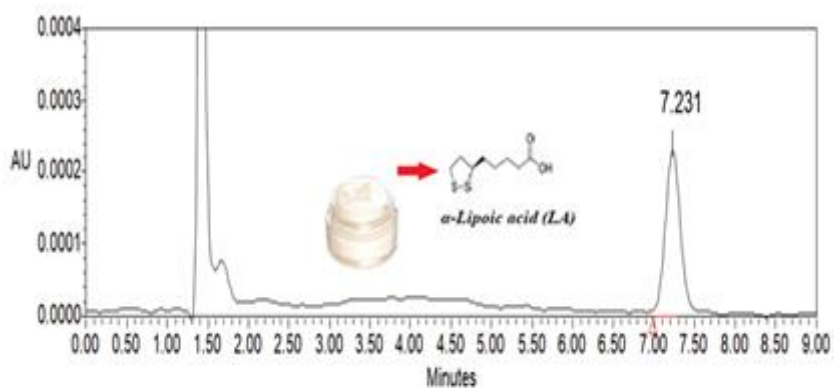


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

PER-OS ΣΕ ΣΕΙΡΑ ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

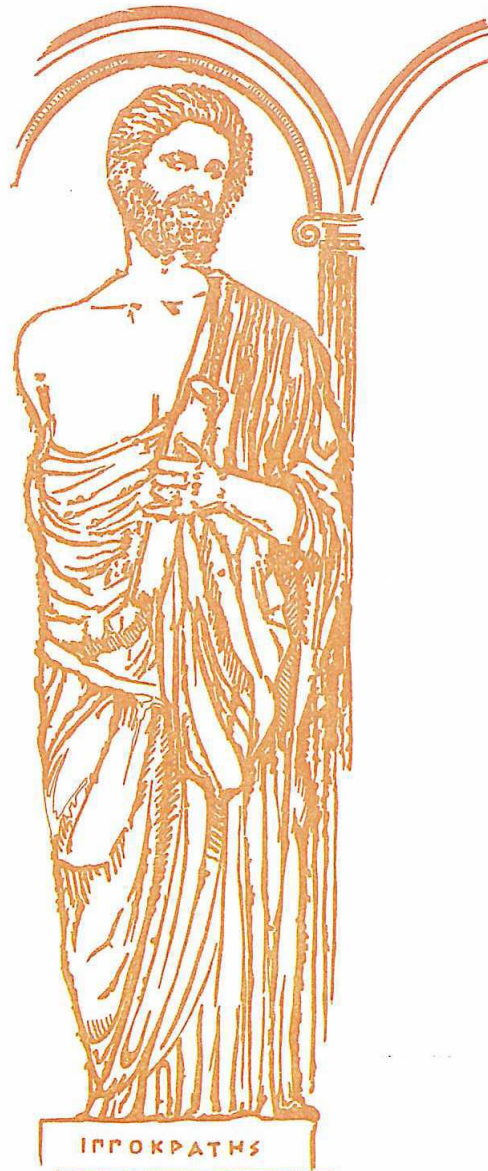


ΣΠΥΡΟΣ Π. ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

«Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή γνώμών του συγγραφέα».

ΕΘΜΙΚΟΝ ἔ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΣΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΗΣΑΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΓΓΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΞΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠΙ ΨΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΩ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΟΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠΙΨΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΟΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΞΙΓΗΣΟΜΑΙ. ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ, Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΣΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΩΣΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΛΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΟΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΗΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΚΙΑΝ, ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΗ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ, ΩΣ ΑΥΤΟΣ, ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΟΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ, ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΗΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ, ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΠΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ, ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΟΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΚΑΙ ΣΑΡΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ, ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης εκπόνησης Διδακτορικής

Διατριβής: 26-2-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής

Επιτροπής: 3-6-2014

Ημερομηνία καθορισμού θέματος Διδακτορικής

Διατριβής: 26-9-2014

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 2-6-2020

Ημερομηνία παρουσίασης Διδακτορικής Διατριβής: 16-7-2020

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σ. Αθανασέλης, Καθηγητής Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπων)

Ε. Παντερή, Καθηγήτρια Φαρμακευτική Ανάλυσης,
Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ.

Α. Βαρβαρέσου, Καθηγήτρια Κοσμητολογίας,
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σ. Αθανασέλης, Καθηγητής Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπων).

Ε. Παντερή, Καθηγήτρια Φαρμακευτική Ανάλυσης, Τμήμα Φαρμακευτικής
ΕΚΠΑ.

Α. Βαρβαρέσου, Καθηγήτρια Κοσμητολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών
Επιστημών, ΠΑΔΑ.

Χ. Σπηλιοπούλου, Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας
Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ.

Μ. Στεφανίδου, Καθηγήτρια Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ.

Ι. Παπουτσής, Επίκουρος Καθηγητής Δικαστικής Τοξικολογίας, Ιατρικής
Σχολής ΕΚΠΑ.

Ε. Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής Δερματολογίας & Αφροδισιολογίας,
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ.

*Στη σύζυγό μου και
τα παιδιά μου*

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ : Σπύρος Παπαγεωργίου του Παναγιώτη

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ :

ΤΗΛ:

Email : spapage@uniwa.gr, spypapage@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 1987-1992 : Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
1992-1993 : Υπότροφος, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ερευνητικό Πρόγραμμα
2002-2004 : Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Βιομηχανική Φαρμακευτική»
Φαρμακευτική Σχολή, ΕΚΠΑ
2014-2020 : Ph.D.(c) Τμήμα Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή,
ΕΚΠΑ

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

- 2010- σήμερα : Λέκτορας Εφαρμογών Κοσμητολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών
Επιστημών
Τομέας Αισθητικής & Κοσμητολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής
Αττικής
1999-2010 : Εργαστηριακός Συνεργάτης, Τμήμα Αισθητικής και
Κοσμητολογίας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας
2000-2010 : Υπεύθυνος Εργοστασίου (ΕΟΦ), Διευθυντής Παραγωγής &
Ποιοτικού Ελέγχου, «Frezyderm ΑΒΕΕ, Καλλυντικά-Φάρμακα-
Είδη Διατροφής»
1995-2000 : Υπεύθυνος Εργοστασίου (ΕΟΦ), Διευθυντής Παραγωγής &
Ποιοτικού Ελέγχου « Γ. Παναγιωτίδης Βιομηχανία Καλλυντικών»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

h index (Scopus): 4

Αναφορές στη Διεθνή Βιβλιογραφία (Scopus): 98

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- **Papageorgiou S**, Varvaresou A, Panderi I, Giannakou M, Spiliopoulou C and S. Athanaselis. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation and stability of α-lipoic acid in cosmetic creams. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020; 42: 221–228.

- Varvaresou, A., Iakovou, K., Mellou, F., Myrogiannis, D., **Papageorgiou S**. Targeted therapy in oncology patients and skin: Pharmaceutical and dermocosmetic management. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019, in Press

- Mellou F, Varvaresou A, **Papageorgiou S**
Renewable sources: applications in personal care formulations.
Int J Cosmet Sci. 2019 Dec; 41 (6) : 517-525.

- Varvaresou A., **Papageorgiou S**. Mellou F. and Protopapa E.
Study in anti-wrinkle activity of a night cream containing a combination of antioxidants, phyto-steroids and acetyl-tetrapeptide-9 by biophysical methods and objective evaluation. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, Int Ed*. 2016; 30:67-70

- Varvaresou A. and **Papageorgiou S**.
Efficacy tests of Alternative Preservatives in combination with Phenoxyethanol for Development of Safe Cosmetic Products for Children.
Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, Int Ed. 2016; 30:79-83.

- Eleni Kalogria, Athanasia Varvaresou, **Spyridon Papageorgiou**, Evaggelia Protopapa Ioannis Tsaknis, Alexios Matikas, Irene Panderi
Pre-Column Derivatization HPLC Procedure for the Quantitation of Aluminium Chlorohydrate in Antiperspirant Creams Using Quercetin as Chromogenic Reagent. *Chromatographia*. 2014; 77:1275–1281.

- Papagianni P, Varvaresou A, **Papageorgiou S**, Panderi I.
Development and validation of an ion-pair RP-HPLC method for the determination of oligopeptide-20 in cosmeceuticals. *J Pharm and Biomed Anal*. 2011; 56 (3):645-649.

- Varvaresou, **S.Papageorgiou**
The development of self- preserving gels *Household and Personal Care Today*, 2011; 18-21.

- **S.Papageorgiou**, A.Varvaresou, E.Tsirivas and C.Demetzos
New alternatives to cosmetics preservation.
Journal of Cosmetic Science. 2010; 61:107-123.

- A.Varvaresou, **S.Papageorgiou**, E.Tsirivas, E.Protopapa, H.Kintziou,
V.Kefala,C.Demetzos **Self- preserving Cosmetics**
International Journal of Cosmetic Science. 2009; 31: 163-175

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- **Σπύρος Παπαγεωργίου**, Αθανασία Βαρβαρέσου, Ειρήνη Παντερή, Μαρία Γιαννάκου, Φωτεινή Μέλλου, Χαρά Σπηλιοπούλου, Σωτήρης Αθανασέλης.
Μελέτη σταθερότητας του α-lipoic acid σε καλλυντικές κρέμες και συμπληρώματα διατροφής με μέθοδο αντίστροφης φάσης HPLC.
19ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο, 16-17 Δεκεμβρίου 2019, Αθήνα

- **Spyridon Papageorgiou**, Maria Giannakou, Athanasia Varvaresou, Irene Panderi, Fotini Mellou, Athanaselis Sotiris. Development and validation of a liquid chromatographic method with UV detection for the quantitation of α-lipoic acid in dietary supplements International Conference & Expo on Chromatography Techniques (2019) Dublin, Ireland, Conference-poster

- **Spyridon Papageorgiou**, Athanasia Varvaresou, Maria Giannakou, Irene Panderi and Fotini Mellou. Development of children's toothpaste gel with natural alternative preservatives. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity, November 25-29 (2018) Athens, Greece

- Varvaresou A, **Papageorgiou S**, Iakovou K, Myrogiannis D.
Dermocosmetic treatment in radiodermatitis in oncology patients. 16th Global Annual Oncologists Meeting, 24,25 April (2017) Dubai

ΚΡΙΤΗΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Journal of Cosmetics & laser Therapy (Taylor & Francis)
- Advances in Medical Sciences (Elsevier)
- Current Microbiology (Springer)

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

Βασικές Αρχές Κοσμητολογίας

(Τσιρίβας Ε., Βαρβαρέσου Α., Παπαγεωργίου Σ. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)
Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε, 2013

Εφαρμοσμένη Κοσμητολογία-Δερμοκαλλυντικά
(Τσιρίβας Ε., Βαρβαρέσου Α., Παπαγεωργίου Σ. , Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)
Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2016

Σημειώσεις Κοσμητολογίας I & III
(Τσιρίβας Ε., Βαρβαρέσου Α., Παπαγεωργίου Σ., Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Εργαστηριακές Ασκήσεις Κοσμητολογίας II
(Τσιρίβας Ε., Παπαγεωργίου Σ. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Σημειώσεις Νομοθεσίας Καλλυντικών
(Παπαγεωργίου Σ. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

Σημειώσεις Παραγωγής Καλλυντικών Προϊόντων
(Παπαγεωργίου Σ. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής)

ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ

- Επιστημονικός Σύμβουλος στην Έρευνα, Ανάπτυξη, Παραγωγή, Ποιοτικό έλεγχο και Νομοθεσία των καλλυντικών, ιατροτεχνολογικών προϊόντων και συμπληρωμάτων διατροφής σε εταιρείες.
- Ανάπτυξη πάνω από 200 τελικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην Ελλάδα και στο Εξωτερικό.
- Εισηγητής στην τεχνική επιτροπή του ΠΒΣΑΚ για την εναρμόνιση του Ελληνικού και του Ευρωπαϊκού τρόπου Επιθεώρησης των Εργοστασίων Παραγωγής Καλλυντικών.
- Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών, της Ελληνικής Εταιρείας Κοσμητολογίας και του Πανελληνίου Συνδέσμου Χημικών Βιομηχανίας.
- Πιστοποιημένος Εσωτερικός Επιθεωρητής "ISO 9001: 2000" Αρ. Διεθνούς Πιστοποιητικού PIR/04/628.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Δερματοκοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κατά την περίοδο του Ιουνίου 2014 έως τον Μάιο 2020. Φτάνοντας στο τέλος αυτού του τόσο δύσκολου, αλλά και εποικοδομητικού ταξιδιού αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν σε αυτήν δύσκολη προσπάθεια.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διατριβή μου Καθηγητή Τοξικολογίας στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σ. Αθανασέλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την αμέριστη συμπαράστασή του, τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Ανάλυσης του ΕΚΠΑ, κ. Ε. Παντερή, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, για το διαρκές και αμείωτο ενδιαφέρον της σε όλη την πορεία της εκπόνησης της εργασίας μου. Οι συνεχείς και κομβικές λύσεις που μου έδωσε, στα δύσκολα και κρίσιμα επιστημονικά προβλήματα που παρουσιάστηκαν, αποτέλεσαν την πυξίδα που με οδήγησε τελικά στην επιτυχή κατάληξη της παρούσας διατριβής.

Θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Κοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, κ. Α. Βαρβαρέσου, το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής και χρόνια συνεργάτη και συνάδελφό μου. Πιστεύω ότι το εξαιρετικό ερευνητικό της πνεύμα, η ικανότητά της στην επίλυση δύσκολων και απρόβλεπτων καταστάσεων, με κάνουν να αισθάνομαι τυχερό που πορευόμαστε μαζί επιστημονικά όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας κ. Χ. Σπηλιοπούλου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας για την τιμή που μου έκανε να εκπονήσω την διατριβή μου στο εργαστήριό της.

Ανεκτίμητη υπήρξε η συμπαράσταση από τη Χημικό Μηχανικό κ. Μ. Γιαννάκου, που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της ίσως να μην κατάφερνε να υλοποιηθεί με επιτυχία το δύσκολο αυτό έργο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πλαστικό Χειρουργό κ. Β. Πάγκαλο για την πολύτιμη συνεργασία του στη λήψη των βιοψιών του δέρματος των εθελοντών και την κ. Β. Καραβάνα Ερευνήτρια-Επιστημονικό Συνεργάτη στα Εργαστήρια Μ. Σίμου και Γ.Π. Λιβανός, 1η Κλινική Εντατικής Θεραπείας Γ.Ν.Α."Ο Ευαγγελισμός", Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συνεργασία στη μέτρηση των βιοψιών του δέρματος.

Ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας του Πανεπιστημίου Δ. Αττικής, κ. Ε. Ράλλη για την πολύτιμη επιστημονική αρωγή του στην δερματολογική αξιολόγηση των ανεπιθύμητων ενεργειών, κατά την διενέργεια της κλινικής μελέτης στους εθελοντές.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη και συνεργάτες του Εργαστηρίου Δερματοκοσμητολογίας κ. Ε. Πρωτόπαπα και κ. Κ. Δηλαβέρη, που στάθηκαν δίπλα μου ψυχικά και επιστημονικά, όποτε χρειάστηκε στο δύσκολο αυτό στάδιο της ζωής μου.

Ευχαριστώ θερμά τον πρώην Πρύτανη του ΤΕΙ Αθήνας κ. Μ. Μπρατάκο, που όποτε χρειάστηκε υποστήριξε τόσο οικονομικά όσο και ηθικά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής μου.

Είμαι αληθινά ευγνώμων στον Καθηγητή Κοσμητολογίας του πρώην ΤΕΙ Αθήνας κ. Ε. Τσιρίβα, ιδρυτή του Εργαστηρίου Δερματοκοσμητολογίας, που με το εξαιρετικό επιστημονικό του υπόβαθρο, τις συμβουλές του και την ηθική και ψυχική του συμπαράσταση με καθοδήγησε και μου συμπαραστάθηκε σε όλη τη διάρκεια της επιστημονικής μου προσπάθειας και της επαγγελματική μου πορείας. Αισθάνομαι πραγματικά πολύ τυχερός που τον συνάντησα στη ζωή μου.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, από τα βάθη της ψυχής μου, στα μέλη της οικογένειάς μου Κωνσταντίνα, Παναγιώτη & Άγγελο, που παρόλο τον πολύτιμο χρόνο που τους στέρησα και ορισμένες ανησυχίες και λύπες που τους μετέφερα, κατά τη διάρκεια αυτού του δύσκολου ταξιδιού, δεν έπαψαν ποτέ να με στηρίζουν, να με εμπυχώνουν και με την περίσσεια αγάπη τους να με βοηθήσουν να φτάσω στην Ιθάκη του επιστημονικού μου ταξιδιού.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : α -ΛΙΠΟΪΚΟ ΟΞΥ

1.1	Εισαγωγή	1
1.2	Φυσικές και Χημικές ιδιότητες	3
1.3	Χημική σύνθεση	4
1.4	Βιοσύνθεση	5
1.5	Βιολογική-Ενζυμική δραστηριότητα	6
1.6	Φαρμακολογία του α -λιποϊκού οξέος	7
1.6.1	Εισαγωγή	7
1.6.2	Αντιοξειδωτική δράση του α -λιποϊκού οξέος.	7
1.6.3	Δέσμευση ελευθέρων ριζών του α -LA και του DHLA	8
1.6.4	Αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών	9
1.6.5	Το α -λιποϊκό οξύ ως χηλικός παράγοντας	9
1.6.6	Το α -λιποϊκό οξύ ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας	9
1.6.7	Φαρμακοκινητική	10
1.6.7.1	Απορρόφηση-Πρόσληψη μέσω τροφής	10
1.6.7.2	Κατανομή	11
1.6.7.3	Βιομετατροπή-Απέκριση	12
1.6.8	Βιοδιαθεσιμότητα του α -λιποϊκού οξέος	13
1.6.9	Χρήση στη θεραπευτική	15
1.6.9.1	Δράση του α -λιποϊκού οξέος στο διαβήτη	15
1.6.9.2	Δράση του α -λιποϊκού οξέος στη διαβητική νευροπάθεια	16
1.6.9.3	Δράση του α -λιποϊκού οξέος σε υπέρβαρους/παχύσαρκους ασθενείς	16
1.6.9.4	Δράση του α -λιποϊκού οξέος στη νόσο Alzheimer	16
1.6.9.5	Δράση του α -λιποϊκού οξέος στο καρκίνο	17
1.7	Τοξικότητα του α -λιποϊκού οξέος	17
1.7.1	Συστημική Τοξική δράση	17

1.7.2 Τοπική Τοξική δράση	20
1.7.3 Δηλητηρίαση με α-λιποϊκό οξύ	21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΔΕΡΜΑ

2.1 Εισαγωγή	22
2.2 Ανατομία του δέρματος	23
2.3 Επιδερμίδα	24
2.4 Κυρίως δέρμα ή χόριο	25
2.5 Εξωκυττάριο υλικό (Extracellular Matrix, ECM)	27
2.6 Υποδόριος ιστός ή υπόδερμα	27
2.7 Γήρανση του δέρματος	28
2.7.1 Ενδογενής Γήρανση	28
2.7.2 Εξωγενής Γήρανση	29
2.7.3 Φωτογήρανση	30
2.7.4 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

3.1 Εισαγωγή	33
3.2 Δραστικά συστατικά	33
3.3 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός έναντι ελευθέρων ριζών	33
3.3.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά στο δέρμα	34
3.4 Εξωγενή αντιοξειδωτικά στα αντιγηραντικά καλλυντικά	35
3.5 Δράση του α-λιποϊκού οξέος ως αντιοξειδωτικό στο δέρμα	36
3.6 Μελέτες της δράσης του α-λιποϊκού οξέος σε προϊόντα τοπικής εφαρμογής στη φωτογήρανση	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

4.1 Εισαγωγή	39
4.2 Οργανολογία	39
4.3 Εφαρμογές της HPLC στη διασφάλιση ποιότητας στα φάρμακα, στα καλλυντικά και στα συμπληρώματα διατροφής	40

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	42
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΟΥ

6.1 Εισαγωγή	44
6.2 Ειδικότητα (Specificity)	44
6.3 Γραμμικότητα (Linearity)	45
6.4 Περιοχή συγκεντρώσεων (Range)	45
6.5 Ακρίβεια (Accuracy)	45
6.6 Πιστότητα (Precision)	46
6.7 Όριο ανίχνευσης (Detection limit) – Όριο ποσοτικ/σης (Quantitation limit)	47
6.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)	47
6.9 Αντοχή μεθόδου (Ruggedness)	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΚΑΨΑΚΙΑ)

7.1 Εισαγωγή	48
7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια)	52
7.2.1 Αρχή μεθόδου	52
7.2.2 Εξοπλισμός-οργανολογία	54
7.2.3 Αντιδραστήρια	55
7.2.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας	56
7.3 Βελτιστοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια)	57
7.3.1 Μελέτη της επίδρασης του ρυθμιστικού δ/τος του δισόξινου φωσφορικού καλίου στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας	57
7.3.2 Μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του οργανικού τροπ/τή στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας	60
7.3.3 Μελέτη της επίδρασης της στάσιμης φάσης με στήλη αντίστροφης φάσης	61

7.3.4	Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	63
7.3.5	Κατεργασία καψακίων	65
7.4	Επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια)	67
7.4.1	Γραμμικότητα	67
7.4.2	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης	72
7.4.3	Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας	72
7.4.4	Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού	74
7.4.5	Ανθεκτικότητα της μεθόδου	75
7.5	Ποσοτικός προσδιορισμός του α-λιποϊκού οξέος σε συμπ/μα διατροφής	77
7.6	Έλεγχος του περιεχομένου των καψακίων σε α-λιποϊκού οξέος	78
7.7	Εφαρμογή της μεθόδου στον προσδιορισμό α-λιποϊκού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής (καψάκια)	79
7.8	Μελέτες σταθερότητας	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ		
8.1	Εισαγωγή	86
8.2	Ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα	87
8.2.1	Αρχή μεθόδου	87
8.2.2	Εξοπλισμός-οργανολογία	88
8.2.3	Αντιδραστήρια	89
8.2.4	Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας	90
8.2.5	Ανάπτυξη της αντιοξειδωτικής καλλυντικής κρέμας με α-λιποϊκό οξύ (formulation)	91
8.2.5.1	Μέθοδος Παραγωγής	93
8.2.6	Κατεργασία της καλλυντικής κρέμας	98
8.3	Βελτιστοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα	101
8.3.1	Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες	101
8.3.2	Βελτιστοποίηση κατεργασίας δείγματος	102

8.4	Επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα	104
8.4.1	Γραμμικότητα	104
8.4.2	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης	109
8.4.3	Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας	109
8.4.4	Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού	111
8.4.5	Ανθεκτικότητα της μεθόδου	112
8.4.6	Έλεγχος ανάκτησης	113
8.5	Εφαρμογή της μεθόδου στη μέτρηση καλλυντικών που περιέχουν α-λιποϊκό οξύ	114
8.6	Μελέτες σταθερότητας	115

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 : ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

9.1	Εισαγωγή-Σχεδιασμός Μελέτης	121
9.2	Εθελοντές	122
9.3	Μέθοδοι	125
9.3.1	Βιοφυσικές Μέθοδοι (in vivo)	125
9.3.2	Ιστολογική μέθοδος- Βιοψίες (ex vivo)	131
9.4	Στατιστική ανάλυση	142

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 : ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

10.1	Οργανολογικός – Υλικοτεχνικός εξοπλισμός	144
------	--	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 : ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΩΝ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

11.1	Εισαγωγή	146
11.2	Μετρήσεις-αποτελέσματα ανά ομάδα εθελοντών (Στατιστικό μοντέλο One-Way Repeated-Measures ANOVA)	148

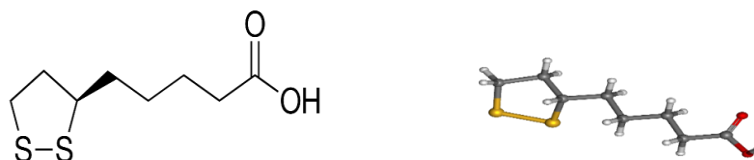
11.3	Μετρήσεις-αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων εθελοντών (Στατιστικό μοντέλο Kruskal-Wallis)	164
11.4	Αποτελέσματα βιοφυσικών μεθόδων	171
11.4.1	Λείανση (απαλότητα, <i>Sesm</i>) του δέρματος του προσώπου (παρειάς)	171
11.4.2	Συνολικός αριθμός ρυτίδων (<i>Sew</i>) του δέρματος του προσώπου (παρειάς)	172
11.4.3	Αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων εθελοντών	177
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 : ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΨΙΩΝ (<i>EX VIVO</i>)		
12.1	Εισαγωγή	182
12.2	Βιοψίες ανά ομάδα εθελοντών. Μετρήσεις-Αποτελέσματα	183
12.3	Αποτελέσματα των βιοψιών	194
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 : ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟΥΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ		
13.1	Εισαγωγή	196
13.2	Αποτελέσματα των ανεπιθύμητων ενεργειών των ομάδων εθελοντών	198
13.3	Συμπεράσματα σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων α-λιποϊκού οξέος	200
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ		
14.1	Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια)	203
14.2	Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα	207
14.2	Δερματοκοσμητολογική δράση του α-λιποϊκού οξέος	210
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	218
	SUMMARY	222
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	225
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	246

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

α-ΛΙΠΟΪΚΟ ΟΞΥ

1.1 Εισαγωγή

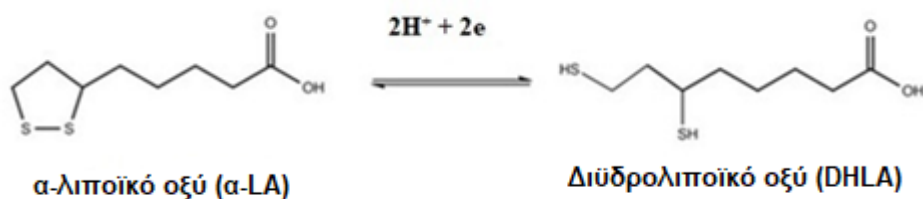
Το α-λιποϊκό οξύ (α-lipoic acid ή α-LA) γνωστό και ως lipoic acid (LA) ή θειοκτικό οξύ (thioctic acid) ή 6,8-Dithiooctanoic acid με ονομασία κατά IUPAC : (R)-5-(1,2-Dithiolan-3-yl) pentanoic acid, (σχ.1.1) είναι μία οργανοθειική ένωση που παράγεται από το οκτανοϊκό οξύ (caprylic acid).



Σχήμα 1.1. Δομή του α-λιποϊκού οξέος

Το α-λιποϊκό οξύ (α-LA) απομονώθηκε αρχικά το 1951 από τον «Reed» και τους συνεργάτες του από το ήπαρ των βοοειδών και θεωρήθηκε αρχικά ως βιταμίνη [1]. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι δεν είναι βιταμίνη και συντίθεται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Βρίσκεται, κυρίως, στο κόκκινο κρέας, στα νεφρά, στην καρδιά και στο ήπαρ και σε μικρότερη ποσότητα στις πατάτες, τα καρότα, το μπρόκολο, τον κόλιανδρο, τη τομάτα, το πίτουρο του ρυζιού και τη ζύμη. Τα ποσά που υπάρχουν, όμως, φυσικώς στα τρόφιμα δεν υπερβαίνουν τα 0,3 mg/100g [2]. Είναι ένας απαραίτητος συμπράγοντας (cofactor) στα μιτοχονδριακά πολυενζυμικά σύμπλοκα, μέσω της κατάλυσης της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του περουβικού, του α-κετογλουταρικού και των α-κετο-οξέων, με διακλαδισμένη αλυσίδα. Το α-λιποϊκό οξύ (α-LA) και η ανηγμένη μορφή του Διϋδρολιποϊκό οξύ (DHLA) εκπληρώνουν όλα τα

κριτήρια για ένα ιδανικό αντιοξειδωτικό λόγω της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (σχ. 1.2). [3-7]



Σχήμα 1.2. Οξειδοαναγωγικό ζεύγος *α-LA/DHLA*

Το α-λιποϊκό οξύ απορροφάται γρήγορα από το γαστρεντερικό σύστημα και φτάνει μέχρι τα κύτταρα. Είναι απαραίτητο για τον αερόβιο μεταβολισμό. Παρασκευάζεται συνθετικά και είναι διαθέσιμο ως συμπλήρωμα διατροφής, λόγω της εξαιρετικής αντιοξειδωτικής και όχι μόνο δράσης του. Διατίθεται ακόμη σε κάποιες χώρες ως φάρμακο και ως δραστικό συστατικό κατά της γήρανσης στα καλλυντικά προϊόντα. Μπορεί να λειτουργήσει ως χηλικό αντιδραστήριο μετάλλων. Δεν έχει παρουσιάσει, μέχρι σήμερα, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Αλληλεπιδρά με άλλα αντιοξειδωτικά και μπορεί να τα αναγεννήσει, όπως τη βιταμίνη C, τη γλουταθειόνη και τη βιταμίνη E. [8-9]. Για αυτό το λόγο το α-LA ονομάζεται και ως «το αντιοξειδωτικό των αντιοξειδωτικών». Η θεραπευτική του δράση βασίζεται στις μοναδικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του. Οι πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τη χρήση του σε επικουρικές αγωγές πολλών ασθενειών, τέτοιες όπως ο διαβήτης, η διαβητική νευροπάθεια, οι καρδιαγγειακές, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος και το AIDS. [10-11].

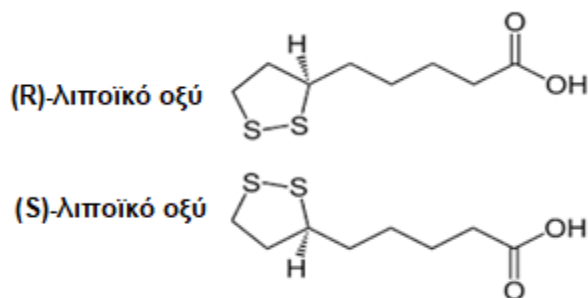
1.2 Φυσικές και Χημικές ιδιότητες.

Το α-λιποϊκό οξύ έχει μοριακό τύπο $C_8H_{14}O_2S_2$ και μοριακό βάρος 206.32 g/mol. Έχει εμφάνιση κίτρινων κρυστάλλων, με μορφή βελόνων και σημείο τήξης 46-48° C (115-118 °F; 319-321 K). Έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (0,24 g/L). Διαλύεται πολύ εύκολα στην αιθυλική αλκοόλη και έχει μικρή διαλυτότητα στα έλαια (πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1. Διαλυτότητα α-λιποϊκό οξύ

ΔΙΑΛΥΤΗΣ	% w/w
Water	0,02%
Ethanol	49%
Glycerin	<0.02%
Propylene Glycol	30.0%
Butylene Glycol	22.4%
Hexylene Glycol	27.0%
Polyethylene Glycol 300	28.0%
Paraffin oil	<0.02%
Methyl Soyate	6.7%
Triethyl Citrate	7.0%
Isopropyl Myristate	4.0%
Methyl Benzoate	50.0%
Soyabean oil	<0.5%
N-methyl pyrrolidone	100%
Coconut oil- fraction A	3.8%

Το α-λιποϊκό οξύ περιέχει δύο άτομα θείου (σχ.1.1) στους C6 και C8 ενωμένοι με δισουλφιδικό δεσμό και έτσι θεωρείται ότι οξειδώνεται αν και τα άτομα του θείου μπορούν να βρεθούν σε ψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις. Το άτομο του άνθρακα (C6) είναι ασύμμετρο και έτσι υπάρχουν δύο εναντιομερή : (*R*)-(+)-lipoic acid (RLA) και (*S*)-(-)-lipoic acid (SLA).

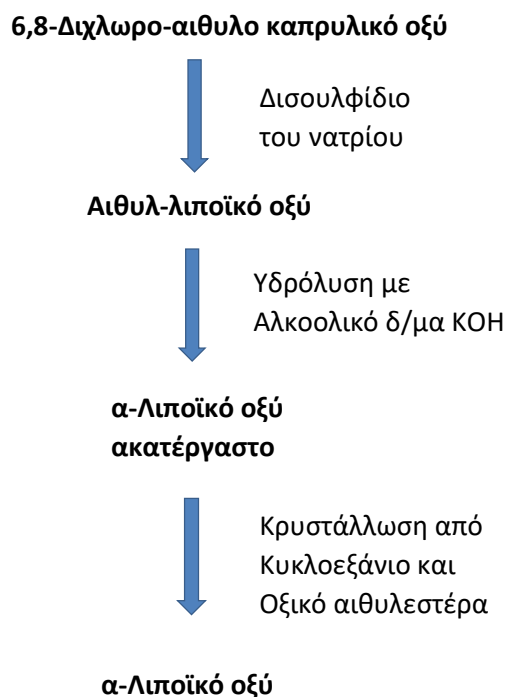


Σχήμα 1.3. Χημική δομή των εναντιομερών (R) και (S) του α-λιποϊκού οξέος

Το ρακεμικό μίγμα DL-alpha lipoic acid έχει CAS No : 1077-28-7 και το (R)-(+)-lipoic acid έχει CAS No : 1200-22-2. Στη φύση υπάρχει μόνο το (R)-(+)-lipoic acid και είναι αυτό που είναι απαραίτητο για τον αερόβιο μεταβολισμό, αφού θεωρείται απαραίτητος συμπράγοντας για πολλά ενζυμικά σύμπλοκα. Πιστεύεται ότι είναι ο κύριος διατροφικός και θεραπευτικός τύπος (σχ.1.3). Συνήθως, χρησιμοποιείται στα συμπληρώματα διατροφής το μόριο ως ρακεμικό μίγμα : (R/S)-lipoic acid (R/S-LA) [12-14].

1.3 Χημική σύνθεση

Οι πρώτες συνθετικές διαδικασίες για το α-λιποϊκό οξύ (RLA, SLA) έγιναν το 1950 [15]. Οι πρόοδοι στον 21^ο αιώνα στη ασύμμετρη σύνθεση οδήγησαν στην ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνολογιών για την παρασκευή του R/S-LA (ρακεμικού μίγματος) και των εναντιομερών μορφών RLA και SLA, με υψηλή καθαρότητα, αλλά και με οπτική καθαρότητα, προκειμένου να διατεθούν στη βιομηχανία. Αν και το RLA προτιμάται διατροφικά, λόγω της ομοιότητας της δράσης του με τη βιταμίνη στη μεταβολική διαδικασία «vitamin like activity», το R/S-LA διατίθενται, κυρίως και ακολούθως το RLA στα συμπληρώματα διατροφής. Στο σχήμα 1.4 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα ροής της βιομηχανικής παραγωγής του R/S LA (USP 99.0 %) (ρακεμικού μίγματος) που διατίθεται στην αγορά [16].



Σχήμα 1.4. Διάγραμμα ροής παραγωγικής διαδικασίας του α-λιποϊκού οξέος

1.4 Βιοσύνθεση

Το α-λιποϊκό οξύ παράγεται από το οκτανικό οξύ μέσω της βιοσύνθεσης του λιπαρού οξέος στη μορφή της οκτανούλ-ακυλ μεταφορικής πρωτεΐνης. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα μία δεύτερη βιοσυνθετική οδός του λιπαρού οξέος γίνεται μέσα στα μιτοχόνδρια. Το οκτανικό οξύ μεταφέρεται ως θειοεστέρας της ακύλ-μεταφορικής πρωτεΐνης από τη βιοσύνθεση του λιπαρού οξέος σε ένα αμίδιο της λιπούλ κυρίαρχης πρωτεΐνης από ένα ένζυμο που λέγεται οκτανουλτρανσφεράση. Δύο άτομα υδρογόνου του οκτανικού οξέος αντικαθίστανται με δύο ομάδες θείου μέσω του μηχανισμού (Radical SAM), από τη λιπούλ συνθάση. Έτσι, συνθέτεται το α-λιποϊκό οξύ προσκολλημένο στις πρωτεΐνες, ενώ καθόλου ελεύθερο α-λιποϊκό οξύ δεν παράγεται. Όταν οι πρωτεΐνες διασπώνται από τη δράση του ενζύμου λιποαμιδάση μετακινείται το α-λιποϊκό οξύ. Το ελεύθερο α-λιποϊκό οξύ χρησιμοποιείται από

κάποιους οργανισμούς ως ένζυμο, που καλείται λιποϊκή πρωτεϊνική λιγάση η οποία προσκολλείται ομοιοπολικώς στη κατάλληλη πρωτεΐνη [17].

1.5 Βιολογική-Ενζυμική δραστηριότητα

Το α-λιποϊκό οξύ είναι ένας πολύτιμος ενζυμικός συμπράγοντας (cofactor). Περιλαμβάνεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και στη διαχείριση της μεταγραφής των γονιδίων. Συμμετέχει σε τουλάχιστον πέντε ενζυμικά συστήματα. Δύο από αυτά βρίσκονται στον βιοχημικό κύκλο του κιτρικού οξέος, μέσω του οποίου πολλοί οργανισμοί μετατρέπουν τα θρεπτικά συστατικά σε ενέργεια. Λιπολυτικά ένζυμα έχουν α-λιποϊκό οξύ προσκολλημένα με ομοιοπολικό τρόπο σε αυτά. Τα κυριότερα ενζυμικά συστήματα που συμμετέχει το α-LA είναι τα εξής :

- Το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (pyruvate dehydrogenase complex)
- Το σύμπλοκο της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης ή 2-οξογλουταρικής αφυδρογενάσης (α-ketoglutarate dehydrogenase).
- Το σύμπλοκο της διακλαδισμένης αλυσίδας οξοοξικής αφυδρογονάσης (branched-chain oxoacid dehydroacid dehydrogenase complex)
- Το σύμπλοκο της ακετοϊνικής αφυδρογονάσης (acetoin dehydrogenase complex)

Το περισσότερο μελετημένο ενζυμικό σύστημα, που συμμετέχει δραστικά το α-λιποϊκό οξύ, είναι το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης [1]. Αυτά τα σύμπλοκα έχουν τρεις κεντρικές υποομάδες, που είναι οι δεκαρβοξυλάση, η λιποϋλική τρανσφεράση και η διυδρολιποαμιδική αφυδρογενάση. Είναι κρίσιμος συμπράγοντας για τον αερόβιο μεταβολισμό, συμμετέχοντας στη μεταφορά των ομάδων του ακυλίου ή της μεθυλαμίνης μέσω του συμπλόκου της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης [9]. Το α-λιποϊκό οξύ λειτουργεί ως συμπράγοντας στο σύμπλοκο της ακετοϊνικής αφυδρογονάσης καταλύοντας τη μετατροπή της ακετοΐνης σε ακεταλδεύδη και ακετυλοσυνένζυμο Α σε μερικά βακτήρια, επιτρέποντας την ακετοΐνη να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αποκλειστική πηγή άνθρακα [18-19].

1.6 Φαρμακολογία του α-λιποϊκού οξέος

1.6.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια το α-λιποϊκό οξύ έχει κερδίσει μία αξιοσημείωτη προσοχή ως ένα συμπλήρωμα διατροφής με ωφέλιμες επιδράσεις, τόσο στη θεραπεία, όσο και στη διαχείριση ασθενειών [3,20]. Παρόλο τις εξαιρετικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες του λιποϊκού οξέος, η θεραπευτική του δράση είναι περιορισμένη και χρησιμοποιείται κυρίως για την πρόληψη ή την επικουρική θεραπεία για την βελτίωση των συμπτωμάτων των ασθενειών, λόγω των περιορισμών που σχετίζονται με την φαρμακοκινητική του. Ειδικότερα, έχει μικρό χρόνο ημιζωής και βιοδιαθεσιμότητα περίπου 30% και υφίσταται άμεση ηπατική διάσπαση, κατά την πρώτη μεταβολική δίοδο, μειωμένη διαλυτότητα και αστάθεια στο στομάχι. Όμως, η χρήση ποικίλων εξελιγμένων σκευασμάτων έχει αποδειχτεί ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα, μέσω της χρήσης αμφίφυλων εκδόχων, ικανά να αυξήσουν την διαλυτότητα και την εντερική απορρόφηση. Έτσι, οι βελτιωμένες συνθέσεις μπορούν να ενισχύσουν την απορρόφηση του α-LA και να βελτιώσουν την βιοδιαθεσιμότητά του, οδηγώντας σε πολύ καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα. Στη Γερμανία, χρησιμοποιείται πάνω από 50 χρόνια, ως φάρμακο ενδοφλεβίως, για την διαβητική νευροπάθεια [21].

1.6.2 Αντιοξειδωτική δράση του α-λιποϊκού οξέος

Ένα «θεραπευτικό» αντιοξειδωτικό θα πρέπει να απορροφάται από τη διατροφή και να μετατρέπεται εύκολα από τα κύτταρα και τους ιστούς σε μία αξιοποιήσιμη μορφή. Θα πρέπει να έχει μία ποικιλία χαρακτηριστικών όπως αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιοξειδωτικά, τόσο μέσα στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στην υδατική φάση και να έχει χαμηλό επίπεδο τοξικότητας. Το α-λιποϊκό οξύ (α-LA) εκπληρώνει όλες τις παραπάνω απαιτήσεις καθιστώντας το, ενδεχομένως, ένα υψηλά αποτελεσματικό «θεραπευτικό» αντιοξειδωτικό, για τις ασθένειες που σχετίζονται με

το οξειδωτικό stress, αλλά και για άλλες παρόλο που χρειάζονται να γίνουν ακόμη αρκετές μελέτες για να επιβεβαιωθεί η θεραπευτική του ισχύς. Έχει την ικανότητα :

- Να δεσμεύει απευθείας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS)
- Να υποβοηθάει την αναγέννηση ενδογενών αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E.
- Να παρουσιάζει εξαιρετική χηλική δραστηριότητα με διάφορα μέταλλα.
- Να προστατεύει διάφορα βιομόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και πυρηνικά οξέα από την οξειδωτική προσβολή [9,22,23].

Το α -lipoic acid (α -LA) και η ανηγμένη του μορφή Dihydrolipoic acid (DHHLA) δημιουργούν ένα ισχυρό οξειδοαναγωγικό ζεύγος LA/DHHLA redox (σχ. 1.2), που έχει πρότυπο δυναμικό αναγωγής $E = -0,32$ V. Το DHHLA δεν καταστρέφεται, όταν εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, αλλά μπορεί να ανακυκλωθεί από το α -LA [3].

1.6.3 Δέσμευση ελευθέρων ριζών από το α -LA και το DHHLA

Το α -λιποϊκό οξύ (α -LA) είναι ένα μοναδικό ενδογενές και εξωγενές αντιοξειδωτικό, γιατί εξουδετερώνει απευθείας τις δραστικές μορφές των οξυγονούχων ριζών (ROS), τόσο στην οξειδωμένη, όσο και στην ανηγμένη του μορφή. Είναι κυρίως λιποδιαλυτό και μερικώς υδατοδιαλυτό και επομένως προσφέρει την αντιοξειδωτική του δράση στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα, τον ορό και τις λιποπρωτεΐνες (τα υδατικά και τα λιπιδικά τμήματα του αίματος), σε αντίθεση με τη βιταμίνη C που είναι υδρόφιλη και τη βιταμίνη E που είναι υδρόφοβη. Άρα είναι ικανό να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες μέσα στο σώμα, εντός και εκτός κυττάρων, για αυτό το λόγο αναφέρεται ως καθολικό «universal» αντιοξειδωτικό. Το α -LA μπορεί να δεσμεύει τις ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), του υποχλωριώδους οξέος HOCl και του απλού (singlet) οξυγόνου $^1\text{O}_2$. Το DHHLA δεσμεύει τις σουπεροξειδικές ρίζες (O_2^-) και τις υπεροξειδικές ρίζες (ROO^-). Τόσο το α -LA, όσο και το DHHLA δεν είναι δραστικά απέναντι στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το DHHLA έχει την εξαιρετική

ιδιότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες χωρίς να συμμετέχει στη διαδικασία [24, 25].

1.6.4 Αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών

Το DHLA είναι ένα ισχυρό αναγωγικό μέσο, το οποίο έχει περισσότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το α-LA και αυτό έχει την ικανότητα να ανάγει τις οξειδωμένες μορφές μερικών σημαντικών αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη και η βιταμίνη C. Μπορεί, ακόμη, να αναγεννά και τη βιταμίνη E από την οξειδωμένη μορφή της. Το DHLA μπορεί να μειώσει τις οξειδωμένες μορφές του συνενζύμου Q10, το οποίο επιπρόσθετα μπορεί να ανάγει την τοκοφερόξυ ρίζα. Το α-λιποϊκό οξύ απευθείας ανακυκλώνει το μεταβολικό χρόνο ζωής της βιταμίνης C, της γλουταθειόνης, του συνενζύμου Q10 και έμμεσα της βιταμίνης E [3,26].

1.6.5 Το α-λιποϊκό οξύ ως χηλικός παράγοντας

Το α-LA και το DHLH, ως απευθείας δεσμευτές δραστικών μορφών οξυγόνου, μπορούν να δράσουν ως χηλικές ενώσεις στα μέταλλα ζεύγη τέτοια όπως : Σίδηρο, Χαλκός, Μαγγάνιο, Ψευδάργυρος. Αυτά τα μέταλλα μπορούν να ξεκινήσουν μία οξειδωτική αλυσιδωτή αντίδραση, καταλύοντας αντιδράσεις οι οποίες αναγεννούν υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες. Το α-LA προτιμά να δεσμεύει τα ιόντα Cu^{2+} , Zn^{2+} και Pb^{2+} , αλλά δεν μπορεί να δεσμεύσει το Fe^{+3} , ενώ το DHLA σχηματίζει σύμπλοκα με τα Cu^{2+} , Zn^{2+} και Pb^{2+} , Hg^{2+} και Fe^{+3} . Το DHLA εμποδίζει την καταλυόμενη από τον Cu(II)-ενδιάμεση οξείδωση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL) [27].

1.6.6 Το α-λιποϊκού οξύ ως αντιφλεγμονώδης παράγοντας.

Το α-λιποϊκό οξύ έχει μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες στην εκκινούμενη από τις κυτοκίνες φλεγμονή. Είναι, γνωστό ότι είναι αναστολέας του NF-kB παράγοντα. Το NF-kB περιλαμβάνεται στην έκφραση πολλών

προ-φλεγμονωδών κυτοκινών τέτοιες όπως οι : IL-4, IL-5, TNF- α και του διαλυτού υποδοχέα ενεργοποιητή του NF-kB (sRANKL). Το α -λιποϊκό οξύ χαμηλώνει την έκφραση του μορίου-1 αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης (VCAM-1) και της ενδοθηλιακής προσκόλλησης των ανθρώπινων μονοκυττάρων και αναστέλλει την, εξαρτώμενη από το NF-kB, έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-9 *in vitro* [3, 28, 29-35]. Η εκκινούμενη από το κολλαγόνο αρθρίτιδα εξασθένησε με λήψη α -LA (10-100 mg/Kg) στα ποντίκια μέσω της μείωσης των φλεγμονωδών κυτοκινών όπως τα TNF-alpha και μερικώς με την αναστολή του NF-kB συνδεδεμένου με το DNA παράγοντα Η κλινική δοκιμή ISLAND έδειξε μία σημαντική μείωση στον ορό του αίματος της τάξης του 15% στα επίπεδα της ιντερλευκίνης-6 (IL-6), όταν έγινε λήψη για τέσσερις εβδομάδες συμπληρώματος διατροφής με α -LA (300 mg/day). [36-38].

1.6.7 Φαρμακοκινητική

1.6.7.1 Απορρόφηση – Πρόσληψη μέσω τροφής

Στο πλάσμα και τα ανθρώπινα κύτταρα το ποσό του α -λιποϊκού οξέος που υπάρχει δεν είναι αρκετό να καλύψει τις σωματικές ανάγκες, αν δε ληφθεί μέσω της διατροφής. Οι μελέτες έχουν αναφέρει μία αύξηση 40% στην απορρόφηση του LA, όταν έγινε κατάποση του ρακεμικού μίγματος R και S ισομερών με άδειο στομάχι, ενώ μία μείωση του 20 % συμβαίνει όταν λαμβάνεται μαζί με άλλες τροφές. Μία μελέτη προτείνει ότι η βιοδιαθεσιμότητα του α -LA μειώνεται σημαντικά μετά την λήψη της τροφής. Προτείνεται να λαμβάνεται 2 ώρες μετά τη λήψη της τροφής, ή 30 λεπτά πριν τη λήψη της τροφής [39]. Επιπρόσθετα, το όξινο pH του στομάχου ευνοεί την απορρόφηση του LA, μέσω της γαστρικής οδού. Επομένως, τα συμπληρώματα διατροφής με α -λιποϊκό οξύ είναι προτιμότερο να λαμβάνονται με άδειο στομάχι για να υπάρχει το όφελος από του όξινου pH του στομάχου (pH 2,8). Επιπλέον, μειώνεται έτσι ο ανταγωνισμός της απορρόφησή του με άλλες θρεπτικές ουσίες [40]. Οι σοβαρές νεφρικές αλλοιώσεις, ακόμη, επηρεάζουν τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους [41,42].

Ο χρόνος που απαιτείται για να φτάσει στην μέγιστη απορρόφηση είναι 0,5 έως 1 ώρα. Επιπλέον, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του R εναντιομερούς ήταν

40-50 % ψηλότερες από το S εναντιομερές. [43,44]. Το R εναντιομερές του α-λιποϊκού οξέος (RLA) απορροφήθηκε πιο γρήγορα στο έντερο όταν χορηγήθηκε σε μία μορφή που είχε εγκλειστεί σε γ-κυκλοδεξτρίνες. Επίσης, παρουσίασε αυξημένη έκθεση στο πλάσμα σε σύγκριση με το RLA χωρίς εγκλεισμό σε γ-κυκλοδεξτρίνες. Επιπλέον, το εμβαδό της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) ήταν 2,2 φορές ψηλότερο σε αυτό που ήταν εγκλεισμένο με γ-κυκλοδεξτρίνες και χορηγήθηκε από το στόμα, σε σύγκριση με μόνο του και 5,1 φορές ψηλότερο όταν χορηγήθηκε ενδο-δωδεκαδακτυλικώς. Ακόμη, η απορρόφηση δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση του αναστολέα της αμυλάσης κατά τη διάρκεια της απολίνωσης του χολικού αγωγού.

Κατά την αξιολόγηση της απορρόφησης του ρακεμικού μίγματος του α-λιποϊκού οξέος σε δόση 600 mg βρέθηκε ότι χρειάζεται πολύ λίγο χρόνο για να φτάσει στην μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα και ήταν $6,86 \pm 1,29 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση του RLA είναι ψηλότερη από αυτή του SLA σε παρόμοιες δόσεις στους ανθρώπους. [41]. Έχει αναφερθεί σε μία μελέτη σε ζώα ότι τα μέγιστα επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα, καθώς και το AUC είναι 1,26 φορές μεγαλύτερα του RLA συγκρινόμενα με το SLA. Κάποιοι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι η απορρόφηση του α-λιποϊκού οξέος δεν επηρεάζεται από το χρόνο που είναι άδειο το στομάχι, όπως βρέθηκε στην μελέτη που διεξήχθη σε ινσουλινο-εξαρτώμενους διαβητικούς ασθενείς, στους οποίους καμία ιδιαίτερη επίδραση στη βιοδιαθεσιμότητα δεν παρατηρήθηκε [42-51].

1.6.7.2 Κατανομή

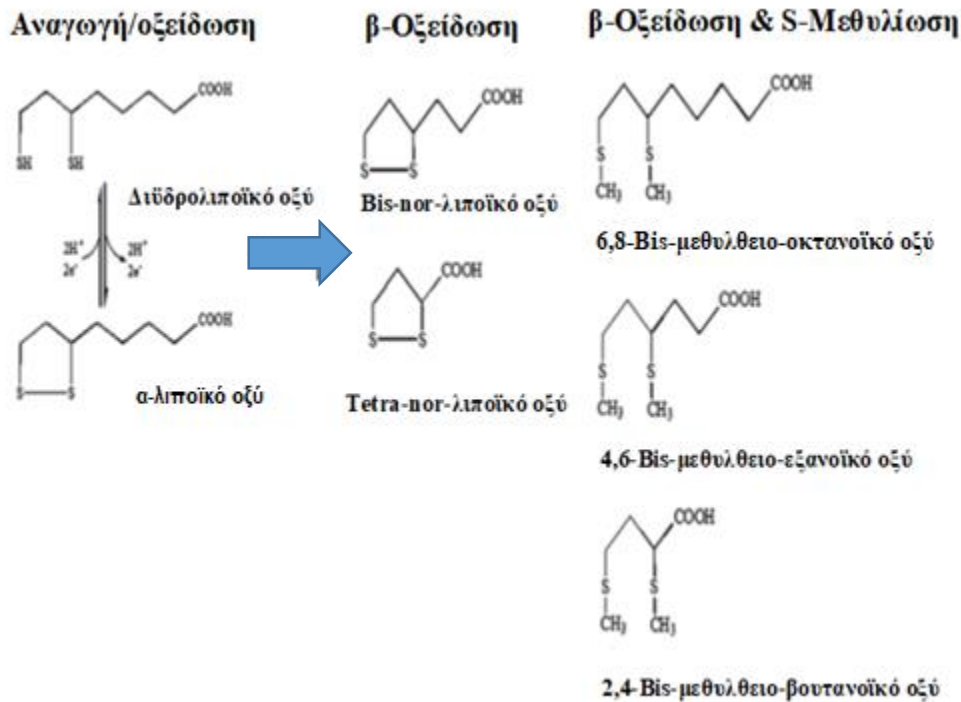
Η από του στόματος λήψη του α-λιποϊκού οξέος και η ταχεία εμφάνισή του στο πλάσμα ακολουθείται από μία εξίσου γρήγορη κάθαρση, που αντιστοιχεί, στη μεταφορά στους ιστούς, στη σπειραματική διήθηση και στη νεφρική απέκκριση. Το α-λιποϊκό οξύ αρχικά αλλά παροδικά συσσωρεύεται στο ήπαρ, στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες, αλλά βρίσκεται και σε άλλους ιστούς [52].

Το α-λιποϊκό οξύ έχει δείξει ότι διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε ορισμένο αριθμό μελετών. Οι ενδοφλέβιες δόσεις των 25 mg/Kg/b.w. που δόθηκαν σε ποντίκια έδειξαν τη συσσώρευση στον εγκεφαλικό φλοιό εντός 60 λεπτών από τη χορήγηση [53]. Σε άλλη μελέτη παρεντερικές δόσεις των 100 mg/Kg/b.w. για 7-14 μέρες, τόσο σε νέα, όσο και σε γερασμένα ποντίκια έδειξε συσσώρευση του α-LA σε διάφορα τμήματα του εγκεφάλου. Μία άλλη μελέτη, όμως, δεν βρήκε σημαντικά επίπεδα του α-LA στον εγκέφαλο μετά από λήψη από το στόμα με καθετήρα δόσεων 50 mg/Kg/b.w. σε ποντίκια [54]. Μεγαλύτερη έρευνα απαιτείται για να διερευνηθούν οι θεραπευτικές δράσεις, όχι μόνο του α-LA, αλλά και της ανηγμένης μορφής του, το DHLA και των μεταβολιτών του.

1.6.7.3 Βιομετατροπή- Απέκριση

Μετά την κατανομή του στους ιστούς, το α-λιποϊκό οξύ υπόκειται σε εκτενή βιομετατροπή στο ήπαρ. Ο Schupke κ.α. χρησιμοποίησαν υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας για να επιβεβαιώσουν τη β-οξειδωση, που είναι η κύρια μεταβολική πορεία του α-LA *in vivo* [55]. Οι πιο γνωστοί μεταβολίτες του α-LA φαίνονται να είναι οι εξής (σχήμα 1.5) : Bis-nor-λιποϊκό οξύ, tetra-nor-λιποϊκό οξύ, β-υδροξυ-bis-nor-λιποϊκό οξύ, ή τα bis-μεθυλωμένα μερκαπτοπαράγωγα αυτών των ενώσεων. Σε όλες τις μελέτες στα μοντέλα των ζώων το α-LA και οι μεταβολίτες του απεκκρίνονται αρχικά από τα ούρα.

Επομένως, το α-λιποϊκό οξύ, είτε προσλαμβάνεται από την τροφική αλυσίδα, είτε ως συμπλήρωμα διατροφής, απορροφάται, μεταβολίζεται και απεκκρίνεται γρήγορα, έχοντας ως αποτέλεσμα μία αμελητέα ποσότητα του ελευθέρου α-LA να παραμένει στους ιστούς, μετά τη λήψη του.



