αν τα επίπεδα ενυδάτωσης αυξηθούν, θα υπάρξει ανάλογη αύξηση του συντελεστή διάχυσης, καθώς επίσης και τροποποίηση της ελαστικότητας, επομένως και της ευκαμψίας του (Donnelly & Singh, 2015).

Η απόφραξη (occlusion) περιορίζει την εξάτμιση του ύδατος από το δέρμα προς το περιβάλλον, με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας και της ενυδάτωσης του δέρματος (Zhai et al., 2001). Συνήθως επιτυγχάνεται με τοποθέτηση ενός αδιαπέραστου στο ύδωρ επιδέσμου στο δέρμα, προκαλείται όμως και με την εφαρμογή τοπικών σκευασμάτων, όπως οι αλοιφές (Coldman et al., 1971). Αυτή η επίδραση ορισμένων σκευασμάτων έχει οδηγήσει σε αύξηση της θεραπευτικής δράσης για μια σειρά ΦΔΟ, όπως η υδροκορτιζόνη και τα στεροειδή (Edwardson et al., 1993).

1.2.4.7 Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη φυσιολογική δομή και δραστηριότητα του δέρματος είναι πολύπλοκη επηρεάζοντας τόσο τη ροή του αίματος όσο και το μεταβολισμό. Είναι γενικά αποδεκτό ότι αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση στο ρυθμό απορρόφησης και ότι η μείωση της μπορεί να οδηγήσει σε αντίστροφα αποτελέσματα. Η διαδερμική απορρόφηση συνήθως εμφανίζεται σε ένα στενό εύρος θερμοκρασίας, μεταξύ 32° και 37° C, και δεν παρουσιάζει μεταβολή μέχρι τους 60°C. Πέρα από τη θερμοκρασία αυτή πραγματοποιούνται μη αναστρέψιμες δομικές αλλαγές στην κεράτινη στοιβάδα, όπως π.χ. διαλυτοποίηση λιπιδίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης του δέρματος (Oliveira et al., 2014).

Η αυξημένη αγγειοδιαστολή είναι ένα συχνό φαινόμενο που σχετίζεται με την απορρόφηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Η παθητική μεταφορά μέσω του δέρματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία, καθώς αρχικά λαμβάνει χώρα η διαδικασία διάχυσης (Ru et al., 2010).

Παρακάτω θα αναλυθούν οι φυσικοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση.

1.2.4.8 Μοριακό Βάρος της ΦΔΟ

Το μέγεθος της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για την ικανότητά της να διαπερνάει το φραγμό της κεράτινης στοιβάδας. Οποιαδήποτε χημική τροποποίηση γίνεται στη δομή του δραστικού συστατικού μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε σημαντικές μεταβολές στη διαδερμική απορρόφησή του, είτε αυξάνοντάς είτε μειώνοντάς τη. Το ιδανικό μοριακό βάρος της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας, η οποία πρόκειται να μορφοποιηθεί και να χορηγηθεί μέσω ενός διαδερμικού φαρμακευτικού προϊόντος είναι μικρότερο από 500 Da (Hadgraft & Valenta, 2000).

1.2.4.9 Εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της ΦΔΟ

Η αύξηση της συγκέντρωσης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας στο φορέα οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας, η οποία απορροφάται. Η μέγιστη ροή επιτυγχάνεται, όταν η συγκέντρωση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας προσεγγίζει τη διαλυτότητα κορεσμού εντός του φορέα της. Αυτό βέβαια προκύπτει και από την μαθηματική έκφραση του 1^{ου} νόμου του Fick, ο οποίος εφαρμόζεται κατά τη διάχυση ουσιών διαμέσου του δέρματος και περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.3.2.

1.2.4.10 Συντελεστή Κατανομής (Partition Coefficient)

Ο συντελεστής κατανομής, που συμβολίζεται ως LogP ή LogK_{ow}, αναφέρεται στην ικανότητα μιας ουσίας να κατανεμηθεί μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, συνήθως οκτανόλης/νερού ή επτανίου/ρυθμιστικού διαλύματος. Προκειμένου, λοιπόν, να διαπεράσει μια χημική ουσία την κεράτινη στοιβάδα, πρέπει πρώτα να κατανεμηθεί σε αυτή, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 1.2.1.

Μια φαρμακολογικά δραστική ουσία χαρακτηρίζεται ως ιδανική υποψήφια για μορφοποίηση σε διαδερμικό φαρμακευτικό προϊόν, όταν διαθέτει τόσο λιπόφιλες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι τα μόρια με ενδιάμεσες τιμές συντελεστή λιποφιλίας, δηλαδή τιμές LogP κοντά στην τιμή 3, θα διασχίσουν το φραγμό του δέρματος μέσω των λιπιδίων, αλλά και μέσω των υδατικών διαδρομών, αλλά πιθανότατα να επικρατεί η διακυτταρική οδός. Η διακυτταρική οδός παίζει πρωταρχικό ρόλο στη διαδερμική απορρόφηση για τα λιπόφιλα μόρια, δηλαδή για εκείνα με τιμές LogP μεγαλύτερες από 3. Όμως, πρέπει να αναφερθεί ότι η αυξημένη λιποφιλία της χημικής ένωσης δεν εξασφαλίζεται αυξημένη διαδερμική απορρόφηση, καθώς παρουσιάζεται μικρή κατανομή μεταξύ της λιπόφιλης κεράτινης στοιβάδας και της υδρόφιλης ζώσας επιδερμίδας (Williams, 2013).

1.2.4.11 pH - Ιονισμός

Λαμβάνοντας υπόψη τη λιπόφιλη φύση της κεράτινης στοιβάδας, θεωρείται πως η ιονισμένη μορφή ενός μορίου είναι λιγότερο πιθανό να διαπεράσει το δέρμα συγκριτικά με τη μη

ιονισμένη. Η ρύθμιση του pH του φορέα, επειδή μεταβάλλει την αναλογία μεταξύ της ιονισμένης/μη ιονισμένης μορφής, επηρεάζει τη διαλυτότητα και τελικά το ρυθμό απορρόφησης μέσω του δέρματος.

Σύμφωνα με τη θεωρία pH-μερισμού, εάν ένα μόριο βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή, τότε μπορεί εύκολα να διεισδύσει στην κεράτινη στοιβάδα μέσω της διακυτταρικής οδού. Η βάση αυτής της θεωρίας είναι ότι οι λιπόφιλες περιοχές του δέρματος δρουν ως εμπόδια στα ιονισμένα μόρια, τα οποία διέρχονται μέσω πόρων και εξαρτημάτων της επιδερμίδας. Παρά τη θεωρία 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 διαφορετικοί. Προτάθηκε πως 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 (Donnelly & Singh, 2015).

1.2.4.12 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υποψήφιων ΦΔΟ για διαδερμική χορήγηση

Από όλα τα παραπάνω γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες θα πρέπει να έχουν κάποια συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, προκειμένου να χορηγηθούν διαμέσου του δέρματος. Κάποιες από τις ιδανικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ΦΔΟ, προκειμένου αυτή να χορηγηθεί διαδερμικά παρουσιάζονται παρακάτω (Naik et al., 2002):

- Μοριακό Βάρος < 500 Da
- Συντελεστής κατανομής (λιποφιλίας) μεταξύ 1 και 5
- Σημείο τήξης < 200° C
- Μικρός χρόνος ημιζωής
- Χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα μετά από *per os* χορήγηση
- Να μην προκαλεί ερεθισμό ή αλλεργία στην περιοχή εφαρμογής

1.2.5 Διαδερμικά φαρμακευτικά προϊόντα

Τα φαρμακευτικά προϊόντα, τα οποία εφαρμόζονται στο δέρμα, μπορούν να ασκήσουν τοπική ή συστηματική δράση. Οι μέθοδοι χορήγησης φαρμακολογικά δραστικών ουσιών διαμέσου του δέρματος μπορούν να διακριθούν ανάλογα με την κατανομή του δραστικού συστατικού σε συγκεκριμένες περιοχές και ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Cannon, 2014).

Τοπική χορήγηση

Το φαρμακευτικό προϊόν εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και η φαρμακολογικά δραστική ουσία δρα τοπικά στην κεράτινη στιβάδα, χωρίς να τη διαπερνά, για την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων ή τη φροντίδα του δέρματος, όπως π.χ. η χορήγηση κορτικοστεροειδών και αντιβιοτικών δραστικών ουσιών που έχουν μορφοποιηθεί σε ημιστερεά φαρμακευτικά προϊόντα.

Διαδερμική χορήγηση

Το φαρμακευτικό προϊόν εφαρμόζεται τοπικά στην κεράτινη στιβάδα και η φαρμακολογικά δραστική ουσία, αφού πρώτα καταμεληθεί στην κεράτινη στιβάδα, διαχέεται στη ζώσα επιδερμίδα και φτάνει ως τους υποδόριους ιστούς. Στόχος είναι η ΦΔΟ να διεισδύσει και να δράσει τοπικά κάτω ακριβώς από το σημείο της εφαρμογής. Μικρές ποσότητες φαρμάκου είναι δυνατόν να εισέλθουν στα τριχοειδή αγγεία, χωρίς όμως να προκληθεί κάποια φαρμακολογική δράση, καθώς η συγκέντρωση του στη γενική κυκλοφορία είναι ελάχιστη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η χορήγηση αντιφλογμονωδών δραστικών ουσιών.

Ελεγχόμενη διαδερμική χορήγηση (Transdermal Drug Delivery Systems – TDDS)

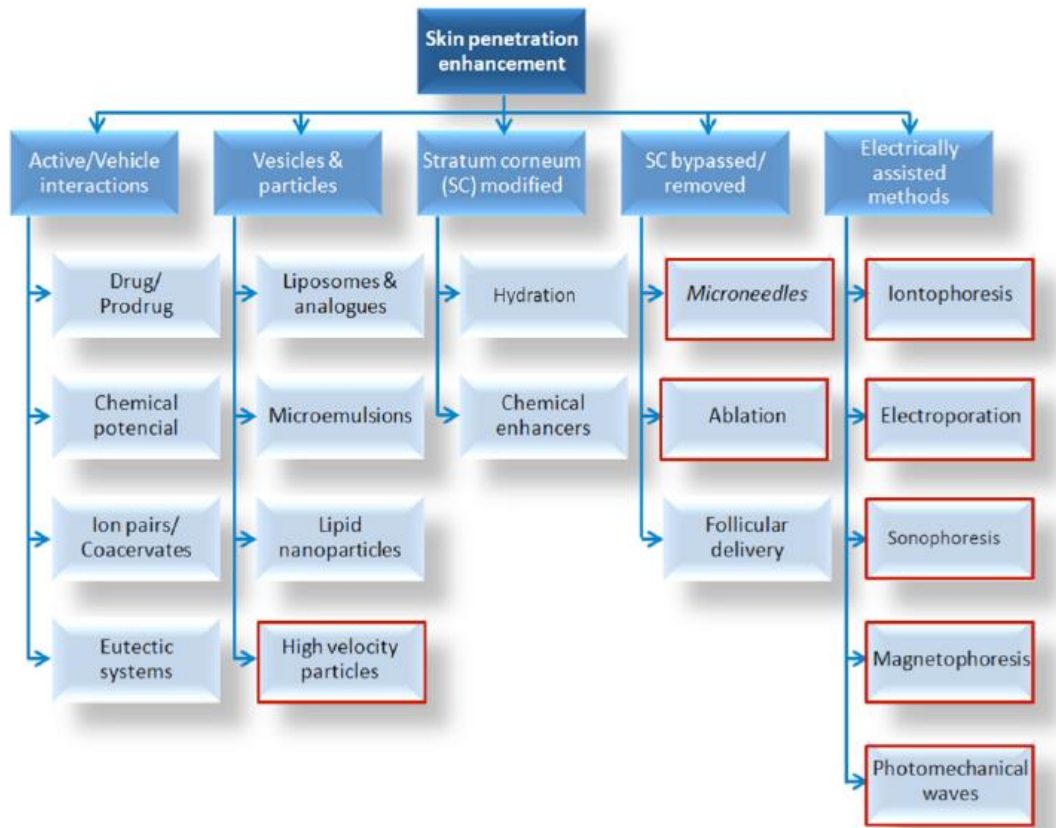
Το Διαδερμικό Θεραπευτικό Σύστημα (ΔΘΣ) εφαρμόζεται σε σημείο του σώματος, σύμφωνα με το Φύλλο Οδηγιών Χρήσης και την Περίληψη των Χαρακτηριστικών του φαρμακευτικού προϊόντος. Η ποσότητα της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που διαπερνά την κεράτινη στιβάδα και εισέρχεται στα αγγεία της επιδερμίδας και από εκεί στη γενική κυκλοφορία, είναι αρκετή για την επίτευξη συστηματικής δράσης και κατ' επέκταση φαρμακολογικό και θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η ελεγχόμενη διαδερμική χορήγηση θεωρείται ισοδύναμη της *per os* χορήγησης.

1.2.6 Βελτιστοποίηση και ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης

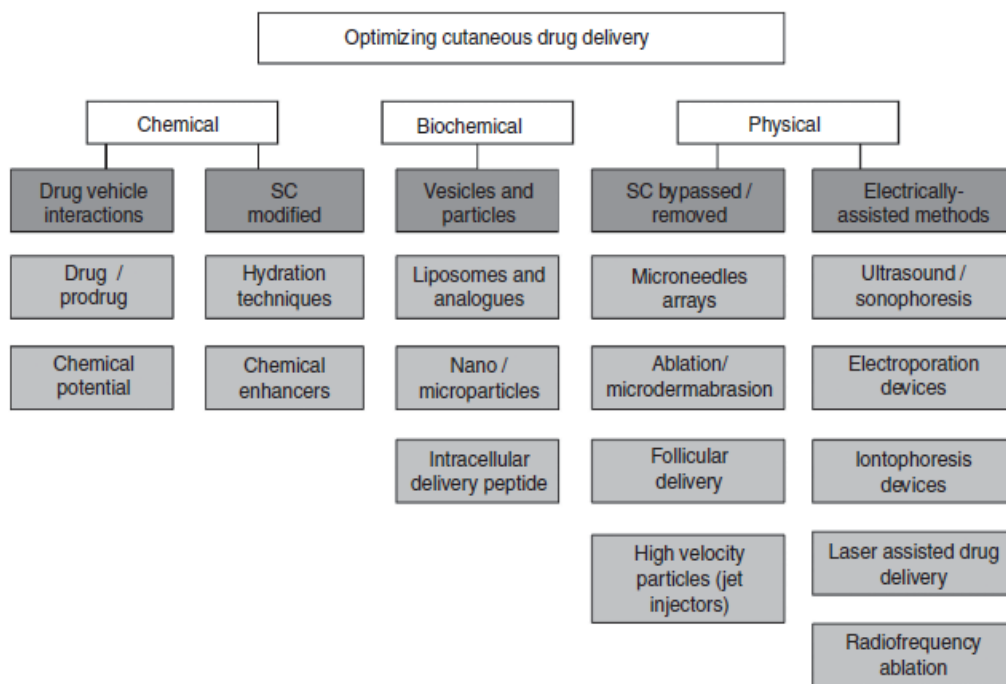
Υπό φυσιολογικές και κανονικές συνθήκες, λόγω των ιδιοτήτων του φραγμού της κεράτινης στιβάδας, η μεταφορά φαρμακολογικά δραστικών ουσιών διαμέσου του δέρματος μέσω απλών φορέων θεωρείται ανεπαρκής, προκειμένου να επιτευχθούν οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις στη θέση δράσης ή/και στον ιστό-στόχο (Adrian, 2002). Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός του φραγμού, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές με σκοπό την ενίσχυση ή/και τη βελτιστοποίηση της μεταφοράς ΦΔΟ διαμέσου του δέρματος και γενικότερα της διαδερμικής απορρόφησης.

Οι τεχνικές αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε παθητικές και ενεργές και στοχεύουν είτε στην άμεση αύξηση της διαδερμικής διαπερατότητας είτε στην παροχή της μέγιστης θερμοδυναμικά κινητήριας δύναμης (driving force) για τη φαρμακολογικά δραστική ουσία. Οι στρατηγικές αυτές περιλαμβάνονται από την απλή απόφραξη (occlusion effect) και τη

βελτιστοποίηση του φαρμακευτικού σκευάσματος/σύνθεσης (formulation), μέχρι τη χρήση φυσικών και χημικών μεθόδων ή και συνδυασμό των δύο (Alexander et al., 2012). Στις παρακάτω Εικόνα A17 και A18 απεικονίζονται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ενίσχυση ή/και βελτιστοποίηση της διαδερμικής απορρόφησης.



Εικόνα A17: Απεικόνιση των τεχνικών για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι ενεργές μέθοδοι (Vitorino et al., 2015, Barry, 2001)



Εικόνα Α18: Σύνοψη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη βελτιστοποίηση της διαδερμικής απορρόφησης (Tran, 2013)

Η πρώτη γενιά αφορά κυρίως στη βελτιστοποίηση της αλληλεπίδρασης του φορέα με τη φαρμακολογικά δραστική ουσία. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι ο σχηματισμός ενός περισσότερο λιπόφιλου προφαρμάκου, ο σχηματισμός ιονικού ζεύγους, καθώς και τα ευτηκτικά μίγματα. Η δεύτερη γενιά περιλαμβάνει κυρίως τεχνικές τροποποίησης της κεράτινης στοιβάδας, όπως είναι η διύγρυνση και η χρήση επιταχυντών διαβατότητας (Chemical Penetration Enhancers – CPEs), καθώς και φυσικές μεθόδους χορήγησης ενέργειας, όπως είναι η ιοντοφόρηση και η χρήση υπερήχων (Benson, 2005). Η τρίτη γενιά βελτιστοποίησης της διαδερμικής διαπερατότητας σχετίζεται με την παράκαμψη της κεράτινης στοιβάδας μέσω διάφορων τεχνικών, όπως είναι η ανάπτυξη μικροβελονών. Με την πάροδο των χρόνων η έρευνα σε αυτόν τον τομέα εξελίσσεται συνεχώς και έτσι, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία η χρήση laser, καθώς και διάφοροι φορείς νανοτεχνολογίας για την ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης (Munch et al., 2017).

1.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ

1.3.1 Εισαγωγή στις πειραματικές τεχνικές μελέτης της διαδερμικής απορρόφησης

Ένα σημαντικό στάδιο της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προϊόντων είναι οι προκλινικές δοκιμές, οι οποίες περιλαμβάνουν μια διαδοχική σειρά *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μελετών πριν τη χορήγηση σε ανθρώπους. Οι δοκιμές αυτές αποτελούν κανονιστική απαίτηση, προκειμένου το τελικό φαρμακευτικό προϊόν να μπορέσει να προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές (Goh et al., 2014).

Κατά την εφαρμογή διαδερμικών φαρμακευτικών προϊόντων, η διαδερμική απορρόφηση των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών περιλαμβάνει δύο διαδοχικές διαδικασίες, την αποδέσμευση του δραστικού συστατικού από το φαρμακευτικό προϊόν και την απορρόφηση του στο σημείο της εφαρμογής διαμέσου του δέρματος. Επομένως, γίνεται εύκολα κατανοητό ότι η τοπική βιοδιαθεσιμότητα του δραστικού συστατικού εξαρτάται, τουλάχιστον σε κάποιο βαθμό, από το ρυθμό αποδέσμευσής του από το φαρμακευτικό προϊόν (Wu et al., 1992).

Οι *in vivo* πειραματικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας παρέχουν περισσότερο ρεαλιστικά δεδομένα σχετικά με την εκτίμηση της έκτασης της διαδερμικής απορρόφησης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας αναλύοντας ανθρώπινα ή ζωικά σωματικά υγρά. Στη συνέχεια, υπάρχει η δυνατότητα για την εκτίμηση της κατανομής, του μεταβολισμού και της κάθαρσης του δραστικού συστατικού. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας εθελοντών, αλλά και της ταυτόχρονης αυξανόμενης πίεσης των κανονιστικών αρχών για τη μείωση του αριθμού των ζώων εργαστηρίου που χρησιμοποιούνται στις κλινικές δοκιμές, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί *in vitro* πειραματικές μέθοδοι, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν μειώσει ή ακόμα και αντικαταστήσει τη χρήση ορισμένων *in vivo* πειραματικών μελετών, με τη σύμφωνη γνώμη των ρυθμιστικών αρχών (Godin & Touitou, 2007).

Αρχικά, πραγματοποιούνται οι *in vitro* μελέτες, οι οποίες συμβάλλουν στη λήψη κάποιων προκαταρκτικών δεδομένων, τα οποία στη συνέχεια θα πλαισιώσουν και θα συμπληρώσουν τα αποτελέσματα από τις *in vivo* μελέτες, οι οποίες θα διεξαχθούν σε ζώα ή/και ανθρώπους σε επόμενα στάδια της ανάπτυξης του φαρμακευτικού προϊόντος. Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην τυποποίηση και την επικύρωση πειραματικών μεθόδων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, για τη μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης (Guth et al., 2015).

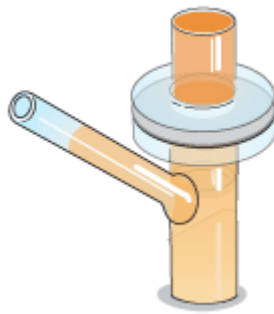
Σήμερα, υπάρχουν διάφορες πειραματικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητας φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, κάθε μία με τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι *in vitro* δοκιμές είναι γενικά πιο απλές στο χειρισμό, οικονομικότερες,

παρέχουν αποτελέσματα και πειραματικά δεδομένα πιο γρήγορα, μπορούν να αναπαραχθούν και να αυτοματοποιηθούν, και γενικότερα παρέχουν ένα περιβάλλον στο οποίο οι μεταβλητές μπορούν να ελεγχθούν πιο εύκολα περιορίζοντας τη μεταβλητότητα των πειραμάτων. Η χρήση *in vitro* τεχνικών για την εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας οδηγεί σε μείωση των κλινικών δοκιμών σε ζώα και ανθρώπους, καθώς χρησιμοποιούνται επικυρωμένες μέθοδοι, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση τεχνητών μεμβρανών ή δέρματος, το οποίο προέρχεται από χειρουργική εκτομή, με αποτέλεσμα την άρση οποιουδήποτε ηθικού περιορισμού (Flaten et al., 2015).

Παρόλα αυτά το ανθρώπινο δέρμα δεν είναι πάντα διαθέσιμο, ενώ η χρήση τεχνητών μεμβρανών για την εκτίμηση της διαδερμικής διαπερατότητας συνήθως οδηγεί σε υπερεκτιμημένη πρόβλεψη. Επίσης, οι *in vitro* πειραματικές τεχνικές αδυνατούν να παράσχουν πειραματικά δεδομένα για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων (Godin & Touitou, 2007).

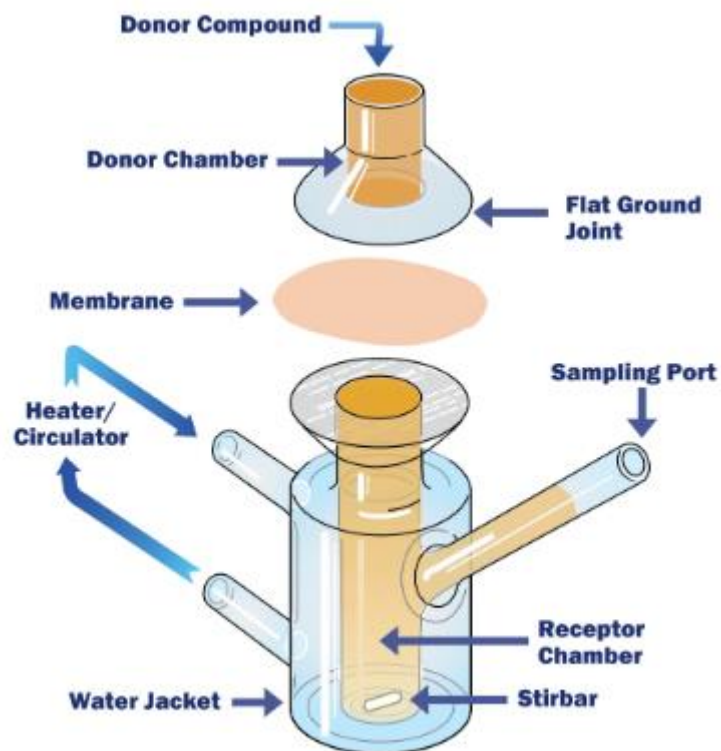
1.3.2 Κύτταρα διάχυσης (Diffusion Cells)

Τα κύτταρα διάχυσης αναπτύχθηκαν το 1975 από τον Franz (Franz, 1975) και αποτελούν σήμερα όχι μόνο την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη *in vitro* τεχνική (Levintova et al., 2011), αλλά παράλληλα συνιστούνται και από τις ρυθμιστικές αρχές για τη μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας (Simon et al., 2016). Ένα τυπικό κύτταρο διάχυσης Franz απεικονίζεται στην παρακάτω Εικόνα A19.

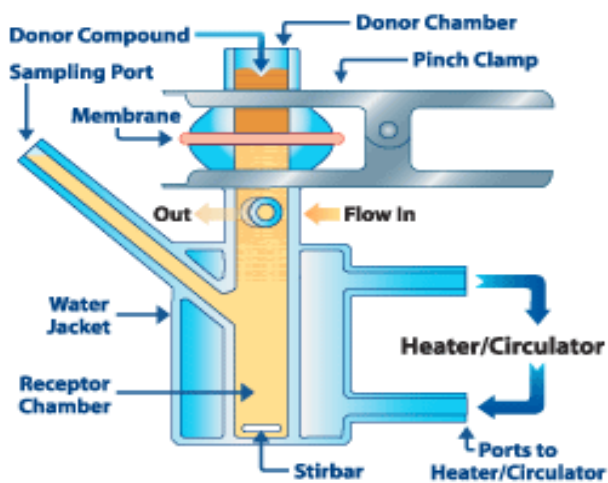


Εικόνα A19.: Απεικόνιση ενός τυπικού κυττάρου διάχυσης Franz (Διαθέσιμο σε: <http://www.permegear.de/vertical.htm>)

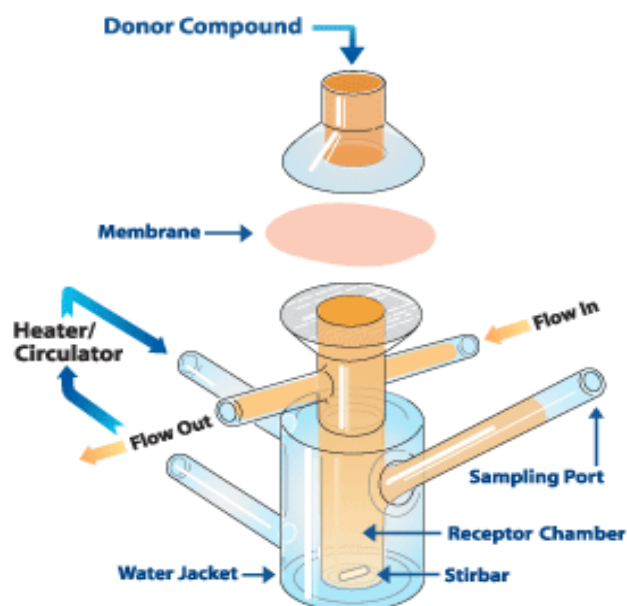
Ανάλογα με την ανάλογα με την κατασκευή τους, τα κύτταρα διάχυσης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τα στατικά κύτταρα, κάθετου ή οριζόντιου σχεδιασμού, και τα flow through κύτταρα διάχυσης. Αξίζει να αναφερθεί πως έχει δημοσιευθεί κατευθυντήρια οδηγία για τη μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης χημικών ουσιών με τη χρήση είτε στατικών κυττάρων διάχυσης είτε του συστήματος συνεχόμενης ροής (OECD, 2004). Στις παρακάτω Εικόνες A20 και A21 παρουσιάζονται ένα στατικό κύτταρο διάχυσης και ένα κύτταρο συνεχόμενης ροής αντίστοιχα.



Εικόνα Α20: Απεικόνιση ενός στατικού κυττάρου διάχυσης Franz (Διαθέσιμο σε: <https://permeagear.com/franz-cells/>)



Εικόνα Α21α: Απεικόνιση ενός κυττάρου διάχυσης συνεχούς ροής (Διαθέσιμο σε: <https://permeagear.com/franz-cells/>)



Εικόνα A21β: Απεικόνιση ενός κυτάρου διάχυσης συνεχούς ροής (Διαθέσιμο σε: <https://permegear.com/franz-cells/>)

Όπως φαίνεται και στα παραπάνω γραφήματα, οι δύο αυτοί τύποι κυτάρων διάχυσης εμφανίζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Αρχικά, αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα του δότη (donor compartment) και το διαμέρισμα του δέκτη (receptor compartment), τα οποία χωρίζονται από μία μεμβράνη, όπως ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα ή δέρμα ζωικής προέλευσης, π.χ. δέρμα προερχόμενο από αυτί χοίρου (pig ear skin), ή τεχνητή μεμβράνη.

Το διαμέρισμα του δότη περιέχει το φαρμακευτικό σκεύασμα/σύνθεση (formulation), το οποίο περιέχει την υπό εξέταση φαρμακολογικά δραστική ουσία και εφαρμόζεται πάνω στη μεμβράνη, η οποία χωρίζει τα δύο διαμερίσματα. Ανάλογα με το ποιο σενάριο μιμείται καλύτερα την πραγματική εφαρμογή του φαρμακευτικού προϊόντος, το διαμέρισμα του δότη μπορεί να είναι ανοιχτό, ημι-ανοιχτό, ή κλειστό ως προς την ατμόσφαιρα. Η δραστική ουσία διαχέεται διαμέσου της μεμβράνης και περνά στο διαμέρισμα του υποδοχέα. Η υπό δοκιμή ουσία εφαρμόζεται στην επιφάνεια του δέρματος, η οποία με τη σειρά της διαχωρίζει τους θαλάμους δότη (donor chamber) και υποδοχέα (receptor chamber). Η ποσότητα της ουσίας που διαπερνά προσδιορίζεται στο υγρό του υποδοχέα ως συνάρτηση του χρόνου (Levintona et al., 2011). Η λειτουργία, καθώς και η λεπτομερής περιγραφή της χρήσης των στατικών κυτάρων διάχυσης Franz αναφέρεται λεπτομερώς στο Πειραματικό Μέρος. Παρακάτω θα αναλυθεί η λειτουργία του συστήματος των κυτάρων διάχυσης συνεχούς ροής.

Το σύστημα των κυτάρων διάχυσης συνεχούς ροής χαρακτηρίζεται από τη συνεχή αντικατάσταση του διαλύματος του υποδοχέα για τη διατήρηση των φυσιολογικών συνθηκών, σε μια προσπάθεια προσομοίωσης της κυκλοφορίας του αίματος (Bronaugh &

Stewart, 1985). Το διάλυμα του υποδοχέα εισέρχεται στο διαμέρισμα του δέκτη με μία περισταλτική αντλία, συνήθως με ροή 1-2 mL/h, η οποία αποσκοπεί στην προσομοίωση της ροής του αίματος κάτω από το δέρμα, και αναδύεται ομοιόμορφα με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (Addicks et al., 1987, Moss, 2015).

Το διάλυμα του υποδοχέα, αφού εξέλθει από το κύτταρο, εισέρχεται σε ένα σωλήνα από τεφλόν και το έκλουσμα που προκύπτει, συλλέγεται σε φιαλίδια που βρίσκονται σε έναν αυτόματο συλλέκτη, ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη συλλογή από έναν αριθμό κυττάρων. Το διάλυμα του υποδοχέα δεν χρειάζεται αντικατάσταση από τον ερευνητή μετά τη δειγματοληψία, καθώς ανανεώνεται αυτόματα μέσω της αντλίας. Η θερμοκρασία του πειράματος διατηρείται στους 32° C με τη χρήση δεξαμενής νερού ελεγχόμενης θερμοκρασίας (Bronaugh & Stewart, 1985, Addicks et al., 1987, Moss, 2015).

Τα κύτταρα συνεχούς ροής παρέχουν τη δυνατότητα διατήρησης των συνθηκών δεξαμενής καθόλη τη διάρκεια του πειράματος λόγω της συνεχούς ροής του υγρού μέσου, ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό για ενώσεις που έχουν υψηλό συντελεστή διαπερατότητας ή ενώσεις με χαμηλή διαλυτότητας. Επιπλέον, μπορεί να μελετηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους η αποδέσμευση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας από δοσολογικές μορφές, καθώς αυτή η μέθοδος εξαλείφει τα ζητήματα που προκύπτουν από την εξάτμιση, όπως συμβαίνει με άλλες συσκευές. Επίσης, η αυτοματοποιημένη δειγματοληψία καθιστά τα κύτταρα συνεχούς ροής πολύ πιο βολικά στη χρήση, ιδίως για πειράματα που διεξάγονται επί μακρά χρονικά διαστήματα επιτρέποντας την εξοικονόμηση έργου και χρόνου. Επιπλέον, η ανάπτυξη *in vitro* - *in vivo* συσχετίσεων καθίσταται πιο ακριβής και αξιόπιστη, καθώς λόγω προσομοιάζονται καλύτερα οι *in vivo* συνθήκες (Fotaki, 2011, Moss, 2015).

Όσον αφορά στα μειονεκτήματα αυτού του συστήματος, τα κύτταρα συνεχούς ροής είναι πιο πολύπλοκα και ουσιαστικά πιο ακριβά από τα στατικά κύτταρα Franz. Επιπλέον, είναι δυνατή η απορρόφηση υδρόφοβων δραστικών ουσιών από τις πλαστικές σωληνώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη συλλογή του υγρού μέσου, και ο εγκλωβισμός φυσαλίδων κάτω από την επιφάνεια της μεμβράνης λόγω της ανομοιογενούς ανάμιξης του διαλύματος του δέκτη που οφείλεται στο μεγάλο όγκο του. Κατά συνέπεια, η χρήση των στατικών κυττάρων διάχυσης Franz είναι πιο συχνή από τη χρήση των κυττάρων συνεχούς ροής (Moss, 2015).

1.3.3 Μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στις *in vitro* μελέτες

Η επιλογή του κατάλληλου *in vitro* μοντέλου για την πρόβλεψη της διαδερμικής διαπερατότητας αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων, τα οποία θα εφαρμοσθούν στο δέρμα. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα μεμβρανών για τη μελέτη της διάχυσης μέσω του δέρματος είναι το ανθρώπινο δέρμα, το

δέρμα ζωικής προέλευσης και οι τεχνητές μεμβράνες (Schmook et al., 2001). Είναι προφανές ότι η ιδανική περίπτωση είναι η χρήση ανθρώπινου δέρματος. Όμως, επειδή δεν είναι πάντα διαθέσιμο και λόγω έλλειψης ακεραιότητας του φραγμού, για την αξιολόγηση της διαδερμικής διαπερατότητας των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών επιλέγεται δέρμα ζωικής προέλευσης. Παρόλο που το δέρμα από ζώα αποτελεί μία εναλλακτική λύση, εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν τους επιστήμονες να αναπτύξουν διάφορες συνθετικές μεμβράνες, προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα (Miki et al., 2010).

1.3.3.1 Ανθρώπινο δέρμα (human epidermal membrane)

Στην πλειονότητα των *in vitro* μελετών της διαδερμικής απορρόφησης επιλέγεται *ex vivo* ανθρώπινο δέρμα λόγω της καλύτερης *in vitro* - *in vivo* συσχέτισης που παρέχει. Συνήθως χρησιμοποιείται δέρμα από πλάτη, κοιλιακή χώρα ή μηρούς λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας, το οποίο προέρχεται από αυτοψίες, μειωτικές πλαστικές επεμβάσεις ή πτώματα, το οποίο απομονώνεται με τη διαδικασία της χειρουργικής εκτομής (Schaefer, 2008, Abd et al., 2016).

Το ανθρώπινο δέρμα με πλήρες πάχος $1000 \pm 200 \mu\text{m}$ (Guth et al., 2015) αποτελείται από την κεράτινη στιβάδα, τη ζώσα επιδερμίδα και το χόριο. Όμως, συνήθως το δέρμα που χρησιμοποιείται, προέρχεται μέσω της τεχνικής της δερμοτομής και αποτελείται μόνο από την κεράτινη στιβάδα και τη ζώσα επιδερμίδα. Η πλήρης απομάκρυνση του χορίου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μηχανικές, θερμικές και χημικές τεχνικές. Αν και έχει αναφερθεί η χρήση αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος, βρωμιούχου νατρίου και αμμωνίας, υπάρχουν υπόνοιες ότι τα ισχυρά οξέα ή βάσεις μπορεί να μεταβάλλουν την ακεραιότητα του φραγμού (Schaefer, 2008). Συνηθέστερα, ο διαχωρισμός του χορίου από την επιδερμίδα επιτυγχάνεται με τη χρήση θερμικού διαχωρισμού που βασίζεται στην τεχνική Kligman (Kligman & Christophers, 1967). Η μέθοδος αυτή περιγράφεται με λεπτομέρειες στο Πειραματικό Μέρος. Αξίζει να αναφερθεί πως σε αρκετές μελέτες, όπως και στην παρούσα, χρησιμοποιείται αποκλειστικά η κεράτινη στιβάδα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Παρόλο την προτίμηση και τη σύσταση των ρυθμιστικών αρχών, αλλά και των ίδιων των ερευνητών, για τη χρησιμοποίηση ανθρώπινου δέρματος στις μελέτες της διαδερμικής διαπερατότητας, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο μειονέκτημα σχετίζεται με την υψηλή μεταβλητότητα. Η χρησιμοποίηση του ανθρώπινου δέρματος συχνά οδηγεί σε υψηλή τόσο ενδοατομική όσο και διατομική μεταβλητότητα, σε ποσοστά που αγγίζουν μέχρι και το 40%. Ο ρυθμός διάχυσης διαμέσου του ανθρώπινου δέρματος εξαρτάται από την ανατομική περιοχή από την οποία έχει αφαιρεθεί το δέρμα και επηρεάζεται από την ηλικία, τη φυλή και το φύλο του δότη, όπως έχει αναφερθεί και στο Κεφάλαιο 1.2. Αξίζει να αναφερθεί ότι η διακύμανση στη λειτουργία φραγμού του δέρματος

μεταξύ ατόμων και μεταξύ ανατομικών θέσεων μπορεί να κυμανθεί από 2 έως 6 φορές, ανάλογα με τη μέθοδο μέτρησης. Επιπρόσθετα μειονεκτήματα είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα του ανθρώπινου δέρματος, η χρονοβόρα προετοιμασία του, η λεπτότητα κατά το χειρισμό, καθώς και το γεγονός ότι τα δείγματα θεωρούνται βιολογικού κινδύνου, με αποτέλεσμα την απαίτηση για ιδιαίτερη μεταχείριση (Miki et al., 2010, van de Sandt et al., 2004).

Στο μέλλον, η ανάπτυξη και εξέλιξη των ισοδυνάμων του ανθρώπινου δέρματος (human skin equivalent) θα είναι σε θέση να άρουν τους παραπάνω περιορισμούς (Pellevoisin et al., 2018). Ιδιαίτερα η ανακατασκευασμένη ανθρώπινη επιδερμίδα (Reconstructed Human Epidermis - RHE) παρέχει μια νέα προοπτική στον τομέα των μελετών της διαδερμικής απορρόφησης (Kandarova et al., 2018). Τέλος, στο σημερινό περιβάλλον της τέταρτης βιομηχανικής επανάστασης (Industry 4.0) είναι η παραγωγή ισοδυνάμων ανθρώπινου δέρματος με τεχνικές και μεθόδους της τρισδιάστατης εκτύπωσης (Sriram et al., 2018, Abdallah et al., 2015).

