



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων
ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης
σε μοντέλο άτριχων μυών»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

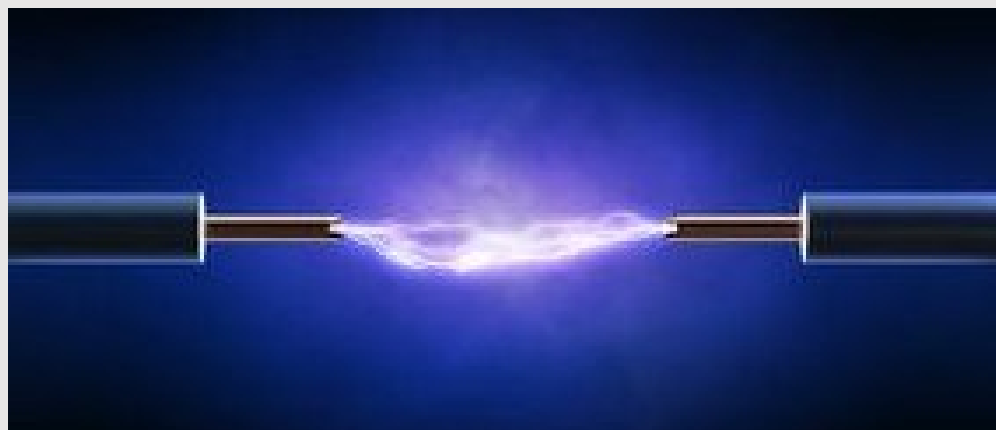
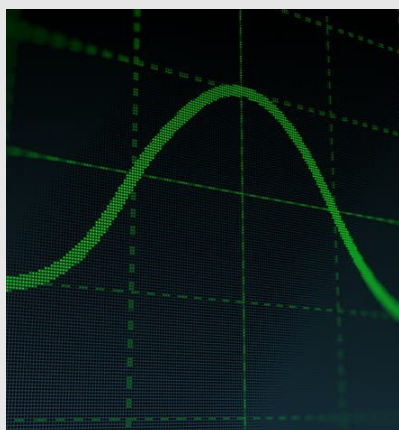
ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑΣ -
ΔΕΡΜΑΤΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΟΥΝΤΑ ΣΤΥΛΙΑΝΗ

ΑΜ: 170705

ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ
2019



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Μιχαήλ Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Πολιτόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τομέα Ηλεκτρομαγνητικών Εφαρμογών Ηλεκτροοπτικής και Ηλεκτρονικών Υλικών, Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Δάλλας Παρασκευάς

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

Ράλλης Μιχαήλ

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

Η μελέτη διεξήχθη σε συνεργασία με τα μέλη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής – Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων-Μηχανολόγων (ΗΜΜΥ) του ΕΜΠ.



Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος «Κοσμητολογίας-Δερματοφαρμακολογίας» του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η πραγματοποίησή της έγινε κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018-2019 από τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών Τούντα Στυλιανή με θέμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών». Το πείραμα με θέμα «Πρόκληση διαβήτη τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών» που αποτέλεσε και το πρώτο βήμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε σε συνεργασία με τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια και συνάδελφο του τμήματος Φαρμακευτικής Στίγκα Ελένη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όσους με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν στην εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας. Εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του καθηγητή, Μιχαήλ Ράλλη στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες για την πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε και την καθοδήγησή του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου Κωνσταντίνο Πολιτόπουλο καθώς και στην κα Ελένη Αλεξανδράτου για την άριστη συνεργασία μας αλλά και για την προθυμία και την άμεση ανταπόκριση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Οι συμβουλές τους ήταν καθοδηγητικές στις διάφορες δυσκολίες που παρουσιάστηκαν στα στάδια της μελέτης, ανάπτυξης και υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμα τους ευγνωμονώ για την άμεση παροχή των συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την έρευνα.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια Φωτεινή Δανιά για την πολύτιμη βοήθειά της και τις χρήσιμες συμβουλές της στο σχεδιασμό του 1ου πειράματος.

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Παρασκευά Δάλλα για τις κρίσιμες παρεμβάσεις του καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του στην πορεία του τελικού πειράματος.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον κύριο Ανδρέα Βίτσο για την άμεση ανταπόκρισή του, αλλά και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και να κατανοήσει τυχόν προβλήματα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Δημήτρη Μοστράτο για την πολύτιμη βοήθειά του στην στατιστική επεξεργασία του 1ου πειράματος.

Ευχαριστώ θερμά όλη την ομάδα του εργαστηρίου Κοσμητολογίας και Πειραματοζώων για την υπομονή τους αλλά και για τη διάθεσή τους να βοηθήσουν.

Ιδιαίτερα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη συμφοιτήτριά μου, Ελένη Στίγκα για την αμέριστη υποστήριξη και βοήθειά της καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας μου, αλλά και για την άψογη συνεργασία μας στη διάρκεια του κοινού μας πειράματος.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στα άτομα από το στενό μου οικογενειακό περιβάλλον, που πίστεψαν στις δυνατότητές μου, με στήριζαν, και με εμπύχωναν κατά τη διάρκεια των σπουδών αλλά και κατά την αποπεράτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τούνα Στυλιανή

Περιεχόμενα

Πρόλογος – Ευχαριστίες	3
Περιεχόμενα	5
Πίνακας Εικόνων	10
Πίνακας Διαγραμμάτων	13
Κατάλογος Συντομογραφιών	16
Περίληψη.....	18
Abstract	20
Θεωρητικό μέρος.....	22
Κεφάλαιο 1:	22
Σακχαρώδης Διαβήτης	22
1.1 Πως εμφανίζεται ο Σακχαρώδης Διαβήτης;.....	22
1.2 Η Ιστορία του Διαβήτη.....	23
1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης).....	23
1.3.1 Κλινική εικόνα	24
1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)	25
1.4.1 Κλινική εικόνα	26
1.5 Διαβήτης κύησης.....	26
1.6 Επιδημιολογικά στοιχεία	26
1.7 Ομάδες υψηλού κινδύνου για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2	28
1.8 Διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη	28
1.9 Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη	29
1.10 Διαβητικό δέρμα.....	30
1.10.1 Ο επιδερμικός φραγμός στο διαβητικό δέρμα.....	30
1.11 Αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη	31
1.11.1 Δίαιτα	32
1.11.2 Φυσική Άσκηση.....	32
1.11.3 Φαρμακευτική αγωγή.....	33
1.12 Θεραπευτικό πρωτόκολλο στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2.....	36

1.13 Αποτελεσματικότητα αντιδιαβητικών φαρμάκων ως μονοθεραπεία	36
Κεφάλαιο 2 :	37
Διαδερμική Χορήγηση	37
2.1 Μια σύντομη ανασκόπηση της δομής του δέρματος	37
2.2 Φυσιολογία δέρματος	38
2.3 Δομή του δέρματος	38
2.3.1 Επιδερμίδα	39
2.3.2 Χόριο	44
2.3.3 Υποδόριος ιστός	45
2.3.4 Αγγεία και νεύρα του δέρματος	45
2.3.5 Τα κεράτινα όργανα του δέρματος	46
2.3.6 Οι αδένες του δέρματος	46
2.3.7 Οργάνωση λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα.....	47
Κεφάλαιο 3 :	48
Τοπική και Διαδερμική χορήγηση φαρμάκου.....	48
3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χορήγησης φαρμάκων από το δέρμα .	49
3.2 Οδοί Διέλευσης προς το δέρμα	51
3.3 Προϋποθέσεις χορήγησης διαδερμικών φαρμάκων	52
3.4 Βασικά συστήματα διαδερμικής χορήγησης	54
3.5 Νέες ανακαλύψεις στη διαδερμική χορήγηση.....	56
3.6 Κινητική των διαδερμικών συστημάτων	58
3.7 Διαπέραση φαρμάκων δια του δέρματος	59
3.8 Διαδερμική διαπερατότητα	60
3.9 Ex-vivo δειξίωση φαρμάκων στο δέρμα	63
3.10 Μέθοδοι ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης φαρμάκων	64
3.10.1 Συνδυασμός μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης.....	67
Κεφάλαιο 4 :	67
Χημικοί Ενισχυτές διαπέρασης.....	67

4.1 Αλκοόλες.....	70
4.2 Εστέρες.....	71
4.3 Αζόνη.....	71
4.4 Γλυκόλες.....	72
4.5 Αιθέρες Γλυκόλης.....	72
4.6 Τερπένια.....	72
4.7 Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO).....	73
Κεφάλαιο 5 :.....	73
Ηλεκτρικό ρεύμα.....	73
5.1 Βασικές έννοιες ηλεκτρικού ρεύματος.....	73
5.1.1 Ηλεκτρική τάση.....	74
5.1.2 Ηλεκτρική αντίσταση.....	74
5.1.3 Σήματα.....	75
5.1.4 Ημιτονοειδείς κυματομορφές.....	75
5.1.5 Τετραγωνικές Κυματομορφές.....	76
Κεφάλαιο 6 :.....	77
Ιοντοφόρηση.....	77
6.1 Ιστορική αναδρομή της Ιοντοφόρησης.....	79
6.2 Φαρμακοκινητική της Ιοντοφόρησης.....	80
6.3 Ηλεκτρικές ιδιότητες του ανθρώπινου δέρματος.....	89
6.4 Τύποι Ιοντοφορητικού συστήματος.....	91
6.5 Τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί-αντενδείξεις χρήσης της διαδερμικής ιοντοφόρησης.....	92
6.6 Κλινικές εφαρμογές Ιοντοφόρησης σε άλλους κλάδους.....	94
Πρακτικό μέρος.....	96
Κεφάλαιο 7 :.....	96
1ο πείραμα «Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών».....	96

2ο πείραμα «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»	96
7.1 Εισαγωγή	97
7.2 Σκοπός της εργασίας	102
7.3 1ο πείραμα: «Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών»	106
7.3.1 Υλικά & Μέθοδοι	106
7.3.2 Μέθοδοι-Πρωτόκολλα	108
7.4 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»	121
7.4.1 Υλικά & Μέθοδοι	121
7.4.2 Δοκιμαστικό πείραμα	137
7.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων του 1ου πειράματος	139
7.6 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων του 2ου πειράματος	140
7.7 Αποτελέσματα 1ου πειράματος.....	143
7.8 Αποτελέσματα 2ου πειράματος.....	176
7.8.1 Δοκιμαστικό πείραμα	176
7.8.2 Τελικό πείραμα	181
7.8.2.1 Ανάλυση μυών ανά ομάδα κατά μόνες.....	183
7.8.2.2 Ανάλυση μέσου όρου κάθε ομάδας	197
7.8.2.3 Σύγκριση εξαρτημένων Ομάδων.....	220
7.8.2.4 Σύγκριση μη εξαρτημένων Ομάδων.....	225
7.8.2.5 Σύγκριση Ομάδων με στατιστική διαφορά	230
7.8.2.6 Σύγκριση Ομάδων με μη στατιστική διαφορά	234
7.9 Συμπεράσματα.....	237
7.9.1 1ο πείραμα: “Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών”	237

7.9.2 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»	242
7.9.2.1 Δοκιμαστικό πείραμα	242
7.9.2.2 Τελικό πείραμα	243
7.10 Συζήτηση.....	252
7.10.1 1ο πείραμα: “Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών”	252
7.10.2 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»	257
7.10.2.1 Δοκιμαστικό πείραμα	257
7.10.2.2 Τελικό πείραμα	260
7.11 Μελλοντικές προσεγγίσεις.....	267
Βιβλιογραφία	270

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1 Παραγωγή ινσουλίνης μετά από γεύμα	22
Εικόνα 2 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 1 (Πηγή: www.khanacademy.org)	24
Εικόνα 3 Τα κυριότερα συμπτώματα του διαβήτη (Πηγή: Wikipedia)	24
Εικόνα 4 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 2 (Πηγή: www.khanacademy.org)	25
Εικόνα 5 Επιδημιολογικός χάρτης διαβήτη (Πηγή: IDF diabetes atlas,2017)	27
Εικόνα 6 Συνήθειες Επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη (Πηγή: Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018).....	29
Εικόνα 7 Θεραπευτικός στόχος Αντιδιαβητικών φαρμάκων (Πηγή: Katzung & Trevor's Pharmacology)	34
Εικόνα 8 Τύποι ινσουλίνης (Πηγή: Diabetes Education Online)	34
Εικόνα 9 Κατευθυντήριες οδηγίες αντιδιαβητικής αγωγής (Πηγή: ΕΔΕ) 2013)	36
Εικόνα 10 Τομή ανθρώπινου δέρματος (Πυριόχου, 2012)	37
Εικόνα 11 Στιβάδες Επιδερμίδας (Baumann, 2009)	39
Εικόνα 12 Δομή κεράτινης στοιβάδας (Πηγή: Society of Cosmetic Scientists).....	41
Εικόνα 13 Δομή "brick & mortar" (Ochalek, 2012).....	43
Εικόνα 14 Επίπεδα φαρμάκου στο αίμα σε διαδερμική και per os χορήγηση (Φράγκου, 2007)	50
Εικόνα 22 Οδοί διέλευσης προς το δέρμα (Shahzad et al., 2015).....	51
Εικόνα 15 Συστήματα διαδερμικής χορήγησης (Schulmeister, 2005).....	56
Εικόνα 16 Στάδια φαρμακοκινητικής κατά τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκου (Lane, 2013a)	58
Εικόνα 17 Περιγραφή ροής κατά μήκος του δέρματος από ένα διαδερμικό έμπλαστρο (Alkilani et al., 2015).....	60
Εικόνα 18 Διάγραμμα της ποσότητας μιας δραστικής ουσίας που απορροφάται από το δέρμα σε συνάρτηση με τον χρόνο (Φράγκου, 2007)	61
Εικόνα 19 Αθροιστική ποσότητα φαρμάκου που διέρχεται από το δέρμα να μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)(Karagianni, 2014)	62
Εικόνα 20 Διάταξη Franz cells (Ντυμένου, 2012)	63
Εικόνα 21 Σύγκριση πάχους δέρματος σε διάφορα είδη οργανισμών (Ντυμένου, 2012)	64
Εικόνα 23 Μέθοδοι για την ενίσχυση διαδερμικής διαπερατότητας (Daniels, 2004; Han and Das, 2015).....	65

Εικόνα 24 Παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων προϊόντων για διαδερμική χορήγηση φαρμάκου με τη βοήθεια φυσικών ενισχυτών και ο τρόπος δράσης τους (Szunerits and Boukherroub, 2018).....	66
Εικόνα 25 Συνδυασμός φυσικών μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης (Barry, 2001; Mitragotri, 2000)	67
Εικόνα 26 Χημικές δομές τυπικών χημικών ενισχυτών της διαπερατότητας (Φράγκου, 2007).....	68
Εικόνα 27 Πιθανές δράσεις ενισχυτών διαπέρασης (Dragicevic et al., 2015).....	69
Εικόνα 28 Εναλλασσόμενες κυματομορφές (Πηγή; Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, HMMY).....	75
Εικόνα 29 Ημιτονοειδής εναλλασσόμενη τάση (Πηγή; Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, HMMY).....	76
Εικόνα 30 Τετραγωνική κυματομορφή (Πηγή; Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, HMMY).....	76
Εικόνα 31 Κύκλος λειτουργίας (Duty cycle).....	77
Εικόνα 32 Σχηματική αναπαράσταση ιοντοφορητικού συστήματος (Dhote, 2012)...	78
Εικόνα 33 Συσκευή Ιοντοφόρησης (Daniels, 2004).....	78
Εικόνα 34 Lipid flip-flop (Menon and Herrmann, 2013)	80
Εικόνα 35 Τροποποιημένη εξίσωση Nernst-Planck	82
Εικόνα 36 Είδη κυματομορφών (Πηγή:www.accessphysiotherapy.com)	83
Εικόνα 37 Τύποι ηλεκτρικού ρεύματος.....	84
Εικόνα 38 Βέλτιστα επίπεδα παραμέτρων που επηρεάζουν το ιοντοφορητικό σύστημα (Dhote, 2012).	88
Εικόνα 39 Παράμετροι που επηρεάζουν το ιοντοφορητικό σύστημα (Sieg and Wascotte, 2009).	89
Εικόνα 40 Ηλεκτρόδιο-δέρμα και τα αντίστοιχα ηλεκτρικά μοντέλα του.....	90
Εικόνα 41 Διάφοροι τύποι Ιοντοφόρησης (Dhote, 2012)	91
Εικόνα 42 Παραδείγματα εμπορικών διαθέσιμων συστημάτων ηλεκτροδίων ιοντοφόρησης (Πηγή:www.electrotherapy.org).....	95
Εικόνα 43 Συσκευή Ιοντοφόρησης για χορήγηση κορτικοστεροειδών στο μάτι (Πηγή: eyegatepharma.com)	95
Εικόνα 44 Συσκευή Ιοντοφόρησης για θεραπεία ασθενών με υπερίδρωση παλαμών (Πηγή: www.medical.gr)	95
Εικόνα 45 Τροφή μυών εργαστηρίου	112

Εικόνα 46 High Fat Diet – παρασκευή στο εργαστήριο	113
Εικόνα 47 Μέτρηση γλυκόζης αίματος με νύξη ουράς στο μυ	114
Εικόνα 48 Μέτρηση ινσουλίνης πλάσματος με μέθοδο ELISA	114
Εικόνα 49 TEWAMETER TM 210	119
Εικόνα 50 CORNEOMETER CM 820.....	120
Εικόνα 51 MEXAMETER MX 18	120
Εικόνα 52 Ιονισμός ρεπαγλινίδης (Mandić and Gabelica, 2006)	122
Εικόνα 53 Μηχανισμός δράσης ρεπαγλινίδης (Moses, 2009)	124
Εικόνα 54 Νεογνικά ηλεκτρόδια Ag/AgCl, ECG Electrodes, size 30 mm, TOP TRACE	127
Εικόνα 55 Παλμογράφος, OSCILLOSCOPE V-212 20 MHz, HITACHI.....	127
Εικόνα 56 Πιπέττα μηχανική ακριβείας GLASSCO μεταβλητού όγκου 20-200μL & Ρύγχη Αυτόματων Πιπετών 0-200μL, Κίτρινα	127
Εικόνα 57 Γεννήτρια ρεύματος, TG210 2MHz FUNCTION GENERATOR, THURLBY THANDAR.....	127
Εικόνα 58 Θήκη φύλαξης μυός από plexiglass (ποντικοπαγίδα).....	127
Εικόνα 59 Μετρητής σακχάρου, GlucoMen® areo sensor & Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, GlucoMen areo® , A. Menarini Diagnostics	127
Εικόνα 60 Απορροφητικός σπόγγος 0,8 cm ² , πάχος: 3mm	127
Εικόνα 61 Διαστάσεις rad	128
Εικόνα 62 Εφαρμογή του rad στο μυ.....	128
Εικόνα 63 Ηλεκτροαγώγιμο ύφασμα, απορροφητικός σπόγγος, κομμένο νεογνικό ηλεκτρόδιο.....	128
Εικόνα 64 Ταινία μέτρησης γλυκόζης GlucoMen areo® (Πηγή: www.menarinidiabetes.gr).....	132
Εικόνα 65 Ευαισθησία μετρητή γλυκόζης (Χαλβατσιώτης, 2015).....	133
Εικόνα 66 Διάγνωση διαταραχών μεταβολισμού της γλυκόζης (American Diabetes Association, 2014).....	238
Εικόνα 67 Κύκλος Cori (Kandi et al., 2014a).....	258
Εικόνα 68 Τυπικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου από του στόματος και διαδερμική χορήγηση (Pegoraro et al., 2012)	265
Εικόνα 69 Τυπικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου από του στόματος και διαδερμική χορήγηση (Pegoraro et al., 2012)	265

Πίνακας Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1 Τιμές γλυκόζης HFD ανά είδος μυών	145
Διάγραμμα 2 Τιμές γλυκόζης NAD ανά είδος μυών	146
Διάγραμμα 3 Τιμές γλυκόζης HFD ανά ημέρα	148
Διάγραμμα 4 Τιμές γλυκόζης NAD ανά ημέρα.....	149
Διάγραμμα 5 Μέσος όρος γλυκόζης νηστείας ανά ημέρα-HFD vs NAD [ημέρα 0: $p<0,05$ *, ημέρα 21: $p<0,05$ *, ημέρα 35: $p<0,0001$ ****]	150
Διάγραμμα 6 HFD vs NAD ανά group. Στατιστική διαφορά HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ ($p<0,05$ *) και HFD-ΜΑΥΡΑ vs NAD-ΜΑΥΡΑ ($p<0,05$ *)	152
Διάγραμμα 7 HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ [ημέρα 35: $p<0,05$ *]	153
Διάγραμμα 8 HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ [ημέρα 0, 14: $p<0,05$ *, ημέρα 21: $p<0,01$ **, ημέρα 35: $p<0,0001$ ****]	154
Διάγραμμα 9 HFD-ΜΑΥΡΑ vs NAD-ΜΑΥΡΑ [ημέρα 14: $p<0,05$ *, ημέρα 21, 35: $p<0,01$ **]	155
Διάγραμμα 10 HFD-ΑΡΟΕ vs NAD-ΑΡΟΕ [ημέρα 7: $p<0,05$ *]	156
Διάγραμμα 11 M.O. ινσουλίνης HFD	157
Διάγραμμα 12 M.O. ινσουλίνης NAD	158
Διάγραμμα 13 M.O. ινσουλίνης HFD vs NAD	158
Διάγραμμα 14 M.O. ινσουλίνης ανά είδος μυών.....	159
Διάγραμμα 15 21η ημέρα: Γλυκόζη vs Ινσουλίνη πλάσματος ανά είδος μυών	159
Διάγραμμα 16 Κατανάλωση τροφής-HFD	161
Διάγραμμα 17 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-HFD [pre: $p<0,0001$ **** από 1η, 2η και 3η εβδομάδα].....	161
Διάγραμμα 18 Κατανάλωση τροφής-NAD	162
Διάγραμμα 19 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-NAD [1η: $p<0,05$ * από την 2η, $p<0,01$ ** από την 3η].....	163
Διάγραμμα 20 Κατανάλωση νερού-HFD	163
Διάγραμμα 21 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-HFD [2η: $p<0,01$ ** από την pre, 3η: $p<0,05$ * από την pre].....	164
Διάγραμμα 22 Κατανάλωση νερού-NAD	165
Διάγραμμα 23 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-NAD [1η: $p<0,01$ ** από την 3η, 2η: $p<0,05$ * από την 3η]	165
Διάγραμμα 24 HFD-Βάρος	166

Διάγραμμα 25 Μέσος όρος Βάρους-HFD	167
Διάγραμμα 26 NAD-Βάρος	167
Διάγραμμα 27 Μέσος όρος Βάρους-NAD [pre->21: p<0,001 ***]	168
Διάγραμμα 28 Μέσος όρος Βάρους- HFD vs NAD [0, 14, 21, 35: p<0,0001 ****, 7: p<0,001 ***].....	169
Διάγραμμα 29 HFD-TEWL	170
Διάγραμμα 30 NAD-TEWL	170
Διάγραμμα 31 Μέσος όρος TEWL HFD vs NAD	171
Διάγραμμα 32 HFD-Ενυδάτωση.....	172
Διάγραμμα 33 NAD-Ενυδάτωση.....	172
Διάγραμμα 34 Μέσος όρος Ενυδάτωσης-HFD vs NAD [HFD pre-end: p<0,05 *, NAD pre-end: p<0,01 **].....	173
Διάγραμμα 35 HFD-Ερύθημα.....	174
Διάγραμμα 36 NAD-Ερύθημα.....	174
Διάγραμμα 37 Μέσος όρος Ερυθήματος-HFD vs NAD [HFD pre-end: p<0,05 *, NAD pre-end: p<0,01 **].....	175
Διάγραμμα 38 Ποσοστιαία μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή-Δοκιμαστικό πείραμα	177
Διάγραμμα 39 ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min.....	178
Διάγραμμα 40 ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min.....	179
Διάγραμμα 41 ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 10 min	180
Διάγραμμα 42 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min.....	181
Διάγραμμα 43 Ομάδα Α-Φάρμακο	183
Διάγραμμα 44 Ομάδα Α2 - Διαλύτης	185
Διάγραμμα 45 Ομάδα Β1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed +φάρμακο).....	187
Διάγραμμα 46 Ομάδα Β2 (ρεύμα AC + φάρμακο)	189
Διάγραμμα 47 Ομάδα Β3 (ρεύμα DC + DC ON/OFF pulsed + φάρμακο).....	191
Διάγραμμα 48 Ομάδα C1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed + διαλύτης)	192
Διάγραμμα 49 Ομάδα C2 (ρεύμα AC + διαλύτης).....	194
Διάγραμμα 50 Ομάδα D-Per os.....	196

Διάγραμμα 51 Μέσος όρος Ομάδα A1-Φάρμακο [t: 0->180, p<0,01 **, t:0->40, p<0,05 *].....	199
Διάγραμμα 52 Μέσος όρος Ομάδα A2-Διαλύτης	202
Διάγραμμα 53 Μέσος όρος Ομάδα B1-Ρεύμα DC ON/OFF pulsed + Φάρμακο [t: 0->30, p<0,01 **, t:0->180, p<0,05 *]	204
Διάγραμμα 54 Μέσος όρος Ομάδα B2- Ρεύμα AC + Φάρμακο [t: 0->30, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,05 *, t:0->35, p<0,01 **].....	207
Διάγραμμα 55 Μέσος όρος Ομάδα B3-Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Φάρμακο [t: 15->75, p<0,05 *].....	210
Διάγραμμα 56 Μέσος όρος Ομάδα C1-Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Διαλύτης [t: 0->180, p<0,01 **]	212
Διάγραμμα 57 Μέσος όρος Ομάδα C2-Ρεύμα AC + Διαλύτης [t: 0->120, 180, p<0,01 **, t: 0->12, 75, 90, p<0,05 *].....	215
Διάγραμμα 58 Μέσος όρος Ομάδα D-Per os [t:0->30, 35, 40, 45, 50, p<0,05 *, t:0->55, 60, 75, p<0,01 **, t:0->90, 120, 180, p<0,001 ***]	218
Διάγραμμα 59 Φάρμακο vs Διαλύτης	221
Διάγραμμα 60 Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο	222
Διάγραμμα 61 Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο [t:0->35, p<0,001 ***, t:0->30, 40, 45, 50, 60, p<0,01 **, t:0->75, p<0,05 *]	223
Διάγραμμα 62 Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο [t:0->35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,01 **, t:0->75, p<0,05 *].....	223
Διάγραμμα 63 Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης vs Ρεύμα AC + Διαλύτης [t:0->120, p<0,05 *].....	225
Διάγραμμα 64 Μέσος όρος και Τυπική απόκλιση % μεταβολής γλυκόζης Ομάδων πειράματος.....	229
Διάγραμμα 65 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ VS PER OS [t:0->40, p<0,0001 ****, t:0->30, 45, 50, 55, 60, 75, p<0,001 ***, t:0->35, 90 p<0,01 **]	230
Διάγραμμα 66 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ VS ΡΕΥΜΑ DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ [t:0->40 min, p<0,01 **, t:0->45, 50, 55, 75 min, p<0,05 *]	230
Διάγραμμα 67 Σύγκριση ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ VS ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ [t:0->30, p<0,01 **, t:0->35, p<0,05 *]	231

Διάγραμμα 68 Σύγκριση PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PER OS [t:0->30, p<0,0001 ****, t:0->35, 40, 45, 50, 60, p<0,001 ***, t:0->55, 75, 90, p<0,01 **, t:0->120, p<0,05 *].....	232
Διάγραμμα 69 Σύγκριση PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ [t:0->35, 40, 60, p<0,01 **, t:0->45, 50, 55, p<0,05 *].....	232
Διάγραμμα 70 Σύγκριση PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PER OS [t:0->35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,0001 ****, t:0->30, 75, 90, p<0,001 ***, t:0->25, 120, p<0,01 **]	233
Διάγραμμα 71 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs PER OS [t:0->30, 40, 45, 60, p<0,01 **, t:0->20, 25, 35, 50, 55, 75, p<0,05 *].....	233
Διάγραμμα 72 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ vs PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ. Μη στατιστική διαφορά.....	234
Διάγραμμα 73 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ vs PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ. Μη στατιστική διαφορά.....	235
Διάγραμμα 74 Σύγκριση PEYMA DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PER OS. Μη στατιστική διαφορά.....	235
Διάγραμμα 75 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ. Μη στατιστική διαφορά.....	236
Διάγραμμα 76 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ. Μη στατιστική διαφορά.....	236

Κατάλογος Συντομογραφιών

AC	Alternating current
APOE	Skh-2-apoe
BBD	Box-behnken design
BG	Γλυκόζη αίματος
BMI	Δείκτης μάζας σώματος
Css	Steady state concentracion
DC	Direct current
DC + DC ON/OFF-Pulsed	Συνεχές + παλμικό ρεύμα
DC ON/OFF-Pulsed	Παλμικό ρεύμα on/off
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
DPP-4 inhibitors	Αναστολείς της διπεπτιδυλικής πεπτιδάσης 4 ή γλιπτίνες
HbA1c	Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
HFD	Δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά

Hz	Hertz
IDDM	Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης
IDF	Διεθνής Ομοσπονδία για τον Διαβήτη
IFG	Διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας
IGT	Διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη
IP	Διαδερμική ιοντοφόρηση
i.p.	Ενδοπεριτοναϊκή ένεση
lag time	Χρόνος υστέρησης
logP	Partition coefficient
LPP	Lipid-protein-partitioning
LSD	Least significant difference
MLD	Πολλαπλή χορήγηση χαμηλής δόσης
NAD	Νικοτιναμίδιο
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NMF	Φυσικός ενυδατικός παράγοντας
PC	Pulsed current
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
PG	Προπυλενογλυκόλη
SC	Κεράτινη στοιβάδα
SGLT-2 inhibitors	Αναστολείς συμμεταφορέα γλυκόζης-νατρίου 2
STZ	Στρεπτοζοτοκίνη
T1DM	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (σδτ1)
t _{1/2}	Χρόνος ημιζωής
T2D	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (σδτ2)
TDDS	Transdermal drug delivery systems
TEWL	Transepidermal water loss
TZD	Θειαζολιδινεδιόνες
ΑΣΠΡΑ	Skh-1
ΔΚΟ	Διαβητική κετοξέωση
ΚΑΦΕ	SKH-2 καφέ
M1	1ο μοντέλο: NAD ⁺ STZ
M2	2ο μοντέλο: HFD+STZ
ΜΑΥΡΑ	Skh-2
ΣΔ	Σακχαρώδης διαβήτης
ΥΥΚ	Υπεροσμωτική υπεργλυκαιμική κατάσταση

Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης αποτελεί νόσο με παγκόσμια κατανομή και σοβαρές επιπλοκές για τους ασθενείς που πάσχουν. Η πρόληψη και η εντατική παρακολούθηση αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την αντιμετώπισή του. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 είναι ο συχνότερος τύπος διαβήτη και σχετίζεται στενά με τη διατροφή και την παχυσαρκία. Διάφορα είδη πειραματοζώων έχουν πρόσφατα αναπτυχθεί ως μοντέλα ζώων για διαβήτη. Αν και αυτά τα μοντέλα εκφράζουν αρκετά σημαντικά μοριακά παθολογικά χαρακτηριστικά του σακχαρώδη διαβήτη, αδυνατούν να εκφράσουν ακριβώς μερικά από τα χαρακτηριστικά του.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκτελείται με δύο βασικά πειράματα:

Κατά το πρώτο, διερευνούμε και αξιολογούμε, σε άτριχους μύες, ποια από τις δύο ευρύτερα εφαρμοζόμενες πειραματικές μεθόδους πρόκλησης διαβήτη τύπου 2 μιμείται καλύτερα την ανθρώπινη κατάσταση με στόχο τη διαδερμική χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων και σε ποιο πρότυπο άτριχων μυών.

Στην 1η μέθοδο, χορηγείται Νικοτιναμίδιο (120 mg/kg) και Στρεπτοζοτοκίνη (100 mg/kg) ενδοπεριτοναϊκώς 2 φορές (με μια ενδιάμεση ημέρα κενή). Στη 2η μέθοδο χορηγείται Στρεπτοζοτοκίνη (75 mg/kg) και οι μύες εκτρέφονται με δίαιτα πλούσια σε λιπαρά και σακχαρόζη (High Fat Diet) για 6 εβδομάδες. Οι μύες που χρησιμοποιούνται και στις 2 μεθόδους είναι SKH-1, SKH-2 (καφέ), SKH-2 και SKH-2 + APOE. Αξιολογείται η γλυκόζη, η ινσουλίνη πλάσματος, το σωματικό βάρος, η κατανάλωση τροφής και νερού και λαμβάνονται βιοφυσικές μετρήσεις, όπως η διαδερμική άδηλη απώλεια ύδατος (TEWL), η ενυδάτωση και η ερυθρότητα δέρματος.

Οι δύο εφαρμοζόμενες μέθοδοι προκαλούν διαφορετική κλινική εικόνα διαβήτη τύπου 2. Η 1η μέθοδος προσομοιάζει το μη παχύσαρκο τύπο διαβήτη με μερική έλλειψη ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, ενώ η 2η μέθοδος μιμείται τον παχύσαρκο τύπο διαβήτη τύπου 2 που συνδέεται με το μεταβολικό σύνδρομο. Οι μύες SKH-2 (καφέ) και στις 2 μεθόδους αναπτύσσουν πιο γρήγορα διαβήτη τύπου 2.

Το δεύτερο πείραμα πραγματοποιείται με σκοπό την εύρεση του βέλτιστου τρόπου χορήγησης αντιδιαβητικών φαρμάκων από το δέρμα. Στα πλαίσια αυτά ερευνάται η βοήθεια της ιοντοφόρησης στην ενίσχυση της διείσδυσης αντιδιαβητικού φαρμάκου.

Το φάρμακο ρεπαγλινίδη διαθέτει τις κατάλληλες ιδιότητες για χρήση από το δέρμα και χορηγείται για 3 ώρες με εφαρμογή παλμικού, εναλλασσόμενου και συνεχούς παλμικού ρεύματος, ισχύος 0,25 mA στο δέρμα της ράχης φυσιολογικών άτριχων μυών, SKH-2 καφέ τύπου, για 10 λεπτά εφάπαξ. Αξιολογείται η φαρμακοδυναμική της ρεπαγλινίδης μετρώντας τη γλυκόζη των μυών ανά πολύ τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι τις 3 ώρες.

Το συνεχές παλμικό ρεύμα βοηθά θετικά τη ρεπαγλινίδη να διαπεράσει τον επιδερμικό φραγμό εντός μιας ώρας και να φτάσει στα αιμοφόρα αγγεία για να εκδηλώσει τη δράση της. Οι υπόλοιποι τύποι ρεύματος δε βοηθούν στη δράση του φαρμάκου, αλλά αντιθέτως παίζουν αρνητικό ρόλο στην απορρόφησή του.

Το επόμενο βήμα είναι η διαδερμική μελέτη του φαρμάκου σε διαβητικούς μύες στους οποίους ο φραγμός του δέρματος είναι περισσότερο διαπερατός.

Λέξεις-κλειδιά:

στρεπτοζοτοκίνη ■ ανεπάρκεια ινσουλίνης ■ αντίσταση ινσουλίνης ■ άτριχοι μύες ■ νικοτιναμίδιο ■ διατροφή πλούσια σε λιπαρά ■ διαβήτη τύπου 2 ■ παχύσαρκος τύπος ■ μη-παχύσαρκος τύπος ■ διαδερμική χορήγηση ■ ρεπαγλινίδη ■ γλυκόζη ■ άτριχοι μύες ■ ρεύμα ■ επιδερμικός φραγμός ■ διαβήτη τύπου 2 ■ αντιδιαβητική δράση ■ ιοντοφόρηση

Abstract

Diabetes mellitus is a disease with serious complications for health and million patients worldwide. Prevention and intensive monitoring are useful tools to deal with. Type 2 Diabetes Mellitus is the most common type of diabetes and is closely related to diet and obesity. Various species of experimental animals have recently been developed as animal models for diabetes. Although these models express several important molecular pathological features of diabetes mellitus, they are unable to accurately express some of its features.

This diploma thesis is carried out with two basic experiments:

In the first, we investigate and evaluate in hairless mice, which of the two most applied experimental methods of inducing type 2 diabetes mimics better the human condition with the aim of transdermal administration of antidiabetic drugs and in which model of hairless mice.

In the first method, Nicotinamide (120 mg / kg) and Streptozotocin (100 mg / kg) are administered intraperitoneally 2 times (with an interval of 2 days). Streptozotocin (75 mg / kg) is given in method 2 and the mice are fed a high fat diet for 6 weeks. The mice used in both methods are SKH-1, SKH-2 (brown), SKH-2 and SKH-2 + APOE. Glucose, plasma insulin, body weight, food and water consumption are assessed, and biophysical measurements, such as translucent loss of water (TEWL), skin hydration and redness, are also evaluated.

The two methods applied cause different symptoms of type 2 diabetes. The first method mimics the non-obese type of diabetes with partial insulin deficiency by the β -cells of the pancreas, while the second method mimics the obese type 2 diabetes associated with the metabolic syndrome. SKH-2 (brown) mice in both methods develop type 2 diabetes more rapidly.

The second experiment is performed in order to find the optimal way of delivering antidiabetic drugs from the skin. In this context, it is investigated the enhancement of penetration of an antidiabetic drug with the aid of iontophoresis.

The repaglinide drug has the appropriate properties for transdermal penetration and is administered for 3 hours by applying a pulsed, alternating and continuous pulsed current of 0.25 mA to the back of normal hairless SKH-2 brown type mice for 10

minutes. It is evaluated the pharmacodynamic profile of repaglinide by measuring the glucose of mice at regular basis up to 3 hours.

The continuous pulsed current helps positively repaglinide penetrate the epidermal barrier within an hour and reach the blood vessels to manifest its action. The other types of current cannot help but augment the negative effect of transdermal absorption of this drug.

The next step is the study of transdermal drug in diabetic mice in which the skin barrier is more permeable.

Keywords:

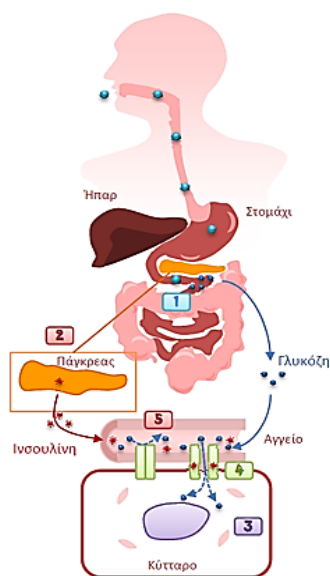
streptozotocin ■ insulin deficiency ■ insulin resistance ■ hairless mice ■ nicotinamide ■ high fat diet ■ type 2 diabetes mellitus ■ obese type ■ non-obese type ■ transdermal delivery ■ repaglinide ■ glucose ■ hairless mice ■ current ■ skin barrier ■ type 2 diabetes mellitus ■ antidiabetic action ■ iontophoresis

Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1:

Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης, είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η χρόνια μεταβολική ανισορροπία που σχετίζεται με αυτή τη νόσο θέτει τους ασθενείς σε υψηλό κίνδυνο για μακροπρόθεσμες αγγειακές επιπλοκές, όπως καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βλάβες του αμφιβληστροειδούς, βλάβες των νεύρων, στυτική δυσλειτουργία κ.ά. (Masharani and German, 2017). Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης. Υπάρχουν και άλλοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη που είναι λιγότερο συχνοί και οφείλονται σε γενετικές διαταραχές των β κυττάρων (διαβήτης τύπου MODY), νοσήματα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, φάρμακα, κλπ. Ο διαβήτης τύπου 2 ευθύνεται για το 90% περίπου των περιπτώσεων διαβήτη. Το υπόλοιπο 10% οφείλεται κυρίως στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και το διαβήτη κύησης.



Εικόνα 1 Παραγωγή ινσουλίνης μετά από γεύμα

(Πηγή: Ελληνικό Ινστιτούτο Καρδιαγγειακών Νοσημάτων)

1.1 Πως εμφανίζεται ο Σακχαρώδης Διαβήτης;

Για να καταλάβουμε καλύτερα πως ακριβώς εμφανίζεται ο Σακχαρώδης Διαβήτης, ας δούμε τι γίνεται στον οργανισμό αμέσως μετά τη λήψη τροφής:

1. Μεγάλο μέρος από το φαγητό που καταναλώνεται διασπάται στο στομάχι και το έντερο σε γλυκόζη η οποία στη συνέχεια απορροφάται και κυκλοφορεί στο αίμα.
2. Όταν αυξηθεί η γλυκόζη στο αίμα, το πάγκρεας απελευθερώνει μια ορμόνη η οποία ονομάζεται ινσουλίνη.
3. Η γλυκόζη αποτελεί το βασικότερο καύσιμο των κυττάρων μας. Όμως για να χρησιμοποιηθεί πρέπει προηγουμένως να περάσει από το αίμα μέσα στα κύτταρα του οργανισμού.

4. Η ινσουλίνη είναι άκρως απαραίτητη προκειμένου να ανοίξουν δίοδοι στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορέσει να μπει η γλυκόζη μέσα σε αυτά.
5. Αν ο οργανισμός δεν μπορεί να απελευθερώσει τη σωστή ποσότητα ινσουλίνης, ή αν η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να ανοίξει επαρκώς όλες τις διόδους των κυττάρων, τότε η γλυκόζη δεν μπορεί να περάσει όλη μέσα στα κύτταρα και συσσωρεύεται στο αίμα. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται Σακχαρώδης Διαβήτης.

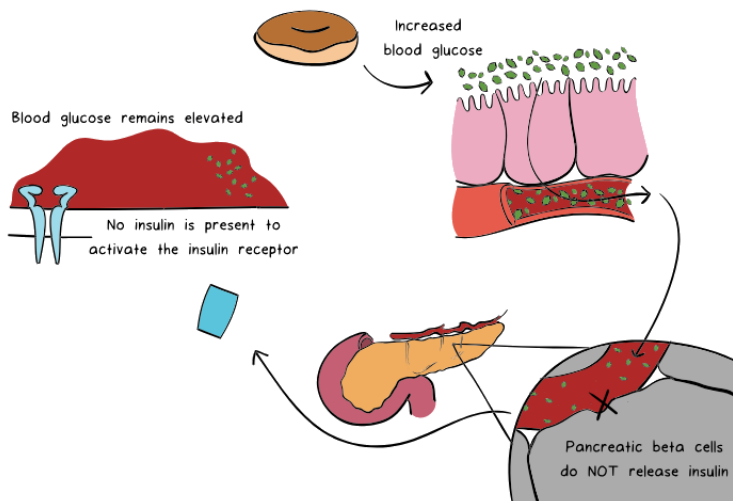
1.2 Η Ιστορία του Διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης αναγνωρίστηκε ως ασθένεια χιλιάδες χρόνια πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική προσπάθεια. Κλινικά συμπτώματα, τα οποία έμοιαζαν με αυτά του Σακχαρώδους Διαβήτη είχαν περιγραφεί από τους Αρχαίους Αιγυπτίους το 1500 π.Χ., ενώ ο όρος “Διαβήτης” χρησιμοποιήθηκε από τον Αρεταίο της Καππαδοκίας (200 μ.Χ.), ο οποίος κατέγραψε αναλυτικά τη νόσο και τα συμπτώματά της. Ο όρος “Σακχαρώδης” αποδόθηκε από τον Βρετανό Thomas Willis το 1675, ο οποίος παρατήρησε ότι τα ούρα και το αίμα των ασθενών είχαν γλυκιά γεύση, ενώ το 1776 ο Dobson απέδειξε τα ανεβασμένα επίπεδα γλυκόζης στα ούρα και στο αίμα. Το 1857 ο Claude Bernard (Γαλλία) καθόρισε το ρόλο του ήπατος στη γλυκογένεση και την θεωρία ότι ο Διαβήτης οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή γλυκόζης. Ο ρόλος του παγκρέατος στην παθογένεση του Διαβήτη προσδιορίστηκε από τους Mering and Minkowski (Αυστρία) το 1889. Τα πρώτα 20 χρόνια του 20ου αιώνα οι επιστήμονες ερευνούσαν την υπόθεση της εσωτερικής έκκρισης του παγκρέατος, η απουσία της οποίας μπορούσε να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές στους πάσχοντες, οι οποίες αποκαλέστηκαν “Διαβήτης”. Η μόνη διαθέσιμη “θεραπεία” για το Διαβήτη τότε ήταν η καθυστέρηση της εξέλιξής του μέσω της ασιτίας, η οποία οδηγούσε στο θάνατο των πασχόντων. Συνεπώς, ο Διαβήτης ήταν μια θανατηφόρα ασθένεια. Το Φθινόπωρο του 1920 ένας νεαρός Καναδός ιατρός, ο Fredrick Banting είχε μια πρωτοποριακή ιδέα, να προσπαθήσει να αποδείξει την υπόθεση της εσωτερικής έκκρισης του παγκρέατος και το 1921 ξεκίνησε τα πειράματά του. Έκτοτε ξεκίνησε η προσπάθεια βελτίωσης των θεραπειών της νόσου που ονομάστηκε «Διαβήτης» (American Diabetes Association, 2014).

1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης)

Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την ολική έλλειψη ή ελάχιστη

έκκριση ινσουλίνης (Cooke and Plotnick, 2008). Η ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη είναι συνήθως φυσιολογική, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά, μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Η καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι στην πλειονότητα των περιπτώσεων αυτοάνοσης αιτιολογίας. Στο μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με διαβήτη τύπου 1 ανιχνεύονται στην κυκλοφορία ένα ή περισσότερα είδη αυτοαντισωμάτων. Οι



Εικόνα 2 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 1 (Πηγή: www.khanacademy.org)

ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν αυξημένη προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις. Παρ'όλα αυτά, σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών με διαβήτη τύπου 1 δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα. Ο τύπος αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Ο

διαβήτης τύπου 1 προσβάλλει συνήθως απότομα τον ασθενή και συχνά οδηγεί στην ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης εάν το έλλειμμα ινσουλίνης δεν καλύπτεται. Ο ασθενής είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για να διατηρηθούν τα επίπεδα σακχάρου του αίματος στο φυσιολογικό επίπεδο.

1.3.1 Κλινική εικόνα

Τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 περιλαμβάνουν: πολυδιψία (έντονη δίψα), πολυουρία (και ειδικότερα κατά τις βραδινές ώρες), πολυφαγία, η οποία όμως συνοδεύεται από απώλεια και όχι από αύξηση βάρους (εξαιτίας της ανικανότητας των κυττάρων να προσλάβουν γλυκόζη), κνησμός, συχνή εξάντληση χωρίς ιδιαίτερη σωματική δραστηριότητα, δυσκολία επούλωσης των πληγών και συχνές φλεγμονές και λοιμώξεις (Εικόνα 3). Πριν ένα άτομο συνειδητοποιήσει ότι έχει διαβήτη, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι

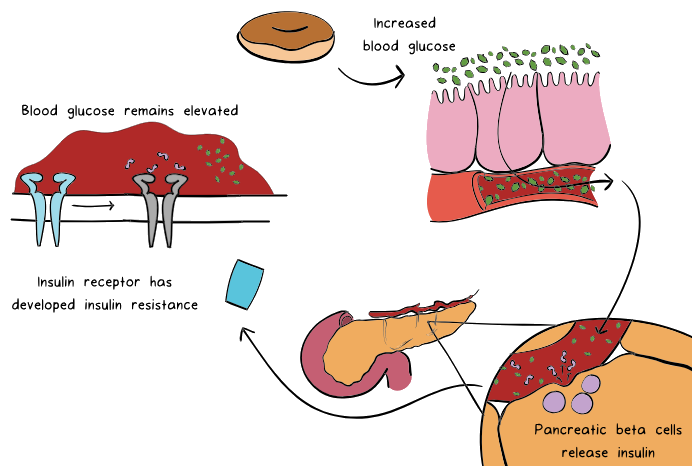


Εικόνα 3 Τα κυριότερα συμπτώματα του διαβήτη (Πηγή: Wikipedia)

πολύ υψηλά για μεγάλες χρονικές περιόδους, κατάσταση η οποία μπορεί να προκαλέσει διαβητική κετοξέωση. Αυτή μπορεί να εκδηλωθεί με συμπτώματα όπως ξηροδερμία, γρήγορη και βαθιά αναπνοή, υπνηλία, κοιλιακό άλγος και έμετος (Cooke and Plotnick, 2008).

1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)

Χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται ινσουλινοαντίσταση). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην



Εικόνα 4 Παθοφυσιολογία διαβήτη τύπου 2
(Πηγή: www.khanacademy.org)

ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα (Internal Clinical Guidelines Team, 2015). Ο διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικους. Σπουδαίος προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι η παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό. Στο διαβήτη τύπου 2, τα συμπτώματα είναι πιο ήπια και η πιθανότητα εμφάνισης διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή. Παρόλα αυτά, ο κίνδυνος απώτερων και σοβαρών επιπλοκών παραμένει υψηλός. Το πρώτο βήμα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής του ασθενούς, με στόχο την απώλεια βάρους, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υγιεινή διατροφή. Εάν κριθεί απαραίτητο, χρησιμοποιούνται αντιδιαβητικά φάρμακα. Στην περίπτωση που η θεραπεία αποτύχει, κρίνεται σκόπιμη η χορήγηση ινσουλίνης για τον έλεγχο και αυτών των ασθενών.

1.4.1 Κλινική εικόνα

Τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 είναι παρόμοια με αυτά του τύπου 1 (Εικόνα 3). Στον διαβήτη τύπου 2, η νόσος εισβάλλει βαθμιαία, η συμπτωματολογία λείπει τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής. Στα άτομα με διαβήτη τύπου 2 μπορεί σπανίως να εμφανιστεί υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα (μια κατάσταση κατά την οποία ο ασθενής παρουσιάζει πολύ υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα παράλληλα με μείωση του επιπέδου συνείδησης και χαμηλή αρτηριακή πίεση). Άλλα κοινά συμπτώματα που διαπιστώνονται κατά τη διάγνωση συμπεριλαμβάνουν, ιστορικό θολής όρασης, φαγούρας, περιφερικής νευροπάθειας, επαναλαμβανόμενα επεισόδια μολύνσεων του κόλπου και κόπωση (Vijan, 2010).

1.5 Διαβήτη της κύησης

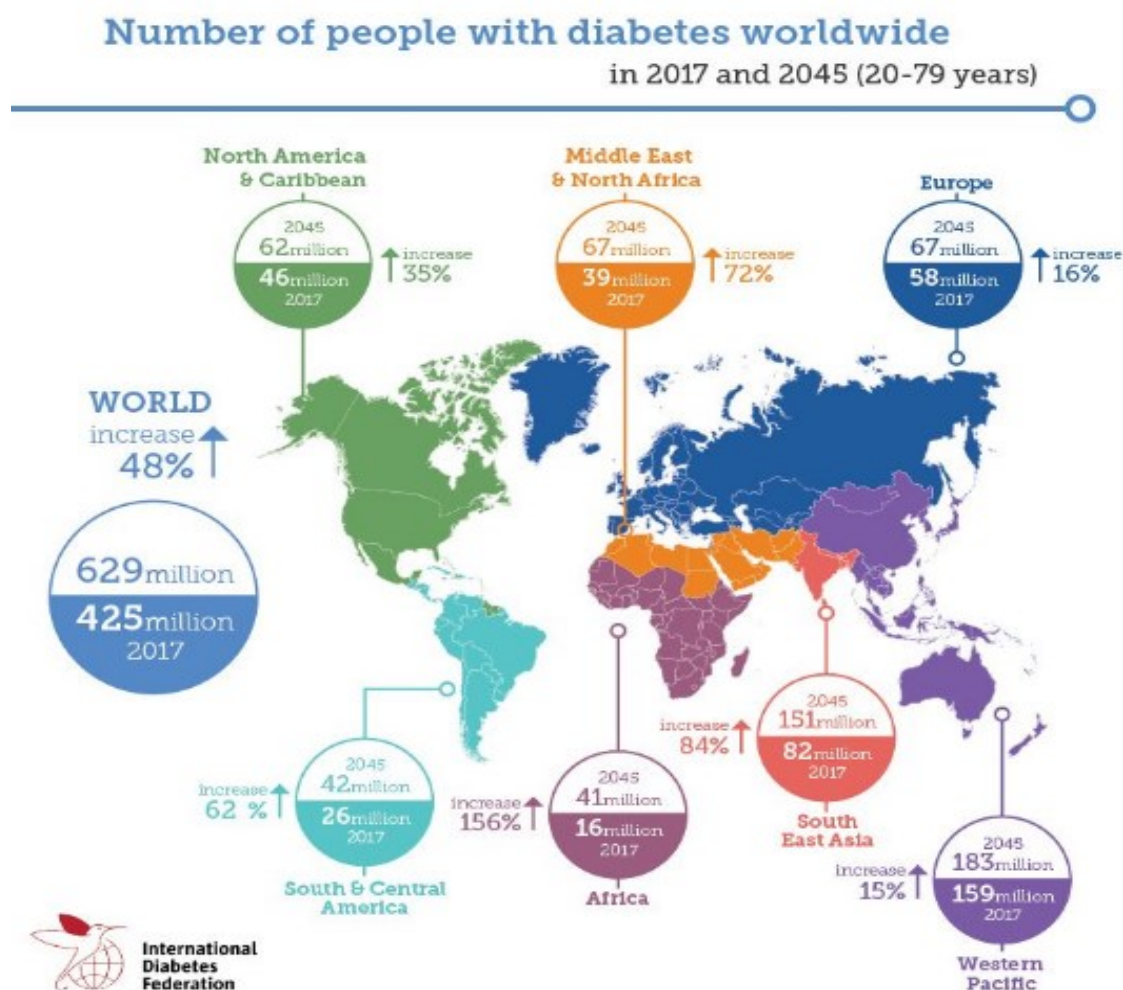
Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου 2 ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Παχύσαρκες γυναίκες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν διαβήτη της κύησης. Αυτός ο τύπος διαβήτη αφορά το 3-5% των κυήσεων. 30-40% των γυναικών με διαβήτη κύησης αναπτύσσουν διαβήτη τύπου 2 αργότερα στη ζωή τους. Ο διαβήτης της κύησης είναι αναστρέψιμος και υποχωρεί μετά τον τοκετό, μπορεί όμως να προκαλέσει περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού.

1.6 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία από τις πιο κοινές χρόνιες ασθένειες και αποτελεί σοβαρό πρόβλημα υγείας στο παγκόσμιο πληθυσμό. Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα διεθνή στατιστικά στοιχεία ο αριθμός των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως ανέρχεται σε 425 εκατομμύρια και περισσότεροι από 58 εκατομμύρια άνθρωποι στην Ευρώπη, ενώ αναμένεται να φτάσει τα 629 και 66,7 εκατομμύρια αντίστοιχα το 2045. Με απλά λόγια 1 στους 11 ενήλικες πάσχει σήμερα από διαβήτη, ενώ το 2045 αναμένεται να πάσχει από διαβήτη 1 στους 10. Σύμφωνα με διεθνή στοιχεία υπολογίζεται ότι περίπου 87%-91% του συνόλου των ατόμων με διαβήτη πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, 7%-12% από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 1%-3% από άλλους τύπους διαβήτη. Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι σύμφωνα με τους τελευταίους υπολογισμούς της Διεθνούς Ομοσπονδίας για τον

Διαβήτης (IDF), 1 στους 2 ενήλικες με διαβήτη παραμένει αδιάγνωστος. Το γεγονός αυτό είναι υψίστης σημασίας αν αναλογιστεί κανείς ότι ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας. Η νόσος υπολογίζεται ότι σήμερα αποτελεί τη 12η αιτία θανάτου παγκοσμίως και προβλέπεται ότι το 2030 θα είναι η 7η, ενώ οι διαβητικοί εμφανίζουν διπλάσια θνησιμότητα σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (IDF, diabetes atlas 2017). Υπολογίζεται ότι κατά το έτος 2015 απεβίωσαν 5 εκατομμύρια άτομα από διαβήτη, που αντιστοιχούν σε 1 θάνατο κάθε 6 δευτερόλεπτα.

Επιπλέον εκτιμάται ότι η πλειονότητα των χωρών δαπανούν μεταξύ 5% και 20% των συνολικών δαπανών για την υγεία των ατόμων με διαβήτη. Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι το 5.9% του γενικού πληθυσμού (578.300) πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη και οι θάνατοι που σχετίζονται με αυτόν ανέρχονται στους 4.963 (για το έτος 2015) (Μιτρού, 2017); (IDF diabetes, 2017). Ο διαβήτης είναι συχνότερος στον ανεπτυγμένο κόσμο



Εικόνα 5 Επιδημιολογικός χάρτης διαβήτη (Πηγή: IDF diabetes atlas, 2017)

(ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου 2) και φαίνεται ότι συνδέεται άμεσα με το λεγόμενο δυτικό τρόπο ζωής που περιλαμβάνει τη διαβίωση στα μεγάλα αστικά κέντρα, τον ανθυγιεινό τρόπο διατροφής και την καθιστική ζωή.

1.7 Ομάδες υψηλού κινδύνου για σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2

- Οι υπέρβαροι και οι παχύσαρκοι (BMI ή Δείκτης Μάζας Σώματος > 25 kg/m²)
- Όσοι κάνουν καθιστική ζωή
- Όσοι εμφανίζουν διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (προδιαβητικοί ασθενείς)
- Όσοι έχουν συγγενή πρώτου βαθμού με διαβήτη
- Οι γυναίκες που παρουσιάζουν διαβήτη κυήσεως ή γεννούν βρέφη με βάρος πάνω από 4 κιλά
- Οι γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
- Οι υπερτασικοί (Α.Π. > 140/90 mmHg)
- Όσοι έχουν χαμηλά επίπεδα καλής χοληστερόλης, HDL-C (< 35 mg/dl) και αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (> 250 mg/dl) καθώς και οι ασθενείς με ιστορικό αγγειακής νόσου (π.χ. στηθάγχη, έμφραγμα, στεφανιαία νόσο, εγκεφαλικό επεισόδιο)

1.8 Διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη

Τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη είναι τα ακόλουθα (Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018):

- Παρουσία κλασικών συμπτωμάτων του διαβήτη και τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή > 200mg/dl
- Τιμή σακχάρου νηστείας (που λαμβάνεται δηλαδή μετά από 8 τουλάχιστον ώρες αποχής από την πρόσληψη τροφής) > 126mg/dl
- Καμπύλη σακχάρου: Τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά από φόρτιση με 75g γλυκόζης από του στόματος > 200mg/dl. Η συγκεκριμένη εξέταση απαιτεί τριήμερη προετοιμασία, με διαιτολόγιο πλούσιο σε υδατάνθρακες και ο γιατρός μετρά τα επίπεδα του σακχάρου διαδοχικά ανά 30 λεπτά, τις επόμενες 2 ή 3 ώρες. Οι διαγνωσμένοι διαβητικοί δεν έχουν λόγο να κάνουν αυτή την εξέταση, η οποία όμως είναι πολύ χρήσιμη για άτομα με κληρονομικό ιστορικό.

Ένας άλλος χρήσιμος δείκτης είναι η τιμή της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Δεν χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη, αλλά για την παρακολούθηση της ρύθμισης του σακχάρου αίματος, αφού αντικατοπτρίζει τη

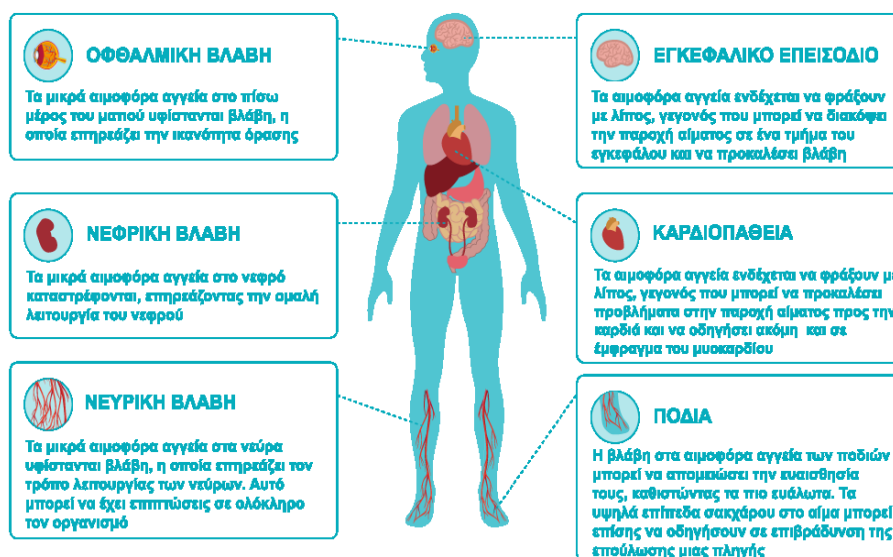
μέση τιμή σακχάρου αίματος τους τελευταίους 3 μήνες πριν την εξέταση. Τιμές HbA1c < 6% θεωρούνται ενδεικτικές καλού γλυκαιμικού ελέγχου.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ		
	Σάκχαρο νηστείας	Σάκχαρο 2 ώρες μετά λήψη 75 gr γλυκόζης
Φυσιολογικό	<100 mg/dl	<140 mg/dl
Σακχαρώδης διαβήτης	≥126 mg/dl	≥200 mg/dl
Διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (IFG) (προδιαβήτης)	100-125 mg/dl	
Διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT) (προδιαβήτης)		140-199 mg/dl
Πρόσφατο διαγνωστικό κριτήριο ΣΔ: Επίπεδα HbA1c >6,5%		

Πίνακας 1 Διαγνωστικά Κριτήρια ΣΔ (Πηγή :Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018)

1.9 Επιπλοκές του Σακχαρώδη Διαβήτη

Οι άνθρωποι που ζουν με το σακχαρώδη διαβήτη μπορεί να αντιμετωπίσουν διάφορες επιπλοκές. Διακρίνονται σε οξείες και μακροπρόθεσμες επιπλοκές. Οι οξείες επιπλοκές του διαβήτη είναι η διαβητική κετοξέωση (ΔΚΟ) που είναι συνηθέστερη στον ΣΔτ1 και η υπερωσμωτική υπεργλυκαιμική κατάσταση (ΥΥΚ) αντίστοιχα στον ΣΔτ2. Στις οξείες επιπλοκές συνήθως εντάσσεται και η υπογλυκαιμία, που ουσιαστικά αποτελεί επιπλοκή της θεραπείας του ΣΔ. Οι πιο μακροπρόθεσμες επιπλοκές του διαβήτη αφορούν την επίδραση που έχει η μακροχρόνια υπεργλυκαιμία σε διάφορα σημεία του σώματος καθώς επηρεάζει τα αγγεία σε όλο τον οργανισμό. Σε αυτές τις επιπλοκές περιλαμβάνονται η αμφιβληστροειδοπάθεια (έχουν επηρεαστεί τα αγγεία του ματιού), η καρδιαγγειακή νόσος, η νεφροπάθεια και η διαβητική νευροπάθεια.



Εικόνα 6 Συνήθεις Επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη (Πηγή: Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018)

Επιπλοκές ΣΔ

- **Βραχυπρόθεσμες**
 - Διαβητικό οξεωτικό κώμα
 - Υπερωσμωτικό κώμα
 - Υπογλυκαιμία
- **Μακροπρόθεσμες**
 - Αγγειοπάθεια μεγάλων αγγείων (διαβητική μακροαγγειοπάθεια)
 - Αγγειοπάθεια μικρών αγγείων (διαβητική μικροαγγειοπάθεια, νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια)
 - Διαβητική νευροπάθεια (περιφερική νευροπάθεια, νευροπάθεια του αυτόνομου νευρικού συστήματος)
 - Στυτική δυσλειτουργία
 - Διαβητικό πόδι

Πίνακας 2Επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη (Πηγή: Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2018)

1.10 Διαβητικό δέρμα

Έχει αναφερθεί ότι το 1/3 των ασθενών που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, έχουν εμφανίσει δερματολογικά προβλήματα (Aye and Masson, 2002). Η πιο συχνή δερματική διαταραχή είναι τα χρόνια έλκη που είναι το αποτέλεσμα ελλιπούς επούλωσης του διαβητικού δέρματος (Falanga, 2005). Οι διαβητικοί ασθενείς με έλκη μπορούν εύκολα να μολυνθούν και να καταλήξουν σε ακρωτηριασμό άκρου (Ngo et al., 2005). Επίσης συχνά εμφανίζονται και άλλες μορφές δερματικών παθήσεων, όπως για παράδειγμα λιποειδική νεκροβίωση, μελανίζουσα ακάνθωση, σκληροοίδημα και δακτυλοειδές κοκκίωμα (Jelinek, 1993). Ο γενικευμένος κνησμός, η ξηροδερμία, η καθυστερημένη επούλωση και οι δερματικές μολύνσεις αποτελούν τους κύριους παράγοντες στους διαβητικούς ασθενείς που επηρεάζουν τη ποιότητα ζωής τους και τους οδηγούν σε δερματικές ασθένειες (Mahajan et al., 2003).

1.10.1 Ο επιδερμικός φραγμός στο διαβητικό δέρμα

Η ινσουλίνη αποτελεί το μόριο κλειδί για την επιδερμική ομοίωση, αφού δρα ως αυξητικός παράγοντας σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Σε αυτά τα κύτταρα εκφράζονται οι υποδοχείς ινσουλίνης, έχοντας το δικό τους σύστημα πρόσληψης ινσουλίνης. Γι'αυτό η ινσουλίνη έχει ιδιαίτερο ρόλο στη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων, στο πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευσή τους στη κεράτινη στιβάδα. Η έκθεση των κερατινοκυττάρων σε μεγάλη συγκέντρωση γλυκόζης αναστέλλει την έκφραση και την αυτοφωσφορίλωση του ινσουλινο-εξαρτώμενου

αυξητικού παράγοντα (Spravchikov et al., 2001). Η κατάσταση του επιδερμικού φραγμού μπορεί να εκτιμηθεί με τη μέτρηση διάφορων βιοφυσικών μεθόδων όπως της ενυδάτωσης, της άδηλης απώλειας νερού, των λιπιδίων του σμήγματος και του pH. Πιο συγκεκριμένα, η ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας ρυθμίζεται κυρίως από τρεις παράγοντες: τον φυσικό ενυδατικό παράγοντα (NMF), τα λιπίδια του σμήγματος και τα ενδοκυτταρικά λιπίδια (κεραμίδια). Σε μελέτες, με μοντέλα μυών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 έχει παρατηρηθεί μειωμένη ποσότητα νερού στην κεράτινη στιβάδα και ανωμαλία στο λιπιδικό περιεχόμενο. Σε αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους φάνηκε μειωμένη ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας και μάλιστα η διαφορά ήταν πιο έντονη σε ηλικιωμένους διαβητικούς ασθενείς (Michaels and Del Rosso, 2012).

Η επιδερμική άδηλη απώλεια νερού, δείχνει τη ποσότητα του νερού που περνάει είτε με διάχυση είτε με εξάτμιση τον επιδερμικό φραγμό. Σε μύες με σακχαρώδη διαβήτη είτε τύπου 1 είτε τύπου 2 δεν φάνηκαν σημαντικές διαφορές. Το σμήγμα και τα ενδοκυτταρικά λιπίδια έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού και στην ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας (Imokawa et al., 1990). Ο σμηγματογόνος αδένας μπορεί να αλληλεπιδρά με την ινσουλίνη, και αυτή η ενέργεια φαίνεται να επηρεάζεται στο σακχαρώδη διαβήτη, αφού σε επίμυες με διαβήτη τύπου 1 υπήρξε μειωμένη έκκριση σμήγματος αλλά και αλλαγή στη σύστασή του. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν μειωμένα τα τριγλυκερίδια στη κεράτινη στιβάδα, ενώ τα λιπαρά οξέα, τα κεραμίδια και η χοληστερόλη ήταν αυξημένα (Sakai et al., 2003). Στον άνθρωπο, έχει παρατηρηθεί μείωση των λιπιδίων στην επιφάνεια του δέρματος, ανάλογα πάντα με την ανατομική περιοχή (Sakai et al., 2005). Τέλος, η ελαστικότητα του δέρματος, βρέθηκε μειωμένη και στους δύο τύπους διαβήτη, σε ανθρώπους (Yoon et al., 2002).

1.11 Αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη

Πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη παίζουν:

- η έγκαιρη διάγνωση της νόσου
- η εκπαίδευση του διαβητικού ασθενούς σε σχέση με τις διαιτητικές του συνήθειες
- η εκπαίδευση του διαβητικού ασθενούς στον αυτοέλεγχο του σακχάρου και τη χορήγηση ινσουλίνης

Η στρατηγική αντιμετώπισης του διαβητικού ασθενούς πρέπει να ικανοποιεί τρεις βασικούς στόχους:

- ο τον μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο του ασθενούς
- ο την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υιοθέτηση από τον ασθενή ενός πιο υγιεινού τρόπου ζωής
- ο την εξάλειψη των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη (πχ τη διακοπή του καπνίσματος, έλεγχος αρτηριακής πίεσης και επιπέδων χοληστερόλης)

Η θεραπευτική προσέγγιση για την κάλυψη των παραπάνω στόχων βασίζεται σε τρεις κύριους άξονες: την τήρηση συγκεκριμένου προγράμματος διατροφής, την αύξηση της σωματικής άσκησης και τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής.

1.11.1 Δίαιτα

Η δίαιτα είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της πετυχημένης γλυκαιμικής ρύθμισης και είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση όλων των διαβητικών. Ανάλογα με τη σοβαρότητα της νόσου συνδυάζεται με υπογλυκαιμικά χάπια ή ινσουλίνη. Το διαιτολόγιο του διαβητικού ασθενούς πρέπει να είναι απόλυτα εξατομικευμένο και να προσαρμόζεται στις ανάγκες της καθημερινής ζωής. Η διατροφή του διαβητικού ασθενούς ουσιαστικά δε διαφέρει από τη σωστή δίαιτα του μη διαβητικού ατόμου. Πρέπει να έχει ποικιλία τροφών, να είναι χαμηλή σε ζωικά λίπη, χοληστερόλη, αλάτι και οινόπνευμα και να περιέχει άφθονες φυτικές ίνες. Οι υδατάνθρακες πρέπει να προέρχονται κατά κύριο λόγο από τροφές πλούσιες σε φυτικές ίνες, όπως φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ψωμί ολικής άλεσης, δημητριακά κ.λπ. Οι τροφές αυτές απελευθερώνονται αργά στο αίμα και ο διαβητικός ασθενής αισθάνεται χορτάτος για περισσότερο χρόνο. Από τη διατροφή του διαβητικού, θα πρέπει να αποφεύγονται η ζάχαρη, το μέλι, η γλυκόζη, τα παγωτά, οι καραμέλες, η σοκολάτα, οι γλυκιές κομπόστες, το σακχαρούχο γάλα, τα αναψυκτικά και οι χυμοί φρούτων με ζάχαρη, τα γλυκά οινόπνευματώδη ποτά (λικέρ, γλυκά κρασιά) κ.λπ.

1.11.2 Φυσική Άσκηση

Με τη σωματική άσκηση ο διαβητικός ασθενής καταναλώνει γλυκόζη, που είναι η κύρια πηγή ενέργειας στον άνθρωπο, ρυθμίζοντας έμμεσα τα επίπεδά της στο αίμα, ενώ από την άλλη πλευρά, διευκολύνει την πρόσληψή της από τους σκελετικούς μύες. Επιπλέον, η μυϊκή άσκηση συντελεί στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ο τύπος και η ένταση της μυϊκής άσκησης για κάθε διαβητικό ασθενή καθορίζεται

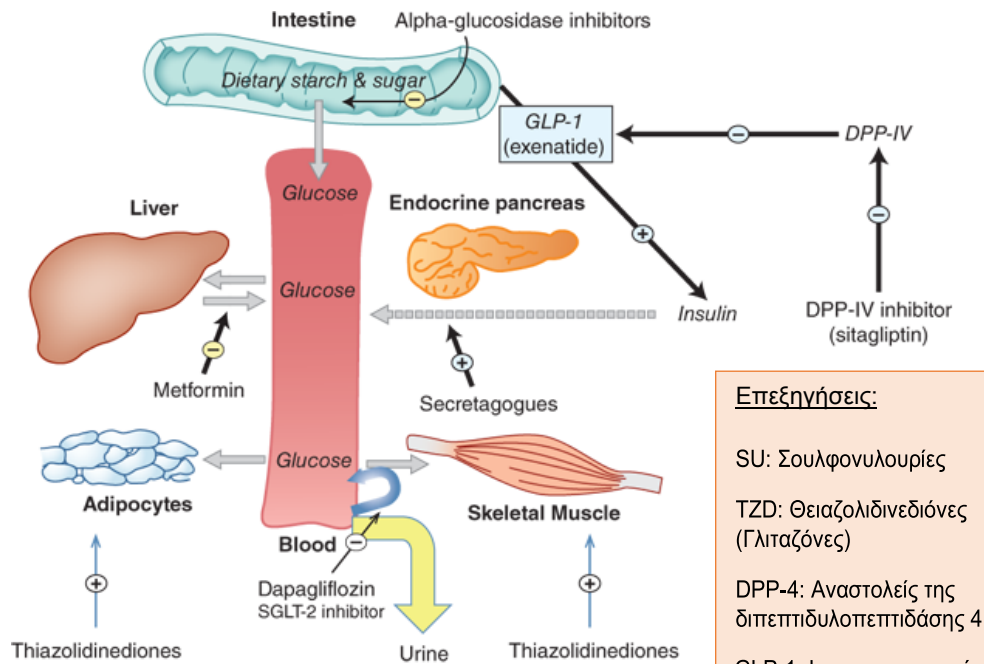
βάσει της ηλικίας, της γενικής κατάστασής του και από την ύπαρξη τυχόν επιπλοκών. Ένας πολύ καλός τρόπος άσκησης για το διαβητικό ασθενή είναι το περπάτημα διάρκειας μισής με μίας ώρας ημερησίως. Είναι προτιμότερο η άσκηση να γίνεται μετά από τα γεύματα, παρά πριν, γιατί το σάκχαρο αίματος πριν είναι συνήθως χαμηλό.

1.11.3 Φαρμακευτική αγωγή

Αντιδιαβητικά δισκία

Οι ενδείξεις χορήγησης των αντιδιαβητικών δισκίων αφορούν τους διαβητικούς τύπου 2, οι οποίοι δε ρυθμίζονται με τη δίαιτα και την άσκηση. Οι βασικότερες κατηγορίες αντιδιαβητικών δισκίων που κυκλοφορούν σήμερα είναι: (Πηγή: Γαληνός)

1. Τα ινσουλινοεκκριταγωγά δισκία, με τα οποία επάγεται η έκκριση μεγαλύτερης ποσότητας ινσουλίνης από το πάγκρεας. Τέτοια δισκία είναι οι σουλφονουλουρίες και οι μεγλιτινίδες.
2. Τα φάρμακα που μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη και έτσι έμμεσα διευκολύνουν τη δράση της στους ιστούς. Τέτοια δισκία είναι οι διγουανίδες (μετφορμίνη) και οι θειαζολιδινεδιόνες (TZD).
3. Πιο πρόσφατες κατηγορίες φαρμάκων είναι οι αναστολείς DPP-4 (γλιπτίνες) και τα ινκρετινομιμητικά (εξανετίδη). Τα πρώτα δίνουν σήμα στα β-κύτταρα του παγκρέατος να αυξήσουν την έκκριση της ινσουλίνης ειδικά μετά την λήψη της τροφής, και στα α-κύτταρα του παγκρέατος να μειώσουν την έκκριση της γλυκαγόνης.
4. Άλλα αντιδιαβητικά τα οποία κυρίως επηρεάζουν την απορρόφηση της γλυκόζης, όπως οι αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης και οι αναστολείς SGLT-2 που αυξάνουν την αποβολή της γλυκόζης μέσω των ούρων, μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.



Επεξηγήσεις:

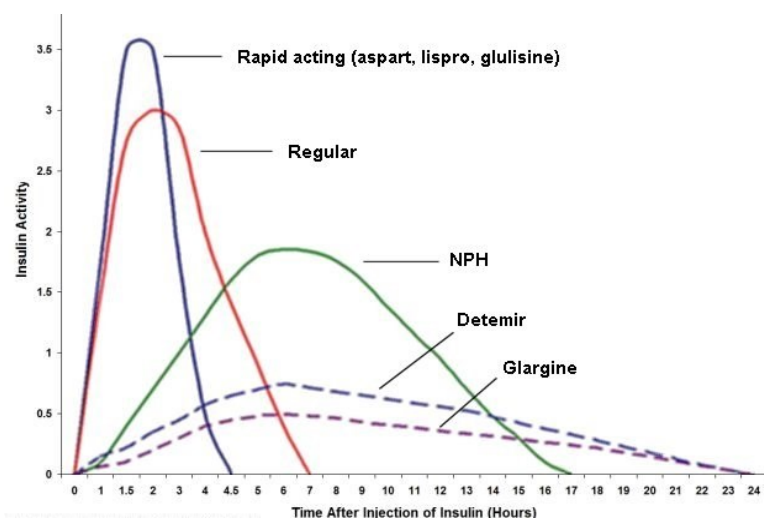
- SU: Σουλφονουριές
- TZD: Θειαζολιδινεδιόνες (Γλιταζόνες)
- DPP-4: Αναστολείς της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης 4
- GLP-1: Ινκρετινομιμητικά
- SGLT-2: Αναστολείς συμμεταφοράς γλυκόζης - νατρίου 2

Εικόνα 7 Θεραπευτικός στόχος Αντιδιαβητικών φαρμάκων (Πηγή: Katzung & Trevor's Pharmacology)

Ινσουλίνη

Η θεραπεία με ινσουλίνη ενδείκνυται στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, στο διαβήτη κύησης και στη διαβητική κετοξέωση. Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, η χορήγηση ινσουλίνης γίνεται εφ' όρου ζωής και είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση των επιθυμητών επιπέδων γλυκόζης. Στις άλλες περιπτώσεις χορηγείται για όσο διάστημα υπάρχει η σχετική ένδειξη. Έτσι, σε κάποια λοίμωξη (π.χ. ουρολοίμωξη) ή σε μια χειρουργική επέμβαση, το διαβητικό άτομο μπορεί να λάβει εξωγενώς ινσουλίνη για κάποιο διάστημα και μετά να

επανέλθει στην προηγούμενη του θεραπεία (δίαιτα ή δίαιτα και υπογλυκαιμικά δισκία). Σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο πολλά είδη ινσουλίνης. Τα ανάλογα ινσουλίνης προκύπτουν από τροποποιήσεις του μορίου της ανθρώπινης ινσουλίνης και διακρίνονται σε βραχείας



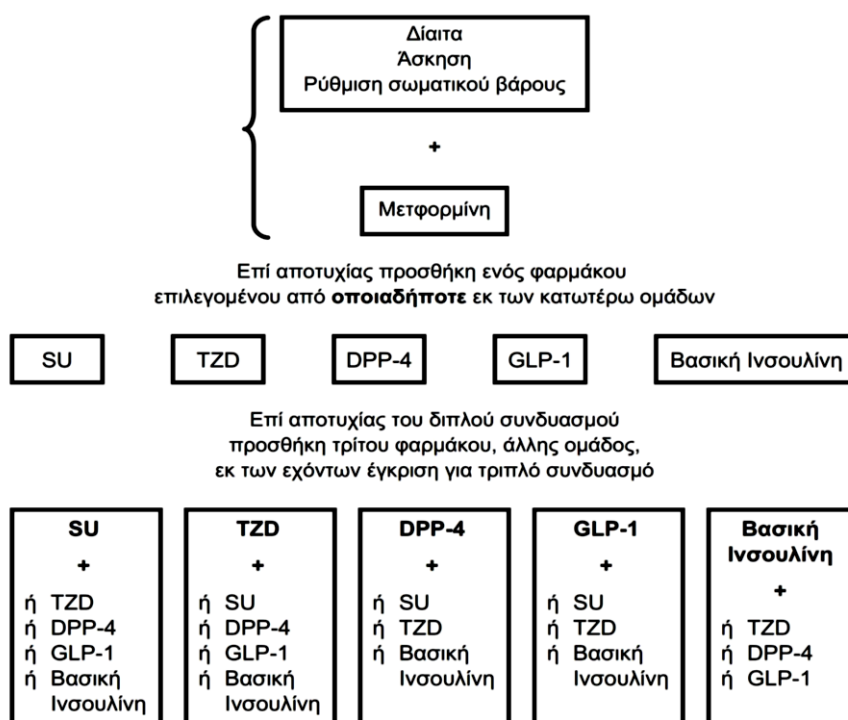
Εικόνα 8 Τύποι ινσουλίνης (Πηγή: Diabetes Education Online)

(Insulin Lispro, Insulin Aspart) και παρατεταμένης δράσης (Insulin Glargin, Insulin Detemir) (Diabetes Education Online, 2019).

Κατηγορία	Μηχανισμός δράσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Κόστος
Διγουανίδια	-Ενεργοποιεί την AMP-κινάση -Ηπατική παραγωγή γλυκόζης	-Μεγάλη εμπειρία -Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες -Πιθανώς μείωση καρδιοαγγειακών συμβαμάτων	-Γαστρεντερικές διαταραχές -Σπάνια γαλακτική οξέωση -Ανεπάρκεια βιταμίνης B12	Χαμηλό
Σουλφονουλουρίες	-Κλείνει τα κανάλια K ATP -Εκκριση ινσουλίνης	-Μεγάλη εμπειρία -Μείωση κινδύνου εμφάνισης μικροαγγειοπάθειας	-Υπογλυκαιμίες -Αύξηση του σωματικού βάρους -Μικρή διατηρησιμότητα	Χαμηλό
Μεγλιτινίδες	-Κλείνει τα κανάλια K ATP -Εκκριση ινσουλίνης	-Ευελξία στη δοσολογία -Βελτίωση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας	-Υπογλυκαιμίες -Αύξηση του σωματικού βάρους -Συχνή δοσολογία	Υψηλό
Γλιταζόνες	-PPAR-ενεργοποιητής -Αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη	-Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες -Βελτιώνει τη λιπιδαιμική εικόνα -Πιθανώς μείωση καρδιοαγγειακών συμβαμάτων -Διατηρησιμότητα	-Αύξηση του σωματικού βάρους -Οίδημα -Καρδιακή ανεπάρκεια -Κατάγματα -Πιθανώς αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου ουροδόχου κύστης	Υψηλό
Αναστολείς α-γλυκοσιδάσης	-Αναστέλλει την α-γλυκοσιδάση -Αναστέλλει την πέψη / απορρόφηση των υδατανθράκων	-Δεν προκαλεί υπογλυκαιμίες -Βελτίωση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας	-Γαστρεντερικές διαταραχές -Συχνή δοσολογία	Χαμηλό
Αναστολείς DPP-4	-Αναστέλλει την DPP-4 -Αυξάνει τα επίπεδα ινκρετίνης (GLP-1, GIP)	Δεν προκαλούν υπογλυκαιμίες	Παγκρεατίτιδα	Υψηλό
Μιμητικά GLP-1	Ενεργοποιεί το GLP-1 R	-Δεν προκαλούν υπογλυκαιμίες -Μείωση του σωματικού βάρους	-Γαστρεντερικές διαταραχές -Ενέσιμα -Απαιτείται εκπαίδευση -Παγκρεατίτιδα	Υψηλό
Ινσουλίνες	Ενεργοποιεί τον υποδοχέα ινσουλίνης	-Μεγάλη εμπειρία -Μείωση κινδύνου εμφάνισης μικροαγγειοπάθειας	-Υπογλυκαιμίες -Αύξηση του σωματικού βάρους -Ενέσιμα -Απαιτείται εκπαίδευση	Ποικίλλει

Πίνακας 3 Ιδιότητες Αντιδιαβητικών φαρμάκων (Μυγδάλης and Τεντολούρης, 2017).

1.12 Θεραπευτικό πρωτόκολλο στο Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2



Εικόνα 9 Κατευθυντήριες οδηγίες αντιδιαβητικής αγωγής (Πηγή: ΕΔΕ) 2013)

1.13 Αποτελεσματικότητα αντιδιαβητικών φαρμάκων ως μονοθεραπεία

Παρεμβάσεις	Αναμενόμενη μείωση της HbA1c
Δίαιτα και άσκηση	1.0-2.0
Μετφορμίνη	1.0-2.0
Σουλφονουλουρίες	1.0-2.0
Αναστολείς α-γλυκοσιδασών	0.5-0.8
Γλινίδες	0.5-1.5
Γλιταζόνες	0.5-1.4
DPP-4	0.5-0.8
GLP-1 ανάλογα	1.0-1.5
Αναστολείς SGLT2	0.6-1.0
Ινσουλίνη	1-3.6

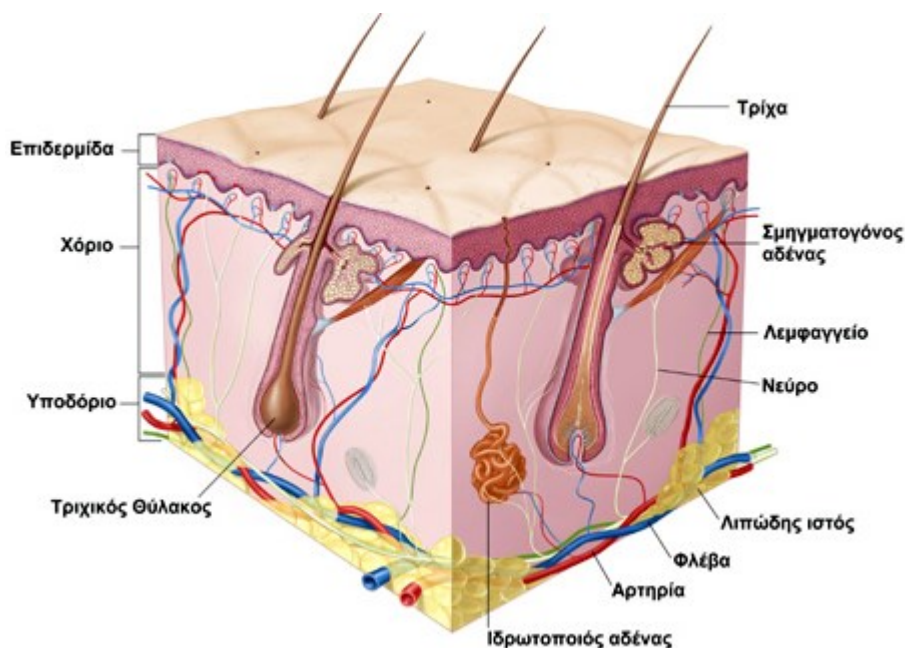
Πίνακας 4 Αποτελεσματικότητα αντιδιαβητικών φαρμάκων στη μείωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) (Bennett et al., 2011; Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία, 2013)

Κεφάλαιο 2 :

Διαδερμική Χορήγηση

2.1 Μια σύντομη ανασκόπηση της δομής του δέρματος

Το δέρμα αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα του ανθρώπινου σώματος και είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος με επιφάνεια 1.7 m², αποτελώντας το 16% της συνολικής μάζας σώματος ενός μέσου ατόμου (Liu et al., 2014; Menon, 2002; Williams and Barry, 2012). Το πάχος του ποικίλει από άτομο σε άτομο και ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή. Επίσης, στις παλάμες και στα πέλματα κυμαίνεται από 0,5 mm έως και 5 mm. Στους άνδρες γενικά είναι παχύτερο σε σχέση με τις γυναίκες σε όλες τις ανατομικές περιοχές και στα παιδιά είναι σχετικά λεπτό και σταδιακά αυξάνει μέχρι και την 5η δεκαετία που αρχίζει και λεπταίνει. Το χρώμα του επίσης, ποικίλει από άτομο σε άτομο ανάλογα με τη φυλή και την ανατομική περιοχή και εξαρτάται από τη ποσότητα της μελανίνης (της φυσιολογικής χρωστικής του δέρματος). Η κύρια λειτουργία του είναι να παρέχει ένα προστατευτικό φράγμα μεταξύ του σώματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος ενάντια στους μικροοργανισμούς, τη διείσδυση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), των χημικών ουσιών, των αλλεργιογόνων και την απώλεια νερού (Burns et al., 2013; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015; Παπαϊωάννου, 2010; Benson and Watkinson, 2012a).



Εικόνα 10 Τομή ανθρώπινου δέρματος (Πυριόχου, 2012)

2.2 Φυσιολογία δέρματος

Το δέρμα σαν όργανο επιτελεί πολλές και διαφορετικές μεταξύ τους λειτουργίες, από τις οποίες οι σημαντικότερες είναι οι ακόλουθες (Guyton, 1990):

- Προστατεύει το σώμα με το επιθήλιό του από τις διάφορες εξωτερικές επιδράσεις (μηχανικές, χημικές και θερμικές). Το επιθήλιο, με τη βοήθεια αδενικών εκκρίσεων προστατεύει τον οργανισμό από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών.
- Συμμετέχει στους αμυντικούς μηχανισμούς του σώματος, καθώς περιέχει ανοσολογικά δραστικά κύτταρα.
- Διατηρεί τη θερμοκρασία του σώματος με την προσαρμοσμένη κυκλοφορία του αίματος και την αποβολή υγρών (ιδρώτα) από τους αδένες του.
- Συμμετέχει στη διατήρηση του ισοζυγίου του νερού με το να προφυλάσσει το σώμα από την αφυδάτωση και να αποτελεί οδό αποβολής υγρών και αλάτων με την έκκριση των αδένων του.
- Με την αισθητική νεύρωσή του αποτελεί αισθητήριο όργανο με τα κατάλληλα κύτταρα υποδοχής για την αφή, την πίεση, τη θερμοκρασία και τον πόνο.
- Οι μηχανισμοί ωχρότητας και ερυθρότητας του προσώπου και η ανόρθωση των τριχών αποτελούν εκδηλώσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος στο δέρμα.

Το δέρμα έχει μεγάλο κλινικό ιατρικό ενδιαφέρον γιατί περισσότερο από κάθε άλλο όργανο προσφέρεται για άμεση παρατήρηση και γιατί συμμετέχει στην συμπτωματολογία πολλών συστηματικών παθήσεων. Για παράδειγμα, σε περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας εμφανίζει κυάνωση, σε περίπτωση αναιμίας ωχρότητα και χαρακτηριστικές φουσαλίδες και ερυθρήματα σε λοιμώδη νοσήματα, όπως η ανεμοβλογιά και άλλα (Guyton, 1990).

2.3 Δομή του δέρματος

Το δέρμα αποτελείται από τρία αλληπάλλληλα στρώματα, τα οποία από έξω προς τα μέσα είναι τα ακόλουθα:

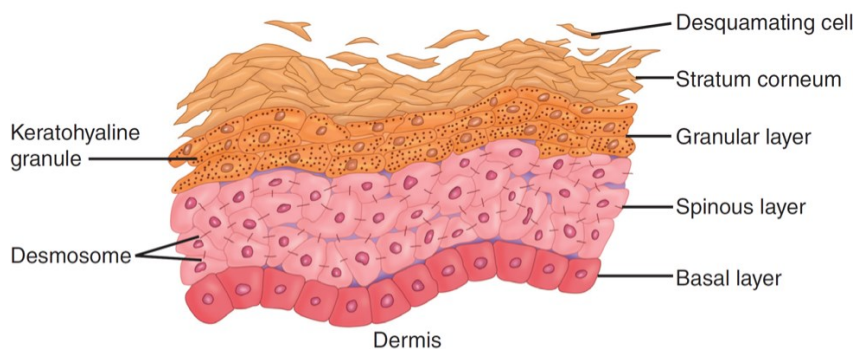
- Η Επιδερμίδα, η οποία αποτελείται από πολύστιβο, κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο
- Το Χόριο, το οποίο είναι αγγειοβριθές συνδετικό υπόστρωμα, και
- Ο Υποδόριος Ιστός, ο οποίος αποτελεί λειτουργικά μέρος του δέρματος και συνάπτει το δέρμα με τα υποκείμενα από αυτό όργανα, π.χ. περιτόναιο, περιόστεο.

2.3.1 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό στρώμα του δέρματος. Πρόκειται για πολύστιβο, πλακώδες επιθήλιο που αποτελείται από πέντε στιβάδες. Έχει μέσο πάχος 1 mm, και διαπερνάται από τα εξαρτήματα του δέρματος. Η επιδερμίδα είναι ένα μεταβολικά ενεργό επιθήλιο, αποτελούμενο από τέσσερις τύπους κυττάρων. Η πλειοψηφία είναι τα κερατινοκύτταρα (90%), ενώ ακολουθούν τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα Merkel σε μικρότερο αριθμό.

Η επιδερμίδα χωρίζεται, αλλά και συνδέεται με το υποκείμενο χόριο, με την κυματοειδή χοριοεπιδερμική συμβολή. Βασικό χαρακτηριστικό της επιδερμίδας είναι ότι στερείται αγγείων και για τη θρέψη της και την αποβολή των προϊόντων του μεταβολισμού εξαρτάται από τη λέμφο που διακινείται μέσω της χοριοεπιδερμικής συμβολής (Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

Κάθε μία στιβάδα αντιπροσωπεύει ένα στάδιο διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, καθώς τα τελευταία έχουν ως αφετηρία τη βασική στιβάδα και μεταναστεύουν προς την επιφάνεια κατά την πορεία της διαφοροποίησής τους. Η διαδικασία του κερατινοκυττάρου, η οποία ξεκινάει από τη βασική στιβάδα, υφίσταται αριθμό μεταβολών και τελικά καταλήγει στη κεράτινη στιβάδα σαν απύρηνο, αποπλατυσμένο πετάλιο, λέγεται κερατινοποίηση και διαρκεί 28 μέρες (Guyton, 1990; Hewer Langton et al., 1993). Έτσι η επιδερμίδα υφίσταται διαρκή ανανέωση. Οι στιβάδες της επιδερμίδας από το βάθος προς την επιφάνεια είναι οι ακόλουθες:



Εικόνα 11 Στιβάδες Επιδερμίδας (Baumann, 2009)

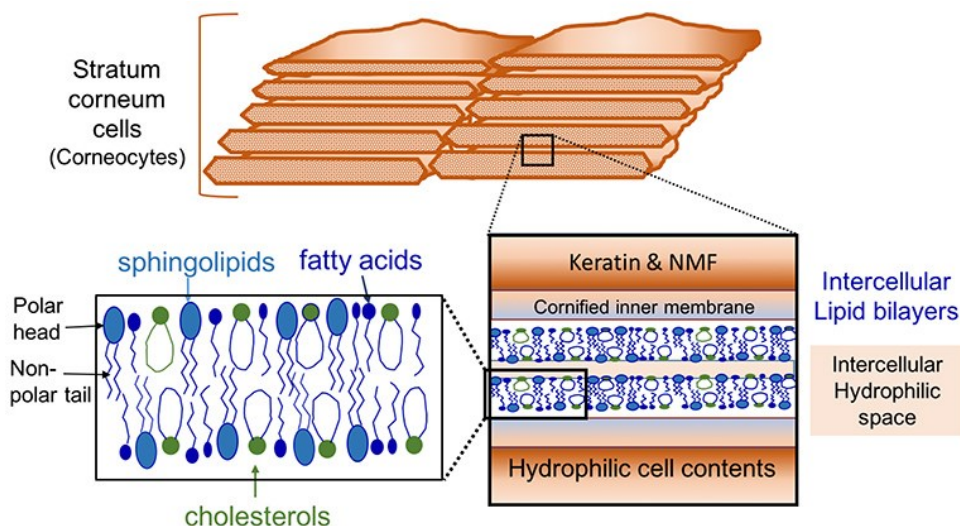
- βασική στιβάδα (Stratum Basale)
- ακανθωτή στιβάδα ή μαλπιγιανή (Stratum Spinosum)
- κοκκώδη στιβάδα (Stratum Granulosum)

- ο διαυγής στιβάδα (Stratum Lucidum) που υπάρχει μόνο στις παλάμες και τα πέλματα
- ο κεράτινη στιβάδα (Stratum Corneum)

Κάθε μία από τις στιβάδες αυτές αποτελείται από διαφορετικά κύτταρα, τα οποία επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες απαραίτητες για την υγεία και τις λειτουργίες του δέρματος. Τα λιπίδια αποτελούν ένα 10-30% του συνολικού όγκου της επιδερμίδας και παρουσιάζουν οργάνωση διπλής στιβάδας.

Κεράτινη στιβάδα

Η κεράτινη στιβάδα είναι το ανώτερο στρώμα της επιδερμίδας, αποκαλείται και «μη ζώσα» επιδερμίδα και αποτελείται από σκληρά κερατινοκύτταρα (70%) ενσωματωμένα σε ένα στρώμα λιπιδικών διπλοστιβάδων (20%), που σχηματίζουν αλληλο-επικαλυπτόμενα στρώματα και το κυτταρόπλασμα τους γεμίζει από μία νηματοειδή πρωτεΐνη, την κερατίνη (Alexander et al., 2012; Domínguez-Delgado et al., 2010; El Maghraby et al., 2008; Benson and Watkinson, 2012b). Τα κύτταρά της συνενώνονται σταθερά μεταξύ τους και δημιουργούν φραγμό προς το περιβάλλον και προσδίδουν στο δέρμα μία σημαντική ιδιότητα, την αδιαπερατότητα. Στην κερατίνη οφείλεται η αντοχή και η σκληρότητα της στιβάδας αυτής που είναι απαραίτητη για την προστασία από μηχανικούς ερεθισμούς. Είναι σε άμεση επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον και οι ιδιότητες φραγμού της σχετίζονται εν μέρει με την πολύ υψηλή πυκνότητά της ($1,4 \text{ g / cm}^3$ σε ξηρή κατάσταση) και τη χαμηλή ενυδάτωσή της που κυμαίνεται σε 15% -20%. Τα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας είναι αποπλατυσμένα, απύρρηνα (νεκρά) κύτταρα και αποπίπτουν συνεχώς. Η κεράτινη στιβάδα μπορεί να έχει πάχος 8-16 στρώματα κυττάρων, κάθε ένα από τα οποία έχει περίπου 0,5 μm πάχος, ενώ στις παλάμες και στα πέλματα η κεράτινη στιβάδα μπορεί να είναι έως και 10 φορές παχύτερη. Το νερό στην κεράτινη στιβάδα συνδέεται με την κερατίνη στα κερατινοκύτταρα.



Εικόνα 12 Δομή κεράτινης στιβάδας (Πηγή: Society of Cosmetic Scientists)

Η κεράτινη στιβάδα θεωρείται συνήθως ως ένας «τοίχος με τούβλα», με τα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα να αποτελούν τα «τούβλα», ενσωματωμένα στη «λάσπη» που σχηματίζουν τα διακυτταρικά λιπίδια. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, τα κερατινοκύτταρα αλλάζουν σε μέγεθος (γίνονται πεπλατυσμένα), αυξάνουν σε διάμετρο (από 6μm γίνονται 34 – 44 μm στην εξωτερική στιβάδα), χάνουν οργανίδια, σχηματίζουν ινώδεις πρωτεΐνες, αφυδατώνονται και αποκτούν αρκετά πυκνές κυτταρικές μεμβράνες (Christophers et al., 1989; Menon, 2002).