Σχήμα 1.5. Το α-λιποϊκό οξύ (α-LA), ο ανηγμένος τύπος του (DHLA) και οι κυριότεροι πέντε μεταβολίτες του. [38]

1.6.8 Βιοδιαθεσιμότητα του α-Λιποϊκού οξέος

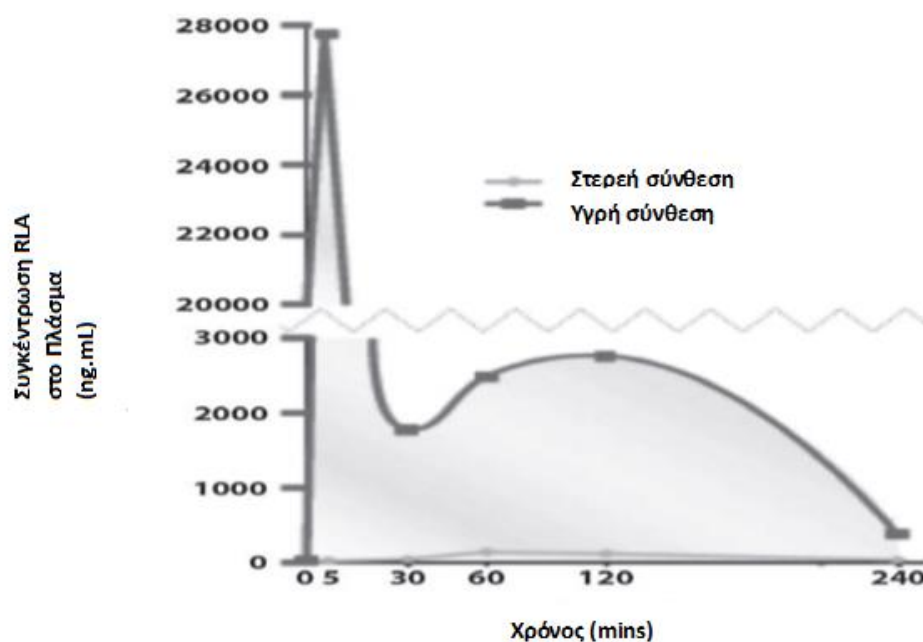
Έχει μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι το α-λιποϊκό οξύ, που έχει μειωμένη διαλυτότητα, όταν χρησιμοποιηθεί ως βάση (matrix) η λεκιθίνη ευνοείται η βιοδιαθεσιμότητα του. Δισκία και καψάκια (soft gelatin) του α-LA σε μία δόση 600 mg είχαν την ίδια βιοδιαθεσιμότητα και άλλες φαρμακοκινητικές παραμέτρους συγκρινόμενες οι δύο διαφορετικές φαρμακοτεχνικές μορφές μέσα στην λιπόφιλη μήτρα, αλλά είχαν ψηλότερη από εκείνες που είχαν μειωμένη διαλυτότητα, χωρίς την λεκιθίνη ως βάση, όταν χορηγήθηκαν στο ανθρώπινο σώμα [56].

Έχει αποδειχτεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα του α-LA αυξάνεται σημαντικά, όταν η δόση χορηγείται per-os σε υγρή μορφή από ότι σε στερεή μορφή. Επιπλέον, παρουσιάζει πληρέστερη απορρόφηση, σταθερότητα, υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα και επιταχυνόμενη απορρόφηση του α-λιποϊκού οξέος. Η αυξημένη

βιοδιαθεσιμότητα πιθανόν οφείλεται α) στην αύξηση του απορροφούμενου κλάσματος β) στον κορεσμό των συνδεδεμένων πρωτεϊνών του πλάσματος γ) στην επιβράδυνση της διαδικασίας διάσπασης [57].

Η πιθανή συνέργεια των παραπάνω παραμέτρων προσδιορίζει μεγαλύτερη ποσότητα του ελεύθερου RLA στο πλάσμα ικανό να φτάσει στους ιστούς και στα όργανα, όπου μπορεί να ασκήσει τη βιολογική λειτουργία του. Αναλύοντας το προφίλ του RLA στο πλάσμα, μετά από απλή χορήγηση από το στόμα σε ποντίκια μίας δόσης 50 mg/Kg (σχήμα 1.6) η υγρή σύνθεση επιβεβαιώνει τη σημαντικά μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα συγκρινόμενη με τη στερεή σύνθεση του RLA [58]. Ειδικότερα, έδειξε ότι :

$$AUC_{liquid\ RLA} = 12231,90\ ng.mL^{-1}.h\ \text{vs}\ AUC_{solid\ RLA} = 512,33\ ng.mL^{-1}.h$$



Σχήμα 1.6. Διάγραμμα συγκέντρωσης RLA στο πλάσμα σε σχέση με το χρόνο μετά από per-os χορήγηση σκευάσματος στερεής και υγρής μορφής.

Πίνακας 1.2. Φαρμακοκινητικά προφίλ του R-Λιποϊκού οξέος μετά από per-os χορήγηση

Φαρμακοκινητικές Παράμετροι	Στερεή Σύνθεση	Υγρή Σύνθεση
AUC _{0-t (final)} (ng.mL ⁻¹ .h)	512,33	12231,90
T _{max} (min)	60	5
C _{max} (ng.mL ⁻¹)	195	27600
C _{120min} (ng.mL ⁻¹)	150,7	2752
C _{240min} (ng.mL ⁻¹)	28,08	353,1

1.6.9 Χρήση στη θεραπευτική

1.6.9.1 Δράση του α-λιποϊκού οξέος στο διαβήτη

Τόσο το α-LA, όσο και το DHLA συμμετέχουν μέρος στην παραγωγή της ινσουλίνης. Έχει αποδειχτεί ότι το α-λιποϊκό οξύ βελτιώνει την πρόσληψη της γλυκόζης, τόσο στους ανθεκτικούς στην ινσουλίνη, όσο και στους ευαίσθητους στην ινσουλίνη μυϊκούς ιστούς. [59,60]. Διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης μέσω της κατανομής των μεταφορέων της στην πλασματική μεμβράνη και της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης, υποστρώματος-1. [61,62]. Έχει αποδειχτεί ότι η ενδοφλέβια χρήση του α-LA βελτιώνει την, ενδοθηλιακώς εξαρτώμενη, αγγειοδιαστολή σε ασθενείς με διαβήτη τύπου-2 [63]. Σε μια πρόσφατη meta-ανάλυση για τη μελέτη της συμπληρωματικής δράσης του α-λιποϊκού οξέος στον γλυκαιμικό δείκτη και στους φλεγμονώδεις βιοδείκτες, τα ευρήματα καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το α-LA έχει ωφέλιμα αποτελέσματα μειώνοντας τους καρδιο-μεταβολικούς συντελεστές κινδύνου, χωρίς σημαντικές παρενέργειες [64-67].

1.6.9.2 Δράση του α-Λιποϊκού οξέος στη διαβητική περιφερική νευροπάθεια

Η ενδοφλέβια και η per-os χορήγηση του α-λιποϊκού οξέος στη θεραπεία της διαβητικής νευροπάθειας και της αμφιβληστροειδοπάθειας έχει εφαρμοστεί ως θεραπευτική μέθοδο για πάνω από 50 χρόνια στη Γερμανία. Η δράση του α-LA στη νευροπάθεια έχει αποδειχτεί με κλινική δοκιμή [21,68]. Μία μετα-ανάλυση όπου εξέτασαν τα αποτελέσματα από τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, συμπέρανε ότι η χρήση του α-LA (300-600 mg/μέρα ενδοφλεβίως, για 2-4 εβδομάδες είναι ασφαλής και μπορεί να βελτιώσει σημαντικά, τόσο τις ταχύτητες αγωγής των νεύρων (nerve conduction velocities, NCV_s), όσο και τα νευροπαθητικά συμπτώματα [69].

1.6.9.3 Δράση του α-Λιποϊκού οξέος σε υπέρβαρους/παχύσαρκους ασθενείς.

Η δράση του α-LA στον έλεγχο του βάρους έχει ερευνηθεί με κλινικές δοκιμές, με υποσχόμενα αποτελέσματα. Σε μία πρόσφατη μελέτη αξιολογήθηκε η δράση του α-λιποϊκού οξέος στα ηπατικά ένζυμα και στους φλεγμονώδεις δείκτες για μία μη-αλκοολική λιπώδη ηπατική νόσο (NAFLD), που συνδέεται στενά με φλεγμονώδη τμήματα της παχυσαρκίας. Η κλινική δοκιμή διεξήχθη σε 45 παχύσαρκους ασθενείς που λάμβαναν 1200 mg α-LA συν 400 mg βιταμίνης E ή placebo, περιλαμβάνοντας 400 mg βιταμίνης E την ημέρα, για 12 εβδομάδες [70].

1.6.9.4 Δράση του α-Λιποϊκού οξέος στη νόσο Alzheimer.

In vitro έρευνες έχουν επιδείξει ότι το α-LA έχει νευροπροστατευτικές επιδράσεις πάνω στο Αβ πεπτίδιο που ρυθμίζει την κυτταροτοξικότητα, κυρίως διαμέσου της προστασίας των νευρώνων του φλοιού από την κυτταροτοξικότητα που εκκινείται από το Αβ πεπτίδιο ή το H₂O₂. Άλλες μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα του α-LA στην προστασία των καλλιεργούμενων νευρώνων του ιππόκαμπου, απέναντι στη ρυθμιζόμενη από το Α,β πεπτίδιο και το Fe/H₂O₂, κυτταροτοξικότητα. Μελέτες έχουν δείξει ότι το α-LA έχει ευεργετικές ιδιότητες κατά της άνοιας ή του Alzheimer, αυξάνοντας την παραγωγή της ακετυλοχολίνης, διαμέσου της ενεργοποίησης της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης, η οποία αυξάνει την

απορρόφηση της γλυκόζης και ως εκ τούτου, προμηθεύει περισσότερο acetyl-CoA για την παραγωγή της ακετυλοχολίνης [71-74]. Επίσης, βρέθηκε ότι το α-LA απορυθμίζει τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6) μέσα στα SK-N-BE ανθρώπινα κύτταρα του νευροβλαστώματος, διαμέσου της DNA μεθυλίωσης [75].

1.6.9.5 Δράση του α-Λιποϊκού οξέος στον καρκίνο.

Έχει ερευνηθεί εάν το α-λιποϊκό οξύ είναι ικανό να ενεργοποιήσει την πυροσταφυλική αφυδρογονάση μέσα σε όγκους κυττάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το α-LA ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το σχηματισμό του γαλακτικού και την αυξημένη απόπτωση μέσα σε κυτταρικές σειρές Kelly σε νευροβλάστωμα και μέσα κυτταρικές σειρές SKBr3 καρκινικών κυττάρων στήθους. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το α-LA είναι ικανό να παράγει ROS, οι οποίες προάγουν τον, εξαρτώμενο από το α-LA κυτταρικό θάνατο στον καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο του στήθους και του παχέους εντέρου [76-80]. Είναι αναγκαίο, όμως, να γίνουν επιπλέον μελέτες για να παράσχουν ισχυρές αποδείξεις, που να υποστηρίζουν την προληπτική και την επικουρική θεραπευτική χρήση του α-λιποϊκού οξέος στον καρκίνο.

1.7 Τοξικότητα του α-λιποϊκού οξέος

1.7.1 Συστημική Τοξική δράση

Η χρήση του α-λιποϊκού οξέος ως συμπλήρωμα διατροφής έχει αυξηθεί σημαντικά και επομένως έχουν μεγαλώσει και τα ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά του.

Οξεία τοξικότητα (Acute toxicity).

Η οξεία τοξικότητα, μετά από του στόματος λήψη, έχει προσδιοριστεί στα ζώα και έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των ειδών (πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Τοξικότητα του α-λιποϊκού οξέος στα ζώα.

Μοντέλο	LD ₅₀ (acute oral)	Αναφορές
Σκύλος	400-500 mg/Kg	[9]
Ποντίκι	500 mg/Kg	[6]
Γάτα	30 mg/Kg	[81]
Αρουραίος	> 2000 mg/Kg	[82]

Χρόνια τοξικότητα (Chronic toxicity).

Στην περίπτωση της χρόνιας χορήγησης του α-LA σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων μέσω καθετήρα υπολογίστηκε το NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) ότι είναι 61,9 mg/Kg/b.w., την ημέρα βασιζόμενοι στις ελαφριές αλλαγές στα ηπατικά ένζυμα, καθώς επίσης και σε ιστοπαθολογικές επιδράσεις στο ήπαρ και στα αγγεία του μαστού. [82]. Επιπρόσθετη μελέτη πάνω στην μακράς διάρκειας χορήγηση (24 μήνες) από του στόματος χορήγηση του α-LA δεν έδειξε ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με το βάρος και την ιστοπαθολογία, μέχρι 60 mg/Kg/b.w., ανά μέρα. Έτσι, έχει εγκαθιδρυθεί το NOAEL των 60 mg/Kg/b.w., ανά μέρα, για μακράς διάρκειας λήψης του α-λιποϊκού οξέος στους αρουραίους.

Για τους ανθρώπους ο αριθμός των κλινικών μελετών, που έχουν γίνει, έχει ληφθεί υπόψη, για να αξιολογηθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι κλινικές μελέτες ALADIN (I, II και III), SYDNEY (I και II) και ORPIL χρησιμοποίησαν δόσεις μέχρι 2.400 mg/day, χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με placebo. Το α-LA έχει επίσης χορηγηθεί ενδοφλεβίως σε δόσεις 600 mg/day για τρεις εβδομάδες χωρίς απόδειξη για σοβαρές παρενέργειες. Η χορήγηση από το στόμα δόσεων 1800 mg/day (600 mg, τρεις φορές την ημέρα) για 6 μήνες δεν έδειξε σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με placebo [83-86]. Όπως, έχει ήδη αναφερθεί, έχει χρησιμοποιηθεί στη Γερμανία πάνω από 50 χρόνια για τη θεραπεία της διαβητικής νευροπάθειας και της αμφιβληστροειδοπάθειας.

Μεταλλαξιγένεση/γενοτοξικότητα (Mutagenicity/genotoxicity)

Σύμφωνα με το National Institute of Environmental Health Science (NIEHS) του National Toxicology Program USA (NTP) δεν είναι μεταλλαξιογόνο ή γενοτοξικό [87]. Ειδικότερα, δοκιμάστηκε και ήταν αρνητικό στα εξής :

- Salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 και TA1535 με και χωρίς αρουραίους και hamster ήπαρ S-9 (NTP, 2004)
- Δοκιμή Ames (NIEHS, 2004)
- Salmonella (A06994) test (NTP, 2004)

Καρκινογένεση (Carcinogenicity)

Η μελέτη από τον Cremer κ.α. [82] έδειξε ότι δεν είχε καμία καρκινική δράση στους αρουραίους και στους σκύλους μέχρι 180 mg/Kg/day. Το α-LA δεν προκάλεσε καμία σημαντική αλλαγή στην συχνότητα και στον αριθμό εμφάνισης των οισοφαγικών όγκων στους αρουραίους. (NIEHS, 2004). Επιπλέον, το α-LA δεν είχε καμία επίδραση την ανάπτυξη των όγκων σε ποντίκια μεταμοσχευμένα με «Ehrlich ascites» καρκίνωμα. Μία μείωση στο χρόνο ζωής, που παρατηρήθηκε πιστεύεται ότι οφείλονταν στην υψηλή δόση του α-LA που χορηγήθηκε [81,88].

Εμβρυοτοξικότητα/τερατογένεση (Reproductive toxicity/teratogenicity)

Δεν υπάρχει δημοσιευμένη απόδειξη ότι το α-λιποϊκό οξύ προκαλεί Εμβρυοτοξικότητα. Αντίθετα, όταν το α-LA χορηγήθηκε σε εγκύους διαβητικούς αρουραίους μείωσε τον αριθμό των δυσμορφιών και της θνησιμότητας, συγκρινόμενα με τους απογόνους σε διαβητικούς αρουραίους, που δεν τους είχε χορηγηθεί α-LA [87,88].

1.7.2 Τοπική Τοξική δράση

Ερεθισμός/ευαισθητοποίηση (Irritation/sensitivity)

Δερματολογικές αντιδράσεις (εξανθήματα) έχουν αναφερθεί με την λήψη α-λιποϊκού οξέος. Αλλεργική δερματίτιδα εξ'επαφής έχει αναφερθεί σε τρεις περιπτώσεις μετά την εφαρμογή μίας αντιρυτιδικής κρέμας με α-LA 5 % w/w. Δέκα (10) υγιείς εθελοντές μέσης ηλικίας δοκίμασαν χωρίς καμία αλλεργική ή ερεθιστική αντίδραση σε δόσεις των 5%, 2,5% και 0,5%. Είκοσι πέντε (25) άλλες αναφορές σε ύποπτες ανεπιθύμητες δερματικές αντιδράσεις του α-LA (5% w/w), μεταξύ της περιόδου 2002-2009, έχουν αναφερθεί στο Σουηδικό σύστημα καλλυντικό-επαγρύπνησης. Μετά από αυτό η παρασκευάστρια εταιρία μείωσε το ποσοστό του α-LA από 5 σε 3% και μέσα στο 2010 και έκτοτε δεν έχει αναφερθεί καμία ανεπιθύμητη ενέργεια [88-89].

Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι τα εθνικά συστήματα καλλυντικό-επαγρύπνησης χαρακτηρίζονται από σοβαρή έλλειψη επαρκών αναφορών. Ως εκ τούτου, οι αναφορές ανεπιθύμητων ενεργειών πιθανότατα αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό μέρος από όλες της αναφορές περιστατικών (case reports), που μπορεί να εμφανίζονται στους καταναλωτές, από τη χρήση κρεμών με υψηλή συγκέντρωση σε α-λιποϊκό οξύ.

Έτσι, προτείνεται κατά την ανάπτυξη νέων προϊόντων με α-LA να δοκιμάζεται μικρότερη δόση του 5% w/w σε α-LA ή σε συνδυασμό με άλλα δραστικά συστατικά και να γίνονται πριν την κυκλοφορία στην αγορά επιδερμικές δοκιμασίες ερεθισμού (Patch tests), τεστ κατά τη χρήση (in use tests), προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των καταναλωτών, με την ελαχιστοποίηση των δερματικών ανεπιθύμητων ενεργειών. Επιπρόσθετα, πρέπει να γίνονται δοκιμασίες αποτελεσματικότητας για να επιβεβαιωθεί η αντιοξειδωτική-αντιγηραντική δράση του α-LA σε μικρότερο ποσοστό [90-91].

1.7.3 Δηλητηρίαση με α-Λιποϊκό οξύ

Το α-λιποϊκό οξύ θεωρείται ασφαλές δραστική ουσία κατά τη χρήση των συμπληρωμάτων διατροφής, όσο και των τοπικά εφαρμοζόμενων δερματοκοσμητολογικών προϊόντων [86-100].

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα βιβλιογραφικά στοιχεία έχουν αναφερθεί τέσσερις περιπτώσεις δηλητηριάσεων σε παιδιά και μία σε ενήλικα 38 ετών. Ένας θάνατος ενός κοριτσιού 14 ετών σημειώθηκε μετά από αυτοκτονία, λαμβάνοντας μία μεγάλη δόση α-λιποϊκού οξέος. Συγκεκριμένα είχε λάβει από το στόμα το λιγότερο 10 δισκία α-LA των 600 mg, το καθένα. Αυτό το οδήγησε σε πολυοργανική ανεπάρκεια και τελικά σε θάνατο, μετά από 24 ώρες. Η πολυοργανική ανεπάρκεια αποτελούνταν από μειωμένη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου, επιληπτικές κρίσεις, ανουρία και στην εκτεταμένη θρόμβωση αγγείων [101].

Η πρώτη περίπτωση δηλητηρίασης ενήλικα (γυναίκα 38 ετών) που έγινε, σε προσπάθεια να αυτοκτονήσει λαμβάνοντας ένα συμπλήρωμα διατροφής α-λιποϊκού οξέος του διαβητικού γονέα του. Συγκεκριμένα, έλαβε με κατάποση χάπια των 600 mg α-LA. Αυτό οδήγησε σε μεταβολική οξέωση, ντελίριο, θρομβοπενία και ραβδομυόλυση [102]. Χορηγήθηκαν βενζοδιαζεπίνες περιοδικά εντατική ενδοφλέβια ενυδάτωση. Μετά από 48 ώρες τα επίπεδα κρεατινίνης μειώθηκαν, απέκτησε τη συνείδηση και την αίσθηση του χώρου και του χρόνου. Ακόμη, τα αιμοπετάλια και οι τιμές της αμυλάσης, αυθόρμητα, εξισορροπήθηκαν. Η μεταβολική οξέωση αναστράφηκε και οι ζωτικές λειτουργίες αποκαταστάθηκαν μετά από 48 ώρες της εισαγωγής στο νοσοκομείο.

Πρέπει, λοιπόν, παρά το γεγονός ότι το α-λιποϊκό οξύ θεωρείται ασφαλές και αξιόπιστη δραστική ουσία, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις σε ενήλικους, σε ψηλές δόσης χορήγησης από το στόμα. Επιπλέον, οι γιατροί στην επείγουσα ιατρική θα πρέπει να έχουν υπόψη τους, η δηλητηρίαση με α-LA μπορεί να παρουσιάσει σπάνια κλινικά ευρήματα, τέτοια όπως η μεταβολική οξέωση, οι σπασμοί, η θρομβοπενία και η ραβδομυόλυση, όπως παρατηρήθηκε και στα παιδιά, χωρίς όμως να αναφερθεί η πολυοργανική ανεπάρκεια [103].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΔΕΡΜΑ

2.1 Εισαγωγή

Το δέρμα είναι ένα ζωτικό όργανο υψίστης σημασίας για τον ανθρώπινο οργανισμό. Είναι το πιο εκτεταμένο όργανο του σώματος, με μέση επιφάνεια περίπου 2 τετραγωνικά μέτρα και βάρος κατά μέσο όρο 4 kg. Θεωρείται ασπίδα του ανθρώπινου σώματος και καλείται να επιτελέσει πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως:

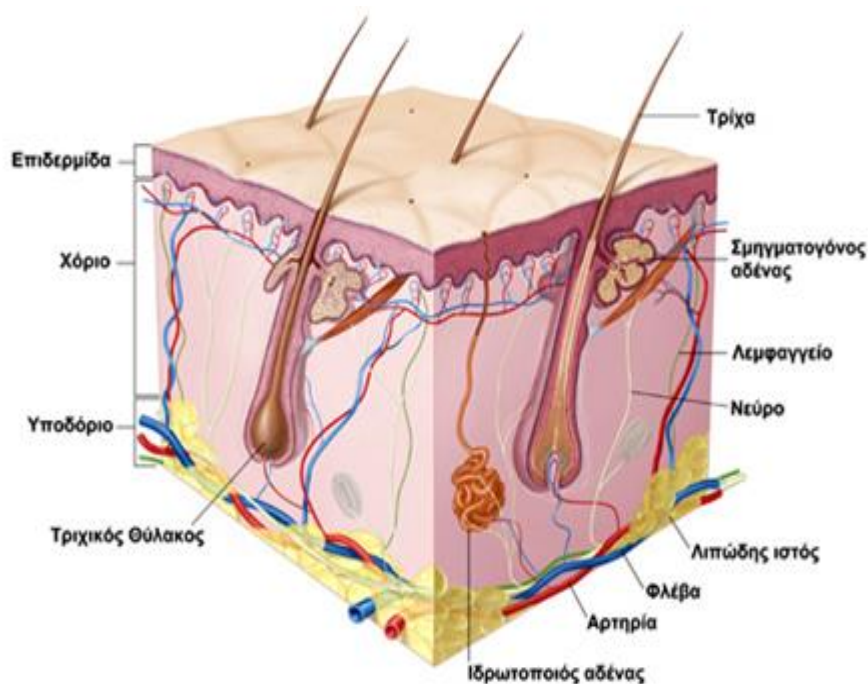
- Η θερμορύθμιση
- Η αναγεννητική ικανότητα του δέρματος
- Η λειτουργία του ως φραγμός
- Η προστασία του εσωτερικού του σώματος από εξωτερικά ερεθίσματα
- Η λειτουργία του ως αισθητήριο όργανο
- Ο Σχηματισμός της βιταμίνης D
- Η ανοσολογική ικανότητα
- Η ικανότητα επούλωσης πληγών
- Ο μεταβολισμός και σύνθεση ορμονών
- Η απορρόφηση ουσιών, με εκλεκτική διείσδυση
- Η απέκκριση άχρηστων ουσιών από τον οργανισμό (τοξίνες) [104].



Σχήμα 2.1. Οι λειτουργίες του δέρματος.

2.2 Ανατομία του δέρματος

Το δέρμα αποτελείται από τρεις στιβάδες, την επιδερμίδα η οποία είναι η εξωτερική στιβάδα, το χόριο ή κυρίως δέρμα, και το υπόδερμα ή υποδόριος ιστός ο οποίος βρίσκεται κάτω από το χόριο και τα εξαρτήματά του, που είναι οι σμηγματογόνοι και οι ιδρωτοποιοί αδένες, οι τρίχες και τα νύχια (σχήμα 2.1). Έχει έκταση 4 m² και βάρος 4 Kg, ενώ το συνολικό μήκος των αιμοφόρων αγγείων ξεπερνάει τα 17 χιλιόμετρα. Σε κάθε cm² του δέρματος υπάρχουν 3.000.000 κύτταρα, 10 νεύρα, 10 τρίχες, 15 σμηγματογόνοι αδένες και 100 ιδρωτοποιοί αδένες. Εμφανίζει στην επιφάνειά του περισσότερα από 1000 διαφορετικά είδη μικροβίων. Σε κάθε εκατοστό του δέρματος υπάρχουν περισσότερα από 7.000.000 βακτήρια. Κάθε λεπτό αποβάλλει 30.000-40.000 κύτταρα μετά από κύκλο 28 ημερών [105].

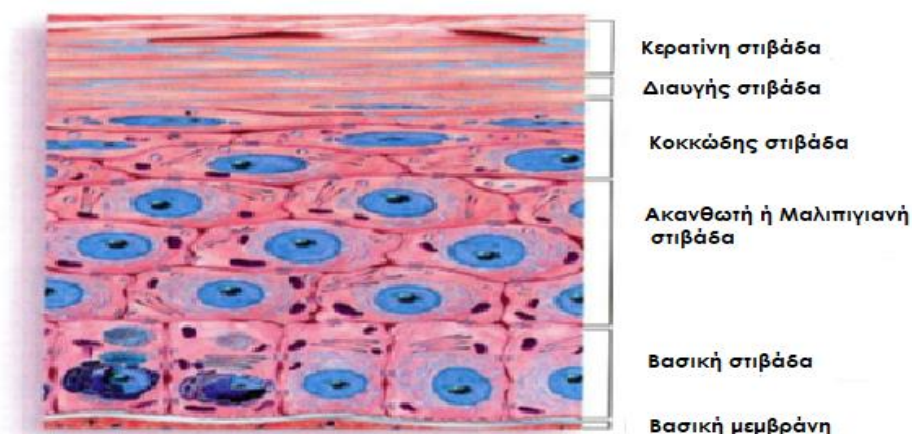


Σχήμα 2.1. Ανατομία του δέρματος.

2.3 Επιδερμίδα

Η επιδερμίδα έχει πάχος 4 χιλιοστά και αποτελείται από πέντε στιβάδες οι οποίες από μέσα προς τα έξω είναι:

- Η βασική ή μητρική στιβάδα: Ρόλος της βασικής στιβάδας είναι η κυτταρική ανανέωση, και ο μεταβολισμός της θρέψης.
- Η μαλπιγιανή ή ακανθωτή στιβάδα: Ρόλος της μαλπιγιανής στιβάδας είναι η συμμετοχή της στο πρώτο στάδιο της κερατινοποίησης
- Η κοκκιώδης στιβάδα: Ρόλος της κοκκώδους στιβάδας είναι η συμμετοχή της στο δεύτερο στάδιο της κερατινοποίησης
- Η διαυγής στιβάδα : Η διαυγής στιβάδα βρίσκεται μόνο στα πέλματα και στις παλάμες μεταξύ της κοκκώδους και κεράτινης στιβάδας και το πρωτόπλασμά της είναι διάφανο και περιέχει ελαϊδίνη.
- Η κερατίνη στιβάδα: Ρόλος της κεράτινης στιβάδας είναι η λειτουργία της ως "φραγμός" [105].

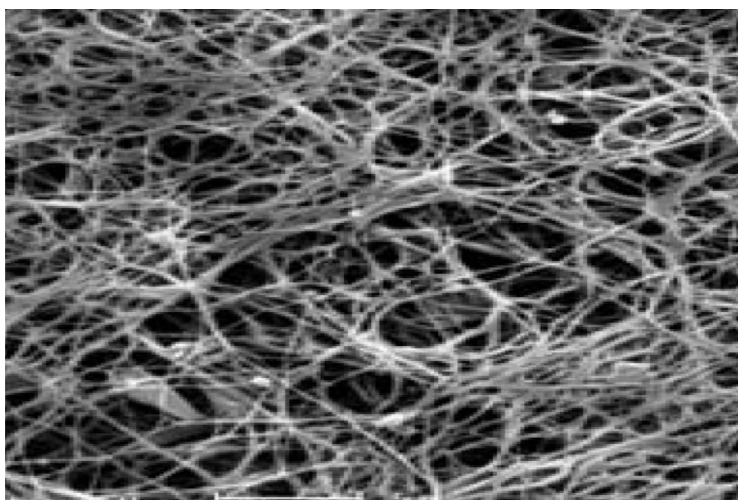


Σχήμα 2.2. Ανατομία τη επιδερμίδας.

2.4 Κυρίως δέρμα ή χόριο

Το χόριο έχει πάχος 1-4 mm και βρίσκεται ανάμεσα στην επιδερμίδα και το υπόδερμα. Αποτελείται από τη θηλώδη και δικτυωτή στοιβάδα και περιέχει μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως οι ινοβλάστες, που είναι ο τύπος παραγωγής των πρωτεϊνών, τα σιτευτικά κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα, τα πλασματοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα. Ακόμη περιέχει ελαστικές και οι δικτυωτές ίνες, το κολλαγόνο και τη θεμέλιο ή βασική ουσία.

Οι ίνες του κολλαγόνου είναι ινώδεις πρωτεΐνες του χορίου που σχηματίζουν δεσμίδες ινών και αποτελούν το 75% του συνολικού συνδετικού ιστού.(σχήμα 2.3). Σκοπός τους είναι να εξασφαλίσουν τη μηχανική αντίσταση του δέρματος, την ανθεκτικότητα των ιστών και τη διατήρηση της ακεραιότητας της δομής τους [106].



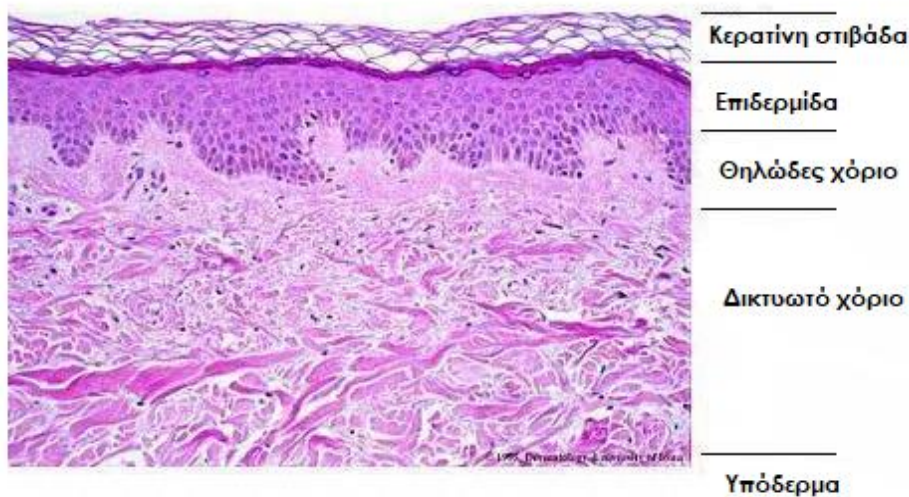
Σχήμα 2.3. Ίνες κολλαγόνου στη δερμίδα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Οι ίνες της ελαστίνης που είναι και αυτές ινώδεις πρωτεΐνες του χορίου, χαρακτηρίζονται από μεγάλη φυσική και χημική ανθεκτικότητα και αποτελούν το 4% αυτού. Εξασφαλίζουν την ελαστικότητα και την τονικότητα του δέρματος. Ρόλος του χορίου είναι η άμυνα, η θρέψη και λειτουργεί σαν υποστήριγμα της επιδερμίδας χάρη στις κολλαγόνες και ελαστικές ίνες που περιέχει. Στο χόριο υπάρχουν αγγεία (αρτηρίες,

φλέβες, λεμφαγγεία), νεύρα, τριχοσημηματογόνοι θύλακες, ορθωτήρες μύες των τριχών και ιδρωτοποιοί αδένες. Το χόριο διακρίνεται σε δυο στιβάδες, τη θηλώδη και τη δικτυωτή:

- *Θηλώδης στιβάδα:* Το θηλώδες χόριο αντιστοιχεί στο χόριο των βλεννογόνων. Περιέχει άφθονη θεμέλιο ουσία και οι δεσμίδες των κολλαγόνων και ελαστικών ινών είναι λιγότερες και λιγότερο πυκνές από εκείνες του δικτυωτού. Περιέχει τις τελικές τριχοειδικές αγκύλες του υποθηλώδους αγγειακού πλέγματος, αυτόχθονα κύτταρα και πολλές νευρικές απολήξεις.

- *Δικτυωτή στιβάδα:* Το δικτυωτό χόριο αποτελεί το σημαντικότερο από πλευράς πάχους, τμήμα του χορίου και επεκτείνεται ανάμεσα στο υποθηλώδες αγγειακό πλέγμα και στο μεγάλο σε όγκο υποδερμικό πλέγμα προς τα κάτω στο όριο του χορίου και του υποδέρματος. Σχηματίζεται από δεσμίδες κολλαγόνων ινών που είναι διατεταγμένες σε κυματοειδή σχηματισμό και από ελαστικές ίνες λεπτότερες στα μεσοδιαστήματα των κολλαγόνων ινών [104].



Σχήμα 2.4. Ανατομία της δερμίδας (χόριο) του δέρματος.

2.5 Εξωκυττάριο υλικό (Extracellular Matrix, ECM)

Είναι ένα αδιάλυτο συσσωμάτωμα μεγάλων πρωτεϊνών και γλυκοζαμινογλυκανών που συνιστά το μικρο-περιβάλλον των κυττάρων στους ιστούς. Το εξωκυττάριο υλικό ή μήτρα βρίσκεται στους διακυτταρικούς χώρους, μέσα στο χόριο του δέρματος (χαλαρό συνδετικό ιστό) και στη βασική μεμβράνη. Η βασική μεμβράνη, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως μία λεπτή εξωκυττάρια ουσία, συνδέεται με τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς και το ινώδες κολλαγόνο στο θηλώδες (ανώτερο) χόριο. Ο εξωκυττάριος χώρος αποτελείται από:

- Κολλαγόνο: Αδιάλυτη ινώδης πρωτεΐνη. Υπάρχουν 12 είδη. Είναι η επικρατέστερη πρωτεΐνη σε : συνδετικό ιστό, δέρμα, χόνδρο, οστίτη ιστό, στις βασικές μεμβράνες.
- Ελαστίνη: Αποτελεί το ελαστικό πρωτεϊνικό συστατικό του συνδετικού ιστού.
- Γλυκοζαμινογλυκάνες : μεγάλη ομάδα ισχυρά φορτισμένων πολυσακχαριτών (πχ. υαλουρονικό οξύ).
- Πρωτεογλυκάνες: Πρωτεϊνικό σύμπλεγμα (ομοιοπολική διασύνδεση) με γλυκοζαμινογλυκάνες.
- Λαμινίνη: Πρωτεΐνη πολλαπλής σύνδεσης (γλυκοπρωτεΐνη). Αποτελεί σημαντικό συστατικό των βασικών μεμβρανών.
- Ιντεγκρίνες: Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Είναι υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας.
- Φιμπρονεκτίνη: Πρωτεΐνη πολλαπλής σύνδεσης (προσκολλητική). Μεσολαβεί στη σύνδεση των κυττάρων με το εξωκυττάριο υλικό.
- Ινωδογόνο: Συμμετέχει στη πήξη του αίματος [107,108].

2.6 Υποδόριος ιστός ή υπόδερμα

Το υπόδερμα είναι η τρίτη και τελευταία στοιβάδα του δέρματος και συνδέει το δέρμα με τις μυϊκές ίνες. Το υποδόριο αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και υπολογίζεται ότι το βάρος του είναι το 10% του συνολικού βάρους σώματος. Παρέχει θερμομονωτική και μηχανική προστασία. Αποτελεί αποθήκη για διάφορες ορμόνες οι

οποίες και μπορούν να παραχθούν σε αυτό το σημείο του δέρματος. Μέσα στο υπόδημα βρίσκονται οι νευρικές απολήξεις, οι ιδρωτοποιοί αδένες και μερικές τριχοσμηγματογόνοι μονάδες [104,105].

Γήρανση του δέρματος

Η γήρανση του δέρματος είναι μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία η οποία διακρίνεται σε δύο μορφές, την ενδογενή (intrinsic) ή χρονολογική ή βιολογική, η οποία συμβαίνει σε όλους τους ανθρώπους με την πάροδο του χρόνου και η εξωγενής εξωτερικούς-περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο κυριότερος εξωτερικός παράγοντας είναι η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, που καλείται φωτογήρανση

Ενδογενής Γήρανση

Η ενδογενής γήρανση (intrinsic aging) είναι μία προδιαγραμμαμένη διαδικασία στο γενετικό μηχανισμό. Η θεωρία των τελομερών υποστηρίζει αυτή τη διαδικασία. Το τελομερές είναι η περιοχή του DNA, που βρίσκεται στο τέλος του χρωμοσώματος και προστατεύει τη χρήσιμη γενετική πληροφορία από τη φθορά. Η πληροφορία που καθιστά το κύτταρο βιολογικά ενεργό βρίσκεται στο μεσομερές, το οποίο προστατεύεται από το τελομερές. Ειδικότερα, τα μήκη των τμημάτων στο τέλος των χρωμοσωμάτων κονταίνουν σε κάθε κύκλο του κυττάρου. Όταν τα τελομερή φτάσουν σε ένα κρίσιμο μήκος τότε συμβαίνει η απόπτωση του κυττάρου. Επιπλέον, οι αρχικές καλλιέργειες των κυττάρων δεν μπορούν να συνεχίζουν να αναπαράγονται συνέχεια, που θεωρείται από μερικούς, ότι είναι μία στρατηγική για την πρόληψη του καρκίνου. Κατά τη βιολογική γήρανση συμβαίνουν εκφυλισμοί στο δέρμα και στις λειτουργίες του [110]. Ειδικότερα, παρουσιάζονται:

Στην επιδερμίδα

- Λέπτυνση της επιδερμίδας λόγω της επιπεδοποίησης του δερμοεπιδερμικού συνδέσμου.

- Μ

είωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.²⁸

- Διαταραχές στη μελάγχρωση λόγω της μείωσης του αριθμού των μελανοκυττάρων.
- Μειωμένη παρουσία κυττάρων Langerhans.

Στο χόριο

- Ατροφία μέσω της απώλειας του όγκου του.
- Μείωση των ινοβλαστών.
- Μείωση και κατακερματισμός των ελαστικών ινών.
- Μείωση και τροποποίηση του κολλαγόνου.
- Μείωση των αγγείων.

Στα εξαρτήματα του δέρματος

- Αποχρωματισμό των τριχών.
- Απώλεια των τριχών.
- Λ

ιγότεροι σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί αδένες.

Εξωγενής Γήρανση

Η εξωγενής γήρανση (extrinsic aging) του δέρματος ή περιβαλλοντική γήρανση είναι μια διαδικασία που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, το stress, το κάπνισμα, η ατμοσφαιρική ρύπανση αλλά και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κρύο η θερμότητα, η σκόνη, το νέφος και η μπλε ακτινοβολία. Η μπλε ακτινοβολία εκπέμπεται από τις οθόνες των υπολογιστών και άλλων ηλεκτρονικών συσκευών. Είναι ένα μέρος του ορατού φωτός: μπλε με βιολετί ζώνη φωτός στα 400-500 nm, που καλείται και HEV (High Energy Visible).

Το κάπνισμα, η ελλιπής αντηλιακή προστασία, η κακή διατροφή, η ελλιπής άσκηση, ο λιγιστός και μη σταθερός ύπνος και το άγχος μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση της εξωγενούς γήρανσης. Οι συνέπειες του ανεξέλεγκτου οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν βλάβες των βιομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες πυρηνικά οξέα), της κυτταρικής μεμβράνης, των μιτοχονδρίων, καθώς και τη δυσλειτουργία πολλών μηχανισμών της κυτταρικής ανανέωσης, που μπορεί να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Απ' όλα τα εξωγενή αίτια, η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί τις πιο αρνητικές

επιπτώσεις στο δέρμα και εξ' αιτίας αυτού πολλές φορές η εξωγενής γήρανση συχνά ονομάζεται και φωτογήρανση (photoaging) [111].

Φωτογήρανση

Με τον όρο φωτογήρανση, αναφερόμαστε στις μεταβολές που υφίσταται το δέρμα μετά από χρόνια έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Το φωτογηρασμένο δέρμα παρουσιάζει τις εξής αλλαγές :

Κλινικές μεταβολές

- Δυσχρωμίες (υπερμελάχρωση και υπομελάχρωση-καφεκόκκινες κηλίδες).
- Χαλαρότητα.
- Τραχύ δέρμα.
- Βαθιές ρυτίδες.
- Τελαγγειεκτασία.
- Δερματικές κακοήθειες.
- Σμηγματορροϊκή κεράτωση.
- Ακτινική ελάστωση (ορισμένοι φαινότυποι)

Ιστοπαθολογικές μεταβολές

- Ατυπία κερατινοκυττάρων.
- Αύξηση πάχους της κερατίνης στοιβάδας.
- Επιπεδοποίηση του δερμοεπιδερμικού συνδέσμου, που οδηγεί σε ατροφία (ποικιλοδερμία)
- Αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων της επιδερμίδας.
- Αύξηση της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) και της αποικοδόμησης του κολλαγόνου.
- Αύξηση της παραγωγής ελαστίνης που ακολουθείται από αύξηση της αποικοδόμησης.
- Μείωση γλυκοσαμινογλυκανών και προτεογλυκανών.

- Μείωση των κυττάρων Langerhans.
- Αύξηση του αριθμού και της μεταβολικής δραστηριότητας των ινοβλαστών.
- Αύξηση των ιστοκυττάρων και των κυτοκινών που σχετίζονται με τη φλεγμονή, όπως η ουσία TNF-α.
- Μεταβολή του DNA των κυττάρων τα οποία εμπλέκονται στη δημιουργία καρκινωμάτων του δέρματος [112].

2.7.4 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου

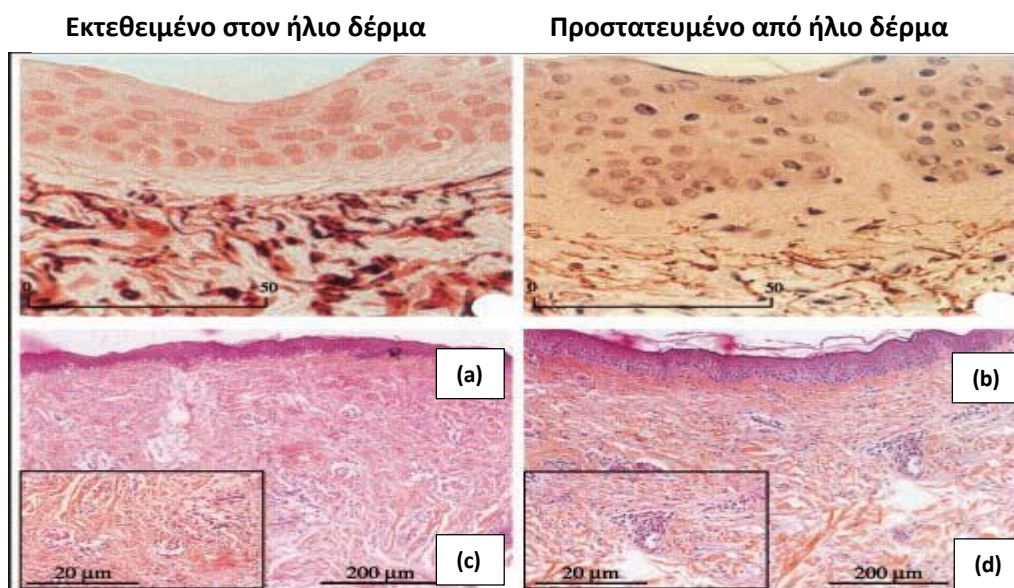
Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι δραστικά μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας, είτε από ενδογενείς πηγές (endogenous), είτε από εξωγενείς πηγές

O₂ απλής κατάστασης

- ρίζα σουπεροξειδίου (O₂⁻)
- ρίζα υπεροξειδίου (ROO[·])
- ρίζα υδροξυλίου (·OH)
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)
- μονοξείδιο του αζώτου (NO[·])

Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών οξυγόνου ROS, κατά τη φωτογήρανση, οδηγεί στο οξειδωτικό στρες που εμπλέκεται στην εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων του δέρματος, όπως: πρόωρη γήρανση, φλεγμονώδεις παθήσεις, φωτοτοξικότητα, φωτοαλλεργία, παθήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνος. Στο σχήμα 2.5. παρουσιάζονται τμήματα από βιοψίες δέρματος με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του φωτογηρασμένου δέρματος, σε δέρμα εκτεθειμένο στον ήλιο και σε δέρμα προστατευμένο στον ήλιο. Είναι εμφανές ότι στο δέρμα (a) που έχει εκτεθεί στον ήλιο φαίνονται άφθονες φωτογηρασμένες ίνες ελαστίνης στο ανώτερο τμήμα του χορίου και σε όλο το χόριο. Στο φωτοπροστατευμένο δέρμα (b) το δίκτυο των ιών ελαστίνης είναι εμφανές εντός του επιφανειακού χορίου. Ακόμη, στο δέρμα που είναι εκτεθειμένο φαίνεται ψηλότερος αριθμός διητημένων κυττάρων



Σχήμα 2.5. Ιστολογικά χαρακτηριστικά από φωτογηρασμένο εκτεθειμένο δέρμα (a,c) και από φωτοπροστατευμένο δέρμα. (b,d).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν διάφορες στρατηγικές που ακολουθούνται για την πρόληψη και τη μείωση των συμπτωμάτων, τόσο της ενδογενούς, όσο και της εξωγενούς γήρανσης του δέρματος. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο τα ενδογενή, όσο και εξωγενή αντιοξειδωτικά συστήματα. Οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται συνοπτικά αποσκοπούν :

- Στη συντήρηση και στην αύξηση του πάχους του δέρματος.
- Στην ανασύσταση της λειτουργίας του δερματικού φραγμού.
- Στην αναστροφή της αλλοίωσης του κολλαγόνου και της ελαστίνης.
- Στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών.
- Στην πρόληψη της φλεγμονής.
- Στην προστασία από την ανοσοκαταστολή
- Στην προστασία του DNA [115].

3.2 Δραστικά συστατικά

Τα αντιγηραντικά καλλυντικά προϊόντα περιέχουν στις συνθέσεις τους, κυρίως, τα εξής :

1. Δραστικές ουσίες όπως : ρετινόλη και παράγωγά της, α-υδροξυ οξέα, φυτοοιστρογόνα, βιοφλαβονοειδή, βιταμίνες, ένζυμα, υαλουρονικό οξύ, γλυκοσίτες, φυτικά βλαστοκύτταρα, ολιγοπεπτίδια-παράγοντες ανάπτυξης (growth- factors) κ.ά.
2. Χημικά και φυσικά φίλτρα ευρέος φάσματος, για την πρόληψη της φωτογήρανσης και της ανοσοκαταστολής.
3. Αντιοξειδωτικά ουσίες που δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, που προέρχονται από τη UV ακτινοβολία, τη περιβαλλοντική μόλυνση και το οξειδωτικό stress [116].

Αντιοξειδωτικός μηχανισμός έναντι των ελευθέρων ριζών.

Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από την ανισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών, όπου οι ελεύθερες ρίζες υπερτερούν. Το οξειδωτικό στρες είναι επιβλαβές για τα κύτταρα, το DNA, τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και τις πρωτεΐνες. Ως αντιοξειδωτική ουσία χαρακτηρίζουμε κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους : α) παρεμποδίζουν τη δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου β) σταματούν τη διάδοση των ελευθέρων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του δέρματος χωρίζονται στα ενδογενή και στα εξωγενή συστήματα.

3.3.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά στο δέρμα

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα μπορεί να είναι *ενζυμικά ή μη ενζυμικά*.

Τα κυριότερα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα που υπάρχουν στο δέρμα και δρουν κατά του οξειδωτικού stress είναι:

- Υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase, SOD)
- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase, GSH peroxidase)
- Αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione reductase, GSH reductase)
- Καταλάση (Catalase)

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα που εντοπίζονται στο δέρμα και δρουν κατά του οξειδωτικού stress είναι:

- Γλουταθειόνη
- Βιταμίνη C
- Βιταμίνη E
- Ουβικινόνη (συνένζυμο Q10).
- α-Λιποϊκό οξύ.

Τόσο τα ενζυμικά, όσο και τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συνεργάζονται για να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες ROS. Για παράδειγμα, η αναγωγή της γλουταθειόνης (GSH reductase) μπορεί να αναγεννήσει την GSH από το GSH δισουλφίδιο, η οξειδωμένη μορφή του GSH. Με τη σειρά του το GSH μπορεί να αναγεννήσει τις βιταμίνες C και E από την οξειδωμένη στην ανηγμένη κατάσταση, έτσι ώστε τα δύο αντιοξειδωτικά να εξουδετερώσουν τις πρόσθετες ROS. Το α-λιποϊκό οξύ, όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο 1.6.4 μπορεί να αναγεννήσει και άλλα αντιοξειδωτικά όπως τη βιταμίνη C, τη γλουταθειόνη και τη βιταμίνη E [117].

Σε μοριακό επίπεδο ένα άλλο κρίσιμο σημείο απέναντι στο οξειδωτικό stress είναι ο μεταγραφικός σχετιζόμενος παράγοντας (Nrf2) και η μεταγραφική ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο Nrf2 είναι προστατευτικός τόσο τα κερατινοκύτταρα του δέρματος, όσο και στους ινοβλάστες από την UVA οξειδωτική φθορά. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η βιολογική γήρανση, εκτός από τη φωτογήρανση, μειώνει τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών. Έχει βρεθεί ότι οι ηλικιωμένοι άνθρωποι, σε σύγκριση με τους νεότερους, είχαν 70% λιγότερη συγκέντρωση σε α-τοκοφερόλη,

Εξωγενή αντιοξειδωτικά στα αντιγηραντικά καλλυντικά

Η χρήση τοπικών αντιοξειδωτικών στα αντιγηραντικά καλλυντικά προϊόντα μόνα τους ή σε συνδυασμό με αντηλιακά φίλτρα (φυσικά και χημικά) στα αντηλιακά προϊόντα, συντελούν στην δέσμευση των ελευθέρων ριζών, που δημιουργούνται από το οξειδωτικό stress και τη UV ακτινοβολία [119].

Οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τοπική εφαρμογή για την αποτελεσματική προστασία, ενάντια στην φωτογήρανση και την ανοσοκαταστολή είναι οι εξής:

- Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ και παράγωγα), βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη και παράγωγα), βιταμίνη A (ρετινόλες και παράγωγα), καροτενοειδή (λυκοπένιο, ασταξανθίνη, λουτεΐνη), συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη), σελήνιο, σιλυμαρίνη, πολυφαινόλες πράσινου τσαγιού (κατεχίνες, επιγαλοκατεχίνες), φλαβονοειδή

(ανθοκυανιδίνες, προκυανιδίνες), ισοφλαβόνες σόγιας ισοθειοκυανάτες (σολφοραφάνη), καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, απιγενίνη, πυκνογενόλες, ρεσβερατρόλη, κερσετίνη, κουρκουμινοειδή.

Πολλές από τις ενδογενείς (ενζυμικές και μη ενζυμικές) αντιοξειδωτικές ουσίες του δέρματος ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα για να προστατεύσουν το δέρμα από τις επιβλαβείς επιδράσεις της ακτινοβολίας και των ελευθέρων ριζών. Μία ενδογενής αντιοξειδωτική ουσία, που χρησιμοποιείται και ως εξωγενής είναι το α-λιποϊκό οξύ, που ενσωματώνεται στα αντιγηραντικά καλλυντικά προϊόντα με τη μορφή ρακεμικού μίγματος (*R/S-lipoic acid*).

Δράση του α-Λιποϊκού οξέος ως αντιοξειδωτικό στο δέρμα

Το α-λιποϊκό οξύ είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, το οποίο υπάρχει μέσα στα κύτταρα και ταυτόχρονα, είναι ένας συμπαράγοντας (cofactor), που συμμετέχει σε πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις του κυτταρικού μεταβολισμού. Επιπλέον, όπως έχει αναφερθεί, εκτενώς, στο κεφάλαιο 1, το α-λιποϊκό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο ως τοπικά εφαρμοζόμενο φωτοπροστατευτική ουσία, χάρη στις εξαιρετικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που το χαρακτηρίζουν. Έχει χαρακτηριστεί ως το καθολικό και στα υδατικά μέρη του κυττάρου, σε αντίθεση με τη βιταμίνη C (η οποία είναι υδατοδιαλυτή) και τη βιταμίνη E και το συνένζυμο Q10 (που είναι οποία είναι λιποδιαλυτά) και μπορεί και αναγεννά άλλα αντιοξειδωτικά συστήματα, όπως τις βιταμίνες C, τη γλουταθειόνη, τη βιταμίνη E και αυξάνει τη δημιουργία της ουβικινόνης (συνένζυμο Q10) και να προστατεύει τα βιομόρια από εκφυλιστικές αλλοιώσεις.

Το α-λιποϊκό οξύ είναι ένας ικανός αντιφλεγμονώδης παράγοντας. Έχει μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες στην εκκινούμενη από τις κυτοκίνες φλεγμονή. Είναι γνωστό ότι μειώνει την παραγωγή των μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο NF-Ακόμη, το α-LA μπορεί να ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1,

προκαλώντας την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), που μπορεί να επιδιορθώσουν τη φθορά του κολλαγόνου μέσα στο χόριο [22].

Η διαδικασία της γήρανσης θεωρείται ότι είναι παρόμοια με την διαδικασία η οποία ευθύνεται για την εμφάνιση φλεγμονής, επειδή και οι δύο επηρεάζονται από την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών. Ως εκ τούτου, κάτι που προκαλεί φλεγμονή στα κύτταρα επιταχύνει και τη διαδικασία της γήρανσης. Για το λόγο αυτό, η χρήση του λιποϊκού οξέως στο δέρμα βοηθάει τόσο στη θεραπεία της δερματικής γήρανσης (φωτογήρανση), όσο και στην πρόληψη του ερυθήματος και οιδήματος (αντιφλεγμονώδης δράση), όπου και τα δύο συνδέονται με την έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία [111].

Μελέτες της δράσης του α-Λιποϊκού οξέος των προϊόντων τοπικής εφαρμογής στη φωτογήρανση.

Ο Bitner το 2003 μελέτησε και έδειξε την σημαντική φωτοπροστατευτική δράση του α-λιποϊκού οξέος σε μία κρέμα που περιείχε 5 % α-LA w/w. Η μελέτη έγινε σε επιλεγμένες γυναίκες με φωτογηρασμένο δέρμα στο πρόσωπο και η αξιολόγηση έγινε με φωτογράφιση και laser profilometry. Υπήρξε σημαντική μείωση των λεπτών γραμμών στο πρόσωπο και των κλινικών χαρακτηριστικών μετά από 12 εβδομάδες εφαρμογής της κρέμας [120].

Μία μελέτη της φωτοπροστατευτικής δράσης του α-λιποϊκού οξέος σε κρέμα που περιέχει 5 % w/w ως τοπικό αντιοξειδωτικό, σε συνδυασμό με 5% βιταμίνη C και 1 % βιταμίνη E. Μετρήθηκε το ερύθημα σε ανθρώπινα κύτταρα μετά από ακτινοβολία με UVA-UVB ακτινοβολία, με προσομοιωτή της ηλιακής ακτινοβολίας, αλλά δεν μπόρεσε να ανιχνεύσει ικανοποιητική φωτοπροστατευτική δράση, μόνο του ή σε συνδυασμό με τα άλλα αντιοξειδωτικά. [121].

Οι Campos και άλλοι το 2012 μελέτησαν την αποτελεσματικότητα καλλυντικών συνθέσεων, που περιείχαν διασπορές σε λιποσώματα με συνδυασμό α-λιποϊκού οξέος, φωσφορικού ασκορβυλίου του μαγνησίου και κινητίνη. Η φωτοπροστατευτική (αντιοξειδωτική) δράση προσδιορίστηκε *in vitro* και *in vivo* με UV ακτινοβολία σε

δέρμα ποντικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την φωτοπροστατευτική δράση του συνδυασμού αυτών των ενώσεων στον δερματικό φραγμό και την σαφή ενυδατική δράση πάνω στο ανθρώπινο δέρμα [122].