1.3.3.2 Μεμβράνη ζωικού δέρματος

Η χρήση δέρματος ζωικής προέλευσης είναι μια αποδεκτή εναλλακτική λύση του ανθρώπινου δέρματος για τις *in vitro* μελέτες διαδερμικής απορρόφησης (Moss, 2015). Οι μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για το ανθρώπινο δέρμα μπορούν εξίσου να εφαρμοστούν και στις ζωικές μεμβράνες με επιφυλάξεις και τροποποιήσεις, όταν είναι απαραίτητο (Haigh & Smith, 1994).

Από τα διάφορα μοντέλα ζωικού δέρματος που χρησιμοποιούνται σήμερα για τις *ex vivo* μελέτες της διαδερμικής διάχυσης, το δέρμα του χοίρου, ιδιαίτερα από το αυτί (pig ear skin), θεωρείται πλησιέστερο προς το ανθρώπινο δέρμα και παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με αυτό (Herkenne et al., 2006). Διάφορες μελέτες και βιβλιογραφικά δεδομένα έχουν δείξει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ *in vivo* πειραμάτων σε ανθρώπινο δέρμα και *ex vivo* πειραμάτων σε απομονωμένο δέρμα χοίρου. Επιπλέον, η ιστολογία και οι διαστάσεις του δέρματος του χοίρου είναι αρκετές παρόμοιες με τις αντίστοιχες του ανθρώπινου δέρματος (Simon et al., 2016).

Εκτός από το δέρμα των χοίρων, μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας δέρμα από ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, φίδια, βατράχους και πιθήκων (Haigh & Smith, 1994, Pongjanyakul et al., 2002).

Γενικά, τα *in vitro* δεδομένα συμφωνούν στενά με τις *in vivo* παρατηρήσεις στο ότι τα περισσότερα δέρματα ζώων παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαπερατότητα από το ανθρώπινο δέρμα με αποτέλεσμα τις χαμηλές *in vitro* - *in vivo* συσχετίσεις. Η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των ζωικών μοντέλων και του ανθρώπινου δέρματος, όπως είναι το πάχος και η σύσταση της κεράτινης στιβάδας σε λιπίδια, η

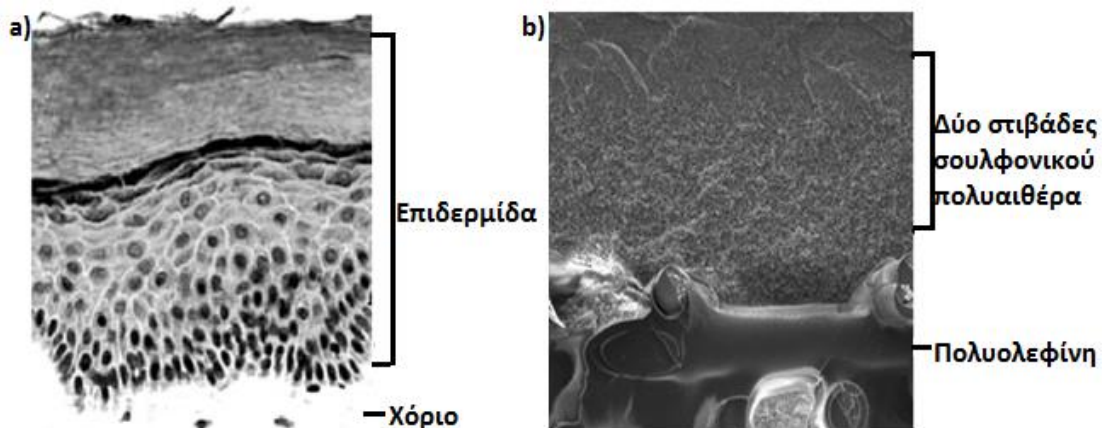
πυκνότητα των τριχοθυλάκιων και των ιδρωτοποιών αδένων, καθώς και η περιεκτικότητα σε νερό (Haigh & Smith, 1994). Έχει αποδειχθεί ότι η περιεκτικότητα του δέρματος σε λιπίδια είναι καθοριστικός παράγοντας της δυναμικής του φραγμού του και ότι οι διαφορές μεταξύ των ειδών ή μεταξύ των ανατομικών περιοχών οφείλονται στη μεταβαλλόμενη σύσταση των λιπιδίων (Walters, 2015, Ansari et al., 2006). Παρά το γεγονός ότι το οικονομικό κόστος από τη χρήση του ζωικού δέρματος είναι πολύ χαμηλότερο από εκείνο του ανθρώπινου, τα θέματα της μεταβλητότητας των δεδομένων και της ηθικής έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες να αναπτύξουν πολλές μορφές συνθετικών μεμβρανών ώστε να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα.

1.3.3.3 Τεχνητή μεμβράνη Strat-M® (Strat-M® Membrane for Transdermal Diffusion Testing)

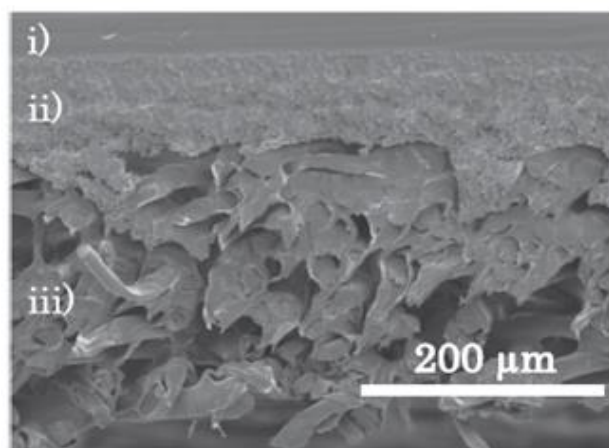
Οι περιορισμοί που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπως η σχετική δυσκολία απόκτησης ανθρώπινων δειγμάτων δέρματος και η υψηλή μεταβλητότητα των ζωικών μοντέλων, οδήγησαν τους επιστήμονες στην ανάπτυξη και χρήση τεχνητών μεμβρανών προσομοίωσης του ανθρώπινου δέρματος (Ottaviani et al., 2006). Η εμπορική διαθεσιμότητα, η σταθερότητα, η ομοιομορφία μεταξύ των παρτίδων και η ευκολία κατά χρήση τους τις καθιστούν ιδιαίτερα επιθυμητές (Haigh & Smith, 1994).

Η συντριπτική πλειοψηφία των συνθετικών μεμβρανών που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες διαδερμικής και τοπικής χορήγησης έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα και κατέχουν ιδιότητες φραγμού, προκειμένου να προσομοιάζουν το δέρμα σε όσο το δυνατό μεγαλύτερο βαθμό (Jung et al., 2015). Έχει προταθεί ότι οι τεχνητές μεμβράνες μπορούν να προσφέρουν χρήσιμη πρόβλεψη της *in vivo* διαδερμικής χορήγησης, όταν πληρούνται κάποια κριτήρια, όπως π.χ. ότι η παθητική διάχυση είναι ο κύριος μηχανισμός μεταφοράς της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας (Pagliara et al., 1999).

Πρόσφατα, εισήχθη στο εμπόριο μια νέα συνθετική μεμβράνη ως υποκατάστατο του ανθρώπινου ή/και ζωικού δέρματος στις *in vitro* μελέτες διάχυσης, η Strat-M® (Strat-M® Membrane for Transdermal Diffusion Testing, Merck Millipore, USA). Η τεχνητή αυτή μεμβράνη έχει παρόμοια πολυστρωματική μορφολογία με αυτή του ανθρώπινου δέρματος, όπως φαίνεται από την Εικόνα A22 (Karadzovska & Riviere, 2013). Η μεμβράνη Strat-M® αποτελείται από δύο στρώματα σουλφονικού πολυαιθέρα (PES), ανθεκτικά στη διάχυση, τα οποία βρίσκονται στην κορυφή ενός στρώματος πολυολεφίνης, το οποίο παρουσιάζει λιγότερο σφιχτές συνδέσεις και παρουσιάζει μεγαλύτερη διάχυση (Hamed et al., 2015).



Εικόνα A22: Η ομοιότητα της πολυστοιβαδικής δομής μεταξύ των στοιβάδων του ανθρώπινου δέρματος (Ermakov et al., 2005) και της τεχνητής Strat-M® (Διαθέσιμο σε: https://www.in-cosmetics.com/__novadocuments/255210?v=636053819429970000)



Εικόνα A23: Εικόνα SEM (Scanning Electron Microscopic) κάθετης τομής της Strat-M® που περιλαμβάνει το πρώτο, το δεύτερο και το τρίτο στρώμα (Uchida et al., 2015)

Η πυκνότητα και το πάχος των στρωμάτων μειώνεται σταδιακά με την αύξηση του βάθους της μεμβράνης, ενώ ταυτόχρονα γίνεται όλο και πιο πορώδης, όπως φαίνεται κι από την Εικόνα A23 (Uchida et al., 2015). Η πορώδης δομή είναι εμπροτισμένη με ένα μείγμα συνθετικών χημικών λιπιδίων με σκοπό την προσομοίωση των λιπιδίων του ανθρώπινου δέρματος, όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και κεραμίδια, αποκτώντας με αυτόν τον τρόπο υδρόφοβο χαρακτήρα (Karadzovska & Riviere, 2013).

Η τεχνητή μεμβράνη Strat-M® χαρακτηρίζεται από χαμηλή μεταβλητότητα παρέχοντας περισσότερο επαναλήψιμα αποτελέσματα. Επιπλέον, κάποια δεδομένα μελετών διάχυσης συσχετίζονται αρκετά καλά με τα αντίστοιχα του ανθρώπινου δέρματος για κάποιες φαρμακολογικά δραστικές ουσίες. Ακόμα, η ευρεία χρήση της οφείλεται στο γεγονός ότι δεν έχει περιορισμούς ασφάλειας και αποθήκευσης, καθώς είναι σταθερή και δεν απαιτεί ιδιαίτερους τρόπους αποθήκευσης. Επίσης, είναι συσκευασμένη σε δίσκους και απλοποιείται έτσι η τοποθέτησή της στα κύτταρα διάχυσης Franz. Τέλος, δεν χρειάζεται ενυδάτωση πριν

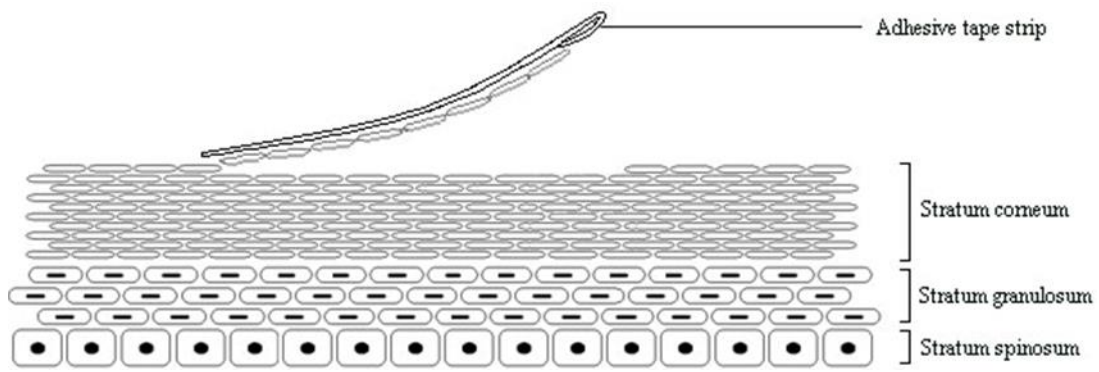
από τη χρήση της σε αντίθεση με το δέρμα. Αν και παρέχει ουσιαστικές και επαναλήψιμες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας της χημικής ένωσης διαμέσου του δέρματος, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως η δυναμική της (Uchida et al., 2015, Karadzovska & Riviere, 2013).

1.3.4 Τεχνική του Tape – Stripping

Η τεχνική tape-stripping αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο για την αξιολόγηση της διαπερατότητας διαμέσου της κεράτινης στοιβάδας των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, οι οποίες χορηγούνται μέσω τοπικών ή/και διαδερμικών φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτή η μη επεμβατική διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί *in vitro*, αλλά και *in vivo* και σε ανθρώπους και ζώα για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την κινητική της διαδερμικής χορήγησης προσφέροντας μια φαινομενικά εύκολη μέθοδο δειγματοληψίας και απορελώντας τη βάση της δέρματοφαρμακοκινητικής προσέγγισης του FDA για την αξιολόγηση της τοπικής βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας (Lademann et al., 2009, Chavez et al., 2008).

Αφού εφαρμοσθεί το φαρμακευτικό προϊόν στην επιδερμίδα, η κεράτινη στοιβάδα απομακρύνεται μέσω κατάλληλων κολλητικών ταινιών. Η κολλητική ταινία πιέζεται πάνω στο δέρμα χρησιμοποιώντας ένα ρολό, ώστε να τεντωθεί η επιφάνειά του. Η ταινία αφαιρεί ένα στρώμα κερατινοκυττάρων, το οποίο περιέχει και το αντίστοιχο ποσό δραστικής ουσίας που έχει διεισδύσει σε αυτά. Συνήθως, όμως, η ποσότητα που απομακρύνεται μέσω της ταινίας, δεν είναι γραμμικά ανάλογη με τον αριθμό των ταινιών που έχουν χρησιμοποιηθεί (Lademann et al., 2009, Chavez et al., 2008).

Παρότι η τεχνική είναι απλή και εύκολη, η ποσότητα της κεράτινης στοιβάδας που απομακρύνεται, επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως η ενυδάτωση του δέρματος, η συνοχή μεταξύ των κυττάρων, η περιοχή εφαρμογής, οι ενδοατομικές διαφορές, το είδος της ταινίας (διαφορετικό σχήμα, σύνθεση, επιφάνεια, συγκολλητικές ιδιότητες), η διάρκεια της πίεσης πάνω στο δέρμα, η δύναμη με την οποία αφαιρείται και η επιλογή των εφαρμοσμένων ουσιών (Lademann et al., 2009, Chavez et al., 2008).

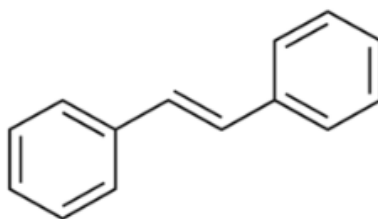


Εικόνα Α24: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου tape-stripping. Μετά την εφαρμογή του φαρμακευτικού προϊόντος στην επιδερμίδα και την απομάκρυνσή του, η κεράτινη στιβάδα αφαιρείται διαδοχικά με τη χρήση ταινιών (Ling Au et al., 2010)

1.4 ΡΕΣΒΕΡΑΤΡΟΛΗ

1.4.1 Προέλευση και πηγές της Ρεσβερατρόλης

Τα στιλβένια αποτελούν μία κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων, τα οποία απαντώνται σε μία ευρεία ποικιλία διατροφικών πηγών, όπως είναι τα σταφύλια, τα μούρα, τα φυστίκια, το κρασί, καθώς και σε πολλά φαρμακευτικά φυτά. Τα τελευταία χρόνια, τα στιλβένια έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή και ενδιαφέρον λόγω των πολλών βιολογικών και φαρμακολογικών δράσεων που κατέχουν, καθιστώντας τα υποψήφιες φαρμακολογικά δραστικές ουσίες (Tsai et al., 2017).



Εικόνα A25: Δομικός σκελετός των στιλβενίων
(Διαθέσιμο σε: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trans-Stilbene>)

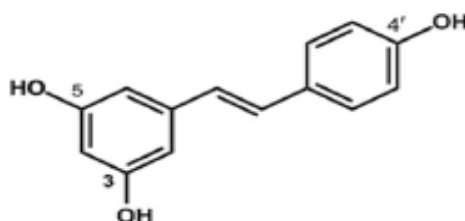
Ένας από τους κύριους εκπροσώπους των στιλβενίων και ταυτόχρονα αυτός που έχει μελετηθεί πιο εκτενώς είναι η Ρεσβερατρόλη (Tsai et al., 2017). Η Ρεσβερατρόλη (3,5,4'-trihydroxystilbene) αποτελεί μία πολυφαινολική, μη-φλαβονοειδής, χημική ένωση, η οποία ανήκει στην οικογένεια των φυτοαλεξινών (phytoalexins) και βρίσκεται σε αφθονία στα σταφύλια, στα μούρα, φυστίκια και σε άλλα τρόφιμα, τα οποία καταναλώνονται καθημερινά ως μέρος μίας συνήθους διατροφής. Η Ρεσβερατρόλη βιοσυνθέτεται από πολλά φυτά, προκειμένου αυτά να προστατευθούν από την υπεριώδη ακτινοβολία, από μυκητιάσεις, καθώς και για τη θεραπεία διάφορων τραυματισμών (Schouten et al., 2002, Jeandet et al., 2002). Η χημική αυτή ένωση απομονώθηκε αρχικά από τις ρίζες του φυτού *Polygonum cuspidatum*, Polygonaceae, ένα φυτό που χρησιμοποιείται ευρέως στην Κινέζικη και Ιαπωνική παραδοσιακή ιατρική (Vastano et al., 2000).

1.4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημική δομή της Ρεσβερατρόλης

Η Ρεσβερατρόλη (Chemical Abstracts Service Registry Number CAS: 501-36-0, Διαθέσιμο σε: <http://www.cas.org>) είναι στερεή, υπόλευκη σκόνη με μοριακό βάρος 228.25 g.mol⁻¹ (O'Neil, 2006) και σημείο τήξης ανάμεσα στους 253-255° C. Η Ρεσβερατρόλη έχει πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο ύδωρ, η οποία έχει βρεθεί να είναι περίπου 3mg ανά 100 mL, δηλαδή 0.03 mg/mL (Wang et al., 2002, Vian et al., 2005, Nicolas et al., 2006), γεγονός που την καθιστά «πρακτικά αδιάλυτη» στο ύδωρ, σύμφωνα με τον ορισμό της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Η τιμή LogP της Ρεσβερατρόλης είναι 3.1 (Kristl et al., 2009). Παρόλο τη

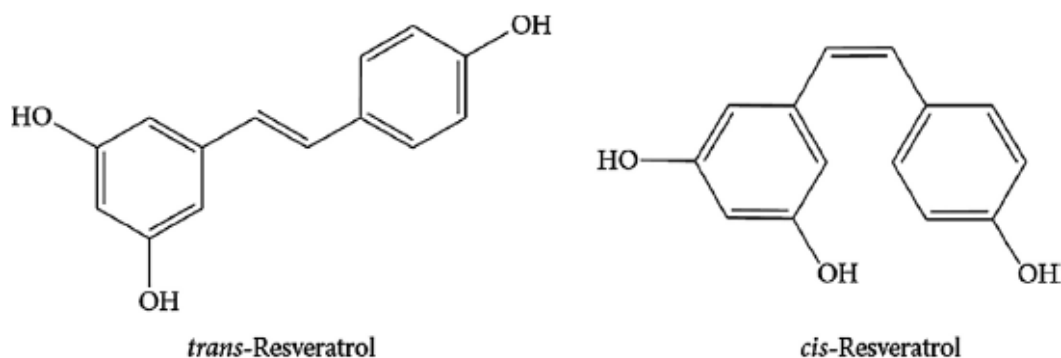
χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η Ρεσβερατρόλη παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα διαμέσου των μεμβρανών και γι' αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μία φαρμακολογικά δραστική ουσία Class II, σύμφωνα με το Biopharmaceutical Classification System (BCS, Amidon et al., 1995).

Η χημική δομή της Ρεσβερατρόλης χαρακτηρίζεται από δύο φαινολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός διπλού δεσμού, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα A26 (Shakibaei et al., 2009).



Εικόνα A26: Χημική δομή της trans-Ρεσβερατρόλης (Tsai et al., 2017)

Η Ρεσβερατρόλη εμφανίζει δύο δομικά ισομερή, cis – (Z) και trans – (E) (Rahman et al. 2006). Το trans-ισομερές είναι πιο δραστικό βιολογικά συγκριτικά με τη cis-Ρεσβερατρόλη (Rius et al., 2010, Fulda 2010), καθώς το cis-ισομερές εμφανίζει μία μη επίπεδη δομή (nonplanar conformation) στο χώρο (Merillon et al., 1997). Η cis-Ρεσβερατρόλη έχει αναφερθεί ότι είναι ασταθής και γι' αυτό δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη (Chen et al., 2007, Basly et al., 2000).



Εικόνα A27: Απεικόνιση των δύο ισομερών της Ρεσβερατρόλης (de Vries et al., 2018)

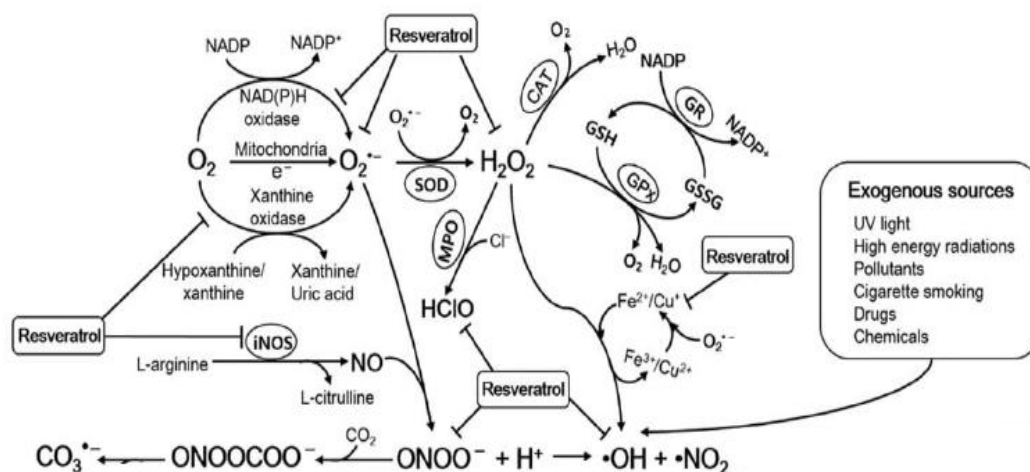
Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, η Ρεσβερατρόλη είναι μία εξαιρετικά φωτοευαίσθητη χημική ένωση, καθώς η έκθεσή της στο ηλιακό φως οδηγεί στη μετατροπή του trans-ισομερούς στο αντίστοιχο cis-ισομερές, που όπως έχει αναφερθεί δεν είναι βιολογικά δραστικό (Vian et al., 2005). Η αντίστοιχη χημική μετατροπή λαμβάνει χώρα κι όταν η trans-Ρεσβερατρόλη εκτεθεί στη UV ακτινοβολία (Trela & Waterhouse, 1996).

1.4.3 Φαρμακολογική δράση και πιθανές θεραπευτικές χρήσεις της Ρεσβερατρόλης

Επιστημονικά δεδομένα, τα οποία βασίζονται σε κλινικές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα θεραπευτικά οφέλη της Ρεσβερατρόλης αποδίδονται στις αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (Smoliga et al., 2011).

1.4.3.1 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες της Ρεσβερατρόλης

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) περιλαμβάνουν τόσο ελεύθερες όσο και μη ελεύθερες ρίζες και παράγονται μέσω ενδογενών πηγών, όπως τα υπεροξυσώματα, η οξειδάση του NADPH, η οξειδάση της ξανθίνης και το κυτόχρωμα P450, καθώς και εξωγενείς πηγές, όπως η ακτινοβολία UV, καθώς και ρύποι και τοξίνες, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα A28.

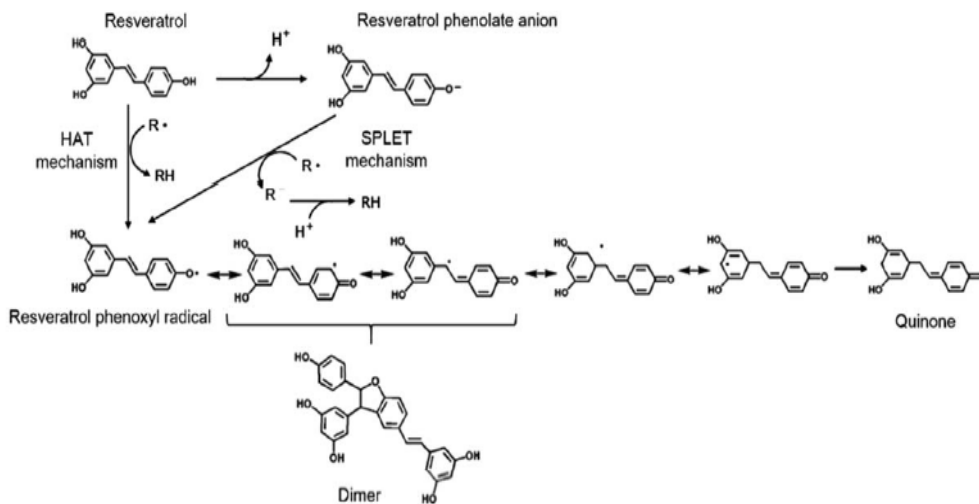


Εικόνα A28: Απεικόνιση της παραγωγής των ROS και των πιθανών μηχανισμών αντιοξειδωτικής δράσης της Ρεσβερατρόλης (Τροποποιημένη από: Truong et al. 2018)

Η Ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας πολύ αποτελεσματικός απενεργοποιητής μίας μεγάλης ποικιλίας των ROS, συμπεριλαμβανομένων του υπεροξειδίου υδρογόνου και της ρίζας του υδροξυλίου. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της Ρεσβερατρόλης συσχετίζονται με την παρουσία των δύο φαινολικών δακτυλίων, οι οποίοι φέρουν τις τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις 3, 4 και 5. Το υδροξύλιο στη θέση 4 είναι περισσότερο απαραίτητο για δραστικότητα σάρωσης των ριζών, αλλά πάντα δρα συνεργικά με τα άλλα δύο υδροξύλια (Shang et al., 2009).

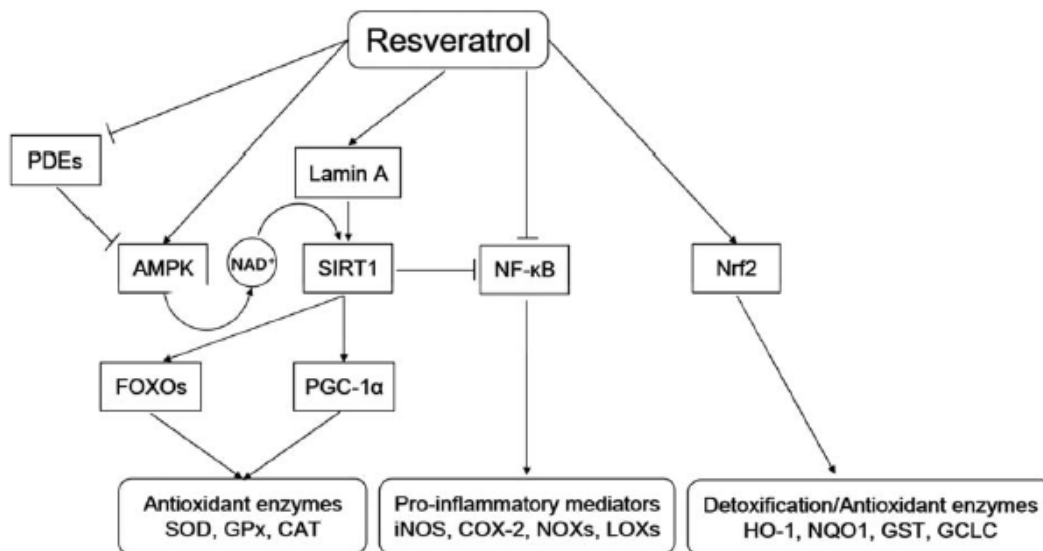
Η αντιοξειδωτική δράση της Ρεσβερατρόλης οφείλεται σε πολλούς μηχανισμούς, όπως είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων στις ελεύθερες ρίζες, η δημιουργία χηλικών συμπλόκων μέσω των υδροξυλίων στις θέσεις 3 και 5 με ιόντα μέταλλα, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, χάνοντας με αυτόν τον τρόπο την προοξειδωτική τους δράση μέσω της αντίδρασης Fenton. Επίσης, η

Ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη λειτουργία του ενζύμου οξειδάσης του NADPH και ταυτόχρονα καταστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Truong et al., 2018).



Εικόνα A29 : Απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης της Ρεσβερατρόλης μέσω μεταφοράς του ηλεκτρονίου του υδροξυλίου της θέσης 4 (Τροποποιημένη από Shang et al. 2009)

Επιπρόσθετοι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης της Ρεσβερατρόλης παρουσιάζονται στην επόμενη Εικόνα A30.



Εικόνα A30: Αντιοξειδωτική δράση της Ρεσβερατρόλης μέσω της παρέμβασής της σε διάφορα βιοχημικά μονοπάτια σηματοδότησης (Truong et al. 2018)

1.4.3.2 Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της Ρεσβερατρόλης

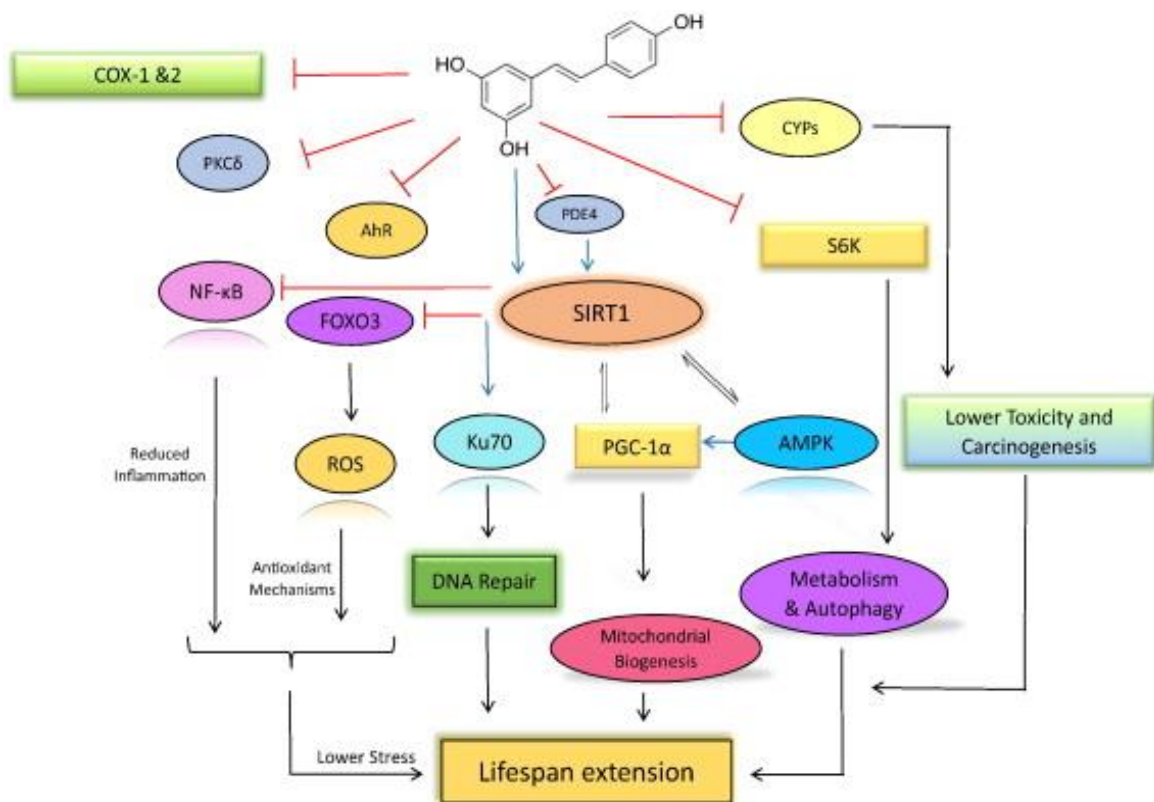
Προκειμένου να γίνουν πλήρως κατανοητές οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της Ρεσβερατρόλης, αρχικά θα ακολουθήσει μία συνοπτική ανάλυση των μηχανισμών της

φλεγμονώδους αντίδρασης. Η φλεγμονώδης αντίδραση αποτελεί μια κυτταρική απάντηση στην είσοδο παθογόνων στον οργανισμό και στον τραυματισμό των ιστών. Η κυτταρική βλάβη ή τα σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen - Associated Molecular Patterns, PAMPs), τα οποία εκφράζονται από μικρόβια, αναγνωρίζονται από ανοσοκύτταρα, όπως μακροφάγα, λευκοκύτταρα, ουδετερόφιλα και ιστιοκύτταρα, τα οποία οδηγούνται στο σημείο της φλεγμονής/τραυματισμού. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν διάφορους μεσολαβητές της φλεγμονής (inflammation mediators), οι οποίοι περιλαμβάνουν κυτοκίνες, ισταμίνη, νιτρικό οξείδιο (NO), λευκοτριένια και προσταγλανδίνες. Οι κυτοκίνες, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) και οι ιντερλευκίνες (ILs) που απελευθερώνονται από μακροφάγα κύτταρα, αποκαθιστούν την τοπική βλάβη και μέσω της δέσμευσης σε υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες (GPCRs) προκαλούν την έκφραση της σελεκτίνης και ιντεγκρινών. Η ισταμίνη απελευθερώνεται από τα ιστιοκύτταρα και προκαλεί αγγειοδιαστολή αυξάνοντας αγγειακή διαπερατότητα. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο απελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, διαχέεται σε λεία μυϊκά κύτταρα προκαλώντας τη χάλασή τους και επομένως, προάγεται η αγγειοδιαστολή. Οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια συντίθενται από ενδοθηλιακά κύτταρα από φωσφολιπίδια κατεστραμμένων μεμβρανών και ενισχύουν τη διαστολή και τη διαπερατότητα των αγγείων. Συνολικά, αυτοί οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές (inflammation mediators) προωθούν την περαιτέρω πρόσληψη ανοσοκυττάρων στην περιοχή του τραυματισμού και έτσι, προκαλούν πυρετό, ερυθρότητα, οίδημα και πόνο (Newton & Dixit, 2012).

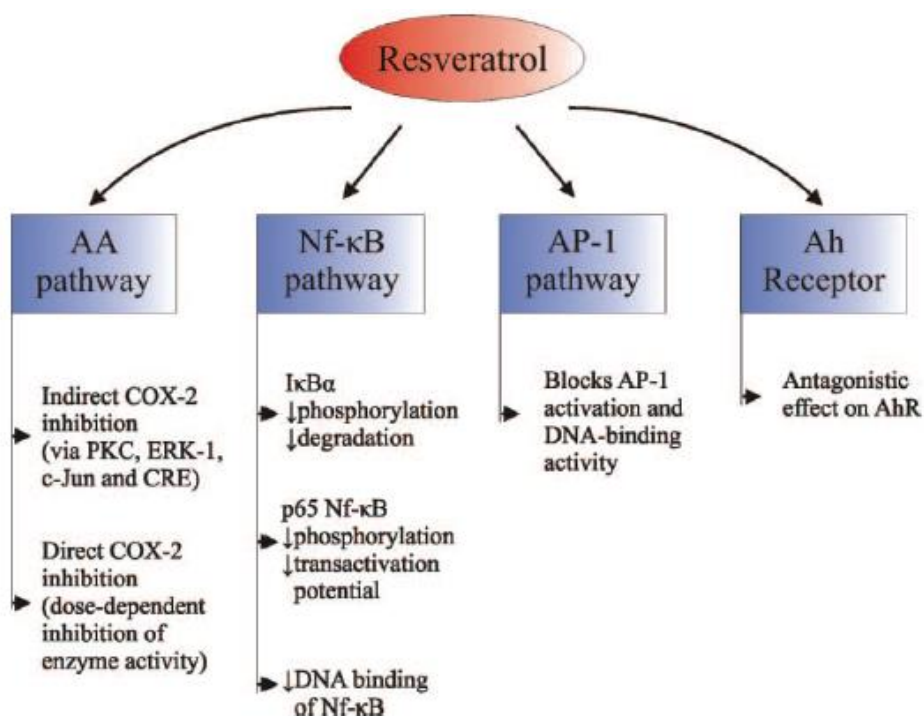
Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, παράγεται μια τεράστια ποσότητα ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Οι ενδοκυτταρικά παραγόμενες ROS είναι βασικοί καταστολείς της φλεγμονής, καθώς αρχίζουν την απόπτωση των ουδετερόφιλων κυττάρων. Ωστόσο, οι παρατεταμένες φλεγμονώδεις και οξειδωτικές αντιδράσεις οδηγούν σε χρόνια φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων και απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής. Η χρόνια φλεγμονή είναι η κύρια αιτία γήρανσης και σοβαρών ασθενειών, όπως άσθμα, αρθρίτιδα, φλεγμονώδεις εντερικές παθήσεις, βρογχίτιδα, παγκρεατίτιδα, ηπατική ίνωση, καρδιαγγειακές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και καρκίνος (Simmons, 2006). Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί σε υπερπαραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Αυτοί οι μεσολαβητές ενεργοποιούν διάφορους παράγοντες μεταγραφής, όπως ο NF-κB, οι οποίοι ρυθμίζονται άμεσα ή έμμεσα μέσω πρωτεϊνικών κινασών (Lewis & Manning, 1999). Επιπροσθέτως, ενεργοποιούνται διάφορα ένζυμα, όπως η κυκλοοξυγενάσες, COX-1 και COX-2 και η λιποξυγενάση, 5-LOX (Tambuwalla, 2016).