Διαυγής στιβάδα

Εμφανίζεται αποκλειστικά στις παλάμες και στα πέλματα (λέγεται έτσι διότι δεν βάφεται με τις κοινές χρωστικές). Τα κύτταρα της στιβάδας αυτής περιέχουν μια ουσία που ονομάζεται ελαιοειδίνη (Burns et al., 2013; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

Κοκκιώδης στιβάδα

Σχηματίζεται από 2-3 σειρές αποπλατυσμένων ρομβοειδών κυττάρων τα οποία εμφανίζουν οριζόντια διάταξη. Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων περιέχει βασεόφιλα κοκκία, τα κοκκία κερατοϋαλίνης ή φιλαγγρίνης. Τα κοκκία αυτά περιέχουν προφιλαγγρίνη, η οποία καθώς τα κύτταρα μεταπίπτουν σταδιακά στα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας, μετατρέπεται σε φιλαγγρίνη. Η φιλαγγρίνη κρατάει συνδεδεμένα τα μόρια κερατινών στα κατώτερα στρώματα της κεράτινης στιβάδας. Οι κερατίνες είναι οι πρωτεΐνες των κερατινοκυττάρων. Η στιβάδα αυτή δεν υπάρχει στους βλεννογόνους (Burns et al., 2013; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

Ακανθωτή στιβάδα

Αποτελείται από 8-10 στρώματα κυττάρων και είναι η παχύτερη στιβάδα της επιδερμίδας. Σε αυτό το στρώμα, τα κερατινοκύτταρα αρχίζουν να γίνονται κάπως αποπλατυσμένα. Στα ανώτερα στρώματα εμφανίζονται τα σωματίδια του Odland ή πεταλιώδη σωματίδια τα οποία περιέχουν λιπίδια. Τα λιπίδια αυτά εκλύονται από τα κύτταρα στο μεσοκυττάριο χώρο με τη λειτουργία της εξωκυττάρωσης (Burns et al., 2013; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

Βασική ή μητρική στιβάδα

Είναι το βαθύτερο στρώμα της επιδερμίδας. Αποτελείται από κύτταρα κυλινδρικού σχήματος. Περιέχει τα βασικά κύτταρα, τα οποία διαιρούνται συνεχώς, δημιουργώντας νέα κερατινοκύτταρα, αντικαθιστώντας τα παλιά που έχουν απομακρυνθεί από την επιφάνεια του δέρματος. Συνεπώς, η βασική στιβάδα είναι πολύ σημαντική αφού από αυτή ανανεώνονται όλες οι άλλες στιβάδες της επιδερμίδας (Burns et al., 2013; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

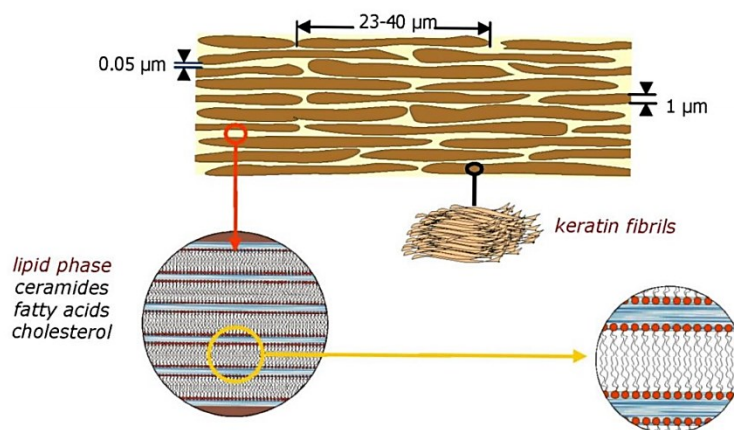
Επιδερμικός φραγμός («brick and mortar structure»)

Ο όρος επιδερμικός φραγμός παραπέμπει στην κεράτινη στιβάδα, την ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας, καθώς και στον υδρολιπιδικό μανδύα που την καλύπτει. Ο επιδερμικός φραγμός διαδραματίζει ένα σημαντικότατο προστατευτικό/αμυντικό ρόλο, καθώς εμποδίζει τη διείσδυση επικίνδυνων αλλεργιογόνων και βακτηριδίων και συγχρόνως αποτρέπει την εξάτμιση των φυσικών αποθεμάτων νερού, γνωστή ως Διαδερμική Απώλεια Νερού (TEWL-Transepidermal Water Loss). Αποτελείται από πολλαπλές στρώσεις επιπεδοποιημένων νεκρών κυττάρων (χωρίς πυρήνα) που ονομάζονται κερατινοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, τα οποία είναι πλούσια σε πρωτεΐνες αλλά φτωχά σε λιπίδια, περικλείονται από την εξωκυττάρια ύλη, ένα λιπαρό και ανθεκτικό στο νερό «κάλυμμα» που αποτελείται κυρίως από κεραμίδια (50%), χοληστερόλη (25%) και λιπαρά οξέα (10%). Ο επιδερμικός φραγμός, στοχεύοντας στην προστασία του οργανισμού από τους εξωτερικούς βλαπτικούς παράγοντες, επιτρέπει τη διέλευση μορίων μέσα από την επιδερμίδα, μόνον όταν αυτά τηρούν ορισμένες προδιαγραφές π.χ. χαμηλό μοριακό βάρος (<500 Dalton), μέτριο βαθμό λιποφιλίας (octanol-water partition coefficient:10-1.000), μέτρια υψηλό σημείο τήξης (<200 °C) κ.ά. (θα αναφερθούν εκτενώς παρακάτω). Ακόμα κι όταν ένα ενεργό συστατικό κατέχει αυτές τις ιδιότητες, είναι συνήθως αναγκαία η συνεισφορά

επιπρόσθετων μέσων για την αύξηση της διείσδυσης του συστατικού αυτού διαμέσου του δέρματος (Daniels, 2004; Walters and Brain, 2002).

Πώς σχηματίζεται;

Όλα τα κύτταρα της επιδερμίδας γεννιούνται στη βασική στιβάδα της και από εκεί, αφού πολλαπλασιαστούν και διαφοροποιηθούν μετακινούνται προς τις ανώτερες στιβάδες της με τελικό στόχο το σχηματισμό του επιδερμικού φραγμού. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κερατινοποίηση. Στην πορεία αυτή και μέσω ποικίλων χημικών διεργασιών παράγεται ένα σύνθετο μείγμα λιπιδίων το οποίο καταλαμβάνει τελικά το χώρο ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα. Η ακεραιότητα του επιδερμικού φραγμού εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο οργανώνονται εκεί τα λιπίδια.



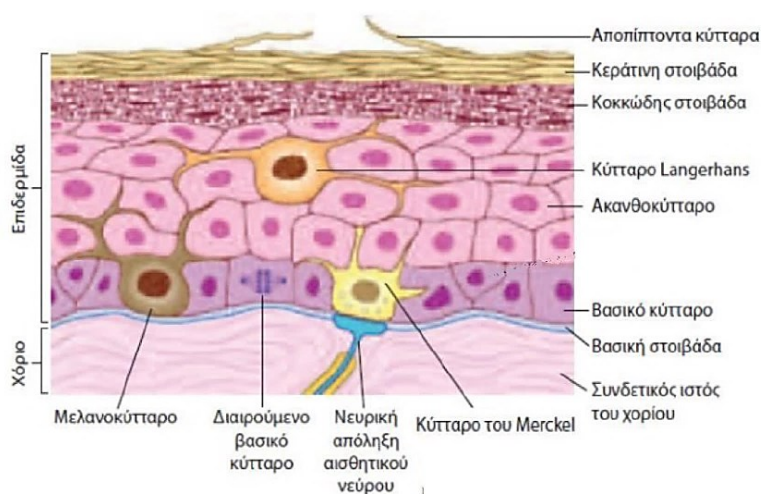
Εικόνα 13 Δομή "brick & mortar" (Ochalek, 2012)

Κύτταρα της επιδερμίδας

- i. **Επιθηλιακά κύτταρα ή κερατινοκύτταρα:** αποτελούν το 90% των κυττάρων της επιδερμίδας. Το κάθε κερατινοκύτταρο κινείται προς τις εξωτερικές στιβάδες για να φτάσει τελικά στην κεράτινη στιβάδα. Η διαδικασία του κερατινοκυττάρου, η οποία λέγεται κερατινοποίηση, ξεκινάει από τη βασική στιβάδα, υφίσταται μεγάλο αριθμό μεταβολών και τελικά καταλήγει στην κεράτινη στιβάδα ως απύρηνο και αποπλατυσμένο πετάλιο. Η κερατινοποίηση διαρκεί 28 ημέρες.
- ii. **Μελανοκύτταρα:** είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μελανίνης και βρίσκονται μεταξύ και κάτω από τα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Η ποσοτική τους σχέση με τα κύτταρα της βασικής στιβάδας είναι 1:5. Είναι νευρογενούς προέλευσης και φέρουν δενδρίτες που διακλαδίζονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων. Οι δενδρίτες είναι γεμάτοι από μελανοσώματα, τα οποία περιέχουν τη μελανίνη. Τα μελανοσώματα φαγοκυτταρώνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, περιβάλλουν

τον πυρήνα των κυττάρων αυτών και τα προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία.

- iii. **Κύτταρα του Langerhans:** είναι δενδριτικά κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης και βρίσκονται πάνω από τη βασική στιβάδα. Επίσης, συμμετέχουν στην ανοσολογική λειτουργία και είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και παρουσίαση των αλλεργιογόνων στα λεμφοκύτταρα.
- iv. **Κύτταρα του Merkel:** εξυπηρετούν την αισθητική λειτουργία του δέρματος και είναι άφθονα σε περιοχές μεγάλης ευαισθησίας (Πυριόχου, 2012).



Εικόνα 13 Κύτταρα επιδερμίδας (Πυριόχου, 2012)

2.3.2 Χόριο

Το χόριο είναι ένας ινώδης ιστός με μεγάλη σταθερότητα και ελαστικότητα, ο οποίος συγκρατεί και υποστηρίζει την επιδερμίδα. Είναι η υπεύθυνη στιβάδα για την ελαστικότητα, το σχήμα και την ανθεκτικότητα του δέρματος (Liu et al., 2014). Το πάχος του χόριου ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική περιοχή από 0,5 έως 4 mm. Η δομή του είναι πιο πολύπλοκη και αποτελείται από δύο στιβάδες, την ανώτερη ή θηλώδη στιβάδα, που ονομάζεται έτσι από τον τρόπο που διεισδύει υπό μορφή θηλών στην επιδερμίδα, και την κατώτερη ή δικτυωτή στιβάδα, που ονομάζεται έτσι λόγω της δικτυωτής μορφής που παρουσιάζει.

Το χόριο αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου και λιγότερο από ελαστικές ίνες, καθώς και από θεμέλια ή βασική ουσία. Στην ανώτερη δερμίδα οι ίνες κολλαγόνου είναι πιο χαλαρές και αραιές μεταξύ τους, σε αντίθεση με την κατώτερη στιβάδα της δερμίδας, όπου είναι πιο πυκνές. Τη δομή του χόριου συμπληρώνει μία άμορφη κολλώδης ουσία, σαν gel, που αποτελείται από ένα μίγμα κυρίως πολυσακχαριτών

και πρωτεϊνών, η θεμέλιος ουσία. Ο κυτταρικός πληθυσμός του χορίου απαρτίζεται κυρίως από ινοβλάστες, καθώς και από ιστιοκύτταρα (μονοκύτταρα/μακροφάγα) και μαστοκύτταρα (Burns et al., 2013).

Το χόριο είναι πολύ πλούσιο σε αιμάτωση και περιέχει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Περιέχει πλούσιο δίκτυο νευρικών ινών, λείες μυϊκές ίνες (τους ανελκτήρες των τριχών) και μέσα σε αυτό περιέχονται τα εξαρτήματα του δέρματος, όπως οι τρίχες και οι αδένες. Τα αιμοφόρα αγγεία που βρίσκονται στο χόριο παρέχουν θρεπτικά συστατικά και για το χόριο και για την επιδερμίδα (Domínguez-Delgado et al., 2010).

2.3.3 Υποδόριος ιστός

Το υπόδερμα ή υποδόριος ιστός είναι το βαθύτερο στρώμα του δέρματος, αμέσως κάτω από το χόριο. Ο υποδόριος ιστός αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό που στερεώνει χαλαρά το δέρμα πάνω στα υποκείμενα όργανα, επιτρέποντάς του να διολισθαίνει πάνω στις υποκείμενες δομές. Σε συγκεκριμένες περιοχές (π.χ. όσχεο) ο υποδόριος ιστός απουσιάζει και το δέρμα είναι σε άμεση επαφή με τους μύες. Το πάχος του ποικίλλει από 2 έως 30 mm, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την περιοχή του σώματος. Είναι παχύτερος στους γλουτούς, στις παλάμες των χεριών και στα πέλματα των ποδιών. Με την πάροδο της ηλικίας, ο υποδόριος ιστός αρχίζει να ατροφεί, ακολουθώντας τη γήρανση του δέρματος (Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015).

Αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και ινώδη διαφραγμάτια και περιέχει τα αγγεία και νεύρα, που διέρχονται προς το υπερκείμενο χόριο και σε ορισμένες περιοχές τα κατώτερα τμήματα εξαρτημάτων του δέρματος (Liu et al., 2014; Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015). Συμβάλλει στη διατήρηση της θερμότητας του σώματος, αφού μονώνει το σώμα από το κρύο και προστατεύει τον οργανισμό από τραυματισμούς, λειτουργώντας ως «αμορτισέρ» για την απορρόφηση των κραδασμών. Στα λιπώδη κύτταρα του υποδόριου ιστού αποθηκεύονται θρεπτικά συστατικά και ενέργεια (Αντωνίου and Κατσάμπας, 2015). Τα λιποκύτταρα που βρίσκονται στον υποδόριο ιστό αντιπροσωπεύουν περίπου το 50% του λίπους του σώματος.

2.3.4 Αγγεία και νεύρα του δέρματος

Τα αγγεία διακρίνονται σε αιμοφόρα και λεμφοφόρα.

- **Αιμοφόρα αγγεία:** Διακρίνονται σε αρτηρίες και φλέβες. Τα αρτηριακά αγγεία προέρχονται από το αγγειακό δίκτυο του υποδόριου συνδετικού ιστού και σχηματίζουν στο χόριο πολλαπλά πλέγματα, τα οποία φτάνουν μέχρι τις θηλές, όπου σχηματίζουν τις τριχοειδείς αγκύλες. Τα φλεβικά αγγεία αρχίζουν από την κεντρική φλέβα των θηλών και σχηματίζουν πλέγματα στο υπόδερμα.
- **Λεμφοφόρα αγγεία:** Το λεμφικό σύστημα του δέρματος αρχίζει από τους μεσοκυττάριους χώρους της βασικής στιβάδας και σχηματίζει στο κυρίως δέρμα και την επιδερμίδα λεμφοφόρα τριχοειδή αγγεία. Σε κάθε θηλή, παράλληλα προς τη φλέβα, υπάρχει και ένα λεμφοφόρο τριχοειδές. Τα λεμφοφόρα αγγεία δεν επικοινωνούν με τα αιμοφόρα, αλλά υπάρχουν ως συνεχές δίκτυο σε όλη την επιφάνεια του δέρματος.

Στην επιδερμίδα τα νεύρα σχηματίζουν εκτεταμένο πλέγμα, από το οποίο χορηγούνται ίνες για το υπόλοιπο δέρμα καθώς και τα όργανά του. Τελειώνουν σε ελεύθερες απολήξεις. Τα νεύρα διακρίνονται σε αισθητικά, κινητικά και αγγειοκινητικά. Τα αισθητικά και κινητικά προέρχονται από τα εγκεφαλονωτιαία νεύρα. Οι ελεύθερες νευρικές απολήξεις υποδέχονται την αίσθηση του πόνου (Χατζημπούγιας, 2000).

2.3.5 Τα κεράτινα όργανα του δέρματος

Τα κεράτινα όργανα του δέρματος είναι τα εξής:

- οι τρίχες
- τα νύχια

Οι τρίχες είναι κεράτινα νημάτια και εκφύονται από τους θύλακες των τριχών. Κάθε τρίχα περιβάλλεται εν μέρει από τον επιθηλιακό και τον ινώδη θύλακα, αποτελείται δε από το στέλεχος και τη ρίζα. Το κάτω τμήμα παρουσιάζει πάχυνση από το οποίο γίνεται η αύξηση της τρίχας.

Τα νύχια αποτελούν φάλαγγα των δακτύλων. Έχουν σχήμα τετράπλευρο κι εμφανίζουν δύο επιφάνειες και τέσσερα χείλη. Τοπογραφικά, κάθε νύχι αποτελείται από τρία μέρη, το ριζονύχιο, το σώμα και την κορυφή (Χατζημπούγιας, 2000).

2.3.6 Οι αδένες του δέρματος

- **Σμηγματογόνοι αδένες:** Βρίσκονται σε σχέση με τις τρίχες και αποβάλλουν το έκκριμά τους στο θύλακά τους και στην επιφάνεια του δέρματος. Οι σμηγματογόνοι

αδένες παράγουν λιπαρή ουσία, το σμήγμα για τη λίπανση του δέρματος και των τριχών. Βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος εκτός από τις παλάμες, τα πέλματα και την ονυχοφόρο φάλαγγα των δακτύλων.

- ο **Ιδρωτοποιοί αδένες**: Οι ιδρωτοποιοί αδένες βρίσκονται σκορπισμένοι σε όλο το δέρμα και σχετίζονται με τη θερμορύθμιση. Το έκκριμα των αδένων αυτών είναι ο ιδρώτας. Με τον ιδρώτα αποβάλλονται από τον οργανισμό διάφορες άχρηστες ουσίες και ρυθμίζεται η θερμοκρασία του σώματος. Μια κατηγορία ιδρωτοποιών αδένων είναι και οι σμηγματογόνοι αδένες (αποκρινείς) οι οποίοι υπάρχουν κυρίως στις μασχάλες και τη γεννητική περιοχή και είναι υπεύθυνοι για την οσμή του σώματος.

2.3.7 Οργάνωση λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα

Το εξωκυτταρικό διάστημα στον πρώτης γραμμής φραγμό του δέρματος είναι γεμάτο από ένα συνεχές λιπιδικό στρώμα, κυρίως σε κρυσταλλική κατάσταση και με τη μορφή πολλαπλών στιβάδων με επαναλαμβανόμενη απόσταση περίπου 5,5 nm. Οι στιβάδες αυτές έχουν στο μεγαλύτερο μέρος τους 8-10 ανεξάρτητα στρώματα που ενώνονται από λεπτότερες περιοχές σύνδεσης και αποτελούνται από 2, 4 ή 6 λιπιδικά στρώματα. Οι περιοχές αυτές είναι μακρύτερες και πιο πλούσιες στην περιφέρεια των κερατινοκυττάρων. Βέβαια, το δέρμα διογκώνεται περισσότερο σε κάθετη (25%) παρά σε οριζόντια (4%) κατεύθυνση, καθώς η διαδικασία περιλαμβάνει εκτεταμένη επέκταση κερατινοκυττάρων. Επίσης, η θερμοκρασία επάγει την ενυδάτωση του δέρματος.

Οι περιοχές εντός των στιβάδων της κεράτινης στιβάδας, συμπεριλαμβανομένων και των περιοχών σύνδεσης, περιέχουν λιγότερο οργανωμένα λιπίδια και περισσότερο ελαστικές υδρόφοβες αλυσίδες. Το ενδοκυτταρικό μακρομοριακό στρώμα εντός της κεράτινης στιβάδας είναι πλούσιο σε κερατίνη, η οποία υποστηρίζει τη μηχανική σταθερότητα και συνεπώς την ακεραιότητα της κεράτινης στιβάδας. Η διακυτταρική διάχυση είναι πρακτικά μηδαμινή στην διαδερμική μεταφορά φαρμάκου (Cevc and Vierl, 2010).

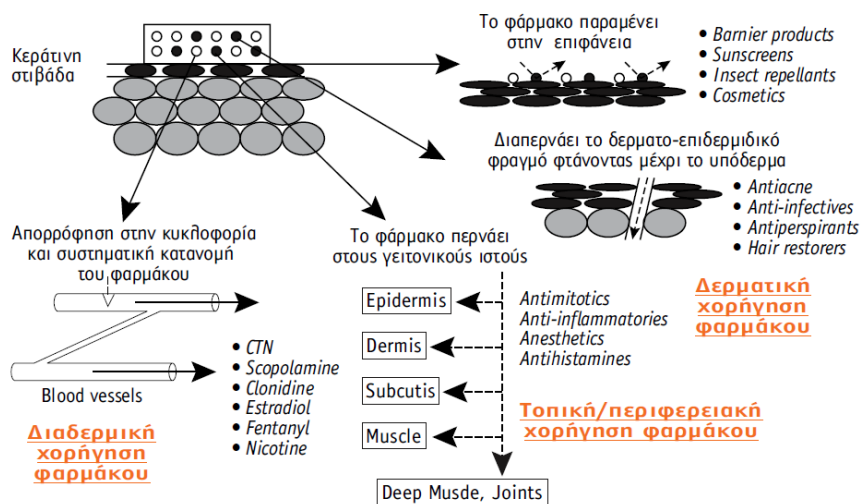
Κεφάλαιο 3 :

Τοπική και Διαδερμική χορήγηση φαρμάκου

Για χιλιάδες χρόνια, οι ανθρώπινοι πολιτισμοί έχουν εφαρμόσει ουσίες στο δέρμα ως καλλυντικά και φαρμακευτικά μέσα (Prausnitz and Langer, 2008). Ωστόσο, μέχρι τον 20ό αιώνα το δέρμα δεν χρησιμοποιήθηκε ως μέσο χορήγησης φαρμάκων. Στην πραγματικότητα, ο Merriam Webster χρονολογεί τη λέξη «διαδερμική» το 1944 (Merriam-Webster, 2011), υπογραμμίζοντας ότι πρόκειται για μια σχετικά πρόσφατη αντίληψη στην ιατρική και φαρμακευτική πρακτική. Παρόλο ότι υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα για τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων, υπάρχουν επίσης μειονεκτήματα και πρέπει να ληφθούν υπόψη και τα δύο (Gordon, 2005; Rios, 2007).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά συστήματα τοπικής και διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου, με σκοπό την ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στον ιστό-στόχο, τη ρύθμιση της δόσης και την αποφυγή των παρενεργειών σε άλλα συστήματα του οργανισμού, παρότι το δέρμα θεωρείται ως αποτελεσματικά μη διαπερατός φραγμός (Schroeter et al., 2010). Οι μέθοδοι αυτές αποτελούν μία εναλλακτική μη-επεμβατική λύση, απέναντι στην επώδυνη κι επισφαλής, κάποιες φορές, χρήση των ενδοφλέβιων μεθόδων ή στην από του στόματος οδό χορήγησης. Οι μέθοδοι χορήγησης φαρμάκου από το δέρμα διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες, ανάλογα με την κατανομή της δραστικής ουσίας σε συγκεκριμένες περιοχές του οργανισμού:

- Τοπική/Δερματική χορήγηση (Topical/Dermal drug delivery): εφαρμογή για την τοπική φροντίδα του δέρματος ή τη θεραπεία δερματικών παθήσεων π.χ. ακμή.
- Τοπική/Περιφερειακή χορήγηση (Topical/Regional drug delivery): χορήγηση με στόχο την τοπική ανακούφιση στους ιστούς που βρίσκονται αμέσως κάτω από την περιοχή της εφαρμογής π.χ.οστεοαρθρίτιδα.
- Διαδερμική χορήγηση (Transdermal drug delivery, TDD): περιλαμβάνει ένα σύνολο κλινικών μεθόδων που στοχεύουν στη συστηματική κατανομή του φαρμάκου στον οργανισμό.



Εικόνα 13 Χορήγηση φαρμάκου από τη δερματική οδό (Φράγκου, 2007)

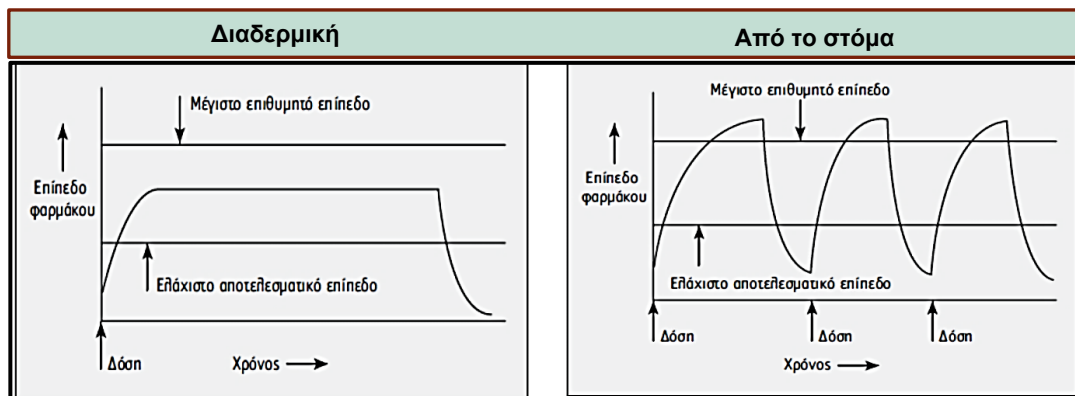
Αρκετά συστήματα τοπικής και διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου χρησιμοποιούν την παθητική διάχυση της ουσίας, που συνοδεύεται από διαφορετικούς βαθμούς απορρόφησης και συστηματικής κατανομής (Down and Harvey, 2003; Walters and Hadgraft, 1993). Ο κύριος τομέας της μελέτης της μεθόδου αυτής αφορά στους τρόπους ενίσχυσης της σχετικά χαμηλής διαπερατότητας του δέρματος, ώστε να διευκολυνθεί η απορρόφηση των φαρμάκων από τον οργανισμό.

3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χορήγησης φαρμάκων από το δέρμα

Για να είναι αποτελεσματική η διαδερμική χορήγηση ενός φαρμάκου, θα πρέπει να φτάσει το φάρμακο στην θέση στόχο μέσα από το δέρμα ώστε να λειτουργήσει θεραπευτικά, και αυτό απαιτεί την υπέρβαση των ιδιοτήτων του φραγμού του δέρματος (Herwadkar and Banga, 2012). Η χορήγηση φαρμάκων μέσω του δέρματος χρησιμοποιώντας ένα τοπικό-διαδερμικό σύστημα χορήγησης, προσφέρει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων, σε σύγκριση με άλλες συμβατικές οδούς χορήγησης (Friend, 1990) τα οποία είναι τα εξής:

- i. Αποφεύγεται η αλληλεπίδραση των φαρμάκων με το γαστρεντερικό σωλήνα, αποτρέποντας έτσι μεταβολές στην απορρόφηση του φαρμάκου λόγω αλλαγής του pH, επίδρασης τροφής, μεταβολής του χρόνου εκκένωσης του στομάχου, μεταβολής της εντερικής κινητικότητας και επίδρασης των βακτηριακών ενζύμων.
- ii. Τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων, αποφεύγουν τους κινδύνους και τις δυσκολίες που συνδέονται με ενδοφλέβια θεραπεία.

- iii. Επιτρέπουν στο φάρμακο να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία κατευθείαν μετά τη διαδερμική απορρόφηση μέσω του αίματος κι έτσι αποφεύγεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου από το ήπαρ.
- iv. Η ικανότητα των συστημάτων διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων να δρουν ως «δεξαμενές φαρμάκου», ελέγχει το ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου, για μεγάλο χρονικό διάστημα και εξασφαλίζει σταθερά επίπεδα στο πλάσμα, ακόμη και για φάρμακα με μικρό χρόνο ημιζωής. Επομένως, φάρμακα με στενό θεραπευτικό εύρος, μπορούν να χορηγηθούν διαδερμικά και έτσι αποφεύγονται αυξομειώσεις στη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο αίμα, μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης τοξικών παρενεργειών που μπορεί να παρουσιαστούν με την επαναλαμβανόμενη χορήγηση εφάπαξ δόσεων (Εικόνα 14).
- v. Πρόκειται για μη επεμβατικές μεθόδους χορήγησης και μπορούν να εφαρμοστούν από τον ασθενή. Η θεραπεία μπορεί να τερματιστεί αμέσως απλώς απομακρύνοντας τη φαρμακοτεχνική μορφή με το φάρμακο από το δέρμα (Friend, 1990).



Εικόνα 14 Επίπεδα φαρμάκου στο αίμα σε διαδερμική και per os χορήγηση (Φράγκου, 2007)

Αν και η τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκων εμφανίζει εντυπωσιακά πλεονεκτήματα, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα που σχετίζονται με αυτό τον τύπο χορήγησης. Τα μειονεκτήματα των οδών αυτών χορήγησης σχετίζονται με:

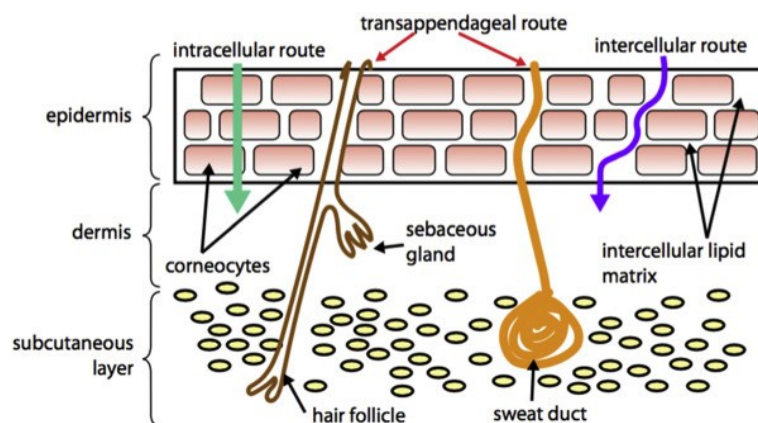
- i. τον αδιαπέραστο και συμπαγή δερματικό φραγμό
- ii. τη δυσκολία στον καθορισμό της παραμέτρου της βιοδιαθεσιμότητας
- iii. την αδυναμία εφαρμογής σε όλους τους τύπους των ενώσεων
- iv. την αδυναμία χορήγησης φαρμάκων που απαιτούν υψηλά επίπεδα στο αίμα
- v. τις αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων με το δέρμα, συμπεριλαμβανομένων του πιθανού ερεθισμού και τοξικών επιδράσεων (Brown and Langer, 1988).

3.2 Οδοί Διέλευσης προς το δέρμα

Υπάρχουν διαφορετικές διαδρομές με τις οποίες ένα μόριο μπορεί να διαπεράσει την κεράτινη στιβάδα. Αυτές είναι:

- ο η ενδοκυτταρική οδός (intercellular),
- ο η διακυτταρική οδός (intracellular) και
- ο μέσω των ιδρωτοποιών αδένων ή τα θυλάκια των τριχών (transappendageal).

Οι ιδρωτοποιοί αδένες και τα θυλάκια των τριχών καταλαμβάνουν μόνο το 0.1% της συνολικής επιφάνειας του δέρματος και έτσι η συγκεκριμένη οδός δεν θεωρείται σημαντική, παρόλο που η διέλευση των ουσιών γίνεται ευκολότερα μέσω των πόρων του δέρματος. Όμως μπορεί να συμβάλει στην διείσδυση ενώσεων κατά τα πρώτα στάδια της διάχυσης ή κατά την μεταφορά φορτισμένων μορίων ή μεγάλων πολικών μορίων μετά από εφαρμογή μικρού ηλεκτρικού ρεύματος (π.χ. ιοντοφόρηση) (Scheuplein, 1967; Schoellhammer et al., 2014; Shahzad et al., 2015). Η διακυτταρική οδός είναι πιθανή κυρίως σε πειραματικές μελέτες και γίνεται μέσω των μεσοκυτταρικών διαστημάτων. Η πιο συχνή οδός είναι η ενδοκυτταρική οδός, όπου το φάρμακο διαχέεται μέσω του στενά τοποθετημένου λιπιδικού στρώματος που περιβάλλει τα κερατινοκύτταρα.



Εικόνα 15 Οδοί διέλευσης προς το δέρμα (Shahzad et al., 2015)

Η ενδοκυτταρική οδός μέσω των κερατινοκυττάρων (intercellular), επιτρέπει τη μεταφορά υδρόφιλων ή πολικών ουσιών. Η μεταφορά μέσω διακυτταρικών χώρων (intra/trans-cellular) επιτρέπει τη διάχυση λιπόφιλων ή μη πολικών ουσιών μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας (Schuetz et al., 2005). Η κύρια οδός καθορίζεται από το συντελεστή K (stratum corneum-formulation partition coefficient) (Daniels, 2004; Down and Harvey, 2003).

3.3 Προϋποθέσεις χορήγησης διαδερμικών φαρμάκων

Εάν ένα φάρμακο είναι κατάλληλο να χορηγηθεί διαδερμικά ή όχι καθορίζεται από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες και τα φαρμακοκινητικά του χαρακτηριστικά. Αρχικά το φάρμακο θα πρέπει να έχει τη κατάλληλη λιποφιλία για να μπορέσει να διέλθει από την κεράτινη στιβάδα, που αποτελεί τον σημαντικότερο φραγμό στη μεταφορά ουσιών διαμέσου του δέρματος. Εκτός αυτού, αφού το φάρμακο περάσει το φραγμό του δέρματος (κεράτινη στιβάδα), θα πρέπει να έχει και την κατάλληλη υδροφιλία, δηλαδή κατάλληλη διαλυτότητα στα υδατικά μέσα, ώστε να διέλθει από τη ζώσα επιδερμίδα και τη δερμίδα (το pH σε αυτές τις περιοχές κυμαίνεται μεταξύ 5 και 6), προτού εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία μέσω της μικροκυκλοφορίας. Ο βιολογικός χρόνος ημιζωής, η συνολική κάθαρση από το σώμα και τα επιθυμητά επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα σε σταθεροποιημένη κατάσταση (steady state) αποτελούν επίσης κάποια απαραίτητα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένα φάρμακο. Αναλυτικότερα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός φαρμάκου, υποψήφιου για διαδερμική χορήγηση είναι (Dhote, 2012; Valecha et al., 2011):

- Ένα διαδερμικό επίθεμα δεν πρέπει να καλύπτει μια περιοχή μεγαλύτερη από 50 cm² και η ημερήσια δόση να είναι μικρή (< 20 mg/day).
- Η αποτελεσματική συγκέντρωση του φαρμάκου πρέπει να είναι χαμηλή (ng/ml).
- Ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) του φαρμάκου πρέπει να είναι μικρός (< 10 hours).
- Τα δραστικά συστατικά δεν πρέπει να προκαλούν τοξικότητα ή ερεθισμό του δέρματος.
- Προτιμώνται φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους (< 500 daltons), καθώς η διάχυση του φαρμάκου μέσω του πολυμερούς καθώς και μέσω του δέρματος εξαρτάται από το μοριακό βάρος του φαρμάκου.
- Το φάρμακο πρέπει να έχει χαμηλό σημείο τήξης έτσι ώστε να δρα σε φυσιολογική θερμοκρασία σώματος (< 200°C).
- Τα φάρμακα, τα οποία αποικοδομούνται στην γαστρεντερική οδό ή / και απενεργοποιούνται με ηπατική δράση πρώτης διόδου, είναι κατάλληλα για διαδερμική χορήγηση.
- Δεν πρέπει να αναπτύσσεται ανοχή στο φάρμακο κάτω από το προφίλ απελευθέρωσής του, μηδενικής τάξης, κατά τη διαδερμική χορήγηση.

- Το υποψήφιο φάρμακο πρέπει να έχει επαρκή υδρόφιλη και λιπόφιλη ισορροπία για να μπορέσει να διαπεράσει το λιπιδικό φραγμό της κεράτινης στιβάδας πριν φτάσει στον υδατικό βιώσιμο ιστό ($1 < \text{LogP} < 4$).

Εκτός των παραπάνω, υπάρχουν και άλλες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές προϋποθέσεις, οι οποίες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη:

- Η ολική από του σώματος κάθαρση
- Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα σε επίπεδα σταθερής κατάστασης (C_{ss} , steady state)
- Η διαλυτότητα στο νερό στους 25 °C
- Η χημική δομή
- Η σταθερά ιονισμού K_a
- Γνωστές χημικές ασυμβασίες
- Γνωστές οδοί αποικοδόμησης
- Η τοξικότητα του φαρμάκου
- Η υγροσκοπία του φαρμάκου

Είναι όμως αδύνατον ένα φαρμακευτικό μόριο να ικανοποιεί ταυτόχρονα όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Επομένως είναι επιθυμητό να υπάρχει ισορροπία μεταξύ αυτών.

Παράμετροι	Ιδιότητες
Dose	< 20 mg/day
$t_{1/2}$	< 10 h
Molecular weight	< 500 Da
Aqueous solubility	>1 mg ml ⁻¹
Partition coefficient	$1 < \text{LogP} < 4$
Skin permeability coefficient	$> 0.5 \times 10^{-3} \text{cm/h}$
Lipophilicity	$10 < K_o/w < 1000$
Oral bioavailability	Low
Therapeutic index	Low
Melting point	< 200 °C
pH	5,0~9,0

Πίνακας 5 Ιδανικές ιδιότητες φαρμάκων για διαδερμική χορήγηση(TDDS)
(Leite-Silva et al., 2012; Prausnitz et al., 2012; Rastogi and Yadav, 2012)

3.4 Βασικά συστήματα διαδερμικής χορήγησης

Τα αυτοκόλλητα δερματικά επιθέματα (έμπλαστρα) χρησιμοποιούν δύο θεμελιώδεις τύπους αποδέσμευσης κατά τη διαδερμική χορήγηση της δραστικής ουσίας:

i. skin-controlled device:

Σε αυτόν τον τύπο η ρύθμιση του ποσοστού απορρόφησης του φαρμάκου γίνεται από το δέρμα.

ii. system-controlled device:

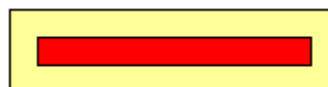
Σε αυτόν τον τύπο η ρύθμιση του ποσοστού αποδέσμευσης κι απορρόφησης του φαρμάκου γίνεται από το σύστημα χορήγησης της ουσίας.

Οι δύο αυτές διαφορετικές διατάξεις αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικά συστήματα χορήγησης της δόσης:

ο μονολιθικό σύστημα (monolithic system)



ο σύστημα δεξαμενής (reservoir system)



Με τις φαρμακευτικές μεθόδους τροποποιούμε τον ρυθμό διαλυτοποίησης ή διαχύσεως ενός δραστικού συστατικού σε μια φαρμακοτεχνική μορφή, τροποποιώντας έτσι και τον ρυθμό αποδέσμευσής του από τη μορφή αυτή. Τα βασικά συστήματα που προκύπτουν με τις φαρμακοτεχνικές μεθόδους είναι 5 και είναι τα εξής (Schulmeister, 2005; Εφεντάκης, 2001):

i. Single-layer Drug-in-Adhesive

Το συγκολλητικό στρώμα αυτού του συστήματος περιέχει και το φάρμακο. Σε αυτόν τον τύπο επιθέματος το συγκολλητικό στρώμα όχι μόνο χρησιμεύει για να προσκολλώνται τα διάφορα στρώματα μαζί με ολόκληρο το σύστημα στο δέρμα, αλλά είναι επίσης υπεύθυνο για την απελευθέρωση του φαρμάκου.

ii. Multi-layer Drug-in-Adhesive

Το πολυστρωματικό επίθεμα φαρμάκου σε συγκολλητικό είναι παρόμοιο με το μονοστρωματικό σύστημα. Ωστόσο το σύστημα πολλαπλών στρώσεων είναι διαφορετικό, επειδή προσθέτει ένα άλλο στρώμα φαρμάκου σε συγκολλητικό,

συνήθως διαχωρισμένο από μεμβράνη (αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις). Ένα από τα στρώματα είναι για άμεση απελευθέρωση του φαρμάκου και το άλλο στρώμα είναι για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου από τη δεξαμενή. Η απελευθέρωση του φαρμάκου από αυτό εξαρτάται από τη διαπερατότητα της μεμβράνης και τη διάχυση των μορίων του φαρμάκου.

iii. Δεξαμενή (Reservoir)

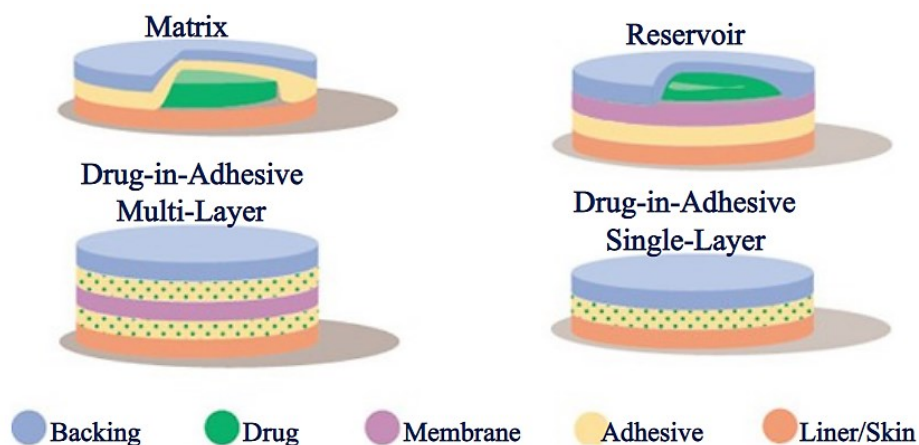
Σε αντίθεση με τα μονοστρωματικά και πολυστρωματικά συστήματα φαρμάκου σε συγκολλητικό, το διαδερμικό σύστημα δεξαμενής έχει ξεχωριστό στρώμα φαρμάκου. Το στρώμα φαρμάκου είναι ένα υγρό διαμέρισμα που περιέχει ένα διάλυμα ή ένα εναιώρημα φαρμάκου διαχωρισμένο από το συγκολλητικό στρώμα. Η δεξαμενή φαρμάκου είναι εγκλεισμένη σε ένα ρηχό θάλαμο διαμορφωμένο από ένα μη διαπερατό από φάρμακο μεταλλικό πλαστικό φύλλο, με μία μεμβράνη ελεγχόμενου ρυθμού που κατασκευάζεται από ένα πολυμερές. Σε αυτόν τον τύπο συστήματος ο ρυθμός απελευθέρωσης είναι μηδενικής τάξης.

iv. Μήτρα (Matrix)

Το σύστημα μήτρας έχει ένα στρώμα φαρμάκου από μια ημιστερεά μήτρα που περιέχει ένα διάλυμα ή ένα εναιώρημα φαρμάκου. Το συγκολλητικό στρώμα σε αυτό το έμπλαστρο περιβάλλει το στρώμα φαρμάκου και μερικώς το επικαλύπτει. Το σύστημα αυτό είναι γνωστό και ως μονολιθική συσκευή.

v. Έμπλαστρα ατμών (Vapour patch)

Σε ένα έμπλαστρο ατμών, το συγκολλητικό στρώμα όχι μόνο χρησιμεύει για τη συγκόλληση των διαφόρων στρωμάτων, αλλά και για την απελευθέρωση ατμού. Τα έμπλαστρα ατμών απελευθερώνουν αιθέρια έλαια για έως 6 ώρες και χρησιμοποιούνται κυρίως για την αποσυμφόρηση. Άλλα έμπλαστρα ατμών στην αγορά βελτιώνουν την ποιότητα του ύπνου ή βοηθούν στην παύση του καπνίσματος.



Εικόνα 16 Συστήματα διαδερμικής χορήγησης (Schulmeister, 2005)

Συστατικά έμπλαστρων

Τα κύρια συστατικά σε ένα διαδερμικό έμπλαστρο είναι:

- Liner - προστατεύει το έμπλαστρο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και αφαιρείται πριν από την εφαρμογή.
- Drug - Διάλυμα φαρμάκου σε άμεση επαφή με την επένδυση απελευθέρωσης
- Adhesive - διατηρεί την επαφή με το δέρμα, περιέχει τη δραστική ουσία και τα έκδοχα (drug-in-adhesive TDD systems).
- Membrane - Ελέγχει την απελευθέρωση του φαρμάκου από τη δεξαμενή και τα πολυστρωματικά επιθέματα.
- Backing - παρέχει προστασία από τους εξωτερικούς παράγοντες κατά τη διάρκεια της περιόδου εφαρμογής.
- Permeation enhancer - Είναι προωθητές διαπερατότητας για φάρμακα, γεγονός που αυξάνει την διαπέραση του φαρμάκου.
- Matrix Filler - Ενεργεί ως παράγοντας ενίσχυσης μήτρας.

Άλλα συστατικά περιλαμβάνουν: Σταθεροποιητές (αντιοξειδωτικά), Συντηρητικά κ.λπ.

3.5 Νέες ανακαλύψεις στη διαδερμική χορήγηση

Τα κύρια πεδία ένδειξης για διαδερμικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων που εισήχθησαν στην αγορά μεταξύ του 1979 και του 2003 ήταν ο χρόνιος πόνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών και η τοπική αναλγησία. Μολονότι, από το 1979 έως το 2003 ένα ιοντοφορητικό επίθεμα με λιδοκαΐνη / επινεφρίνη ήταν το μόνο εγκεκριμένο σύστημα που χρησιμοποίησε

τεχνικές φυσικής ενίσχυσης (Iwai et al., 2012). Περαιτέρω διαδερμικά συστήματα εγκρίθηκαν από το FDA τα επόμενα 10 χρόνια: υπέρηχοι για λιδοκαΐνη, ιοντοφόρηση

Year	Generic Name	Indication	Mechanism / Technology
2004	Lidocaine/ultrasound	Local dermal anesthesia	Sonophoresis
2005	Lidocaine/tetracaine	Local dermal analgesia	Heat Assisted System
2006	Fentanyl/iontophoresis	Acute postoperative pain	Iontophoresis
2006	Methylphenidate	ADHD	Passive diffusion
2006	Selegiline	Depression	Passive diffusion
2007	Diclofenac epolamine	Acute pain	Passive diffusion
2007	Rivastigmine	Dementia	Passive diffusion
2008	Granisetron	Chemo-induced emesis	Passive diffusion
2009	Capsaicin	Neuropathy pain	Passive diffusion
2010	Buprenorphine	Chronic pain	Passive diffusion
2012	Rotigotine	Parkinson's disease	Passive diffusion
2013	Sumatriptane	Migraine	Iontophoresis

Πίνακας 6 Ιστορικό έγκρισης διαδερμικών φαρμάκων (FDA), 1979-2003 (Wolff, 2014)

Year	Generic Names	Indication	Mechanism / Technology
1979	Scopolamine	Motion sickness	Passive diffusion
1984	Clonidine	Hypertension	Passive diffusion
1986	Estradiol	Menopausal symptoms	Passive diffusion
1990	Fentanyl	Chronic pain	Passive diffusion
1991	Nicotine	Smoking cessation	Passive diffusion
1993	Testosterone	Testosterone deficiency	Passive diffusion
1995	Lidocaine/epinephrine	Local dermal analgesia	Iontophoresis
1996	Nitroglycerin	Angina Pectoris	Passive diffusion
1998	Estradiol/norethindrone	Menopausal symptoms	Passive diffusion
1999	Lidocaine	Post-herpetic neuralgia pain	Passive diffusion
2001	Ethinyl estradiol/norelgestromin	Contraception	Passive diffusion
2003	Estradiol/levonorgestrel	Menopause	Passive diffusion
2003	Oxybutynin	Overactive bladder	Passive diffusion

Πίνακας 7 Ιστορικό έγκρισης διαδερμικών φαρμάκων (FDA), 2004-2013 (Wolff, 2014)

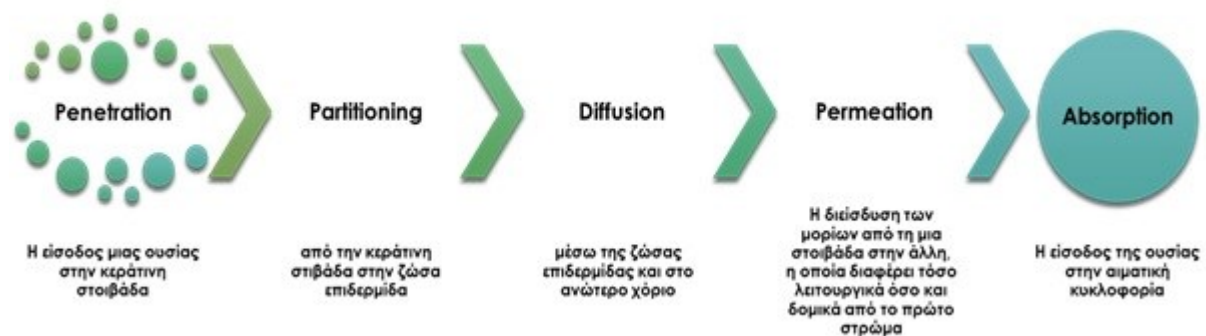
για φεντανύλη σε οξύ μετεγχειρητικό πόνο, ή πιο πρόσφατα ιοντοφόρηση για σουματριπτάνη για τη θεραπεία ασθενών με ημικρανία (Smith et al., 2012). Επιπλέον, εγκρίθηκε ένα θερμικά υποβοηθούμενο σύστημα το οποίο παρείχε ενισχυμένη παθητική διάχυση λιδοκαΐνης δημιουργώντας θερμότητα στη θέση εφαρμογής με ελεγχόμενη χημική αντίδραση μετά από εφαρμογή. Κύρια πεδία ένδειξης για διαδερμικά συστήματα που εγκρίθηκαν από το 2004 ήταν ο χρόνιος πόνος, οι νόσοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), ο καρκίνος και η άνοια.

3.6 Κινητική των διαδερμικών συστημάτων

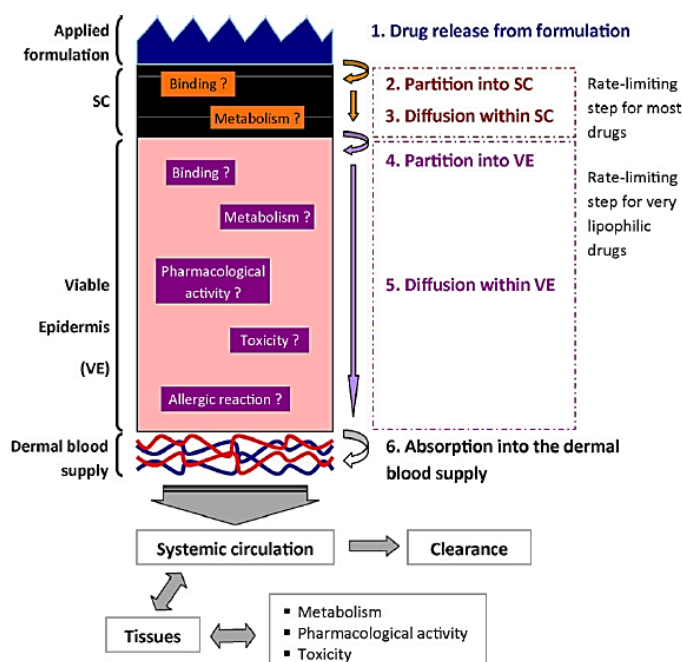
Η διαδερμική απορρόφηση ορίζεται ως η διείσδυση της ουσίας σε διάφορα στρώματα της επιδερμίδας και της διαπέρασης μέσω του χορίου στη συστηματική κυκλοφορία (Langer, 2004).

Η διαδερμική απορρόφηση είναι μια βαθιά διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Alkilani et al., 2015):

1. Διείσδυση (Penetration): Η είσοδος μιας ουσίας στην κεράτινη στιβάδα.
2. Διαμερισμός (Partitioning) από την κεράτινη στιβάδα στη ζώσα επιδερμίδα.
3. Διάχυση (Diffusion) μέσω της ζώσας επιδερμίδας και στο άνω χόριο.
4. Διαπέραση (Permeation): Η διείσδυση από το ένα στρώμα στο άλλο, το οποίο είναι διαφορετικό τόσο λειτουργικά όσο και δομικά από το πρώτο στρώμα.
5. Απορρόφηση (Absorption): Η πρόσληψη μιας ουσίας στη συστηματική κυκλοφορία.



Σχήμα 1 Κινητική διαδερμικών συστημάτων



Εικόνα 17 Στάδια φαρμακοκινητικής κατά τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκου (Lane, 2013a)

3.7 Διαπέραση φαρμάκων δια του δέρματος

Τα κερατινοκύτταρα περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη. Η λιπιδική φάση είναι η μόνη συνεχής φάση της κεράτινης στοιβάδας (αφού τα κερατινοκύτταρα είναι συνήθως απομονωμένα) και επομένως είναι αυτή που καθορίζει τη διαπερατότητα του δέρματος καθώς και όλες τις διεργασίες μεταφοράς που λαμβάνουν χώρα σε αυτό. Η φάση αυτή αποτελείται από κεραμίδια, χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα λιπίδια, 2-10% του βάρους της κεράτινης στοιβάδας, σχηματίζουν ένα υδροφοβικό στρώμα μεταξύ των κυττάρων και γι' αυτό εμποδίζουν τη διαρροή του νερού και υδρόφιλων ενώσεων κατά μήκος της κεράτινης στοιβάδας. Τα λιπίδια αποτελούν το 10-15% της ξηρής μάζας του ιστού. Τα κεραμίδια αποτελούν περίπου το 50% της λιπιδικής μάζας, η χοληστερόλη περίπου 25% και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποτελούν περίπου το 15% των λιπιδίων. Επίσης παρούσες είναι και μικρότερες ποσότητες θειικών αλάτων χοληστερόλης και εστέρων χοληστερόλης, ενώ τα φωσφολιπίδια είναι πρακτικώς απόντα. Μια από τις 6 κύριες τάξεις κεραμιδίων, το κεραμίδιο 1 θεωρείται μοναδικά σημαντικό στο σχηματισμό των κερατινοκυττάρων. Αποτελείται από σφιγγοσίνη και μια μακριά αλυσίδα, 30 κορεσμένων, μονο- και δι-ακόρεστων ω-υδροξυοξέων στον αμιδικό δεσμό. Η χοληστερόλη μειώνει την κινητικότητα της αλυσίδας. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποτελούνται κυρίως από μακριές αλυσίδες κορεσμένων λιπαρών οξέων με περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα. Το ολεϊκό (6%) και το λινολεϊκό (2%) οξύ είναι τα μόνα ακόρεστα λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται στην κεράτινη στοιβάδα.

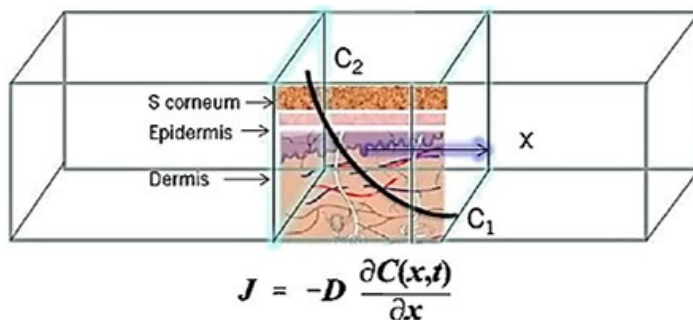
Μείωση της συγκέντρωσης καθενός από αυτά τα βασικά λιπίδια επηρεάζει την ακεραιότητα του φραγμού. Δύο από τα μοντέλα οργάνωσης του λιπιδικού φραγμού είναι το «μοντέλο επικρατούς μωσαϊκού» και το «μοντέλο πλαστικού μωσαϊκού». Το πρώτο θεωρεί το λιπιδικό στρώμα ως διφασικό στρώμα με μια ασυνεχή κρυσταλλική δομή εμβαπτισμένη σε μια συνεχή κρυσταλλική δομή. Οι κρυσταλλικές περιοχές θεωρούνται αδιαπέραστες, ενώ οι υγρές κρυσταλλικές περιοχές είναι διαπερατές και το νερό βρίσκεται κυρίως στις υγρές κρυσταλλικές περιοχές. Το δεύτερο μοντέλο που έχει προταθεί ως φραγμός είναι το πλαστικό μοντέλο. Βασίζεται στα ευρήματα ότι μόνο κορεσμένα λιπίδια με μακριές αλυσίδες αλκυλίων μαζί με χοληστερόλη είναι παρόντα στην εξωκυτταρική περιοχή της κεράτινης στοιβάδας. Στην ατοπική δερματίτιδα, την ψωρίαση και άλλες δερματικές παθήσεις, ο φραγμός διείσδυσης είναι λιγότερο αποτελεσματικός. Η μειωμένη λειτουργία του φραγμού σε ασθενείς με ατοπική

δερματίτιδα προκύπτει από τη μειωμένη ποσότητα κεραμιδίων (ιδίως του κεραμιδίου 1) και διατάραξη της δομής των επιφανειακών λιπιδίων (Bouwstra and Ponc, 2006). Επιπλέον, υπάρχει ένα ασυνεχές μοτίβο λιπιδικής οργάνωσης των πρωτεϊνών των δεσμοσωμάτων.

3.8 Διαδερμική διαπερατότητα

Η διάχυση είναι μία παθητική κινητική διαδικασία που λαμβάνει χώρα κάτω από μια βαθμιδωτή συγκέντρωση, από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε μία περιοχή χαμηλότερης συγκέντρωσης. Η σταθερή κατάσταση διάχυσης μπορεί να περιγραφεί χρησιμοποιώντας τον πρώτο νόμο του Fick (Subramony, 2013, 2004; Wiedersberg and Guy, 2014) (εξίσωση 1).

$$J = -AD \left(\frac{dC}{dx} \right) \quad \text{Εξίσωση 1 1ος Νόμος του Fick}$$



Εικόνα 18 Περιγραφή ροής κατά μήκος του δέρματος από ένα διαδερμικό έμπλαστρο (Alkilani et al., 2015)

Η εξίσωση αυτή περιγράφει το ρυθμό ροής (J) της διάχυσης μιας ουσίας μέσω της επιφάνειας (A) της μεμβράνης, ως ανάλογη προς την ταχύτητα της μοριακής κίνησης μέσα από το μέσο διάχυσης (ή συντελεστής διάχυσης, D) και προς την βαθμίδα συγκέντρωσης που μετριέται κατά μήκος της μεμβράνης (dC/dx). Το αρνητικό πρόσημο δηλώνει ότι η διάχυση συμβαίνει σε κατεύθυνση αντίθετη από αυτή που αυξάνεται η συγκέντρωση.

Ο δεύτερος νόμος του Fick (εξίσωση 2) προέρχεται από την εξίσωση 1 για να περιγράψει τη διάχυση υπό μη-σταθερή κατάσταση. Ο νόμος αυτός είναι μια μερική διαφορική εξίσωση που συσχετίζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης με το χρόνο και το ρυθμό μεταβολής στην βαθμίδα συγκέντρωσης (Jasti and Ghosh, 2004).

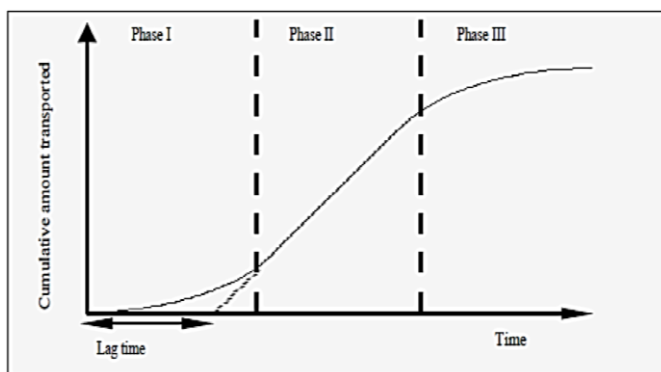
$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad \text{Εξίσωση 2 2ος Νόμος του Fick}$$

Μια αναλυτική λύση της εξίσωσης αυτής μπορεί να περιγράψει το προφίλ συγκέντρωσης ενός μορίου διαμέσου του δέρματος καθώς εξελίσσεται με την ώρα. Όταν το φάρμακο εφαρμόζεται στην μεμβράνη σε μια μέγιστη συγκέντρωση στο σταθερό διαμέρισμα του δότη και διατηρώντας συνθήκες βύθισης στο διαμέρισμα του υποδοχέα σε σταθερή κατάσταση, τότε η εξίσωση 2 μπορεί να γίνει ως εξής (Jasti and Ghosh, 2004):

$$J = AD \frac{C_m}{h} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

όπου C_m είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στο διαμέρισμα του δότη και h το πάχος φραγμού διάχυσης. Ο συντελεστής κατανομής (K) του φαρμάκου, μπορεί να καθοριστεί περαιτέρω ως ο λόγος μεταξύ της συγκέντρωσης του δότη (C_v) και του δέκτη (C_r). Έτσι προκύπτει μια τροποποιημένη μορφή του πρώτου νόμου του Fick (Jasti and Ghosh, 2004) (εξίσωση 4).

$$J = \frac{ADK(C_v - C_r)}{h} \quad \text{Εξίσωση 4 Τροποποιημένη μορφή του 1ου Νόμου του Fick}$$



Εικόνα 19 Διάγραμμα της ποσότητας μιας δραστηκής ουσίας που απορροφάται από το δέρμα σε συνάρτηση με τον χρόνο (Φράγκου, 2007)

Για την ενίσχυση της παθητικής διάχυσης ενός φαρμάκου, η αυξημένη ροή του φαρμάκου μπορεί να επιτευχθεί με μια αλλαγή του D , K και C στην εξίσωση 4. Ωστόσο, οι ενισχυτές διαπέρασης στο δέρμα, μπορούν να αλλάξουν τη συμπεριφορά του φαρμάκου μέσα στην κεράτινη στοιβάδα ή/και τις ιδιότητες διάχυσής του (Lane, 2013a). Γενικά, η διάχυση του φαρμάκου στην κεράτινη στοιβάδα καθορίζεται κατά μεγάλο βαθμό από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου καθώς και της κεράτινης στοιβάδας. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί μαθηματικά πρότυπα τα οποία συσχετίζουν τις πειραματικές τιμές της διαπερατότητας του φαρμάκου μέσω ακέραιου δέρματος με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου. Το

πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μαθηματικό μοντέλο είναι η εξίσωση Potts και Guy (εξίσωση 5) (Potts and Guy, 1992):

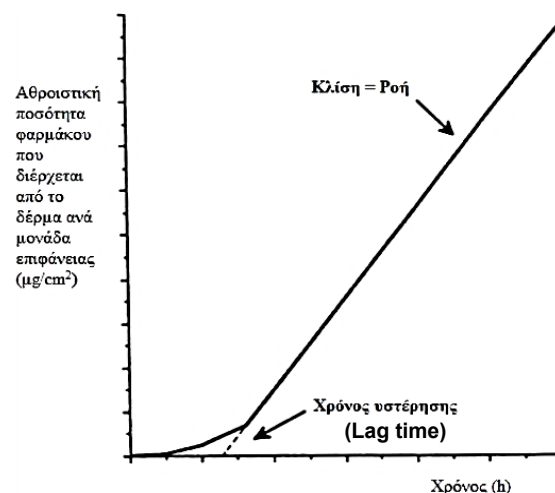
$$\log k_p = -2.72 + 0.71 \log K_o/w - 0.0061 M_w \quad \text{Εξίσωση 5 Potts and Guy}$$

όπου, ο ρυθμός διαπέρασης (k_p) εξαρτάται από το συντελεστή μερισμού στο σύστημα οκτανόλης/νερού (K_o/w) και το μοριακό βάρος του φαρμάκου (M_w) (Russell and Guy, 2009).

Επίσης, η διαπέραση ενός φαρμάκου μέσω του άθικτου δέρματος απαιτεί φάρμακα με μοριακό βάρος μικρότερο από 500 Da (ο κανόνας των 500 Da), μέτριο βαθμό λιποφιλικότητας (επαρκή μερισμό μεταξύ οκτανόλης-νερού 10-1000) και υψηλό σημείο τήξης μικρότερο των 200 °C (Brown et al., 2006; Thong et al., 2007). Ακόμη και να έχει αυτές τις ιδιότητες ένα συστατικό, συνήθως είναι αναγκαία η συνεισφορά επιπρόσθετων μέσων για την αύξηση της διαπερατότητας διαμέσου του δέρματος (Daniels, 2004).

Η αθροιστική ποσότητα του φαρμάκου που διέρχεται διαμέσου του δέρματος ανά μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) σε σχέση με το χρόνο, φαίνεται στην

Εικόνα 20. Η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης παρέχει τη ροή σε σταθεροποιημένη κατάσταση ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$), ενώ η τομή με τον άξονα του χρόνου παρέχει τον χρόνο υστέρησης (lag time).



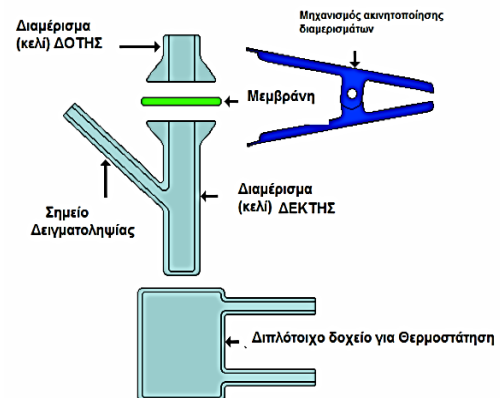
Εικόνα 20 Αθροιστική ποσότητα φαρμάκου που διέρχεται από το δέρμα να μονάδα επιφάνειας ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)(Karagianni, 2014)

Με τα παθητικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί απελευθέρωση φαρμάκου περίπου $1 \text{ mg} / \text{cm}^2$, δηλαδή με τα συνήθη μεγέθη επιθέματος από 10 έως 40 cm^2 , ημερήσια δόση φαρμάκου από 10 έως 40 mg μπορεί να εφαρμοστεί στο δέρμα. Οι τεχνικές

φυσικής ενίσχυσης σχεδιάζονται για να παρέχουν το φάρμακο μέσω μικρότερων επιφανειών του δέρματος. Παρόλα αυτά, μπορούν να επιτρέψουν την διείσδυση μεγαλύτερων ποσοτήτων φαρμάκων ακόμη και για μεγάλα μόρια.

3.9 Ex-vivo διείσδυση φαρμάκων στο δέρμα

Οι συσκευές διάχυσης (diffusion cells) χρησιμοποιούνται ευρέως προκειμένου να αξιολογηθεί η διείσδυση μορίων μέσα στο δέρμα και η διαπέραση ουσιών μέσω του δέρματος σε συνθήκες ex-vivo. Στις συσκευές αυτές, το φάρμακο εφαρμόζεται στο διαμέρισμα του δότη το οποίο διαχωρίζεται από το διαμέρισμα υποδοχής με μια μεμβράνη. Συνήθως, επιλέγεται η κατάλληλη μεμβράνη και το κατάλληλο υγρό στον υποδοχέα (RF) έτσι ώστε να μιμείται τις in vivo συνθήκες όσο το δυνατόν καλύτερα. Ως μεμβράνη μπορούν να χρησιμοποιούνται τμήματα ανθρώπινου



Εικόνα 21 Διάταξη Franz cells (Ντυμένου, 2012)

δέρματος ή δέρματος πειραματόζωου ή τεχνητή μεμβράνη. Γενικά, το ανθρώπινο δέρμα προτιμάται. Το δέρμα που χρησιμοποιείται στις μελέτες διαπέρασης αφαιρείται με χειρουργική επέμβαση και απαιτεί έκπλυση του δέρματος ή προεργασία με αντισηπτικά. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα του ανθρώπινου δέρματος είναι περιορισμένη, συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και υποκατάστατα δέρματος από άλλες πηγές. Το δέρμα του χοίρου είναι σχετικά ανάλογο με το ανθρώπινο δέρμα και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε ex vivo μελέτες διαπέρασης. Μελέτες έχουν δείξει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ in vivo πειραμάτων σε ανθρώπινο δέρμα και ex vivo πειραμάτων σε απομονωμένο δέρμα χοίρου (Herkenne et al., 2006). Επιπλέον, η ιστολογία και οι διαστάσεις του δέρματος χοίρου είναι πολύ παρόμοιες με την ιστολογία και τις διαστάσεις του ανθρώπινου δέρματος. Εκτός από το δέρμα του χοίρου, έχει χρησιμοποιηθεί και δέρμα από τρωκτικά προκειμένου να μελετηθεί η διείσδυση στο δέρμα, αν και η διαπέραση διαμέσου του δέρματος αυτού είναι πολύ υψηλότερη από τη διαπέραση κατά μήκος του ανθρώπινου δέρματος λόγω της πολύ λεπτότερης κεράτινης στιβάδας (SC) στο δέρμα των τρωκτικών σε σύγκριση με το ανθρώπινο.

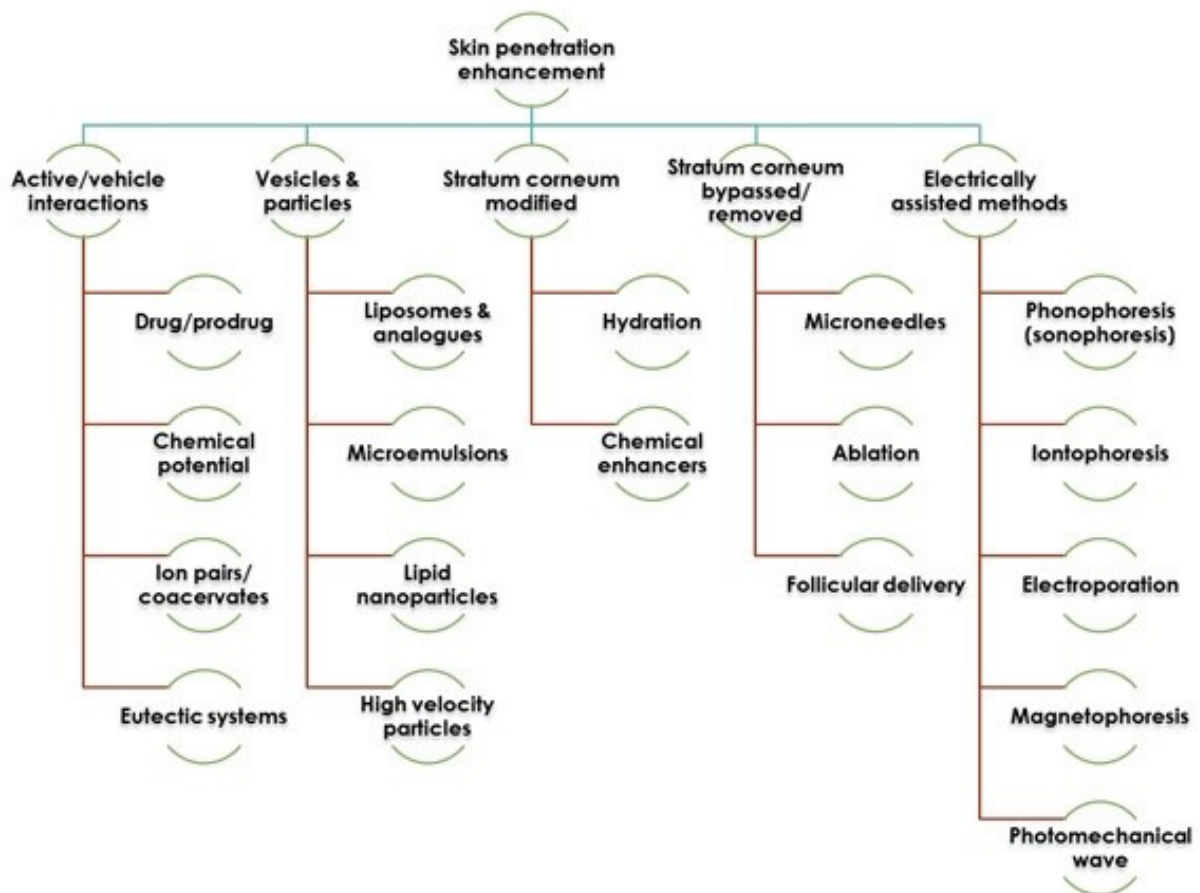
Είδος	SC (μm)	Επιδερμίδα (μm)	Πλήρες δέρμα (mm)
Άνθρωπος	16.8 ± 0.7	46.9 ± 2.3	2.97 ± 0.28
Χοίρος	26.4 ± 0.4	65.8 ± 1.8	3.43 ± 0.05
Ποντίκι	5.8 ± 0.3	12.6 ± 0.8	0.84 ± 0.02

Εικόνα 22 Σύγκριση πάχους δέρματος σε διάφορα είδη οργανισμών (Ντυμένου, 2012)

3.10 Μέθοδοι ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης φαρμάκων

Αρκετές τεχνικές ενίσχυσης της διείσδυσης έχουν αναπτυχθεί για να ξεπεραστεί ο φραγμός του δέρματος και να διευκολυνθεί η διείσδυση των φαρμάκων, όπως είναι πεπτιδία, πρωτεΐνες και άλλα μόρια τα οποία είναι συνήθως μεγάλα, πολικά ή/και φορτισμένα, τα οποία καθιστούν δύσκολη την διαδερμική χορήγηση (Naik et al., 2000). Όλες αυτές οι τεχνικές είναι μη επεμβατικές ή ελαφρώς επεμβατικές και ταξινομούνται σε πέντε κατηγορίες:

- (i) μέθοδοι που προσαρμόζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων του φαρμάκου ή αυξάνουν το χημικό δυναμικό του (προφάρμακο),
- (ii) μέθοδοι που μεταβάλλουν προσωρινά την δομή του δέρματος ή τροποποιούν το συντελεστή κατανομής φαρμάκου/δέρματος για να μειωθεί η αντίσταση της κεράτινης στοιβάδας (π.χ. χημικοί ενισχυτές)
- (iii) μέθοδοι που παρέχουν φάρμακα με τη βοήθεια «μεταφορέων» πχ. λιποσώματα, νανογαλακτώματα
- (iv) μέθοδοι που χρησιμοποιούν πίεση ή ηλεκτρικό φορτίο για την πρόκληση αυξανόμενης ροής φαρμάκων (π.χ. ιοντοφόρηση) και
- (v) μέθοδοι που διαταράσσουν φυσικά ή καταστρέφουν το δέρμα για να δημιουργήσουν νέες οδούς που θα επιτρέπουν την ροή φαρμάκου μέσω του δερματικού φραγμού (π.χ. μικροβελόνες) (Han and Das, 2015).



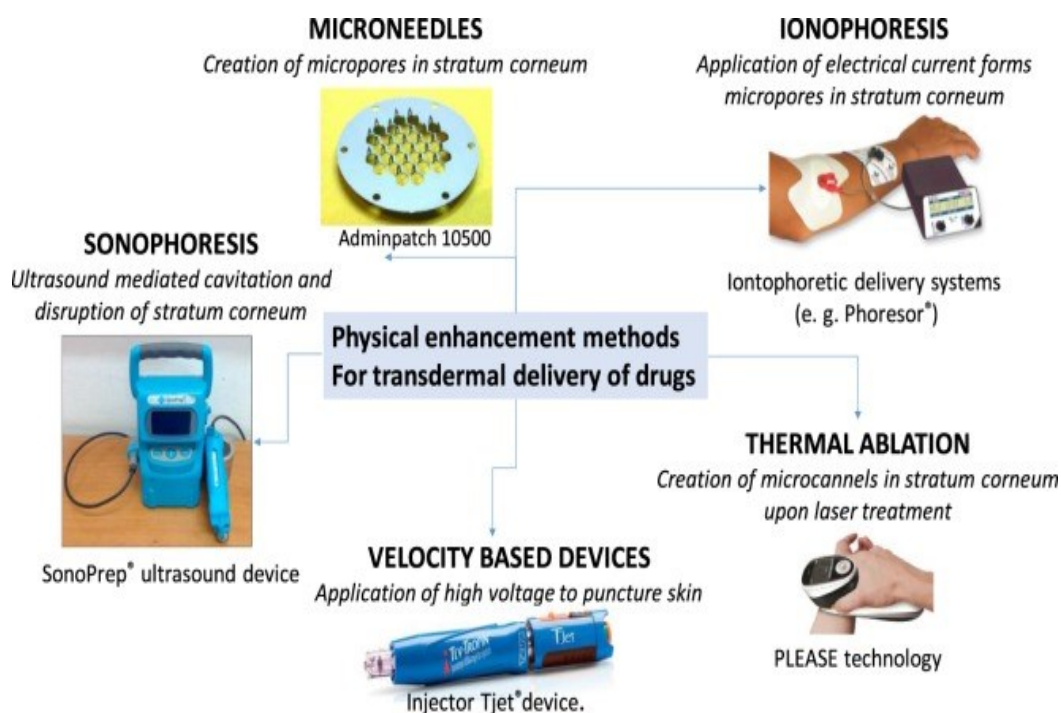
Εικόνα 23 Μέθοδοι για την ενίσχυση διαδερμικής διαπερατότητας (Daniels, 2004; Han and Das, 2015)

Το 2008, ο Prausnitz και ο Langer δημοσίευσαν ένα έγγραφο στο οποίο πρότειναν τρεις γενιές διαδερμικών συστημάτων χορήγησης φαρμάκων (TDDS) (Prausnitz and Langer, 2008):

- I. Η πρώτη γενιά TDDS περιλαμβάνει παραδοσιακά επιθέματα όπως κλονιδίνη ή οιστρογόνα. Επί του παρόντος, υπάρχουν δύο τύποι απλών επιθεμάτων (Scheindlin, 2004):
 - a. liquid reservoir system
 - b. adhesive matrix system
 Τα περισσότερα διαθέσιμα σήμερα έμπλαστρα, είναι τύπου μήτρας (adhesive matrix system).
- II. Τα TDDS 2ης γενιάς περιλαμβάνουν επιθέματα συν κάποιο είδος ενίσχυσης για τη βελτίωση της χορήγησης φαρμάκων. Η 2η γενιά TDDS επιχειρεί να ενισχύσει την παροχή οργανικών μορίων μέσω της κεράτινης στιβάδας διαταράσσοντας τη λειτουργία φραγμού της και / ή παρέχοντας κάποιο είδος κινητήριας δύναμης για

την κίνηση μορίων μέσω της επιδερμίδας (Dua et al., 2009). Η διαταραχή αυτή πρέπει να είναι αναστρέψιμη και να αποφεύγεται ο τραυματισμός του δέρματος. Εντούτοις, μπορεί να είναι δύσκολη η διαταραχή του φραγμού χωρίς να προκαλείται βλάβη ή ερεθισμός, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται χημικοί ενισχυτικές. Επιπλέον, αυτές οι τεχνικές ενίσχυσης δεύτερης γενιάς περιορίζονται σε μικρά, λιπόφιλα μόρια και έχουν μικρή επίδραση σε μεγαλύτερα ή υδρόφιλα μόρια. Οι μέθοδοι ενίσχυσης δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν χημικούς ενισχυτές διείσδυσης, ήπια θέρμανση και ιοντοφόρηση.

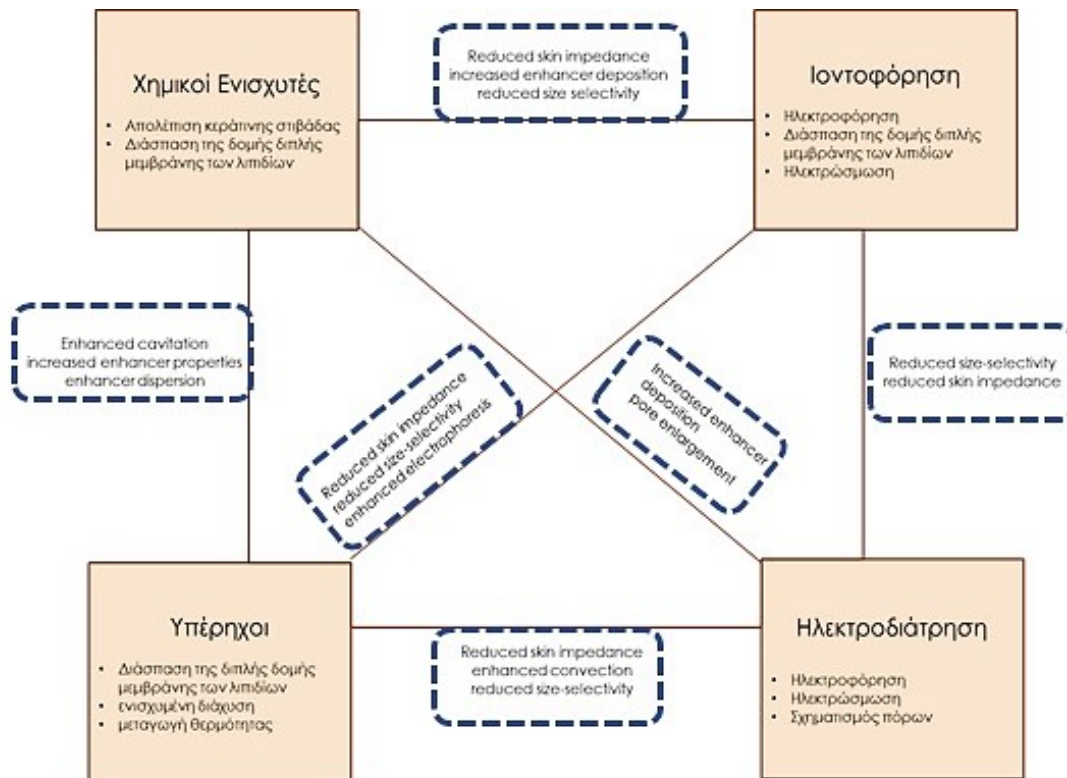
III. Η τρίτη γενιά TDDS χρησιμοποιεί νέες τεχνολογίες για την αύξηση της διαπέρασης των μορίων που μπορούν να διανεμηθούν μέσω του δέρματος. Η τρίτη γενιά TDDS στοχεύει να διαταράξει αρκετά την κεράτινη στιβάδα, επιτρέποντας στα μεγάλα μόρια να περάσουν στην κυκλοφορία.



Εικόνα 24 Παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων προϊόντων για διαδερμική χορήγηση φαρμάκου με τη βοήθεια φυσικών ενισχυτών και ο τρόπος δράσης τους (Szunerits and Boukherroub, 2018).

3.10.1 Συνδυασμός μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης

Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζονται οι μηχανισμοί δράσεων των φυσικών ενισχυτών διαδερμικής διείσδυσης (σε ορθογώνια πλαίσια) και οι πιθανές συνέργειες μεταξύ τους όπως απεικονίζονται στα πλαίσια σύνδεσης (στρογγυλεμένα ορθογώνια).



Εικόνα 25 Συνδυασμός φυσικών μεθόδων ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης (Barry, 2001; Mitragotri, 2000)

Οι χημικές τεχνικές ενίσχυσης και οι τεχνικές τροποποίησης είναι κατάλληλες για μικρά μόρια, ενώ για διαδερμική χορήγηση μεγάλων μορίων καταλληλότερες είναι οι τεχνικές φυσικής ενίσχυσης (Benson and Namjoshi, 2008).

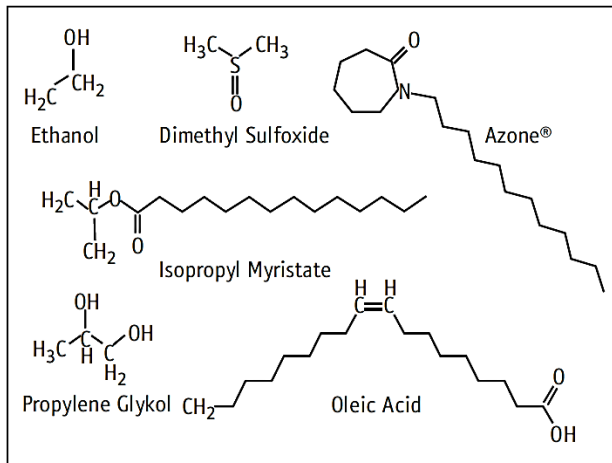
Στην μεταπτυχιακή εργασία επικεντρωθήκαμε στη χρήση χημικών ενισχυτών διαπέρασης και στη χρήση ιοντοφόρησης για την ενίσχυση διαδερμικής απορρόφησης αντιδιαβητικού φαρμάκου και θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω.

Κεφάλαιο 4 :

Χημικοί Ενισχυτές διαπέρασης

Οι χημικοί ενισχυτές διαπέρασης βρίσκουν συχνά εφαρμογή για τον έλεγχο της απορρόφησης των φαρμάκων. Στην εικόνα 26, φαίνονται οι χημικές δομές ορισμένων τυπικών χημικών ενισχυτών διαπερατότητας. Ιδιαίτερη σημασία έχει η κατανόηση

των μηχανισμών δράσης των ενισχυτών διαπέρασης, που είναι υπεύθυνοι για την αυξημένη διαπέραση του φαρμάκου. Η σπουδαιότερη θεωρία που έχει διατυπωθεί για την ερμηνεία του τρόπου δράσης τους είναι η θεωρία Lipid-Protein-Partitioning (ή συνοπτικά θεωρία LPP) (Barry, 1991). Ο πυρήνας της θεωρίας αυτής είναι ότι οι ενισχυτές διαπέρασης συνήθως λειτουργούν με έναν ή περισσότερους κύριους μηχανισμούς (Barry, 1991, 2001; Williams and Barry, 2012):



Εικόνα 26 Χημικές δομές τυπικών χημικών ενισχυτών της διαπερατότητας (Φράγκου, 2007)

- ο Προκαλούν αλλαγές στις λιπιδικές περιοχές (Lipid).

Οι επιταχυντές δρουν στη λιπόφιλη περιοχή της κεράτινης στιβάδας. Είναι γνωστό ότι διαταράσσουν την οργάνωση των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας με αποτέλεσμα να την καθιστούν πιο διαπερατή. Τα μόρια αυτά εισέρχονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα και δημιουργούν μικρές

κοιλότητες με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο διαθέσιμος όγκος για τη διάχυση του φαρμάκου. Με το μηχανισμό αυτό δρουν το Azone, τα τερπένια, τα λιπαρά οξέα (π.χ. ολεϊκό οξύ), το DMSO και οι αλκοόλες. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις οι επιταχυντές αυτοί δεν αναμιγνύονται ομοιογενώς με τα λιπίδια αλλά σχηματίζουν ξεχωριστές περιοχές ανάμεσα στα λιπίδια ("pool" domains).

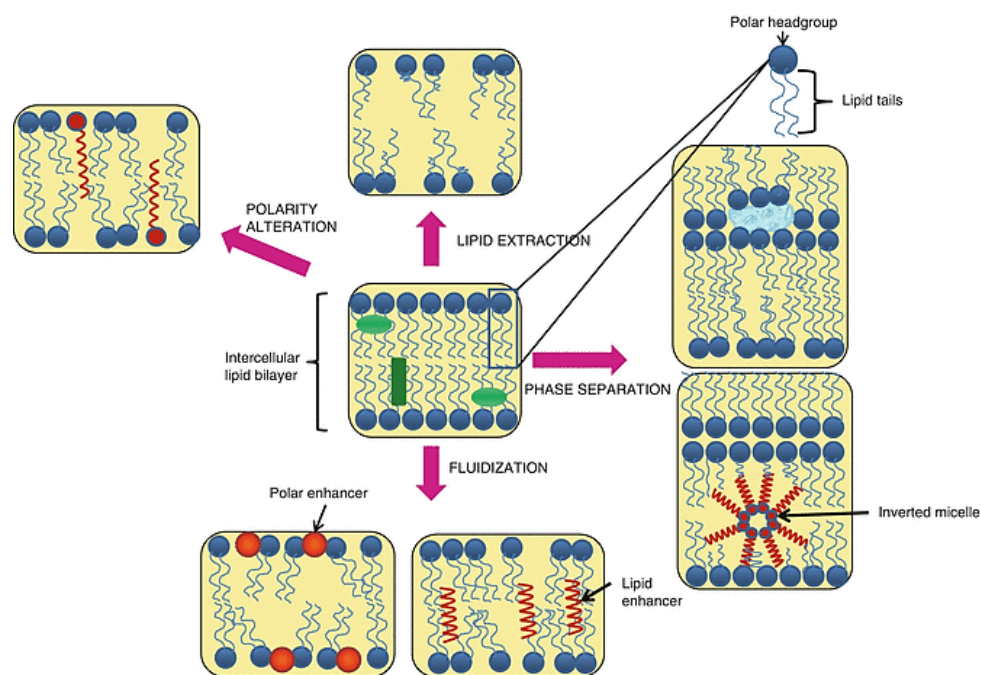
- ο Επιδρούν στις πρωτεΐνες της κεράτινης στοιβάδας (Protein).

Με αυτό το μηχανισμό, ουσίες όπως τα σουλφοξείδια και τα επιφανειοδραστικά αλληλεπιδρούν με την κερατίνη των κερατινοκυττάρων με αποτέλεσμα να χαλαρώνουν την πυκνή δομή της και αυτό καθιστά την κερατίνη στιβάδα λιγότερο συμπαγή. Τα μόρια που εμφανίζουν τη δράση τους στις πρωτεΐνες μπορούν να μεταβάλλουν και τους δεσμούς των πεπτιδίων στη διπλοστιβάδα και να δημιουργούν κανάλια νερού ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό τη διάχυση του φαρμάκου.

- ο Αυξάνουν τον συντελεστή κατανομής στο δέρμα, του φαρμάκου ή άλλων ενισχυτών διαπέρασης (Partitioning).

Πολλοί διαλύτες όταν εισέρχονται στην κερατίνη στιβάδα μεταβάλλουν τις ιδιότητες της καθώς μεταβάλλουν τη χημική ισορροπία με αποτέλεσμα να αυξάνουν την

κατανομή ενός δευτέρου μορίου στην κεράτινη στιβάδα. Αυξάνοντας το συντελεστή κατανομής στην υδατική περιοχή μεταξύ των λιπιδικών διπλοστιβάδων αυξάνεται και η ικανότητα διάλυσης λιπόφιλων μορίων στο σημείο εκείνο με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου. Μικρά πολικά μόρια όπως οι πυρρολιδόνες, η προπυλενογλυκόλη και η αιθανόλη, συσσωρεύονται στην κεράτινη στιβάδα και αυξάνουν την κατανομή του φαρμάκου ή ενός άλλου επιταχυντή, εμφανίζοντας συνεργιστική δράση.



Εικόνα 27 Πιθανές δράσεις ενισχυτών διαπέρασης (Dragicevic et al., 2015)

Είναι συχνό φαινόμενο να εμφανίζουν οι επιταχυντές διαπέρασης περισσότερους από ένα μηχανισμό δράσης. Πρακτικά λοιπόν, ουσίες που μεταβάλλουν τη διάταξη της λιπιδικής διπλοστιβάδας αυξάνουν και το συντελεστή κατανομής λιπόφιλων φαρμάκων. Επιπλέον, μπορούν να δρουν τόσο στις πρωτεΐνες όσο και στα λιπίδια όπως συμβαίνει στην περίπτωση του DMSO. Τέλος, μπορεί να εμφανίζουν συνεργιστική δράση όπως συμβαίνει για την προπυλενογλυκόλη σε συνδυασμό με το ολεϊκό οξύ.

Αν και υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατάταξης των ενισχυτών διαπέρασης, που λαμβάνουν υπόψη τους φυσικοχημικά και άλλα κριτήρια, ο απλούστερος και πλέον αποδεκτός τρόπος είναι η κατάταξη ανάλογα με τη χημική κατηγορία που ανήκουν.

Chemical classification	Enhancer
Alcohols	<i>Short chain alcohols</i> Ethanol, Isopropyl alcohol <i>Long chain alcohols</i> Decanol, Hexanol, Lauryl alcohol, Myristyl alcohol, Octanol, Octyl dodecanol, Oleyl alcohol
Amides	<i>Cyclic amides</i> Azone
Esters	<i>Alkyl esters</i> Ethyl acetate <i>Benzoic acid esters</i> Octyl salicylate, Padimate O <i>Fatty acid esters</i> Ethyl oleate, Glyceryl monooleate, Glyceryl monocaprate, Glyceryl tricaprilate Isopropyl myristate, Isopropyl palmitate, Propylene glycol monolaurate, Propylene glycol monocaprilate
Ether alcohols	Transcutol®
Fatty acids	Lauric acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Myristic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Isostearic acid
Glycols	Dipropylene glycol, Propylene glycol, 1,2-butylene glycol, 1,3- butylene glycol
Pyrrolidones	N-methyl-2-pyrrolidone, 2-pyrrolidone
Sulphoxides	Decylmethyl sulphoxide, Dimethyl sulphoxide
Surfactants	<i>Anionic surfactants</i> Sodium lauryl sulphate <i>Cationic surfactants</i> Alkyl dimethylbenzyl ammonium halides Alkyl trimethyl ammonium halides Alkyl pyridinium halides <i>Non-ionic surfactants</i> Brij 36T Tween 80
Terpenes	<i>Monoterpenes</i> Eugenol, <i>n</i> -Limonene, Menthol, Menthone <i>Sesquiterpenes</i> Farnesol, Neridol

Πίνακας 8 Κατάταξη ενισχυτών διαπέρασης ανά χημική κατηγορία (Lane, 2013a)

Συνοπτικά, οι κυριότερες κατηγορίες επιταχυντών είναι : η Αζόνη, τα σουλφοξειδία, οι πυρρολιδόνες, τα λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες, η προπυλενογλυκόλη, τα επιφανειοδραστικά, η ουρία, τα τερπένια, τα φωσφολιπίδια και οι οργανικοί διαλύτες σε υψηλές συγκεντρώσεις. Κάθε ενισχυτής διαπέρασης που δρα στο δέρμα θα πρέπει να έχει συγκεκριμένες ιδιότητες (Williams and Barry, 2012) οι οποίες είναι οι εξής:

- Να μεταβάλει αντιστρεπτά τις ιδιότητες του φραγμού της κεράτινης στιβάδας
- Να έχει κατάλληλη διάρκεια δράσης ανάλογα με το υπό χρήση φάρμακο
- Να είναι χημικά και φυσικά συμβατοί στο σύστημα χορήγησης
- Να μην έχει καμία φαρμακολογική δράση με το δέρμα
- Να μην είναι τοξικός, ερεθιστικός και αλλεργιογόνος
- Να έχει ταχεία έναρξη δράσης

4.1 Αλκοόλες

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ευρέως στη διαδερμική χορήγηση. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί όσο αφορά τη δράση της αιθανόλης, καθώς έχει διπλό ρόλο, ως ενισχυτής

και ως συνδιαλύτης. Ως διαλύτης, η αιθανόλη είναι σε θέση να αυξήσει τη διείσδυση του φαρμάκου, εξάγοντας τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες και με τον τρόπο αυτό τελικά να αυξήσει το πορώδες της κεράτινης στιβάδας (Williams and Barry, 2012). Έτσι, η διείσδυση υδρόφιλων φαρμακευτικών ουσιών διευκολύνεται. Η ενίσχυση της διείσδυσης των λιπόφιλων φαρμάκων χρησιμοποιώντας αλκοόλες οφείλεται στην υψηλότερη διαλυτότητα των φαρμακευτικών ουσιών στις λιπόφιλες περιοχές της κεράτινης στιβάδας λόγω της παρουσίας των αλκοολούχων ενισχυτών. Για υδατοδιαλυτά φάρμακα ένα ελάχιστο ποσό νερού είναι αναγκαίο για ενίσχυση. Το μήκος της αλυσίδας αλκυλίου είναι σημαντικό για τη δράση των αλκοολών στη διαπέραση. Η χρήση αλκοολών με παραπάνω από έξι άτομα άνθρακα έδειξε μία μείωση στο ποσοστό διείσδυσης κατά τη διάρκεια πειραμάτων με ινδομεθακίνη ως πρότυπο φάρμακο (Chien et al., 1988).

4.2 Εστέρες

Μόρια των οποίων οι δομές μιμούνται εκείνα των φωσφολιπιδίων, εκείνα δηλαδή με μικρή, πολική κεφαλή και μακρά υδρογονανθρακική ουρά, εισάγονται στη λιπιδική διπλοστιβάδα και αυξάνουν τη ρευστότητα εντός αυτού του στρώματος. Εάν η διπλοστιβάδα είναι περισσότερο ρευστή, θα είναι ευκολότερο για τα μόρια του φαρμάκου να κινηθούν μέσα από αυτή, και έτσι ενισχύεται η μεσοκυττάρια κίνηση. Παραδείγματα αποτελούν οι ουσίες glyceryl monooleate και lauryl lactate (Wilson, 2011).

4.3 Αζόνη

Η Αζόνη (λαυροκαπράμη) και τα παράγωγά της αποτελούν τα πρώτα μόρια τα οποία σχεδιάστηκαν ειδικά ως ενισχυτές διαπέρασης. Η Αζόνη είναι ένα εξαιρετικά λιπόφιλο υγρό με συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού 6,21 (Kalbitz et al., 1996). Η ανθρακική αλυσίδα του μορίου της αζόνης αποτελείται από 12 άτομα άνθρακα και είναι μια χημικά σταθερή ένωση. Η ουσία έχει πολύ χαμηλή τοξικότητα και διερευνήθηκε σε μεγάλο βαθμό τη δεκαετία του 1980. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτής διαπέρασης τόσο για υδρόφιλες όσο και για λιπόφιλες ουσίες. Η δράση της αζόνης πιθανώς οφείλεται σε αλλαγές στις λιπιδικές περιοχές της κεράτινης στιβάδας. Αξιοσημείωτο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αζόνη είναι αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-10%) (Trommer and Neubert,

2006). Η δραστηριότητά της μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη συν-διαλυτών όπως προπυλενογλυκόλη, πολυαιθυλενογλυκόλη ή αιθανόλη.

4.4 Γλυκόλες

Μεταξύ των πολυσθενών αλκοολών, η προπυλενογλυκόλη (PG) και η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ενισχυτές διαπέρασης στη δερματολογία, παρόλο που η δράση τους ακόμα και σήμερα συζητείται αμφιλεγόμενα στη βιβλιογραφία. Η δραστηριότητά τους περιορίζεται στο διάλυμα διαπέρασης, ωστόσο ο μηχανισμός δράσης τους έγκειται στο ότι διαλύουν την κεράτινη στιβάδα, καταλαμβάνοντας τις θέσεις των δεσμών υδρογόνου. Αυτό εξηγεί τη συνεργική δράση της προπυλενογλυκόλης και της πολυαιθυλενογλυκόλης με την αζόνη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται μεταξύ 1 και 70% w/w (Trommer and Neubert, 2006).

4.5 Αιθέρες Γλυκόλης

Ομοίως προς τα PG και PEG, η τρανσκουτόλη είναι ένας ισχυρός παράγοντας διαλυτοποίησης που χρησιμοποιείται σε διάφορες δοσολογίες. Πρόκειται για ένα διαυγές, άχρωμο και υγροσκοπικό υγρό. Δομικά είναι μια αλκοόλη και ένας αιθέρας, μία τριαιθυλενο-γλυκόλη της οποίας λείπει η μία ομάδα του υδροξυλίου. Φαίνεται να είναι πολύ ελκυστική ως ενισχυτής διαπέρασης λόγω της μη τοξικότητάς της, της βιοσυμβατότητάς της με το δέρμα και το γεγονός ότι είναι αναμίξιμη τόσο με πολικούς όσο και μη πολικούς διαλύτες. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η τρανσκουτόλη αυξάνει σημαντικά τη διαδερμική διείσδυση διαφόρων δραστικών ουσιών ιδιαίτερα εάν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κατάλληλους συν-διαλύτες (Lane, 2013b).

4.6 Τερπένια

Τα τερπένια είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Σήμερα γνωρίζουμε τη δομή χιλιάδων τερπενίων, μερικά από αυτά είναι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα είναι μόρια ανοιχτής αλυσίδας και άλλα περιέχουν δακτυλίους. Τα τερπένια μπορούν να βελτιώσουν τη διαπέραση τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων φαρμάκων παρόλο που χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-10% w/w) (Aqil et al., 2007).

4.7 Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)

Το διμεθυλοσουλφοξείδιο έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ως ένας απρωτικός διαλύτης και ενισχυτής διείσδυσης (Coldman et al., 1971; Klamerus and Lee, 1992; Maibach and Feldmann, 1967; Remane et al., 2006; Roth and Fuller, 2011). Ο Stoughton (1965) κατέδειξε την επαγωγή μιας "δεξαμενής" υδροκορτιζόνης *in vivo* στους ανθρώπους όταν τα φάρμακα ήταν διαλυμένα σε 40% DMSO: 60% αιθανόλη (Stoughton, 1965). Εκτός από τις ιδιότητες του συνδιαλύτη, έχουν προταθεί πολλοί μηχανισμοί για την ενίσχυση διείσδυσης ουσιών που εμφανίζονται με τη χρήση του DMSO σε χαμηλή συγκέντρωση (20%) συμπεριλαμβανομένης της μετατόπισης δεσμευμένου νερού από την κερατίνη (Allenby et al., 1969; Rammler and Zaffaroni, 1967), αλλαγές στη διαμόρφωση κερατίνης και / ή αλληλεπίδραση με αλυσίδες αλκυλ-λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα (Anigbogu et al., 1995). Λόγω του μικρού μοριακού μεγέθους του, το DMSO μπορεί εύκολα να διεισδύσει στην περιοχή της πρωτεϊνικής υπομονάδας (κερατίνη). Το DMSO στην συνέχεια μετατοπίζει το πρωτεϊνικό-νερό και παρεμποδίζει τη φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης (παρεμβαίνοντας με δεσμούς υδρογόνου και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις). Συνεπώς, τα φάρμακα / ενώσεις έχουν αρκετές χαλαρές ή εύκαμπτες περιοχές για να διεισδύσουν μέσω της κεράτινης στιβάδας (Wilson, 2011). Λόγω των σχετικά υψηλών ποσοτήτων DMSO που φαίνεται να χρειάζονται για τη βελτίωση διείσδυσης και τα συναφή ζητήματα ερεθισμού, αυτή η ένωση είχε περιοριστεί στη χρήση σε εμπορικά τοπικά προϊόντα. Εντούτοις, τα αδιαπέραστα χαρακτηριστικά του δέρματος αποκαθίστανται αμέσως μετά την απομάκρυνση του DMSO καθώς ο διαλύτης απομακρύνεται από το δέρμα πολύ γρήγορα (Barry, 1987). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν με τη χρήση μοριακών προσομοιώσεων ότι το DMSO πρέπει να είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις στο δέρμα ώστε να είναι αποτελεσματικό ως ενισχυτής διείσδυσης (Notman et al., 2008).