Σε μία μελέτη ο Saly Sherif και άλλοι διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα του α-λιποϊκού οξέος, ως αντιρυτιδικό δραστικό συστατικό, ενσωματωμένο μέσα σε υγρές κρυσταλλικές διασπορές (κυβωσώματα), χρησιμοποιώντας γλυσερύλ μονολεϊνη και πολοξαμέρ. Η μελέτη έδειξε την βελτίωση των ρυτίδων στην περιοχή του προσώπου (λεπτές γραμμές στην περικογχική περιοχή στα πάνω χείλη και την συνολική χρωματική βελτίωση του δέρματος των εθελοντών), μετά από χρήση τριών μηνών από του εθελοντές, με φωτογραφική αξιολόγηση. [123]

Πρόσφατα το 2020, ο Zhuang Zhou και άλλοι προσπάθησαν να αυξήσουν την διαδερμική κατανομή του α-λιποϊκού οξέος στο δέρμα, αφού σύζευξαν το α-LA με αντίθετου φορτίου μόρια, όπως τριαιθανολαμίνη, πιπεριδίνη και πυρρολιδίνη, μέσα σε ένα w/o γαλάκτωμα, διαλύοντας το α-λιποϊκό οξύ στη υδατική φάση του γαλακτώματος. Η βελτίωση της σταθερότητας του α-LA μέσα στην υδατική φάση συνετέλεσε σε παρασκευή τοπικών προϊόντων με σταθερότερες μορφές του α-LA. Επιπρόσθετα, αυξήθηκε η κατακράτηση του α-λιποϊκού οξέος στο δέρμα ποντικών (μέτρηση του α-LA στην κερατίνη στοιβάδα με ATR-FTIR) και παρατηρήθηκε βελτίωση της αντιγηραντικής του δράσης (αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση) μέσω, όμως, μόνο της φωτογραφικής αξιολόγησης. [124].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

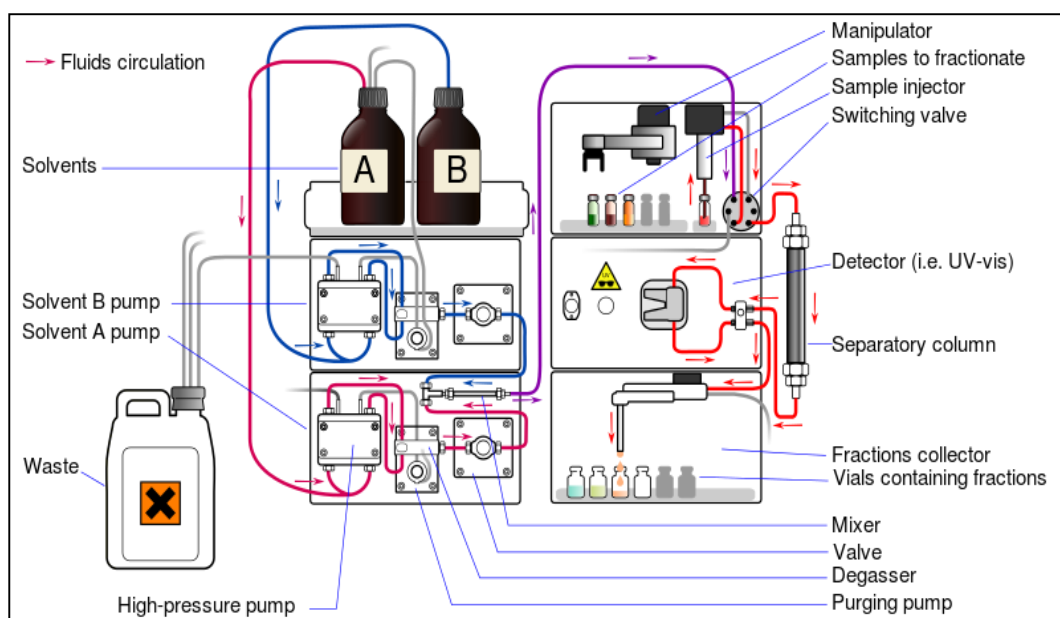
4.1 Εισαγωγή

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια και θεωρείται μία από τις πιο αξιόπιστες αναλυτικές τεχνικές, που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των φαρμάκων, καλλυντικών, τροφίμων αλλά και για ερευνητικούς σκοπούς.

Η αναλυτική τεχνική (HPLC) δίνει εξαιρετικά αποτελέσματα τόσο από πλευράς ακρίβειας όσο και από επαναληψιμότητας. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή, προσρόφηση, ιονανταλλαγή, μοριακό αποκλεισμό, ή συγγένεια της προς ανάλυσης ουσίας μεταξύ μίας στατικής και μίας κινητής φάσης.

4.2 Οργανολογία

Στο παρακάτω σχήμα 5.1 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μία διάταξη HPLC.



Σχήμα 5.1. Σχηματική παράσταση μιας διάταξης HPLC. Πηγή «Preparative HPLC», από Jacopo Werther, διαθέσιμο με άδεια CC BY-SA 3.0, ανοικτά ακαδημαϊκά μαθήματα ΠΑΔΑ

4.3 Εφαρμογές της HPLC στη διασφάλιση ποιότητας στα φάρμακα, καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής.

Η σύγχρονη βιομηχανία των φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων περιλαμβάνει την έρευνα, ανάπτυξη, παραγωγή και τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων. Η HPLC έχει εξελιχθεί παράλληλα με τις αυξανόμενες απαιτήσεις της βιομηχανίας, χάρη στα μοναδικά πλεονεκτήματά της, που περιλαμβάνουν την ακρίβεια, την πιστότητα των μεθόδων, την υψηλή ευαισθησία (χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης), την εκλεκτικότητα, την ανθεκτικότητα, την ευελιξία σε σχέση με τις χρωματογραφικές συνθήκες (στήλη και κινητή φάση) και το εύρος μεθόδων ανίχνευσης [125].

Ο έλεγχος της ποιότητας είναι το μέρος εκείνο των κανόνων καλής παρασκευαστικής πρακτικής (Good Manufacturing Practice, GMP) που ασχολείται με τη δειγματοληψία, τον έλεγχο των προδιαγραφών των υλικών (πρώτες ύλες, υλικά συσκευασίας), του ημετοίμου προϊόντος (bulk) και του τελικού προϊόντος. Ακόμη, ελέγχει τις δοκιμασίες καθαρισμού (cleaning validation) στο εργοστάσιο παραγωγής (παραγωγή και συσκευασία), την τεκμηρίωση των μη συμμορφούμενων υλικών (πρώτες ύλες, υλικά συσκευασίας, τελικά προϊόντα) την επενεκατεργασία ή την τελική απόρριψη των υλικών ή του προϊόντος και τέλος αποδεσμεύει προς την αγορά και τους καταναλωτές τα τελικά προϊόντα, εφόσον είναι εντός των αποδεκτών προδιαγραφών και των απαιτήσεων του ΕΟΦ και της Ευρωπαϊκής Νομοθεσίας [126,127].

Ο ποιοτικός έλεγχος (Quality control) αποτελεί, ίσως, το βασικότερο τμήμα ενός ολοκληρωμένου συστήματος διασφάλισης ποιότητας (Quality assurance system), που υποχρεωτικά πρέπει να εφαρμόζει πλέον όλη η βιομηχανία παραγωγής. Ειδικότερα, Τα φάρμακα και τα καλλυντικά ακολουθούν υποχρεωτικά τα σύστημα διασφάλισης ποιότητας ISO 9001:2015 και ISO 22716:2007 αντίστοιχα Όλα τα συστήματα διασφάλισης ποιότητας εφαρμόζουν αυστηρούς κανόνες και διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου για να ελαχιστοποιήσουν τον ενδεχόμενο κίνδυνο κυκλοφορίας μίας προβληματικής παρτίδας προϊόντος στην αγορά, προκειμένου να διασφαλιστεί η υγεία των καταναλωτών [128].

Η χρήση της HPLC στον έλεγχο ποιότητας των φαρμάκων και των συμπληρωμάτων διατροφής γίνεται, κυρίως, για τα εξής :

1. Έλεγχο ταυτοποίησης και ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας ή των δραστικών ουσιών και των εκδόχων που περιέχει το τελικό σκεύασμα του φαρμάκου και του συμπληρώματος διατροφής.
2. Έλεγχο περιεκτικότητας πρώτων υλών που παρέχει πληροφορίες για τον έλεγχο καθαρότητας (συγγενείς ουσίες, προϊόντα διάσπασης).
3. Έλεγχο διαλυτοποίησης.
4. Έλεγχο σταθερότητας.
5. Έλεγχο ομοιομορφίας περιεχομένου.

Στα καλλυντικά ως δραστική θεωρείται ο ειδικός παράγοντας που μπορεί επηρεάσει τόσο την αποτελεσματικότητα, όσο και την ασφάλεια του προϊόντος προς τους καταναλωτές και που υποχρεωτικά πρέπει να προσδιορίζεται ποσοτικά (European Regulation EC 12223/2009), τόσο στην πρώτη ύλη, όσο και στο τελικό προϊόν, πριν την τελική αποδέσμευσή του στην κυκλοφορία [127]. Ενδεικτικά αναφέρονται τα εξής με τα είδη χρωματογραφίας που, συνήθως, προσδιορίζονται :

- Συντηρητικά (HPLC-UV)
- Αντιοξειδωτικά (HPLC-UV)
- Αντηλιακά φίλτρα (HPLC-UV)
- Αντιπιτυριδικοί παράγοντες (HPLC-UV)
- Τριχοβαφές. (HPLC UV/MS)
- Φθόριο (HPLC-IC)
- Σαλικυλικό οξύ (HPLC-UV)
- Αρωματικά αλλεργιογόνα. (HPLC-GC/MS)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής & Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Δερματοκοσμητολογίας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, ήταν :

Η διερεύνηση των δερματοκοσμητολογικών παραμέτρων της μικροτοπογραφίας του δέρματος με τη χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής του α-λιποϊκού οξέος, με την ανάπτυξη, παρασκευή και την τοπική εφαρμογή μίας αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής κρέμας με α-LA, τη διερεύνηση της συνεργιστικής δράσης με την ταυτόχρονη χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής και της τοπικής εφαρμογής της κρέμας με α-λιποϊκό οξύ, τόσο με τη χρήση *in-vivo* μεθόδων (βιοφυσικές), όσο και με *ex-vivo* μεθόδους (βιοψίες).

Ένας από τους σκοπούς της κλινικής μελέτης, που εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής & Δεοντολογίας του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Αρ. Πρωτ.: 2552/4-11-2014), χρονικής διάρκειας δύο μηνών ήταν η αξιολόγηση των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών (Local toxicity) όπως ερύθημα, οίδημα και ξηρότητα στους εθελοντές. Επιπλέον, ένας ακόμη στόχος ήταν η μελέτη της σταθερότητας του δραστικού συστατικού (α-LA) στα προϊόντα, τόσο της κρέμας, όσο και του συμπληρώματος διατροφής (καψάκια), μετά από εξαναγκασμένες συνθήκες διάσπασης, επιταχυνόμενης και μακροχρόνιας γήρανσης.

Αρχικός σκοπός ήταν η ανάπτυξη (formulation) μίας αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής κρέμας με α-λιποϊκό οξύ, που θα πληρούσε όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις (σταθερότητα, αποτελεσματικότητα και ασφάλεια) για τον ποσοτικό προσδιορισμό του δραστικού συστατικού του α-LA μέσα σε αυτή και την χρήση της κρέμας από τους στους εθελοντές στη δερματοκοσμητολογική μελέτη.

Στη συνέχεια σκοπός ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση μίας αναλυτικής μεθόδου υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης με UV-Vis ανιχνευτή για τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας του α-λιποϊκού οξέος, σύμφωνα με τις οδηγίες της ICH Q2 (R1): International Conference on Harmonization (2005), στα προϊόντα τοπικής εφαρμογής, όπως είναι η κρέμα, αλλά που να μπορεί να εφαρμοστεί και σε συμπληρώματα διατροφής (καψάκια) που περιέχουν α-λιποϊκό οξύ.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα συμπλήρωμα διατροφής του α-λιποϊκού οξέος (καψάκια των 120 mg), γνωστοποιημένο στον ΕΟΦ της εταιρίας Solgar. Η νέα αντιοξειδωτική-αντιγηραντική καλλυντική κρέμα που αναπτύχθηκε περιείχε α-λιποϊκό οξύ σε περιεκτικότητα (1,5 % w/w), σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό κανονισμό για τα καλλυντικά προϊόντα (EC Regulation 1223/2009) και χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια των κλινικών μελετών, των αναλυτικών πειραμάτων, καθώς και των μελετών σταθερότητας των τελικών προϊόντων σε διάφορες συνθήκες.

Τελικός σκοπός για την ολοκλήρωση της διατριβής ήταν η διεξαγωγή κλινικής μελέτης σε είκοσι (20) εθελοντές και ήταν μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, σε παράλληλες ομάδες, μελέτη (Randomized double blide study, parallel groups). Οι βιοφυσικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν αξιολόγησαν τις δερματοκοσμητολογικές παραμέτρους της μικροτοπογραφίας δέρματος, όπως είναι η απαλότητα και η μείωση των λεπτών γραμμών στο πρόσωπο των εθελοντών. Οι βιοψίες (*ex vivo*) που ελήφθησαν από το άνω βραχίονα συντέλεσαν στην αξιολόγηση της πιθανής αύξησης του πάχους της επιδερμίδας και του κολλαγόνου τύπου I και III στο θηλώδες χόριο του δέρματος και συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα αυτά των βιοφυσικών μεθόδων (*in vivo*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΟΥ

6.1 Εισαγωγή

Η επικύρωση της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος τόσο στο συμπλήρωμα διατροφής, όσο και στην καλλυντική κρέμα πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή των οδηγιών που αναφέρονται στο Διεθνές Συνέδριο Εναρμόνισης Τεχνικών Απαιτήσεων για την Καταχώριση των Φαρμακευτικών Προϊόντων για Ανθρώπινη Χρήση (ICH). Για να πραγματοποιηθεί η επικύρωση μιας μεθόδου, θα πρέπει να εξεταστούν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά ποιότητας της αναλυτικής μεθόδου, σύμφωνα με το ICH [129] :

- Ειδικότητα (Specificity)
- Γραμμικότητα (Linearity)
- Περιοχή συγκεντρώσεων (Range)
- Ακρίβεια (Accuracy)
- Πιστότητα (Precision)
- Όριο ανίχνευσης (Detection limit)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Quantification limit)
- Ανθεκτικότητα (Robustness)

6.2 Ειδικότητα (Specificity)

Η ικανότητα να προσδιοριστεί ο επιθυμητός αναλύτης παρουσία άλλων συστατικών με ακρίβεια και εκλεκτικότητα, ονομάζεται ειδικότητα. Αποτελεί ένα μέτρο του βαθμού παρεμπόδισης από τα άλλα δραστικά συστατικά (φάρμακα, συμπληρώματα διατροφής) ή τους ειδικούς παράγοντες (καλλυντικά), τα έκδοχα, τις προσμίξεις, τους μεταβολίτες και τα προϊόντα διάσπασης.

6.3 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα θα πρέπει να εξετάζεται σ' όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου. Μπορεί να αποδειχθεί: α) απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία (με αραιώσεις ενός πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης) β) με ξεχωριστές ζυγίσεις του συνθετικού μίγματος των συστατικών ενός προϊόντος και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου (εξετάζεται κατά τον έλεγχο της περιοχής συγκεντρώσεων) γ) με διαδοχικές αυξανόμενες προσθήκες «τυφλού» δείγματος και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου.

Η γραμμικότητα αναφέρεται γενικά ως διακύμανση της εξίσωσης παλινδρόμησης. Αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος (plot) των αναλυτικών σημάτων με τη συγκέντρωση ή την περιεκτικότητα του αναλύτη. Εφόσον υφίσταται γραμμική σχέση, τα αποτελέσματα ελέγχου πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους, π.χ. ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης [125].

6.4 Περιοχή συγκεντρώσεων (Range)

Η καθοριζόμενη περιοχή των συγκεντρώσεων κανονικά προκύπτει από τη μελέτη της γραμμικότητας και εξαρτάται από τη σκοπούμενη εφαρμογή της μεθόδου. Αποδεικνύεται με την επιβεβαίωση ότι η αναλυτική μέθοδος παρέχει έναν αποδεκτό βαθμό γραμμικότητας, ακρίβειας και επαναληψιμότητας, όταν εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν ποσότητες/συγκεντρώσεις εντός ή στα άκρα της καθοριζόμενης περιοχής της αναλυτικής μεθόδου.

6.5 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια είναι η μέτρηση που αποδεικνύει πόσο κοντά είναι η πειραματική τιμή από την αληθινή τιμή. Υπολογίζεται ως το ποσοστό του αναλύτη που έχει ανακτηθεί κατά τον προσδιορισμό του στο δείγμα ή σε εμβολιασμένα δείγματα. Για το

φαρμακευτικό προϊόν, το συμπλήρωμα διατροφής, ή το καλλυντικό προϊόν πραγματοποιείται αναλύοντας συνθετικά μίγματα (placebo) εμβολιασμένα με γνωστές ποσότητες του φαρμάκου ή του ειδικού παράγοντα, που θέλουμε να αναλύσουμε (βιταμίνη, πεπτίδιο, συντηρητικό, αντιοξειδωτικό, αντηλιακό φίλτρο κ.α.).

6.6 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η πιστότητα συνήθως εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Η πιστότητα συνήθως πραγματοποιείται σε δυο διαφορετικές συνθήκες:

α) Επαναληψιμότητα (repeatability) β) Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)

Επαναληψιμότητα (repeatability): ορίζεται το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο) σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η επαναληψιμότητα θα πρέπει να εκτιμάται χρησιμοποιώντας: α) τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς που καλύπτουν την καθορισμένη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου, β) τουλάχιστον 6 προσδιορισμούς στο 100% της συγκέντρωσης ελέγχου.

Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility): ορίζεται το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλαδή διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικοί χρόνοι. Η αναπαραγωγιμότητα εκτιμάται ενδοεργαστηριακά ή διεργαστηριακά. [125,130].

6.7 Όριο ανίχνευσης (Detection limit)-Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation limit)

Ως όριο ανίχνευσης (detection limit) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί. Ενώ όριο ποσοτικοποίησης (quantitation limit) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή πιστότητα και ακρίβεια κάτω από καθορισμένες συνθήκες της μεθόδου. Συνήθως, αυτά τα όρια προσδιορίζονται από το λόγο σήματος/θορύβου (S/N), προσέγγιση που εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές μεθόδους, οι οποίες παρουσιάζουν θόρυβο γραμμής βάσης ή με βάση την τυπική απόκλιση SD της αναλυτικής απόκρισης (response) και την κλίση (slope) b της καμπύλης απόκρισης. Το όριο ανίχνευσης μπορεί να εκφραστεί ως: $LOD = [3,3 \times SD] / b$ και το όριο ποσοτικοποίησης ως : $LOQ = [10 \times SD] / b$, όπου SD είναι η τυπική απόκλιση και b η κλίση της καμπύλης απόκρισης [125].

6.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Η αξιολόγηση της ανθεκτικότητας μιας αναλυτικής μεθόδου πρέπει να εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξης της και εξαρτάται από τον τύπο της μελετούμενης μεθόδου. Η ανθεκτικότητα ορίζεται ως η ικανότητα της μεθόδου να παράγει αναπαραγωγίμα αποτελέσματα, όταν επιφέρονται σκοπούμενες μικρο-αλλαγές των πειραματικών συνθηκών, που είναι δυνατόν να εμφανιστούν κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε βάθος χρόνου.

6.9 Αντοχή μεθόδου (Ruggedness)

Είναι ο βαθμός της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων της μεθόδου, όταν τα δείγματα αναλύονται κάτω από διαφορετικές κανονικές συνθήκες ελέγχου, όπως διαφορετικά εργαστήρια, αναλυτές, όργανα, παρτίδες αντιδραστηρίων, θερμοκρασία προσδιορισμού και χρόνος προσδιορισμού [130,131].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α -ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΚΑΨΑΚΙΑ)

7.1 Εισαγωγή

Η διερεύνηση της βιβλιογραφίας ανέδειξε τις μεθόδους αναφορικά με τον ποσοτικό προσδιορισμό του α -λιποϊκού οξέος. Έτσι, έχουν αναφερθεί οι μέθοδοι ποσοτικοποίησης σε βιολογικά υγρά περιλαμβάνοντας την υγρή χρωματογραφία HPLC με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD) [132] και ποικίλες χρωματογραφικές μέθοδοι με διαδικασίες προ-στήλης παραγωγοποίησης σε συνδυασμό με ανιχνευτές UV [133] ή φθορισμού [134]. Επιπρόσθετα, η υγροχρωματογραφία HPLC με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή και η υγροχρωματογραφία φασματομετρίας μάζας σε σειρά (LC-MS/MS) έχουν εφαρμοστεί στην ανάλυση του α -LA σε πλάσμα [135,136], καθώς επίσης και για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εναντιομερούς της ένωσης στα ούρα [137]. Σε δείγματα δέρματος έχει ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας ανιχνευτές υπεριώδους, ηλεκτροχημικούς και εξάτμισης σκέδασης φωτός [138]. Το α -LA έχει προσδιοριστεί σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων, χρησιμοποιώντας HPLC συζευγμένο με διάταξη κουλομετρικού ηλεκτροδίου ανίχνευσης και LC-MS με ηλεκτροψεκασμό ανίχνευσης ESI, με λειτουργία αρνητικού ιόντος [139].

Λίγες μέθοδοι είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό του α -LA μόνο του σε συμπληρώματα διατροφής. Αυτές περιλαμβάνουν την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με UV ανίχνευση [140] και HPLC με UV [141] και διάταξη με κουλομετρικό ηλεκτρόδιο ανίχνευσης (CEAD) [139]. Άλλες HPLC-UV μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του α -LA σε συνδυασμό με διάφορες άλλες βιταμίνες σε συμπληρώματα διατροφής. [142,143].

Στα καλλυντικά μερικές μέθοδοι έχουν αναφερθεί για τη μελέτη αποτελεσματικότητας του α -LA και άλλων αντιοξειδωτικών μαζί, για να εμποδίσουν τη φωτοχημική διάσπαση του epigallocatechin-3-gallate σε κρέμες τοπικής εφαρμογής

μετά από έκθεση σε απευθείας ηλιακό φως, με HPLC-UV [144]. Ακόμη έχει μελετηθεί η σταθερότητα του α-λιποϊκού οξέος σε ο/w γαλακτώματα παρουσία των βιταμινών Α, Ε σε διαφορετικές συνθήκες διάσπασης [145]. Αυτές οι μέθοδοι δεν είναι επικυρωμένες και απλά μετράνε την απορρόφηση του με UV ανιχνευτή. Μία αξιοσημείωτη προσπάθεια αναφέρθηκε χρησιμοποιώντας χημική παραγωγοποίηση συνδυασμένη με τριχοειδή υγροχρωματογραφία LC και MALDI-TOF MS για τον προσδιορισμό ιχνών λιποϊκού οξέος σε καλλυντικά και της ολοκληρωμένης έκφρασης του πρωτεϊνικού προφίλ στα κερατινοκύτταρα [146]. Η μέθοδος ήταν πολύπλοκη, χρονοβόρος και ακριβής. Επιπλέον αποδείχτηκε ότι δεν ήταν επαρκώς εφαρμόσιμη στα καλλυντικά προϊόντα και έτσι δεν μπορούσε να εφαρμοστεί για τον ποιοτικό έλεγχο στη βιομηχανία.

Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι κυριότερες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την ποσοτικοποίηση του α-λιποϊκού οξέος και παρατίθενται περιληπτικά τα στοιχεία των αναλυτικών μεθόδων.

Πίνακας 7.1. Κυριότερες βιβλιογραφικές αναφορές αναλύσεων του α-λιποϊκού οξέος.

Αναλύτες	Αναλυτική μέθοδος	Βιβλιογραφία
Ανθρώπινο πλάσμα ¹⁴⁷	Σύστημα HPLC-ECD, με υγρή-υγρή και στερεής φάσης εκχύλιση, αναλυτική στήλη : Discovery HS C18 RP (250 mm×4.6mm,5 μm), κινητή φάση : 0.05 M phosphate buffer : acetonitrile (50:50, v/v), (pH 2.5), ταχύτητα ροής 1.5 ml/min, DC mode 500-1000 mV.	Μεθοδος HPLC ECD στην ανάλυση α-λιποϊκού οξέος.
Ανθρώπινο πλάσμα ¹³³	Σύστημα HPLC-UV (321 nm), αναλυτική στήλη : Zorbax C18 (150 mm×4.6 mm,5 μm), κινητή φάση, βαθμιδωτή έκλυση: A: 2% οξικό οξύ, B: MeCN (pH 2.36), ταχύτητα ροής 1.0 ml/min, αντιδραστήριο παραγωγοποίησης 1-benzyl-2-chloropyridinium.	Μεθοδος HPLC UV στην ανάλυση του πρωτεϊνικά-δεσμευμένου λιποϊκού οξέος (protein bound α-LA) και του συνολικού α-LA.
Ανθρώπινο πλάσμα ¹³⁴	Φθορισμομετρία (lex 380 nm, lem 510 nm), αντιδραστήρια φθορισμομετρικά : 4-fluoro-7-aminosulfonylbenzofurazan (ABD-F) και 7 fluorobenzofurazan-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F)	Μεθοδος HPLC με φθορισμομετρικό αιχνευτή στον ταυτόχρονο προσδιορισμό του α-LA και του Dehydroliipoic acid (DHLA) σε δείγματα πλάσματος.
Πλάσμα αρουραίων ¹³⁶	Σύστημα LC-MS/MS, με ηλεκτροψεκασμό ανίχνευσης ESI και λειτουργία θετικού και αρνητικού ιόντος, αναλυτική στήλη : Hichrom RPB, κινητή φάση, 0.05 M formic acid:acetonitrile (40:60, v/v), ταχύτητα ροής 1.0 ml/min	Μεθοδος LC-MS/MS με ESI στην ανάλυση του α-LA σε πλάσμα αρουραίων.
Ανθώπινα Ούρα ¹³⁷	Σύστημα LC-MS/MS, με ηλεκτροψεκασμό ανίχνευσης ESI και λειτουργία αρνητικού ιόντος, αναλυτική στήλη : CHIRALPAK AD-3R, κινητή φάση, acetonitrile-methanol-formic acid (10 mM) (25:25:50, v/v/v)	Προσδιορισμός των εναντιομερών (R),(S) του α-LA με τη μέθοδο LC-MS/MS με ESI, με χειρική χρωματογραφία, σε ούρα.
Δέρμα χοίρου ¹³⁸	Σύστημα HPLC-ELS με εξατμιστικό ανιχνευτή σκέδασης φωτός (evaporative light scattering detector), αναλυτική στήλη : LiChrospher®100 RP-18 (250 x 4 mm x 5 μ) , με προστήλη RP-18 (4×4 m x 5 μ) Merck), πίεση συμπιεσμένου αέρα	Μεθοδος HPLC-ELS στην ανάλυση α-LA σε χοιρινό δέρμα.

	(300 ± 5.0 kPa), θερμοκρασία μετακίνησης σωλήνα 40°C	
Τρόφιμα ¹⁴⁸	Σύστημα LC-MS/MS, με ηλεκτροψεκασμό ανίχνευσης ESI και λειτουργία αρνητικού ιόντος, αναλυτική στήλη : ACE 3 C18 column (150 x 2.1 mm, 3 μ), κινητή φάση : 0.1% glacial acetic acid in water/acetonitrile (55:45, v/v), ταχύτητα ροής 0.2 ml/min	Προσδιορισμός του α-LA με τη μέθοδο LC-MS/MS με ESI, σε τρόφιμα.
Συμπλήρωμα διατροφής ¹⁴²	Σύστημα RP-HPLC (UV ανίχνευση 332 nm), αναλυτική στήλη : Supelcosil LC-18 (150 × 4 mm, 3 μm), κινητή φάση: acetonitrile: 0.05 M potassium mono-phosphate (45:55 v/v), pH 2.5, ταχύτητα ροής 0.8 ml/min	Μεθοδος RP-HPLC με ανιχνευτή UV στον προσδιορισμό του α-LA σε συμπληρώματα διατροφής (ταμπλέτες).
Συμπλήρωμα διατροφής ¹⁴³	Σύστημα RP-HPLC (UV ανίχνευση 285 nm), αναλυτική στήλη : Inertsil C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), κινητή φάση: (buffer 0,5 % hexane-1-sulfonic acid :acetonitrile (10:90 v/v), pH 2.5, ταχύτητα ροής 1.0 ml/min	Μεθοδος RP-HPLC με ανιχνευτή UV στον προσδιορισμό του α-LA ταυτόχρονα με τις δραστικές methylcobalaminpyridoxine hydrochloride και folic acid σε συμπληρώματα διατροφής.
Γαλακτώματα o/w ¹⁴⁴	Σύστημα RP-HPLC (UV ανίχνευση 336 nm), αναλυτική στήλη : Luna C18 column (150 × 4.6 x 5μm; Phenomenex, προστήλη 4 × 3 mm x 5 μm) κινητή φάση: sodium phosphate buffer /acetonitrile (60:40, v/v), pH 2.8, ταχύτητα ροής 1.0 ml/min	Μεθοδος RP-HPLC με ανιχνευτή UV στον προσδιορισμό του α-LA ως αντιοξειδωτικό σε σύγκριση με τη βιταμίνη E, το butylated hydroxytoluene, και τη βιταμίνη C σε o/w γαλακτώματα.
Καλλυντικά προϊόντα & Συμπληρώματα διατροφής ¹⁴⁶	Σύστημα Τριχοειδούς υγροχρωματογραφίας συζευγμένη με UV ανιχνευτή, 345 nm (CapLC-UV) και υποβοηθούμενος με laser εκρόφησης ιονισμός της μήτρας με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF MS) με λειτουργία θετικού ιόντος, και νανοξεκασμό ανίχνευσης, αναλυτική στήλη: Phenomenex 150 mm x 0.3 mm x 4 μm, βαθμιδωτή έκλουση, κινητή φάση : A: 0,1% υδ. δ/μα φορμικού οξέος, B: ACN (pH 2.36), ταχύτητα ροής 0,5 ml/min.	Μέθοδος CapLC-UV και υποβοηθούμενος με laser εκρόφησης ιονισμός της μήτρας με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF MS για τον προσδιορισμό του α-LA σε καλλυντικά προϊόντα και συμπληρώματα διατροφής και μελέτη της προστατευτικής δράσης του α-λιποϊκού οξέος, μετά από UV ακτινοβολία στο πρωτεϊνικό προφίλ των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων.

7.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α -ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΚΑΨΑΚΙΑ)

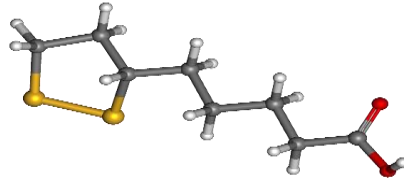
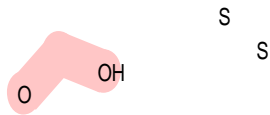
7.2.1 Αρχή μεθόδου

Το α -λιποϊκό οξύ (α -LA) προσδιορίζεται ποσοτικά στα συμπληρώματα διατροφής, με κατάλληλη μέθοδο κατεργασίας του δείγματος, με στόχο την απομάκρυνση των εκδόχων και την κατάλληλη απομόνωση της δραστικής ουσίας. Το α -λιποϊκό οξύ είναι ένα ασθενές οξύ με pKa: 5.4 (υπολογισμός με ADME boxes software) και logP : 2.1, (υπολογισμός ChemAxon), (Πίνακας 7.2). Είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (0.24 g/L), διαλυτό στην αιθυλική αλκοόλη (50 mg/ml), στη MeOH, ACN, CHCl₃ κ.α.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε η μέθοδος αντίστροφου φάσης υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) σε αναλυτική στήλη Phenomenex Luna C18, με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (UV/Vis). Λόγω της μη ισχυρής χρωμοφόρου ομάδας στο μόριο του α -λιποϊκού οξέος, και της πιθανής απορρόφησης των εκδόχων του συμπληρώματος διατροφής σε χαμηλά μήκη κύματος, που μπορεί να δρουν παρεμποδιστικά στον προσδιορισμό του αναλύτη, αλλά και λόγω της προσπάθειας εφαρμογής της αναπτυχθείσας μεθόδου με τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες και στις κρέμες, ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ρυθμίστηκε σε μήκος κύματος 340 nm.

Το pH που χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη της μεθόδου είναι 4,5 όπου το α -λιποϊκό οξύ είναι 70% σε ουδέτερη μορφή και παρουσιάζει, ως ασθενές οξύ, καλύτερη κατακράτηση στην αντίστροφης φάσης υγροχρωματογραφία.

Πίνακας 7.2: Προβλεπόμενες τιμές pKa και ιοντισμός του α-λιποϊκού οξέος από το πρόγραμμα ADME boxes



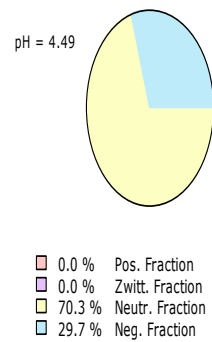
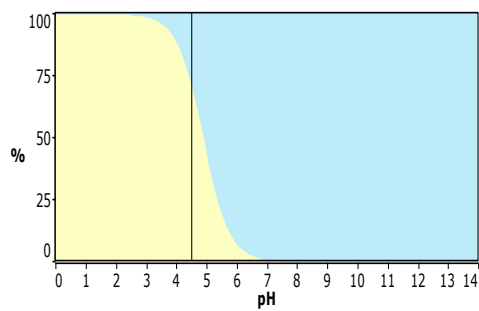
α-Λιποϊκό οξύ

Ακριβής μάζα: 206.32 g·mol⁻¹

Μοριακός τύπος: C₈H₁₄O₂S₂

pKa (οξύ) = 5,4

LogP = 2,1



7.2.2 Εξοπλισμός-οργανολογία.

- **Σύστημα HPLC-UV** : Εταιρία Waters® Breeze™ 2 HPLC System. Αποτελείται από διπλή αντλία, Waters® 1525 Binary HPLC Pump, αυτόματο δειγματολειτουργη Waters® 2707 HPLC autosampler, με βρόχο εισαγωγής 20 µL, και ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού, Waters® 2489 UV/Vis detector. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν στήλη αντίστροφης φάσης: Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm) σε συνδυασμό με μία προστήλη της ίδιας εταιρίας pre-column Phenomenex (C18, 4.0 mm x 3.0 mm). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογιστικό πρόγραμμα Breeze της ίδιας εταιρίας Waters.
- Η ρύθμιση του pH έγινε με τη χρησιμοποίηση ψηφιακού πεχαμέτρου της εταιρίας Isolab.
- Η κινητή φάση φιλτραρίστηκε μέσω διήθησης υπό κενό με φίλτρα 0.45 µm PTFE membrane filters (εταιρία Membrane Solution).
- Η διαλυτοποίηση των αναλυτών και η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με τη χρήση λουτρού υπέρηχων, εταιρία Ultra sonic cleaner, μοντέλο GT Sonic, ισχύς 100 W, συχνότητα 40 KHz.
- Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων έγινε με τη φυγόκεντρο της εταιρίας Hettich, μοντέλο Mikro 22R (Max 18.000 rpm, Θ: -20° C έως +40° C)
- Η ανάδευση των δειγμάτων έγινε σε συσκευή Vortex.
- Η τελική φίλτρανση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση PET 45/25 polyester syringe filters, εταιρία Macherey-Nagel GmbH.
- Η γήρανση έγινε σε κλίβανο επώασης 0-80° C, εταιρία Heraeus.
- Για τη παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματη πιπέτα των 200 και 1000 µL, εταιρία Hamilton
- Η ζύγιση των πρώτων υλών και των δραστικών ουσιών για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε αναλυτικό ζυγό, εταιρία Kern

7.2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής :

- Ακετονιτρίλιο, Μεθανόλη καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Fisher Scientific UK
- Νερό καθαρότητας HPLC, εταιρία Fisher Scientific UK
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, υδροχλωρικό οξύ (37% w/w), υδροξείδιο του νατρίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου (3.0 % v/v) και ortho-φωσφορικό οξύ (85% w/w), αναλυτικού βαθμού, εταιρία Fisher Scientific UK
- α-λιποϊκό οξύ φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας (USP 99.0%), εταιρία Sabinsa Europe GmbH.

Συμπλήρωμα διατροφής σε καψάκια 120 mg α-Lipoic acid (εταιρία Solgar)

Συστατικά : Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, φυτική κυτταρίνη, στεατικό μαγνήσιο.



Εικόνα 7.1. Συμπλήρωμα διατροφής 120 mg/καψάκι (Solgar)

Καθαρισμός υάλινων σκευών: Ο καθαρισμός όλων των υάλινων σκευών, λόγω της λιποδιαλυτής φύσης του α -λιποϊκού οξέος, έγινε με την χρήση καθαριστικού υγρού σαπουνιού (28 % w/w Sodium Laureth sulfate) και νερό. Στο τέλος, ξεπλένονταν όλα τα σκεύη με νερό καθαρότητας HPLC. Η διαδικασία αυτή του καθαρισμού αποδείχτηκε ικανή και δεν παρατηρήθηκε καμία πρόσμιξη ή παρεμπόδιση.

7.2.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας

Διάλυμα παρακαταθήκης A: Ζυγίζονται με ακρίβεια 50 mg α -λιποϊκό οξύ και μεταφέρονται μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Ακολουθεί διάλυση με ACN, με ανάδευση σε Vortex και λουτρό υπερήχων και αραίωση μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης φυλάσσεται στο σκοτάδι και στο ψυγείο (4°C), όπου διατηρούνται σταθερά για αρκετές εβδομάδες.

Διαλύματα εργασίας: Για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς και την επικύρωση της μεθόδου παρασκευάζονται κάθε φορά διαλύματα εργασίας σε συγκεντρώσεις 5, 10, 15, 20, 25 και $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε α -LA, χρησιμοποιώντας κατάλληλους όγκους από το διάλυμα παρακαταθήκης A. Τα διαλύματα εργασίας και ελέγχου παρασκευάζονται φρέσκα κάθε εργαστηριακή μέρα.

Ρυθμιστικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 50mM) : Ζυγίζονται 6,8 g KH_2PO_4 (Mr 136) διαλύονται με ανάδευση σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL με νερό, ώστε να ληφθεί ένα διάλυμα KH_2PO_4 $50,0 \text{ mM mL}^{-1}$

7.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΚΑΨΑΚΙΑ)

Για τον καθορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες μελέτες.

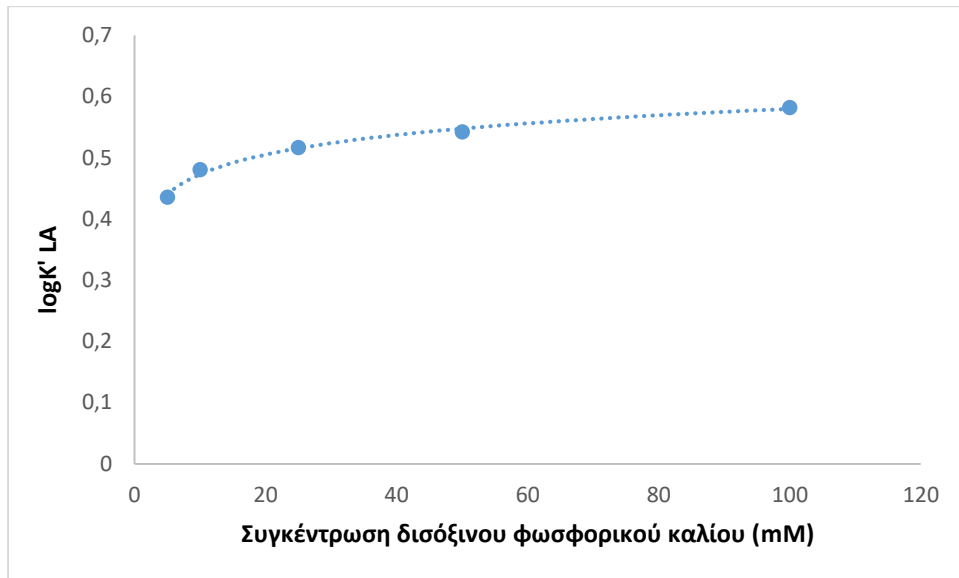
- Μελέτη επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας.
- Μελέτη της επίδρασης του οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης του α-λιποϊκού οξέος.
- Μελέτη της επίδρασης της στάσιμης φάσης με στήλη αντίστροφης φάσης C18, μικρότερου μήκους (Symmetry C18, 70mm x 4.6 mm i.d., 5 μ).

7.3.1 Μελέτη της επίδρασης του ρυθμιστικού διαλύματος του δισόξιου φωσφορικού καλίου στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας.

Το ρυθμιστικό διάλυμα δισόξιου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) σε pH: 4,5 προσαρμοσμένο με ορθο-φωσφορικό οξύ 85% w/w (OPA) θεωρήθηκε κατάλληλο για τον επιτυχή προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε σχέση με το χρόνο συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας. Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα και μελετήθηκε αναλυτικά η επίδραση της συγκέντρωσης του. Ειδικότερα, μελετήθηκε η επίδραση σε μία σειρά συγκεντρώσεων: 5, 10, 25, 50, 100 mM KH_2PO_4 προσαρμοσμένα σε pH : 4.5 με OPA. Μετρήθηκαν πρότυπα διαλύματα α-LA ($12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), κατάλληλα παρασκευασμένα από το διάλυμα παρακαταθήκης Α, σε στήλη αντίστροφης φάσης C18 (Symmetry C18, 70mm x 4.6 mm i.d., 5 μ). Στον πίνακα 7.3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος δισόξιου φωσφορικού καλίου στους χρόνους συγκράτησης, τον παράγοντα χωρητικότητας και το εμβαδό των κορυφών.

Πίνακας 7.3 : Επίδραση της συγκέντρωσης του δισόξινου φωσφορικού καλίου στις βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους του αναλύτη, στο εμβαδό και στο σχήμα των κορυφών.					
Δισόξινου φωσφορικού καλίου (mM)	5	10	25	50	100
α-Λιποϊκό οξύ					
t_R (min)	2,88	3,18	3,41	3,55	3,29
logK'	0,435	0,480	0,516	0,542	0,581
Tⁱ	1,10	1,05	1,15	1,14	1,15
Nⁱⁱ	1020	2180	2447	2784	2456
ⁱ T : παράγοντας συμμετρίας πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					
ⁱⁱ N : αριθμός θεωρητικών πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					

Στο σχήμα 7.1 παριστάνεται γραφικά η συσχέτιση της συγκέντρωσης του δισόξινου φωσφορικού καλίου με τον παράγοντα χωρητικότητας του αναλύτη.



Σχήμα 7.1 : Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του παράγοντα χωρητικότητας του α-λιποϊκού οξέος σε συνάρτηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 , της κινητή φάσης.

Όπως φαίνεται από τα πειραματικά δεδομένα ο παράγοντας χωρητικότητας του αναλύτη ελαττώνεται μειώνοντας τη συγκέντρωση του δισόξινου φωσφορικού καλίου. Παρατηρούμε όμως, ότι μειώνεται και αριθμός των θεωρητικών πλακών. Λαμβανομένου ότι η απορρόφηση, του λιποϊκού οξέος δεν είναι ισχυρή, λόγω έλλειψης χρωμοφόρου ομάδας και του μικρού αριθμού των θεωρητικών πλακών, καθώς και τη συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής, επιλέχθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση του δισόξινου φωσφορικού καλίου η συγκέντρωση των 50 mM, όπου ο χρόνος έκλουσης είναι $t_r = 3,55 \text{ min}$ και ο αριθμός των θεωρητικών πλακών είναι : $N = 2784$ με τον παράγοντα συμμετρίας της κορυφής να είναι : $T = 1,14$

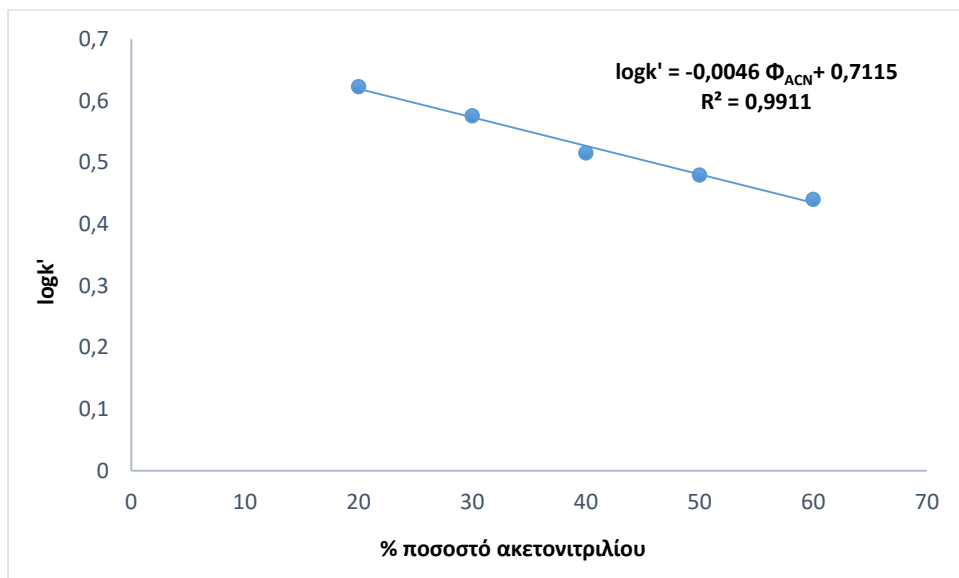
7.3.2 Μελέτη της επίδρασης του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας.

Μελετήθηκε η επίδραση της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου ως οργανικών τροποποιητών και επιλέχτηκε το ακετονιτρίλιο, ως οργανικός τροποποιητής, επειδή βελτιώνει τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Εξετάστηκαν τα εξής πέντε διαφορετικά ποσοστά ακετονιτριλίου στους χρόνους συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας του α-λιποϊκού οξέος στην κινητή φάση : 30, 35, 40, 45 και 50 % v/v, σε υδατικό διάλυμα KH_2PO_4 50 mM και ρύθμιση της τιμής του pH της κινητής φάσης στην τιμή 4,5 με ο-φωσφορικό οξύ (85 % w/w)

Στον πίνακα 7.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του % ποσοστού του ακετονιτριλίου στους χρόνους συγκράτησης και τον παράγοντα χωρητικότητας του λιποϊκού οξέος. Αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή επέφερε μείωση στο χρόνο ανάλυσης του αναλύτη.

Πίνακας 7.4 : Επίδραση του % ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στις βασικές χρωματογραφικές παραμέτρους του αναλύτη, στο εμβαδό και στο σχήμα των κορυφών.					
%Ποσοστό ακετονιτριλίου (ACN)	30	35	40	45	50
α-Λιποϊκό οξύ					
t_R (min)	4,02	3,76	3,40	3,18	3,01
logK'	0,623	0,575	0,515	0,480	0,440
Tⁱ	1,15	1,14	1,08	1,10	1,10
Nⁱⁱ	2270	2430	2675	2620	2590
ⁱ T : παράγοντας συμμετρίας πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					
ⁱⁱ N : αριθμός θεωρητικών πλακών, μέση τιμή δύο μετρήσεων					

Στο σχήμα 7.2 παριστάνεται η τιμή $\log k'$ σε συνάρτηση με το % ποσοστό του ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.



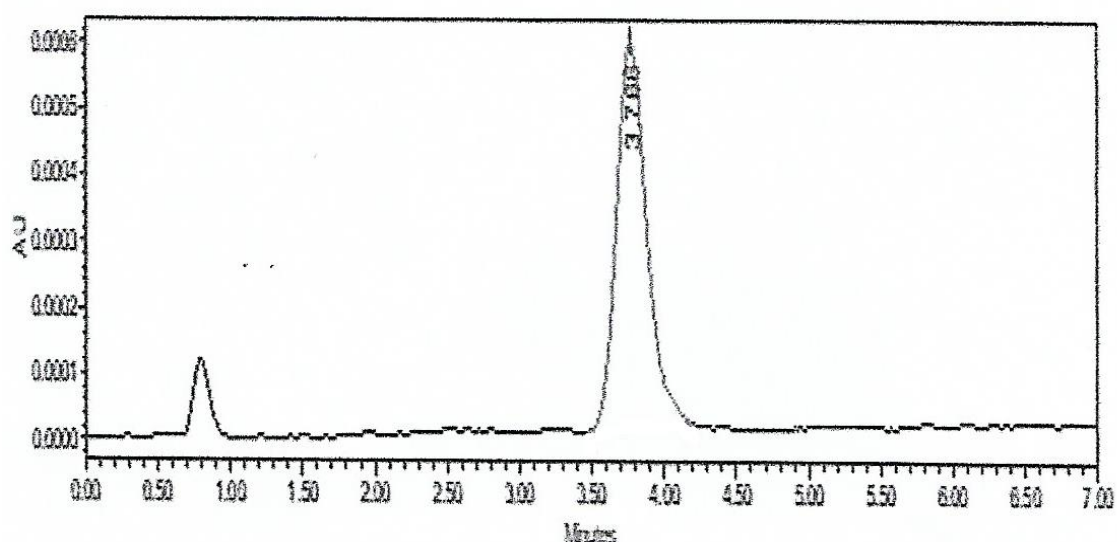
Σχήμα 7.2 : Γραφική παράσταση του λογαρίθμου του παράγοντα χωρητικότητας του α-λιποϊκού οξέος σε συνάρτηση με το % ποσοστό του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης (Φ_{ACN}).

Όπως φαίνεται από το διαγράμματος του σχήματος 7.2 υπάρχει γραμμική σχέση ανάμεσα στην τιμή $\log K'$ και του ποσοστού του ακετονιτριλίου της κινητής φάσης, που είναι αναμενόμενο αφού εφαρμόζουμε υδροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης στην οποία το ακετονιτρίλιο είναι ο διαλύτης με την μεγαλύτερη εκλουστική ισχύ και επικρατούν φαινόμενα κατανομής. Ως βέλτιστο ποσοστό επιλέχθηκε το 40% v/v όπου το α-λιποϊκό οξύ εκλύεται σε χρόνο $t_R = 3,40$ min, όπου ο αριθμός θεωρητικών πλακών είναι $N=2675$ και ο παράγοντας συμμετρίας είναι : $T=1,08$

7.3.3 Μελέτη της επίδρασης της στάσιμης φάσης με στήλη αντίστροφης φάσης

Αρχικά διερευνήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης μεθόδου υδροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης σε στήλη Symmetry C18, 70mm x 4.6 mm i.d., 5 μ) της εταιρίας Waters. Το σχήμα των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού είναι σφαιρικό με το

μέγεθος πόρων του διοξειδίου πυριτίου (SiO_2) να είναι 100 \AA και το φορτίο του άνθρακα (Carbon load) 19%, δηλαδή το ποσοστό του άνθρακα που είναι χημικά προσκολλημένο στην επιφάνεια της silica στη στατική φάση. Ελήφθησαν χρωματογραφήματα με την κινητή φάση που μελετήθηκε παραπάνω στο pH 4.5, σε διάφορες περιεκτικότητες των standard διαλυμάτων του α -LA σε ACN (5, 12, 15, 20, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Παρατηρήθηκε, όμως (σχ.7.3), ότι ο συνολικός αριθμός θεωρητικών πλακών ήταν πολύ μικρός $N= 1646$, και ο παράγοντας συμμετρίας (symmetry factor) όχι ικανοποιητικός $T=1.25$, παρόλο που ο χρόνος κατακράτησης ήταν πολύ μικρός ($t_r= 3.7 \text{ min}$).



Σχήμα 7.3 : Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση προτύπου διαλύματος α -λιποϊκού οξέος σε συγκέντρωση $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη Symmetry C18, 70mm x4.6 mm i.d.,5 μ , κινητή φάση : ACN/υδ.διάλ. KH_2PO_4 50mM 40/60 v/v, pH: 4.5, ταχύτητα ροής $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda=340 \text{ nm}$

Στην προσπάθεια βελτίωσης των χρωματογραφημάτων, τόσο για την αύξηση των θεωρητικών πλακών, λόγω της απουσίας ισχυρής χρωμοφόρου ομάδας του αναλύτη, όσο και για το σχήμα της κορυφής (μείωση του Symmetry factor), επιλέχθηκε μία άλλη αναλυτική στήλη της εταιρίας Phenomenex (Luna® C18, 150mm x 4.6 mm

i.d, 5 μm). Αυτή η μεγαλύτερη σε μήκος στήλη (150 mm), σε σχέση με αυτή της Symmetry (70 mm), είχε σχήμα σωματιδίων του πληρωτικού υλικού, που ήταν πλήρως πορώδης, ενώ το μέγεθος πόρων του διοξειδίου πυριτίου (SiO_2) ήταν 100 Å. Ακόμη, για την προστασία του χρωματογραφικού συστήματος και τη βελτίωση της αναλυτικής διαδικασίας και λόγω του ότι οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες θα χρησιμοποιούνταν στον προσδιορισμό του λιποϊκού οξέος μέσα σε κρέμες καλλυντικές, που έχουν ιδιαίτερα δύσκολο matrix, λόγω των πλούσιων και διαφορετικής φύσης (εκδόχων), συνδέθηκε και μία προστατευτική στήλη (pre-column), που δεν υπήρχε πριν της ίδιας εταιρίας : Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm. Αυτό οδήγησε σε βελτίωση των χρωματογραφημάτων, εφαρμόζοντας την ίδια κινητή φάση στο pH 4.5, αφού έδωσε σημαντική αύξηση των θεωρητικών πλακών $N=7263$ και βελτίωση (μείωση) του παράγοντα συμμετρίας των κορυφών $T=1.02$. Ο χρόνος κατακράτησης, όμως, αυξήθηκε $t_r = 7.2 \text{ min}$. Παρόλα αυτά, επειδή παραμένει αρκετά μικρός και δεν εμποδίζει την ανάλυση ρουτίνας στον ποιοτικό έλεγχο, ούτε την ερευνητική διαδικασία και με δεδομένο την βελτίωση στην ποιότητα των κορυφών και των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων, επιλέχθηκε αυτή η αναλυτική στήλη, για την περεταίρω βελτιστοποίηση και επικύρωση στη μέθοδο προσδιορισμού του λιποϊκού οξέος, στα συμπληρώματα διατροφής, αλλά και στις καλλυντικές κρέμες στη συνέχεια.

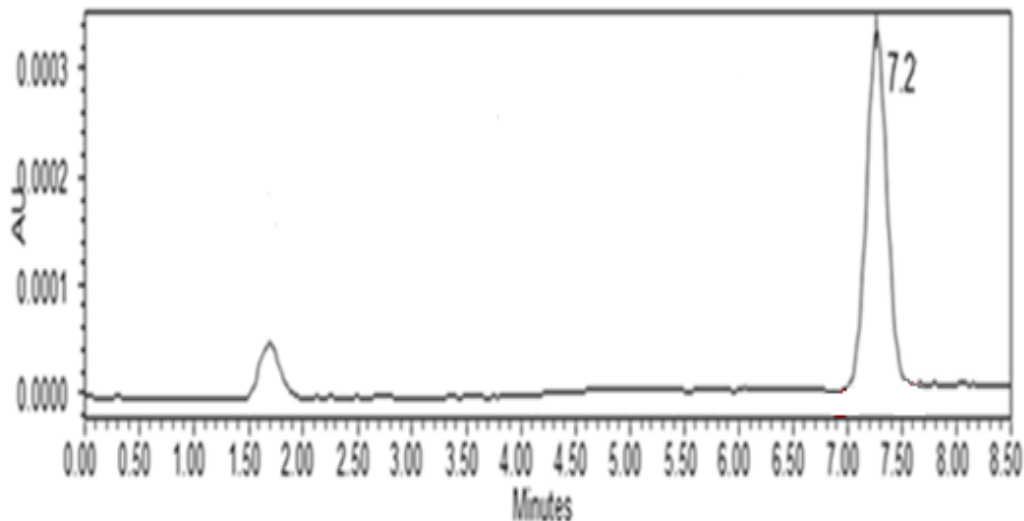
7.3.4 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Με βάση τα αποτελέσματα από τη μελέτη βελτιστοποίησης του συστήματος υδροχρωματογραφίας επιλέχθηκαν οι ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του λιποϊκού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής.

- **Στατική φάση:** χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Luna® C18, αντίστροφης φάσης με διαστάσεις 150 mm x 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm , σε σύνδεση με την προστήλη (Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm)

- **Κινητή φάση:** Μίγμα ακετονιτριλίου/υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 50 mM (ρυθμιστικό διάλυμα σε pH : 4.5 με ο-φωσφορικό οξύ 85% w/w) σε αναλογία 60:40 v/v.
- **Ταχύτητα ροής:** 1 mL.min⁻¹
- **Όγκος βρόγχου:** 10μL
- **Ανιχνευτής:** ανιχνευτής υπεριώδους ορατού (UV-Vis), ρυθμισμένος στα 340 nm. Ο χρόνος έκλουσης για το οξύ ήταν 7,2 min.

Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα μετά την ανάλυση προτύπου διαλύματος λιποϊκού οξέος σε συγκέντρωση 12 μg.mL⁻¹, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, με χρόνο έκλουσης του οξέυ στα 7,2 min.