Έχει αποδειχθεί ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της Ρεσβερατρόλης σχετίζεται με την ικανότητά της να αναστέλλει τη δραστηριότητα COX-1 και COX-2 (Zykova et al., 2008, Khairullina et al., 2008). Επίσης, έχει δείχθει ότι η Ρεσβερατρόλη αναστέλλει τη δραστηριότητα

των παραγόντων μεταγραφής NF-κB και AP-1 (activator protein 1), οι οποίοι ρυθμίζουν άμεσα τη δραστηριότητα των κυκλοοξυγενασών, καθώς επίσης και την επαγωγή του ενζύμου της συνθετάσης του NO (Szaefer et al., 2014). Αρκετά μοντέλα *in vitro*, αλλά και *in vivo* μελέτες έχουν αποδείξει ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της Ρεσβερατρόλης οφείλεται τόσο στην αναστολή των ενζύμων COX-1 και COX-2 όσο και στην αναστολή διαφόρων άλλων παραγόντων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, όπως ο NF-κB, οι ιντερλευκίνες (IL-1, IL-6 και IL-8) και ο TNFα (Dvorakova & Landa, 2017)



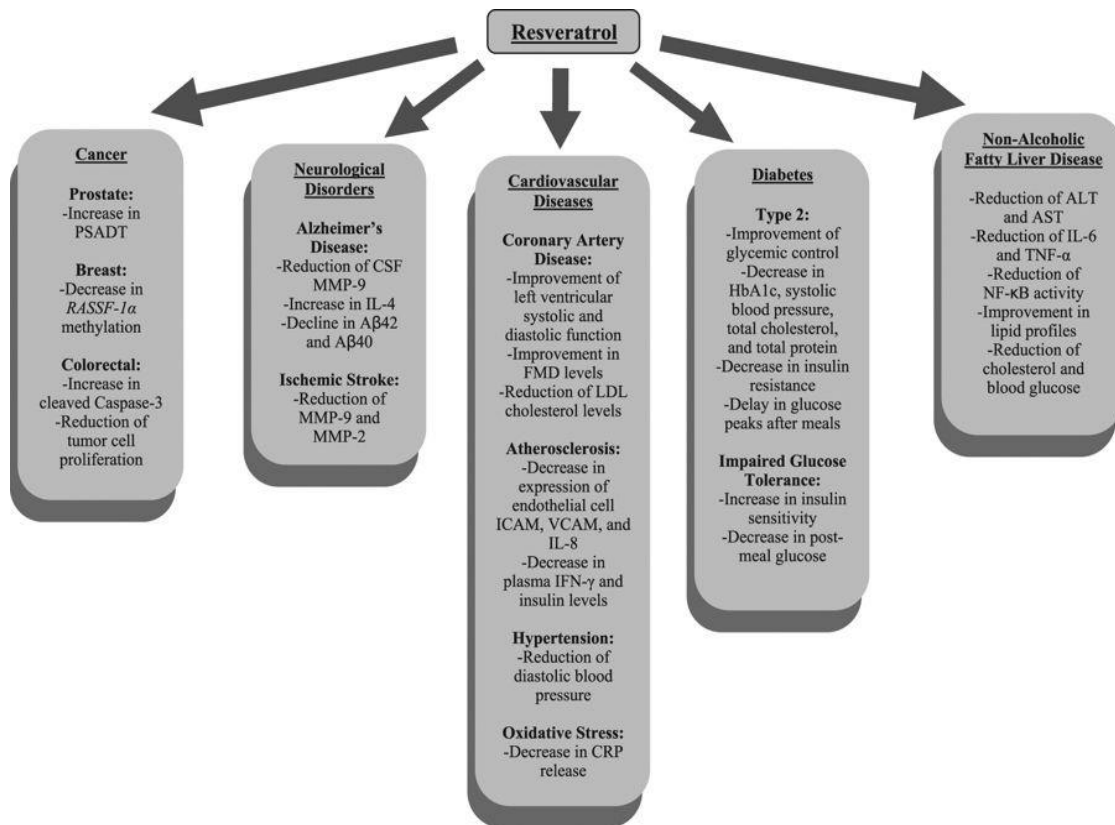
Εικόνα A31: Συνοπτική παρουσίαση των μηχανισμών αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης (Bhullar & Hubbard, 2015)



Εικόνα A32: Απεικόνιση της κατασταλτικής επίδρασης της Ρεσβερατρόλης σε διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης (Svajger & Jeras, 2012)

1.4.3.3 Επιπρόσθετες φαρμακολογικές δράσεις της Ρεσβερατρόλης

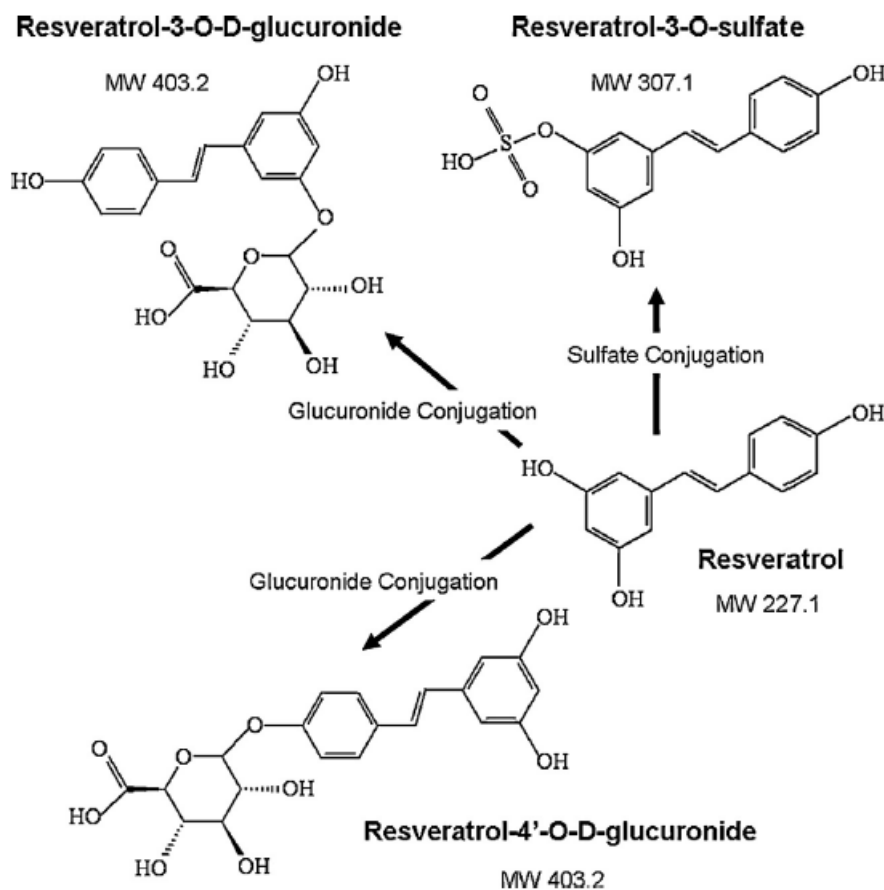
Η Ρεσβερατρόλη έχει προσελκύσει εδώ και πολλά χρόνια μεγάλη προσοχή από τους επιστήμονες, επειδή σχετίζεται με ένα φαινόμενο, το οποίο ονομάζεται «γαλλικό παράδοξο». Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται, για να περιγράψει την παρατήρηση ότι ο γαλλικός πληθυσμός έχει χαμηλή συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, παρά την υψηλή κατανάλωση λιπαρών τυριών και κόκκινου κρέατος. Η πρόσληψη του οίνου που περιέχει Ρεσβερατρόλη σε υψηλές ποσότητες, μπορεί να αποτελεί εξήγηση για αυτό το φαινόμενο (Catalog et al., 2012). Η Ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ποικίλες επιδράσεις προαγωγής της υγείας και πρόληψης πολλών ασθενειών, όπως καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη τύπου II, του καρκίνου, καθώς και νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως η νόσος του Alzheimer (Carrizzo et al., 2013). Στην παρακάτω Εικόνα A33 συνοψίζονται τα θεραπευτικά οφέλη της Ρεσβερατρόλης σύμφωνα με διάφορες κλινικές μελέτες.



Εικόνα A33: Κλινικά θεραπευτικά οφέλη της Ρεσβερατρόλης (Berman et al., 2017)

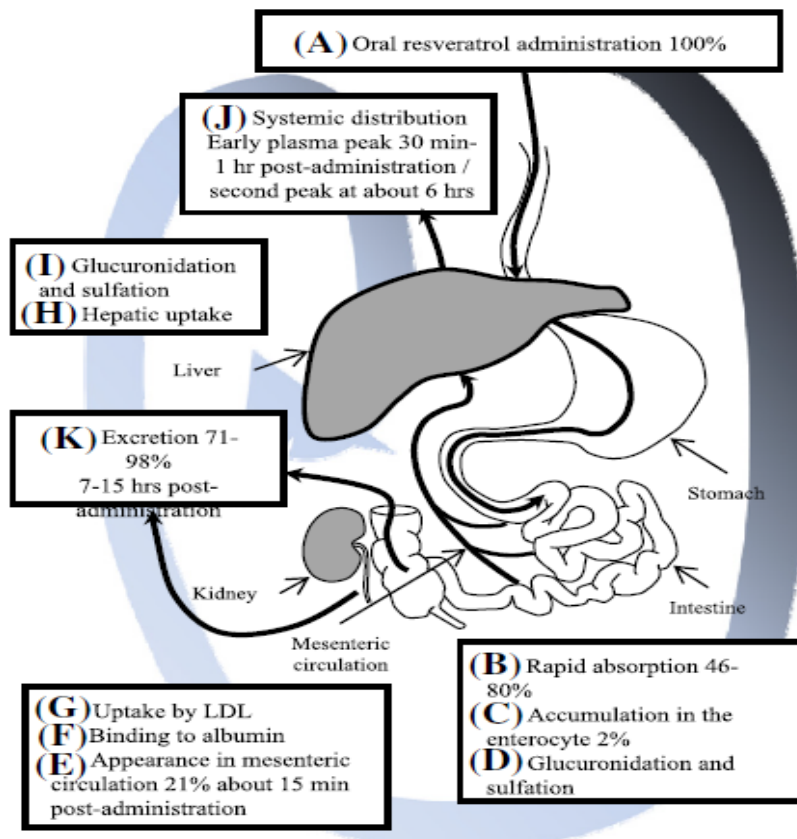
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι βιολογικές ιδιότητες της Ρεσβερατρόλης αποδίδονται στην ικανότητά της απενεργοποιεί τις ελεύθερες ή μη ρίζες και στην αντιφλεγμονώδη δράση της μέσω διάφορων βιοχημικών μονοπατιών (Baur & Sinclair, 2006, King et al., 2005). Έτσι, η αντικαρκινική δράση της Ρεσβερατρόλης οφείλεται στην αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου Quinone Reductase 2, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση κυτταρικών αντιοξειδωτικών και αποτοξινωτικών μηχανισμών για τη βελτίωση της κυτταρικής αντίστασης στο οξειδωτικό στρες (Buryanovskyy et al., 2004). Επιπλέον, η Ρεσβερατρόλη αυξάνει τη δραστηριότητα του ενζύμου SIRT, ένα μέλος της οικογένειας Sirtuin of Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Dependent Deacetylases, οδηγώντας σε βελτιωμένη κυτταρική αντίσταση έναντι του οξειδωτικού stress και σε μακροβιότητα (Howitz et al., 2003, Holme & Pervaiz, 2007). Ακόμα, η Ρεσβερατρόλη έχει τη δυνατότητα ρύθμισης ορμονοεξαρτώμενων γονιδίων, όπως το BRCA1 στα κύτταρα του μαστού, λόγω της δομικής της ομοιότητας με τη φαρμακολογικά δραστική ουσία Diethylstilbestrol (Εικόνα A34), η οποία χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες (Kundu & Surh, 2008, Le Corre et al., 2004). Τέλος, η Ρεσβερατρόλη είναι γνωστή για την καρδιοπροστατευτική της δράση (Hung et al., 2004, Das, 2007).

τόσο στο έντερο όσο και στο ήπαρ, θεωρείται ότι αποτελούν τις κυριότερες μεταβολικές, με αποτέλεσμα τον περιορισμό στη βιοδιαθεσιμότητα. Η πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της Ρεσβερατρόλης μετά την *per os* χορήγηση οφείλεται επίσης στον πολύ μικρό χρόνο ημιζωής της και σε προβλήματα σταθερότητας (Walle et al., 2004, Wenzel & Somoza, 2005 Walle, 2011). Στην επόμενη Εικόνα A36 απεικονίζονται οι κυριότερες μεταβολικές οδοί της Ρεσβερατρόλης.



Εικόνα A36: Οι κυρίαρχες μεταβολικές οδοί Φάσης II της Ρεσβερατρόλης (Lou et al., 2014)

Η *in vivo* πορεία και συμπεριφορά της Ρεσβερατρόλης μετά από *per os* χορήγηση έχει επιχειρηθεί να προσομοιωθεί μέσω διάφορων μοντέλων, όπως *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες, *ex vivo* σε απομονωμένα κύτταρα λεπτού εντέρου και *in vivo* σε ζώα και ανθρώπους. Οι έρευνες για το μεταβολισμό *in vivo* έχουν δείξει ότι το ήπαρ είναι μια σημαντική θέση συσσώρευσης για τη Ρεσβερατρόλη και τους μεταβολίτες της, αν και δεν είναι ακόμη γνωστό εάν λαμβάνει χώρα συσσώρευση των μεταβολιτών της Ρεσβερατρόλης στο ήπαρ λόγω μεταβολισμού στο λεπτό έντερο και την επακόλουθη απορρόφηση ή τον μεταβολισμό *in situ* (Amri et al., 2012).



Εικόνα A37: Απεικόνιση της φαρμακοκινητικής εικόνας της Ρεσβερατρόλης μετά από *per os* χορήγηση (Amri et al., 2012)

1.5 Ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

1.5.1 Εισαγωγή στην Ποιότητα

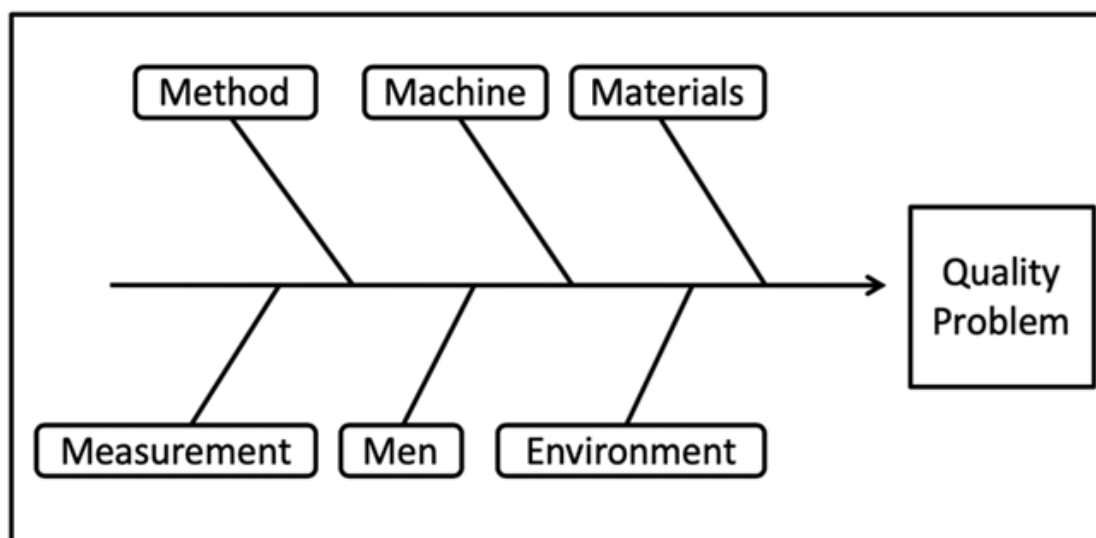
Η κατανόηση της έννοιας της ποιότητας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για οποιοδήποτε ασχολείται με τη βιομηχανική φαρμακευτική και γενικότερα με τον τομέα της Φαρμακευτικής Τεχνολογίας. Οι θεωρήσεις για την ποιότητα διαδόθηκαν ευρέως από τους σημαντικούς μελετητές της, όπως οι W.A. Shewhart, W.E. Deming και J.M. Juran, οι οποίοι υπέδειξαν τη διεργασιοκεντρική προσέγγιση ως τον ορθολογικό τρόπο για την ενσωμάτωση της ποιότητας στα παραγόμενα προϊόντα ή τις προσφερόμενες υπηρεσίες.

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

Ο W.E. Deming, μισό και πλέον αιώνα πριν, διατύπωσε μια από τις πιο διαχρονικές θεωρίες για τη διαχείριση της ποιότητας, προτείνοντας ένα χρηστό τρόπο διοίκησης που συνοψισε σε δύο λέξεις «Βαθιά Γνώση». Επεσήμανε και αυτός με τη σειρά του τη σημασία της έμφασης στη διεργασία και όχι στο τελικό προϊόν τονίζοντας ότι αν δεν μπορούμε να περιγράψουμε τις ενέργειές μας ως μια διεργασία, απλά δε γνωρίζουμε τι κάνουμε, καθώς και ότι η ποιότητα ενός προϊόντος ενυπάρχει σε αυτό και δεν μπορεί να ελεγχθεί. Ο Deming διέδωσε ευρέως τη εργασία του δασκάλου του W.A. Shewhart πάνω στη συνεχή βελτίωση και στο στατιστικό έλεγχο διεργασιών με τη χρήση των διαγραμμάτων ελέγχου (Διαθέσιμο σε: <https://deming.org/theman/theories/profoundknowledge>).

«If you cannot describe what you are doing as a process, you do not know what you are doing».

«You cannot inspect quality into the product; it is already there».



Εικόνα Α38: Γενικό διάγραμμα αιτίου-αποτελέσματος ή διάγραμμα fishbone που αποτελεί τη σημαντικότερη προσφορά Ishikawa, ένας από τους σημαντικότερους μελετητές της ποιότητας

1.5.2 Ποιότητα μέσω Σχεδιασμού (Quality by Design – QbD)

Η ποιότητα στο φαρμακευτικό τομέα αφορά στην ανάπτυξη τελικών προϊόντων, τα οποία ικανοποιούν τις θεραπευτικές ανάγκες του ασθενή τηρώντας παράλληλα τις κανονιστικές οδηγίες για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα. Πλέον επικρατεί η αντίληψη ότι ο έλεγχος στο τελικό προϊόν, προσέγγιση της Ποιότητας μέσω Ελέγχου (Quality by Testing - QbT), είναι ανεπαρκής, προκειμένου να διασφαλισθεί η ποιότητα, δηλαδή η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα, του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος, το οποίο τελικά θα χορηγηθεί στον ασθενή.

Σε αντίθεση με την προσέγγιση του Quality by Testing, οι κατευθυντήριες οδηγίες για την ποιότητα αναπτύχθηκαν, ώστε η ποιότητα να εξασφαλίζεται σε κάθε στάδιο της διεργασίας παραγωγής, προκειμένου το τελικό φαρμακευτικό προϊόν να πληροί τις προκαθορισμένες προδιαγραφές του. Η κυρίαρχη αρχή που διατυπώνεται τόσο στις κανονιστικές απαιτήσεις της ορθής βιομηχανικής παραγωγής (cGMPs) όσο και στα σύγχρονα φαρμακευτικά συστήματα ποιότητας (Pharmaceutical Quality Systems – PQS) είναι:

«Quality should be built into the product, and testing alone cannot be relied on to ensure product quality»

Δηλαδή η ποιότητα θα πρέπει να ενσωματώνεται στα προϊόντα από την αρχή και ο τελικός έλεγχος από μόνος του δεν εξασφαλίζει την ύπαρξή της.

Τα τελευταία χρόνια ο FDA ενθαρρύνει τις φαρμακευτικές βιομηχανίες να υιοθετήσουν συστηματικά την προσέγγιση της **Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού** (Quality by Design - QbD), η οποία είναι αντίθετη με την παλαιότερη προσέγγιση της Ποιότητας μέσω Ελέγχου (QbT). Η

προσέγγιση της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού (QbD) αποτελεί την κεντρική ιδέα του ισχύοντος κανονιστικού πλαισίου για την ανάπτυξη και την παραγωγή των φαρμακευτικών προϊόντων, σύμφωνα με το οποίο η ποιότητα πρέπει να ενσωματώνεται στα προϊόντα και όχι απλά να ελέγχεται σε αυτά μετά την παραγωγή τους (ICH Q8, 2009).

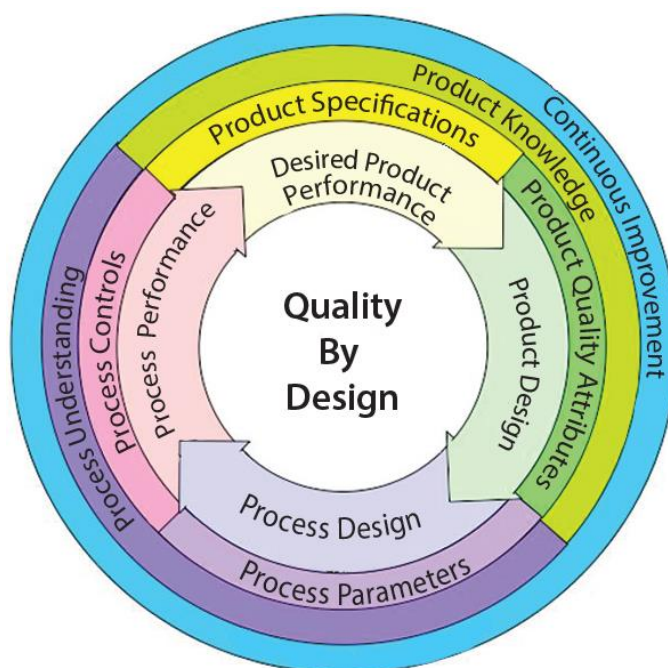
«Quality cannot be tested into products, i.e., Quality should be built in by design».

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

Υιοθετώντας και εφαρμόζοντας την προσέγγιση της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού για την ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων η γνώση προκύπτει από τη συλλογή αξιόπιστων δεδομένων μέσω ορθολογικών, δηλαδή στατιστικά σχεδιασμένων, πειραμάτων για την επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η εφαρμογή της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού οδηγεί στον προσδιορισμό των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας (Critical Quality Attributes – CQAs) του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να είναι φυσικοχημικά, βιολογικά, μικροβιολογικά και πρέπει να βρίσκονται εντός κάποιων ορίων, ενός εύρους ή μιας κατανομής, ώστε να μην επηρεάζεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Για παράδειγμα, για ένα δισκίο τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας μπορεί να είναι η δόση, η σκληρότητα, ο ρυθμός διάλυσης και η ομοιομορφία περιεχομένου. Για εισπνεόμενα προϊόντα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας μπορεί να είναι οι αεροδυναμικές ιδιότητες των σωματιδίων, το εύρος κατανομής, ενώ για τα Διαδερμικά Θεραπευτικά Συστήματα οι προσκολλητικές ιδιότητες στο δέρμα (adhesion).

Αφού προσδιορισθούν σαφώς τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας (CQAs) του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος, έπειτα πρέπει να προσδιορισθούν οι κρίσιμοι παράγοντες της διεργασίας (Critical Process Parameters – CPPs) και οι κρίσιμες ιδιότητες των υλικών (Critical Material Attributes – CMAs) που έχουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο στα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος. Εφόσον έχουν προσδιορισθεί οι κρίσιμοι παράγοντες της διεργασίας και τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας των υλικών, το επόμενο βήμα είναι η σύνδεσή τους με τα κρίσιμα χαρακτηριστικά ποιότητας του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος. Η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με στατιστικά σχεδιασμένα πειράματα, ώστε να διαμορφωθεί ο χώρος σχεδιασμού (Design Space). Αυτός ο χώρος διαμορφώνεται από την αλληλεπίδραση των εισερχομένων

μεταβλητών (CMAs, CPPs) που έχει αποδειχθεί ότι διασφαλίζουν την ποιότητα του τελικού φαρμακευτικού προϊόντος.



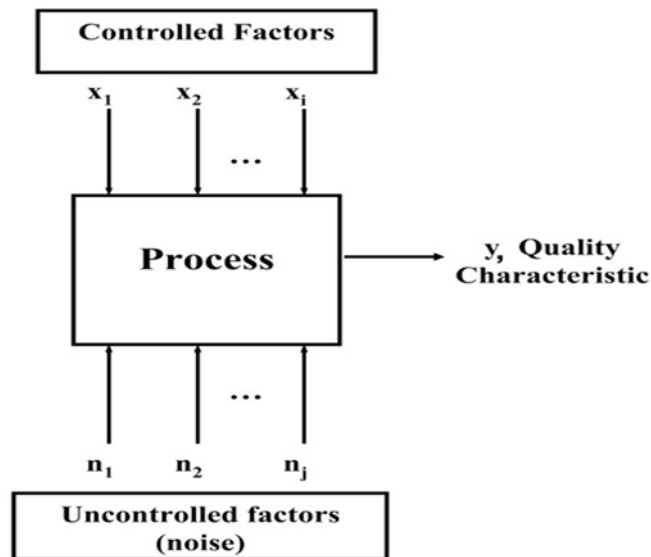
Εικόνα A39: Απεικόνιση της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού (Quality by Design) (Moore, FDA, 2012)

1.5.3 Εισαγωγή στο Σχεδιασμό των Πειραμάτων (Design of Experiments – DoE)

Πλέον η φάση της ανάπτυξης ενός φαρμακευτικού προϊόντος είναι άμεσα συνυφασμένη με την εφαρμογή της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού (QbD). Αναγνωρίζοντας τα βασικά χαρακτηριστικά αυτής της συστηματικής προσέγγισης για την ανάπτυξη των φαρμακευτικών προϊόντων, η Ποιότητα μέσω Σχεδιασμού (QbD) στοχεύει στη μαθηματική σύνδεση των CMAs και των CPPs με τα CQAs. Με βάση αυτή την επιστημονική γνώση επιτυγχάνεται συστηματικά η επιθυμητή ποιότητα του τελικού προϊόντος, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει η δυνατότητα για τη συνεχή βελτίωσή της.

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων είναι το βασικό συστατικό της στατιστικής εργαλειοθήκης για την εφαρμογή της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού. Η πρώτη δημοσίευση εφαρμογής του σχεδιασμού των πειραμάτων στην ανάπτυξη φαρμακευτικών μορφών έγινε το 1967 (Marlow and Shangraw, 1967) και έκτοτε έχουν ακολουθήσει εκατοντάδες άλλες μελέτες λόγω και της εισαγωγή της οδηγίας ICH Q8 που δημιούργησε ένα ευνοϊκό κανονιστικό περιβάλλον για την εφαρμογή του (Singh et al., 2005). Ο σχεδιασμός των πειραμάτων αποτελεί ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την επίτευξη και βελτίωση της ποιότητας των φαρμακευτικών προϊόντων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνιστά μια οργανωμένη μέθοδο προσδιορισμού της μαθηματικής σχέσης μεταξύ των εισερχόμενων και εξερχόμενων μιας διεργασίας με σκοπό την απόκτηση γνώσης σχετικά με αυτήν.

Διεργασία είναι μια ενέργεια που προσθέτει αξία, μετατρέποντας μια σειρά εισερχόμενων σε εξερχόμενα υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων που κατηγοριοποιούνται ως ελεγχόμενοι και μη. Οι τελευταίοι συνιστούν το θόρυβο μιας διεργασίας, είναι τυχαίοι και η συνολική τους επίδραση στα εξερχόμενα και στη διαμόρφωση των χαρακτηριστικών τους είναι μηδαμινή σε σχέση με την επίδραση των ελεγχόμενων παραγόντων σε αυτά (Montgomery, 2013).



Εικόνα Α40: Γραφική απεικόνιση μίας διεργασίας

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

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων συνιστά μια στατιστική προσέγγιση με την οποία οι ελεγχόμενοι (εισερχόμενοι) παράγοντες μεταβάλλονται σκόπιμα και στρατηγικά με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασής τους στις αποκρίσεις (χαρακτηριστικά ποιότητας –

εξερχόμενες μεταβλητές) (Montgomery, 2013). Η στρατηγική αυτή πειραματισμού επιτρέπει τη μαθηματική συσχέτιση των κρίσιμων παραμέτρων της διεργασίας, δηλαδή των CPPs (ανεξάρτητες μεταβλητές) με τα CQAs (εξαρτημένες μεταβλητές), όπως περιγράφονται στην Εικόνα Α39. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπονται:

- Ο προσδιορισμός των πιο σημαντικών (CPPs) από το σύνολο των παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν μια συγκεκριμένη διεργασία.
- Η εύρεση των βέλτιστων ρυθμίσεων των κρίσιμων παραμέτρων (CPPs) που διασφαλίζουν ότι οι τιμές των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας (CQAs) βρίσκονται εντός των προδιαγραφών και έχουν την ελάχιστη δυνατή μεταβλητότητα.
- Η ταυτοποίηση των **αλληλεπιδράσεων** (interactions) μεταξύ των παραγόντων, που συνιστά μια ουσιαστική διαφορά, αλλά και βασικό πλεονέκτημα σε σχέση με τον παραδοσιακό και συνήθη τρόπο εκτέλεσης πειραμάτων, που βασίζονται στην αλλαγή ενός μόνο παράγοντα τη φορά και ανεξάρτητα από τους υπολοίπους (One Factor At a Time - OFAT).

Οι μαθηματικές αυτές συσχετίσεις επιτρέπουν τη χαρτογράφηση της συμπεριφοράς της διεργασίας στα διαφορετικά επίπεδα των παραγόντων. Έτσι, διαμορφώνεται ο χώρος σχεδιασμού (Design Space), δηλαδή ο πολυδιάστατος συνδυασμός των κύριων επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων των εισερχόμενων μεταβλητών και των παραγόντων της διεργασίας που έχει αποδειχθεί πως διασφαλίζει την ποιότητα του προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητάς του. Η χαρτογράφηση του χώρου σχεδιασμού καθιστά εφικτή την επίτευξη των χαρακτηριστικών που ικανοποιούν τον προκαθορισμένο στόχο ποιότητας του συγκεκριμένου προϊόντος (Quality Target Product Profile - QTPP). Αυτό το προφίλ είναι το πρώτο και τελευταίο βήμα κάθε ανάπτυξης δεδομένου ότι συνιστά το στόχο της (χωρίς στόχο δεν μπορεί να υπάρξει διεργασία), αλλά και την τελική επιβεβαίωση του αν και κατά πόσον το τελικό προϊόν έχει τα προκαθορισμένα χαρακτηριστικά όπως αυτά περιγράφηκαν με επιστημονική σαφήνεια και καθαρότητα στο QTPP (ICH Q8, 2009).

1.5.4 Πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού

Ο στατιστικός σχεδιασμός των πειραμάτων παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτημάτων σε σχέση με τον παραδοσιακό τρόπο διεξαγωγής των πειραμάτων (OFAT). Η προσέγγιση του OFAT επικεντρώνεται στην αλλαγή ενός μόνο παράγοντα κάθε φορά και δεν επιτρέπει την ταυτόχρονη μελέτη τους, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η αναγνώριση πιθανών αλληλεπιδράσεών τους. Τα πλεονεκτήματα του Πειραματικού Σχεδιασμού συνοψίζονται παρακάτω (Montgomery, 2013):

- Μεγιστοποίηση της γνώσης για την υπό μελέτη διεργασία με την ελάχιστη χρήση πόρων.
- Παροχή ακριβής και αξιόπιστης πληροφορίας και γνώσης.
- Αναγνώριση των στατιστικά σημαντικών παραγόντων που έχουν το μεγαλύτερο αντίκτυπο στις εξερχόμενες μεταβλητές, καθώς και των αλληλεπιδράσεών τους.
- Διαμόρφωση του χώρου σχεδιασμού μέσω της μαθηματικής συσχέτισης αιτίου-αποτελέσματος μεταξύ CPPs και CQAs, καθώς και δυνατότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς της διεργασίας εντός του συγκεκριμένου χώρου.
- Βελτιστοποίηση των CQAs μέσω της επιλογής κατάλληλων τιμών των CPPs, οπότε έτσι διαμορφώνεται ένα αποδεδειγμένα αποδεκτό εύρος τους (Proven Acceptable Range, PAR). Πρόκειται δηλαδή για ένα συγκεκριμένο εύρος ρυθμίσεων των CPPs, εντός του οποίου η διεργασία θα παράγει σταθερά προϊόν με επαναλήψιμο τρόπο ικανοποιώντας τα κριτήρια ποιότητας που συνοψίζονται στο QTPP.
- Βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων, δηλαδή των διαφόρων χαρακτηριστικών ποιότητας. Αυτό πολύ σημαντικό, καθώς τα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν πάντα περισσότερα του ενός χαρακτηριστικά ποιότητας και γι' αυτό απαιτείται ταυτόχρονη βελτιστοποίηση τους.
- Σχεδιασμός και ανάπτυξη διεργασιών και προϊόντων πιο ανθεκτικά, δηλαδή λιγότερο ευαίσθητα, στη μεταβλητότητα.
- Εγκαιρη ανίχνευση και ταυτοποίηση εξωκείμενων παρατηρήσεων.

1.5.5 Φάσεις του Πειραματικού Σχεδιασμού

Σύμφωνα με τον Montgomery (1997), ο στατιστικός σχεδιασμός των πειραμάτων έχει μια σειρά διακριτών, αλλά και αλληλοεξαρτώμενων φάσεων.

1. Θέσπιση ενός σαφούς και επιστημονικά βάσιμου σκοπού. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης θα πρέπει να καθορισθεί το QTPP (Quality Target Product Profile) με βάση τη σύγχρονη επιστημονική γνώση, όπως αυτή προκύπτει από τη συστηματική μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας. Αναπόσπαστο κομμάτι της διαμόρφωσης του QTPP αποτελεί η διαχείριση της διακινδύνευσης της ποιότητας (Quality Risk Management approach ICH Q9, 2005).

2. Επιλογή των εξαρτημένων και ανεξάρτητων μεταβλητών της διεργασίας, δηλαδή των παραγόντων και των αποκρίσεων αντίστοιχα, ώστε να εξυπηρετείται ο σκοπός που ορίστηκε στο QTPP. Επίσης, είναι απαραίτητο να διασφαλισθεί ότι ο πειραματικός σχεδιασμός είναι εκτελέσιμος και στοχεύει στην αποτίμηση της αρχικής ιδέας που διαμορφώνεται ως QTPP.

Έτσι, οι παράγοντες (αριθμητικοί ή κατηγορικοί), καθώς και τα επίπεδα τους (οι τιμές που θα λαμβάνουν στο σχεδιασμό) θα πρέπει να επιλεγούν με βάση αυτά τα κριτήρια.

3. Επιλογή του κατάλληλου τύπου σχεδιασμού με βάση την εξυπηρέτηση του σκοπού, που μπορεί να αφορά σε χαρακτηρισμό, βελτιστοποίηση της διεργασίας ή/και της σύνθεσης ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Έτσι, είναι δυνατό να επιλεγεί ένας σχεδιασμός για τον προσδιορισμό των πιο σημαντικών παραγόντων που επιδρούν σε μια διεργασία παραγωγής ή ένας σχεδιασμός μίγματος για τη βελτιστοποίηση της ποιοτικής και ποσοτικής συνταγής ενός συστήματος χορήγησης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να ληφθούν και αποφάσεις σχετικά με τη τυχαιοποίηση της σειράς εκτέλεσης των πειραμάτων και τον αριθμό των επαναλήψεων για τον ασφαλή προσδιορισμό του πειραματικού σφάλματος, ώστε να καταστεί διακριτή η πιθανή επίδραση των παραγόντων στις αποκρίσεις.

4. Εκτέλεση του σχεδιασμού με ιδιαίτερη προσοχή και διασφάλιση ότι οι παράγοντες που δεν αποτελούν μέρος του σχεδιασμού έχουν ταυτοποιηθεί και διατηρούνται σταθεροί.

5. Έλεγχος ότι τα δεδομένα είναι συμβατά με τις αρχικές παραδοχές. Οι σχεδιασμοί είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην ταυτοποίηση εξωκείμενων παρατηρήσεων (outliers) που μπορούν να εμφανισθούν από πλημμελή εκτέλεση των πειραμάτων του σχεδιασμού. Με άλλα λόγια, εξωκείμενες παρατηρήσεις μπορούν να αποτελούν ένδειξη ότι μια δεδομένη συνθήκη δεν τηρήθηκε, όπως για παράδειγμα, ένας ή περισσότεροι παράγοντες που θα πρέπει να παραμείνουν σταθεροί, ενώ στην πραγματικότητα δεν είναι.

6. Ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και οι διάφοροι τύποι γραφημάτων αποτελούν τα εργαλεία για την ταυτοποίηση των σημαντικών παραγόντων και των ενδεχόμενων αλληλεπιδράσεων τους. Τα αποτελέσματα εκτιμώνται με βάση τη στατιστική, αλλά και τη συμβατότητα τους με επιστημονικά βάσιμες εξηγήσεις. Με αυτόν τον τρόπο διαμορφώνεται η γνώση, η οποία αφορά στην υπό μελέτη διεργασία.

7. Με βάση αυτή τη γνώση αποφασίζονται τα επόμενα βήματα, όπως για παράδειγμα, η εκτέλεση επιβεβαιωτικών πειραμάτων, η περαιτέρω ανάπτυξη του αρχικού σχεδιασμού, η μεταφορά της τεχνογνωσίας στην παραγωγή κλπ.

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι η επιτυχής διαδρομή μέσα από τα επτά αυτά βήματα προϋποθέτει την ύπαρξη ενός κατάλληλου περιβάλλοντος, το οποίο υποστηρίζει σταθερά και συνειδητά την απρόσκοπτη εφαρμογή του σχεδιασμού των πειραμάτων, εντός ενός ευρύτερου πλαισίου λειτουργίας του οργανισμού με κεντρικό πυλώνα την στατιστική σκέψη. Προκειμένου εφαρμοσθούν όλα τα παραπάνω, η Φαρμακευτική Βιομηχανία θα πρέπει να έχει αναπτύξει, ολοκληρώσει και ενσωματώσει ένα κατάλληλο Φαρμακευτικό Σύστημα Ποιότητας (Pharmaceutical Quality System, PQS, ICH Q10, 2008) σε όλο το εύρος του οργανισμού, ώστε να λειτουργήσουν αποτελεσματικά και συνεργιστικά οι άλλες δύο προσεγγίσεις, δηλαδή η απαίτηση για βαθιά γνώση των

διεργασιών (ICH Q8, 2008) και η διαχείριση διακινδύνευσης της ποιότητας (ICH Q9, 2005). Με άλλα λόγια οι τρεις αυτές οδηγίες αλληλοσυμπληρώνονται και θα πρέπει έτσι να εφαρμόζονται με ενιαίο τρόπο σε όλο το εύρος του οργανισμού καθ' όλη τη διάρκεια κυκλοφορίας του προϊόντος (product lifecycle approach).

1.5.6 Στόχοι του Πειραματικού Σχεδιασμού

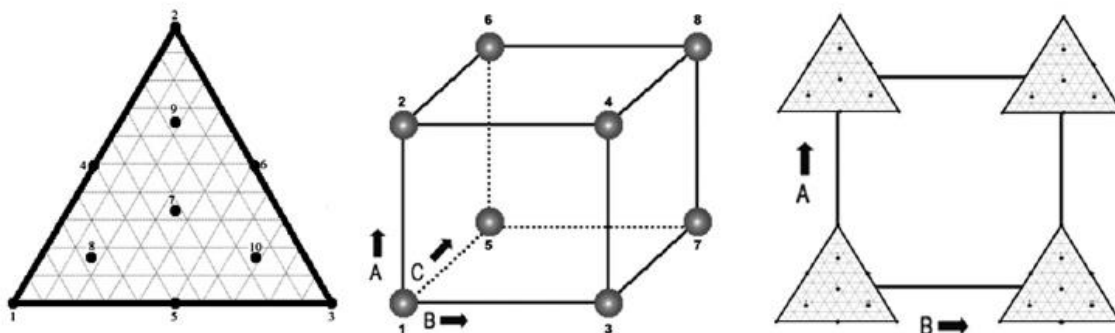
Ο απώτερος στόχος του στατιστικού σχεδιασμού των πειραμάτων είναι διπλός (Montgomery, 1999) και αφορά στο χαρακτηρισμό της διεργασίας (process characterization) και στη συνέχεια στη βελτιστοποίηση της (optimization).

Ο χαρακτηρισμός της διεργασίας έγκειται στη διάκριση των κρίσιμων παραγόντων, αυτών δηλαδή που είναι στατιστικά σημαντικοί από το σύνολο εκείνων που την επηρεάζουν. Επιτυγχάνεται με τη εφαρμογή προκαταρκτικών δοκιμασιών διαλογής (screening designs), οι οποίοι είναι συνήθως κλασματικοί, και σπανιότερα πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί, δύο επιπέδων. Οι πρώτοι έχουν το μειονέκτημα της μη αναγνώρισης των πιθανών αλληλεπιδράσεων, αλλά εξυπηρετούν την ταυτοποίηση των παραγόντων με σημαντική επίδραση στη διεργασία ή διαφορετικά ο αποκλεισμός από περαιτέρω μελέτη των υπολοίπων. Αντίθετα, οι πλήρεις σχεδιασμοί παραγόντων σε δύο επίπεδα αναγνωρίζουν τις αλληλεπιδράσεις και μπορούν να ενσωματώσουν κεντρικά σημεία (center points) για τη διερεύνηση πιθανής καμπυλότητας, δηλαδή μη γραμμικών επιδράσεων.

Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου οι σημαντικοί παράγοντες μελετώνται περαιτέρω, υιοθετώντας πιο αναλυτικούς σχεδιασμούς και στοχεύοντας στη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Αυτή περιλαμβάνει τον προσδιορισμό των τιμών ή του εύρους των σημαντικών παραγόντων που επιτρέπουν την επίτευξη των επιθυμητών τιμών όλων των κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας του προϊόντος ταυτοχρόνως. Οι σχεδιασμοί αυτοί είναι τουλάχιστον τριών επιπέδων, ώστε να καθίσταται εφικτή η αναγνώριση συναρτήσεων δευτέρου ή μεγαλύτερου βαθμού. Η μεθοδολογία των επιφανειών απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο υποστήριξης για τέτοιου είδους εφαρμογές.