Κεφάλαιο 5 :

Ηλεκτρικό ρεύμα

5.1 Βασικές έννοιες ηλεκτρικού ρεύματος

Το ηλεκτρικό ρεύμα είναι η προσανατολισμένη κίνηση ηλεκτρικών φορτίων ή φορέων ηλεκτρικού φορτίου, κατά μήκος ενός ηλεκτροφόρου αγωγού. Το μέγεθος που μετρά το ηλεκτρικό ρεύμα είναι η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, που ορίζεται ως:

$$I = \frac{dQ}{dt}$$

Εξίσωση 6

δηλαδή ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος είναι ο ρυθμός διέλευσης του ηλεκτρικού φορτίου από τη διατομή ενός αγωγού. Πιο απλά, σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα περνάει από τη διατομή του αγωγού ηλεκτρικό φορτίο. Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος δείχνει πόσο φορτίο περνά στη μονάδα του χρόνου.

Το μέγεθος είναι μονόμετρο, αλλά επιπλέον έχει φορά (διάνυσμα) από τα σημεία ψηλού δυναμικού στα σημεία χαμηλού δυναμικού. Μετριέται στο διεθνές σύστημα μονάδων σε Αμπέρ (A) και θεωρείται θεμελιώδης μονάδα.

5.1.1 Ηλεκτρική τάση

Η ηλεκτρική τάση, ή απλώς τάση, είναι η τιμή της διαφοράς του ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ δύο σημείων. Μπορεί να είναι θετική, αρνητική ή μηδέν και έχει διαστάσεις ενέργειας προς ηλεκτρικό φορτίο και η μονάδα μέτρησης είναι το Βολτ (Volt).

5.1.2 Ηλεκτρική αντίσταση

Η ηλεκτρική αντίσταση ενός αγωγού είναι η δυσκολία (αντίσταση) που παρουσιάζεται στη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος δια μέσου ενός αγωγού. Η αντίθετη έννοια ονομάζεται ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οποία αναφέρεται στην ευκολία διέλευσης ηλεκτρικού ρεύματος. Στο Διεθνές σύστημα μονάδων (SI) η μονάδα ηλεκτρικής αντίστασης μετριέται σε Ohm (Ω), ενώ η ηλεκτρική αγωγιμότητα μετριέται σε μονάδα Siemens (S). Όλα τα υλικά παρουσιάζουν κάποια μορφή αντίστασης εκτός από τα υπεραγώγιμα υλικά τα οποία έχουν αντίσταση μηδέν.

Η αντίσταση (R) είναι μια μονάδα η οποία ορίζεται ως το κλάσμα της τάσης του υλικού (V) προς το ρεύμα (I). Η αγωγιμότητα (G) ορίζεται ως το ανάποδο:

$$R = \frac{V}{I}, \quad G = \frac{I}{V} = \frac{1}{R}$$

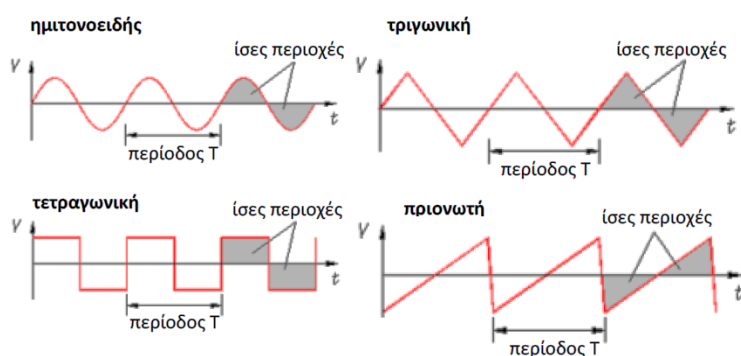
Εξίσωση 7 Αντίσταση *Εξίσωση 8 Αγωγιμότητα*

Για πολλά είδη υλικών και συνθήκες, τα V και I έχουν άμεση και γραμμική συσχέτιση, έτσι το R και G θεωρούνται σταθερές (παρόλο που μπορούν να επηρεάζονται από άλλες παραμέτρους, όπως την θερμοκρασία). Αυτή η αναλογία ονομάζεται νόμος του

Ohm και τα υλικά που ικανοποιούν αυτή τη σχέση ονομάζονται ωμικά υλικά. Ο Νόμος του Ohm συνδέει την Τάση, την Ένταση και την Αντίσταση.

5.1.3 Σήματα

Τα σήματα που αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα σχήματα ονομάζονται κυματομορφές. Τα σήματα που εναλλάσσουν τα επίπεδα τάσης μεταξύ θετικών και αρνητικών τιμών ονομάζονται εναλλασσόμενα ή AC σήματα. Στην παρακάτω εικόνα 28, φαίνονται διάφορες εναλλασσόμενες κυματομορφές. Οι εναλλασσόμενες κυματομορφές έχουν ως χαρακτηριστικό τις ίσες περιοχές πάνω και κάτω από τον



άξονα Χ. Ανάλογα με το σήμα οι κυματομορφές διακρίνονται σε ημιτονοειδείς, τετραγωνικές, τριγωνικές και πριονωτές.

Εικόνα 28 Εναλλασσόμενες κυματομορφές (Πηγή: Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, ΗΜΜΥ)

Η **περίοδος** της κυματομορφής ορίζεται ως ο χρόνος ενός πλήρους κύκλου της τάσης (από μηδέν σε μέγιστη θετική τιμή, μηδέν, μέγιστη αρνητική τιμή και πάλι μηδέν). Η **συχνότητα** της κυματομορφής ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων ανά δευτερόλεπτο. Μονάδα μέτρησης της συχνότητας είναι το Hz (Hertz). 1 Hz αντιστοιχεί σε ένα κύκλο το δευτερόλεπτο, 1 kHz (χιλιόκυκλος) σε χίλιους κύκλους το δευτερόλεπτο και 1 MHz (μεγάκυκλος) σε ένα εκατομμύριο κύκλους το δευτερόλεπτο.

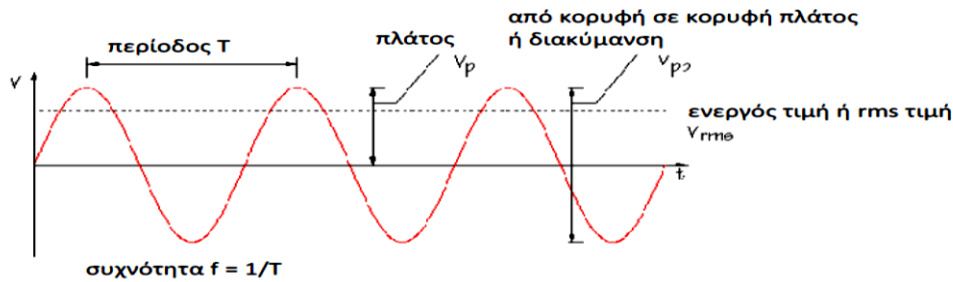
$$f = \frac{1}{T} \quad \text{Εξίσωση 9 Συχνότητα κυματομορφής}$$

5.1.4 Ημιτονοειδείς κυματομορφές

Ενεργός ένταση εναλλασσόμενου ρεύματος

Η ενεργός τιμή της εναλλασσόμενης τάσης ή rms τιμή (root mean square) ορίζεται ως η τιμή συνεχούς τάσης που παράγει την ίδια μέση ισχύ με την εναλλασσόμενη.

$$V_{rms} = V_o / \sqrt{2} \quad \text{Εξίσωση 10 Ενεργός τάση}$$



Εικόνα 29 Ημιτονοειδής εναλλασσόμενη τάση (Πηγή; Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, ΗΜΜΥ)

Ενεργός τιμή της έντασης του εναλλασσόμενου ρεύματος

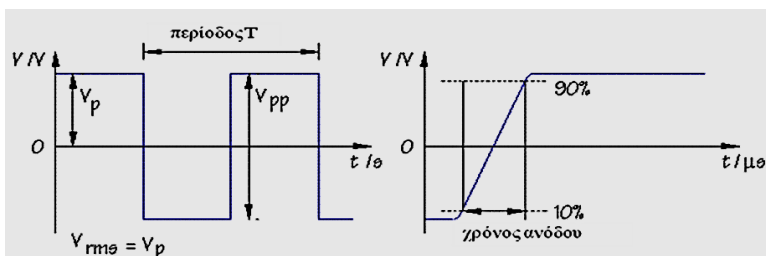
Ενεργός τιμή της έντασης του εναλλασσόμενου ρεύματος είναι η ένταση εκείνη του συνεχούς ρεύματος που αν περάσει μέσα από την ίδια κατανάλωση, στο ίδιο χρονικό διάστημα, δίνει τα ίδια αποτελέσματα με το εναλλασσόμενο ρεύμα. Συμβολίζεται με το γράμμα I. Εξορισμού, η ενδεικτική (ενεργός) τιμή ενός περιοδικού μεγέθους είναι ίση προς τη μέση τετραγωνική τιμή αυτού. Συνεπώς η ενεργός τιμή του ρεύματος ορίζεται από τη σχέση:

$$I = \sqrt{\frac{1}{T} \int_{t_1}^{T+t_1} i^2(t) \cdot dt} = \sqrt{\frac{1}{T} \int_{t_1}^{T+t_1} i_m^2 \cdot \cos^2(\omega t) dt} = \frac{i_m}{\sqrt{2}}$$

Εξίσωση 11 Ενεργός ένταση

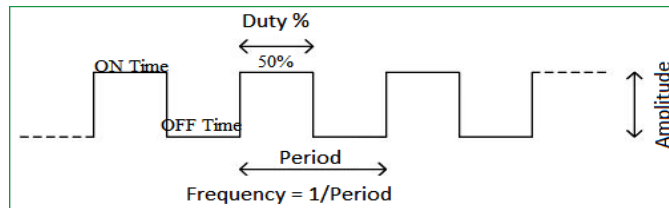
5.1.5 Τετραγωνικές Κυματομορφές

Η ενεργός τιμή είναι ίση με το πλάτος, αφού ναι μεν η τάση εναλλάσσεται από θετικές σε αρνητικές τιμές αλλά η απόλυτη τιμή του πλάτους μένει σταθερή. Η τετραγωνική τάση μπορεί να αλλάζει πολύ γρήγορα από τις θετικές στις αρνητικές τιμές, αλλά αυτό δεν μπορεί να συμβεί στιγμιαία. Χαρακτηριστικό της τετραγωνικής κυματομορφής είναι ο χρόνος ανόδου που ορίζεται ως η διάρκεια που χρειάζεται η τάση από το 10% να φθάσει το 90% της μέγιστης τιμής της.



Εικόνα 30 Τετραγωνική κυματομορφή (Πηγή; Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, ΗΜΜΥ)

Κύκλος λειτουργίας (duty cycle) $\frac{time\ on}{pulse\ width}$ ονομάζεται ο λόγος της διάρκειας του θετικού παλμού προς την περίοδο επί τοις εκατό. Όταν ο κύκλος λειτουργίας είναι 50% σημαίνει ότι η διάρκεια του θετικού και του αρνητικού παλμού είναι ίσες.



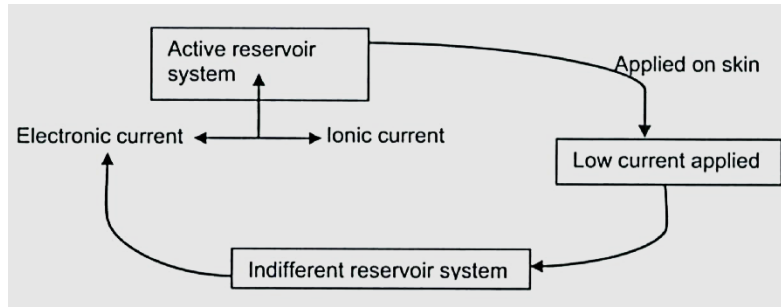
Εικόνα 31 Κύκλος λειτουργίας (Duty cycle)

Κεφάλαιο 6 :

Ιοντοφόρηση

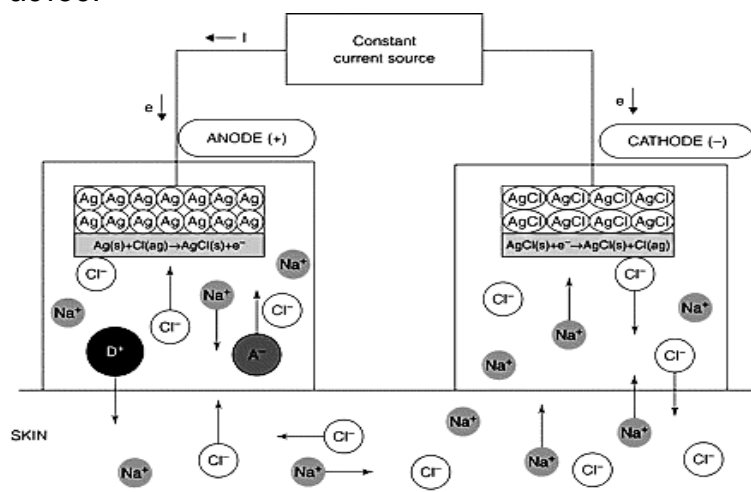
Ιοντοφόρηση ορίζεται ως η μεταφορά ιόντων με τη βοήθεια δυνάμεων ηλεκτρικού πεδίου. Με την μέθοδο της ιοντοφόρησης ηλεκτρικό ρεύμα χαμηλής έντασης (0.5 mA/cm^2 ή λιγότερο) εφαρμόζεται στο δέρμα, εξασφαλίζοντας έτσι την απαραίτητη δύναμη για την εισχώρηση των μορίων της χορηγούμενης ουσίας (Daniels, 2004; Williams and Barry, 2012). Το σύστημα αποτελείται από τη δεξαμενή της ουσίας, συνδεδεμένη με ένα ενεργό ηλεκτρόδιο ομόσημου φορτίου με εκείνο της χορηγούμενης ουσίας. Ένα ουδέτερο ηλεκτρόδιο τοποθετημένο σε ένα διαφορετικό σημείο συμπληρώνει το κύκλωμα, καθοδηγώντας τη χορηγούμενη ουσία διαμέσου της συγκεκριμένης διαδρομής με έναν απλό μηχανισμό απώθησης ηλεκτρικής φύσης, βασισμένο στα εξής φαινόμενα (Dhote, 2012; Masada et al., 1989):

- I. Το φορτισμένο ηλεκτρόδιο διώχνει ιόντα παρασέρνοντας μαζί με αυτά και την δραστική ουσία (electrorepulsion, electromigration).
- II. Η ροή του ρεύματος μειώνει την αντίσταση του δέρματος αυξάνοντας έτσι την διαπερατότητα.
- III. Το φαινόμενο της ηλεκτρώσμωσης οφείλεται στην επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου στις φορτισμένες μεμβράνες των δερματικών κυττάρων προκαλώντας τη ροή του διαλύτη διαμέσου αυτών και συμπαρασύροντας τα διαλυμένα μόρια της ουσίας και ιδιαίτερα όταν αυτά εμφανίζουν πολικότητα (electroosmosis).



Εικόνα 32 Σχηματική αναπαράσταση ιοντοφορητικού συστήματος (Dhote, 2012)

Για την αποτελεσματική χορήγηση ουσιών μέσω ιοντοφόρησης, ο θετικά φορτισμένος θάλαμος, που ονομάζεται άνοδος, απωθεί μια θετικά φορτισμένη χημική ουσία, ενώ η αρνητικά φορτισμένη κάθοδος, απωθεί μια αρνητικά φορτισμένη χημική ουσία στο δέρμα. Παρουσία ενός ηλεκτρικού πεδίου, η ηλεκροαπόθεση-ηλεκτρομετανάστευση και η ηλεκτρώσμωση είναι οι κυρίαρχες δυνάμεις στη μεταφορά ουσιών (Cullander, 1992). Αυτές οι κινήσεις μετρώνται σε μονάδες χημικής ροής ($\mu\text{mol} / \text{cm}^2 \text{h}$). Αυτή η τεχνική βασίζεται στη γενική αρχή ότι τα όμοια φορτία απωθούνται. Έτσι, κατά τη διάρκεια της ιοντοφόρησης, εάν είναι επιθυμητή η παροχή ενός θετικά φορτισμένου φαρμάκου (D^+), το φορτισμένο φάρμακο διαλύεται στον ηλεκτρολύτη που περιβάλλει το ηλεκτρόδιο παρόμοιας πολικότητας, δηλ. το ηλεκτρόδιο ανόδου σε αυτό το παράδειγμα (Singh and Bhatia, 1996). Με εφαρμογή της ηλεκτρεγερτικής δύναμης το φάρμακο απωθείται και κινείται κατά μήκος της κεράτινης στιβάδας προς την κάθοδο, η οποία τοποθετείται αλλού στο σώμα. Η επικοινωνία μεταξύ των ηλεκτροδίων κατά μήκος της επιφάνειας του δέρματος έχει αποδειχθεί ότι είναι αμελητέα, δηλ. κίνηση των ιόντων φαρμάκου μεταξύ των ηλεκτροδίων συμβαίνει μέσω του δέρματος και όχι στην επιφάνεια αυτού.



Εικόνα 33 Συσκευή Ιοντοφόρησης (Daniels, 2004)

6.1 Ιστορική αναδρομή της Ιοντοφόρησης

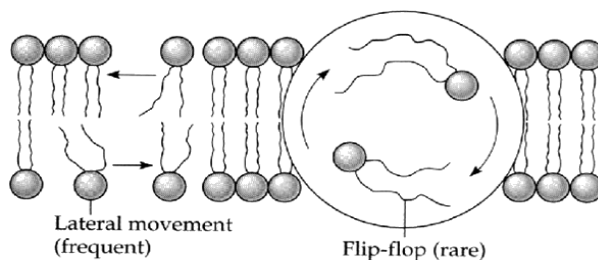
Η ιοντοφόρηση που προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «ión» και «φόρηση» είναι μια διαδικασία που επιτρέπει την αυξημένη διείσδυση του ιονισμένου μορίου κατά μήκος ή μέσα στον ιστό με εφαρμογή χαμηλού ηλεκτρικού ρεύματος. Η πρώτη εφαρμογή χρήσης ηλεκτρικού ρεύματος στην χορήγηση φαρμάκων χρονολογείται από τα μέσα του 18ου αιώνα. Στη δημοσίευση του 1747, ο Ιταλός βιβλιοθηκάριος Giovanni Francesco Rivati (1689 - 1764) ανέφερε ότι η μυρωδιά του περουβιανού βάλαμου ερμητικά σφραγισμένου σε γυάλινο κύλινδρο έγινε εμφανής σε ένα δωμάτιο μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος και μπορούσε ακόμη να μεταδοθεί και σε άλλο δωμάτιο με καλώδιο (Helmstädter, 2001). Αφού ο Alessandro Volta βρήκε μια απλή μέθοδο παραγωγής συνεχούς ροής ρεύματος το 1800, έγιναν και πάλι προσπάθειες να μεταδοθούν χημικές ουσίες μέσω μεμβρανών. Ένα άλλο ορόσημο στην ιστορία της ιοντοφόρησης ήταν ο «βολταϊκός ναρκωτισμός», μια διαδικασία για την οδοντιατρική αναισθησία, που εισήχθη από τον Benjamin Ward Richardson (πατέρας της οδοντικής ιοντοφόρησης, 1828-1896). Στη δεκαετία του 1870 ο Γερμανός Hermann Munk (1839-1912) διερεύνησε εκτενώς την τρέχουσα διαμεσολαβούμενη μεταφορά ουσιών μέσω πορωδών μεμβρανών (Helmstädter, 2001). Η πρώτη προσπάθεια για τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος στη χορήγηση φαρμάκων χρονολογείται από τα μέσα του 18ου αιώνα. Μεγάλη πρόοδος σημειώθηκε κατά τον 19ο αιώνα κυρίως από τον William James Morton (1846-1920), τον Stephen Leduc (1853-1939) και τον Fritz Frankenhauser (1868), στη δοκιμή μεταλλικών ιόντων καθώς και αλκαλοειδών (Helmstädter, 2001). Μέχρι τις αρχές του 20ου αιώνα, η διαδερμική ιοντοφόρηση ήταν γνωστή ως "καταφόρηση". Ο Frankenhauser λέγεται ότι εισήγαγε τον όρο "ιοντοφόρηση" πριν από το 1908. Πρόσφατα οι ερευνητές μιλούν για "ηλεκτρικά υποβοηθούμενη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων". Η τεχνική ποτέ δεν υιοθετήθηκε ευρέως αλλά πάντοτε αποδείχθηκε χρήσιμη σε κάποιο βαθμό στην επίλυση συγκεκριμένων προβλημάτων χορήγησης φαρμάκων (Khan et al., 2011; Neeraj, 2017).

Drug / Solution	Main Indication(s)	Parameters	Drug / Solution	Main Indication(s)	Parameters
Acetic Acid	Calcific tendinitis (myositis ossificans)	2 - 5% aqueous solution	Lidocaine	Soft tissue pain Inflammation	4 - 5% solution (ointment)
Calcium chloride	Muscle spasm (also hypersensitive peripheral nerves)	NEGATIVE pole	Magnesium sulphate (sulfate)	Muscle spasm Myositis	POSITIVE pole
Dexamethasone	Inflammation	2 - 5% aqueous solution	Hyaluronidase	Oedema (local) Subacute and Chronic stages	2% aqueous solution (ointment)
Hydrocortisone	Inflammation	NEGATIVE pole	Salicylates	Muscle and Joint pain Acute and Chronic	POSITIVE pole
Hydrocortisone, prednisone	Inflammation	4mg/mL aqueous solution	Tolazoline hydrochloride	Ulcers (open wounds)	Delivered after reconstitution with 0.9% sodium chloride to give a 150µg/mL solution
Zinc Oxide	Open wounds - ulcers Some dermatological conditions	POSITIVE pole			
Iodine	Adhesive capsulitis Other soft tissue adhesive presentations Infection (microbial)	NEGATIVE pole			

Πίνακας 9 Κατάλογος των συνήθως χρησιμοποιούμενων φαρμάκων και των διαλυμάτων με την Ιοντοφόρηση (Bélangier, 2010; Rothstein et al., 2005)

6.2 Φαρμακοκινητική της Ιοντοφόρησης

Με την ιοντοφόρηση έχουμε μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών με τέτοιο τρόπο, ώστε η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα του αίματος να παραμένει στο «θεραπευτικό παράθυρο» για παρατεταμένη περίοδο. Το «θεραπευτικό παράθυρο» αναφέρεται στην ελάχιστη συγκέντρωση μιας φαρμακευτικής ουσίας στο πλάσμα του αίματος, έτσι ώστε να έχει θεραπευτική επίδραση χωρίς όμως σημαντικές παρενέργειες. Η δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου καθορίζεται από την πυκνότητα του ρεύματος. Η διαφορά στην πυκνότητα ρεύματος μεταξύ ενεργού και ανενεργού ηλεκτροδίου δημιουργεί την ικανή διαφορά δυναμικού που θα εξασφαλίσει την κίνηση των ιόντων και τη μεταφορά της φαρμακευτικής ουσίας. Ειδικότερα, η ποσότητα των ιόντων που μεταφέρεται στους ιστούς καθορίζεται από την ένταση του ρεύματος, την πυκνότητα του ρεύματος στο ενεργό ηλεκτρόδιο, τη διάρκεια εφαρμογής και τη συγκέντρωση των ιόντων στο φαρμακευτικό διάλυμα που χρησιμοποιείται. Ο αριθμός των φορτισμένων σωματιδίων που μετακινούνται είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον αριθμό των κινούμενων φορτίων και μπορεί έτσι να ρυθμιστεί ανάλογα με



Εικόνα 34 Lipid flip-flop (Menon and Herrmann, 2013)

την ένταση του ρεύματος. Το μεγαλύτερο μέρος της ουσίας διαπερνάει τις περιοχές με την μικρότερη αντίσταση (π.χ. πόροι, περιοχές που εμφανίζουν κάποια φθορά ή ασυνέχεια). Η μεσοκυττάρια διαδρομή που αποτελείται από λιπιδικές διπλοστιβάδες με πολικές κεφαλές, παίζει και αυτή ουσιαστικό ρόλο στην ιοντοφόρηση. Σχηματίζονται πολικοί υδατικοί πόροι ως αποτέλεσμα της μετατόπισης (flip-flop) φωσφολιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα.

Πώς ακριβώς περνάνε τα ουδέτερα, πολικά μόρια;

Σε φυσιολογικές συνθήκες δέρματος, η ιοντοφόρηση ευνοεί την μεταφορά κατιόντων μέσω της ανοδικής ιοντοφόρησης. Όμως η κεράτινη στιβάδα πάνω από το pH 4, είναι αρνητικά φορτισμένη, λόγω των ιονισμένων καρβοξυλικών άκρων των λιπιδίων και μπορεί να συμπεριφέρεται σαν μία επιλεκτικής διαπερατότητας μεμβράνη που προκαλεί ηλεκτρωσμωτική ροή του διαλύτη και κίνηση των ουδέτερων μορίων (ή/και κατιόντων) σε απάντηση της κίνησης των αντίθετων ιόντων (counter ions) (Dhote, 2012; Masada et al., 1989).

Ο Abramson και ο Gorin απέδωσαν μια εξίσωση για να συγκρίνουν τη ροή ιοντοφόρησης με την ηλεκτρική κινητικότητα, την ηλεκτρώσμωση και την απλή διάχυση. Η αυξημένη ροή κατά τη διάρκεια της ιοντοφόρησης περιλαμβάνει (Anderson et al., 2003) :

- Ροή λόγω της ηλεκτροχημικής διαφοράς δυναμικού κατά μήκος του δέρματος
- Αλλαγή της διαπερατότητας του δέρματος λόγω του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου και
- Ηλεκτρο-ωσμωτική ροή νερού και διαλύτη.

$$J_{\text{ionto}} = J_{\text{electric}} + J_{\text{passive}} + J_{\text{convective}} \quad \text{Εξίσωση 12}$$

J_{electric} = ροή λόγω εφαρμογής ηλεκτρικού ρεύματος (Migration)

J_{passive} = ροή λόγω παθητικής διάχυσης μέσω του δέρματος (Diffusion)

$J_{\text{convective}}$ = ροή λόγω μεταφοράς διαλύτη μέσω ηλεκτρο-ώσμωσης (Convection)

Η εξίσωση Nernst-Planck έχει χρησιμοποιηθεί με τροποποιήσεις για την πρόβλεψη ιοντοφορητικών «enhancement ratios» (λόγος ροής σταθερής κατάστασης παρουσία ηλεκτρικού δυναμικού και σε απουσία ηλεκτρικού δυναμικού), καθώς στην αρχική

εξίσωση δεν υπάρχει κανένας όρος για την κίνηση των μορίων που οφείλεται στην ηλεκτρώσμωση (Pikal, 1990; Pikal and Shah, 1990b, 1990a).

$$N_i(x) = - \underbrace{D_i}_{\text{Diffusion}} \frac{d}{dx} C_i(x) - \underbrace{\frac{z_i F}{RT} D_i C_i}_{\text{Migration}} \frac{d\phi(x)}{dx} + \underbrace{C_i v(x)}_{\text{Convection}}$$

↓ Flux
↓ Diffusion
↓ Migration
↓ Convection

Εικόνα 35 Τροποποιημένη εξίσωση Nernst-Planck

Οι παράμετροι που επηρεάζουν το σχεδιασμό ενός ιοντοφορητικού συστήματος διαδερμικής χορήγησης είναι ο τύπος του χρησιμοποιούμενου ηλεκτροδίου, η ένταση του ρεύματος, το pH του συστήματος, η ύπαρξη κοινών ιόντων, η φύση της προς διαπέραση ουσίας καθώς και βιολογικοί παράγοντες όπως το pH του δέρματος και η αιματική κυκλοφορία.

Name of the factors			
Physiochemical Properties	Drug formulation	Experimental factors	Biological factors
Molecular size	pH	Current strength	Intra and inter subject variability
Molecular weight	Ionic strength	Current density	Regional blood flow
Charge	Presence of co-ions	Pulsed current	Skin pH
Polarity		Duration of application	Condition of skin
Concentration		Electrode materials	

Πίνακας 10 Παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα ιοντοφόρησης (Khan et al., 2011).

Πυκνότητα ρεύματος

Η πυκνότητα ρεύματος είναι η ποσότητα ρεύματος που παραδίδεται ανά μονάδα επιφάνειας. Η πυκνότητα του ρεύματος είναι ευθέως ανάλογη της έντασης του ρεύματος, ενώ επηρεάζεται και από το μέγεθος των ηλεκτροδίων. Τα ακόλουθα κριτήρια θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή κατάλληλης πυκνότητας ρεύματος για την διαδερμική ιοντοφόρηση.

- Το ρεύμα θα πρέπει να είναι αρκετά υψηλό ώστε να παρέχει ένα επιθυμητό ρυθμό παροχής φαρμάκου.
- Δεν πρέπει να προκαλεί επιβλαβείς επιδράσεις στο δέρμα.

- Πρέπει να υπάρχει μια ποσοτική σχέση μεταξύ του εφαρμοζόμενου ρεύματος.
- Το φάρμακο πρέπει να είναι ηλεκτροχημικά σταθερό.
- Η πυκνότητα του ρεύματος προτείνεται να είναι μειωμένη στο αρνητικό ηλεκτρόδιο (κάθοδος) γιατί η συσσώρευση θετικών ιόντων δημιουργεί αλκαλική αντίδραση η οποία αυξάνει την πιθανότητα βλάβης των ιστών, σε αντίθεση με την όξινη αντίδραση που προκαλεί η συγκέντρωση των αρνητικών ιόντων στο θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος).

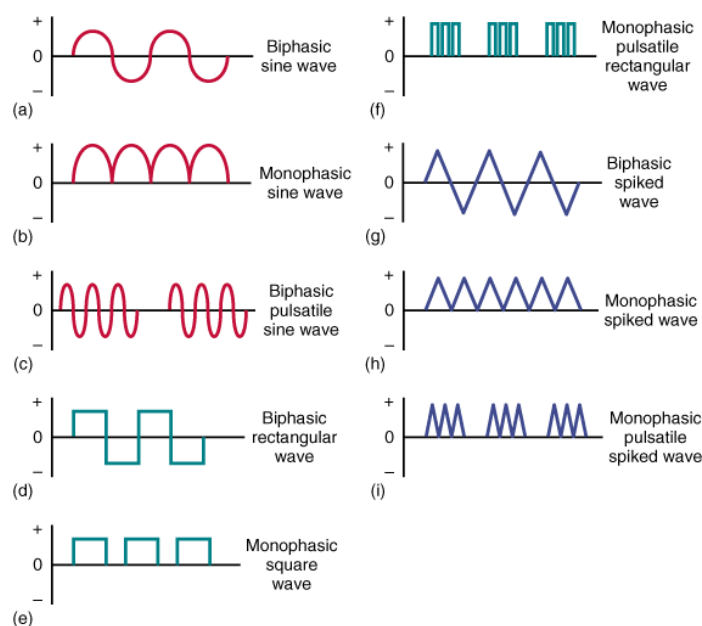
Κυματομορφή

Το σχήμα του ηλεκτρικού ρεύματος μπορεί να είναι:

Μονοφασικό: Υποδεικνύει ότι υπάρχει μόνο μία φάση σε κάθε παλμό.

Διφασικό: δύο αντίθετες φάσεις περιέχονται σε έναν μόνο κύκλο.

- **Συμμετρικό:** Το ίδιο μέγεθος και σχήμα για κάθε φάση και προς τις δύο κατευθύνσεις.
- **Ασύμμετρο:** Ανόμοιο μέγεθος και σχήμα για κάθε φάση. Όταν ισορροπείται η καθαρή φόρτιση είναι ίση και στις δύο κατευθύνσεις.



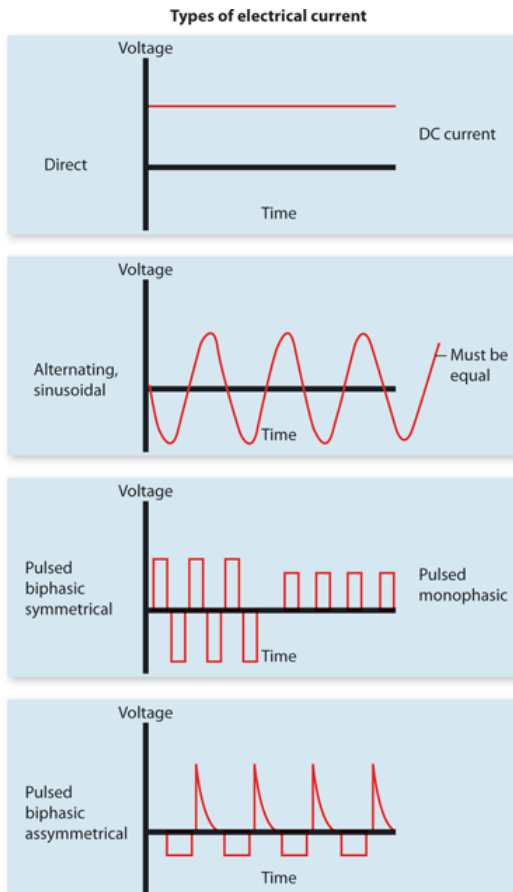
Εικόνα 36 Είδη κυματομορφών (Πηγή: www.accessphysiotherapy.com)

Τύπος ρεύματος

Στον τομέα της φυσικής ιατρικής και της αποκατάστασης, οι ηλεκτρικοί διεγέρτες ταξινομούνται ως εξής:

Συνεχές ρεύμα (DC): Ηλεκτρικό ρεύμα που ρέει προς μία κατεύθυνση για περίπου 1 δευτερόλεπτο ή περισσότερο.

Εναλλασσόμενο ρεύμα (AC): Ηλεκτρικό ρεύμα που αλλάζει την κατεύθυνση ροής, σε σχέση με τη μηδενική γραμμή αναφοράς, τουλάχιστον μία φορά κάθε δευτερόλεπτο.



Εικόνα 37 Τύποι ηλεκτρικού ρεύματος

(Πηγή: www.accessphysiotherapy.com)

απόδοση της παλμικής μεταφοράς εάν η συχνότητα είναι πολύ υψηλή. Η ενισχυμένη ιοντοφορητική μεταφορά έχει αναφερθεί για πεπτίδια και πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας παλμικό DC σε σύγκριση με συμβατικό DC.

Ηλεκτρόδια

Τα ηλεκτρόδια που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ηλεκτρόδια κασσιτέρου, χαλκού, αργύρου ή ελαστικά από καουτσούκ τα οποία καλύπτονται πλήρως από σπόγγο, ύφασμα ή γάζα, υλικά με τα οποία έρχονται σε επαφή με το δέρμα. Το υλικό αυτό εμποτίζεται με το διάλυμα που έχει το ιόν της χορηγούμενης φαρμακευτικής ουσίας. Επειδή η αλκαλική αντίδραση της καθόδου (-) είναι καυσικότερη της όξινης

Παλμικό ρεύμα (PC): Ηλεκτρικό ρεύμα που εκτελείται ως σήματα μικρής διάρκειας. Κάθε παλμός διαρκεί μόνο μερικά micro ή milli-δευτερόλεπτα. Η ιοντοφόρηση αρχικά εφαρμόστηκε με τη χρήση συνεχούς ρεύματος (DC), ενώ πρόσφατα συνδυάστηκε με την εφαρμογή εναλλασσόμενου (AC) αυξάνοντας τη διαπερατότητα και δίνοντας μεγαλύτερη σταθερότητα στα μεγέθη της αντίστασης και της ροής. Η εφαρμογή συνεχούς ρεύματος για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε πόλωση του δέρματος, γεγονός που μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα της ιοντοφορητικής παροχής. Αυτή η πόλωση μπορεί να αντισταθμιστεί με τη χρήση παλμικού DC, ενός συνεχούς ρεύματος που παρέχεται περιοδικά. Κατά τη διάρκεια του "off time" το δέρμα εκπολώνεται, ωστόσο μειώνεται η

αντίδρασης της ανόδου (+), το αρνητικό ηλεκτρόδιο πρέπει να έχει μεγαλύτερο μέγεθος από το θετικό, έτσι ώστε να μειώνεται και η πυκνότητα του ρεύματος. Αυτό πρέπει να γίνεται ακόμη και αν το αρνητικό ηλεκτρόδιο είναι το ενεργό. Η διαφορά μεγέθους μπορεί να φτάσει έως και στο διπλάσιο (Molitor and Fernandez, 1939).

Ένταση ρεύματος

Η χαμηλή ένταση ρεύματος είναι αποτελεσματικότερη και πιο φιλική στο δέρμα στη μεταφορά των ιόντων από ότι η υψηλή. Η συνιστώμενη ένταση ρεύματος κυμαίνεται μεταξύ 3-5 mA για τον άνθρωπο. Το μέγιστο της εφαρμοζόμενης έντασης καθορίζεται από το μέγεθος των ηλεκτροδίων. Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται έτσι ώστε η πυκνότητα του να κυμαίνεται μεταξύ 0,1-0,5 mA/cm² επιφάνειας ενεργού ηλεκτροδίου.

Επίδραση ιόντων

Όταν χρησιμοποιείται ιοντοφόρηση, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι η ρύθμιση του pH γίνεται με την προσθήκη ρυθμιστικών παραγόντων. Η χρήση ρυθμιστικών παραγόντων ως συν-ιόντα, τα οποία είναι συνήθως μικρότερα και πιο κινητικά από το ιόν που πρόκειται να χορηγηθεί, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των ιόντων φαρμάκου που πρόκειται να διεισδύσουν μέσω του φραγμού του δέρματος από το εφαρμοζόμενο ρεύμα (Burnette and Ongripattanakul, 1988). Αυτό σημαίνει ότι όταν ένα θετικά φορτισμένο φάρμακο αραιώνεται σε φυσιολογικό ορό, τα ιόντα νατρίου θα ανταγωνίζονται την ποσότητα των ιόντων του φαρμάκου που πρόκειται να διαπεράσουν το φραγμό. Στην ιδανική περίπτωση, η χρήση ρυθμιστικού συστήματος σε ιοντοφόρηση θα πρέπει να αποφευχθεί, αλλά εάν αυτό δεν είναι δυνατό, προτιμώνται εναλλακτικά ρυθμιστικά διαλύματα, που αποτελούνται από ιόντα με χαμηλή κινητικότητα ή αγωγιμότητα (Neeraj, 2017).

Επίδραση του pH

Το pH είναι σημαντικό για τη διαδερμική ιοντοφόρηση (IP) φαρμάκων. Οι βέλτιστες συνθήκες για τη διαδερμική ιοντοφόρηση είναι να υπάρχει μια ένωση κυρίως σε ιονισμένη μορφή. Όταν το pH μειωθεί, η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου αυξάνεται και η αγγειακή αντίδραση (αγγειοδιαστολή) ξεκινά, επομένως είναι σημαντικό να διατηρείται το pH όσο το δυνατόν πιο κοντά σε pH 5.5 και κάτω. Υπάρχει ένας αυξανόμενος κίνδυνος αγγειακής αντίδρασης λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου και όχι της χρησιμοποιούμενης ένωσης. Δεδομένου ότι τα ιόντα υδρογόνου είναι μικρά, διεισδύουν στο δέρμα πιο εύκολα από τα μεγαλύτερα ιόντα

φαρμάκων. Τα εργαστηριακά ευρήματα διαφέρουν ως προς την επίδραση του pH και της συμπεριφοράς των φαρμάκων. Σύμφωνα με την εξίσωση Henderson-Hasselbalch, το pH είναι ο καθοριστικός παράγοντας που καθορίζει την ποσότητα του φαρμάκου που υπάρχει στην ιονισμένη κατάσταση. Για βέλτιστη IP, είναι επιθυμητό να υπάρχει σχετικά μεγάλη αναλογία του φαρμάκου στην ιονισμένη κατάσταση. Ωστόσο, αυτό πρέπει να αντισταθμιστεί με την διαδερμική απορρόφηση ενός φαρμάκου σε ένα pH που είναι ανεκτό και ασφαλές για τον ασθενή (Neeraj, 2017).

Συγκέντρωση φαρμάκου

Ανάλογα με το φάρμακο που χρησιμοποιείται, η σταθερής κατάστασης ροή (κίνηση ιόντων) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνεται με αυξανόμενη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας στο διαμέρισμα δότη, δηλαδή στην ηλεκτρόδιο παροχής. Έχει αναφερθεί αυξημένη πρόσληψη από το δέρμα κατά τη διάρκεια και μετά τη διαδερμική ιοντοφόρηση με αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου (Talbi et al., 2018). Ένας περιοριστικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι η ισχύς του ρεύματος που χρησιμοποιείται.

Μοριακό μέγεθος

Έχει αποδειχθεί ότι οι συντελεστές διαπερατότητας σε θετικά φορτισμένες, αρνητικά φορτισμένες και μη φορτισμένες διαλυμένες ουσίες στο ανθρώπινο δέρμα είναι συνάρτηση του μοριακού μεγέθους (Chien et al., 1989). Όταν αυξηθεί το μοριακό μέγεθος, ο συντελεστής διαπερατότητας μειώνεται. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες διαλυμένες ουσίες με ένα σχετικά υψηλό μοριακό μέγεθος (π.χ., ινσουλίνη, βασοπρεσσίνη και μερικές αυξητικές ορμόνες), οι οποίες έχουν καταφέρει να διεισδύσουν το φραγμό του δέρματος και να περάσουν στη συστηματική κυκλοφορία (Neeraj, 2017).

Ηλεκτρο-ωσμωτική μεταφορά

Κατά την ιοντοφόρηση, η ροή ιόντων διαμέσου της μεμβράνης προκαλεί ροή διαλύτη που ονομάζεται ηλεκτρο-ώσμωση. Σε σύγκριση με τη μεταφορά ιόντων, η ηλεκτροωσμωτική συμβολή είναι μικρή. Η διείσδυση των αφόρτιστων ουσιών (π.χ. αλβουμίνη βόειου ορού) έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνεται από την επίδραση ροής όγκου που επάγεται από μια εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης. Γενικά, η ιοντοφόρηση είναι πιο αποτελεσματική για φορτισμένες ενώσεις, ειδικά για μονοσθενή ιόντα (Phipps et al., 1989).

Διάρκεια θεραπείας

Στη διάρκεια της θεραπείας, ο ασθενής δεν πρέπει να έχει αίσθηση πόνου ή καύσου, ενώ κάθε 3-5min το δέρμα θα πρέπει να ελέγχεται για πιθανή εμφάνιση ερεθισμού. Η συνολική δόση του φαρμάκου που χορηγείται με την ιοντοφόρηση είναι συνάρτηση της έντασης του ρεύματος και της διάρκειας της θεραπείας (mA-min). Για παράδειγμα μια 40mA-min δόση φαρμάκου ιοντοφόρησης απαιτεί 4mA ένταση ρεύματος και 10min διάρκεια θεραπείας. Ένταση ρεύματος 2mA και διάρκεια θεραπείας 15min εξασφαλίζει 30 mA-min συνολική δόση φαρμάκου. Τα περισσότερα από τα ιόντα φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς σκοπούς σε συνδυασμό με ιοντοφόρηση είναι μικρού μεγέθους και έτσι ο απαιτούμενος χρόνος της ιοντοφόρησης είναι σχετικά μικρός (5-20 δευτερόλεπτα). Αντίθετα όταν η ιοντοφόρηση χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς, η απαιτούμενη διάρκεια ιοντοφόρησης κυμαίνεται στα 20-40 λεπτά (Chien et al., 1989).

Άλας φαρμάκου

Έχει αναφερθεί ότι διαφορετικές μορφές άλατος έχουν διαφορετικές ειδικές αγωγιμότητες και ότι πειράματα αγωγιμότητας in vitro παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη γενική καταλληλότητα ενός φαρμάκου για διαδερμική ιοντοφόρηση. Η μορφή άλατος των φαρμάκων πρέπει να εξεταστεί μαζί με το pH του διαλύματος για τον προσδιορισμό της ποσότητας του φαρμάκου στην ιονισμένη κατάσταση.

Σταθερότητα του φαρμάκου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας

Το φάρμακο που υποβάλλεται σε διαδερμική ιοντοφόρηση, πρέπει να είναι σταθερό στο περιβάλλον διαλύματος μέχρι τη στιγμή της ιοντοφόρησης και επίσης κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Η οξειδωση ή η αναγωγή ενός φαρμάκου όχι μόνο μειώνει το συνολικό διαθέσιμο φάρμακο, αλλά οι ενώσεις αποικοδόμησης, αν διαθέτουν το ίδιο φορτίο όπως το ιόν φαρμάκου, θα μειώσουν τη συνολική ταχύτητα διαπέρασης του φαρμάκου από τον φραγμό της μεμβράνης.

Τύπος μήτρας που περιέχει το φάρμακο, διαλύματα vs. γέλη

Η διαπέραση του φαρμάκου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού ρεύματος θα είναι διαφορετική καθώς οι μήτρες είναι διαφορετικές. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με διαφορές στα ιξώδη, το υλικό του ηλεκτροδίου και τα πορώδη.

Φυσικοί παράγοντες

Η ιοντοφόρηση μειώνει την ενδοατομική μεταβλητότητα (Intra-Individual) και τη μεταβλητότητα μεταξύ των ασθενών (Inter-Individual). Αυτό είναι ένα εγγενές πλεονέκτημα σε σχέση με την τεχνική της παθητικής απορρόφησης. Πειράματα in vivo διαδερμικής ιοντοφόρησης έδειξαν ότι υπάρχουν μικρές διαφορές στο ρυθμό ροής μετά από διαδερμική ιοντοφόρηση μεταξύ αρρένων και θηλέων, καθώς και μεταξύ τριχωτού και άτριχου δέρματος (Gangarosa et al., 1978).

Ανατομικοί παράγοντες ασθενούς

Οι ανατομικοί παράγοντες του ασθενούς που επηρεάζουν το βάθος της διείσδυσης περιλαμβάνουν το πάχος του δέρματος στο σημείο της εφαρμογής, την παρουσία υποδόριου λιπώδους ιστού και το μέγεθος άλλων δομών, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών. Επιπλέον, η παρουσία και η σοβαρότητα της φλεγμονής μπορούν να επηρεάσουν τη διείσδυση του φαρμάκου λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας (η οποία μπορεί να αυξηθεί και μπορεί να χρησιμεύσει για τη μεταφορά του φαρμάκου σε όλο το σώμα. Παρακάτω παρατίθενται οι βέλτιστες συνθήκες για τη χρήση διαδερμικής ιοντοφόρησης.

Parameter	Optimum range	Above range	Below range
Influence of pH	pH 5.5 and below	Increasing risk for vascular reaction	The concentration of hydrogen ion increases and a vascular reaction (vasodilatation) is initiated because of C-fibre activation.
Current strength	1 mA not more than 3 min	Risk of non specific vascular reactions (vasodilatation) increases.	No resultant.
Current density	3–5 mA	Risk for unspecific electrically mediated vasodilatation	No resultant.
Molecular size and molecular weight	smaller and hydrophilic	The permeability coefficient decreases	Non specific transport.
Ionic strength & presence of other ions	—	Decrease drug delivery, as extraneous ions compete with the drug ions.	No resultant.

Εικόνα 38 Βέλτιστα επίπεδα παραμέτρων που επηρεάζουν το ιοντοφορητικό σύστημα (Dhote, 2012).

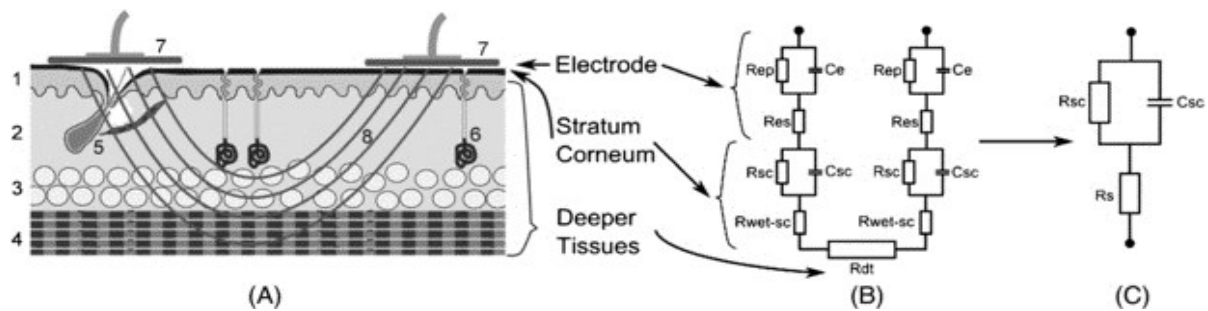
	Parameters increased	Effect on iontophoretic transport
Physicochemical properties of the active	Molecular weight	↓
	Charge	↑/↓
	Lipophilicity	↓
Formulation of the active	pH: ionization	↑/↓
	Competitive ions	↓
Electrical parameters	Current	↑
	Duration of current application	↑
	Current waveform	↑/↓
	Electrode design	↑/↓

Εικόνα 39 Παράμετροι που επηρεάζουν το ιοντοφορητικό σύστημα (Sieg and Wascotte, 2009).

6.3 Ηλεκτρικές ιδιότητες του ανθρώπινου δέρματος

Τα ηλεκτρικά σήματα που προέρχονται από ηλεκτρόδια τοποθετημένα στην επιφάνεια του δέρματος θα πρέπει να περνούν διαδοχικά μέσω της κεράτινης στιβάδας, μέσω της υπόλοιπης επιδερμίδας, που περιέχει ζωντανά κύτταρα και μέσω του χορίου. Από ηλεκτρική άποψη, αυτή η διαδρομή αποτελείται από δύο στρώματα, ένα μονωτικό και ένα αγώγιμο. Το επιφανειακό στρώμα του δέρματος, η κεράτινη στιβάδα, αντιπροσωπεύει το μονωτικό στρώμα. Όλα τα άλλα βαθύτερα στρώματα θεωρούνται ότι είναι αγώγιμα. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες του ανθρώπινου δέρματος ως υλικού παρουσιάζονται γενικά ως τιμές διαπερατότητας και αγωγιμότητας (Birlea et al., 2014). Έχει αποδειχθεί ότι τόσο η διαπερατότητα όσο και η αγωγιμότητα ποικίλλουν ανάλογα με τη θερμοκρασία και με τη συχνότητα. Η διαπερατότητα μειώνεται με την αύξηση της συχνότητας, ενώ η αγωγιμότητα αυξάνεται. Η τελευταία αξιολόγηση της διαπερατότητας του δέρματος και της αγωγιμότητας σε ευρεία περιοχή συχνοτήτων από 10 Hz έως 100 GHz (Gabriel et al., 1996) έδειξε ότι η σχετική διαπερατότητα του ανθρώπινου δέρματος μειώνεται από 105 στα 10 Hz έως 10 στα 100 GHz ενώ η αγωγιμότητα του ανθρώπινου δέρματος αυξάνεται από 10^{-4} S m^{-1} στα 10 Hz έως 10 S m^{-1} στα 100 GHz. Τα ηλεκτρικά ρεύματα στο ανθρώπινο δέρμα οφείλονται στην κίνηση ιόντων (Denda et al., 2000). Οι ηλεκτρικές συσκευές διέγερσης λειτουργούν χρησιμοποιώντας ηλεκτρονική αγωγιμότητα, ενώ η επαγωγή που προκαλείται στο ανθρώπινο σώμα είναι ιοντική. Στην περίπτωση διέγερσης της επιδερμίδας, η κεράτινη στιβάδα του δέρματος δρα ως το διηλεκτρικό μέσο ανάμεσα στο αγώγιμο ηλεκτρόδιο που τοποθετείται στην επιφάνεια του και στους αγώγιμους ιστούς κάτω από αυτό. Για το λόγο αυτό, η κεράτινη στιβάδα του δέρματος παριστάνεται σε ισοδύναμα ηλεκτρικά

μοντέλα (Εικόνα 40), ως πυκνωτής (πυκνωτής C_{sc}), και οι υποκείμενοι αγωγιμοί ιστοί ως ένας ή περισσότεροι αντιστάτες (R_s). Ωστόσο, μερικά ιόντα επιτυγχάνουν τη διέλευση από την κεράτινη στιβάδα μέσω των εξαρτημάτων του δέρματος (αδένες ιδρώτα, θυλάκια τρίχας ή ατέλειες στην επιφάνεια του δέρματος). Αυτή η ροή ιοντικού ρεύματος αντιπροσωπεύεται ως μεγάλη αντίσταση (αντίσταση στην κεράτινη στιβάδα, R_{sc}) παράλληλα με τον πυκνωτή κεράτινης στιβάδας.



Εικόνα 40 Ηλεκτρόδιο-δέρμα και τα αντίστοιχα ηλεκτρικά μοντέλα του.

(A) Ανατομία δέρματος-ηλεκτροδίου: 1-επιδερμίδα, 2-δερμίδα, 3-υποδερμίδα, 4-σκελετικοί μύες, 5-θυλάκιο τριχών με σμηγματογόνο αδέν, 6-ιδρωτοποιός αδέν, 7-ηλεκτρόδιο, 8-ηλεκτρικό πεδίο. (B) Ηλεκτρικό μοντέλο: παράλληλη αντίσταση με ηλεκτροφόρα ηλεκτρόδια, C_e -χωρητικότητα ηλεκτροδίου, R_{sc} -αντίσταση ηλεκτροδίων, R_{sc} -αντίσταση στην κεράτινη στιβάδα, C_{sc} -χωρητικότητα κεράτινης στιβάδας, R_{wet-sc} -χαμηλή αντίσταση κεράτινης στιβάδας, R_{dt} -αντίσταση στους βαθύτερους ιστούς. (C) Απλοποιημένο ηλεκτρικό μοντέλο ισοδύναμο τριών συστατικών: R_{sc} -Αντίσταση της κεράτινης στιβάδας, C_{sc} -χωρητικότητα κεράτινης στιβάδας, R_s - αντίσταση των ηλεκτροδίων (Birlea et al., 2014).

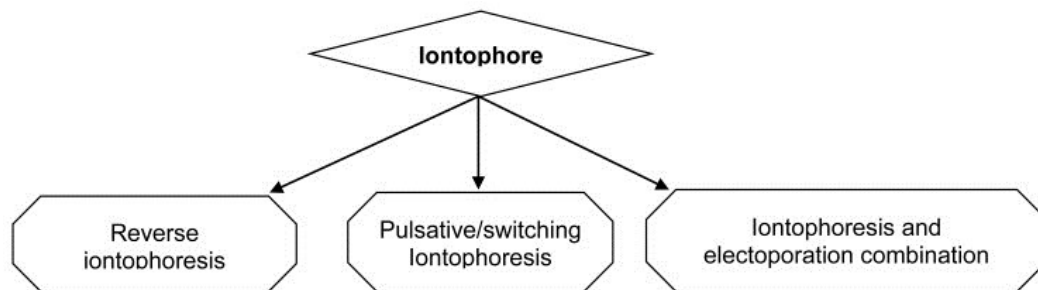
Κατά την έρευνα των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου δέρματος σε απόκριση των σημάτων εναλλασσόμενου ρεύματος, εντοπίζονται τιμές αντίστασης του δέρματος. Η αντίσταση δέρματος υψηλής συχνότητας είναι περίπου 100, ενώ η αντίσταση δέρματος χαμηλής συχνότητας κυμαίνεται από 10 k έως 1 M (Rosell et al., 1988). Έχει αποδειχθεί ότι η αντίσταση ανθρώπινου δέρματος κυριαρχείται από την κεράτινη στιβάδα σε χαμηλές συχνότητες (κάτω από 1 kHz) και από το βιώσιμο δέρμα σε υψηλότερες συχνότητες (Martinsen et al., 1999). Στα 10 kHz η κεράτινη στιβάδα αντιστοιχεί στο 50% της αντίστασης του δέρματος, ενώ στα 100 kHz η κεράτινη στιβάδα αντιστοιχεί μόνο στο 10% της αντίστασης του δέρματος (Yamamoto and Yamamoto, 1986).

Η διερεύνηση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του ανθρώπινου δέρματος σε απόκριση των σημάτων DC αποδίδει τιμές αντίστασης και χωρητικότητας. Έχει αποδειχθεί ότι ο πυκνωτής της κεράτινης στιβάδας έχει τιμή ~ 2 nF και ότι η χωρητική φόρτιση του δέρματος διαρκεί ~ 200 μ s (Chizmadzhev et al., 1998). Η μεγάλη αντίσταση της

κεράτινης στιβάδας αποδείχθηκε ότι μειώνεται μη γραμμικά με την αύξηση της πυκνότητας ρεύματος (van Boxtel, 1977; Kuhn et al., 2009). Σε άθικτο δέρμα η αντίσταση του δέρματος βρέθηκε να έχει τιμή ~ 2,5 k και σε αποξησμένο δέρμα διαπιστώθηκε ότι έχει τιμή μόλις ~ 500 (van Boxtel, 1977; Kuhn et al., 2009).

6.4 Τύποι Ιοντοφορητικού συστήματος

Το σύστημα χορήγησης φαρμάκου μέσω ιοντοφόρησης μπορεί να ταξινομηθεί σύμφωνα με την τροποποίηση και βελτίωση που γίνεται σε αυτό το σύστημα, το οποίο επιτρέπει την ομοιόμορφη και προβλέψιμη απελευθέρωση του φαρμάκου με αποτελεσματικό τρόπο (Potts et al., 2002; Santi and Guy, 1996).



Εικόνα 41 Διάφοροι τύποι Ιοντοφόρησης (Dhote, 2012)

Αντίστροφη ιοντοφόρηση

Είναι η τεχνική στην οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα χαμηλής έντασης για τη λήψη εντερικού υγρού μέσω του δέρματος και χρησιμοποιείται ευρέως αυτές τις μέρες σε συσκευές που προορίζονται για διαγνωστική εφαρμογή. Αυτή η τεχνική παρέχει μια βολική και μη επεμβατική μέθοδο δειγματοληψίας των σωματικών υγρών έτσι ώστε να επιτρέπεται η μέτρηση αλλά και η παρακολούθηση της επιθυμητής ουσίας στο σώμα. Η αντίστροφη ιοντοφορητική διαδικασία εφαρμόζεται στη συνεχή παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και παρέχει ένα μέσο χωρίς βελόνες για την παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης αίματος σε διαβητικούς ασθενείς που χρησιμοποιούν ηλεκτρικό σήμα το οποίο είναι ανάλογο με την ποσότητα γλυκόζης στο αίμα. Ωστόσο, αυτή η τεχνική για να είναι επιτυχής, χρειάζεται πολλές αναλυτικές μεθόδους με μεγάλη ευαισθησία, δεδομένου ότι η εξαγόμενη ποσότητα είναι πολύ χαμηλή.

Παλμική ιοντοφόρηση

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες όπου αντί να χρησιμοποιείται ιοντοφόρηση συνεχούς ρεύματος DC, χρησιμοποιείται DC με τη μορφή βραχέων παλμών (Potts et al., 2002).

Ιοντοφόρηση και Ηλεκτροδιάτρηση

Η ιοντοφόρηση μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές ενίσχυσης της διείσδυσης του δέρματος, όπως η ηλεκτροδιάτρηση, η οποία περιλαμβάνει τη σύντομη εφαρμογή παλμών υψηλής τάσης (> 100 V) διάρκειας (ps-ms) για την αύξηση της διαπερατότητας μέσω του δέρματος. Εφαρμόζεται ηλεκτροδιάτρηση πριν από την ιοντοφόρηση, η οποία προκαλεί τη δημιουργία πόρων στο δέρμα λόγω της έκθεσης σε υψηλή τάση παλμών (Huang et al., 2005). Έτσι, όταν εφαρμόζεται ιοντοφόρηση μετά την ηλεκτροδιάτρηση, βοηθάει επεκτείνοντας την διαπερατή κατάσταση του δέρματος, με αποτέλεσμα την αυξημένη ροή ουσιών (Prausnitz et al., 1993). Η αυξημένη μεταφορά με ηλεκτροδιάτρηση προκαλείται από τη δημιουργία ηλεκτροπορών καθώς και από την ηλεκτροφορητική μετατόπιση. Ο Fang et al., μελέτησε την επίδραση της ηλεκτροδιάτρησης στην απορρόφηση της βουπρενορφίνης και έδειξε ότι με εφαρμογή παλμών 300 V ή 500 V αύξησε τη ροή της βουπρενορφίνης κατά πολύ σε σχέση με την παθητική μεταφορά της (Huang et al., 2005).

6.5 Τα πλεονεκτήματα και οι περιορισμοί-αντενδείξεις χρήσης της διαδερμικής ιοντοφόρησης

Πλεονεκτήματα

- Χορήγηση τόσο ιονισμένων όσο και ουδέτερων μορίων.
- Ανάλογα με το εφαρμοζόμενο ρεύμα, επιτρέπει τη συνεχή ή παλμική παροχή φαρμάκου.
- Επιτρέπει ευκολότερο τερματισμό χορήγησης φαρμάκων.
- Προσφέρει καλύτερο έλεγχο της ποσότητας του χορηγούμενου φαρμάκου, δεδομένου ότι η ποσότητα της χορηγούμενης ένωσης εξαρτάται από το εφαρμοζόμενο ρεύμα, τη διάρκεια του εφαρμοζόμενου ρεύματος και την περιοχή του δέρματος που εκτίθεται στο ρεύμα.
- Αποκατάσταση των λειτουργιών του φραγμού του δέρματος χωρίς να προκαλεί σοβαρό δερματικό ερεθισμό.
- Βελτίωση της χορήγησης πολικών μορίων καθώς και ενώσεων με υψηλό μοριακό βάρος.
- Δυνατότητα χρήσης για συστηματική ή τοπική χορήγηση φαρμάκων.

- Μείωση της μεταβλητότητας μεταξύ των διαφόρων ανθρώπων ενόψει του γεγονότος ότι ο ρυθμός χορήγησης φαρμάκου εξαρτάται περισσότερο από το εφαρμοζόμενο ρεύμα παρά από τα χαρακτηριστικά της κεράτινης στιβάδας.

Περιορισμοί-Αντενδείξεις χρήσης Ιοντοφόρησης

Οι περιορισμοί στα ιοντοφορητικά συστήματα περιλαμβάνουν:

- την ένταση του ρεύματος που πρέπει να είναι ανεκτή και επιτρεπτή από τον ανθρώπινο οργανισμό (0.5 mA/cm²).
- τη μη αντιστρεπτή φθορά που προκαλείται στο φραγμό της επιδερμίδας.
- τη μη αποτελεσματικότητα στην ενίσχυση της διαπερατότητας μορίων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 7000 Da (Mathur et al., 2010; Subedi et al., 2010).
- την απαραίτητη ιονική μορφή φαρμάκου σε επαρκή συγκέντρωση
- τα εγκαύματα που μπορεί να προκληθούν από ηλεκτρολυτικές αλλαγές στους ιστούς.
- το κόστος της θεραπείας το οποίο είναι κάπως δαπανηρό.
- την εφαρμογή συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος στο δέρμα που προκαλεί ποικίλες αντιδράσεις ανάλογα με τον πόλο που χρησιμοποιείται (θετικός ή αρνητικός). Οι βασικότερες αντιδράσεις ανάλογα με τον πόλο που χρησιμοποιείται για τη χορήγηση του φαρμάκου, φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

ΘΕΤΙΚΟΣ ΠΟΛΟΣ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΠΟΛΟΣ
Στυπτικές ιδιότητες και κλείσιμο των πόρων.	Μαλακώνει τους ιστούς και άνοιγμα των πόρων.
Όξινη αντίδραση που πιθανόν σχετίζεται με μικροβιοκτόνο δράση.	Αλκαλική αντίδραση που προκαλεί διαλυτοποίηση (αλκαλοποίηση) του σμήγματος.
Αύξηση της ουδού του πόνου με αποτέλεσμα τη μείωση του αισθήματος του πόνου.	Μείωση της ουδού του πόνου με αποτέλεσμα την αύξηση του αισθήματος του πόνου.
Συστολή των αγγείων με αποτέλεσμα τη μείωση της αιματικής κυκλοφορίας.	Διαστολή των αγγείων με αποτέλεσμα την αύξηση της αιματικής κυκλοφορίας.

Πίνακας 11 Οι βασικότερες αντιδράσεις που προκαλούνται σε κάθε πόλο

Η χρήση ιοντοφόρησης αντενδείκνυται στις κατωτέρω περιπτώσεις:

- Ασθενείς με προβλήματα αισθητικότητας στην υπό θεραπεία περιοχή.
- Ασθενείς με αλλεργικές αντιδράσεις στο φαρμακευτικό παρασκεύασμα.
- Δεν επιτρέπεται η εφαρμογή σε περιοχές του δέρματος με πληγές ή άλλες δερματικές παθήσεις.

6.6 Κλινικές εφαρμογές Ιοντοφόρησης σε άλλους κλάδους

Οδοντιατρική

Η οδοντιατρική, έχει χρησιμοποιήσει ιοντοφόρηση σε ασθενείς πριν από τις στοματικές χειρουργικές επεμβάσεις (Glass et al., 1980).

1. Θεραπεία υπερευαισθησίας οδοντίνης (π.χ. σε δόντια ευαίσθητα στον αέρα και σε ψυχρά υγρά) χρησιμοποιώντας αρνητικά φορτισμένα ιόντα φθορίου.
2. Θεραπεία στοματίτιδας χρησιμοποιώντας αρνητικά φορτισμένα κορτικοστεροειδή φάρμακα.
3. Η εφαρμογή τοπικών αναισθητικών για την παραγωγή βαθιάς τοπικής αναισθησίας, όπως γίνεται σε ορισμένες εφαρμογές φυσικοθεραπείας.

Δερματολογία

Η ιοντοφόρηση έχει πολλές χρήσεις στον τομέα της δερματολογίας. Εκτός από τη χρήση λιδοκαΐνης για πρόκληση αναισθησίας και τη θεραπεία ασθενών με υπερίδρωση, οι περισσότερες χρήσεις ιοντοφόρησης στην δερματολογία έχουν εγκαταλειφθεί σε μεγάλο βαθμό. Ιοντοφόρηση με αντιχολινεργικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών με υπερίδρωση παλαμών και ποδιών (Delgado-Charro, 2012).

Ωτορινολαρυγγολογία

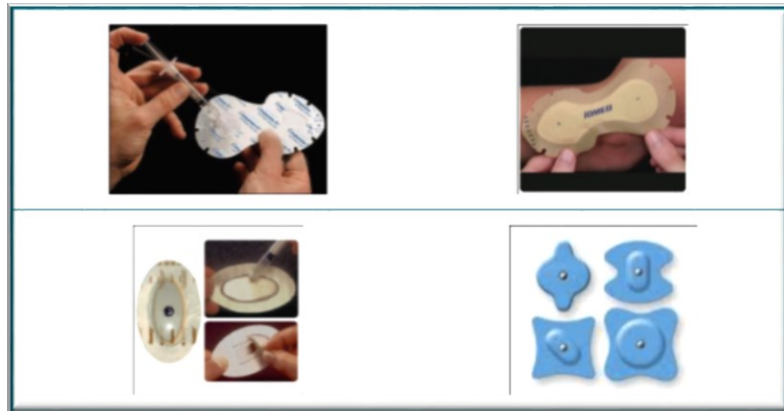
Η ιοντοφόρηση είναι μια προτιμώμενη μέθοδος για την απόκτηση της αναισθησίας της τυμπανικής μεμβράνης του ωτός πριν από απλές χειρουργικές διαδικασίες που αφορούν τη δομή αυτή. Ιοντοφόρηση με ψευδάργυρο έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών με αλλεργική ρινίτιδα (Karakos et al., 2002).

Οφθαλμολογία

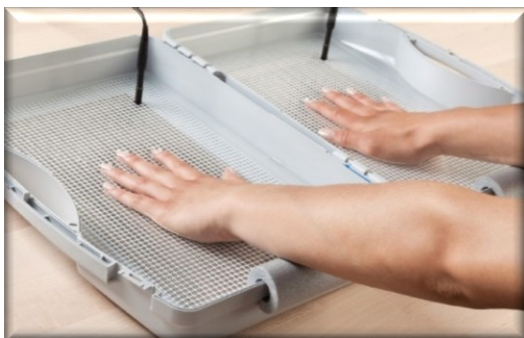
Η ιοντοφόρηση έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικά για την παροχή αντιβιοτικών στο μάτι. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ο χρόνος που απαιτείται για την άμεση επαφή του ηλεκτροδίου με το μάτι (Srinivasan and Higuchi, 1990).

Διαγνωστικές εφαρμογές

Η ιοντοφορητική εφαρμογή του φαρμάκου πιλοκαρπίνη προκαλεί έντονη εφίδρωση, επιτρέποντας επαρκείς ποσότητες ιδρώτα που συλλέγονται και αναλύονται. Αυτή η μέθοδος είναι αποδεκτή ως πρωταρχική δοκιμή στη διάγνωση κυστικής ίνωσης (Karakoç et al., 2002).



Εικόνα 42 Παραδείγματα εμπορικών διαθέσιμων συστημάτων ηλεκτροδίων ιοντοφόρησης (Πηγή: www.electrotherapy.org)



Εικόνα 44 Συσκευή Ιοντοφόρησης για θεραπεία ασθενών με υπερίδρωση παλαμών (Πηγή: www.medical.gr)



Εικόνα 43 Συσκευή Ιοντοφόρησης για χορήγηση κορτικοστεροειδών στο μάτι (Πηγή: eyegatepharma.com)

Πρακτικό μέρος

Κεφάλαιο 7 :

1ο πείραμα |

«Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη
Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών»

2ο πείραμα |

«Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων
ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε
μοντέλο άτριχων μυών»

7.1 Εισαγωγή

Ο σακχαρώδης διαβήτης, μια ενδοκρινική διαταραχή που επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης, έχει καταστροφικές για τους ανθρώπους συνέπειες τους τελευταίους δύο αιώνες. Είναι γεγονός ότι ο αριθμός των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη, που εκδηλώνουν αντίσταση στην ινσουλίνη, παρουσιάζει αλματώδη αύξηση σε όλο τον κόσμο (Bonora et al., 2004).

Οι κύριες αιτίες είναι οι λειτουργικές διαταραχές στην ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης και η αλλοίωση του μεταβολισμού των υδατανθράκων που εμφανίζεται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα (Jaber et al., 2003; Lipson, 1986). Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 χωρίς παχυσαρκία, η μείωση της έκκρισης ινσουλίνης φαίνεται να είναι πιο σημαντική από την αύξηση της ινσουλινοαντίστασης (Gelding et al., 1994). Αντίθετα στους παχύσαρκους διαβητικούς ασθενείς τύπου 2, η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι η κυριότερη αιτία εμφάνισης του διαβήτη. Η μειωμένη έκκριση ινσουλίνης μπορεί να προκληθεί από μακροχρόνια υπερέκκριση αυτής ως απόκριση στην πρόσληψη τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες λόγω των δυτικοποιημένων διατροφικών συνηθειών. Η υπερέκκριση της ινσουλίνης οδηγεί στην εξάντληση του αποθέματος ινσουλίνης και συνεπώς, στη μείωση της έκκρισης ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα.

Ο διαβήτης τύπου 2 αντιμετωπίζεται ολοένα και περισσότερο ως μια ασθένεια ανεπάρκειας ινσουλίνης, λόγω όχι μόνο της ενδογενούς β-κυτταρικής δυσλειτουργίας του παγκρέατος αλλά και της μείωσης της β-κυτταρικής μάζας (Masiello, 2006). Είναι πιθανόν, σε άτομα που έχουν προδιάθεση για εμφάνιση διαβήτη, ο ρυθμιζόμενος κύκλος βήτα-κυττάρων που προσαρμόζει την κυτταρική μάζα στις ανάγκες του σώματος σε ινσουλίνη, να έχει υποστεί βλάβη και πιθανώς οφείλεται σε γενετική βάση.

Διάφορα είδη ποντικών έχουν πρόσφατα αναπτυχθεί ως μοντέλα ζώων για διαβήτη. Αν και αυτά τα μοντέλα εκφράζουν αρκετά σημαντικά μοριακά παθολογικά χαρακτηριστικά του σακχαρώδη διαβήτη, έχουν ορισμένα μειονεκτήματα, ότι αδυνατούν να εκφράσουν ακριβώς μερικά από τα χαρακτηριστικά του διαβήτη τύπου 2. Επιπλέον, η διατήρηση αυτών των γενετικά τροποποιημένων ποντικών απαιτεί εντατική διαχείριση σε εγκαταστάσεις μεγάλης κλίμακας, κάτι που απαιτεί μεγάλο κόστος. Για να ξεπεράσουμε τα μειονεκτήματα των γενετικά τροποποιημένων μοντέλων ποντικών, επιχειρήσαμε να αναπτύξουμε δύο διαφορετικά μοντέλα διαβήτη

τύπου 2 σε 4 διαφορετικά ζωικά πρότυπα άτριχων μυών με μη γενετικό τρόπο. Το ένα μοντέλο αναφέρεται σε διαβήτη τύπου 2 για παχύσαρκους ασθενείς, ενώ το άλλο μοντέλο προσομοιάζει το διαβήτη τύπου 2 σε μη παχύσαρκους ασθενείς.

Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) είναι ένα αντινεοπλασματικό φάρμακο που προκαλεί την καταστροφή β-κυττάρων παγκρεατικών νησιδίων και χρησιμοποιείται ευρέως πειραματικά για την παραγωγή ενός μοντέλου σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 (T1DM) (Hayashi et al., 2006). Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) απομονώθηκε αρχικά από *Streptomyces achromogenes* το 1960, με τις διαβητογόνες ιδιότητές της να μην περιγράφονται μέχρι το 1963 (Rakieten et al., 1963). Αυτή η δράση χαρακτηρίστηκε από κάποιους ερευνητές (Junod et al., 1969) με βάση προηγούμενες εργασίες (Junod et al., 1967), που δείχνουν ότι οι διαβητογόνες επιδράσεις οφείλονται στην επιλεκτική καταστροφή β-κυττάρων των παγκρεατικών νησιδίων. Ως αποτέλεσμα αυτής της δράσης, τα ζώα παρουσιάζουν ανεπάρκεια ινσουλίνης, υπεργλυκαιμία, πολυδιψία και πολουρία, όλα αυτά τα οποία είναι χαρακτηριστικά του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 (Kolb, 1987). Αρκετά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ποντικού, του αρουραίου και του πιθήκου, είναι ευαίσθητα στις παγκρεατικές β-κυτταροτοξικές επιδράσεις της STZ, ενώ το κουνέλι είναι λιγότερο (Lazar et al., 1968).

Η εισαγωγή χημικών ενώσεων για την πρόκληση διαβήτη δεν μπορεί να αντανakλά επαρκώς την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, η επιλογή ενός πειραματικού μοντέλου διαβήτη τύπου 1 ή 2 καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το σκοπό της έρευνας: εξέταση της φαρμακολογικής δραστηριότητας, γενετική έρευνα ή αποσαφήνιση των μηχανισμών ανάπτυξης της νόσου. Το υψηλό κόστος των αντίστοιχων γενετικών σειρών των πειραματόζων, η πολυπλοκότητα της αναπαραγωγής του μοντέλου, οι ειδικές συνθήκες φροντίδας και ο υψηλός βαθμός συγγένειας καθορίζουν την αναγκαιότητα για την ανάπτυξη, τη δοκιμή και τη βελτίωση των μη γενετικών μοντέλων. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο χημικό μοντέλο πρόκλησης διαβήτη τύπου 1 στη σύγχρονη πειραματική διαβητολογία είναι το μοντέλο αλλοξάνης και για το διαβήτη τύπου 2 ή μικτού τύπου είναι το μοντέλο στρεπτοζοτοκίνης. Η ευαισθησία στην εισαγωγή των διαβητογόνων ενώσεων μπορεί ουσιαστικά να εξαρτάται από το είδος, αλλά και από τη γενετική φύση των ζώων και την ηλικία τους.

Παρά τις προόδους στην κατανόηση της παθογένεσης και της θεραπείας του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, σήμερα οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές δεν είναι

καθόλου ικανοποιητικές. Επίσης ο αυξανόμενος διαβητικός πληθυσμός εντείνει τη σοβαρότητα της κατάστασης. Οι διαβητικοί ασθενείς παρότι λαμβάνουν σχετική φαρμακευτική αγωγή, παραμένουν αρρυθμιστοι κατά μεγάλο ποσοστό. Η χρόνια μεταβολική ανισορροπία που σχετίζεται με αυτή τη νόσο θέτει τους ασθενείς σε υψηλό κίνδυνο για μακροπρόθεσμες αγγειακές επιπλοκές, όπως καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βλάβες του αμφιβληστροειδούς, βλάβες των νεύρων, στυτική δυσλειτουργία κ.ά. (Masharani and German, 2017). Στον διαβήτη τύπου 2, τα αντιδιαβητικά φάρμακα χορηγούμενα από του στόματος προκαλούν συχνά είτε υπογλυκαιμία λόγω υψηλών συγκεντρώσεων στο αίμα είτε αδυνατούν να μειώσουν την υπεργλυκαιμία λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων. Το ανωτέρω αποτέλεσμα οφείλεται στο φαρμακοκινητικό τους προφίλ. Επιπλέον, παρουσιάζουν συχνά χαμηλή από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα και είθισται να λαμβάνονται περισσότερες από μία φορές ημερησίως, λόγω μικρών χρόνων ημίσειας ζωής. Τα ανωτέρω, συνδυαζόμενα και με την κακή συμμόρφωση του ασθενούς, αναδεικνύουν την ανάγκη για βελτιωμένους τρόπους χορηγήσεως των αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει έντονο ενδιαφέρον προς τη διερεύνηση νέων μεθόδων απορρόφησης φαρμάκων μέσω του δέρματος, αφού η διαδερμική οδός χορήγησης αποτελεί μια αξιόπιστη εναλλακτική οδό για αποφυγή αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων με το γαστρεντερικό σωλήνα, καθώς και του μεταβολισμού τους από το ήπαρ. Λόγω των πλεονεκτημάτων της έναντι άλλων οδών, η διαδερμική προσέγγιση έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών σε όλο τον κόσμο. Τα διαδερμικά συστήματα χορήγησης φαρμάκων στοχεύουν στην επίτευξη σταθερών θεραπευτικών συγκεντρώσεων φαρμάκου μέσω του δέρματος. Αυτά τα συστήματα σχεδιάζονται έτσι ώστε το φάρμακο να μπορεί να χορηγείται με προκαθορισμένο και ελεγχόμενο ρυθμό. Αυτό το καθιστά ιδιαίτερα ευνοϊκό για τη θεραπεία χρόνιων διαταραχών όπως ο διαβήτης. Τροχοπέδη στη διαδερμική χορήγηση αποτελεί η χαμηλή απορρόφηση. Αυτό οφείλεται στον πολύ αποτελεσματικό φραγμό του δέρματος λόγω της συμπαγούς κεράτινης στιβάδας την οποία διαθέτει.

Είναι πλέον ευρέως γνωστό ότι η μεταφορά ουσιών από το δέρμα με τη βοήθεια φυσικών και χημικών τρόπων ενίσχυσης της διαπέρασης, έχει αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματική στο να διεισδύουν οι ουσίες σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος και έτσι αποτελεί πρόκληση για καινούργιες μελέτες (Ahad et al., 2015; Haque and Talukder, 2018; Rao et al., 2014; Zhang et al., 2015).

Υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν ερευνήσει τη διαδερμική απορρόφηση αντιδιαβητικών φαρμάκων και συγκεκριμένα της ρεπαγλινίδης με την οποία θα ασχοληθούμε στη συνέχεια. Οι περισσότερες μελέτες βασίζονται στη χρήση χημικών ενισχυτών, μικρογαλακτωμάτων, νανοσωματιδίων για τη βελτίωση της διαδερμικής διαπερατότητας μέσω παθητικής διάχυσης (Lohora et al., 2016; Prajapati et al., 2011; Rehman and Zulfakar, 2014; Shinde et al., 2018; Vijayan et al., 2013; Zaman et al., 2017). Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα των παθητικών μεθόδων είναι ο χρόνος υστέρησης (lag time) στην απελευθέρωση του φαρμάκου που εμφανίζεται με προφανή αρνητική επίδραση στα φάρμακα ταχείας έναρξης, όπως η ρεπαγλινίδη. Άλλοι περιορισμοί που σχετίζονται με τους χημικούς ενισχυτές διείσδυσης είναι η χαμηλή αποτελεσματικότητα και ασφάλεια. Δεν επιτυγχάνουν την επιθυμητή λύση του δέρματος και η ικανότητά τους να αυξάνουν τη μεταφορά φαρμάκων στο δέρμα είναι χαμηλή και μεταβλητή (Karande and Mitragotri, 2009; Marianecchi et al., 2014). Όσον αφορά τα θέματα ασφάλειας, έχουν διαπιστωθεί ενισχυτές διείσδυσης σε περιορισμένο αριθμό περιπτώσεων να προκαλούν ερεθισμό του δέρματος συμπεριλαμβανομένης της τοπικής φλεγμονής, ερύθημα, οίδημα και δερματίτιδα (Karande and Mitragotri, 2009). Οι φυσικές μέθοδοι ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης επιτρέπουν την διείσδυση μιας ευρύτερης κατηγορίας φαρμάκων στο δέρμα. Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση εξωτερικής ενέργειας για να λειτουργήσει ως κινητήρια δύναμη για τη μεταφορά φαρμάκων στο δέρμα ή με φυσική διατάραξη της κεράτινης στιβάδας (Lee et al., 2011; Mitragotri, 2013). Αυτές οι τεχνικές διευρύνουν σημαντικά το φάσμα των φαρμάκων που μπορούν να χορηγηθούν αποτελεσματικά στο δέρμα. Αυτό με τη σειρά του θα ενισχύσει σημαντικά την αξία της αγοράς διαδερμικών επιθεμάτων και θα είναι όλο και πιο σημαντικό τα επόμενα χρόνια καθώς ο αριθμός των νέων φαρμάκων βιολογικής προέλευσης συνεχίζει να αυξάνεται. Επιπρόσθετα, οι φυσικές μέθοδοι προσφέρουν περισσότερο αναπαραγωγίμο έλεγχο των φαρμακοκινητικών προφίλ των φαρμάκων, υπερβαίνοντας έτσι τους χρόνους υστέρησης (lag time) σε σύγκριση με παθητικές μεθόδους (Agora et al., 2008; Mitragotri, 2013).

Μελέτες ενίσχυσης διαδερμικής απορρόφησης αντιδιαβητικών φαρμάκων με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος, δεν έχουν ευρέως πραγματοποιηθεί καθώς οι έρευνες έχουν στραφεί πλέον στη χρήση επεμβατικών μεθόδων χορήγησης φαρμάκων, όπως οι «μικροβελόνες». Αυτές αναπτύσσονται συνεχώς για να ξεπεράσουν μερικά από τα

μειονεκτήματα που συνήθως συνδέονται με τη χρήση υποδερμικών βελονών, όπως στην περίπτωση χορήγησης ινσουλίνης και για την αντιμετώπιση και τη βελτίωση της συμμόρφωσης των ασθενών (Alkilani et al., 2015). Παρόλα αυτά, τα ιοντοφορητικά διαδερμικά επιθέματα, χρησιμοποιώντας φυσιολογικώς αποδεκτά ηλεκτρικά ρεύματα ($0,1-1 \text{ mA cm}^{-2}$) που εφαρμόζονται για λεπτά έως ώρες από ένα εξωτερικά τοποθετημένο ηλεκτρόδιο, για να βοηθούν τα φάρμακα να διαπερνούν την κεράτινη στιβάδα και να φτάνουν στην αιματική κυκλοφορία, έχουν δείξει κάποια επιτυχία για φάρμακα που μπορούν να επωφεληθούν από τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος για την αύξηση της ταχύτητας ή του ρυθμού χορήγησης, όπως η λιδοκαΐνη / επινεφρίνη, η φεντανύλη ή, πιο πρόσφατα, ένα φάρμακο κατά της ημικρανίας, η σουματριπτάνη (Szunerits and Boukherroub, 2018). Ο ρυθμός διαδερμικής μεταφοράς είναι ανάλογος με το εφαρμοζόμενο ρεύμα, επιτρέποντας την αύξηση της διαδερμικής δόσης και τον έλεγχο της φαρμακοκινητικής του φαρμάκου. Η ποσότητα του χορηγούμενου φαρμάκου προσδιορίζεται από το μέγιστο ρεύμα που εφαρμόζεται πριν επιτευχθεί το επίπεδο πόνου. Αυτή η προσέγγιση, ωστόσο, δεν είναι προσαρμοσμένη στη χορήγηση μεγαλύτερων μορίων. Οι πόροι μπορούν επίσης να σχηματιστούν με την εφαρμογή βραχέων και υψηλών τάσεων (50-500 V), διαδικασία που είναι γνωστή ως ηλεκτροδιάτρηση. Τα σωστά σχεδιασμένα συστήματα μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την αίσθηση από τους παλμούς και να διευκολύνουν την απελευθέρωση φαρμάκων, ιδιαίτερα των υδρόφιλων και φορτισμένων μορίων στο δέρμα. Μια πρόσφατη μελέτη που βασίστηκε στον πειραματικό σχεδιασμό ενός ιοντοφορητικού συστήματος χορήγησης της ρεπαγλινίδης, έδειξε ότι η διαπερατότητα του φαρμάκου επηρεάστηκε από το φορέα διάλυσής του και την πυκνότητα του ρεύματος. Η εφαρμογή της στατιστικής τεχνικής Box-Behnken Design (BBD) για τη βελτιστοποίηση των παραμέτρων της διαδικασίας ιοντοφόρησης βοήθησε στην επίτευξη του βέλτιστου επιπέδου με ελάχιστα πειράματα στο συντομότερο χρονικό διάστημα (Pavani et al., 2016).

7.2 Σκοπός της εργασίας

Το πρώτο και βασικό βήμα της παρούσας εργασίας είναι να προκαλέσουμε διαβήτη τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών. Αυτό θα διευκολύνει τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκου σε συνθήκες που θα προσομοιώνουν τη διαδερμική εφαρμογή του φαρμάκου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.

Μετά από συστηματική έρευνα της βιβλιογραφίας προέκυψε ότι υπάρχει πληθώρα πρωτοκόλλων για πρόκληση διαβήτη Τύπου 1 (T1DM) σε άτριχους μύες, ενώ μελέτες για πρόκληση διαβήτη τύπου 2 υπάρχουν μόνο σε έντριχους μύες. Η χρήση άτριχων μυών βοηθάει στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης που θα εξετάσουμε στο 2ο πείραμα, καθώς αποφεύγονται τυχόν ερεθισμοί ή τραυματισμοί του επιδερμικού φραγμού που συνήθως συμβαίνουν κατά την αφαίρεση τριχών. Η αφαίρεση τριχών στα έντριχα ζώα γίνεται για διευκόλυνση της διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου. Δύο δυνητικώς χρήσιμα μοντέλα του T2D θα παρουσιαστούν στη συνέχεια με χρήση Στρεπτοζοτοκίνης (STZ) (Junod et al., 1969).

Η στρεπτοζοτοκίνη (STZ) έχει αποδειχθεί ότι παράγει ελεύθερες ρίζες στο σώμα οι οποίες κόβουν ειδικά τις αλυσίδες του DNA στα παγκρεατικά β-κύτταρα, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας του παγκρεατικού βήτα κυττάρου και σε μεταγενέστερη φάση, την καταστροφή του από τη νέκρωση (Okamoto and Yamamoto, 1983). Αυτές οι διαδικασίες προκαλούν ενεργοποίηση της πολυ-ADP συνθάσης της ριβόζης για την αποκατάσταση του κατεστραμμένου DNA (Uchigata et al., 1982) και μια μεγάλη ποσότητα δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου (NAD) καταναλώνεται για αυτή την αποκατάσταση (Anderson et al., 1974). Εδώ, η κατανάλωση NAD συμπληρώνεται αποτελεσματικά με τη λήψη του. Μοντέλο διαβήτη τύπου 2 σε αρουραίους με ταυτόχρονη εφαρμογή των STZ και NAD έχει εφαρμοσθεί σε διάφορες μελέτες (Masiello et al., 1998). Αναφέρεται κλινική πρακτική όπου η περιστασιακή χορήγηση υψηλής δόσης NAD σε διαβητικούς ασθενείς, συμβάλλει στη ρύθμιση ινσουλινοεξαρτώμενου διαβήτη (IDDM) (Schein et al., 1967).

Τα δύο μοντέλα που εφαρμόζουμε έχουν στόχο την πρόκληση διαβήτη τύπου 2 με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Πιο αναλυτικά, στο πρώτο μοντέλο (M1) γίνεται ταυτόχρονη χορήγηση Νικοτιναμιδίου (NAD) για μερική προστασία των β-κυττάρων του παγκρέατος έναντι της STZ (Masiello et al., 1998). Αυτό το μοντέλο βασίζεται σε έρευνα (Schein et al., 1967) στην οποία διαπιστώθηκε ότι το Νικοτιναμίδιο

προστατεύει από το διαβητογόνο αποτέλεσμα της STZ. Αυτός ο συνδυασμός παράγει ένα μοντέλο ανεπαρκούς και μη ανθεκτικού στην ινσουλίνη, διαβήτη τύπου 2. Χαρακτηρίζεται από σταθερή, μέτρια υπεργλυκαιμία που σχετίζεται με απώλεια κατά περίπου 60% της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος (Ghasemi et al., 2014; Masiello et al., 1998). Ωστόσο, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, εκτός από την εξασθενημένη έκκριση ινσουλίνης, έχει αναπτυχθεί ένα άλλο μοντέλο (M2) για να μιμείται με μεγαλύτερη ακρίβεια την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2, η οποία εμφανίζεται μετά την εγκατάσταση του μεταβολικού συνδρόμου. Σε αυτή την περίπτωση, οι μύες εκτρέφονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και σακχαρόζη για να επάγουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, ακολουθούμενη από χορήγηση μέτριας δόσης STZ για τη μείωση της ικανότητας β-κυττάρων για έκκριση ινσουλίνης (Reed et al., 2000). Το αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου είναι η υπεργλυκαιμία, που σχετίζεται με την υπερινσουλιναιμία και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Τα δύο αυτά μοντέλα εφαρμόζονται για πρώτη φορά σε άτριχα πρότυπα μυών, καθώς η πλειοψηφία των ερευνών έχει διεξαχθεί σε έντριχα πρότυπα μυών (BALB/c, C57BL/6) και αρουραίων για την πρόκληση διαβήτη τύπου 2 (Furman, 2015; Masiello, 2006; Nakamura et al., 2006; Shimizu et al., 2012). Οι άτριχοι μύες χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των παθολογικών συμπτωμάτων του διαβήτη, όπως η εμφάνιση πολυουρίας και πολυδιψίας και για την έρευνα διαδερμικής χορήγησης ενός αντιδιαβητικού φαρμάκου, της ρεπαγλινίδης, και είναι προτιμητέοι έναντι των έντριχων μυών, καθώς δεν χρειάζονται αφαίρεση τριχών και το δέρμα τους παραμένει ακέραιο, δίχως την παραμικρή αλλοίωση από πιθανή χρήση ξυραφιού (Abd et al., 2016).

Ο κύριος στόχος του πρώτου πειράματος είναι η δημιουργία μεθόδου η οποία προκαλεί μη παχύσαρκο μοντέλο διαβητικού άτριχου μύος τύπου 2 με μη γενετικό τρόπο, εμφανίζοντας μερική ανεπάρκεια ινσουλίνης. Επιπλέον άλλης μεθόδου η οποία προκαλεί παχύσαρκο μοντέλο διαβητικού άτριχου μύος τύπου 2, προσομοιάζοντας έτσι τους ασθενείς που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη. Δείχνουμε επίσης ότι το παρόντα μοντέλα άτριχων μυών είναι χρήσιμα για τη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης με στόχο τη θεραπεία του μη παχύσαρκου/παχύσαρκου διαβήτη τύπου 2, της οποίας η δράση της εξετάζεται στο 2^ο πείραμα.

Οι στόχοι αυτού του πειράματος συνοψίζονται στα παρακάτω ερωτήματα, τα οποία στο τέλος θα απαντηθούν:

Ποιο από τα 4 ζωικά πρότυπα προσομοιάζει καλύτερα τον διαβήτη τύπου 2 στον άνθρωπο; Τι επίπεδα γλυκόζης, πότε και σε ποιο πρότυπο λαμβάνονται τα βέλτιστα αποτελέσματα; Ποια από τις δύο μεθόδους είναι περισσότερο επιτυχής και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε διαδερμική χορήγηση αντιδιαβητικού φαρμάκου;

Το επόμενο βήμα, που αποτελεί και το βασικό πείραμα, είναι η μελέτη δράσεως ενός αντιδιαβητικού φαρμάκου σε διαδερμικό επίθεμα με χρήση παλμικού, εναλλασσόμενου και συνεχούς-παλμικού ηλεκτρικού ρεύματος. Επελέγη η πρώτη πιλοτική in vivo μελέτη να πραγματοποιηθεί στο δέρμα φυσιολογικών άτριχων μυών, αξιολογώντας τις μεταβολές γλυκόζης σε διάφορα χρονικά διαστήματα.

Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η διαδερμική απορρόφηση του αντιδιαβητικού φαρμάκου, ρεπαγλινίδη (Novonorm), η οποία ανήκει στην κατηγορία των μεγλιτινιδών, υπό μορφή διαδερμικού επιθέματος. Η ρεπαγλινίδη είναι ένα εκκριταγωγό φάρμακο βραχείας δράσης που λαμβάνεται από το στόμα. Το φάρμακο αυτό μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα εντόνως διεγείροντας την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η χορήγηση δόσεων από 0,5 mg έως 4 mg ρεπαγλινίδης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, προκαλεί δοσοεξαρτώμενη μείωση της γλυκόζης στο αίμα.

Για την κατά το δυνατόν αύξηση της απορροφήσεως της ρεπαγλινίδης εφαρμόζεται παλμικό, εναλλασσόμενο και συνεχές-παλμικό ρεύμα και αξιολογείται η φαρμακοδυναμική του φαρμάκου. Η χρήση ηλεκτρικού ρεύματος κατηγοριοποιείται στις φυσικές μεθόδους ενίσχυσης της διαδερμικής απορρόφησης και η εφαρμογή του έχει ως στόχο την προσωρινή μείωση του επιδερμικού φραγμού. Από τους βασικούς στόχους της μελέτης είναι να αξιολογηθεί αν το παλμικό, το εναλλασσόμενο και το συνεχές-παλμικό ρεύμα διαφέρουν ως προς το ενεργειακό τους αποτέλεσμα και κατά συνέπεια συμβάλλουν στη βελτίωση της διαδερμικής απορρόφησης του φαρμάκου. Η φαρμακολογική δράση αξιολογείται εμμέσως παρακολουθώντας την κινητική των μεταβολών των επιπέδων γλυκόζης.

Η μελέτη διεξάγεται από κοινού με τα μέλη του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής – Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων-Μηχανολόγων (ΗΜΜΥ) του ΕΜΠ. Στο δέρμα της ράχης άτριχων φυσιολογικών μυών, χορηγείται ηλεκτρικό ρεύμα

μικρής εντάσεως τετραγωνικού παλμικού (DC ON/OFF-Pulsed) (~0,25mA) εναλλασσόμενου (AC±), με ημιτονοειδή κυματομορφή (~0,25mA) άλλα και συνεχούς ρεύματος με τετραγωνικό παλμό (DC + DC ON/OFF-Pulsed) (~0,25 mA) με χρόνο εφαρμογής 10 min, με στόχο να αυξηθεί η διαδερμική απορρόφηση της ρεπαγλινίδης. Η πρώτη αυτή πιλοτική έρευνα πραγματοποιείται σε φυσιολογικούς μύες, καθώς η ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 απαιτεί μακρύ χρονικό διάστημα και ο χρόνος μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής δεν επαρκούσε. Έτσι προτιμήθηκαν φυσιολογικοί μύες, των οποίων ο φραγμός του δέρματός τους, είναι περισσότερο συμπαγής και αδιαπέραστος σε σχέση με το δέρμα των διαβητικών μυών. Ακόμα, προτιμήθηκαν φυσιολογικοί μύες καθώς η εργασία αυτή αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για τις επακόλουθες μελέτες. Τα μοντέλα διαβητικών μυών που αναπτύσσονται στο πρώτο πείραμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης σε ένα επόμενο πείραμα.

Επίσης χρησιμοποιούνται 3 χημικοί ενισχυτές διείσδυσης του φαρμάκου από την κεράτινη στιβάδα οι οποίοι είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η προπυλενογλυκόλη (PG) και η πολυαιθανογλυκόλη 400 (PEG 400). Το DMSO δρα και ως διαλύτης του φαρμάκου που χρησιμοποιείται. Ο μηχανισμός δράσης των παραπάνω ενισχυτών έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα (σελ.67).

Οι στόχοι της μελέτης αυτής συνοψίζονται στα παρακάτω ερωτήματα:

1. Το υπό εξέταση αντιδιαβητικό φάρμακο βελτιώνει τη διαδερμική του απορρόφηση με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος;
2. Ποιο από τα τρία χρησιμοποιούμενα ρεύματα ενισχύει καλύτερα τη διαδερμική απορρόφηση του φαρμάκου;
3. Το φαρμακολογικό αποτέλεσμα μετά από διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης με χρήση ρεύματος είναι συγκρίσιμο με το αντίστοιχο αποτέλεσμα κατά την χορήγηση της ρεπαγλινίδης από του στόματος;

7.3 1ο πείραμα: «Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών»

7.3.1 Υλικά & Μέθοδοι

Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη μελέτη ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-1, SKH-2, SKH-2 καφέ και SKH-2-APOE ηλικίας 12-16 εβδομάδων και βάρους 25-35g. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας και Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μύες και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 22°C και 24°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 ΒΙΟ 07). Το πρωτόκολλο με αριθμό **5628/25-10-2018** και τίτλο «**P51 Πρωτόκολλο πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε άτριχους μύες – Συγκριτική μελέτη**», πλήρωσε τις προδιαγραφές με βάση την ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία και έλαβε τη σχετική άδεια. Θα εστιάσουμε σε άτριχους μύες μόνο, οι οποίοι αποτελούν ικανοποιητικό πρότυπο (μοντέλο) για μελέτες στο δέρμα αλλά και για διαδερμική χορήγηση ουσιών.

Ομάδες

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

- | | | |
|---------------------|---|--|
| 1. SKH-hr-1 (άσπρα) | } | THE STREPTOZOTOCIN -
NICOTINAMIDE MICE MODEL (M1) |
| 2. SKH-hr-2 (μαύρα) | | |
| 3. SKH-hr-2 (καφέ) | | |
| 4. SKH-hr-2-APOE | | |
| 5. SKH-hr-1 (άσπρα) | } | THE HIGH FAT DIET -STREPTOZOTOCIN
MICE MODEL (M2) |
| 6. SKH-hr-2 (μαύρα) | | |
| 7. SKH-hr-2 (καφέ) | | |
| 8. SKH-hr-2-APOE | | |

Άρα συνολικά χρησιμοποιήσαμε 56 άτριχους αρσενικούς μύες. Επιλέχθηκαν αρσενικοί μύες καθώς οι θηλυκοί είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην στρεπτοζοτοκίνη και έτσι τα περισσότερα πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη διεξάγονται σε αρσενικούς μύες (Kolb, 1987).

Υλικά-Όργανα-Αντιδραστήρια

- TEWAMETER® TM 240, Όργανο μέτρησης Άδηλης Απώλειας νερού
- CORNEOMETER® CM 820, Όργανο μέτρησης της ενυδάτωσης
- Cutometer® MPA 580, Όργανο μέτρησης της ελαστικότητας
- Φασματοφωτόμετρο
- Φίλτρα, μήκη κύματος 450 nm και 590 nm
- Τροφή μυών εργαστηρίου
- Νικοτιναμίδιο (NAD, Sigma)
- Ύδωρ ενέσιμο (water for injection, DEMO SOLV.INJ.)
- 50 mM κιτρικό νάτριο (enzyme grade, Fisher), pH 4.5
- Στρεπτοζοτοκίνη (STZ, Sigma)
- Βελόνες 23-G και 25-G
- Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (METTLER TOLEDO, B154)
- Περιστροφικός μηχανικός αναδευτήρας Vortex Mixer (MS1 Minishakeerr IKA®)
- Χειρουργικό ψαλιδάκι
- Μετρητής σακχάρου, GlucoMen® areo sensor, A. Menarini Diagnostics
- Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, GlucoMen areo® , A. Menarini Diagnostics
- Σύριγγες 1 ml με αποσπώμενη βελόνα 27G, Μάρκα: Pic
- Σκουρόχρωμο Φιαλίδιο Γυάλινο 10 ml
- Σακχαρόζη
- Ζωικό λίπος
- Απιονισμένο ύδωρ
- Αυτόματη πιπέτα (Costar)
- Eppendorf μιας χρήσεως
- Φυγόκεντρος (Sigma 202 MK)
- Elisa kit για προσδιορισμό ινσουλίνης πλάσματος (Rat / Mouse Insulin 96 Well Plate Assay Cat. # EZRMI-13K, EMD Millipore Corporation)
- Αναδευτήρας πλάκας μικροτίτλου

- Πρόσθετα αντιδραστήρια και εξοπλισμός για ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μυών (Donovan and Brown, 2006a) και συλλογή αίματος αυτών (Donovan and Brown, 2006b).