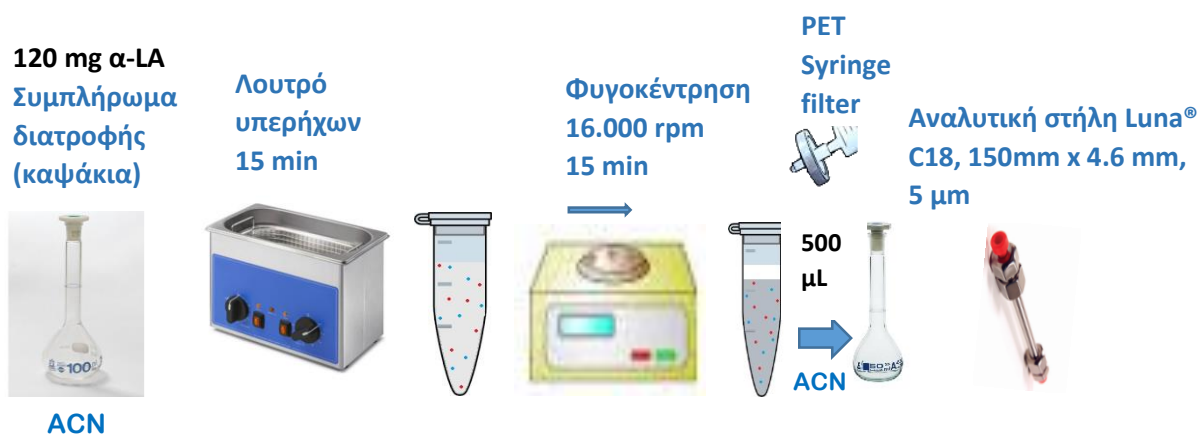


Σχήμα 7.4 : Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση διαλύματος α-λιποϊκού οξέος σε συγκέντρωση 12 μg.mL⁻¹. Χρωματογραφικές συνθήκες: Phenomenex (Luna® C18, 150mm x 4.6 mm i.d, 5 μm, pre-column Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm), κινητή φάση : AC8N/KH₂PO₄ 50mM 40/60 v/v, pH: 4.5, ταχύτητα ροής 1mL.min⁻¹, λ=340 nm

7.3.5 Κατεργασία καψάκιων

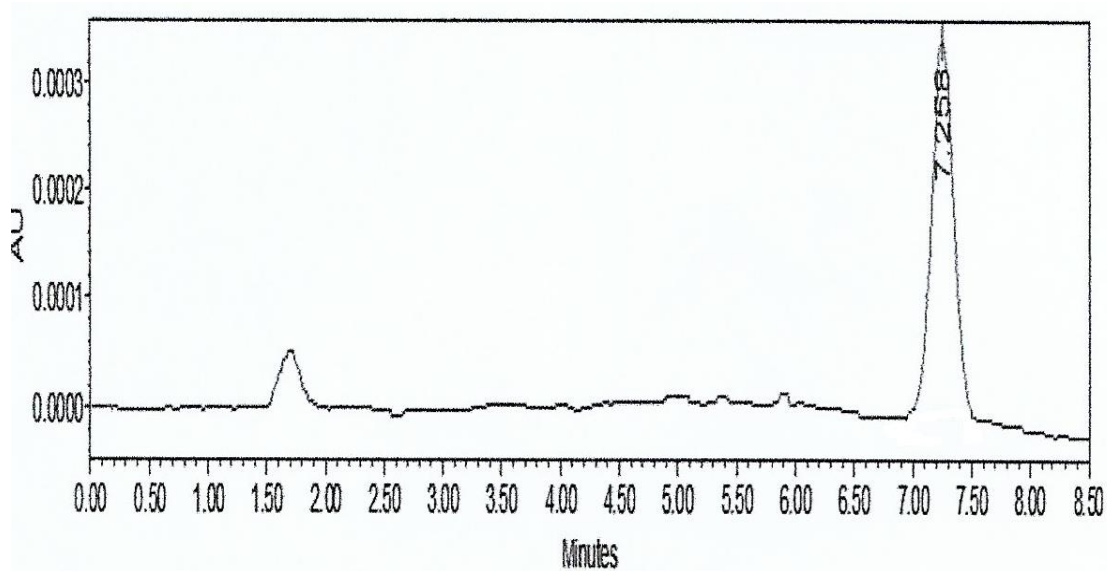
Η μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση καψάκιων α-λιποϊκού οξέος της εταιρίας Solgar. Κάθε καψάκι έχει ονομαστική ποσότητα 120 mg α-LA.

Για την ανάλυση των συμπληρωμάτων διατροφής ζυγίστηκαν ένα προς ένα δέκα καψάκια και υπολογίστηκε το μέσο βάρος του που βρέθηκε ότι είναι ίσο με 380.30 ± 8.21 mg. Στη συνέχεια ακολούθησε κονιοποίηση των καψάκιων. Από τη σκόνη, (κίτρινου χρώματος), ελήφθησε ποσότητα ίση με το μέσο βάρος τους και τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, όπου προστέθηκαν 90 mL ακετονιτρίλιο, και αναδεύτηκαν μηχανικά με vortex για 3 λεπτά. Τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε λουτρό υπερήχων για 15 min. Ακολούθησε αραιώση του διαλύματος μέχρι τη χαραγή με ACN. Μία ποσότητα από το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 16.000 rpm για 15 λεπτά. 500 μL από το υπερκείμενο διάλυμα φιλτράρονται μέσω PET 45/25 polyester syringe filters και μεταφέρονται απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, όπου αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με το ίδιο διαλύτη (σχ.7.5)



Σχήμα 7.5 : Σχηματική παράσταση της κατεργασίας του συμπληρώματος διατροφής σε καψάκι, που περιέχει α-λιποϊκό οξύ 120 mg.

Ύστερα από την παραπάνω επεξεργασία το δείγμα αναλύεται σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 7.6 : Τυπικό χρωματογράφημα του περιεχομένου ενός καψακίου Solgar® που περιέχει α-λιποϊκό οξύ σε συγκέντρωση $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: στήλη Phenomenex (Luna® C18, 150mm x 4.6 mm i.d, 5 μm , pre-column Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm), κινητή φάση : ACN/ KH_2PO_4 50 mM 40/60 v/v, pH: 4.5, ταχύτητα ροής $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda=340 \text{ nm}$

7.4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α -ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ (ΚΑΨΑΚΙΑ)

7.4.1 Γραμμικότητα

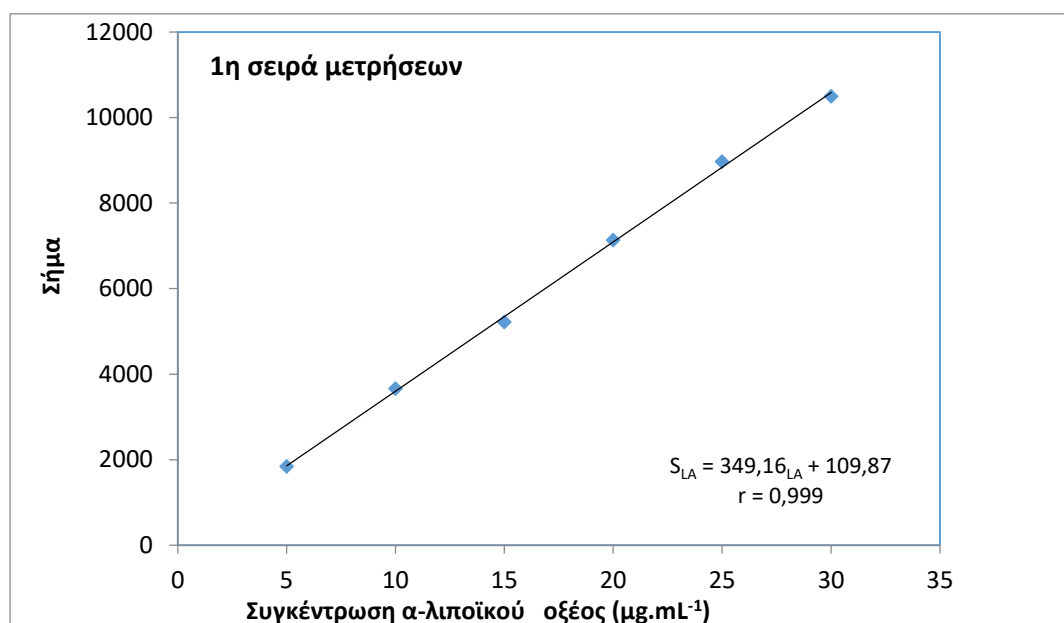
Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρεις καμπύλες βαθμονόμησης σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές μέρες, σε περίοδο ενός μήνα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με τρόπο που έχει περιγραφεί στην παράγραφο 7.3.5 και ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV, δύο φορές το καθένα. Κάθε καμπύλη αποτελείται από έξι σημεία που προκύπτουν από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων α -λιποϊκού οξέος, με εύρος συγκεντρώσεων 5,0 έως 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η επιφάνεια της χρωματογραφική κορυφής του LA. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή της επιφάνειας, η πειραματική συγκέντρωση και το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, %E_r, με βάση τη θεωρητική συγκέντρωση.

Για τη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, χωρίς συντελεστή στατιστικού βάρους. Στους πίνακες (7.5 έως 7.7) που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάθε εργαστηριακής μέρας για την προσδιοριζόμενη ουσία του λιποϊκού οξέος.

Πίνακας 7.5 : Πειραματικά αποτελέσματα της πρώτης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος.

C θεωρητική ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής (v=2)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5	1842	4,96	-0,78
10	3662	10,17	1,73
15	5216	14,62	-2,50
20	7137	20,12	0,63
25	8971	25,37	1,51
30	10493	29,74	-0,87

$$\% \text{ Σχετικό αναλυτικό σφάλμα} = [(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$$

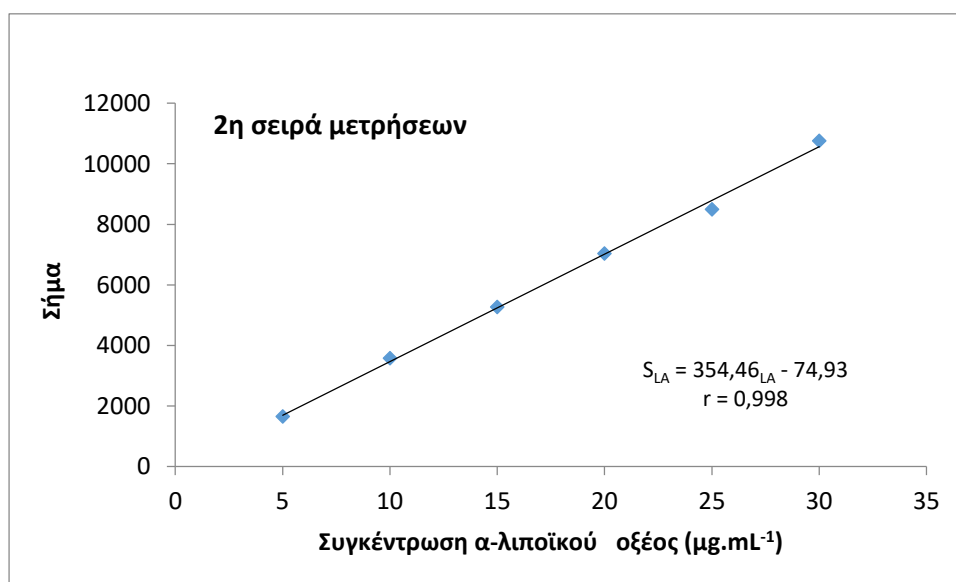


Σχήμα 7.7 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την πρώτη σειρά μετρήσεων.

Πίνακας 7.6 : Πειραματικά αποτελέσματα της δεύτερης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος.

C θεωρητική ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής ($v=2$)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5	1653	4,87	-2,50
10	3571	10,28	2,86
15	5268	15,07	0,49
20	7030	20,04	0,22
25	8494	24,17	-3,30
30	10753	30,54	1,82

$$\% \text{ Σχετικό αναλυτικό σφάλμα} = [(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$$

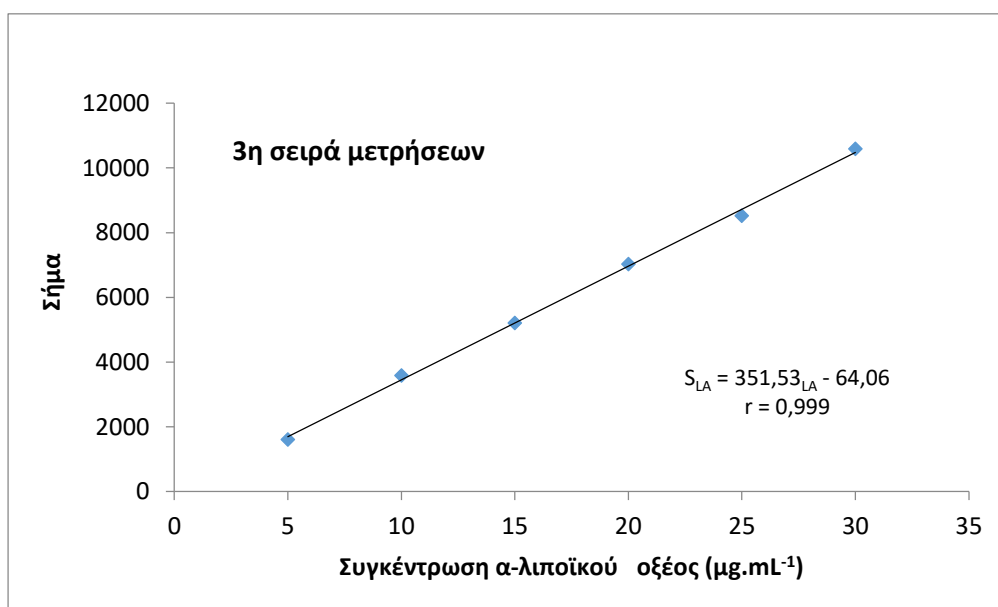


Σχήμα 7.8 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την δεύτερη σειρά μετρήσεων.

Πίνακας 7.7 : Πειραματικά αποτελέσματα της τρίτης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος.

C θεωρητική (μg.mL ⁻¹)	Επιφάνεια Κορυφής (v=2)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος (μg.mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5	1605	4,75	-5,04
10	3585	10,38	3,80
15	5209	15,00	-0,00
20	7021	20,15	0,77
25	8524	24,43	-2,28
30	10583	30,29	0,96

% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = $[(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$



Σχήμα 7.9 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την τρίτη σειρά μετρήσεων.

Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς έγιναν με το υπολογιστικό πρόγραμμα SPSS vers. 19 και παρουσιάζονται στον πίνακα 7.8. Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζονται οι γραμμικές εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς για κάθε μία από τις τρεις σειρές μετρήσεων μαζί με τις αντίστοιχες τιμές των συντελεστών συσχέτισης, του τυπικού σφάλματος και των τυπικών αποκλίσεων για την τομή και την κλίση. Διαπιστώνεται ότι η μέθοδος είναι γραμμική και για τις τρεις σειρές μετρήσεων, που πραγματοποιήθηκαν στη διάρκεια του μήνα, αφού η τιμή του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε μεγαλύτερη από 0,998, ενώ το % σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων δεν ξεπέρασε την τιμή 3,8 %.

Πίνακας 7.8 : Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης του α-λιποϊκού οξέος με την τεχνική HPLC-UV							
Μήτρα	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg.mL ⁻¹)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r ^b	Τυπική Απόκλιση		S _f ^c	a/Sa ^d
				Κλίση	Τομή		
Ακετονιτρίλιο	5,0 – 30,0	S _{α-LA} = 349,16 × C _{α-LA} + 109,87	0,999	5,28	102,90	110,54	1,06
1 ^η σειρά μετρήσεων							
2 ^η σειρά μετρήσεων	5,0 – 30,0	S _{α-LA} = 354,46 × C _{α-LA} - 74,93	0,998	8,83	171,93	184,69	-0,43
3 ^η σειρά μετρήσεων	5,0 – 30,0	S _{α-LA} = 351,53 × C _{α-LA} - 64,06	0,999	6,71	130,84	140,54	-0,49

^a Το σήμα (εμβαδό) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του α-λιποϊκού οξέος

^b Συντελεστής συσχέτισης

^c Τυπικό σφάλμα

^d Θεωρητική τιμή του t για P= 0,05 και f = n-2 = 4 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,77

7.4.2 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίηση

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση : $LOD = 3,3 (S_a / b)$, όπου S_a είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των y , δηλαδή τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς και b είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση : $LOQ = 10 (S_a / b)$

Σε αυτή τη μελέτη οι μέσες τιμές LOD και LOQ υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς να είναι: LOD: $1,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ και LOQ: $3,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

7.4.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Η προτεινόμενη μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ορθότητα και την πιστότητά της, τόσο κατά τη διάρκεια μίας εργαστηριακής μέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Για τον έλεγχο αυτόν παρασκευάστηκαν διαλύματα ελέγχου σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) $5,0$, $15,0$ και $30,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ προτύπων διαλυμάτων α-λιποϊκού οξέος. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι δείγματα σε κάθε εργαστηριακή μέρα. Τελικά σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν από έξι μετρήσεις σε τρεις εργαστηριακές μέρες (18 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver 19. Για τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one way ANOVA). Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το % σχετικό σφάλμα ($\%E_r$), ενώ η πιστότητα εκτιμήθηκε με βάση τις % σχετικές αποκλίσεις ($\%RSD$), τόσο εντός της ημέρας (intra-day), όσο και μεταξύ των ημερών (inter-day).

Τα συνολικά αποτελέσματα του ελέγχου της ορθότητας και της πιστότητας για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος παρουσιάζονται στον πίνακα 7.9.

Πίνακας 7.9 : Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε πρότυπα διαλύματα (n=3 runs, six replicates per run)			
Θεωρητική συγκέντρωση	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος (μg.mL⁻¹)		
	5,0	15,0	30,0
1 ^η σειρά μετρήσεων	4,81 ± 0,06	15,28 ± 0,09	30,00 ± 0,35
2 ^η σειρά μετρήσεων	4,81 ± 0,09	15,25 ± 0,12	29,62 ± 0,12
3 ^η σειρά μετρήσεων	4,88 ± 0,10	15,20 ± 0,13	30,17 ± 0,42
Ολική μέση τιμή	4,83	15,24	29,94
RSD Εντός της ημέρας (%) ^a	0,11	0,19	1,56
RSD Δια των ημερών (%) ^a	0,01	0,02	0,95
Ολική ορθότητα			
% E_r ^b	-3,33	1,62	-0,21
^a Σχετική τυπική απόκλιση εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών, υπολογισμένη με ANOVA			
^b % Σχετικό σφάλμα = [(πειραματική συγκέντρωση – θεωρητική συγκέντρωση)/θεωρητική συγκέντρωση] x100			

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και της πιστότητας της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου δείχνουν ότι η εντός ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{intra-day}) κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,11 και 1,56%. Η μεταξύ των ημερών σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{inter-day}) ήταν μεταξύ 0,01 και 0,95 %. Η ολική ακρίβεια, που εκφράζεται με το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, για το α-λιποϊκό οξύ κυμαίνεται μεταξύ των τιμών -3,33 έως 1,62 %.

7.4.4 Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού

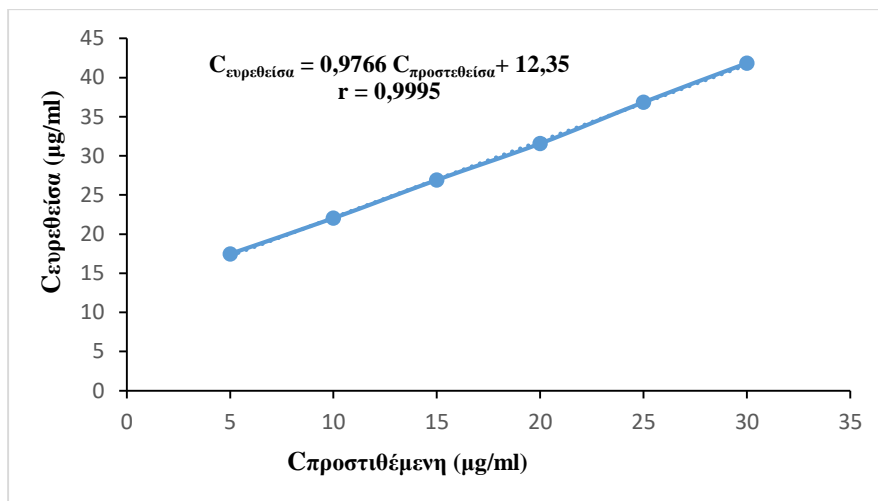
Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανάκτησης του αναλύτη χρησιμοποιώντας τη μέθοδο γνωστής προσθήκης. Παρασκευάζονται έξι (6) διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης α -λιποϊκού οξέος συγκεντρώσεων 5,0, 10,0 15,0, 20,0, 25,0 και 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Σε καθένα από αυτά τα διαλύματα έχει προστεθεί ακριβώς 1mL από το διάλυμα περιεχομένου καψακίου (Solgar 120 mg) συγκέντρωσης 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, σύμφωνα με την επιλεγμένη μέθοδο κατεργασίας των καψάκιων του α -LA (παράγραφος 7.3.5). Σε όλες τις περιπτώσεις ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του α -λιποϊκού οξέος πραγματοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς, μετρώντας το εμβαδό της κορυφής του λιποϊκού οξέος, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Ακολούθως, καταρτίζεται καμπύλη αναφοράς με γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης των αποτελεσμάτων μεταξύ της ευρεθείσας ποσότητας του αναλύτη και την προστεθείσα ποσότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.10.

Πίνακας 7.10 : Αποτελέσματα της τεχνικής των γνωστών προσθηκών				
	Προστεθείσα	Ευρεθείσα	M^β	Ανάκτηση^γ (%)
	Ποσότητα^α ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ποσότητα ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
α-Λιποϊκό οξύ	5	17,46	0,976	97,6
	10	22,03		
	15	26,91		
	20	31,56		
	25	36,84		
	30	41,83		

^α πρότυπη ποσότητα α -λιποϊκού οξέος προστιθέμενη σε σκόνη καψάκιων ισοδύναμη με 12,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ α -LA

^β M είναι η κλίση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς

^γ ανάκτηση (%) = M x 100



Σχήμα 7.10: Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς μεταξύ της ευρεθείσας και της προστιθέμενης ποσότητας του α-LA σε σκόνη καψάκιων Solgar 120 mg/12µg.mL⁻¹

Η % ανάκτηση του α-λιποϊκού οξέος υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς x 100 και βρέθηκε ίση με 97,6 % και είναι παρόμοια με την ανάκτηση των δισκίων (7.10), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα υπόλοιπα συστατικά στο καψάκι δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση του α-λιποϊκού οξέος.

7.4.5 Ανθεκτικότητα της μεθόδου

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας της μεθόδου μελετήθηκε η επιρροή μικρών μελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στο χρόνο ανάσχεσης του α-λιποϊκού οξέος. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν η συγκέντρωση του δισόξινου φωσφορικού καλίου στην κινητή φάση, η ταχύτητα ροής και το μήκος κύματος. Κάθε παράγοντας μελετήθηκε σε τρία επίπεδα (-1, 0, +1). Κάθε φορά μεταβάλλεται μόνο ένας παράγοντας για να υπολογιστεί η επίδρασή του, ενώ οι υπόλοιποι διατηρούνται σταθεροί. Οι μικρές αλλαγές των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκαν σε επαναλαμβανόμενες εγχύσεις (n=2) ενός διαλύματος α-λιποϊκού οξέος σε ACN, που περιείχε 15 µg.mL⁻¹. Σε Στον πίνακα 7.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών ανθεκτικότητας της μεθόδου.

Πίνακας 7.11 : Πειραματικά αποτελέσματα για τη μελέτη ελέγχου της ανθεκτικότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος			
Χρωματογραφικές αλλαγές	α-Λιποϊκό οξύ		
Παράμετροι	t_r^α	k'^β	T^γ
A. Συγκέντρωση δισόζινου φωσφορικού καλίου KH₂PO₄ (49-51 mM)			
<i>Μέση τιμή</i>	7.11	4.23	1.01
<i>(%RSD)</i>	(0.07)	(0.25)	(0.46)
B. Μήκος κύματος ανίχνευσης (339-341 nm)			
<i>Μέση τιμή</i>	6.73	4.01	1.03
<i>(%RSD)</i>	(0.06)	(0.08)	(0.5)
Γ. Ταχύτητα ροής (0,9 - 1,1 mL.min⁻¹)			
<i>Μέση τιμή</i>	7.0	4.04	1.01
<i>(%RSD)</i>	(0.14)	(0.18)	(0.9)
^α χρόνος ανάσχεσης ^β παράγοντας χωρητικότητας ^γ παράγοντας συμμετρίας κορυφής			

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ανθεκτική, αφού κανένας από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στις παραμέτρους που διερευνήθηκαν.

7.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του α-λιποϊκού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής (καψάκια)

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής της εταιρίας Solgar, περιεκτικότητας 120 mg/καψάκι. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε κάθε φορά σε ποσότητα ίση με το μέσο βάρος δέκα καψάκιων του προϊόντος (380.30 mg), που αντιστοιχεί σε 120 mg α-λιποϊκού οξέος, σύμφωνα με τη μέθοδο κατεργασίας, που περιγράφεται στην παράγραφο 7.3.5. Στον πίνακα 7.12 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Πίνακας 7.12 : Ανάλυση α-LA σε καψάκια συμπληρωμάτων διατροφής (Solgar 120 mg)					
α/α	Επιφάνεια Κορυφής (n=2)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg.mL⁻¹)	Ευρεθείσα ποσότητα α-λιποϊκού οξέος/καψάκι (mg)	% επί της αναγραφόμενης τιμής	%E_r
1	4271	12,33	123,31	102,76	2,76
2	4332	12,50	125,05	104,21	4,21
3	4228	12,20	122,09	101,74	1,74
4	4411	12,73	127,30	106,08	6,08
5	4249	12,26	122,69	102,24	2,24
6	4255	12,28	122,86	102,38	2,38
7	4280	12,35	123,57	102,97	2,97
8	4297	12,40	124,05	103,38	3,38
9	4325	12,48	124,85	104,04	4,04
10	4305	12,42	124,28	103,57	3,57
	Μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (n=10)		124,01 ± 1,49	103,34 ± 1,24	3.34

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα δεν είναι εκτός των ορίων, καθώς η μέση ποσότητα του α-λιποϊκού οξέος επί της αναγραφόμενης τιμής είναι 103,34 % ή 124,01 mg ανά καψάκι (n=10), με μέσο % σχετικό σφάλμα 3,34 %.

7.6 Έλεγχος του περιεχομένου των καψάκιων σε α-λιποϊκό οξύ

Η μέθοδος αποδείχθηκε κατάλληλη για τον έλεγχο ομοιομορφίας, όπου απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός δοκιμών σε μεμονωμένα καψάκια. Δύο διαφορετικές εμπορικές παρτίδες διαθέσιμων καψάκιων που περιέχουν αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο. Η ανάλυση των καψάκιων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την προεπιλεγμένη μέθοδο κατεργασίας που περιγράφεται στην παράγραφο 7.8. Σε όλες τις περιπτώσεις ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του α-λιποϊκού οξέος πραγματοποιήθηκε με βάση την καμπύλη αναφοράς, μετρώντας το εμβαδό της κορυφής του κάθε αναλύτη. Στον πίνακα 7.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του μέσου όρου των δέκα διαφορετικών μετρήσεων όπως προκύπτουν από την ανάλυση δύο διαφορετικών παρτίδων (καψάκια, Solgar 120 mg).

Πίνακας 7.13 : Προσδιορισμός του α-λιποϊκού οξέος σε καψάκια συμπληρωμάτων διατροφής με HPLC-UV		
Συμπλήρωμα διατροφής Solgar (120 mg/καψάκι)	Ευρεθείσα ποσότητα του α-λιποϊκού οξέος mg/καψάκι^a	
Παρτίδα	Μέση τιμή ± SD (n=10)	Ανάκτηση (%)
1	123,27 ± 1,72	102,72 ± 1,44
2	123,88 ± 1,95	103,24 ± 1,62
^a Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στο μέσο όρο δέκα διαφορετικών μετρήσεων από καψάκια της ίδιας παρτίδας		

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα δεν είναι εκτός ορίων, καθώς η μέση % ποσότητα του α-λιποϊκού οξέος επί της αναγραφόμενης τιμής είναι από 102,72 και 103,24 %, ενώ η μέση ποσότητα του α-λιποϊκού οξέος ανά καψάκι είναι 123,27 και 123,88 mg, για τις παρτίδες 1 και 2 αντίστοιχα.

7.7 Εφαρμογή της μεθόδου στον προσδιορισμό α-λιποϊκού οξέος σε συμπληρώματα διατροφής (καψάκια)

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση εμπορικά διαθέσιμων συμπληρωμάτων διατροφής (καψάκια), σε διάφορες περιεκτικότητες α-LA. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε κάθε φορά σε ποσότητα καψάκιων ίση με το μέσο βάρος δέκα καψάκιων του κάθε προϊόντος, σύμφωνα με τη μέθοδο κατεργασίας, που περιγράφεται στην παράγραφο 7.3.5. Τα δείγματα αναλύονται χρωματογραφικά σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές τεχνικές. Στον πίνακα 7.14 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για το κάθε εμπορικά διαθέσιμο προϊόν.

Πίνακας 7.14 : Προσδιορισμός του α-λιποϊκού οξέος σε καψάκια εμπορικά διαθέσιμων συμπληρωμάτων διατροφής με HPLC-UV			
Συμπλήρωμα διατροφής	Ποσότητα (mg) ανά καψάκι		Ανάκτηση (%)
	Μέση τιμή ± SD (n=10)		
	Αναγραφόμενη τιμή	Ευρεθείσα τιμή	κ
Εταιρία Solgar	60	61,49 ± 0,93	102,49
Εταιρία Solgar	120	122,83 ± 0,60	102,36
Εταιρία Scitec Nutrition, USA	250	244,27 ± 3,50	97,70
Εταιρία Prozis	500	467,61 ± 5,55	93,52

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα των διάφορων εμπορικών σκευασμάτων δεν είναι εκτός ορίων, καθώς η μέση % ποσότητα του α-λιποϊκού οξέος επί της αναγραφόμενης τιμής είναι 93,52 % έως 102,49 %, εντός του αποδεκτού ορίου του σχετικού σφάλματος (%E_r: ± 10 %). Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη και μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος των διάφορων εμπορικά διαθέσιμων συμπληρωμάτων διατροφής.

7.8 Μελέτες σταθερότητας

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου στον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη (α-λιποϊκού οξέος), για να αποδειχτεί ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας εξακολουθεί να είναι ειδική και σταθερή, παρουσία άγνωστων προϊόντων αποικοδόμησης. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιταχυνόμενης «εξαναγκασμένης» διάσπασης (forced degradation studies) με κατεργασία της δραστικής ουσίας και του τελικού προϊόντος (συμπλήρωμα διατροφής με) σε διαφορετικές συνθήκες διάσπασης «stress» και φύλαξης. Έτσι κατά την μελέτη της αποικοδόμησης μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω συνθηκών :

- Όξινη συνθήκη αποικοδόμησης (HCl 0.1 M, 25°C)
- Βασική συνθήκη αποικοδόμησης (NaOH 0.1 M, 25°C)
- Οξειδωτική συνθήκη αποικοδόμησης (H₂O₂ 3% v/v, 25°C)
- Θερμικής αποικοδόμησης (42° C ± 1° C / 75% v/v σχετική υγρασία RH)
- Θερμικής αποικοδόμησης (50° C ± 1° C / 75% v/v σχετική υγρασία RH)
- Θερμικής αποικοδόμησης (25° C ± 1° C / 40% v/v σχετική υγρασία RH)

Παρασκευάζονται αρχικά πυκνά διαλύματα του αναλύτη σε συγκέντρωση 50 μg.mL⁻¹ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονται 2 mL από το παραπάνω πυκνό διάλυμα και αραιώνονται στα 10 mL με ACN, εξουδετερώνοντας κάθε φορά με την αντίστοιχη ποσότητα του οξέος, της βάσης και του οξειδωτικού παράγοντα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη επιτυγχάνεται με τις καμπύλες αναφοράς που έγιναν με τον προσδιορισμό του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον πίνακα 7.15.

Πίνακας 7.15 : Μελέτες σταθερότητας του α-λιποϊκού οξέος σε διάφορες συνθήκες διάσπασης με την τεχνική HPLC-UV			
Συνθήκες διάσπασης	Χρόνος διάσπασης (ώρες)	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) / % ανάκτηση	Προϊόντα / χρόνοι κατακράτησης
Όξινη υδρόλυση (HCl 0.1 M, 25°C)	0	10,13 (101,3)	---
	1	9,26 (92,6)	5,42, 5,82
	2	9,29 (92,9)	5,42, 5,82
	4	9,42 (94,2)	5,42, 5,82
	8	9,52 (95,2)	2,98, 5,42, 5,81
Βασική υδρόλυση (NaOH 0.1 M, 25°C)	0	10,26 (102,6)	---
	1	10,19 (101,9)	---
	2	10,08 (100,8)	---
	4	9,71 (97,1)	---
	8	9,29 (92,9)	---
Οξειδωτική διάσπαση (H₂O₂ 3% v/v, 25°C)	0	10,00 (100,0)	---
	0.5	7,65 (76,5)	---
	1	6,06 (60,6)	---
	4	4,25 (42,5)	---
	8	0,18 (1,8)	Κανένα σήμα δεν ανιχνεύτηκε

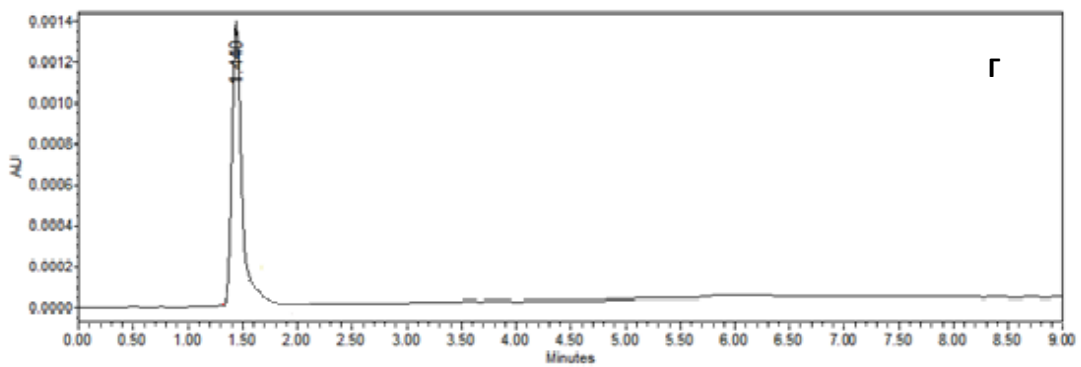
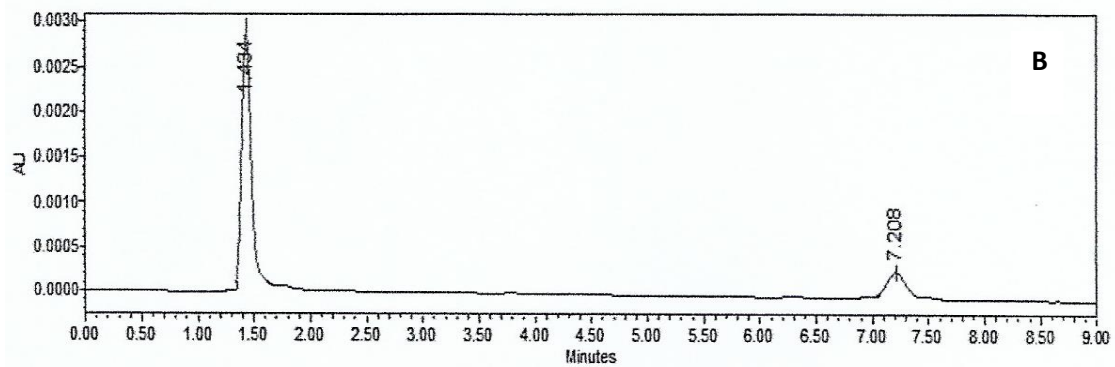
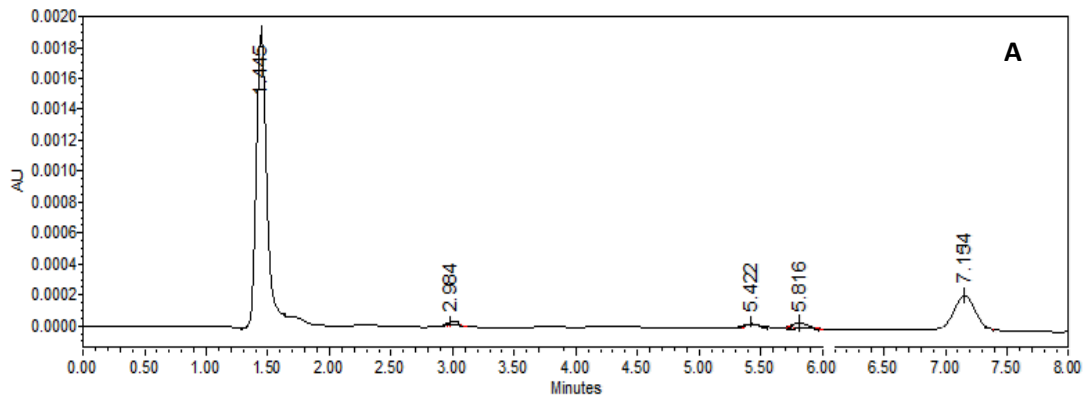
Όπως φαίνονται από τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας σχετικά με τις όξινες συνθήκες διάσπασης του α-λιποϊκού οξέος, μετά από 1 ώρα η ανάκτησή του ανέρχεται σε 92,6 %, ενώ σύμφωνα με τις συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης ανιχνεύονται δύο προϊόντα διάσπασης στα 5,42 και 5,82 λεπτά. Μετά από 8 ώρες όμως σε όξινες συνθήκες η ανάκτηση φτάνει στο 95,2 %, ενώ ανιχνεύεται ένα επιπλέον προϊόν διάσπασης στα 2,98 λεπτά.

Στις βασικές συνθήκες διάσπασης το α -LA παραμένει σταθερό, αφού μετά από 8 ώρες η ανάκτησή του ανέρχεται στο 92,9 %, χωρίς να ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες οξειδωτικής διάσπασης το α -LA υφίσταται πολύ γρήγορη διάσπαση, αφού μετά από 30 λεπτά η ανάκτησή του είναι 76,5%. Μετά από 4 ώρες η ανάκτησή του φτάνει στο 42,5%, χωρίς όμως να ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης. Μετά από 8 ώρες, όμως δεν ανιχνεύεται κανένα σήμα.

Από όλες τις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα διάσπασης δεν παρεμποδίζουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Στο σχήμα 7.11 απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από την ανάλυση δειγμάτων της επιταχυνόμενης διάσπασης του α -λιποϊκού οξέος σε όξινο περιβάλλον με HCl 0.1 M στους 25° C για 8 ώρες, σε αλκαλικό περιβάλλον με NaOH 0.1 M στους 25° C για 8 ώρες και σε διάλυμα H₂O₂ 3% v/v στους 25° C για 8 ώρες.



Σχήμα 7.11 : Τυπικά χρωματογραφήματα από τις μελέτες επιταχυνόμενης διάσπασης του α-λιποϊκού οξέος (A) μετά από παραμονή για 8 ώρες σε υδ.δ/μα HCL 0.1M στους 25°C (B) μετά από παραμονή για 8 ώρες σε υδ.δ/μα NaOH 0,1 M στους 25°C (Γ) μετά από παραμονή για 8 ώρες σε υδ.δ/μα H₂O₂ 3% v/v. Σε όλες τις περιπτώσεις η θεωρητική συγκέντρωση του α-λιποϊκού οξέος σε χρόνο το από την έναρξη της διάσπασης ήταν 10 μg.mL⁻¹.

Μελετήθηκε η σταθερότητα των καψάκιων του συμπληρώματος διατροφής Solgar 120 mg/καψάκι (τελικό προϊόν) με συνθήκες επιταχυνόμενης θερμικής αποικοδόμησης σε θερμοκρασία $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας (RH) 75% v/v, σε θερμοκρασία $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας (RH) 75% v/v, για χρονικό διάστημα 3 μηνών. Επιπλέον, μελετήθηκε η σταθερότητα σε συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας (RH) 40% v/v. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον πίνακα 7.16.

Πίνακας 7.16 : Μελέτες σταθερότητας των καψάκιων Solgar 120 mg α-λιποϊκού οξέος, με την τεχνική HPLC-UV			
Συνθήκες διάσπασης	Χρόνος διάσπασης (μήνες)	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) / % ανάκτηση	Προϊόντα/ χρόνοι κατακράτησης
$42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 75% v/v	1	12,63 (105,27)	----
	2	12,37 (103,14)	----
	3	12,29 (102,43)	----
$50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 75% v/v	1	11,40 (95,06)	---
	2	8,07 (67,25)	---
	3	5,27 (43,99)	---
$25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 40% v/v	1	12,53 (104,47)	---
	2	12,46 (103,87)	---
	4	12,41 (103,47)	---
	8	12,29 (102,43)	---
	12	12,21 (101,79)	---

Όπως φαίνονται από τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας σχετικά με τις επιταχυνόμενες συνθήκες θερμικής διάσπασης του α-λιποϊκού οξέος, σε θερμοκρασία $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v μετά από 3 μήνες, η ανάκτησή του ανέρχεται σε 102,4%, ενώ σύμφωνα με τις συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης δεν ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες όμως θερμικής αποικοδόμησης σε θερμοκρασία $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v μετά από 2 μήνες η ανάκτησή του είναι 67,25 % και μετά από 3 μήνες φτάνει σε 43,99%, χωρίς όμως να ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης (long term stability) σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 40% v/v μετά από 12 μήνες, η ανάκτησή του είναι 101,79% και δεν ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Από όλες τις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε ότι κατά τις μελέτες επιταχυνόμενης θερμικής διάσπασης και μακροχρόνιας αποθήκευσης δεν παρεμποδίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη μέσα στο προϊόν στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, παρόλο που η ανάκτηση του στους $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 75 % v/v μετά από 3 μήνες, ήταν αρκετά μειωμένη αν και δεν παρουσιάστηκε κανένα προϊόν διάσπασης. Στις υπόλοιπες συνθήκες στους $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 75 % v/v και στους $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 40% v/v η ανάκτηση ήταν πολύ ικανοποιητική σε όλη τη χρονική διάρκεια των δοκιμασιών.

Εξετάζοντας τα παραπάνω στοιχεία της επιταχυνόμενης θερμικής διάσπασης και της χρόνιας αποθήκευσης παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται οποιαδήποτε προϊόντα διάσπασης, που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη, υπό τις επιλεγμένες βέλτιστες χρωματογραφικές τεχνικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ

8.1 Εισαγωγή.

Το α-λιποϊκό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί λόγω των εξαιρετικών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του σε διάφορα καλλυντικά προϊόντα (κρέμες, γαλακτώματα κ.α). Η δράση του αφορά την μείωση του οξειδωτικού stress του δέρματος, την δράση του κατά της φωτογήρανσης (εξωγενής γήρανση), που μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλιστικές καταστάσεις (καρκίνο του δέρματος) και στον κύκλο της ενδογενούς γήρανσης μέσω της προστασίας του κολλαγόνου και της βελτίωσης της μικροτοπογραφίας του δέρματος [149-151].

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο εδάφιο 7.1 σύμφωνα με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες επικυρωμένες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση του (R/S)-lipoic acid, σε καλλυντικές κρέμες, που να μπορούν να εφαρμοστούν με αξιοπιστία σε ανάλυση ρουτίνας στον ποιοτικό έλεγχο, αν και είναι υποχρεωτικός ο προσδιορισμός, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, για την ποσοτικοποίηση των δραστικών συστατικών στα τελικά καλλυντικά προϊόντα.

Επιπλέον, η αναπτυχθείσα μέθοδος προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος στα καλλυντικά προϊόντα θα μπορεί να εφαρμοστεί και στα συμπληρώματα διατροφής με α-λιποϊκό οξύ, πράγμα που μπορεί να βοηθήσει στην ανάλυση ρουτίνας των προϊόντων στον ποιοτικό έλεγχο στη φαρμακευτική βιομηχανία. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες που είχαν εφαρμοστεί στην ανάπτυξη και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος στο συμπλήρωμα διατροφής, αλλά με διαφορετική κατεργασία στην κρέμα, με σκοπό την απαλλαγή της από τα έκδοχα που εμποδίζουν σημαντικά στην επιτυχή ανάκτηση του δραστικού συστατικού, όπως συμβαίνει στα καλλυντικά προϊόντα, λόγω του μεγάλου αριθμού που περιέχονται και των πολλών διαφορετικών χημικών ουσιών, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες, πολυμερή, συντηρητικά, αρώματα κ.α.

8.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α -ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ

8.2.1 Αρχή μεθόδου

Το α -λιποϊκό οξύ (α -LA) προσδιορίζεται ποσοτικά στη σύνθεση μιας αντιοξειδωτικής καλλυντικής κρέμας, που αναπτύχθηκε (formulation) ειδικά για αυτό το σκοπό, σε συγκέντρωση 1,5 % w/w σε α -λιποϊκό οξύ. Το α -λιποϊκό οξύ, όπως αναφέρθηκε και στην ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του στο συμπλήρωμα διατροφής (κεφ.7.1) είναι ένα ασθενές οξύ με pKa: 5.4 (υπολογισμός με ADME boxes software) και logP: 2.1 (υπολογισμός ChemAxon). Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία της καλλυντικής κρέμας, με σκοπό την απαλλαγή του προς ανάλυση δείγματος από τα έκδοχα, που δρουν παρεμποδιστικά στην ανάκτηση του αναλύτη, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει ένα σύστημα αντίστροφης φάσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) με ανιχνευτή (UV-Vis) στα 340 nm.

Το μήκος κύματος αυτό επιλέχθηκε όπως και στην ανάλυση του συμπληρώματος διατροφής, επειδή τα έκδοχα της κρέμας δεν απορροφούν εκεί, σε αντίθεση με τη χαμηλότερη περιοχή μήκους κύματος 210-230 nm, όπου το α -LA έχει υψηλή σχετικά απορρόφηση, αλλά απορροφούν τα περισσότερα έκδοχα και επομένως θα παρεμποδιζόταν η προσδιορισμός του αναλύτη.

Χρησιμοποιήθηκε η ίδια στήλη Phenomenex Luna C18 150mm x 4.6mm, 5 μ m και οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες (κινητή φάση: μίγμα ακετονιτριλίου/υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 50 mM, ρυθμιστικό διάλυμα σε pH : 4,5 με ο-φωσφορικό οξύ 85% w/w, σε αναλογία 60:40 v/v), που είχαν τελικά επιλεχτεί και για τον προσδιορισμό του α -λιποϊκού οξέος στο συμπλήρωμα διατροφής. Η προεργασία της κρέμας μόνο διέφερε και η επικύρωση της μεθόδου έγινε σε εμβολιασμένα δείγματα της βάσης της αντιοξειδωτικής κρέμας (placebo cream).

8.2.2 Εξοπλισμός-οργανολογία.

- **Σύστημα HPLC-UV** : Εταιρία Waters® Breeze™ 2 HPLC System. Αποτελείται από διπλή αντλία, Waters® 1525 Binary HPLC Pump, αυτόματο δειγματολειτουργη Waters® 2707 HPLC autosampler, με βρόχο εισαγωγής 20 µL, και ανιχνευτή υπεριώδους - ορατού, Waters® 2489 UV/Vis detector. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν στήλη αντίστροφης φάσης: Phenomenex Luna C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm) σε συνδυασμό με μία προστήλη της ίδιας εταιρίας pre-column Phenomenex (C18, 4.0 mm x 3.0 mm). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογιστικό πρόγραμμα Breeze της ίδιας εταιρίας Waters.
- Η ρύθμιση του pH έγινε με τη χρησιμοποίηση ψηφιακού πεχαμέτρου της εταιρίας Isolab.
- Η κινητή φάση φιλτραρίστηκε μέσω διήθησης υπό κενό με φίλτρα 0.45 µm PTFE membrane filters (εταιρία Membrane Solution).
- Η διαλυτοποίηση των αναλυτών και η κατεργασία των δειγμάτων έγινε με τη χρήση λουτρού υπερήχων, εταιρία Ultra sonic cleaner, μοντέλο GT Sonic, ισχύς 100 W, συχνότητα 40 KHz.
- Η φυγοκέντρωση των δειγμάτων έγινε με τη φυγόκεντρο της εταιρίας Hettich, μοντέλο Mikro 22R (Max 18.000 rpm, Θ: -20° C έως +40° C)
- Η ανάδευση των δειγμάτων έγινε σε συσκευή Vortex.
- Η τελική φίλτρανση των δειγμάτων έγινε με τη χρήση PET 45/25 polyester syringe filters, εταιρία Macherey-Nagel GmbH.
- Για την παρασκευή διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε η αυτόματη πιπέτα των 10 -100 µL και των 200-1000 µL, εταιρία Hamilton.
- Για τη παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αυτόματη πιπέτα των 200 και 1000 µL, εταιρία Hamilton.
- Η ζύγιση των πρώτων υλών και των δραστικών ουσιών για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε αναλυτικό ζυγό, εταιρία Kern.

- Η δημιουργία των γαλακτωμάτων κατά την παρασκευή των κρεμών (γαλακτωματοποίηση) έγινε με τον φορητό ομογενοποιητή τύπου Silverson L4RT.
- Η γήρανση έγινε σε κλίβανο επώασης 0-80o C, εταιρία Heraeus.
- Η μέτρηση του ιξώδους για την παρασκευή της κρέμας έγινε με το ιξωδόμετρο της εταιρίας Brookfield (μοντέλο DVI+, spindle 3, rpm 12, 20° C).
- Η φυγοκέντρηση για την αξιολόγηση της σταθερότητας των γαλακτωμάτων έγινε με τη φυγόκεντρο Hermle Z 320 (4.000 rpm/min, 1h).
- Η ακτινοβολήση UV για τη μελέτη σταθερότητας έγινε με λάμπα UV cabinet (VL-6C, 12W – 254 nm, εταιρία Vilber Lourmat).

8.2.3 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής :

- Ακετονιτρίλιο, Μεθανόλη, Αιθυλική αλκοόλη, καθαρότητας HPLC, της εταιρίας Fisher Scientific UK
- Νερό καθαρότητας HPLC, εταιρία Fisher Scientific UK
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, υδροχλωρικό οξύ (37% w/w), υδροξείδιο του νατρίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου (3.0 % v/v), οξικό οξύ, διγλωρομεθάνιο και ortho- φωσφορικό οξύ (85% w/w) αναλυτικού βαθμού, εταιρία Fisher Scientific UK.
- α-λιποϊκό οξύ α-LA φαρμακευτικού βαθμού καθαρότητας (USP 99.0%), εταιρία Sabinsa Europe GmbH.
- Η σύνθεση της βάσης της καλλυντική κρέμα (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) είναι: Water, Caprylic capric/Triglyceride, Alcohol, Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate, Xanthan Gum, Lecithin, Sclerotome Gum, Pullulan, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Fragrance, Citric acid.

Καθαρισμός υάλινων σκευών: Ο καθαρισμός όλων των υάλινων σκευών, λόγω της λιποδιαλυτής φύσης του α-λιποϊκού οξέος, έγινε με την χρήση καθαριστικού υγρού σαπουνιού (28 % w/w Sodium Laureth sulfate) και νερό. Στο τέλος, ξεπλένονταν όλα τα σκεύη με νερό καθαρότητας HPLC. Η διαδικασία αυτή του καθαρισμού αποδείχτηκε ικανή και δεν παρατηρήθηκε καμία πρόσμιξη ή παρεμπόδιση.

8.2.4 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας

Διάλυμα παρακαταθήκης A : Ζυγίζονται με ακρίβεια 500 mg α-Lipoic acid και μεταφέρονται μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml. Ακολουθεί διάλυση με ACN, σε Vortex και λουτρό υπερήχων και αραιώση μέχρι τη χαραγή με τον ίδιο διαλύτη. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα συγκέντρωσης 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε α-λιποϊκό οξύ.

Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης φυλάσσεται στο σκοτάδι και στο ψυγείο (4° C), όπου διατηρείται σταθερά για αρκετές εβδομάδες.

Διαλύματα εργασίας : Τα εμβολιασμένα δείγματα βάσης κρέμας για την κατασκευή των καμπύλων αναφοράς παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλους όγκους από το διάλυμα παρακαταθήκης A και ανάλογες αραιώσεις. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα εργασίας σε συγκεντρώσεις 5,01, 10,03 15,06, 20,07, 25,09 και 30,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε α-λιποϊκό οξύ.

Για την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις : 5,01, 15,06 και 30,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ σε α-λιποϊκό οξύ. Τα διαλύματα ελέγχου παρασκευάστηκαν από διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης του αναλύτη.

Τα διαλύματα εργασίας και ελέγχου παρασκευάζονται φρέσκα κάθε εργαστηριακή μέρα.

Ρυθμιστικό διάλυμα Δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4 , 50mM) : Ζυγίζονται 6,8 g KH_2PO_4 (Mr 136) διαλύονται με ανάδευση σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL με νερό, ώστε να ληφθεί ένα διάλυμα KH_2PO_4 50,0 mM.mL⁻¹.

8.2.5 Ανάπτυξη της αντιοξειδωτικής καλλυντικής κρέμας με α-λιποϊκό οξύ (formulation)

Η αντιοξειδωτική καλλυντική κρέμα, που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, περιέχει α-λιποϊκό οξύ 1,5% w/w. Το α-λιποϊκό οξύ είναι λιπόφιλο ($\log P$ 2,1), πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (0,02% w/w) και πολύ διαλυτό στο ακετονιτρίλιο και στην αιθυλική αλκοόλη (49% w/w). Για αυτό τον λόγο και επιλέχθηκε και διαλύθηκε σε 3% αιθυλική αλκοόλη προκειμένου να ενσωματωθεί στην κρέμα με τον καλύτερο δυνατό τρόπο ποιοτικά και ποσοτικά. Βέβαια, η προσθήκη αλκοόλης με διαλυμένο το α-λιποϊκό οξύ μέσα στην κρέμα, προϋπόθετε την μεγαλύτερη σταθεροποίησή της, λόγω της αλκοόλης που πολλές φορές δρα αποσταθεροποιητικά (μείωση του ιξώδους, της ομοιογένειας γαλακτώματος κ.α).

Επιλέχθηκε έτσι, η προσθήκη ενός ειδικού πηκτώματος (gelling agent) από πολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια μέσα στην υδατική φάση της κρέμας (Xanthan gum, Lecithin, Sclerotome gum, Pullulan), που θα δρούσε ως σταθεροποιητής (stabilizer), συν-γαλακτωματοποιητής (co-emulsifier), αυξητικό του ιξώδους (thickener) και για βελτίωση της αίσθησης του δέρματος (skin feel enhancer), που έχει ταυτόχρονα υψηλή αντοχή στην αιθυλική αλκοόλη, στους ηλεκτρολύτες, στα οξέα και στα χαμηλά pH, όπως είναι το 4,5, που είναι το pH της κρέμας που αναπτύχθηκε. Το α-λιποϊκό οξύ με pK_a 5.4 (υπολογισμός με ADME boxes software) βρίσκεται στην μη ιονική του μορφή (περίπου 70%) και είναι ίδιο με το φαινόμενο pH της κινητής φάσης που χρησιμοποιήθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα.

Στον παρακάτω πίνακα 8.1 παρουσιάζονται τα συστατικά της αναπτυχθείσας κρέμας, σύμφωνα με την διεθνή ονοματολογία των συστατικών των καλλυντικών (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients), η ποσοτική σύνθεση, καθώς και οι ιδιότητές τους.

Πίνακας 8.1 : Ποιοτική και ποσοτική σύσταση της αντιοξειδωτικής καλλυντικής κρέμας α-LA

A/A	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ (INCI ονοματολογία)	% w/w	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
1	Aqua (Water)	86,5	Φυσικός διαλύτης
2	Caprylic capric/Triglyceride	3,0	Μαλακτικό, θρεπτικό
3	Alcohol	3,0	Διαλύτης
4	Glyceryl Stearate	2,0	Γαλακτωματοποιητής
5	α-Lipoic acid	1,5	Αντιοξειδωτικό, Αντιγηραντικό
6	PEG-100 Stearate	1,0	Γαλακτωματοποιητής
7	Xanthan Gum	0.4	Πηκτικό, σταθεροποιητής
8	Lecithin	0.4	Συν-γαλακτωματοποιητής, Σταθεροποιητής
9	Sclerotome Gum	0.4	Πηκτωματοποιητής, παράγοντας «conditioning», Σταθεροποιητής
10	Pullulan	0.35	Πηκτωματοποιητής, παράγοντας «conditioning», Σταθεροποιητής
11	Phenoxyethanol	0.9	Συντηρητικό
12	Ethylhexylglycerin	0.1	Ενισχυτικό συντήρησης
13	Parfum	0.4	Άρωμα
14	Citric acid	0.05	Ρυθμιστικό pH

8.2.5.1 Μέθοδος Παραγωγής

Για την ανάπτυξη και παρασκευή των τελικών προϊόντων των κρεμών με α -LA και χωρίς (placebo) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρώτες ύλες και υλικά :

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΡΕΜΑΣ ΜΕ α -ΛΙΠΟΪΚΟ ΟΞΥ 1,5 % w/w ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

A/A	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ (ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ)	% w/w	ΔΙΕΘΝΗΣ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ (INCI NAMES)
1	DEIONIZED WATER	84.92	Aqua
2	SILIGEL (Εταιρία Lucas Meyer Cosmetics)	3.0	Xanthan Gum (and) Lecithin (and) Sclerotium Gum (and) Pullulan
3	CITHROL GMS /AS (Εταιρία Croda)	2.0	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate
4	TEGIN M (Εταιρία Evonic)	1.0	Glyceryl Stearate
5	CRODAMOL GTCC (Εταιρία Croda)	3.0	Caprylic capric/triglyceride
6	EUXYL PE 9010 (Εταιρία Schülke & Mayr GmbH)	1.0	Phenoxyethanol (and) Ethylhexylglycerin
7	ALCOHOL (95 ⁰ v/v) (Εταιρία Alcovin S.E)	3.0	Alcohol
8	α -LIPOIC ACID (USP 99.0 %) (Εταιρία Sabinsa Europe GmbH)	1.5	α -Lipoic acid
9	PERFUME (Εταιρία Vioryl S.A)	0.4	Parfum
10	CITRIC ACID MONOHYDRATE (Εταιρία DSM)	0.18	Citric acid

ΚΡΕΜΑ α-ΛΙΠΟΪΚΟ ΟΞΥ

Συστατικά

(International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

Aqua, Caprylic capric/triglyceride, α-Lipoic acid, Alcohol, Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate, Xanthan Gum, Lecithin, Sclerotome Gum, Pullulan, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Parfum, Citric acid

ΚΡΕΜΑ PLACEBO

Συστατικά

(International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

Aqua, Caprylic capric/triglyceride, Alcohol, Glyceryl Stearate, PEG-100 Stearate, Xanthan Gum, Lecithin, Sclerotome Gum, Pullulan, Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin, Parfum, Citric acid

ΦΑΣΕΙΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΡΕΜΑΣ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

ΦΑΣΗ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	% w/w
A1	DEIONIZED WATER	84,02
A2	SILIGEL	3,0
B3	DEIONIZED WATER	0,9
B4	CITRIC ACID	0,18

Γ5	ALCOHOL	3,0
Γ6	α-LIPOIC ACID	1,5

Δ7	CITHROL GMS/ AS	2,0
Δ8	TEGIN M	1,0
Δ9	CRODAMOL GTCC	3,0

E10	EUXYL PE 9010	1,0
-----	---------------	-----

Z11	PERFUME	0,4
-----	---------	-----

ΠΡΟΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΦΑΣΕΩΝ

ΦΑΣΗ Α (Υδατική Φάση)

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζεται το Α1 (απιονισμένο νερό) και διασπείρεται εν ψυχρώ το Α2 με φορητό ομογενοποιητή (Silverson) με στροφές 3500 rpm για 10 min. Παρασκευάζεται ένα λευκό παχύρευστο gel.