1.5.7 Τύποι του Πειραματικού Σχεδιασμού

Οι βασικές κατηγορίες των πειραματικών σχεδιασμών είναι οι σχεδιασμοί μιγμάτων, οι παραγοντικοί σχεδιασμοί ή σχεδιασμοί διεργασιών και οι μικτοί σχεδιασμοί, όπως φαίνεται και στην παρακάτω Εικόνα A41.



Εικόνα A41: Βασικές κατηγορίες πειραματικών σχεδιασμών: μείγματα (αριστερά), παραγοντικοί ή διεργασιών (κέντρο) και μικτοί (δεξιά) (Politis et al., 2017)

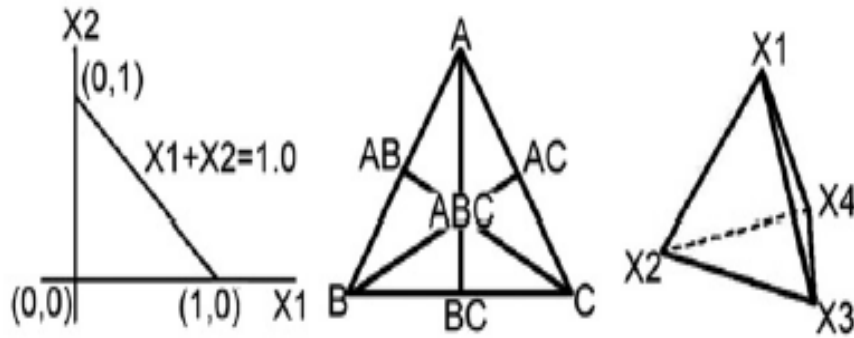
1.5.7.1 Σχεδιασμοί μιγμάτων (Mixture Designs)

Οι σχεδιασμοί μιγμάτων χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό και βελτιστοποίηση των φαρμακευτικών συνθέσεων και εφαρμόζονται, όταν το συνολικό ποσό της συνταγής είναι ορισμένο, όπως π.χ. για τον ποσοτικό καθορισμό των επιμέρους συστατικών της σύνθεσης ενός δισκίου με συγκεκριμένο βάρος. Ο σκοπός των σχεδιασμών αυτών είναι ο εξορθολογισμός της χρήσης κάθε συστατικού και της αναλογίας του στη συνταγή (Piepel & Cornell, 1994). Τυπικές εφαρμογές αποτελούν ο προσδιορισμός της αναλογίας των αραιωτικών σε στερεές φαρμακοτεχνικές μορφές, η επιλογή των κατάλληλων ποσοτήτων διαλυτών και συνδιαλυτών σε μια υγρή φαρμακευτική μορφή κλπ.

Είναι προφανές ότι στους σχεδιασμούς μιγμάτων οι αναλογίες των συστατικών δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει, επειδή η αύξηση του ενός συστατικού προϋποθέτει αναγκαστικά τη μείωση του ή των υπολοίπων, ώστε το σύνολό τους να διατηρείται σταθερό. Η παρακάτω εξίσωση εκφράζει τη σχέση μεταξύ των επιλεχθέντων αποκρίσεων ως συνάρτηση των αναλογιών των συστατικών του μίγματος.

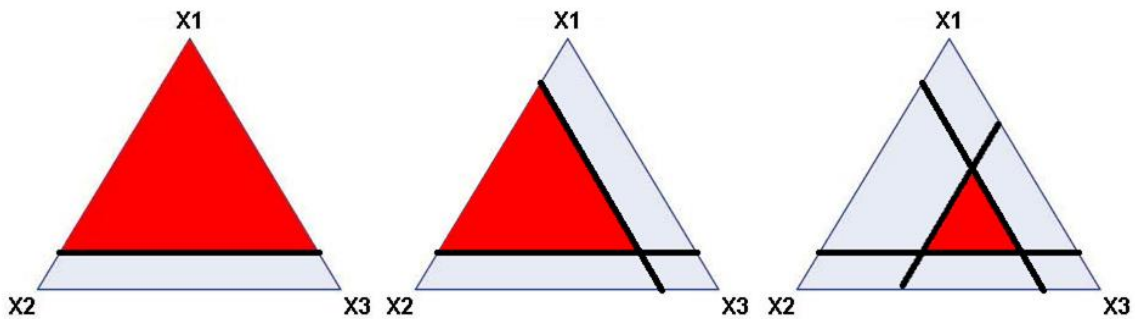
$$\text{Responses} = f(\text{component proportions})$$

Οι σχεδιασμοί Simplex είναι οι απλούστεροι και περιγράφουν μίγματα των οποίων οι αναλογίες κυμαίνονται μεταξύ του μηδενός και ενός μέγιστου ποσοστού συνήθως 100%. Στην παρακάτω Εικόνα A42 παρουσιάζονται οι περιπτώσεις σχεδιασμών με δύο, τρία και τέσσερα συστατικά.



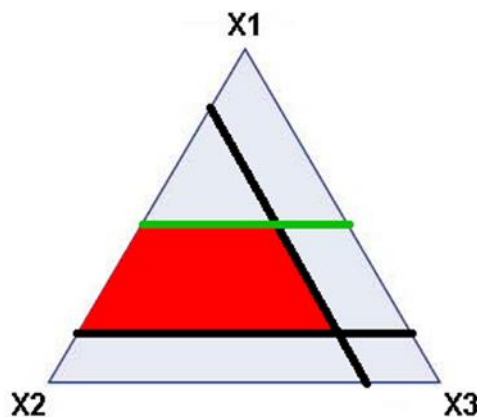
Εικόνα A42: Γραφική αναπαράσταση μιγμάτων τύπου simplex για δύο (αριστερά) τρία (κέντρο) και τέσσερα (δεξιά) συστατικά (Politis et al., 2017)

Στην περίπτωση που απαιτούνται κατώτατα όρια για ένα ή περισσότερα συστατικά, ο χώρος σχεδιασμού διαμορφώνεται, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα A43.



Εικόνα A43: Σχεδιασμοί μείγματος με κατώτερο όριο σε ένα (X_1), δύο (X_1 και X_2) ή τρία συστατικά (αριστερά, κέντρο και δεξιά αντίστοιχα) (Politis et al., 2017)

Τέλος στην περίπτωση που χρειαστεί ανώτατο όριο τουλάχιστον για ένα συστατικό, ο σχεδιασμός δεν είναι πλέον simplex, αλλά καθίσταται πιο σύνθετος και η κατασκευή και μελέτη του απαιτεί την υποστήριξη κατάλληλου αλγόριθμου (σχεδιασμοί optimal).



Εικόνα A44: Παράδειγμα non simplex σχεδιασμού όπου ένα συστατικό (X_1) εμφανίζει διαφορετικό ανώτερο όριο στην περιεκτικότητά του (Politis et al., 2017)

1.5.7.2 Παραγοντικοί Σχεδιασμοί (Factorial Designs)

Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί αναφέρονται σε παραμέτρους που ρυθμίζονται ανεξάρτητα μεταξύ τους, όπως για παράδειγμα η δύναμη συμπίεσης, η θερμοκρασία, ο ρυθμός ψεκασμού κλπ. Στην προκειμένη περίπτωση οι αποκρίσεις είναι συνάρτηση των επιπέδων των παραγόντων, όπως περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση.

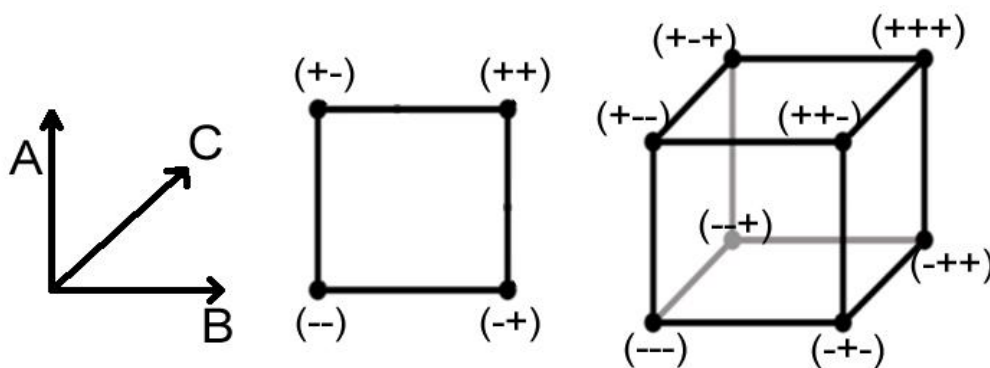
$$\text{Responses} = f(\text{factor levels})$$

Στους παραγοντικούς σχεδιασμούς οι παράγοντες της διεργασίας μεταβάλλονται ταυτόχρονα και σκόπιμα σύμφωνα με μια προσχεδιασμένη μήτρα συνδυασμών των επιπέδων τους. Η βασική διαφορά με τους σχεδιασμούς μιγμάτων είναι ότι στην περίπτωση αυτή κάθε παράγοντας μπορεί να μεταβληθεί ανεξάρτητα από τους άλλους.

Οι παράγοντες συνήθως παρουσιάζονται με κεφαλαία γράμματα (A,B,C...), ενώ το χαμηλό και υψηλό επίπεδο τους με (-) ή -1 και (+) ή (+1), αντίστοιχα. Εφόσον υπάρχει και ενδιάμεσο επίπεδο αυτό συμβολίζεται με το μηδέν (0). Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί περιλαμβάνουν όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των παραγόντων και των επιπέδων τους, ο συνολικός αριθμός των οποίων ορίζεται από την παρακάτω εξίσωση.

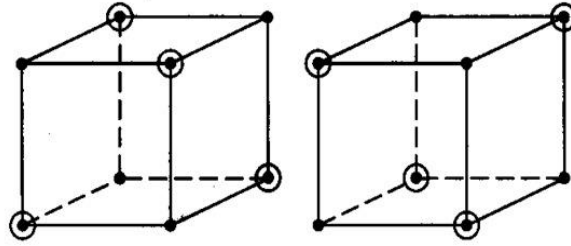
$$\text{Αριθμός των πειραμάτων} = \text{Επίπεδα}^{\text{Παράγοντες}}$$

Για παράδειγμα, ένας πλήρης σχεδιασμός τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα ο καθένας, απαιτεί $2^3=8$ πειράματα.



Εικόνα A45: Γραφική αναπαράσταση πλήρων παραγοντικών σχεδιασμών δύο και τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα (Politis et al., 2017)

Οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί συνιστούν μέρος των αντίστοιχων πλήρων σχεδιασμών, συνήθως το $\frac{1}{2}$ ή το $\frac{1}{4}$ αυτών. Χρησιμοποιούνται ευρέως, όταν ο αριθμός των παραγόντων ξεπερνά τους 4-5, με σκοπό την επιλογή των πιο σημαντικών από αυτούς προς περαιτέρω διερεύνηση (screening designs).



Εικόνα A46: Μισός κλασματικός σχεδιασμός τεσσάρων παραγόντων σε δύο επίπεδα

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

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπό της παρούσας ερευνητικής μελέτης αποτελεί η μορφοποίηση της Ρεσβερατρόλης σε ημιστερεές μορφές με σκοπό τη διαμέσου του δέρματος χορήγησή της, και ειδικότερα η ανάπτυξη ημιστερεών γαλακτωμάτων ο/w τοπικής χρήσης, χρησιμοποιώντας τεχνικές του Σχεδιασμού Μίγματος, καθώς και η αξιολόγηση της *in vitro* διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα και την τεχνητή μεμβράνη Strat-M®. Επίσης, επιχειρήθηκε η συσχέτιση των *in vitro* αποτελεσμάτων διαπερατότητας ανάμεσα στο ανθρώπινο δέρμα και την τεχνητή μεμβράνη.

Η Ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα ότι έχει αξιόλογες αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις βιολογικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να σχετίζεται με πολλές δυνητικά θεραπευτικές χρήσεις. Όμως, η Ρεσβερατρόλη έχει πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα μετά από *per os* λόγω του εκτεταμένου μεταβολισμού και του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής. Έτσι, το δέρμα μπορεί να αποτελέσει μία εναλλακτική οδό χορήγησης της Ρεσβερατρόλης. Επίσης, το μοριακό βάρος ($228.25 \text{ g mol}^{-1}$), καθώς και ο συντελεστής λιποφιλίας ($\log P_{o/w} = 3.1$) καθιστούν τη Ρεσβερατρόλη υποψήφια φαρμακολογικά δραστική ουσία, προκειμένου να μορφοποιηθεί και να χορηγηθεί μέσω ενός συστήματος διαδερμικής χορήγησης.

Ο Σχεδιασμός των Πειραμάτων (Design of Experiments) είναι το στατιστικό εργαλείο που θέτει σε εφαρμογή την προσέγγιση της Ποιότητας μέσω Σχεδιασμού (Quality by Design), η οποία πλέον αποτελεί την κεντρική ιδέα του κανονιστικού πλαισίου για τη φαρμακευτική ανάπτυξη. Γι' αυτό ο Πειραματικός Σχεδιασμός αποτελεί βασικό συστατικό της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Παρότι το ανθρώπινο δέρμα είναι η μεμβράνη επιλογής στα *in vitro* πειράματα διάχυσης, παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες και περιορισμούς στη χρήση, όπως η υψηλή μεταβλητότητα ανάλογα με το δόση από τον οποίο προέρχεται, η περιορισμένη διαθεσιμότητα, η ευαισθησία στις συνθήκες αποθήκευσης και η ειδική προεργασία. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η εύρεση μίας εμπορικά διαθέσιμης τεχνητής μεμβράνης με χαμηλή μεταβλητότητα και επαναλήψιμα αποτελέσματα, υψηλή σταθερότητα και ευκολία στη χρήση, η οποία θα προσομοιάζει το ανθρώπινο δέρμα και θα μπορεί να αξιολογήσει τη διαδερμική διαπερατότητα φαρμακολογικά δραστικών ουσιών από διαδερμικά φαρμακευτικά προϊόντα με τοπική ή/και συστηματική δράση.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

2.1.1 Υλικά

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, τα οποία περιλαμβάνονται στη παρούσα εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) «Βιομηχανική Φαρμακευτική» χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αναφερόμενες πρώτες ύλες και αντιδραστήρια. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού και γι' αυτό δε χρειάστηκαν περαιτέρω επεξεργασία.

- Resveratrol (Batch No: 18G25-H04-00726, Fagron, Greece)
- Hydrochloric acid S.G. 1.18 ~ 37% (Lot: 1603524, Fischer Scientific, UK)
- Macrogol 400 (Batch No: 18C20-H16-00203, Fagron, Greece)
- Cetyl Alcohol (Batch No: 17C22-H09-00122, Fagron, Greece)
- Phenoxyethanol (Batch No: 18B21-H05-00112, Fagron, Greece)
- Labrasol (Gattefosse, France)
- Isopropyl myristate (Lot: 17H01-B10-340281, Fagron, Greece)
- Liquid Satin Blend (Lot: 0008934694, Dow Corning, USA)
- Ethoxydiglycol (Batch No: 16G15-H01-00656, Fagron, Greece)
- BHT (Batch No: P1401865-000, Farmalabor, Italy)
- Gelot 64 (Batch No: 165240, France)
- Tefose 63 (Batch No: 157847, Gattefosse, France)
- EDTA (Batch No: 17D25-B08-341591, Fagron GmbH, Germany)
- Propylene Glycol (Batch No: 18C20-H03-00020, Fagron, Greece)
- Pentravan[®] - Transdermal Cream Base (Batch No: 1709950/3, Fagron, Greece)
- Sepineo D.E.R.M. (Batch No: 80054N 160530011178, France)
- Sepineo P 600 (Batch No: 38406W 17011015660, France)
- Lipoid H 100-3 (Batch No: 511570-2150002-20/030, Lipoid GmbH, Germany)
- Acetonitrile HPLC Gradient Grade (Lot: 1709890, Fischer Scientific UK)
- Water HPLC Gradient Grade (Lot: 1856602, Fischer Scientific UK)
- Methanol HPLC Gradient Grade (Lot: 1845285, Fischer Scientific, UK)
- Sodium Dihydrogen Phosphate Dihydrate G.R. (Batch No: PP/2011/00057 Lach Ner, Chzech Republic)
- Sodium Hydroxide Pearls G.R. (Batch No: PP/2017/12966 (Lach Ner, Chzech Republic)

2.1.2 Εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός ζυγός: Mettler Toledo AT261, Delta Range (Mettler, Switzerland)
- Υδατόλουτρο υπερήχων: Elmasonic S 100 H (Elma Schmidbauer GmbH, Germany)
- Μαγνητικοί αναδευτήρες: Nuova II Stir Plate (Thermolyne, U.S.A.)
- Συσκευή φυγοκέντρωσης: HERMLE Type Z 32 HK (Labortechnik GmbH Germany)
- Ομογενοποιητής: Virtis Tempest 302968 Blade-type Homogenizer (VirTis, USA)
- Vortex: Heidolph Reax top (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Germany)
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου: Finnpiquette Digital (Thermo Scientific, Germany)
- pHμετρο: Lab 860 (Schott® Instruments GmbH, Germany)
- Κλίβανος: WT binder (Binder, Germany)
- Κύτταρα διάχυσης: Τροποποιημένα κύτταρα Franz με όγκο 6.275 mL και διαθέσιμη επιφάνεια διάχυσης 0.636 cm² (Crown Glass, Somerville, U.S.A.)
- Θερμορρυθμιστής: Edmund Bühler 7400 (Tübingen, Germany)
- Υδατόλουτρο: Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany)
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης: Cimarec 3 (Thermolyne, U.S.A.)
- Μικροσκόπιο Leica (Leica Microsystems Wetzal GmbH, Germany) εξοπλισμένο με σύστημα ανάλυσης εικόνας (Leica Q500IW System, Leica Cambridge, England), αποτελούμενο από έγχρωμη συσκευή λήψης εικόνας (JVC Colour Digital Camera, TKC1381, Japan)

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Λήψη φάσματος UV

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων, τα οποία λαμβάνονται από το διάλυμα του υποδοχέα των τροποποιημένων κυττάρων διάχυσης (κύτταρα διάχυσης – modified Franz Diffusion Cells), μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), είναι απαραίτητο οι μετρήσεις να πραγματοποιούνται στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας (λ_{max}).

Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους: α) Για την επίτευξη της μέγιστης ευαισθησίας και β) την ελαχιστοποίηση της μεταβολής των απορροφήσεων εξαιτίας μικρών μεταβολών του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, αφού στο λ_{max} παρατηρείται πλατό του φάσματος απορρόφησης.

Έτσι, πραγματοποιήθηκε η λήψη του φάσματος UV της Ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του διαμερίσματος δέκτη με τη χρήση του φασματομετρου Shimadzu PharmaSpec UV-1700 UV/Vis spectrometer, το οποίο είναι εξοπλισμένο με το λογισμικό πρόγραμμα UV Probe 2.10 software (Shimadzu).

Μετά από μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού με διάλυμα από το διαμέρισμα δέκτη, ελήφθη το φάσμα απορρόφησης της ουσίας σε κυψελίδα από χαλαζία πάχους 1 cm (No 6030-UV, Helma, Γερμανία).

2.2.2 Αναλυτική Μέθοδος HPLC

2.2.2.1 Χρωματογραφικές συνθήκες

Προκειμένου να αναλυθεί και να ποσοτικοποιηθεί η Ρεσβερατρόλη στα άγνωστα δείγματα και στα πρότυπα διαλύματα, χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη μέθοδος αντίστροφής φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Abla & Banga, 2013, Polonini et al., 2014). Το σύστημα της HPLC που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από μία αντλία υψηλής πίεσης (P1000, Spectra Physics, USA), έναν αυτόματο δειγματολήπτη (AS1000, Spectra Physics, USA), μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή (Spectra System SN 4000, Thermo Separation Products, U.S.A.) κι έναν ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Spectra System 2000 UV-Vis detector, Thermo Separation Products, USA).

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Hypersil® BDS C18 column (250 x 4.6mm, 5 μ m, Thermo Fischer Scientific). Οι αναλύσεις των δεδομένων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ChromQuest Chromatography Data System, version 5.1 (ThermoQuest, USA). Η κινητή φάση αποτελούταν από ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.03 M pH ~ 4 σε αναλογία 35:65 αντίστοιχα. Η ροή ρυθμίστηκε στην τιμή 1

mL/min, ενώ ο όγκος της ένεσης ήταν 50 µL. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι χρωματογραφικές συνθήκες συνοψίζονται στον παρακάτω Πίνακα Β1.

Πίνακας Β1: Σύνοψη των χρωματογραφικών συνθηκών

| ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ | |
|---------------------------------|---|
| Στήλη (Στατική Φάση) | Hypersil® BDS C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) |
| Κινητή Φάση | ACN : Phosphate Buffer 0.03M pH 4 (35 : 65) |
| Ροή | 1 mL/min |
| Όγκος Ένεσης | 50 µL |
| Θερμοκρασία | Θερμοκρασία περιβάλλοντος |
| λ_{max} | 306 nm |
| Χρόνος Έκλουσης | 5.5 min |

2.2.2.2 Παρασκευή της κινητής φάσης

Η κινητή φάση αποτελούταν από ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.03 M pH ~ 4 σε αναλογία 35:65 αντίστοιχα. Για την παρασκευή δύο λίτρων (2 L) κινητής φάσης, αρχικά ζυγίζονται 9.36 g NaH₂PO₄·2H₂O και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 2000 mL. Ακολουθεί προσθήκη H₂O βαθμού καθαρότητας HPLC περίπου μέχρι τα 1800 mL και ανάδευση σε πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα, μέχρι να διαλυθεί πλήρως το άλας και να προκύψει διάλυμα. Μόλις διαλυθεί το άλας, μετράται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται στην τιμή 4.0 με διάλυμα HCl κανονικότητας 1M. Στη συνέχεια το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως μεταφέρεται σε μία ογκομετρική φιάλη των 2000 mL και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τη χαραγή με H₂O βαθμού καθαρότητας HPLC.

Έπειτα ογκομετρούνται 1300 mL του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος και 700 mL ACN (CH₃CN) που αναμιγνύονται μεταξύ τους. Ακολουθεί καλή ανακίνηση και διήθηση υπό κενό μέσω αντλίας (Millipore, UK) χρησιμοποιώντας φίλτρα. Τέλος, η κινητή φάση τοποθετείται στο υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά με σκοπό την απαέρωσή της.

2.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Το διάλυμα παρακαταθήκης (stock solution) παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.02 g Ρεσβερατρόλης με 200 mL μεθανόλης (MeOH) σε σκοτεινόχρωμη (amber) ογκομετρική φιάλη των 200 mL, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση να είναι 100 µg/mL. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης με το διάλυμα του υποδοχέα (receptor solution) ή με την κινητή φάση, ανάλογα τη φύση της

πειραματικής διεργασίας. Με βάση αυτά τα πρότυπα διαλύματα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς.

2.2.4 Έλεγχος γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης

Τα πρότυπα διαλύματα της Ρεσβερατρόλης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης. Κάθε πρότυπο αναλύθηκε τρεις φορές ($n=3$). Τα αποτελέσματα, τα οποία προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των κορυφών των χρωματογραφημάτων, χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους ($y=ax+b$), η κλίση (a , slope), η τεταγμένη επί την αρχή (b , intercept) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2).

2.2.5 Παρασκευή του διαλύματος του υποδοχέα

Το διάλυμα του υποδοχέα αποτελείται από ύδωρ και προπυλενογλυκόλη σε αναλογία 50 : 50 ($H_2O:PG$ 50:50). Η προσθήκη συνδιαλυτών που είναι αναμίξιμοι με το ύδωρ, όπως η αιθανόλη, η προπυλενογλυκόλη και η πολυιθυλενογλυκόλη 400 (PEG 400), στο διάλυμα του υποδοχέα, το οποίο συνήθως αποτελείται είτε από ύδωρ είτε από PBS pH 7.4, είναι μία συχνή τακτική, προκειμένου να διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διάχυσης (Tavano et al., 2014, Tsai et al., 2016, Kalita et al., 2016).

Για την παρασκευή 500 mL διαλύματος αρχικά ογκομετρήθηκαν 250 mL προπυλενογλυκόλης (Propylene Glycol - PG) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου που μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL. Στη συνέχεια ογκομετρήθηκαν 250 mL H_2O μέσω ογκομετρικού κυλίνδρου και μεταφέρθηκαν στην ίδια ογκομετρική φιάλη. Έπειτα, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε πλάκα και το περιεχόμενο αναδεύτηκε για περίπου 30 λεπτά με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Τέλος, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά, προκειμένου να απαερωθεί το διάλυμα.

2.2.6 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα

Ο προσδιορισμός της διαλυτότητας κορεσμού πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας περίσσεια ποσότητας της Ρεσβερατρόλης σε υάλινα φιαλίδια ($n=3$), τα οποία περιείχαν 5 mL του διαλύματος του υποδοχέα, $PG:H_2O$ 50:50. Αρχικά, τα υάλινα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε πλάκα με το περιεχόμενο να αναδεύεται για περίπου 2 ώρες με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο δίσκο για 24 ώρες σε θερμοκρασία $25^\circ C$.

Το περιεχόμενο των φιαλιδίων μεταφέρθηκε σε κωνικό ογκομετρικό σωλήνα και τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο συσκευή, όπου και φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 rpm για 10 λεπτά. Έπειτα, το περιεχόμενο του κάθε ογκομετρικού σωλήνα διηθήθηκε μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45 μm (CHROMAFIL® Xtra RC-45/13, Germany). Στη συνέχεια, κατάλληλοι όγκοι του κάθε διηθήματος αραιώθηκαν με το διάλυμα του υποδοχέα και η συγκέντρωση της Ρεσβερατρόλης προσδιορίστηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

2.2.7 Αρχικές συνταγές (συνθέσεις) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία

Αναζητώντας στη βιβλιογραφία σύγχρονες βάσεις κρεμών για τη μορφοποίηση λιπόφιλων φαρμακολογικά δραστικών ουσιών, βρέθηκε ο παρακάτω φορέας.

Πίνακας B2: Αρχικός φορέας για τη μορφοποίηση λιπόφιλων ΦΔΟ

| ΦΑΣΗ Α | % w/w | ΦΑΣΗ Β | % w/w | ΦΑΣΗ Γ | % w/w | ΦΑΣΗ Δ | % w/w |
|---------------------|-------|----------------|-------|---------------|-------|------------------|-------|
| Gelot 64 | 4 | Water | 65.1 | Sepineo P 600 | 2 | Phenoxy ethanol | 1 |
| Tefose 63 | 4 | Lipoid H 100-3 | 2.5 | Sepineo DERM | 2.3 | Vitamin E | 1 |
| Labrasol | 4 | EDTA | 0.1 | | | Satin Blend 3901 | 5 |
| Cetyl Alcohol | 2 | BHT | 0.01 | | | Transcu. P | 5 |
| Isopropyl Myristate | 2 | | | | | | |

Παρακάτω παρουσιάζονται τα INCI Names των συστατικών του φορέα:

- Gelot 64: Glyceryl stearate (and) PEG-75 Stearate
- Tefose 63: PEG-6 Stearate (and) Glycol Stearate (and) PEG-32 Stearate
- Labrasol: PEG-8 Caprylic/Capric Glycerides
- Lipoid H 100-3: Hydrogenated Phosphatidylcholine
- Vitamin E: Tocopheryl acetate
- Sepineo P 600: Acrylamide/Sodium Acryloyldimethyl taurate copolymer isohexadecane (and) Polysorbate 80
- Sepineo DERM: Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyl Dimethyl Taurate Copolymer
- Satin Blend 3901: Dimethicone (and) Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer
- Transcutol P: Ethoxydiglycol
- BHT: Butylated HydroxyToluene

Ο φορέας αυτό αποτελείται από την λιπαρή φάση Α, η οποία αποτελείται από δύο ελαιώδη συστατικά, το Isopropyl Myristate και το Labrasol, και την κετυλική αλκοόλη που είναι στερεό λιπαρό συστατικό. Το σύστημα των γαλακτοματοποιητών αποτελείται από δύο μη ιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, το Gelot 64 και το Tefose 63. Η υδατική φάση Β αποτελείται από το ύδωρ, ένα χηλικό παράγοντα, το EDTA, μία αντιοξειδωτική ουσία, το BHT, καθώς κι ένα υδρογονωμένο παράγωγο της λεκιθίνης, το Lipoid H 100-3. Η φάση Γ αποτελείται από δύο σύγχρονα ακρυλικά πολυμερή για την αύξηση του ιξώδους του γαλακτώματος. Τέλος, η φάση Δ αποτελείται από τα θερμοευαίσθητα συστατικά, δηλαδή τη φαινοξυαιθανόλη, που δρα ως συντηρητικό, τη Βιταμίνη Ε, που δρα ως αντιοξειδωτική ουσία, το Satin Blend 3901, που βελτιώνει τις ρεολογικές ιδιότητες του γαλακτώματος, καθώς κι από την επιφανειοδραστική ουσία Transcutol P, που έχει διπλό ρόλο, καθώς είναι καλός διαλύτης πολλών λιπόφιλων δραστικών ουσιών και ταυτόχρονα δρα ως ενισχυτής διαβατότητας βελτιώνοντας τη διαδερμική απορρόφηση.

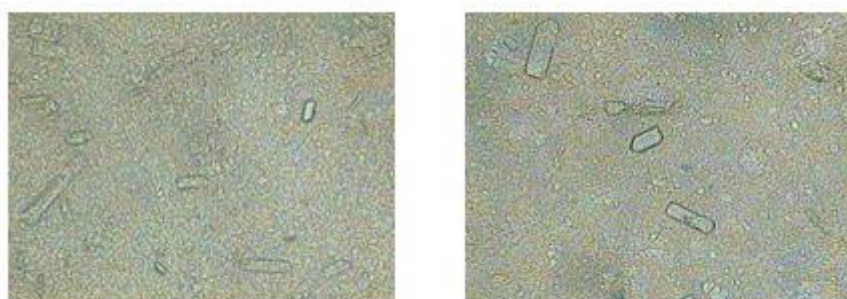
Ο συγκεκριμένος φορέας παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία να εμφανίζει δύο σημαντικά πλεονεκτήματα, την αυξημένη σταθερότητα και την αυξημένη διαδερμική διαπερατότητα των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών που ενσωματώνονται σε αυτόν. Αξίζει να αναφερθεί πως ο συγκεκριμένος φορέας προτείνεται ειδικά για τη μορφοποίηση και την ανάπτυξη γαλακτωμάτων τοπικής χρήσης που περιέχουν ως δραστικό συστατικό τη Ρεσβερατρόλη. Επειδή, όμως, δεν αναφέρεται σε ποια φάση προστίθεται η Ρεσβερατρόλη, αποφασίσθηκε να εισαχθεί στη Φάση Ε (Συνταγή F1), αλλά και στη λιπαρή Φάση Α (Συνταγή F2). Μετά από μελέτες προμορφοποίησης, καθώς κι μέσω φωτογραφιών από το μικροσκόπιο, αποδείχθηκε ότι και στις δύο συνταγές F1 και F2 η Ρεσβερατρόλη είναι απαιωρημένη και όχι πλήρως διαλυμένη. Στους παρακάτω Πίνακες Β3 και Β4 παρουσιάζονται οι συνταγές F1 και F2, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τις αρχικές *in vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη Strat-M®.

Πίνακας Β3: Συνταγή F1 με 2% w/w Ρεσβερατρόλη (ΦΑΣΗ Ε)

| ΦΑΣΗ Α | % w/w | ΦΑΣΗ Β | % w/w | ΦΑΣΗ Γ | % w/w | ΦΑΣΗ Δ | % w/w | ΦΑΣΗ Ε | % w/w |
|---------------------|-------|----------------|-------|---------------|-------|------------------|-------|------------|-------|
| Gelot 64 | 4 | Water | 65.1 | Sepineo P 600 | 2 | Phenoxy ethanol | 1 | RESV | 2 |
| Tefose 63 | 4 | Lipoid H 100-3 | 2.5 | Sepineo DERM | 2.3 | Vitamin E | 1 | Transcu. P | 5 |
| Labrasol | 4 | EDTA | 0.1 | | | Satin Blend 3901 | 5 | | |
| Cetyl Alcohol | 2 | BHT | 0.01 | | | | | | |
| Isopropyl Myristate | 2 | | | | | | | | |

Πίνακας B4: Συνταγή F2 με 2% w/w Ρεσβερατρόλη (ΦΑΣΗ Α)

| ΦΑΣΗ Α | % w/w | ΦΑΣΗ Β | % w/w | ΦΑΣΗ Γ | % w/w | ΦΑΣΗ Δ | % w/w |
|---------------------|-------|----------------|-------|---------------|-------|------------------|-------|
| Gelot 64 | 4 | Water | 65.1 | Sepineo P 600 | 2 | Phenoxy ethanol | 1 |
| Tefose 63 | 4 | Lipoid H 100-3 | 2.5 | Sepineo DERM | 2.3 | Vitamin E | 1 |
| Labrasol | 4 | EDTA | 0.1 | | | Satin Blend 3901 | 5 |
| Cetyl Alcohol | 2 | BHT | 0.01 | | | Transcu. P | 5 |
| Isopropyl Myristate | 2 | | | | | | |
| RESV | 2 | | | | | | |



Εικόνα B1: Φωτογραφίες μικροσκοπίου των Συνταγών F1 (δεξιά) και F2 (αριστερά) στις οποίες φαίνονται ευκρινώς οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι της Ρεσβερατρόλης

Επίσης, μετά από εκτενή αναζήτηση στη βιβλιογραφία, βρέθηκε ότι η παρακάτω συνταγή F3 προτείνεται για τη μορφοποίηση της Ρεσβερατρόλης, καθώς εμφανίζει πολύ ικανοποιητική σταθερότητα και σύμφωνα με τα αποτελέσματα των *in vitro* μελετών διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα, η Ρεσβερατρόλη παρουσίασε πολύ αυξημένη διαπερατότητα. Στον παρακάτω Πίνακα B5 παρουσιάζεται η συνταγή F3 (Polonini et al., 2014). Σε αυτή τη συνταγή η Ρεσβερατρόλη διασπείρεται αρχικά στην επιφανειοδραστική ουσία Transcutol P και στη συνέχεια ακολουθεί η ανάμιξη και η ενσωμάτωση με την κρέμα βάση Pentravan®.

Πίνακας B5: Συνταγή F3 με 2% w/w Ρεσβερατρόλη

| ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ | % w/w |
|---------------------------------|----------|
| Ρεσβερατρόλη (RESV) | 2 |
| Transcutol P | 0.5 |
| Pentravan® Transdermal Emulsion | q.s. 100 |

2.2.8 Παρασκευή των γαλακτωμάτων

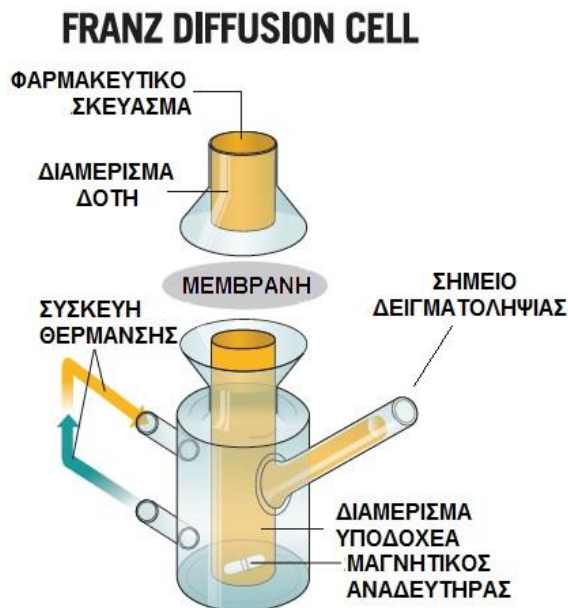
Τα ημιστερεά γαλακτώματα ο/ω παρασκευάστηκαν μέσω της γενικής μεθόδου παρασκευής των γαλακτωμάτων. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται τα συστατικά της λιπαρής φάσης (ΦΑΣΗ Α), το οποίο τοποθετείται σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης. Ακολουθεί θέρμανση στους 70° C υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται τα συστατικά της υδατικής φάσης (ΦΑΣΗ Β), το οποίο τοποθετείται σε μαγνητική πλάκα ανάδευσης. Ακολουθεί θέρμανση στους 70° C υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Για την καλύτερη ενσωμάτωση του Lipoid H 100-3, μετά την προσθήκη του ακολουθεί ομογενοποίηση (μόνο της φάσης Β) για 5 λεπτά.

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

2.2.9 Αρχικές *in vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M® (Strat-M® Membrane for Transdermal Diffusion Testing)

Για τη διεξαγωγή των *in vitro* μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας της Ρεσβερατρόλης χρησιμοποιήθηκαν κάθετα στατικά υάλινα κύτταρα διάχυσης (EPA, 1992). Τα τροποποιημένα κύτταρα Franz (modified Franz Diffusion Cells), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν όγκου 6.275 mL και διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης 0.636 cm².

Τα κύτταρα διάχυσης Franz αποτελούνται από δυο διαμερίσματα, αυτό του δότη (donor compartment) και αυτό του δέκτη (receptor compartment), όπως έχει αναφερθεί και στο Κεφάλαιο 1.3. Η πειραματική διαδικασία αρχίζει με την ενεργοποίηση του υδατόλουτρου, έτσι ώστε όλα τα τροποποιημένα κύτταρα Franz να εξισορροπούνται στους 32° C (OECD, 2004). Η θερμοκρασία γύρω από τα κύτταρα διατηρείται σταθερή στους 32° C, για να προσομοιάζεται η θερμοκρασία επιφάνειας του δέρματος (Itin, 2016). Το διάλυμα υποδοχέα, το οποίο έχει πρώτα απαερωθεί, τοποθετείται στο υδατόλουτρο προκειμένου να εξισορροπηθεί στους 32° C.



Εικόνα Β2: Απεικόνιση ενός τροποποιημένου κυτάρου διάχυσης Franz

Μεταξύ του διαμερίσματος του δότη και του δέκτη παρεμβάλλεται η μεμβράνη, που στην προκειμένη περίπτωση είναι η τεχνητή μεμβράνη Strat-M®. Η μεμβράνη αυτή δεν απαιτεί καμία κατεργασία πριν τη χρήση της στα *in vitro* πειράματα διάχυσης. Αφού αφαιρέθηκε το προστατευτικό της κάλυμμα, η μεμβράνη σε σχήμα δίσκου τοποθετήθηκε πάνω σε μία πλάκα και κόπηκαν κυκλικά τεμάχια με τη βοήθεια μεταλλικού εμβόλου. Τα κυκλικά αυτά τεμάχια είχαν μέγεθος τέτοιο που κάλυπτε ολόκληρη τη διαθέσιμη επιφάνεια του κυτάρου διάχυσης Franz.



Εικόνα Β3: Απεικόνιση της τεχνητής μεμβράνης Strat-M® (Διαθέσιμο σε: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892)

Τα κυκλικά τεμάχια τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμέρισμα του δέκτη με τη γυαλιστερή επιφάνεια προς το διαμέρισμα του δότη. Μετά την τοποθέτηση του θαλάμου του δότη, η όλη

διάταξη σταθεροποιήθηκε με την προσαρμογή του μεταλλικού σφιγκτήρα. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους 32° C, από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου.