7.3.2 Μέθοδοι-Πρωτόκολλα

Μέθοδος 1 (M1): THE STREPTOZOTOCIN-NICOTINAMIDE MICE MODEL (3 weeks)

Προετοιμασία μυών (1 εβδομάδα):

- 7 ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, εγκλιματίσαμε τους μύες σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος δηλαδή, στους $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και υγρασία $55\% \pm 5\%$, με 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους (αναμμένα φώτα από τις 7:00 π.μ. και σβησμένα φώτα από τις 19:00 μ.μ.). Κάθε κλωβός περιείχε 1 ομάδα, δηλαδή 7 αρσενικούς μύες οι οποίοι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.
- Εντός της εβδομάδας εγκλιματισμού, μετρήθηκαν στους μύες η άδηλη απώλεια νερού, η ενυδάτωση και η ερυθρότητα του δέρματος.
- Την ημέρα πριν την πρόκληση του διαβήτη (Ημέρα 0), όλοι οι μύες παρέμειναν **νηστικοί για 5 ώρες** (από τις 09:00 π.μ. έως τις 14:00 μ.μ.) και γίνεται μέτρηση γλυκόζης - νηστείας. Η παροχή νερού γινόταν κανονικά.

Πρόκληση διαβήτη με STZ και NAD (3 εβδομάδες):

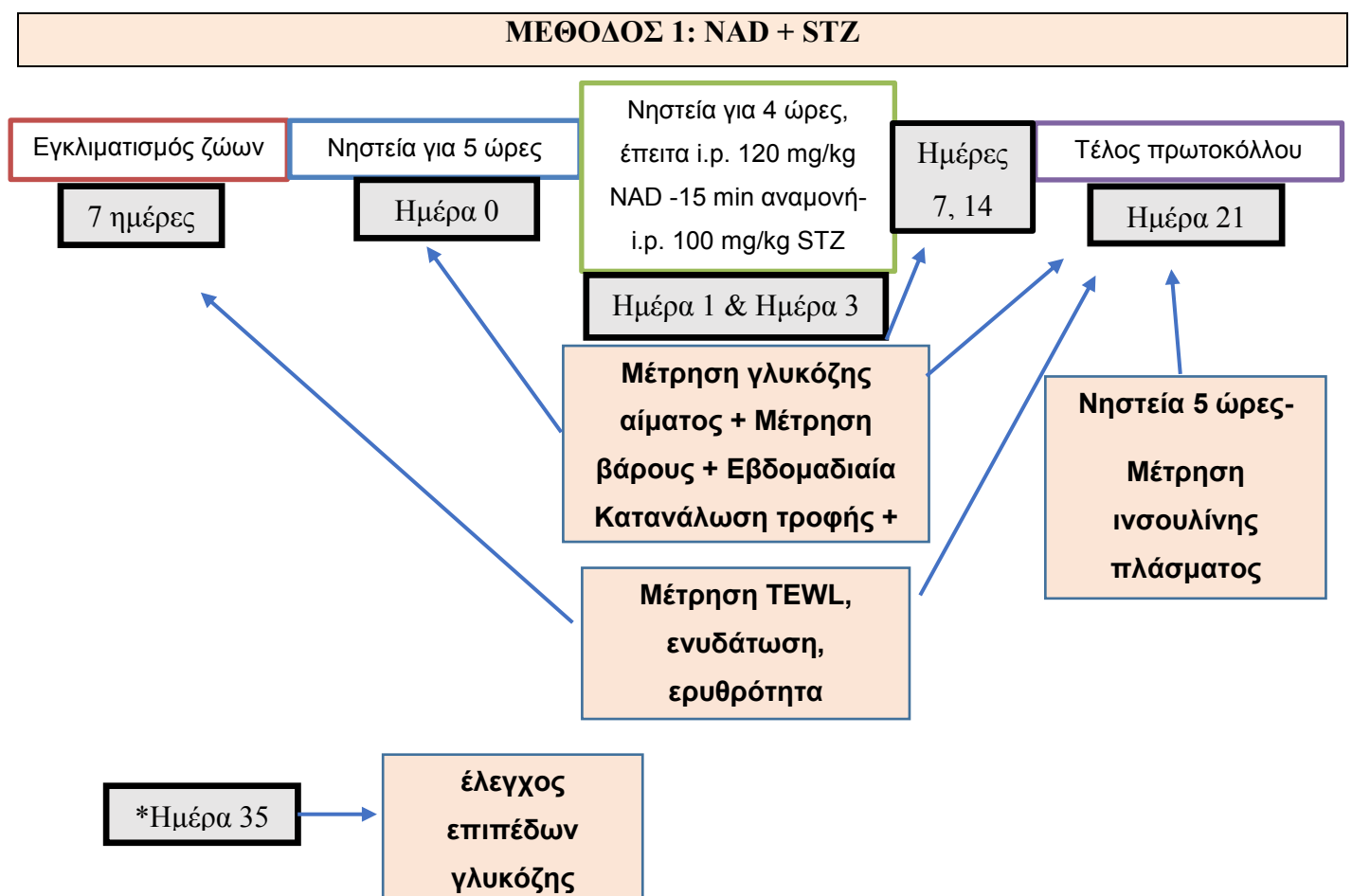
- Ημέρα 1:
 - Το NAD διαλύθηκε σε φυσιολογικό ορό και εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκώς (i.p.) σε δόση 120 mg/kg **15 λεπτά πριν** από τη χορήγηση της STZ.
 - Εγχύθηκε ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) ένεση STZ , διαλυμένη (εκείνη τη στιγμή) σε 50 mmol / L ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού (pH 4,5) σε δόση 100 mg / kg σωματικού βάρους **15 λεπτά μετά** τη χορήγηση του NAD.

Οι μύες παρέμειναν **νηστικοί 4 ώρες** πριν τη χορήγηση ενέσεων (από τις 09:00 π.μ. έως τη 13:00 μ.μ.).

- Ημέρα 3: Μετά από ένα διάστημα 1 ημέρας, το NAD και η STZ χορηγήθηκαν και πάλι με τον ίδιο τρόπο.

- Η συγκέντρωση γλυκόζης αίματος (BG), το σωματικό βάρος των μυών και η εβδομαδιαία κατανάλωση τροφής και νερού μετρήθηκαν τις ημέρες 0, 7, 14 και 21 του πειράματος σε μία καθορισμένη ώρα (09:00 π.μ.). Την τελευταία ημέρα (21^η) μετρήθηκαν στους μύες η άδηλη απώλεια νερού, η ενυδάτωση και η ερυθρότητα του δέρματος και έγινε λήψη αίματος για μέτρηση συγκέντρωσης ινσουλίνης στο πλάσμα. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.
- Μετρήσεις γλυκόζης-νηστείας λήφθηκαν και 2 εβδομάδες μετά το τέλος του πειράματος, δηλαδή τη 35η ημέρα για να έχουμε μια εμπειριστατωμένη εικόνα για την εξέλιξη του διαβήτη.

Χρονοδιάγραμμα Πειράματος: Μέθοδος 1



Μέθοδος 2 (M2): THE HIGH FAT-DIET STREPTOZOTOCIN MICE MODEL

(3 +3 weeks)

Προετοιμασία μυών (3 εβδομάδες):

- 7 ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος, εγκλιματίσαμε τους μύες σε σταθερές συνθήκες περιβάλλοντος δηλαδή, στους $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ και υγρασία $55\% \pm 5\%$, με 12ωρο κύκλο φωτός-σκότους (αναμμένα φώτα από τις 7:00 π.μ. και σβησμένα φώτα από τις 19:00 μ.μ.). Κάθε κλωβός περιείχε 1 ομάδα, δηλαδή 7 αρσενικούς μύες οι οποίοι είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.
- Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, ξεκινήσαμε στους μύες δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (HFD) για 3 εβδομάδες. Χρησιμοποιήσαμε την τροφή με την οποία εκτρέφονταν οι μύες του εργαστηρίου (pellets 6mm) και προσθέσαμε ζωικό λίπος μέχρι να πάρουμε 60% kcal σε λίπη (αναλογία τροφής που παρασκευάζεται: 100 g αλεσμένης τροφής εργαστηρίου + 40 g λίπος + 20 g ζάχαρη). Το ζωικό λίπος χρησιμοποιείται στη δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, καθώς είναι γνωστό ότι το λίπος αυτού του είδους προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη (Boivin and Deshaies, 1995). Στην ενότητα Υλικά παρουσιάζονται οι πίνακες που περιλαμβάνουν τη δίαιτα με τα συστατικά της.
- Εντός των 3 εβδομάδων, μετρήθηκαν στους μύες η άδηλη απώλεια νερού, η ενυδάτωση και η ερυθρότητα του δέρματος. Επίσης, μετρήθηκε το σωματικό βάρος των μυών και η κατανάλωση τροφής και νερού 1 φορά κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού.
- Την ημέρα πριν την πρόκληση του διαβήτη (Ημέρα 0), όλοι οι μύες παρέμειναν **νηστικοί για 5 ώρες** (09: 00 π.μ. -14:00 μ.μ.) για μέτρηση της «γλυκόζης-νηστείας». Η παροχή νερού γινόταν κανονικά.

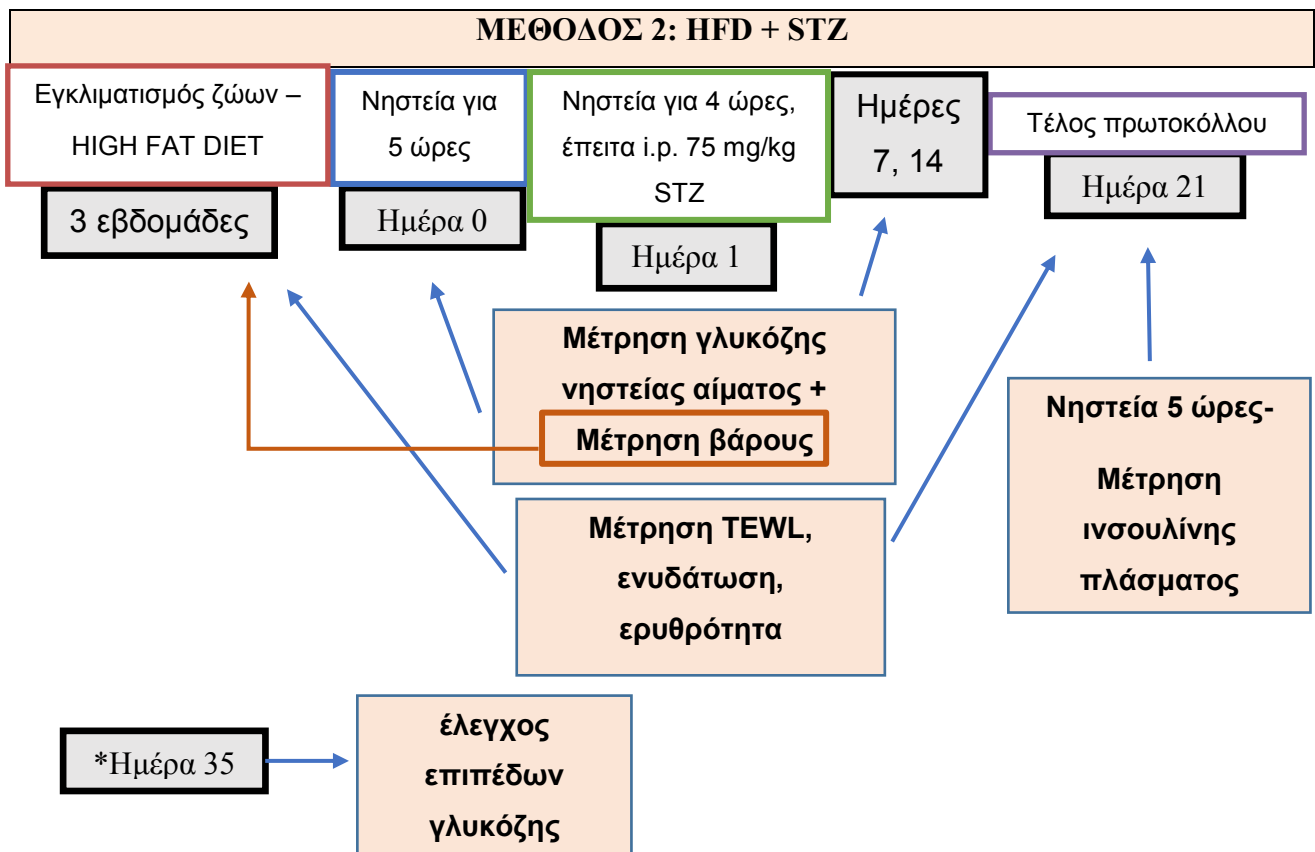
Πρόκληση διαβήτη με χαμηλή δόση STZ (3 εβδομάδες):

- Ημέρα 1:
 - Οι μύες έμειναν **νηστικοί για 4 ώρες** (09:00 π.μ.-13:00 μ.μ.). Έπειτα έγινε ενδοπεριτοναϊκή (i.p.) ένεση STZ, διαλυμένη (εκείνη τη στιγμή) σε 50 mmol

/ L ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού (pH 3,5) σε δόση 75 mg / kg σωματικού βάρους για την πρόκληση μερικής ανεπάρκειας ινσουλίνης. Ακολούθησαν 3 εβδομάδες ακόμη με την ίδια διατροφή.

- Ημέρα 14:
 - Τρεις εβδομάδες μετά την έγχυση STZ, οι περισσότεροι μύες που είχαν λάβει HFD / STZ εμφάνισαν υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Mu et al., 2006).
- Η συγκέντρωση «γλυκόζης–νηστείας» στο αίμα (BG), το σωματικό βάρος των μυών και η κατανάλωση τροφής και νερού μετρήθηκαν τις ημέρες 0, 7, 14 και 21 του πειράματος. Την τελευταία ημέρα (21η), μετρήθηκαν στους μύες η άδηλη απώλεια νερού, η ενυδάτωση και η ερυθρότητα του δέρματος και έγινε λήψη αίματος για μέτρηση συγκέντρωσης ινσουλίνης στο πλάσμα. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω.
- Μετρήσεις γλυκόζης-νηστείας λήφθηκαν και 2 εβδομάδες μετά το τέλος του πειράματος, δηλαδή τη 35η ημέρα για να έχουμε μια πιο εμπειριστατωμένη εικόνα για την εξέλιξη του διαβήτη.

Χρονοδιάγραμμα Πειράματος: Μέθοδος 2



Τροφή πειραματοζώων

Ανάλυση συστατικών της τροφής που εκτρέφονται οι μύες στο εργαστήριο

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



Εικόνα 45 Τροφή μυών εργαστηρίου

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

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

High Fat Diet

Προσθήκη συστατικών στην τροφή του εργαστηρίου με βάση τη βιβλιογραφία (Brunengraber et al., 2003; Gajda et al., 2007; Lee et al., 2018; Panchal and Brown, 2011; Ulman, 1999):

HIGH FAT DIET FOR MICE
Προσθήκη Συστατικών:
+ 12,5 % Σακχαρόζη
+ 27,7 % Ζωικό λίπος

Διαδικασία παρασκευής 100 gr τροφής πλούσια σε λιπαρά και σακχαρόζη (High Fat Diet):

- Χρησιμοποιήσαμε την τροφή με την οποία εκτρέφονταν οι μύες του εργαστηρίου σε μορφή σκόνης και ζυγίσαμε 34,8 gr.
- Μετά από θέρμανση του λίπους, ζυγίσαμε 27,7 gr & το προσθέσαμε στην κονιοποιημένη τροφή.
- Ζυγίσαμε 12,5 gr σακχαρόζη διαλυμένη σε διπλάσια ποσότητα νερού (25 gr) & την προσθέσαμε στο μείγμα.
- Αναμίξαμε και τα 3 συστατικά (σκόνη τροφής-λίπος-σακχαρόζη) και μορφοποιήσαμε σε κατάλληλο σχήμα.



Εικόνα 46 High Fat Diet – παρασκευή στο εργαστήριο

Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης-νηστείας στο αίμα (Blood Glucose Concentration, BG)

Όργανα:

- a. Χειρουργικό ψαλιδάκι
- b. Μετρητής σακχάρου, GlucoMen® areo sensor, A. Menarini Diagnostics
- c. Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, GlucoMen areo® , A. Menarini Diagnostics

Ανοίγεται μια ταινία μέτρησης γλυκόζης και εισάγεται στην υποδοχή του μετρητή το άκρο της ταινίας που έχει 3 μαύρες γραμμές. Με το ψαλιδάκι κόβεται με προσοχή απειροελάχιστο κομμάτι από την ουρά του μυός, ώστε να σχηματιστεί μικρή σταγόνα αίματος. Τοποθετείται το αίμα στην άκρη της ταινίας (λευκή περιοχή). Η ταινία

μέτρησης λειτουργεί ως σπόγγος, τραβώντας το αίμα στο εσωτερικό της. Η μέτρηση ξεκινάει αυτόματα όταν τοποθετηθεί επαρκής ποσότητα αίματος. Δεν πρέπει να απομακρυνθεί η ουρά από την ταινία μέχρι να αρχίσει η μέτρηση. Η μέτρηση ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα και το αποτέλεσμα εμφανίζεται αυτόματα στην οθόνη του

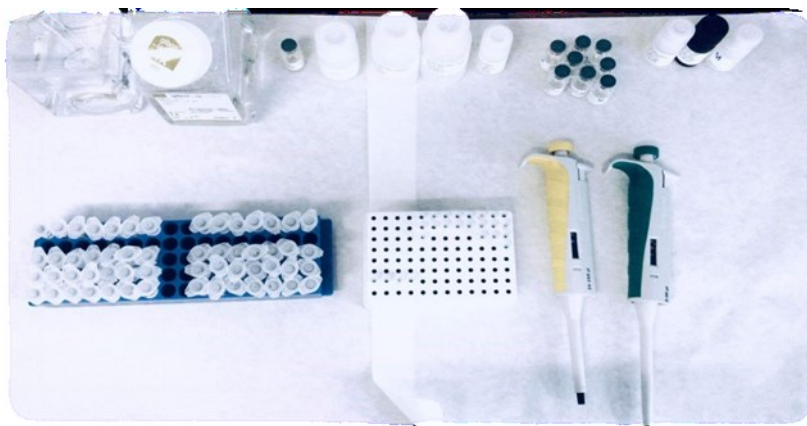


Εικόνα 47 Μέτρηση γλυκόζης αίματος με νύξη ουράς στο μυ

μετρητή. Αίμα συλλέχθηκε τις ημέρες 0, 7, 14 και 21 την ίδια ώρα κάθε φορά για την αξιολόγηση της «γλυκόζης νηστείας» κατά την οποία λήφθηκε η μέτρηση μετά από 4 ώρες χωρίς λήψη τροφής. Χρησιμοποιήσαμε ηλεκτροχημικό μετρητή γλυκόζης αίματος, ο οποίος αποτελεί ενδεδειγμένο τρόπο μέτρησης της γλυκόζης (Χαλβασιώτης, 2015).

Πρωτόκολλο μέτρησης ινσουλίνης πλάσματος (Plasma Insulin Concentration in the Diabetic Model Mice, PI)

Την ημέρα 21 μετά την έναρξη της επαγωγής του διαβήτη, οι μύες έμειναν νηστικοί για 5 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκε αίμα από την προσωπική φλέβα που βρίσκεται στην περιοχή της κάτω γνάθου του μύς. Έπειτα με φυγοκέντρηση σε 9000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C πήραμε το πλάσμα, συλλέγοντας 25 μl από αυτό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για μέτρηση ινσουλίνης με τη μέθοδο ELISA kit (Insulin mouse ELISA Kit).



Εικόνα 48 Μέτρηση ινσουλίνης πλάσματος με μέθοδο ELISA

Μέθοδος ELISA Kit για μέτρηση ινσουλίνης σε πλάσμα μυός

Δειγματική Συλλογή και Αποθήκευση

- Για να παρασκευαστεί ορός, το ολικό αίμα κατευθύνεται απευθείας σε σωλήνα φυγοκέντρησης που δεν περιέχει αντιπηκτικό. Αφήνουμε τον θρόμβο αίματος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Αμέσως φυγοκεντρούμε το θρομβωμένο αίμα σε 9000 στροφές για 10 λεπτά στους $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Μεταφέρουμε και αποθηκεύουμε τα δείγματα ορού σε χωριστούς σωλήνες.
- Χρησιμοποιούμε πρόσφατα παρασκευασμένο δείγμα ορού ή πλάσματος και αποθηκεύουμε τα δείγματα στους $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ για μεταγενέστερη χρήση. Για μακροχρόνια αποθήκευση, τα διατηρούμε στους -70°C . Αποφεύγουμε τους κύκλους ψύξης / απόψυξης.
- Για την παρασκευή δείγματος πλάσματος, το πλήρες αίμα πρέπει να συλλέγεται σε σωληνάρια φυγοκέντρησης που περιέχουν αρκετό K_3EDTA για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση $1.735 \text{ mg} / \text{mL}$ και να φυγοκεντρηθούν αμέσως μετά τη συλλογή.
- Εάν η ηπαρίνη πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό, πρέπει να προκαθορίζεται η επίδραση στην έκβαση της ανάλυσης στη δόση της χρησιμοποιούμενης ηπαρίνης.
- Αποφεύγουμε τη χρήση δειγμάτων με αιμόλυση ή λιπαιμία.

Διαδικασία Ανάλυσης

Προθερμαίνουμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν ξεκινήσουμε την ανάλυση δειγμάτων.

1. Αραιώνουμε το συμπύκνωμα 10X Wash Buffer 10 φορές αναμειγνύοντας ολόκληρο το περιεχόμενο από κάθε μπουκάλι ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης με 450mL απιονισμένο νερό. (αραιώνουμε και τα δύο μπουκάλια με 900 mL απιονισμένο νερό).
2. Αφαιρούμε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών από την πλάκα δοκιμής μικροτιτλοδότησης. Οι αχρησιμοποίητες λωρίδες πρέπει να σφραγιστούν εκ νέου στη θήκη από φύλλο αλουμινίου και να αποθηκευτούν στους $2-8^{\circ}\text{C}$. Συγκροτούμε τις λωρίδες σε μια άδεια υποδοχή πλάκας και πλένουμε το κάθε πηγάδι 3 φορές

με 300 μL αραιωμένου Wash Buffer ανά πλύση. Αποστάζουμε το Wash Buffer και αφαιρούμε την υπολειμματική ποσότητα από όλα τα πηγαδάκια αναστρέφοντας την πλάκα και χτυπώντας την ελαφρά σε διηθητικό χαρτί αρκετές φορές. Δεν αφήνουμε τα πηγαδάκια να στεγνώσουν πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα. Εάν χρησιμοποιούμε αυτοματοποιημένο μηχάνημα για δοκιμασία, ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή για όλα τα βήματα πλύσης που περιγράφονται σε αυτό το πρωτόκολλο.

3. Προσθέτουμε 10 μL Assay Buffer σε κάθε ένα από τα πηγαδάκια Blank και τα πηγαδάκια δειγμάτων (Sample wells).
4. Εάν τα δείγματα που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμασία είναι ορός ή πλάσμα, προσθέτουμε 10 μL Matrix Solution στο Blank, Standard και Control πηγαδάκια (επιλογή A). Αν τα δείγματα είναι απαλλαγμένα από σημαντικά συστατικά του ορού, προσθέστε 10 μL Assay Buffer (επιλογή B).
5. Προσθέτουμε εις διπλούν 10 μL Mice Insulin Standards με τη σειρά ανόδου συγκέντρωσης στα κατάλληλα πηγαδάκια.
6. Προσθέτουμε 10 μL QC1 (Quality Control 1) και 10 μL QC2 (Quality Control 2) στα κατάλληλα πηγαδάκια.
7. Προσθέτουμε διαδοχικά 10 μL από τα άγνωστα δείγματα εις διπλούν στα υπόλοιπα πηγαδάκια.
8. Προσθέτουμε 80 μL Detection Antibody σε όλα τα πηγαδάκια. Για καλύτερα αποτελέσματα, όλες οι προσθήκες θα πρέπει να ολοκληρωθούν εντός μίας ώρας. Καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστή πλάκας και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες σε έναν αναδευτήρα πλάκας τροχιακού μικροτίτλου που έχει ρυθμιστεί να περιστρέφεται με μέτρια ταχύτητα, περίπου 400 έως 500 rpm.
9. Αφαιρούμε το σφραγιστικό πλακιδίων και τα διαλύματα απόσταξης από την πλάκα. Αναστρέφοντας την πλάκα και την χτυπάμε ελαφρά σε διηθητικό χαρτί αρκετές φορές για να αφαιρέσουμε τα υπόλοιπα διαλύματα καλά.
10. Πλένουμε τα πηγαδάκια 3 φορές με αραιωμένο Wash Buffer, 300 μL ανά πηγαδάκι ανά πλύση. Πλένουμε μετά από κάθε πλύση για να αφαιρέσουμε το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα.
11. Προσθέτουμε 100 μl Enzyme Solution σε κάθε πηγαδάκι. Καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστικό και επωάζουμε με μέτρια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά στον αναδευτήρα πλάκας μικροτίτλου.

12. Αφαιρούμε τα σφραγιστικά και τα διαλύματα απόσταξης από την πλάκα και χτυπάμε ελαφρώς την πλάκα για να αφαιρέσουμε το υπολειμματικό υγρό.
13. Πλένουμε τα πηγαδάκια 6 φορές με αραιωμένο Wash Buffer, 300 μL ανά πηγαδάκι ανά πλύση. Πλένουμε μετά από κάθε πλύση για να αφαιρέσουμε το υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα.
14. Προσθέτουμε 100 μL Substrate Solution σε κάθε πηγαδάκι, καλύπτουμε την πλάκα με σφραγιστικό και ανακινούμε στον αναδευτήρα πλάκας για περίπου 5 έως 20 λεπτά. Το μπλε χρώμα θα πρέπει να σχηματίζεται σε πηγάδια των Insulin Standards με ένταση ανάλογη προς τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις ινσουλίνης.

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

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

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5-7	Step 8	Step 8-10	Step 11	Step 11-13	Step 14	Step 14	Step 15	St
Well #	Dilute each bottle 10X Wash Buffer with 450mL Deionized Water.	Wash plate 3X with 300 μ L Wash Buffer. Remove residual buffer by tapping smartly on absorbent towels	Assay Buffer	Matrix Solution	Standards/ Controls/ Samples	Detection Ab	Seal, Agitate, Incubate 2 hours at Room Temperature. Wash 3X with 300 μ L Wash Buffer	Enzyme Solution	Seal, Agitate, Incubate 30 minutes at Room Temperature. Wash 6X with 300 μ L Wash Buffer	Substrate	Seal, Agitate, Incubate 15 minutes at Room Temperature.	Stop Solution	Read Absorbance at 450 nm and 590 nm.
A1, B1			10 μ L	10 μ L	-----	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
C1, D1			-----	10 μ L	10 μ L of 0.2 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
E1, F1			-----	10 μ L	10 μ L of 0.5 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
G1, H1			-----	10 μ L	10 μ L of 1 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
A2, B2			-----	10 μ L	10 μ L of 2 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
C2, D2			-----	10 μ L	10 μ L of 5 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
E2, F2			-----	10 μ L	10 μ L of 10 ng/mL Standard	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
G2, H2			-----	10 μ L	10 μ L of QC I	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
A3, B3			-----	10 μ L	10 μ L of QC II	80 μ L		100 μ L		100 μ L			
C3, D3 ↓			10 μ L	-----	10 μ L of Sample	80 μ L		100 μ L		100 μ L			

Πίνακας 12 Βήματα για προσδιορισμό ινσουλίνης πλάσματος με τη μέθοδο Elisa kit

Υπολογισμοί

Η καμπύλη δόσης-απόκρισης αυτής της ανάλυσης ταιριάζει καλύτερα σε μια σιγμοειδής λογική εξίσωση 4 ή 5 παραμέτρων. Τα αποτελέσματα άγνωστων δειγμάτων μπορούν να υπολογιστούν με οποιοδήποτε πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή που έχει μια λογική λειτουργία 4 ή 5 παραμέτρων. Σχεδιάζουμε την καμπύλη αναφοράς για την ερμηνεία δείγματος, βάζοντας στον άξονα Y την διαφορά των τιμών απορρόφησης από τα μήκη κύματος 450-590 nm και στον άξονα X, τη συγκέντρωση (ng / mL) των προτύπων διαλυμάτων ινσουλίνης.

Σημείωση: Όταν οι δοκιμασμένοι όγκοι δειγμάτων διαφέρουν από 10 μ L, πρέπει να γίνει μια κατάλληλη μαθηματική προσαρμογή για να ληφθεί υπόψη ο συντελεστής αραίωσης (π.χ., εάν χρησιμοποιούνται 5 μ L δείγματος, τότε τα υπολογιζόμενα δεδομένα πρέπει να πολλαπλασιαστούν επί 2).

Ερμηνεία

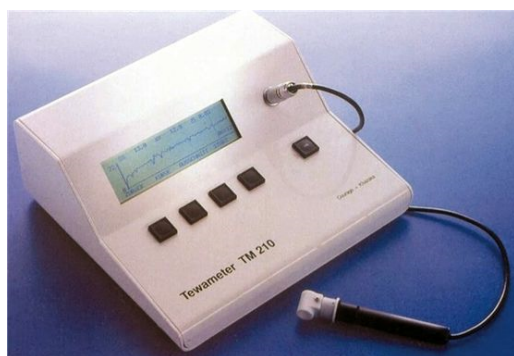
Κριτήρια αποδοχής:

1. Η ανάλυση θα θεωρείται αποδεκτή όταν όλες οι τιμές ελέγχου ποιότητας εμπίπτουν στο υπολογισμένο εύρος ποιοτικού ελέγχου.

2. Εάν η διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων ενός δείγματος είναι > 15% CV, επαναλαμβάνουμε το δείγμα.
3. Το όριο ευαισθησίας αυτής της ανάλυσης είναι 0,1 ng / mL (17,5 μM) ινσουλίνης (μέγεθος δείγματος 10 μL).
4. Το κατάλληλο εύρος αυτής της ανάλυσης είναι 0,1 ng / mL έως 10 ng / mL ινσουλίνης (μέγεθος δείγματος 10 μL). Οποιοδήποτε αποτέλεσμα μεγαλύτερο από 10 ng / mL σε ένα δείγμα 10 μL που αναλύθηκε θα πρέπει να επαναλαμβάνεται με αραιώση χρησιμοποιώντας είτε διάλυμα μήτρας είτε ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης, όποιο είναι κατάλληλο, ως αραιωτικό μέχρι να πέσει στην περιοχή.

Πρωτόκολλο Μέτρησης Άδηλης Απώλειας νερού:

Όργανο: TEWAMETER® TM 210



Εικόνα 49 TEWAMETER TM 210

Για την άδηλη απώλεια ύδατος χρησιμοποιήθηκε το όργανο TEWAMETER® TM 210 (Courage-Khazaka, Germany). Η συγκεκριμένη παράμετρος δίνει την ικανότητα να αξιολογηθεί η λειτουργία του φραγμού στο δέρμα. Ακόμα και η μικρότερη βλάβη, όπου δεν μπορεί να γίνει ορατή με γυμνό μάτι, μπορεί να καθοριστεί με αυτό το όργανο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει πάντα μια καθορισμένη εξάτμιση ύδατος από την επιδερμίδα, ως τμήμα του φυσιολογικού δερματικού μεταβολισμού. Μόλις εμφανιστεί η παραμικρή βλάβη, η τιμή της εξάτμισης αυξάνεται. Ο αισθητήρας μπορεί να μετρήσει τη διαφορά στην εξάτμιση του ύδατος μέσω ενός ζεύγους ανιχνευτών όπου διαθέτει (ένας για τη μέτρηση της θερμοκρασίας και ένας για τη μέτρηση της σχετικής υγρασίας). Ένας μικροεπεξεργαστής δίνει το ρυθμό εξάτμισης σε g/h/m².

Πρωτόκολλο Μέτρησης ενυδάτωσης:

Όργανο: CORNEOMETER® CM 820

Η κεράτινη στοιβάδα αποτελείται σε ένα ποσοστό 10- 20% από νερό. Η μείωση αυτού του νερού σε ποσοστό μικρότερο του 10% από το ανώτερο τμήμα της κεράτινης στοιβάδας συνοδεύεται από ξηρότητα, τραχύτητα, ευθραυστότητα, ενώ αντιθέτως η παρουσία του νερού σε ικανοποιητικά ποσοστά συνοδεύεται από μία επιφάνεια



Εικόνα 50 CORNEOMETER CM 820

δέρματος, που είναι λεία και απαλή. Η λεπιδώδης εμφάνιση, η οποία παρατηρείται σε πολλές δερματικές βλάβες στην κλινική πράξη, οφείλεται στην ελαττωματική λειτουργία της παθολογικής κεράτινης στοιβάδας, η οποία δε μπορεί να συγκρατήσει αρκετή υγρασία ακόμα και σε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το Corneometer® μετρά σε αυθαίρετες μονάδες από 0 (καθόλου νερό) - 120 (για το νερό). Οι μονάδες μέτρησης έχουν καθιερωθεί ως «μονάδες Conpreometer». Το βάθος διείσδυσης του ηλεκτρικού πεδίου σκέδασης είναι αποδεδειγμένα πολύ μικρό, έτσι ώστε μόνο η υγρασία στην επιφάνεια του δέρματος να μετριέται. Η πολύ σύντομη χρονική διάρκεια της μέτρησης (1 δευτερόλεπτο) αποτρέπει τη δημιουργία απόφραξης που επηρεάζει το αποτέλεσμα. Η μικρή κεφαλή μέτρησης επιτρέπει μετρήσεις σε όλα τα σημεία του σώματος. Η μέτρηση της χωρητικότητας πρέπει να έχει πλήρη επαφή με την επιφάνεια στήριξης (Liao et al., 2009).

Πρωτόκολλο Μέτρησης ερυθρότητας:

Όργανο: MEXAMETER® MX 18

Η μέτρηση της ερυθρότητας πραγματοποιήθηκε με το όργανο MEXAMETER® MX 18 (Courage-Khazaka, Germany). Η αρχή λειτουργίας του οργάνου βασίζεται στην απορρόφηση και στην ανάκλαση της ακτινοβολίας. Ο αισθητήρας εκπέμπει σε μήκη κύματος τα οποία αντιστοιχούν στις κορυφές απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης. Ένας δέκτης μετρά την ακτινοβολία που ανακλάται από την επιδερμίδα. Η ποσότητα της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι καθορισμένη, επομένως υπολογίζεται από το όργανο η ποσότητα που έχει απορροφηθεί.



Εικόνα 51 MEXAMETER MX 18

7.4 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθέματων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»

7.4.1 Υλικά & Μέθοδοι

Επιλογή φαρμάκου

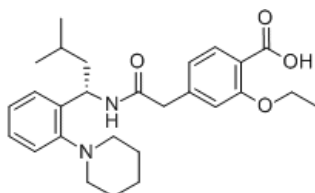
Η επιλογή φαρμάκου έγινε με βάση τα χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει η ουσία για να περάσει το φραγμό του δέρματος. Η επιλογή της ρεπαγλινίδης βασίστηκε στα φυσικοχημικά και φαρμακοκινητικά της χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, το φάρμακο έχει ημερήσια δόση 1-4 mg (<20 mg), μοριακό βάρος 452.5 (<500), logP 3,97 (δηλαδή μεταξύ 1-4), χρόνο ημίσειας ζωής 1 h (<10 h) και σημείο τήξης 130-131 °C (<200 °C). Τα χαρακτηριστικά αυτά αποτελούν θετικές ενδείξεις ανάπτυξης διαδερμικού θεραπευτικού επιθέματος.

Ρεπαγλινίδη

Χημική ονομασία: (S)-2-Ethoxy-4-[2-[[methyl-1-[2-(1-piperidiny)]-phenyl]butyl]amino]-2-oxoethyl]-benzoic acid

Μοριακός τύπος: C₂₇H₃₆N₂O₄

Συντακτικός τύπος:



Catalog Num	A10783
Actions	Inhibitor
M. Wt	452.59
Formula	C ₂₇ H ₃₆ N ₂ O ₄
Solubility	DMSO
Purity	>98%
Melting Point	130-131 °C
Storage	at -20°C 3 years Powder

Πίνακας 13 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ρεπαγλινίδης (Πηγή: AdooQ BioScience®)

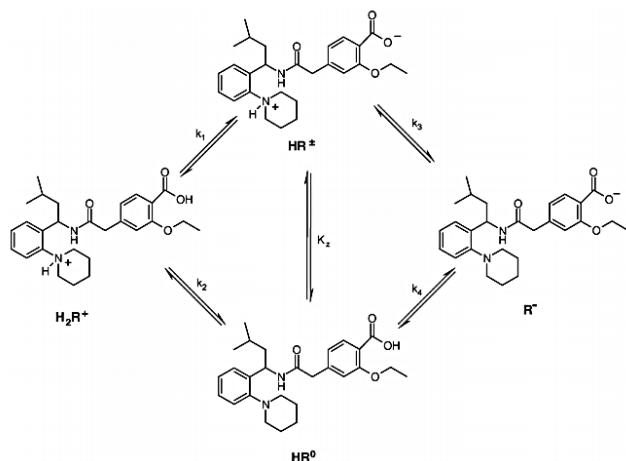
Solubility (25°C)*	In vitro	DMSO	91 mg/mL (201.06 mM)
		Water	<1 mg/mL (<1 mM)
		Ethanol	91 mg/mL (201.06 mM)
* <1 mg/ml means slightly soluble or insoluble.			

Πίνακας 14 Διαλυτότητα ρεπαγλινίδης (Πηγή: AdooQ BioScience®)

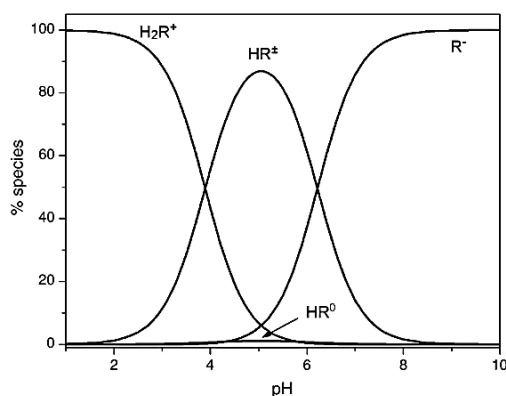
Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η ρεπαγλινίδη είναι μια λευκή έως υπόλευκη σκόνη. Είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, ευδιάλυτη στο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), στο χλωροφόρμιο και στην άνυδρη αιθανόλη. Η ρεπαγλινίδη έχει pH 5,0-7,0, σημείο τήξης 130-131 ° C και το pK_a είναι: $pK_{a1} = 3.9$ και $pK_{a2} = 6.1$ (Tarantino, 2015).

Η ρεπαγλινίδη διαθέτει δύο θέσεις πρόσδεσης πρωτονίων που της δίνουν αμφολυτική φύση και η φυσικοχημική και φαρμακολογική συμπεριφορά της καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την αμφολυτική μορφή της, η οποία υπάρχει κυρίως σε υδατικά διαλύματα. Παρά τη αμφολυτική της φύση, η ρεπαγλινίδη είναι μάλλον λιπόφιλη, όπως προσδιορίζεται από την σχετικά υψηλή τιμή $\log P$ της. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία ενδομοριακής ηλεκτροστατικής έλξης της θετικά φορτισμένης αρωματικής αμινομάδας και του αρνητικά φορτισμένου καρβοξυλικού ιόντος. Αυτά τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά έχουν ισχυρό αντίκτυπο σχετικά με τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά της ρεπαγλινίδης *in vivo*, με αποτέλεσμα τον μοναδικό μηχανισμό δράσης και μηχανισμό απέκκρισης μεταξύ άλλων αντιδιαβητικών φαρμάκων. Η τιμή $\log P = 3,97$ δείχνει υψηλή λιποφιλία της ρεπαγλινίδης, η οποία μαζί με την εγγενή διαλυτότητά της, 34 $\mu g / ml$ στους 37 °C, επιτρέπει την ταχεία απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σωλήνα (Mandić and Gabelica, 2006).

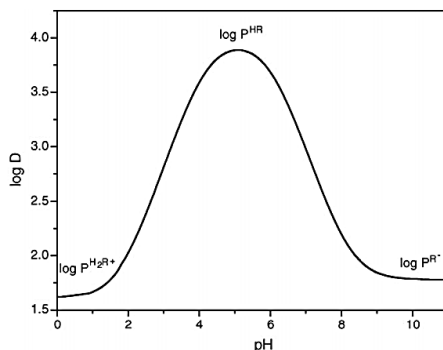


Εικόνα 52 Ιονισμός ρεπαγλινίδης
(Mandić and Gabelica, 2006)



Σχήμα 2 Κατανομή των τεσσάρων πιθανών ιοντισμένων και μη ιοντισμένων μορφών της ρεπαγλινίδης σε υδατικό διάλυμα (Mandić and Gabelica, 2006).

Λόγω της μεγάλης λιποφιλικότητας της αφόρτιστης μορφής ρεπαγλινίδης, HR^0 , και της αξιοσημείωτης κατανομής του αμφολυτικού ιόντος HR^\pm σε οκτανόλη, το προφίλ λιποφιλίας της ρεπαγλινίδης παρουσιάζει μια καμπύλη σχήματος καμπάνας (Mandić and Gabelica, 2006).



Σχήμα 3 Λιποφιλικό προφίλ ρεπαγλινίδης (Mandić and Gabelica, 2006)

Διαλυτότητα

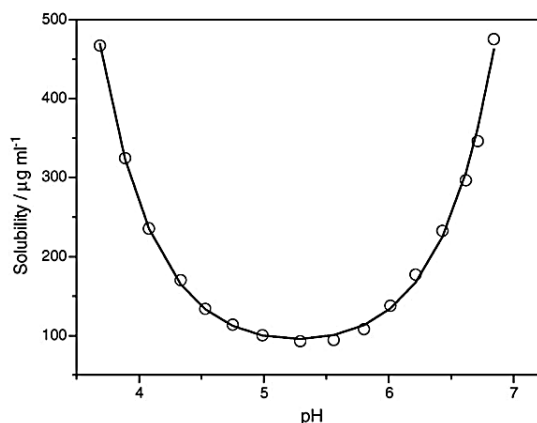
Για ενώσεις με δύο ιονιζόμενες ομάδες, η διαλυτότητα σε δεδομένο pH είναι το άθροισμα των συγκεντρώσεων του κάθε ιόντος σε κορεσμένο διάλυμα. Για την αμφολυτική ρεπαγλινίδα η διαλυτότητα μπορεί να εκφραστεί ως εξής:

$$S = [H_2R^+] + [HR^0] + [HR^\pm] + [R^-] \text{ (Εξίσωση 13)}$$

Είναι προφανές από την εξίσωση (13) ότι η διαλυτότητα της ρεπαγλινίδης εξαρτάται από τις σταθερές ιονισμού, το pH και την ενδογενή διαλυτότητα, S_0 , η οποία ορίζεται ως η διαλυτότητα της ουδέτερης μορφής της ένωσης, $[HR] = [HR^0] + [HR^\pm]$. Συνεπώς, η διαλυτότητα της ρεπαγλινίδης μπορεί να εκφραστεί με την ακόλουθη εξίσωση:

$$S = S_0 (1 + 10^{pKa1-pH} + 10^{pH-pKa2}) \text{ (Εξίσωση 14)}$$

Το παρακάτω σχήμα δείχνει το προφίλ pH-διαλυτότητας της ρεπαγλινίδης στους 25 °C. Το προφίλ διαλυτότητας παρουσιάζει το χαρακτηριστικό σχήμα U για αμφολυτικές ενώσεις (Mandić and Gabelica, 2006).

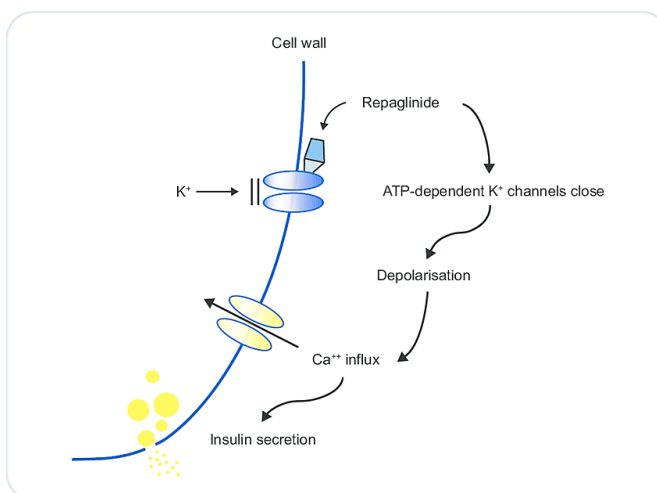


Σχήμα 4 Διαλυτότητα της ρεπαγλινίδης ως συνάρτηση του pH στους 25 °C (Mandić and Gabelica, 2006)

Φαρμακοδυναμική

Η ρεπαγλινίδη είναι ένα πρωτοποριακό εκκριταγωγό φάρμακο βραχείας δράσης που λαμβάνεται από το στόμα. Το φάρμακο αυτό μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα εντόνως διεγείροντας την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας, δράση που εξαρτάται από τα ενεργά β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων.

Η ρεπαγλινίδη κλείνει τις εξαρτώμενες από ATP διαύλους καλίου στη μεμβράνη των β-κυττάρων, μέσω μιας πρωτεΐνης - στόχου που διαφέρει από άλλα εκκριταγωγά φάρμακα. Αυτό εξουδετερώνει την πόλωση των β-κυττάρων και οδηγεί σε άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου. Η αυξημένη εισροή ασβεστίου που προκαλείται, επιφέρει την έκκριση ινσουλίνης από το β-κύτταρο. Σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 2, η ινσουλινοτρόπος ανταπόκριση σε γεύμα εμφανίζεται εντός 30 λεπτών μετά τη χορήγηση από το στόμα μιας δόσης ρεπαγλινίδης. Αυτό οδηγεί σε μείωση της γλυκόζης στο αίμα κατά τη διάρκεια του γεύματος. Τα αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης δεν διατηρούνται πέραν του χρόνου του γεύματος. Τα επίπεδα ρεπαγλινίδης στο πλάσμα μειώνονται γρήγορα και εμφανίζονται χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου στο πλάσμα ασθενών με διαβήτη τύπου 2, 4 ώρες μετά τη χορήγηση.



Εικόνα 53 Μηχανισμός δράσης ρεπαγλινίδης (Moses, 2009)

Η χορήγηση δόσεων από 0,5 mg έως 4 mg ρεπαγλινίδης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, προκαλεί δόσοεξαρτώμενη μείωση της γλυκόζης στο αίμα. Τα αποτελέσματα κλινικής μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση της ρεπαγλινίδης είναι καλύτερη σε σχέση με τα κύρια γεύματα (προγευματική χορήγηση). Οι δόσεις λαμβάνονται συνήθως 15 λεπτά προ του γεύματος, αλλά ο χρόνος μπορεί να ποικίλλει μεταξύ αυτού ακριβώς πριν από το γεύμα, έως και 30 λεπτά πριν από το γεύμα (Πηγή: Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων).

Φαρμακοκινητική

Η ρεπαγλινίδη απορροφάται ταχέως από το γαστρεντερικό σωλήνα, γεγονός που οδηγεί σε ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Τα μέγιστα

επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα επιτυγχάνονται εντός μιας ώρας μετά τη χορήγηση.

Μετά την επίτευξη ενός μέγιστου, τα επίπεδα στο πλάσμα μειώνονται ταχέως και η ρεπαγλινίδη απομακρύνεται εντός 4 – 6 ωρών. Ο χρόνος ημιζωής στο πλάσμα είναι περίπου 1 ώρα. Η φαρμακοκινητική της ρεπαγλινίδης χαρακτηρίζεται από μία μέση απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της τάξης του 63% (CV 11%), μικρό όγκο κατανομής, 30 λίτρα (κατά την κατανομή μέσα στο ενδοκυττάριο υγρό), και από ταχεία απομάκρυνση από το αίμα. Μια δια-ατομική υψηλή διακύμανση (60%) των συγκεντρώσεων της ρεπαγλινίδης στο πλάσμα έχει ανιχνευτεί στις κλινικές μελέτες. Η ενδο-ατομική διακύμανση είναι χαμηλή έως μέτρια (35%) και εφόσον η ρεπαγλινίδη πρέπει να τιτλοποιείται σύμφωνα με την κλινική ανταπόκριση, η αποτελεσματικότητά της δεν επηρεάζεται από τις δια-ατομικές διακυμάνσεις.

Η έκθεση στη ρεπαγλινίδη αυξάνεται σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια και σε ηλικιωμένους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Η AUC (SD) μετά από έκθεση σε εφάπαξ δόση 2 mg (4 mg σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια) ήταν 31,4 ng/ml X ώρες (28,3) σε υγιείς εθελοντές, 304,9 ng/ml X ώρες (228,0) σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια και 117,9 ng/ml X ώρες (83,8) σε ηλικιωμένους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Μετά από θεραπεία 5 ημερών με ρεπαγλινίδη (2 mg X 3/ημέρα) ασθενών με σοβαρή διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας (κάθαρση κρεατινίνης: 20 – 39 ml/λεπτό), τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική 2πλάσια αύξηση της έκθεσης (AUC) και του χρόνου ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$), σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Η ρεπαγλινίδη έχει υψηλό ποσοστό δέσμευσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος στους ανθρώπους (μεγαλύτερο από 98%) (Πηγή: Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων).

Υλικά-Όργανα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που περιλαμβάνονται στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθως αναφερόμενα υλικά, όργανα και αντιδραστήρια.

- Πιπέτα μηχανική ακριβείας GLASSCO μεταβλητού όγκου 20-200μL
- Πιπέτα δοσομέτρησης, πλαστική
- Ρύγχη Αυτόματων Πιπετών 0-200μL, Κίτρινα, AHN myTip T, AHN Biotechnologie GmbH
- Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (METTLER TOLEDO, B154)

- Περιστροφικός μηχανικός αναδευτήρας Vortex Mixer (MS1 Minishakeerr IKA®)
- Παλμογράφος, OSCILLOSCOPE V-212 20 MHz, HITACHI
- Γεννήτρια ρεύματος, TG210 2MHz FUNCTION GENERATOR, THURLBY THANDAR
- Ηλεκτροαγωγή ύφασμα
- Νεογνικά ηλεκτρόδια Ag/AgCl, ECG Electrodes, size 30 mm, TOP TRACE
- Απορροφητικός σπόγγος 0,8 cm², πάχος: 3mm
- Θήκη φύλαξης μυός από plexiglass (ποντικοπαγίδα), Braintree Scientific, Inc.
- 2 καλώδια συνδεδεμένα στη γεννήτρια ρεύματος (θετικός-αρνητικός πόλος)
- 2 καλώδια με κροκοδειλάκια
- Χειρουργικό ψαλιδάκι
- Μετρητής σακχάρου, GlucoMen® areo sensor, A. Menarini Diagnostics
- Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, GlucoMen areo® , A. Menarini Diagnostics
- Κολλητική ταινία PVC, 19mm x50mm Ferrara, χρώμα: μαύρο
- Χρονόμετρο Junso® JS-316
- Σύριγγες 1 ml με αποσπώμενη βελόνα 27G, Μάρκα: Pic
- Gavage για per os χορήγηση
- Σκουρόχρωμο Φιαλίδιο Γυάλινο 10 ml
- Conical Tube 50ml, Heathrow Scientific

Αντιδραστήρια

- Dimethyl sulfoxide CHROMASOLV® (DMSO), Sigma-Aldrich
- Ethanol, Anhydrous (Histological), Fisher Chemical
- Propylene Glycol USP, ΣΕΛΚΟ ΧΗΜΙΚΑ Α.Ε.
- Polyglycol 400, ΣΕΛΚΟ ΧΗΜΙΚΑ Α.Ε.
- Glycerol Anhydrous A.G., Penta Chemicals
- Repaglinide, CAS No 135062-02-1, Purity >98%, AdooQ BioScience
- Novonorm® δισκία 2 mg, Novo Nordisk®
- Ηλεκτροαγωγή γέλη, ECG SUPERGEL, CERACARTA
- Απιονισμένο ύδωρ

Σχετικές εικόνες με τα Όργανα-Αντιδραστήρια:



Εικόνα 57 Γεννήτρια ρεύματος, TG210 2MHz FUNCTION GENERATOR, THURLBY THANDAR



Εικόνα 54 Νεογνικά ηλεκτρόδια Ag/AgCl, ECG Electrodes, size 30 mm, TOP TRACE



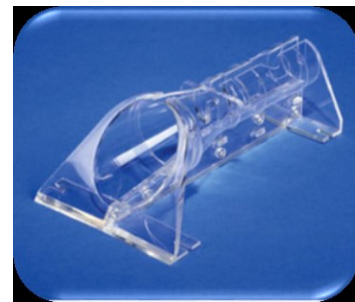
Εικόνα 55 Παλμογράφος, OSCILLOSCOPE V-212 20 MHz, HITACHI



Εικόνα 56 Πιπέτα μηχανική ακριβείας GLASSCO μεταβλητού όγκου 20-200µL & Ρύγχη Αυτόματων Πιπετών 0-200µL, Κίτρινα



Εικόνα 59 Μετρητής σακχάρου, GlucoMen® areo sensor & Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, GlucoMen areo®, A. Menarini Diagnostics



Εικόνα 58 Θήκη φύλαξης μύς από plexiglass (ποντικοπαγίδα)



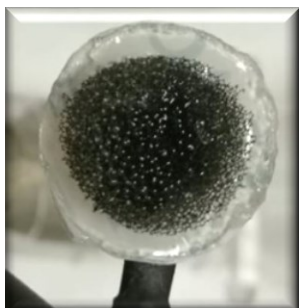
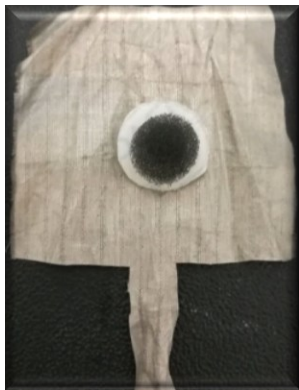
Εικόνα 60 Απορροφητικός σπόγγος 0,8 cm², πάχος: 3mm

Μέθοδοι

Πρωτόκολλο παρασκευής pad

Παρασκευάστηκε σχετικό pad όπως αυτό εφαρμόζεται στον ηλεκτροκαρδιογράφο προσθέτοντας έναν απορροφητικό σπόγγο όπου ενσωματώθηκε το φάρμακο υπό μορφή διαλύματος με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας ακριβείας. Αφαιρέσαμε από το νεογνικό pad την κολλητική ταινία κόβοντάς το περιμετρικά για να μειωθεί το μέγεθός του και να εφαρμόζεται καλύτερα στο μυ. Έτσι η συνολική επιφάνειά του μειώθηκε από 7 cm² σε 2,3 cm². Το pad αποτελείται από ηλεκτρόδια Ag/AgCl των οποίων η επιφάνεια είναι ~ 0,4 cm² και εφαρμόσθηκε στο πίσω μέρος της ράχης του μυός. Ο απορροφητικός σπόγγος με επιφάνεια 0,8 cm², εφαρμόσθηκε πάνω στο ηλεκτρόδιο καλύπτοντάς το ολοκληρωτικά. Ακόμη χρησιμοποιήθηκε υδατική γέλη, πλούσια σε ηλεκτρολύτες, για να άγει τον ηλεκτρισμό, όπου εφαρμόσθηκε σε ένα ύφασμα, το οποίο είναι και αυτό ηλεκτροαγώγιμο και πάνω στο οποίο πατούσε ο μυς.

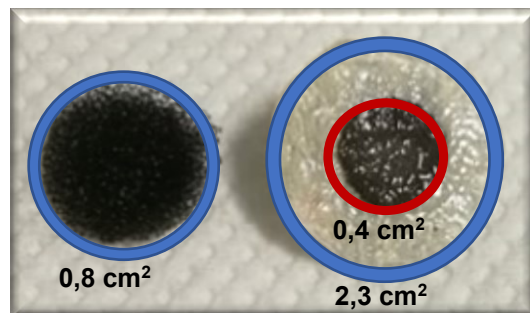
Παρακάτω παρατίθενται εικόνες, σχετικές με την ανωτέρω περιγραφή του pad.



Εικόνα 63 Ηλεκτροαγώγιμο ύφασμα, απορροφητικός σπόγγος, κομμένο νεογνικό ηλεκτρόδιο



Εικόνα 62 Εφαρμογή του pad στο μυ



Εικόνα 61 Διαστάσεις pad

Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος φαρμάκου

Το φάρμακο, όντας μη υδατοδιαλυτό, διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO) και προσθέσαμε προπυλενογλυκόλη (PG) και πολυαιθανολογλυκόλη 400 (PEG 400) ως ενισχυτές διαπέρασης αλλά και γλυκερόλη ως καταπραϋντικό για αποτροπή εμφάνισης τυχόν ερεθισμών του δέρματος. Η αναλογία των διαλυτών ήταν DMSO:PG:PEG 400:Glycerol |4:2:2:2 (Zhu et al., 2014). Ως δόση φαρμάκου για τα διαδερμικά επιθέματα/pads χρησιμοποιήσαμε τη μέγιστη ποσότητα φαρμάκου που διαλύεται στην ποσότητα DMSO. Δεδομένου ότι η διαλυτότητα της ρεπαγλινίδης είναι 91 mg/ml DMSO σε 25 °C (AdooQ BioScience), και λαμβάνοντας υπόψη ότι χρησιμοποιούμε διάλυμα με 40% DMSO, η συνολική περιεκτικότητα % του διαλύματος στο φάρμακο είναι 3,6 % w/v. Δεδομένου ότι ουσίες που βρίσκονται κοντά στη συγκέντρωση κορεσμού του διαλύματος, περνούν πιο εύκολα τον φραγμό του δέρματος, επιλέξαμε να αυξήσουμε την περιεκτικότητα του φαρμάκου σε 4% w/v καθώς και οι άλλοι διαλύτες που χρησιμοποιήσαμε συνεισφέρουν έστω και λίγο στη διαλυτότητα της ρεπαγλινίδης (Karande and Mitragotri, 2009; Karsa and Stephenson, 2007; P. Schwarb et al., 1999). Στον απορροφητικό σπόγγο ενσωματώθηκε το φάρμακο, εμποτίζοντάς το με 100 μl από το παρασκευασμένο διάλυμα για κάθε μμ. Επομένως κάθε μμς λάμβανε 4 mg ρεπαγλινίδης διαδερμικά. Για την per os χορήγηση, διαλύσαμε 2 mg ρεπαγλινίδης (Nonoform®) σε 20 ml απιονισμένο ύδωρ και υπολογίσαμε τα μl που χρειάζονται για κάθε μμ ώστε η δόση που λαμβάνει per os να είναι 0,07 mg/kg σωματικού βάρους. Στην ουσία λήφθηκε εναιώρημα και όχι διάλυμα οπότε πριν από τη χρήση ήταν απαραίτητη η ανακίνηση μέσα στο φιαλίδιο φύλαξης. Η per os χορήγηση στους μύες έγινε με τη βοήθεια σύριγγας με αποσπώμενη βελόνα και χρήση gavage (Turner et al., 2011; Zhang and Zhang, 2011).

Σταθερότητα & Φύλαξη φαρμάκου

Η ρεπαγλινίδη όντας φωτοευαίσθητη φυλασσόταν σε σκούρο φιαλίδιο για να προστατευτεί από το φως. Επίσης, όντας υγροσκοπική ουσία, φυλασσόταν στην κατάψυξη στους -20 °C σε μορφή κόνεως και στο ψυγείο στους 5 °C διαλυμένη στο σύστημα διαλυτών (DMSO:PG:PEG 400:Glycerol).

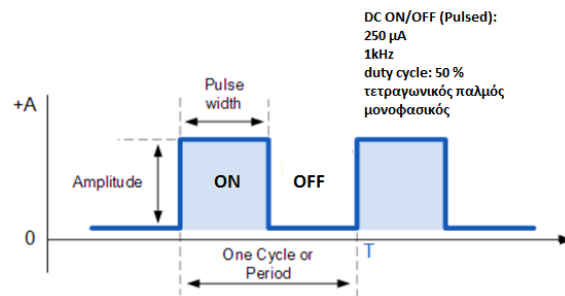
Πρωτόκολλο εφαρμογής ρεύματος

Στο pad εφαρμόσθηκε τετραγωνικό DC-ON/OFF παλμικό ρεύμα, μονοφασικό (DC ON/OFF-Pulsed), ημιτονοειδές εναλλασσόμενο ρεύμα διφασικό (AC ±) και τετραγωνικό συνεχές DC+παλμικό ρεύμα DC-ON/OFF μονοφασικό (DC+ DC-

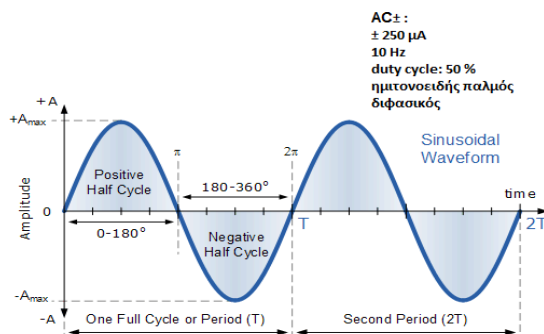
ON/OFF-Pulsed) σε διαφορετικές ημέρες και γινόταν αιμοληψία με νύξη της ουράς για να αξιολογούνται τα επίπεδα γλυκόζης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή. Η δειγματοληψία επιλέχθηκε να είναι πολύ συχνή, όπως θα δούμε παρακάτω, για να αξιολογηθεί η αντίδραση των μυών στην εφαρμογή ρεύματος. Συνολικά υπήρχαν 3 διαφορετικές συνθήκες ρεύματος, οι οποίες είναι οι εξής:

1. Τετραγωνικό DC-ON/OFF Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC ON/OFF-Pulsed):

- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 1kHz,
- πολικότητα: + πάνω
- χρόνος εφαρμογής: 10 min



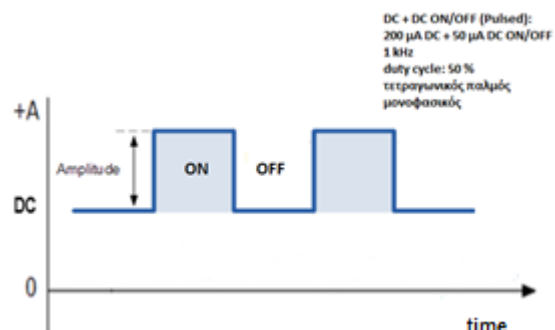
2. Ημιτονοειδές Εναλλασσόμενο ρεύμα διφασικό (AC±):



- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 10 Hz,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min

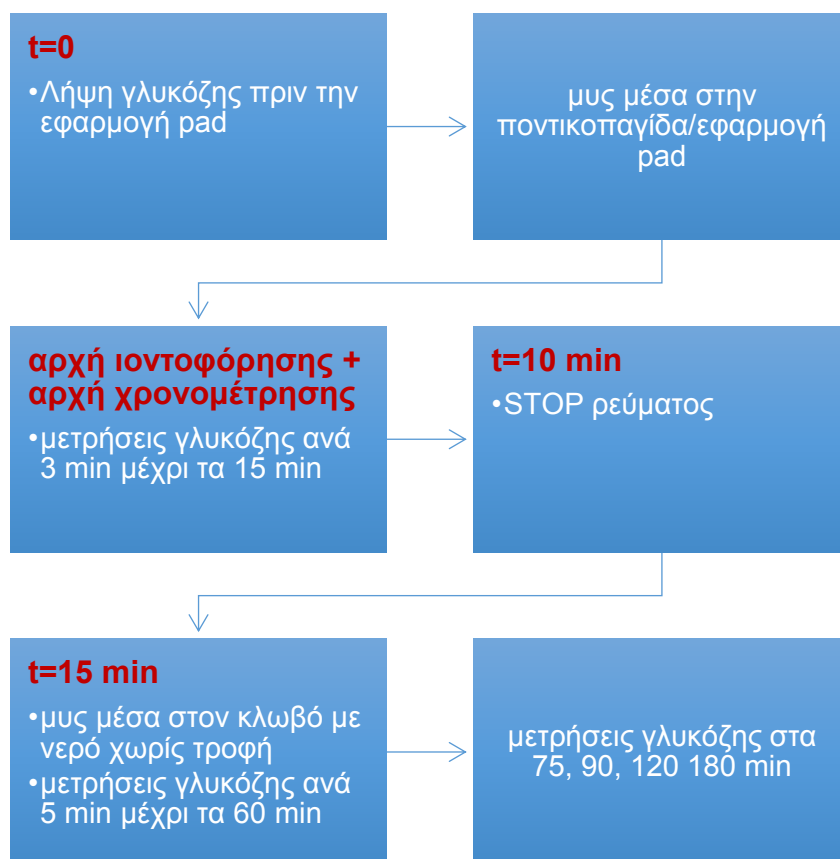
3. Τετραγωνικό συνεχές Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC+ DC-ON/OFF-Pulsed):

- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 1kHz,
- πολικότητα: - πάνω,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min



Στις παραπάνω συνθήκες υποβλήθηκαν οι ίδιοι μύες ώστε να μπορούν να συγκριθούν οι διαφορές που μπορεί να υπάρχουν στην εφαρμογή διαφορετικού τύπου ρεύματος (**current group**).

Χρονοδιάγραμμα εφαρμογής ρεύματος



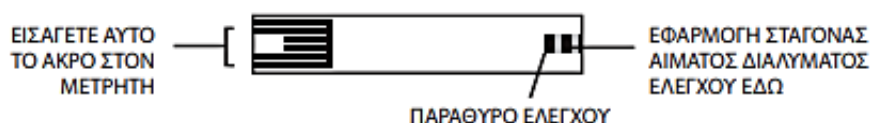
Σχήμα 5 Χρονοδιάγραμμα εφαρμογής ρεύματος

Πρωτόκολλο μέτρησης επιπέδων γλυκόζης στο αίμα

Όργανα: α) Χειρουργικό ψαλιδάκι β) Μετρητής και ταινίες γλυκόζης, GlucoMen areo®, A. Menarini Diagnostics

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

ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα και το αποτέλεσμα εμφανίζεται αυτόματα στην οθόνη του μετρητή.



Εικόνα 64 Ταινία μέτρησης γλυκόζης GlucoMen areo® (Πηγή: www.menarinidiabetes.gr)

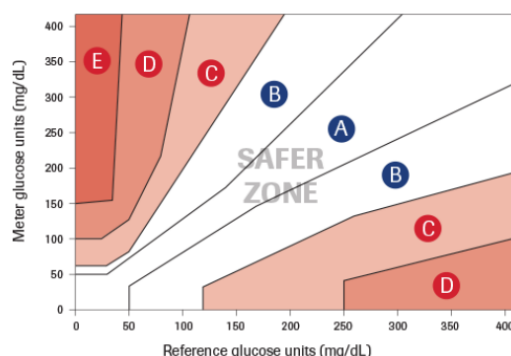
Τεχνικές προδιαγραφές

Προϊόν:	GlucoMen® areo
Κατασκευαστής:	A. Menarini Diagnostics srl
Αντικείμενο μέτρησης:	Επίπεδο γλυκόζης αίματος
Μονάδα μέτρησης:	mg/dL
Εύρος μέτρησης:	20 – 600 mg/dL
Εύρος αιματοκρίτη:	10 – 70% (αντιστάθμιση αιματοκρίτη)
Ταινία μέτρησης:	Ταινία μέτρησης GlucoMen® areo Sensor
Κωδικοποίηση ταινίας μέτρησης:	δεν απαιτείται κωδικοποίηση
Δείγμα:	Πρόσφατα συλλεγμένο πλήρες τριχοειδικό αίμα
Μέγεθος δείγματος:	τουλάχιστον 0,5 µL
Χρόνος μέτρησης:	5 δευτερόλεπτα
Μέθοδος προσδιορισμού:	Ηλεκτροχημική μέθοδος, με βάση την Οξειδάση της γλυκόζης (GOD, με πηγή <i>Aspergillus niger</i>). Μεσολαβητής: Εξακυανοσιδηρικό(III) ιόν.
Βαθμονόμηση και ιχνηλασιμότητα:	Τα αποτελέσματα ισοδυναμούν με τη συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος (με αναφορά τριχοειδικού πλάσματος). Το σύστημα GlucoMen® areo έχει βαθμονομηθεί έναντι τιμών τριχοειδικού πλάσματος προσδιορισμένων με χρήση αναλυτή Yellow Springs 2300 (YSI). Ο αναλυτής YSI έχει βαθμονομηθεί (ως δευτερεύουσα διαδικασία μέτρησης αναφοράς) χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων YSI (πρωτεύοντες βαθμονομητές) που είναι δυνατό να αναχθούν άμεσα στα πρότυπα του Εθνικού Ινστιτούτου Προτύπων και Τεχνολογίας των ΗΠΑ (National Institute of Standards and Technology - NIST).

Πίνακας 15 Τεχνικές προδιαγραφές μετρητή γλυκόζης (Πηγή: www.menarinidiabetes.gr)

Ευαισθησία μετρητή γλυκόζης

Οι νέες οδηγίες ISO 15197:2013 απαιτούν για τιμές αίματος κάτω των 75 mg/dl, οι 99 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μιας συσκευής να κυμαίνονται + 15 mg/dl. Άρα μια πραγματική τιμή γλυκόζης αίματος των 70 mg/dl απαιτείται για να είναι ένας μετρητής αξιολογήσιμος να δίνει τιμές στο εύρος 55-85 mg/dl. Αντίστοιχα για τις μετρήσεις πάνω από τα 75 mg/dl, οι 99 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μιας συσκευής θα 15 % της πραγματικής.



Εικόνα 65 Ευαισθησία μετρητή γλυκόζης (Χαλβατσιώτης, 2015)

Επομένως για το επίπεδο γλυκόζης 180 mg/dl του εργαστηρίου αναφοράς ο υπο αξιολόγηση μετρητής θα πρέπει να δώσει τιμές από 153 έως πρέπει να βρίσκονται σε ένα εύρος τιμών του + 207 mg/dl.

Πλασματικές τιμές γλυκόζης

Ο μετρητής γλυκόζης θα παρουσιάσει πλασματικές τιμές στις παρακάτω περιπτώσεις (Χαλβατσιώτης, 2015):

- Αφυδάτωση
- Υπόταση
- Αλκοόλη τοπικά
- Αιμοδιύλιση
- Αιμόλυση
- Οξέωση

Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη ήταν άτριχοι αρσενικοί μύες τύπου SKH-2, ηλικίας 12-16 εβδομάδων και βάρους 25-35g. Οι μύες προέρχονταν από το εργαστήριο Δερματοφαρμακολογίας και Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ζώα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε κατάλληλη τροφή για μύες και σε νερό δικτύου. Η θερμοκρασία στο χώρο πειραματισμού ήταν ελεγχόμενη και σταθερή μεταξύ 22°C και 24°C και η υγρασία πάνω από 30% (Νομοθεσία EL 25 BIO 07). Το πρωτόκολλο με αριθμό **2002/5-04-2019** και τίτλο «**P59 Πιλοτική μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων αντιδιαβητικού φαρμάκου με χρήση παλμικού και εναλλασσόμενου ηλεκτρικού ρεύματος σε μοντέλο άτριχων μυών**», πλήρωσε τις προδιαγραφές με βάση την ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία και έλαβε τη σχετική άδεια.

Ομάδες πειράματος

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 32 αρσενικοί μύες τύπου SKH-hr2, (12–16 εβδομάδων, 25–35 g) οι οποίοι χωρίστηκαν σε 4 ομάδες (A, B, C, D) των 8 μυών έκαστος. Πιο αναλυτικά, οι ομάδες έχουν ως εξής:

Ομάδα A: Διαδερμική χορήγηση-Παθητική διάχυση με διασταυρούμενη χορήγηση φαρμάκου και διαλυτών (8 μύες)

A1.Control group | Επίθεμα με 4 % w/v φάρμακο και διαλύτες, χρόνος εφαρμογής: 180 min

A2.Placebo group | Επίθεμα με διαλύτες, χρόνος εφαρμογής: 180 min

Ομάδα B: Διαδερμική χορήγηση φαρμάκου + Ηλεκτροφόρηση με διασταυρούμενη χορήγηση παλμικού, εναλλασσόμενου και συνεχούς-παλμικού ρεύματος (Current group) (8 μύες)

B1.Current group | Τετραγωνικό Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC ON/OFF-Pulsed), πολικότητα: + πάνω, ένταση: 0,25 mA, συχνότητα: 1kHz, χρόνος εφαρμογής ρεύματος: 10 min, χρόνος εφαρμογής επιθέματος: 180 min

B2.Current group | Ημιτονοειδές Εναλλασσόμενο ρεύμα διφασικό (AC±), ένταση: 0,25 mA, συχνότητα: 10 Hz, χρόνος εφαρμογής ρεύματος: 10min, χρόνος εφαρμογής επιθέματος: 180 min

B3.Current group | Τετραγωνικό Συνεχές-Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC+DC ON/OFF -Pulsed), πολικότητα: - πάνω, ένταση: 0,25 mA, συχνότητα: 1kHz, χρόνος εφαρμογής ρεύματος: 10 min, χρόνος εφαρμογής επιθέματος: 180 min

Ομάδα C: Διαδερμική χορήγηση διαλυτών + Ηλεκτροφόρηση με διασταυρούμενη χορήγηση παλμικού και εναλλασσόμενου ρεύματος (Current+Placebo group) (8 μύες)

C1.Current+Placebo group | Τετραγωνικό Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC ON/OFF-Pulsed), πολικότητα: + πάνω, ένταση: 0,25 mA, συχνότητα: 1kHz, χρόνος εφαρμογής ρεύματος: 10 min, χρόνος εφαρμογής επιθέματος: 180 min

C2.Current+Placebo group | Ημιτονοειδές Εναλλασσόμενο ρεύμα διφασικό (AC±), ένταση: 0,25 mA, συχνότητα: 10 Hz, χρόνος εφαρμογής ρεύματος: 10min, χρόνος εφαρμογής επιθέματος: 180 min

Ομάδα D: Χορήγηση φαρμάκου από του στόματος (8 μύες)

•**Oral group** | Διάλυμα ρεπαγλινίδης σε δόση 0,07 mg/kg (μέγιστη συνιστώμενη εφάπαξ δόση, Πηγή: Γαληνός Οδηγός Φαρμάκων)

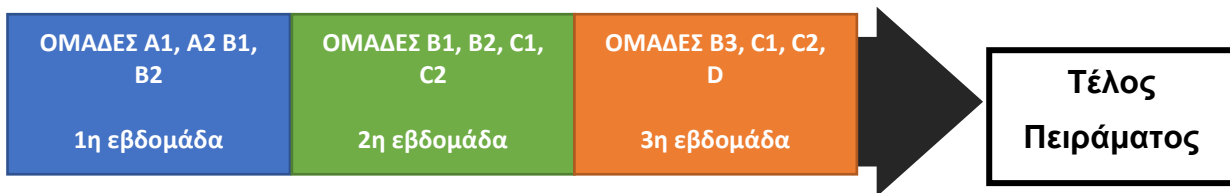
Στις Ομάδες A, B και C, εφαρμόσθηκε η τεχνική διασταύρωσης (crossover). Πιο αναλυτικά, στην Ομάδα A, εφαρμόσθηκε σε 4 μύες το διαδερμικό επίθεμα με το φάρμακο και στους υπόλοιπους 4 μύες, το διαδερμικό επίθεμα με τους διαλύτες. Μετά το πέρας μιας εβδομάδας εφαρμόσθηκαν στους ίδιους μύες οι αντίθετες συνθήκες.

Στις Ομάδες B & C εφαρμόσθηκε στην αρχή τετραγωνικό DC-ON/OFF παλμικό ρεύμα σε 4 μύες (B1, C1) και ημιτονοειδές εναλλασσόμενο ρεύμα (AC±) στους άλλους 4 μύες της ίδιας ομάδας (B2, C2) και μετά από διάστημα 1 εβδομάδας εφαρμόσθηκαν στους ίδιους μύες οι αντίθετες συνθήκες, δηλαδή ημιτονοειδές εναλλασσόμενο ρεύμα (AC±) στους 4 πρώτους μύες (B2, C2) και στους υπόλοιπους 4 μύες εφαρμόσθηκε τετραγωνικό DC-ON/OFF παλμικό ρεύμα (B1, C1). Το διάστημα αυτών των ημερών κρίθηκε απαραίτητο για να αποκατασταθεί πλήρως ο φραγμός του δέρματος (Kumar and Lin, 2008; Nolan et al., 2007; Turner et al., 1997). Η υποομάδα B3 (τετραγωνικό συνεχές παλμικό ρεύμα, DC+DC ON/OFF-Pulsed), εφαρμόσθηκε σε 4 συγκεκριμένους μύες από την ομάδα B που επιλέχτηκαν με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων μετρήσεων τους, όπως θα δούμε και στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

Χρονοδιάγραμμα πειράματος

Το χρονοδιάγραμμα του πειράματος απεικονίζεται στο παρακάτω Σχήμα 6. Συνοπτικά, αξιολογούνταν 4 μύες ανά ημέρα από την εκάστοτε ομάδα. Υπενθυμίζουμε ότι κάθε Ομάδα αποτελούνταν από 8 μύες. Συνεπώς για την Ομάδα A χρειαστήκαμε 4 ημέρες εργασίας, καθώς υπήρχαν 2 υποομάδες (A1, A2), δηλαδή 8 μύες x 2 φορές. Το ίδιο ίσχυσε και για την Ομάδα C, ενώ για την Ομάδα B χρειαστήκαμε 4 ημέρες εργασίας, για τις υποομάδες B1 & B2, και 1 ημέρα για την υποομάδα B3, καθώς

αποτελούνταν από 4 μύες και όχι από 8. Για την Ομάδα D, που δεν είχε υποομάδες χρειαστήκαμε 2 ημέρες εργασίας.



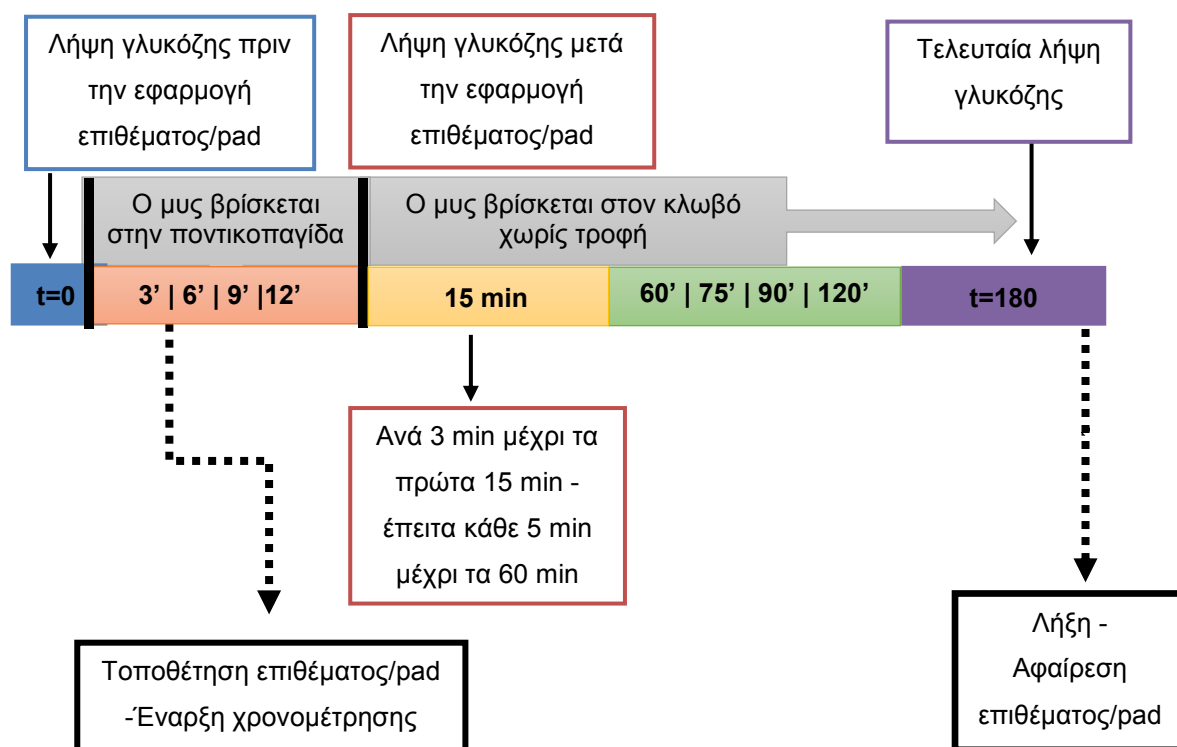
Σχήμα 6 Χρονοδιάγραμμα πειράματος

Αξιολόγηση της γλυκόζης

Μετρήσεις γλυκόζης λήφθηκαν πριν την εφαρμογή του επιθέματος και του pad με το ρεύμα ($t=0$) αλλά και πριν από την λήψη του φαρμάκου από το στόμα, στις αντίστοιχες ομάδες και μετά την εφαρμογή τους, ανά 3 min, για τα πρώτα 15 min και μετά ανά 5 min μέχρι 60 min. Οι μετρήσεις μετά τη 1 ώρα λήφθηκαν σε πιο αραιά διαστήματα και συγκεκριμένα στα 75, 90, 120 και 180 min.

Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων οι μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση μόνο σε νερό και παρέμεναν νηστικοί μέχρι τη λήξη του πειράματος (180 min). Στον χρόνο $t=0$ ο μυς βρίσκεται σε ηρεμία και λαμβάνεται η 1η μέτρηση γλυκόζης. Έπειτα τοποθετούμε τον μυ μέσα στην ποντικοπαγίδα και εφαρμόζουμε το επίθεμα/ pad στη ράχη του και αμέσως μετά ξεκινά η χρονομέτρηση για την αξιολόγηση της γλυκόζης. Ο μυς παραμένει στην ποντικοπαγίδα για 15 min και μετά τοποθετείται σε έναν καθαρό κλωβό με πρόσβαση μόνο σε νερό μέχρι τη λήξη του πειράματος. Μετά την τελευταία μέτρηση στα 180 min το επίθεμα/pad αφαιρείται και ο μυς επιστρέφει στο αρχικό του κλουβί. Οι ίδιες ακριβώς συνθήκες για τη λήψη γλυκόζης εφαρμόστηκαν και στην Ομάδα D (Oral group). Έτσι αξιολογήσαμε τη χρονική αντίδραση του μυός στην εφαρμογή/ή μη ρεύματος και φαρμάκου/διαλύτη.

Χρονοδιάγραμμα λήψης γλυκόζης:



Σχήμα 7 Χρονοδιάγραμμα λήψης γλυκόζης

7.4.2 Δοκιμαστικό πείραμα

Για να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε τη συμπεριφορά του μυός στο ρεύμα αλλά και να εξασφαλίσουμε την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του διαδερμικού επιθέματος, εφαρμόστηκαν μια σειρά από δοκιμαστικά τεστ αλλάζοντας διάφορες παραμέτρους, όπως θα δούμε στη συνέχεια, με σκοπό να μπορέσουμε να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες πειράματος για να προχωρήσουμε στην εκτέλεση του τελικού πειράματος, οι συνθήκες του οποίου περιγράφηκαν ενδελεχώς παραπάνω. Οι διαφορές που υπήρχαν στα δοκιμαστικά τεστ σε σχέση με το τελικό πείραμα ήταν:

1. Πρωτόκολλο παρασκευής διαλύματος φαρμάκου: Αλλαγή συστήματος διαλυτών

Δοκιμαστικό πείραμα:

- DMSO:PG:EtOH Anhydrous:Glycerol |Αναλογία|4:2:2:2 (ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ)
- DMSO:PG:Glycerol |Αναλογία|4:2:4 (ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ)

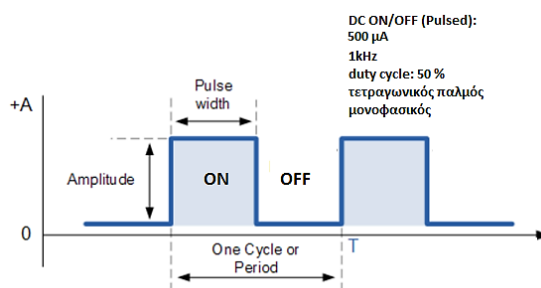
Τελικό πείραμα: DMSO:PG:PEG 400:Glycerol |Αναλογία|4:2:2:2

2. Πρωτόκολλο εφαρμογής ρεύματος: Αλλαγή έντασης ρεύματος, χρόνου εφαρμογής

Δοκιμαστικό πείραμα:

Τετραγωνικό DC ON/OFF-Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (Pulsed):

- πολικότητα: + πάνω
- ένταση: 0,5 mA,
- συχνότητα: 1kHz,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min, 60 min



Τελικό πείραμα:

Τετραγωνικό DC ON/OFF-Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (Pulsed):

- πολικότητα: + πάνω
- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 1kHz,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min

Ημιτονοειδές Εναλλασσόμενο ρεύμα διφασικό(AC \pm):

- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 10 Hz,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min

Τετραγωνικό Συνεχές+Παλμικό ρεύμα μονοφασικό (DC+ DC ON/OFF-Pulsed):

- πολικότητα: - πάνω
- ένταση: 0,25 mA,
- συχνότητα: 1kHz,
- χρόνος εφαρμογής: 10 min

3. Αξιολόγηση της γλυκόζης: Αλλαγή χρόνων μέτρησης γλυκόζης

Δοκιμαστικό πείραμα:

t (min)= 0|3|6|9|12|15|20|25|30|35|40|45|50|55|60|180

Τελικό πείραμα:

t (min)= 0|3|6|9|12|15|20|25|30|35|40|45|50|55|60|75|90|120|180

4. Εφαρμογή επιθέματος: Αλλαγή χρόνου εφαρμογής επιθέματος

Δοκιμαστικό πείραμα: 10 min, 60 min

Τελικό πείραμα: 180 min

5. Πειραματόζωα: Αλλαγή αριθμού μυών

Δοκιμαστικό πείραμα: 1 μυς/ομάδα

Τελικό πείραμα: 8 μύες/ομάδα

Ομάδες δοκιμαστικού πειράματος

Σύγκριση των παρακάτω ομάδων:

ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ **ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ** 60 min

ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ **ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ** 60 min

ΡΕΥΜΑ 10 min+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ **10 min**

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min

7.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων του 1ου πειράματος

Στην παρούσα εργασία έγινε παρουσίαση των περιγραφικών μεγεθών των δεδομένων και χρησιμοποιήθηκαν μία σειρά από παραμετρικές και μη παραμετρικές μεθόδους ανάλυσης. Για την εύρεση του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό Graphpad prism 8.0.1 (Manolesou, 2015a).

Έλεγχος κανονικότητας 1ου πειράματος

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων προκειμένου να επιλεγούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Shapiro-Wilk test ($n < 50$) (Manolesou, 2015b; Mohd Razali and Yap, 2011). Το κριτήριο αυτό αποτελεί μία μη παραμετρική στατιστική μέθοδο που ελέγχει αν η κατανομή του πληθυσμού, από τον οποίο προήλθε το τυχαίο δείγμα, ακολουθεί μία συγκεκριμένη κατανομή πιθανότητας (πχ. κανονική). Στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωριστά για καθεμία ομάδα μυών. Σε όλες τις περιπτώσεις, προέκυψε ότι τα δεδομένα ακολουθούν κανονική κατανομή ($p > 0,05$).

Εύρεση εξωκείμενων παρατηρήσεων 1ου πειράματος

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ROUT ($Q=1\%$) για την εύρεση τυχόν εξωκείμενων παρατηρήσεων στο μέσο όρο τιμών γλυκόζης κάθε χρονικής στιγμής σε κάθε ομάδα/υποομάδα (Motulsky and Brown, 2006). Με αυτή τη μέθοδο δεν βρέθηκε καμία εξωκείμενη παρατήρηση.

7.6 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων του 2ου πειράματος

Στην παρούσα εργασία έγινε παρουσίαση των περιγραφικών μεγεθών των δεδομένων και χρησιμοποιήθηκαν μία σειρά από παραμετρικές και μη παραμετρικές μεθόδους ανάλυσης. Για την εύρεση του μέσου όρου, της τυπικής απόκλισης και τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκαν το SPSS statistics 25.0. και το Graphpad prism 8.0.1 (Manolesou, 2015a)

Έλεγχος κανονικότητας 2ου πειράματος

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων προκειμένου να επιλεγούν παραμετρικές ή μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Shapiro-Wilk test ($n < 50$) (Manolesou, 2015b; Mohd Razali and Yap, 2011). Το κριτήριο αυτό αποτελεί μία μη παραμετρική στατιστική μέθοδο που ελέγχει αν η κατανομή του πληθυσμού, από τον οποίο προήλθε το τυχαίο δείγμα, ακολουθεί μία συγκεκριμένη κατανομή πιθανότητας (πχ. κανονική). Στην παρούσα ανάλυση ο έλεγχος κανονικότητας εφαρμόστηκε ξεχωριστά για καθεμία ομάδα/υποομάδα μυών. Οι ομάδες με κανονική κατανομή ήταν οι B1, B2, C1 και C2. Οι υπόλοιπες ομάδες, δηλαδή οι A1, A2, B3, και D δεν ακολουθούσαν

κανονική κατανομή ($p < 0,05$) οπότε σε αυτές τις ομάδες εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης, όπως θα δούμε και παρακάτω.

Εύρεση εξωκείμενων παρατηρήσεων 2ου πειράματος

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ROUT ($Q=1\%$) για την εύρεση τυχόν εξωκείμενων παρατηρήσεων στο μέσο όρο τιμών γλυκόζης κάθε χρονικής στιγμής σε κάθε ομάδα/υποομάδα (Motulsky and Brown, 2006). Με αυτή τη μέθοδο δεν βρέθηκε καμία εξωκείμενη παρατήρηση.

Παραμετρικοί και μη παραμετρικοί έλεγχοι υποθέσεων

One-Way ANOVA για ανεξάρτητα δείγματα (1ο και 2ο πείραμα)

Για τη διαπίστωση τυχόν στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων/υποομάδων με κανονική κατανομή εφαρμόστηκε η ανάλυση διασποράς (ANOVA). Η ANOVA χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών των μέσων όρων περισσότερων από δύο ομάδων-δειγμάτων. Βασική αρχή της ανάλυσης διακύμανσης είναι ότι η συνολική διασπορά που παρατηρείται σε μία μέτρηση, προέρχεται από δύο πηγές:

- Η διακύμανση μεταξύ των ομάδων (M.O.). Για κάθε ομάδα-δείγμα της έρευνας προκύπτει διαφορετικός μέσος όρος. Όσο περισσότερο διαφέρουν, μεταβάλλονται οι μετρήσεις μεταξύ των διαφορετικών ομάδων, τόσο πιθανότερο είναι να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση.
- Η διακύμανση εντός των ομάδων (E.O.). Από όλα τα δείγματα της ίδιας ομάδας δεν λαμβάνουμε την ίδια τιμή. Υπάρχουν ατομικές διαφορές. Αυτή η πηγή διαφοροποίησης των μετρήσεων αναφέρεται και ως σφάλμα. Όσο μικρότερο είναι το σφάλμα της μέτρησης, τόσο πιθανότερο είναι να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση.

Τα αποτελέσματα της ANOVA αξιολογήθηκαν παρατηρώντας την τιμή της σημαντικότητας. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$. Για να προσδιοριστούν οι μέσοι που διέφεραν μεταξύ τους, έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις (post-hoc) μεταξύ των ομάδων (ανά δύο) με τη μέθοδο Fisher's LSD.

Kruskal-Wallis test (2ο πείραμα)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στις ομάδες με μη κανονική κατανομή και ανεξάρτητα δείγματα και είναι αντίστοιχη της One-Way ANOVA. Σε αντίθεση με τον έλεγχο One-way ANOVA που εξετάζει την ισότητα των μέσων, εδώ χρησιμοποιείται το άθροισμα

των βαθμών των θέσεων των παρατηρήσεων. Κατ' επέκταση η υπόθεση που εξετάζεται είναι αν οι ομάδες έχουν ίσο μέσο βαθμών (δηλ. τυχαία διάταξη) ή κάποια ομάδα διαφοροποιεί τη διάταξη των παρατηρήσεων. Για να προσδιοριστούν οι μέσοι που διέφεραν μεταξύ τους, έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις (post-hoc) μεταξύ των ομάδων (ανά δύο) με τη μέθοδο Dunn's-Bonferroni. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$.

Wilcoxon paired test (2ο πείραμα)

Ο έλεγχος αυτός είναι ο μη παραμετρικός ισοδύναμος του paired t-test για εξαρτημένα δείγματα. Τα εξαρτημένα δείγματα στη μελέτη ήταν τα: A1-A2, B1-B2 (t-test παραμετρικός έλεγχος), B1-B3, B2-B3 και C1-C2 (t-test παραμετρικός έλεγχος). Το κριτήριο Wilcoxon είναι ένας βαθμολογικός έλεγχος που εξετάζει την υπόθεση ότι το άθροισμα των βαθμών των αρνητικών διαφορών είναι ίσο με το άθροισμα των βαθμών των θετικών διαφορών που προκύπτουν από τη διαφορά των τιμών των δύο δειγμάτων. Τα αποτελέσματα του Wilcoxon test αξιολογήθηκαν παρατηρώντας την τιμή της σημαντικότητας. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$.

Friedman test (2ο πείραμα)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στην ομάδα B με 3 εξαρτημένα δείγματα (υποομάδες B1-B2-B3) από τα οποία η B3 δεν ακολουθεί κανονική κατανομή. Επίσης έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις (post-hoc) μεταξύ των υποομάδων (ανά δύο) με τη μέθοδο Dunn's-Bonferroni. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$.

2way ANOVA (Repeated Measures) (2ο πείραμα)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στις ομάδες με κανονική κατανομή για την εύρεση τιμών στατιστικά σημαντικών μεταξύ των εξαρτημένων δειγμάτων (B1-B2 & C1-C2) αλλά και για την εύρεση στατιστικά σημαντικών τιμών σε σχέση με τον χρόνο σε κάθε υποομάδα. Η αντίστοιχη μέθοδος που εφαρμόστηκε για τις ομάδες με μη κανονική κατανομή (A1, A2, B3, D) ήταν η Nonparametric Two-way ANOVA by ranks. Επίσης έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις (post-hoc) με την μέθοδο Uncorrected Fisher's LSD. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$.