Ακολουθεί έλεγχος πλήρους διασποράς

Ακολουθεί θέρμανση στους 70-75⁰ C με ανάδευση και 1500-2000 rpm και διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία η υδατική φάση Α

ΦΑΣΗ Β

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζεται το Β3 και διαλύεται εν ψυχρώ το Β4 με ανάδευση

Ακολουθεί έλεγχος πλήρους διάλυσης

ΦΑΣΗ Γ

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζεται το Γ5 και διαλύεται εν ψυχρώ το Γ6 (α-lipoic acid) με ανάδευση για 10-15 min.

Ακολουθεί έλεγχος πλήρους διάλυσης

ΦΑΣΗ Δ (Λιπαρή Φάση)

Σε ποτήρι ζέσεως ζυγίζονται ένα-ένα τα Δ7, Δ8, Δ9 και θερμαίνονται με ανάδευση μέχρι τους 70-75⁰ C και διατηρείται σε αυτή τη θερμοκρασία.

Ακολουθεί έλεγχος πλήρους διάλυσης της ελαιώδους φάσης.

ΑΝΑΜΙΞΗ ΦΑΣΕΩΝ

Όταν η θερμοκρασία της υδατικής και της λιπαρής φάσης είναι 70-75⁰ C μεταφέρεται προσεκτικά η Λιπαρή φάση Δ (Oil phase) μέσα στην Υδατική φάση Α (Water phase) με ανάδευση και ομογενοποιητή 1000 rpm.

ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ

Μετά την ανάμιξη των φάσεων ο/w ακολουθεί γαλακτωματοποίηση με το σύστημα γαλακτωματοποιητών (Glyceryl stearate, PEG-100 Stearate) με ανάδευση και υψηλές στροφές ομογενοποιητή 3000 rpm, για 5-10 min.

ΨΥΞΗ - ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΦΑΣΕΩΝ

Μετά την πάροδο του χρόνου γαλακτωματοποίησης το προϊόν ψύχεται μέχρι τους 26-28⁰ C με συνεχή ανάδευση και ομογενοποιητή 1500-2000 rpm

Στους 55 °C προστίθεται το E10 και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης με ανάδευση και 3000 rpm για 5 min.

Ακολουθεί έλεγχος διάλυσης.

Στους 38 °C προστίθεται Z11 και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης με ανάδευση και 3000 rpm για 5 min.

Ακολουθεί έλεγχος διάλυσης.

Στους 35 °C προστίθεται η φάση Γ και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης με ανάδευση και 3000 rpm για 10 min.

Ακολουθεί έλεγχος διάλυσης.

Στους 30 °C προστίθεται η φάση Β (ρύθμιση pH) και αναδεύεται μέχρι πλήρους διάλυσης με ανάδευση και 3000 rpm για 10 min.

Ακολουθεί έλεγχος διάλυσης

Συνεχίζεται η ψύξη μέχρι τους 26-28⁰ C με συνεχή ανάδευση.

Φυσικοχημικές και Μικροβιολογικές προδιαγραφές:

Λευκή κρέμα με χαρακτηριστική οσμή.

pH (ως έχει) : 4,4 – 4,6

Ιξώδες : 20.000 – 30.000 cPs

(Brookfield DV-I, Θ: 20 C, spindle: 4, rpm :12, beaker 200 ml)

Φυγοκέντρωση (4.000 rpm, 1h): Ομοιογενές.

Συνολικός Αριθμός Αερόβιων μικροβίων, Ζύμες- Μύκητες <100 cfu/g,

Παθογόνοι μικροοργανισμοί: Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa

Candida albicans: Απουσία /g

Τα τελικά προϊόντα, τόσο της κρέμας με LA 1.5 % w/w, όσο και της κρέμας Placebo, δηλαδή η κρέμα βάσης (ίδια έκδοχα) χωρίς το α-λιποϊκό οξύ, παρασκευάστηκαν με την παραπάνω μέθοδο παραγωγής συσκευάστηκαν σε σωληνάριο, που ήταν κατασκευασμένο από αλουμινο-πλαστικό υλικό (Laminated-plastic tube), προκειμένου να διασφαλιστεί η καλύτερη αποθήκευση και αποφυγή πιθανής οξείδωσης και διαπίδυσης από υγρασία και αέρα. Επιπλέον, τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους (42⁰C, 50⁰C) προκειμένου να γίνουν οι μελέτες σταθερότητας, καθώς και ακτινοβολήθηκαν με λάμπα UV στα 254 nm.



Εικόνα 8.1. Κρέμα με α-λιποϊκό οξύ (1,5 % w/w)

8.2.6 Κατεργασία της καλλυντικής κρέμας

Η κατεργασία της αντιοξειδωτικής καλλυντικής κρέμας είχε σκοπό την απαλλαγή του δείγματος από τα έκδοχα της κρέμας, προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια το α-λιποϊκό οξύ ποσοτικά, με την καλύτερη δυνατή ανάκτηση. Ως γνωστόν, τα έκδοχα της κρέμας αποτελούν ένα αρκετά περίπλοκο ζήτημα, ως προς την απομόνωση του δραστικού συστατικού. Η κρέμα αποτελείται από μεγάλο αριθμό ουσιών διάφορων χημικών ενώσεων όπως: υδρόφιλες ουσίες (γλυκερίνη, πολυσακχαρίτες), λιπόφιλες ουσίες (τριγλυκερίδια, μη ιονικοί (αιθοξυλιωμένοι)

γαλακτωματοποιητές, εστέρες λιπαρών οξέων, φωσφολιπίδια), αλκοόλη, συντηρητικά, άρωμα κá. Έτσι, η ανάπτυξη μίας ικανής μεθόδου κατεργασίας της κρέμας αποτελεί κρίσιμο στάδιο για τον προσδιορισμό του δραστικού συστατικού και την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου.

Στα προκαταρκτικά πειράματα επιχειρήθηκε, η απευθείας διάλυση της κρέμας σε μεθυλική αλκοόλη με ζύγιση 670 mg της κρέμας που περιείχε 1,5 % w/w α-λιποϊκού οξέος μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml και αραιώση μέχρι τη χαραγή. Ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 2-3 λεπτά και διάλυση σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά στους 25ο C. Λαμβάνονται 0,5 mL από το διάλυμα μέσω φίλτρανσης με filter PET syringe και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL μέχρι τη χαραγή με MeOH. Ακολουθώς, ενίεται στο χρωματογραφικό σύστημα, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Το σήμα που λαμβάνεται από το εκχυλισμένο α-λιποϊκό οξύ αντιστοιχεί σε ανάκτηση 63%. Ακολουθούν οι παρακάτω δοκιμές κατεργασίας με MeOH συνδυαστικά με άλλους διαλύτες, της ίδιας ποσότητας κρέμας, με τις ίδιες αραιώσεις και τις ίδιες συνθήκες κατεργασίας, για τη βελτίωση του λαμβανόμενου σήματος και την καλύτερη εκχύλιση του αναλύτη :

- MeOH/ H₂O 80:20 v/v
- MeOH/ H₂O 60:40 v/v, 1 mL HCl 0.1 N
- MeOH/ CH₂Cl₂ 80:20 v/v
- MeOH/ CH₂Cl₂ 50:50 v/v
- MeOH/ CH₃COOH (aq.sol 0,4 % w/w) 20:80 v/v
- MeOH/ HCl (0,01 M) 80:20 v/v

Στη συνέχεια δοκιμάστηκαν άλλοι συνδυασμοί διάλυσης της κρέμας και της εκχύλισης του δραστικού όπως :

- EtOH (abs) : 100 %
- EtOH (abs) / H₂O 50:50 v/v

- CH_2Cl_2 : 100 %
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{H}_2\text{O}$ 50:50 v/v
- ACN : 100 %
- ACN/ H_2O 40:60 v/v

Καμία από τις παραπάνω δοκιμές δεν έδωσαν βελτίωση του λαμβανόμενου σήματος του α -λιποϊκού οξέος στην κρέμα. Σε αυτό το σημείο κρίθηκε αναγκαίο, αφού βελτιώθηκε το χρωματογραφικό σήμα να προστεθεί ένα παραπάνω στάδιο στην κατεργασία της κρέμας, αυτό της φυγοκέντρωσης. Έτσι, μετά την κατεργασία στο λουτρό υπερήχων και αφού κρυώσει και συμπληρωθεί ο απαιτούμενος όγκος ως τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης των 50 mL, ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 16.000 στους 25ο C για 15 λεπτά. Λαμβάνονται από το υπερκείμενο υγρό 0.5 mL (τα υπολειπόμενα αδιάλυτα λιπαρά έκδοχα έχουν προσκολληθεί στον πυθμένα του φιαλιδίου Eppendorf) και μέσω φίλτρανσης με PET 45/25 polyester syringe filters αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με το αντίστοιχο αρχικό αραιωτικό μέσο.

Τελικά, δοκιμάστηκε η προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCL 2N, προκειμένου να διαχωριστεί καλύτερα η υδατική από τη λιπαρή φάση μέσα στην κρέμα και να εκχυλιστεί με ACN ποσοτικά το α -λιποϊκό οξύ. Πράγματι, ο συνδυασμός αυτός βελτίωσε το σήμα για τη χρωματογραφική κορυφή του α -λιποϊκού οξέος. Το μίγμα που επιλέχτηκε για την κατεργασία της κρέμας ήταν τελικά το εξής :

- ACN/ HCL (2M) 50:50 v/v

8.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α-ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ

Ο καθορισμός των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών βασίστηκε στις μελέτες που είχαν γίνει κατά την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος στο συμπλήρωμα διατροφής, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο 7 και περιλάμβανε τα παρακάτω :

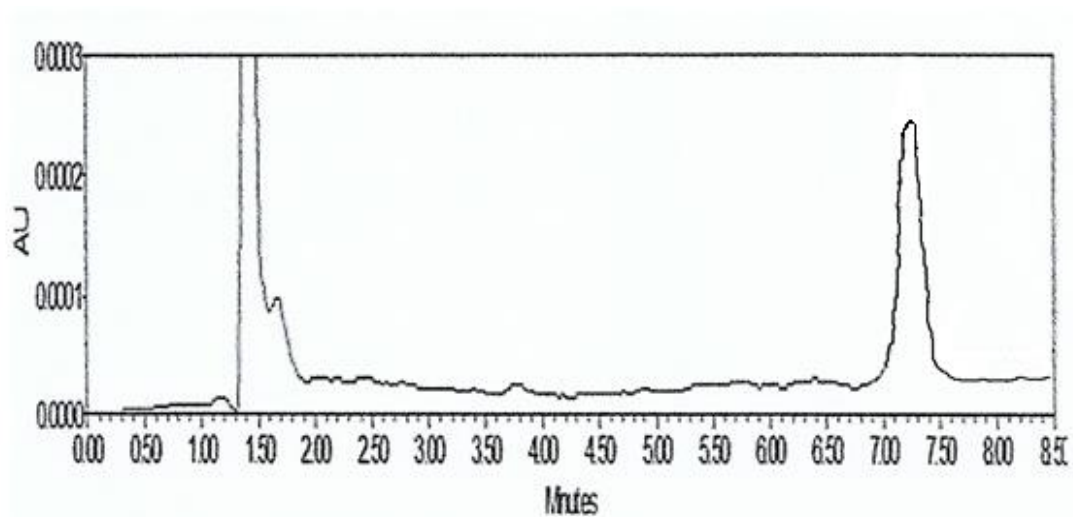
- Μελέτη επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στο χρόνο συγκράτησης και στον παράγοντα χωρητικότητας.
- Μελέτη της επίδρασης του οργανικού τροποποιητή της κινητής φάσης στο χρόνο συγκράτησης του α-λιποϊκού οξέος.
- Μελέτη της επίδρασης της στάσιμης φάσης με στήλη αντίστροφης φάσης C18, μικρότερου μήκους (Symmetry C18, 70mm x 4.6 mm i.d., 5 μ).

8.3.1 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Με βάση τα αποτελέσματα από τη μελέτη βελτιστοποίησης του συστήματος υγροχρωματογραφίας, που είχαν γίνει στο συμπλήρωμα διατροφής επιλέχτηκαν οι ίδιες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του λιποϊκού οξέος στην αντιοξειδωτική καλλυντική κρέμα.

- **Στατική φάση:** χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Luna® C18, αντίστροφης φάσης με διαστάσεις 150 mm x 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm, σε σύνδεση με την προστήλη (Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm)
- **Κινητή φάση:** Μίγμα ακετονιτριλίου/υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 50 mM (ρυθμιστικό διάλυμα σε pH : 4.5 με ο-φωσφορικό οξύ 85% w/w) σε αναλογία 60:40 v/v.
- **Ταχύτητα ροής:** 1 mL.min⁻¹
- **Όγκος βρόγχου:** 10μL
- **Ανιχνευτής:** ανιχνευτής υπεριώδους ορατού (UV-Vis), ρυθμισμένος στα 340 nm. Ο χρόνος έκλουσης για το α-λιποϊκό οξύ ήταν 7,2 min.

Στο σχήμα 8.1 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα μετά την ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένη με α -λιποϊκό οξύ σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, με χρόνο έκλουσης του α -λιποϊκού οξέος στα 7,26 min.



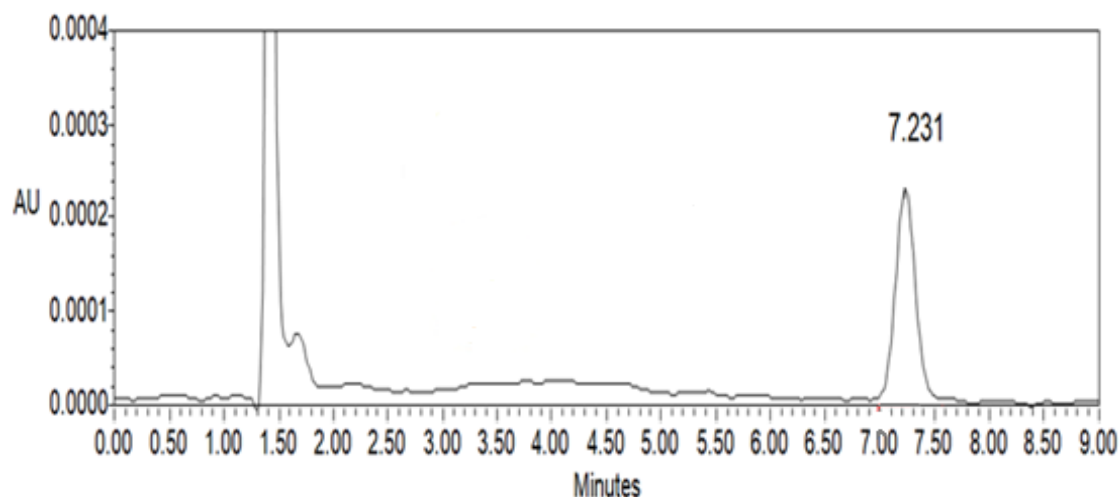
Σχήμα 8.1 : Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση βάσης κρέμας εμβολιασμένη με α -λιποϊκό οξύ σε συγκέντρωση $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: Phenomenex (Luna® C18, 150mm x 4.6 mm i.d, 5 μm , pre-column Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm), κινητή φάση : ACN/ KH_2PO_4 50mM 40/60 v/v, pH: 4.5, ταχύτητα ροής $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $\lambda=340 \text{ nm}$

8.3.2 Βελτιστοποίηση κατεργασίας δείγματος

Σύμφωνα με την πορεία κατεργασίας πραγματοποιείται αρχικά αραιώση και διαχωρισμός των συστατικών της κρέμας σε μίγμα διαλύματος HCL 2N και ακετονιτριλίου, σε αναλογία 50:50 v/v. Ακολουθεί διάλυση σε λουτρό υπερήχων, φυγοκέντρωση, φίλτρανση και τελικά αραιώση και ανάλυση του α -λιποϊκού οξέος στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV. Αναλυτικά η προεργασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια :

- Ζύγιση 670 mg κρέμας απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Προσθήκη 20 mL υδατικού διαλύματος HCL 2M και 20 mL ακετονιτριλίου (ACN). Ακολουθεί ανάδευση με Vortex για 3-5 λεπτά και τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά, στους 25° C. Στη συνέχεια, αφού κρυώσει, αραιώνεται μέχρι τη χαραγή στα 50 mL με ACN.
- Ακριβώς 2 mL από το μίγμα μεταφέρονται σε φιαλίδιο Eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 16.000 στροφές, στους 25° C. Με τον τρόπο αυτό διαχωρίζεται η υδατική στοιβάδα από τα αδιάλυτα λιπαρά συστατικά.
- Ακριβώς 500 μ L από την υπερκείμενη στοιβάδα μεταφέρονται μέσω PET 45/25 polyester syringe filters και αραιώνονται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL με ACN.

Ύστερα από την παραπάνω επεξεργασία το δείγμα αναλύεται στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV, σύμφωνα με τις προκαθορισμένες βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.



Σχήμα 8.2 : Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την κρέμα που περιέχει α -λιποϊκό οξύ σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Χρωματογραφικές συνθήκες: Phenomenex (Luna® C18, 150mm x 4.6 mm i.d, 5 μm , pre-column Phenomenex, C18, 4.0 mm x 3.0 mm), κινητή φάση : ACN/ KH_2PO_4 50 mM 40/60 v/v, pH: 4.5, ταχύτητα ροής 1mL.min⁻¹, $\lambda=340$ nm

8.4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ α -ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΗ ΚΡΕΜΑ

8.4.1 Γραμμικότητα

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου κατασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρεις καμπύλες βαθμονόμησης σε τρεις διαφορετικές εργαστηριακές μέρες, σε περίοδο ενός μήνα. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης αναλύονται εμβολιασμένα δείγματα με α -λιποϊκό οξύ που παρασκευάστηκαν με τρόπο που έχει περιγραφεί στην παράγραφο 8.3.2. Κάθε καμπύλη αποτελείται από έξι σημεία που προκύπτουν από την ανάλυση προτύπων διαλυμάτων α -λιποϊκού οξέος, με εύρος συγκεντρώσεων 5,01 έως 30,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ και ενίονται στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV, δύο φορές το καθένα.

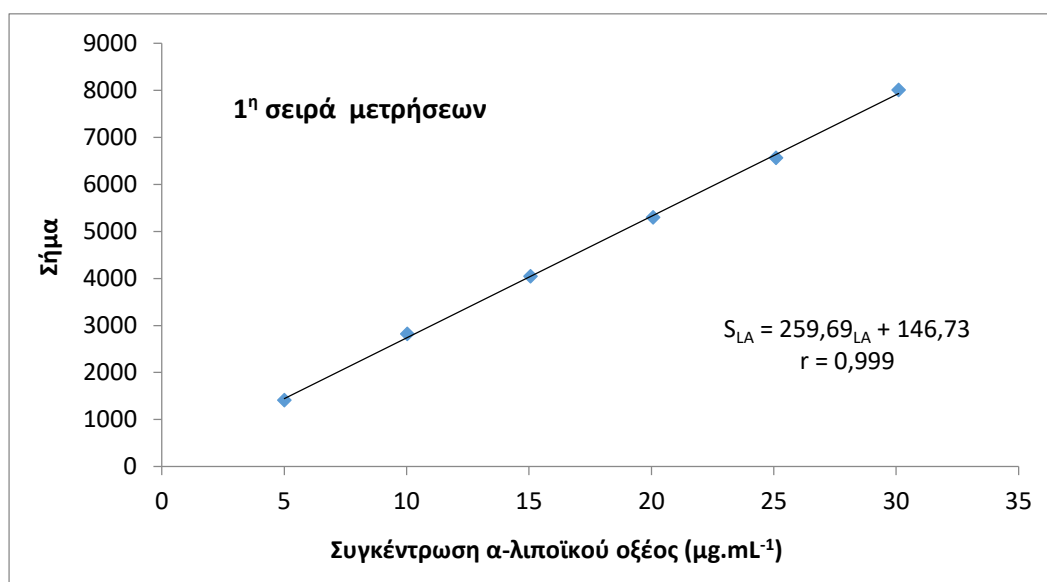
Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χωρίς τη χρήση του εσωτερικού προτύπου και σε κάθε δείγμα μετρήθηκε η επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής του α -LA. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται η μέση τιμή της επιφάνειας, η πειραματική συγκέντρωση και το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, %E_r, με βάση τη θεωρητική συγκέντρωση.

Για τη στατιστική επεξεργασία εφαρμόζεται η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, χωρίς συντελεστή στατιστικού βάρους. Στους πίνακες (8.2 έως 8.4) που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς κάθε εργαστηριακής μέρας, με τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων κρέμας, για την προσδιοριζόμενη ουσία του α -λιποϊκού οξέος.

Πίνακας 8.2 : Πειραματικά αποτελέσματα της πρώτης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος σε αντιοξειδωτική κρέμα

C θεωρητική ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής (v=2)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5,01	1412	4,88	-2,47
10,03	2821	10,33	3,00
15,06	4049	15,07	0,11
20,07	5297	19,90	-0,84
25,09	6562	24,79	-1,19
30,10	8007	30,37	0,91

% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα = $[(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$

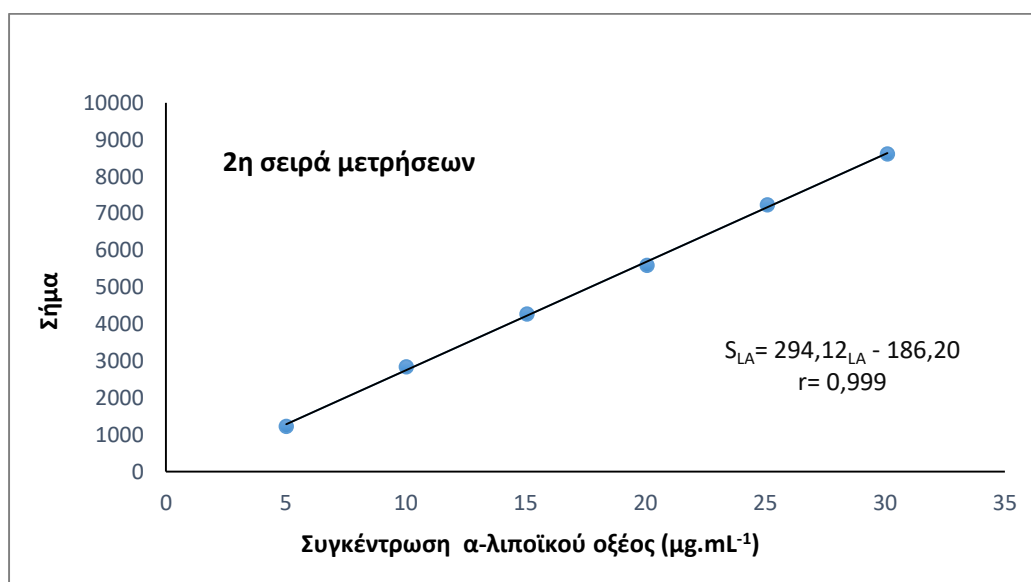


Σχήμα 8.3 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την πρώτη σειρά μετρήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα κρέμας

Πίνακας 8.3 : Πειραματικά αποτελέσματα της δεύτερης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος σε αντιοξειδωτική κρέμα

C θεωρητική ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής (n=2)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5,01	1221	4,79	-4,23
10,03	2839	10,31	2,88
15,06	4270	15,20	0,94
20,07	5587	19,69	-1,86
25,09	7234	25,31	0,89
30,10	8615	30,02	-0,23

$$\% \text{ Σχετικό αναλυτικό σφάλμα} = [(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$$

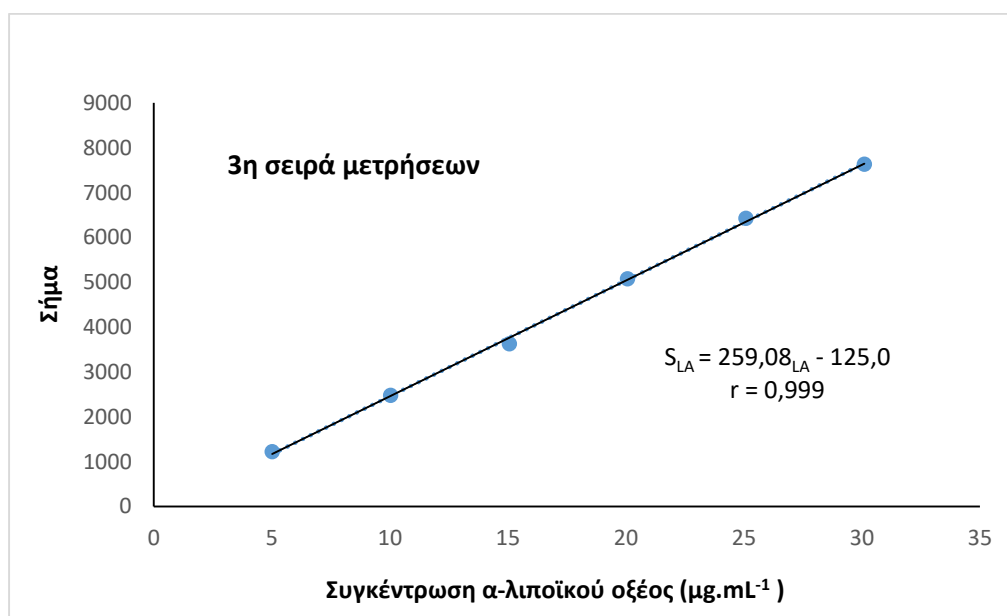


Σχήμα 8.4 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την δεύτερη σειρά μετρήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα κρέμας

Πίνακας 8.4 : Πειραματικά αποτελέσματα της τρίτης σειράς μετρήσεων για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος σε αντιοξειδωτική κρέμα

C θεωρητική ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Επιφάνεια κορυφής (v=2)	Πειραματική συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
5,01	1222	5,21	4,07
10,03	2475	10,06	0,37
15,06	3625	14,52	-3,56
20,07	5076	20,14	0,36
25,09	6428	25,38	1,16
30,10	7628	30,02	-0,23

$$\% \text{ Σχετικό αναλυτικό σφάλμα} = [(C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{θεωρητική}}) / C_{\text{θεωρητική}}] \times 100$$



Σχήμα 8.5 : Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του α-λιποϊκού οξέος μετά την τρίτη σειρά μετρήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα κρέμας

Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς έγιναν με το υπολογιστικό πρόγραμμα SPSS vers. 19 και παρουσιάζονται στον πίνακα 8.5. Η μέση τιμή των αποτελεσμάτων της στατιστικής επεξεργασίας παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα, όπου έχουν υπολογιστεί ο συντελεστής συσχέτισης r , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης αναφοράς S_r , η τυπική απόκλιση της τομής και της κλίσης. Διαπιστώνεται ότι η μέθοδος είναι γραμμική και για τις τρεις σειρές μετρήσεων, αφού η τιμή του συντελεστή συσχέτισης βρέθηκε 0,999, ενώ το % σχετικό σφάλμα των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων δεν ξεπέρασε την κατά απόλυτη τιμή 4,3 %.

Πίνακας 8.5 : Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών βαθμονόμησης του α-LA							
Μήτρα	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (μg.mL ⁻¹)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^a	r^b	Τυπική Απόκλιση		S_r^c	a/Sa^d
				Κλίση	Τομή		
<i>Εμβολιασμένα δείγματα κρέμας</i>	5,01 – 30,10	$S_{\alpha-LA} = 259,69 \times C_{\alpha-LA} + 146,73$	0,999	3,36	65,50	70,35	2,24
1^η σειρά μετρήσεων							
2^η σειρά μετρήσεων	5,01 – 30,10	$S_{\alpha-LA} = 294,12 \times C_{\alpha-LA} - 186,20$	0,999	4,14	80,61	86,59	-2,30
3^η σειρά μετρήσεων	5,01 – 30,10	$S_{\alpha-LA} = 259,08 \times C_{\alpha-LA} - 125,0$	0,999	3,99	77,65	83,40	-1,61
Μέση τιμή των καμπυλών βαθμονόμησης							
<i>Εμβολιασμένα δείγματα κρέμας</i>	5,01-30,10	$S_{\alpha-LA} = 270,96 \times C_{\alpha-LA} - 164,47$	$\geq 0,999$	3,80	74,58	$\leq 70,35$	$\leq 2,24$
^a Το σήμα (εμβαδό) σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του α-λιποϊκού οξέος ^b Συντελεστής συσχέτισης ^c Τυπικό σφάλμα ^d Θεωρητική τιμή του t για P= 0,05 και f = n-2 = 4 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,77							

8.4.2 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση : $LOD = 3,3 (S_a / b)$, όπου S_a είναι η τυπική απόκλιση της τομής της καμπύλης αναφοράς στον άξονα των y , δηλαδή τυπική απόκλιση του σταθερού όρου της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς και b είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση : $LOQ = 10 (S_a / b)$.

Σε αυτή τη μελέτη οι μέσες τιμές LOD και LOQ υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς να είναι: LOD: $0,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ και LOQ: $2,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

8.4.3 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Η προτεινόμενη μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την ορθότητα και την πιστότητά της, τόσο κατά τη διάρκεια μίας εργαστηριακής μέρας, όσο και μεταξύ των ημερών. Για τον έλεγχο αυτόν παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως ακριβώς και τα εμβολιασμένα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) $5,0$, $15,0$ και $30,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ διαλυμάτων α -λιποϊκού οξέος. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι δείγματα σε κάθε εργαστηριακή μέρα. Τελικά σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκαν από έξι μετρήσεις σε τρεις εργαστηριακές μέρες (18 μετρήσεις συνολικά ανά επίπεδο).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS ver 19. Για τον υπολογισμό των στατιστικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης. Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το % σχετικό σφάλμα ($\%E_r$), ενώ η πιστότητα εκτιμήθηκε με βάση τις % σχετικές αποκλίσεις ($\%RSD$), τόσο εντός της ημέρας (intra-day), όσο και μεταξύ των ημερών (inter-day). Τα συνολικά αποτελέσματα του ελέγχου της ορθότητας και της πιστότητας για τον προσδιορισμό του α -λιποϊκού οξέος παρουσιάζονται στον πίνακα 8.6.

Πίνακας 8.6 : Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα καλλυντικής κρέμας (n=3 runs, six replicates per run)			
Θεωρητική συγκέντρωση	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος (μg.mL⁻¹)		
	5,0	15,0	30,0
1 ^η σειρά μετρήσεων	4,62 ± 0,04	15,30 ± 0,14	30,9 ± 0,15
2 ^η σειρά μετρήσεων	4,72 ± 0,11	16,20 ± 0,21	30,8 ± 0,22
3 ^η σειρά μετρήσεων	5,23 ± 0,12	14,30 ± 0,06	30,60 ± 1,10
Ολική μέση τιμή	4,86	15,30	30,80
RSD Εντός της ημέρας (%) ^a	0,13	0,31	6,90
RSD Δια των ημερών (%) ^a	1,3	10,0	0,28
Ολική ορθότητα % E_r ^b	-2,9	1,8	2,8

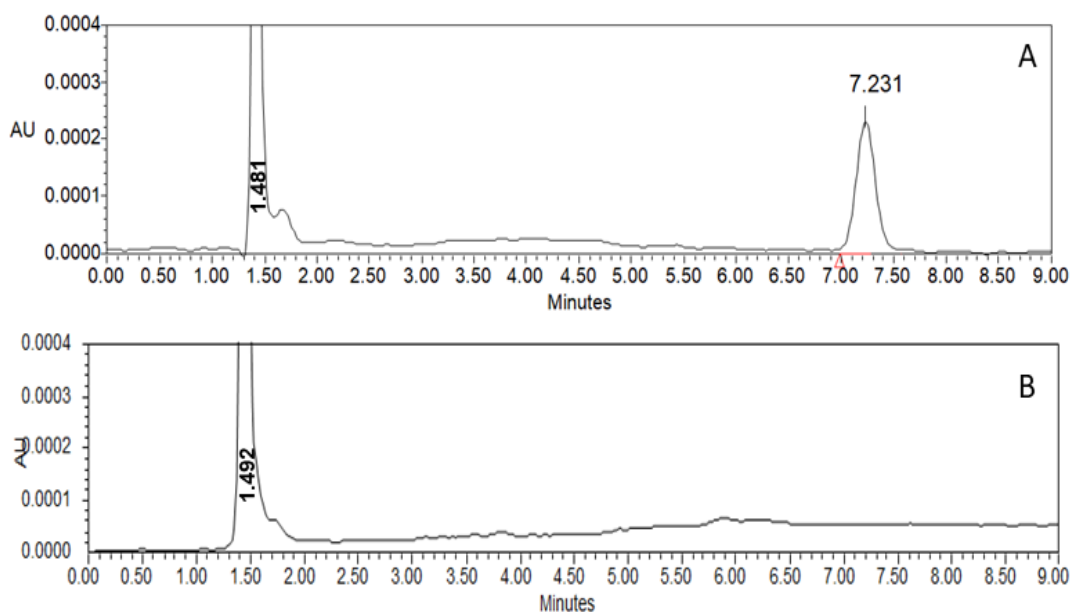
^a Σχετική τυπική απόκλιση εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών, υπολογισμένη με ANOVA
^b % Σχετικό σφάλμα = [(πειραματική συγκέντρωση – θεωρητική συγκέντρωση)/θεωρητική συγκέντρωση] x100

Τα αποτελέσματα αξιολόγησης της ορθότητας και της πιστότητας της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου δείχνουν ότι η εντός ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{intra-day}) κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,13 και 6,9 %. Η μεταξύ των ημερών σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{inter-day}) ήταν μεταξύ 1,3 και 10,0 %. Η ολική ακρίβεια, που εκφράζεται με το % σχετικό αναλυτικό σφάλμα, για το οξύ κυμαίνεται μεταξύ των τιμών -2,9 έως 2,8 %.

8.4.4 Έλεγχος ειδικότητας μεθόδου προσδιορισμού

Ο έλεγχος ειδικότητας είναι ο έλεγχος ικανότητας της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος παρουσία εκδόχων, προκειμένου να ελεγχθεί η απουσία παρεμποδίσεων από το υλικό μήτρας (βάση κρέμας). Οι κρέμες στα καλλυντικά περιέχουν μεγάλο αριθμό συστατικών (συνήθως 15-30) και πολλά διαφορετικά είδη χημικών ενώσεων. Έτσι, η μελέτη της επίδρασης των εκδόχων στον προσδιορισμό του αναλύτη είναι καθοριστικής σημασίας.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η βάση της κρέμας δεν επιδρά στον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος, λαμβάνεται χρωματογράφημα σε βάση κρέμας, χωρίς α-λιποϊκό οξύ (placebo), που παρασκευάστηκε για αυτό το σκοπό. Χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος κατεργασίας και οι χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόζονται στην κρέμα που περιέχει α-λιποϊκό οξύ. Στο σχήμα 8.6 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα μετά από ανάλυση σε κρέμα που περιέχει $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ α-LA και σε βάση κρέμας (placebo). Με βάση αυτά φαίνεται ότι τα έκδοχα στην κρέμα δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος, αφού δεν απορροφούν στην περιοχή που απορροφά ο αναλύτης στα 340 nm (δεν υπάρχει κορυφή).



Σχήμα 8.6 : Τυπικά χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση **A** : κρέμας που περιέχει $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ α-LA και **B** : βάση κρέμας χωρίς α-LA (placebo)

8.4.5 Ανθεκτικότητα της μεθόδου

Για την αξιολόγηση της μεθόδου μελετήθηκε η επιρροή μικρών μελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου στο χρόνο ανάσχεσης του α-λιποϊκού οξέος. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν η συγκέντρωση του δισόξινου φωσφορικού καλίου στην κινητή φάση, η ταχύτητα ροής και το μήκος κύματος. Κάθε παράγοντας μελετήθηκε σε τρία επίπεδα (-1, 0, +1). Παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα κρέμας που περιείχαν συγκέντρωση α-LA 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Στον πίνακα 8.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μελετών ανθεκτικότητας της μεθόδου, όπου είναι φανερό ότι η προτεινόμενη μέθοδος είναι ανθεκτική, αφού κανένας από τους εξεταζόμενους παράγοντες δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές.

Πίνακας 8.7 : Πειραματικά αποτελέσματα για τη μελέτη ελέγχου της ανθεκτικότητας της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα κρέμας			
Χρωματογραφικές αλλαγές	α-Λιποϊκό οξύ		
Παράμετροι	t_r^a	$k' ^\beta$	$T ^\gamma$
A. Συγκέντρωση δισόξινου φωσφορικού καλίου KH_2PO_4 (49-51 mM)			
Μέση τιμή	7,20	3,99	1,05
(%RSD)	(0,30)	(0,24)	(0,67)
B. Μήκος κύματος ανίχνευσης (339-341 nm)			
Μέση τιμή	7.26	4.04	1.05
(%RSD)	(0.12)	(0.23)	(0.11)
Γ. Ταχύτητα ροής (0,9 - 1,1 mL.min⁻¹)			
Μέση τιμή	7.28	4.04	1.04
(%RSD)	(0.18)	(0.17)	(0.45)
^a χρόνος ανάσχεσης ^β παράγοντας χωρητικότητας ^γ παράγοντας συμμετρίας κορυφής			

8.4.6 Έλεγχος ανάκτησης

Η ανάκτηση της προτεινόμενης πορείας κατεργασίας της καλλυντικής κρέμας υπολογίζεται με βάση το μέσο όρο κλίσεων των τριών καμπύλων βαθμονόμησης και την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης που κατασκευάζεται με ανάλυση διαλυμάτων α-λιποϊκού οξέος χωρίς την παρουσία βάσης της κρέμας. Τα δείγματα αυτά παρασκευάζονται με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από το διάλυμα παρακαταθήκης του α-λιποϊκού οξέος, ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις 5,01, 10,03, 15,06, 20,07, 25,09 και 30,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, την προσθήκη 40 ml μίγματος διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 2M και ακετονιτριλίου (50:50, v/v) σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, αραιώση μέχρι τη χαραγή με ACN, χωρίς περαιτέρω κατεργασία και ανάλυση στο σύστημα HPLC-UV. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8.8. Η ανάκτηση για το α-λιποϊκό οξύ υπολογίστηκε ότι είναι: 77,87%.

Πίνακας 8.8 : Ανάκτηση της μεθόδου προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε αντιοξειδωτική καλλυντική κρέμα					
Εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης (εμβολιασμένα δείγματα κρέμας)	Κλίση της εξίσωσης παλινδρόμησης				
1^η σειρά : Σήμα = 259,69 C + 146,73	259,69				
2^η σειρά : Σήμα = 294,12 C - 186,20	294,12				
3^η σειρά : Σήμα = 259,08 C - 125,0	259,08				
Μέσος όρος κλίσεων	270,96				
% RSD των κλίσεων	7,4				
Εξισώσεις της καμπύλης αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα α-λιποϊκού οξέος	Κλίση	r	Τυπική απόκλιση Κλίσης Τομής		S _r
Σήμα = 347,95 C - 186,87	347,95	0,999	5,53	107,73	115,72
% Ανάκτηση = [(270,96 x 100) / 347,95] = 77,87 %					

8.5 Εφαρμογή της μεθόδου στη μέτρηση καλλυντικών προϊόντων που περιέχουν α-λιποϊκό οξύ

Το α-λιποϊκό οξύ προσδιορίζεται ποσοτικά σε δύο καλλυντικά προϊόντα που παρασκευάστηκαν για αυτό το σκοπό. Ένα γαλάκτωμα που περιέχει 1,0% και μία κρέμα που περιέχει 1,5% w/w. Δέκα διαφορετικά δείγματα αναλύθηκαν χρωματογραφικά σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες και τα αποτελέσματα των μετρήσεων συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 8.9 : Ανάλυση δειγμάτων καλλυντικών προϊόντων που περιέχουν α-λιποϊκό οξύ με HPLC-UV			
Καλλυντικά προϊόντα	Ποσότητα % w/w ανά προϊόν		Ανάκτηση (%)
	Μέση τιμή ± SD (n=10)		
	Αναγραφόμενη τιμή	Ευρεθείσα τιμή	
Κρέμα	1,5	1,58 ± 0,93	105,0
Γαλάκτωμα	1,0	1,04 ± 0,03	103,0

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα αναλυόμενα δείγματα των διάφορων σκευασμάτων δεν είναι εκτός ορίων με το σχετικό σφάλμα %E_r να είναι από 103,0 έως 105,0 %. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη και μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος των διάφορων καλλυντικών προϊόντων.

8.6 Μελέτες σταθερότητας

Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου στον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη (α -LA), για να αποδειχτεί ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας εξακολουθεί να είναι ειδική και σταθερή, παρουσία άγνωστων προϊόντων αποικοδόμησης.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες επιταχυνόμενης «εξαναγκασμένης» διάσπασης (forced degradation studies) με κατεργασία της δραστικής ουσίας και του τελικού προϊόντος (αντιοξειδωτική καλλυντική κρέμα) σε διαφορετικές συνθήκες διάσπασης «stress» και φύλαξης. Έτσι, κατά την μελέτη της αποικοδόμησης μελετήθηκε η επίδραση των παρακάτω συνθηκών :

- Όξινες συνθήκες αποικοδόμησης (HCl 0.1 M, 25°C)
- Βασικές συνθήκες αποικοδόμησης (NaOH 0.1 M, 25°C)
- Οξειδωτικές συνθήκες αποικοδόμησης (H₂O₂ 3% v/v, 25°C)
- Θερμικής αποικοδόμησης (42° C ± 1° C / 75% v/v σχετική υγρασία RH)
- Θερμικής αποικοδόμησης (50° C ± 1° C / 75% v/v σχετική υγρασία RH)
- Θερμικής αποικοδόμησης (25° C ± 1° C / 40% v/v σχετική υγρασία RH)
- Φωτόλυση (UV ακτινοβολία στα 254 nm)

Χρησιμοποιούνται εμβολιασμένα δείγματα κρέμας με συγκέντρωση σε α -λιποϊκό οξύ 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, όπως περιγράφεται στην στο κεφάλαιο 15.4. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονται 500 μL από το παραπάνω διάλυμα και αραιώνονται στα 10 mL με ACN, εξουδετερώνοντας κάθε φορά με την αντίστοιχη ποσότητα του οξέος, της βάσης και του οξειδωτικού παράγοντα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη επιτυγχάνεται με τις καμπύλες αναφοράς που έγιναν με τον προσδιορισμό του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον πίνακα 8.10.

Πίνακας 8.10 : Μελέτες σταθερότητας του α-λιποϊκού οξέος σε εμβολιασμένα δείγματα κρέμας σε διάφορες συνθήκες διάσπασης με την τεχνική HPLC-UV			
Συνθήκες διάσπασης	Χρόνος διάσπασης (ώρες)	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) / % ανάκτηση	Προϊόντα / χρόνοι κατακράτησης (λεπτά)
Όξινη υδρόλυση (HCl 0.1 M, 25°C)	0	10,19 (101,9)	---
	1	9,37 (93,7)	---
	2	7,54 (75,4)	2,32, 2,99, 3,81, 5,42, 5,82
	4	7,42 (74,2)	2,32, 2,99, 3,81, 5,42, 5,82
	8	7,40 (74,0)	2,31, 2,98, 3,81, 5,42, 5,82
Βασική υδρόλυση (NaOH 0.1 M, 25°C)	0	10,46 (104,6)	---
	1	10,19 (101,9)	---
	2	9,10 (91,0)	1,82, 3,81
	4	9,08 (90,8)	1,82, 3,81
	8	9,06 (90,6)	1,82, 3,81
Οξειδωτική διάσπαση (H₂O₂ 3% v/v, 25°C)	0,3	--- (0,0)	Κανένα σήμα δεν ανιχνεύτηκε 1,78
	1	--- (0,0)	---
	2	--- (0,0)	---
	8	--- (0,0)	---
	Φωτόλυση (254 nm, 25°C)	0	10,36 (103,6)
1		10,20 (102,0)	---
2		9,50 (95,0)	---
6		8,80 (88,0)	2,82, 3,81
8		8,83 (88,3)	2,82, 3,81

Όπως φαίνονται από τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας σχετικά με τις όξινες συνθήκες διάσπασης το α-λιποϊκό οξύ, μετά από 2 ώρες, η ανάκτησή του ανέρχεται σε 75,4 %, ενώ σύμφωνα με τις συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης ανιχνεύονται πέντε προϊόντα διάσπασης στα 2,32, 2,99, 3,81, 5,42 και 5,82 λεπτά. Μετά από 8 ώρες σε όξινες συνθήκες η ανάκτηση φτάνει στο 74,0 %, χωρίς να ανιχνεύεται επιπλέον προϊόν διάσπασης.

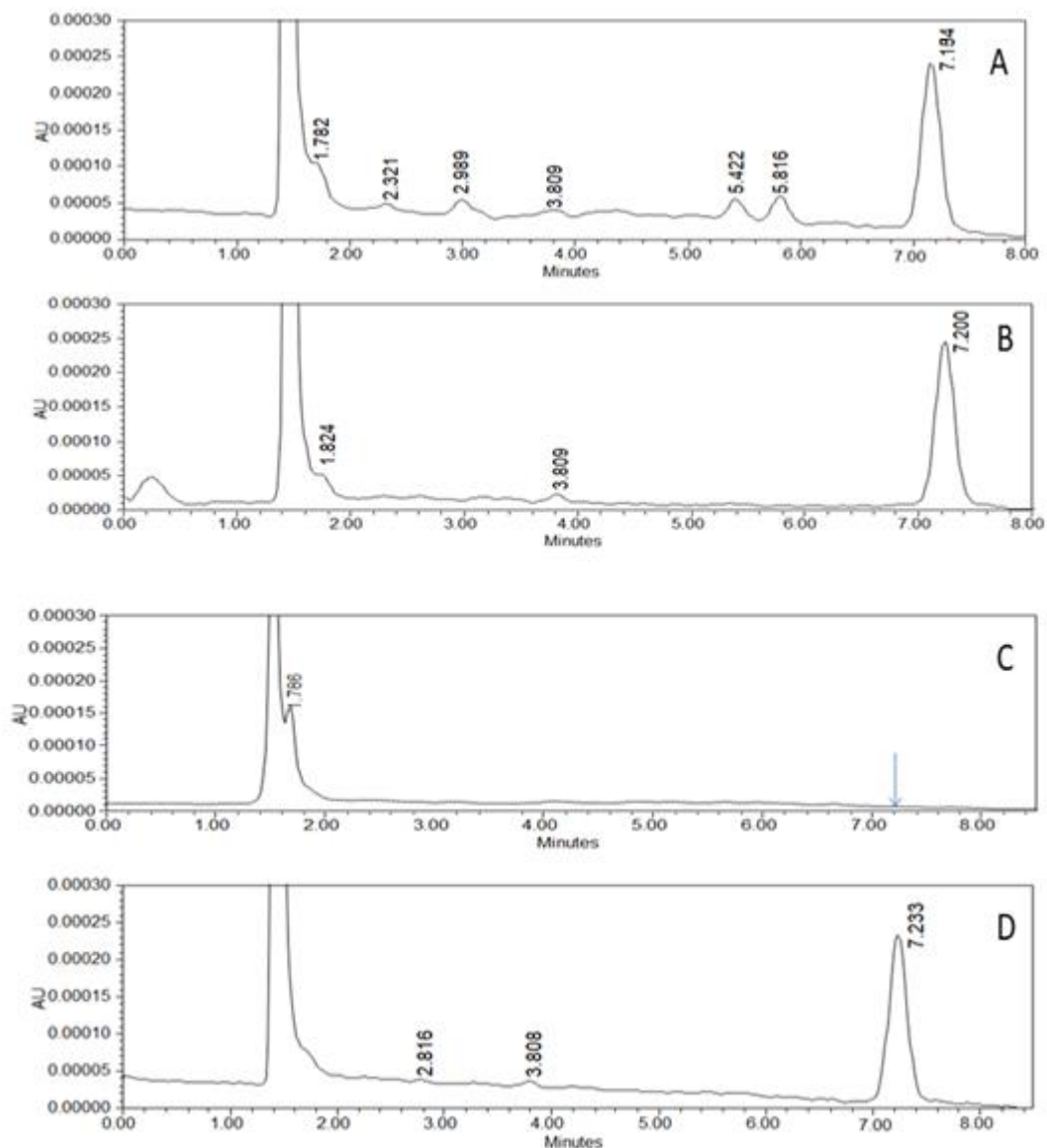
Στις βασικές συνθήκες διάσπασης το α-LA παραμένει σταθερό ακόμη και μετά από 8 ώρες, όπου η ανάκτησή του ανέρχεται στο 90,6 %. Ένα προϊόν διάσπασης εμφανίζεται στα 3,81 λεπτά και ένα στα 1,82 λεπτά, που δεν παρεμποδίζει τον προσδιορισμό του αναλύτη.

Σε συνθήκες οξειδωτικής διάσπασης το α-LA υφίσταται πολύ γρήγορη διάσπαση, αφού μετά από 30 λεπτά η ανάκτησή του είναι 0 %, αφού δεν εμφανίζει καθόλου σήμα. Ανιχνεύεται ένα μόνο προϊόν διάσπασης στα 1,78 λεπτά. Μετά από 8 ώρες, εξακολουθεί να μην ανιχνεύεται κανένα σήμα και να εμφανίζει ένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες φωτόλυσης (ακτινοβόλησης) της κρέμας μέσα στον περιέκτη στα 254 nm, μετά από 6 ώρες, η ανάκτηση του α-LA έφτασε 88 % και εμφανίστηκαν δύο προϊόντα διάσπασης στα 2,82 και 3,81 λεπτά και ήταν ίδια και μετά από 8 ώρες.

Από όλες τις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα προϊόντα διάσπασης δεν παρεμποδίζουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, αφού δεν εμφανίζονται στο χρόνο ανίχνευσης του α-LA.

Στο σχήμα 8.7 απεικονίζονται τυπικά χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων κρέμας α-λιποϊκού οξέος σε συγκέντρωση $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, σε όξινο περιβάλλον με HCl 0.1 M στους 25° C για 2 ώρες, σε αλκαλικό περιβάλλον με NaOH 0,1 M στους 25° C για 2 ώρες, μετά από 30 λεπτά οξείδωσης με H₂O₂ (3.0 % w/w) και μετά από έξι ώρες φωτόλυσης στα 254 nm, της καλλυντικής κρέμας που ήταν σε περιέκτη σωληναρίου από αλουμίνιο-πλαστικό.



Σχήμα 8.7 : Τυπικά χρωματογραφήματα από τις μελέτες εξαναγκασμένης διάσπασης του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα

(A) μετά από παραμονή για 2 ώρες σε υδ.δ/μα HCL 0.1M στους 25° C

(B) μετά από παραμονή για 2 ώρες σε υδ. δ/μα NaOH 0,1 M 25° C

(C) μετά από παραμονή για 30 λεπτά σε υδ. δ/μα H₂O₂ 3% v/v.

(D) μετά από φωτόλυση στα 254 nm για 6 ώρες.

Σε όλες τις περιπτώσεις η θεωρητική συγκέντρωση του α-λιποϊκού οξέος σε χρόνο t=0 από την έναρξη της διάσπασης ήταν 10 μg.mL⁻¹.

Μελετήθηκε η σταθερότητα του τελικού καλλυντικού προϊόντος που περιείχε 1,5 % w/w α-LA με συνθήκες επιταχυνόμενης θερμικής αποικοδόμησης σε θερμοκρασία $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας (RH) 75% v/v, σε θερμοκρασία $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας (RH) 75% v/v, για χρονικό διάστημα 3 μηνών.

Επιπλέον, μελετήθηκε η σταθερότητα σε συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης (long term stability) σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ σε σχετική υγρασία (RH) 40% v/v.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη, έγινε όπως και στις συνθήκες όξινης, βασικής και οξειδωτικής αποικοδόμησης, με βάση τις καμπύλες αναφοράς και τον προσδιορισμό του εμβαδού των χρωματογραφικών κορυφών, σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα των μελετών συνοψίζονται στον πίνακα 8.11.

Πίνακας 8.11 : Μελέτες σταθερότητας καλλυντικής κρέμας α-λιποϊκού οξέος, με την τεχνική HPLC-UV			
Συνθήκες διάσπασης	Χρόνος διάσπασης (μήνες)	Συγκέντρωση α-λιποϊκού οξέος ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) / % ανάκτηση	Προϊόντα / χρόνοι κατακράτησης
$42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 75% v/v	1	9,37 (93,7)	----
	2	8,20 (82,0)	----
	3	7,76 (77,6)	----
$50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 75% v/v	1	9,66 (96,6)	---
	2	8,17 (81,7)	---
	3	8,10 (81,0)	---
$25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ Σχετική υγρασία 40% v/v	1	9,87 (98,7)	---
	2	9,80 (98,0)	---
	4	9,75 (97,5)	---
	8	9,74 (97,4)	---
	12	9,50 (95,0)	---

Όπως φαίνονται από τα αποτελέσματα των μελετών σταθερότητας σχετικά με τις επιταχυνόμενες συνθήκες θερμικής διάσπασης του α-λιποϊκού οξέος, σε θερμοκρασία $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v μετά από 3 μήνες, η ανάκτησή του ανέρχεται σε 77,6%, ενώ σύμφωνα με τις συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης δεν ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες θερμικής αποικοδόμησης σε θερμοκρασία $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v, μετά από 3 μήνες η ανάκτησή του είναι 81 %, χωρίς όμως να ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Σε συνθήκες μακροχρόνιας αποθήκευσης (long term stability) σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ παρουσία σχετικής υγρασίας 40% v/v μετά από 12 μήνες, η ανάκτησή του είναι 95,0% και δεν ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης.

Από όλες τις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε ότι κατά τις μελέτες επιταχυνόμενης θερμικής διάσπασης και μακροχρόνιας αποθήκευσης δεν παρεμποδίζεται ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη μέσα στο προϊόν στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, παρόλο που η ανάκτηση του στους $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 75 % v/v μετά από 3 μήνες, ήταν αρκετά μειωμένη αν και δεν παρουσιάστηκε κανένα προϊόν διάσπασης, όπως και στους $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 75 % v/v. Στους $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με σχετική υγρασία 40% v/v η ανάκτηση ήταν πολύ ικανοποιητική σε όλη τη χρονική διάρκεια των δοκιμασιών (long term stability).

Εξετάζοντας τα παραπάνω στοιχεία της επιταχυνόμενης θερμικής διάσπασης και της χρόνιας αποθήκευσης παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται οποιαδήποτε προϊόντα διάσπασης, που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη, υπό τις επιλεγμένες βέλτιστες χρωματογραφικές τεχνικές και επομένως να επηρεάσουν την προτεινόμενη αναλυτική μέθοδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

9.1 Εισαγωγή-Σχεδιασμός Μελέτης

Διεξήχθη κλινική μελέτη για την αξιολόγηση της αντιρυτιδικής δράσης στο πρόσωπο (μάγουλα και περιοχή γύρω από τα μάτια) του α -λιποϊκού οξέος μετά από χορήγηση Pero os, ενός συμπληρώματος διατροφής (α -LA 120 mg/καψάκι) σε υγιείς εθελοντές, σε σύγκριση με την εφαρμογή τοπικά μίας κρέμας με (α -LA 1.5 % w/w), που παρασκευάστηκε για αυτό τον σκοπό και την ενδεχόμενη συνέργεια μεταξύ τους και μία κρέμα-εικονική (Placebo) που δεν περιείχε το α -LA, εφαρμόζοντας μία τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή μελέτη σε παράλληλες ομάδες (Randomized Double Blide Study Parallel Groups).

Ειδικά, αξιολογήθηκε η μικροτοπογραφία του δέρματος, δηλαδή ο συνολικός αριθμός και το πλάτος των λεπτών γραμμών (fine lines), η λείανση και η απαλότητα των ρυτίδων στο πρόσωπο (smoothness), η αύξηση του κολλαγόνου (τύπος I και III) στο χόριο του δέρματος (θηλώδες), η συνολική εικόνα του δέρματος και οι ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την εφαρμογή.

Η μελέτη έγινε σε 20 (είκοσι) υγιείς εθελοντές, αφού χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες (groups). Ο χρόνος εφαρμογής ήταν δύο μήνες και οι μετρήσεις έγιναν στην αρχή (T=0 μέρες), πριν τη χρήση των σκευασμάτων (κρέμα με α -LA, συμπλήρωμα διατροφής με α -LA, κρέμα και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA και κρέμα Placebo), μετά την εφαρμογή στις 30 μέρες (T=30 μέρες) και στο τέλος της εφαρμογής (T=60 μέρες). Η συχνότητα εφαρμογής ήταν για την κρέμα δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ σε καθαρή περιοχή του προσώπου στην παρειά ή στην άκρη του οφθαλμού «crow's foot area of the eye» και μία φορά την ημέρα (πρωί) για τη λήψη του συμπληρώματος με α -LA (Solgar 120 mg /καψάκι). Η μία ομάδα εθελοντών (ομάδα 1) εφάρμοσε την κρέμα με α -LA. Η ομάδα 2 το συμπλήρωμα διατροφής με α -LA, η ομάδα 3 και τα δύο (κρέμα και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA και η ομάδα 4 εφάρμοσε την κρέμα

placebo (κρέμα βάσης που δεν περιείχε α-LA και δεν λάμβαναν συμπλήρωμα διατροφής με α-LA).

Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την αξιολόγηση της μικροτοπογραφίας (micro topography) στους εθελοντές μετά από την χρήση των παραπάνω προϊόντων με α-LA ήταν α) οι βιοφυσικές μέθοδοι (*in vivo*) β) η ιστολογική μέθοδος (*ex vivo*) με λήψη βιοψιών. Τέλος, έγινε η αξιολόγηση της ασφάλειας (τοξικότητας) των προϊόντων από τους εθελοντές κατά την έναρξη, την διάρκεια και την λήξη της κλινικής μελέτης. Η μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Δερματοσκομητολογίας του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

9.2 Εθελοντές

Επιλέχθηκαν 20 (είκοσι) υγιείς με καλή υγεία χωρίς κάποια ψυχολογική ή γνωσιακή διαταραχή. Οι εθελοντές ήταν άντρες και γυναίκες, ηλικίας 30-60 ετών που δεν ελάμβαναν καμία άλλη φαρμακευτική, κοσμητολογική ή συμπληρωματική διατροφική αγωγή. Δεν είχαν καμία δερματοπάθεια και αλλεργική παθολογία στα καλλυντικά ή στα συμπληρώματα διατροφής ή σε κάποιο συγκεκριμένο έκδοχο. Όλοι οι εθελοντές έδωσαν την γραπτή συγκατάθεσή τους για τη διεξαγωγή της μελέτης και έλαβαν γνώση για τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο βιοηθικής της Επιτροπής Βιοηθικής & Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συμφωνία με τη Δήλωση της Συνθήκης του Ελσίνκι [152]. Το συμπλήρωμα διατροφής της εταιρίας Solgar α-LA 120 mg είναι γνωστοποιημένο στο ΕΟΦ και η κρέμα που αναπτύχθηκε με α-LA 1,5 % w/w αξιολογήθηκε ως προς την ασφάλεια της σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό των καλλυντικών (EC Regulation 1223/2009). Η μελέτη ήταν σύμφωνη με τις οδηγίες του «Cosmetics Europe» για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των καλλυντικών προϊόντων (2008), που είναι η Ευρωπαϊκή εμπορική ένωση των βιομηχανιών καλλυντικών και ειδών προσωπικής υγιεινής [153].

Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε τέσσερις τυχαιοποιημένες ομάδες (πίνακας 9.1) που αποτελούνταν από 5 εθελοντές προκειμένου να διεξάγουν την κλινική μελέτη για χρονική διάρκεια δύο (2) μηνών. Η 1^η ομάδα (5 εθελοντές) εφάρμοσε την κρέμα με α-LA δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ στο πρόσωπο (παρειές) και στην άκρη του οφθαλμού). Η 2^η ομάδα (πέντε εθελοντές) έλαβε per-os το συμπλήρωμα διατροφής της Solgar (α-LA 120 mg/ καψάκι) μία φορά την ημέρα (κατά προτίμηση πρωί). Η 3^η ομάδα (5 εθελοντές) έλαβε και εφάρμοσε τοπικά την κρέμα με α-LA πρωί- βράδυ στο πρόσωπο (παρειά και στην άκρη του οφθαλμού) και το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA μία φορά την ημέρα. Η 4^η ομάδα (5 εθελοντές) έλαβε και εφάρμοσε τοπικά την κρέμα placebo (κρέμα χωρίς το α-LA), χωρίς να κάνει καθόλου λήψη συμπληρώματος διατροφής, πρωί- βράδυ στο πρόσωπο (παρειά και άκρη του οφθαλμού).

Δύο εθελοντές από την κάθε ομάδα από τις ομάδες 1,3,4 εκτός από την ομάδα 2 (εθελοντές που έβαλαν μόνο το συμπλήρωμα διατροφής) εφάρμοσαν αντίστοιχα με το πρόσωπο και στο άνω μέρος του βραχίονα (upper arm) τα αντίστοιχα σκευάσματα. Οι δύο εθελοντές αυτοί από τις τρεις ομάδες και δύο από την ομάδα 2 έδωσαν βιοψία στην αρχή (T=0 μέρες), πριν τη χρήση των προϊόντων (κρέμα με α-LA, συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, κρέμα και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA και κρέμα Placebo) και στο τέλος της εφαρμογής (T=60 μέρες), προκειμένου να αξιολογηθεί σε περίπτωση αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής δράσης του α-LA η αύξηση του κολλαγόνου (τύπος I και III) στο θηλώδες χόριο του δέρματος, μέσω ειδικής ιστοχημικής χρώσης και μέτρησης του πάχους του δέρματος. Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά οι ομάδες (groups) των εθελοντών που έλαβαν μέρος στην κλινική μελέτη τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*.

Πίνακας 9.1. Σχεδιασμός πειραμάτων των ομάδων εθελοντών και των λαμβανόμενων σκευασμάτων στην κλινική μελέτη.

Ομάδα Εθελοντών (Group)	Λαμβανόμενο Σκεύασμα	Περιεκτικότητα Δραστικού συστατικού (α-λιποϊκό οξύ)	Τρόπος Χορήγησης	Συχνότητα	Χρονική Διάρκεια
No 1	Κρέμα	1.5 % w/w	Τοπική Εφαρμογή	Πρωί-Βράδυ	30-60 μέρες
No 2	Συμπλήρωμα Διατροφής	120mg/ καψάκι	per-os	Πρωί	30-60 μέρες
No 3	Κρέμα & Συμπλήρωμα Διατροφής	1.5 % w/w & 120mg/ καψάκι	Τοπική Εφαρμογή & per-os	Πρωί-Βράδυ Πρωί	30-60 μέρες
No 4	Κρέμα Placebo & Όχι λήψη Συμπληρώματος διατροφής	0 % w/w	Τοπική Εφαρμογή	Πρωί-Βράδυ	30-60 μέρες

9.3 Μέθοδοι

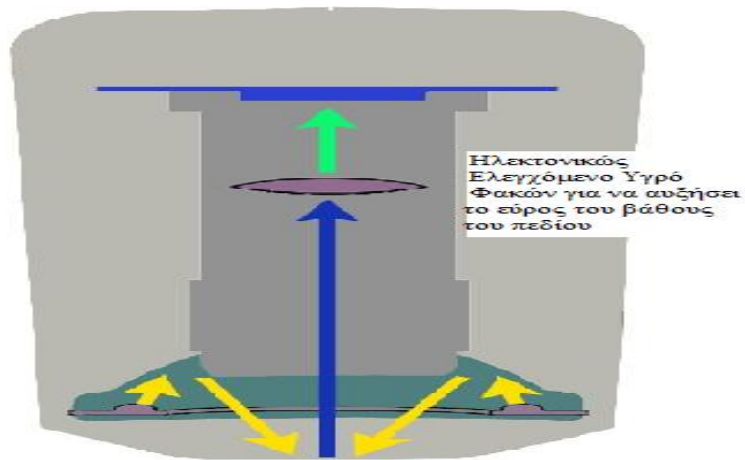
9.3.1 Βιοφυσικές Μέθοδοι (*In vivo*)

Χρησιμοποιείται μία συσκευή που φέρει UV-A Light Video κάμερα υψηλής ανάλυσης και τοποθετείται απευθείας στο δέρμα και λαμβάνεται φωτογραφία από την προσδιορισμό των παραμέτρων των ρυτίδων (Visioscan® VC 20, εταιρία Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany) [154].



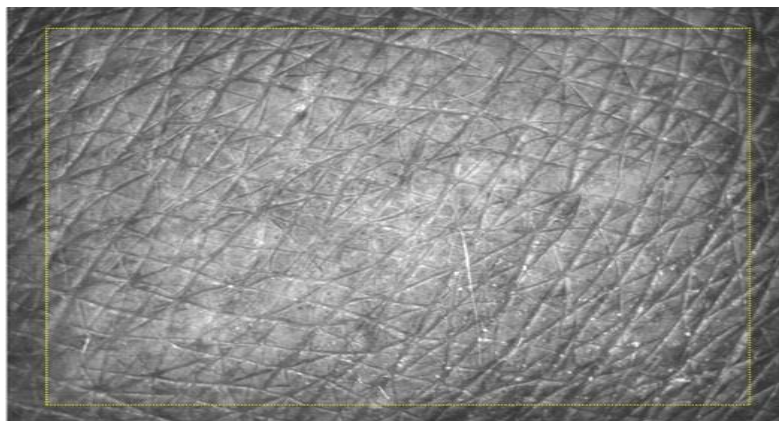
Εικόνα 9.1. Συσκευή Visioscan® VC 20, εταιρία Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany [154].

Οι εικόνες δείχνουν εξαιρετικά τη δομή του δέρματος και το επίπεδο ξηρότητας, φολίδωσης (dryness, scaliness) πάνω στο δέρμα. Χρησιμοποιεί ένα πολύ-λειτουργικό software, που χαρακτηρίζει την επιφάνεια δέρματος εύκολα και με ακρίβεια. Ο μοναδικός UV-A LED φωτισμός (που δεν έχει κίνδυνο για το κανονικό ανθρώπινο δέρμα) είναι τοποθετημένος σε ένα πλαστικό περίβλημα, που είναι εύκολος στο χειρισμό. Το φως είναι ομοιογενώς καταναμημένο από ένα κάτοπτρο. Επιπρόσθετα, η κάμερα αποτελείται από έναν πολύ υψηλής-ανάλυσης αισθητήρα video-chip και ένα ηλεκτρονικά ελεγχόμενο υγρό φακών (liquid lens technology), που προσαρμόζεται αυτόματα στην απόσταση της επιφάνειας του δέρματος για να μεγεθύνει το εύρος του βάθους του πεδίου.



Εικόνα 9.2. Διάταξη κάμερας υψηλής-ανάλυσης με αισθητήρα video-chip, συσκευής Visioscan® VC 20, εταιρία Courage+Khazaka electronic GmbH [154].

Τα αποτελέσματα είναι μη-γυαλιστερές εικόνες από την επιφάνεια του δέρματος, μεγέθους περίπου 10 x 8 mm, που εμφανίζεται σε 255 επίπεδα χρώματος γκρι. (εικόνα 9.3.) Οι ρυτίδες και οι γραμμές εμφανίζονται σκούρες και η φολίδωση του δέρματος μπορεί να φαίνεται με πολύ φωτεινά εικονοστοιχεία (pixels). Το κατάλληλο λογισμικό αναλύει τις εικόνες σε σχέση με την ποικιλία των τοπογραφικών παραμέτρων. Σημειώνεται ότι η επιφάνεια του δέρματος δεν είναι επίπεδη. Σε μικρή μεγέθυνση (X10) η επιφάνεια του δέρματος παρουσιάζεται ως ένα δίκτυο που αναφέρεται ως μικροανάγλυφο ή υφή του δέρματος.



Εικόνα 9.3. Εικόνα επιφάνειας του δέρματος συσκευής Visioscan® VC 20 [154].

Το computer που είναι συνδεδεμένο με την video-camera προσδιορίζει μία ποικιλία από ενδιαφέρουσες δερματοκοσμητολογικές παραμέτρους. Η μέθοδος αξιολόγησης αυτών των παραμέτρων ονομάζεται μέθοδος αξιολόγησης του ζωντανού δέρματος SELS® (Surface Evaluation of the Living Skin) και αναπτύχθηκε στο Ινστιτούτο Πειραματικής Δερματολογίας από τον Καθηγητή Tronnier, στο Πανεπιστήμιο Witten-Herdecke στη Γερμανία. Χρησιμοποιείται σε πλήθος εφαρμογές στα καλλυντικά, φάρμακα και απορρυπαντικά για την αξιολόγηση της τραχύτητας του δέρματος και της μικροτοπογραφίας του, καθώς και στη βασική δερματολογική έρευνα των ανθρώπων. Αναλύει την κατανομή των γκρι επιπέδων και επιτρέπει τον υπολογισμό των τεσσάρων κλινικών παραμέτρων για να περιγράψει ποιοτικά και ποσοτικά την επιφάνεια του δέρματος ως έναν δείκτη (index)

- **Sesm** : Απαλότητα-λείανση του δέρματος (Skin Smoothness)
- **Ser** : Τραχύτητα του δέρματος (Skin Roughness)
- **Sesc**: Φολίδωση του δέρματος (Skin Scaliness)
- **Sew**: Ρυτίδες του δέρματος (Skin Wrinkles)

Στο τέλος της αντιοξειδωτικής- αντιγηραντικής θεραπείας στη κλινική μελέτη που διεξάγαμε για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα της δράσης του α-LA σε κάθε ομάδα εθελοντών θα πρέπει οι μετρούμενοι παράμετροι του δέρματος να παρουσιάζουν τιμή (αυθαίρετες μονάδες) σε σχέση με την αρχική τιμή (baseline), εφόσον υπάρχει μείωση των λεπτών γραμμών και βελτίωση της εμφάνισης του δέρματος, ως εξής :

- **Sesm**: *Αύξηση*, αφού είναι αντιστρόφως ανάλογο του πλάτους των ρυτίδων. Βελτίωση της απαλότητας (λείανσης) της επιδερμίδας.
- **Sew**: *Μείωση*, αφού είναι ανάλογο του συνολικού αριθμού και του πλάτους των ρυτίδων.
- **Ser** : *Μείωση*, αφού είναι αντιστρόφως ανάλογο με την απαλότητα του δέρματος. Μείωση της τραχύτητας της επιδερμίδας.
- **Sesc**: *Μείωση*, αφού είναι αντιστρόφως ανάλογο με την ενυδάτωση και την απαλότητα του δέρματος. Μείωσης φολίδων του δέρματος.

Οι ρυτίδες ανάλογα με τη μορφολογία τους, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες :

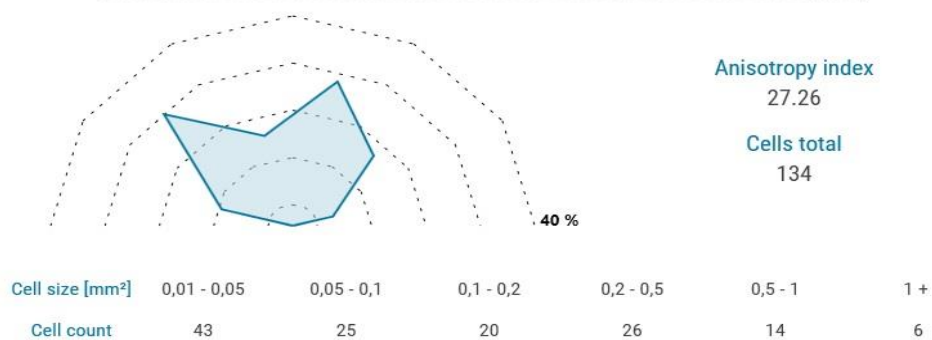
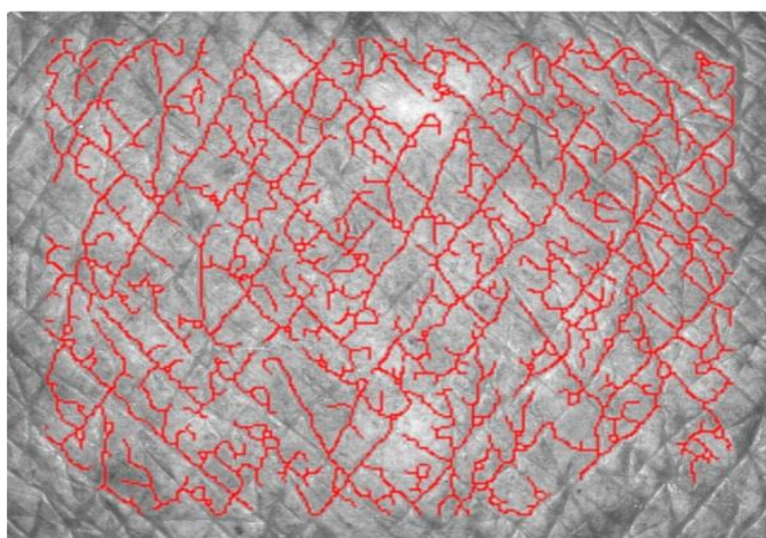
α) Λεπτές ρυτίδες ή πτυχές (fine wrinkles or crinkles) : Είναι λεπτές, μικρές ρυτίδες της επιφάνειας του δέρματος που εμφανίζονται λόγω της βιολογικής ή ενδογενούς γήρανσης (Intrinsic aging). Οφείλονται στην αποδιοργάνωση και μείωση των κάθετων ελαστικών ινών (κολλαγόνου και ελαστίνης) που συνδέουν την επιδερμίδα με το κυρίως δέρμα. Μπορεί να υπάρχει και χαλάρωση του δερμοεπιδερμικού συνδέσμου και εξαφανίζονται με ελαφριά έκταση του δέρματος.

β) Βαθιές ρυτίδες ή αύλακες (deep wrinkles or glyphic) : Εμφανίζονται στις περιοχές του δέρματος που παρατηρείται εκφύλιση των ινών και του εξωκυττάριου υλικού το δέρματος, κυρίως λόγω της έκθεσης στη ηλιακή ακτινοβολία εξωγενής γήρανση (Extrinsic aging). Είναι μόνιμες και μπορεί να συνυπάρχει με την βιολογική-ενδογενή γήρανση.

γ) Γραμμικές ρυτίδες (linear wrinkles) : Είναι μακριές, στενές, ευθείες ή με πολύ μικρή καμπυλότητα και δεν εξαφανίζονται με την έκταση του δέρματος. Είναι οι ρυτίδες έκφρασης και συνήθως, παράλληλες με τις μυϊκές ίνες. Διακρίνονται στις οριζόντιες γραμμές του μετώπου, τις γραμμές της εξωτερικής γωνίας του ματιού (πόδι της χήνας), τις ρινοχειλικές και τις κάθετες στο άνω και κάτω χείλος.

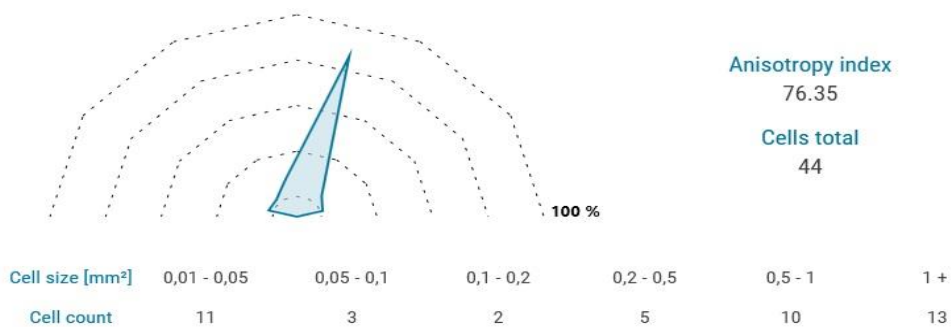
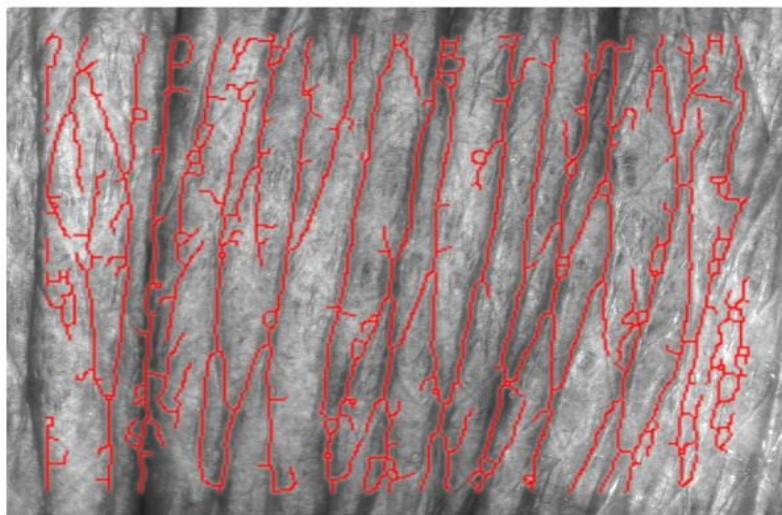
Με την συσκευή Visioscan® VC 20 μπορούν να υπολογιστούν εκτός από τις παραμέτρους της επιφάνειας του δέρματος, που αναφέρθηκαν και άλλες παράμετροι όπως : γραμμές που μπορεί να σχεδιαστούν πάνω στις εικόνες και το προφίλ της επιφάνειας του δέρματος και να φανούν αμέσως. Η τραχύτητα παρουσιάζεται με έως και 180 γραμμές τοποθετημένες κατακόρυφα, οριζόντια ή κυκλικά. Ακόμη, ειδικές παράμετροι μπορούν να περιγράψουν πραγματικά την τοπογραφία του όγκου του δέρματος (mm²). Άλλοι παράμετροι γήρανσης όπως της ανισοτροπίας (κατευθυντικότητα των γραμμών) και του μεγέθους των κυττάρων (πολύγωνα μεταξύ των ορατών γραμμών) μπορούν να υπολογιστούν.

Ένα παράδειγμα της διαφοράς της μικροτοπογραφίας του δέρματος και της παραμέτρου γήρανσης του δέρματος, όπως είναι αυτό της ανισοτροπίας των γραμμών μεταξύ ενός νεανικού και ενός γερασμένου δέρματος, απεικονίζεται στις παρακάτω εικόνες 9.4 και 9.5. Οι γραμμές στο νεανικό δέρμα (εικόνα 9.4) είναι ορατές σε όλες τις κατευθύνσεις. Έχει χαμηλή ανισοτροπία και περισσότερα πολύγωνα σχήματα μεταξύ των γραμμών.



Εικόνα 9.4. Εικόνα επιφάνειας νεανικού δέρματος [154].

Οι γραμμές στο γερασμένο δέρμα (εικόνα 9.5) είναι βαθιές, κατευθυντήριες, λιγότερα και μεγαλύτερα πολύγωνα μεταξύ των γραμμών και υψηλή ανισοτροπία.



Εικόνα 9.5. Εικόνα επιφάνειας γερασμένου δέρματος [154].

9.3.2 Ιστολογική μέθοδος- Βιοψίες (Ex vivo)

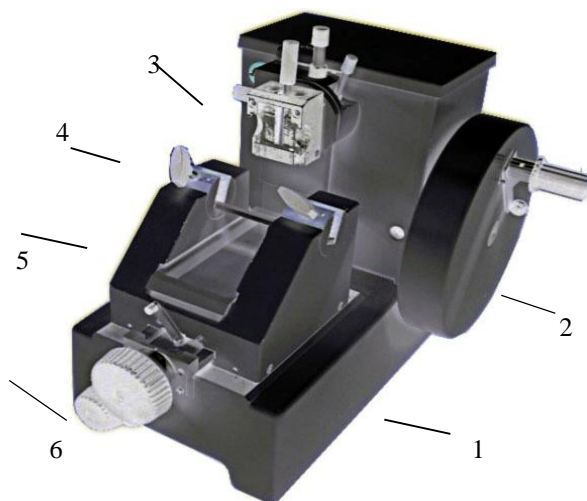
Ελήφθησαν βιοψίες διάτρησης (puncture biopsies) δέρματος (2,5-3,0 mm) από το άνω βραχίονα (forearm) από δύο εθελοντές από την κάθε ομάδα διεξαγωγής της κλινικής μελέτης, κατά την έναρξη της θεραπείας (Pre-treatment) T=0 μέρες και στο τέλος (Post treatment) T= 60 μέρες. Για τη λήψη της βιοψίας εγχέεται τοπικό αναισθητικό και χρησιμοποιείται ένα ειδικό κυλινδρικό εργαλείο, το οποίο περιστρέφεται μέσα στο δέρμα, για να αφαιρέσει ένα μικρό τμήμα του δέρματος, συμπεριλαμβανομένων και βαθύτερων στρωμάτων του. Οι βιοψίες ελήφθησαν κοντά στο σημείο βιοψίας της γραμμής βάσης, προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση ουλής στον ιστό σε αυτές τις περιοχές [155]. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εξέταση των βιοψιών του δέρματος είναι αυτή που εφαρμόζεται για την παρασκευή των μόνιμων παρασκευασμάτων κυττάρων και ιστών και είναι συνοπτικά η παρακάτω

α) Μονιμοποίηση : Είναι η χημική διαδικασία που έχει σκοπό την επεξεργασία, αλλά και την προστασία των ιστών από την αυτόλυση και τη βακτηριακή μόλυνση, καθώς και η σταθεροποίησή τους, ώστε να διατηρείται η κυτταρική δομή στα επόμενα στάδια της επεξεργασίας. Ο ιστός πρέπει να έχει μικρό μέγεθος (όχι > 5 mm) και ο λόγος επιφάνειας/πάχους να είναι $\gg 1$. Τα μονιμοποιητικά είναι η αιθανόλη, η φορμαλδεΰδη, το οξικό οξύ, το πικρικό οξύ κ.ά. Εδώ χρησιμοποιήθηκε το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μονιμοποιητικό υλικό στην ιστοπαθολογία, (διάλυμα φορμαλδεΰδης 40 % v/v), που διατίθεται στο εμπόριο με την γνωστή ονομασία φορμαλίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα. Οι αλδεΰδες γενικά σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών και με αυτό τον τρόπο διασυνδέουν τις γειτονικές πρωτεΐνες και τις σταθεροποιούν. Η μονιμοποίηση καθιστά τα κύτταρα διαπερατά στις χρωστικές, που θα χρησιμοποιηθούν στα επόμενα στάδια της μελέτης του ιστού.

β) Έγκλιση : Γίνεται σε παραφίνη με διαδοχική εμβάπτιση σε μια σειρά μιγμάτων όπως η αιθυλική αλκοόλη (70%, 100%) για την απομάκρυνση του νερού και μέσου διαύγασης (καθαρισμού), όπως το ξυλόλη ή τολουόλη για τη διάλυση του λίπους. Η έγκλιση σε παραφίνη (μέσο έγκλισης) γίνεται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία τήξης της παραφίνης. Μετά την τέλεια διαπότιση του ιστού σε υγρή

παραφίνη φτιάχνεται μπλοκ παραφίνης σε καλούπια, που διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πλεονεκτεί εκτός από τον μεγάλο χρόνο αποθήκευσης και στη δυνατότητα λήψης ομοιόμορφων και λεπτότερων τομών.

γ) Λήψη τομών : Τα δείγματα των ιστών είναι πολύ παχιά για να μπορούν τα κύτταρά τους να εξεταστούν κατευθείαν στο μικροσκόπιο και να αποκαλύψουν τις λεπτομέρειες της δομής τους. Για αυτό πρέπει να κοπούν σε λεπτές τομές (συνήθως πάχους 1-10 μm) με ένα μικροτόμο. (εικόνα 9.6). Το όργανο αυτό έχει ως κύρια μέρη το μαχαίρι που κόβει τις τομές, τη θέση που τοποθετείται το μπλοκ με το δείγμα και το μηχανισμό που φέρνει το μπλοκ με το δείγμα και το μηχανισμό που φέρνει το μπλοκ προς το μαχαίρι.



1. Βάση
2. Κοχλίας προώθησης
3. Υποδοχέας παραφίνης
4. Υποδοχέας στήριξης μαχαιριού
5. Κινούμενο μέρος
6. Μοχλός προώθησης

Εικόνα 9.6. Εικόνα μικροτόμου δέρματος.

δ) Χρώση : Σκοπός της χρώσης είναι:

1. Η αύξηση της αντίθεσης ώστε να εντοπιστούν κύτταρα και οι ιστοί και να παρατηρηθεί η μορφολογία τους. Τα περισσότερα κύτταρα είναι διάφανα. Δεν περιέχουν φυσικές χρωστικές όπως χλωροφύλλη, αιμοσφαιρίνη, ώστε να είναι δυνατή η διάκριση ανάμεσα σε αυτά και το περιβάλλον τους. Γι' αυτό ένας τρόπος αύξησης της αντίθεσης είναι η χρήση χρωστικών.

2. Η ανίχνευση συγκεκριμένων χημικών ομάδων και ενώσεων σε κύτταρα και ιστούς. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της χρωστικής καθορίζουν αν αυτή θα προσροφηθεί επιλεκτικά σε συγκεκριμένες δομές ή αν θα διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Πολλές όμως χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου δρουν βάσει φορτίου και διακρίνονται σε όξινες και βασικές. Επειδή οι περισσότερες χρωστικές δρουν σε υδατικά διαλύματα, αν οι τομές έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη πρέπει πριν τη χρώση να ενυδατωθούν αφού προηγουμένως απομακρυνθεί η παραφίνη με ξυλόλη. Η ενυδάτωση των τομών γίνεται με το πέρασμά τους από υδατικά διαλύματα αιθανόλης μειούμενης συγκέντρωσης και τελικά από νερό.

ε) Επικάλυψη τομών : Είναι το τελευταίο στάδιο για να δημιουργηθεί το μόνιμο παρασκεύασμα. Καλύπτεται με κατάλληλο διάφανο υλικό, που στη συνέχεια θα σκληρύνει. Η επικάλυψη είναι απαραίτητη για να προστατευτεί το παρασκεύασμα και να διατηρηθεί χωρίς να χάσει την ποιότητά του με το χρόνο. Χρησιμοποιείται συνθετική ρητίνη διαλυμένη σε οργανικό διαλύτη. Πάνω σε αυτή την κολλώδη ουσία τοποθετείται η καλυπτρίδα για να παραμείνει μόνιμα στη θέση της πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού προηγουμένως απομακρύνουμε όλο το νερό από την τομή με τα την χρώση με αύξουσες συγκεντρώσει απόλυτης αιθανόλης [156-158].

ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ - ΗΩΣΙΝΗΣ

Η πιο κατάλληλη και διαδεδομένη χρώση για τομές ζωικών ιστών που χρησιμοποιείται ευρέως και για ιστοπαθολογικά παρασκευάσματα είναι η διπλή χρώση Αιματοξυλίνης - Ηωσίνης. Οι δύο χρωστικές εκμεταλλεύονται τις διαφορές της χημικής σύστασης των συστατικών του ιστού και τον βάφουν με διαφορετικά χρώματα. Η σύνδεση των συστατικών του ιστού με τις χρωστικές γίνεται μέσω της ιοντικής δέσμησης και περιλαμβάνει την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των ιόντων αντίθετου φορτίου, ένα από τα οποία βρίσκεται στον ιστό, και το δεύτερο στην χρωστική. Η αιματοξυλίνη ως βασική χρωστική βάφει τον πυρήνα μπλε ενώ ηωσίνη ως όξινη χρωστική βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ. Η αιματοξυλίνη βάφει επίσης και άλλες όξινες δομές, όπως περιοχές του κυτταροπλάσματος πλούσιες σε RNA. Οι όξινες χρωστικές πάλι όπως η ηωσίνη τείνουν να βάφουν όλα τα συστατικά των ιστών ιδίως σε χαμηλό pH και για αυτό χρησιμοποιούνται για να βάφουν το φόντο με διαφορετικό χρώμα (counterstains) από εκείνο που βάφει η χρωστική που έχει επιλεγεί για τις δομές που μας ενδιαφέρουν.

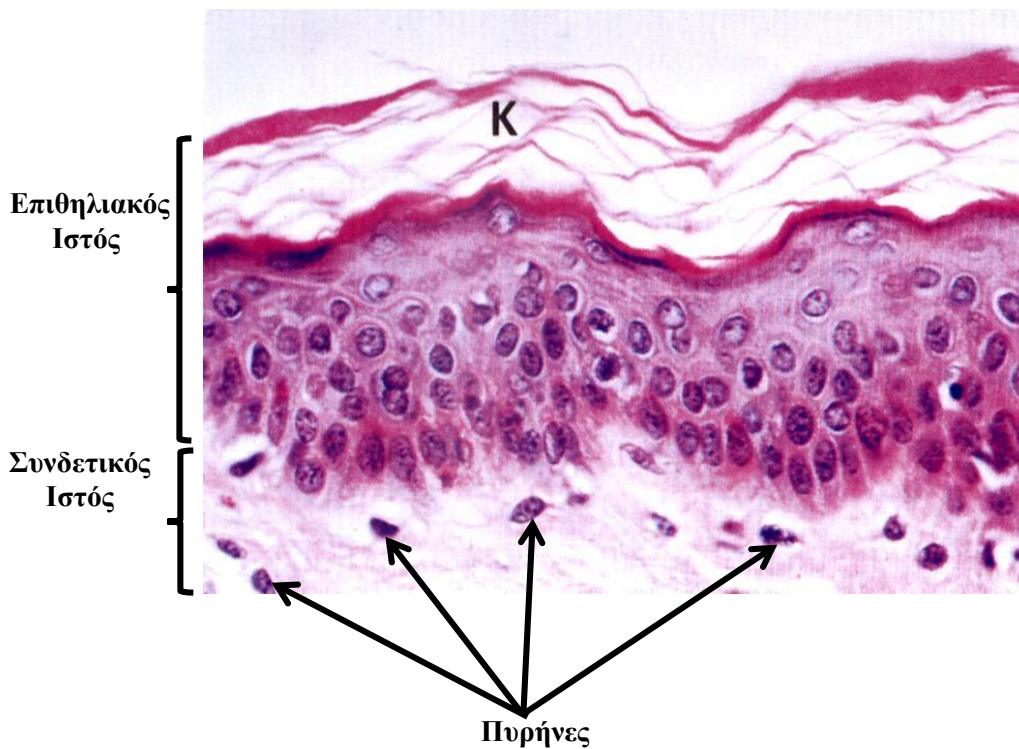
Η Αιματοξυλίνη από μόνη της δεν είναι χρωστική, και δεν μπορεί να βάψει τον ιστό. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μία «διαβρωτική» ουσία η οποία βοηθάει στην ένωση της αιματοξυλίνης με τον ιστό. Η διαβρωτική ουσία που χρησιμοποιείται είναι τυπικά ένα κατιόν μετάλλου, όπως είναι το αλουμίνιο. Η αιματοξυλίνη, σε σύμπλεγμα με άλατα αλουμινίου που είναι κατιονικά, λειτουργεί σαν μια βασική χρωστική. Τα θετικά φορτισμένα άλατα αντιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα βασεόφιλα κυτταρικά συστατικά. Χαρακτηριστικά βασεόφιλα κυτταρικά συστατικά είναι νουκλεοπρωτεΐνες πλούσιες σε αργινίνη, όπως είναι οι ιστόνες, που προσδένεται στις φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) καθώς και στις θειούχες ομάδες των γλυκοσαμινογλυκανών (GAC) και τα βάφει μπλε. Για να εξασφαλιστεί ο κορεσμός των χημικών θέσεων δέσμησης, η χρωστική εφαρμόζεται περισσότερο από όσο χρειάζεται, με αποτέλεσμα την υπερχρώση (overstaining) των ιστών. Η πλεονάζουσα ποσότητα της χρωστικής απομακρύνεται επιλεκτικά με ελεγχόμενη έκπλυση σε αλκοολικό όξινο διάλυμα, (οξινισμένη αλκοόλη). Η

διαδικασία αυτή ονομάζεται διαφοροποίηση. Το χρώμα της αιματοξυλίνης επανέρχεται όταν οι τομές εμβαπτιστούν σε αλκαλικό περιβάλλον (νερό βρύσης, Scott's tap water) οπότε προσλαμβάνει ιόντα OH^- από το νερό και σχηματίζει αδιάλυτα άλατα υδροξυλίου παίρνοντας μια μπλε απόχρωση. Η χρωστική της αιματοξυλίνης είναι μόνιμη.

Η Ηωσίνη είναι μία ερυθρά φθορίζουσα χρωστική. Είναι το άλας με κάλιο της τετραβρωμοφλουορεσκεΐνης. Είναι όξινη χρωστική, αρνητικά φορτισμένη και αντιδρά με τα θετικά φορτισμένα, οξεόφιλα συστατικά στον ιστό, όπως είναι οι αμινοομάδες των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, που τελικά βάφεται ροζ (εικ.9.7). Στον παρακάτω πίνακα 9.2 παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά του δερματικού ιστού, που έχουν βαφτεί με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης [159,160].

Πίνακας 9.2. Χρωματισμός συστατικών του ιστού του δέρματος με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΙΣΤΟΥ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	ΧΡΩΜΑ
Κολλαγόνο	Ανοικτό ροζ
Μυικές ίνες	Βαθύ ροζ
Οξεόφιλο κυτταρόπλασμα	Κόκκινο
Βασεόφιλο κυτταρόπλασμα	Μωβ
Πυρήνες	Μπλε
Ερυθροκύτταρα	Έντονο κόκκινο
Κολλαγόνο	Ανοικτό ροζ
Μυικές ίνες	Βαθύ ροζ



Εικόνα 9.7. Βιοψία Δέρματος με Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης

ΧΡΩΣΗ ΤΡΙΧΩΜΙΚΗ (MASSON'S TRICHROME)

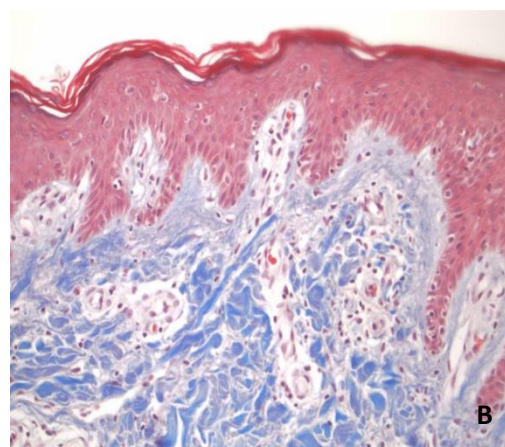
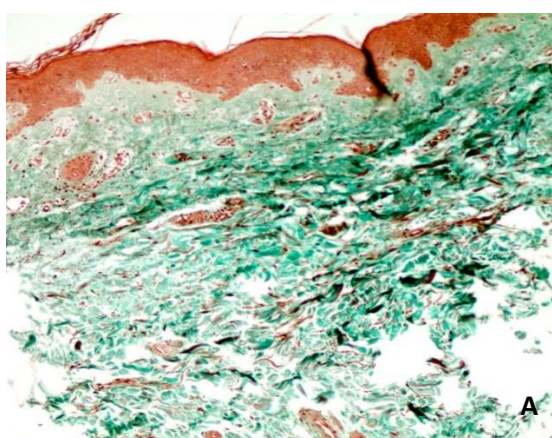
Χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση του κολλαγόνου και των λείων μυϊκών ινών σε όγκους, καθώς και για την αύξηση του κολλαγόνου σε νοσήματα όπως είναι η κύρωση του ήπατος και η πυελονεφρίτιδα. Ακόμη, ξεχωρίζει όγκους που προέρχονται από μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες. Χρώση ρουτίνας στις βιοψίες ήπατος και νεφρού. Στην κοσμητολογία, όπως εφαρμόστηκε και στο πείραμά μας, ξεχωρίζουν οι ίνες κολλαγόνου (τύπος I και III) από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, την κερατίνη, τις μυϊκές ίνες και τα οξεόφιλα κοκκία. Το κολλαγόνο, χωρίς να μπορούμε να ξεχωρίσουμε αν είναι I ή III βάφεται πράσινο ή μπλε (εικόνα 9.8), ενώ τα ερυθροκύτταρα βάφονται κίτρινα.

Ονομάζεται τριχρωμική γιατί χρησιμοποιούμε επιλεκτικά τρεις χρωστικές. Η γενική αρχή της τριχρωμικής χρώσης είναι ότι ο λιγότερο πορώδης ιστός βάφεται με την μικρότερου μοριακού βάρους χρωστική. Αντίθετα οι μεγάλοι μοριακού βάρους χρωστικές δεν μπορούν να διεισδύουν σε αυτόν. Στην περίπτωση που η μεγάλη μοριακού βάρους χρωστική διηθήσει και βάψει τον ιστό θα είναι εις βάρος της χρωστικής μικρού μοριακού βάρους. Στην αρχή ο ιστός βάφεται με μία οξεόφιλη χρωστική η οποία συνδέεται και βάφει τα οξεόφιλα συστατικά του ιστού. Η επεξεργασία με φωσφορικά οξέα επιτρέπει στον ιστό να συγκρατήσει την κόκκινη χρωστική. Το κολλαγόνο αποβάλλει την κόκκινη χρωστική, δημιουργώντας συγχρόνως δεσμούς που επιτρέπουν την σύνδεση με την χρωστική Aniline blue ή Light green. Στις τομές παραφίνης που ελήφθησαν στη μελέτη μας έγινε επεξεργασία του ιστού με διάλυμα πικρικού οξέος, που αυξάνει την ένταση και την φωτεινότητα της τριχρωμικής χρώσης. Η Χρώση του πυρήνα στην χρώση Masson's Trichrome γίνεται με χρήση της σιδηρούχας Αιματοξυλίνης (Iron hematoxylin), γιατί είναι ανθεκτική στις όξινες χρωστικές. Η Χρώση του κολλαγόνου γίνεται με τη χρωστική Aniline blue ή Methyl blue (που χρωματίζει μπλε το κολλαγόνο (τύπος I και III). Εναλλακτικά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη χρωστική Light green, όπως έγινε εδώ, που το χρωματίζει πράσινο. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να αντικαταστήσουμε το διάλυμα του Φωσφοβολφραμικού οξέος με αυτό του Φωσφομολυβδενικού οξέος [163-165].

Στον παρακάτω πίνακα 9.3 παρουσιάζονται τα κυριότερα συστατικά του δερματικού ιστού, που έχουν βαφτεί με χρώση Masson's Trichrome

Πίνακας 9.3. Χρωματισμός συστατικών του ιστού του δέρματος
με χρώση Masson's Trichrome

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΙΣΤΟΥ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	ΧΡΩΜΑ
Κολλαγόνο	Μπλε ή Πράσινο
Βασεόφιλα κοκκία	Μπλε ή Πράσινο
Βλέννη	Μπλε ή Πράσινο
Μυικές ίνες	Κόκκινο
Κυτταρόπλασμα	Κόκκινο
Ερυθροκύτταρα	Κόκκινο
Οξεόφιλα κοκκία	Κόκκινο
Κερατίνη	Κόκκινο
Ερυθροκύτταρα	Κίτρινο
Πυρήνες	Μαύρο



Εικόνα 9.8. Βιοψία Δέρματος με Χρώση Masson's Trichrome

A: χρώση με Light green, **B:** χρώση με Aniline blue

ΙΣΤΟΜΕΤΡΙΑ

Η κλινική αξιολόγηση ποιοτική και ποσοτική των βιοψιών του δέρματος (*ex vivo*) που ελήφθησαν από τους εθελοντές σε κάθε ομάδα (κρέμα με α -LA, συμπλήρωμα διατροφής με α -LA, κρέμα με α -LA και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA και κρέμα placebo χωρίς συμπλήρωμα διατροφής με α -LA) έγινε με δύο τρόπους, αφού εφαρμόστηκαν και οι δύο χρώσεις (Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης και Masson's Trichrome, εικ. 9.9).

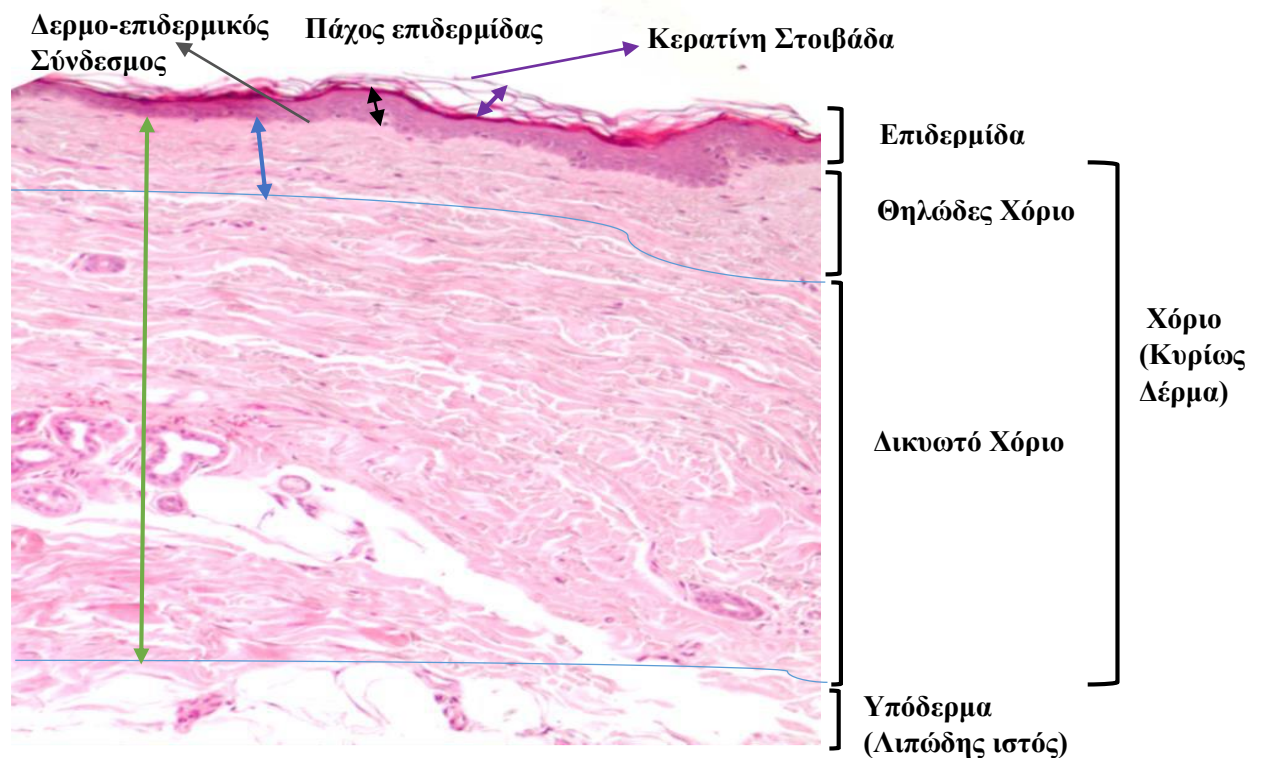


Εικόνα 9.9. Masson's Trichrome Kit

Πάχος της επιδερμίδας και του χορίου του δέρματος.

Το πάχος της επιδερμίδας και του χορίου μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φωτός (Olympus BX50) συνδεδεμένο με υπολογιστή με ειδικό μορφομετρικό λογισμικό (Olympus Cell imaging software by Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Germany). Το επιδερμικό πάχος (μm) ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ της εξωτερικής (ανώτερης) επιφάνειας της επιδερμίδας, εκτός από την κερατίνη στοιβάδα και τον δερμο-επιδερμικό σύνδεσμο (Dermo-epidermal junction). Οι μετρήσεις ελήφθησαν από τρία εξεταζόμενα τμήματα, από δύο μικροσκοπικές διαφάνειες για κάθε περίπτωση. Έγιναν πέντε τυχαίες κάθετες μετρήσεις υπό (X10, X20) μεγέθυνση. Η περιοχή μεταξύ της ζώνης της βασικής μεμβράνης και του ανώτερου ορίου της ποσότητας (υλικού) του κολλαγόνου μετρήθηκε με παρόμοιο

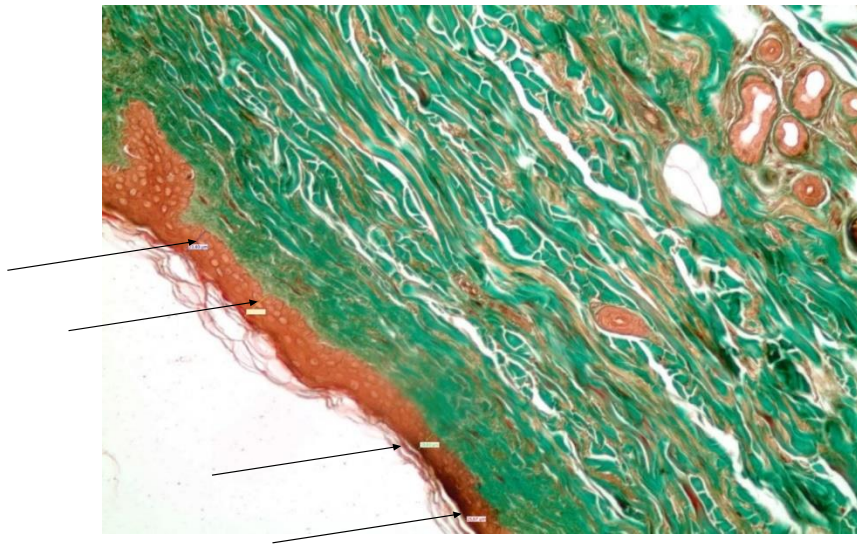
τρόπο, όπως άνω και ορίζεται ως το θηλώδες χόριο.



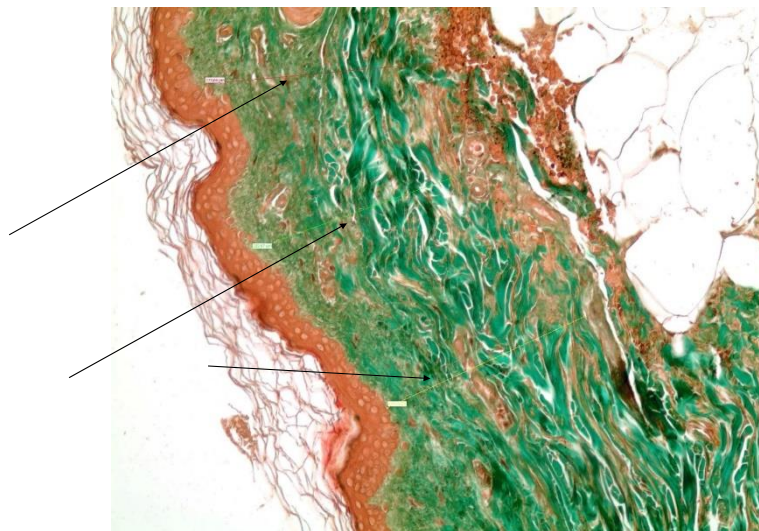
Εικόνα 9.10. Ενδεικτικές στοιβάδες σε βιοψία δέρματος εθελοντή με χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης.

- Πάχος της επιδερμίδας (μαύρο βέλος) →
- Πάχος του δέρματος (θηλώδες χόριο), μπλε βέλος →
- Πάχος του συνολικού κυρίως δέρματος (θηλώδες και δικτυωτό χόριο), πράσινο βέλος →

Στην παρούσα μελέτη μας, η αύξηση του πάχους της επιδερμίδας, δηλαδή η απόσταση της βασικής στοιβάδας από το ανώτερο σημείο της (εκτός της κερατίνης) στο τέλος της χρήσης, σε σχέση με την απόσταση στην αρχή, σημαίνει αύξηση του πάχους της επιδερμίδας (εικόνα 9.11), μετά από την αντιγηραντική θεραπεία με α-λιποϊκό οξύ και επομένως μείωση της γήρανσης του δέρματος. Ανάλογο συμπέρασμα για την αύξηση του πάχους στο χόριο (κυρίως δέρμα) οδηγούμαστε με την αύξηση της απόστασης στο θηλώδες και στο δικτυωτό χόριο από τον δερμοεπιδερμικό σύνδεσμο (εικόνα 9.12)



Εικόνα 9.11. Μέτρηση του πάχους της επιδερμίδας (βέλη), από βιοψία σε εθελοντή, σε 4 διαφορετικά σημεία (X20 μεγέθυνση) με χρώση Masson's Trichrome.



Εικόνα 9.12. Μέτρηση του πάχους του χορίου του δέρματος (βέλη), από βιοψία σε εθελοντή, σε 3 διαφορετικά σημεία (X20 μεγέθυνση) με χρώση Masson's Trichrome.

9.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε για τις μετρήσεις-πληροφορίες που ελήφθησαν κατά τη διεξαγωγή της μελέτης της μελέτης, έγινε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS™ Vers.25 (Chicago, IL, USA). Για κάθε παράμετρο που μετρήθηκε υπολογίστηκαν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση.

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των μετρήσεων με τις βιοφυσικές μεθόδους των παραγόντων απαλότητας του δέρματος (Sesm) και του συνολικού αριθμού και πλάτους των λεπτών γραμμών (Sew) εφαρμόστηκε για κάθε ομάδα εθελοντών (κρέμα με α-LA, συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα με α-LA και κρέμα Placebo χωρίς α-LA και χωρίς συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), σε σύγκριση με το χρονικό σημείο (T=0), δηλαδή πριν την εφαρμογή της αγωγής για χρονικό διάστημα T=60 μέρες, το μοντέλο «One-way Repeated Measures Anova».

Για τη σύγκριση των παραμέτρων όλων των ομάδων (groups) μεταξύ τους, μετά το τέλος της μελέτης, εφαρμόστηκε το μοντέλο Kruskal-Wallis, που είναι ένα τεστ μη-παραμετρικό της Anova για να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ τους. Οι τιμές p-Values<0.05 θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές και για τα δύο στατιστικά μοντέλα.

Ο έλεγχος Kruskal-Wallis που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των τεσσάρων ομάδων μεταξύ τους (χρήση διάμεσων τιμών), είναι μία μη παραμετρική διαδικασία που μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύγκριση τριών ή περισσότερων πληθυσμών [166-169]. Ειδικότερα :

- ✓ Αποτελεί τη μη παραμετρική εκδοχή της one-way ANOVA.
- ✓ Δεν επικεντρώνονται στον έλεγχο υποθέσεων αναφορικά με συγκεκριμένες παραμέτρους του πληθυσμού, όπως στα παραμετρικά κριτήρια.
- ✓ Εφαρμόζεται σε πλήρως τυχαιοποιημένα πειραματικά σχέδια.
- ✓ Εν γένει, έχει μικρότερη ισχύ (power) από την παραμετρική ANOVA.

- ✓ Δεν απαιτεί κανονικότητα στην κατανομή των μεταβλητών (μετρήσεων) μέσα σε κάθε ομάδα.
- ✓ Η κλίμακα μέτρησης των μεταβλητών πρέπει να είναι τουλάχιστον διάταξης (ordinal).
- ✓ Δεν απαιτούνται εκτιμήσεις των παραμέτρων των κατανομών.
- ✓ Μπορεί να εφαρμοστεί όταν τα δείγματα είναι μικρά.
- ✓ Εφαρμόζονται στις περιπτώσεις που δεν μπορούν να εφαρμοστούν έλεγχοι της παραμετρικής στατιστικής.
- ✓ Οι αναλύσεις βασίζονται στη διάταξη των δεδομένων της έρευνας (ιεραρχήσεις των τιμών)

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της αύξησης του πάχους της επιδερμίδας και του κυρίως δέρματος (χόριο) από τις μετρήσεις που ελήφθησαν από τις βιοψίες των εθελοντών για κάθε ομάδα, λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων (βιοψίες από δύο εθελοντές πριν και μετά την μελέτη για κάθε group εθελοντών) ελήφθησαν οι μέσες τιμές των μετρήσεων της απόστασης (μm) ανά ομάδα πριν και μετά την αγωγή και υπολογίστηκε η διαφορά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

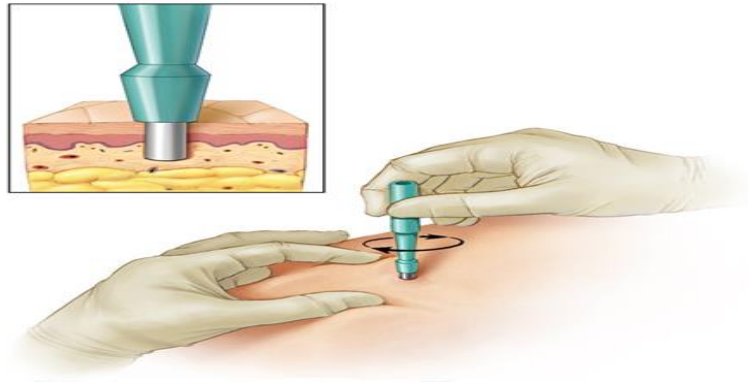
10.1 Οργανολογικός – Υλικοτεχνικός εξοπλισμός.