Στη συνέχεια 100 µL από το κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα/σύνθεση (formulation) τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα του δότη πάνω στη γυαλιστερή επιφάνεια της μεμβράνης Strat-M®. Η μαγνητική ανάδευση εντός του θαλάμου του δέκτη ήταν σχετικά ήπια για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Η ομοιογένεια του διαλύματος εντός του διαμερίσματος του δέκτη εξασφαλίζεται με την παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα (Itin, 2006), καθώς η όλη διάταξη βρίσκεται σταθεροποιημένη στην επιφάνεια συστήματος μαγνητικής ανάδευσης. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 32 ± 0.5° C με τη βοήθεια υδατόλουτρου (OECD, 2004). Επειδή η Ρεσβερατρόλη είναι φωτοευαίσθητη, τα πειράματα διάχυσης έλαβαν χώρα σε σκοτεινό θάλαμο προστατευμένο από το ηλιακό φως.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος επικρατούσαν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) (OECD, 2004, Jones et al., 1989). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, 3, 6, 12 και 24 ωρών, γινόταν πλήρης λήψη του διαλύματος του υποδοχέα από τον πλευρικό βραχίονα. Σε κάθε δειγματοληψία των κυττάρων, γινόταν άμεση αντικατάσταση με ίσο όγκο φρέσκου και προθερμασμένου διαλύματος του υποδοχέα. Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα του υποδοχέα.

Για κάθε συνταγή, όταν χρησιμοποιήθηκε ως φραγμός η τεχνητή μεμβράνη Strat-M®, χρησιμοποιήθηκαν 3 κύτταρα διάχυσης Franz. Στον παρακάτω Πίνακα Β5 συνοψίζονται οι συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας Β5: Σύνοψη των συνθηκών κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων διάχυσης

| ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΥΣΗΣ | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Όγκος του Κυττάρου Διάχυσης | 6.275 mL |
| Διαθέσιμη Επιφάνεια Διάχυσης | 0.636 cm ² |
| Διάλυμα του Υποδοχέα | PG : H ₂ O (50 : 50) |
| Δειγματοληπτικό Σχήμα | 3h, 6h, 12h & 24h |
| Θερμοκρασία | 32 ± 0.5° C |
| Δόση Εφαρμογής | 100 µL |

2.2.10 Χρησιμοποίηση των τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments – DoE)

Ο στόχος ήταν να βελτιωθεί ο αρχικός φορέας (βλέπε Πίνακα Β2). Έτσι, αποφασίσθηκε η Ρεσβερατρόλη να είναι πλήρως διαλυμένη στην υδατική φάση του γαλακτώματος και όχι απλώς απαιωρημένη, όπως ήταν στις αρχικές συνταγές των πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας (βλέπε Εικόνα Β1). Γι' αυτό το λόγο προστέθηκε ένας καλός διαλύτης της Ρεσβερατρόλης στο φορέα. Αυτός ο διαλύτης ήταν η πολυαιθυλνογλυκόλη 400 (PEG-400) (Hatanaka et al., 1993, Haukvik et al., 2010, Hu et al. 2016). Παράλληλα, αποφασίσθηκε να αφαιρεθεί το Lipoid H 100-3 από την υδατική φάση, αποφεύγοντας πιθανές πολύπλοκες λιπιδικές δομές, καθώς η αφαίρεσή του από τη συνταγή δεν επιφέρει καμία αρνητική επίπτωση στη φυσική σταθερότητα του γαλακτώματος τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά, όπως φαίνεται κι από την παρακάτω Εικόνα Β4.



Εικόνα Β4: Μακροσκοπική (αριστερά) και μικροσκοπική (δεξιά) απεικόνιση του φορέα (ημιστερεού γαλακτώματος) στις οποίες φαίνεται ότι η αφαίρεση του υδρογονωμένου παράγωγου της λεικθίνης δεν επηρεάζει τη φυσική σταθερότητα

Προκειμένου να είναι πλήρως διαλυμένη η Ρεσβερατρόλη στην υδατική φάση, αποφασίσθηκε να χρησιμοποιηθεί το στατιστικό εργαλείο του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments - DoE) μέσω του λογισμικού προγράμματος Design-Expert® (DX - 11). Ο τύπος που επιλέχθηκε ήταν ο σχεδιασμός μιγμάτων (Mixture Design) χρησιμοποιώντας τρεις διαλύτες, το ύδωρ, το οποίο είναι το βασικότερο συστατικό της υδατικής φάσης των γαλακτωμάτων, και δύο καλούς διαλύτες της Ρεσβερατρόλης, το PEG-400 (βλέπε ακριβώς παραπάνω) και το Transcutol P, το οποίο ήταν συστατικό και του αρχικού φορέα (Singh & Pai, 2015, Pund et al., 2014).

Το λογισμικό πρόγραμμα δημιούργησε τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού, δηλαδή πρότεινε μίγματα των τριών διαλυτών (νερό – PEG 400 – Transcutol P) σε διαφορετικές αναλογίες στα οποία προσδιορίσθηκε η διαλυτότητα κορεσμού της Ρεσβερατρόλης ως απόκριση. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι υπήρχαν περιορισμοί Design Constraints) στην περιεκτικότητα του PEG-400 και του Transcutol P.

Για το PEG-400 οι περιορισμοί ήταν $20.66 \% < \text{PEG-400} < 68.87 \%$ για την υδατική φάση, ποσοστά τα οποία αν αναχθούν στο τελικό γαλάκτωμα, εκφράζονται ως: $15.0\% < \text{PEG-400} < 50.0\%$. Η επιλογή αυτή έγινε, καθώς το 15% PEG-400, σε βάρος του ύδατος, αποτελεί την ελάχιστη ποσότητα, προκειμένου να διαλυθεί 1% w/w Ρεσβερατρόλη στην υδατική φάση, ενώ μέχρι και 50% δεν έχουν αναφερθεί ποτέ στην βιβλιογραφία δεδομένα τοξικότητας για την τοπική χορήγηση στο δέρμα.

Για το Transcutol P οι περιορισμοί ήταν $0\% < \text{Transcutol P} < 6.89\%$ για την υδατική φάση, ποσοστά τα οποία αν αναχθούν στο τελικό γαλάκτωμα, εκφράζονται ως:

$0\% < \text{Transcutol P} < 5.0\%$. Η επιλογή αυτή έγινε, γιατί επιθυμία ήταν να χρησιμοποιηθεί όσο το δυνατό λιγότερη ποσότητα Transcutol P, κυρίως για λόγους ασφάλειας και τοξικότητας. Επίσης, 5% w/w Transcutol P χρησιμοποιήθηκε στον αρχικό φορέα, ενώ στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ακόμα μεγαλύτερα ποσοστά σε φορείς για διαδερμική χορήγηση (Mura et al., 2000, Prasanthi & Lakshmi, 2012). Στις παρακάτω Εικόνες B3 και B4 απεικονίζονται οι περιορισμοί του σχεδιασμού μίγματος, καθώς και η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού με απόκριση τη διαλυτότητα κορεσμού, αντίστοιχα.

Design Constraints

Mixture Coding: Actual

| Low Limit | | Constraint | High Limit |
|-----------|---|----------------|------------------|
| 24,240 | ≤ | A:Water | ≤ 79,340 |
| 20,660 | ≤ | B:PEG400 | ≤ 68,870 |
| 0,000 | ≤ | C:Transcutol P | ≤ 6,890 |
| | | A+B+C | = 100,000 |

Εικόνα B5: Απεικόνιση των περιορισμών (Design Constraints) του σχεδιασμού μίγματος (Design-Expert® - DX 11)

| Run | Component 1 A:Water % | Component 2 B:PEG400 % | Component 3 C:Transcutol P % | Response 1 Solubility - |
|-----|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 55,235 | 44,765 | 0 | |
| 2 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | |
| 3 | 79,34 | 20,66 | 0 | |
| 4 | 79,34 | 20,66 | 0 | |
| 5 | 41,46 | 56,8175 | 1,7225 | |
| 6 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | |
| 7 | 24,24 | 68,87 | 6,89 | |
| 8 | 38,015 | 56,8175 | 5,1675 | |
| 9 | 48,345 | 44,765 | 6,89 | |
| 10 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | |
| 11 | 63,8425 | 32,7125 | 3,445 | |
| 12 | 24,24 | 68,87 | 6,89 | |
| 13 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | |
| 14 | 75,895 | 20,66 | 3,445 | |
| 15 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | |
| 16 | 27,685 | 68,87 | 3,445 | |
| 17 | 31,13 | 68,87 | 0 | |
| 18 | 31,13 | 68,87 | 0 | |
| 19 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | |

Εικόνα Β6: Απεικόνιση της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design-Expert® - DX 11)

2.2.11 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού για τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού (Mixture Design – DoE)

Η πειραματική διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε και περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6 με τη μόνη διαφορά ότι αντί για το διάλυμα του υποδοχέα χρησιμοποιήθηκαν τα διάφορα μίγματα των τριών διαλυτών σε διαφορετικές αναλογίες, όπως φαίνεται από τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού (Εικόνα Β6). Τα πρότυπα διαλύματα της Ρεσβερατρόλης προέκυψαν με κατάλληλες αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης (stock solution) με την κινητή φάση. Τα άγνωστα δείγματα αραιώθηκαν επίσης κατάλληλα με την κινητή φάση πριν ποσοτικοποιηθούν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

2.2.12 *In vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα

2.2.12.1 Προετοιμασία της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας

Πριν τη διεξαγωγή του πειράματος διάχυσης, είναι απαραίτητη η προετοιμασία της ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας. Όπως έχει αναφερθεί και στο Θεωρητικό Μέρος, η διαπέραση της κεράτινης στοιβάδας (stratum corneum) αποτελεί το περιοριστικό βήμα για τη διαδερμική απορρόφηση και συχνά υποτίθεται ότι η δερμίδα και το χόριο δεν επηρεάζουν τη μεταφορά της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας διαμέσου του δέρματος (Itin, 2006, Shah, 2014).

Η κεράτινη στοιβάδα απομονώθηκε από ανθρώπινο δέρμα πλήρους πάχους (full thickness) χρησιμοποιώντας μία τεχνική θερμικού διαχωρισμού (OECD, 2004). Το ανθρώπινο δέρμα για τις παρούσες *in vitro* μελέτες λήφθηκε από την New York Firefighters Skin Bank (Presbyterian Hospital, Νέα Υόρκη). Αρχικά, το λίπος του υποδόριου ιστού κόβεται και αφαιρείται με τη βοήθεια νυστεριών. Στη συνέχεια, ολόκληρο το δέρμα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει απιονισμένο ύδωρ και θερμαίνεται στους 60° C για περίπου 1 λεπτό (heat separation technique). Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα και τη χαλάρωση των συνδέσεων μεταξύ των υποκείμενων στοιβάδων, η κεράτινη στοιβάδα μπορεί να αφαιρεθεί απαλά από τη δερμίδα χρησιμοποιώντας λαβίδες εργαστηρίου (Kligman & Christophers, 1963).

Η απομονωμένη κεράτινη στοιβάδα τοποθετείται σε τετράγωνο κομμάτι γυαλιού, προκειμένου να τεντωθεί. Επιπλέον, πρέπει να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα του φραγμού. Για το λόγο αυτό, η ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα παρατηρείται κάτω από το μεγεθυντικό φακό. Κομμάτι δέρματος με τρύπες, κρεατοελιές ή οποιοδήποτε άλλο ελάττωμα, όπως υπερβολικό πάχος, πρέπει να απορρίπτεται. Η απομονωμένη και ακέραια κεράτινη στοιβάδα, χωρίς ανωμαλίες, τοποθετείται σε φύλλο αλουμινίου και φυλάσσεται στους -20° C (OECD, 2004).

2.2.12.2 *In vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας

Για τη διεξαγωγή των *in vitro* μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας της Ρεσβερατρόλης χρησιμοποιήθηκαν κάθετα στατικά υάλινα κύτταρα διάχυσης (EPA, 1992). Τα τροποποιημένα κύτταρα Franz (modified Franz Diffusion Cells), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν όγκου 6.275 mL και διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης 0.636 cm².

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

Η κεράτινη στοιβάδα αφέθηκε εκτός ψύξης 30 περίπου λεπτά πριν την έναρξη των πειραμάτων, ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια κόπηκε σε τετράγωνα τεμάχια διαστάσεων περίπου 1.5 cm x 1.5 cm. Τα τετράγωνα αυτά τεμάχια τοποθετήθηκαν στα κύτταρα διάχυσης με την κεράτινη στοιβάδα να προσανατολίζεται προς το διαμέρισμα του δότη. Πάνω από την κεράτινη στοιβάδα τοποθετείται πλαστικός δακτύλιος Teflon, προκειμένου να σταθεροποιηθεί καλύτερα η μεμβράνη και να είναι ευκολότερη η εφαρμογή του σκευάσματος. Μετά την τοποθέτηση του θαλάμου του δότη, η όλη διάταξη

σταθεροποιήθηκε με την προσαρμογή του μεταλλικού σφιγκτήρα. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους 32° C, από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου. Η μαγνητική ανάδευση εντός του θαλάμου του δέκτη ήταν σχετικά ήπια για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Η ομοιογένεια του διαλύματος εντός του διαμερίσματος του δέκτη εξασφαλίζεται με την παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα (Itin, 2006), καθώς η όλη διάταξη βρίσκεται σταθεροποιημένη στην επιφάνεια συστήματος μαγνητικής ανάδευσης. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 32 ± 0.5° C με τη βοήθεια υδατόλουτρου (OECD, 2004). Τα κύτταρα αφήνονται, προκειμένου να εξισορροπήσουν για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα, μετά το πέρας των 24 ωρών, 100 μL από το κάθε φαρμακευτικό σκεύασμα/σύνθεση (formulation) τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα του δότη πάνω στην ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος επικρατούσαν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) (OECD, 2004, Jones et al., 1989). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, 3, 6, 12 και 24 ωρών, γινόταν πλήρης λήψη του διαλύματος του υποδοχέα από τον πλευρικό βραχίονα. Σε κάθε δειγματοληψία των κυττάρων, γινόταν άμεση αντικατάσταση με ίσο όγκο φρέσκου και προθερμασμένου διαλύματος του υποδοχέα. Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα του υποδοχέα.

Για κάθε συνταγή, όταν χρησιμοποιήθηκε ως φραγμός η ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα, χρησιμοποιήθηκαν 5 κύτταρα διάχυσης Franz. Οι συνθήκες του πειράματος είναι ίδιες με αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα Β1. Η μόνη διαφορά είναι ο διαφορετικός φραγμός, καθώς στην αρχική περίπτωση χρησιμοποιείται τεχνητή μεμβράνη, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ανθρώπινο δέρμα.

2.2.13 Ποσοτικός προσδιορισμός της Ρεσβερατρόλης στα γαλακτώματα

Για την αξιολόγηση της χημικής σταθερότητας της Ρεσβερατρόλης ήταν απαραίτητος ο ποσοτικός προσδιορισμός της. Αρχικά, 1 g γαλακτώματος ζυγίστηκε και μεταφέρθηκε ποσοτικά σε σκοτεινόχρωμη (amber) ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα η συμπληρώθηκε ο όγκος της ογκομετρικής φιάλης μέχρι τη χαραγή με ACN (CH₃CN). Η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για περίπου 20 λεπτά.

Μετά το πέρας των 20 λεπτών η σκοτεινόχρωμη ογκομετρική φιάλη αφαιρέθηκε από το λουτρό υπερήχων και τοποθετείται σε πλάκα, όπου το περιεχόμενο αναδεύεται με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το περιεχόμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0.45 μm. Στη συνέχεια, κατάλληλοι όγκοι του κάθε διηθήματος αραιώθηκαν με την κινητή φάση και η συγκέντρωση της

Ρεσβερατρόλης προσδιορίσθηκε μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

2.2.14 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των *in vitro* μελετών διαδερμικής διαπερατότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS Statistics 24 (IBM, USA). Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι τιμές της ποσότητας της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που διαπέρασε το φραγμό της κεράτινης στοιβάδας ανά μονάδα επιφάνειας των διαφορετικών συνταγών/συνθέσεων (formulations) στα διάφορα χρονικά σημεία της δειγματοληψίας.

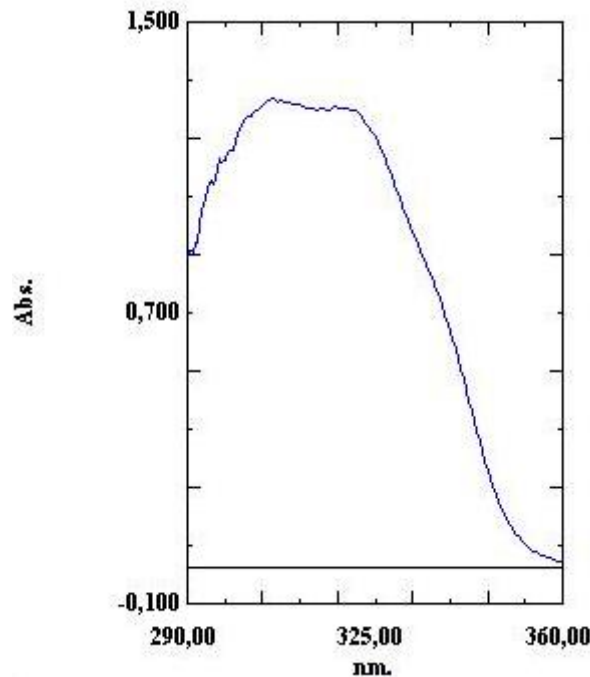
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των τιμών για κάθε χρονικό σημείο των δειγματοληψιών εφαρμόζοντας τη δοκιμασία Shapiro-Wilk (Ghasemi & Zahediasl 2012). Έπειτα, ακολούθησε η σύγκριση των μεταβλητών μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, One Way ANOVA (Baghban et al., 2013). Τέλος, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις των συνταγών/συνθέσεων (formulations) ανά ζεύγη για όλα τα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών, προκειμένου να διαπιστωθεί, εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, εφαρμόζοντας την post hoc δοκιμασία Tukey. Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο σημαντικότητας ήταν $\alpha = 0.05$. Επομένως, όταν η τιμή p (p value) είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$), είναι δυνατή η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Άρα, όταν η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05, τότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (Ng et al., 2010).

Σε περίπτωση που τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, τότε εφαρμόζεται η μη παραμετρική την post hoc δοκιμασία Games-Howell για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Φάσμα UV

Το μήκος κύματος, το οποίο αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της Ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα είναι 306 nm, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω Εικόνα Γ1. Η τιμή αυτή συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα μελετών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Abla & Banga, 2012).

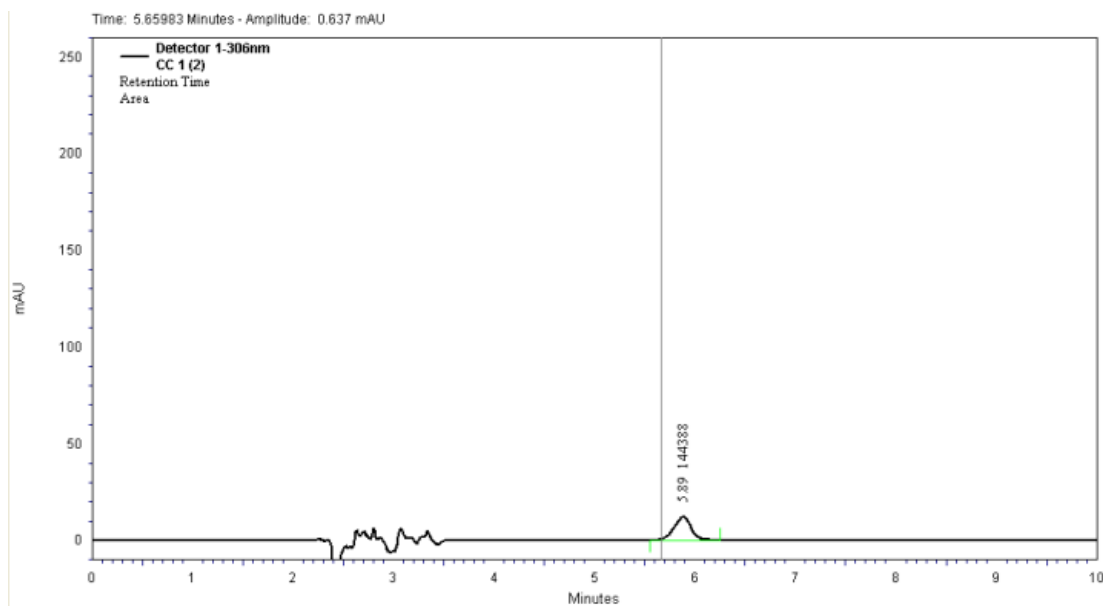


| Peak Pick | | | | |
|-----------|-----|----------------|-------|-------------|
| No. | P/V | Wavelength nm. | Abs. | Description |
| 1 | | 306,50 | 1,262 | |
| 2 | | 291,50 | 0,906 | |

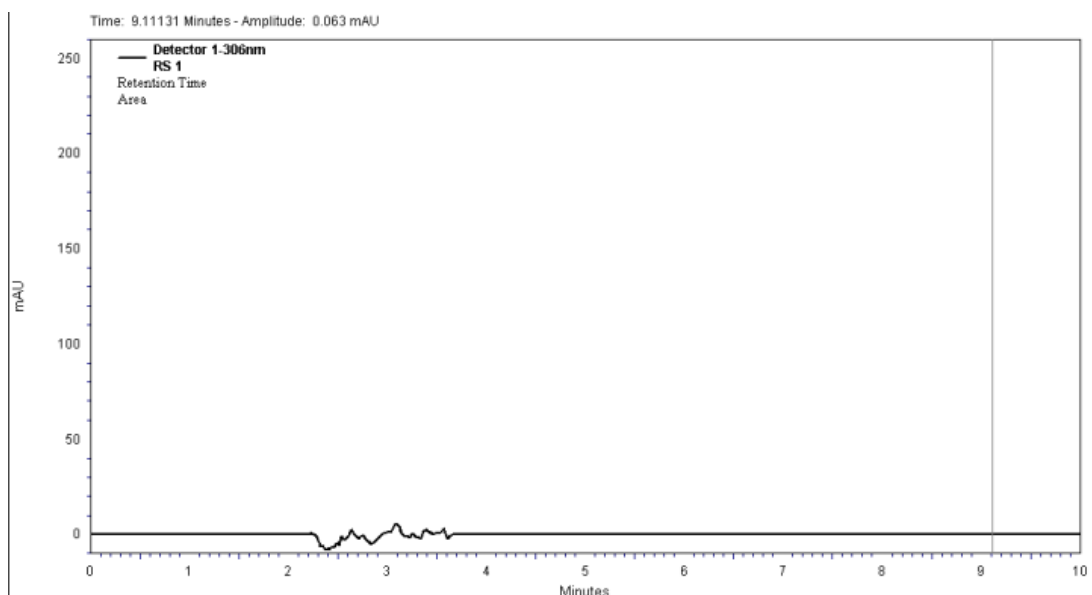
Εικόνα Γ1: Φάσμα UV πρότυπου διαλύματος Ρεσβερατρόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα H₂O:PG 50:50. Το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας (λ_{max}) είναι τα 306 nm

3.2 Μέθοδος HPLC

Η Εικόνα Γ2 απεικονίζει μία τυπική κορυφή ενός χρωματογραφήματος πρότυπου διαλύματος της Ρεσβερατρόλης συγκέντρωσης 1 μg/mL σε διάλυμα του υποδοχέα. Η φαρμακολογικά δραστική ουσία εκκλύεται στα 5.6 λεπτά. Οι κορυφές, οι οποίες εμφανίζονται στο χρωματογράφημα μεταξύ 2.5 και 3.5 λεπτών είναι αποτέλεσμα της σύστασης του διαλύματος του υποδοχέα, όπως φαίνεται κι από το αντίστοιχο χρωματογράφημα της Εικόνας Γ3.

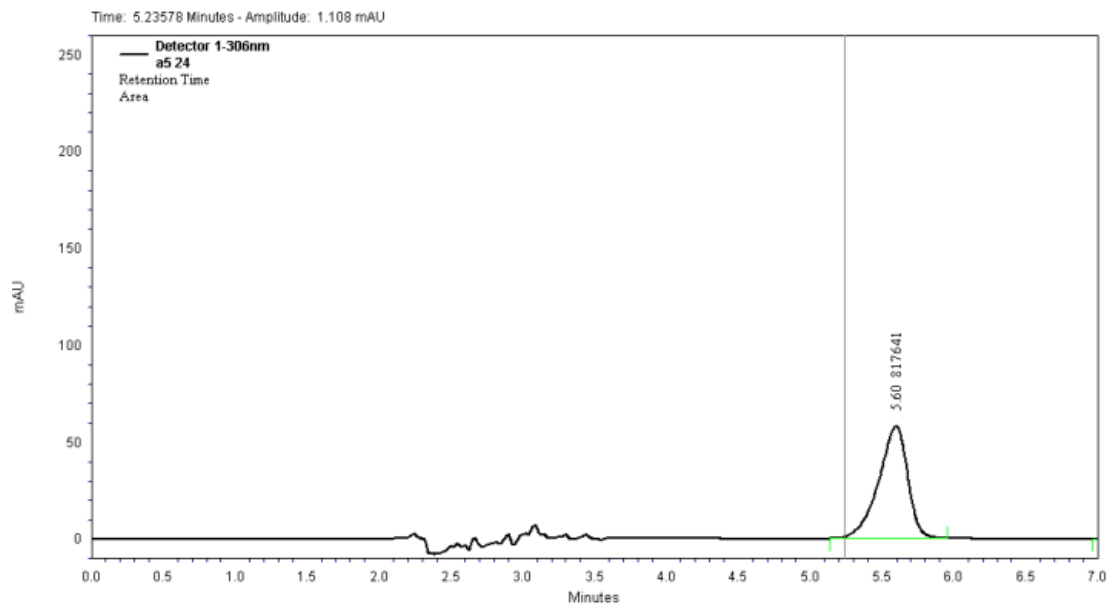


Εικόνα Γ2: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος της Ρεσβερατόλης σε διάλυμα του υποδοχέα

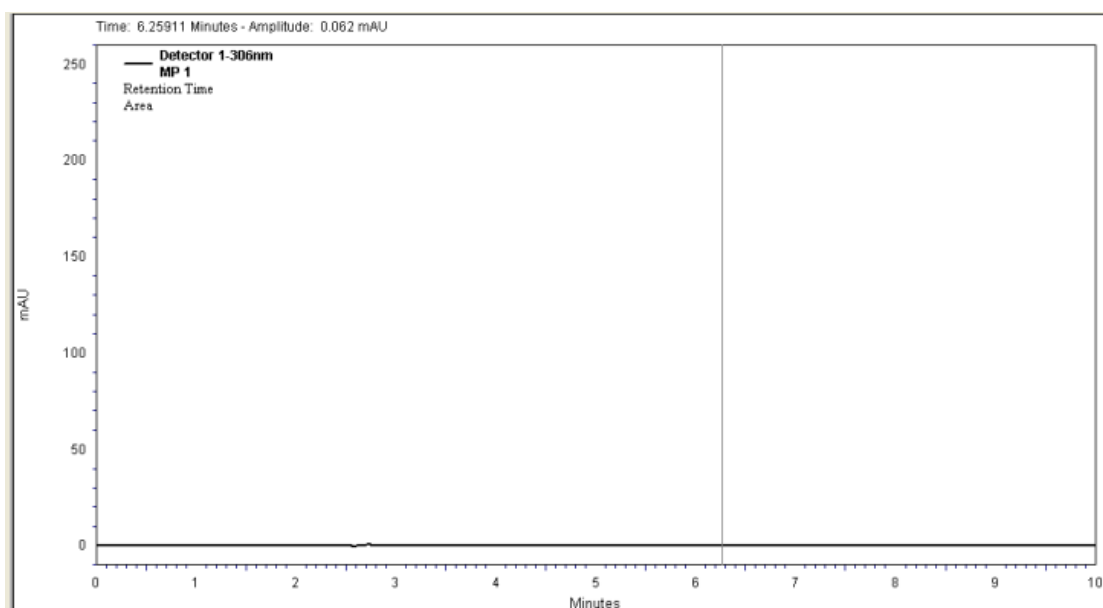


Εικόνα Γ3: Χρωματογράφημα του διαλύματος του υποδοχέα (PG:H₂O 50:50)

Στην παρακάτω Εικόνα Γ4 απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα του διαλύματος του υποδοχέα ενός αγνώστου δείγματος Ρεσβερατόλης από πείραμα διαδερμικής διαπερατότητας με τη χρήση ανθρώπινης κεράτινης στοιβάδας ως φραγμό.



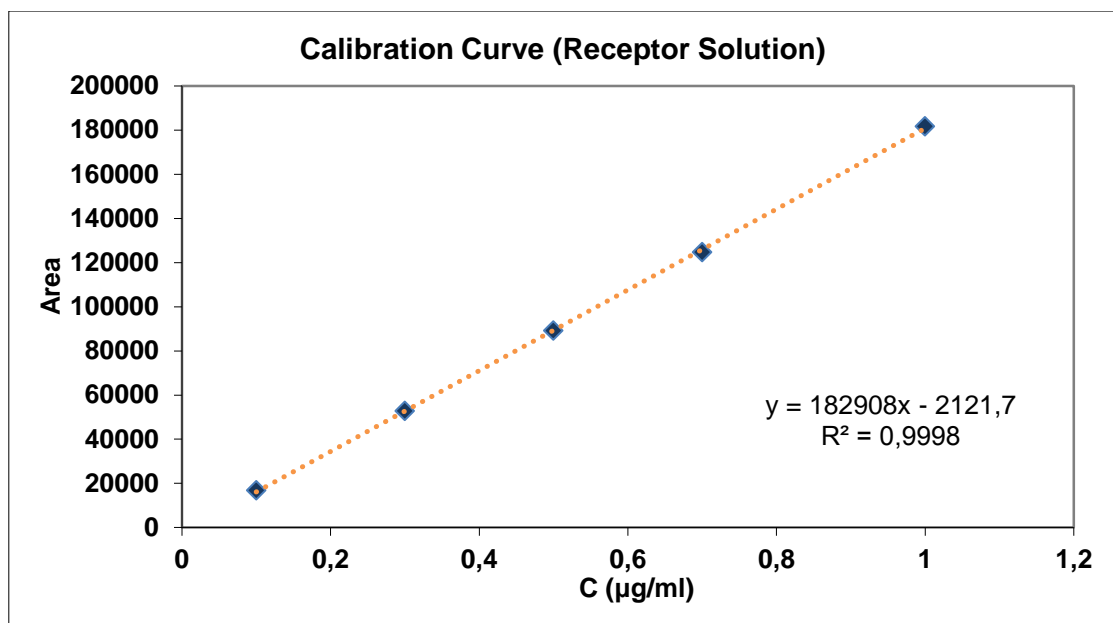
Εικόνα Γ4: Χρωματογράφημα της Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα του υποδοχέα που προέρχεται από μελέτη *in vitro* διαδερμικής διαπερατότητας



Εικόνα Γ5: Χρωματογράφημα της κινητής φάσης (ACN:PB 0.03M pH~4 35:65)

3.3 Έλεγχος Γραμμικότητας (Linearity) της μεθόδου ανάλυσης

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων της Ρεσβερατρόλης, τα οποία παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3, χρησιμοποιήθηκαν, προκειμένου να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους ($y = ax + b$), η κλίση (a , slope), η τεταγμένη επί την αρχή (b , intercept), καθώς και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2).



Εικόνα Γ6: Καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα του υποδοχέα

3.4 Μελέτες διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα (Receptor Solution)

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος διαδερμικής διαπερατότητας είναι σημαντική η διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής (sink conditions), έτσι ώστε η συγκέντρωση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας, η οποία διαχέεται διαμέσου του φραγμού, να μην ξεπερνάει το 10% του κορεσμένου διαλύματος της στο διάλυμα του υποδοχέα και η δόση της στην επιφάνεια της μεμβράνης να θεωρείται άπειρη, δηλαδή η συγκέντρωσή της στη φάση του δότη να μην υφίσταται αλλαγές κατά τη διάρκεια του πειράματος (Smith, 1990). Έτσι, κρίνεται απαραίτητο να προσδιορισθεί η διαλυτότητα κορεσμού της Ρεσβερατρόλης στο διάλυμα του υποδοχέα, πριν πραγματοποιηθούν οι *in vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας, τόσο χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M[®], όσο και ανθρώπινο δέρμα.

Η διαλυτότητα κορεσμού της Ρεσβερατρόλης σε διάλυμα PG:H₂O 50:50 βρέθηκε να είναι 5.8 mg/mL (τυπική απόκλιση = 0.013). Συνεπώς, οι συνθήκες δεξαμενής στο διάλυμα υποδοχέα διατηρούνται για συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες με 580 µg/mL.

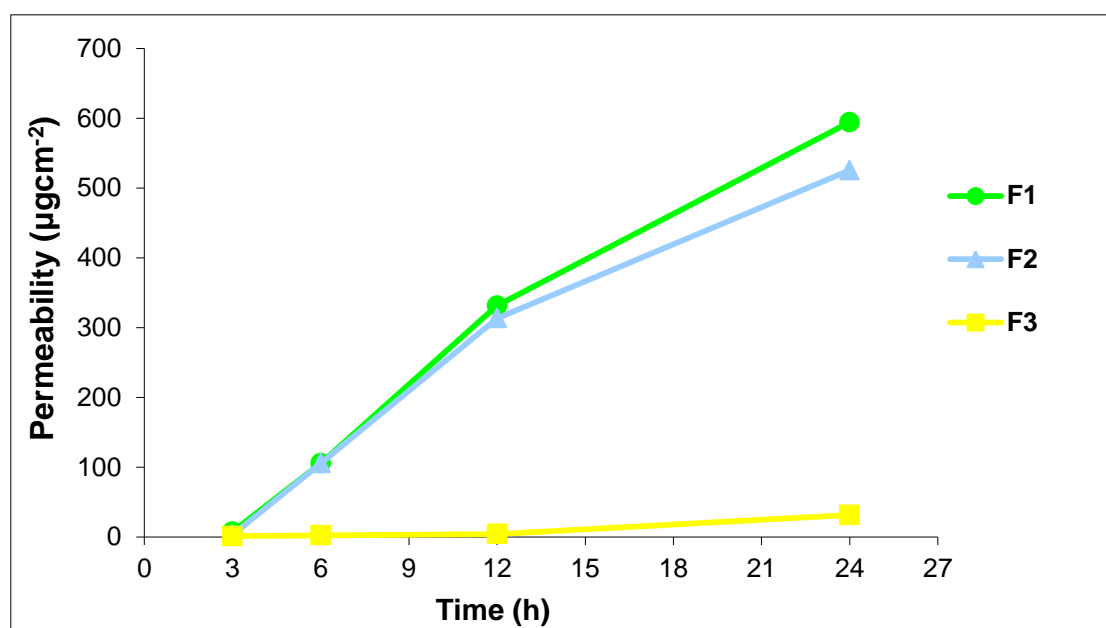
3.5 Αρχικές *in vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M[®]

Ο Πίνακας Γ1 και το διάγραμμα της Εικόνας Γ7 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, Q (µg/cm²), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφάνειας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux, J , µgcm⁻²h⁻¹), επειδή η ροή

υπολογίζεται από το γραμμικό τμήμα των καμπυλών, το οποίο συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους (Martin, 2003, Barry, 2000).

Πίνακας Γ1: Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) για $n=3$

| Time Points (hours) | F1 | F2 | F3 |
|------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| 3 | 7.57 ± 1.65 | 3.20 ± 1.69 | 1.07 ± 0.04 |
| 6 | 105.58 ± 32.08 | 105.59 ± 31.93 | 2.23 ± 0.15 |
| 12 | 331.41 ± 54.35 | 313.38 ± 40.42 | 4.11 ± 0.86 |
| 24 | 594.33 ± 101.30 | 525.65 ± 46.03 | 31.52 ± 7.34 |



Εικόνα Γ7: Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Είναι εμφανές από το διάγραμμα της Εικόνας Γ7 ότι η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη από τις συνταγές F1 και F2 είναι πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με την ποσότητα από τη συνταγή F3 σε όλα τα χρονικά σημεία.

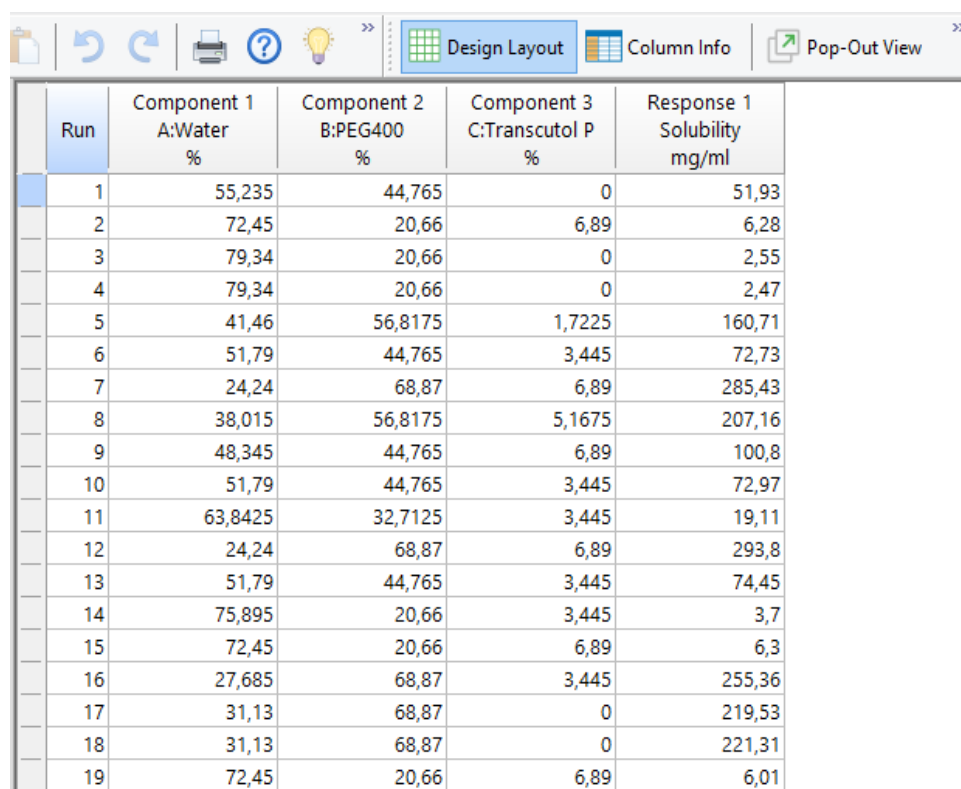
Επίσης, οι εικόνες διαπερατότητας των συνταγών F1 και F2 φαίνεται να συμπεριφέρονται αρκετά παρόμοια. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία χρονική στιγμή, εκτός από τη χρονική στιγμή των

3h, με την τιμή p να είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$), καθώς η ποσότητα που διαπέρασε από τη συνταγή F1 είναι σχεδόν διπλάσια διαπερατότητα από την αντίστοιχη ποσότητα από τη συνταγή F2 σε εκείνη τη χρονική στιγμή.