7.7 Αποτελέσματα 1ου πειράματος

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

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

Αποτελέσματα Επιπέδων Γλυκόζης

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

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

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

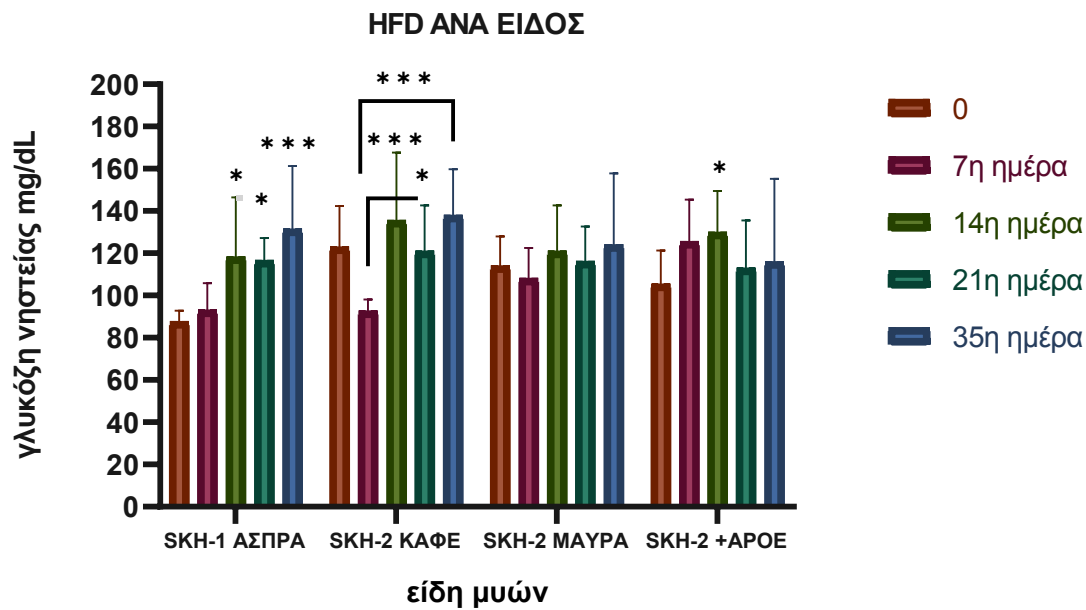
Ελεγχος κανονικής κατανομής

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

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

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

Διαγράμματα-Τιμές γλυκόζης ανά είδος μυών



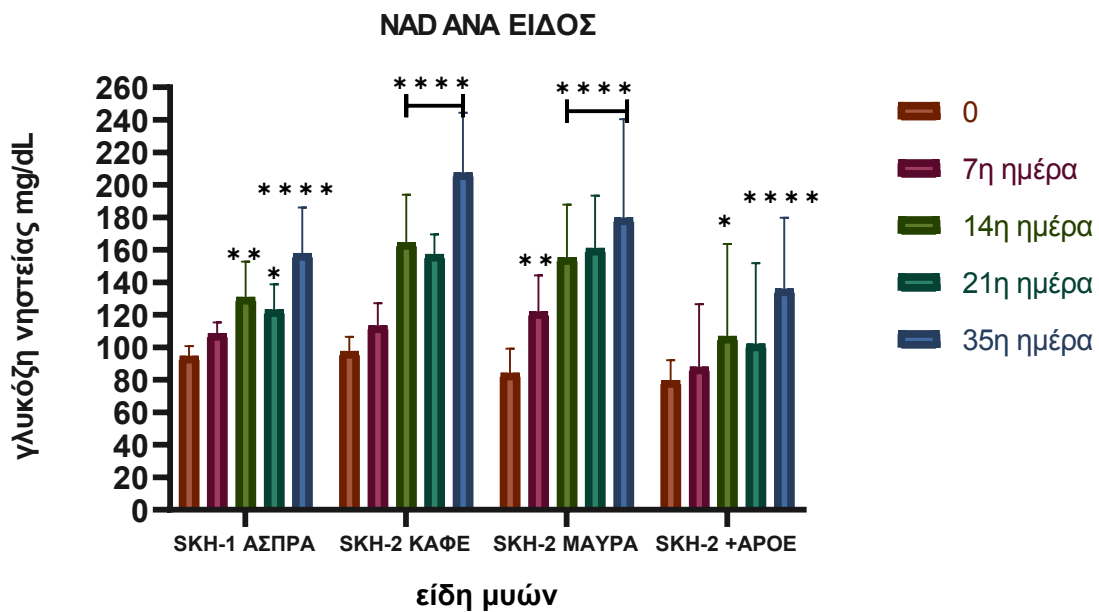
Διάγραμμα 1 Τιμές γλυκόζης HFD ανά είδος μυών

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

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

Πίνακας 16 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD ανά είδος μυών

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



Διάγραμμα 2 Τιμές γλυκόζης NAD ανά είδος μυών

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

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

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

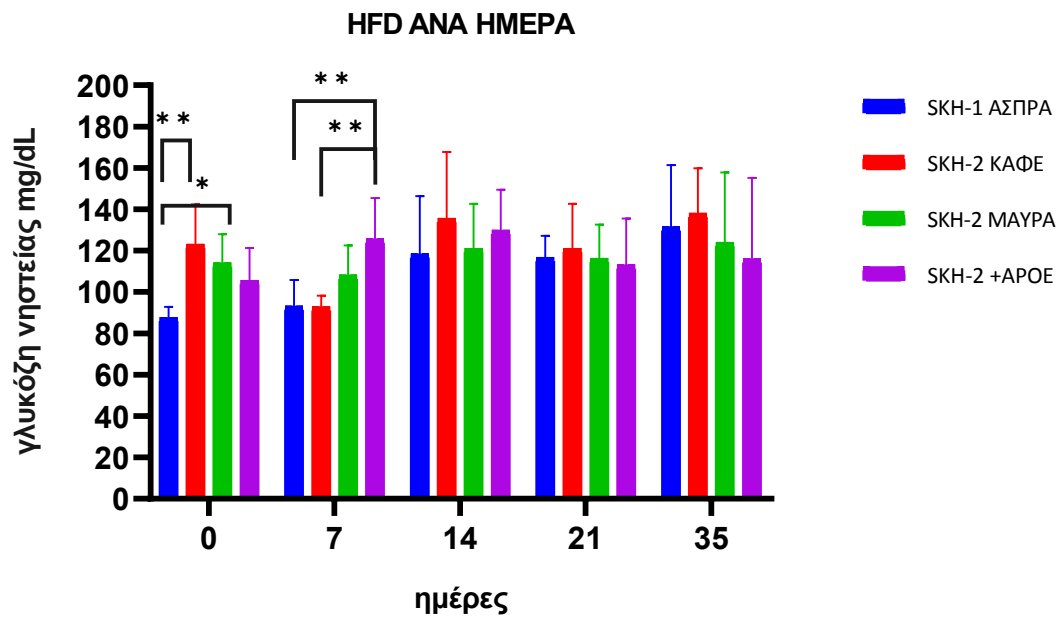
[ΑΡΟΕ: 0->14, $p < 0,05$ *, 0->35, $p < 0,0001$ ****]

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

Πίνακας 17 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD-NAD ανά είδος μυών

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

Διαγράμματα-Τιμές γλυκόζης ανά ημέρα



Διάγραμμα 3 Τιμές γλυκόζης HFD ανά ημέρα

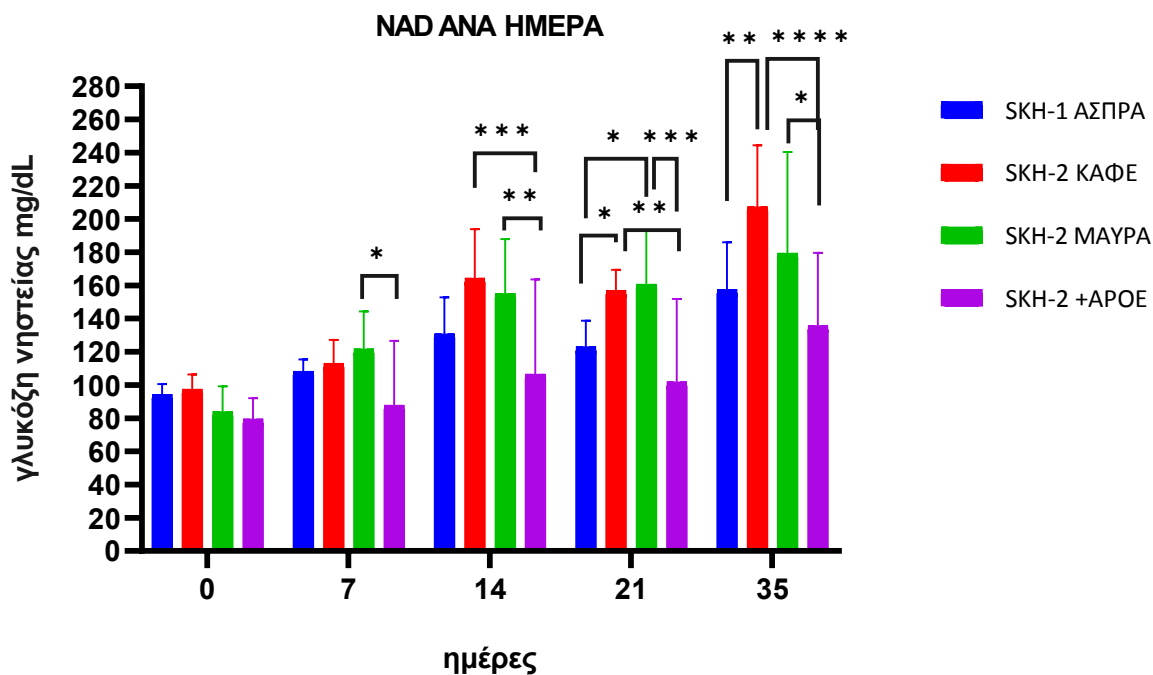
[0: ΑΣΠΡΑ vs ΚΑΦΕ, $p < 0,01$ **, ΑΣΠΡΑ vs ΜΑΥΡΑ, $p < 0,05$ *]

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

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

Πίνακας 18 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD-HFD ανά ημέρα

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



Διάγραμμα 4 Τιμές γλυκόζης NAD ανά ημέρα

[7: ΜΑΥΡΑ vs ΑΡΟΕ, $p < 0,05$ *]

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

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

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

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

Πίνακας 19 2way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD-NAD ανά ημέρα

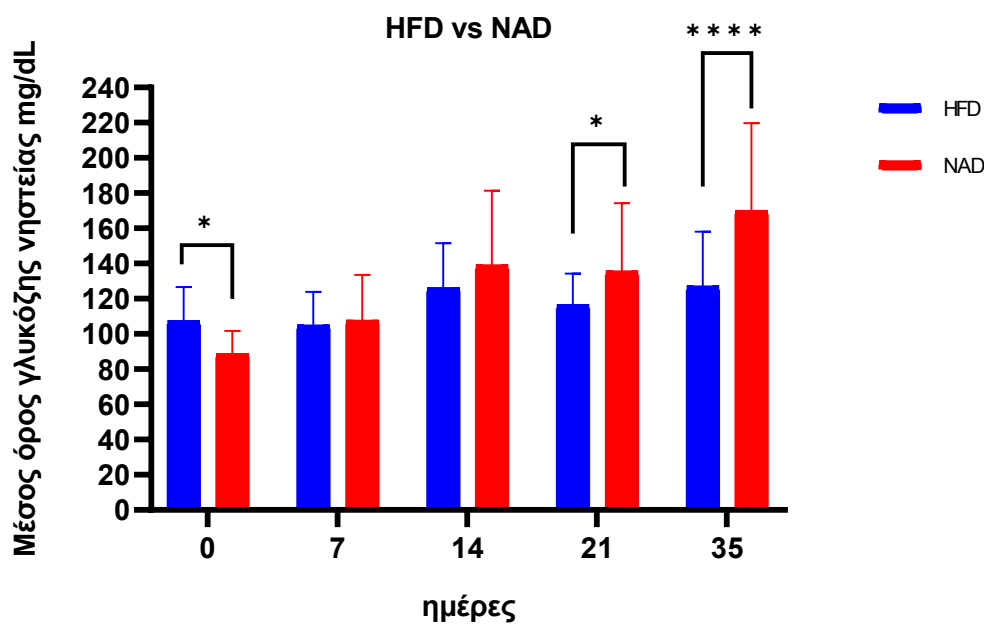
Στο διάγραμμα παρατηρείται στατιστική διαφορά την 7η ημέρα μεταξύ των ομάδων NAD-MAYPA+ NAD-APOE. Επίσης, την 14η ημέρα υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των ζευγών ομάδων NAD-MAYPA + NAD-APOE (***) και NAD-ΚΑΦΕ + NAD-APOE (**). Την 21η ημέρα σημειώθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων:

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

Την τελευταία ημέρα υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των:

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

Διαγράμματα-Μέσος όρος γλυκόζης HFD vs NAD



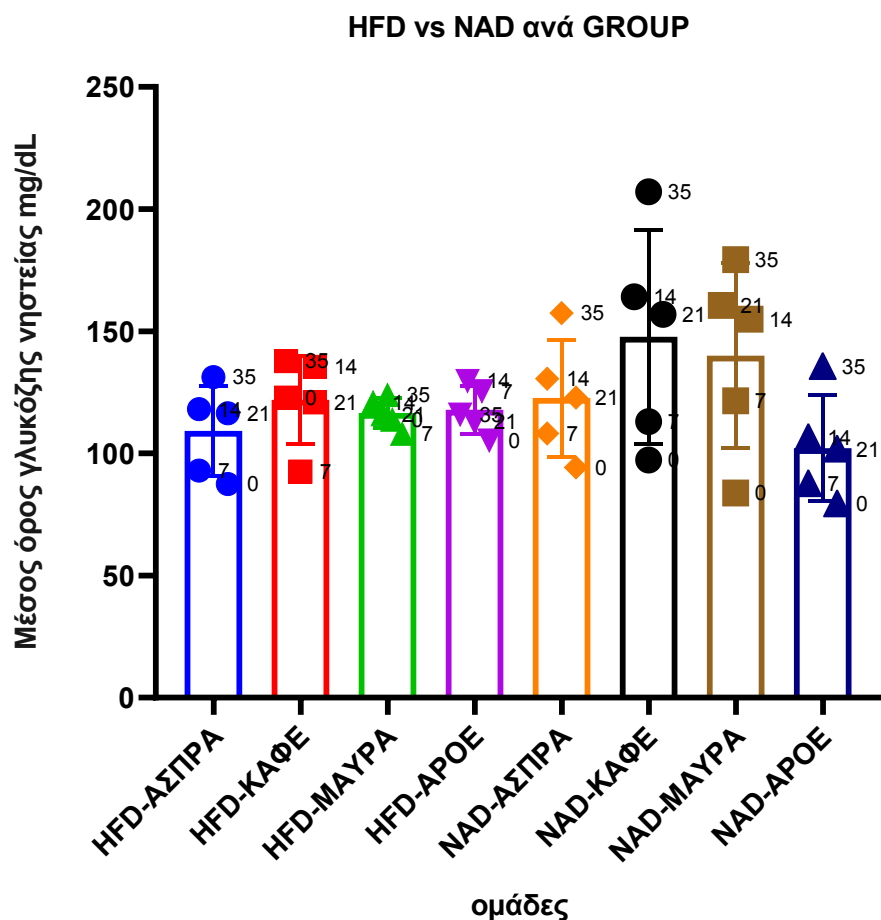
Διάγραμμα 5 Μέσος όρος γλυκόζης νηστείας ανά ημέρα-HFD vs NAD [ημέρα 0: $p < 0,05$ *, ημέρα 21: $p < 0,05$ *, ημέρα 35: $p < 0,0001$ ****]

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

Πίνακας 20 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD-HFD vs NAD

Παρατηρούμε ότι η αύξηση της γλυκόζης στους μύες στους οποίους εφαρμόστηκε η μέθοδος NAD είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με την αντίστοιχη αύξηση που έδειξαν οι μύες του πρωτοκόλλου HFD τις ημέρες 21 και 35. Αξίζει να σημειωθεί ότι η γλυκόζη στους μύες της μεθόδου NAD είχαν χαμηλότερες τιμές γλυκόζης σε σύγκριση με τους μύες της μεθόδου HFD την ημέρα 0 και μάλιστα η διαφορά στη γλυκόζη τους κρίνεται στατιστικά σημαντική. Παρόλο που οι μύες της μεθόδου NAD ξεκίνησαν με χαμηλότερες τιμές γλυκόζης, κατά τη διάρκεια του πειράματος τα επίπεδα γλυκόζης τους αυξήθηκαν περισσότερο από αυτά των μυών της μεθόδου HFD.

Διαγράμματα-Μέσος όρος γλυκόζης ομάδων HFD vs NAD



Διάγραμμα 6 HFD vs NAD ανά group. Στατιστική διαφορά HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ ($p < 0,05$ *) και HFD-ΜΑΥΡΑ vs NAD-ΜΑΥΡΑ ($p < 0,05$ *)

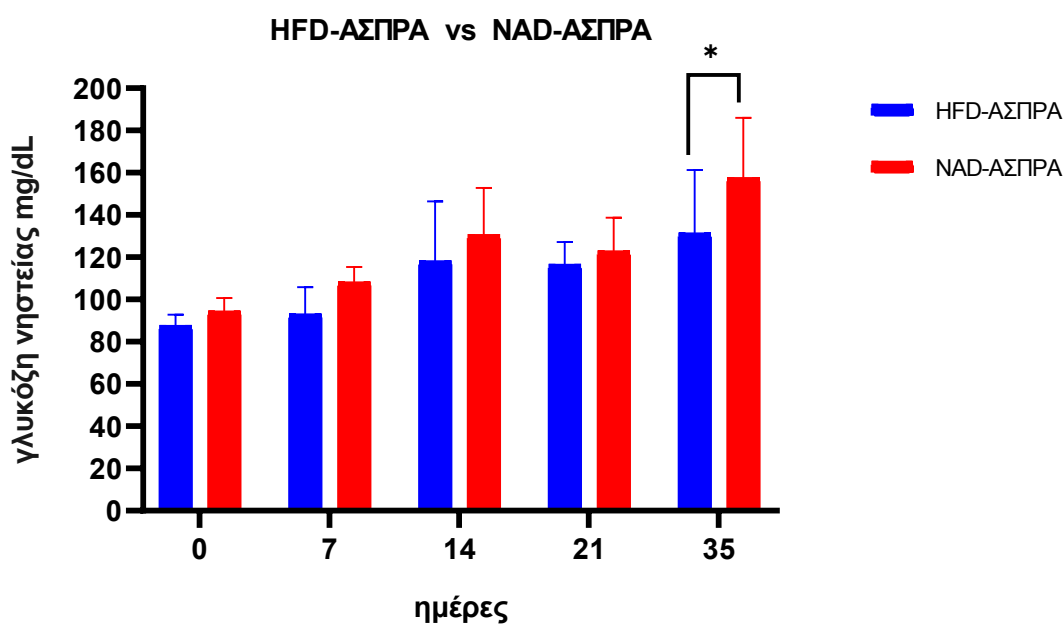
2way ANOVA			
ΟΜΑΔΕΣ HFD vs NAD			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	***	0,0009
HFD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-ΜΑΥΡΑ	Yes	**	0,0057
HFD-ΚΑΦΕ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	*	0,0183
HFD-ΜΑΥΡΑ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	**	0,0052
HFD-ΜΑΥΡΑ vs. NAD-ΜΑΥΡΑ	Yes	*	0,0299
HFD-ΑΡΟΕ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	**	0,0072
HFD-ΑΡΟΕ vs. NAD-ΜΑΥΡΑ	Yes	*	0,0395
NAD-ΑΣΠΡΑ vs. NAD-ΚΑΦΕ	Yes	*	0,0217
NAD-ΚΑΦΕ vs. NAD-ΑΡΟΕ	Yes	***	0,0001
NAD-ΜΑΥΡΑ vs. NAD-ΑΡΟΕ	Yes	***	0,001

Πίνακας 21 2way ANOVA+ post-hoc Fisher's LSD- ΟΜΑΔΕΣ HFD vs NAD

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

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

Διαγράμματα-HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ



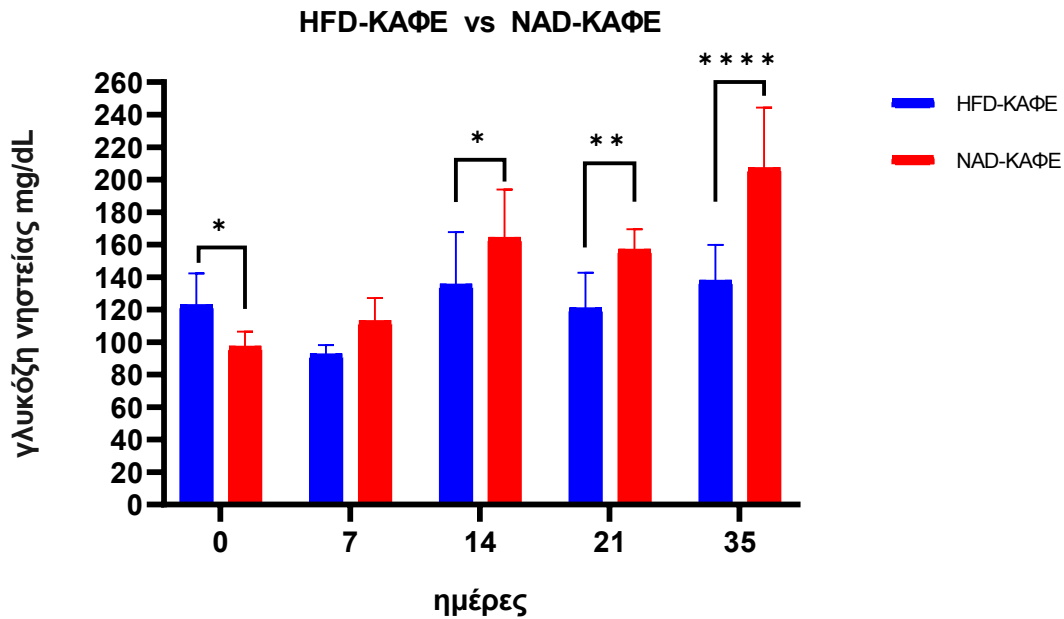
Διάγραμμα 7 HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ [ημέρα 35: $p < 0,05$ *]

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

Πίνακας 22 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- HFD-ΑΣΠΡΑ vs NAD-ΑΣΠΡΑ

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

Διαγράμματα-HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ



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

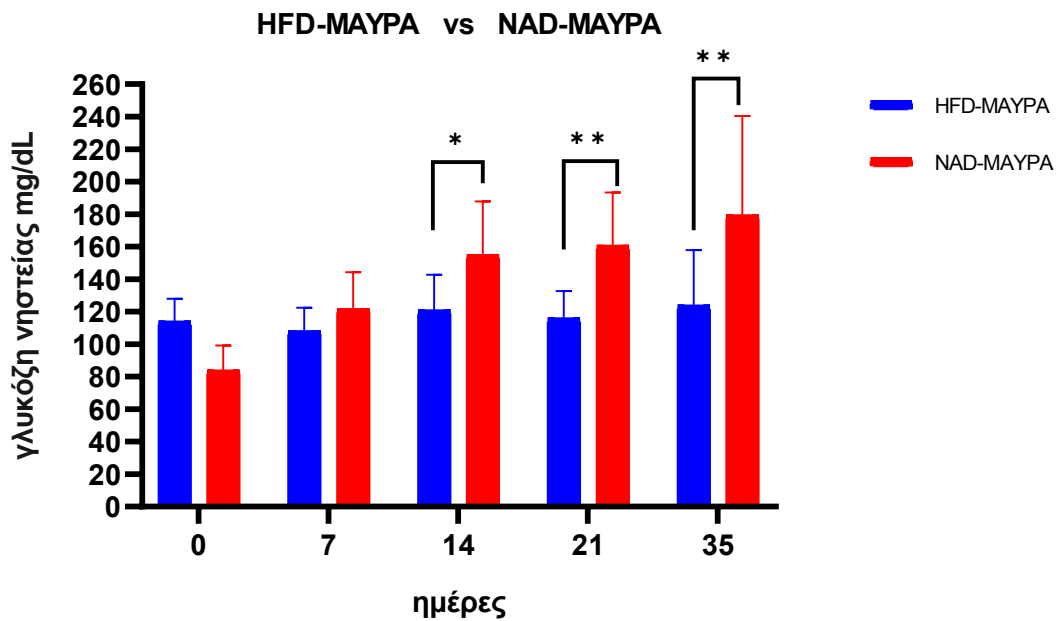
2way ANOVA			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-ΚΑΦΕ - NAD-ΚΑΦΕ			
0	Yes	*	0,0393
7	No	ns	0,0974
14	Yes	*	0,0212
21	Yes	**	0,0043
35	Yes	****	<0,0001

Πίνακας 23 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- HFD-ΚΑΦΕ vs NAD-ΚΑΦΕ

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

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

Διαγράμματα-HFD-MAYPA vs NAD-MAYPA



Διάγραμμα 9 HFD-MAYPA vs NAD-MAYPA [ημέρα 14: $p < 0,05$ *, ημέρα 21, 35: $p < 0,01$ **]

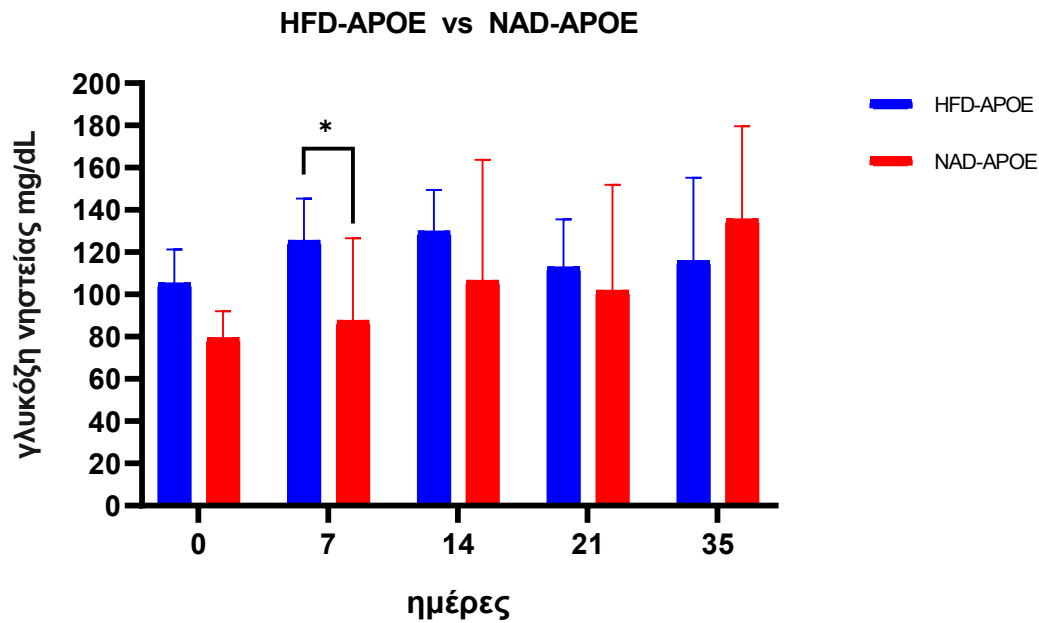
2way ANOVA			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
HFD-MAYPA - NAD-MAYPA			
0	No	ns	0,0648
7	No	ns	0,3981
14	Yes	*	0,0364
21	Yes	**	0,007
35	Yes	**	0,0014

Πίνακας 24 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- HFD-MAYPA vs NAD-MAYPA

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

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

Διαγράμματα-HFD-APOE vs NAD-APOE



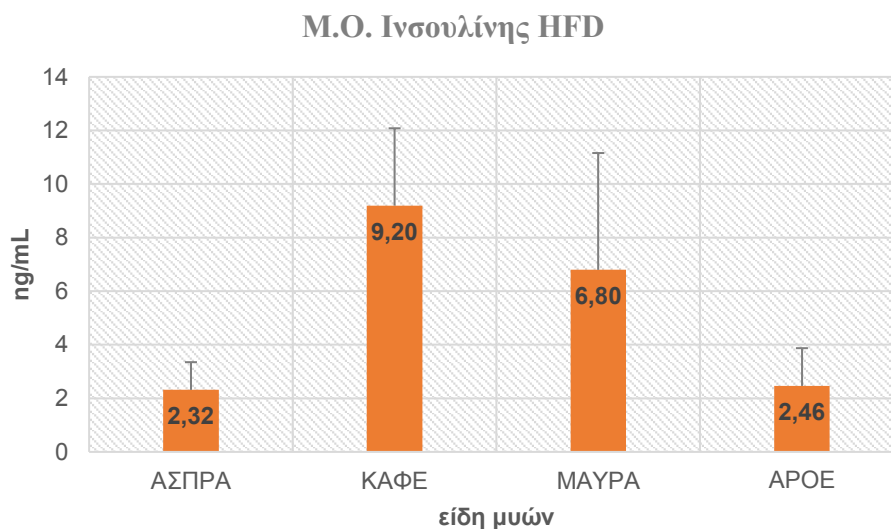
Διάγραμμα 10 HFD-APOE vs NAD-APOE [ημέρα 7: $p < 0,05$ *]

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

Πίνακας 25 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- HFD-APOE vs NAD-APOE

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

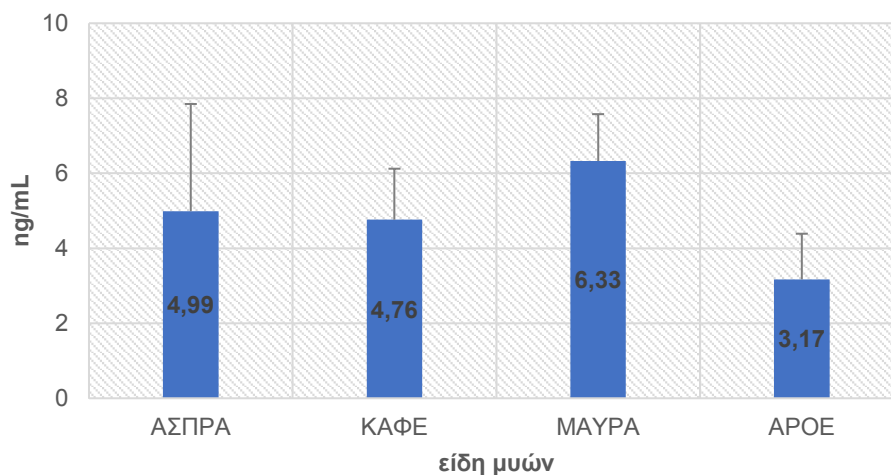
Από το διάγραμμα συμπεραίνουμε ότι η ομάδα NAD SKH-hr-2+APOE δεν παρουσιάζει σημαντική αύξηση γλυκόζης μέχρι την 21η ημέρα και από την 35η σημειώνει άνοδο, ενώ στην ομάδα HFD δεν υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα στις τιμές γλυκόζης μεταξύ των ημερών.



Διάγραμμα 11 M.O. ινσουλίνης HFD

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

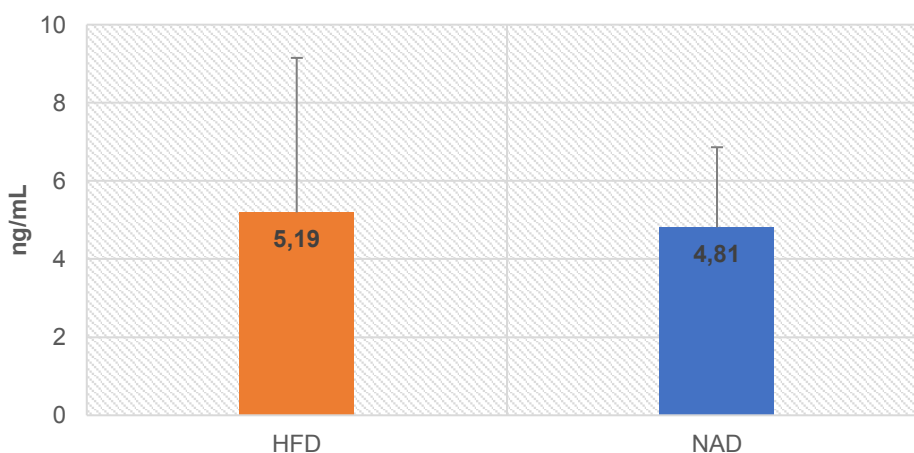
Μ.Ο. Ινσουλίνης NAD



Διάγραμμα 12 Μ.Ο. ινσουλίνης NAD

Στο πρωτόκολλο του NAD, παρατηρούμε μία μικρή διαφορά μεταξύ των ομάδων. Με βάση τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος σε φυσιολογικούς μύες κυμαίνονται γύρω 6-6,5 ng/mL, ενώ οι μύες που έχουν λάβει NAD+STZ έχουν τιμές γύρω 5 ng/mL (Furman, 2015).

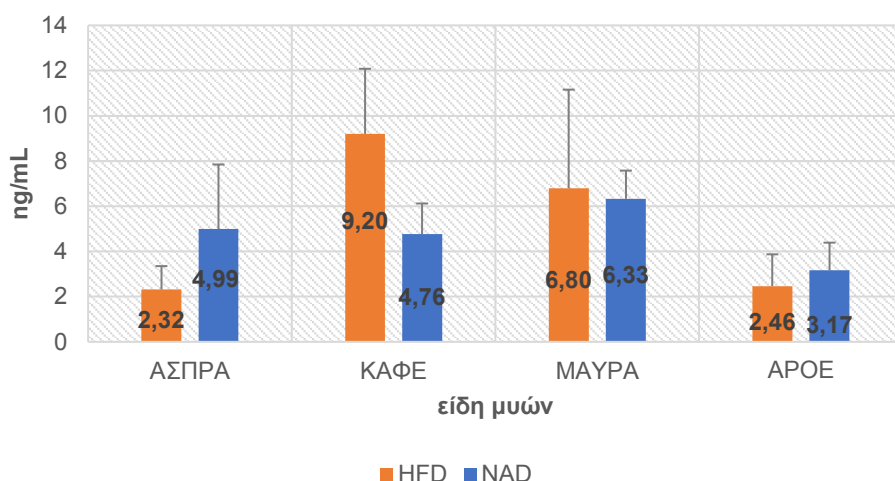
Μ.Ο. Ινσουλίνης HFD vs NAD



Διάγραμμα 13 Μ.Ο. ινσουλίνης HFD vs NAD

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

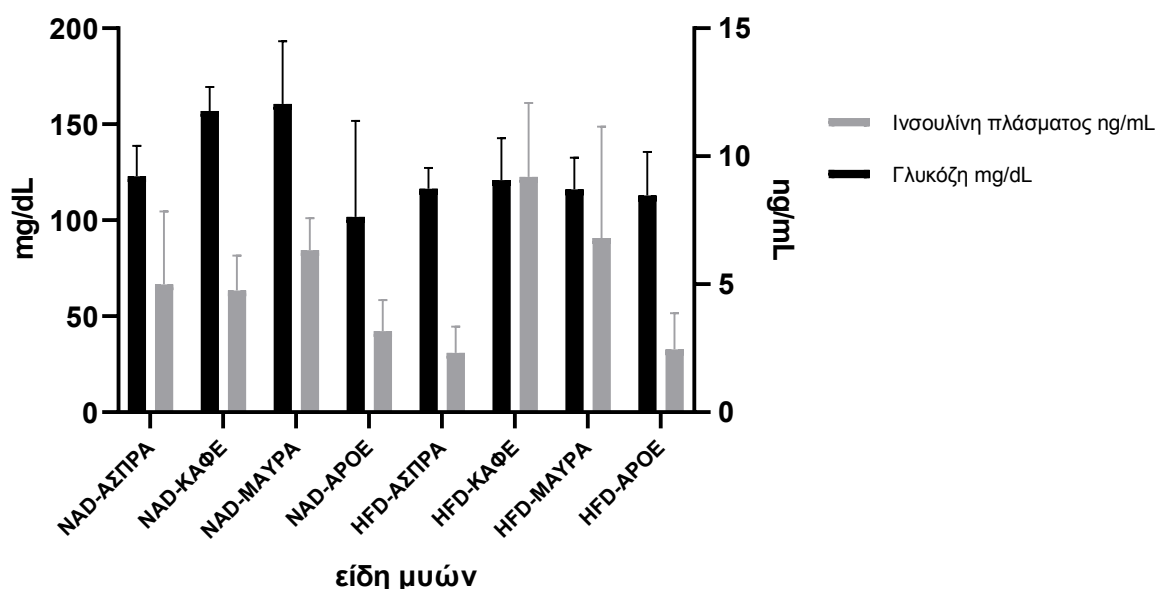
Μ.Ο. Ινσουλίνης ανά είδος



Διάγραμμα 14 Μ.Ο. ινσουλίνης ανά είδος μυών

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

21η ημέρα: Γλυκόζη vs Ινσουλίνη πλάσματος



Διάγραμμα 15 21η ημέρα: Γλυκόζη vs Ινσουλίνη πλάσματος ανά είδος μυών

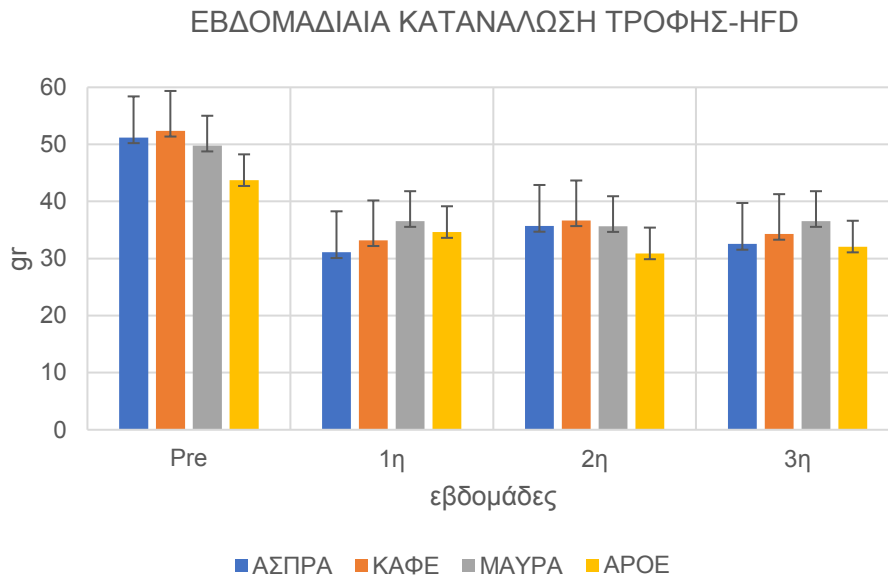
Οι ομάδες μυών του πρωτοκόλλου NAD, παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές ινσουλίνης πλάσματος, σε αντίθεση με τις ομάδες των μυών του πρωτοκόλλου HFD.

Πιο συγκεκριμένα, την 21 ημέρα στο πρωτόκολλο NAD, παρόλο που οι περισσότερες ομάδες μυών έχουν αναπτύξει διαβήτη τύπου 2, η ινσουλίνη πλάσματος έχει μειωθεί ~5% με βάση τις τιμές αναφοράς για φυσιολογικούς μύες της βιβλιογραφίας (6-6,5 ng/mL) (Furman, 2015). Πιθανώς σε αυτό το αποτέλεσμα να συντελεί η δράση του νικοτιναμιδίου, το οποίο όντας αντιοξειδωτικό, προστατεύει εν μέρει τα παγκρεατικά β-κύτταρα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο κι έτσι η παραγωγή της ινσουλίνης δεν επηρεάζεται. Τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος εξαρτώνται άμεσα από την ικανότητα παραγωγής ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, οπότε στο πρωτόκολλο NAD, η παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης φαίνεται να έχουν επηρεαστεί ελάχιστα.

Στο πρωτόκολλο HFD, παρόλο που οι τιμές γλυκόζης των ομάδων των μυών βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα, οι τιμές της ινσουλίνης πλάσματος διαφέρουν κατά πολύ. Αναλυτικότερα, τα είδη HFD-ΚΑΦΕ και HFD-ΜΑΥΡΑ, την 21η ημέρα παρουσιάζουν αυξημένες τιμές ινσουλίνης πλάσματος σε αντίθεση με τα άλλα δύο είδη μυών (HFD-ΑΣΠΡΑ, HFD-ΑΡΟΕ). Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι έχουν εμφανίσει υπερινσουλιαιμία, δηλαδή αυξημένες ποσότητες ινσουλίνης στο πλάσμα τους για να πετύχουν μείωση στη γλυκόζη. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται πριν την ανάπτυξη του διαβήτη, δηλαδή κατά τη διάρκεια του προδιαβήτη. Σε συνθήκες αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης, όπως συμβαίνει στη παχυσαρκία και τον προδιαβήτη, τα β-κύτταρα του παγκρέατος υπερεκκρίνουν την ινσουλίνη. Τα υπόλοιπα είδη, δηλαδή τα HFD-ΑΣΠΡΑ και HFD-ΑΡΟΕ, δεδομένου ότι τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος κυμαίνονται χαμηλά, μπορεί να σημαίνει ότι δεν έχουν αναπτύξει ακόμα αντίσταση στην ινσουλίνη και στην παρούσα φάση, είναι λιγότερο επιρρεπή στην ανάπτυξη παχύσαρκου τύπου διαβήτη. Ίσως η ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης να χρειάζεται περισσότερο χρόνο στους συγκεκριμένους μύες. Ωστόσο, δεν θα μπορούσαμε να αποκλείσουμε και την υπόθεση ότι αυτά τα δύο είδη έχουν περάσει το στάδιο του προδιαβήτη, όπου εμφανίζεται η υπερινσουλιαιμία, και έχουν πλέον αναπτύξει διαβήτη τύπου 2 που προσομοιάζει τον παχύσαρκο ασθενή. Η ειδική δίαιτα που ακολούθησαν προάγει την εμφάνιση υπερινσουλιαιμίας και ινσουλινοαντίστασης, οπότε τα είδη HFD-ΚΑΦΕ και HFD-ΜΑΥΡΑ έχουν φανερά εμφανίσει προδιαβήτη.

Κατανάλωση τροφής

- HFD

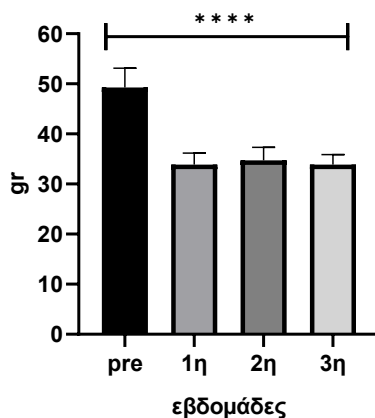


Διάγραμμα 16 Κατανάλωση τροφής-HFD

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

Πίνακας 26 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- Κατανάλωση τροφής-NAD

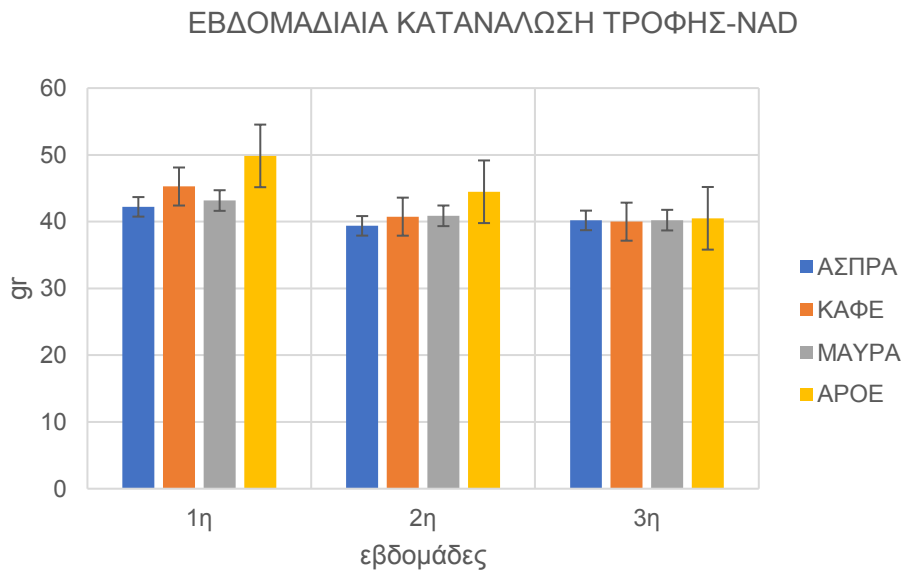
Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Τροφής-HFD



Διάγραμμα 17 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-HFD [pre: p<0,0001 **** από 1η, 2η και 3η εβδομάδα]

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

- NAD

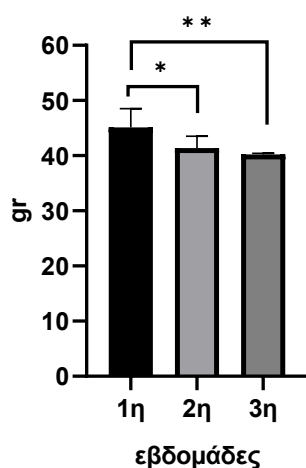


Διάγραμμα 18 Κατανάλωση τροφής-NAD

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

Πίνακας 27 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD- Κατανάλωση τροφής-NAD

Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Τροφής-NAD

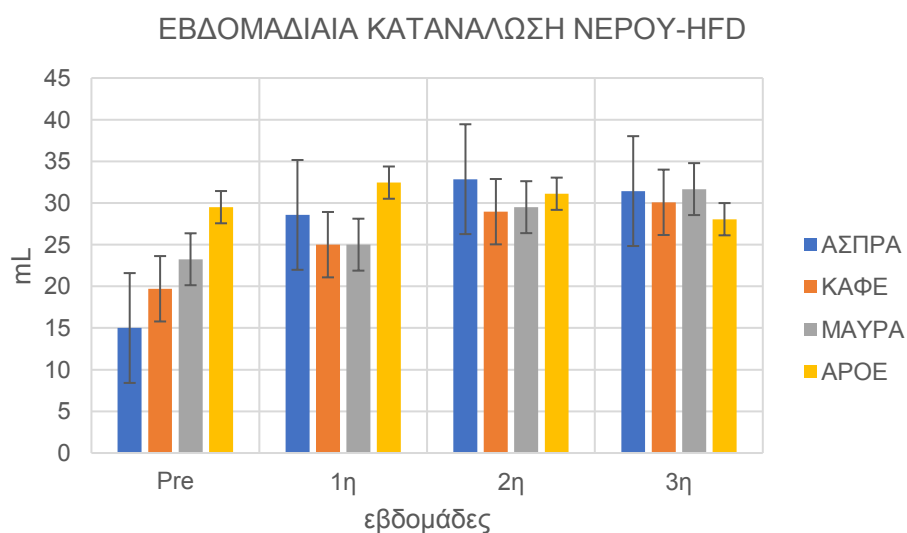


Διάγραμμα 19 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης τροφής-NAD [1η; $p < 0,05$ * από την 2η, $p < 0,01$ ** από την 3η]

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

Κατανάλωση νερού

- HFD

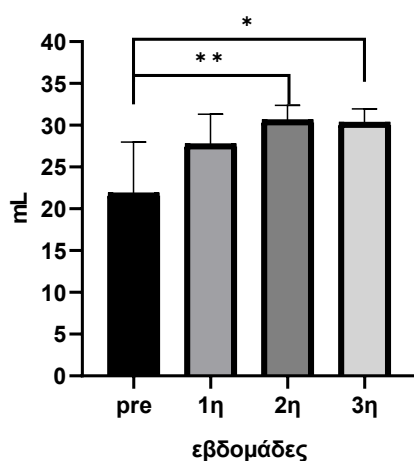


Διάγραμμα 20 Κατανάλωση νερού-HFD

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

Πίνακας 28 2way ANOVA+ post-hoc Fisher's LSD -Κατανάλωση νερού-HFD

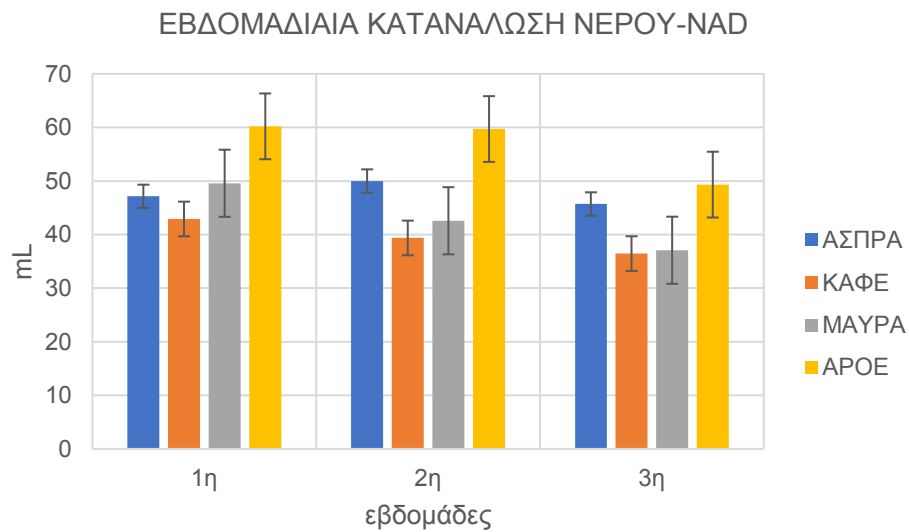
Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Νερού-HFD



Διάγραμμα 21 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-HFD
[2η: $p < 0,01$ ** από την pre, 3η: $p < 0,05$ * από την pre]

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

- NAD

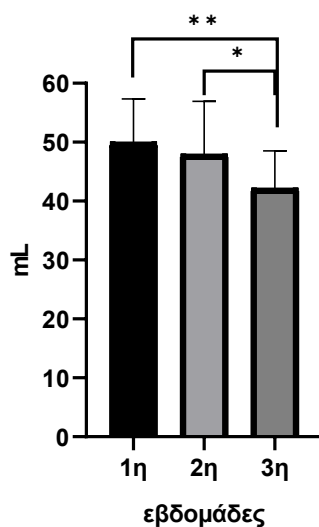


Διάγραμμα 22 Κατανάλωση νερού-NAD

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

Πίνακας 29 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -Κατανάλωση νερού-NAD

Μέσος όρος Εβδομαδιαίας Κατανάλωσης Νερού-NAD

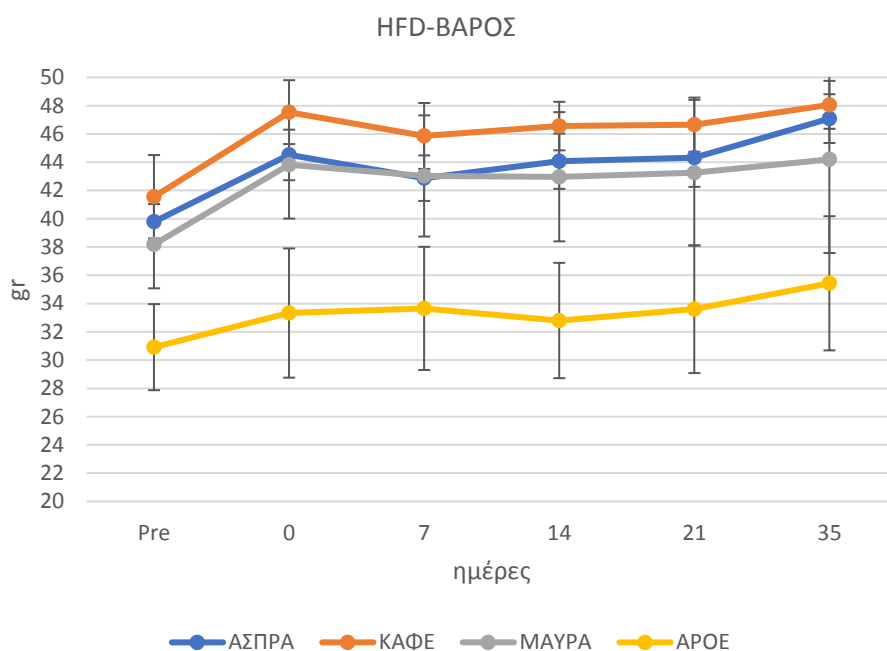


Διάγραμμα 23 Μέσος όρος εβδομαδιαίας κατανάλωσης νερού-NAD [1η:p<0,01 ** από την 3η, 2η:p<0,05 * από την 3η]

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

Μέτρηση βάρους

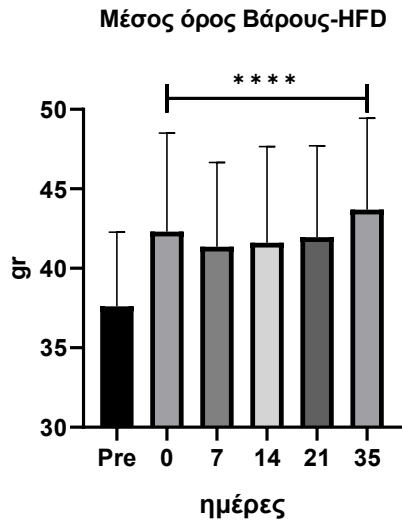
- HFD



Διάγραμμα 24 HFD-Βάρος

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

Πίνακας 30 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -HFD-BAPOΣ

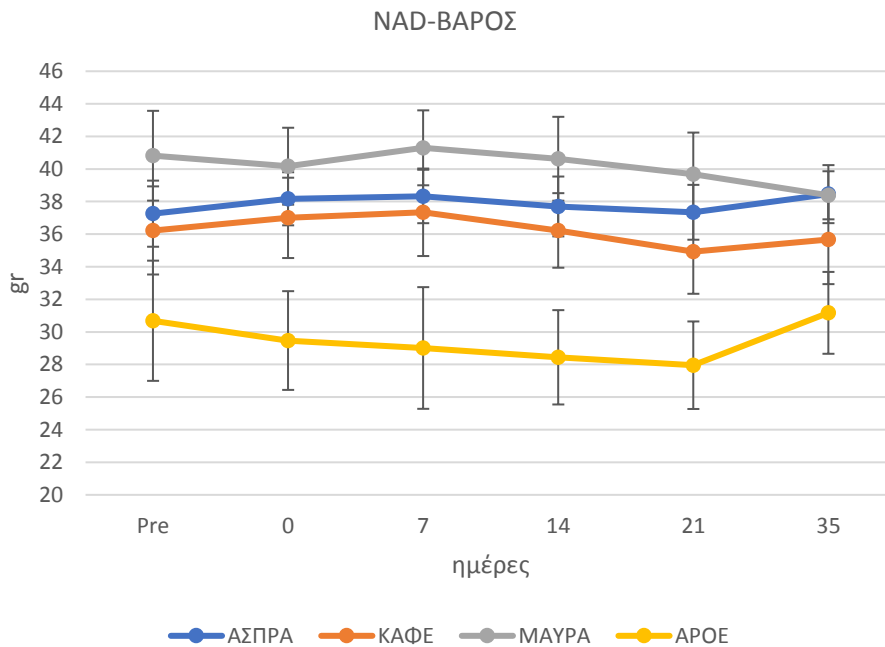


Διάγραμμα 25 Μέσος όρος Βάρους-HFD

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

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

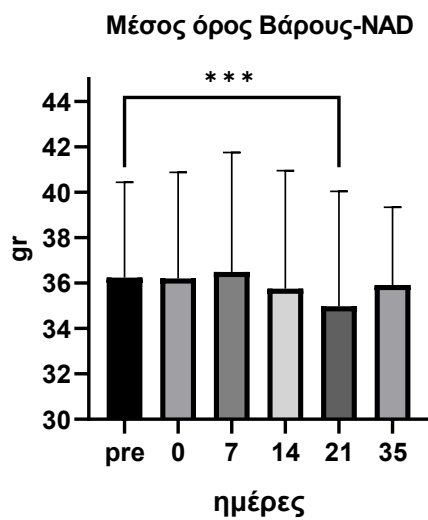
- NAD



Διάγραμμα 26 NAD-Βάρος

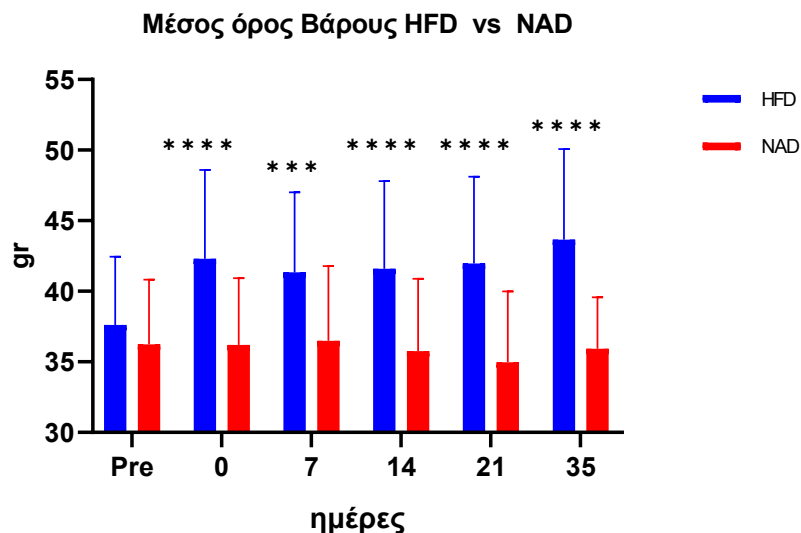
2way ANOVA			
NAD-BAΠΟΣ			
Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
pre vs. 21	Yes	***	0,0002
0 vs. 21	Yes	***	0,0003
7 vs. 14	Yes	*	0,025
7 vs. 21	Yes	****	<0,0001
14 vs. 21	Yes	*	0,0195
21 vs. 35	Yes	**	0,0046

Πίνακας 31 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -NAD-BAΠΟΣ



Διάγραμμα 27 Μέσος όρος Βάρους-NAD [pre->21: $p < 0,001$ ***]

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



Διάγραμμα 28 Μέσος όρος Βάρους- HFD vs NAD [0, 14, 21, 35: $p < 0,0001$ ****, 7: $p < 0,001$ ***]

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

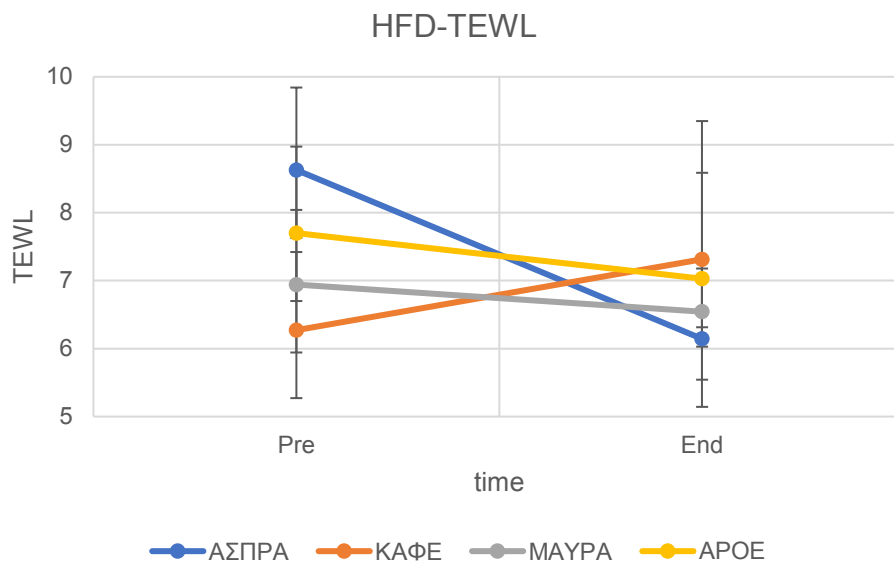
Πίνακας 32 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -HFD vs NAD-ΒΑΡΟΣ

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

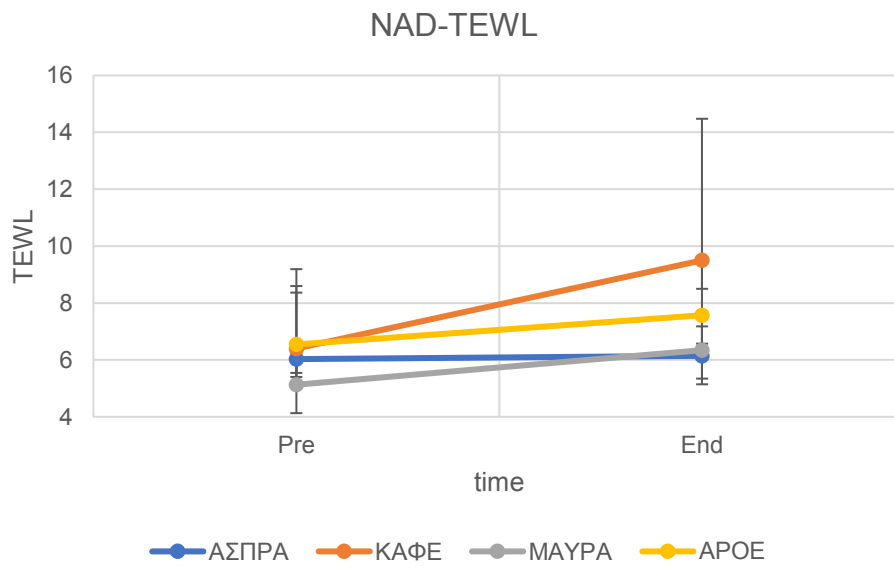
Παρατηρούμε στο πρωτόκολλο HFD, σε αντίθεση με το πρωτόκολλο NAD, ότι μετά την περίοδο εγκλιματισμού, αυξήθηκε σημαντικά το βάρος των μυών και έπειτα σταθεροποιήθηκε.

Βιοφυσικές μετρήσεις

- Άδηλη απώλεια νερού (TEWL)



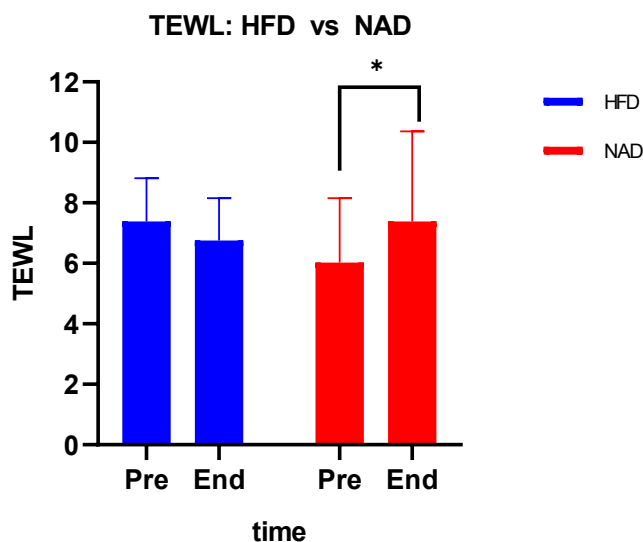
Διάγραμμα 29 HFD-TEWL



Διάγραμμα 30 NAD-TEWL

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

Πίνακας 33 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -TEWL HFD vs NAD



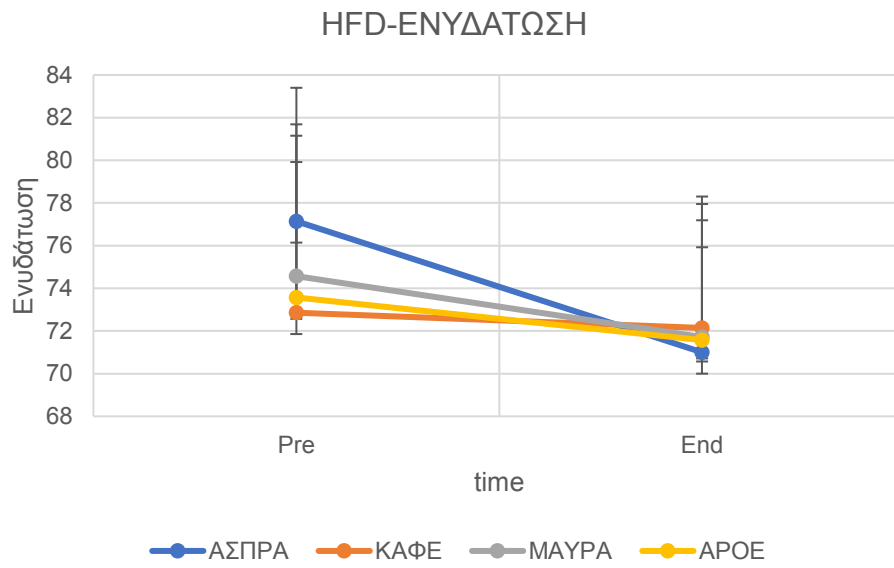
Διάγραμμα 31 Μέσος όρος TEWL HFD vs NAD

[NAD pre-end: $p < 0,05$ *]

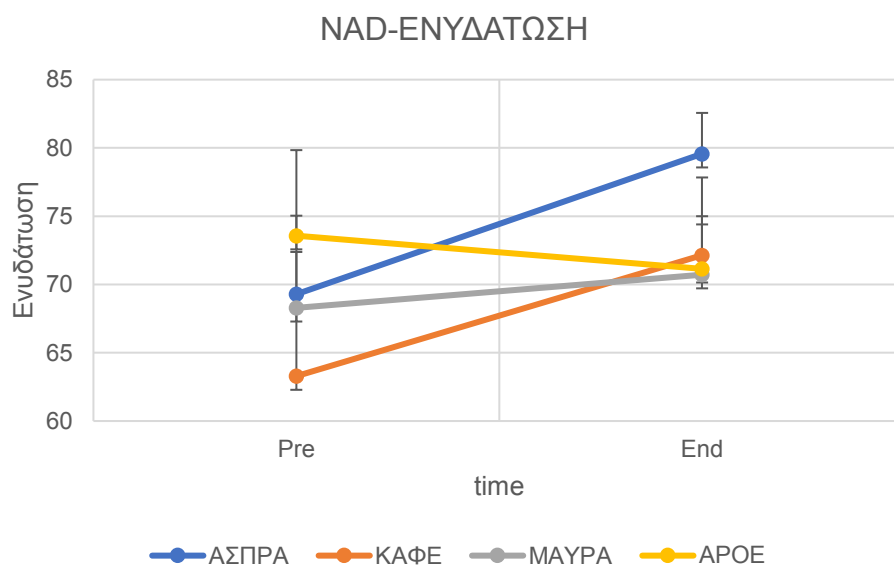
Παρατηρήσεις:

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

- Ενυδάτωση



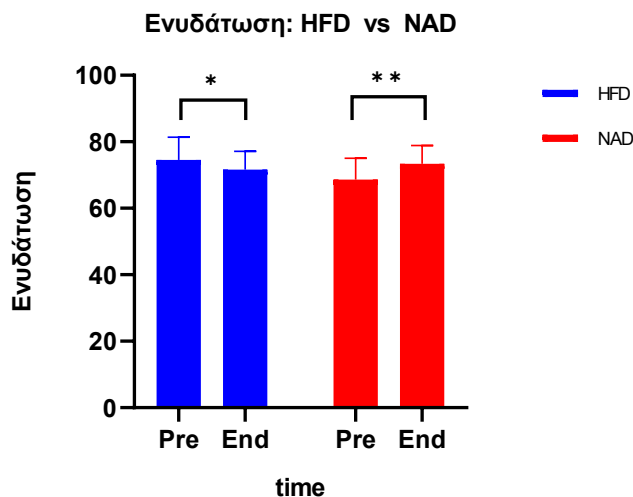
Διάγραμμα 32 HFD-Ενυδάτωση



Διάγραμμα 33 NAD-Ενυδάτωση

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

Πίνακας 34 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD -ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ HFD vs NAD

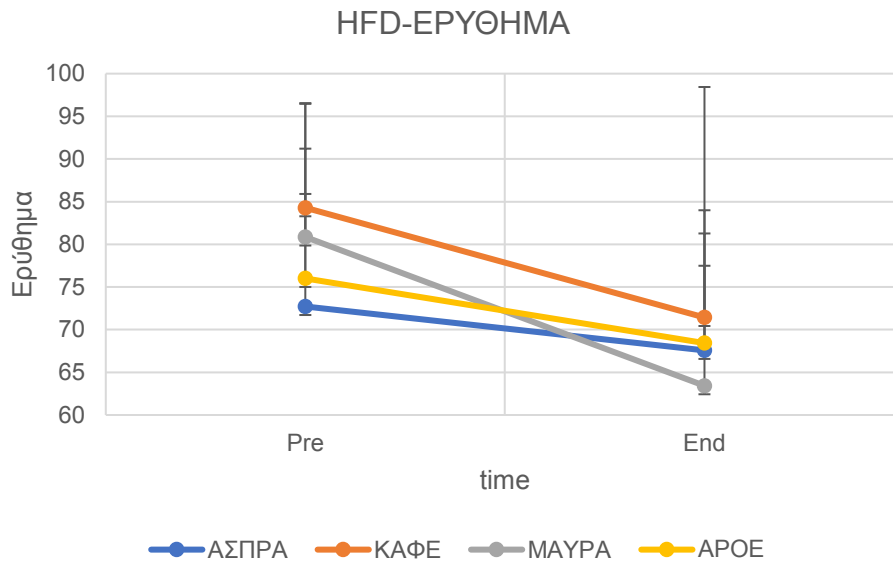


Διάγραμμα 34 Μέσος όρος Ενυδάτωσης-HFD vs NAD [HFD pre-end: $p < 0,05$ *, NAD pre-end: $p < 0,01$ **]

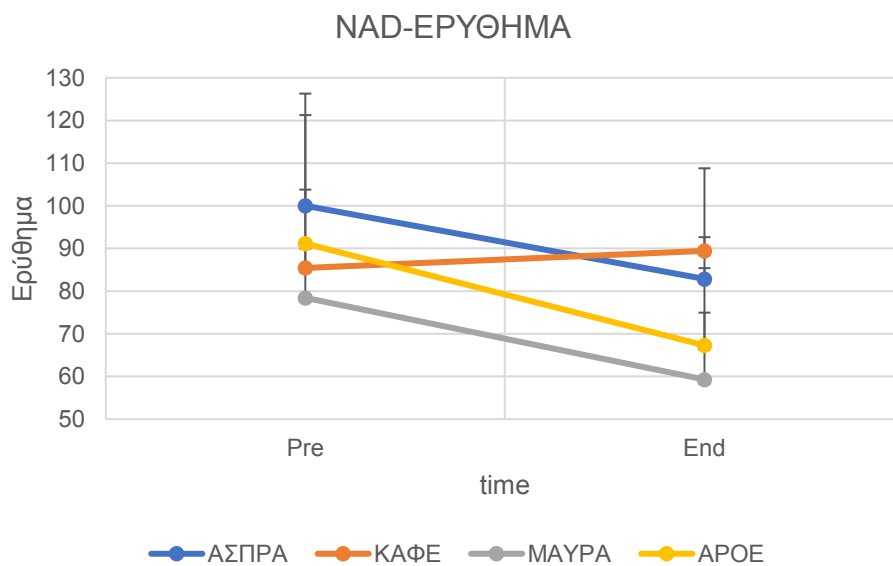
Παρατηρήσεις:

- HFD: παρατηρείται μείωση ενυδάτωσης σε όλες τις ομάδες.
- NAD: παρατηρείται αύξηση ενυδάτωσης στα ΑΣΠΡΑ, ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, ενώ μειώνεται η ενυδάτωση στα ΑΡΟΕ.
- Συγκρίνοντας τον μέσο όρο της ενυδάτωσης των αρχικών και των τελικών μετρήσεων και στα δύο πρωτόκολλα, παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$ *) της ενυδάτωσης στους μύες HFD στις τελικές μετρήσεις, ενώ στους μύες NAD, η ενυδάτωση αυξάνεται στις τελικές μετρήσεις και μάλιστα στατιστικά πολύ σημαντικά ($p < 0,01$ **) από τις αρχικές μετρήσεις.
- Αυτές οι παρατηρήσεις δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα για το αν οι αλλαγές που παρουσίασαν οι μύες στην ενυδάτωση, οφείλονται στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

- Ερύθημα



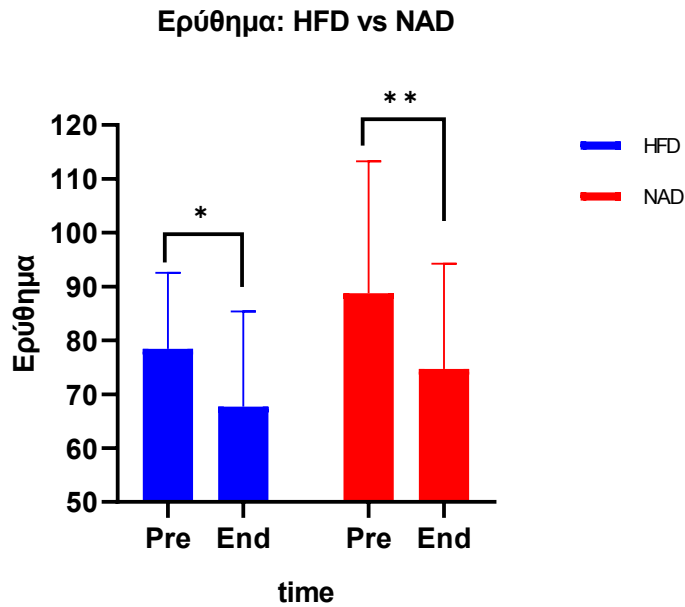
Διάγραμμα 35 HFD-Ερύθημα



Διάγραμμα 36 NAD-Ερύθημα

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

Πίνακας 35 2way ANOVA+post-hoc Fisher's LSD-ΕΡΥΘΗΜΑ HFD vs NAD



Διάγραμμα 37 Μέσος όρος Ερυθήματος-HFD vs NAD [HFD pre-end: $p < 0,05$ *, NAD pre-end: $p < 0,01$ **]

Παρατηρήσεις:

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

7.8 Αποτελέσματα 2ου πειράματος

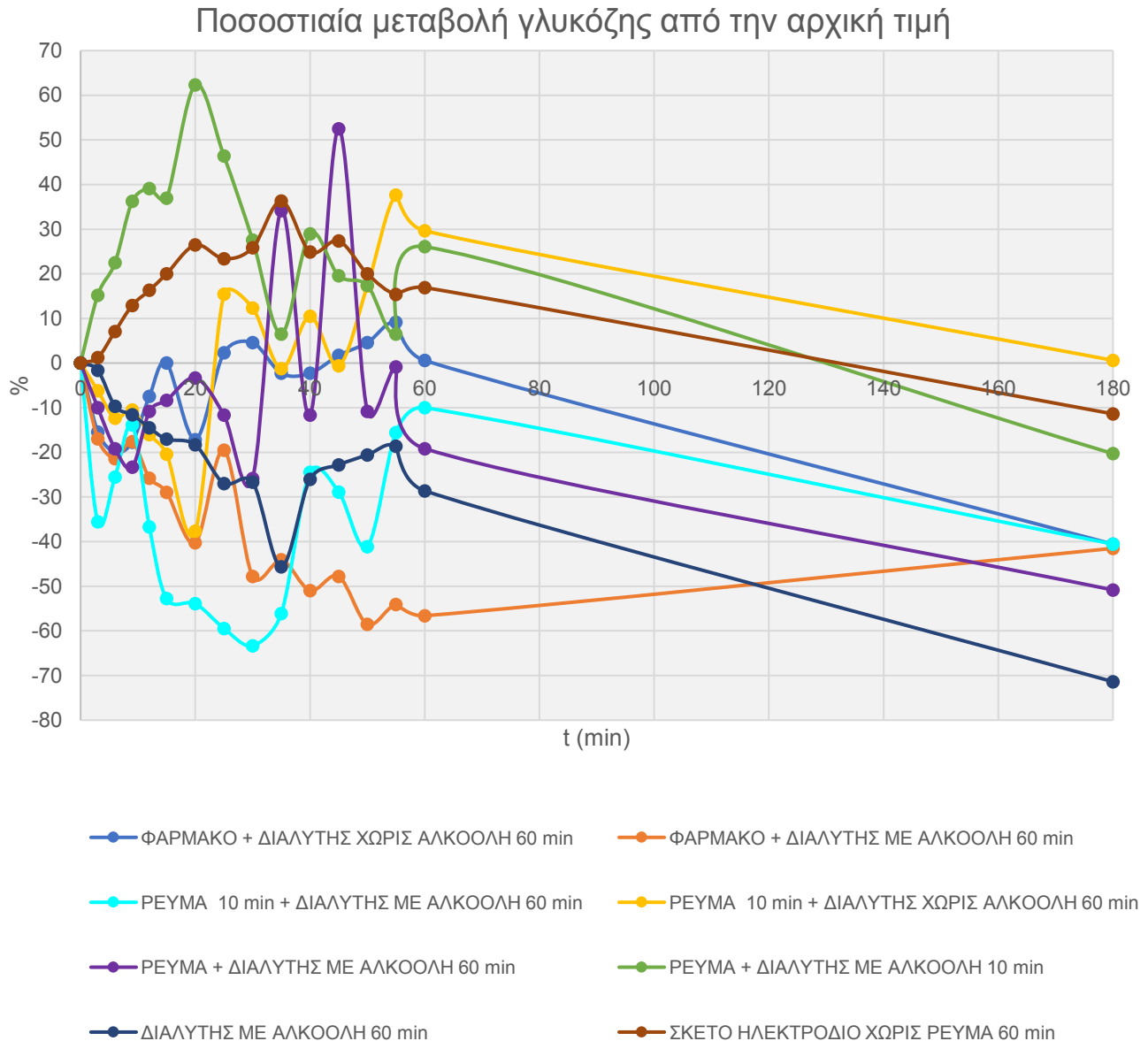
7.8.1 Δοκιμαστικό πείραμα

Παρακάτω θα αναλύσουμε τα αποτελέσματα από τα γραφήματα στα οποία απεικονίζεται η ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης κάθε ομάδας σε κάθε χρόνο από την αρχική τιμή. Έχουμε ορίσει ότι $t=0$ είναι η χρονική στιγμή που ο μυς βρίσκεται σε ηρεμία πριν ξεκινήσει η διαδικασία της χρονομέτρησης και της παρακολούθησης της γλυκόζης. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι τιμές γλυκόζης στους αντίστοιχους χρόνους λήψης αίματος για κάθε ομάδα.

Πίνακας 36 Τιμές γλυκόζης δοκιμαστικού πειράματος

ΧΡΟΝΟΣ (t)=min	ΦΑΡΜΑΚ Ο + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min	ΦΑΡΜΑΚ Ο + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛ Η 60 min	ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛ Η 60 min	ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛ Η 60 min	ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛ Η 60 min	ΡΕΥΜΑ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛ Η 10 min	ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛ Η 60 min	ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟ ΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min
0	175	159	180	162	120	138	156	163
3	148	132	116	152	108	159	153	165
6	140	125	134	142	97	169	141	174
9	144	131	155	145	92	188	138	184
12	162	118	114	136	107	192	133	189
15	175	113	85	129	110	189	129	195
20	145	95	83	101	116	224	127	206
25	179	128	73	187	106	202	114	201
30	183	83	66	182	89	176	114	205
35	171	89	79	160	161	147	85	222
40	171	78	136	179	106	178	115	203
45	178	83	128	161	183	165	120	207
50	183	66	106	190	107	162	124	195
55	191	73	152	223	119	147	127	188
60	176	69	162	210	97	174	111	190
180	104	93	107	163	59	110	45	144

Στα διαγράμματα που ακολουθούν απεικονίζεται η ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης, $\frac{G(t)-G(0)}{G(0)}\%$, για κάθε χρονική στιγμή από την αρχική της τιμή (G_0 =γλυκόζη σε $t=0$, G_t =γλυκόζη σε κάθε t αιμοληψίας).



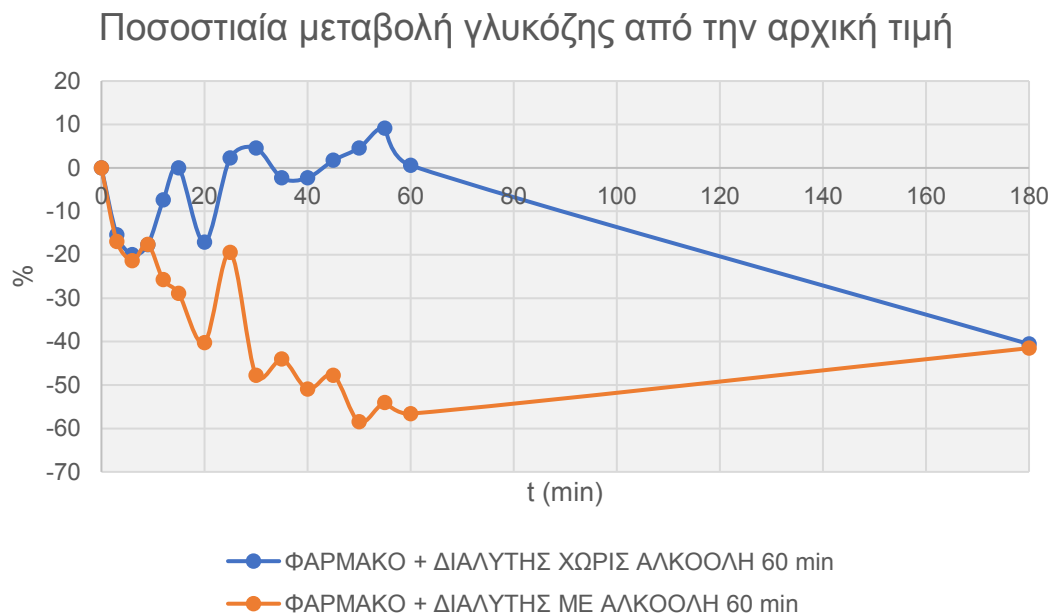
Διάγραμμα 38 Ποσοστιαία μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή-Δοκιμαστικό πείραμα

Από το παραπάνω διάγραμμα μπορούμε να καταλάβουμε ότι η χρήση ρεύματος προκαλεί μια ταραχή στον μυ καθώς σχεδόν όλες οι ομάδες με το ρεύμα πλην της ομάδας **ΡΕΥΜΑ 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min**, έχουν μια σημαντική αύξηση στη γλυκόζη τα πρώτα 60 min.

Ας δούμε τώρα τις ομάδες που συγκρίναμε μεμονωμένα για να έχουμε πιο ξεκάθαρη εικόνα για τη συνέχεια του πειράματος. Θα αξιολογήσουμε σε όλες τις ομάδες την

ποσοστιαία μεταβολή στη γλυκόζη για τα πρώτα 60 min, δηλαδή για όσο χρόνο μένει το επίθεμα/ραδ στη ράχη του μυός.

ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS
ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min



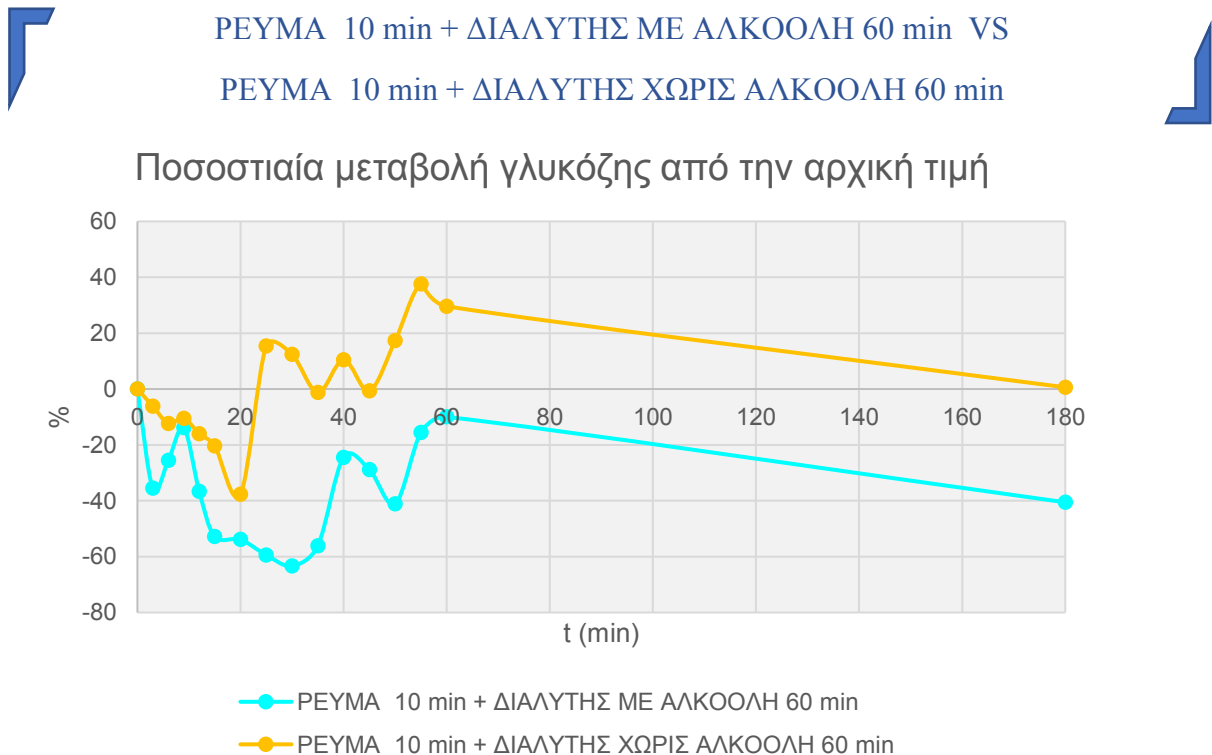
Διάγραμμα 39 ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

Παρατηρήσεις:

- Το **ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** ρίχνει τη γλυκόζη 30 min (-48%) μετά την εφαρμογή του και η μέγιστη πτώση είναι στα 50 min (-58,5%).
- Το **ΦΑΡΜΑΚΟ + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** δεν παρουσιάζει μεγάλες μεταβολές γλυκόζης. Η μεγαλύτερη πτώση στη γλυκόζη εντός της 1 ώρας εφαρμογής του επιθέματος γίνεται στα 6 min (-21%).

Συμπέρασμα:

- Η αλκοόλη είτε ως διαλύτης, είτε ως ενισχυτής διαπέρασης, έχει συνεργιστική δράση με το φάρμακο και βοηθά στην αποτελεσματικότερη μείωση των επιπέδων γλυκόζης.



Διάγραμμα 40 PEYMA 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS PEYMA 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min

Παρατηρήσεις:

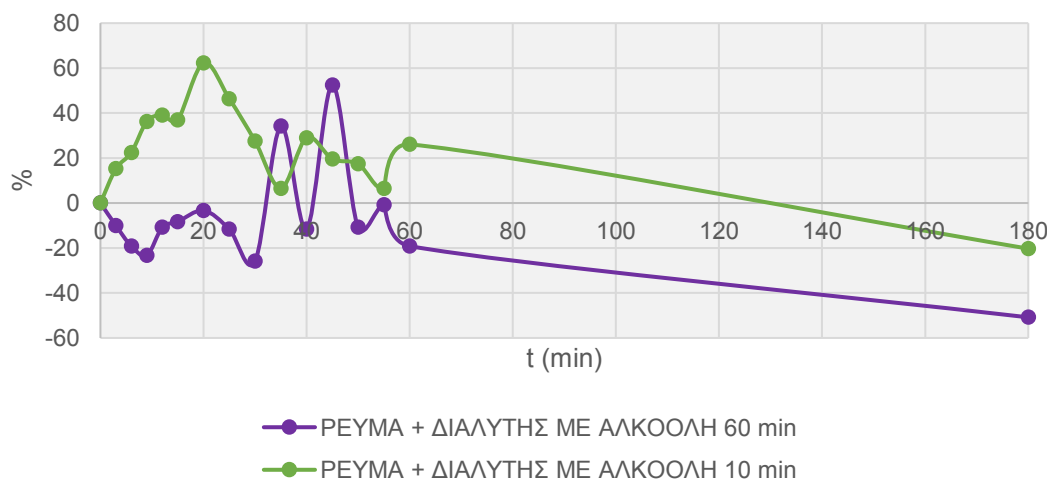
- Το **PEYMA 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση στη γλυκόζη στα 30 min (-63%).
- Το **PEYMA 10 min + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΧΩΡΙΣ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** δεν παρουσιάζει τόσο μεγάλη μείωση στη γλυκόζη, όσο η ομάδα με την αλκοόλη στον διαλύτη. Η μεγαλύτερη μείωση σε αυτή την ομάδα γίνεται στα 20 min (-38%).

Συμπέρασμα:

- Ο διαλύτης με την αλκοόλη φαίνεται να έχει κάποια δράση καθώς μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης από τα πρώτα 30 min εφαρμογής του rad.

PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS
PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 10 min

Ποσοστιαία μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή



Διάγραμμα 41 PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 10 min

Παρατηρήσεις:

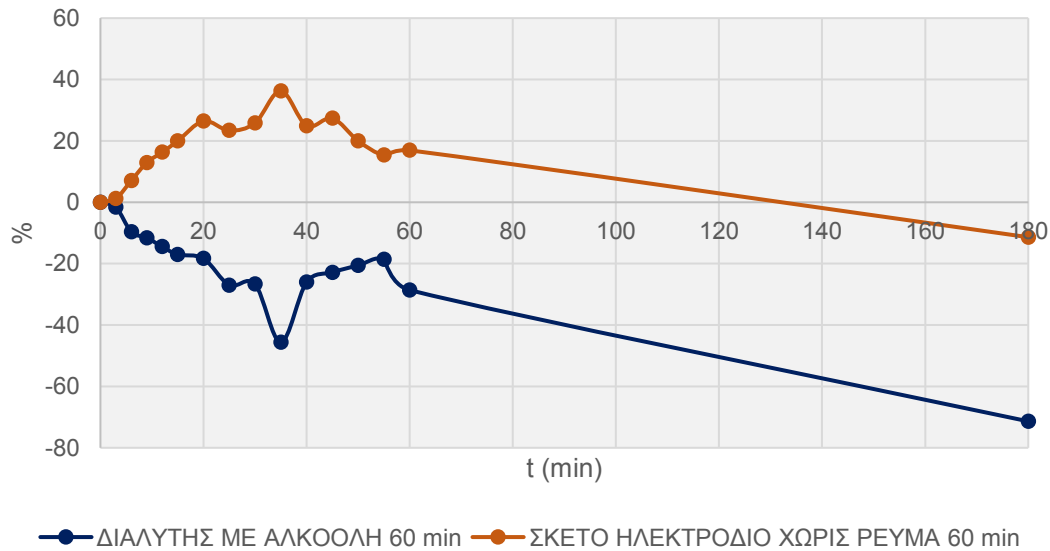
- Και οι δύο ομάδες παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση στη γλυκόζη, και αυτό πιθανώς οφείλεται στην πρόκληση στρες στους μύες όσον αφορά την ομάδα **PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min**, ενώ για την ομάδα **PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 10 min** μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το pad έμεινε μόνο 10 min πάνω στον μυ και δεν κατάφερε η αλκοόλη να προκαλέσει τη μείωση στη γλυκόζη που είχε στις υπόλοιπες ομάδες.
- Στην ομάδα **PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 10 min** παρατηρείται μόνο αύξηση στη γλυκόζη στα πρώτα 60 min, με τη μεγαλύτερη αύξηση να συμβαίνει στα 20 min (+62%), 10 min μετά την αφαίρεση του pad.
- Στην ομάδα **PEYMA + ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** παρατηρούνται αυξομειώσεις στη γλυκόζη, με την μεγαλύτερη μείωση να συμβαίνει στα 30 min (-26%).

Συμπέρασμα:

- Η εφαρμογή ρεύματος για 60 min φαίνεται να προκαλεί περισσότερες αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης, άρα και μεγαλύτερη ταραχή στους μύες.

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min

Ποσοστιαία μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή



Διάγραμμα 42 ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min VS ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min

Παρατηρήσεις:

- Η ομάδα **ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΜΕ ΑΛΚΟΟΛΗ 60 min** παρουσιάζει μεγάλη μείωση στη γλυκόζη, με τη μέγιστη μείωσή της να συμβαίνει στα 35 min (-46%) λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις μέχρι την αφαίρεση του επιθέματος, δηλαδή μέχρι τα 60 min.
- Η ομάδα με **ΣΚΕΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΟ (pad) ΧΩΡΙΣ ΡΕΥΜΑ 60 min** παρουσιάζει μόνο αύξηση στις τιμές γλυκόζης σε σχέση με την αρχική τιμή γλυκόζης του μυός ($t=0$). Η μέγιστη αύξηση συμβαίνει στα 35 min (+36%), στα ίδια ακριβώς λεπτά όπου η άλλη ομάδα παρουσιάζει τη μέγιστη μείωση στην τιμή γλυκόζης.

Συμπέρασμα:

- Η αλκοόλη έχει κάποια δράση στα επίπεδα γλυκόζης, καθώς προκαλεί μείωση -46% όταν εφαρμοσθεί για 60 min στη ράχη του μυός.

7.8.2 Τελικό πείραμα

Στους παρακάτω πίνακες δίνεται ο μέσος όρος (Μ.Ο.) για δείγμα $n=8$ (με εξαίρεση την υποομάδα Β3, όπου $n=4$) και η τυπική απόκλιση (SD) της γλυκόζης σε κάθε χρονική στιγμή της δειγματοληψίας για κάθε ομάδα/υποομάδα.

t (min)	ΦΑΡΜΑΚΟ (Α1)			ΔΙΑΛΥΤΗΣ (Α2)			PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (Β1)			PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (Β2)			PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (Β3)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	143,1	28,5	8	138,9	14,2	8	138,3	22,2	8	134,3	19,6	8	134,0	9,0	4
3	139,4	27,5	8	138,6	12,4	8	145,5	23,3	8	127,3	16,3	8	127,8	2,9	4
6	145,5	27,7	8	138,5	24,2	8	141,5	18,4	8	126,6	15,2	8	137,8	18,4	4
9	145,9	27,0	8	154,6	25,7	8	145,1	26,5	8	138,0	28,4	8	149,0	34,2	4
12	149,8	23,4	8	166,1	40,1	8	140,0	30,5	8	149,0	37,2	8	156,0	24,3	4
15	150,3	23,6	8	162,3	31,9	8	150,6	15,2	8	148,9	37,0	8	163,3	23,3	4
20	147,1	28,3	8	164,0	41,8	8	149,8	28,6	8	148,9	43,5	8	142,3	25,2	4
25	154,6	44,6	8	166,0	33,8	8	166,9	45,9	8	167,4	64,6	8	133,5	21,4	4
30	183,4	89,2	8	159,1	35,6	8	199,3	68,5	8	175,0	72,7	8	130,5	43,4	4
35	179,1	81,3	8	154,8	36,4	8	180,5	89,9	8	200,1	81,2	8	109,5	27,7	4
40	189,6	111,9	8	156,6	45,0	8	174,1	84,0	8	188,5	73,6	8	99,3	19,0	4
45	176,6	123,5	8	156,8	46,9	8	173,1	104,3	8	182,4	71,0	8	97,0	20,0	4
50	181,4	148,8	8	146,0	45,3	8	164,0	96,3	8	184,3	67,6	8	96,5	17,9	4
55	176,5	157,7	8	137,8	44,6	8	156,8	96,1	8	185,8	68,7	8	100,8	12,5	4
60	170,9	160,1	8	139,6	48,8	8	153,4	95,7	8	184,3	62,6	8	101,8	15,1	4
75	163,8	147,9	8	122,1	41,2	8	141,0	93,0	8	157,3	52,6	8	93,3	8,3	4
90	149,4	137,3	8	113,9	29,1	8	138,8	77,6	8	150,9	50,1	8	107,8	3,5	4
120	115,6	71,6	8	104,0	20,6	8	115,1	41,9	8	129,5	40,5	8	108,3	5,4	4
180	83,3	25,9	8	97,9	15,4	8	84,5	16,7	8	95,6	20,5	8	101,0	7,1	4

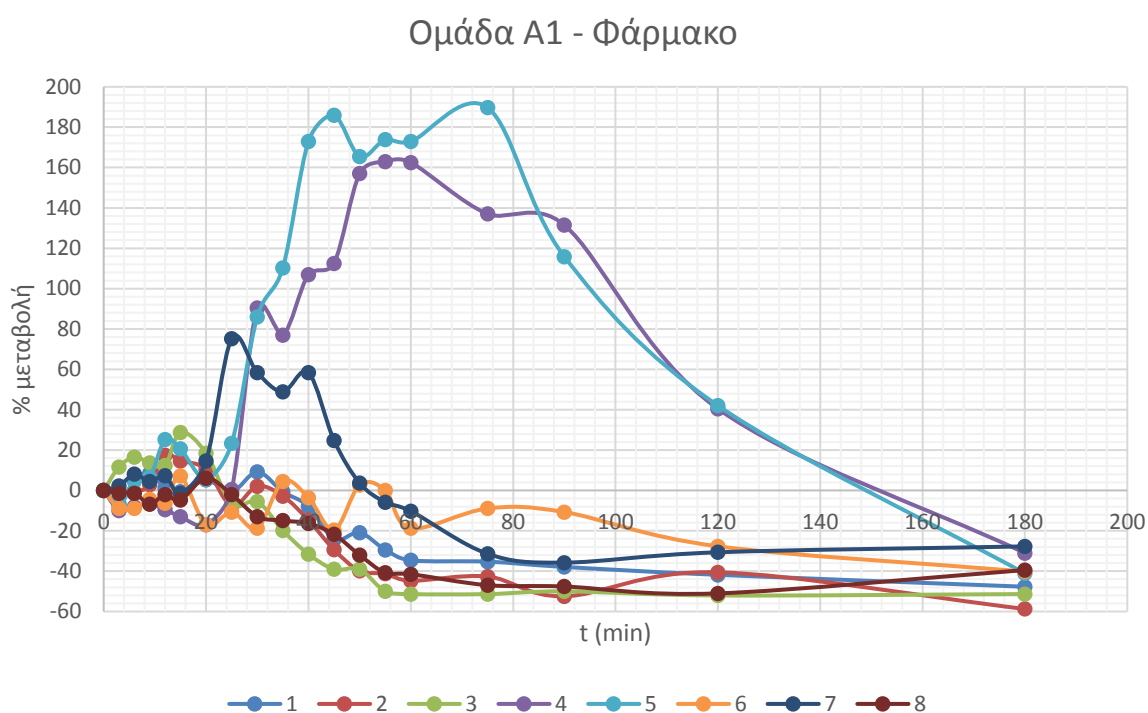
Πίνακας 37 Ομάδες Α (1,2) και Β (1,2,3)

t (min)	PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)			PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)			PER OS (D)		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
0	149,1	20,4	8	135	10,0	8	156,6	15,1	8
3	156,0	24,2	8	140	16,6	8	147,9	22,6	8
6	158,1	35,5	8	142	24,8	8	151,3	22,7	8
9	152,5	22,2	8	156	45,6	8	152,6	22,3	8
12	150,6	25,3	8	157	53,5	8	142,6	20,3	8
15	151,3	22,4	8	144	29,9	8	143,9	24,5	8
20	148,5	21,8	8	148	31,3	8	125,8	35,7	8
25	132,0	30,6	8	143	30,5	8	118,6	33,6	8
30	138,9	35,3	8	141	25,1	8	103,4	29,7	8
35	140,8	41,4	8	134	21,1	8	104,0	30,8	8
40	146,3	33,6	8	132	22,8	8	94,6	26,8	8
45	147,0	42,4	8	132	26,8	8	95,6	26,5	8
50	139,5	45,0	8	132	26,6	8	94,1	31,4	8
55	138,8	47,9	8	131	30,7	8	90,4	33,3	8
60	139,5	46,5	8	122	26,6	8	82,4	20,8	8
75	130,4	40,2	8	113	22,8	8	81,9	27,6	8
90	137,6	34,1	8	108	17,0	8	74,3	31,0	8
120	130,5	23,4	8	96	19,6	8	73,8	37,5	8
180	111,6	12,2	8	92	13,3	8	74,6	45,1	8

Πίνακας 38 Ομάδες C (1,2) και D

7.8.2.1 Ανάλυση μυών ανά ομάδα κατά μόνες

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, απεικονίζεται η ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης $\frac{G(t)-G(0)}{G(0)}\%$, από την αρχική τιμή ($t=0$), για κάθε μυ από κάθε ομάδα. Έχουμε ορίσει ότι $t=0$ είναι η χρονική στιγμή που ο μυς βρίσκεται σε ηρεμία πριν ξεκινήσει η διαδικασία της χρονομέτρησης και της παρακολούθησης της γλυκόζης. Οι μύες θα αναλυθούν κατά μόνες σε πρώτη φάση καθώς παρουσιάζουν διαφορετική απόκριση.



Διάγραμμα 43 Ομάδα A-Φάρμακο

Παρατηρήσεις:

- Είναι εμφανής η διαφορά στην απόκριση του φαρμάκου για κάθε μυ ξεχωριστά. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι τα 20 πρώτα min υπάρχει μία μεταβολή στις τιμές γλυκόζης σε όλους τους μύες. Στα 30 min ξεκινά η διαφοροποίηση στην απόκριση του φαρμάκου μεταξύ των μυών. Στους μύες 4, 5 και 7 υπάρχει μια σοβαρή αύξηση στη γλυκόζη από την αρχική τους τιμή εντός της 1 ώρας κατά +185%, +162% και +75% αντίστοιχα, κάτι που είναι αξιοσημείωτο σε σύγκριση με τους υπόλοιπους μύες. Αντίθετα στους μύες 1, 2, 3 και 8 παρατηρείται μείωση στη γλυκόζη εντός της 1 ώρας κατά -35%, -45%, -51% και -42% αντίστοιχα. Υπάρχει και ο μυς 6 που παρουσιάζει μία σταθερότητα στις τιμές γλυκόζης του και η μέγιστη μείωση εντός της 1 ώρας συμβαίνει στα 45 min (-19%). Αυτή η μείωση δεν μπορεί να θεωρηθεί

αξιοσημείωτη καθώς βρίσκεται στα όρια μεταβολής του μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015).

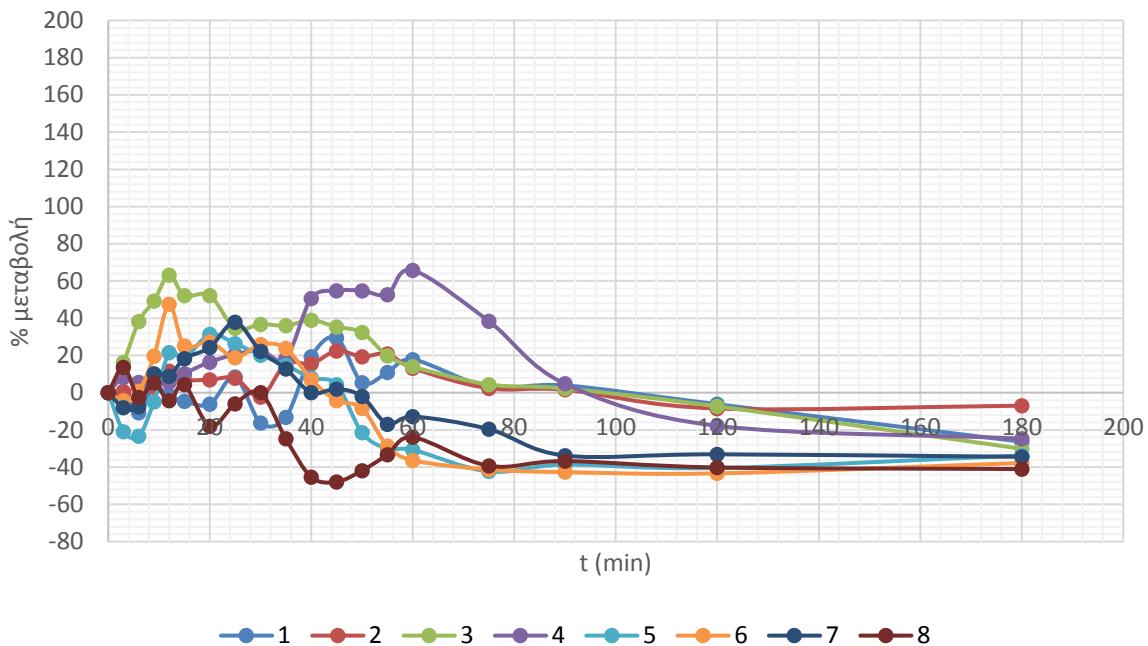
- Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -42\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013).
- Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν από τα 30 έως τα 60 min.

Συμπεράσματα:

- Η διαφορετική απόκριση των μυών στο διαδερμικό φάρμακο πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη κάποιων ιόντων φαρμάκου τα οποία εμποδίζουν τη θετική δράση του, που είναι η μείωση της γλυκόζης στο αίμα. Το φάρμακο μπορεί να βρίσκεται σε περισσότερες από μία ιονισμένες μορφές (όπως αναφέραμε και παραπάνω, σελ.121) και κάποια από αυτές ενδέχεται να προκαλεί αρνητική δράση, αυξάνοντας τα επίπεδα γλυκόζης. Δηλαδή, κάποια από τα σχηματιζόμενα ιόντα δημιουργούν ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό που περιμέναμε.
- Τον ιονισμό φαρμάκου ενδέχεται να επηρεάζει και ο φορέας διάλυσης που επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε μαζί με τους ενισχυτές διείσδυσης (DMSO + PG + PEG 400 + Glycerin).
- Σε αυτή την Ομάδα δεν μπορούμε να πούμε ότι έχουμε κάποια ένδειξη κατεύθυνσης στο αν δρα θετικά ή αρνητικά η ρεπαγλινίδα. Παρόλα αυτά είναι σαφές από το παραπάνω διάγραμμα ότι υπάρχει απόκριση από τους μύες άρα και δράση η οποία μπορεί να είναι θετική ή αρνητική (με εξαίρεση τον μυ 6 που έχει σταθερές τιμές γλυκόζης).
- Η πτώση στη γλυκόζη (σε 4 μύες) συμβαίνει εντός της 1 ώρας και είναι $\sim -42\%$. Στις 3 ώρες η πτώση στους ίδιους μύες αγγίζει το -49% .
- Η αύξηση στη γλυκόζη (σε 3 μύες) συμβαίνει και αυτή εντός της 1 ώρας και είναι $\sim +140\%$. Ωστόσο στις 3 ώρες οι ίδιοι μύες παρουσιάζουν μείωση -33% στη γλυκόζη από την αρχική τους τιμή.

- Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η δράση της ρεπαγλινίδης και η θετική ή αρνητική απόκριση στους μύες συμβαίνει εντός 1 ώρας από την εφαρμογή του επιθέματος.
- Η καθαρή πτώση στη γλυκόζη στις 3 ώρες είναι περίπου ~ -30% (αντί ~-42%), αφαιρώντας ~10% λόγω της κατάστασης νηστείας των μυών (Jensen et al., 2013). Ωστόσο στην πτώση αυτή δεν υπολογίσαμε και την ευαισθησία του μηχανήματος στη μέτρηση σακχάρου ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015).