Για τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης με βιοφυσικές μεθόδους και με ιστολογικές χρώσεις σε βιοψίες δέρματος, προκειμένου να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική-αντιρυτιδική δράση στο πρόσωπο της κρέμας με α-LA και του συμπληρώματος διατροφής με α-LA, καθώς και για την ανάπτυξη και παραγωγή της κρέμας με α-LA και χωρίς (Placebo), χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

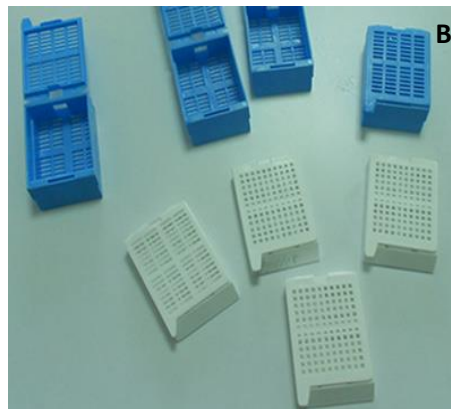
- Visioscan® VC 20
(εταιρεία Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)
- Οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX50
- Λογισμικό (Olympus Cell imaging software by Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Germany).
- Punch βιοψίας δέρματος
- Μικροτόμος δέρματος
- Ιστοκινέτα
- Κασετίνες μονιμοποίησης δέρματος
- Αιθυλική αλκοόλη (70 % v/v., 95 % v/v, 100 % v/v)
- Φορμαλδεύδη (40 % v/v)
- Παραφίνη 56-58 C
- Ξυλόλιο
- Απεσταγμένο νερό
- Masson Trichrome Goldner with light green 04 – 011802
(εταιρεία Bio Optica Milano s.p.a)

- Weigert's iron hematoxylin - A solution
- Weigert's iron hematoxylin - B solution
- Πικρικό αλκοολικό διάλυμα
- Φωσφομολυβδενικό οξύ
- Light green solution according to Goldner
- Οξικό οξύ 1% v/v
- Aniline blue ή Methyl blue
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Κλίβανος 0-80⁰ C (Memmert)



Εικόνα 10.1. Βιοψίας διάτρησης δέρματος (punch skin biopsy)

πηγή: <https://www.mayoclinic.org>



Εικόνα 10.2. Α: Ιστοκινέτα Β: Κασετίνες μονιμοποίησης ιστού δέρματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΔΕΡΜΑΤΟΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

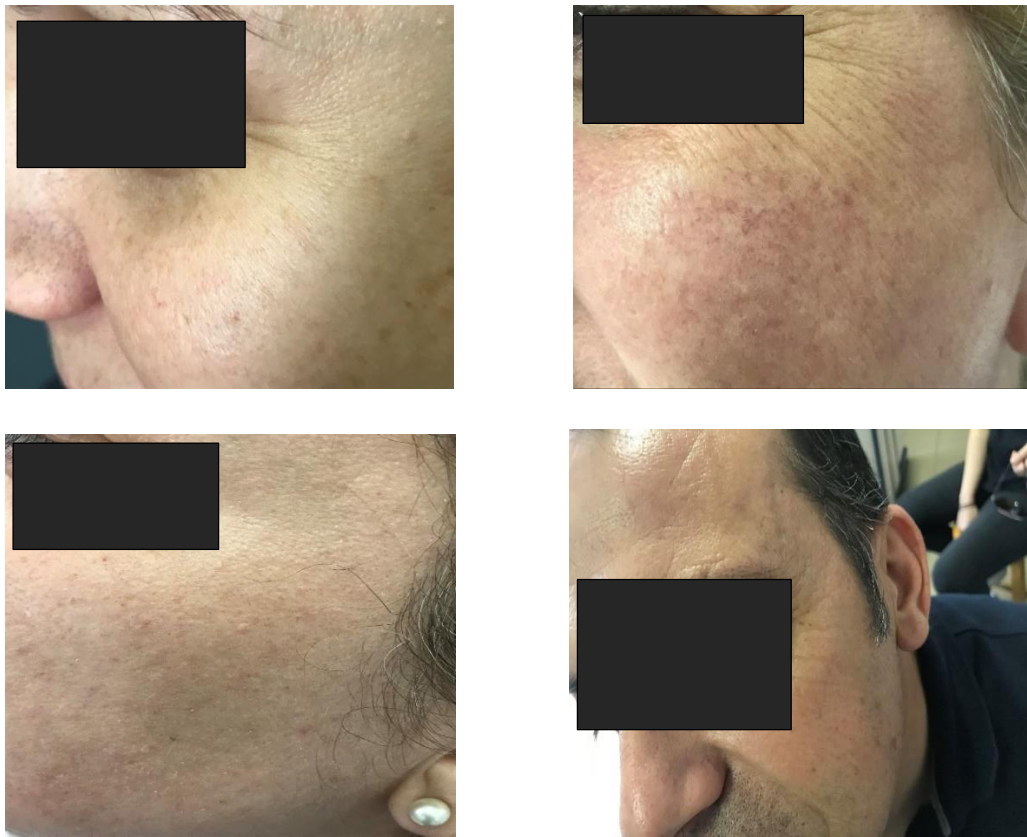
11.1 Εισαγωγή.

Κατά τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης με βιοφυσικές μεθόδους μετρήθηκαν οι παράμετροι απαλότητας-λείανσης του δέρματος (Sesm) και του συνολικού αριθμού-πλάτους των ρυτίδων (Sew) στο πρόσωπο (παρειά και άκρη του οφθαλμού) στα τέσσερα group εθελοντών, που αποτελούνταν από πέντε άτομα το καθένα, για χρονικό διάστημα δύο μηνών. Ειδικότερα, ελήφθησαν οι μετρήσεις στην αρχή T=0 μέρες, T=30 μέρες και στο τέλος της αγωγής T=60 μέρες και υπολογίστηκε η μέση τιμή (ποσοστιαία %) και η τυπική απόκλιση και έγινε η στατιστική επεξεργασία με το μοντέλο «One way repeated measures Anova» για να μετρηθεί το p-Value. Υπολογίστηκε η διαφορά στη μέση ποσοστιαία αύξηση μεταξύ της δεύτερης (T=30 μέρες) και της πρώτης περιόδου (T=0 μέρες), της τρίτης (T= 60 μέρες) και της πρώτης, αλλά και μεταξύ της δεύτερης και της πρώτης χρονικής περιόδου. Έγιναν συγκρίσεις για τις παραμέτρους της μικροτοπογραφίας του δέρματος, στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής θεραπείας στις παρακάτω τέσσερις ομάδες των πέντε (5) εθελοντών, σε σχέση με το baseline, δηλαδή την ληφθείσα τιμή στην αρχή της μελέτης, δηλαδή T=0 μέρες.

- **Ομάδα Α :** αυτοί που εφάρμοσαν τοπικά την κρέμα με α-λιποϊκό οξύ (α-LA) 1,5 % w/w δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ για δύο μήνες.
- **Ομάδα Β :** αυτοί που έλαβαν per-os συμπλήρωμα διατροφής με α-λιποϊκό οξύ (α-LA 120 mg/ καψάκι), ένα καψάκι μία φορά την ημέρα για δύο μήνες.
- **Ομάδα Γ :** αυτοί που εφάρμοσαν τοπικά την κρέμα με α-λιποϊκό οξύ (α-LA) 1,5 % w/w δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ και συγχρόνως ελάμβαναν per-os και ένα συμπλήρωμα διατροφής (α-LA 120 mg/ καψάκι), ένα καψάκι μία φορά την ημέρα, συνήθως το πρωί, για δύο μήνες.

- **Ομάδα Δ** : αυτοί που εφάρμοσαν τοπικά την κρέμα Placebo, δηλαδή την ίδια κρέμα χωρίς όμως να περιέχει λιποϊκό οξύ δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ για δύο μήνες και δεν λάμβαναν συμπλήρωμα διατροφής με α-LA

Για τη σύγκριση των παραμέτρων όλων των ομάδων (groups) μεταξύ τους, μετά το τέλος της μελέτης, εφαρμόστηκε το μοντέλο Kruskal-Wallis, για να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ τους, αφού είχαμε μικρό αριθμό δειγμάτων (20). Οι τιμές p-values <0.05 θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές.

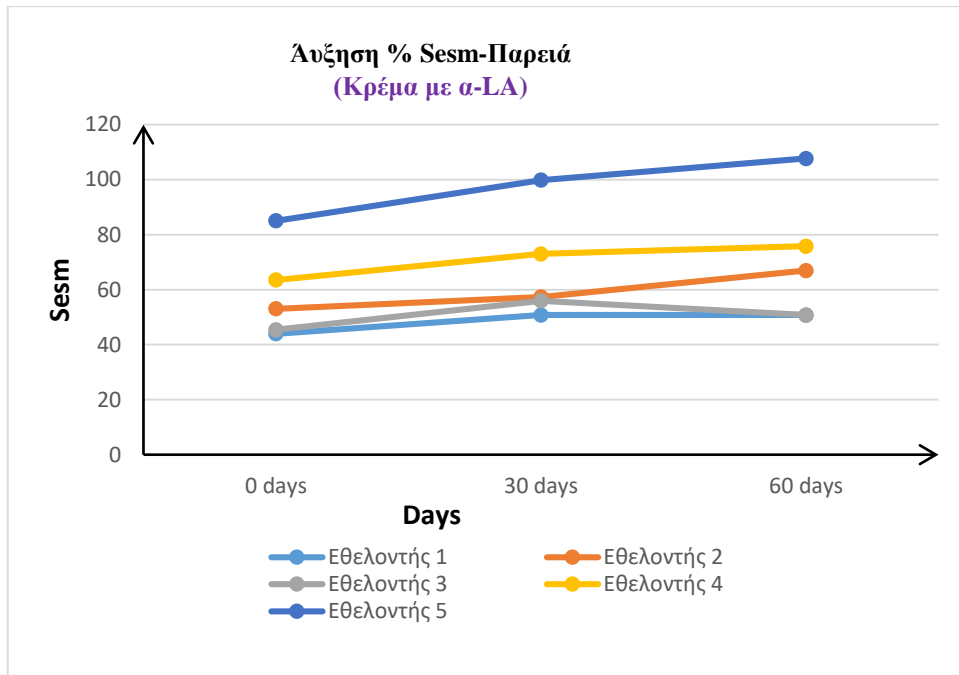


Εικόνα 11.1. Φωτογραφίες από το πρόσωπο εθελοντών που έλαβαν μέρος στην κλινική μελέτη

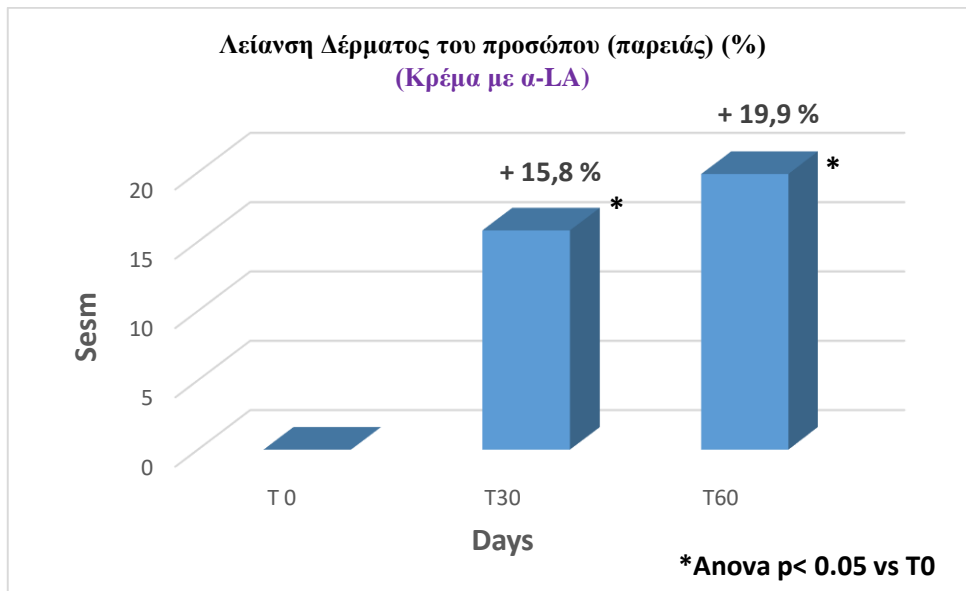
11.2 Μετρήσεις-αποτελέσματα ανά ομάδα εθελοντών (Στατιστικό μοντέλο One-Way Repeated-Measures ANOVA)

Πίνακας 11.1. Μετρήσεις Sesm-Παρειά (Group A : κρέμα με α-LA 1.5 %)

ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		ΑΥΞΗΣΗ	% ΑΥΞΗΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		% ΑΥΞΗΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>		
1	43,97	50,76	6,79	15,44	50,76	6,79	15,44
2	53,07	57,37	4,3	8,10	66,94	13,87	26,13
3	45,43	55,95	10,52	23,16	50,81	5,38	11,84
4	63,51	73,03	9,52	14,99	75,82	12,31	19,38
5	85,05	99,85	14,8	17,40	107,7	22,65	26,63
ST.DEV	16,89	19,96	3,97	5,40	23,46	6,85	6,50
		M.O 0-30 days	9,19	15,82 Anova p <0.05 vs T0	M.O 0-60 days	12,20	19,89 Anova p <0.05 vs T0



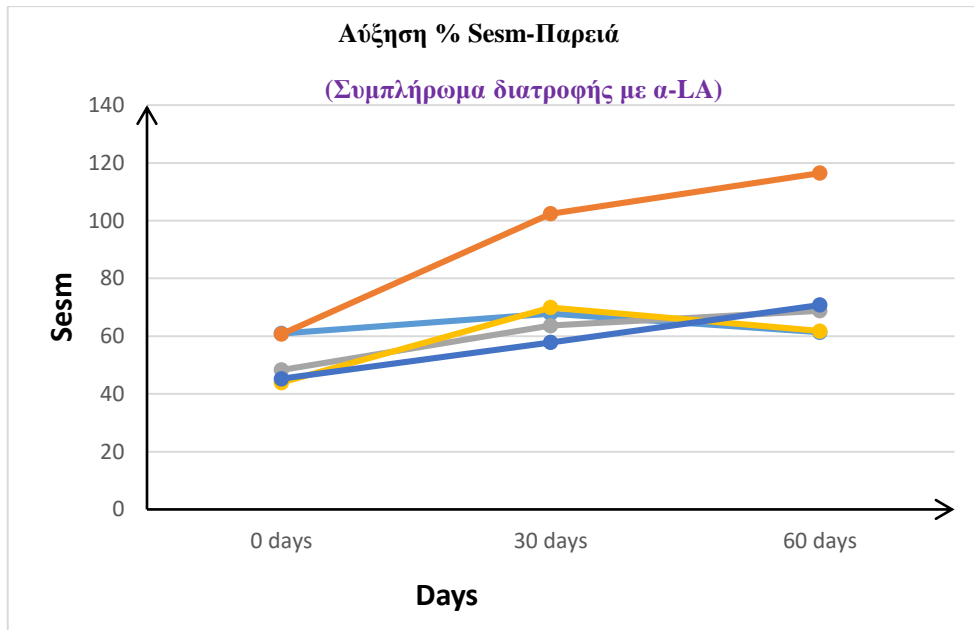
Σχήμα 11.1. Αύξηση % Sesm στην παρεία σε εθελοντές, ομάδα Α: κρέμα με α-LA



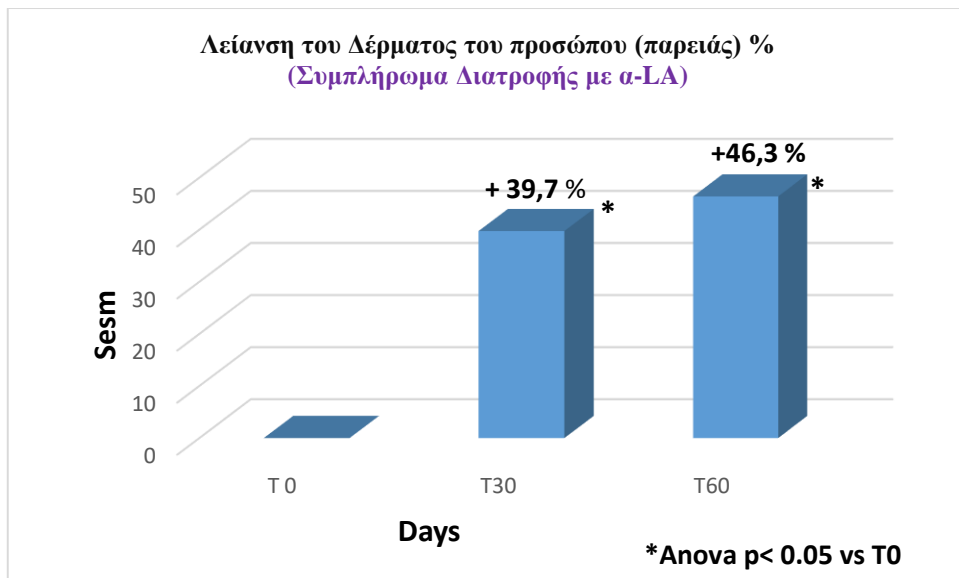
Σχήμα 11.2. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρείας) (Sesm) στην ομάδα εθελοντών Α (κρέμα με α-LA)

Πίνακας 11.2. Μετρήσεις Sesm-Παρειά (Group B: Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		ΑΥΞΗΣΗ	% ΑΥΞΗΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		ΑΥΞΗΣΗ	% ΑΥΞΗΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>			
1	60,96	67,85	6,89	11,30	61,37	0,41	0,67	
2	60,74	102,4	41,66	68,58	116,5	55,76	91,80	
3	48,34	63,65	15,31	31,67	68,81	20,47	42,34	
4	43,93	69,96	26,03	59,25	61,77	17,84	40,61	
5	45,26	57,86	12,60	27,84	70,82	25,56	56,47	
ST.DEV	8,37	17,42	13,72	23,60	23,10	20,11	32,80	
		M.O <i>0-30 days</i>	20,50	39,73 Anova p< 0.05 vs T0	M.O <i>0-60 days</i>	24,008	46,38 Anova p< 0.05 vs T0	



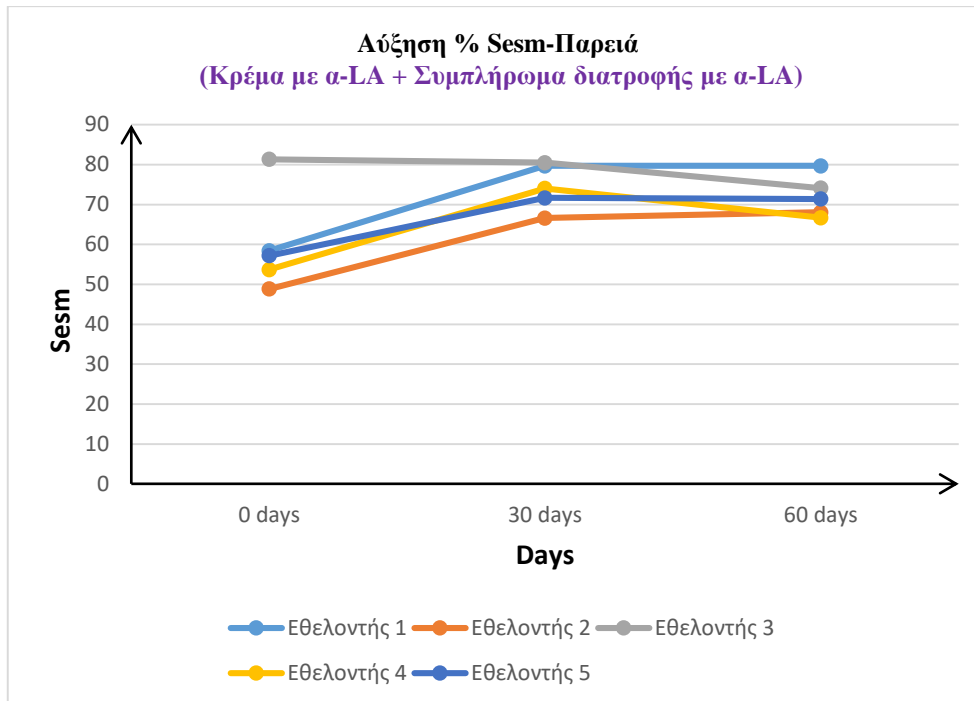
Σχήμα 11.3. Αύξηση % Sesm στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα B: συμπλήρωμα διατροφής με α-LA



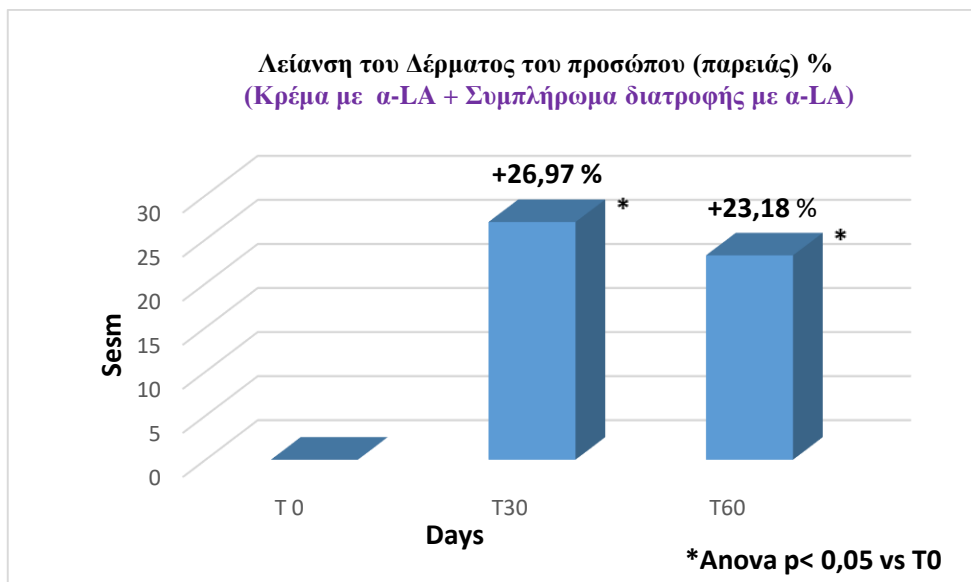
Σχήμα 11.4. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρειάς) (Sesm), στην ομάδα εθελοντών B (συμπλήρωμα διατροφής με α-LA)

Πίνακας 11.3. Μετρήσεις Sesm-Παρειά (Group Γ : Κρέμα με α-LA 1.5 % και Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		ΑΥΞΗΣΗ	% ΑΥΞΗΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		% ΑΥΞΗΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>		
1	58,42	79,67	21,25	36,37	79,67	21,25	36,37
2	48,84	66,6	17,76	36,36	68,05	19,21	39,33
3	81,32	80,49	-0,83	-1,02	74,12	-7,20	-8,85
4	53,72	74,02	20,3	37,79	66,71	12,99	24,18
5	57,17	71,65	14,48	25,32	71,4	14,23	24,89
ST.DEV	12,54	5,77	9,01	16,43	5,18	11,31	19,14
		MO 0-30 days	14,59	26,97 Anova p< 0.05 vs T0	M.O 0-60 days	12,096	23,18 Anova p< 0.05 vs T0



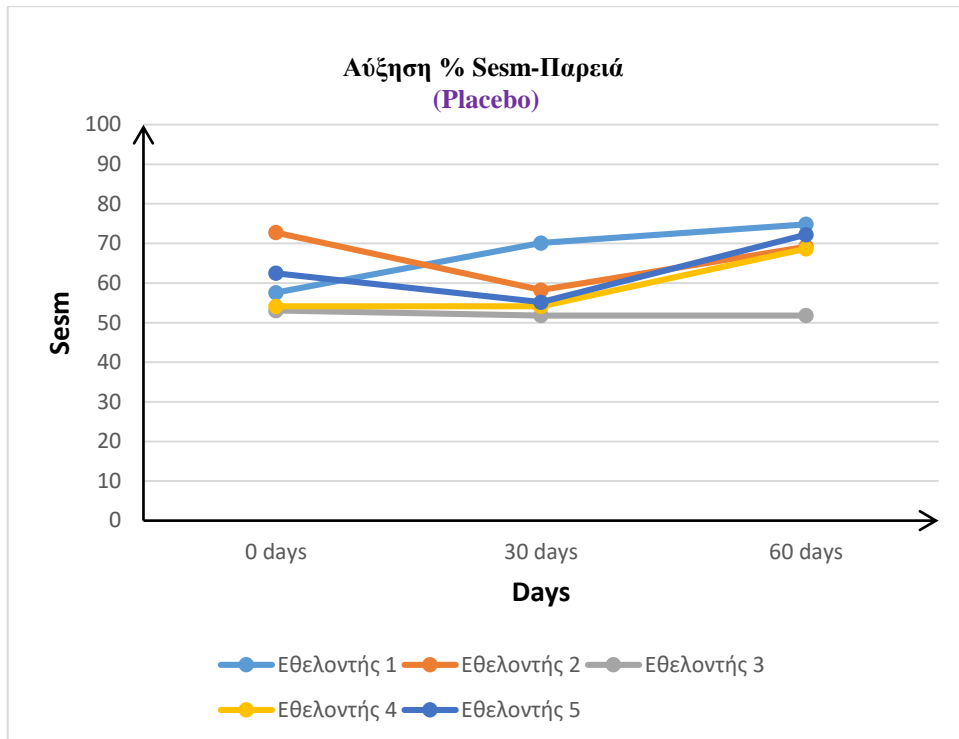
Σχήμα 11.5. Αύξηση % Sesm στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα Γ: κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA



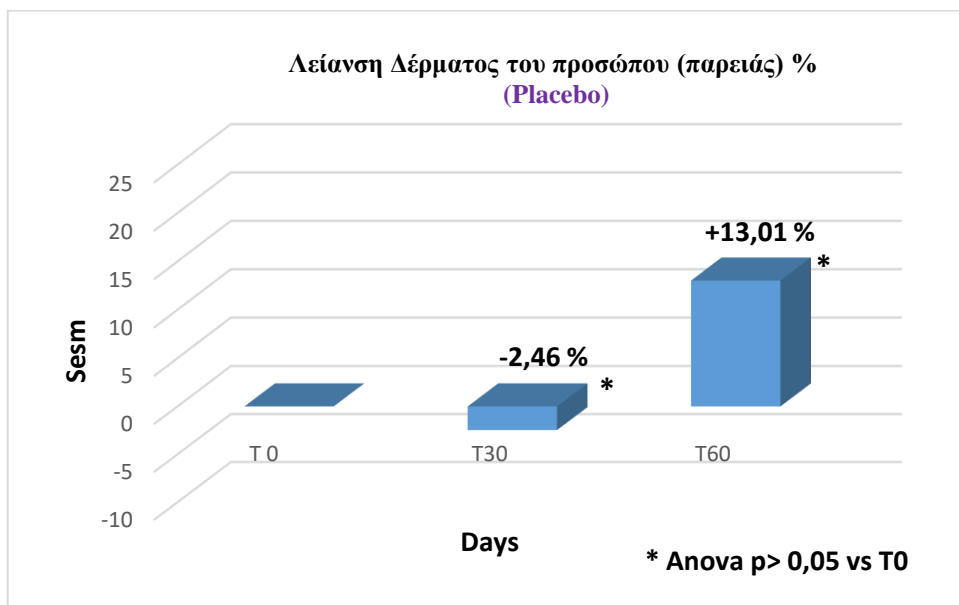
Σχήμα 11.6. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sesm) στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA & συμπλήρωμα διατροφής με α-LA)

Πίνακας 11.4. Μετρήσεις Sesm-Παρειά (Group Δ : Κρέμα Placebo, χωρίς α-LA)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		ΑΥΞΗΣΗ	% ΑΥΞΗΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sesm Παρειά		% ΑΥΞΗΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>		
1	<i>57,6</i>	<i>70,13</i>	12,53	21,75	<i>74,86</i>	<i>17,26</i>	29,96
2	<i>72,76</i>	<i>58,21</i>	-14,55	-19,99	<i>69,2</i>	<i>-3,56</i>	-4,89
3	<i>53,07</i>	<i>51,8</i>	-1,27	-2,39	<i>51,8</i>	<i>-1,27</i>	-2,39
4	<i>54,12</i>	<i>54,12</i>	0,0	0,0	<i>68,64</i>	<i>14,52</i>	26,83
5	<i>62,48</i>	<i>55,17</i>	-7,31	-11,70	<i>72,21</i>	<i>9,73</i>	15,57
ST.DEV	<i>8,02</i>	<i>7,22</i>	<i>10,02</i>	<i>15,69</i>	<i>9,04</i>	<i>9,33</i>	<i>16,15</i>
		M.O 0-30 days	-2,12	-2,47 Anova p> 0.05 vs T0	M.O 0-60 days	7,336	13,02 Anova p> 0.05 vs T0



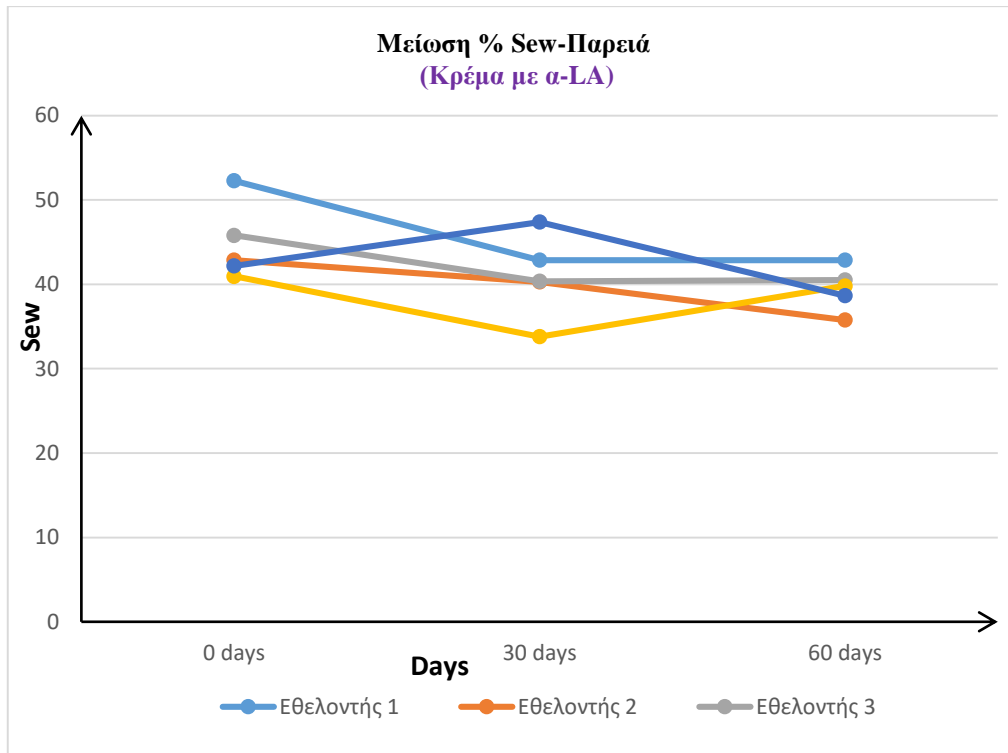
Σχήμα 11.7. Αύξηση % Sesm στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα Δ: Placebo κρέμα χωρίς α-LA



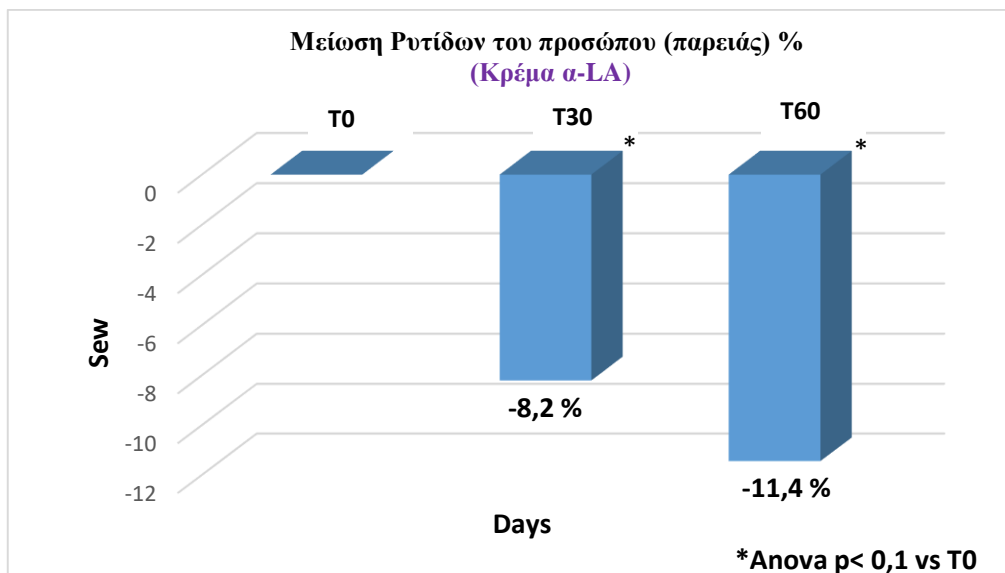
Σχήμα 11.8. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sesm) στην ομάδα εθελοντών Δ (Placebo κρέμα, χωρίς α-LA)

Πίνακας 11.5. Μετρήσεις Sew-Παρειά (Group A : Κρέμα με α-LA 1,5 % w/w)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>			
1	52,28	42,87	-9,41	-17,99	42,87	-9,41	-17,99	
2	42,87	40,29	-2,58	-6,02	35,78	-7,09	-16,54	
3	45,8	40,37	-5,43	-11,85	40,52	-5,28	-11,53	
4	40,95	33,81	-7,14	-17,43	39,82	-1,13	-2,76	
5	42,19	47,37	5,18	12,28	38,65	-3,54	-8,39	
ST.DEV	4,54	4,91	5,64	12,44	2,60	3,18	6,19	
		MO 0-30 days	-3,876	-8,21 Anova p< 0.10 vs T0	M.O 0-60 days	-5,29	-11,44 Anova p< 0.10 vs T0	



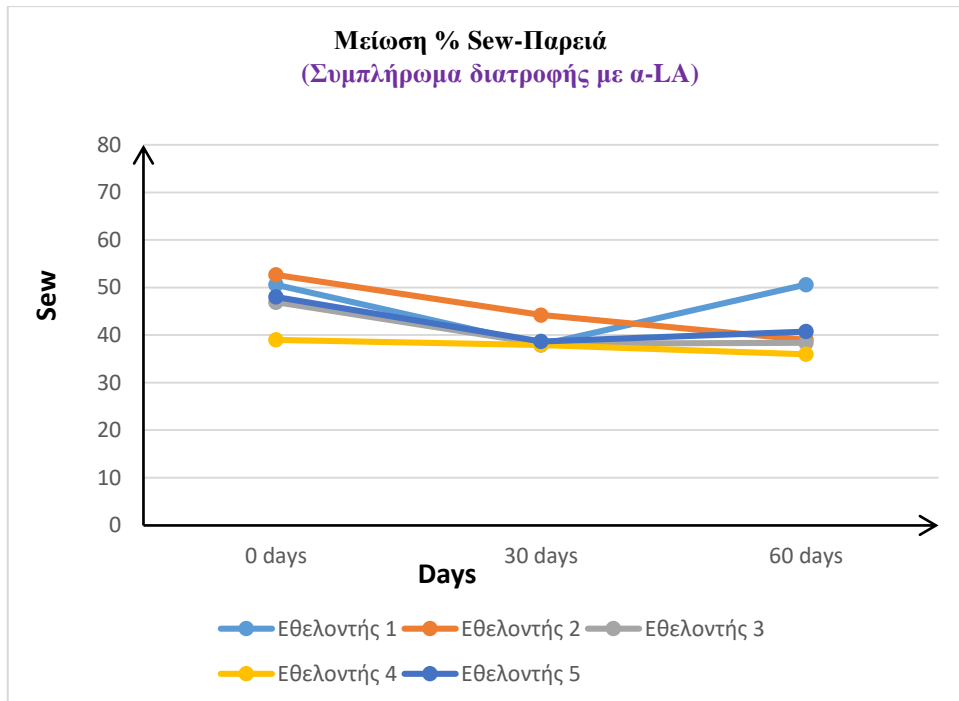
Σχήμα 11.9. Μείωση % Sew στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα Α: κρέμα με α-LA



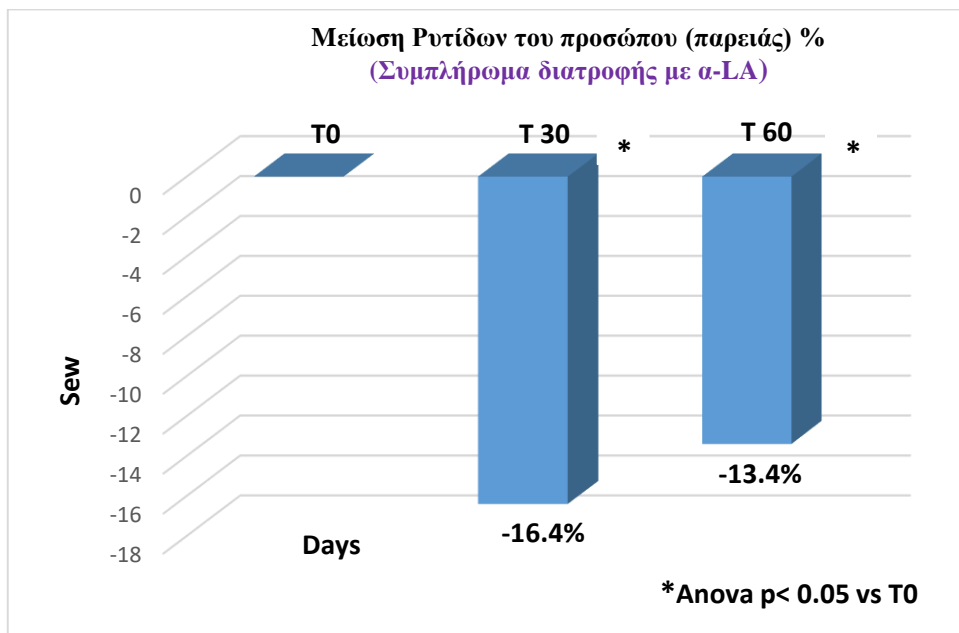
Σχήμα 11.10. Μείωση % ρυτίδων του προσώπου (παρειάς), (Sew) στην ομάδα εθελοντών (κρέμα με α-LA)

Πίνακας 11.6. Μετρήσεις Sew-Παρειά (Group B : Συμπλήρωμα διατροφής με α -LA 120 mg)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ
	0 days	30 days			60 days			
1	50,57	37,94	-12,63	-24,97	50,62	0,05	0,10	
2	52,67	44,2	-8,47	-16,08	38,98	-13,69	-25,99	
3	46,92	38,14	-8,78	-18,71	38,35	-8,57	-18,26	
4	38,98	37,91	-1,07	-2,74	35,97	-3,01	-7,72	
5	48,0	38,65	-9,35	-19,48	40,75	-7,25	-15,10	
ST.DEV	5,23	2,72	4,24	8,29	5,68	5,28	9,99	
		MO 0-30 days	-8,06	-16,40 Anova p< 0.05 vs T0	M.O 0-60 days	-6,49	-13,40 Anova p< 0.05 vs T0	



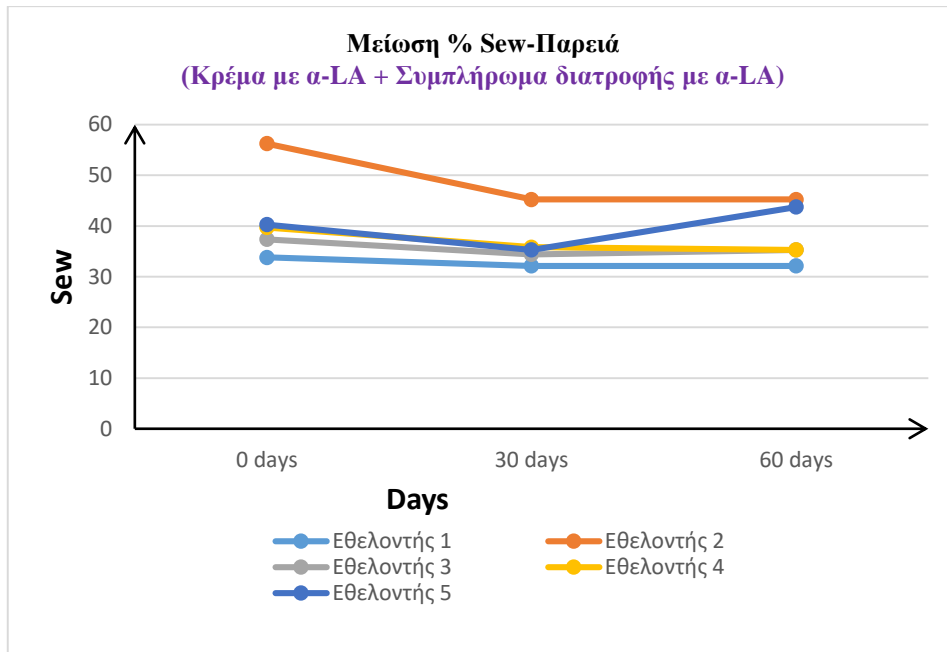
Σχήμα 11.11. Μείωση % Sew στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα Β: συμπλήρωμα διατροφής με α-LA



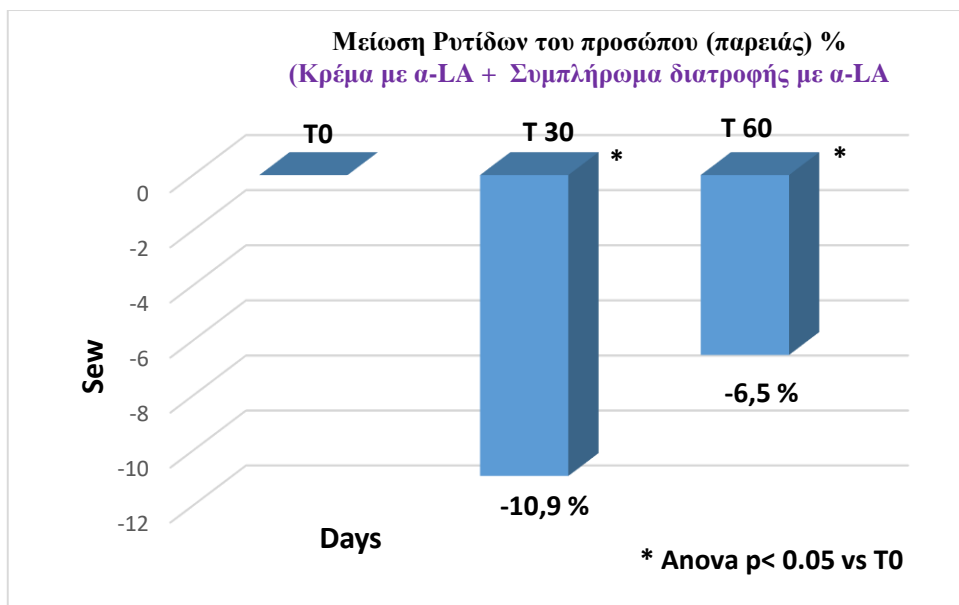
Σχήμα 11.12. Μείωση % ρυτίδων του προσώπου (παρειάς), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Β : συμπλήρωμα διατροφής με α-LA

Πίνακας 11.7. Μετρήσεις Sew-Παρειά (Group Γ : Κρέμα με α-LA 1.5 % και Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ A/A	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>			
1	33,81	32,14	-1,67	-4,94	32,14	-1,67	-4,94	
2	56,27	45,24	-11,03	-19,60	45,24	-11,03	-19,60	
3	37,37	34,40	-2,97	-7,95	35,29	-2,08	-5,56	
4	39,71	35,84	-3,87	-9,74	35,29	-4,42	-11,13	
5	40,29	35,29	-5,0	-12,41	43,75	3,46	8,59	
ST.DEV	8,65	5,04	3,63	5,56	5,79	5,26	10,30	
		MO <i>0-30 days</i>	-4,91	-10,93 Anova p< 0.05 vs T0	M.O <i>0-60 days</i>	-3,15	-6,53 Anova p< 0.05 vs T0	



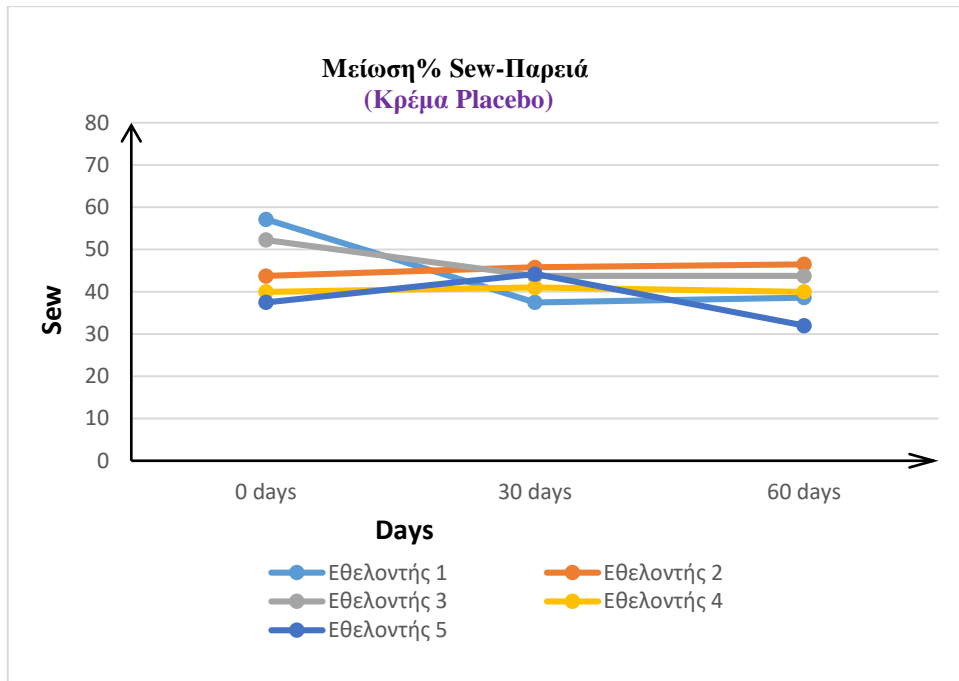
Σχήμα 11.13. Μείωση % ρυτίδων στην παρειά (Sew) στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA)



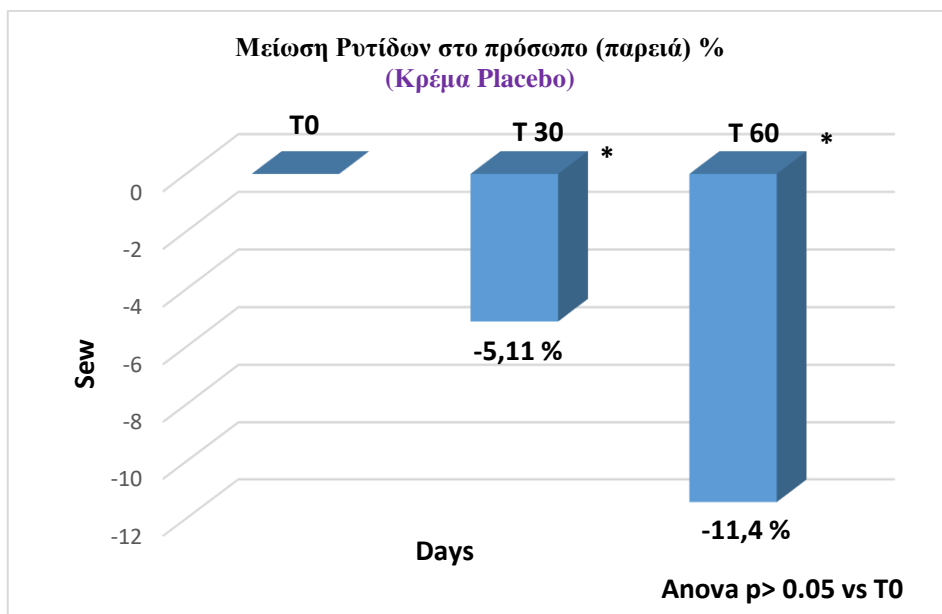
Σχήμα 11.14. Μείωση % ρυτίδων του προσώπου (παρειάς), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Γ : κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA

Πίνακας 11.8. Μετρήσεις Sew-Παρειά (Group Δ : Κρέμα Placebo, χωρίς α-LA)

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ Α/Α	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ Sew Παρειά		ΜΕΙΩΣΗ	% ΜΕΙΩΣΗ
	<i>0 days</i>	<i>30 days</i>			<i>60 days</i>			
1	<i>57,14</i>	<i>37,5</i>	-19,64	-34,38	<i>38,62</i>	-18,52	-32,41	
2	<i>43,73</i>	<i>45,8</i>	2,07	4,73	<i>46,5</i>	2,77	6,33	
3	<i>52,28</i>	<i>43,75</i>	-8,53	-16,31	<i>43,75</i>	-8,53	-16,31	
4	<i>40,0</i>	<i>41,0</i>	1,0	2,50	<i>40</i>	0,0	0,0	
5	<i>37,5</i>	<i>44,2</i>	6,7	17,87	<i>31,99</i>	-5,51	-14,70	
ST.DEV	<i>8,32</i>	<i>3,26</i>	<i>10,50</i>	<i>20,40</i>	<i>5,53</i>	<i>8,315</i>	<i>15,17</i>	
		MO <i>0-30 days</i>	-3,68	-5,12 Anova p> 0.05 vs T0	M.O <i>0-60 days</i>	-5,96	-11,42 Anova p> 0.05 vs T0	



Σχήμα 11.15. Μείωση % Sew στην παρειά σε εθελοντές, ομάδα Δ: Placebo κρέμα, χωρίς α-LA



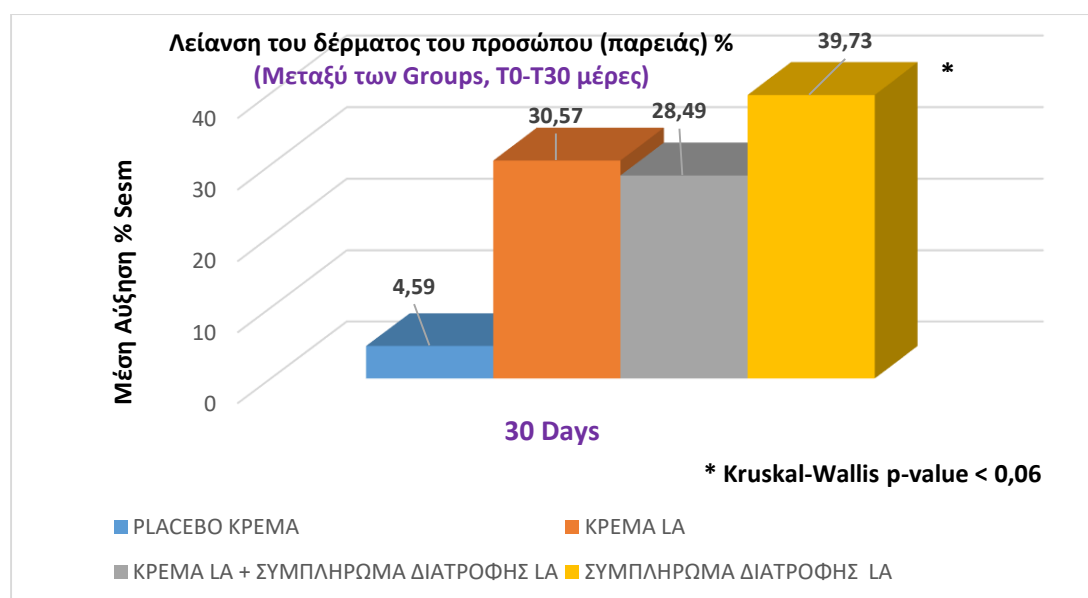
Σχήμα 11.16. Μείωση % ρυτίδων του προσώπου (παρειάς) (Sew) στην ομάδα εθελοντών Δ : Placebo κρέμα, χωρίς α-LA

11.3 Μετρήσεις-αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων εθελοντών

(στατιστικό μοντέλο Kruskal-Wallis)

Πίνακας 11.9. Μέση % αύξηση Sesm-Παρεία μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} μέτρησης (T0-T30 days)

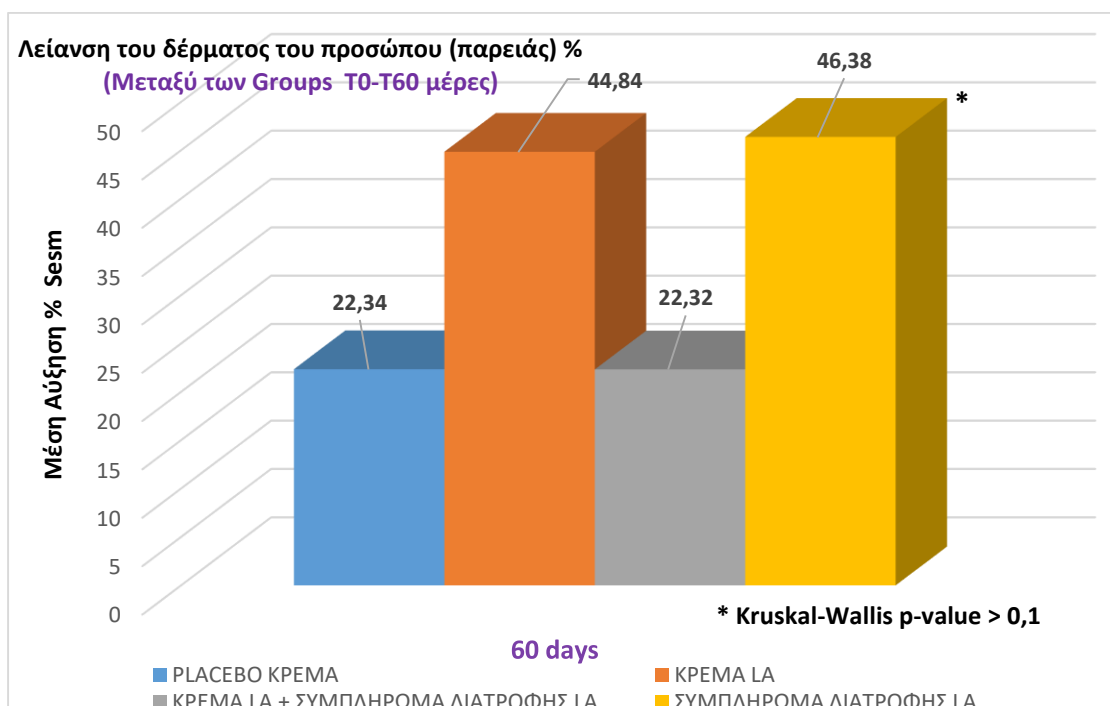
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ % ΑΥΞΗΣΗ (Sesm) T: 0-30 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	30,57
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	39,73
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	28,49
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	4,59



Σχήμα 11.17. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sesm) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T30 μέρες.

Πίνακας 11.10. Μέση % αύξηση Sesm-Παρεία μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1^{ης} και 3^{ης} μέτρησης (T0-T60 days)

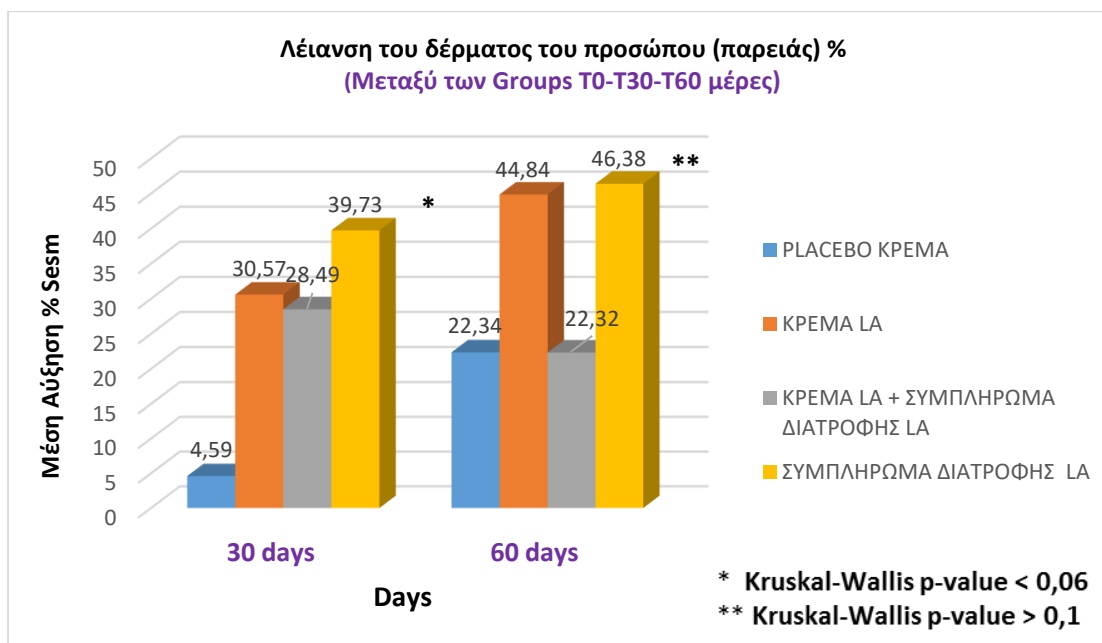
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ % ΑΥΞΗΣΗ (Sesm) T: 0-60 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	44,84
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	46,38
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	22,32
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	22,34



Σχήμα 11.18. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sesm) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T60 μέρες.