3.6 Πειραματικός Σχεδιασμός (Design of Experiments – DoE)

3.6.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του Πειραματικού Σχεδιασμού πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Design-Expert® Software Version 11 (Statease, Minneapolis, USA). Η Στην παρακάτω Εικόνα Γ8 απεικονίζεται η μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού συμπεριλαμβανομένων των τιμών των αποκρίσεων, δηλαδή η διαλυτότητα κορεσμού (mg/mL) στα μίγματα των τριών διαλυτών (H₂O – PEG 400 – Transcutol P) σε αναλογίες που πρότεινε το λογισμικό πρόγραμμα.



| Run | Component 1 A:Water % | Component 2 B:PEG400 % | Component 3 C:Transcutol P % | Response 1 Solubility mg/ml |
|-----|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 55,235 | 44,765 | 0 | 51,93 |
| 2 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | 6,28 |
| 3 | 79,34 | 20,66 | 0 | 2,55 |
| 4 | 79,34 | 20,66 | 0 | 2,47 |
| 5 | 41,46 | 56,8175 | 1,7225 | 160,71 |
| 6 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | 72,73 |
| 7 | 24,24 | 68,87 | 6,89 | 285,43 |
| 8 | 38,015 | 56,8175 | 5,1675 | 207,16 |
| 9 | 48,345 | 44,765 | 6,89 | 100,8 |
| 10 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | 72,97 |
| 11 | 63,8425 | 32,7125 | 3,445 | 19,11 |
| 12 | 24,24 | 68,87 | 6,89 | 293,8 |
| 13 | 51,79 | 44,765 | 3,445 | 74,45 |
| 14 | 75,895 | 20,66 | 3,445 | 3,7 |
| 15 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | 6,3 |
| 16 | 27,685 | 68,87 | 3,445 | 255,36 |
| 17 | 31,13 | 68,87 | 0 | 219,53 |
| 18 | 31,13 | 68,87 | 0 | 221,31 |
| 19 | 72,45 | 20,66 | 6,89 | 6,01 |

Εικόνα Γ8: Απεικόνιση της μήτρας του Πειραματικού Σχεδιασμού με τα αποτελέσματα, δηλαδή με τις τιμές των αποκρίσεων (Design Expert® – DX 11)

Παρατηρώντας τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού φαίνεται μία συγκεκριμένη τάση τιμών, δηλαδή οι τιμές διαλυτότητας κορεσμού μεγαλύτερες από 220 mg/mL έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό. Το κοινό αυτό χαρακτηριστικό είναι η μέγιστη περιεκτικότητα σε PEG-400 του φορέα. Επίσης, όταν η τιμή του ύδατος έχει τη μικρότερη τιμή, τότε η διαλυτότητα κορεσμού προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή, η οποία είναι περίπου 290 mg/mL. Άρα, εύκολα

συμπεραίνεται ότι η μεταβλητότητα της απόκρισης, δηλαδή η διαλυτότητα κορεσμού, επηρεάζεται από τη σχέση του ύδατος με το PEG-400. Αυτή η σχέση θα φάνει κι από την ανάλυση διασποράς ANOVA παρακάτω.

Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω της ανάλυσης της διασποράς (ANOVA) επιλέγοντας ως μοντέλο το Quadratic, επιλογή η οποία δικαιολογείται μέσω των παρακάτω Εικόνων (από το λογισμικό πρόγραμμα του Πειραματικού Σχεδιασμού), οι οποίες παρουσιάζουν στατιστικές παραμέτρους για την καταλληλότητα προσαρμογής του κάθε μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

Fit Summary

Response 1: Solubility

Mixture Component Coding is L_Pseudo.

| Source | Sequential p-value | Lack of Fit p-value | Adjusted R ² | Predicted R ² | |
|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|------------------|
| Linear | < 0.0001 | | 0,9163 | 0,8692 | |
| Quadratic | 0,0150 | | 0,9755 | 0,9587 | Suggested |
| Special Cubic | 0,5942 | | 0,9724 | 0,9343 | |
| Cubic | 0,2378 | | 0,9886 | 0,9175 | |
| Sp Quartic vs Quadratic | 0,1838 | | 0,9883 | 0,8897 | |
| Quartic vs Cubic | | | | | Aliased |
| Quartic vs Sp Quartic | | | | | Aliased |

Εικόνα Γ9: Απεικόνιση του Fit Summary για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert[®] – DX 11)

Sequential Model Sum of Squares [Type I]

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|----------------------------|----------------|----------|----------------|-------------|---------------|------------------|
| Mean vs Total | 1,623E+05 | 1 | 1,623E+05 | | | |
| Linear vs Mean | 1,169E+05 | 2 | 58473,64 | 61,18 | < 0.0001 | |
| Quadratic vs Linear | 6925,69 | 3 | 2308,56 | 8,26 | 0,0150 | Suggested |
| Sp Cubic vs Quadratic | 101,81 | 1 | 101,81 | 0,3234 | 0,5942 | |
| Cubic vs Sp Cubic | 1313,59 | 3 | 437,86 | 3,36 | 0,2378 | |
| Quartic vs Cubic | 260,66 | 2 | 130,33 | | | Aliased |
| Residual | 0,0000 | 0 | | | | |
| Sp Quartic vs Quadratic | 1275,03 | 3 | 425,01 | 3,18 | 0,1838 | |
| Quartic vs Sp Quartic | 401,04 | 3 | 133,68 | | | Aliased |
| Residual | 0,0000 | 0 | | | | |
| Total | 2,878E+05 | 12 | 23985,01 | | | |

Select the highest order polynomial where the additional terms are significant and the model is not aliased.

Εικόνα Γ10: Απεικόνιση του Sequential Model Sum of Squares για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert® – DX 11)

Model Summary Statistics

| Source | Std. Dev. | R ² | Adjusted R ² | Predicted R ² | PRESS | |
|------------------|--------------|----------------|-------------------------|--------------------------|----------------|------------------|
| Linear | 30,92 | 0,9315 | 0,9163 | 0,8692 | 16426,19 | |
| Quadratic | 16,71 | 0,9867 | 0,9755 | 0,9587 | 5185,59 | Suggested |
| Special Cubic | 17,74 | 0,9875 | 0,9724 | 0,9343 | 8250,76 | |
| Cubic | 11,42 | 0,9979 | 0,9886 | 0,9175 | 10361,70 | |
| Special Quartic | 11,56 | 0,9968 | 0,9883 | 0,8897 | 13847,30 | |
| Quartic | | | | | * | Aliased |

* Case(s) with leverage of 1.0000: PRESS statistic not defined. ?

Focus on the model maximizing the **Adjusted R²** and the **Predicted R²**.

Εικόνα Γ11: Απεικόνιση του Model Summary Statistics για την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου (Design Expert® – DX 11)

Η στατιστική ανάλυση βασίστηκε στον έλεγχο της τιμής p, η οποία αντιστοιχεί στη πιθανότητα η τιμή F (λόγος διαδειγματικής προς ενδοδειγματική μεταβλητότητα) να είναι

μεγαλύτερη από τη κρίσιμη τιμή F_{crit} , τιμή η οποία προκύπτει από κατάλληλους πίνακες. Στην περίπτωση κατά την οποία η τιμή p για το μοντέλο είναι μεγαλύτερη από 0.05, δηλαδή $F < F_{crit}$, τότε το επιλεγμένο μοντέλο **δεν** είναι στατιστικά σημαντικό σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% ή αλλιώς η διαδειγματική μεταβλητότητα είναι μικρότερη σε σχέση με την ενδοδειγματική (τυχαίο σφάλμα). Επίσης, αξιολογήθηκε η τιμή F της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit) του μοντέλου στα δεδομένα (σύγκριση σφάλματος υπολοίπων – residuals – με το καθαρό σφάλμα) και η πιθανότητα αυτή να οφείλεται σε θόρυβο. Στις επόμενες δύο Εικόνες Γ12 και Γ13 απεικονίζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση της διασποράς ANOVA.

ANOVA for Quadratic model

Response 1: Solubility

| Source | Sum of Squares | df | Mean Square | F-value | p-value | |
|-------------------------------|----------------|----|-------------|---------|----------|-------------|
| Model | 1,239E+05 | 5 | 24774,59 | 88,69 | < 0.0001 | significant |
| ⁽¹⁾ Linear Mixture | 1,169E+05 | 2 | 58473,64 | 209,32 | < 0.0001 | |
| AB | 5478,91 | 1 | 5478,91 | 19,61 | 0,0044 | |
| AC | 20,07 | 1 | 20,07 | 0,0718 | 0,7976 | |
| BC | 48,91 | 1 | 48,91 | 0,1751 | 0,6902 | |
| Residual | 1676,06 | 6 | 279,34 | | | |
| Cor Total | 1,255E+05 | 11 | | | | |

Εικόνα Γ12: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση διασποράς ANOVA (Design Expert® – DX 11)

The **Model F-value** of 88,69 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

P-values less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case B, AB are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Εικόνα Γ13: Ανάλυση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων της ANOVA από το λογισμικό πρόγραμμα (Design Expert® – DX 11)

Συμπεραίνεται ότι εκτός από το μοντέλο, στατιστικά σημαντικοί παράγοντες είναι ο παράγοντας B (PEG – 400), καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ του παράγοντα A (Water) και του παράγοντα B, καθώς η τιμή p είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.05$).

| | | | | |
|------------------|--------|--|--------------------------------|---------|
| | | | | |
| Std. Dev. | 12,60 | | R² | 0,9899 |
| Mean | 108,56 | | Adjusted R² | 0,9860 |
| C.V. % | 11,61 | | Predicted R² | 0,9842 |
| | | | Adeq Precision | 42,0652 |

Εικόνα Γ14: Απεικόνιση των αποτελεσμάτων από το Fit Statistics που προέκυψαν μετά την ανάλυση ANOVA (Design Expert® – DX 11)

The **Predicted R²** of 0,9842 is in reasonable agreement with the **Adjusted R²** of 0,9860; i.e. the difference is less than 0.2.

Adeq Precision measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 42,065 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

Εικόνα Γ15: Ανάλυση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων του Fit Statistics από το λογισμικό πρόγραμμα (Design Expert® – DX 11)

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 (R – squared) αποτελεί το μέτρο της διακύμανση των δεδομένων γύρω από τη μέση τιμή, η οποία εξηγείται από το προσαρμοζόμενο σε αυτά μοντέλο. Όσο η τιμή του συντελεστή αυτού προσεγγίζει τη μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην προκειμένη περίπτωση η τιμή του R^2 ισούται με 0.9899, τιμή η οποία υποδηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προσαρμοσμένος συντελεστής συσχέτισης R^2 (adjusted R^2 - R^2_{adj}) αποτελεί μέτρο της διακύμανσης των δεδομένων γύρω από τη μέση τιμή, η οποία εξηγείται από το προσαρμοσμένο σε αυτά μοντέλο, λαμβάνοντας όμως υπόψη τους βαθμούς ελευθερίας, οι οποίοι συνδέονται με τον υπολογισμό των όρων του μοντέλου. Η τιμή του συντελεστή αυτού μειώνεται, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των όρων, οι οποίοι υπάρχουν στο μοντέλο, χωρίς να προσθέτουν αξία σε αυτό. Όσο η τιμή του R^2_{adj} προσεγγίζει τη μονάδα, τόσο καλύτερη είναι η προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Στην παρούσα ανάλυση η τιμή του adjusted R^2 ισούται με 0.9860, γεγονός που δηλώνει πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα.

Ο προβλεπόμενος συντελεστής συσχέτισης R^2 (predicted R^2 - R^2_{pred}) αποτελεί μέτρο της μεταβλητότητας των νέων δεδομένων που μπορεί να εξηγήσει το μοντέλο και σχετίζεται με τη δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Ο συντελεστής R^2_{pred} λαμβάνει τιμές μεταξύ μηδέν και μονάδας, ενώ όσο η τιμή του προσεγγίζει τη μονάδα τόσο καλύτερη είναι η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Σε αυτήν την περίπτωση η τιμή του predicted R^2 ισούται με 0.9842.

Αξίζει βέβαια να σημειωθεί πως θα πρέπει η διαφορά μεταξύ του προσαρμοσμένου συντελεστή συσχέτισης και του προβλεπόμενου συντελεστή συσχέτισης να είναι μικρότερη του 0.2 [$R^2_{adj} - R^2_{pred} < 0.2$]. Σε διαφορετική περίπτωση απαιτείται έλεγχος για ύπαρξη εξωκείμενων παρατηρήσεων, καθώς και εξέταση μετασχηματισμού της απόκρισης ή χρήσης πολυωνύμου διαφορετικού βαθμού. Στην προκειμένη περίπτωση η διαφορά αυτή είναι μικρότερη από 0.2, όπως φαίνεται κι από την Εικόνα Γ.15.

Το στατιστικό μέγεθος Adequate Precision (Adeq Precision) συγκρίνει το εύρος των προβλεπόμενων τιμών στα σημεία του σχεδιασμού με τη μέση τιμή του σφάλματος της πρόβλεψης, δηλαδή υπολογίζεται η αναλογία "σήματος προς θόρυβο" (signal to noise ratio). Η ακρίβεια του μοντέλου θεωρείται επαρκής για τιμές μεγαλύτερες του τέσσερα. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα Γ15 το μοντέλο είναι κατάλληλο, προκειμένου να χαρτογραφηθεί ο χώρος σχεδιασμού.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι συντελεστές και τα σχετικά διαστήματα εμπιστοσύνης για το μοντέλο Quadratic.

B Coefficients ▾ Coded Equation Real Equation Actual Equation

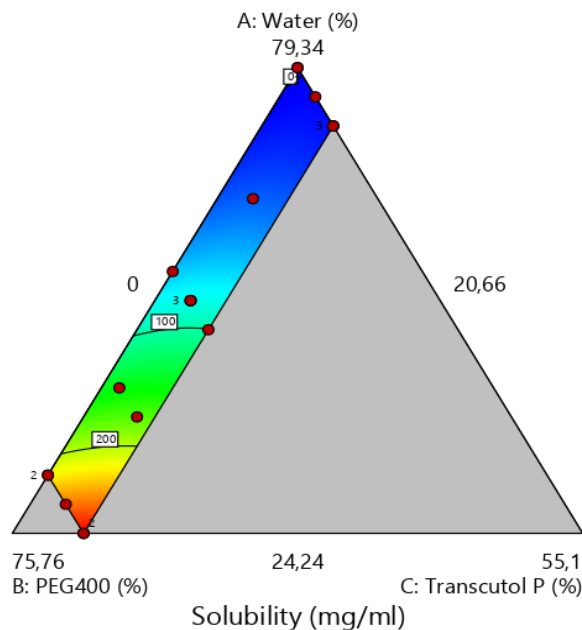
Coefficients in Terms of Coded Factors

| Component | Coefficient Estimate | df | Standard Error | 95% CI Low | 95% CI High | VIF |
|----------------|----------------------|----|----------------|------------|-------------|---------|
| A-Water | -1,58 | 1 | 8,30 | -19,50 | 16,35 | 3,10 |
| B-PEG400 | 286,64 | 1 | 11,26 | 262,31 | 310,97 | 4,55 |
| C-Transcutol P | -245,97 | 1 | 1595,63 | -3693,11 | 3201,17 | 2037,73 |
| AB | -263,83 | 1 | 38,44 | -346,88 | -180,78 | 3,36 |
| AC | 344,44 | 1 | 1824,03 | -3596,13 | 4285,02 | 1005,04 |
| BC | 696,53 | 1 | 1806,67 | -3206,55 | 4599,60 | 751,89 |

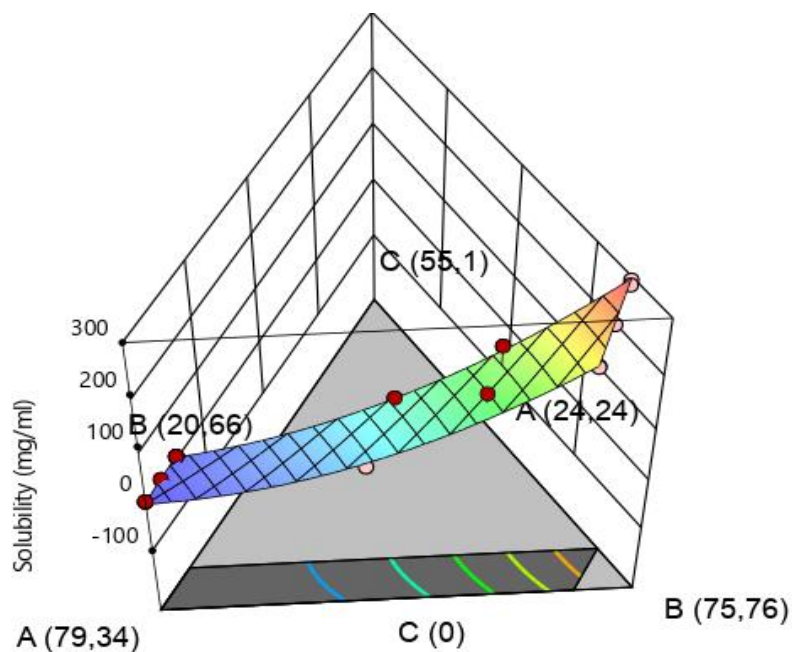
The coefficient estimate represents the expected change in response per unit change in factor value when all remaining factors are held constant. The intercept in an orthogonal design is the overall average response of all the runs. The coefficients are adjustments around that average based on the factor settings. When the factors are orthogonal the VIFs are 1; VIFs greater than 1 indicate multi-collinearity, the higher the VIF the more severe the correlation of factors. As a rough rule, VIFs less than 10 are tolerable.

Εικόνα Γ16: Παρουσίαση των συντελεστών και των σχετικών διαστημάτων εμπιστοσύνης για το μοντέλο Quadratic (Design Expert® – DX 11)

Στις παρακάτω Εικόνες Γ17 και Γ18 απεικονίζεται ο χώρος σχεδιασμού (Design Space), ο οποίος προέκυψε με βάση τους περιορισμούς που τέθηκαν για τρία συστατικά (βλέπε παράγραφο 2.2.9) σε δύο και τρεις διαστάσεις στο χώρο, αντίστοιχα. Οι περιοχές με το μπλε χρώμα αντιστοιχούν στις χαμηλές τιμές διαλυτότητας κορεσμού της Ρεσβερατρόλης για τις διαφορετικές αναλογίες των τριών συστατικών, ενώ όσο απομακρυνόμαστε από τις μπλε και προσεγγίζονται οι κόκκινες περιοχές, η διαλυτότητα κορεσμού αυξάνεται. Αξίζει να αναφερθεί ότι η χαμηλότερη διαλυτότητα κορεσμού, που μπορεί να επιτευχθεί, είναι 2.47 mg/mL, ενώ η μεγαλύτερη προσεγγίζει την τιμή 294 mg/mL.

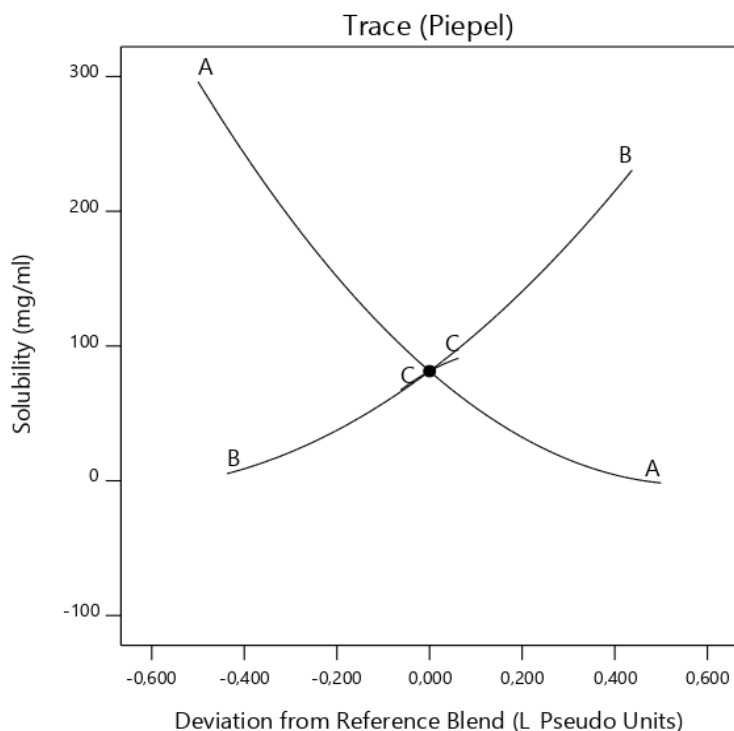


Εικόνα Γ17: Response Surface Contour plot (Design Expert® – DX 11)



Εικόνα Γ18: 3D Response Surface Contour plot (Design Expert® – DX 11)

Το παρακάτω διάγραμμα Trace (Piepel) της Εικόνας Γ19 παρουσιάζει το πώς μπορεί να μεταβληθεί η διαλυτότητα κορεσμού της Ρεσβερατρόλης μεταβάλλοντας κάποιο από τα συστατικά του μίγματος.



Εικόνα Γ19: Trace plot (Design Expert® – DX 11)

Μέσω του διαγράμματος της Εικόνας Γ19 γίνεται περισσότερο κατανοητή η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο ύδωρ και στο PEG-400, καθώς φαίνεται πως η απόκριση είναι πολύ ευαίσθητη σε αυτή την αλληλεπίδραση. Σύμφωνα με το διάγραμμα Trace (Piepel) της Εικόνας Γ19, συμπεραίνεται εύκολα ότι προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα κορεσμού της Ρεσβερατρόλης, θα πρέπει να αυξηθεί η ποσότητα της πολυαιθυλενογλυκόλης 400 (PEG-400 – Component B) σε βάρος του ύδατος (Component A). Το συστατικό C (Transcutol P) δεν εμφανίζεται σαν κρίσιμος παράγοντας που επηρεάζει τη διαλυτότητα κορεσμού, πιθανότατα λόγω της χαμηλής περιεκτικότητάς του που χρησιμοποιήθηκε. Ουσιαστικά το παραπάνω διάγραμμα επιβεβαιώνει την ανάλυση διασποράς ANOVA (βλέπε Εικόνα Γ12 και Γ13).

3.6.2 Βελτιστοποίηση (Optimization – Numerical)

Παρατηρείται από τα διαγράμματα των Εικόνων Γ17, Γ18 και Γ19, αλλά και από τη μήτρα του Πειραματικού Σχεδιασμού (Εικόνα Γ8) ότι καθίσταται δυνατή η αύξηση της ποσότητας της ποσότητας της Ρεσβερατρόλης, που είναι διαλυμένη στην υδατική φάση, σε περιεκτικότητες μεγαλύτερες του 2% w/w. Έτσι, αφού ολοκληρώθηκε η ανάλυση των

αποτελεσμάτων, ακολούθησε η άσκηση βελτιστοποίησης. Ο σκοπός ήταν να προκύψουν τρεις συνταγές/συνθέσεις (formulations), ώστε στο τελικό γαλάκτωμα η Ρεσβερατρόλη να βρίσκεται σε περιεκτικότητα 2%, 4% και 6% w/w και ταυτόχρονα να είναι διαλυμένη στην υδατική φάση.

Όσον αφορά στις περιεκτικότητες των τριών συστατικών του μίγματος, το ύδωρ τέθηκε να έχει τιμές ανάμεσα στα όρια του εύρους του (in range), ενώ η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 (PEG-400) να έχει τη χαμηλότερη τιμή (minimize). Η επιφανειοδραστική ουσία Transcutol P τέθηκε να πάρει την τιμή 6.89 (Target Concentration), η οποία αντιστοιχεί σε περιεκτικότητα 5% w/w στο τελικό γαλάκτωμα, ίδια περιεκτικότητα με αυτή στον αρχικό φορέα. Παρακάτω παρουσιάζονται οι λύσεις (solutions), οι οποίες προτάθηκαν από το λογισμικό πρόγραμμα Design Expert® (DX - 11). Παρακάτω παρουσιάζονται οι λύσεις του Πειραματικού Σχεδιασμού.

Constraints

| Name | Goal | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| A:Water | is in range | 24,24 | 79,34 | 1 | 1 | 3 |
| B:PEG400 | minimize | 20,66 | 68,87 | 1 | 1 | 3 |
| C:Transcutol P | is target = 6,89 | 0 | 6,89 | 1 | 1 | 3 |
| Solubility | is target = 28,92 | 2,47 | 293,8 | 1 | 1 | 3 |

Solutions

4 Solutions found

| Number | Water | PEG400 | Transcutol P | Solubility | Desirability | |
|----------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|
| 1 | 63,518 | 29,592 | 6,890 | 28,920 | 0,934 | Selected |
| 2 | 54,092 | 39,018 | 6,890 | 68,621 | 0,807 | |
| 3 | 49,953 | 43,157 | 6,890 | 90,935 | 0,742 | |
| 4 | 45,533 | 47,577 | 6,890 | 118,050 | 0,664 | |

Εικόνα Γ20: Απεικόνιση των λύσεων του Πειραματικού Σχεδιασμού για 2% w/w Ρεσβερατρόλη στο τελικό γαλάκτωμα

Constraints

| Name | Goal | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| A:Water | is in range | 24,24 | 79,34 | 1 | 1 | 3 |
| B:PEG400 | minimize | 20,66 | 68,87 | 1 | 1 | 3 |
| C:Transcutol P | is target = 6,89 | 0 | 6,89 | 1 | 1 | 3 |
| Solubility | is target = 57,85 | 2,47 | 293,8 | 1 | 1 | 3 |

Solutions

4 Solutions found

| Number | Water | PEG400 | Transcutol P | Solubility | Desirability | |
|----------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|
| 1 | 56,318 | 36,792 | 6,890 | 57,850 | 0,873 | Selected |
| 2 | 49,953 | 43,157 | 6,890 | 90,935 | 0,771 | |
| 3 | 46,390 | 46,720 | 6,890 | 112,523 | 0,707 | |
| 4 | 44,280 | 48,830 | 6,890 | 126,352 | 0,666 | |

Εικόνα Γ21: Απεικόνιση των λύσεων του Πειραματικού Σχεδιασμού για 4% w/w Ρεσβερατρόλη στο τελικό γαλάκτωμα

Constraints

| Name | Goal | Lower Limit | Upper Limit | Lower Weight | Upper Weight | Importance |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| A:Water | is in range | 24,24 | 79,34 | 1 | 1 | 3 |
| B:PEG400 | minimize | 20,66 | 68,87 | 1 | 1 | 3 |
| C:Transcutol P | is target = 6,89 | 0 | 6,89 | 1 | 1 | 3 |
| Solubility | is target = 86,77 | 2,47 | 293,8 | 1 | 1 | 3 |

Solutions

4 Solutions found

| Number | Water | PEG400 | Transcutol P | Solubility | Desirability | |
|----------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|-----------------|
| 1 | 50,685 | 42,425 | 6,890 | 86,770 | 0,819 | Selected |
| 2 | 48,418 | 44,692 | 6,890 | 99,961 | 0,777 | |
| 3 | 46,131 | 46,979 | 6,890 | 114,179 | 0,733 | |
| 4 | 44,713 | 48,397 | 6,890 | 123,450 | 0,704 | |

Εικόνα Γ22: Απεικόνιση των λύσεων του Πειραματικού Σχεδιασμού για 6% w/w Ρεσβερατρόλη στο τελικό γαλάκτωμα

Λαμβάνοντας υπόψη τις λύσεις του Πειραματικού Σχεδιασμού και ανάγοντας τις περιεκτικότητας σε % w/w προέκυψαν οι συνταγές F4, F5 και F6, οι οποίες αντιστοιχούν σε περιεκτικότητα Ρεσβερατρόλης 2% w/w, 4% w/w και 6% w/w στο τελικό γαλάκτωμα. Παρατηρούμε ότι προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα της διαλυμένης Ρεσβερατρόλης, θα πρέπει να αυξηθεί η ποσότητα του PEG-400 σε βάρος του ύδατος. Στους παρακάτω Πίνακες Γ2, Γ3 και Γ4 παρουσιάζονται οι συνταγές F4, F5 και F6 για περιεκτικότητα Ρεσβερατρόλης 2% w/w, 4% w/w και 6% w/w αντίστοιχα.

Πίνακας Γ2: Συνταγή F4 με 2% w/w Ρεσβερατρόλη (Optimized)

| ΦΑΣΗ Α | % w/w | ΦΑΣΗ Β | % w/w | ΦΑΣΗ Γ | % w/w | ΦΑΣΗ Δ | % w/w | ΦΑΣΗ Ε | % w/w |
|---------------------|-------|---------|-------|---------------|-------|------------------|-------|------------|-------|
| Gelot 64 | 4 | Water | 44.1 | Sepineo P 600 | 2 | Phenoxy ethanol | 1 | RESV | 2 |
| Tefose 63 | 4 | PEG 400 | 21.5 | Sepineo DERM | 2.3 | Vitamin E | 1 | Transcu. P | 5 |
| Labrasol | 4 | EDTA | 0.1 | | | Satin Blend 3901 | 5 | | |
| Cetyl Alcohol | 2 | BHT | 0.01 | | | | | | |
| Isopropyl Myristate | 2 | | | | | | | | |

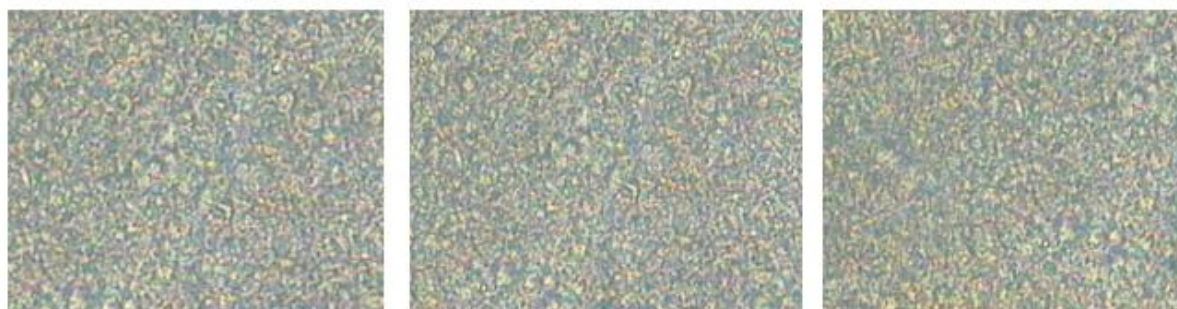
Πίνακας Γ3: Συνταγή F5 με 4% w/w Ρεσβερατρόλη (Optimized)

| ΦΑΣΗ Α | % w/w | ΦΑΣΗ Β | % w/w | ΦΑΣΗ Γ | % w/w | ΦΑΣΗ Δ | % w/w | ΦΑΣΗ Ε | % w/w |
|---------------------|-------|---------|-------|---------------|-------|------------------|-------|------------|-------|
| Gelot 64 | 4 | Water | 38.4 | Sepineo P 600 | 2 | Phenoxy ethanol | 1 | RESV | 4 |
| Tefose 63 | 4 | PEG 400 | 25.2 | Sepineo DERM | 2.3 | Vitamin E | 1 | Transcu. P | 5 |
| Labrasol | 4 | EDTA | 0.1 | | | Satin Blend 3901 | 5 | | |
| Cetyl Alcohol | 2 | BHT | 0.01 | | | | | | |
| Isopropyl Myristate | 2 | | | | | | | | |

Πίνακας Γ4: Συνταγή F6 με 6% w/w Ρεσβερατρόλη (Optimized)

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

Η Ρεσβερατρόλη διασπείρεται αρχικά με το Transcutol P και τελικά ενσωματώνεται στο τελικό ημιστερεό γαλάκτωμα, όπως απεικονίζεται στους παραπάνω Πίνακες Γ2, Γ3 και Γ4 ως ΦΑΣΗ Ε, έχοντας προηγηθεί το στάδιο της γαλακτωματοποίησης της υδατικής φάσης (ΦΑΣΗ Β) με τη λιπαρή φάση (ΦΑΣΗ Α) και έπειτα το στάδιο της προσθήκης των Φάσεων Γ και Δ.



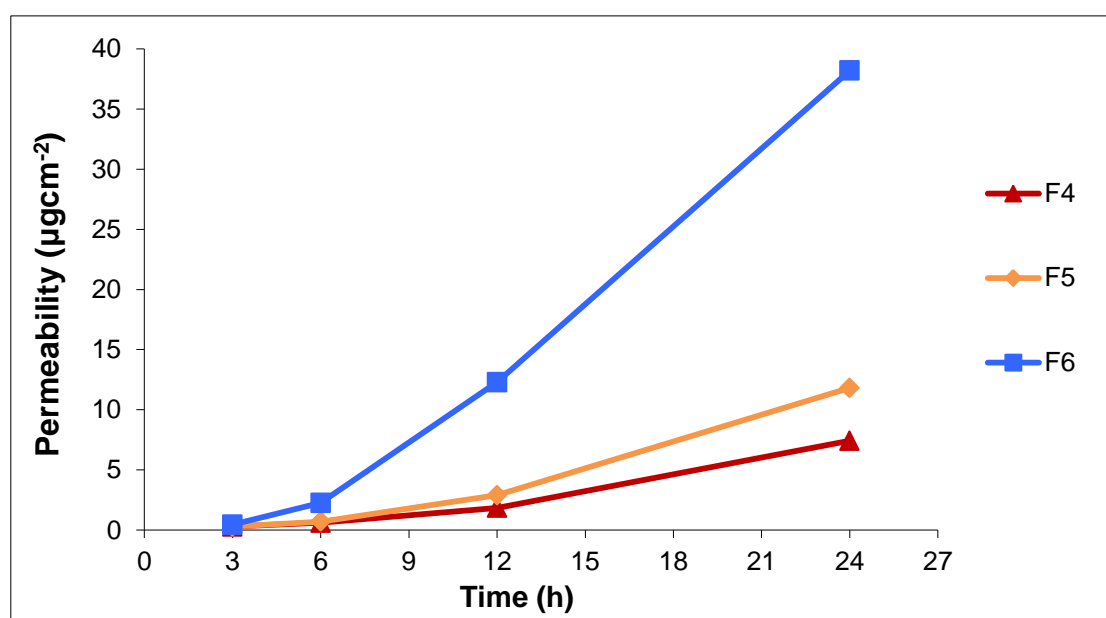
Εικόνα Γ23: Μικροσκοπική απεικόνιση των συνταγών F4 (αριστερά), F5 (στο κέντρο) και F6 (δεξιά) όπου φαίνεται ευκρινώς ότι η Ρεσβερατρόλη είναι πλήρως διαλυμένη

3.7 *In vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας τη τεχνητή μεμβράνη Strat-M®

Ο Πίνακας Γ5 και το διάγραμμα της Εικόνας Γ24 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφανείας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux, J , $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$), επειδή η ροή υπολογίζεται από το γραμμικό τμήμα των καμπυλών, το οποίο συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους (Martin, 2003, Barry, 2000).

Πίνακας Γ5: Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F4, F5 και F6. Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) για $n=3$

| Time Points (hours) | F4 | F5 | F6 |
|------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 3 | 0.27 ± 0.02 | 0.38 ± 0.004 | 0.45 ± 0.01 |
| 6 | 0.60 ± 0.04 | 0.79 ± 0.01 | 3.25 ± 0.25 |
| 12 | 1.84 ± 0.28 | 3.89 ± 0.03 | 13.29 ± 0.49 |
| 24 | 7.42 ± 7.42 | 11.81 ± 0.79 | 37.21 ± 0.39 |



Εικόνα Γ24: Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F4, F5 και F6 σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Είναι προφανές από το διάγραμμα της Εικόνας Γ24 ότι η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη από τη συνταγή F6 είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F4 και F5. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) στην αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε από τη συνταγή F6 για όλα τα χρονικά σημεία.

Η αύξηση της ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπερνά τη μεμβράνη από τη συνταγή F6 (6% w/w) πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη δόση της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που εφαρμόζεται. Γενικά αναγνωρίζεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του

δραστικού συστατικού σε ένα φορέα και η επακόλουθη αυξημένη εφαρμοζόμενη δόση οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας της φαρμακολογικά φαρμακολογικά δραστικής ουσίας που απορροφάται από το δέρμα (Williams, 2013, Barry, 1983, Maibach & Feldman, 1969, Woolfson et al., 1992).

Επίσης, οι εικόνες διαπερατότητας των συνταγών F4 και F5 φαίνεται να συμπεριφέρονται αρκετά παρόμοια. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F4 και F5 για καμία χρονική στιγμή.

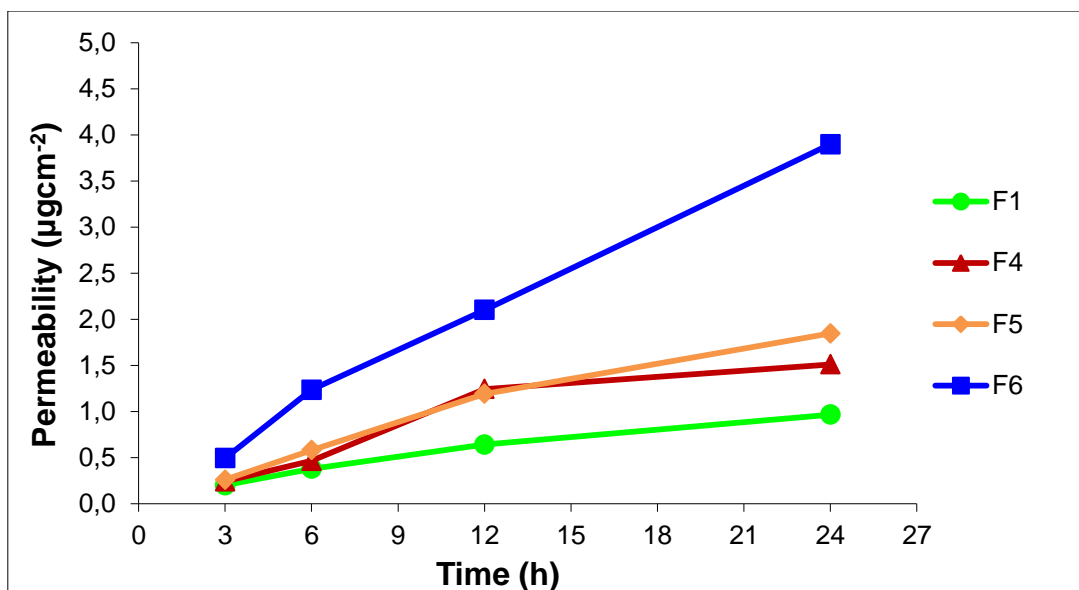
3.8 *In vitro* μελέτες διαδερμικής διαπερατότητας χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

Ο Πίνακας Γ6 και το διάγραμμα της Εικόνας Γ25 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφάνειας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux, J , $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$), επειδή η ροή υπολογίζεται από το γραμμικό τμήμα των καμπυλών, το οποίο συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους (Martin, 2003, Barry, 2000).

Πίνακας Γ6: Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F1, F4, F5 και F6. Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) για $n=5$

| Time Points (hours) | F1 | F4 | F5 | F6 |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3 | 0.20 \pm 0.02 | 0.24 \pm 0.06 | 0.26 \pm 0.04 | 0.59 \pm 0.05 |
| 6 | 0.38 \pm 0.04 | 0.46 \pm 0.04 | 0.58 \pm 0.07 | 1.24 \pm 0.13 |
| 12 | 0.64 \pm 0.04 | 1.24 \pm 0.22 | 1.19 \pm 0.08 | 2.10 \pm 0.20 |
| 24 | 0.97 \pm 0.08 | 1.55 \pm 0.19 | 1.85 \pm 0.13 | 3.90 \pm 0.28 |

Οι αντίστοιχες τιμές RSD κυμαίνονται από 6.55% έως 23.05%. Τιμές RSD περίπου 30% δεν είναι ασυνήθιστες σε *in vitro* πειράματα διείσδυσης χρησιμοποιώντας βιολογικά φραγμό (ανθρώπινο δέρμα), ενώ ακόμη και τιμές RSD περίπου 40% έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Southwell et al., 1984, Williams et al., 1992).



Εικόνα Γ25: Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F1, F4, F5 και F6 σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Η εικόνα της διαπερατότητας των συνταγών F4, F5 και F6 που προέκυψε από το *in vitro* πείραμα διάχυσης χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα είναι η ίδια με αυτή χρησιμοποιώντας την τεχνητή μεμβράνη Strat-M[®], με τη μόνη διαφορά ότι οι αθροιστικές ποσότητες της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε την κεράτινη στοιβάδα είναι μειωμένες. Η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη από τη συνταγή F6 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F1, F4 και F5. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) στην αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε από τη συνταγή F6 για όλα τα χρονικά σημεία

Επίσης, οι εικόνες διαπερατότητας των συνταγών F4 και F5 φαίνεται να συμπεριφέρονται αρκετά παρόμοια. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F4 και F5 για καμία χρονική στιγμή.