Ομάδα A2 - Διαλύτης



Διάγραμμα 44 Ομάδα A2 - Διαλύτης

Παρατηρήσεις:

- Παρατηρούνται αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης την 1η ώρα εφαρμογής του επιθέματος.
- Οι μύες είναι ίδιοι με την υποομάδα A1 (φάρμακο), αλλά έχουν διαφορετική συμπεριφορά στις τιμές γλυκόζης τους με την εφαρμογή του διαλύτη.
- Οι μύες 5, 6 και 8 παρουσιάζουν μια σημαντική πτώση στη γλυκόζη εντός της 1 ώρας, και η μεγαλύτερη είναι -30%, -36% και -48% αντίστοιχα.
- Οι μύες 1, 3, 4 παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση στη γλυκόζη εντός της 1 ώρας και η μεγαλύτερη φτάνει στο +29%, +39% και +66% αντίστοιχα.
- Ο μυς 2 παρουσιάζει τις πιο σταθερές τιμές γλυκόζης μέχρι και τις 3 ώρες, κάτι που περιμέναμε να συμβεί σε όλους τους μύες. Η μεγαλύτερη μεταβολή στη γλυκόζη

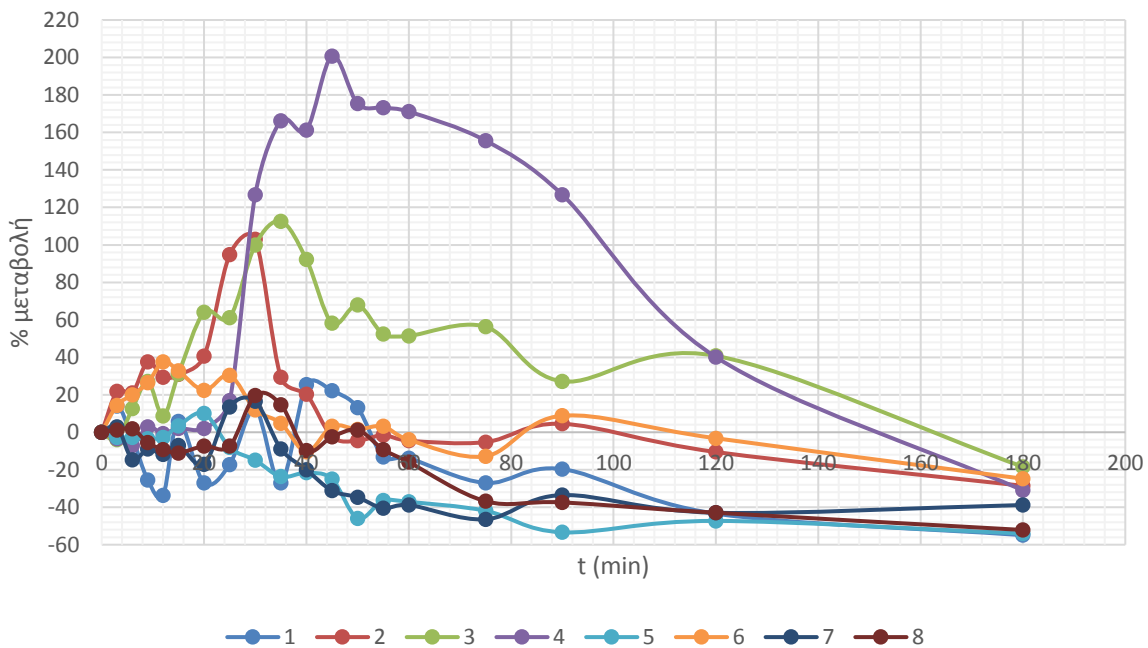
συμβαίνει στα 45 min όπου παρατηρείται αύξηση +22%, κάτι το οποίο δεν είναι αξιοσημείωτο καθώς βρίσκεται στα όρια μεταβολής του μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης (Χαλβατσιώτης, 2015).

- Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -29\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013).
- Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν από τα 30 έως τα 60 min.

Συμπεράσματα:

- Οι μεταβολές στις τιμές γλυκόζης είναι μικρότερες σε σχέση με αυτές που υπήρχαν στην υποομάδα A1 (φάρμακο).
- Φαίνεται ότι ο διαλύτης δεν τους επηρεάζει τόσο αρνητικά/θετικά όσο το φάρμακο
- Οι διακυμάνσεις στη γλυκόζη μπορεί να οφείλονται και στην ύπαρξη στρες στους μύες, καθώς τα πρώτα 15 min βρίσκονταν μέσα στην ποντικοπαγίδα και ύστερα επέστρεφαν στον κλωβό τους χωρίς πρόσβαση σε τροφή (Folmer et al., 2002; Wellen and Hotamisligil, 2005).
- Στις 3 ώρες η μείωση στη γλυκόζη είναι περίπου $\sim -29\%$. Ωστόσο αν υπολογίσουμε και μια πτώση $\sim -10\%$ από τη νηστεία των μυών, τότε η καθαρή μείωση που προκαλεί ο διαλύτης στη γλυκόζη στις 3 ώρες είναι $\sim -19\%$. Ωστόσο στην πτώση αυτή δεν υπολογίσαμε και την ευαισθησία του μηχανήματος στη μέτρηση σακχάρου ($\pm 15\%$) (ΧΑΛΒΑΤΣΙΩΤΗΣ, 2015).
- Άρα η δράση του διαλύτη στη μείωση της γλυκόζης είναι μηδαμινή.

Ομάδα B1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed +φάρμακο)



Διάγραμμα 45 Ομάδα B1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed +φάρμακο)

Παρατηρήσεις:

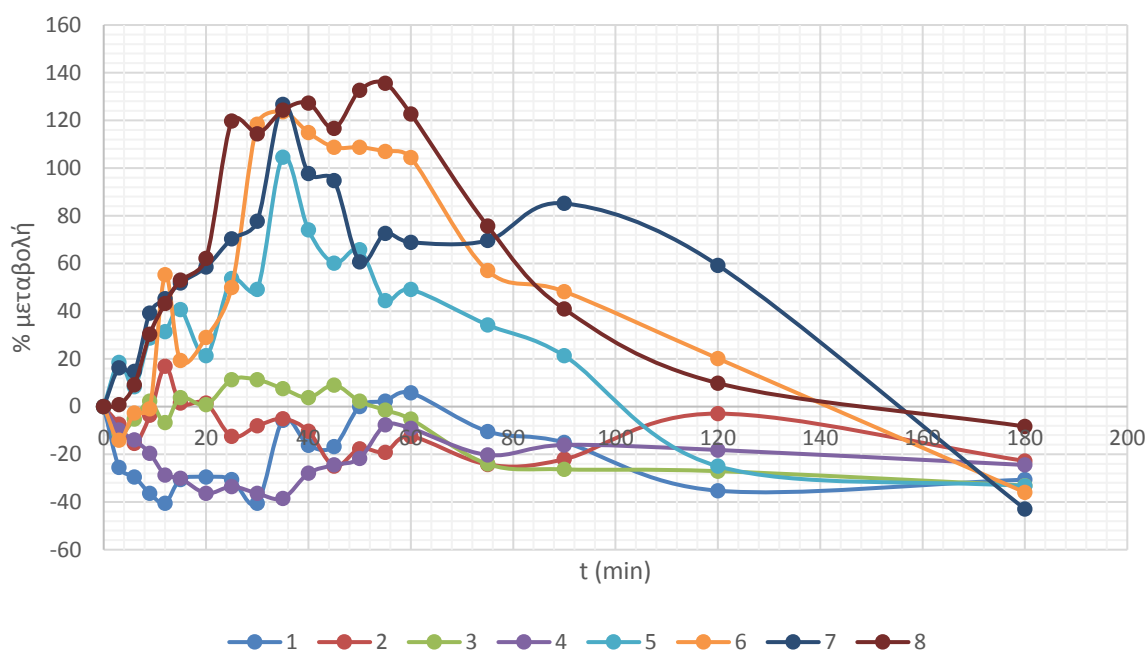
- Παρατηρούνται έντονες μεταβολές σε όλους τους μύες και είναι ιδιαίτερα εμφανείς την 1η ώρα.
- Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν από τα 30 έως τα 60 min.
- Στα 30 min ξεκινά η διαφοροποίηση μεταξύ των μυών στην απόκριση στο φάρμακο. Στους μύες 2, 3 και 4 υπάρχει μια σοβαρή αύξηση στη γλυκόζη από την αρχική τους τιμή εντός της 1 ώρας κατά +103%, +112% και +200% αντίστοιχα, κάτι που είναι αξιοσημείωτο σε σύγκριση με τους υπόλοιπους μύες. Αντίθετα στους μύες 1, 5 και 7 παρατηρείται μείωση στη γλυκόζη εντός της 1 ώρας κατά -33%, -46% και -40% αντίστοιχα. Ο μύς 8 παρουσιάζει αξιοσημείωτη καθυστερημένη μείωση στη γλυκόζη αφού συμβαίνει μετά τη 1 ώρα, όπου η μέγιστη πτώση είναι -52% στις 3 ώρες. Όπως και στην Ομάδα A1, έτσι κι εδώ υπάρχει ο μύς 6 που παρουσιάζει μία σταθερότητα στις τιμές γλυκόζης του και η μέγιστη μείωση εντός της 1 ώρας συμβαίνει στα 40 min (-10%). Αυτή η μείωση δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιοσημείωτη καθώς βρίσκεται στα όρια μεταβολής του μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015).

- Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -38\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρους της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013).

Συμπεράσματα:

- Το παλμικό ρεύμα θα μπορούσαμε να πούμε ότι επαύξησε τη δράση του φαρμάκου, η οποία όπως αναλύθηκε στην Ομάδα A1 ήταν θετική σε κάποιους μύες, ενώ σε άλλους αρνητική. Αυτή η επαύξηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το παλμικό ρεύμα βοηθά στην ευκολότερη και γρηγορότερη διείσδυση του φαρμάκου από την κεράτινη στιβάδα, γεγονός που επιφέρει και γρηγορότερη απόκριση του μυός στο φάρμακο.
- Το παλμικό ρεύμα εισάγει συγκεκριμένα ιόντα και όχι τυχαία και στη συγκεκριμένη περίπτωση εισήγαγε τα θετικά ιόντα του φαρμάκου και του διαλύτη, καθώς το φάρμακο βρισκόταν στον πόλο με (+) πρόσημο (άνοδος).
- Επειδή το ρεύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ON/OFF, δηλαδή δεν ήταν συνεχές, κατά την φάση του OFF, τα ιόντα που είχαν αποκτήσει κίνηση λόγω του ρεύματος χάνουν την επιτάχυνσή τους, με αποτέλεσμα αυτό να δημιουργεί έντονες αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης στα πρώτα 10 min εφαρμογής του ρεύματος αλλά και στρες στους μύες.
- Με τη χρήση του ρεύματος, θα περιμέναμε να εισχωρήσει πιο γρήγορα το φάρμακο, αυξάνοντας παράλληλα και τη συγκέντρωσή του στο αίμα και να μειώσει τη γλυκόζη ικανοποιητικά στα 10 πρώτα λεπτά εφαρμογής του ρεύματος. Ωστόσο παρατηρείται μια καθυστερημένη αντίδραση των μυών στη μεταβολή γλυκόζης που δεν οφείλεται άμεσα στο ρεύμα, αλλά μάλλον στα θετικά ιόντα του φαρμάκου που διαπερνούν την κεράτινη στιβάδα, υποβοηθούμενα από το ρεύμα και δεν μπορούν να μειώσουν τόσο γρήγορα και αποτελεσματικά τη γλυκόζη. Μια άλλη άποψη είναι ότι το παλμικό ρεύμα δημιουργεί στρες στους μύες και είναι αδύνατον να ανταποκριθούν στο φάρμακο, καθώς γνωρίζουμε ότι το στρες ανεβάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Folmer et al., 2002; Wellen and Hotamisligil, 2005).
- Από τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνεται η άποψη ότι η απόκριση στο φάρμακο είναι μια δράση χημικής προσέγγισης και όχι τόσο ηλεκτρονικής.

Ομάδα B2 (ρεύμα AC + φάρμακο)



Διάγραμμα 46 Ομάδα B2 (ρεύμα AC + φάρμακο)

Παρατηρήσεις:

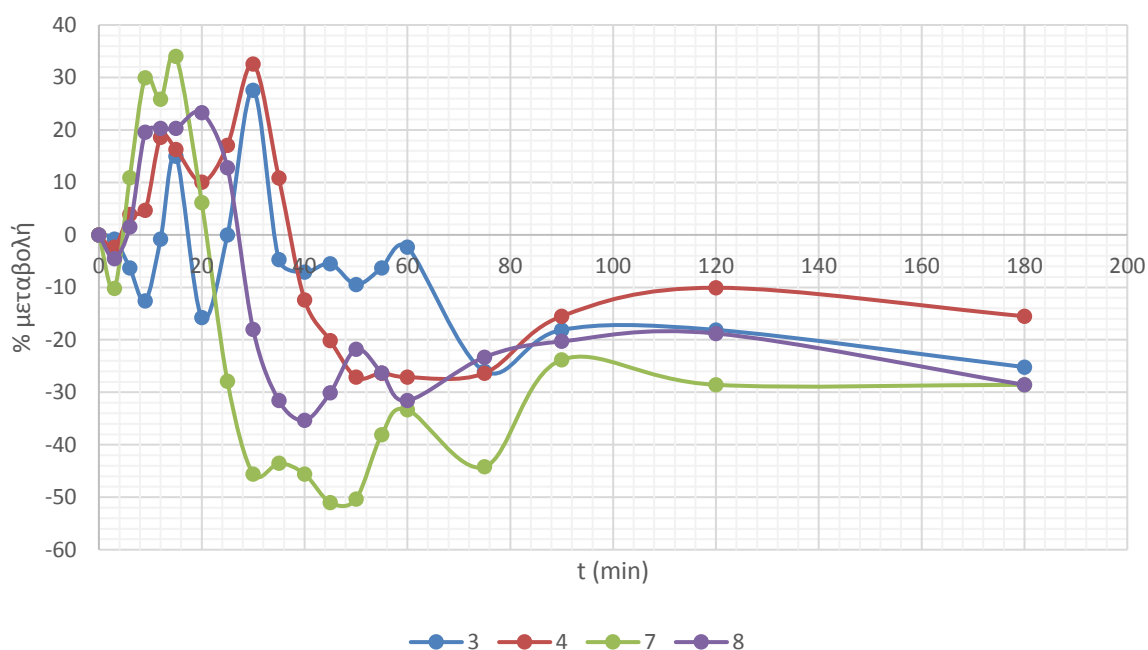
- Παρατηρούνται έντονες μεταβολές σε όλους τους μύες και είναι ιδιαίτερα εμφανείς την 1η ώρα.
- Εδώ οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν πιο γρήγορα από το παλμικό ρεύμα και συγκεκριμένα, από τα 3 έως τα 60 min.
- Παρατηρώντας το διάγραμμα, είναι ξεκάθαρο ότι το δείγμα μυών έχει χωρισθεί σε δύο υποσύνολα των 4 μυών. Δηλαδή, 4 μύες που ανταποκρίνονται θετικά στο φάρμακο την 1η ώρα και 4 μύες που ανταποκρίνονται αρνητικά στο φάρμακο.
- Οι μύες είναι οι ίδιοι με την υποομάδα B1. Παρατηρούμε αντίθετη απόκριση από αυτήν που είχαν οι μύες με το παλμικό ρεύμα. Πιο συγκεκριμένα, οι μύες 5, 6, 7 και 8 παρουσιάζουν μεγάλη αύξηση στη γλυκόζη την 1η ώρα εφαρμογής του επιθέματος που είναι +104%, +123%, +126% και +135% αντίστοιχα. Οι ίδιοι μύες στο παλμικό ρεύμα παρουσίαζαν μείωση γλυκόζης με μέσο όρο ~ -28% εντός της 1ης ώρας. Οι μύες 2 και 4 στο εναλλασσόμενο ρεύμα παρουσιάζουν μια σημαντική μείωση στη γλυκόζη εντός της 1ης ώρας, που είναι -25% και -38% αντίστοιχα. Αυτοί οι μύες στην εφαρμογή παλμικού ρεύματος είχαν μια πολύ μεγάλη αύξηση στη γλυκόζη που ήταν +103% για τον μυ 2 και +200% για τον μυ 4.

- Ο μυς 1 όπως και στο παλμικό, έτσι και στο εναλλασσόμενο παρουσιάζει μείωση στη γλυκόζη, -40% εντός της 1ης ώρας εφαρμογής του επιθέματος.
- Ο μυς 3 αποκρίνεται στο φάρμακο όπως αποκρίθηκε ο μυς 6 στο παλμικό ρεύμα, δηλαδή δείχνει μια καθυστερημένη απόκριση στη δράση του φαρμάκου που γίνεται αντιληπτή μετά τη 1 ώρα.
- Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -29\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013).

Συμπεράσματα:

- Το εναλλασσόμενο ρεύμα προκαλεί αντίθετη απόκριση των μυών στο φάρμακο από αυτή που προκαλείται με το παλμικό ρεύμα.
- Παρόλο που υπάρχει ίδια ροή ρεύματος στο χρόνο και στο παλμικό και στο εναλλασσόμενο, το εναλλασσόμενο ρεύμα δημιουργεί μεγαλύτερη μεταβολή και αναταραχή με αποτέλεσμα να επηρεάζει άμεσα την απόκριση των μυών στο φάρμακο.
- Το εναλλασσόμενο ρεύμα ωθεί και τα θετικά και τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και του φορέα διάλυσης με αποτέλεσμα να παραμένει ασαφές ποιο ιόν του φαρμάκου ασκεί τη θετική απόκριση στους μύες.
- Στο εναλλασσόμενο ρεύμα τα σχηματιζόμενα ιόντα δεν χάνουν την κίνησή τους, οπότε η δράση του φαρμάκου είτε θετική είτε αρνητική είναι, μπορεί να παρατηρηθεί από τα πρώτα κιόλας 10 min. Άρα εμφανίζει τη δράση του φαρμάκου πιο γρήγορα.
- Με το εναλλασσόμενο ρεύμα, δεν μπορούμε να καταλάβουμε ποια ιόντα περνάνε και μειώνουν τη γλυκόζη και ποια άλλα περνάνε και την αυξάνουν.
- Ο μέσος όρος της πτώσης της γλυκόζης με το παλμικό ρεύμα (-38%) ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με το εναλλασσόμενο ρεύμα (-29%) στις 3 ώρες εφαρμογής του επιθέματος.

Ομάδα B3 (ρεύμα DC + DC ON/OFF pulsed + φάρμακο)



Διάγραμμα 47 Ομάδα B3 (ρεύμα DC + DC ON/OFF pulsed + φάρμακο)

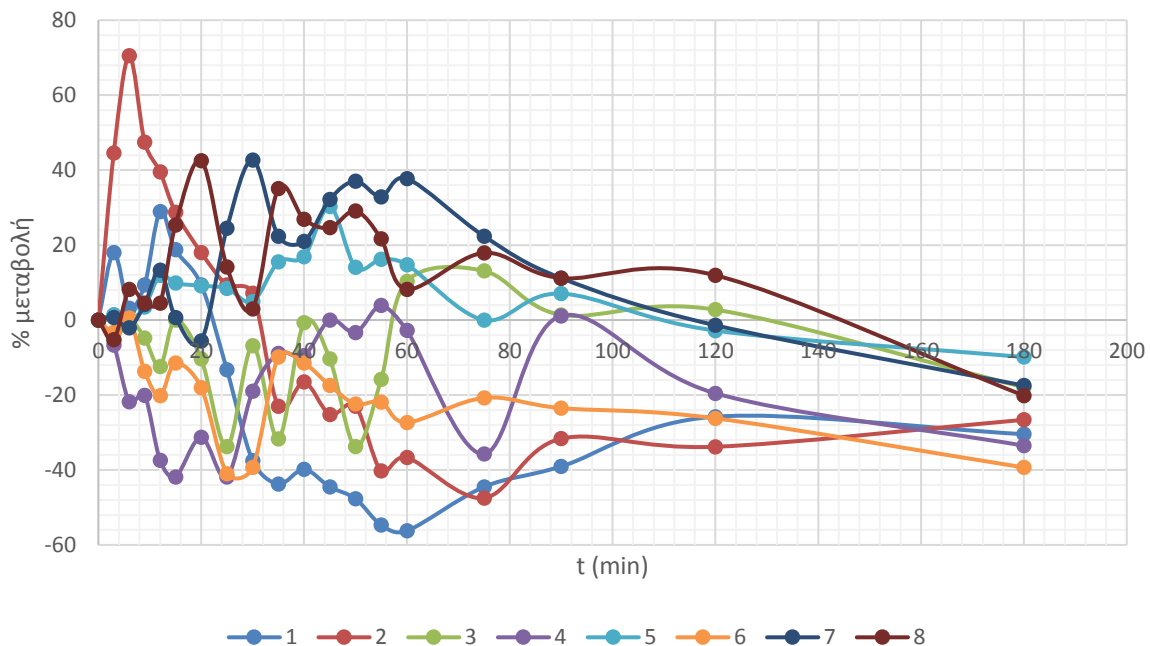
Παρατηρήσεις:

- Οι μύες που επιλέχθηκαν σε αυτή την υποομάδα ήταν ίδιοι με τις υποομάδες B1 και B2 αλλά σκοπίμως επιλέχθηκαν οι μύες 3 και 4 επειδή παρουσίασαν πολύ μεγάλη αύξηση γλυκόζης στο παλμικό ρεύμα και οι μύες 7 και 8 επειδή παρουσίασαν πολύ μεγάλη αύξηση γλυκόζης στο εναλλασσόμενο ρεύμα. Ουσιαστικά επιλέχθηκαν 4 μύες που θεωρήθηκαν ακραίες περιπτώσεις ώστε να διερευνηθεί η απόκρισή τους στο φάρμακο υπό συνεχές + παλμικό ρεύμα.
- Παρατηρείται μια αύξηση στη γλυκόζη τα πρώτα 15 min σε όλους τους μύες, περίπου ~ +20%.
- Είναι εμφανής η μείωση στη γλυκόζη από τα 30 min στους μύες 7 και 8 και από τα 40 min στους μύες 3 και 4.
- Οι έντονες μεταβολές στη γλυκόζη παρατηρούνται τα 30 πρώτα min και έπειτα είναι εμφανές ότι οι μύες αποκρίνονται θετικά στο φάρμακο.
- Η μέγιστη μείωση στη γλυκόζη κατά μέσο όρο συμβαίνει στα 75 min, όπου η μείωση είναι ~-30%. Το αξιοσημείωτο είναι ότι στις 3 ώρες έχουμε μικρότερη μείωση, ~-24%, κάτι που δε συνέβαινε στις προηγούμενες υποομάδες του ρεύματος.

Συμπεράσματα:

- Το ρεύμα δημιούργησε και εδώ αυξημένη μεταβολή στη γλυκόζη, ωστόσο αυτή η αναταραχή τα πρώτα 15 min δεν θεωρείται αξιοσημείωτη, καθώς είναι περίπου +20% και βρίσκεται στα όρια μεταβολής του μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015).
- Το συνεχές + παλμικό ρεύμα εισάγει συγκεκριμένα ιόντα και όχι τυχαία και στη συγκεκριμένη περίπτωση εισήγαγε τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και του διαλύτη, καθώς το φάρμακο βρισκόταν στον πόλο με (-) πρόσημο (κάθοδος).
- Επειδή το ρεύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνεχές, δηλαδή δεν ήταν ON/OFF, τα ιόντα είχαν συνεχή ροή προς μία κατεύθυνση. Έτσι αυτό το γεγονός δημιούργησε λιγότερες και μικρότερες μεταβολές στις τιμές γλυκόζης στα πρώτα 10 min εφαρμογής του ρεύματος.
- Η θετική απόκριση των μυών στο φάρμακο είναι εμφανής από τα πρώτα κιόλας 30 min και η μέγιστη μείωση επιτυγχάνεται πριν τις 3 ώρες, στα 75 min ($\sim 30\%$).
- Εισάγοντας τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και με χρήση συνεχούς παλμικού ρεύματος, αποφυγάμε την αρνητική αλλά και την καθυστερημένη απόκριση των μυών στη ρεπαγλινίδη.

Ομάδα C1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed + διαλύτης)



Διάγραμμα 48 Ομάδα C1 (ρεύμα DC ON/OFF pulsed + διαλύτης)

Παρατηρήσεις:

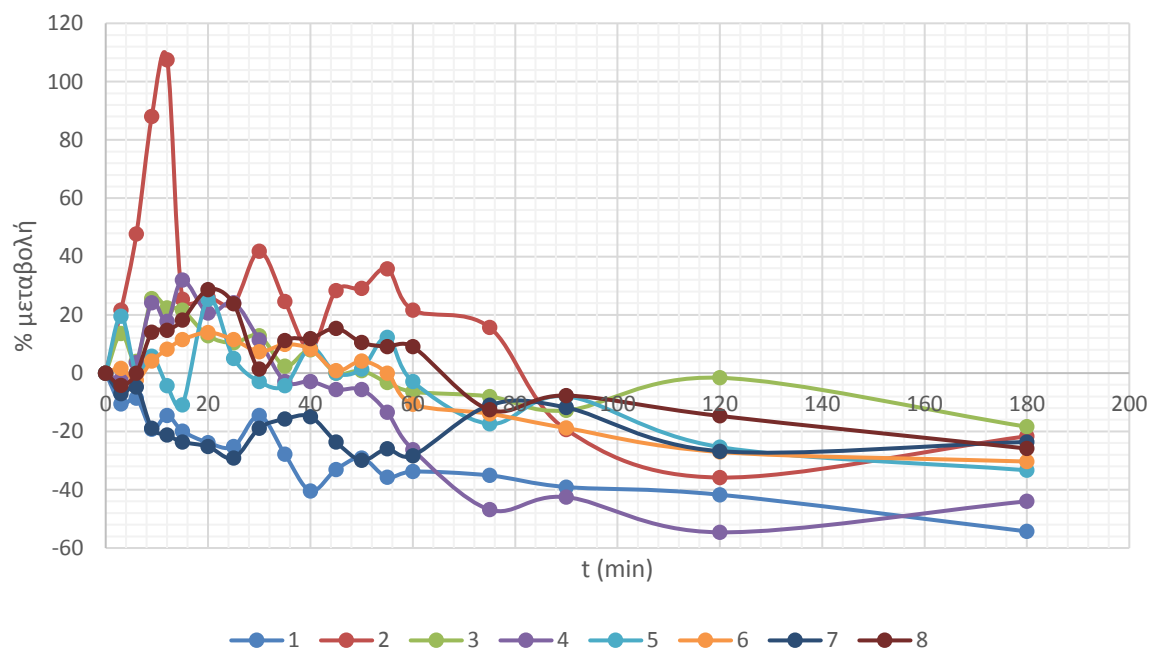
- Παρατηρούνται έντονες μεταβολές στη γλυκόζη σε όλους τους μύες, που μπορεί να οφείλονται στην εφαρμογή του παλμικού ρεύματος τα πρώτα 10 min.
- Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν από τα 10 έως τα 60 min.
- Οι μύες 1, 2, 5, 7 και 8 ξεκινάνε από αύξηση στις τιμές γλυκόζης τους και μετά τα 30 min στους μύες 1 και 2 και τη 1 ώρα στους μύες 5, 7 και 8, ακολουθεί η πτώση στη γλυκόζη. Αντίθετα, οι μύες 3, 4 και 6 ξεκινούν από χαμηλές τιμές γλυκόζης και μετά τα 30 min, εμφανίζουν αύξηση στη γλυκόζη τους.
- Η μεγαλύτερη πτώση στη γλυκόζη για τους μύες 3, 4 και 6 επιτυγχάνεται στα 25 min, που φτάνει στο $\sim -39\%$ κατά μέσο όρο.
- Η μεγαλύτερη άνοδος στη γλυκόζη για τους μύες 1 και 2 επιτυγχάνεται στα ~ 10 min και είναι $\sim +35\%$ και για τους μύες 5, 7 και 8 στα ~ 35 min και είναι $\sim +24\%$.
- Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -24\%$ από τον χρόνο $t=0$.

Συμπεράσματα:

- Η χρήση του παλμικού ρεύματος οδήγησε σε έντονες μεταβολές στις τιμές γλυκόζης, ιδιαίτερα την 1η ώρα.
- Παρατηρούνται 2 υποσύνολα μυών, τα οποία αποκρίνονται αντίθετα στο ρεύμα και το διαλύτη. Το ένα υποσύνολο (5 μύες) ξεκινά με ανοδική πορεία στη γλυκόζη και στη συνέχεια πέφτει, ενώ το άλλο υποσύνολο (3 μύες) ξεκινά με μεγάλη πτώση στη γλυκόζη και έπειτα αυξάνεται.
- Το παλμικό ρεύμα εισάγει συγκεκριμένα ιόντα και όχι τυχαία και στη συγκεκριμένη περίπτωση εισήγαγε τα θετικά ιόντα του διαλύτη, καθώς ο διαλύτης βρισκόταν στον πόλο με (+) πρόσημο (άνοδος).
- Επειδή το ρεύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ON/OFF, δηλαδή δεν ήταν συνεχές, κατά την φάση του OFF, τα ιόντα που είχαν αποκτήσει κίνηση λόγω του ρεύματος, χάνουν την επιτάχυνσή τους με αποτέλεσμα αυτό να δημιουργεί έντονες αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης στα πρώτα 10 min εφαρμογής του ρεύματος αλλά και στρες στους μύες.

- Από το παραπάνω διάγραμμα δεν μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο διαλύτης ίσως έχει κάποια δράση στη μείωση της γλυκόζης καθώς στους μύες που μειώνεται γρήγορα η γλυκόζη, μετά τα 75 min αυξάνεται.
- Στις 3 ώρες η πτώση της γλυκόζης αγγίζει το ~-24% από την αρχική τιμή ($t=0$). Η πτώση αυτή δεν οφείλεται καθαρά στον διαλύτη, αλλά μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Επίσης σε αυτή την πτώση δεν έχουμε συμπεριλάβει και την ευαισθησία του μετρητή γλυκόζης στη μεταβολή τιμών ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015).
- Συγκριτικά με την Ομάδα B1, που χρησιμοποιήσαμε παλμικό ρεύμα + φάρμακο, η πτώση γλυκόζης από την αρχική τιμή εδώ είναι μικρότερη στις 3 ώρες (-24%) ενώ στην Ομάδα B1 ήταν -38%.

Ομάδα C2 (ρεύμα AC + διαλύτης)



Διάγραμμα 49 Ομάδα C2 (ρεύμα AC + διαλύτης)

Παρατηρήσεις:

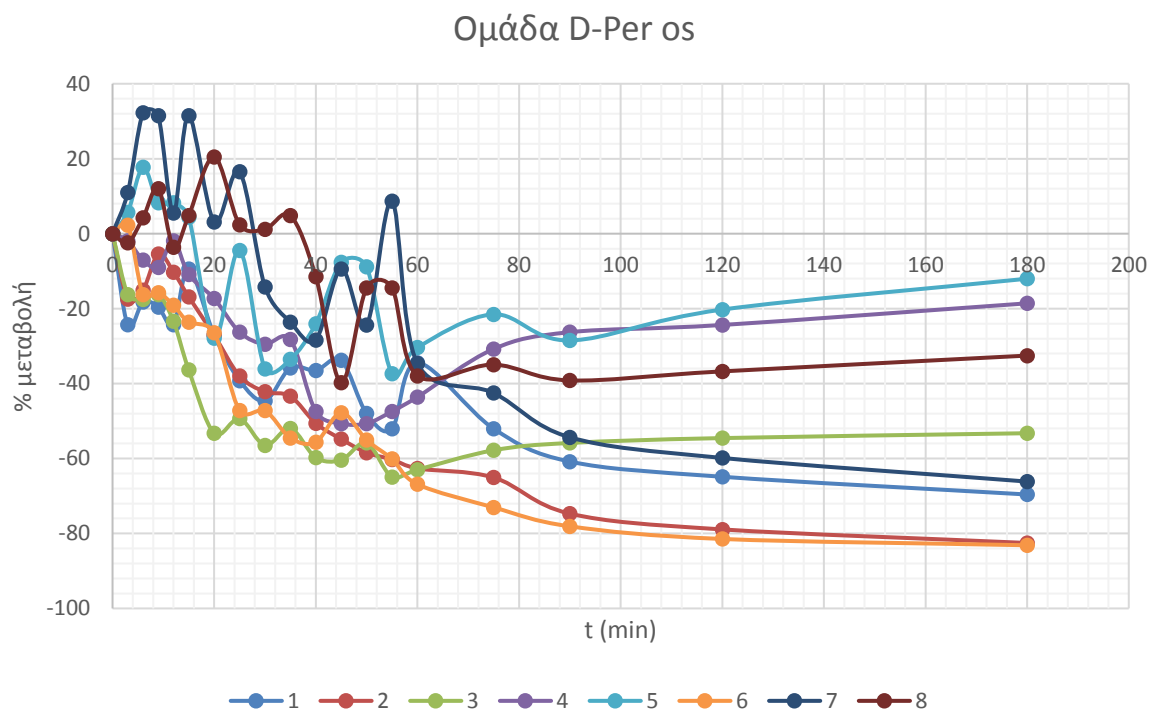
- Παρατηρούνται λιγότερο έντονες αυξομειώσεις στη γλυκόζη σε όλους τους μύες, συγκεκριμένα $\pm 20\%$ μεταβολή γλυκόζης, που μπορεί να οφείλεται στην εφαρμογή του εναλλασσόμενου ρεύματος τα πρώτα 10 min.
- Οι μύες της υποομάδας αυτής είναι ίδιοι με τους μύες της προηγούμενης υποομάδας C1, οπότε παρατηρούμε κάποιες ομοιότητες αλλά και διαφορές με την αλλαγή του ρεύματος από παλμικό σε εναλλασσόμενο.
- Εκτός από τους μύες 1 και 7, οι οποίοι παρουσίασαν πτωτική τάση στη γλυκόζη από τα πρώτα 10 min και μετά, οι υπόλοιποι μύες είχαν μια σταθερή εικόνα στις τιμές γλυκόζης τους μέχρι και τη 1η ώρα. Εξαιρέση αποτελεί ο μύς 2, ο οποίος παρουσίασε αρκετά ανοδική τάση το πρώτο 10λεπτο, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην 10λεπτη εφαρμογή ρεύματος. Ο ίδιος μύς στην εφαρμογή παλμικού ρεύματος είχε παρόμοια συμπεριφορά, έτσι φαίνεται ότι το ρεύμα του προκάλεσε στρες.
- Οι μύες 1 και 7 αντέδρασαν διαφορετικά στη χρήση παλμικού ρεύματος, καθώς είχαν μια ανοδική πορεία στη γλυκόζη τους στην αρχή του πειράματος, ενώ με τη χρήση εναλλασσόμενου ρεύματος, η γλυκόζη τους έπεσε από την αρχή.
- Στον χρόνο $t=180$ min, παρατηρούμε μείωση στη γλυκόζη από την αρχική τιμή, $\sim -31\%$ κατά μέσο όρο, μια πτώση που δεν περνά απαρατήρητη.

Συμπεράσματα:

- Το εναλλασσόμενο ρεύμα επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τους μύες, καθώς είδαμε στους ίδιους μύες διαφορετικές μεταβολές με την αλλαγή του ρεύματος από παλμικό σε εναλλασσόμενο.
- Το εναλλασσόμενο ρεύμα φαίνεται να μην προκαλεί στρες σε μεγάλο βαθμό στους μύες, καθώς οι μεταβολές στις τιμές γλυκόζης είναι λιγότερο έντονες, σε σχέση με το παλμικό ρεύμα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός, ότι το εναλλασσόμενο ρεύμα ωθεί τυχαία ιόντα σε αντίθεση με το παλμικό ρεύμα. Τα σχηματιζόμενα ιόντα δεν χάνουν την κίνησή τους, οπότε η δράση του διαλύτη είτε θετική είτε αρνητική είναι, μπορεί να παρατηρηθεί από τα πρώτα κιάλας 10 min. Με το εναλλασσόμενο ρεύμα δημιουργείται μια «αναταραχή», η οποία ήταν περισσότερο εμφανής στην υποομάδα B2 με το φάρμακο. Σε αυτή την ομάδα με τον διαλύτη, δεν φάνηκε τόσο

αυτή η «αναταραχή», ίσως επειδή τα σχηματιζόμενα ιόντα του διαλύτη να μην επηρέασαν τόσο αρνητικά την απόκριση των μυών.

- Από τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνεται η άποψη ότι η απόκριση στο φάρμακο είναι μια δράση χημικής προσέγγισης και όχι τόσο ηλεκτρονικής.
- Η πτώση στις 3 ώρες που αγγίζει το $\sim -31\%$ δεν μπορεί να δικαιολογηθεί, αλλά ούτε μπορούμε να εξάγουμε ασφαλές συμπέρασμα για τη δράση του διαλύτη στις τιμές γλυκόζης. Σίγουρα όμως, η πτώση αυτή δεν οφείλεται καθαρά στον διαλύτη, αλλά μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Επίσης σε αυτή την πτώση δεν έχουμε συμπεριλάβει και την ευαισθησία του μετρητή γλυκόζης στη μεταβολή τιμών ($\pm 15\%$)(Χαλβασιώτης, 2015).



Διάγραμμα 50 Ομάδα D-Per os

Παρατηρήσεις:

- Όλοι οι μύες παρουσιάζουν πτωτική τάση στη γλυκόζη και φαίνεται ότι υπάρχει μια ομοιογένεια ως προς την απόκρισή τους στο φάρμακο.
- Η πτώση της γλυκόζης ξεκινάει στους περισσότερους μύες μέσα σε 10 min, ενώ σε κάποιους άλλους καθυστερεί και ξεκινά περίπου σε 20 min.

- Στους μύες 3, 4, 5 και 8 η πτώση στη γλυκόζη σταματά περίπου στη 1 ώρα. Στους υπόλοιπους μύες, 1, 2, 6 και 7 η πτώση στη γλυκόζη συνεχίζει μέχρι και το τέλος του πειράματος.
- Οι μύες 1, 2, 6 και 7 είχαν σοβαρή υπογλυκαιμία, κάτι που δείχνει ότι παρόλο που ήταν φυσιολογικοί μύες και όχι διαβητικοί, οι αντιρροπιστικοί τους μηχανισμοί δεν μπορούσαν να αποτρέψουν τη σοβαρή υπογλυκαιμία.
- Οι μύες 3, 4, 5 και 8 φαίνεται ότι κατάφεραν να εξισορροπήσουν την κατάσταση υπογλυκαιμίας, απελευθερώνοντας πιθανώς την αποθηκευμένη γλυκόζη από το ήπαρ.

Συμπέρασμα:

- Όλοι οι μύες ανταποκρίθηκαν στο φάρμακο, καθώς μειώθηκε αποτελεσματικά η γλυκόζη τους.
- Η πτώση στη γλυκόζη γίνεται άμεσα, εντός 10 min σε κάποια, και εντός 20 min σε κάποια άλλα πειραματόζωα. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο.
- Δεν υπάρχουν τόσο έντονες μεταβολές στις τιμές γλυκόζης, κάτι που συνέβαινε με την εφαρμογή ρεύματος αλλά και του φαρμάκου διαδερμικά.
- Σε κάποιους μύες λειτούργησαν οι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί για να ανακτήσουν τη γλυκόζη τους στα φυσιολογικά επίπεδα και φαίνεται ότι είχαν ικανότητα προσαρμογής στην υπογλυκαιμία. Αντίθετα, σε κάποιους άλλους μύες δε λειτούργησαν, με αποτέλεσμα να υποστούν σοβαρή υπογλυκαιμία.
- Στις 3 ώρες, η μείωση στη γλυκόζη αγγίζει το ~-52% κατά μέσο όρο.
- Η ρεπαγλινίδα έχει χρόνο ημίσειας ζωής ~60 min, κάτι που σημαίνει ότι η δράση της είναι βραχεία και αποβάλλεται γρήγορα από τον οργανισμό. Αυτό διαπιστώθηκε και από το παραπάνω διάγραμμα, καθώς η δράση της στους μισούς μύες ολοκληρώθηκε στη 1 ώρα. Στους μύες που συνέχισε η δράση του φαρμάκου και μετά τη 1 ώρα, φαίνεται από το διάγραμμα ότι οι μεταβολές στη γλυκόζη τους είχαν οριζοντιωθεί από τη 2η ώρα μέχρι και το τέλος του πειράματος.

7.8.2.2 Ανάλυση μέσου όρου κάθε ομάδας

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται ο μέσος όρος ($n=8$, εκτός από τη B3 όπου $n=4$) της ποσοστιαίας μεταβολής της γλυκόζης $(G(t)-G(0))/(G(0))$ % από την αρχική τιμή ($t=0$) με την τυπική απόκλιση, για κάθε ομάδα. Έχουμε ορίσει ότι $t=0$

είναι η χρονική στιγμή που οι μύες βρίσκονται σε ηρεμία πριν ξεκινήσει η διαδικασία της χρονομέτρησης και της παρακολούθησης της γλυκόζης τους.

Αρχικά, θα μελετήσουμε κάθε ομάδα ως προς τη σημαντικότητα των μεταβολών στις τιμές γλυκόζης σε κάθε χρονική στιγμή, αξιολογώντας αυτές με στατιστική ανάλυση ($p < 0,05$). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στις ομάδες με κανονική κατανομή για την εύρεση στατιστικά σημαντικών τιμών σε σχέση με τον χρόνο σε κάθε υποομάδα ήταν η Two-way ANOVA. Η αντίστοιχη μέθοδος που εφαρμόστηκε για τις ομάδες με μη κανονική κατανομή ήταν η Nonparametric Two-way ANOVA by ranks. Επίσης έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις (post-hoc) με την μέθοδο Uncorrected Fisher's LSD. Το όριο για τη σημαντικότητα σε όλες τις δοκιμές ήταν $p = 0,05$.

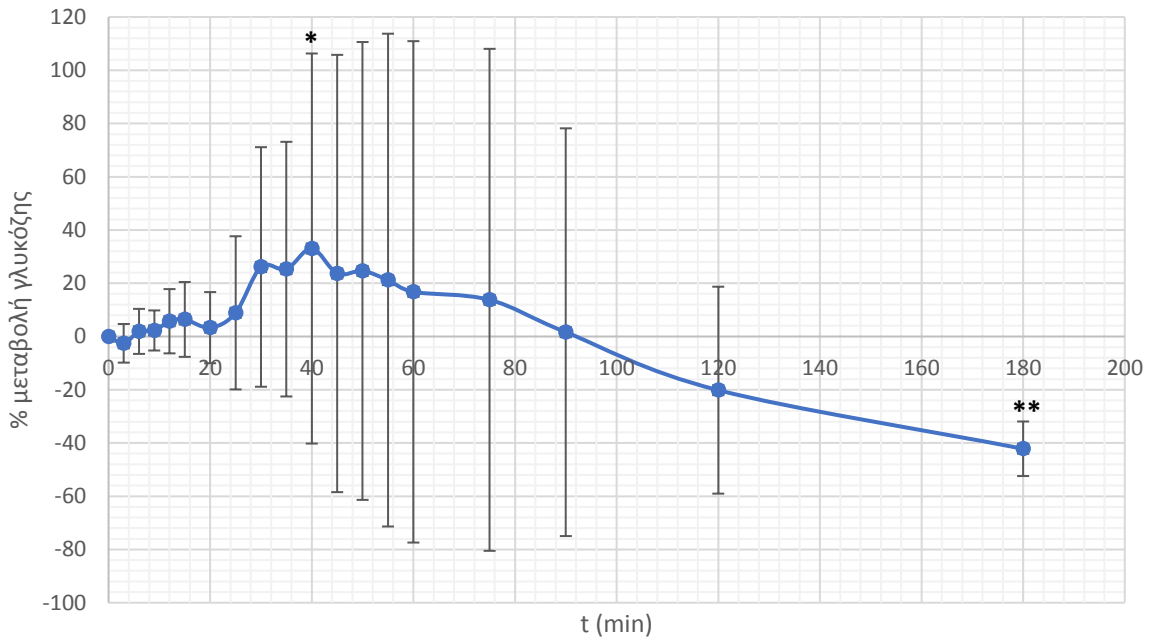
Ομάδα A1-Φάρμακο

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	ΦΑΡΜΑΚΟ (A1)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	-2,56	7,25	8
6	1,92	8,46	8
9	2,27	7,53	8
12	5,73	12,07	8
15	6,41	14,05	8
20	3,32	13,36	8
25	8,89	28,76	8
30	26,12	44,99	8
35	25,30	47,82	8
40	33,04	73,26	8
45	23,66	82,13	8
50	24,62	85,99	8
55	21,19	92,55	8
60	16,77	94,17	8
75	13,77	94,28	8
90	1,62	76,58	8
120	-20,16	38,86	8
180	-42,17	10,25	8

Test for normal distribution	ΦΑΡΜΑΚΟ (A1)
Shapiro-Wilk test	
W	0,8964
P value	0,0418
Passed normality test (alpha=0.05)?	No
P value summary	*
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	ΦΑΡΜΑΚΟ (A1)
Number of values	19
Minimum	83,25
Maximum	189,6
Range	106,4
Mean	155
Std. Deviation	25,76
Std. Error of Mean	5,909
Lower 95% CI of mean	142,6
Upper 95% CI of mean	167,4
Coefficient of variation	16,62%

Μέσος όρος Ομάδα Α1-Φάρμακο



Διάγραμμα 51 Μέσος όρος Ομάδα Α1-Φάρμακο [t: 0->180, p<0,01 **, t:0->40, p<0,05 *]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα Α1 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 39 Ομάδα Α1: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
ΦΑΡΜΑΚΟ (Α1)			
0 vs. 40	Yes	*	0,029
0 vs. 180	Yes	**	0,0056
3 vs. 40	Yes	*	0,0188
3 vs. 180	Yes	**	0,0092
6 vs. 40	Yes	*	0,0396
6 vs. 180	Yes	**	0,0038
9 vs. 40	Yes	*	0,0418
9 vs. 180	Yes	**	0,0036
12 vs. 180	Yes	**	0,0017
15 vs. 180	Yes	**	0,0015
20 vs. 40	Yes	*	0,0492
20 vs. 180	Yes	**	0,0029
25 vs. 180	Yes	***	0,0009
30 vs. 120	Yes	**	0,0024
30 vs. 180	Yes	****	<0,0001
35 vs. 120	Yes	**	0,0029
35 vs. 180	Yes	****	<0,0001
40 vs. 90	Yes	*	0,0377

40 vs. 120	Yes	***	0,0005
40 vs. 180	Yes	****	<0,0001
45 vs. 120	Yes	**	0,004
45 vs. 180	Yes	****	<0,0001
50 vs. 120	Yes	**	0,0033
50 vs. 180	Yes	****	<0,0001
55 vs. 120	Yes	**	0,0066
55 vs. 180	Yes	****	<0,0001
60 vs. 120	Yes	*	0,0149
60 vs. 180	Yes	***	0,0001
75 vs. 120	Yes	*	0,0251
75 vs. 180	Yes	***	0,0003
90 vs. 180	Yes	**	0,0041

Παρατηρήσεις:

- Η % μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο t=0 στο χρόνο t=180 min, είναι ~-42% και είναι στατιστικά πολύ σημαντική (p<0,01). Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη μειώθηκε ικανοποιητικά.
- Η % μεταβολή γλυκόζης από t=0 σε t=40 min είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05). Ωστόσο, κοιτώντας το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι η μεταβολή της γλυκόζης από την αρχική τιμή είναι +33% και είναι η μέγιστη τιμή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 ώρες). Άρα εδώ η σημαντικότητα αφορά την αύξηση στην τιμή γλυκόζης στον χρόνο t=40 min. Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Το αποτέλεσμα αυτό έχει αναλυθεί εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα (σελ. 183).
- Από τον παραπάνω Πίνακα συμπεραίνουμε ότι η μεταβολή γλυκόζης από κάθε χρόνο στο χρόνο t=180 min είναι στατιστικά πολύ σημαντική (p<0,01, **) ή πάρα πολύ σημαντική (p<0,001, ***) και σε κάποιες περιπτώσεις εξαιρετικά σημαντική (p<0,0001, ****).

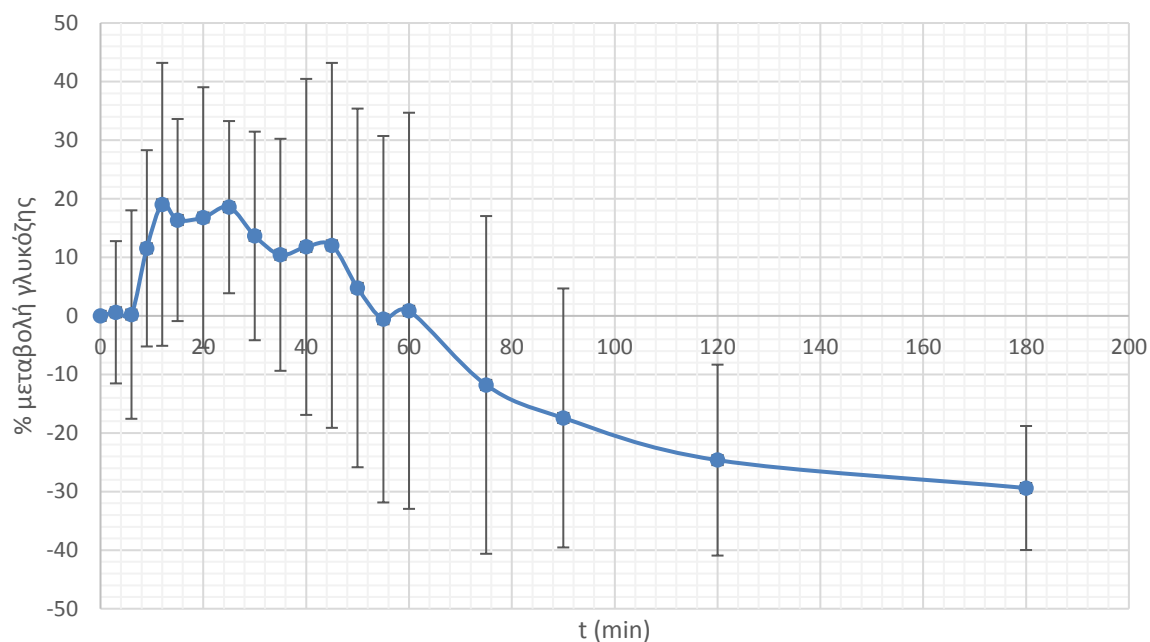
Ομάδα Α2-Διαλύτης

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	ΔΙΑΛΥΤΗΣ (Α2)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	0,61	12,15	8
6	0,23	17,80	8
9	11,53	16,76	8
12	19,04	24,15	8
15	16,36	17,25	8
20	16,80	22,24	8
25	18,56	14,70	8
30	13,65	17,81	8
35	10,42	19,81	8
40	11,78	28,68	8
45	12,04	31,15	8
50	4,77	30,61	8
55	-0,57	31,28	8
60	0,87	33,81	8
75	-11,79	28,83	8
90	-17,43	22,11	8
120	-24,63	16,30	8
180	-29,39	10,59	8

Test for normal distribution	ΔΙΑΛΥΤΗΣ (Α2)
Shapiro-Wilk test	
W	0,8887
P value	0,0306
Passed normality test (alpha=0.05)?	No
P value summary	*
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	ΔΙΑΛΥΤΗΣ (Α2)
Number of values	19
Minimum	97,88
Maximum	166,1
Range	68,25
Mean	143
Std. Deviation	20,72
Std. Error of Mean	4,754
Lower 95% CI of mean	133
Upper 95% CI of mean	153
Coefficient of variation	14,49%

Μέσος όρος Ομάδα Α2-Διαλύτης



Διάγραμμα 52 Μέσος όρος Ομάδα Α2-Διαλύτης

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα Α2 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 40 Ομάδα Α2: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
ΔΙΑΛΥΤΗΣ (Α2)			
3 vs. 180	Yes	*	0,0471
6 vs. 180	Yes	*	0,05
9 vs. 120	Yes	*	0,0171
9 vs. 180	Yes	**	0,0071
12 vs. 75	Yes	*	0,0414
12 vs. 90	Yes	*	0,0162
12 vs. 120	Yes	**	0,0042
12 vs. 180	Yes	**	0,0015
15 vs. 90	Yes	*	0,0257
15 vs. 120	Yes	**	0,0071
15 vs. 180	Yes	**	0,0027
20 vs. 90	Yes	*	0,0239
20 vs. 120	Yes	**	0,0065
20 vs. 180	Yes	**	0,0025
25 vs. 75	Yes	*	0,0446
25 vs. 90	Yes	*	0,0176
25 vs. 120	Yes	**	0,0046
25 vs. 180	Yes	**	0,0017

30 vs. 90	Yes	*	0,0399
30 vs. 120	Yes	*	0,0117
30 vs. 180	Yes	**	0,0047
35 vs. 120	Yes	*	0,0207
35 vs. 180	Yes	**	0,0088
40 vs. 120	Yes	*	0,0164
40 vs. 180	Yes	**	0,0068
45 vs. 120	Yes	*	0,0157
45 vs. 180	Yes	**	0,0065
50 vs. 180	Yes	*	0,0241
60 vs. 180	Yes	*	0,0453

Παρατηρήσεις:

- Δεν έχουμε στατιστικά σημαντική μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο t=0.
- Οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p < 0,05$, * και $p < 0,01$, **) υπάρχουν στους χρόνους t= 75, 90, 120 και 180 min, αλλά όχι σημαντικές από τον χρόνο t=0.
- Η % μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή (t=0) στην τελική (t=180) είναι ~-29% αλλά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

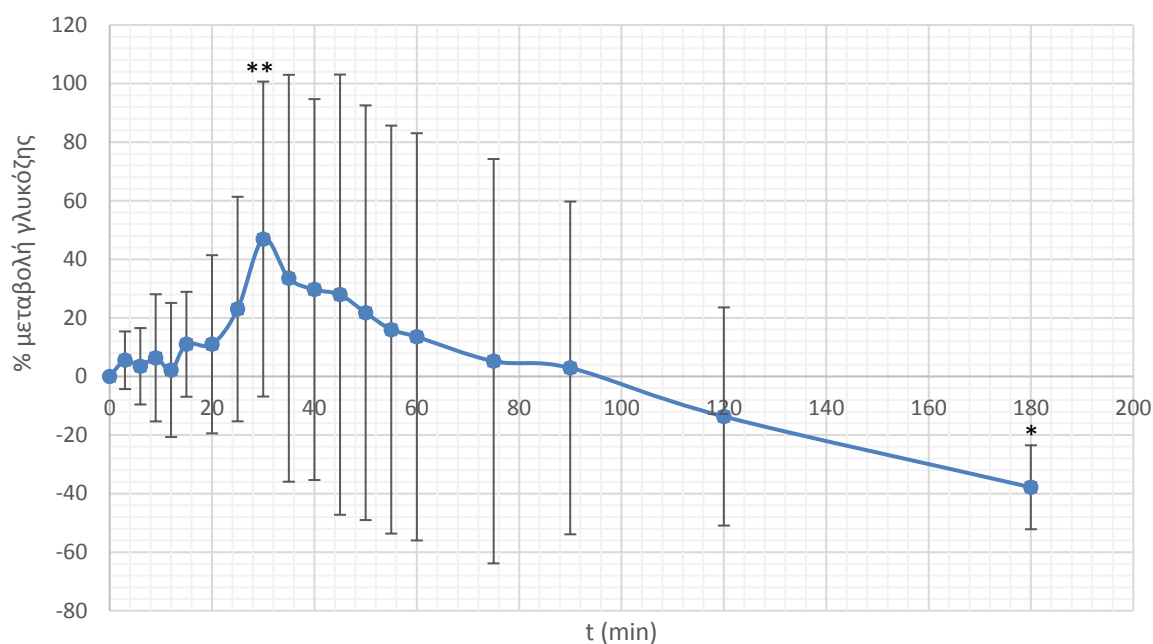
Ομάδα B1- Ρεύμα DC ON/OFF + Φάρμακο

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	5,53	9,84	8
6	3,47	13,06	8
9	6,36	21,71	8
12	2,21	22,90	8
15	10,98	17,92	8
20	10,98	30,42	8
25	23,01	38,34	8
30	46,91	53,78	8
35	33,52	69,47	8
40	29,67	65,03	8
45	27,92	75,16	8
50	21,76	70,80	8
55	16,00	69,65	8
60	13,53	69,53	8
75	5,21	69,04	8
90	2,91	56,82	8
120	-13,68	37,25	8
180	-37,84	14,34	8

Test for normal distribution	PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)
Shapiro-Wilk test	
W	0,9391
P value	0,2545
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)
Number of values	19
Minimum	84,5
Maximum	199,3
Range	114,8
Mean	150,4
Std. Deviation	24,81
Std. Error of Mean	5,691
Lower 95% CI of mean	138,5
Upper 95% CI of mean	162,4
Coefficient of variation	16,49%

Μέσος όρος Ομάδα B1-Ρεύμα DC ON/OFF + Φάρμακο



Διάγραμμα 53 Μέσος όρος Ομάδα B1-Ρεύμα DC ON/OFF pulsed + Φάρμακο [t: 0->30, p<0,01 **, t:0->180, p<0,05 *]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα B1 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 41 Ομάδα B1: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)			
0 vs. 30	Yes	**	0,0095
0 vs. 180	Yes	*	0,0355
3 vs. 30	Yes	*	0,0217
3 vs. 180	Yes	*	0,0162
6 vs. 30	Yes	*	0,0161
6 vs. 180	Yes	*	0,0219
9 vs. 30	Yes	*	0,0244
9 vs. 180	Yes	*	0,0143
12 vs. 30	Yes	*	0,0133
12 vs. 180	Yes	*	0,0262
15 vs. 30	Yes	*	0,0456
15 vs. 180	Yes	**	0,007
20 vs. 30	Yes	*	0,0457
20 vs. 180	Yes	**	0,007
25 vs. 120	Yes	*	0,0414
25 vs. 180	Yes	***	0,0008
30 vs. 75	Yes	*	0,0207
30 vs. 90	Yes	*	0,0148
30 vs. 120	Yes	***	0,0009

30 vs. 180	Yes	****	<0,0001
35 vs. 120	Yes	**	0,009
35 vs. 180	Yes	***	0,0001
40 vs. 120	Yes	*	0,0163
40 vs. 180	Yes	***	0,0002
45 vs. 120	Yes	*	0,021
45 vs. 180	Yes	***	0,0003
50 vs. 120	Yes	*	0,0487
50 vs. 180	Yes	**	0,0011
55 vs. 180	Yes	**	0,003
60 vs. 180	Yes	**	0,0046
75 vs. 180	Yes	*	0,017
90 vs. 180	Yes	*	0,0237

Παρατηρήσεις:

- Η % μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο t=0 στο χρόνο t=180 min, είναι ~-38% και είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05, *). Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη μειώθηκε ικανοποιητικά.
- Η % μεταβολή γλυκόζης από t=0 σε t=30 min είναι στατιστικά πολύ σημαντική (p<0,01, **). Ωστόσο, κοιτώντας το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι η μεταβολή της γλυκόζης από την αρχική τιμή είναι ~+47% και είναι η μέγιστη τιμή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 ώρες). Άρα εδώ η σημαντικότητα αφορά την αύξηση στην τιμή γλυκόζης στον χρόνο t=30 min. Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Το αποτέλεσμα αυτό έχει αναλυθεί εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα (σελ.183).
- Από τον παραπάνω Πίνακα συμπεραίνουμε ότι η μεταβολή γλυκόζης από κάθε χρόνο στο χρόνο t=180 min είναι στατιστικά σημαντική (p<0,05, *) ή πολύ σημαντική (p<0,01, **) και σε κάποιες περιπτώσεις πάρα πολύ σημαντική (p<0,001, ***) και εξαιρετικά σημαντική στο t:30->180 min (p<0,0001, ****).

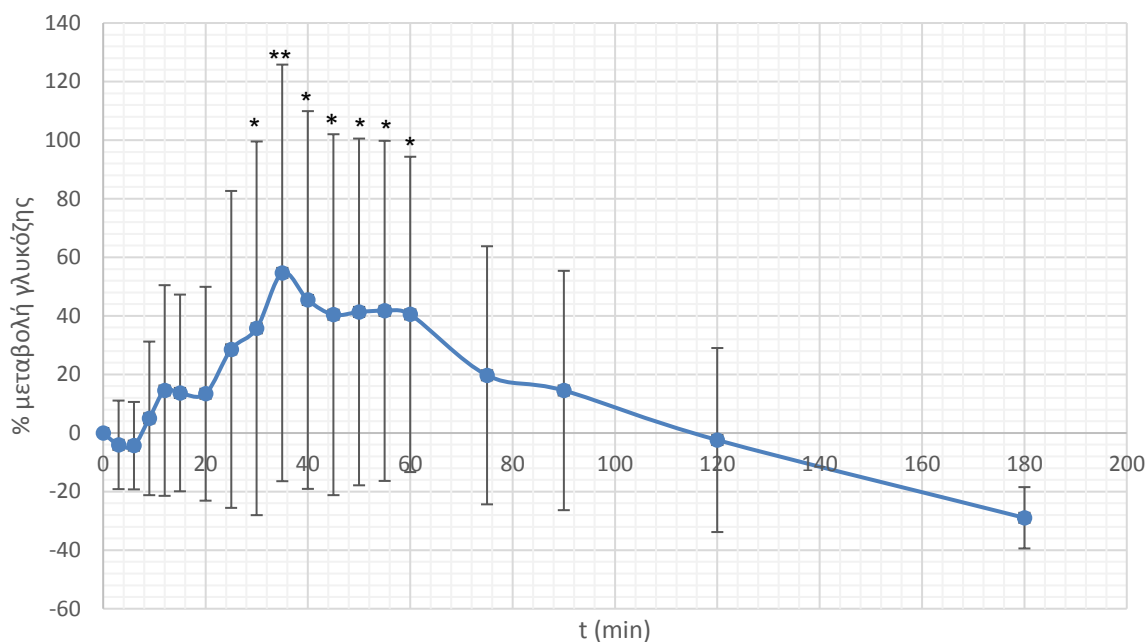
Ομάδα B2- Ρεύμα AC(±) + Φάρμακο

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	-4,04	15,12	8
6	-4,32	14,93	8
9	5,00	26,22	8
12	14,52	35,97	8
15	13,68	33,58	8
20	13,41	36,51	8
25	28,54	54,11	8
30	35,75	63,80	8
35	54,67	71,12	8
40	45,42	64,49	8
45	40,40	61,62	8
50	41,35	59,20	8
55	41,71	58,07	8
60	40,50	53,84	8
75	19,71	44,07	8
90	14,52	40,87	8
120	-2,40	31,42	8
180	-28,95	10,47	8

Test for normal distribution	ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)
Shapiro-Wilk test	
W	0,9527
P value	0,4381
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)
Number of values	19
Minimum	95,63
Maximum	200,1
Range	104,5
Mean	156,5
Std. Deviation	27,57
Std. Error of Mean	6,324
Lower 95% CI of mean	143,2
Upper 95% CI of mean	169,8
Coefficient of variation	17,61%

Μέσος όρος Ομάδα Β2- Ρεύμα AC + Φάρμακο



Διάγραμμα 54 Μέσος όρος Ομάδα Β2- Ρεύμα AC + Φάρμακο [t: 0->30, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,05 *, t:0->35, p<0,01 **]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα Β2 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 42 Ομάδα Β2: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)			
0 vs. 30	Yes	*	0,0467
0 vs. 35	Yes	**	0,0026
0 vs. 40	Yes	*	0,0119
0 vs. 45	Yes	*	0,0249
0 vs. 50	Yes	*	0,0218
0 vs. 55	Yes	*	0,0207
0 vs. 60	Yes	*	0,0246
3 vs. 30	Yes	*	0,0271
3 vs. 35	Yes	**	0,0013
3 vs. 40	Yes	**	0,0063
3 vs. 45	Yes	*	0,0138
3 vs. 50	Yes	*	0,012
3 vs. 55	Yes	*	0,0113
3 vs. 60	Yes	*	0,0136
6 vs. 30	Yes	*	0,0261
6 vs. 35	Yes	**	0,0012
6 vs. 40	Yes	**	0,006
6 vs. 45	Yes	*	0,0133
6 vs. 50	Yes	*	0,0115

6 vs. 55	Yes	*	0,0109
6 vs. 60	Yes	*	0,0131
9 vs. 35	Yes	**	0,0061
9 vs. 40	Yes	*	0,0249
9 vs. 45	Yes	*	0,0489
9 vs. 50	Yes	*	0,0432
9 vs. 55	Yes	*	0,0412
9 vs. 60	Yes	*	0,0482
12 vs. 35	Yes	*	0,0258
12 vs. 180	Yes	*	0,016
15 vs. 35	Yes	*	0,0229
15 vs. 180	Yes	*	0,0181
20 vs. 35	Yes	*	0,0221
20 vs. 180	Yes	*	0,0188
25 vs. 180	Yes	**	0,0016
30 vs. 120	Yes	*	0,034
30 vs. 180	Yes	***	0,0004
35 vs. 90	Yes	*	0,0258
35 vs. 120	Yes	**	0,0017
35 vs. 180	Yes	****	<0,0001
40 vs. 120	Yes	**	0,0082
40 vs. 180	Yes	****	<0,0001
45 vs. 120	Yes	*	0,0177
45 vs. 180	Yes	***	0,0002
50 vs. 120	Yes	*	0,0154
50 vs. 180	Yes	***	0,0001
55 vs. 120	Yes	*	0,0146
55 vs. 180	Yes	***	0,0001
60 vs. 120	Yes	*	0,0174
60 vs. 180	Yes	***	0,0002
75 vs. 180	Yes	**	0,0072
90 vs. 180	Yes	*	0,016

Παρατηρήσεις:

- Η % μεταβολή γλυκόζης από t=0 σε t=30, 40, 45, 50, 55 και 60 min είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$ *) και από t: 0->35 min είναι πολύ σημαντική ($p < 0,01$ **). Ωστόσο, κοιτώντας το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι η μεταβολή της γλυκόζης από την αρχική τιμή στους προαναφερθέντες χρόνους έχει θετική τιμή, κάτι που σημαίνει ότι οι τιμές γλυκόζης αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου. Άρα εδώ η σημαντικότητα αφορά την αύξηση στην τιμή γλυκόζης στους χρόνους αυτούς. Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της

ρεπαγλινίδης. Το αποτέλεσμα αυτό έχει αναλυθεί εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα (σελ.183).

- Στατιστική σημαντικότητα για τη μείωση της γλυκόζης στις 3 ώρες έχουμε από τα 12 min, όπου $p < 0,05$ (*) και εξαιρετική σημαντικότητα έχουμε στη μεταβολή t: 35- >180 min όπου $p < 0,0001$ (****).

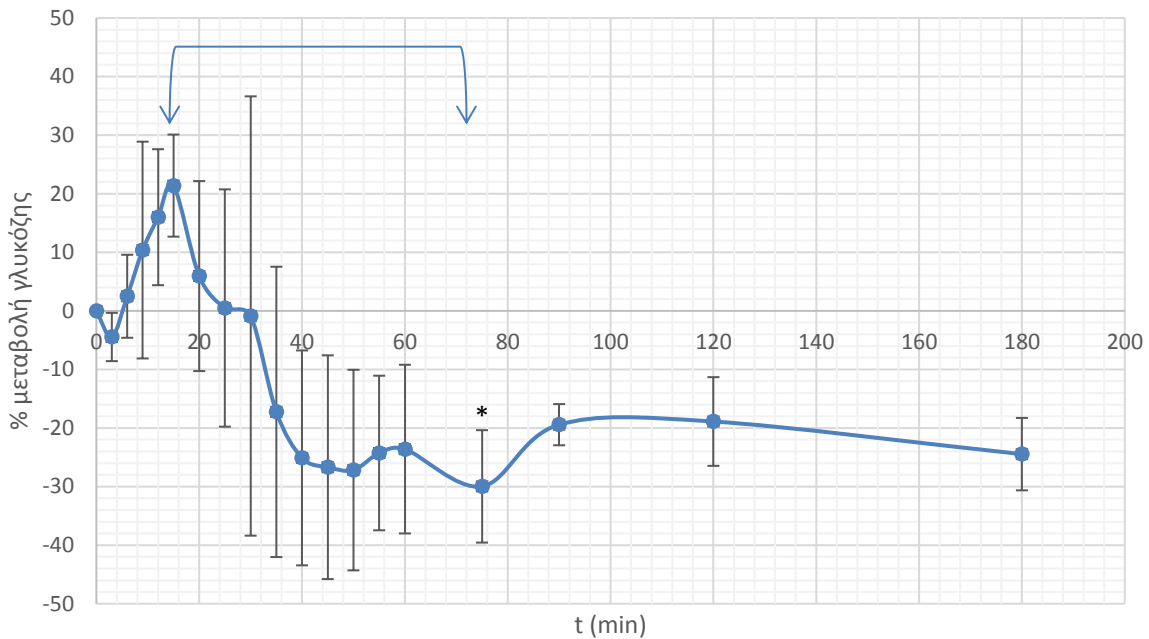
Ομάδα B3- Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Φάρμακο

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	4
3	-4,46	4,12	4
6	2,49	7,08	4
9	10,38	18,50	4
12	15,99	11,61	4
15	21,39	8,72	4
20	5,94	16,22	4
25	0,48	20,26	4
30	-0,88	37,51	4
35	-17,25	24,79	4
40	-25,10	18,35	4
45	-26,69	19,10	4
50	-27,18	17,12	4
55	-24,27	13,20	4
60	-23,60	14,40	4
75	-29,97	9,60	4
90	-19,43	3,52	4
120	-18,89	7,57	4
180	-24,46	6,18	4

Test for normal distribution	PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)
Shapiro-Wilk test	
W	0,9001
P value	0,0488
Passed normality test (alpha=0.05)?	No
P value summary	*
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)
Number of values	19
Minimum	93,25
Maximum	163,3
Range	70
Mean	120,5
Std. Deviation	22,43
Std. Error of Mean	5,145
Lower 95% CI of mean	109,7
Upper 95% CI of mean	131,3
Coefficient of variation	18,61%

Μέσος όρος Ομάδα Β3-Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Φάρμακο



Διάγραμμα 55 Μέσος όρος Ομάδα Β3-Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Φάρμακο [t: 15->75, p<0,05 *]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα Β3 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 43 Ομάδα Β3: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)			
15 vs. 75	Yes	*	0,0471

Παρατηρήσεις:

- Δεν έχουμε στατιστικά σημαντική μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο t=0.
- Η μόνη στατιστικά σημαντική μεταβολή (p<0,05, *) υπάρχει στο χρόνο t= 75min, και είναι σημαντική η μείωση γλυκόζης από το χρόνο t=15min.
- Η % μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή (t=0) στην τελική (t=180) είναι ~-24% αλλά δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

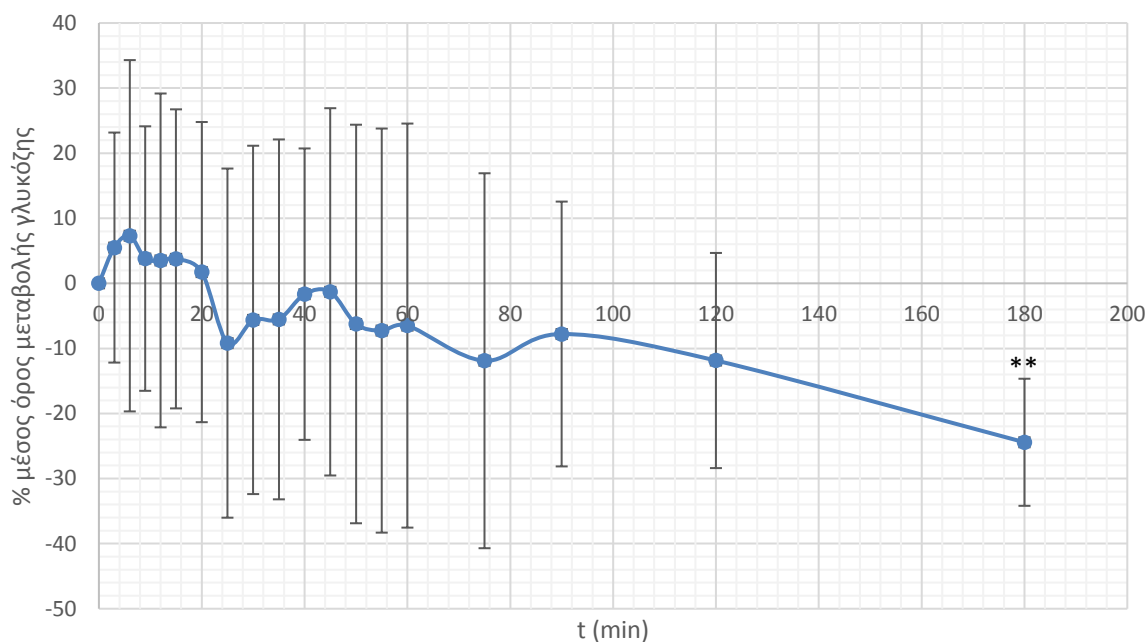
Ομάδα C1-Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	5,50	17,67	8
6	7,31	26,99	8
9	3,81	20,32	8
12	3,52	25,65	8
15	3,76	22,98	8
20	1,73	23,06	8
25	-9,19	26,83	8
30	-5,62	26,76	8
35	-5,54	27,65	8
40	-1,66	22,39	8
45	-1,31	28,22	8
50	-6,25	30,62	8
55	-7,26	31,05	8
60	-6,49	31,04	8
75	-11,89	28,81	8
90	-7,79	20,35	8
120	-11,86	16,53	8
180	-24,42	9,76	8

Test for normal distribution	PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)
Shapiro-Wilk test	
W	0,9281
P value	0,1598
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)
Number of values	19
Minimum	111,6
Maximum	158,1
Range	46,5
Mean	142
Std. Deviation	11,07
Std. Error of Mean	2,54
Lower 95% CI of mean	136,7
Upper 95% CI of mean	147,4
Coefficient of variation	7,79%

Μέσος όρος Ομάδα C1-Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης



Διάγραμμα 56 Μέσος όρος Ομάδα C1-Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Διαλύτης [t: 0->180, p<0,01 **]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα C1 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 44 Ομάδα C1: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Διαλύτης (C1)			
0 vs. 180	Yes	**	0,0022
3 vs. 75	Yes	*	0,0281
3 vs. 120	Yes	*	0,0284
3 vs. 180	Yes	***	0,0002
6 vs. 25	Yes	*	0,037
6 vs. 75	Yes	*	0,0155
6 vs. 120	Yes	*	0,0157
6 vs. 180	Yes	****	<0,0001
9 vs. 75	Yes	*	0,047
9 vs. 120	Yes	*	0,0474
9 vs. 180	Yes	***	0,0004
12 vs. 180	Yes	***	0,0005
15 vs. 75	Yes	*	0,0477
15 vs. 120	Yes	*	0,0481
15 vs. 180	Yes	***	0,0005
20 vs. 180	Yes	**	0,0011
30 vs. 180	Yes	*	0,0178
35 vs. 180	Yes	*	0,0173
40 vs. 180	Yes	**	0,0043
45 vs. 180	Yes	**	0,0038

50 vs. 180	Yes	*	0,0218
55 vs. 180	Yes	*	0,0302
60 vs. 180	Yes	*	0,0237
90 vs. 180	Yes	*	0,0355

Παρατηρήσεις:

- Υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά ($p < 0,01$ **) στην % μεταβολή γλυκόζης $t=0 \rightarrow 180$ min και εξαιρετική στατιστική διαφορά ($p < 0,0001$ ****) στην % μείωση γλυκόζης στο $t=6 \rightarrow 180$ min.
- Στις 3 ώρες η πτώση στη γλυκόζη αγγίζει το ~-24% από την αρχική τιμή ($t=0$). Η πτώση αυτή δεν οφείλεται καθαρά στον διαλύτη, αλλά μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Επίσης σε αυτή την πτώση δεν έχουμε συμπεριλάβει και την ευαισθησία του μετρητή γλυκόζης στη μεταβολή τιμών ($\pm 15\%$) (ΧΑΛΒΑΤΣΙΩΤΗΣ, 2015).

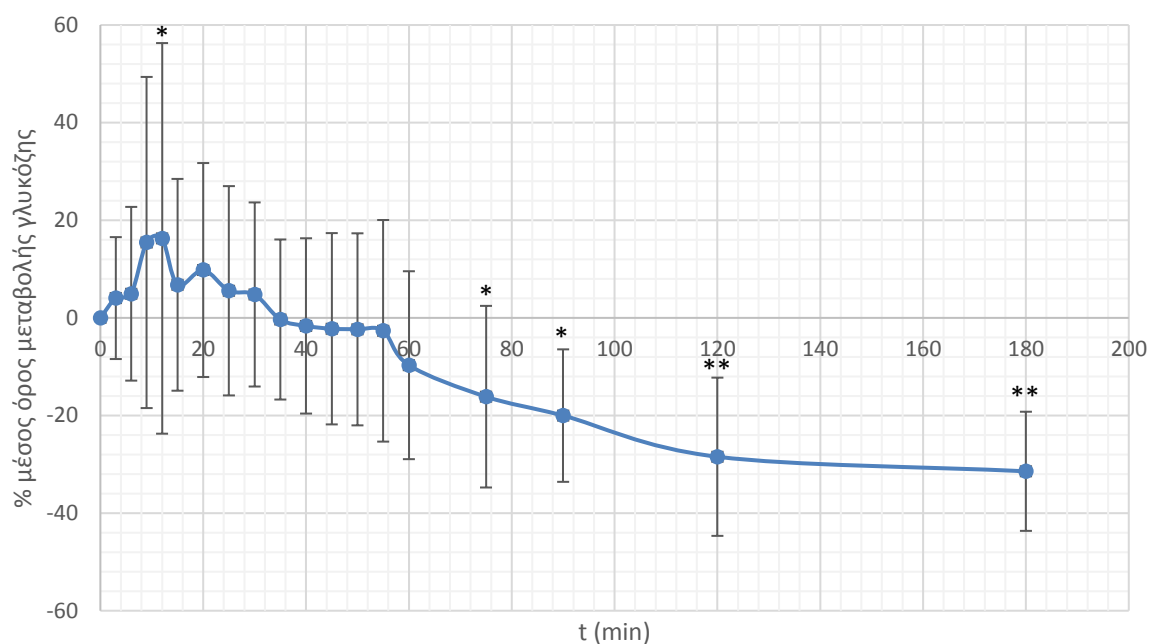
Ομάδα C2-Ρεύμα AC(±) +Διαλύτης

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0*			
t (min)	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	4,05	12,49	8
6	4,94	17,80	*8
9	15,44	33,92	8
12	16,29	40,01	8
15	6,77	21,69	8
20	9,80	21,92	8
25	5,55	21,44	8
30	4,79	18,86	8
35	-0,34	16,40	8
40	-1,65	17,96	8
45	-2,23	19,60	8
50	-2,35	19,67	8
55	-2,65	22,70	8
60	-9,70	19,25	8
75	-16,15	18,61	8
90	-20,02	13,57	8
120	-28,45	16,21	8
180	-31,43	12,20	8

Test for normal distribution	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
Shapiro-Wilk test	
W	0,9136
P value	0,0863
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes
P value summary	ns
Number of values	** 19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
Number of values	19
Minimum	91,88
Maximum	156,8
Range	64,88
Mean	131,4
Std. Deviation	18,16
Std. Error of Mean	4,166
Lower 95% CI of mean	122,6
Upper 95% CI of mean	140,1
Coefficient of variation	13,82%

Μέσος όρος Ομάδα C2-Ρεύμα AC + Διαλύτης



Διάγραμμα 57 Μέσος όρος Ομάδα C2-Ρεύμα AC + Διαλύτης [t: 0->120, 180, p<0,01 **, t: 0->12, 75, 90, p<0,05 *]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα C2 είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 45 Ομάδα C2: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
Ρεύμα AC + Διαλύτης (C2)			
0 vs. 12	Yes	*	0,0395
0 vs. 75	Yes	*	0,0412
0 vs. 90	Yes	*	0,0117
0 vs. 120	Yes	***	0,0004
0 vs. 180	Yes	***	0,0001
3 vs. 75	Yes	*	0,011
3 vs. 90	Yes	**	0,0026
3 vs. 120	Yes	****	<0,0001
3 vs. 180	Yes	****	<0,0001
6 vs. 75	Yes	**	0,008
6 vs. 90	Yes	**	0,0018
6 vs. 120	Yes	****	<0,0001
6 vs. 180	Yes	****	<0,0001
9 vs. 35	Yes	*	0,0459
9 vs. 40	Yes	*	0,0308
9 vs. 45	Yes	*	0,0257
9 vs. 50	Yes	*	0,0247
9 vs. 55	Yes	*	0,0224
9 vs. 60	Yes	**	0,0017
9 vs. 75	Yes	****	<0,0001
9 vs. 90	Yes	****	<0,0001
9 vs. 120	Yes	****	<0,0001

9 vs. 180	Yes	****	<0,0001
12 vs. 35	Yes	*	0,0356
12 vs. 40	Yes	*	0,0236
12 vs. 45	Yes	*	0,0195
12 vs. 50	Yes	*	0,0188
12 vs. 55	Yes	*	0,017
12 vs. 60	Yes	**	0,0012
12 vs. 75	Yes	****	<0,0001
12 vs. 90	Yes	****	<0,0001
12 vs. 120	Yes	****	<0,0001
12 vs. 180	Yes	****	<0,0001
15 vs. 60	Yes	*	0,0373
15 vs. 75	Yes	**	0,004
15 vs. 90	Yes	***	0,0008
15 vs. 120	Yes	****	<0,0001
15 vs. 180	Yes	****	<0,0001
20 vs. 60	Yes	*	0,014
20 vs. 75	Yes	**	0,0012
20 vs. 90	Yes	***	0,0002
20 vs. 120	Yes	****	<0,0001
20 vs. 180	Yes	****	<0,0001
25 vs. 75	Yes	**	0,0064
25 vs. 90	Yes	**	0,0014
25 vs. 120	Yes	****	<0,0001
25 vs. 180	Yes	****	<0,0001
30 vs. 75	Yes	**	0,0085
30 vs. 90	Yes	**	0,0019
30 vs. 120	Yes	****	<0,0001
30 vs. 180	Yes	****	<0,0001
35 vs. 75	Yes	*	0,0455
35 vs. 90	Yes	*	0,0132
35 vs. 120	Yes	***	0,0005
35 vs. 180	Yes	***	0,0001
40 vs. 90	Yes	*	0,0205
40 vs. 120	Yes	***	0,0008
40 vs. 180	Yes	***	0,0002
45 vs. 90	Yes	*	0,0247
45 vs. 120	Yes	**	0,0011
45 vs. 180	Yes	***	0,0003
50 vs. 90	Yes	*	0,0257
50 vs. 120	Yes	**	0,0011
50 vs. 180	Yes	***	0,0003
55 vs. 90	Yes	*	0,0283
55 vs. 120	Yes	**	0,0013
55 vs. 180	Yes	***	0,0003
60 vs. 120	Yes	*	0,018
60 vs. 180	Yes	**	0,0063

Παρατηρήσεις:

- Υπάρχει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$ *) στην % μεταβολή γλυκόζης $t = 0 \rightarrow 12, 75, 90$ min και πολύ μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,01$ **) στην % μείωση γλυκόζης στο $t = 0 \rightarrow 120, 180$ min. Στην % μεταβολή γλυκόζης στα 12 min έχουμε

άνοδο ~+16%, ενώ στους υπόλοιπους προαναφερθέντες χρόνους έχουμε πτώση γλυκόζης.

- Στις 3 ώρες η πτώση στη γλυκόζη αγγίζει το ~-31% από την αρχική τιμή (t=0) και είναι και στατιστικά πολύ σημαντική (p<0,01). Η πτώση αυτή δεν οφείλεται καθαρά στον διαλύτη, αλλά μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Επίσης σε αυτή την πτώση δεν έχουμε συμπεριλάβει και την ευαισθησία του μετρητή γλυκόζης στη μεταβολή τιμών ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015). Ωστόσο δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλές συμπέρασμα αν υπάρχει κάποια δράση του διαλύτη στη μείωση των τιμών γλυκόζης.

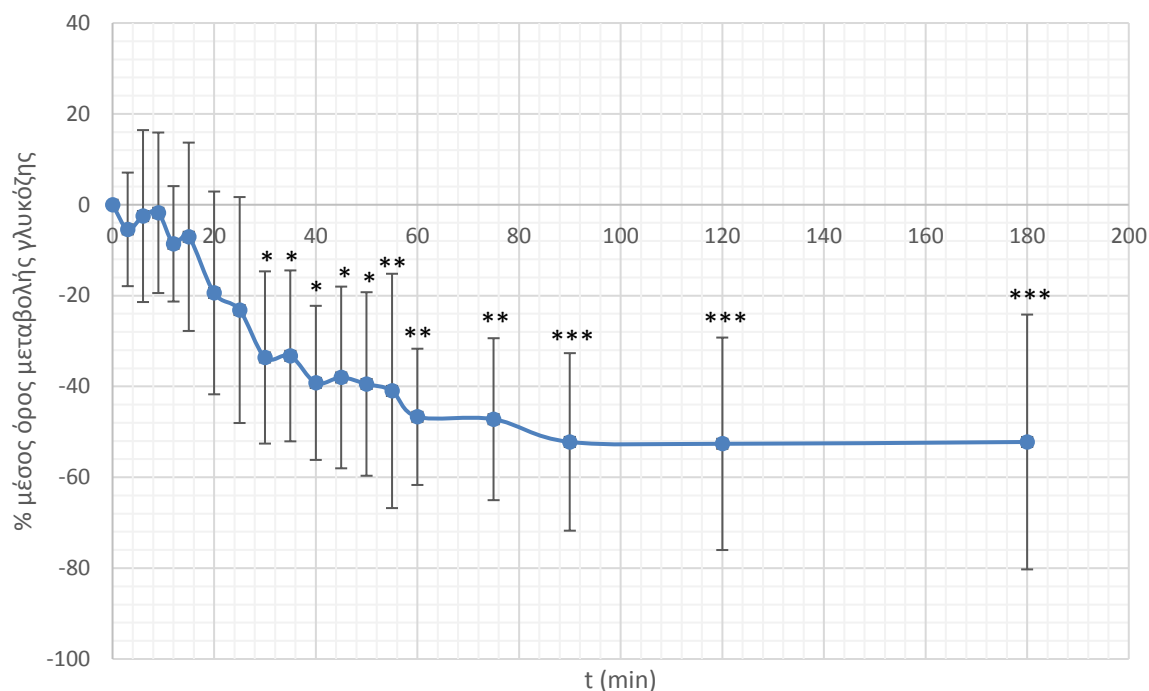
Ομάδα D-Per os

% Μεταβολή γλυκόζης από t=0			
t (min)	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)		
X	Mean	SD	N
0	0,00	0,00	8
3	-5,42	12,50	8
6	-2,49	18,92	8
9	-1,77	17,67	8
12	-8,60	12,71	8
15	-7,06	20,73	8
20	-19,42	22,32	8
25	-23,18	24,87	8
30	-33,62	18,95	8
35	-33,27	18,81	8
40	-39,22	16,96	8
45	-38,02	20,00	8
50	-39,46	20,20	8
55	-40,99	25,79	8
60	-46,69	14,99	8
75	-47,21	17,82	8
90	-52,21	19,54	8
120	-52,62	23,38	8
180	-52,23	28,05	8

Test for normal distribution	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
Shapiro-Wilk test	
W	0,8856
P value	0,0269
Passed normality test (alpha=0.05)?	No
P value summary	*
Number of values	19

Περιγραφικά στατιστικά μέσου όρου γλυκόζης	PEYMA AC+ ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
Number of values	19
Minimum	73,75
Maximum	156,6
Range	82,88
Mean	111
Std. Deviation	30
Std. Error of Mean	6,883
Lower 95% CI of mean	96,5
Upper 95% CI of mean	125,4
Coefficient of variation	27,04%

Μέσος όρος Ομάδα D-Per os



Διάγραμμα 58 Μέσος όρος Ομάδα D-Per os [t:0->30, 35, 40, 45, 50, p<0,05 *, t:0->55, 60, 75, p<0,01 **, t:0->90, 120, 180, p<0,001 ***]

Στατιστικά σημαντικοί χρόνοι που συνεπάγεται και σημαντική μεταβολή στη γλυκόζη για την ομάδα D είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 46 Ομάδα D: 2-way ANOVA + post-hoc Fisher's LSD

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
Per os (D)			
0 vs. 30	Yes	*	0,0289
0 vs. 35	Yes	*	0,0306
0 vs. 40	Yes	*	0,0111
0 vs. 45	Yes	*	0,0137
0 vs. 50	Yes	*	0,0106
0 vs. 55	Yes	**	0,008
0 vs. 60	Yes	**	0,0026
0 vs. 75	Yes	**	0,0024
0 vs. 90	Yes	***	0,0008
0 vs. 120	Yes	***	0,0007
0 vs. 180	Yes	***	0,0008
3 vs. 40	Yes	*	0,0281
3 vs. 45	Yes	*	0,034
3 vs. 50	Yes	*	0,027
3 vs. 55	Yes	*	0,021
3 vs. 60	Yes	**	0,0076
3 vs. 75	Yes	**	0,0069
3 vs. 90	Yes	**	0,0026
3 vs. 120	Yes	**	0,0024
3 vs. 180	Yes	**	0,0026
6 vs. 30	Yes	*	0,0428

6 vs. 35	Yes	*	0,0451
6 vs. 40	Yes	*	0,0172
6 vs. 45	Yes	*	0,0211
6 vs. 50	Yes	*	0,0165
6 vs. 55	Yes	*	0,0126
6 vs. 60	Yes	**	0,0043
6 vs. 75	Yes	**	0,0039
6 vs. 90	Yes	**	0,0014
6 vs. 120	Yes	**	0,0013
6 vs. 180	Yes	**	0,0014
9 vs. 30	Yes	*	0,0383
9 vs. 35	Yes	*	0,0404
9 vs. 40	Yes	*	0,0152
9 vs. 45	Yes	*	0,0186
9 vs. 50	Yes	*	0,0145
9 vs. 55	Yes	*	0,0111
9 vs. 60	Yes	**	0,0038
9 vs. 75	Yes	**	0,0034
9 vs. 90	Yes	**	0,0012
9 vs. 120	Yes	**	0,0011
9 vs. 180	Yes	**	0,0012
12 vs. 40	Yes	*	0,0463
12 vs. 50	Yes	*	0,0446
12 vs. 55	Yes	*	0,0352
12 vs. 60	Yes	*	0,0136
12 vs. 75	Yes	*	0,0124
12 vs. 90	Yes	**	0,0049
12 vs. 120	Yes	**	0,0045
12 vs. 180	Yes	**	0,0048
15 vs. 40	Yes	*	0,0364
15 vs. 45	Yes	*	0,0439
15 vs. 50	Yes	*	0,0351
15 vs. 55	Yes	*	0,0275
15 vs. 60	Yes	*	0,0103
15 vs. 75	Yes	**	0,0093
15 vs. 90	Yes	**	0,0036
15 vs. 120	Yes	**	0,0033
15 vs. 180	Yes	**	0,0036
20 vs. 90	Yes	*	0,033
20 vs. 120	Yes	*	0,0309
20 vs. 180	Yes	*	0,0329

Παρατηρήσεις:

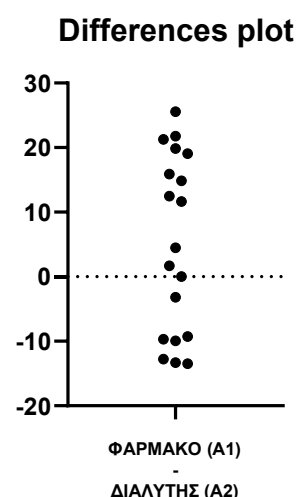
- Υπάρχει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) στην % μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή στους χρόνους $t=30$ έως 50 min. Στους χρόνους $t=55$ έως 75 min υπάρχει πολύ μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,01$) και στους χρόνους $t=90$, 120 και 180 min, υπάρχει πάρα πολύ μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,001$).
- Σε αυτή την ομάδα, η μεταβολή της γλυκόζης έχει μόνο πτωτική πορεία από την αρχική της τιμή και η μεγαλύτερη πτώση συμβαίνει σε $t=120$ min (~-52%).

7.8.2.3 Σύγκριση εξαρτημένων Ομάδων

Παρακάτω, θα συγκρίνουμε τις υποομάδες A1-A2, B1-B2-B3 και C1-C2, καθώς αποτελούνταν από τα ίδια πειραματόζωα. Η σύγκριση θα γίνει στο Μέσο όρο (Mean) της % μεταβολής γλυκόζης για κάθε χρονική στιγμή σε κάθε υποομάδα. Χρησιμοποιήσαμε παραμετρικές μεθόδους ανάλυσης για τις υποομάδες B1-B2 και C1-C2 (paired t-test) καθώς είχαν κανονική κατανομή και μη παραμετρικές μεθόδους ανάλυσης για τα ζεύγη A1-A2, B1-B3 και B2-B3 (Wilcoxon matched-pairs signed rank test) λόγω ύπαρξης μη κανονικής κατανομής. Αξιολογήσαμε αν υπάρχει στατιστική διαφορά στις υποομάδες αυτές και σε ποια χρονική στιγμή υπάρχει. Σε όλες τις υποθέσεις ορίσαμε διάστημα εμπιστοσύνης 95% ($p=0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

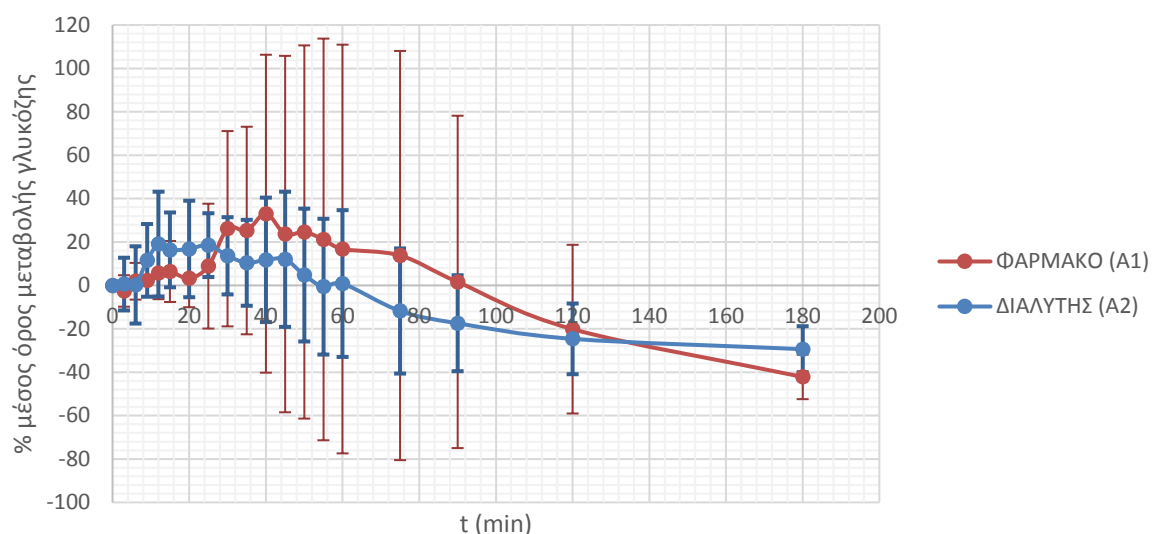
ΦΑΡΜΑΚΟ(A1) vs ΔΙΑΛΥΤΗΣ(A2)

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0,0987
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	124,0 , -47,00
Sum of signed ranks (W)	77
Number of pairs	19
Number of ties (ignored)	1
Median of differences	4,473
How effective was the pairing?	
rs (Spearman)	0,4702
P value (one tailed)	0,0211
P value summary	*
Was the pairing significantly effective?	Yes



Δεν υπάρχει στατιστική σημαντικότητα καθώς $p>0,05$. Άρα οι υποομάδες A1-A2 δεν διαφέρουν και δεν χρειάζεται να κάνουμε post-hoc ανάλυση για να βρούμε τα χρονικά σημεία που διαφέρουν.

Φάρμακο vs Διαλύτης



Διάγραμμα 59 Φάρμακο vs Διαλύτης

PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ(B1) vs PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ(B2) vs PEYMA DC+DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ(B3)

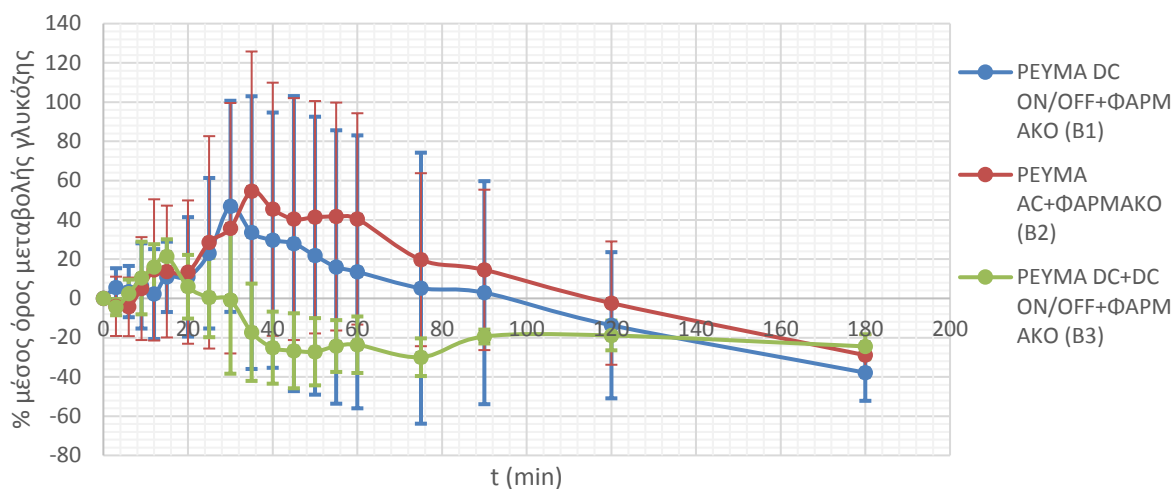
Friedman test	
P value	0,0242
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	3
Friedman statistic	7,444
Number of treatments (columns)	3
Number of subjects (rows)	19

Σύμφωνα με το Friedman test, υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των υποομάδων B1-B2-B3, που είναι σημαντική ($p < 0,05$). Στη συνέχεια θα δούμε ποιες ομάδες διαφέρουν μεταξύ τους με το Dunn's multiple comparisons test και σε ποιους χρόνους υπάρχει διαφορά μεταξύ των υποομάδων με τη βοήθεια post-hoc Fisher's LSD test.

Uncorrected Dunn's test	Rank sum difference	Significant?	Summary	Individual P Value
(B1) vs. (B2)	-5	No	ns	0,4173
(B1) vs. (B3)	11	No	ns	0,0744
(B2) vs. (B3)	16	Yes	**	0,0094

Υπάρχει στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά ($p < 0,01$) στις υποομάδες B2-B3.

Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο

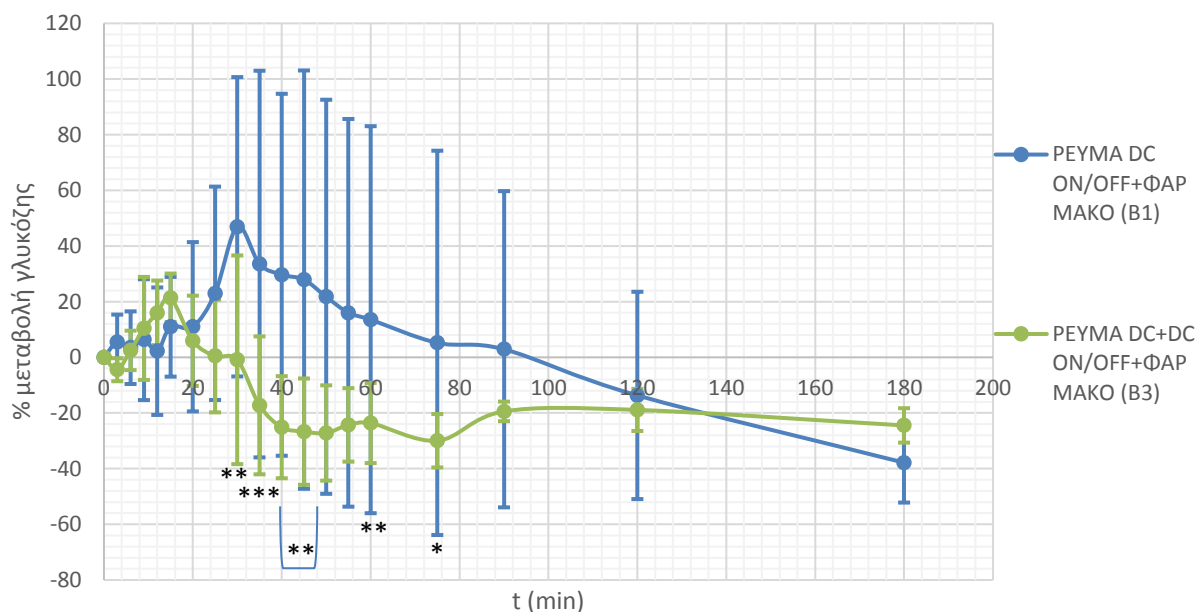


Διάγραμμα 60 Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα χρονικά σημεία όπου υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των υποομάδων.