Όσον αφορά στη συνταγή F1, η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0.05$) μικρότερη συγκριτικά με τις τρεις άλλες συνταγές για τις χρονικές στιγμές των 12h και 24h. Στις 6h στατιστικές σημαντικές διαφορές υπάρχουν μόνο με τη συνταγή F5 ($p < 0.05$), ενώ στις 3h δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε με την ποσότητα που διαπέρασε από τη συνταγή F4 ούτε από τη συνταγή F5.

Το επόμενο βήμα ήταν να ενσωματωθεί η Ρεσβερατρόλη στην υδατική φάση (ΦΑΣΗ Β) μαζί με το PEG-400 και να γαλακτωματοποιηθεί με τη λιπαρή φάση, ελέγχοντας εάν ο διαφορετικός τρόπος ενσωμάτωσης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας στο γαλάκτωμα επηρεάζει τη διαπερατότητα. Έτσι, προέκυψαν οι συνταγές F7 (2% w/w), F8 (4% w/w) και F9

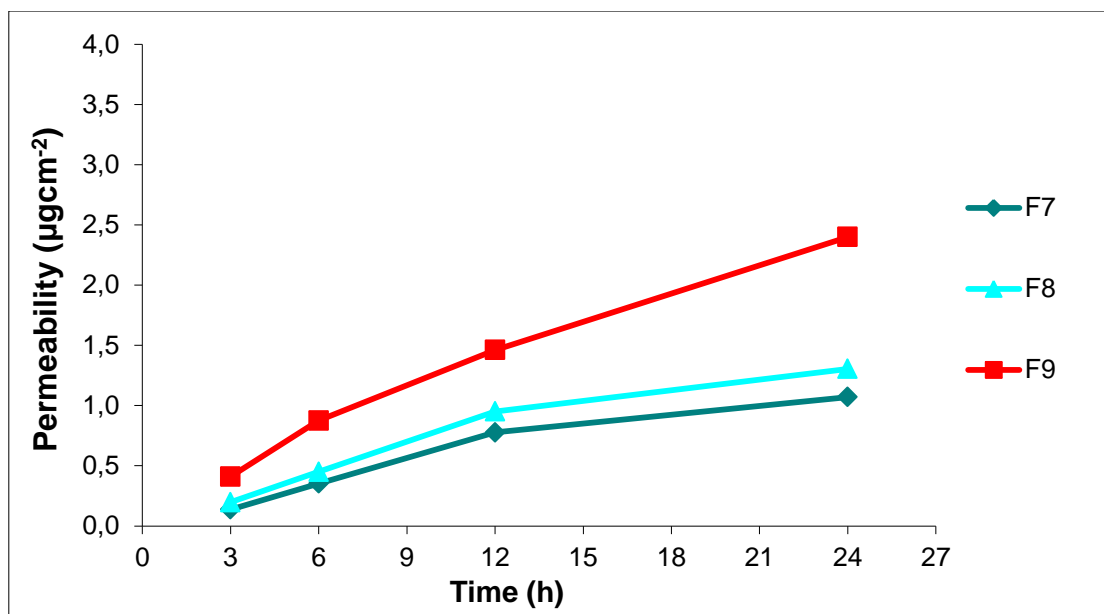
(6% w/w), οι οποίες αντιστοιχούν πλήρως στις συνταγές F4, F5 και F6, με τη μόνη διαφορά ότι η Ρεσβερατρόλη έχει προστεθεί από την αρχή στην υδατική φάση και μετά έλαβε χώρα η ομογενοποίηση.

Ο Πίνακας Γ7 και το διάγραμμα της Εικόνας Γ26 απεικονίζουν την αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) για κάθε μία από τις συνταγές/συνθέσεις (formulations). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε όρους αθροιστικής ποσότητας ανά μονάδα επιφάνειας παρά σε ροή σταθεροποιημένης κατάστασης (steady-state flux, J , $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$), επειδή η ροή υπολογίζεται από το γραμμικό τμήμα των καμπυλών, το οποίο συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερους χρόνους (Martin, 2003, Barry, 2000).

Πίνακας Γ7: Αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας σε κάθε χρονική στιγμή ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F1, F4, F5 και F6. Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) για $n=5$

| Time Points (hours) | F7 | F8 | F9 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3 | 0.19 \pm 0.03 | 0.21 \pm 0.03 | 0.48 \pm 0.01 |
| 6 | 0.46 \pm 0.02 | 0.49 \pm 0.07 | 0.91 \pm 0.11 |
| 12 | 0.92 \pm 0.11 | 0.99 \pm 0.04 | 1.53 \pm 0.14 |
| 24 | 1.21 \pm 0.09 | 1.35 \pm 0.02 | 2.46 \pm 0.31 |

Οι αντίστοιχες τιμές RSD κυμαίνονται από 1.73% έως 24.22%. Τιμές RSD περίπου 30% δεν είναι ασυνήθιστες σε *in vitro* πειράματα διείσδυσης χρησιμοποιώντας βιολογικά φραγμό (ανθρώπινο δέρμα), ενώ ακόμη και τιμές RSD περίπου 40% έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Southwell et al., 1984, Williams et al., 1992).



Εικόνα Γ26: Διάγραμμα της αθροιστικής ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) για τις συνταγές F7, F8 και F9 σε συνάρτηση με το χρόνο (t)

Η εικόνα της διαπερατότητας των συνταγών F7, F8 και F9 είναι παρόμοια με την αντίστοιχη των συνταγών F4, F5 και F6. Η αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη από τη συνταγή F9 είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F7 και F8. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) στην αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε από τη συνταγή F9 για όλα τα χρονικά σημεία.

Επίσης, οι εικόνες διαπερατότητας των συνταγών F7 και F8 φαίνεται να συμπεριφέρονται αρκετά παρόμοια. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ποσότητα που διαπέρασε από τις συνταγές F7 και F8 για καμία χρονική στιγμή.

Όσον αφορά στη σύγκριση του τρόπου ενσωμάτωσης της Ρεσβερατρόλης, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για καμία από τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις στις 3h και 6h. Η μικρή αύξηση που παρατηρείται στις αθροιστικές ποσότητες του δραστικού συστατικού που διαπέρασε στις 12h και 24h, όταν η Ρεσβερατρόλη ενσωματώθηκε μαζί με το Transcutol P (ΦΑΣΗ Ε), αφού είχε προηγηθεί η ομογενοποίηση και η προσθήκη των Γ και Δ, δεν σχετίζονται με αυτόν τον τύπο πειραμάτων διαδερμικής διαπερατότητας.

3.9 Συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ της τεχνητής μεμβράνης Strat-M[®] και του ανθρώπινου δέρματος

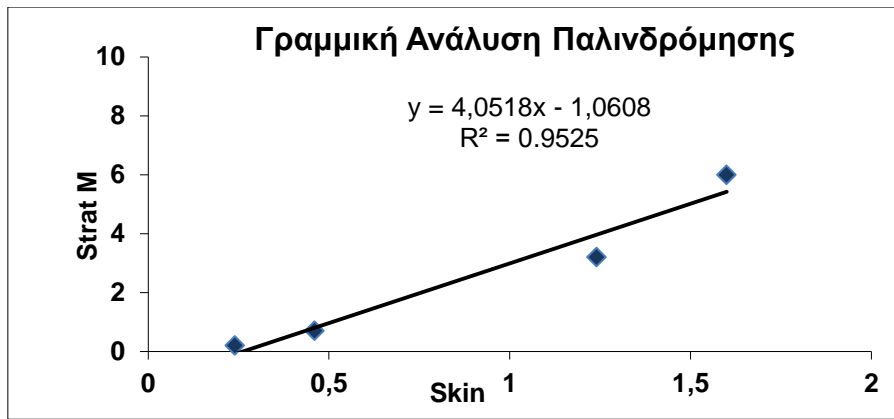
Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η γραμμική συσχέτιση της *in vitro* διαπέρασης της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας μέσω του ανθρώπινου δέρματος και της τεχνητής

μεμβράνης Strat-M[®] για τις συνταγές F4, F5 και F6. των αποτελεσμάτων διαπερατότητας. Οι συσχετίσεις που προέκυψαν ήταν γραμμικές και για τις τρεις περιεκτικότητες της Ρεσβερατρόλης (2% w/w, 4% w/w και 6% w/w) με καλούς συντελεστές συσχέτισης R² έχοντας τιμές μεγαλύτερες από 0.95, όπως φαίνεται από τις Εικόνες Γ27, Γ28 και Γ29.

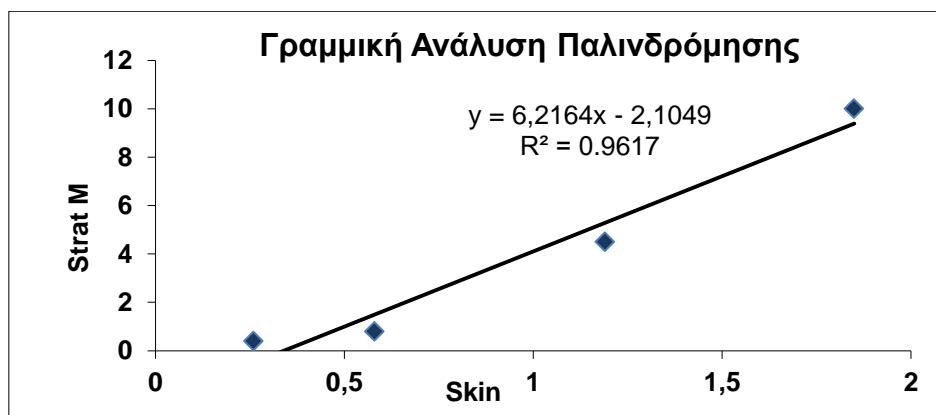
Τα αποτελέσματα της *in vitro* - *in vitro* συσχέτισης έδειξαν ότι, για τις συγκεκριμένες συνταγές που περιέχουν Ρεσβερατρόλη, υπάρχει γραμμική συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος και της τεχνητής μεμβράνης ανεξάρτητα της περιεκτικότητας της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα *in vitro* πειράματα διαπερατότητας του δέρματος και της μεμβράνης Strat-M[®] ενδεχομένως να έχουν συγκριτικό χαρακτήρα.

Στην παρούσα μελέτη η συνθετική μεμβράνη Strat-M[®] παρουσίασε σχετικά καλή συσχέτιση με την ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα για τη Ρεσβερατρόλη. Όπως φαίνεται από τις Εικόνες Γ26, Γ27 και Γ28, οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης R² ανάμεσα στα χρονικά σημεία για τα αποτελέσματα της αθροιστικής ποσότητας της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm²), σε συνάρτηση με το χρόνο (t), κυμαίνονται από 0.95 έως 0.99. Έτσι, υποδηλώνεται ότι κάποιος από τους μηχανισμούς μεταφοράς φαρμακολογικά δραστικών ουσιών μέσω διάχυσης είναι πιθανό να είναι παρόμοιος με ένα *ex vivo* μοντέλο ανθρώπινου δέρματος. Όμως, είναι σίγουρο ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για χημικές ενώσεις διαφορετικής λιποφιλίας για την επιβεβαίωση αυτών των προτάσεων.

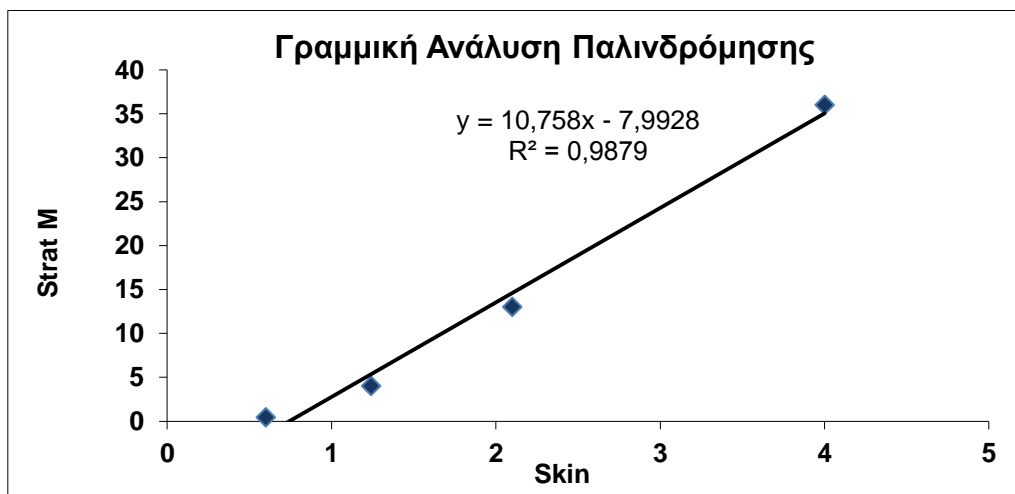
Τέλος, παρατηρείται ότι οι αθροιστικές ποσότητες της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M[®] ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm²), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) είναι περίπου από 4 έως 10 φορές μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες, όταν χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο δέρμα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες της βιβλιογραφίας. Η αθροιστική ποσότητα της Νικοτίνης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M[®] ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm²), σε συνάρτηση με το χρόνο (t), χρησιμοποιώντας επιταχυντές διαβατότητας, όπως την αζόνη, την ευκαλυπτόλη και την επιφανειοδραστική ουσία Tween 80, ήταν 5-10 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα (Haq et al., 2018). Επίσης, η αθροιστική ποσότητα της Υδροκορτιζόνης, της Καφεΐνης και της Νατριούχου Δικλοφενάκης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M[®] ανά μονάδα επιφάνειας, Q (μg/cm²), έχοντας μορφοποιηθεί σε φαρμακευτικές μορφές που εφαρμόζονται στο δέρμα (διαλύματα, γέλες, γαλακτώματα, ΔΘΣ), ήταν 4-12 φορές μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες χρησιμοποιώντας ανθρώπινο δέρμα (Haq et al., 2018).



Εικόνα Γ27: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης για τη συνταγής F4 (2% w/w) μεταξύ του ανθρώπινου δέρματος και της μεμβράνης Strat-M®



Εικόνα Γ28: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης για τη συνταγής F5 (4% w/w) μεταξύ του ανθρώπινου δέρματος και της μεμβράνης Strat-M®



Εικόνα Γ29: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης για τη συνταγής F6 (6% w/w) μεταξύ του ανθρώπινου δέρματος και της μεμβράνης Strat-M®

3.10 Ποσοτικός προσδιορισμός

Στον παρακάτω Πίνακα Γ8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χημικής σταθερότητας της Ρεσβερατρόλης μέσω του ποσοτικού προσδιορισμού στις συνταγές F4, F5 και F6, οι οποίες προέκυψαν από την άσκηση βελτιστοποίησης (optimization) του Πειραματικού Σχεδιασμού. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού δείχνουν ότι η μικρότερη % μέση περιεκτικότητα της Ρεσβερατρόλης είναι 98.12, ενώ η αντίστοιχη μεγαλύτερη είναι 104.06. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η Ρεσβερατρόλη είναι σταθερή στα συγκεκριμένα ημιστερεά γαλακτώματα ο/w για τουλάχιστον 6 μήνες.

Πίνακας Γ8: Απεικόνιση της μέσης περιεκτικότητας (%) της Ρεσβερατρόλης. Οι ποσότητες εκφράζονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση (SD) για n=3

% Περιεκτικότητα Ρεσβερατρόλης

| Time Points | Day 1 | Month 1 | Month 2 | Month 3 | Month 4 | Month 5 | Month 6 |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| F4 | 101.92 \pm 2.96 | 102.84 \pm 0.99 | 103.11 \pm 1.16 | 102.98 \pm 0.80 | 102.74 \pm 1.07 | 104.06 \pm 4.00 | 99.37 \pm 1.27 |
| F5 | 100.03 \pm 1.40 | 100.91 \pm 1.61 | 103.46 \pm 1.03 | 100.15 \pm 3.66 | 100.51 \pm 0.87 | 101.65 \pm 2.10 | 102.68 \pm 2,25 |
| F6 | 102.28 \pm 0.66 | 100.69 \pm 0.74 | 100.25 \pm 3.06 | 99.59 \pm 1.47 | 98.12 \pm 1.82 | 101.64 \pm 1.40 | 100.89 \pm 3.54 |

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη έχουν προκύψει τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Είναι δυνατή η μορφοποίηση και η ανάπτυξη ημιστερεών γαλακτωμάτων ο/w με τη Ρεσβερατρόλη να είναι πλήρως διαλυμένη στην υδατική φάση μέσω της χρήσης τεχνικών του Πειραματικού Σχεδιασμού.
- Η συνταγή F6 (6% w/w), η οποία προέκυψε από την άσκηση βελτιστοποίησης του Πειραματικού Σχεδιασμού, παρουσίασε τη μεγαλύτερη αθροιστική ποσότητα της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε ανά μονάδα επιφάνειας, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), σε συνάρτηση με το χρόνο (t), χρησιμοποιώντας τόσο την τεχνητή μεμβράνη Strat-M[®] όσο και ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα.
- Υπάρχει γραμμική συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος και της τεχνητής μεμβράνης ($0.95 < R^2 < 0.99$) για τη Ρεσβερατρόλη ανεξάρτητα της περιεκτικότητας της φαρμακολογικά δραστικής ουσίας. Έτσι, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα *in vitro* πειράματα διαπερατότητας του δέρματος και της μεμβράνης Strat-M[®] ενδεχομένως να έχουν συγκριτικό χαρακτήρα.
- Οι αθροιστικές ποσότητες της Ρεσβερατρόλης που διαπέρασε τη μεμβράνη Strat-M[®] ανά μονάδα επιφάνειας, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), σε συνάρτηση με το χρόνο (t) είναι περίπου από 4 έως 10 φορές μεγαλύτερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες, όταν χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο δέρμα. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με κάποια αποτελέσματα αντίστοιχων βιβλιογραφικών μελετών.
- Ο τρόπος ενσωμάτωσης της Ρεσβερατρόλης στα συγκεκριμένα ημιστερεά γαλακτώματα ο/w δεν επηρεάζει τη διαπερατότητα διαμέσου της κεράτινης ανθρώπινης στοιβάδας.
- Η Ρεσβερατρόλη είναι σταθερή στα συγκεκριμένα ημιστερεά γαλακτώματα ο/w για τουλάχιστον 6 μήνες σε συνθήκες περιβάλλοντος.

•

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd E., Yousef S.A., Pastore M.N., Telaprolu K., Mohammed Y.H., Namjoshi S. and Grice J.E., M.S. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 8, pp. 163-176
- Abdallah M.A.E., Pawar G. and Harrad S. (2015). Evaluation of 3D-human skin equivalents for assessment of human dermal absorption of some brominated flame retardants. *Environment International*, 84, pp. 64-70
- Abla M.J. and Banga A.K. (2013). Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity. *International Journal of Cosmetic Science*, 35 (1), pp. 1-8
- Addicks W.J., Flynn G.L. and Weiner N. (1987). Validation of a flow-through diffusion cell for use in transdermal research. *Pharmaceutical Research*, 4 (4), pp. 337-341
- Adrian D., Robert G., Jonathan H., Mark P. and Kenneth W. (2002). Formulation Strategies for Modulating Skin Permeation. In: ed., *Dermatological and Transdermal Formulations*. Chapter 6, CRC Press
- Alexander A., Dwivedi S., Ajazuddin, Giri T.K., Saraf S., Saraf S. and Tripathi D.K. (2012). Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 164 (1), pp. 26-40
- Alkilani A.Z., Maelíosa T.C. McCrudden M.T.C. and Ryan F. Donnelly R.F. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7, pp. 438-470
- Amidon G.L., Lennernäs H., Shah V.P. and Crison J.R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12 (3), pp. 413-420
- Amri A., Chaumeil J.C., Sfar S. and Charrueau C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?. *Journal of Controlled Release*, 158, pp. 182–193

- Ansari M., Maryam Kazemipour M. and Aklamli M. (2006). The study of drug permeation through natural membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 327, pp. 6-11
- Au W.L., Michael Skinner M. and 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*, 13 (1), pp. 11-20
- Baghban A.A., Younespour S., Jambarsang S., Yousefi M., Zayeri F. and Jalilian F.A. (2013). How to test normality distribution for a variable: a real example and a simulation study. *Journal of Paramedical Sciences*, 4 (1), pp. 73-77
- Baroni A., Buommino E., De Gregorio V., Ruocco E., Ruocco V. and Wolf R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30, pp. 257–262
- Barry B.W. (1983). *Dermatological formulations*, pp. 128. Marcel Dekker, New York
- Barry B.W. (1983). *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. Marcel Dekker, New York, USA
- Barry B.W. (2000). Topical preparations. In: *Pharmaceutics: The science of the dosage form design*, 2nd Edition, edited by Aulton M.E., Churchill Livingstone, London, UK
- Barry B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, pp. 101-114
- BaslyJ.P., Marre-Fournier F., Le Bail L.C., Habrioux G. and Chulia A.J. (2000). Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences*, 66 (9), pp. 769-777
- Baur J. A. and Sinclair D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (6), pp. 493-506

- Benson H.A.E. (2005). Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, 2, pp. 23-33
- Berman A. Y., Motechin R. A., Wiesenfeld M. Y. and Holz M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Precision Oncology*, 1 (1)
- Bhullar K.S. and Hubbard B.P. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852 (6), pp. 1209-1218
- Bolzinger M.A., Briancon S., Pelletier J. and Chevalier Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17, pp. 156-165
- Bouwstra J.A. and Honeywell-Nguyen P.L. (2002). Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 Supplement 1, pp. S41-S55
- Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S. and Ponec M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, 42, pp. 1-36
- Bronaugh R. L. and Stewart R. F. (1985). Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (1), pp. 64-67
- Buryanovskyy L., Fu Y., Boyd M., Ma Y., Hsieh T.C., Wu J.M. and Zhang Z. (2004). Crystal Structure of Quinone Reductase 2 in Complex with Resveratrol. *Biochemistry*, 43, pp. 11417-11426
- Cannon (2014). Lipids in Transdermal and Topical Drug Delivery. American Pharmaceutical Review. Διαθέσιμο σε: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/170872-Lipids-in-Transdermal-and-Topical-Drug-Delivery/> Τελευταία πρόσβαση: 23 Ιουνίου 2019

- Carrizzo A., Forte M., Damato A., Trimarco V., Salzano F., Bartolo M., Maciag A., Pucaf A.A. and Vecchione C. (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 61, pp. 215-226
- CAS Registry®, Διαθέσιμο σε: <http://www.cas.org> Τελευταία πρόσβαση: 30 Μαΐου 2019
- Catalgol B., Batirel S., Taga Y. and Ozer N. K. (2012). Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 3
- Chen X., He H., Wang G., Yang B., Ren W., Ma L. and Yu, Q. (2007). Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*, 21 (3), pp. 257-265
- Christine Moore M.V. (2012). Quality by Design - FDA Lessons Learned and Challenges for International Harmonization. *International Conference on Drug Development*, Austin, TX, Office of New Drug Quality Assessment (ONDQA/OPS/CDER)
- Chu D.H. (2008): Overview of biology, development, and structure of skin. In: Fitzpatrick's dermatology in general medicine, 7th Edition, Wolff K., Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrest B.A., Paller A.S. and Leffell D.J. (Eds.), New York: McGraw-Hill, pp. 57-73
- Crank J. (1975). The diffusion equations. In: Crank J. (Ed.), *The Mathematics of Diffusion*, 2nd Edition. Clarendon Press, Oxford, pp. 1–10
- Daniela Karadzovska D. and Jim E. Riviere J.E. (2013). Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, pp. 569–576
- Dayan N. (2005). Pathways for Skin Penetration. *Cosmetics & Toiletries*, 120, pp. 67-76

- de Vries K., Strydom M. and Steenkamp V. (2018). Bioavailability of resveratrol: Possibilities for enhancement. *Journal of Herbal Medicine*, 11, pp. 71-77
- Denyer S.P., Guy R.H., Hadgraft J. and Hugo W.B. (1985). The microbial degradation of topically applied drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 26, pp. 89-97
- Donnelly, R. F. and Singh T. R. (2015). Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom
- Dvorakova M. and Premysl Landa P. (2017). Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*, 124, pp. 126-145
- Elias P.M. (1981). Lipids and the Epidermal Permeability Barrier'. *Archives of Dermatological Research*, 270, pp. 95-117
- Elias P.M. (1983). Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*, 80 Supplement (1S), pp. S44-S49
- Elias P.M. (2005). Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. *Journal of Investigative Dermatology*, 125 (2), pp. 183-200
- Elias P.M., Cooper E.R., Korc A., Brown B.E. (1981). Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *The Journal of Investigative Dermatology*, 76 (4), pp. 297-301
- Ermakov I.V., Sharifzadeh I.M., Ermakova M., and Gellermann W. (2005). Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue. *Journal of Biomedical Optics*, 10 (6): 064028
- Escobar-Chávez J.J., Merino-Sanjuán V., López-Cervantes M., Urban-Morlan Z., Piñón-Segundo E., Quintanar-Guerrero D. and Ganem-Quintanar A. (2008). The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11, pp. 104-130

- Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment, United States Environmental Protection Agency (1992): Dermal exposure assessment: principles and applications (EPA/600/8-91-011B, January 1992)
- Feingold K.R. and Elias P.M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841 (3), pp. 280-294
- Feldman S. and Gibaldi M. (1967). Effect of Urea on Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56 (3), pp. 370-375
- Flaten G.E., Palac Z., Engesland A., Grcic J.F., Vanic Z. and Basnet N.S. (2015). In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, pp. 10-24
- Forslind B. and Albano R.E (2004). Skin, Hair, and Nails: Structure and Function. In: Marcel Dekker Inc., Chapter 2, Part I, New York, USA
- Fotaki N. (2011). Flow-through cell apparatus (USP apparatus 4): Operation and features. *Dissolution Technologies*, vol. 18, pp. 46-49
- Franz T.J. (1975). Percutaneous Absorption on the Relevance of *in vitro* Data. *The Journal of Investigative Dermatology*, 64 (3), pp. 190-195
- Fulda S. (2010). Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discovery Today*, 15 (17-18), pp. 757-765
- Ghasemi A. and Zahediasl S. (2012). Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10 (2), pp.486-489
- Godin B. and Touitou E. (2007). Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animals models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (11), pp. 1152-1161

- Goh J.Y., Weaver R.J., Dixon L., Nicola J. Platta N.J. and Roberts R.A. (2014) Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013, *Toxicology Research*, 4, pp. 1297–1307
- Goldberg D.M., George J.Y. and Soleas J. (2003). Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, 36 (1), pp. 79-87
- Guth K., Monika Schäfer-Korting M., Fabian E., Landsiedel R. and van Ravenzwaay B. (2015). Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 29, pp. 113-123
- Hadgraft J. and Lane M.E. (2011). Skin: The ultimate interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (12), pp. 5215-22
- Hadgraft J. and Valenta C. (2000) pH, pK_a and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 200, pp. 243-247
- Haigh J. M. and Smith E. W. (1994). The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (5-6), pp. 311-330
- Hamed R., Basil M., AlBaraghthi T., Sunoqrot S. and Tarawneh O. (2015). Nanoemulsion-based gel formulation of diclofenac diethylamine: design, optimization, rheological behavior and in vitro diffusion studies. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21 (8), pp. 980-989
- Haq A., Dorrani M., Goodyear B., Joshi V. and Michniak-Kohn B. (2018). Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 539, pp. 58-64
- Haq A., Goodyear B., Ameen D., Joshi V. and Michniak-Kohn B. (2018). Strat-M[®] synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547, pp. 432-437

- Haq A., Goodyear B., Ameen D., Vivek Joshi V. and Michniak-Kohna B. (2018). Strat-M[®] synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver Skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 547, pp. 432-437
- Hatanaka T., Shimoyama M., Sugibayashia K. and Morimoto Y. (1993). Effect of vehicle on the skin permeability of drugs: polyethylene glycol 400-water and ethanol-water binary solvents. *Journal of Controlled Release*, 23, pp. 247-260
- Haukvik T., Bruzell E., Kristensen S. and Tonnesen H.H. (2010). Photokilling of bacteria by curcumin in selected polyethylene glycol 400 (PEG 400) preparations. Studies on curcumin and curcuminoids, XLI. *Pharmazie*, 65 (8). pp. 600-606
- Herkenne C., Naik A., Kalia Y.K., Hadgraft J. and H. Guy R.H. (2006). Pig Ear Skin *ex Vivo* as a Model for *in Vivo* Dermatopharmacokinetic Studies in Man. *Pharmaceutical Research*, 23 (8), pp. 1850-1856
- Holme A.L. and Pervaiz S. (2007). Resveratrol in cell fate decisions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39 (1), pp. 59-63
- Houben E., De Paepe K. and Rogiers V. (2006). A Keratinocyte's Course of Life. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20 (3), pp. 122–132
- Howitz K. T., Bitterman K. J., Cohen H. Y., Lamming D. W., Lavu S., Wood J. G. and Sinclair D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425 (6954), pp. 191-196
- http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892 Τελευταία πρόσβαση: 09 Ιουνίου 2019
- <http://www.permeagear.de/vertical.htm> Τελευταία πρόσβαση: 04 Ιουνίου 2019
- <https://deming.org/theman/theories/profoundknowledge> Τελευταία πρόσβαση: 01 Ιουνίου 2019
- <https://permeagear.com/franz-cells/> Τελευταία πρόσβαση: 04 Ιουνίου 2019

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trans-Stilbene> Τελευταία πρόσβαση: 15 Ιουνίου 2015
- https://www.in-cosmetics.com/_novadocuments/255210?v=636053819429970000 Τελευταία πρόσβαση: 11 Ιουνίου 2019
- <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hyperhidrosis/multimedia/sweat-glands/img-20007980> Τελευταία πρόσβαση: 03 Ιουνίου 2019
- <https://www.yourdictionary.com/diffusion> Τελευταία πρόσβαση: 03 Ιουνίου 2019
- Hu C., Wang Q., Ma C. and Xia, Q. (2016). Non-aqueous self-double-emulsifying drug delivery system: A new approach to enhance resveratrol solubility for effective transdermal delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 489, pp. 360-369
- Hu Y., Converse C., Lyons M. C. and Hsu W. H. (2018). Neural control of sweat secretion: a review. *British Journal of Dermatology*, 178 (6), pp. 1246-1256
- Hung L.M., Su M.J. and Chen J.K. (2004). Resveratrol protects myocardial ischemia–reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (6), pp. 774-781
- ICH Q10, Pharmaceutical Quality System, Guideline. Διαθέσιμο σε: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf Τελευταία πρόσβαση: 21 Ιουνίου 2019
- ICH Q8(R2), Pharmaceutical Development, Guideline. Διαθέσιμο σε: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf Τελευταία πρόσβαση: 01 Ιουνίου 2019
- ICH Q9, Quality Risk Management, Guideline. Διαθέσιμο σε: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf Τελευταία πρόσβαση: 21 Ιουνίου 2019

- Itin P., Jemec G.B.E., Agner T., Nielsen J.B., Benfeldt E. and Holmgaard R. (2016). Skin Barrier Function. *Current Problems in Dermatology*, 49. 1421-5721, Basel ; New York : Karger, Section 2, pp. 103-111
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. and Adrian M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10), pp. 2731-2741
- Jones S.P., Greenway M.J. and Orr N.A. (1989). The influence of receptor fluid on in vitro percutaneous penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 53, pp. 43-46
- Kalita B., Das M. K., Sarma M. and Deka A. (2016). Sustained Anti-inflammatory Effect of Resveratrol-Phospholipid Complex Embedded Polymeric Patch. *AAPS PharmSciTech*, 18 (3), pp. 629-645
- Kandarova H., Bendova H., Letasiova S., Coleman K.P., de Jong W.H and Dagmar Jírova D. (2018). Evaluation of the medical devices benchmark materials in the controlled human patch testing and in the RhE *in vitro* skin irritation protocol. *Toxicology in Vitro*, 50, pp. 433-438
- Kang N.G., Park S.G. and Jeong S.H. (2012). Diffusion properties of different compounds across various synthetic membranes using Franz-type diffusion cells. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 42, pp. 271-277
- Katz, M. and Poulsen B. J. (1971). Absorption of drugs through the skin. In: B. B. Brodie and J. Gillette, *Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 103-174, Springer-Verlag
- Khairullina V.R., Mukhametov A.D., Gerchikov A.Y., Tarasov G.P., Garifullina G.G., Tyurina L.A. and Zarudii F.S. (2009). Computer design of trans-stilbene derivatives with pronounced anti-inflammatory activity and low toxicity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 43:505

- King R. E., Kent K. D. and Bomser J. A. (2005). Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, 151 (2), pp. 143-149
- Kligman A. M. and Christophers E. (1963). Preparation of isolated sheets of human stratum Corneum. *Archives of Dermatology*, 88, pp. 702-709
- Kligman A.M. and Christophers E. (1963). Preparation of isolated sheets of human stratum Corneum. *Archives of Dermatology*, 88, pp. 702-705
- Kolarsick P.A.J., Kolarsick M.A and Goodwin C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3 (4), pp. 203-213
- Kristl J., Teskac K., Caddeo C., Abramovic Z. and Sentjurc M. (2009). Improvements of cellular stress response on resveratrol in liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73 (2), pp. 253-259
- Kundu J.K. and Surh Y.J. (2008). Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, 269, pp. 243-261
- Lademann J., Jacobi U., Surberb C., Weigmann H.J. and Fluhr J.W. (2009). The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (2), pp. 317-323
- Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N. and Sterry W. (2006). Hair Follicles – A Long Term Reservoir for Drug Delivery. *Skin Pharmacology & Physiology*, 19, pp. 232-236
- Lai-Cheong J.E. and McGrath J.A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 37 (5), pp. 223-226
- Lane M. E. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447, pp. 12-21
- Le Corre L., Fustier P., Chalabi N., Bignon Y.J. and Dominique Bernard-Gallon D. (2004). Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with

the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines. *Clinica Chimica Acta*, 344, pp. 115-121

- Levintova Y., Plakogiannis F.M. and Bellantone R.A. (2011). An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 419, pp. 96-106
- Lewis A.J. and Manning A.M. (1999). New targets for anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3 (4), pp. 489-494
- Lopez-Nicolas J.M., Nunez-Delicado E., Perez-Lopez A.J., Barrachina A.C. and Cuadra-Crespo P. (2006). Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for -cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1135, pp. 158-165
- Lou B.S., Wu P.S., Hou C.W., Cheng F.Y. and Chen J.K. (2014). Simultaneous quantification of trans-resveratrol and its sulfate and glucuronide metabolites in rat tissues by stable isotope-dilution UPLC–MS/MS analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 94, pp. 99-105
- Maibach H.I. and Feldman R.J. (1969). Effect of applied concentration on percutaneous absorption in man. *Journal of Investigative Dermatology*, 52, 382
- Marlowe E. and Shangraw R.F. (1967). Dissolution of Sodium Salicylate from Tablet Matrices Prepared by Wet Granulation and Direct Compression. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56 (4), pp. 498-504
- Martin A., Bustamante P. and Chun A.H.C. (1993). Diffusion and dissolution. In: *Physical Pharmacy*, 4th Edition, Lea & Febiger, Philadelphia, USA
- Menon G.K., Cleary G.W. and Lane M.E. (2012). The structure and function of the stratum Corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435, pp. 3-9

- Merillon J.M., Fauconneau B., Waffo P.T., Barrier L., Vercauteren J. and Huguet F. (1997). Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical Chemistry*, 43 (6), pp. 1092-1093
- Michaels A. S., Chandrasekaran, S. K. and Shaw J. E. (1975). Drug permeation through human skin: Theory and *in vitro* experimental measurement. *AIChE Journal*, 21 (5), pp. 985-996
- Miki R., Kimura S., Ueda H., Shimamura T., Numajiri S., Seki T., Juni K., Kitano H. and Morimoto Y. (2010). Suitability of Synthetic Copolymer Membranes as a Human Skin Alternative for *In Vitro* Skin Permeation Testing, *AATEX*, 15 (1), pp. 14-27
- Mitragotri S., Anissimov Y.G., Bunge A.L., Frasch H.F., Guy R.H., Hadgraft J., Kasting G.B., Lane M.E., Roberts M.S. (2011). Mathematical models of skin permeability: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 418, pp. 115-129
- Montgomery D.C. (2013). Design and analysis of experiments. 8th edition. New York: John Wiley Sons
- Moritz A., Gust R. and Pertz H. H. (2007). Characterization of the Relaxant Response to N,N'-Dipropyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamine in Porcine Coronary Arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321 (2), pp. 699-706
- Moss G.P., Dearden J.C., Patel H. and Cronin M.T.D. (2002). Quantitative structure–permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicology in Vitro*, 16, pp. 299-317
- Moss G.P., Gullick D.R. and Wilkinson S.C. (2015). Methods for the Measurement of Percutaneous Absorption. In: Predictive Methods in Percutaneous Absorption, Chapter 2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Moss G.P., Gullick D.R. and Wilkinson S.C. (2015). Skin Structure and Physiology. In: Predictive Methods in Percutaneous Absorption, Chapter 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

- Munch S., Wohlrab J. and Neubert R.H.H. (2017). Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, pp.235-242
- Mura P., Faucci M.T., Bramanti G. and Corti P. (2000). Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, pp. 365-372
- Murphree R.W. (2017). Impairments in Skin Integrity. *Nursing Clinics of North America*, 52 (3), pp. 405-417
- Murphy G.F. (1997). Histology of the skin. In Lever's histopathology of the skin (8th Ed.), Elder D., Elenitsas R., Jaworsky C., Johnson Jr. B. (Eds.), Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 5–45.
- Naik A., Kalia Y.N. and Guy R.H. (2000). Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3 (9), pp. 318-326
- Nakashima E., Noonan P.K. and Benet L.Z. (1987). Transdermal Bioavailability and First-Pass Skin Metabolism: A Preliminary Evaluation with Nitroglycerin, *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 15 (4), pp. 423-437
- Newman T. (2018). Skin: How it works. Διαθέσιμο σε: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320435.php> Τελευταία πρόσβαση: 13 Απριλίου 2019
- Newton K. and Dixit V. M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (3)
- Ng S.F., Rouse J., Sanderson D. and Eccleston G. (2010). A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*, 2, pp. 209-223

- Nguyen C., Savouret J.F., Widerak M., Corvol M.T. and Rannou F. (2017). Resveratrol, Potential Therapeutic Interest in Joint Disorders: A Critical Narrative Review. *Nutrients*, 9 (1), 45
- O’Rahilly (2004). Basic Human Anatomy: A Regional Study of Human Structure. Dartmouth Medical School, part I, Chapter 4
- OECD Series on Testing and Assessment (2004). Guidance Documentation for the Conduction of Skin Absorption Studies. Number 28, ENV/JM/MONO(2004)2 (05-March-2004)
- OECD/OCDE 428 (2004). OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Skin Absorption: in *vitro* Method
- Oliveiraa G., Leverett J.C., Emamzadeh M. and Lane M.E. (2014). The effects of heat on skin barrier function and in vivo dermal absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 464, pp. 145-151
- O’Neil M.J., Heckelman P.E., Koch C.B., Roman K.J., Kenny C.M. and D’Arecca M.R. (2006). The Merck Index, 14th ed. Merck Publishing, Whitehouse Station, New Jersey, USA
- Otberg N., Richter H., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Sterry W. and Lademann J. (2004). Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites, *Journal of Investigative Dermatology*, 122 (1), pp. 14-19
- Ottaviani G., Martel S. and Carrupt P.A. (2006). Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (13), pp. 3948-3954
- Pagliara A., Reist M., Geinoz S., Carrupt P.A. and Testa B. (1999). Evaluation and prediction of drug permeation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (12), pp. 1339-1357