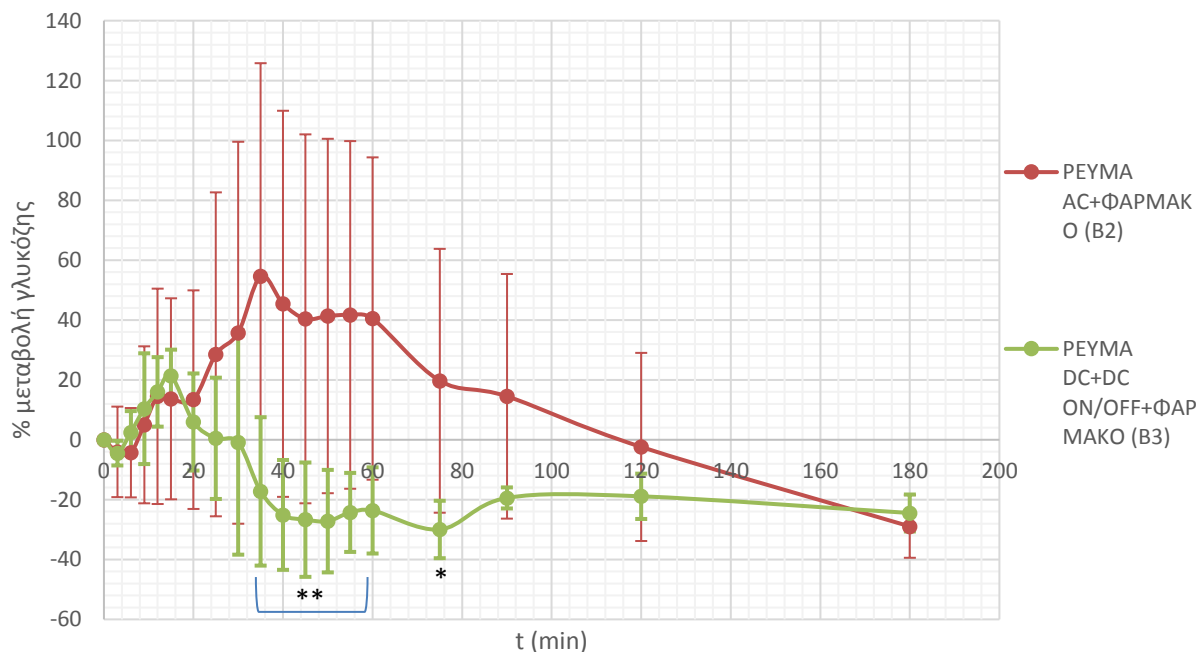
Uncorrected Fisher's LSD	Time (min)	Significant?	Summary	Individual P Value
(B1) vs. (B3)	30	Yes	**	0,0078
(B1) vs. (B3)	35	Yes	***	0,0005
(B2) vs. (B3)	35	Yes	**	0,004
(B1) vs. (B3)	40	Yes	**	0,0013
(B2) vs. (B3)	40	Yes	**	0,0027
(B1) vs. (B3)	45	Yes	**	0,001
(B2) vs. (B3)	45	Yes	**	0,0026
(B1) vs. (B3)	50	Yes	**	0,0016
(B2) vs. (B3)	50	Yes	**	0,0048
(B1) vs. (B3)	55	Yes	**	0,0065
(B2) vs. (B3)	55	Yes	**	0,0032
(B1) vs. (B3)	60	Yes	**	0,0088
(B2) vs. (B3)	60	Yes	**	0,0067
(B1) vs. (B3)	75	Yes	*	0,0129
(B2) vs. (B3)	75	Yes	*	0,0266

Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο



Διάγραμμα 61 Ρεύμα DC ON/OFF+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο [t:0->35, p<0,001 ***, t:0->30, 40, 45, 50, 60, p<0,01 **, t:0->75, p<0,05 *]

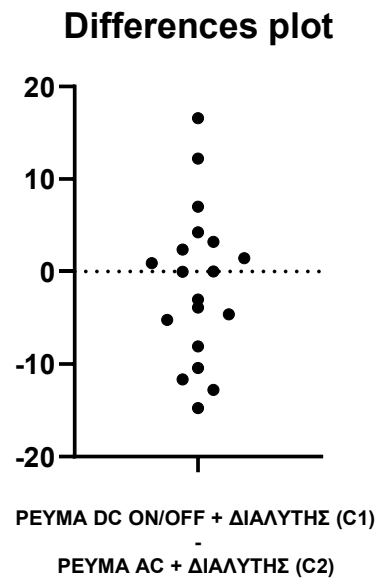
Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο



Διάγραμμα 62 Ρεύμα AC+Φάρμακο vs Ρεύμα DC+DC ON/OFF+Φάρμακο [t:0->35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,01 **, t:0->75, p<0,05 *]

PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ(C1) vs PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ(C2)

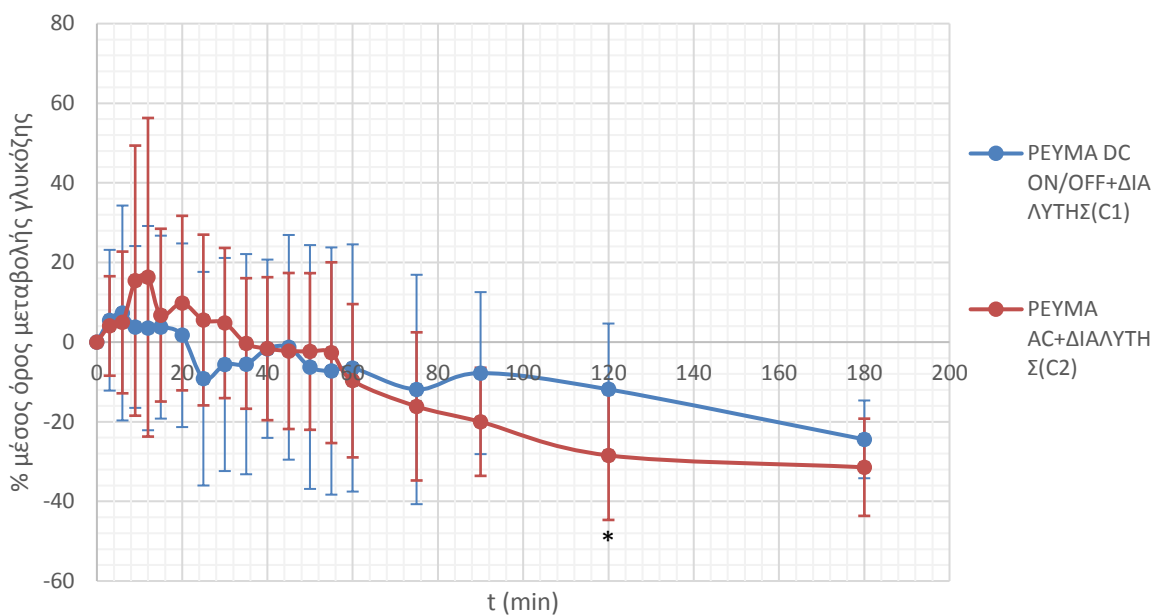
Paired t test	
P value	0,4753
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0,7292,df=18
Number of pairs	19
How big is the difference?	
Mean of differences	-1,386
SD of differences	8,288
SEM of differences	1,901
95% confidence interval	-5,381 to 2,608
R squared (partial eta squared)	0,02869
How effective was the pairing?	
Correlation coefficient (r)	0,8196
P value (one tailed)	<0,0001
P value summary	****
Was the pairing significantly effective?	Yes



Σύμφωνα με το paired t-test, δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των υποομάδων C1-C2. Στη συνέχεια θα ελέγξουμε αν σε κάποιο χρόνο υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των υποομάδων με τη βοήθεια post-hoc Fisher's LSD test.

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1) VS PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)			
120 min	Yes	*	0,036

Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης vs Ρεύμα AC + Διαλύτης



Διάγραμμα 63 Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης vs Ρεύμα AC + Διαλύτης [t:0->120, p<0,05 *]

7.8.2.4 Σύγκριση μη εξαρτημένων Ομάδων

Για να δούμε αν υπάρχουν στατιστικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων, εφαρμόσαμε το Kruskal-Wallis test για μη παραμετρικά δεδομένα και έπειτα κάναμε post-hoc Dunn's test για να δούμε ποιες ομάδες διαφέρουν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 47 Kruskal-Wallis test

Kruskal-Wallis test	
P value	<0,0001
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	****
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	8
Kruskal-Wallis statistic	59,42
Number of treatments (columns)	8
Number of values (total)	152

Παρακάτω, θα αναλύσουμε τις στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε διάφορους χρόνους. Τα ζεύγη σύγκρισης για κάθε χρόνο είναι:

ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs. ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2)
ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs. ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)
ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs. ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)
ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs. ΡΕΥΜΑ DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)
ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs. PER OS (D)
ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs. ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)
ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs. ΡΕΥΜΑ AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs. PER OS (D)
ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs. ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)
ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs. ΡΕΥΜΑ DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)
ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs. ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)
ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs. PER OS (D)
ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2) vs. ΡΕΥΜΑ DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)
ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2) vs. ΡΕΥΜΑ AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)
ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2) vs. PER OS (D)
ΡΕΥΜΑ DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3) vs. PER OS (D)
ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1) vs. ΡΕΥΜΑ AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)

Πίνακας 48 Dunn's test για εύρεση στατιστικών διαφορών μεταξύ των ομάδων

Uncorrected Dunn's test	Mean rank difference	Significant?	Summary	Individual P Value
(A1) vs. (A2)	11,74	No	ns	0,4112
(A1) vs. (B1)	-5,579	No	ns	0,6961
(A1) vs. (B2)	-13,63	No	ns	0,3398
(A1) vs. (B3)	42,79	Yes	**	0,0027
(A1) vs. (D)	74,37	Yes	****	<0,0001
(A2) vs. (D)	62,63	Yes	****	<0,0001
(A2) vs. (C1)	25,53	No	ns	0,0739
(A2) vs. (C2)	16,05	No	ns	0,261
(B1) vs. (B2)	-8,053	No	ns	0,5729
(B1) vs. (B3)	48,37	Yes	***	0,0007
(B1) vs. (C1)	42,84	Yes	**	0,0027
(B1) vs. (D)	79,95	Yes	****	<0,0001
(B2) vs. (B3)	56,42	Yes	****	<0,0001
(B2) vs. (C2)	41,42	Yes	**	0,0037
(B2) vs. (D)	88	Yes	****	<0,0001
(B3) vs. (D)	31,58	Yes	*	0,027
(C1) vs. (C2)	-9,474	No	ns	0,5071

Για να ελέγξουμε σε ποιους χρόνους υπήρχε στατιστική διαφορά μεταξύ των παραπάνω ομάδων, εφαρμόσαμε non-parametric 2-way ANOVA test με post-hoc Fisher's LSD, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Οι χρόνοι αυτοί καταγράφονται παρακάτω

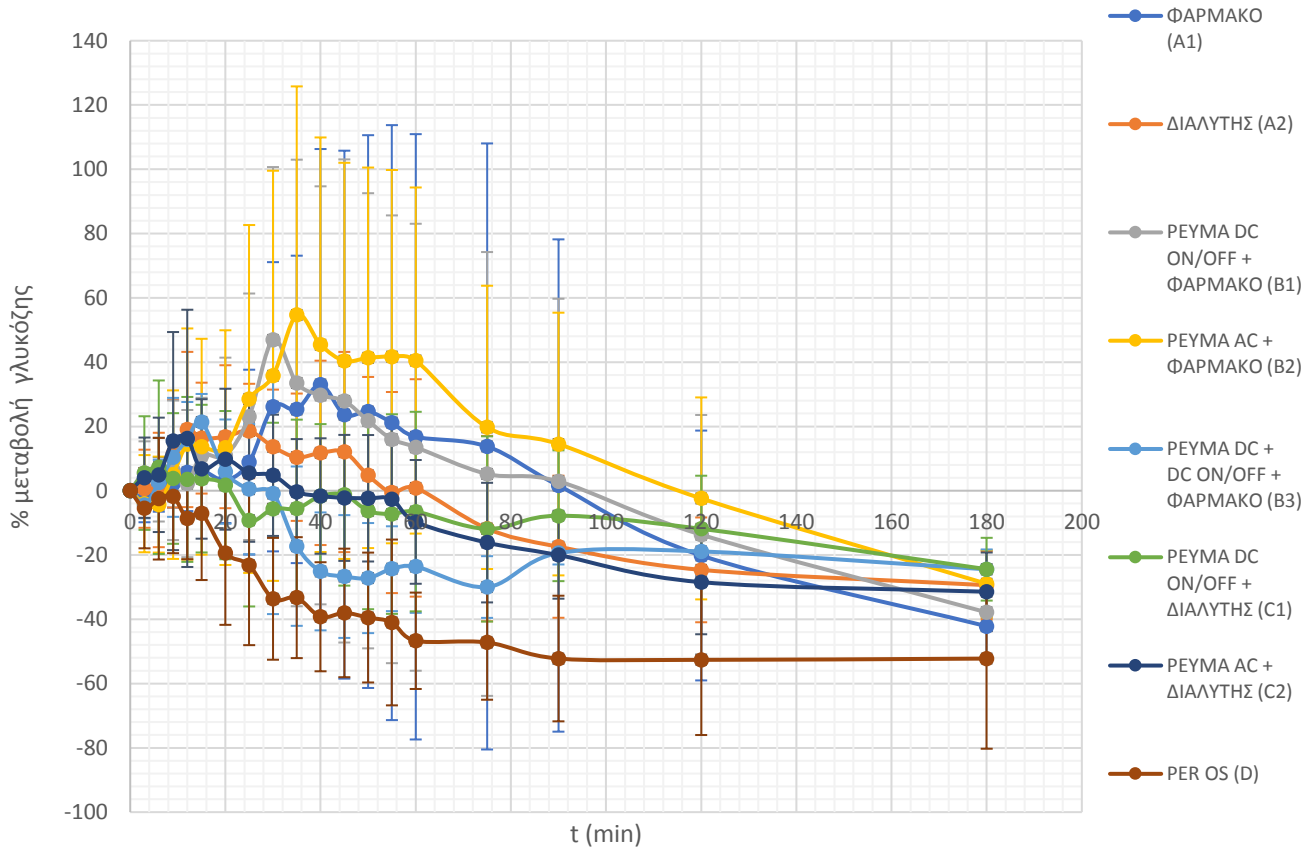
Πίνακας 49 Σύγκριση Ομάδων σε όλους τους χρόνους και στατιστική διαφορά

Uncorrected Fisher's LSD	Significant?	Summary	Individual P Value
20 min			
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0444
25 min			
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0205
(B1) vs. (D)	Yes	*	0,0104
(B2) vs. (D)	Yes	**	0,0041
30 min			
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0009
(A2) vs. (D)	Yes	**	0,0087
(B1) vs. (B3)	Yes	*	0,0303
(B1) vs. (C1)	Yes	**	0,0036
(B1) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
(B2) vs. (D)	Yes	***	0,0001
35 min			
(A1) vs. (D)	Yes	**	0,0012
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0153
(B1) vs. (B3)	Yes	*	0,0214
(B1) vs. (C1)	Yes	*	0,0301
(B1) vs. (D)	Yes	***	0,0002
(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0011
(B2) vs. (C2)	Yes	**	0,0023
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
40 min			
(A1) vs. (B3)	Yes	**	0,0084
(A1) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
(A2) vs. (D)	Yes	**	0,0047
(B1) vs. (B3)	Yes	*	0,0131
(B1) vs. (D)	Yes	***	0,0001
(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0014
(B2) vs. (C2)	Yes	**	0,009
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
45 min			
(A1) vs. (B3)	Yes	*	0,0225
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0006
(A2) vs. (D)	Yes	**	0,0055
(B1) vs. (B3)	Yes	*	0,0133
(B1) vs. (D)	Yes	***	0,0003
(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0024
(B2) vs. (C2)	Yes	*	0,018
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
50 min			
(A1) vs. (B3)	Yes	*	0,0189
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0004
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0141
(B1) vs. (B3)	Yes	*	0,0266
(B1) vs. (D)	Yes	***	0,0007

(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0019
(B2) vs. (C2)	Yes	*	0,0153
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
55 min			
(A1) vs. (B3)	Yes	*	0,0393
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0006
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0249
(B1) vs. (D)	Yes	**	0,0016
(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0028
(B2) vs. (C2)	Yes	*	0,0138
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
60 min			
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0004
(A2) vs. (D)	Yes	**	0,0083
(B1) vs. (D)	Yes	***	0,0008
(B2) vs. (B3)	Yes	**	0,0037
(B2) vs. (C2)	Yes	**	0,0054
(B2) vs. (D)	Yes	****	<0,0001
75 min			
(A1) vs. (B3)	Yes	*	0,0474
(A1) vs. (D)	Yes	***	0,0007
(A2) vs. (D)	Yes	*	0,0492
(B1) vs. (D)	Yes	**	0,0037
(B2) vs. (B3)	Yes	*	0,0244
(B2) vs. (C2)	Yes	*	0,0465
(B2) vs. (D)	Yes	***	0,0002
90 min			
(A1) vs. (D)	Yes	**	0,0028
(B1) vs. (D)	Yes	**	0,0022
(B2) vs. (D)	Yes	***	0,0002
120 min			
(B1) vs. (D)	Yes	*	0,0306
(B2) vs. (D)	Yes	**	0,0053

Οι Ομάδες A1-A2, A1-B1, A1-B2, B1-B2, B3-D, A2-C1 και A2-C2 δεν έχουν στατιστική διαφορά σε κανέναν από τους χρόνους λήψης γλυκόζης. Παρακάτω, θα αναλύσουμε τα ζεύγη των ομάδων με στατιστική σημαντικότητα με τα αντίστοιχα διαγράμματά τους.

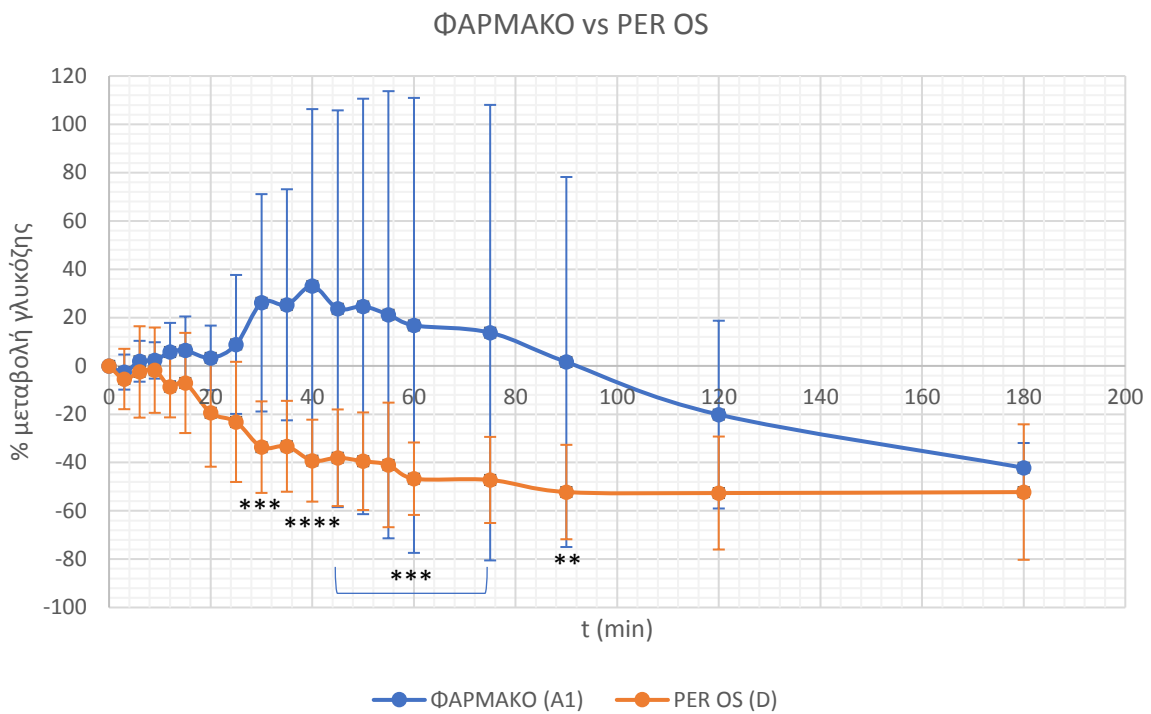
ΟΜΑΔΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ



Διάγραμμα 64 Μέσος όρος και Τυπική απόκλιση % μεταβολής γλυκόζης Ομάδων πειράματος

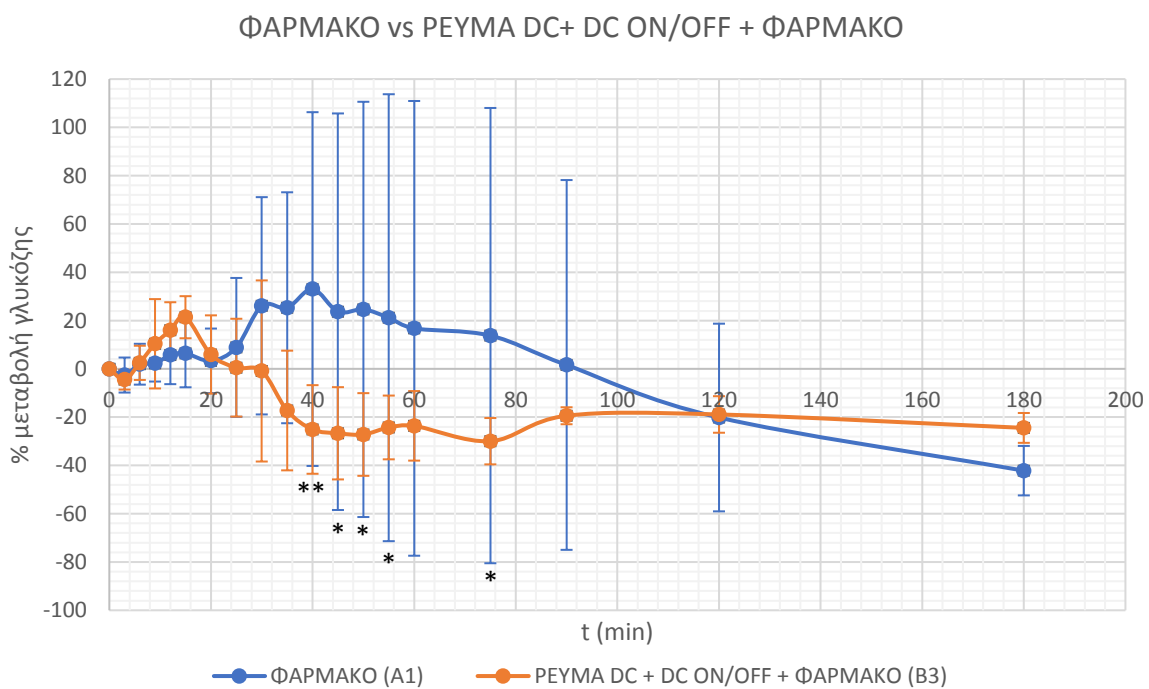
7.8.2.5 Σύγκριση Ομάδων με στατιστική διαφορά

ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs PER OS (D)



Διάγραμμα 65 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ VS PER OS [t:0->40, p<0,0001 ****, t:0->30, 45, 50, 55, 60, 75, p<0,001 ***, t:0->35, 90 p<0,01 **]

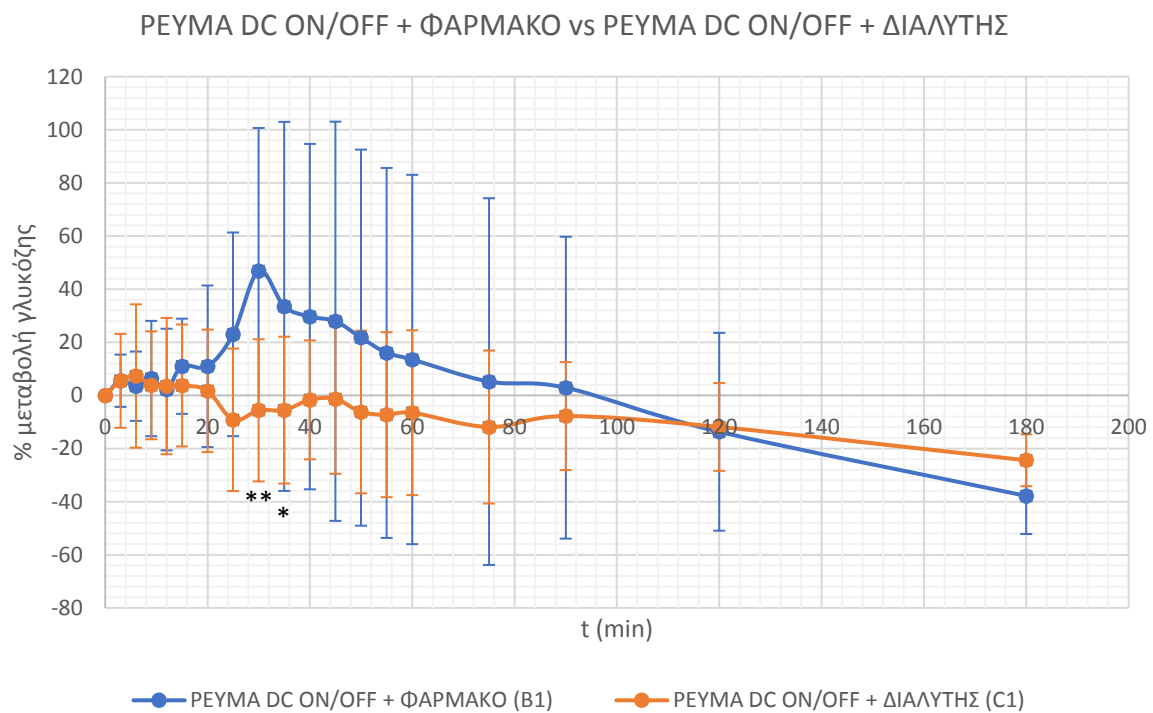
ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs PEYMA DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3)



Διάγραμμα 66 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ VS PEYMA DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ [t:0->40 min, p<0,01 **, t:0->45, 50, 55, 75 min, p<0,05 *]

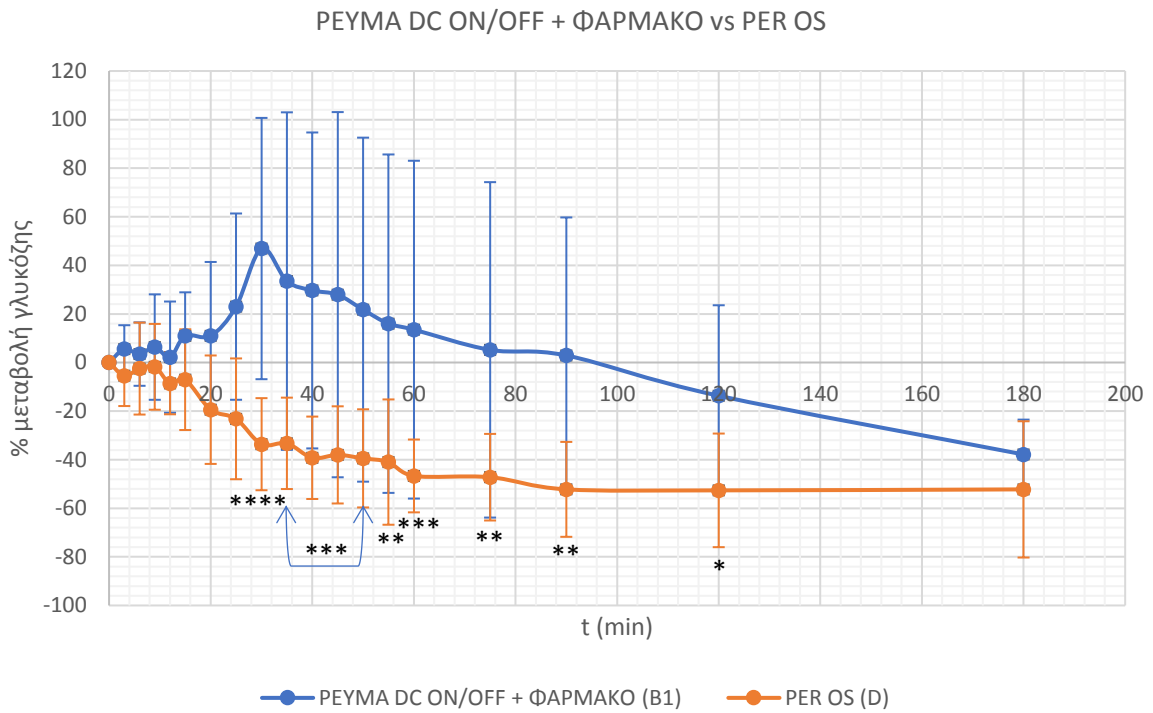
Τα ζεύγη ομάδων B1-B3 και B2-B3 με στατιστική διαφορά, έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη ενότητα καθώς τα δείγματα ήταν εξαρτημένα (ίδια πειραματόζωα σε κάθε υποομάδα) και έχουν παρουσιαστεί και τα αντίστοιχα διαγράμματά τους (σελ.220).

PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)



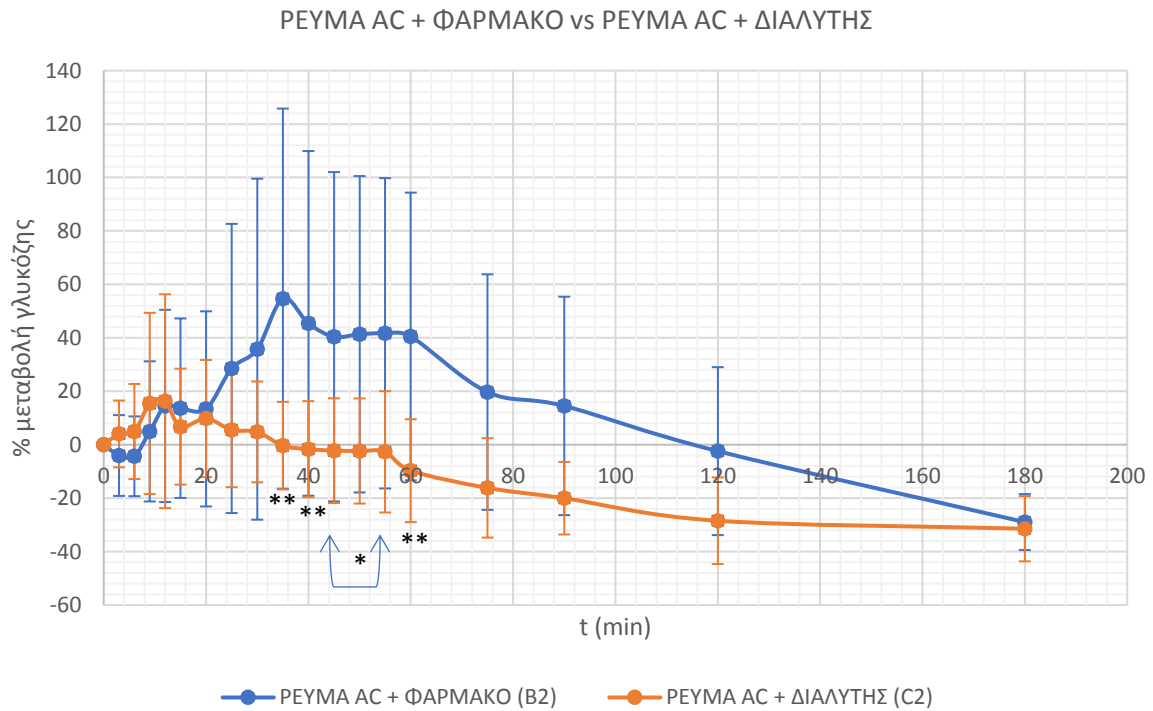
Διάγραμμα 67 Σύγκριση PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ VS PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ [t:0->30, p<0,01
**, t:0->35, p<0,05 *]

PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1) vs PER OS (D)



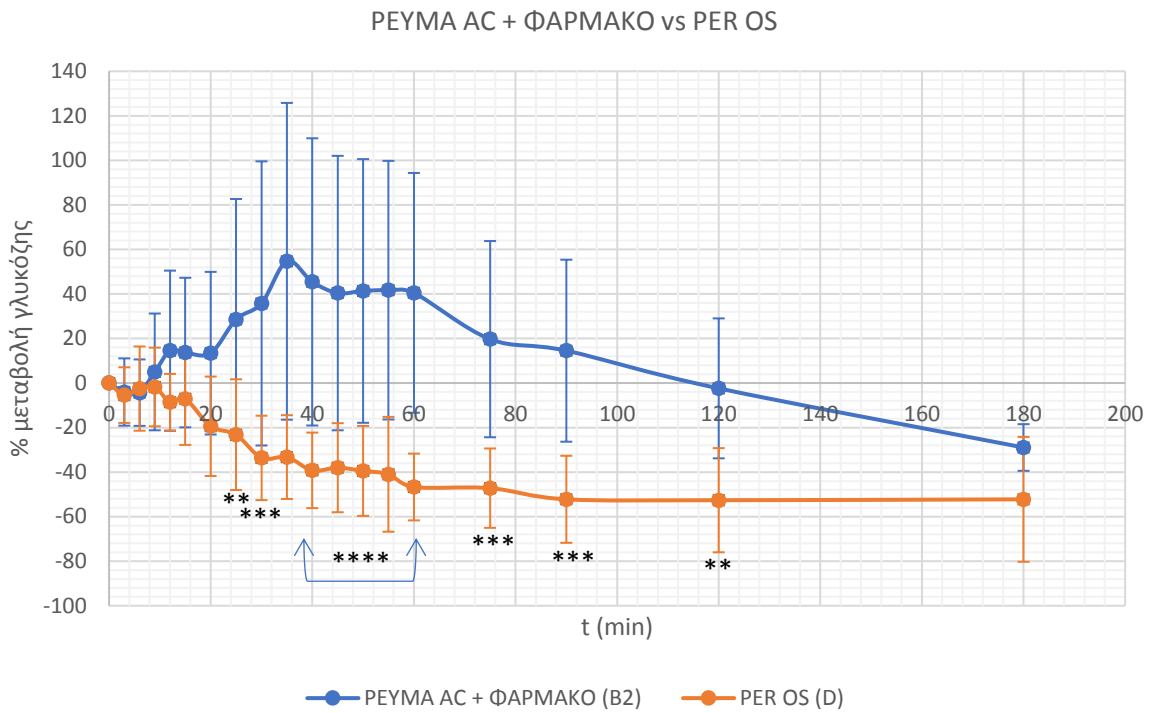
Διάγραμμα 68 Σύγκριση PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ VS PER OS [t:0->30, p<0,0001 ****, t:0->35, 40, 45, 50, 60, p<0,001 ***, t:0->55, 75, 90, p<0,01 **, t:0->120, p<0,05 *]

PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2) vs PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)



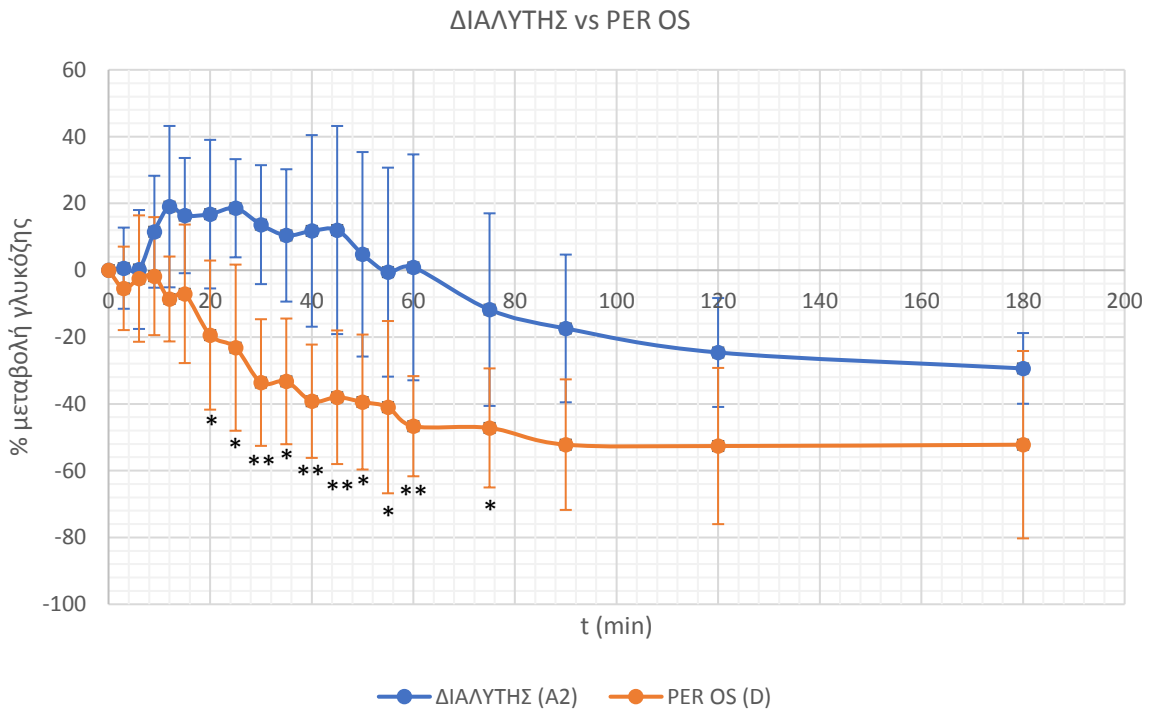
Διάγραμμα 69 Σύγκριση PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ [t:0->35, 40, 60, p<0,01 **, t:0->45, 50, 55, p<0,05 *]

PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2) vs PER OS (D)



Διάγραμμα 70 Σύγκριση PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PER OS [t:0->35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,0001 ****, t:0->30, 75, 90, p<0,001 ***, t:0->25, 120, p<0,01 **]

ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs PER OS (D)

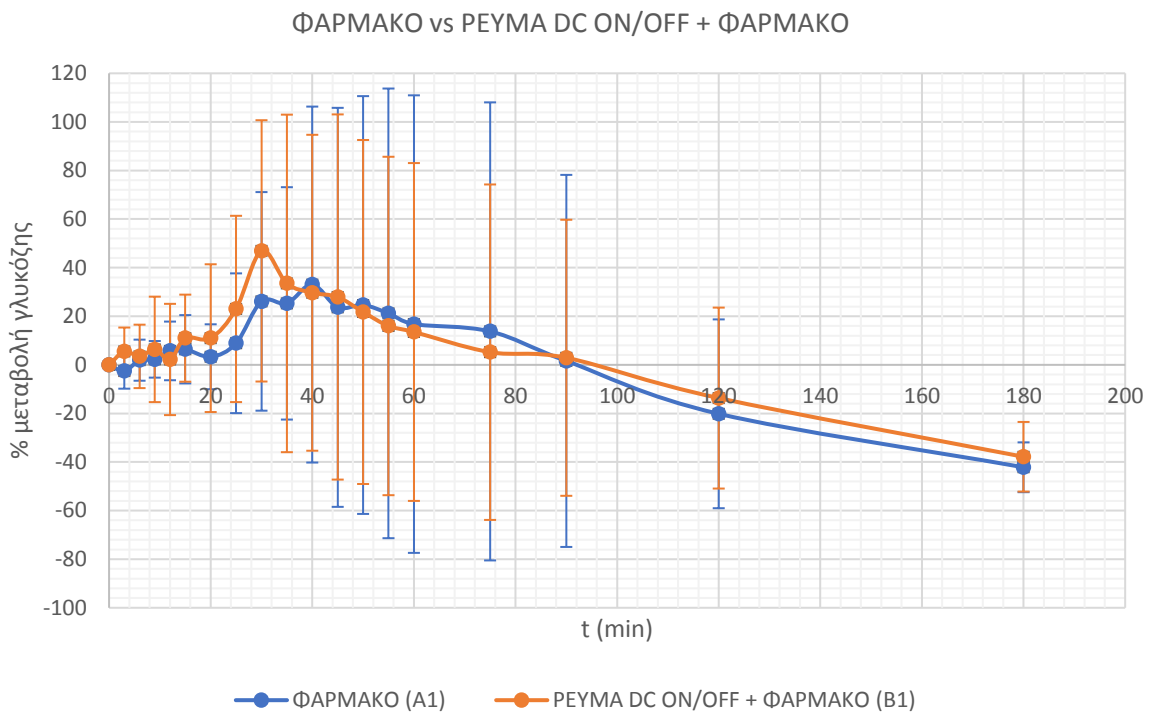


Διάγραμμα 71 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs PER OS [t:0->30, 40, 45, 60, p<0,01 **, t:0->20, 25, 35, 50, 55, 75, p<0,05 *]

7.8.2.6 Σύγκριση Ομάδων με μη στατιστική διαφορά

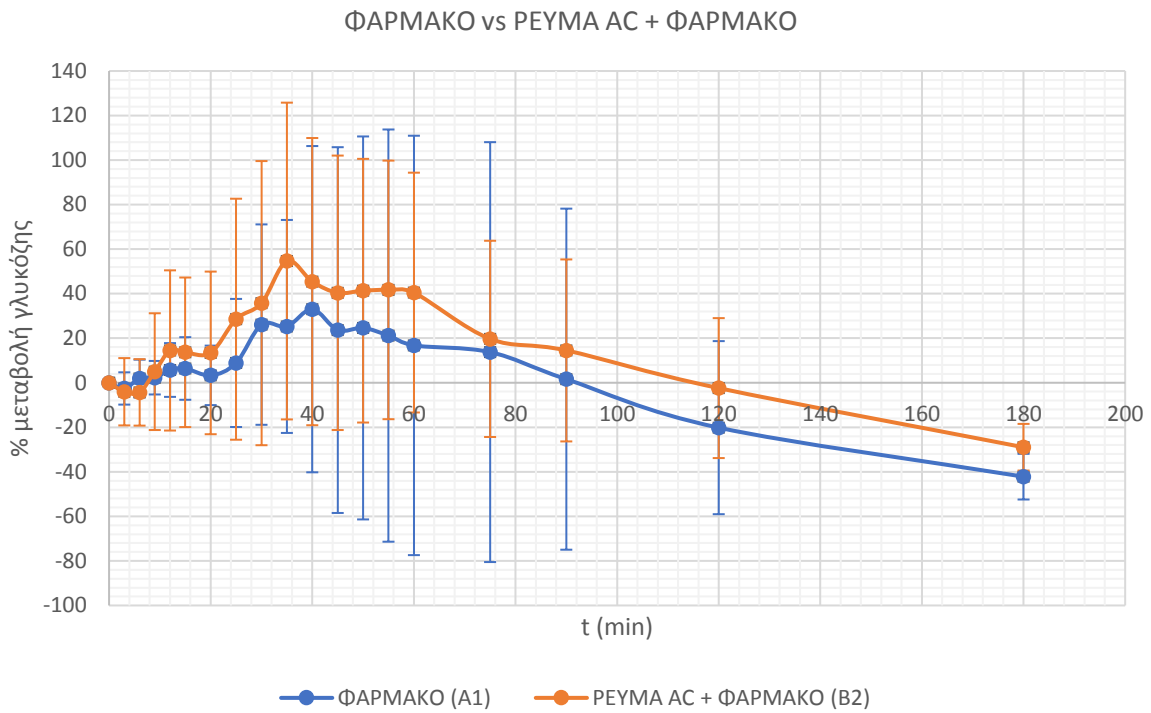
Τα ζεύγη ομάδων A1-A2, B1-B2 και C1-C2 με μη στατιστική διαφορά, έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη ενότητα καθώς ήταν εξαρτημένα τα δείγματα (ίδια πειραματόζωα σε κάθε υποομάδα) και έχουν παρουσιαστεί και τα αντίστοιχα διαγράμματά τους (σελ. 220).

ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B1)



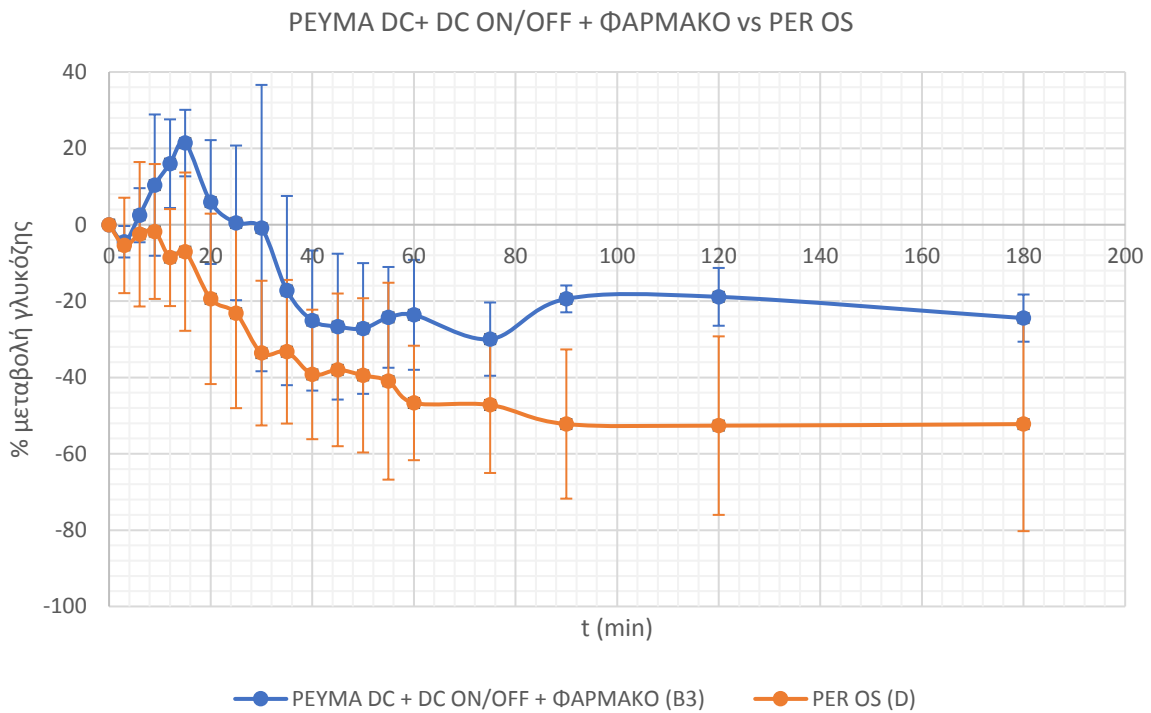
Διάγραμμα 72 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ vs PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ. Μη στατιστική διαφορά.

ΦΑΡΜΑΚΟ (A1) vs ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ (B2)



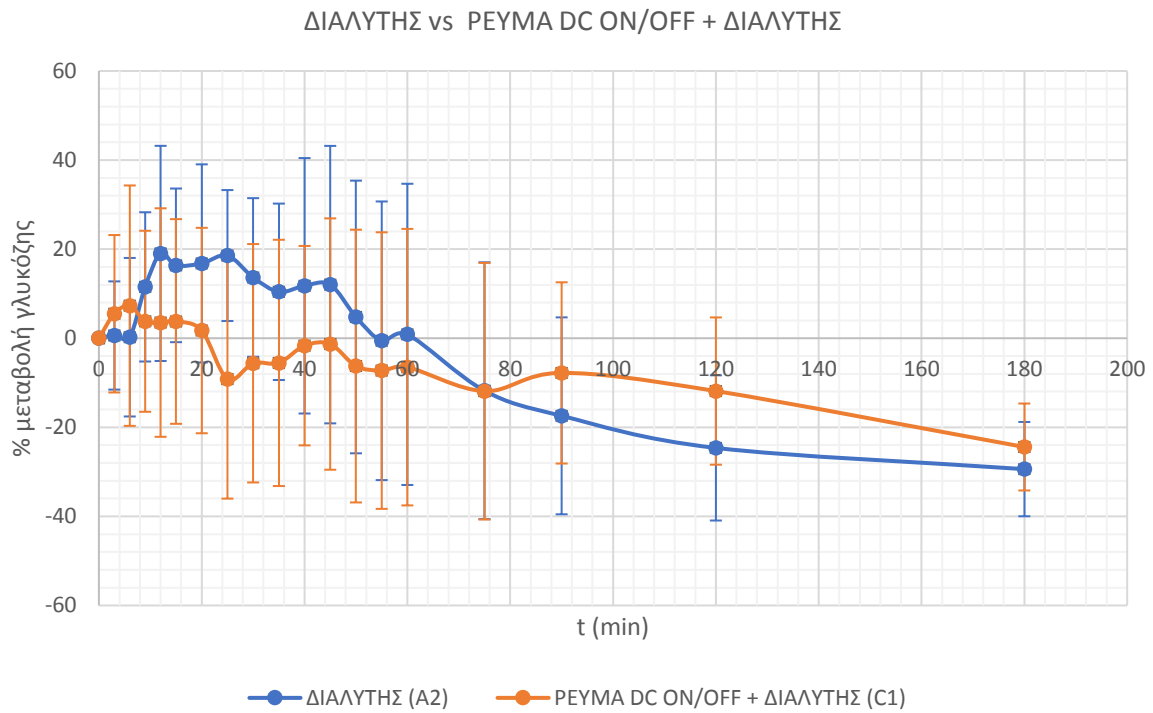
Διάγραμμα 73 Σύγκριση ΦΑΡΜΑΚΟ vs ΡΕΥΜΑ AC + ΦΑΡΜΑΚΟ. Μη στατιστική διαφορά.

ΡΕΥΜΑ DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ (B3) vs PER OS (D)



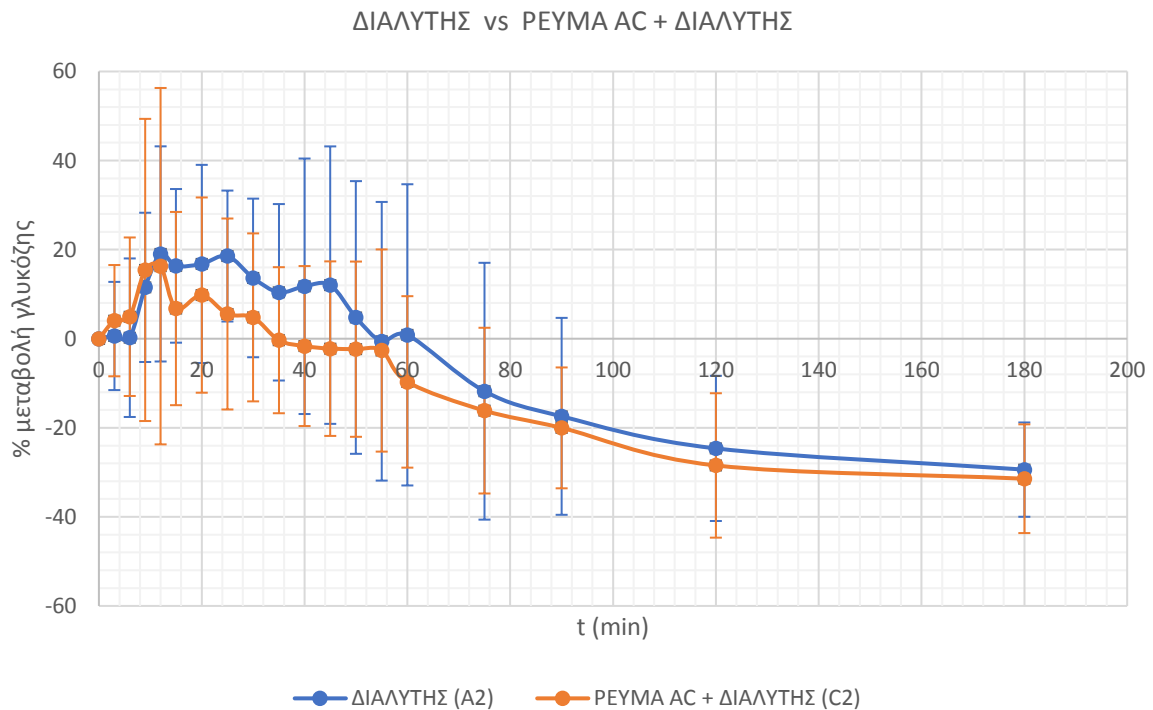
Διάγραμμα 74 Σύγκριση ΡΕΥΜΑ DC+ DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ vs PER OS. Μη στατιστική διαφορά.

ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C1)



Διάγραμμα 75 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs ΡΕΥΜΑ DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ. Μη στατιστική διαφορά.

ΔΙΑΛΥΤΗΣ (A2) vs ΡΕΥΜΑ AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ (C2)



Διάγραμμα 76 Σύγκριση ΔΙΑΛΥΤΗΣ vs ΡΕΥΜΑ AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ. Μη στατιστική διαφορά

7.9 Συμπεράσματα

7.9.1 1ο πείραμα: “Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών”

Αξιολόγηση γλυκόζης νηστείας

Στο πρωτόκολλο του NAD, παρατηρήθηκε ότι οι ομάδες που παρουσίασαν υψηλότερες τιμές γλυκόζης-νηστείας, με αυξανόμενη τάση, μέχρι και την 35η ημέρα που μετρήθηκαν, ήταν τα ΚΑΦΕ & τα ΜΑΥΡΑ. Πιο συγκεκριμένα, όλα τα είδη μυών παρουσίασαν στατιστική διαφορά την ημέρα 35 από την ημέρα 0 που ήταν και εξαιρετικά σημαντική ($p < 0,0001$ ****). Ωστόσο αυτή τη σημαντική διαφορά στις τιμές γλυκόζης την παρουσιάζουν από τη 14η ημέρα του πειράματος μόνο τα ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ. Συγκρίνοντας τα είδη μυών μεταξύ τους, παρατηρήσαμε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά στη γλυκόζη τις ημέρες 14, 21 και 35. Πιο συγκεκριμένα, την ημέρα 14 βρέθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των ΚΑΦΕ-ΑΡΟΕ ($p < 0,001$ ***) και των ΜΑΥΡΑ-ΑΡΟΕ ($p < 0,01$ **). Την ημέρα 21, εκτός από τις παραπάνω διαφορές βρέθηκαν και διαφορές στα είδη ΑΣΠΡΑ-ΚΑΦΕ ($p < 0,05$ *) και ΑΣΠΡΑ-ΜΑΥΡΑ ($p < 0,05$ *). Τέλος την ημέρα 35 οι διαφορές στις τιμές γλυκόζης ήταν μεταξύ των παρακάτω ομάδων: ΑΣΠΡΑ-ΚΑΦΕ ($p < 0,01$ **), ΚΑΦΕ-ΑΡΟΕ ($p < 0,0001$ ****) και ΜΑΥΡΑ-ΑΡΟΕ ($p < 0,05$ *). Από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι ξεκάθαρο το γεγονός ότι οι ομάδες NAD-ΚΑΦΕ & NAD-ΜΑΥΡΑ είχαν πιο υψηλές τιμές γλυκόζης σε σχέση με τα υπόλοιπα ζωικά πρότυπα.

Στο πρωτόκολλο του HFD, υπάρχει στατιστική διαφορά στη γλυκόζη κυρίως στα ΚΑΦΕ και ΑΣΠΡΑ. Πιο αναλυτικά, στατιστική διαφορά με εξαιρετική σημαντικότητα υπάρχει στα ΚΑΦΕ, τις ημέρες 14 και 35 από την ημέρα 7 ($p < 0,0001$ ****) και την ημέρα 21 από την ημέρα 7 υπάρχει στατιστική διαφορά στις τιμές γλυκόζης ($p < 0,05$ *). Στα ΑΣΠΡΑ υπάρχει στατιστική διαφορά στη γλυκόζη τις ημέρες 14 και 21 ($p < 0,05$ *) και την ημέρα 35 πάρα πολύ σημαντική διαφορά από τη ημέρα 0 ($p < 0,001$ ***). Συγκρίνοντας τα είδη μυών μεταξύ τους, την ημέρα 7 βρέθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων ΑΣΠΡΑ-ΑΡΟΕ ($p < 0,001$ ***) και ΚΑΦΕ-ΑΡΟΕ ($p < 0,01$ **), κάτι που σημαίνει ότι τα ΑΡΟΕ είχαν ανεβασμένες τιμές γλυκόζης που ήταν και στατιστικά σημαντικές σε σχέση με τις προαναφερθείσες ομάδες.

Συγκρίνοντας τα πρωτόκολλα μεταξύ τους, διαπιστώσαμε διαφορά στο μέσο όρο της γλυκόζης όλων των ζωικών προτύπων τις ημέρες 21 ($p < 0,05$ *) και 35 ($p < 0,0001$ ****).

Δηλαδή στο πρωτόκολλο NAD, οι τιμές γλυκόζης ήταν σημαντικά αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στο πρωτόκολλο HFD, τις ημέρες 21 και 35. Στο πρωτόκολλο του HFD, παρατηρήθηκε ότι όλες οι ομάδες παρουσίασαν ταυτόχρονη σταδιακή αύξηση γλυκόζης-νηστείας, και από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι μύες έχουν εμφανίσει αντίσταση στους υποδοχείς ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση υπερινσουλιαιμίας, κάτι που αποτελεί χαρακτηριστικό των ανθρώπων που εμφανίζουν διαβήτη τύπου 2. Τα β-κύτταρα του παγκρέατος ίσως ακόμα να μην έχουν επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό καθώς οι τιμές γλυκόζης δεν είναι αρκετά υψηλές συγκρινόμενες με αυτές του πρωτοκόλλου NAD. Παρόλα αυτά, οι ομάδες ΑΣΠΡΑ & ΚΑΦΕ του πρωτοκόλλου HFD εμφάνισαν διαβήτη, καθώς οι τιμές γλυκόζης-νηστείας ήταν > 126 mg/dL. Σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση Διαβήτη (American Diabetes Association) τα κριτήρια για τη διάγνωση διαφόρων διαταραχών μεταβολισμού της γλυκόζης είναι τα εξής:

	Φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη	Διαταραχή σακχάρου νηστείας (IFG) Διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη (IGT)	Σακχαρώδης Διαβήτης
Νηστεία	< 100 mg/dl	100 – 125 mg/dl (IFG)	≥ 126 mg/dl
2 ώρες μετά 75 g γλυκόζης από το στόμα	< 140 mg/dl	140 – 199 mg/dl (IGT)	≥ 200 mg/dl

Εικόνα 66 Διάγνωση διαταραχών μεταβολισμού της γλυκόζης (American Diabetes Association, 2014)

Ακόμη, συγκρίνοντας τα ίδια είδη μυών μεταξύ των 2 πρωτοκόλλων, διαπιστώσαμε ότι υπάρχει στατιστική διαφορά σε όλα. Πιο αναλυτικά, στατιστική διαφορά στη γλυκόζη βρέθηκε στις εξής ημέρες:

HFD vs NAD-ΑΣΠΡΑ την ημέρα 35 ($p < 0,05$ *)

HFD vs NAD-ΚΑΦΕ τις ημέρες 14 ($p < 0,05$ *), 21 ($p < 0,01$ **) και 35 ($p < 0,0001$ ****)

HFD vs NAD-MAYPA τις ημέρες 14 ($p < 0,05$ *), 21 ($p < 0,01$ **) και 35 ($p < 0,01$ **)

HFD vs NAD-APOE την ημέρα 7 ($p < 0,05$ *)

Οι διαφορές σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από την ομάδα APOE, αναφερόντουσαν στις στατιστικώς υψηλότερες τιμές γλυκόζης στο πρωτόκολλο NAD. Ωστόσο, στην ομάδα APOE, οι τιμές γλυκόζης ήταν υψηλότερες και στατιστικά διαφορετικές στο πρωτόκολλο HFD από το πρωτόκολλο NAD. Βέβαια, αυτό το στοιχείο δεν είναι και

τόσο κρίσιμο, καθώς αυτή η διαφορά εντοπίστηκε μόλις την 7η ημέρα του πειράματος και δεν εμφανίστηκε διαφορά σε καμία από τις επόμενες μετρήσεις γλυκόζης μέχρι το τέλος του πειράματος.

Αξιολόγηση ινσουλίνης πλάσματος

Στις μετρήσεις ινσουλίνης πλάσματος, δεν ανιχνεύθηκε καμία στατιστική διαφορά στις τιμές ούτε μεταξύ των ομάδων αλλά ούτε και μεταξύ των πρωτοκόλλων. Παρόλα αυτά, επισημάναμε κάποιες διαφορές μεταξύ τους, που δεν είναι στατιστικά σημαντικές, αλλά σίγουρα αξίζει να τις αναφέρουμε και τις αναλύουμε παρακάτω.

Στο πρωτόκολλο του HFD, παρατηρήσαμε ότι οι ομάδες των ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΩΝ μυών έχουν αυξημένη ινσουλίνη στο πλάσμα (ΚΑΦΕ-> 9,2 ng/mL, ΜΑΥΡΑ-> 6,8 ng/mL), σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες του πρωτοκόλλου αυτού. Αυτό σημαίνει ότι το πάγκρεας μπορεί να εκκρίνει φυσιολογικά ινσουλίνη από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, η οποία όμως να μην αξιοποιείται κατάλληλα από τον οργανισμό και έτσι να αναπτύσσεται αντίσταση των υποδοχέων ινσουλίνης σε αυτή. Ακόμη, με βάση τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος σε μύες που έχουν λάβει HFD-STZ κυμαίνονται σε τιμές μεταξύ 1-2 ng/mL (Furman, 2015; Nakamura et al., 2006). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά καθιστά τους ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΟΥΣ μύες παχύσαρκους που συνδέονται με υπερλιπιδαιμία, υπερινσουλιναιμία και δυσανεξία στη γλυκόζη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ένα προδιαβητικό στάδιο.

Στο πρωτόκολλο του NAD, παρατηρούμε μία μικρή διαφορά μεταξύ των ομάδων. Με βάση τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος σε φυσιολογικούς μύες κυμαίνονται γύρω στα 6-6,5 ng/mL, ενώ οι μύες που έχουν λάβει NAD+STZ έχουν τιμές γύρω στα 5 ng/mL (Furman, 2015; Nakamura et al., 2006). Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ινσουλίνης πλάσματος, υπάρχει μια μικρή μείωση, ~5%, από τις αντίστοιχες τιμές ινσουλίνης σε φυσιολογικούς μύες. Πιθανώς σε αυτό το αποτέλεσμα να συντελεί η δράση του νικοτιναμιδίου, το οποίο όντας αντιοξειδωτικό, προστατεύει εν μέρει τα παγκρεατικά β-κύτταρα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο κι έτσι η παραγωγή της ινσουλίνης δεν επηρεάζεται. Τα επίπεδα της ινσουλίνης πλάσματος εξαρτώνται άμεσα από την ικανότητα παραγωγής ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, οπότε στο πρωτόκολλο NAD, η παραγωγή και έκκριση ινσουλίνης φαίνεται να έχουν επηρεαστεί ελάχιστα. Σε αυτό το πρωτόκολλο δεν

εμφανίζεται ινσουλινοαντίσταση, η οποία θεωρείται ότι συμμετέχει κυρίως στη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε περίπτωση κατανάλωσης δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Lee et al., 1988, 2018). Θα μπορούσαμε να πούμε ότι το πρωτόκολλο NAD προσομοιάζει καλύτερα το διαβήτη τύπου 2 σε μη παχύσαρκα άτομα.

Αξιολόγηση κατανάλωσης τροφής

Στο πρωτόκολλο HFD, υπάρχει στατιστική διαφορά στην κατανάλωση της τροφής των μυών, η οποία είναι και εξαιρετικής σημαντικότητας ($p < 0,0001$ ****). Πιο συγκεκριμένα, οι μύες κατά την περίοδο του εγκλιματισμού έτρωγαν αρκετά την τροφή που παρασκευαζόταν, ενώ τις επόμενες εβδομάδες μέχρι και την 3η εβδομάδα που τελείωσε το πείραμα, η κατανάλωση της τροφής μειώθηκε αισθητά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ένιωθαν κορεσμό καθώς η τροφή τους ήταν πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά και σακχαρόζη. Βέβαια, οι πρωτεΐνες έχουν την υψηλότερη δύναμη κορεσμού, οι υδατάνθρακες έχουν μέτρια επίδραση στον κορεσμό, ενώ το λίπος έχει τη χαμηλότερη δύναμη κορεσμού (Stubbs et al., 1996).

Παρόμοια εικόνα διαπιστώσαμε και στους μύες του πρωτοκόλλου NAD, όπου τρέφονταν με την τροφή του εργαστηρίου, η οποία είναι ενδεδειγμένη για μύες. Αναλυτικότερα, η κατανάλωση τροφής την 1η εβδομάδα ήταν στατιστικά μεγαλύτερη σε σχέση με την κατανάλωση τη 2η εβδομάδα ($p < 0,05$ *) και πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την κατανάλωση την 3η εβδομάδα ($p < 0,01$ **). Άρα δεν μπορούμε να πούμε ότι εμφανίζεται πολυφαγία, που είναι ένα σύμπτωμα του διαβήτη τύπου 2. Ωστόσο η τροφή αυτή, που είναι ενδεδειγμένη για τα πειραματόζωα, είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, οι οποίες μειώνουν το αίσθημα της πείνας και αυξάνουν το αίσθημα κορεσμού (Stubbs et al., 1996).

Αξιολόγηση κατανάλωσης νερού

Στο πρωτόκολλο HFD, τη 2η και 3η εβδομάδα αυξάνεται η κατανάλωση νερού στους μύες και μάλιστα υπάρχει και μεγάλη στατιστική διαφορά της 2ης εβδομάδας ($p < 0,01$ **) και της 3ης εβδομάδας ($p < 0,05$ *) με την εβδομάδα εγκλιματισμού. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στην κατανάλωση λιπαρής τροφής ή/και στην πρώιμη εμφάνιση διαβήτη τύπου 2. Στο πρωτόκολλο NAD, μεγαλύτερη κατανάλωση νερού παρατηρήθηκε την 1η εβδομάδα και σε σχέση με την 3η εβδομάδα, η διαφορά ήταν

στατιστικά πολύ σημαντική ($p < 0,01$ **). Άρα δεν μπορούμε να πούμε ότι εμφανίζεται πολυδιψία μέχρι και την 3η εβδομάδα που έγιναν μετρήσεις στην κατανάλωση νερού.

Αξιολόγηση βάρους σώματος

Στο πρωτόκολλο HFD, το βάρος των μυών αυξάνεται από την πρώτη κιόλας εβδομάδα και την 35η ημέρα οι μύες ζύγιζαν τα περισσότερα κιλά σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, και είχαν γίνει πλέον παχύσαρκοι. Έτσι στατιστική διαφορά στο βάρος μυών με εξαιρετική σημαντικότητα υπάρχει από την ημέρα 7 στην ημέρα 35 ($p < 0,0001$ ****). Στο πρωτόκολλο NAD, το βάρος των μυών μειώνεται, και ιδιαίτερα την 21η ημέρα, υπάρχει στατιστική διαφορά εξαιρετικής σημαντικότητας από την ημέρα 7 ($p < 0,0001$ ****), αλλά και πάρα πολύ σημαντική διαφορά από την εβδομάδα εγκλιματισμού στην ημέρα 0 ($p < 0,001$ ***). Η απώλεια βάρους οφείλεται σε δυο κύριους παράγοντες: ο ένας είναι η απώλεια βάρους μέσω της συχνής ούρησης και ο δεύτερος έχει να κάνει με τις θερμίδες που χάνονται μέσω της ούρησης και εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν απορροφώνται από τον οργανισμό, λόγω ελλιπούς διαχείρισης της γλυκόζης. Συγκρίνοντας τα δύο πρωτόκολλα, είναι εμφανής η διαφορά στη μεταβολή του βάρους των μυών και μάλιστα υπάρχει εξαιρετικής σημαντικότητας στατιστική διαφορά τις ημέρες 14, 21 και 35 ($p < 0,0001$ ****). Με άλλα λόγια, στο πρωτόκολλο HFD, παρατηρούμε αύξηση βάρους ενώ στο πρωτόκολλο NAD το βάρος των μυών μειώνεται από εβδομάδα σε εβδομάδα. Αυτή η στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων μπορεί να σημαίνει και διαφορά στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2. Πιο συγκεκριμένα, το πρωτόκολλο HFD προσομοιάζει καλύτερα τους διαβητικούς ασθενείς οι οποίοι είναι παχύσαρκοι και μπορεί να πάσχουν και από μεταβολικό σύνδρομο. Αντίθετα, το πρωτόκολλο NAD, αναφέρεται σε διαβητικούς ασθενείς οι οποίοι δεν είναι παχύσαρκοι και το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η μειωμένη λειτουργία του παγκρέατος που συνεπάγεται και μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης.

Αξιολόγηση βιοφυσικών μετρήσεων

Η άδηλη απώλεια νερού (TEWL), αυξήθηκε στους μύες του πρωτοκόλλου NAD και η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή που μετρήθηκε κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού των μυών ($p < 0,05$ *). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ο επιδερμικός φραγμός έχει αρχίσει να αλλοιώνεται και δεν είναι πλέον τόσο αδιαπέραστος. Σε αυτό σαφώς μπορεί να έχει συμβάλει η ανάπτυξη του διαβήτη

τύπου 2. Στο πρωτόκολλο HFD, δεν υπήρχε στατιστική διαφορά μεταξύ των αρχικών και τελικών μετρήσεων της άδηλης απώλειας νερού.

Η ενυδάτωση στους μύες HFD, μειώθηκε στο τέλος του πειράματος και η μείωση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική από τις αρχικές μετρήσεις της ενυδάτωσης ($p < 0,05$ *). Αντίθετα, στους μύες του πρωτοκόλλου NAD, η ενυδάτωση αυξήθηκε στο τέλος του πειράματος και η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική από τις τιμές της ενυδάτωσης στην αρχή του πειράματος ($p < 0,05$ *).

Τέλος, το ερύθημα μετρήθηκε και στα δύο πρωτόκολλα και βρέθηκε ότι μειώθηκε στους μύες HFD με στατιστική σημαντικότητα από τις αρχικές μετρήσεις ($p < 0,05$ *), ενώ μεγαλύτερη μείωση παρουσίασαν οι μύες NAD από τις αρχικές τιμές τους ($p < 0,01$ **).

Από τις βιοφυσικές μετρήσεις που λήφθηκαν και τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν και αξιολογήθηκαν, δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, παρά μόνο για την άδηλη απώλεια νερού που αυξήθηκε στους μύες NAD. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται στην απώλεια ύδατος μέσω της συχνής ούρησης που αποτελεί ένα από τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη.

7.9.2 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»

7.9.2.1 Δοκιμαστικό πείραμα

- ο διαλύτης με αλκοόλη ρίχνει τα επίπεδα γλυκόζης -46% σε 35 min.
- το φάρμακο μαζί με την αλκοόλη στον διαλύτη ρίχνει τη γλυκόζη -48% σε 30 min και -58,5% σε 50 min.
- το φάρμακο χωρίς αλκοόλη στον διαλύτη ρίχνει τη γλυκόζη -21% σε 6 min ενώ σε 30 min παρουσιάζει μια μηδαμινή αύξηση στη γλυκόζη της τάξεως +5%.
- το ρεύμα με εφαρμογή 10 min βοηθά στην γρηγορότερη και μεγαλύτερη πτώση της γλυκόζης που οφείλεται στη δράση της αλκοόλης καθώς παρουσιάζει μείωση >-46% σε 15 min και -63% μείωση σε 30 min. Αυτό όμως δεν συμβαίνει όταν η αλκοόλη εφαρμόζεται για 10 min.
- η εφαρμογή ρεύματος για 60 min οδηγεί σε πρόκληση μεγαλύτερου στρες στον μυ, κάτι που επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

- ο η αλκοόλη επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και δεν διακρίνεται η καθαρή δράση του φαρμάκου.

7.9.2.2 Τελικό πείραμα

Ομάδα Α

A1: Διαδερμική χορήγηση Ρεπαγλινίδης

Η απόκριση των μυών στη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης ήταν διαφορετική. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι τα 20 πρώτα min υπάρχει μία μεταβολή στις τιμές γλυκόζης σε όλους τους μύες. Στα 30 min ξεκινά η διαφοροποίηση στην απόκριση των μυών στο φάρμακο. Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες συμβαίνουν από τα 30 έως τα 60 min. Τρεις μύες αύξησαν κατά $\sim +210\%$ κατά μέσο όρο από την αρχική τιμή (που λήφθηκε σε κατάσταση ηρεμίας), τη γλυκόζη τους την 1η ώρα του πειράματος. Αυτό πιθανώς δείχνει μια αρνητική αντίδραση του οργανισμού στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Τα υπόλοιπα 4 πειραματόζωα, αντέδρασαν θετικά στη χορήγηση του φαρμάκου και μέσα σε 1 ώρα η γλυκόζη τους μειώθηκε κατά μέσο όρο $\sim -43\%$ από την αρχική τιμή. Επίσης υπάρχει ακόμα ένας μυς ο οποίος παρουσίασε μία σταθερότητα στις τιμές γλυκόζης του, καθώς φάνηκε ότι μάλλον δεν τον επηρέασε το φάρμακο, αφού σημείωσε μία μικρή μείωση στη γλυκόζη του, $\sim -19\%$ εντός της 1ης ώρας του πειράματος. Αυτή η μείωση δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιοσημείωτη καθώς βρίσκεται στα όρια μεταβολής του μηχανήματος μέτρησης γλυκόζης ($\pm 15\%$) (Χαλβατσιώτης, 2015). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η χορήγηση ρεπαγλινίδης διαδερμικώς, μπορεί να προκαλέσει θετική ή αρνητική απόκριση στους μύες που συνεπάγεται μείωση ή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης αντίστοιχα εντός 1 ώρας. Στις 3 ώρες πειράματος, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσίασαν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -42\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Η καθαρή πτώση στη γλυκόζη στις 3 ώρες είναι περίπου $\sim -30\%$ (αντί $\sim -42\%$), αφαιρώντας $\sim -10\%$ λόγω της κατάστασης νηστείας των μυών.

Δεν θα μπορούσαμε να δούμε τους 3 μύες με τις ακραίες τιμές γλυκόζης ως εξωκείμενες παρατηρήσεις καθώς αποτελούν το 37,5% της πληροφορίας της ομάδας αυτής. Οπότε συμπεριλάβαμε όλους τους μύες για την επακόλουθη στατιστική

ανάλυση, υπολογίζοντας τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της ομάδας σε κάθε χρονική στιγμή αιμοληψίας. Στατιστική σημαντικότητα της % μεταβολής γλυκόζης από $t=0$ βρέθηκε στα 40 min ($p<0,05$) και στα 180 min ($p<0,01$). Ωστόσο, η σημαντικότητα στα 40 min προέκυψε καθώς τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή η % μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή είναι στη μέγιστη τιμή της σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 ώρες), που είναι $\sim+33\%$ κατά μέσο όρο. Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Αντιθέτως, η % μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο $t=0$ στο χρόνο $t=180$ min, που είναι $\sim-42\%$, είναι στατιστικά πολύ σημαντική ($p<0,01$) κάτι που σημαίνει ότι η γλυκόζη μειώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό. Ακόμη, η μεταβολή γλυκόζης από τους χρόνους 30, 35, 40, 45, 50 και 55 min στο χρόνο $t=180$ min είναι στατιστικά εξαιρετικά σημαντική ($p<0,0001$, ****) και συγκεκριμένα, $\sim-68\%$, $\sim-67\%$, $\sim-75\%$, $\sim-66\%$, $\sim-67\%$ και $\sim-63\%$ αντίστοιχα. Από τη σύγκριση της ομάδας αυτής με τις υπόλοιπες, προέκυψε στατιστική διαφορά με τις ομάδες B3 (PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ) ($p<0,01$) και D (PER OS) ($p<0,0001$). Πιο συγκεκριμένα, με τη ομάδα B3 υπήρχε στατιστική διαφορά στους ακόλουθους χρόνους : $t:0 \rightarrow 40$ min, $p<0,01$ **, $t:0 \rightarrow 45, 50, 55, 75$ min, $p<0,05$ *. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η ομάδα B3 κατάφερε να μειώσει τη γλυκόζη σε αυτούς τους χρόνους, πιο αποτελεσματικά και με στατιστική σημαντικότητα από την ομάδα A1. Όσον αφορά την ομάδα D, υπήρχε σημαντική στατιστική διαφορά στην % μεταβολή γλυκόζης σε σύγκριση με τη ομάδα A1, στους εξής χρόνους: $t:0 \rightarrow 40$, $p<0,0001$ ****, $t:0 \rightarrow 30, 45, 50, 55, 60, 75$, $p<0,001$ ***, $t:0 \rightarrow 35, 90$ $p<0,01$ **. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνει την άμεση και βραχεία δράση της ρεπαγλινίδης, χορηγούμενη δια του στόματος. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά στις % μεταβολές γλυκόζης από τις αρχικές τιμές, στις 2 και 3 ώρες λήψης γλυκόζης.

Αυτό που αξίζει να επισημανθεί, είναι το γεγονός ότι δεν υπήρχε στατιστική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα A1 και την ομάδα A2 με τη διαδερμική χορήγηση του διαλύτη. Όντας ίδια πειραματόζωα και στις δύο υποομάδες (A1, A2), ο μέσος όρος των μεταβολών γλυκόζης τους για κάθε χρόνο δεν είχε στατιστική διαφορά. Ωστόσο, θα πρέπει να μην ξεχνάμε την διαφορετική απόκριση των μυών στη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης, που είναι μια πολύ σημαντική πληροφορία η οποία δεν είναι ορατή, όταν υπολογίζουμε τον μέσο όρο όλων των μυών για κάθε χρόνο.

A2: Διαδερμική χορήγηση Διαλύτη (DMSO:PG:PEG 400:Glycerin)

Στην ομάδα αυτή, οι μύες έχουν διαφορετική απόκριση σε σύγκριση με την απόκριση που είχαν στη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης. Κι εδώ τρεις μύες παρουσιάζουν σημαντική πτώση γλυκόζης την 1η ώρα, περίπου $\sim -38\%$, ενώ άλλοι τρεις παρουσιάζουν αύξηση στη γλυκόζη τους την 1η ώρα, με μέσο όρο $\sim +45\%$. Η διαφορά με την ομάδα A1 είναι στο γεγονός ότι σε αυτή την ομάδα δεν παρουσιάζονται τόσο μεγάλες θετικές ή αρνητικές μεταβολές στις τιμές γλυκόζης. Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσιάζουν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -29\%$ από τον χρόνο $t=0$. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Έπειτα, υπολογίζοντας τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της % μεταβολής γλυκόζης για όλους τους χρόνους αιμοληψίας, διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο $t=0$ και οι στατιστικά σημαντικές μεταβολές ($p < 0,05$, * και $p < 0,01$, **) υπάρχουν στους χρόνους $t=75, 90, 120$ και 180 min, αλλά δεν είναι σημαντικές από τον χρόνο $t=0$. Η μεγαλύτερη άνοδος στην τιμή γλυκόζης συνέβη στα 12 min, περίπου $\sim +19\%$ από την αρχική τιμή, ενώ η μεγαλύτερη πτώση στη γλυκόζη έγινε στις 3 ώρες, όπου η μείωση ήταν $\sim -29\%$ κατά μέσο όρο. Από τη σύγκριση της ομάδας αυτής με τις υπόλοιπες, προέκυψε στατιστική διαφορά, εξαιρετικής σημαντικότητας ($p < 0,0001$), μόνο με την ομάδα D (PER OS), κάτι που ήταν αναμενόμενο για τη ρεπαγλινίδη που χορηγείται αποκλειστικά έως τώρα από το στόμα. Πιο συγκεκριμένα, στους παρακάτω χρόνους βρέθηκε στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ομάδων: $t:0 \rightarrow 30, 40, 45, 60$, $p < 0,01$ **, $t:0 \rightarrow 20, 25, 35, 50, 55, 75$, $p < 0,05$ *. Οπότε από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι στους χρόνους από 20 έως 75 min, φαίνεται η δράση του φαρμάκου, λαμβανόμενο από το στόμα. Δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά με τις υπόλοιπες ομάδες του πειράματος και ειδικότερα, ούτε με τις ομάδες C1 και C2 που περιλάμβαναν τη χρήση διαφορετικών τύπων ρεύματος + διαδερμική χορήγηση διαλύτη. Αυτό σημαίνει ότι η χρήση ρεύματος δεν επηρεάζει την απόκριση των μυών στη διαδερμική χορήγηση του διαλύτη.

Ομάδα Β

B1: Ρεύμα DC ON/OFF + Ρεπαγλινίδη

Το παλμικό ρεύμα δημιούργησε πιο έντονες αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης οι οποίες ήταν εμφανείς από τα 30 έως τα 60 min. Στα 30 min ξεκινά η διαφοροποίηση στην απόκριση των μυών στο φάρμακο. Σε 3 μύες υπήρχε σοβαρή αύξηση στη γλυκόζη από την αρχική τους τιμή εντός μίας ώρας κατά $\sim +138\%$ κατά μέσο όρο. Αντίθετα σε άλλους 3 μύες παρατηρήθηκε μείωση στη γλυκόζη εντός της 1ης ώρας κατά $\sim -40\%$ κατά μέσο όρο. Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσίασαν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο $\sim -38\%$ από τον χρόνο $t=0$ που είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$, *). Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη μειώθηκε ικανοποιητικά. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Και σε αυτή την ομάδα βλέπουμε μια διαφορετική απόκριση σε κάθε μυ, η οποία ήταν θετική ή αρνητική ή δεν υπήρχε καθόλου απόκριση στο φάρμακο. Το παλμικό ρεύμα, ως φυσικός ενισχυτής διείσδυσης, προκαλεί μια προσωρινή λύση του επιδερμικού φραγμού, ούτως ώστε να βοηθά στην ευκολότερη και γρηγορότερη διείσδυση του φαρμάκου από την κεράτινη στιβάδα, γεγονός που επιφέρει και γρηγορότερη απόκριση του μυός στο φάρμακο. Επομένως θα περιμέναμε να μειωθεί ο χρόνος απόκρισης των μυών στη ρεπαγλινίδη και να αυξηθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα, λαμβάνοντας μεγαλύτερη ποσοστιαία μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή σε $t=0$. Ωστόσο, στο πείραμα παρατηρήσαμε ότι το παλμικό ρεύμα ναι μεν επαύξησε τη δράση του φαρμάκου, που ήταν είτε θετική είτε αρνητική στους μύες, αλλά δεν μείωσε το χρόνο απόκρισής τους. Η % μεταβολή γλυκόζης από $t=0$ σε $t=30$ min είναι στατιστικά πολύ σημαντική ($p < 0,01$, **). Ωστόσο αυτή η μεταβολή αναφέρεται στην % αύξηση της γλυκόζης από την αρχική τιμή, η οποία αγγίζει το $\sim +47\%$ και είναι η μέγιστη τιμή γλυκόζης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 ώρες). Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Ακόμη, η μεταβολή γλυκόζης από κάθε χρόνο στο χρόνο $t=180$ min είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$, *) ή πολύ σημαντική ($p < 0,01$, **) και σε κάποιες περιπτώσεις πάρα πολύ σημαντική ($p < 0,001$, ***) και εξαιρετικά σημαντική στο $t:30 \rightarrow 180$ min ($p < 0,0001$, ****). Έπειτα συγκρίναμε την ομάδα B1 με τις εξαρτημένες ομάδες B2 και B3 αλλά και με όλες τις

υπόλοιπες ομάδες. Βρέθηκε ότι υπάρχει πολύ σημαντική στατιστική διαφορά με την ομάδα B3 ($p < 0,001$) στους εξής χρόνους: $t:0 \rightarrow 35$, $p < 0,001$ ***, $t:0 \rightarrow 30, 40, 45, 50, 60$, $p < 0,01$ **, $t:0 \rightarrow 75$, $p < 0,05$ *. Η διαφορά δηλαδή στην % μεταβολή της γλυκόζης γίνεται αντιληπτή από τα 30 min μέχρι τη 1 ώρα. Να υπενθυμίσουμε ότι οι μύες ήταν ίδιοι αλλά στην ομάδα B3 ήταν 4 σε αριθμό αντί για 8. Στατιστική διαφορά της ομάδας B1 βρέθηκε και με τις ομάδες C1 (PEYMA DC ON/OFF + ΔΙΑΛΥΤΗΣ) ($p < 0,01$) και D (PER OS) ($p < 0,0001$). Η διαφορά με την ομάδα C1 ήταν στους ακόλουθους χρόνους: $t:0 \rightarrow 30$, $p < 0,01$ **, $t:0 \rightarrow 35$, $p < 0,05$ *, δηλαδή στη χρονική στιγμή όπου η ομάδα B1 παρουσίαζε τη μεγαλύτερη αύξηση στη μεταβολή της γλυκόζης. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το παλμικό ρεύμα δεν κατάφερε να προκαλέσει γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη μείωση γλυκόζης, η οποία θα έπρεπε να διαφέρει και στατιστικά από την αντίστοιχη μείωση που εμφανίζει η ομάδα C1. Η μόνη αξιοσημείωτη διαφορά από την ομάδα C1 αλλά όχι στατιστικώς σημαντική ήταν στις 3 ώρες, όπου η μείωση της γλυκόζης ήταν ~-38%, ενώ στην ομάδα C1 η αντίστοιχη μείωση ήταν ~-24%.

B2: Ρεύμα AC + Ρεπαγλινίδη

Το εναλλασσόμενο ρεύμα προκάλεσε μεγαλύτερες μεταβολές στη γλυκόζη, είτε αρνητικές είτε θετικές, σε όλους τους μύες οι οποίες συνέβησαν πιο γρήγορα από το παλμικό ρεύμα και συγκεκριμένα, από τα πρώτα 3 min. Το ιδιάζον χαρακτηριστικό σε αυτή την ομάδα ήταν ότι οι μισοί μύες ανταποκρίνονταν θετικά στη ρεπαγλινίδη, ενώ οι άλλοι μισοί αρνητικά. Επίσης παρατηρήσαμε ότι οι μύες που ανταποκρίθηκαν θετικά στο εναλλασσόμενο ρεύμα ήταν οι ίδιοι μύες που ανταποκρίθηκαν αρνητικά στο παλμικό ρεύμα και το ανάποδο. Είδαμε δηλαδή διαφορετική συμπεριφορά των ίδιων μυών με την αλλαγή του ρεύματος. Υπήρχαν 4 μύες που παρουσίασαν μεγάλη αύξηση στη γλυκόζη τους από την αρχική τιμή την 1η ώρα του πειράματος, περίπου ~+122% κατά μέσο όρο. Οι ίδιοι μύες στη χρήση παλμικού ρεύματος παρουσίασαν μείωση γλυκόζης με μέσο όρο ~ -28% εντός της 1ης ώρας. Υπήρχαν και άλλοι 4 μύες που στο εναλλασσόμενο ρεύμα παρουσίασαν μείωση γλυκόζης κατά ~-32% εντός της 1η ώρας, ενώ με τη χρήση παλμικού ρεύματος, οι ίδιοι μύες αύξησαν τη γλυκόζη τους κατά ~+152%. Άρα το εναλλασσόμενο ρεύμα προκαλεί αντίθετη απόκριση του μυός στο φάρμακο από αυτή που προκαλείται με το παλμικό ρεύμα. Στον χρόνο $t=180$ min, που είναι και η τελευταία μέτρηση γλυκόζης, όλοι οι μύες παρουσίασαν μείωση στη γλυκόζη με μέσο όρο ~ -29% από τον χρόνο $t=0$. Ο μέσος όρος πτώσης της γλυκόζης με το παλμικό ρεύμα (-38%) ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με το εναλλασσόμενο ρεύμα

(-29%) στις 3 ώρες εφαρμογής του επιθέματος. Μέρος της πτώσης αυτής μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Η % μεταβολή γλυκόζης από $t=0$ σε $t=30, 40, 45, 50, 55$ και 60 min είναι στατιστικά σημαντική ($p<0,05, *$) και από $t: 0\rightarrow35$ min είναι πολύ σημαντική ($p<0,01, **$). Στα 35 min συνέβη η μέγιστη αύξηση στην τιμή της γλυκόζης, η οποία κατά μέσο όρο ήταν $\sim+55\%$ από την αρχική τιμή ($p<0,01$). Άρα εδώ η σημαντικότητα αφορά την αύξηση στην τιμή γλυκόζης στους χρόνους αυτούς. Αυτή η αύξηση εξηγείται από το γεγονός ότι οι μύες της ομάδας αυτής παρουσίαζαν εντελώς διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης. Στατιστική σημαντικότητα για τη μείωση της γλυκόζης στις 3 ώρες έχουμε από τα 12 min, όπου $p<0,05 (*)$ και εξαιρετική σημαντικότητα έχουμε στη μεταβολή $t: 35\rightarrow180$ min όπου $p<0,0001 (****)$. Συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες ομάδες, η ομάδα B2 είχε στατιστική διαφορά με τις ομάδες B3 (PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ) ($p<0,0001$), C2 (PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ) ($p<0,01$) και D (PER OS) ($p<0,0001$). Πιο συγκεκριμένα, με την ομάδα B3, είχε στατιστική διαφορά στους παρακάτω χρόνους: $t:0\rightarrow35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,01 **$, $t:0\rightarrow75, p<0,05 *$. Η διαφορά ήταν στο γεγονός ότι η ομάδα B2 σε αυτούς τους χρόνους παρουσίαζε μεγάλη αύξηση στις τιμές γλυκόζης, ενώ όπως θα πούμε στη συνέχεια, η ομάδα B3 παρουσίαζε μείωση. Αντίστοιχα και με την ομάδα C2, οι χρόνοι στους οποίους υπήρχε στατιστική διαφορά ήταν οι εξής: $t:0\rightarrow35, 40, 60, p<0,01 **$, $t:0\rightarrow45, 50, 55, p<0,05 *$. Εδώ θα πρέπει να πούμε ότι αυτή η διαφορά είναι ουσιαστική καθώς η σύγκριση γίνεται ανάμεσα σε μια ομάδα με φάρμακο και μια με διαλύτη. Άρα φάνηκε αξιόλογη διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες, η οποία προέκυψε πιθανώς από τη διαφορετική απόκριση των μύων στη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης και όχι σε πιθανή δράση διαλύτη. Τέλος οι χρόνοι στους οποίους υπήρχε στατιστική διαφορά με την ομάδα D ήταν οι εξής: $t:0\rightarrow35, 40, 45, 50, 55, 60, p<0,0001 ****$, $t:0\rightarrow30, 75, 90, p<0,001 ***$, $t:0\rightarrow25, 120, p<0,01 **$. Από τα 30 min μέχρι τα 120 min υπάρχει πάρα πολύ σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p<0,001$) και σε κάποια χρονικά σημεία η διαφορά είναι εξαιρετική ($p<0,0001$).

B3: Ρεύμα DC + DC ON/OFF + Ρεπαγλινίδη

Οι μύες που επιλέχτηκαν σε αυτή την υποομάδα ήταν ίδιοι με τις υποομάδες B1 και B2 αλλά σκοπίμως επιλέχτηκαν 2 μύες που παρουσίαζαν πολύ μεγάλη αύξηση στο παλμικό ρεύμα και 2 μύες που παρουσίαζαν πολύ μεγάλη αύξηση στο εναλλασσόμενο

ρεύμα. Ουσιαστικά επιλέχθηκαν 4 μύες που θεωρήθηκαν ακραίες περιπτώσεις ώστε να διερευνηθεί η απόκρισή τους στο φάρμακο υπό συνεχές + παλμικό ρεύμα. Και εδώ υπήρχε μια αύξηση στη γλυκόζη τα πρώτα 15 min σε όλους τους μύες, περίπου ~ + 20%. Ωστόσο μετά τα 30 min, οι μύες φάνηκαν να αποκρίνονται θετικά στο φάρμακο. Η μέγιστη μείωση στη γλυκόζη κατά μέσο όρο συνέβη στα 75 min, όπου η μείωση ήταν ~-30%. Το αξιοσημείωτο γεγονός ήταν ότι στις 3 ώρες η μείωση ήταν μικρότερη, ~-24%, κάτι που δε συνέβαινε στις προηγούμενες υποομάδες του ρεύματος. Ίσως αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι δημιουργείται μια ισορροπία στη μεταβολή γλυκόζης μετά τα 40 min (ως μετα-ιοντοφορητικό αποτέλεσμα) καθώς τα επίπεδα γλυκόζης δεν έχουν απότομη πτωτική τάση, όπως στην περίπτωση της per os χορήγησης. Όλοι οι μύες είχαν παρόμοια απόκριση στη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης, λαμβανόμενη υπό συνεχές παλμικό ρεύμα. Δεν έχουμε στατιστικά σημαντική μεταβολή γλυκόζης από το χρόνο t=0. Η μόνη στατιστικά σημαντική μεταβολή ($p < 0,05$, *) υπάρχει στο χρόνο t= 75min, και είναι σημαντική η μείωση γλυκόζης (-51%) από το χρόνο t=15min. Σε αυτή την ομάδα η δράση του φαρμάκου φάνηκε να είναι μόνο θετική στους μύες σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ομάδες που περιλάμβαναν τη διαδερμική χορήγηση ρεπαγλινίδης (A1, B1, B2). Στατιστική διαφορά της ομάδας B3 υπήρχε με τις ομάδες A1, B1 και B2 στους ακόλουθους χρόνους:

A1-B3: t:0->40 min, $p < 0,01$ **, t:0->45, 50, 55, 75 min, $p < 0,05$ *

B1-B3: t:0->35, $p < 0,001$ ***, t:0->30, 40, 45, 50, 60, $p < 0,01$ **, t:0->75, $p < 0,05$ *

B2-B3: t:0->35, 40, 45, 50, 55, 60, $p < 0,01$ **, t:0->75, $p < 0,05$ *

Όλοι οι παραπάνω στατιστικά σημαντικοί χρόνοι έχουν αναλυθεί εκτενώς στις προηγούμενες ομάδες. Η σημαντική διαφορά είναι ότι το συνεχές παλμικό ρεύμα, παρά τις μικρές αρχικές αυξομειώσεις στη γλυκόζη που δημιούργησε, κατάφερε να αυξήσει τη θετική δράση της ρεπαγλινίδης, η οποία δεν διέφερε στατιστικά από την αντίστοιχη δράση του φαρμάκου, λαμβανόμενο από το στόμα στην ομάδα D. Η ουσιαστική μείωση στη γλυκόζη στην ομάδα B3 ξεκινά από τα 35 min (~-17%), ενώ στην ομάδα D από τα 20 min (~-19%). Ωστόσο στην ομάδα B3 μετά τα 75 min σταματά η απότομη μείωση της γλυκόζης και φαίνεται να υπάρχει μια πιο σταθερή κατάσταση στη γλυκόζη των μυών, προσομοιώνοντας έτσι την κινητική μηδενικής τάξεως (zero order kinetic) των διαδερμικών συστημάτων, σε αντίθεση με την ομάδα D, όπου η μείωση συνεχίζεται μέχρι και την τελευταία μέτρηση γλυκόζης, στις 3 ώρες.

Ομάδα C

C1: Ρεύμα DC ON/OFF + Διαλύτης

Το παλμικό ρεύμα προκάλεσε αυξομειώσεις στις τιμές γλυκόζης σε όλους τους μύες, οι οποίες ήταν μικρότερες συγκριτικά με την ομάδα B1 που περιλάμβανε το παλμικό ρεύμα + ρεπαγλινίδη. Υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά ($p < 0,01$ **) στην % μεταβολή γλυκόζης $t = 0 \rightarrow 180$ min και εξαιρετική στατιστική διαφορά ($p < 0,0001$ ****) στην % μείωση γλυκόζης στο $t = 6 \rightarrow 180$ min. Στις 3 ώρες η πτώση στη γλυκόζη αγγίζει το ~-24% από την αρχική τιμή ($t = 0$). Η πτώση αυτή δεν οφείλεται καθαρά στον διαλύτη, αλλά μέρος της πτώσης αυτής, περίπου 10-15%, μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι οι μύες παρέμειναν νηστικοί για 3 ώρες και είχαν ελευθερία κινήσεων μέσα στον κλωβό τους, καταναλώνοντας ενέργεια (Jensen et al., 2013). Επίσης σε αυτή την πτώση δεν έχουμε συμπεριλάβει και την ευαισθησία του μετρητή γλυκόζης στη μεταβολή τιμών ($\pm 15\%$) (ΧΑΛΒΑΤΣΙΩΤΗΣ, 2015). Από τα παραπάνω, δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιήσαμε έχει ουσιαστική δράση στη μείωση των τιμών γλυκόζης. Συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες ομάδες, δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά με τις ομάδες C2 (PEYMA AC + ΔΙΑΛΥΤΗΣ) και A2 (ΔΙΑΛΥΤΗΣ) αλλά μόνο με την ομάδα B1 (PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ) στους ακόλουθους χρόνους: $t: 0 \rightarrow 30$, $p < 0,01$ **, $t: 0 \rightarrow 35$, $p < 0,05$ *, δηλαδή στα χρονικά σημεία όπου η ομάδα B1 παρουσίαζε τη μεγαλύτερη αύξηση στη μεταβολή της γλυκόζης. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκε στατιστική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα C1 και A2, σημαίνει ότι το παλμικό ρεύμα δεν επηρέασε αρνητικά την απόκριση των μυών στη διαδερμική χορήγηση του διαλύτη, ενώ στην περίπτωση του φαρμάκου, το παλμικό ρεύμα επαύξησε την θετική/αρνητική δράση της ρεπαγλινίδης.

C2: Ρεύμα AC + Διαλύτης

Το εναλλασσόμενο ρεύμα προκάλεσε λιγότερο έντονες μεταβολές στη γλυκόζη σε όλους τους μύες, με $\pm 20\%$ μεταβολή γλυκόζης τα πρώτα 10min. Οι μύες της υποομάδας αυτής ήταν ίδιοι με τους μύες της προηγούμενης υποομάδας C1, οπότε παρατηρήσαμε κάποιες ομοιότητες αλλά και διαφορές με την αλλαγή του ρεύματος από παλμικό σε εναλλασσόμενο. Στον χρόνο $t = 180$ min, παρατηρήσαμε μείωση στη γλυκόζη από την αρχική τιμή, ~-31% κατά μέσο όρο, μια πτώση που δεν περνά απαρατήρητη. Οι χρόνοι στους οποίους υπήρχε στατιστική σημαντικότητα της % μεταβολής γλυκόζης ήταν: $t: 0 \rightarrow 120, 180$, $p < 0,01$ **, $t: 0 \rightarrow 12, 75, 90$, $p < 0,05$ *. Ακόμα, υπήρχε στατιστική διαφορά μόνο με την ομάδα B2 (PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ)

($p < 0,01$, **), η οποία προέκυψε από το γεγονός ότι στην ομάδα B2 οι μύες παρουσίαζαν διαφορετική απόκριση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης και υπήρχαν πολύ μεγαλύτερες μεταβολές στις τιμές γλυκόζης κατά τη διάρκεια του πειράματος. Οι χρόνοι στους οποίους υπήρχε στατιστική διαφορά για τις ομάδες B2-C2 ήταν: $t:0 \rightarrow 35, 40, 60$, $p < 0,01$ **, $t:0 \rightarrow 45, 50, 55$, $p < 0,05$ * και έχουν αναλυθεί παραπάνω. Το ερώτημα είναι αν οι έντονες μεταβολές που δημιουργούνται στις τιμές γλυκόζης οφείλονται στο εναλλασσόμενο ρεύμα ή στη διαδερμική χορήγηση φαρμάκου. Θα προσπαθήσουμε να απαντήσουμε σε αυτό το ερώτημα στην παρακάτω ενότητα Συζήτηση.

Ομάδα D: Per os

Στη χορήγηση από του στόματος ρεπαγλινίδης, όλοι οι μύες παρουσίασαν πτωτική τάση στη γλυκόζη και φάνηκε ότι υπήρχε μια ομοιογένεια ως προς την απόκρισή τους στο φάρμακο. Με άλλα λόγια, δεν υπήρχαν τόσο έντονες μεταβολές στις τιμές γλυκόζης, κάτι που συνέβαινε με την εφαρμογή ρεύματος αλλά και του φαρμάκου διαδερμικά. Η πτώση της γλυκόζης ξεκίνησε στους περισσότερους μύες μέσα σε 10 min, ενώ σε κάποιους άλλους καθυστέρησε και ξεκίνησε περίπου σε 20 min. Το ιδιάζον χαρακτηριστικό εδώ είναι το γεγονός ότι σε 4 μύες η πτώση της γλυκόζης σταματά στην 1η ώρα, ενώ στους άλλους 4 μύες η γλυκόζη συνεχίζει να μειώνεται, προκαλώντας μάλιστα και σοβαρή υπογλυκαιμία μέχρι τις 3 ώρες, που είναι και η λήξη του πειράματος. Οι πρώτοι 4 μύες, όντας φυσιολογικοί, κατάφεραν να εξισορροπήσουν την κατάσταση υπογλυκαιμίας, απελευθερώνοντας πιθανώς την αποθηκευμένη γλυκόζη από το ήπαρ. Το ήπαρ είναι σε θέση να φέρει μια αποθηκευμένη εκδοχή γλυκόζης, το γλυκογόνο, και μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη για απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος, όταν απαιτείται. Μόλις εξαντληθούν τα αποθέματα γλυκόζης του ήπατος, τότε προκαλείται υπογλυκαιμία (Warshaw, 2017). Υπάρχει στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) στην % μεταβολή γλυκόζης από την αρχική τιμή στους χρόνους $t=30$ έως 50 min. Στους χρόνους $t=55$ έως 75 min υπάρχει πολύ μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,01$) και στους χρόνους $t=90, 120$ και 180 min, υπάρχει πάρα πολύ μεγάλη στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,001$). Δηλαδή η στατιστικά σημαντική μείωση στη γλυκόζη ξεκίνησε από τα 30 min, κάτι που ήταν αναμενόμενο, λαμβάνοντας υπόψιν το χρόνο ημίσειας ζωής του φαρμάκου που είναι $t_{1/2} = 60$ min. Σε αυτή την ομάδα, η μεταβολή της γλυκόζης κατά μέσο όρο είχε μόνο πτωτική πορεία από την αρχική της τιμή και η μεγαλύτερη πτώση συνέβη σε $t=120$

min (~52%). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες, η ομάδα D αποδείχθηκε στατιστικώς διαφορετική με εξαιρετική σημαντικότητα ($p < 0,0001$, ****) με τις εξής ομάδες: A1 (ΦΑΡΜΑΚΟ), A2 (ΔΙΑΛΥΤΗΣ), B1 (PEYMA DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ) και B2 (PEYMA AC + ΦΑΡΜΑΚΟ). Το σημαντικό και ταυτόχρονα ελπιδοφόρο είναι το γεγονός ότι δεν βρέθηκε ουσιαστική στατιστική διαφορά με την ομάδα B3 (PEYMA DC + DC ON/OFF + ΦΑΡΜΑΚΟ), κάτι που μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για περαιτέρω μελέτες.

7.10 Συζήτηση

7.10.1 1ο πείραμα: “Συγκριτική μελέτη πρόκλησης Διαβήτη Τύπου 2 σε μοντέλο άτριχων μυών”

Σε αυτό το πείραμα, περιγράφηκαν 2 διαφορετικά πρωτόκολλα πρόκλησης διαβήτη τύπου 2 σε μύες. Οι διαβητικοί μύες έχουν σαφή πλεονεκτήματα έναντι άλλων ειδών, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους των ζώων, τη σύντομη περίοδο επαγωγής διαβήτη, την ευκολία στην πρόκληση του διαβήτη και το μειωμένο κόστος (Wu and Huan, 2007). Ωστόσο, επειδή η STZ μπορεί να είναι τοξική σε όργανα και ιστούς εκτός των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα μοντέλα STZ δεν μιμούνται με ακρίβεια την ανθρώπινη κατάσταση. Ενώ ο διαβήτης τύπου 2 είναι η κυρίαρχη μορφή του διαβήτη στους ανθρώπους, στην ανάπτυξη ενός τέτοιου ζωικού μοντέλου οι προκλήσεις είναι μεγαλύτερες από ό, τι για το διαβήτη τύπου 1. Γενετικά μοντέλα, ειδικά το πρότυπο διαβητικών και παχύσαρκων μυών db / db, ίσως να προσομοιάζουν καλύτερα την ανθρώπινη νόσο. Παρ 'όλα αυτά, η χρήση τους είναι περιορισμένη επειδή παρουσιάζουν ορισμένες σημαντικές διαφορές από την ανθρώπινη κατάσταση (Wang et al., 2014) και είναι πολύ ακριβά. Γι'αυτό το λόγο θέλαμε να δούμε αν προκαλείται διαβήτης τύπου 2 σε άτριχους μύες, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιο εύκολα σε μια μελλοντική μελέτη διαδερμικής χορήγησης αντιδιαβητικών φαρμάκων. Αναλυτικότερα, εφαρμόσαμε δύο μοντέλα διαβήτη τύπου 2 που χρησιμοποιούνται περισσότερο συχνά σε αντίστοιχες μελέτες.

Το διαβητικό μοντέλο, που αναπτύχθηκε με STZ / NAD, έχει χαρακτηριστικά αρκετά παρόμοια με τον μη-παχύσαρκο διαβήτη τύπου 2, όπως υποδεικνύεται από τα ακόλουθα σημαντικά χαρακτηριστικά. Πιο αναλυτικά, το μοντέλο διαβητικού μυός που

προκαλείται από STZ / NAD είναι ο μη παχύσαρκος τύπος, στον οποίο η ανοχή γλυκόζης ήταν ελαφρά εξασθενημένη. Έδειξε μερικώς αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης νηστείας την 3η εβδομάδα (όπου την 5η εβδομάδα, η γλυκόζη είχε αυξηθεί αρκετά), μείωση σωματικού βάρους και φυσιολογικά επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος, χωρίς δηλαδή να αναπτύσσεται αντίσταση στην ινσουλίνη, αν και πρέπει έχει μειωμένη περιεκτικότητα σε παγκρεατική ινσουλίνη.

Στο δεύτερο μοντέλο τα STZ / HFD διαβητικά ποντίκια ανέπτυξαν αρκετά εύκολα αντίσταση στην ινσουλίνη, όταν ταΐστηκαν με δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και σακχαρόζη. Το μοντέλο με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι θεωρείται γενικά το καλύτερο μοντέλο για το χαρακτηρισμό πολλών επιπλοκών που σχετίζονται με τον ανθρώπινο διαβήτη.

Όσον αφορά την αντίσταση στην ινσουλίνη, είναι η κατάσταση κατά την οποία έχει χαθεί, εν μέρει, η ικανότητα της ινσουλίνης να ωθεί τη γλυκόζη μέσα στους ιστούς του σώματος. Η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για να εισέλθει η γλυκόζη στα περισσότερα κύτταρα του σώματος, όπου χρησιμοποιείται για να παράγει ενέργεια. Μετά από ένα σύνηθες γεύμα που περιέχει υδατάνθρακες, η γλυκόζη κυκλοφορεί στο αίμα και «ενεργοποιεί» το πάγκρεας να παράγει ινσουλίνη. Χωρίς την ινσουλίνη, πολύ λίγη γλυκόζη μπορεί να εισέλθει στα μυϊκά κύτταρα και σε άλλους ιστούς (στον εγκέφαλο η γλυκόζη εισέρχεται χωρίς τη βοήθεια της ινσουλίνης). Η ινσουλίνη βοηθάει επίσης τα αμινοξέα (τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών) να εισέλθουν στα μυϊκά κύτταρα. Τέλος η ινσουλίνη εμποδίζει την λιπόλυση, δηλαδή τη διάσπαση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων και την έξοδο των λιπαρών οξέων από τις αποθήκες τους προς την κυκλοφορία του αίματος. Όταν υπάρχει αντίσταση στην ινσουλίνη, το πάγκρεας αναγκάζεται να παράγει περισσότερη ποσότητα ινσουλίνης από το κανονικό (διπλάσια ή ακόμα και τετραπλάσια ποσότητα) κι έτσι τελικά η γλυκόζη εισέρχεται μέσα στα μυϊκά κύτταρα για να δώσει ενέργεια. Η υπερπαραγωγή ινσουλίνης (υπερινσουλιναιμία) σημαίνει ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει εύκολα στα μυϊκά κύτταρα, στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Το πάγκρεας παράγει μεγάλη ποσότητα ινσουλίνης για να υπερνικήσει την αντίσταση των κυττάρων. Σταδιακά, αυτή η κατάσταση μπορεί να εξαντλήσει τα β-κύτταρα του παγκρέατος και να τα κάνει να χάσουν την παραγωγική τους ικανότητα. Μερικές φορές, τα β-κύτταρα του παγκρέατος αρχίζουν να αποπύπτουν με ρυθμό 4% το χρόνο και έτσι δεν μπορεί να παραχθεί πλέον αρκετή ινσουλίνη. Το αποτέλεσμα είναι η γλυκόζη να παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στο

αίμα, δηλαδή να εμφανίζεται ο διαβήτης τύπου 2. Ένας διαβητικός ασθενής αρχικά εμφανίζει υπερινσουλιναμία και στη συνέχεια αρχίζει να έχει μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης. Αντίσταση στην ινσουλίνη έχουν κατά πάσα πιθανότητα αυτοί που εμφανίζουν τις τέσσερις «κακές» ενδείξεις: υψηλή γλυκόζη στο αίμα, πολλά τριγλυκερίδια, λίγη καλή χοληστερόλη (HDL) και υψηλή αρτηριακή πίεση. Πίσω από αυτή την τετράδα που ο ενδοκρινολόγος Gerald Reaven του Πανεπιστημίου Στάνφορντ αποκάλεσε αρχικά Σύνδρομο X (τώρα λέγεται Μεταβολικό Σύνδρομο) κρύβεται η αντίσταση στην ινσουλίνη (Kim and Abbasi, 2019).

Το ήπαρ είναι υπεύθυνο μεταξύ των γευμάτων και στη διάρκεια του ύπνου να παράγει γλυκόζη για να διατηρείται μια σταθερή τιμή σακχάρου στο αίμα. Κατά τη διάρκεια των γευμάτων, η παραγόμενη ινσουλίνη σηματοδοτεί το ήπαρ, ώστε να σταματήσει τη δική του παραγωγή σακχάρων, μιας και το γεύμα παρέχει έτοιμα σάκχαρα. Στην περίπτωση που το ήπαρ έχει λιπώδη διήθηση, έχει αναπτύξει ινσουλινοαντίσταση, με αποτέλεσμα η ινσουλίνη που παράγεται με το γεύμα να μην μπορεί να αναστείλει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έρχεται γλυκόζη από το φαγητό, αλλά και από το ήπαρ, επειδή δεν σταματάει η δική του παραγωγή σακχάρων. Τα αυξημένα σάκχαρα απαιτούν υψηλότερη παραγωγή ινσουλίνης, η οποία χειροτερεύει την εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, ενώ προκαλεί εναπόθεση λίπους και στο πάγκρεας. Η λιπώδης διήθηση του παγκρέατος δημιουργεί δυσλειτουργία στην παραγωγή της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα ανεπαρκή έκκρισή της και τελικά απορρύθμιση του σακχάρου. Αυτός ο φαύλος κύκλος επιτείνεται συνεχώς και μπορεί να περάσει διάστημα αρκετών ετών μέχρι να εμφανιστεί η διαταραχή στο σάκχαρο του αίματος και ο σακχαρώδης διαβήτης. Η μη αναστρέψιμη απώλεια και δυσλειτουργία των κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη (β-κύτταρα) θέλει περίπου 2 χρόνια να εμφανιστεί και σταδιακά χειροτερεύει (American Diabetes Association, 2013).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη στο ήπαρ θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως στη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε περίπτωση κατανάλωσης δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Lee et al., 1988). Υπάρχουν πολλές έρευνες στις οποίες έχει αποδειχθεί ότι η διατροφή πλούσια σε λιπαρά προκαλεί παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη (Akiyama et al., 1996; Pedersen et al., 1991). Μετά από ένα τυπικό γεύμα, ενώ κυκλοφορεί αρκετή γλυκόζη και ινσουλίνη στο αίμα, υπάρχει συγχρόνως ακατάσχετη έξοδος λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό που φτάνουν στο

ήπαρ και μετατρέπονται σε τριγλυκερίδια. Η γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια ανταγωνίζονται μεταξύ τους ποιο θα αποτελέσει το καύσιμο των κυττάρων. Ωστόσο τόσο η γλυκόζη όσο και τα τριγλυκερίδια δεν παύουν να βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο αίμα. Έτσι προκύπτουν τα δύο βασικά χαρακτηριστικά του Μεταβολικού Συνδρόμου. Βάσει της σημαντικής μείωσης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη μετά από μια διατροφή πολύ υψηλή σε λίπος και κορεσμένα λιπαρά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι μια τέτοια δίαιτα μπορεί να είναι επιζήμια για την ομοίωση της γλυκόζης και θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2.

Κρίσιμες παράμετροι

Για το μοντέλο STZ/NAD, οι κύριες μεταβλητές είναι οι δόσεις του NAD (60 έως 290 mg / kg, i.p.) και της STZ (45 έως 100 mg / kg, i.p. ή i.v.), και όχι τόσο το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο ενέσεων, καθώς υπάρχει γενική ομοφωνία στα 15 λεπτά (Ghasemi et al., 2014). Στο μοντέλο STZ / HFD, οι μεταβλητές είναι πιο πολλές και πιο κρίσιμες, καθώς υπάρχει περίπτωση να αλλάζει η περιεκτικότητα του λίπους (40% έως 60%), η διάρκεια της διατροφής πριν από την ένεση STZ (2 έως 12 εβδομάδες), η συμπερίληψη (ή όχι) σακχαρόζης, η δόση και η οδός χορήγησης της STZ (15, 35 ή 50 mg / kg ενδοφλεβίως ή 25 έως 75 mg / kg, i.p .) (Skonvsø, 2014). Πράγματι, σε μια έρευνα, η STZ χορηγήθηκε σε νεογνικούς μύες, ακολουθούμενη από τη δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Mancini et al., 2013).

Ευαισθησία του μύος στην STZ

Υπάρχει έντονη επιρροή του φύλου στους μύες για την ανάπτυξη του διαβήτη. Ενώ τα θηλυκά είναι ανθεκτικά στα αποτελέσματα των χαμηλών δόσεων STZ, αυτό μπορεί να ξεπεραστεί αυξάνοντας τη δόση (Kolb, 1987). Αυτό συμβαίνει γιατί οι αρσενικοί μύες έχουν πιο επιρρεπή παγκρεατικά β-κύτταρα από τους θηλυκούς μύες, σε προκαλούμενη από STZ κυτταροτοξικότητα, λόγω της έλλειψης οιστρογόνων (Paik et al., 1982). Τα διαφορετικά είδη μυών εμφανίζουν διαφορετικές ευαισθησίες στην STZ. Ζωικά πρότυπα όπως τα CD-1 και C57BL/6 ποντίκια είναι ευαίσθητα σε αυτή την τοξίνη (Like and Rossini, 1976; Rossini et al., 1977). Σε αντίθεση, τα Balb / cJ είναι ανθεκτικά στο διαβήτη (Zunino et al., 1994). Εάν τα επίπεδα γλυκόζης-νηστείας στο αίμα δεν ξεπερνούν τα 126 mg / dl σε 3 ή 4 εβδομάδες μετά την ένεση της STZ (American Diabetes Association, 2014), είναι πιθανόν αυτά τα ζωικά πρότυπα να μην είναι ευαίσθητα σε αυτή την τοξίνη. Στο πείραμά μας, στο πρωτόκολλο NAD, ήδη από τη 2η εβδομάδα, τα είδη ΑΣΠΡΑ, ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, είχαν >130 mg/dl γλυκόζη

νηστείας, ενώ τα APOE, την 5η εβδομάδα κατάφεραν να ξεπεράσουν αυτό το όριο. Στο πρωτόκολλο HFD, οι τιμές γλυκόζης-νηστείας έχουν μια πιο βραδεία αύξηση που σαφώς οφείλεται και στη μικρότερη δόση της STZ, αλλά και στον διαφορετικό μηχανισμό ανάπτυξης διαβήτη τύπου 2. Και εδώ ξεχωρίζουν τα ΚΑΦΕ, καθώς από την 2η εβδομάδα έχουν ξεπεράσει τα 126 mg/dl στη γλυκόζη νηστείας. Τα υπόλοιπα είδη έχουν παρόμοια βραδεία αύξηση και μόνο τα ΑΣΠΡΑ κατάφεραν να ξεπεράσουν τα 126mg/dl την 5η και τελευταία εβδομάδα.

Σε προηγούμενες μελέτες, τα διαβητικά μοντέλα τύπου 2 έγιναν σε μύες ή επίμυες με πολλαπλή χορήγηση χαμηλής δόσης (MLD) της STZ (40 mg / kg, ip, κάθε 5 ημέρες), με στόχο την προσαρμογή του βαθμού καταστροφής των β κυττάρων (Ito et al., 2001; Paik et al., 1980). Το μοντέλο MLD-STZ χρειάζεται, ωστόσο, τουλάχιστον δώδεκα εβδομάδες για να γίνουν τα διαβητικά συμπτώματα σταθερά. Επιπλέον, για τον πλήρη έλεγχο της ασθένειας χρειάζεται εκλεπτυσμένη προσαρμογή της δόσης της STZ καθ'όλη τη διάρκεια της χορήγησής της. Στο μη παχύσαρκο-διαβητικό μοντέλο τύπου 2 με συνδυασμένη εφαρμογή STZ και NAD που εφαρμόσαμε, χρειάστηκαν μόνο 5 εβδομάδες για την καθιέρωση του διαβήτη. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό σε αυτό το μοντέλο ποντικίου είναι ότι η έκκριση ινσουλίνης στο πλάσμα ήταν φυσιολογική και δεν έδειξε την ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη σε αντίθεση με το παχύσαρκο μοντέλο διαβητικού μυός, όπου η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά προκάλεσε ινσουλινοαντίσταση στο ήπαρ. Αιτία της εμφάνισης αντοχής στην ινσουλίνη πιθανώς να είναι η εμφάνιση υπερλιπιδαιμίας στα παχύσαρκα ποντίκια. Τα παρόντα μοντέλα διαβητικών μυών είναι πολύ χρήσιμα για τη διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού στα μη παχύσαρκα και παχύσαρκα άτομα του διαβήτη τύπου 2 και για τον έλεγχο πιθανών φαρμάκων για την καταστολή της ανάπτυξης της αντίστασης στην ινσουλίνη στον διαβήτη τύπου 2.

Μετρήσεις νηστείας πέντε ωρών

Οι μύες είναι νυκτόβιοι οργανισμοί, οπότε μια ολονύκτια νηστεία θα τους οδηγούσε σε βαθιά εξάντληση των αποθεμάτων γλυκόζης και σε βαθιά λιμοκτονία. Αντ' αυτού, μια περίοδος νηστείας 5 ωρών θεωρείται ότι είναι επαρκής για τον ορισμό της νηστείας στα μικρά τρωκτικά, καθώς αποφεύγεται η μαζική μείωση της περιεκτικότητας σε λιπαρά και γλυκόζης (Agouni et al., 2010; Mutel et al., 2011; Pacini et al., 2013). Τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και μη νηστείας στο αίμα των μυών είναι αρκετά

διαφορετικά. Τα απόλυτα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε κατάσταση νηστείας είναι χαμηλότερα και λιγότερο μεταβλητά από ότι σε κατάσταση μη νηστείας (Andrikopoulos et al., 2008). Οπότε καταλήξαμε να μετράμε τη γλυκόζη μετά από νηστεία 5 ωρών καθώς και την ινσουλίνη πλάσματος την τελευταία ημέρα κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Ανακεφαλαιώνοντας, στο πρωτόκολλο NAD, τα ΚΑΦΕ & ΜΑΥΡΑ, έδειξαν να είναι πιο επιρρεπή στην STZ, ενώ στο πρωτόκολλο HFD, τα ΑΣΠΡΑ & ΚΑΦΕ. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι τα άλλα ζωικά πρότυπα δεν μπορούν να αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2, αλλά προφανώς αδυνατούν να τον αναπτύξουν κάτω από αυτές τις συνθήκες. Δηλαδή, αν αλλάζαμε κάποιες κρίσιμες παραμέτρους, όπως π.χ. τη δόση της STZ ή την ηλικία των χρησιμοποιούμενων μυών, ίσως να παίρναμε διαφορετικά αποτελέσματα.

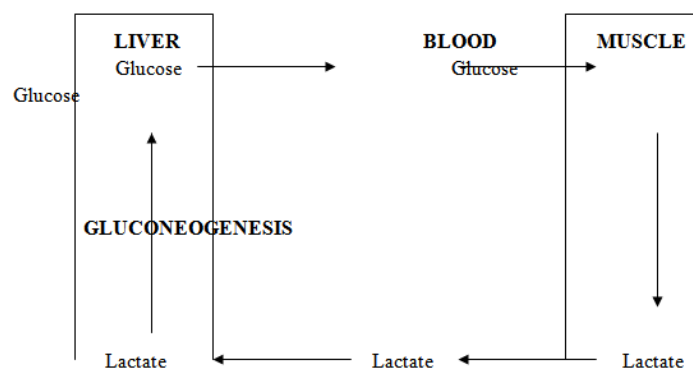
Συμπεραίνεται ότι η μοντελοποίηση του διαβήτη με έγχυση STZ απαιτεί ευρέως την ανάγκη βελτιστοποίησης των ζωικών προτύπων ώστε αυτά να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν καλύτερα τη ανθρώπινη παθολογική κατάσταση σε περίπτωση διαβήτη.

7.10.2 2ο πείραμα: «Μελέτη δράσεως διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης με χρήση ιοντοφόρησης σε μοντέλο άτριχων μυών»

7.10.2.1 Δοκιμαστικό πείραμα

Η αιθανόλη έδειξε ότι έχει συνεργιστική δράση με τη ρεπαγλινίδα στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν κατανοήσουμε το μηχανισμό δράσης της. Πιο συγκεκριμένα, η αιθανόλη είναι κατασταλτική και χαρακτηρίζεται ως «ηρεμιστικό-υπνωτικό φάρμακο» επειδή καταστέλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα. Κάθε όργανο στο σώμα μπορεί να επηρεαστεί από το αλκοόλ. Μόλις καταναλωθεί, απορροφάται γρήγορα από το στομάχι και το λεπτό έντερο και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η αιθανόλη μπορεί να επηρεάσει το σάκχαρο του αίματος καθώς και τις ορμόνες που απαιτούνται για τη διατήρηση υγιών επιπέδων σακχάρου στο αίμα. Για να καταλάβουμε πώς το αλκοόλ μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας, βοηθά να καταλάβουμε πώς λειτουργεί το ήπαρ. Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος, απελευθερώνοντας σταθερά τη γλυκόζη στο αίμα μέσα στην ημέρα. Στο ήπαρ αποθηκεύεται το γλυκογόνο του οργανισμού το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη και να εισαχθεί στην κυκλοφορία του αίματος. Η αιθανόλη μπορεί να προκαλέσει πτώση της γλυκόζης του

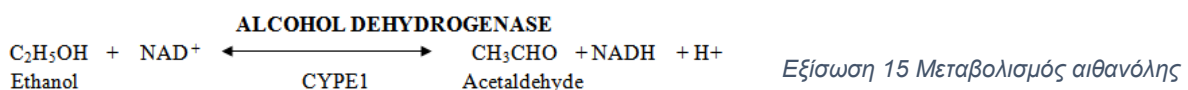
αίματος, επειδή εμποδίζει την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ. Μόλις εξαντληθούν τα αποθέματα γλυκόζης του ήπατος, τότε προκαλείται υπογλυκαιμία (Warshaw, 2017). Σε προηγούμενες έρευνες, μελέτησαν την επίδραση της αλκοόλης στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του γαλακτικού (2-υδροξυπροπανικό οξύ). Αποδείχθηκε ότι τόσο η ανακύκλωση της γλυκόζης όσο και η μετατροπή της γλυκόζης στο γαλακτικό μειώθηκαν, υποδεικνύοντας ότι η αιθανόλη ανέστειλε την περιφερική χρήση γλυκόζης. Έτσι συμπέραναν ότι η αιθανόλη μειώνει τη μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό καθώς και τη μετατροπή του γαλακτικού σε γλυκόζη, αναστέλλοντας έτσι τον κύκλο Cori (Kandi et al., 2014a; Kreisberg et al., 1971).



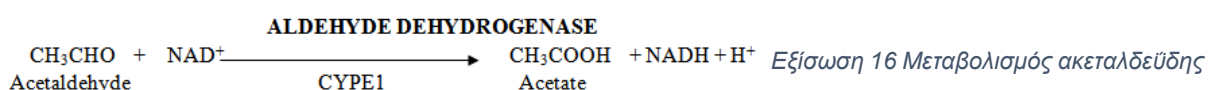
Εικόνα 67 Κύκλος Cori (Kandi et al., 2014a)

Μεταβολισμός αλκοόλης

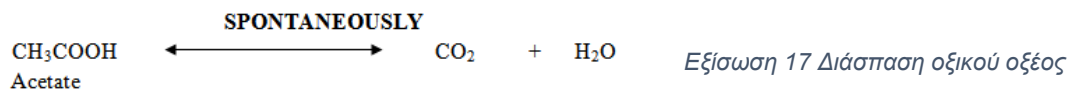
Η αιθανόλη μεταβολίζεται στο ήπαρ μέσω της αλκοολικής αφυδρογονάσης σε ακεταλδεΐδη, και μετατρέπει το NAD^+ σε NADH που διευκολύνεται από το κυτόχρωμα P450 E1 (CYP E1).



Η ακεταλδεΐδη μεταβολίζεται από την αφυδρογονάση της αλδεΐδης για να παραχθεί οξικό οξύ, και το NAD^+ μετατρέπεται σε $\text{NADH} + \text{H}^+$ (δεύτερο στάδιο). Αυτό το στάδιο επίσης λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και διευκολύνεται από το CYPE1.



Το οξικό οξύ που παράγεται από τη διάσπαση της αιθανόλης, αφήνει το ήπαρ για το μεταβολισμό του σε επιπλέον ηπατικούς ιστούς όπως οι σκελετικούς μύες. Το οξικό οξύ διασπάται αυθόρμητα σε CO₂ και H₂O.



Έτσι, ο μεταβολισμός της αιθανόλης μειώνει σημαντικά την αναλογία ηπατικού NAD⁺ / NADH (Kandi et al., 2014b).

Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού της αιθανόλης υπάρχουν αυξημένα επίπεδα NADH, τα οποία επηρεάζουν αρκετές κρίσιμες αφυδρογονάσεις στο ήπαρ που απαιτούνται για τη γλυκονεογένεση (Krebs et al., 1969). Έτσι, η κατανάλωση αιθανόλης αυξάνει τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στο αίμα, ενώ μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης. Σε πειραματικές μελέτες που διεξήχθησαν σε επίμυες για να ερευνηθούν την επίδραση της αιθανόλης στην κατάσταση ηπατικής οξειδοαναγωγής (NAD⁺ / NADH), παρατήρησαν αλλαγή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση (Stubbs et al., 1972). Αυτή η αλλαγή στην κατάσταση οξειδοαναγωγής έχει βαθιά επίδραση στις μεταβολικές διεργασίες στο ήπαρ, καθώς τόσο ο μεταβολισμός της αιθανόλης όσο και η γλυκονεογένεση, μεταβάλλουν τη σχέση NAD⁺ / NADH (Hammerstedt et al., 2011).

Αιθανόλη & Υπογλυκαιμία

Η οξείδωση αιθανόλης αυξάνει τα επίπεδα NADH τα οποία αναστέλλουν τα βασικά ή ρυθμιστικά ένζυμα της γλυκονεογένεσης και έτσι εμποδίζει την απελευθέρωση γλυκόζης από το ήπαρ, γεγονός το οποίο οδηγεί σε υπογλυκαιμία (American Diabetes Association, 2013; Steiner et al., 2015). Το αλκοόλ ασκεί ουσιαστικές επιδράσεις στην παγκρεατική μικροκυκλοφορία προκαλώντας μια σημαντική ανακατανομή της ροής του παγκρεατικού αίματος από την εξωκρινή στην ενδοκρινή μοίρα, η οποία παράγει και την ινσουλίνη, μέσω μηχανισμών που μεσολαβούν, αυξάνοντας έτσι την έκκριση της αργής φάσης της ινσουλίνης και οδηγώντας σε υπογλυκαιμία (Williams, 1984).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεράσματα αλλά και τη συμπεριφορά του μύος κατά την εκτέλεση του δοκιμαστικού πειράματος, κρίναμε απαραίτητο να αλλάξουμε κάποιες παραμέτρους για να πετύχουμε όσο το δυνατό βελτιστοποίηση στις συνθήκες του τελικού πειράματος. Οι συνθήκες αυτές έχουν περιγραφεί λεπτομερώς παραπάνω, στις μεθόδους του πειράματος (σελ.128).

7.10.2.2 Τελικό πείραμα

Από τους βασικούς στόχους της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί αν το παλμικό, το εναλλασσόμενο ρεύμα και το συνεχές-παλμικό ρεύμα διαφέρουν ως προς την επίδραση στο φραγμό του δέρματος και την ικανότητα διαπερατότητας του φαρμάκου. Αυτό που διαπιστώσαμε ήταν ότι στις ομάδες που χρησιμοποιήθηκε παλμικό (B1, C1), εναλλασσόμενο (B2, C2) ή συνεχές παλμικό ρεύμα (B3), δημιουργήθηκαν έντονες μεταβολές στη γλυκόζη, ιδιαίτερα στα 10 πρώτα λεπτά εφαρμογής του ρεύματος. Παρόλο που η ενεργός τιμή του ρεύματος ήταν ίδια σε όλες τις περιπτώσεις, η απόκριση των μυών ήταν διαφορετική ανάλογα με τον τύπο ρεύματος που εφαρμοζόταν. Να σημειωθεί ότι οι ίδιοι μύες εμφάνισαν διαφορετική συμπεριφορά στους 3 τύπους ρεύματος.

Πιο αναλυτικά, το παλμικό ρεύμα επαύξησε ή αλλιώς επιτάχυνε τη δράση του φαρμάκου, η οποία ήταν θετική σε κάποιους μύες, ενώ σε άλλους αρνητική. Άξιο αναφοράς είναι ότι ένας μύς από τους οκτώ της ομάδας δεν επηρεάστηκε καθόλου από τη χορήγηση του φαρμάκου. Αυτή η επαύξηση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το παλμικό ρεύμα, προκαλώντας μια προσωρινή διαταραχή του επιδερμικού φραγμού, βοηθά με φυσικό τρόπο στην ευκολότερη και ταχύτερη διείσδυση του φαρμάκου από την κεράτινη στιβάδα, γεγονός που επιφέρει και γρηγορότερη απόκριση του μυός στο φάρμακο. Το παλμικό ρεύμα εισάγει συγκεκριμένα ιόντα και όχι τυχαία και στη συγκεκριμένη περίπτωση εισήγαγε τα θετικά ιόντα του φαρμάκου και του διαλύτη, καθώς το φάρμακο βρισκόταν στον πόλο με (+) πρόσημο (άνοδος). Επειδή το ρεύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ON/OFF, δηλαδή δεν ήταν συνεχές, κατά τη φάση OFF ($t_{\text{off}}=0,5 \text{ ms}$), τα ιόντα που είχαν αποκτήσει κίνηση λόγω του ρεύματος, έχαναν την επιτάχυνση λόγω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου, με αποτέλεσμα αυτό να δημιουργεί έντονες ταλαντώσεις στις τιμές γλυκόζης στα πρώτα 10 min εφαρμογής του ρεύματος αλλά και στρες στο μυ. Με τη χρήση του ρεύματος, θα περιμέναμε να διεισδύσει πιο γρήγορα το φάρμακο αυξάνοντας παράλληλα και τη βιοδιαθεσιμότητά του στο αίμα και να μειώσει τη γλυκόζη ικανοποιητικά στα 10 πρώτα λεπτά εφαρμογής του ρεύματος. Ωστόσο παρατηρείται μια καθυστερημένη αντίδραση των μυών στην πτώση της γλυκόζης που δεν οφείλεται άμεσα στο ρεύμα, αλλά μάλλον στα θετικά ιόντα του φαρμάκου που διαπερνούν την κεράτινη στιβάδα, υποβοηθούμενα από το ρεύμα και δεν μπορούν να μειώσουν τόσο γρήγορα και αποτελεσματικά τη γλυκόζη. Μια άλλη άποψη είναι ότι το παλμικό ρεύμα δημιουργεί στρες στους μύες και είναι

αδύνατον να ανταποκριθούν στο φάρμακο, καθώς γνωρίζουμε ότι το στρες αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Folmer et al., 2002; Wellen and Hotamisligil, 2005). Σε αυτή την περίπτωση όμως θα περιμέναμε η πτώση της γλυκόζης να συμβεί λίγο μετά το τέλος εφαρμογής του ρεύματος, κάτι που συνέβη μετά τα 60 min. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν και τη συμπεριφορά των μυών στην εφαρμογή παλμικού ρεύματος και διαλύτη, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι έντονες αυξομειώσεις που συμβαίνουν τα πρώτα 10 min οφείλονται στο παλμικό ρεύμα, ενώ μετά τα 10 min, καθοριστικό ρόλο παίζουν τα ιόντα που έχουν αποκτήσει κίνηση και δημιουργούν ή όχι μια αναταραχή στους μύες. Αυτό θα μπορούσαμε να το χαρακτηρίσουμε ως μετα-ιοντοφορητικό αποτέλεσμα. Από τα παραπάνω συμπεράσματα προκύπτει η άποψη ότι οι αλλαγές των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών οφείλονται στο φάρμακο και όχι στο παλμικό ρεύμα.

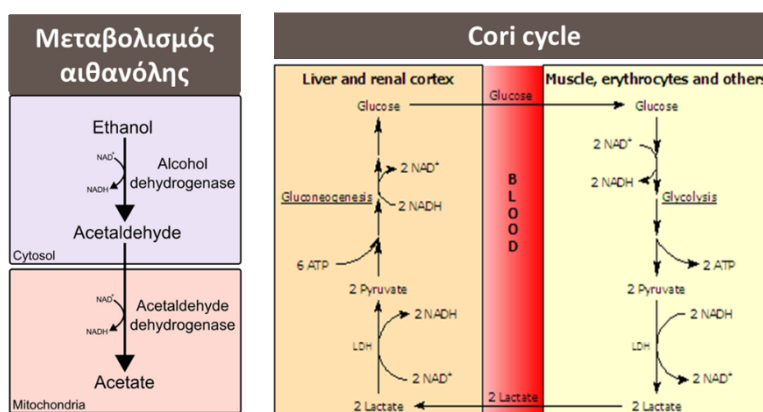
Όσον αφορά το εναλλασσόμενο ρεύμα, προκαλεί αντίθετη απόκριση του μυός στο φάρμακο από αυτή με το παλμικό ρεύμα. Παρόλο που υπάρχει ίδια ροή ρεύματος στο χρόνο και στο παλμικό και στο εναλλασσόμενο, το εναλλασσόμενο ρεύμα δημιουργεί μεγαλύτερη μεταβολή στη γλυκόζη όταν χρησιμοποιείται με το φάρμακο. Στην ομάδα με το εναλλασσόμενο ρεύμα και τον διαλύτη, δεν φάνηκε τόσο αυτή η «αναταραχή», ίσως επειδή τα σχηματιζόμενα ιόντα του διαλύτη να μην επηρέασαν τόσο αρνητικά την απόκριση των μυών. Άρα το παρατεταμένο στρες που φαίνεται ότι προκαλείται στους μύες πιθανώς οφείλεται σε κάποια ιόντα του φαρμάκου και όχι του διαλύτη. Το εναλλασσόμενο ρεύμα ωθεί και τα θετικά και τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και του φορέα διάλυσης με αποτέλεσμα να παραμένει ασαφές ποιο ιόν του φαρμάκου είναι αυτό που ασκεί τη θετική απόκριση στους μύες. Επιπλέον, ένα άλλο χαρακτηριστικό του εναλλασσόμενου ρεύματος είναι το γεγονός ότι τα σχηματιζόμενα ιόντα δεν χάνουν την κίνησή τους, οπότε η δράση του φαρμάκου είτε θετική είτε αρνητική είναι, μπορεί να παρατηρηθεί από τα πρώτα κιόλας 10 min. Άρα εμφανίζει τη δράση του φαρμάκου πιο γρήγορα. Κι εδώ παρατηρήσαμε ένα μετα-ιοντοφορητικό αποτέλεσμα, το οποίο ήταν οι πολύ έντονες αλλαγές στη γλυκόζη μετά τα 10 min εφαρμογής του ρεύματος, που πιθανώς να οφείλεται στην κίνηση των ιόντων του φαρμάκου. Με το εναλλασσόμενο ρεύμα, δεν μπορούμε να καταλάβουμε ποια ιόντα περνάνε τον επιδερμικό φραγμό, φτάνουν στην αιματική κυκλοφορία και μειώνουν τη γλυκόζη και ποια την αυξάνουν.

Το συνεχές παλμικό ρεύμα δημιούργησε στην αρχή και αυτό μεταβολές στη γλυκόζη, αλλά δεν ήταν τόσο έντονες συγκριτικά με αυτές που δημιούργησαν το παλμικό και το εναλλασσόμενο ρεύμα. Και αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι το ρεύμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνεχές, δηλαδή δεν ήταν ON/OFF και τα ιόντα είχαν συνεχή ροή προς μία κατεύθυνση κάτι που δεν συνέβαινε με τη χρήση παλμικού ρεύματος, όπου κατά την φάση του OFF τα ιόντα έχαναν την επιτάχυνσή τους, δημιουργώντας έντονες μεταβολές στη γλυκόζη. Έτσι αυτό το γεγονός δημιούργησε λιγότερες και μικρότερες αλλαγές στις τιμές γλυκόζης στα πρώτα 10 min εφαρμογής του ρεύματος. Το συνεχές παλμικό ρεύμα εισάγει συγκεκριμένα ιόντα και όχι τυχαία και στη συγκεκριμένη περίπτωση εισήγαγε τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και του διαλύτη, καθώς το φάρμακο βρισκόταν στον πόλο με (-) πρόσημο (κάθοδος). Εισάγοντας τα αρνητικά ιόντα του φαρμάκου και με χρήση συνεχούς παλμικού ρεύματος, αποφύγαμε την αρνητική αλλά και την καθυστερημένη απόκριση των μυών στη ρεπαγλινίδη. Μια άλλη άποψη είναι ότι οι μύες ανταποκρίθηκαν θετικά στην εφαρμογή ρεύματος και στη χορήγηση φαρμάκου σε αυτή την ομάδα καθώς είχαν προσαρμοσθεί σε αυτές τις συνθήκες από τις προηγούμενες ομάδες (B1, B2) και έτσι είχαν αναπτύξει μια «μνήμη» στην εφαρμογή του ρεύματος, η οποία τους βοήθησε στη βραχύτερη απόκριση στο φάρμακο. Και εδώ τίθεται το ερώτημα αν είναι θέμα προσαρμοστικότητας η ανταπόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως εδώ στο ρεύμα και το φάρμακο.

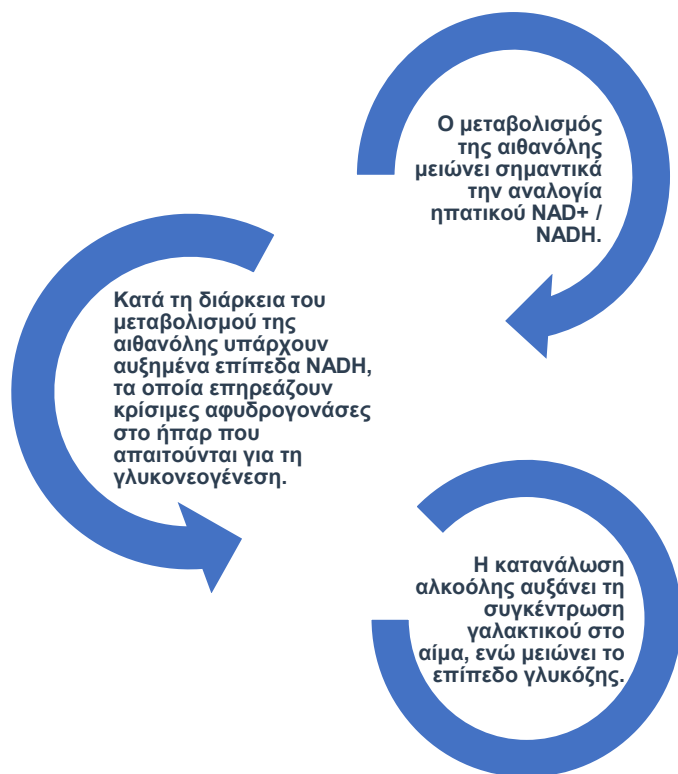
Όπως και στους ανθρώπους έτσι και στα πειραματόζωα διαπιστώσαμε ότι η απόκριση στο φάρμακο ήταν πολυπαραμετρική και εξατομικευμένη καθώς υπήρχε διαφορετική αντίδραση σε κάθε μυ. Οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάστηκαν σε κάθε ομάδα δεν μπορούσαν να παραληφθούν, καθώς ήταν μέρος σημαντικής πληροφορίας για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου όταν δίνεται διαδερμικά. Έτσι για τη ρεπαγλινίδη που χορηγήθηκε διαδερμικά υποθέτουμε ότι κάποια από τα σχηματιζόμενα ιόντα φαρμάκου ή φορέα διάλυσης μπορεί να παρεμποδίζουν τη μείωση γλυκόζης. Το φάρμακο μπορεί να βρίσκεται σε περισσότερες από μία ιονισμένες μορφές (όπως αναφέραμε και παραπάνω, σελ.121) και κάποια από αυτές ενδέχεται να προκαλεί αρνητική δράση, αυξάνοντας τα επίπεδα γλυκόζης. Δηλαδή, κάποια από τα σχηματιζόμενα ιόντα δημιουργούν ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα από αυτό που περιμέναμε. Ας μην ξεχνάμε ότι οι μύες ήταν φυσιολογικοί, και αυτή η αντίδραση μπορεί να οφείλεται σε αντιρροπιστικούς μηχανισμούς που διαθέτουν στη μείωση της γλυκόζης στο αίμα. Οι διακυμάνσεις στη γλυκόζη μπορεί να οφείλονται και στην

ύπαρξη στρες στους μύες, καθώς τα πρώτα 15 min βρίσκονταν μέσα στην ποντικοπαγίδα και ύστερα επέστρεφαν στον κλωβό τους χωρίς πρόσβαση σε τροφή (Folmer et al., 2002; Wellen and Hotamisligil, 2005).

Ακόμη, μπορεί να μην κατάφεραν οι ενισχυτές διαπέρασης που χρησιμοποιήσαμε, να βελτιώσουν την είσοδο του φαρμάκου στην αιματική κυκλοφορία, καθώς παρατηρήσαμε ότι μετά τις 2 ώρες εφαρμογής του επιθέματος η γλυκόζη μειώνεται. Ο φορέας διάλυσης παίζει πολύ ουσιαστικό ρόλο στο βαθμό και την ικανότητα διείσδυσης του φαρμάκου από τον επιδερμικό φραγμό, καθώς γνωρίζουμε ότι ουσίες που βρίσκονται κοντά στη συγκέντρωση κορεσμού του διαλύματος, περνούν πιο εύκολα τον φραγμό του δέρματος (Karande and Mitragotri, 2009; Karsa and Stephenson, 2007; P. Schwarb et al., 1999). Από το δοκιμαστικό πείραμα διαπιστώσαμε ότι η αιθανόλη δρα συνεργιστικά με τη ρεπαγλινίδη, καθώς η πτώση στη γλυκόζη ήταν μεγαλύτερη (-59%) σε σχέση με την πτώση που προκάλεσε η ρεπαγλινίδη σε φορέα διάλυσης χωρίς αλκοόλη (-21%), ενώ η αιθανόλη από μόνη της μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης κατά 46%. Άρα η αιθανόλη δε δρα μόνο σαν τους κλασσικούς χημικούς ενισχυτές διαπέρασης, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης, καθώς εμμέσως παρεμβαίνει στη διαδικασία της γλυκονογένεσης στο ήπαρ (Hammerstedt et al., 2011; Steiner et al., 2015; Stubbs et al., 1972; Williams, 1984). Τα παρακάτω σχήματα εξηγούν ακριβώς την έμμεση δράση της αλκοόλης στη μείωση της γλυκόζης στο αίμα.



Σχήμα 8 Μεταβολισμός αιθανόλης-Κύκλος Cori



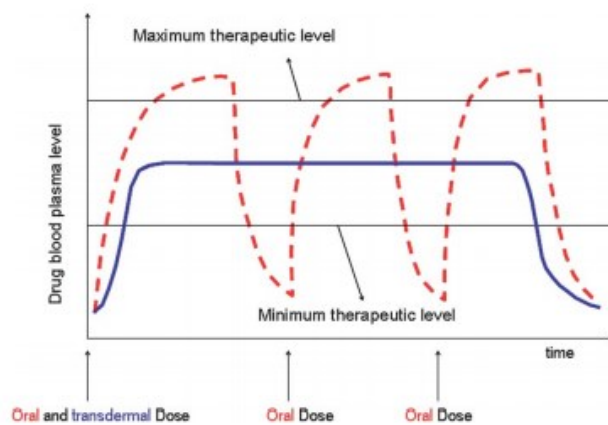
Σχήμα 9 Μηχανισμός δράσης αιθανόλης στη μείωση γλυκόζης

υδρόφιλο. Ο συντελεστής κατανομής του PEG 400 είναι $\log P = -4.8$ (Ma et al., 1990), που σημαίνει ότι πιθανώς να μη βοήθησε στην ενίσχυση της παθητικής διάχυσης του φαρμάκου, λόγω διαφορετικής φύσης από αυτό. Το ίδιο ισχύει και με το DMSO, το οποίο έχει $\log P = -1.35$ αλλά και με την προπυλενογλυκόλη (PG) που έχει $\log P = -0.79$ (Martin, 1996). Το DMSO χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλη περιεκτικότητα στο φορέα διάλυσης (40%), καθώς πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει με τη χρήση μοριακών προσομοιώσεων ότι πρέπει να είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις στο δέρμα ώστε να είναι αποτελεσματικό ως ενισχυτής διείσδυσης (Notman et al., 2008). Εντούτοις, τα αδιαπέραστα χαρακτηριστικά του δέρματος αποκαθίστανται αμέσως μετά την απομάκρυνση του DMSO καθώς ο διαλύτης απομακρύνεται από το δέρμα πολύ γρήγορα (Barry, 1987). Επίσης ανασταλτικό ρόλο στη δράση της ρεπαγλινίδης μπορεί να προέκυψε και από τη χρήση γλυκερόλης, που χρησιμοποιήθηκε ως καταπραϋντικό μέσο για την αποτροπή τυχόν ερεθισμών από τους διαλύτες (Fierro et al., 2016; Mast, 2018). Ωστόσο όλοι οι προαναφερθέντες διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες διαδερμικών επιθεμάτων ρεπαγλινίδης (Prajapati et al., 2011; Shinde et al., 2018).

Ο φορέας διάλυσης που χρησιμοποιήσαμε στο τελικό πείραμα ίσως να δυσκόλεψε τη διάχυση του φαρμάκου στις στιβάδες της επιδερμίδας. Η ρεπαγλινίδη είναι μετρίως λιπόφιλο μόριο έχοντας ένα $\log P = 3.97$, το οποίο είναι επιτρεπτό για διαδερμική χορήγηση. Ωστόσο οι ενισχυτές διείσδυσης που χρησιμοποιήσαμε ήταν κατά κύριο λόγο υδρόφιλοι.

Το PEG 400 είναι αρκετά

Η δόση στη διαδερμική χορήγηση της ρεπαγλινίδης (4mg σε κάθε επίθεμα) ήταν ~170 φορές μεγαλύτερη από τη δόση που λήφθηκε από το στόμα, η οποία ήταν η μέγιστη ημερήσια εφάπαξ δόση για το συγκεκριμένο φάρμακο (0,07 mg/kg). Το φάρμακο αυτό δεν φάνηκε ικανό να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης σε όλους τους μύες από την 1η κιόλας ώρα κατά τη διαδερμική χορήγηση, όπως συνέβη με το ίδιο φάρμακο, χορηγούμενο από το στόμα. Ωστόσο μετά την 1η ώρα εφαρμογής του επιθέματος και συγκεκριμένα στις 3 ώρες, η μείωση αγγίζει το 42%, κάτι που δεν περνά απαρατήρητο. Η αντίστοιχη μείωση στην per os χορήγηση είναι 52% και ήδη από την 1η ώρα έχει μειωθεί η γλυκόζη > 42%. Η σύγκριση με την per os χορήγηση δεν είναι και τόσο βοηθητική, καθώς εμείς θέλαμε να πετύχουμε σταθερή συγκέντρωση φαρμάκου στο αίμα και μια ελεγχόμενη, βραδεία και παρατεταμένη αποδέσμευση και να αποφύγουμε



Εικόνα 68 Τυπικά προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου από του στόματος και διαδερμική χορήγηση (Pegoraro et al., 2012)

την απότομη πτώση γλυκόζης και την εμφάνιση υπογλυκαιμίας, που αποτελεί μια σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια των περισσότερων αντιδιαβητικών δισκίων. Η διαδερμική χορήγηση δημιουργεί μια απελευθέρωση μηδενικής τάξεως (zero order kinetic) και αποφεύγει τα υψηλά και χαμηλά επίπεδα του φαρμάκου που βρίσκονται στο αίμα κατά τη διάρκεια της από του

στόματος χορήγησης και κατά την ενδοφλέβια χορήγηση, τα οποία οδηγούν σε συχνή δοσολογία. Επίσης, γνωρίζοντας ότι η ρεπαγλινίδα απορροφάται ταχύτατα και σε μία ώρα μετά τη λήψη της έχει τη μεγαλύτερη δράση, με τη διαδερμική της χορήγηση παρατείνεται η δράση της και μετά τη 1 ώρα και αποφεύγεται και η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια αυτής και εν γένει των εκκριταγωγών φαρμάκων, που είναι η υπογλυκαιμία. Η φαρμακοκινητική της ρεπαγλινίδης βελτιώνεται με τη διαδερμική χορήγηση, δεδομένου ότι αποφεύγει την επίδραση του pH στο γαστρεντερικό περιβάλλον, αλλά και τον ηπατικό μεταβολισμό πρώτης διόδου και έτσι αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητά της, που στην περίπτωση της per os χορήγησης φθάνει το 56%.

Από τα αποτελέσματά μας, διαπιστώσαμε ότι ο χρόνος που χρειάστηκε για να εμφανιστεί μείωση στη γλυκόζη στην περίπτωση του διαδερμικού επιθέματος ήταν

περίπου 1,5 ώρα. Το φάρμακο δημιουργεί μία «δεξαμενή» στις στιβάδες της επιδερμίδας και διαχέεται με αργό ρυθμό προς το χόριο, όπου βρίσκονται τα αιμοφόρα αγγεία. Μετά τη 1,5 ώρα τα επίπεδα γλυκόζης άρχισαν να μειώνονται μέχρι και τις 3 ώρες που είχαμε τη μεγαλύτερη μείωση. Η χρήση ρεύματος, μόνο στην περίπτωση του συνεχούς παλμικού ρεύματος, μείωσε αποτελεσματικά το χρόνο απόκρισης των μυών στη ρεπταγλινίδη, σε 30 min και έτσι τα επίπεδα γλυκόζης μειώθηκαν σε λιγότερο χρόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση του συνεχούς παλμικού ρεύματος δημιουργείται «δεξαμενή φαρμάκου» (ως μετα-ιοντοφορητικό αποτέλεσμα), καθώς διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα γλυκόζης δεν έχουν απότομη πτωτική τάση, όπως στην περίπτωση της *per os* χορήγησης. Έτσι και με τη χρήση ρεύματος, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η φαρμακοκινητική του φαρμάκου προσομοιάζει την «zero order» κινητική των κλασικών διαδερμικών επιθεμάτων με τη διαφορά ότι η απορρόφηση ξεκινά πιο γρήγορα, εξαιτίας της μικρής διάρτησης του επιδερμικού φραγμού και τα επίπεδα φαρμάκου στο αίμα είναι σαφώς πιο αυξημένα.

Η χρήση του ρεύματος, ως φυσική μέθοδος ενίσχυσης της διείσδυσης της ρεπταγλινίδης έδειξε ότι μπορεί να ενισχύσει τη δράση του φαρμάκου η οποία ήταν είτε θετική είτε αρνητική. Η μέθοδος αυτή ήταν ανώδυνη και ελάχιστα επεμβατική καθώς οι ιδιότητες του φραγμού αποκαθίστανται γρήγορα, εντός 24ώρου (Barry, 1987; Turner et al., 1997). Η χρήση επεμβατικών μεθόδων, όπως είναι οι «μικροβελόνες», θα δημιουργούσε διάτρηση στο δέρμα, δηλαδή μικροτραύματα και έτσι θα αποτελούσε πρόσφορο έδαφος για βακτηρίδια τα οποία θα μπορούσαν να εισβάλουν στο δέρμα και να προκαλέσουν ανοσοαντίδραση.

Ελέγχοντας τις παραμέτρους του ρεύματος είναι δυνατός ο έλεγχος του αριθμού των μορίων του φαρμάκου που μετακινούνται με την πάροδο του χρόνου. Η αποδοτικότητα της μεταφοράς του φαρμάκου εξαρτάται από την πολικότητα, το σθένος και την κινητικότητα των φορτισμένων μορίων, κάτι το οποίο διαπιστώσαμε στο *in vivo* πείραμα που εφαρμόσαμε.

Εν κατακλείδι, λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω συμπεράσματα, δύο ερωτήματα προκύπτουν από την ανωτέρω μελέτη. Το πρώτο είναι αν η απορρόφηση της ρεπταγλινίδης, που θεωρείται μετρίως λιπόφιλο φάρμακο ($\log P = 3.97$), υποβοηθείται από το φορέα διάλυσης και τους χημικούς ενισχυτές διαπέρασης που χρησιμοποιήσαμε να διαπεράσει τον επιδερμικό φραγμό. Το δεύτερο ερώτημα

προκύπτει από το εάν η τοξική δράση της αιθανόλης σε σχέση με τη θετική δράση της, στη μείωση γλυκόζης είναι ωφέλιμη, ιδιαίτερα στη χρόνια χορήγηση αυτής.

7.11 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Το πείραμα αυτό θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα ελπιδοφόρο ξεκίνημα και δίνει ένα σπουδαίο κίνητρο για να συνεχίσουν οι μελέτες στη διαδερμική χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων με χρήση ρεύματος ως φυσικός τρόπος ενίσχυσης της απορρόφησης αυτών. Τα επόμενα βήματα για μια τέτοια μελέτη, θα πρέπει να γίνουν προσεκτικά όσον αφορά την επιλογή του «ιδεατού» φαρμάκου, που να είναι αποτελεσματικό και πιο «συμβατό» και «φιλικό» με τον φορέα διάλυσης και τους ενισχυτές διείσδυσης. Η επιλογή ενός πιο υδρόφιλου φαρμάκου, θα ήταν πιο ιδανική στη μεταφορά των ιόντων με τη χρήση ρεύματος. Άρα χρειάζεται πιο ενδεδειγμένη χημική προσέγγιση του φαρμάκου και του φορέα διάλυσης. Θα μπορούσε να συνεχίσει αυτή η μελέτη με το ίδιο φάρμακο αλλάζοντας όμως το φορέα διάλυσης και τους ενισχυτές διείσδυσης, οι οποίοι δεν κατάφεραν να υποβοηθήσουν τόσο αποτελεσματικά τη διαπέραση της ρεπαγλινίδης από τον επιδερμικό φραγμό. Ωστόσο θα πρέπει να αποφευχθεί η χρήση αιθανόλης, καθώς όπως διαπιστώσαμε, «αλλοιώνει» την καθαρή δράση του αντιδιαβητικού φαρμάκου (όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στα συμπεράσματα του δοκιμαστικού πειράματος, σελ. 257), με αποτέλεσμα να παίρνουμε πλασματικές μετρήσεις. Παρόλα αυτά θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε την αιθανόλη μαζί με το αντιδιαβητικό φάρμακο και να εκμεταλλευτούμε τη συνέργεια που ασκεί στη μείωση γλυκόζης.

Ένα επόμενο βήμα, θα ήταν να γίνει η μελέτη σε διαβητικούς τύπου 2 μύες. Δεδομένου ότι οι φυσιολογικοί οργανισμοί έχουν αντιροπιστικούς μηχανισμούς στη μείωση της γλυκόζης κάτω από τα φυσιολογικά επίπεδα, κάτι που διαπιστώσαμε κι εμείς κατά τη διάρκεια του πειράματος σε μερικά πειραματόζωα, θα ήταν εύλογο να δούμε τι γίνεται σε διαβητικούς μύες.

Ένα ακόμη ζήτημα, είναι να προσπαθήσουμε να περιορίσουμε την πρόκληση stress στους μύες, καθώς γνωρίζουμε, αλλά και είδαμε, ότι επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Folmer et al., 2002; Wellen and Hotamisligil, 2005). Αυτό θα μπορούσε να γίνει με την πρόκληση αναισθησίας στους μύες ή με τη χορήγηση μυοχαλαρωτικών, προσέχοντας ωστόσο τι ακριβώς θα χρησιμοποιήσουμε ώστε να μην επηρεάζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

Επίσης, θα μπορούσαμε να βρούμε έναν ασφαλέστερο τρόπο μέτρησης της γλυκόζης με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, καθώς οι μετρήσεις ήταν αλληπάλληλες και είχαν τον ίδιο βαθμό σημαντικότητας. Εμείς χρησιμοποιήσαμε τον ενδεδειγμένο τρόπο μέτρησης γλυκόζης με χρήση μετρητή και ταινιών μέτρησης, οι οποίες λαμβάνουν το τριχοειδές αίμα. Η μετρήσεις αυτές είχαν μεταβλητότητα $\pm 15\%$ (Χαλβατσιώτης, 2015).

Ως προς την επιλογή του ρεύματος, θα πρέπει να είμαστε ιδιαίτερα προσεκτικοί με τον τύπο του ρεύματος (DC, AC, Pulsed ON/OFF κ.ά.) που θα χρησιμοποιήσουμε. Στο πείραμα αυτό, η χρήση συνεχούς παλμικού ρεύματος (DC + DC ON/OFF) αποδείχθηκε η καλύτερη επιλογή σε σύγκριση με το παλμικό και το εναλλασσόμενο ρεύμα. Ακόμα πιο προσεκτικοί θα πρέπει να είμαστε με τους πόλους του ρεύματος, δηλαδή σε ποιον πόλο θα τοποθετήσουμε το φάρμακο και αυτό φυσικά εξαρτάται από τις χημικές ιδιότητες του φαρμάκου και τον τρόπο ιονισμού του. Στην περίπτωση της ρεπαγλινίδης, διαπιστώσαμε ότι όταν την χορηγήσαμε από τον αρνητικό πόλο (κάθοδος) η απόκριση των μυών στο φάρμακο ήταν εμφανώς βελτιωμένη. Οπότε θα πρέπει να γνωρίζουμε ποια είναι η επικρατέστερη μορφή ιονισμού του φαρμάκου για να μπορέσουμε να το χορηγήσουμε από την άνοδο ή την κάθοδο του ιοντοφορητικού συστήματος. Θα ήταν καλό, σε πρώτη φάση, να αποφύγουμε τις αλλαγές στις παραμέτρους του ρεύματος, όπως η ισχύς ή η κυματομορφή, από τη στιγμή που στο πείραμα αυτό δεν υπήρχε κατευθυντικότητα, λόγω έλλειψης χημικής προσέγγισης του φαρμάκου, η οποία θα έδειχνε κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών ρευμάτων. Ωστόσο η συχνότητα ρεύματος είναι σημαντική παράμετρος, καθώς η εφαρμογή μεγάλων συχνοτήτων μειώνει την αποτελεσματικότητα της ιοντοφορητικής παροχής (Neeraj, 2017).

Θα ήταν καλό, στην επόμενη μελέτη, να γίνει αρχικά ένα πείραμα αγωγιμότητας *in vitro* που θα παρέχει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την καταλληλότητα του χρησιμοποιούμενου φαρμάκου στη διαδερμική ιοντοφόρηση. Μια τέτοια μελέτη θα δώσει πληρέστερη εικόνα για την ύπαρξη ή μη ιόντων και θα καθορίσει τα επόμενα βήματα.

Τέλος, αν προσεγγισθούν όλες οι παραπάνω προτάσεις, θα ήταν ένα καινοτόμο εγχείρημα, να σχεδιασθεί ένα ιοντοφορητικό σύστημα που να μπορεί να λειτουργεί με μπαταρία (δίχως συνδεδεμένα καλώδια στη γεννήτρια ρεύματος) και να αφήνεται στο πειραματόζωο επί 24ώρου βάσεως, με περιοδική εφαρμογή ρεύματος (πχ. για 10 min

ανά 2 ώρες). Έτσι θα υπήρχε καλύτερος και μεγαλύτερος έλεγχος των τιμών γλυκόζης, καθώς θα κάλυπτε επαρκώς τις ανάγκες του διαβητικού μυός για φάρμακο όλη την ημέρα. Αυτό θα αποτελούσε ένα γερό θεμέλιο για τη συνέχιση της μεγάλης προσπάθειας στη διαδερμική χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Βιβλιογραφία

Abd, E., Yousuf, S., Pastore, M., Telaprolu, K., Mohammed, Y., Namjoshi, S., Grice, J., and Roberts, M. (2016). Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications Volume 8*, 163–176.

Agouni, A., Owen, C., Czopek, A., Mody, N., and Delibegovic, M. (2010). In vivo differential effects of fasting, re-feeding, insulin and insulin stimulation time course on insulin signaling pathway components in peripheral tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications 401*, 104–111.

Ahad, A., Al-Saleh, A.A., Akhtar, N., Al-Mohizea, A.M., and Al-Jenoobi, F.I. (2015). Transdermal delivery of antidiabetic drugs: formulation and delivery strategies. *Drug Discovery Today 20*, 1217–1227.

Akiyama, T., Tachibana, I., Shirohara, H., Watanabe, N., and Otsuki, M. (1996). High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract. 31*, 27–35.

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*, 26–40.

Alkilani, A., McCrudden, M.T., and Donnelly, R. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics 7*, 438–470.

Allenby, A.C., Fletcher, J., Schock, C., and Tees, T.F.S. (1969). The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin. *British Journal of Dermatology 81*, 31–39.

American Diabetes Association (2013). Standards of Medical Care in Diabetes--2013. *Diabetes Care 36*, S11–S66.

American Diabetes Association (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care 37*, S81–S90.

American Diabetes Association (2017). Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes Care 40*, 986–986.

Anderson, C.R., Morris, R.L., Panus, S.D.B., Peter C., and Sembrowich, W.L. (2003). Effects of Iontophoresis Current Magnitude and Duration on Dexamethasone Deposition and Localized Drug Retention. *Physical Therapy*.

Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., and Cooney, D.A. (1974). Streptozotocin Diabetes correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest 54*, 672–677.

Andrikopoulos, S., Blair, A.R., Deluca, N., Fam, B.C., and Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 295*, E1323–E1332.

- Anigbogu, A.N.C., Williams, A.C., Barry, B.W., and Edwards, H.G.M. (1995). Fourier transform raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 125, 265–282.
- Aqil, M., Ahad, A., Sultana, Y., and Ali, A. (2007). Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discovery Today* 12, 1061–1067.
- Arora, A., Prausnitz, M.R., and Mitragotri, S. (2008). Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int J Pharm* 364, 227–236.
- Aye, M., and Masson, E.A. (2002). Dermatological Care of the Diabetic Foot: *American Journal of Clinical Dermatology* 3, 463–474.
- Barry, B.W. (1987). Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* 6, 85–97.
- Barry, B.W. (1991). Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release* 15, 237–248.
- Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14, 101–114.
- Baumann, L. (2009). *Cosmetic dermatology: principles and practice* (New York McGraw-Hill).
- Bélanger, A. (2010). *Therapeutic electrophysical agents: evidence behind practice* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).
- Bennett, W.L., Maruthur, N.M., Singh, S., Segal, J.B., Wilson, L.M., Chatterjee, R., Marinopoulos, S.S., Puhan, M.A., Ranasinghe, P., Block, L., et al. (2011). Comparative Effectiveness and Safety of Medications for Type 2 Diabetes: An Update Including New Drugs and 2-Drug Combinations. *Annals of Internal Medicine* 154, 602.
- Benson, H.A.E., and Namjoshi, S. (2008). Proteins and Peptides: Strategies for Delivery to and Across the Skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, 3591–3610.
- Bîrlea, S.I., Breen, P.P., Corley, G.J., Bîrlea, N.M., Quondamatteo, F., and ÓLaighin, G. (2014). Changes in the electrical properties of the electrode–skin–underlying tissue composite during a week-long programme of neuromuscular electrical stimulation. *Physiol. Meas.* 35, 231–252.
- Boivin, A., and Deshaies, Y. (1995). Dietary rat models in which the development of hypertriglyceridemia and that of insulin resistance are dissociated. *Metab. Clin. Exp.* 44, 1540–1547.
- Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Meigs, J.B., Bonadonna, R.C., Muggeo, M., and Bruneck study (2004). Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. *Diabetes* 53, 1782–1789.

Bouwstra, J.A., and Ponec, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 2080–2095.

van Boxtel, A. (1977). Skin resistance during square-wave electrical pulses of 1 to 10 mA. *Med Biol Eng Comput* 15, 679–687.

Brown, L., and Langer, R. (1988). Transdermal Delivery of Drugs. *Annual Review of Medicine* 39, 221–229.

Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S.A., and Akomeah, F.K. (2006). Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects. *Drug Delivery* 13, 175–187.

Brunengraber, D.Z., McCabe, B.J., Kasumov, T., Alexander, J.C., Chandramouli, V., and Previs, S.F. (2003). Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 285, E917–E925.

Burnette, R.R., and Ongpipattanakul, B. (1988). Characterization of the Pore Transport Properties and Tissue Alteration of Excised Human Skin during Iontophoresis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 77, 132–137.

Burns, T., Breathnach, S., Cox, N., and Griffiths, C. (2013). *Rook's Textbook of Dermatology* (New York, NY: John Wiley & Sons).

Cevc, G., and Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* 141, 277–299.

Chien, Y.W., Xu, H., Chiang, C., and Huang, Y. (1988). Transdermal controlled administration of indomethacin. Enhancement of skin permeability. *Pharmaceutical Research* 05, 103–106.

Chien, Y.W., Siddiqui, O., Shi, W.M., Lelawongs, P., and Liu, J.C. (1989). Direct current iontophoretic transdermal delivery of peptide and protein drugs. *J Pharm Sci* 78, 376–383.

Chizmadzhev, Y.A., Indenbom, A.V., Kuzmin, P.I., Galichenko, S.V., Weaver, J.C., and Potts, R.O. (1998). Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macropores. *Biophys. J.* 74, 843–856.

Christophers, E., Schubert, C., Goos (auth.), M., M.D, P.M.W.G., Ph.D, F.R.C.P, M.D, P.S.S., and F.R.C.P. (eds.) (1989). *Pharmacology of the Skin I: Pharmacology of Skin Systems Autocoids in Normal and Inflamed Skin* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).

Coldman, M.F., Kalinovsky, T., and Poulsen, B.J. (1971). The in vitro penetration of fluocinonide through human skin from different volumes of DMSO. *British Journal of Dermatology* 85, 457–461.

Cooke, D.W., and Plotnick, L. (2008). Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics. *Pediatrics in Review* 29, 374–385.

Cullander, C. (1992). What are the pathways of iontophoretic current flow through mammalian skin? *Advanced Drug Delivery Reviews* 9, 119–135.

Daniels, R. (2004). *Strategies for Skin Penetration Enhancement*. 14.

Delgado-Charro, M.B. (2012). Iontophoretic drug delivery across the nail. *Expert Opin Drug Deliv* 9, 91–103.

Denda, M., Hosoi, J., and Asida, Y. (2000). Visual Imaging of Ion Distribution in Human Epidermis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272, 134–137.

Dhote, V. (2012). Iontophoresis: A Potential Emergence of a Transdermal Drug Delivery System. *Scientia Pharmaceutica* 80, 1–28.

Domínguez-Delgado, C.L., Rodríguez-Cruz, I.M., López-Cervantes, M., Escobar-Chávez, J., and Merino, V. (2010). The skin a valuable route for administration of drugs. *Current Technologies To Increase The Transdermal Delivery Of Drugs*. The Netherlands: Bentham Science Publishers Ltd 1–22.

Donovan, J., and Brown, P. (2006a). Parenteral injections. *Curr Protoc Immunol Chapter 1*, Unit 1.6.

Donovan, J., and Brown, P. (2006b). Blood collection. *Curr Protoc Immunol Chapter 1*, Unit 1.7.

Down, J., and Harvey, N. (2003). Minimally Invasive Systems for Transdermal Drug Delivery. In *Transdermal Drug Delivery*, (New York: Marcel Dekker), pp. 305–326.

Dragicevic, N., Atkinson, J.P., and Maibach, H.I. (2015). Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic, and H.I. Maibach, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 11–27.

Dua, K., Sharma, V.K., Sara, U.V.S., Agrawal, D.K., and Ramana, M.V. (2009). Penetration enhancers for TDDS: a tale of the under skin travelers. *Advances in Natural and Applied Sciences* 3, 95–102.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W., and Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 34, 203–222.

Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* 366, 1736–1743.

Fierro, J., Martínez, E.J., Rosas, J.G., Fernández, R.A., López, R., and Gomez, X. (2016). Co-Digestion of Swine Manure and Crude Glycerine: Increasing Glycerine Ratio Results in Preferential Degradation of Labile Compounds. *Water, Air, & Soil Pollution* 227.

- Folmer, V., Soares, J.C.M., and Rocha, J.B.T. (2002). Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 1279–1285.
- Friend, D.R. (1990). Transdermal delivery of contraceptives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 7, 149–186.
- Furman, B.L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol* 70, 5.47.1-20.
- Gabriel, C., Gabriel, S., and Corthout, E. (1996). The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey. *Physics in Medicine and Biology* 41, 2231–2249.
- Gajda, A.M., Pellizzon, M.A., Ricci, M.R., and Ulman, E.A. (2007). Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models. 8.
- Gangarosa, L.P., Park, N.H., Fong, B.C., Scott, D.F., and Hill, J.M. (1978). Conductivity of drugs used for iontophoresis. *J Pharm Sci* 67, 1439–1443.
- Gelding, S.V., Niththyanathan, R., Chan, S.P., Skinner, E., Robinson, S., Gray, I.P., Mather, H., and Johnston, D.G. (1994). Insulin sensitivity in non-diabetic relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes from two ethnic groups. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 40, 55–62.
- Ghasemi, A., Khalifi, S., and Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol Hung* 101, 408–420.
- Glass, J.M., Stephen, R.L., and Jacobson, S.C. (1980). The Quantity and Distribution of Radiolabeled Dexamethasone Delivered to Tissue by Iontophoresis. *International Journal of Dermatology* 19, 519–525.
- Gordon, R. (2005). More than skin deep: advances in transdermal technologies are opening up new avenues of exploration. *Pharmaceutical Technology Europe* 17, 66.
- Guyton, A. (1990). *Φυσιολογία του Ανθρώπου* (Athens: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).
- Hamm, R.L. *Text and Atlas of Wound Diagnosis and Treatment* | AccessPhysiotherapy | McGraw-Hill Medical.
- Hammerstedt, H., Chamberlain, S.L., Nelson, S.W., and Bisanzo, M.C. (2011). Alcohol-related hypoglycemia in rural Uganda: socioeconomic and physiologic contrasts. *Int J Emerg Med* 4, 5.
- Han, T., and Das, D.B. (2015). Potential of combined ultrasound and microneedles for enhanced transdermal drug permeation: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 89, 312–328.
- Haque, T., and Talukder, M.M.U. (2018). Chemical Enhancer: A Simplistic Way to Modulate Barrier Function of the Stratum Corneum. *Adv Pharm Bull* 8, 169–179.
- Hayashi, K., Kojima, R., and Ito, M. (2006). Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1110–1119.

Helmstädter, A. (2001). The history of electrically-assisted transdermal drug delivery (“iontophoresis”). *Pharmazie* 56, 583–587.

Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y.N., Hadgraft, J., and Guy, R.H. (2006). Pig Ear Skin ex Vivo as a Model for in Vivo Dermatopharmacokinetic Studies in Man. *Pharmaceutical Research* 23, 1850–1856.

Herwadkar, A., and Banga, A.K. (2012). Peptide and protein transdermal drug delivery. *Drug Discovery Today: Technologies* 9, e147–e154.

Hewer Langton, R., Read, A., and Barritt, D. (1993). Σύγχρονη Παθολογία (Athens: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).

Huang, J.-F., Sung, K.C., Hu, O.Y.-P., Wang, J.-J., Lin, Y.-H., and Fang, J.-Y. (2005). The effects of electrically assisted methods on transdermal delivery of nalbuphine benzoate and sebacoyl dinalbuphine ester from solutions and hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics* 297, 162–171.

Imokawa, Genji., Kuno, Hiroshi., and Kawai, Michio. (1990). Stratum Corneum Lipids Serve as a Bound-Water Modulator. *Journal of Investigative Dermatology* 96, 845–851.

Internal Clinical Guidelines Team (2015). Type 2 Diabetes in Adults: Management (London: National Institute for Health and Care Excellence (UK)).

Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K., and Naruse, A. (2001). Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9, 71–78.

Iwai, I., Han, H., Hollander, L. den, Svensson, S., Öfverstedt, L.-G., Anwar, J., Brewer, J., Bloksgaard, M., Laloeuf, A., Nosek, D., et al. (2012). The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 2215–2225.

Jaber, L.A., Brown, M.B., Hammad, A., Nowak, S.N., Zhu, Q., Ghafoor, A., and Herman, W.H. (2003). Epidemiology of diabetes among Arab Americans. *Diabetes Care* 26, 308–313.

Jelinek, J.E. (1993). The Skin in Diabetes. *Diabetic Medicine* 10, 201–213.

Jensen, T., Kiersgaard, M., Sørensen, D., and Mikkelsen, L. (2013). Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals* 47, 225–240.

Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E., and Renold, A.E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126, 201–205.

Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., and Renold, A.E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48, 2129–2139.

Kalbitz, J., Neubert, R., and Wohlrab, W. (1996). Modulation of drug penetration in the skin. *Pharmazie* 51, 619–637.

Kandi, S., Deshpande, N., Rao, P., and Ramana, K.V. (2014a). Alcoholism and Its Relation to Hypoglycemia – An Overview. *American Journal of Medicine Studies* 2, 46–49.

Kandi, S., Deshpande, N., Pinnelli, V.B.K., Devaki, R., Rao, P., and Ramana, K.V. (2014b). Alcoholism and Its Role in the Development of Oxidative Stress and DNA Damage: An Insight. *American Journal of Medical Sciences and Medicine* 2, 64–66.

Karagianni, A.-M. (2014). Comparative in vitro evaluation using penetration enhancers in the transdermal delivery of antihypertensive substances. Postgraduate Programm «Medicinal Chemistry: Drug Discovery and Design». University of Patras Department of Chemistry. UNIVERSITY OF PATRAS DEPARTMENT OF CHEMISTRY.

Karakoç, Y., Aydemir, E.H., Kalkan, M.T., and Ünal, G. (2002). Safe control of palmoplantar hyperhidrosis with direct electrical current. *International Journal of Dermatology* 41, 602–605.

Karande, P., and Mitragotri, S. (2009). Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788, 2362–2373.

Karsa, D.R., and Stephenson, R.A. (2007). *Chemical Aspects of Drug Delivery Systems* (Royal Society of Chemistry).

Katzung, B.G., Kruidering-Hall, M., and Trevor, A.J. *Pancreatic Hormones, Antidiabetic Drugs, & Glucagon | Katzung & Trevor's Pharmacology: Examination & Board Review, 12e | AccessPharmacy | McGraw-Hill Medical.*

Khan, A.A., Yasir, M., Asif, M., Chauhan, I., Singh, A.P., Sharma, R., Singh, P.K., and Rai, S. (2011). Iontophoretic drug delivery: History and applications.

Kim, S.H., and Abbasi, F. (2019). Myths about Insulin Resistance: Tribute to Gerald Reaven. *Endocrinol Metab (Seoul)* 34, 47–52.

Klamerus, K., and Lee, G. (1992). Effects of some hydrophilic permeation enhancers on the absorption of bepridil through excised human skin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 18, 1411–1422.

Kolb, H. (1987). Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes / Metabolism Reviews* 3, 751–778.

Krebs, H.A., Freedland, R.A., Hems, R., and Stubbs, M. (1969). Inhibition of hepatic gluconeogenesis by ethanol. *Biochem. J.* 112, 117–124.

Kreisberg, R.A., Siegal, A.M., and Owen, W.C. (1971). Glucose-lactate interrelationships: effect of ethanol. *J Clin Invest* 50, 175–185.

Kuhn, A., Keller, T., Lawrence, M., and Morari, M. (2009). A model for transcutaneous current stimulation: simulations and experiments. *Medical & Biological Engineering & Computing* 47, 279–289.

Kumar, M.G., and Lin, S. (2008). Transdermal iontophoresis: impact on skin integrity as evaluated by various methods. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25, 381–401.

Lane, M.E. (2013a). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 447, 12–21.

Lane, M.E. (2013b). Percutaneous Penetration Paradigms: The Contribution of Jonathan Hadgraft. *Skin Pharmacology and Physiology* 26, 277–285.

Langer, R. (2004). Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 557–558.

Lazar, M., Golden, P., Furman, M., and Lieberman, T.W. (1968). Resistance of the rabbit to streptozotocin. *Lancet* 2, 919.

Lee, J.W., Gadiraju, P., Park, J.-H., Allen, M.G., and Prausnitz, M.R. (2011). Microsecond thermal ablation of skin for transdermal drug delivery. *J Control Release* 154, 58–68.

Lee, K.U., Lee, H.K., Koh, C.S., and Min, H.K. (1988). Artificial induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin infusion leads to insulin resistance in man. *Diabetologia* 31, 285–290.

Lee, Y.-H., Hsu, H.-C., Kao, P.-C., Shiao, Y.-J., Yeh, S.H.-H., Shie, F.-S., Hsu, S.-M., Yeh, C.-W., Liu, H.-K., Yang, S.-B., et al. (2018). Augmented Insulin and Leptin Resistance of High Fat Diet-Fed APP^{swe}/PS1^{dE9} Transgenic Mice Exacerbate Obesity and Glycemic Dysregulation. *Int J Mol Sci* 19.

Leite-Silva, V.R., de Almeida, M.M., Fradin, A., Grice, J.E., and Roberts, M.S. (2012). Delivery of drugs applied topically to the skin. *Expert Review of Dermatology* 7, 383–397.

Liao, H., Zakhaleva, J., and Chen, W. (2009). Cells and tissue interactions with glycosylated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials* 30, 1689–1696.

Like, A.A., and Rossini, A.A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193, 415–417.

Lipson, L.G. (1986). Diabetes in the elderly: diagnosis, pathogenesis, and therapy. *Am. J. Med.* 80, 10–21.

Liu, X., Kruger, P., Maibach, H., Colditz, P.B., and Roberts, M.S. (2014). Using skin for drug delivery and diagnosis in the critically ill. *Advanced Drug Delivery Reviews* 77, 40–49.

Lohora, D., Attri, K., and Yadav, M. (2016). Preparation and characterization of transdermal patches of repaglinide for the treatment of diabetes. *SPER J Pharm Res* 1, 24–28.

Ma, T.Y., Hollander, D., Krugliak, P., and Katz, K. (1990). PEG 400, a hydrophilic molecular probe for measuring intestinal permeability. *Gastroenterology* 98, 39–46.

Mahajan, S., Koranne, R.V., and Sharma, S.K. (2003). Cutaneous manifestation of diabetes melitus. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology* 69, 105.

Maibach, H.I., and Feldmann, R.J. (1967). The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man. *Annals of the New York Academy of Sciences* 141, 423–427.

Mancini, J.E., Ortiz, G., Croxatto, J.O., and Gallo, J.E. (2013). Retinal upregulation of inflammatory and proangiogenic markers in a model of neonatal diabetic rats fed on a high-fat-diet. *BMC Ophthalmol* 13, 14.

Mandić, Z., and Gabelica, V. (2006). Ionization, lipophilicity and solubility properties of repaglinide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 866–871.

Manolesou, A. (2015a). Παραμετρικοί και μη παραμετρικοί έλεγχοι υποθέσεων.

Manolesou, A. (2015b). Βασικές έννοιες ελέγχων υποθέσεων και έλεγχοι κανονικότητας.

Marianecchi, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F., Esposito, S., and Carafa, M. (2014). Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Adv Colloid Interface Sci* 205, 187–206.

Martin, Y.C. (1996). Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. *Journal of Medicinal Chemistry* 39, 1189–1190.

Martinsen, Ø.S.G., Grimnes, S., and Haug, E. (1999). Measuring depth depends on frequency in electrical skin impedance measurements. *Skin Research and Technology* 5, 179–181.

Masada, T., Higuchi, W., Srinivasan, V., Rohr, U., Fox, J., Behl, C., and Pons, S. (1989). Examination of iontophoretic transport of ionic drugs across skin: baseline studies with the four-electrode system. *International Journal of Pharmaceutics* 49, 57–62.

Masharani, U., and German, M.S. (2017). Pancreatic Hormones and Diabetes Mellitus. In *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, D.G. Gardner, and D. Shoback, eds. (New York, NY: McGraw-Hill Education), p.

Masiello, P. (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 873–893.

Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., and Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes* 47, 224–229.

- Mast, R. (2018). Glycerine: A Key Cosmetic Ingredient.
- Mathur, V., Satrawala, Y., and Rajput, M. (2010). Physical and chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery system. *Asian Journal of Pharmaceutics* 4, 173.
- Menon, G.K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, S3–S17.
- Menon, A.K., and Herrmann, A. (2013). Lipid Flip-Flop. In *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1261–1264.
- Merriam-Webster (2011). Definition of Transdermal.
- Michaels, B.D., and Del Rosso, J.Q. (2012). Importance of treatment of skin xerosis in diabetes. *Yearbook of Dermatology and Dermatologic Surgery* 2012, 99–100.
- Mitragotri, S. (2000). Synergistic Effect of Enhancers for Transdermal Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* 17, 1354–1359.
- Mitragotri, S. (2013). Devices for overcoming biological barriers: the use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 100–103.
- Mitrou, P. (2017). Latest data on metabolic diseases: Diabetes Mellitus. In *Scientific Chronicles*, pp. 83–91.
- Mohd Razali, N., and Yap, B. (2011). Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *J. Stat. Model. Analytics* 2.
- Molitor, H., and Fernandez, L. (1939). Experimental studies on the causes and prevention of iontophoretic burns. *The American Journal of the Medical Sciences* 198, 778–784.
- Motulsky, H.J., and Brown, R.E. (2006). Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7, 123.
- Mu, J., Woods, J., Zhou, Y.-P., Roy, R.S., Li, Z., Zycband, E., Feng, Y., Zhu, L., Li, C., Howard, A.D., et al. (2006). Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 1695–1704.
- Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigó-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberton, I., Tourette, J.-A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2011). Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes* 60, 3121–3131.
- Naik, A., Kalia, YV., and Guy, RH. (2000). Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3, 318–326.

Nakamura, T., Terajima, T., Ogata, T., Ueno, K., Hashimoto, N., Ono, K., and Yano, S. (2006). Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1167–1174.

Neeraj, B. (2017). IONTOPHORESIS: -A newer approach in transdermal drug delivery. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 612–628.

Ngo, B.T., Hayes, K.D., DiMiao, D.J., Srinivasan, S.K., Huerter, C.J., and Rendell, M.S. (2005). Manifestations of Cutaneous Diabetic Microangiopathy: *American Journal of Clinical Dermatology* 6, 225–237.

Nolan, L.M.A., Corish, J., Corrigan, O.I., and Fitzpatrick, D. (2007). Combined effects of iontophoretic and chemical enhancement on drug delivery. II. Transport across human and murine skin. *Int J Pharm* 341, 114–124.

Notman, R., Anwar, J., Briels, W.J., Noro, M.G., and den Otter, W.K. (2008). Simulations of Skin Barrier Function: Free Energies of Hydrophobic and Hydrophilic Transmembrane Pores in Ceramide Bilayers. *Biophysical Journal* 95, 4763–4771.

Ochalek, M. (2012). Barrier properties of stratum corneum lipid model membranes based on ceramide [AP] and [EOS].

Okamoto, H., and Yamamoto, H. (1983). DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase activation in pancreatic islets—a new aspect to development of insulin-dependent diabetes and pancreatic B-cell tumors. *Int. Symp. Princess Takamatsu Cancer Res. Fund* 13, 297–308.

P. Schwarb, F., Imanidis, G., W. Smith, E., Haigh, J., and Surber, C. (1999). Effect of Concentration and Degree of Saturation of Topical Fluocinonide Formulations on In Vitro Membrane Transport and In Vivo Availability on Human Skin. *Pharmaceutical Research* 16, 909–915.

Pacini, G., Omar, B., and Ahrén, B. (2013). Methods and Models for Metabolic Assessment in Mice. *Journal of Diabetes Research* 2013, 1–8.

Paik, S.G., Fleischer, N., and Shin, S.I. (1980). Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6129–6133.

Paik, S.G., Michelis, M.A., Kim, Y.T., and Shin, S. (1982). Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes* 31, 724–729.

Panchal, S.K., and Brown, L. (2011). Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *J Biomed Biotechnol* 2011.

Pavani, S., Rao, Y.M., and Kumar, Y.S. (2016). Use of Box-Behnken Experimental design for Optimization of process Variables in Iontophoretic delivery of Repaglinide. *Journal of Young Pharmacists* 8, 350–355.

Pedersen, O., Kahn, C.R., Flier, J.S., and Kahn, B.B. (1991). High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats. *Endocrinology* 129, 771–777.

Phipps, J.B., Padmanabhan, R.V., and Lattin, G.A. (1989). Iontophoretic delivery of model inorganic and drug ions. *J Pharm Sci* 78, 365–369.

Pikal, M.J. (1990). Transport mechanisms in iontophoresis: A theoretical model for the effect of electro osmotic flow on flux enhancement in transdermal iontophoresis. *Pharmaceutical Research* 07, 118–126.

Pikal, M.J., and Shah, S. (1990a). Transport mechanisms in iontophoresis: Electro osmotic flow and transference number measurements for hairless mouse skin. *Pharmaceutical Research* 07, 213–221.

Pikal, M.J., and Shah, S. (1990b). Transport mechanisms in iontophoresis: An experimental study of the contributions of electro osmotic flow and permeability change in transport of low and high molecular weight solutes. *Pharmaceutical Research* 07, 222–229.

Potts, R.O., and Guy, R.H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm. Res.* 9, 663–669.

Potts, R.O., A. Tamada, J., and J. Tierney, M. (2002). Glucose monitoring by reverse iontophoresis. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 18, S49–S53.

Prajapati, S.T., Patel, C.G., and Patel, C.N. (2011). Formulation and Evaluation of Transdermal Patch of Repaglinide. *ISRN Pharm* 2011.

Prausnitz, M.R., and Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* 26, 1261–1268.

Prausnitz, M.R., Bose, V.G., Langer, R., and Weaver, J.C. (1993). Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10504–10508.

Prausnitz, M.R., Elias, P.M., Franz, T.J., Schmuth, M., Tsai, J.-C., Menon, G.K., Holleran, W.M., and Feingold, K.R. (2012). Skin barrier and transdermal drug delivery. *Dermatology* 3, 2065–2073.

Rakieten, N., Rakieten, M.L., and Nadkarni, M.V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29, 91–98.

Rammler, D.H., and Zaffaroni, A. (1967). Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. *Annals of the New York Academy of Sciences* 141, 13–23.

Rao, R., Mahant, S., Chhabra, L., and Nanda, S. (2014). Transdermal innovations in diabetes management. *Curr Diabetes Rev* 10, 343–359.

Rastogi, V., and Yadav, P. (2012). Transdermal drug delivery system: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics* 6, 161.

Reed, M.J., Meszaros, K., Entes, L.J., Claypool, M.D., Pinkett, J.G., Gadbois, T.M., and Reaven, G.M. (2000). A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metab. Clin. Exp.* 49, 1390–1394.

Rehman, K., and Zulfakar, M.H. (2014). Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 40, 433–440.

Remane, Y., Leopold, C.S., and Maibach, H.I. (2006). Percutaneous Penetration of Methyl Nicotinate from Ointments Using the Laser Doppler Technique: Bioequivalence and Enhancer Effects. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 33, 719–735.

Rios, M. (2007). Advances in Transdermal Technologies-Transdermal delivery takes up once-forbidden compounds, reviving markets and creating formulation opportunities. *Pharmaceutical Technology* 31, 54–58.

Rosell, J., Colominas, J., Riu, P., Pallas-Areny, R., and Webster, J.G. (1988). Skin impedance from 1 Hz to 1 MHz. *IEEE Trans Biomed Eng* 35, 649–651.

Rossini, A.A., Appel, M.C., Williams, R.M., and Like, A.A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* 26, 916–920.

Roth, S.H., and Fuller, P. (2011). Diclofenac Sodium Topical Solution 1.5% w/w with Dimethyl Sulfoxide Compared with Placebo for the Treatment of Osteoarthritis: Pooled Safety Results. *Postgraduate Medicine* 123, 180–188.

Rothstein, J.M., Roy, S.H., Wolf, S.L., and Scalzitti, D.A. (2005). *The Rehabilitation Specialist's Handbook* (Philadelphia: F.A. Davis Company).

Russell, L., and Guy, R. (2009). Measurement and prediction of the rate and extent of drug delivery into and through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6, 355–369.

Sakai, S., Endo, Y., Ozawa, N., Sugawara, T., Kusaka, A., Sayo, T., Inoue, S., and Tagami, H. (2003). Characteristics of the Epidermis and Stratum Corneum of Hairless Mice with Experimentally Induced Diabetes Mellitus. *Journal of Investigative Dermatology* 120, 79–85.

Sakai, S., Kikuchi, K., Satoh, J., Tagami, H., and Inoue, S. (2005). Functional properties of the stratum corneum in patients with diabetes mellitus: similarities to senile xerosis. *British Journal of Dermatology* 153, 319–323.

Santi, P., and Guy, R.H. (1996). Reverse iontophoresis — parameters determining electro-osmotic flow. II. Electrode chamber formulation. *Journal of Controlled Release* 42, 29–36.

Schein, P.S., Cooney, D.A., and Vernon, M.L. (1967). The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.* 27, 2324–2332.

Scheindlin, S. (2004). Transdermal drug delivery: past, present, future. *Molecular Interventions* 4, 308.

Scheuplein, R.J. (1967). Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* *48*, 79–88.

Schoellhammer, C.M., Blankschtein, D., and Langer, R. (2014). Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery* *11*, 393–407.

Schroeter, A., Engelbrecht, T., Neubert, R.H.H., and Goebel, A.S.B. (2010). New Nanosized Technologies for Dermal and Transdermal Drug Delivery. A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology* *6*, 511–528.

Schuetz, Y.B., Naik, A., Guy, R.H., and Kalia, Y.N. (2005). Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* *2*, 533–548.

Schulmeister, L. (2005). Transdermal drug patches: Medicine with muscle. *Nursing* *2018* *35*, 48–52.

Shahzad, Y., Louw, R., Gerber, M., and du Plessis, J. (2015). Breaching the skin barrier through temperature modulations. *J Control Release* *202*, 1–13.

Shimizu, R., Sakazaki, F., Okuno, T., Nakamuro, K., and Ueno, H. (2012). Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Biomed. Res.* *33*, 63–66.

Shinde, U.A., Modani, S.H., and Singh, K.H. (2018). Design and Development of Repaglinide Microemulsion Gel for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech* *19*, 315–325.

Sieg, A., and Wascotte, V. (2009). Diagnostic and therapeutic applications of iontophoresis. *Journal of Drug Targeting* *17*, 690–700.

Singh, J., and Bhatia, K.S. (1996). Topical iontophoretic drug delivery: Pathways, principles, factors, and skin irritation. *Medicinal Research Reviews* *16*, 285–296.

Skovsø, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation* *5*, 349–358.

Smith, T.R., Goldstein, J., Singer, R., Pugach, N., Silberstein, S., and Pierce, M.W. (2012). Twelve-month tolerability and efficacy study of NP101, the sumatriptan iontophoretic transdermal system. *Headache* *52*, 612–624.

Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., and Wertheimer, E. (2001). Glucose Effects on Skin Keratinocytes: Implications for Diabetes Skin Complications. *Diabetes* *50*, 1627–1635.

Srinivasan, V., and Higuchi, W.I. (1990). A model for iontophoresis incorporating the effect of convective solvent flow. *International Journal of Pharmaceutics* *60*, 133–138.

Steiner, J., Crowell, K., and Lang, C. (2015). Impact of Alcohol on Glycemic Control and Insulin Action. *Biomolecules* *5*, 2223–2246.

Stoughton, R.B. (1965). Dimethylsulfoxide (DMSO) Induction of a Steroid Reservoir in Human Skin. *Archives of Dermatology* 91, 657.

Stubbs, M., Veech, R.L., and Krebs, H.A. (1972). Control of the redox state of the nicotinamide-adenine dinucleotide couple in rat liver cytoplasm. *Biochem. J.* 126, 59–65.

Stubbs, R.J., van Wyk, M.C., Johnstone, A.M., and Harbron, C.G. (1996). Breakfasts high in protein, fat or carbohydrate: effect on within-day appetite and energy balance. *Eur J Clin Nutr* 50, 409–417.

Subedi, R.K., Oh, S.Y., Chun, M.-K., and Choi, H.-K. (2010). Recent advances in transdermal drug delivery. *Archives of Pharmacal Research* 33, 339–351.

Subramony, J.A. (2013). Needle free parenteral drug delivery: Leveraging active transdermal technologies for pediatric use. *International Journal of Pharmaceutics* 455, 14–18.

Szunerits, S., and Boukherroub, R. (2018). Heat: A Highly Efficient Skin Enhancer for Transdermal Drug Delivery. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 15.

Talbi, Y., Campo, E., Brulin, D., and Fourniols, J.Y. (2018). Controllable and re-usable patch for transdermal iontophoresis drug delivery. *Electronics Letters* 54, 739–740.

Tarantino, S. (2015). PRODUCT MONOGRAPH GlucoNorm®. Novo Nordisk Canada Inc. 41.

Thong, H.-Y., Zhai, H., and Maibach, H.I. (2007). Percutaneous Penetration Enhancers: An Overview. *Skin Pharmacology and Physiology* 20, 272–282.

Trommer, H., and Neubert, R.H.H. (2006). Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. *Skin Pharmacology and Physiology* 19, 106–121.

Turner, N.G., Kalia, Y.N., and Guy, R.H. (1997). The effect of current on skin barrier function in vivo: recovery kinetics post-iontophoresis. *Pharm. Res.* 14, 1252–1257.

Turner, P.V., Brabb, T., Pekow, C., and Vasbinder, M.A. (2011). Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50, 600–613.

Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A., and Okamoto, H. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* 257, 6084–6088.

Ulman, E.A. (1999). D12492 Formula - OpenSource Diets - Search Formulas - Research Diets, Inc.

Valecha, V., Mathur, P., Syan, N., and Verma, S. (2011). Various penetration enhancement techniques in transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Technology* 3, 2373–2401.

- Vijan, S. (2010). Type 2 Diabetes. *Annals of Internal Medicine* 152, ITC3-1.
- Vijayan, V., Reddy, K.R., Sakthivel, S., and Swetha, C. (2013). Optimization and characterization of repaglinide biodegradable polymeric nanoparticle loaded transdermal patches: in vitro and in vivo studies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 111, 150–155.
- Walters, K.A., and Brain, K.R. (2002). *Dermatological and Transdermal Formulations* (New York: CRC Press).
- Walters, K.A., and Hadgraft, J. (1993). *Pharmaceutical skin penetration enhancement* (Informa Health Care).
- Wang, B., Chandrasekera, P.C., and Pippin, J.J. (2014). Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 10, 131–145.
- Warshaw, H.S. (2017). Alcohol.
- Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111–1119.
- Wiedersberg, S., and Guy, R.H. (2014). Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *Journal of Controlled Release* 190, 150–156.
- Williams, H.E. (1984). Alcoholic hypoglycemia and ketoacidosis. *Med. Clin. North Am.* 68, 33–38.
- Williams, A.C., and Barry, B.W. (2012). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 128–137.
- Wilson, E.J. (2011). Three generations: the past, present, and future of transdermal drug delivery systems. SC, USA Pharmcon.
- Wolff, M. (2014). Future of Transdermal Drug Delivery Systems (TDDS).
- Wu, K.K., and Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis* 191, 241–249.
- Yamamoto, Y., and Yamamoto, T. (1986). Characteristics of skin admittance for dry electrodes and the measurement of skin moisturisation. *Med. Biol. Eng. Comput.* 24, 71–77.
- Yoon, H.S., Baik, S.H., and Oh, C.H. (2002). Quantitative measurement of desquamation and skin elasticity in diabetic patients. *Skin Research and Technology* 8, 250–254.
- Zaman, M., Khalid, U., Raja, M.A.G., Siddique, W., Sultana, K., Amjad, M.W., Rehman, A.U., and Khan, M.A. (2017). Fabrication and Characterization of Matrix-Type Transdermal Patches Loaded with Ramipril and Repaglinide Through Cellulose-based Hydrophilic and Hydrophobic Polymers: In Vitro and Ex Vivo Permeation Studies. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* 56, 1713–1722.

Zhang, L., and Zhang, L. (2011). Voluntary oral administration of drugs in mice. Protocol Exchange.

Zhang, H., Zhai, Y., Yang, X., and Zhai, G. (2015). Breaking the skin barrier: achievements and future directions. *Curr. Pharm. Des.* 21, 2713–2724.

Zhu, Z., Yang, T., Zhao, Y., Gao, N., Leng, D., and Ding, P. (2014). A simple method to improve the dissolution of repaglinide and exploration of its mechanism. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9, 218–225.

Zunino, S.J., Simons, L.F., Sambrook, J.F., and Gething, M.J. (1994). Interleukin-1 promotes hyperglycemia and insulinitis in mice normally resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Am. J. Pathol.* 145, 661–670.

Αντωνίου, Χ., and Κατσάμπας, Α. (2015). Δερματολογία-Αφροδισιολογία (Αθήνα: Πασχαλίδης).

Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (2013). Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη Διαχείριση του Διαβητικού Ασθενούς.

Ελληνική Διαβητολογική Εταιρεία (2018). Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη Διαχείριση του Διαβητικού Ασθενούς.

Εφεντάκης, Ι. (2001). Φαρμακευτική τεχνολογία των στερεών μορφών (Πανεπιστήμιο Αθηνών: Φαρμακευτικό Τμήμα).

Μυγδάλης, Η., and Τεντολούρης, Ν. (2017). Θεραπευτικό Πρωτόκολλο Συναγογράφησης: Σακχαρώδης Διαβήτης.

Ντυμένου, Β.Π. (2012). Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων: Ι] Σύγκριση διαφόρων τύπων ελαστικών λιποσωμάτων και μελέτη μηχανισμού αύξησης διαπερατότητας υδατοδιαλυτών φαρμάκων με τη χρήση τους. ΙΙ] Αύξηση διαπερατότητας αντιυπερτασικών φαρμάκων με συστήματα ενισχυτών διαπέρασης. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

Παπαϊωάννου, Γ. (2010). ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ - ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ - ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ - ΧΡΗΣΗ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ (ΓΚΕΛΜΠΕΣΗΣ Γ.).

Πυριόχου, Δ. (2012). Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CREB σε καρκινικά κύτταρα του δέρματος. Thesis.

Φράγκου, Ε. (2007). Τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκου με νέα φαρμακοτεχνικά συστήματα. In ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΕΡΜΑΤΟΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ, (Athens), pp. 41–53.

Χαλβατσιώτης, Π.Γ. (2015). Η σημασία της αυτομέτρησης & η αξιοπιστία των μεθόδων για τη σωστή ρύθμιση του ΣΔ με ινσουλίνη ως βασικό κριτήριο επιλογής μετρητών σακχάρου. p.

Χατζημπούγιας, Ι. (2000). Στοιχεία ανατομικής του ανθρώπου (ΡΟΤΟΝΤΑ).

(2004). Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutics (CRC Press).

(2012a). Transdermal and topical drug delivery: principles and practice.

(2012b). Transdermal and topical drug delivery: principles and practice (Hoboken, N.J: Wiley).

(2017). Cardiovascular Disease and Risk Management. Diabetes Care 40, NaN-NaN.

What is diabetes mellitus?

International Diabetes Federation.

Diabetes UK - Know diabetes. Fight diabetes.

MyDiabetes.

Επιπλοκές του Διαβήτη.

Σακχαρώδης Διαβήτης.

Electrotherapy.

Repaglinide | Potassium Channel inhibitor |.

CCAC - Canadian Council on Animal Care.

Standard Operating Procedure ORAL GAVAGE IN THE MOUSE Florida State University.

Oral Dosing (Gavage) in the Mouse and Rat).

Repaglinide Datasheet.

Repaglinide Safety Data Sheet.

Εγχειρίδιο χρήσης GlucoMen areo.

Alcohol and Hypoglycemia - The Liver, Blood Glucose, Hypos & Sport.

www.khanacademy.org.

www.eyegatepharma.com.

www.electrotherapy.org.

www.medical.gr.

www.menarinidiabetes.gr.

www.wikipedia.org.

Εργαστήριο Ηλεκτρικών Μετρήσεων, HMMY.