- Pailler-Mattei C., Bec S. and Zahouani H. (2008). *In vivo* measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Medical Engineering & Physics*, 30 (5), pp. 599-606
- Pellevoisin C., Videau C., Briotet D., Gregoire C., Tornier C., Alonso A., Rigaudeau A.S., Bouez C. and Seyler N. (2018). SkinEthic™ RHE for in vitro evaluation of skin irritation of medical device extracts. *Toxicology in Vitro*, 50, pp. 418-425
- Piepel G.F. and Cornell J.A. (1994). Mixture Experiment Approaches: Examples, Discussion, and Recommendations. *Journal of Quality Technology*, 26 (3), pp. 177-196
- Politis S.N., Colombo P., Gaia Colombo G. and Dimitrios M. Rekkas D.M. (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43 (6), pp. 889-901
- Polonini H.C., de Almeida Bastos C., de Oliveira M.A.L., da Silva C.G.A., Collins C.H., Marcos Antônio Fernandes Brandão A.F. and Raposo N.R.B. (2014). In vitro drug release and ex vivo percutaneous absorption of resveratrol cream using HPLC with zirconized silica stationary phase, *Journal of Chromatography B*, 947– 948, pp. 23-31
- Pongjanyakul T., Prakongpan S., Panomsuk S., Puttipipatkachor S. and Priprem A. (2002). Shed king cobra and cobra skins as model membranes for *in-vitro* nicotine permeation studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54 (10), pp. 1345-1350
- Prasanthi D. and Lakshmi P.K. (2012). Effect of Chemical Enhancers in Transdermal Permeation of Alfuzosin Hydrochloride. *ISRN Pharmaceutics*, 2012: 965280
- Prausnitz M., Melias P., Franz T.J., Schmuth M., Tsai J.C., Kmenon G., Mholleran W. and Feingold K.R. (2012). Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery. *Medical Therapy Section*, 19, pp. 2065-2073
- Pund S., Thakur R., More U. and Joshi A. (2014). Lipid based nanoemulsifying resveratrol for improved physicochemical characteristics, in vitro cytotoxicity and in

vivo antiangiogenic efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 120, pp. 110-117

- Rahman I., Biswas K.S. and Kirkham P.A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72 (11), pp. 1439-1452
- Rius C., Abu-Taha M., Hermenegildo C., Piqueras L., Cerda-Nicolas J.-M., Issekutz A.C., Estan L., Cortijo J., Morcillo E.J. and Sanz M.J. (2010). Trans - but Not Cis-Resveratrol Impairs Angiotensin-II-Mediated Vascular Inflammation through Inhibition of NF- B Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor - Upregulation. *The Journal of Immunology*, 185 (6), pp. 3718-3727
- Rogers J., Harding C., Mayo A., J. Banks J. and A. Rawlings A. (1996). Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Archives of Dermatological Research*, 288 (12), pp. 765-770
- Ru Q., Yu H. and Huang Q. (2010). Encapsulation of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Using Oil-in-Water (OW) Submicrometer Emulsions Stabilized by κ -Carrageenan and β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58, pp. 10373-1038
- Sala M., Diab R. and Elaissari A. and Fessi H. (2018). Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 535, pp. 1–17
- Samarjit Das B. S. P. and Dipak K. Das B. S. P. (2007). Resveratrol: A Therapeutic Promise for Cardiovascular Diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 2 (2), pp. 133-138
- Sanders J.E., Goldstein B.S., Leotta D.F. and Richard K.A. (1999). Image processing techniques for qualitative analysis of skin structures. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 59 (3), pp. 167-180
- Schaefer U. F., Hansen S., Schneider M., Contreras J. and Lehr C.M. (2008). Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. In Ehrhardt C. and, & K. J. Kim K.J.,

Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models, pp. 3-33. Springer, New York

- Schaefer U.F., Hansen S., Schneider M., Contreras J.L. and Claus-Michael Lehr C.M. (2008). Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. In: *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*, Ehrhardt C. and Kim K.J., Springer, New York, 2008, Part I, Chapter 1
- Schmook F.P., Meingassner J.G. and Billich A. (2001). Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 215, pp. 51-56
- Schouten A., Wagemakers L., Stefanato F. L., van der Kaaij R. M. and van Kan J. A. L. (2002). Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology*, 43 (4), pp. 883-894
- Shah V.P., Maibach H.I. and Jenner J. (2014) *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration* 2nd Edition. New York, USA: Springer Science & Business Media New York, Chapter 1, pp. 6-7
- Shakibaei M., Harikumar K. B. and Aggarwal B. B. (2009). Resveratrol addiction: To die or not to die. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53 (1), pp. 115-128
- Shang Y.J., Qian Y.P., Liu X.D., Dai F., Shang X.L., Jia W.Q., Liu Q., Fang J.G. and Zhou B. (2009). Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical and Substitution. *Journal of Organic Chemistry*, 74 (14), pp. 5025-5031
- Sigma Product Information, Resveratrol Sigma Product N° R5010, Διαθέσιμο σε: <http://www.sigmaaldrich.com> Τελευταία πρόσβαση: 30 Μαΐου 2019
- Simmons D.L. (2006). What makes a good anti-inflammatory drug target?. *Drug Discovery Today*, 11 (5-6), pp. 210-219
- Simon A., Amaro M.I., Healy A.M., Cabral L.M. and Pereira de Sousa V. (2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the

Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *International Journal of Pharmaceutic*, 512, pp. 234-241

- Singh B., Dahiya M., Saharan V. and Naveen Ahuja N. (2005). Optimizing Drug Delivery Systems Using Systematic "Design of Experiments." Part II: Retrospect and Prospects. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22 (3), pp. 215-294
- Singh G. and Pai R.S. (2015). Trans-resveratrol self-nano-emulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced bioavailability potential: optimization, pharmacokinetics and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) studies. *Drug Delivery*, 22 (4), pp. 522-530
- Singh S. & Singh J. (1993). Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: A review. *Medical Research Reviews*, 13(5), pp. 569-621
- Skelly J.P., Shach V.P., Maibach H.I., Guy R.H., Wester R.C. and Yacobi A. (1987). FDA and AAPS report of the Workshop on Principles and Practices of in vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence', *Pharmaceutical Research*, 4, pp. 265-267
- Smith K.L. (1990). Penetrant characteristics influencing skin absorption, *Methods for skin absorption*, edited by Kemppainen B.W., Reifenrath W.G., CRC Press, Boca Raton
- Smoliga J.M., Baur J.A. and Heather A. Hausenblas H.A. (2011). Resveratrol and health – A comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55 (8), pp. 1129-1141
- Southwell D., Barry B.W. and Woodford R. (1984). Variations in permeability of human skin within and between specimens. *International Journal of Pharmaceutics*, 18, pp. 299-309
- Sriram G., Alberti M., Dancik Y., Wu B., Wu R., Feng Z., Ramasamy S., Bigliardi P.L., Bigliardi-Qi M. and Wang Z. (2018). Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function. *Materials Today*, 21 (4), pp. 326-340

- Steffansen B., Brodin B. and Nielsen C.U. (2010). Molecular Biopharmaceutics Aspects of drug characterization, drug delivery and dosage form evaluation, Pharmaceutical Press, London, 2010, Part III, Chapt. 3.2
- Svajger U. and Jeras M. (2012). Anti-inflammatory Effects of Resveratrol and Its Potential Use in Therapy of Immune-mediated Diseases. *International Reviews of Immunology*, 31, pp. 202-222
- Szaefer H., Cichock, M., Krajka-Kuźniak V., Stefański, T., Sobia, S., Licznerska B. and Baer-Dubowska W. (2014). The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF- κ B and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes. *Pharmacological Reports*, 66 (5), pp. 732-740
- Szollosi A.G., Olah A., Biro T. and Toth B.I. (2018). Recent advances in the endocrinology of the sebaceous gland. *Dermatology – Endocrinology*, 9 (1), e1351576
- Tambuwala M. M. (2016). Natural Nuclear Factor Kappa Beta Inhibitors. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22 (3), pp. 719-723
- Tavano L., Muzzalupo R., Picci N. and de Cindio B. (2014). Co-encapsulation of lipophilic antioxidants into niosomal carriers: Percutaneous permeation studies for cosmeceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, pp. 144-149
- Thanh-Nga Tran T. (2013). Cutaneous Drug Delivery: An Update. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 16, S67-S69
- Trela B. C. and Waterhouse A. L. (1996). Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (5), pp. 1253-1257
- Truong V.L., Jun M. and Jeong W.S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44 (1), pp. 36-49

- Tsai H.Y., Ho C.T. and Chen Y.K. (2017). Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (1), pp. 134-147
- Tsai M.J., Lu I.J., Fu Y.S., Fang Y.P., Huang Y.B. and Wu P.C. (2016). Nanocarriers enhance the transdermal bioavailability of resveratrol: In-vitro and in-vivo study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, pp. 650-656
- Uchida T., Kadhum W.R., Kanai S., Todo H., Oshizaka T., Sugibayashi K. (2015). Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, pp. 113-118
- Valladeau J. and Saeland S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 17 (4), pp. 273-283
- van de Sandt J.J.M., van Burgsteden J.A., Cage S., Carmichael P.L., Dick I., Kenyon S., Korinth G., Larese F., Limasset J.C., Maas W.J.M., Montomoli L., Nielsen J.B., Payan J.P., Robinson E., Sartorelli P., Schaller K.H., Wilkinson S.C. and Williams F.M. (2004). In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, pp. 271-281
- Vastano B. C., Chen Y., Zhu N., Ho C.T., Zhou Z. and Rosen R. T. (2000). Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (2), pp. 253-256
- Vian M.A., Tomao V., S.Gallet S., Coulomb P.O. and Lacombe J.M. (2005). Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A*, 1085 (2), pp. 224-229
- Vitorino C., João Sousa J. and Pais A. (2015). Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. *Current Pharmaceutical Design*, 21 (20), pp. 2698-2712

- Walle T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215 (1), pp. 9-15
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E. and Walle K.U. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32 (12), pp. 1377-1382
- Waller J.M. and Howard I. Maibach H.I. (2006). Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Research and Technology*, 12, pp. 145-154
- Walters K.A. (2002). Dermatological and Transdermal Formulations. In: Marcel Dekker Inc., Chapter, 1 New York, USA
- Wang Y., Catana F., Yang Y., Roderick R. and van Breemen R. B. (2002). An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (3), pp. 431-435
- Waters L.J. (2015). Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation, *Current Pharmaceutical Design*, 21, pp. 2725-2732
- Waters L.J. (2015). Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation, *Current Pharmaceutical Design*, 21, pp. 2725-2732
- Wenzel, E., & Somoza, V. (2005). Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 472–481
- Wiechers J.W., Kelly C.L., Blease T.G. and Dederen C.J. (2004). Formulating for efficacy, *International Journal of Cosmetic Science*, 26, pp. 173–182
- Wiechers J.W., Kelly C.L., Blease T.G. and Dederen J.C. (2004). Formulating for Efficacy, *Cosmetics & Toiletries*, 119 (3), pp. 49-62
- Williams A. C. (2013) Topical and Transdermal Drug Delivery. In Aulton M.E. and Taylor K.MM, *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines* (4th edition, pp. 675-697). Elsevier Ltd.

- Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery*, The Pharmaceutical Press, London, UK
- Williams A.C., Cornwell P.A. and Barry B.W. (1992). On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities. *International Journal of Pharmaceutics*, 86, pp. 69-77
- Wilson J.S. and Holland L.M. (1982). The effect of application frequency on epidermal carcinogenesis assays. *Toxicology*, 24, pp. 45-53
- Woolfson A.D., McCafferty D.F. and McGowan K.E. (1992). Percutaneous penetration characteristics of amethocaine through porcine and human skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 78, pp. 209-216
- Wu S.T., Shiu G.K., Simmons J.E., Bronaugh R.L. and Skelly J.P. (1992). *In Vitro* Release of Nitroglycerin from Topical Products by Use of Artificial Membranes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, pp. 1153-1156
- Yamamoto A., Serizawa S., Ito M. and Sato Y. (1991). Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, 283, pp. 219-223
- Yan W.C., Davoodi P., Vijayavenkataraman S., Tian Y., Wei Cheng Ng, Jerry Y.H.F., Robinson K.S. and Wang C.H. (2018). 3D bioprinting of skin tissue: From pre-processing to final product evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, pp. 270-295
- Zaidi Z. and Lanigan S.W. (2010). *Dermatology in Clinical Practice*. Chapter 1, Springer, London
- Zhai H. and Maibach H.I. (2001). Effects of Skin Occlusion on Percutaneous Absorption: An Overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 14, pp. 1-10

- Zouboulis C. (2000). Human Skin: An Independent Peripheral Endocrine Organ. *Hormone Research*, 54, pp. 230–242
- Zykova T.A., Zhu F., Zhai X., Ma W.Y., Ermakova S.P., Lee K.W., Bode A.M., and Dong Z. (2008). Resveratrol Directly Targets COX-2 to Inhibit Carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 47 (10), pp. 797-805

ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας ΣΤ1: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F1, F2 και F3 για τις 3h

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F1 | 0.280 | 6 | 0.153 | 0.917 | 6 | 0.483 |
| F2 | 0.246 | 6 | 0.200 | 0.934 | 6 | 0.614 |
| F3 | 0.174 | 6 | 0.200 | 0.969 | 6 | 0.888 |

Πίνακας ΣΤ2: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F1, F2 και F3 για τις 6h

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F1 | 0.380 | 6 | 0.007 | 0.716 | 6 | 0.009 |
| F2 | 0.251 | 6 | 0.200 | 0.855 | 6 | 0.172 |
| F3 | 0.224 | 6 | 0.200 | 0.958 | 6 | 0.803 |

Πίνακας ΣΤ3: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F1, F2 και F3 για τις 12h

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F1 | 0.218 | 6 | 0.200 | 0.879 | 6 | 0.264 |
| F2 | 0.183 | 6 | 0.200 | 0.921 | 6 | 0.512 |
| F3 | 0.284 | 6 | 0.140 | 0.875 | 6 | 0.264 |

Πίνακας ΣΤ4: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F1, F2 και F3 για τις 24h

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F1 | 0.328 | 6 | 0.043 | 0.849 | 6 | 0.153 |
| F2 | 0.277 | 6 | 0.167 | 0.847 | 6 | 0.150 |
| F3 | 0.200 | 6 | 0.200 | 0.926 | 6 | 0.550 |

Πίνακας ΣΤ5: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 3h χρησιμοποιώντας μεμβράνη Strat-M®

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-----|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.292 | 3 | - | 0.923 | 3 | 0.463 |
| F5 | 0.385 | 3 | - | 0.750 | 3 | 0.000 |
| F6 | 0.385 | 3 | - | 0.750 | 3 | 0.000 |

Πίνακας ΣΤ6: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 3h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.315 | 5 | 0.117 | 0.818 | 5 | 0.113 |
| F5 | 0.210 | 5 | 0.200 | 0.929 | 5 | 0.589 |
| F6 | 0.353 | 5 | 0.041 | 0.773 | 5 | 0.048 |

Πίνακας ΣΤ7: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 6h χρησιμοποιώντας μεμβράνη Strat-M®

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-----|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.385 | 3 | - | 0.750 | 3 | 0.000 |
| F5 | 0.175 | 3 | - | 1.000 | 3 | 1.000 |
| F6 | 0.364 | 3 | - | 0.800 | 3 | 0.114 |

Πίνακας ΣΤ8: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 6h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.256 | 5 | 0.200 | 0.833 | 5 | 0.145 |
| F5 | 0.300 | 5 | 0.161 | 0.870 | 5 | 0.268 |
| F6 | 0.374 | 5 | 0.021 | 0.682 | 5 | 0.006 |

Πίνακας ΣΤ9: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 12h χρησιμοποιώντας μεμβράνη Strat-M®

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-----|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.199 | 3 | - | 0.995 | 3 | 0.865 |
| F5 | 0.204 | 3 | - | 0.993 | 3 | 0.843 |
| F6 | 0.345 | 3 | - | 0.840 | 3 | 0.214 |

Πίνακας ΣΤ10: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 12h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.358 | 5 | 0.036 | 0.804 | 5 | 0.087 |
| F5 | 0.250 | 5 | 0.200 | 0.862 | 5 | 0.243 |
| F6 | 0.304 | 5 | 0.147 | 0.844 | 5 | 0.176 |

Πίνακας ΣΤ11: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 24h χρησιμοποιώντας μεμβράνη Strat-M®

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-----|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.176 | 3 | - | 1.000 | 3 | 0.979 |
| F5 | 0.175 | 3 | - | 1.000 | 3 | 1.000 |
| F6 | 0.362 | 3 | - | 0.804 | 3 | 0.124 |

Πίνακας ΣΤ12: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F4, F5 και F6 για τις 24h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F4 | 0.341 | 5 | 0.057 | 0.779 | 5 | 0.054 |
| F5 | 0.199 | 5 | 0.200 | 0.933 | 5 | 0.620 |
| F6 | 0.309 | 5 | 0.133 | 0.720 | 5 | 0.015 |

Πίνακας ΣΤ13: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F7, F8 και F9 για τις 3h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F7 | 0.276 | 5 | 0.200 | 0.853 | 5 | 0.203 |
| F8 | 0.221 | 5 | 0.200 | 0.902 | 5 | 0.421 |
| F9 | 0.300 | 5 | 0.161 | 0.883 | 5 | 0.325 |

Πίνακας ΣΤ14: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F7, F8 και F9 για τις 6h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F7 | 0.214 | 5 | 0.200 | 0.952 | 5 | 0.749 |
| F8 | 0.324 | 5 | 0.094 | 0.751 | 5 | 0.030 |
| F9 | 0.229 | 5 | 0.200 | 0.935 | 5 | 0.628 |

Πίνακας ΣΤ15: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F7, F8 και F9 για τις 12h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F7 | 0.291 | 5 | 0.192 | 0.843 | 5 | 0.173 |
| F8 | 0.241 | 5 | 0.200 | 0.952 | 5 | 0.749 |
| F9 | 0.179 | 5 | 0.200 | 0.980 | 5 | 0.933 |

Πίνακας ΣΤ16: Έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής (Normality Test) των δεδομένων των συνταγών F7, F8 και F9 για τις 24h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγές | Kolmogorov-Smirnov | | | Shapiro-Wilk | | |
|----------|--------------------|----|-------|--------------|----|-------|
| | Statistic | df | Sig | Statistic | df | Sig |
| F7 | 0.169 | 5 | 0.200 | 0.987 | 5 | 0.968 |
| F8 | 0.275 | 5 | 0.200 | 0.897 | 5 | 0.392 |
| F9 | 0.220 | 5 | 0.200 | 0.937 | 5 | 0.647 |

Πίνακας ΣΤ17: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F1, F2 και F3 στις 3h

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F1 | F2 | 0.005 | 1.4264 | 7.3236 |
| | F3 | 0.001 | 4.0181 | 8.9885 |
| F2 | F1 | 0.005 | -7.3236 | -1.4264 |
| | F3 | 0.092 | -0.4141 | 4.6708 |
| F3 | F1 | 0.001 | -8.9885 | -4.0181 |
| | F2 | 0.092 | -4.6708 | 0.4141 |

Πίνακας ΣΤ18: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F1, F2 και F3 στις 6h

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F1 | F2 | 1.000 | -56.5429 | 56.5229 |
| | F3 | 0.002 | 55.0239 | 151.6795 |
| F2 | F1 | 1.000 | -56.5229 | 56.5429 |
| | F3 | 0.002 | 55.2629 | 151.4605 |
| F3 | F1 | 0.002 | -151.6795 | -55.0239 |
| | F2 | 0.002 | -151.4605 | -55.2629 |

Πίνακας ΣΤ19: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F1, F2 και F3 στις 12h

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F1 | F2 | 0.912 | -67.8456 | 103.9156 |
| | F3 | 0.000 | 245.4293 | 409.1740 |
| F2 | F1 | 0.912 | -103.9156 | 67.8456 |
| | F3 | 0.000 | 248.3908 | 370.1426 |
| F3 | F1 | 0.000 | -409.1740 | -245.4293 |
| | F2 | 0.000 | -370.1426 | -248.3908 |

Πίνακας ΣΤ20: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F1, F2 και F3 στις 24h

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F1 | F2 | 0.479 | -81.7986 | 219.1486 |
| | F3 | 0.000 | 410.4195 | 715.1838 |
| F2 | F1 | 0.479 | -219.1486 | 81.7986 |
| | F3 | 0.000 | 425.2147 | 563.0386 |
| F3 | F1 | 0.000 | -715.1838 | -410.4195 |
| | F2 | 0.000 | -563.0386 | -425.2147 |

Πίνακας ΣΤ21: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 3h χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη Strat M[®]

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 1.000 | -0.0983 | 0.0983 |
| | F6 | 0.015 | -0.2683 | -0.0717 |
| F5 | F4 | 1.000 | -0.0983 | 0.0983 |
| | F6 | 0.000 | -0.1945 | -0.1455 |
| F6 | F4 | 0.015 | 0.0717 | 0.2683 |
| | F5 | 0.000 | 0.1455 | 0.1945 |

Πίνακας ΣΤ22: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 3h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.999 | -0.1385 | 0.1065 |
| | F6 | 0.001 | -0.3810 | -0.1230 |
| F5 | F4 | 0.999 | -0.1065 | 0.1385 |
| | F6 | 0.001 | -0.3533 | -0.1187 |
| F6 | F4 | 0.001 | 0.1230 | 0.3810 |
| | F5 | 0.001 | 0.1187 | 0.3533 |

Πίνακας ΣΤ23: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 6h χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη Strat M®

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.221 | -0.2882 | 0.1015 |
| | F6 | 0.030 | -2.9323 | -0.3744 |
| F5 | F4 | 0.221 | -0.1015 | 0.2882 |
| | F6 | 0.037 | -2.8941 | -0.2259 |
| F6 | F4 | 0.030 | 0.3744 | 2.9323 |
| | F5 | 0.037 | 0.2259 | 2.8941 |

Πίνακας ΣΤ24: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 6h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.137 | -0.2632 | 0.0312 |
| | F6 | 0.001 | -1.0536 | -0.4864 |
| F5 | F4 | 0.137 | -0.0312 | 0.2632 |
| | F6 | 0.001 | -0.9330 | 0.3750 |
| F6 | F4 | 0.001 | 0.4864 | 1.0536 |
| | F5 | 0.001 | 0.3750 | 0.9330 |

Πίνακας ΣΤ25: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 12h χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη Strat M®

| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.098 | -2.5288 | 0.4288 |
| | F6 | 0.000 | -12.4087 | -8.5046 |
| F5 | F4 | 0.098 | 0.4288 | 2.5288 |
| | F6 | 0.004 | -11.9932 | -6.8202 |
| F6 | F4 | 0.000 | 8.5046 | 12.4087 |
| | F5 | 0.004 | 6.8202 | 11.9932 |

Πίνακας ΣΤ26: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 12h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

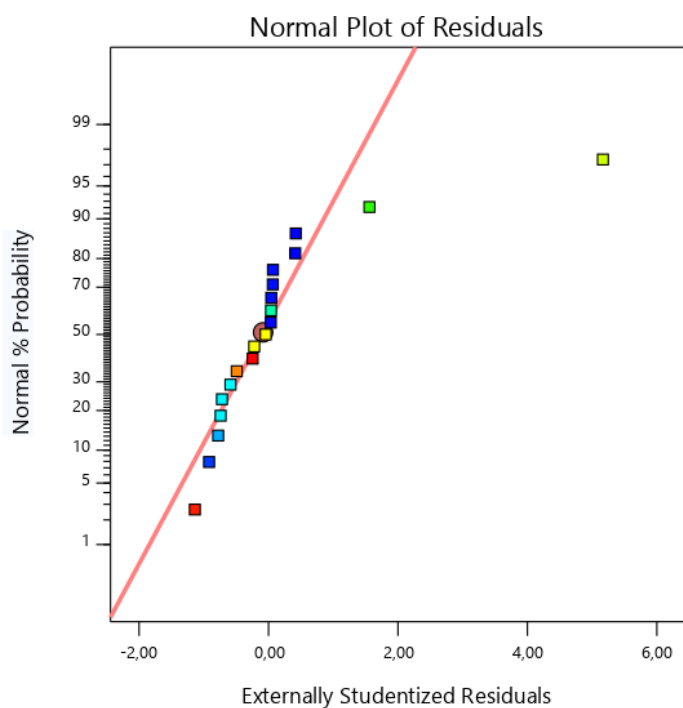
| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.999 | -0.4367 | 0.5407 |
| | F6 | 0.002 | -1.3899 | -0.3301 |
| F5 | F4 | 0.999 | -0.5407 | 0.4367 |
| | F6 | 0.003 | -1.3539 | -0.4701 |
| F6 | F4 | 0.002 | 0.3301 | 1.3899 |
| | F5 | 0.003 | 0.4701 | 1.3539 |

Πίνακας ΣΤ27: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 24h χρησιμοποιώντας τη μεμβράνη Strat M®

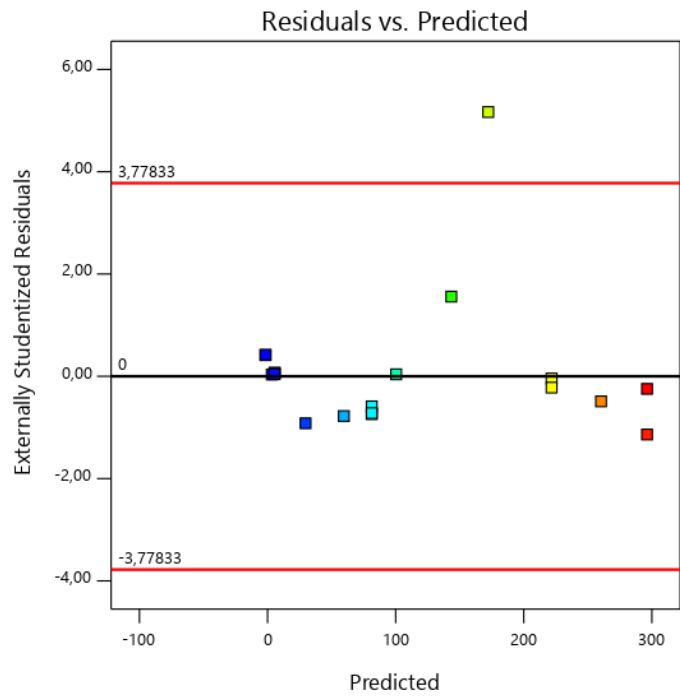
| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.196 | -12.2619 | 3.4753 |
| | F6 | 0.004 | -39.9131 | -21.6669 |
| F5 | F4 | 0.196 | -3.4753 | 12.2619 |
| | F6 | 0.000 | 29.6578 | -23.1356 |
| F6 | F4 | 0.004 | 21.6669 | 39.9131 |
| | F5 | 0.000 | 23.1356 | 29.6578 |

Πίνακας ΣΤ28: One Way ANOVA μέσω post hoc δοκιμασιών για τις συνταγές F4, F5 και F6 στις 24h χρησιμοποιώντας ανθρώπινη κεράτινη στοιβάδα

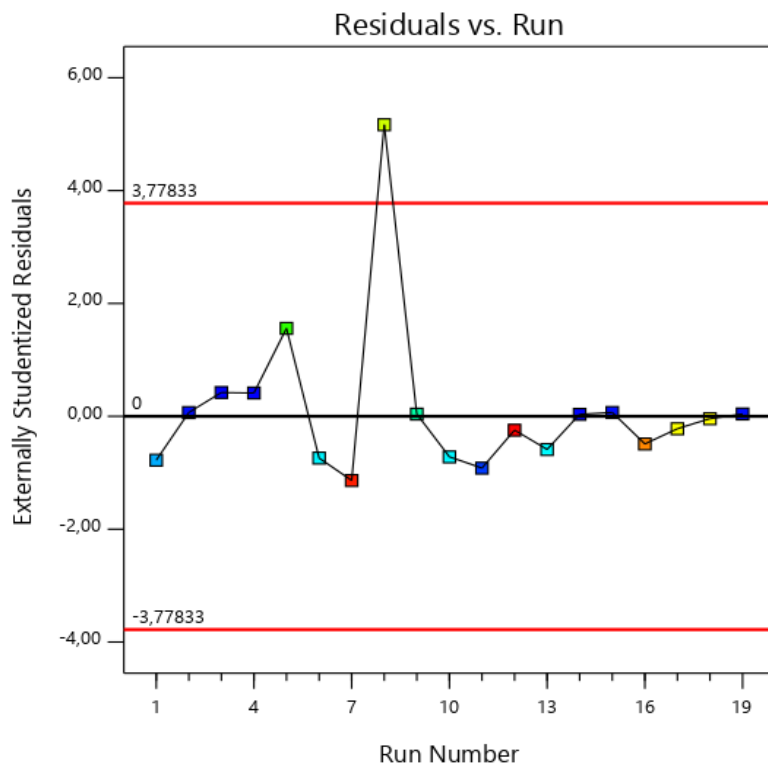
| Συνταγή | Συνταγές | Sig | 95% confidence interval | |
|---------|----------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| F4 | F5 | 0.134 | -0.7634 | 0.0874 |
| | F6 | 0.000 | -3.0023 | -1.7737 |
| F5 | F4 | 0.134 | -0.0874 | 0.7634 |
| | F6 | 0.000 | -2.6520 | -1.4480 |
| F6 | F4 | 0.000 | 1.7737 | 3.0023 |
| | F5 | 0.000 | 1.4480 | 2.6520 |



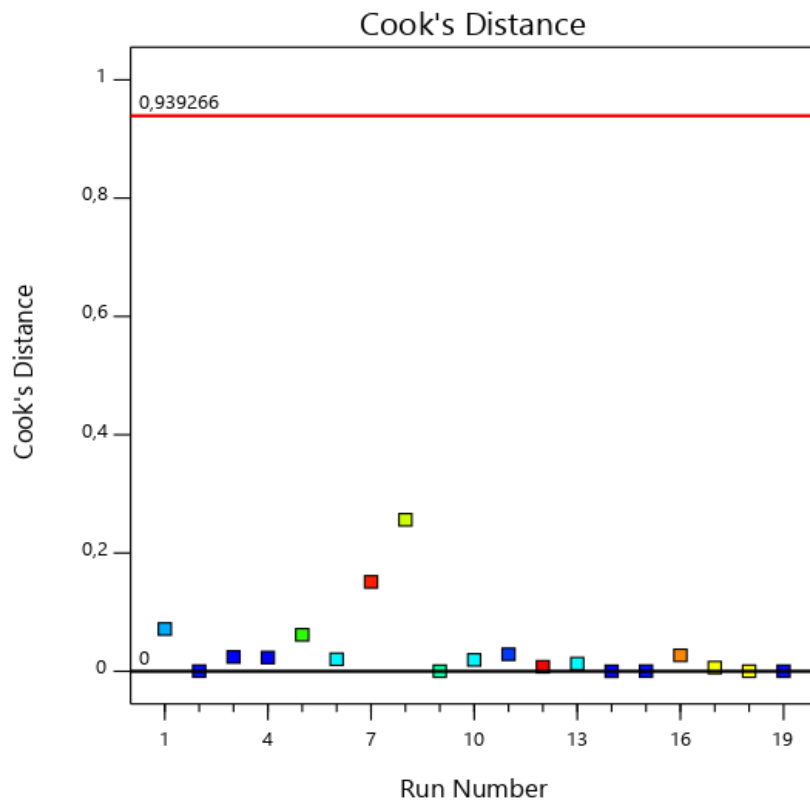
Εικόνα ΣΤ1: Normal plot (Design Expert® - DX 11)



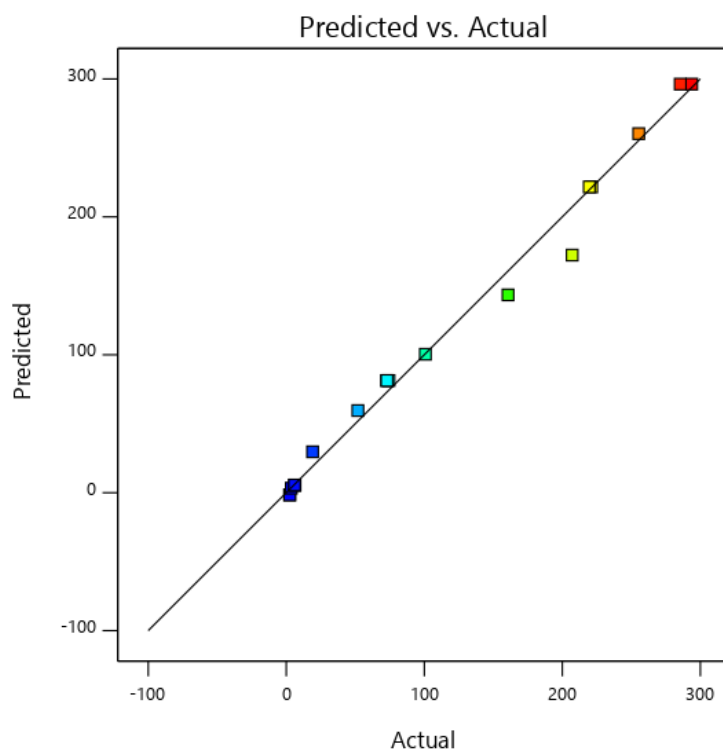
Εικόνα ΣΤ2: Residuals vs Predicted (Design Expert® - DX 11)



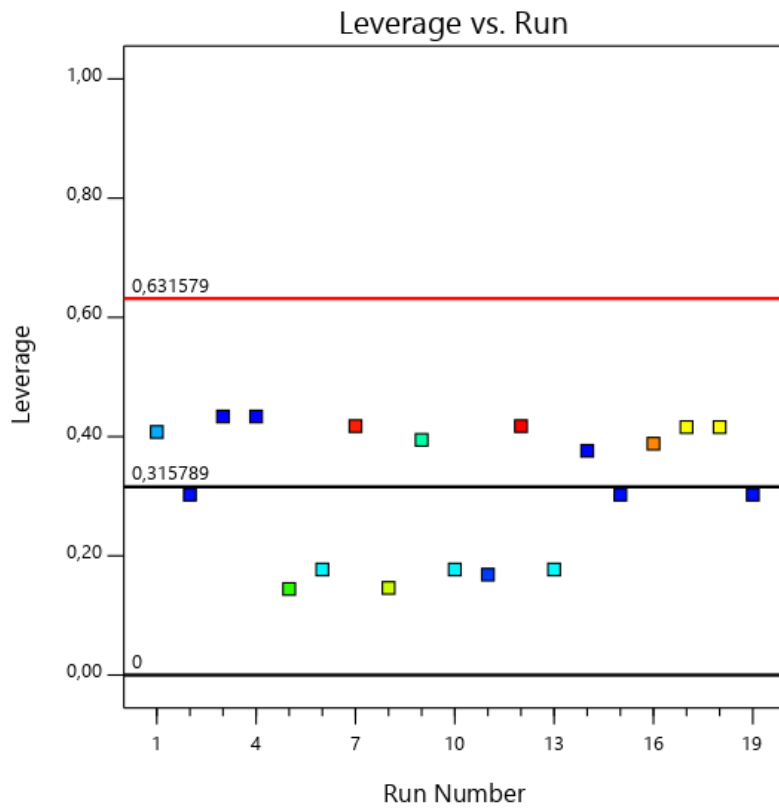
Εικόνα ΣΤ3: Residuals vs Run (Design Expert® - DX 11)



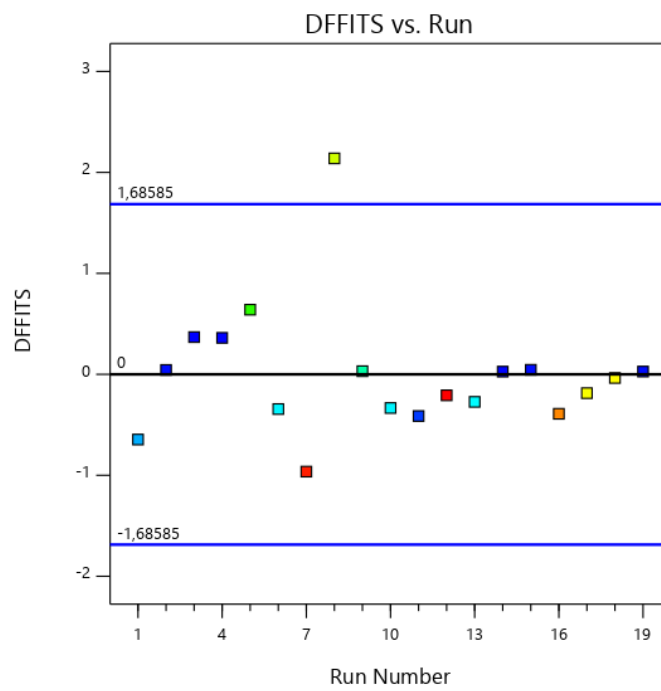
Εικόνα ΣΤ4: Cook's Distance (Design Expert® - DX 11)



Εικόνα ΣΤ5: Predicted vs Actual (Design Expert® - DX 11)



Εικόνα ΣΤ6: Leverage (Design Expert® - DX 11)



Εικόνα ΣΤ7: DFFITS (Design Expert® - DX 11)

Report

| Run Order | Actual Value | Predicted Value | Residual | Leverage | Internally Studentized Residuals | Externally Studentized Residuals | Cook's Distance | Influence on Fitted Value DFFITS | Standard Order |
|-----------|--------------|-----------------|----------|----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------|
| 1 | 51,93 | 59,59 | -7,66 | 0,408 | -0,790 | -0,777 | 0,072 | -0,645 | 3 |
| 2 | 6,28 | 5,55 | 0,7323 | 0,303 | 0,070 | 0,067 | 0,000 | 0,044 | 14 |
| 3 | 2,55 | -1,58 | 4,13 | 0,434 | 0,435 | 0,421 | 0,024 | 0,369 | 2 |
| 4 | 2,47 | -1,58 | 4,05 | 0,434 | 0,427 | 0,413 | 0,023 | 0,362 | 1 |
| 5 | 160,71 | 143,46 | 17,25 | 0,144 | 1,480 | 1,559 | 0,062 | 0,641 | 6 |
| 6 | 72,73 | 81,34 | -8,61 | 0,177 | -0,753 | -0,740 | 0,020 | -0,344 | 9 |
| 7 | 285,43 | 296,25 | -10,82 | 0,418 | -1,125 | -1,138 | 0,151 | -0,963 | 19 |
| 8 | 207,16 | 172,30 | 34,86 | 0,146 | 2,995 | 5,168 ⁽¹⁾ | 0,256 | 2,139 ⁽²⁾ | 13 |
| 9 | 100,80 | 100,40 | 0,3964 | 0,395 | 0,040 | 0,039 | 0,000 | 0,031 | 17 |
| 10 | 72,97 | 81,34 | -8,37 | 0,177 | -0,732 | -0,719 | 0,019 | -0,334 | 11 |
| 11 | 19,11 | 29,71 | -10,60 | 0,169 | -0,923 | -0,917 | 0,029 | -0,413 | 8 |
| 12 | 293,80 | 296,25 | -2,45 | 0,418 | -0,254 | -0,245 | 0,008 | -0,207 | 18 |
| 13 | 74,45 | 81,34 | -6,89 | 0,177 | -0,603 | -0,588 | 0,013 | -0,273 | 10 |
| 14 | 3,70 | 3,33 | 0,3684 | 0,376 | 0,037 | 0,036 | 0,000 | 0,028 | 7 |
| 15 | 6,30 | 5,55 | 0,7523 | 0,303 | 0,071 | 0,069 | 0,000 | 0,045 | 15 |
| 16 | 255,36 | 260,34 | -4,98 | 0,388 | -0,505 | -0,490 | 0,027 | -0,390 | 12 |
| 17 | 219,53 | 221,73 | -2,20 | 0,416 | -0,229 | -0,220 | 0,006 | -0,186 | 5 |
| 18 | 221,31 | 221,73 | -0,4246 | 0,416 | -0,044 | -0,042 | 0,000 | -0,036 | 4 |
| 19 | 6,01 | 5,55 | 0,4623 | 0,303 | 0,044 | 0,042 | 0,000 | 0,028 | 16 |

Εικόνα ΣΤ8: Report (Design Expert® - DX 11)