Πίνακας 11.11. Μέση % αύξηση Sesm-Παρείά μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} μέτρησης (T0,T30,T60 days)

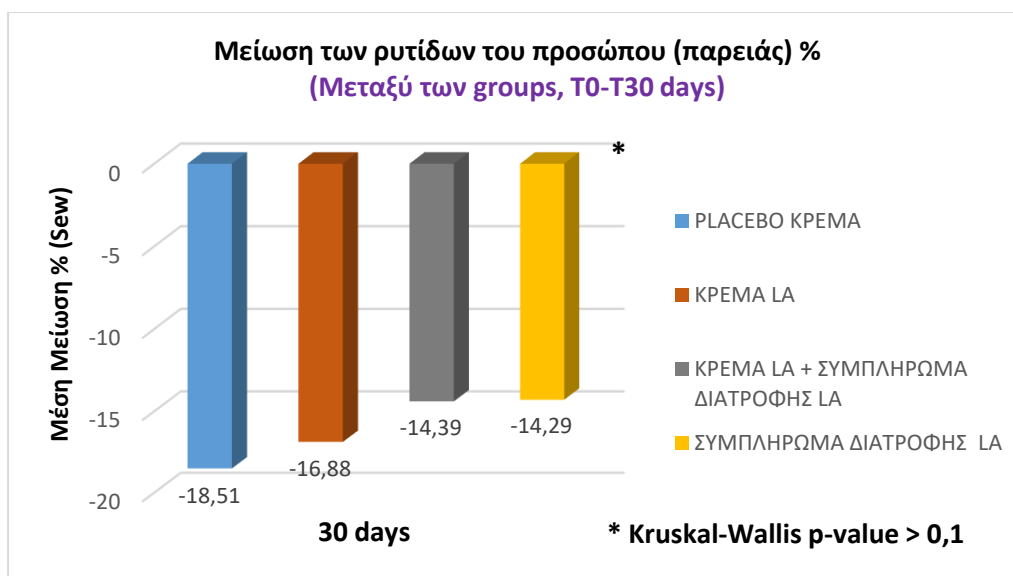
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ% ΑΥΞΗΣΗ (Sesm) T: 0-30 days	ΜΕΣΗ% ΑΥΞΗΣΗ (Sesm) T: 0-60 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	30,57	44,84
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	39,73	46,38
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	28,49	22,32
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	4,59	22,34



Σχήμα 11.19. Αύξηση % λείανσης του δέρματος του προσώπου (παρείας), (Sesm) μεταξύ των ομάδων εθελοντών (T0,T30,T60 days)

Πίνακας 11.12. Μέση % μείωση Sew-Παρεία μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1^{ης} και 2^{ης} μέτρησης (T0-T30 days)

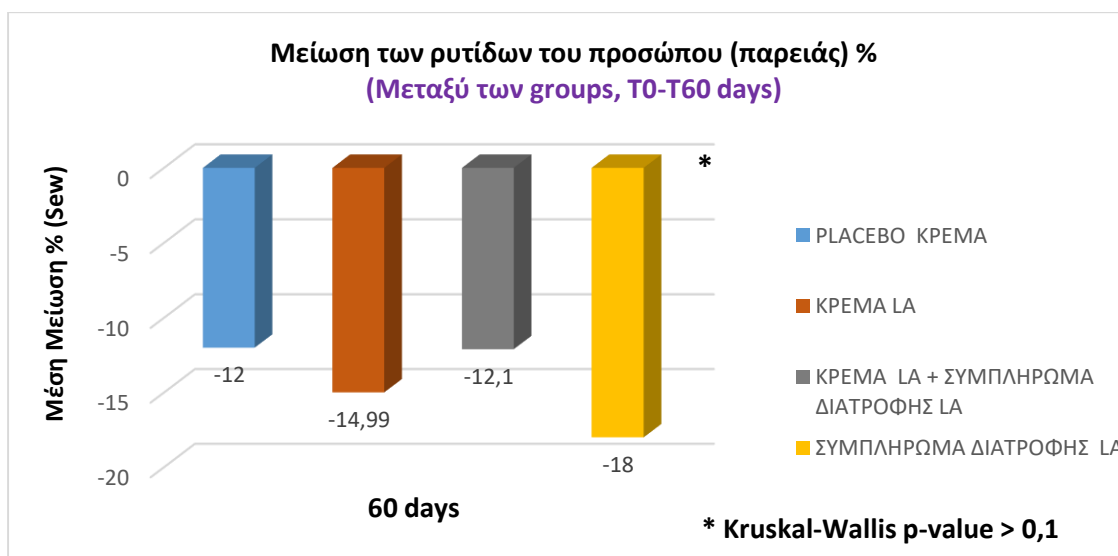
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ % ΜΕΙΩΣΗ (Sew) T: 0-30 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	-16,88
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-14,29
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-14,39
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	-18,51



Σχήμα 11.20. Μείωση ρυτίδων του δέρματος του προσώπου (παρείας), (Sew) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T30 μέρες.

Πίνακας 11.13. Μέση % μείωση Sew-Παρεία μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1^{ης} και 3^{ης} μέτρησης (T0-T60 days)

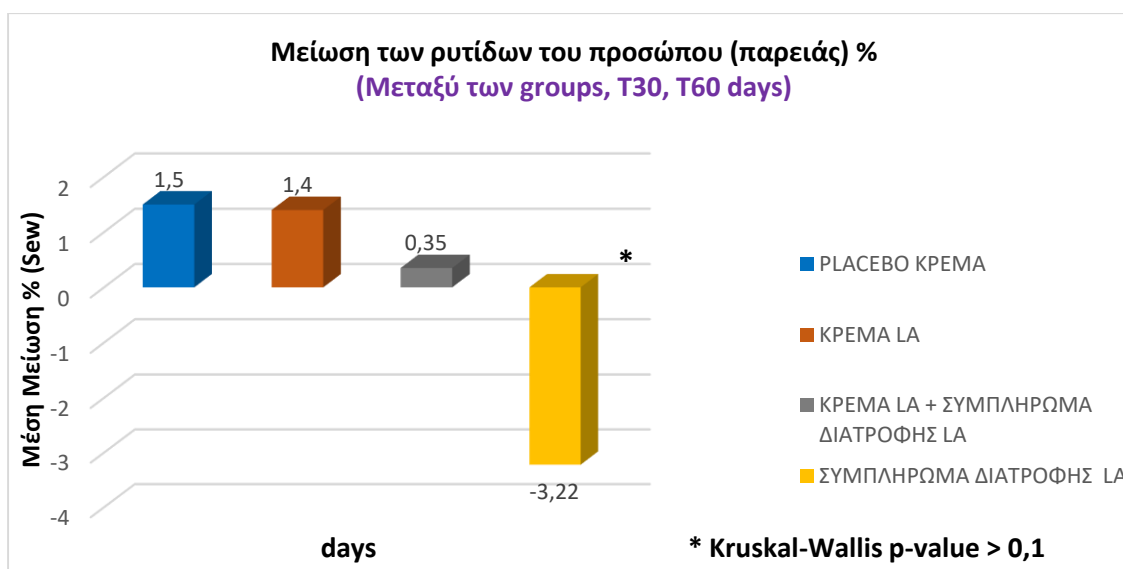
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ % ΜΕΙΩΣΗ (Sew) T: 0-60 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	-14,99
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-18,0
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-12,1
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	-12,0



Σχήμα 11.21. Μείωση ρυτίδων του δέρματος του προσώπου (παρείας), (Sew) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T60 μέρες.

Πίνακας 11.14. Μέση % μείωση Sew-Παρειά μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 2^{ης} και 3^{ης} μέτρησης (T30-T60 days)

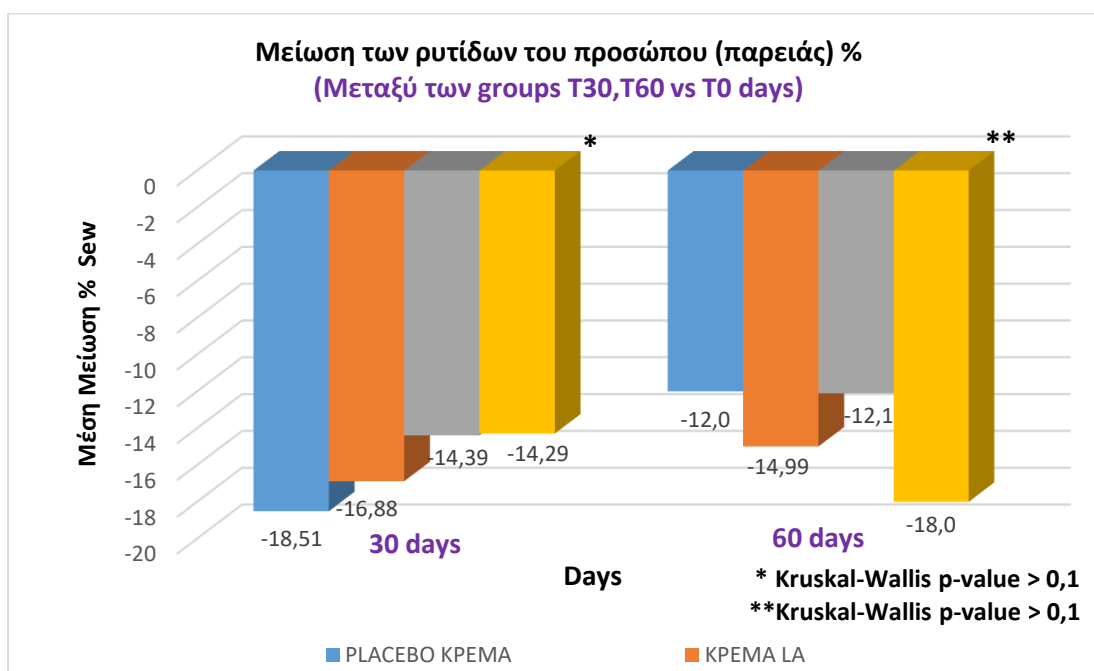
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ % ΜΕΙΩΣΗ (Sew) T30-T60 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	1,4
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-3,22
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	0,35
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	1,5



Σχήμα 11.22. Μείωση ρυτίδων του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sew) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T30-T60 μέρες.

Πίνακας 11.15. Μέση % μείωση Sew-Παρειά μεταξύ των ομάδων, μεταξύ 1ης, 2ης και 3ης μέτρησης (T0,T30,T60 days)

ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΜΕΣΗ% ΜΕΙΩΣΗ (Sew) T: 0-30 days	ΜΕΣΗ% ΜΕΙΩΣΗ (Sew) T: 0-60 days
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA	-16,88	-14,99
B ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-14,29	-18,0
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α-LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α-LA	-14,39	-12,1
Δ : ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α-LA)	-18,51	-12,0



Σχήμα 11.23. Μείωση ρυτίδων του δέρματος του προσώπου (παρειάς), (Sew) μεταξύ των ομάδων εθελοντών, (T0,T30,T60 days)

11.4 Αποτελέσματα βιοφυσικών μεθόδων.

Ελήφθησαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων, από τη μελέτη με τις βιοφυσικές μεθόδους, των παραμέτρων λείανσης (απαλότητας) του δέρματος (Sesm) και του συνολικού αριθμού και πλάτους των ρυτίδων του δέρματος (Sew). Η μελέτη έγινε σε συνολικά είκοσι (20) εθελοντές, που χωρίστηκαν σε τέσσερα (4) groups των πέντε (5) ατόμων που έλαβαν για 2 μήνες την κρέμα με τοπική εφαρμογή στο πρόσωπο πρωί-βράδυ με α-LA (1,5 % w/w) (ομάδα Α), το συμπλήρωμα διατροφής per-os με α-LA 120 mg/καψάκι (ομάδα Β), την κρέμα τοπικά και το συμπλήρωμα διατροφής per-os (ομάδα Γ) και την κρέμα Placebo και χωρίς λήψη α-LA (ομάδα Δ). Τα αποτελέσματα μετά από τη στατιστική επεξεργασία τους έδειξαν:

11.4.1 Λείανση (απαλότητα, Sesm) του δέρματος του προσώπου (παρειάς)

- 15.8 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Α (κρέμα με α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)
- 19.9 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Α (κρέμα με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής (τέλος της αγωγής), σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)
- 39,7 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Β (Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p <0.05)
- 46,3 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Β (Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθησε στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p <0.05)

- 26,97 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p <0.05)
- 23,18 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p <0.05)
- -2,46 % μείωση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Δ (κρέμα Placebo χωρίς α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p >0.05)
- +13,01 % αύξηση της λείανσης του δέρματος στην παρειά (Sesm), στην ομάδα εθελοντών Δ (κρέμα Placebo χωρίς α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθησε στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p >0.05)

11.4.2 Συνολικός αριθμός ρυτίδων του δέρματος (Sew) του προσώπου (παρειάς)

- -8,2 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Α (κρέμα με α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθησε στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 10 % (Anova p-value <0.10)
- -11,4 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Α (κρέμα με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 10 % (Anova p-value <0.10)
- -16,4 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Β (Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των

30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)

- -13,4 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Β (Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)
- -10,9 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)
- -6,5 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Γ (κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05)
- -5,1 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Δ (κρέμα Placebo χωρίς α-LA), μετά την πάροδο των 30 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value >0.10)
- -11,4 % μείωση των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά), (Sew) στην ομάδα εθελοντών Δ (κρέμα Placebo χωρίς α-LA), μετά την πάροδο των 60 ημερών της αγωγής, σε σχέση με την τιμή που ελήφθη στην αρχή T=0 μέρες (baseline), που δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value >0.10)

Με βάση τις παραπάνω αξιολογήσεις μπορούμε να συμπεράνουμε τα παρακάτω σε σχέση με την αποτελεσματικότητα των προϊόντων (κρέμα με α-LA 1,5 w/w και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg/καψάκι), καθώς και για το συνδυασμό και των δύο σχημάτων μαζί (τοπική εφαρμογή κρέμας και per-os χορήγηση του συμπληρώματος διατροφής).

- ✓ Τόσο η τοπική εφαρμογή της κρέμας στο πρόσωπο (πρωί-βράδυ), όσο και η λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής (μία φορά την ημέρα) με α-LA, αλλά και ο συνδυασμός και των δύο (κρέμας με α-LA και λήψη συμπληρώματος μαζί) έδειξαν σημαντική αύξηση, που ήταν στατιστικά σημαντική (Ανονα $p < 0.05$), στη λείανση (απαλότητα) στις ρυτίδες της επιδερμίδας του προσώπου (παρειά), παράγοντας (*Sesm*), σε σχέση με την αρχή T=0 μέρες, που ήταν η αρχική μέτρηση (baseline), μετά από την πάροδο των 30 ημερών, αλλά και των 60 ημερών (τέλος της αγωγής).
- ✓ Στις πρώτες 30 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA έχει προκαλέσει μεγαλύτερη λείανση (απλότητα) στην επιδερμίδα (παρειά), (39,7 % αύξηση) και ακολουθεί ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (26,97 % αύξηση) και μετά η εφαρμογή τοπικά της κρέμας με α-LA 1,5 % w/w (15,8 % αύξηση). Τέλος, η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA) είχε μείωση (-2,46 %) που δεν ήταν στατιστικά σημαντική.
- ✓ Στο τέλος της διενέργειας της μελέτης (60 ημέρες) φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA εξακολουθεί να έχει προκαλέσει τη μεγαλύτερη λείανση (απλότητα) στην επιδερμίδα (παρειά), (46,3 % αύξηση) και ακολουθεί πάλι ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (23,18 % αύξηση) και μετά η εφαρμογή τοπικά της κρέμας με α-LA 1,5 % w/w (19,9 % αύξηση). Τέλος, η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA) είχε την μικρότερη αύξηση +13,01 % που δεν ήταν στατιστικά σημαντική, αν και σαφώς μεγαλύτερη από αυτή των 30 μερών, προφανώς λόγω των εκδόχων της κρέμας.
- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η αύξηση (στατιστικά σημαντική $p < 0.05$) της παραμέτρου της λείανσης του δέρματος (παρειά), (*Sesm*) με την λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA 120 mg /καψάκι ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών (46,3 % αύξηση σε σχέση με 39,7 %), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline).

- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η αύξηση (στατιστικά σημαντική $p < 0.05$) της λείανσης του δέρματος (παρειά), (Sesm) με τον συνδυασμό της εφαρμογής της κρέμας με α -LA και της λήψης per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA 120 mg /καψάκι ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών (23,18 % αύξηση σε σχέση με 26,97 %), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline).
- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η αύξηση (στατιστικά σημαντική $p < 0.05$) της λείανσης του δέρματος (παρειά), (Sesm) με την εφαρμογή της κρέμας με α -LA ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών (19.9 % αύξηση σε σχέση με 15.8 %), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline).
- ✓ Η αύξηση στις 60 μέρες της λείανσης του δέρματος (παρειά), (Sesm) με την εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α -LA) είχε μεγαλύτερη αύξηση (+13,01 %) από αυτή των 30 μερών (-2,46 %) προφανώς λόγω των εκδόχων της κρέμας. Παρέμεινε όμως στατιστικά μη σημαντική.
- ✓ Τόσο η τοπική εφαρμογή της κρέμας στο πρόσωπο (πρωί-βράδυ), όσο και η λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής (μία φορά την ημέρα) με α -LA, αλλά και ο συνδυασμός και των δύο (κρέμας με α -LA και λήψη συμπληρώματος διατροφής μαζί) έδειξαν σημαντική μείωση των ρυτίδων (συνολικός αριθμός και πλάτος ρυτίδων στο πρόσωπο (παρειά), παράγοντας *Sew*, που ήταν στατιστικά σημαντική, σε σχέση με την αρχή T=0 μέρες, που ήταν η αρχική μέτρηση (baseline), μετά από την πάροδο των 30 ημερών, αλλά και των 60 ημερών (τέλος της αγωγής). Στην περίπτωση, όμως της τοπικής εφαρμογής της κρέμας η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 10 % ($p < 0.1$), ενώ στα υπόλοιπα σχήματα (συμπλήρωμα διατροφής και συνδυασμός κρέμας με α -LA και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA ήταν στατιστικά σημαντικό σε επίπεδο 5 % ($p < 0.05$))
- ✓ Στις πρώτες 30 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA έχει προκαλέσει τη μεγαλύτερη μείωση των ρυτίδων στο δέρμα (παρειά), (-16,4 %) και ακολουθεί ο συνδυασμός της κρέμας με α -LA και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA (-10,9 % μείωση) και μετά η εφαρμογή

τοπικά της κρέμας με α -LA 1,5 % w/w (-8,2 % μείωση). Τέλος, η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α -LA) είχε την μικρότερη (-5,1 % μείωση) που δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

- ✓ Στο τέλος της διενέργειας της μελέτης (60 ημέρες) φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA εξακολουθεί να έχει προκαλέσει τη μεγαλύτερη μείωση των ρυτίδων στο πρόσωπο (παρειά), (-13,4 % μείωση), αλλά ακολουθεί, όμως, η εφαρμογή τοπικά της κρέμας με α -LA (-11,4 % μείωση), αν και ήταν στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο 10 % ($p < 0.1$), που δείχνει όμως μία τάση, σε σχέση με τα υπόλοιπα που ήταν σε επίπεδο 5 % ($p < 0.05$) και ακολουθεί ο συνδυασμός της κρέμας με α -LA και συμπλήρωμα διατροφής με α -LA (-6,5 % μείωση). Τέλος, η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς LA) είχε μείωση -11,4 % που ήταν, στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 10 % ($p > 0,1$), αν και σαφώς μικρότερη από αυτή των 30 μερών (-5,1 % μείωση), προφανώς λόγω των εκδόχων της κρέμας, που έχουν μία μικρή μαλακτική και ενυδατική δράση, κατά τη διάρκεια τη αγωγής.
- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η μείωση (στατιστικά σημαντική $p < 0.05$) της παραμέτρου μείωσης των ρυτίδων του δέρματος (παρειά), (Sew) με την λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA 120 mg /καψάκι ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών (-13,4 % μείωση, T60 days σε σχέση με -16,4 %, T30 days), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline). Παρέμεινε όμως στατιστικά σημαντική.
- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η μείωση (στατιστικά σημαντική $p < 0.10$) των ρυτίδων του δέρματος (παρειά), (Sew) με την εφαρμογή της κρέμας με α -LA ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών (11,4 % μείωση σε σχέση με 8,2 %), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline).
- ✓ Μετά την πάροδο των 60 ημερών η μείωση (στατιστικά σημαντική $p < 0.05$) των ρυτίδων του δέρματος (παρειά), (Sew) με τον συνδυασμό της εφαρμογής της κρέμας με α -LA και της λήψης per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA 120 mg /καψάκι ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών

(-6,5 % % μείωση σε σχέση με -10,9 %), πάντα συγκρινόμενη με αυτή του T=0 (baseline).

- ✓ Η μείωση των ρυτίδων του δέρματος (παρειά), στις 60 μέρες (Sew) με την εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA), παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση (-11,4 %) από αυτή των 30 μερών (-5,1 %), προφανώς λόγω των εκδόχων της κρέμας. Παρέμεινε όμως στατιστικά μη σημαντική ($p>0,1$).

11.4.3 Αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων εθελοντών

(στατιστικό μοντέλο Kruskal-Wallis)

- ✓ Στις πρώτες 30 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA έχει προκαλέσει τη μεγαλύτερη λείανση (απαλότητα) (*Sesm*), στο δέρμα (παρειά), (39,7 % αύξηση) και ακολουθεί η τοπική εφαρμογή της κρέμας με α-LA (30,5 %), μετά ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (28,5% αύξηση) και τέλος η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA), που είχε την μικρότερη αύξηση (4,59 %), που δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Σύμφωνα με το κριτήριο της στατιστικής ανάλυσης του Kruskal-Wallis, που εξετάζει και συγκρίνει όλα τα group μαζί, χρησιμοποιώντας τις διάμεσες τιμές, όλα τα αποτελέσματα, εκτός της κρέμας placebo ήταν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο 6 % ($p<0.06$).
- ✓ Στο τέλος της αγωγής T=60 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA εξακολουθεί να έχει επιφέρει τη μεγαλύτερη λείανση στο δέρμα (παρειά), (46,4 % αύξηση) και ακολουθεί πάλι η τοπική εφαρμογή της κρέμας με α-LA 1,5 % w/w (44,8 %), μετά σε χαμηλότερο ποσοστό ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (22,3 % αύξηση) & τέλος η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA), που είχε την μικρότερη αύξηση (22,3 %). Σύμφωνα με το κριτήριο της στατιστικής ανάλυσης του Kruskal-Wallis, που

εξετάζει και συγκρίνει όλα τα group μαζί, όλα ήταν μη στατιστικά σημαντικά ($p>0.1$), αν και φαίνεται η διαφορά και η τάση και στο τέλος των 60 ημερών της αγωγής, για τη σαφή βελτίωση και υπερίσχυση της λείανσης των ρυτίδων στο πρόσωπο του συμπληρώματος διατροφής και ακολουθεί πολύ κοντά η κρέμα με α -LA. Αντίθετα, ο συνδυασμός κρέμας με α -LA και του συμπληρώματος διατροφής α -LA, φαίνεται ότι δεν είχε σαφή βελτίωση συγκριτικά με τα παραπάνω, αφού είχε σχεδόν ίδια αύξηση, με την κρέμα Placebo.

- ✓ Φαίνεται ότι η σημαντική βελτίωση με τη λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής με α -LA επέρχεται στις πρώτες 30 ημέρες (αύξηση 39,7 %), που είναι και στατιστικά σημαντική ($p<0.06$). Στη συνέχεια υπάρχει βελτίωση που είναι, όμως, μικρότερη στις 60 μέρες (αύξηση 46,3 %), αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική. Παρόμοια, η τοπική εφαρμογή κρέμας με α -LA έχει επιφέρει σημαντική βελτίωση στις πρώτες 30 ημέρες (αύξηση 30,6 %), που είναι και στατιστικά σημαντική ($p<0.06$). Μετά δείχνει ότι συνεχίζει να βελτιώνει τη λείανση του δέρματος (παρειά) μέχρι τις 60 ημέρες (αύξηση 44,8 %), αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.1$). Αυτό μπορεί να οφείλεται στην άμεση ανταπόκριση του δέρματος, που έχει η λήψη per-os του συμπληρώματος με α -LA, αλλά και η τοπική εφαρμογή της κρέμας με α -LA, που στη συνέχεια όμως, εξισορροπείται ή μειώνεται.
- ✓ Ανάλογο συμπέρασμα εξάγεται και για τον συνδυασμό της κρέμας με α -LA και του συμπληρώματος διατροφής με α -LA όπου η σημαντική αύξηση, που είναι στατιστικά σημαντική ($p<0.06$), επέρχεται στις πρώτες 30 ημέρες της χορήγησης per-os και της τοπικής εφαρμογής (αύξηση 28,5 %), ενώ μετά από 60 ημέρες (τέλος της αγωγής) δείχνει ότι δεν έχει καμία άλλη θετική επίδραση στην λείανση του δέρματος (παρειά), (αύξηση 22,3 %), αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p>0.10$).

- ✓ Στις πρώτες 30 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής α-LA έχει προκαλέσει παρόμοια μείωση του συνολικού αριθμού και του πλάτους των ρυτίδων (*Sew*) στο δέρμα (παρειά), (-14,2 % μείωση) μαζί με τα υπόλοιπα σκευάσματα, αν και η κρέμα Placebo έχει δείξει ελαφρώς μεγαλύτερη (-18,5%) και ακολουθεί η τοπική εφαρμογή της κρέμας α-LA με (-16,8) και μετά ο συνδυασμός της κρέμας α-LA και το συμπλήρωμα διατροφής α-LA (-14,3 μείωση). Σύμφωνα με το κριτήριο της στατιστικής ανάλυσης του Kruskal-Wallis, που εξετάζει και συγκρίνει όλα τα group μαζί χρησιμοποιώντας τις διάμεσες τιμές, όλα τα αποτελέσματα, δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p>0,1$). Αυτό προφανώς οφείλονταν στο μικρό αριθμό των εθελοντών (είκοσι συνολικά, πέντε άτομα ανά group).

- ✓ Στο τέλος της αγωγής T=60 ημέρες φαίνεται ότι η χορήγηση per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA εξακολουθεί να έχει επιφέρει τη μεγαλύτερη μείωση των ρυτίδων στο δέρμα (παρειά), (-18,0 %) και ακολουθεί πάλι η τοπική εφαρμογή της κρέμας με α-LA (-15,0 %), μετά σε χαμηλότερο ποσοστό ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (-12,1% μείωση) & τέλος η εφαρμογή της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA) μείωση (-12,0 %). Σύμφωνα με το κριτήριο της στατιστικής ανάλυσης του Kruskal-Wallis, όλα ήταν μη στατιστικά σημαντικά ($p>0,1$), αν και φαίνεται όπως και στις 30 μέρες η διαφορά και η τάση στο τέλος των 60 ημερών της αγωγής, για τη σαφή βελτίωση στη μείωση των ρυτίδων στο πρόσωπο και την υπερίχωση του συμπληρώματος διατροφής, συγκριτικά με τα υπόλοιπα σχήματα και ακολουθεί πολύ κοντά η κρέμα με α-LA.

- ✓ Μεταξύ της χρονικής διάρκειας των T=30 ημερών και T=60 ημερών φαίνεται, αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά ($p> 0,1$), ότι η βελτίωση στην μείωση των ρυτίδων του δέρματος (παρειά) ήταν πολύ μικρή μεταξύ των ομάδων, με μεγαλύτερη αν και εκείνη ελάχιστη, της ομάδας B (-3,2 %, συμπλήρωμα διατροφής με α-LA).

- ✓ Φαίνεται ότι η σημαντική βελτίωση στη μείωση του συνολικού αριθμού των ρυτίδων στο πρόσωπο (παρειά) με τη λήψη per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA (μείωση -14,29 %) επέρχεται, όπως και στην περίπτωση της λείανσης (απαλότητας) του δέρματος, στις πρώτες 30 ημέρες αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.1$). Μετά, η βελτίωση είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στις 60 μέρες (-18,0 %). Παρόμοια συμπεριφορά δείχνει και η τοπική εφαρμογή κρέμας με α-LA. Ενώ έχει επιφέρει βελτίωση στις πρώτες 30 ημέρες (μείωση -16,8 %), αν και όχι στατιστικά σημαντική ($p>0.1$) δείχνει ότι δεν συνεχίζει να βελτιώνει τη μείωση των ρυτίδων μέχρι τις 60 ημέρες (μείωση 15,0 %), αν και όχι στατιστικά σημαντικά ($p>0.1$). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι μπορεί να έχουν συνηθίσει οι υποδοχείς του δέρματος και δεν υπάρχει μεγαλύτερη ανταπόκριση με την πάροδο του χρόνου, στο τέλος της αγωγής (T= 60 μέρες), σε σύγκριση με την αρχή (T= 30 μέρες).
- ✓ Ανάλογο συμπέρασμα εξάγεται και για τον συνδυασμό της κρέμας με α-LA και του συμπληρώματος διατροφής με α-LA, όπου η μείωση των ρυτίδων στο πρόσωπο (παρειά), που ήταν (-14,3%) αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p>0.10$), επέρχεται στις πρώτες 30 ημέρες της χορήγησης per-os και της τοπικής εφαρμογής της κρέμας, ενώ μετά από 60 ημέρες (τέλος της αγωγής) δείχνει ότι δεν έχει καμία άλλη θετική επίδραση στη μείωση των ρυτίδων (μείωση -12,1 %), αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p>0.10$).
- ✓ Επιπλέον, φαίνεται ότι τόσο στο αποτέλεσμα της μείωσης των ρυτίδων όσο και στην λείανση (απαλότητα) του δέρματος (παρειά), ο συνδυασμός της κρέμας με α-LA και του συμπληρώματος διατροφής με α-LA, δεν έδρασε συνεργιστικά και δεν επέφερε μεγαλύτερη βελτίωση σε σχέση με τα υπόλοιπα σχήματα, που ελήφθησαν μόνα τους (per-os χορήγηση συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, και εφαρμογή τοπικά της κρέμας με α-LA).

- ✓ Αυτό μπορεί, αν και αναμέναμε το αντίθετο, να οφείλεται στην αντίδραση των υποδοχέων του δέρματος από την ταυτόχρονη χορήγηση ενός σκευάσματος ret-08 με α-LA και ενός τοπικού προϊόντος (κρέμας με α-LA). Ειδικότερα, μπορεί οι υποδοχείς του δέρματος να έφτασαν σε ένα μέγιστο της απόκρισης-ενεργοποίησής τους και μετά να μην είχε καμία περαιτέρω επίδραση πάνω τους η μεγαλύτερη λήψη του α-λιποϊκού οξέος, (απευαισθητοποίηση).

- ✓ Τέλος, η κρέμα Placebo (χωρίς α-LA) είχε την μικρότερη δυνατή επίδραση στη μείωση των ρυτίδων (-12,0 %) στο τέλος της αγωγής (T=60 μέρες), σε σχέση με όλα τα παραπάνω σχήματα, αν και στις 30 ημέρες είχε μία φαινομενική δράση (μείωση -18,5%), μάλλον λόγω της μαλακτικής δράσης των εκδόχων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΨΙΩΝ (*EX VIVO*)

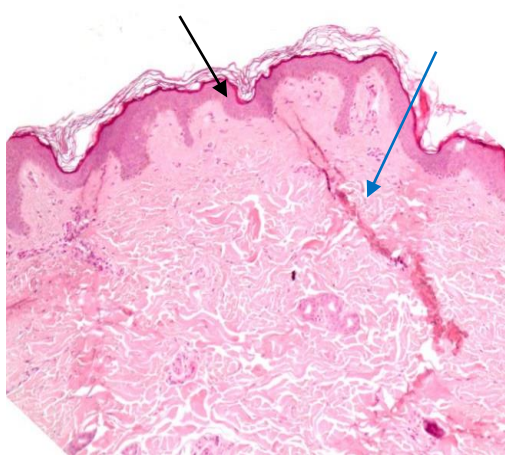
12.1 Εισαγωγή.

Κατά τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης με ιστολογικές μεθόδους ελήφθησαν βιοψίες διάτρησης δέρματος (2,5-3,0 mm) από το αντιβράχιο (forearm) από δύο εθελοντές από την κάθε ομάδα διεξαγωγής της κλινικής μελέτης, κατά την έναρξη της θεραπείας (Pre-treatment) T=0 μέρες και στο τέλος (Post treatment) T= 60 μέρες. Ομάδα Α : κρέμα με α-LA, Ομάδα Β : συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, Ομάδα Γ : κρέμα με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA και Ομάδα Δ : κρέμα placebo, χωρίς λήψη συμπληρώματος α-LA). Η κλινική αξιολόγηση (ποιοτική και ποσοτική) των βιοψιών του δέρματος (*ex vivo*) που ελήφθησαν από τους εθελοντές έγινε σε κάθε ομάδα με δύο τρόπους, αφού εφαρμόστηκαν και οι δύο χρώσεις (Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης και Masson's Trichrome).

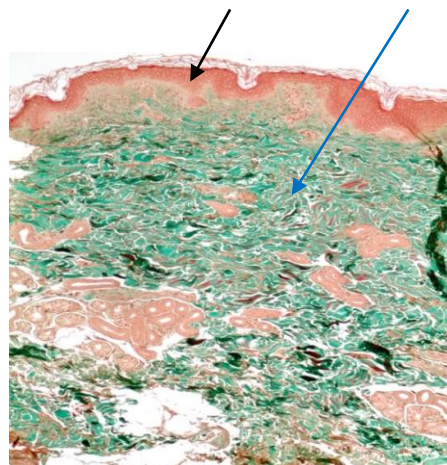
Μετρήθηκαν το πάχος της επιδερμίδας και του χορίου χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φωτός συνδεδεμένο με υπολογιστή με ειδικό μορφομετρικό λογισμικό. Το επιδερμικό πάχος (μm) μετρήθηκε ως η απόσταση μεταξύ της εξωτερικής (ανώτερης) επιφάνειας της επιδερμίδας, εκτός από την κερατίνη στοιβάδα και τον δερμο-επιδερμικό σύνδεσμο. Το πάχος του δέρματος (θηλώδες χόριο) μετρήθηκε ως η απόσταση μεταξύ της ζώνης της βασικής μεμβράνης και του ανώτερου ορίου της ποσότητας (υλικού) του κολλαγόνου στο χόριο.

12.2 Βιοψίες ανά ομάδα εθελοντών. Μετρήσεις-Αποτελέσματα.

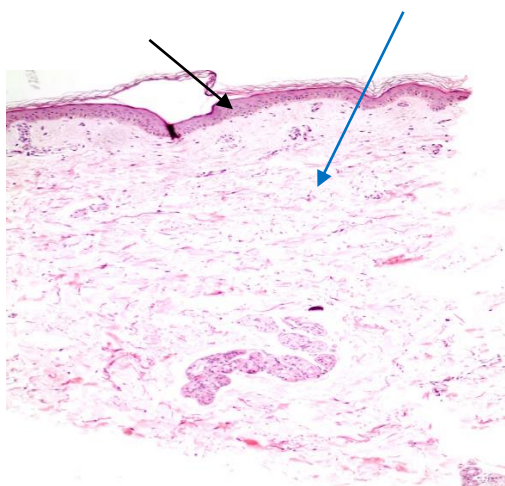
ΟΜΑΔΑ Α : Εθελοντές με κρέμα α-LA (Ex vivo)



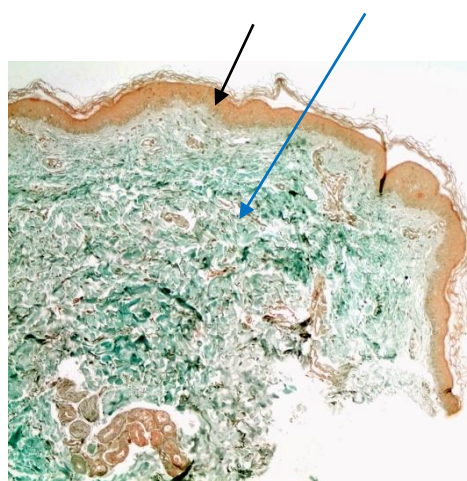
Δείγμα Νο5-έναρξη (pre)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο5-έναρξη (pre)
Χρώση Masson Trichrome Golden (10X μεγέθυνση)

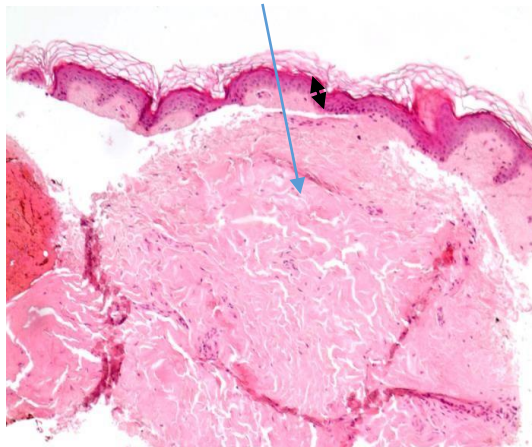


Δείγμα Νο5-τέλος (post)
Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (10X μεγέθυνση)

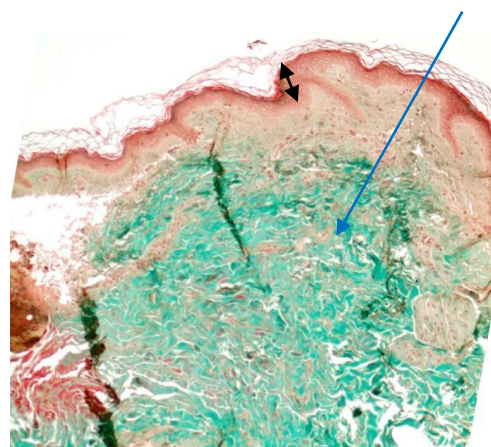


Δείγμα Νο5-τέλος (post) Χρώση
Χρώση Masson Trichrome Golden (10X μεγέθυνση)

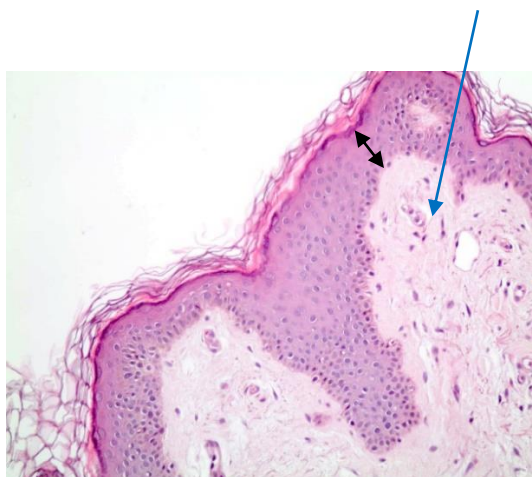
Εικόνα 12.1. Βιοψίες από εθελοντή Νο 1 (Ομάδα Α : κρέμα με α-LA 1.5 % w/w) πριν και μετά την αγωγή με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)



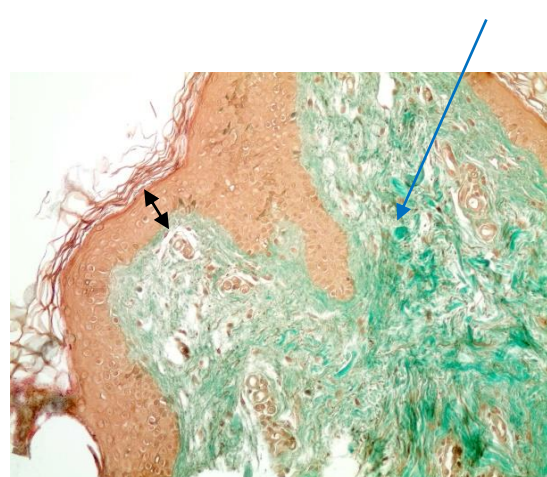
Δείγμα Νο 6-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X20 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 6-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X20 μεγέθυνση)



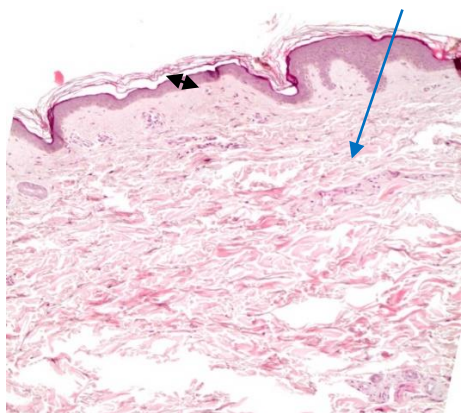
Δείγμα Νο 6-τέλος (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X20 μεγέθυνση)



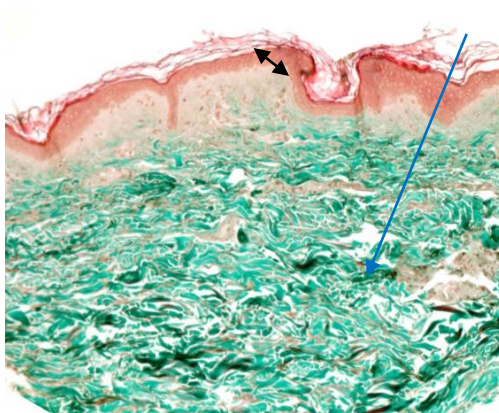
Δείγμα Νο 6-τέλος (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X20 μεγέθυνση)

Εικόνα 12.2. Βιοψίες από εθελοντή Νο 2 (Ομάδα Α : κρέμα με α -LA 1.5 % w/w) πριν και μετά την αγωγή με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)

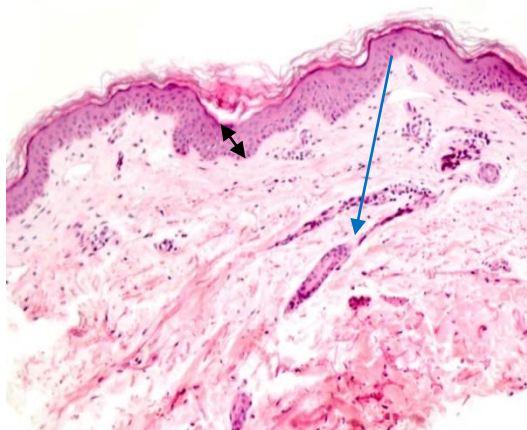
ΟΜΑΔΑ Β : Εθελοντές με Συμπλήρωμα Διατροφής με α-LA (Ex vivo)



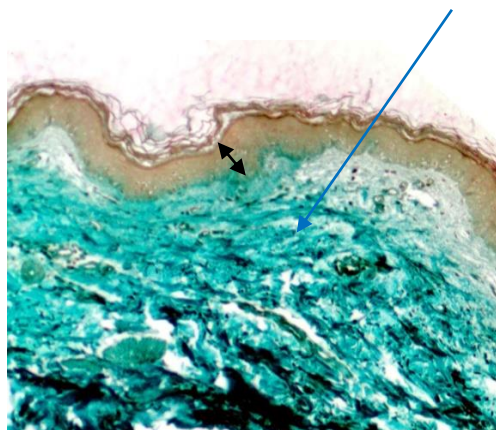
Δείγμα Νο 3-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 3-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

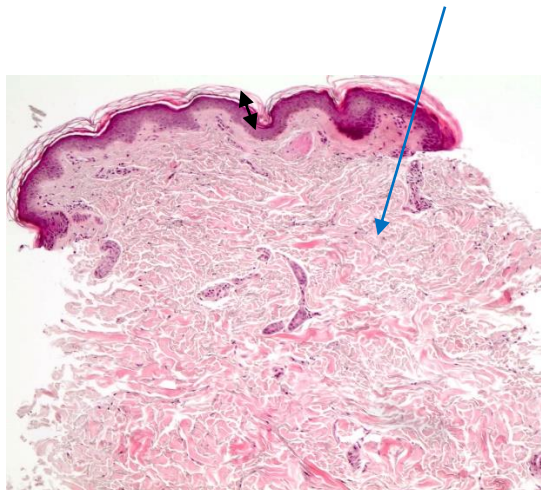


Δείγμα Νο 3-τέλος (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)

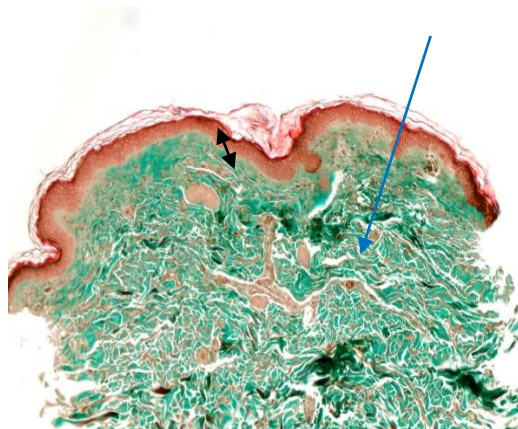


Δείγμα Νο 3-τέλος (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

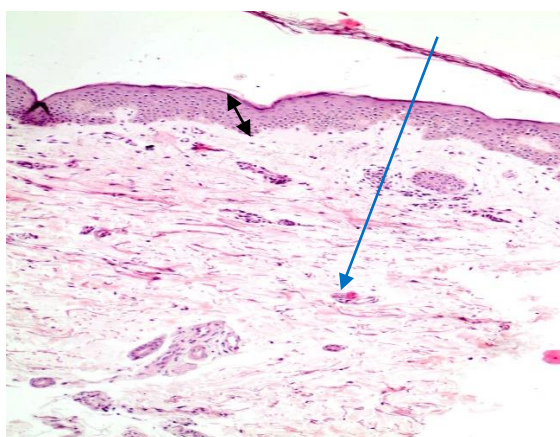
Εικόνα 12.3. Βιοψίες από εθελοντή Νο 3 (Ομάδα Β : Συμπλήρωμα με α-LA 120 mg, πριν και μετά την αγωγή, με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)



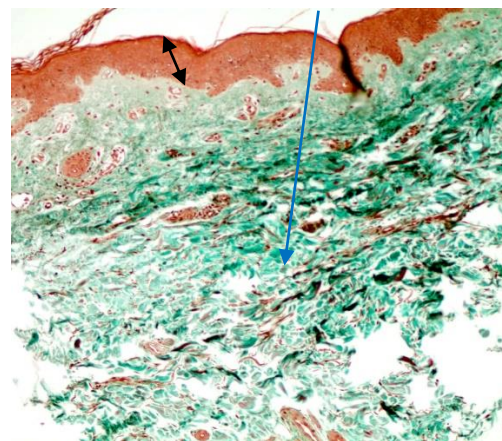
Δείγμα Νο 7-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 7-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)



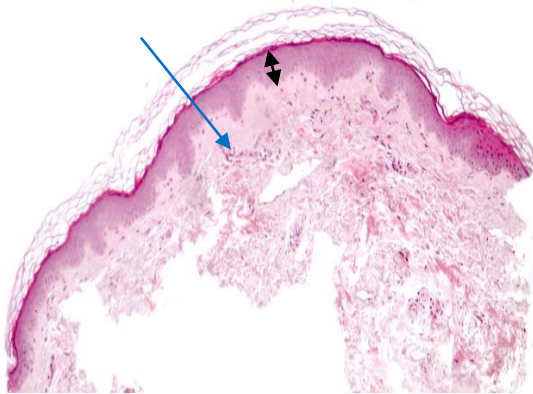
Δείγμα Νο 7-τέλος (**post**)
Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



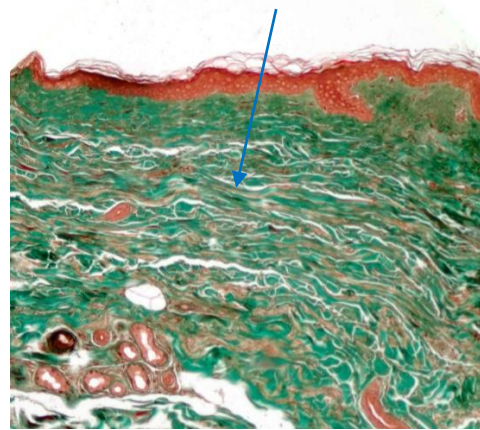
Δείγμα Νο 7-τέλος (**post**) Χρώση
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

Εικόνα 12.4. Βιοψίες από εθελοντή Νο 4 (Ομάδα Β : Συμπλήρωμα με α -LA 120 mg, πριν και μετά την αγωγή, με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)

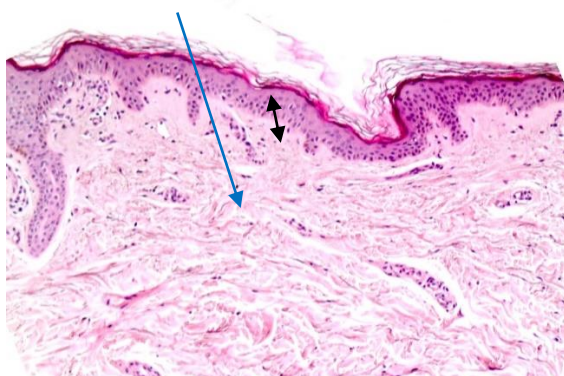
ΟΜΑΔΑ Γ : Εθελοντές με Κρέμα με α-LA & Συμπλήρωμα Διατροφής με α-LA (Ex vivo)



Δείγμα Νο 1-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 1-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

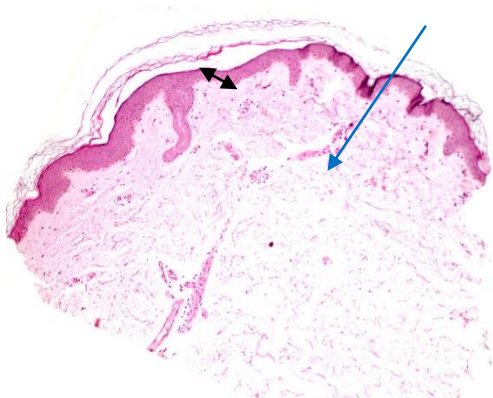


Δείγμα Νο 1-τέλος (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)

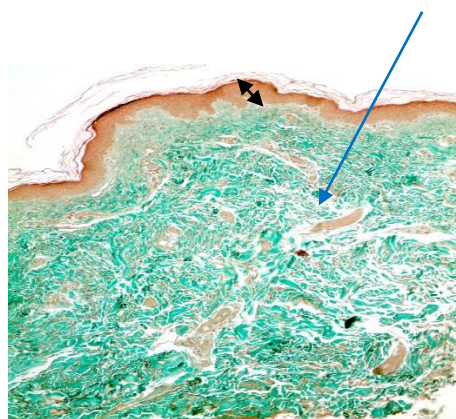


Δείγμα Νο 1-τέλος (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

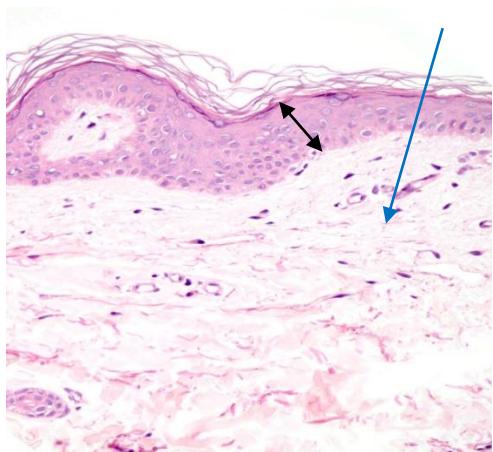
Εικόνα 12.5. Βιοψίες από εθελοντή Νο 5 (Ομάδα Γ : Κρέμα με α-LA 1,5 % w/w & Συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg, πριν και μετά την αγωγή, χρώση EX-H & MT-G



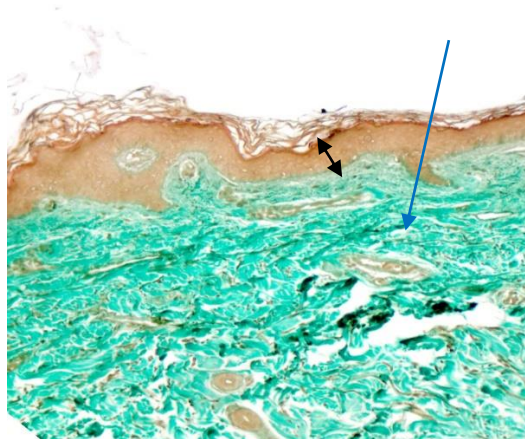
Δείγμα Νο 2-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 2-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)



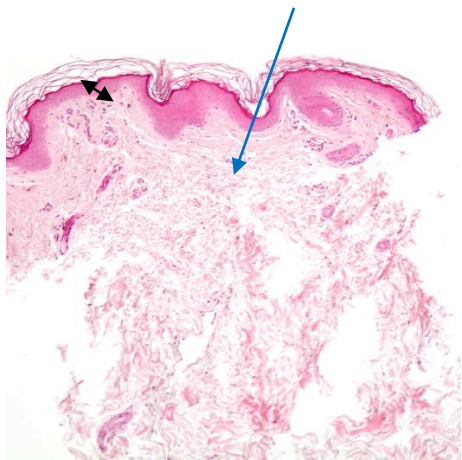
Δείγμα Νο 2-έναρξη (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



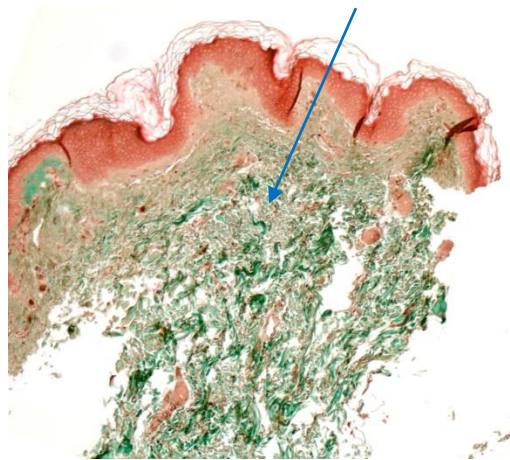
Δείγμα Νο 2-έναρξη (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

Εικόνα 12.6. Βιοψίες από εθελοντή Νο 6 (Ομάδα Γ : Κρέμα με α -LA 1,5 % w/w & Συμπλήρωμα διατροφής με α -LA 120 mg, πριν και μετά την αγωγή, χρώση EX-H & MT-G

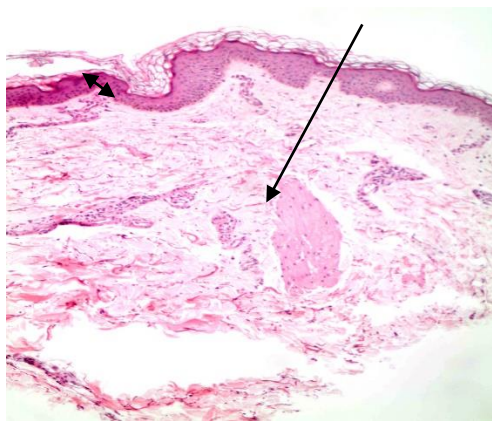
ΟΜΑΔΑ Δ : Εθελοντές με Κρέμα Placebo, χωρίς α-LA (Ex vivo)



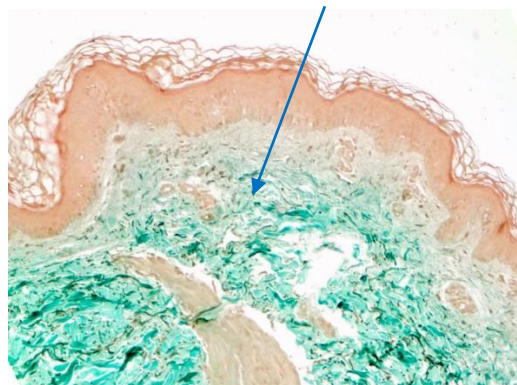
Δείγμα Νο 4-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 4-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

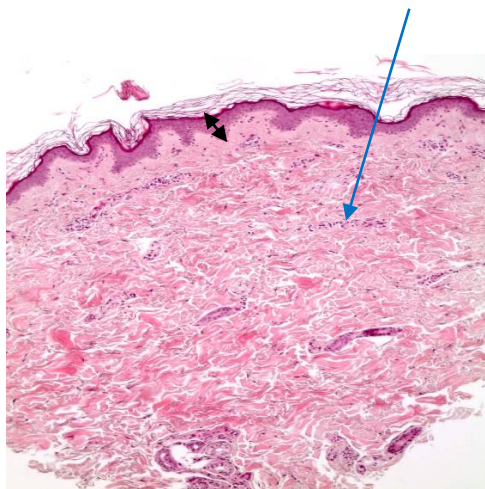


Δείγμα Νο 4-τέλος (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)

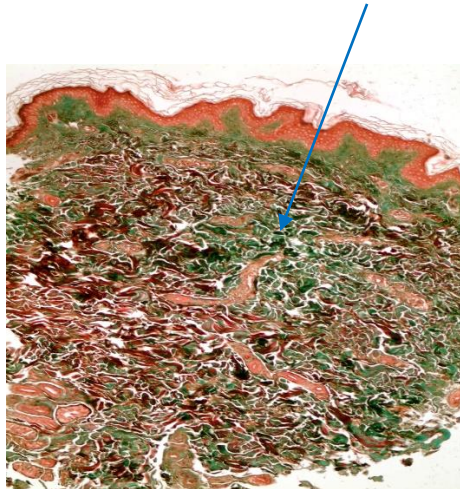


Δείγμα Νο 4-τέλος (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

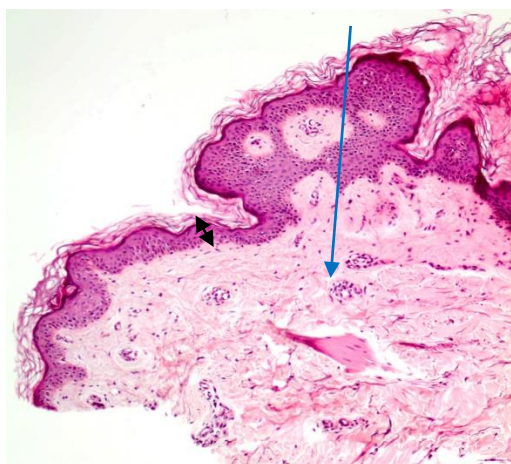
Εικόνα 12.7. Βιοψίες από εθελοντή Νο 7 (Ομάδα Δ : Κρέμα Placebo, χωρίς α-LA, πριν και μετά την αγωγή, με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)



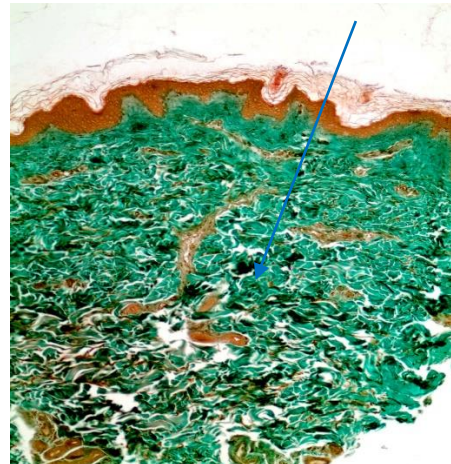
Δείγμα Νο 8-έναρξη (**pre**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 8-έναρξη (**pre**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 8-τέλος (**post**)
Χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (X10 μεγέθυνση)



Δείγμα Νο 8-τέλος (**post**)
Χρώση Masson Trichrome Golden (X10 μεγέθυνση)

Εικόνα 12.8. Βιοψίες από εθελοντή Νο 8 (Ομάδα Δ : Κρέμα Placebo, χωρίς α-LA, πριν και μετά την αγωγή, με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης (EX-H) & Masson Trichrome (MT-G)

Πίνακας 12.1. Μέση % αύξηση του πάχους της επιδερμίδας (μm),

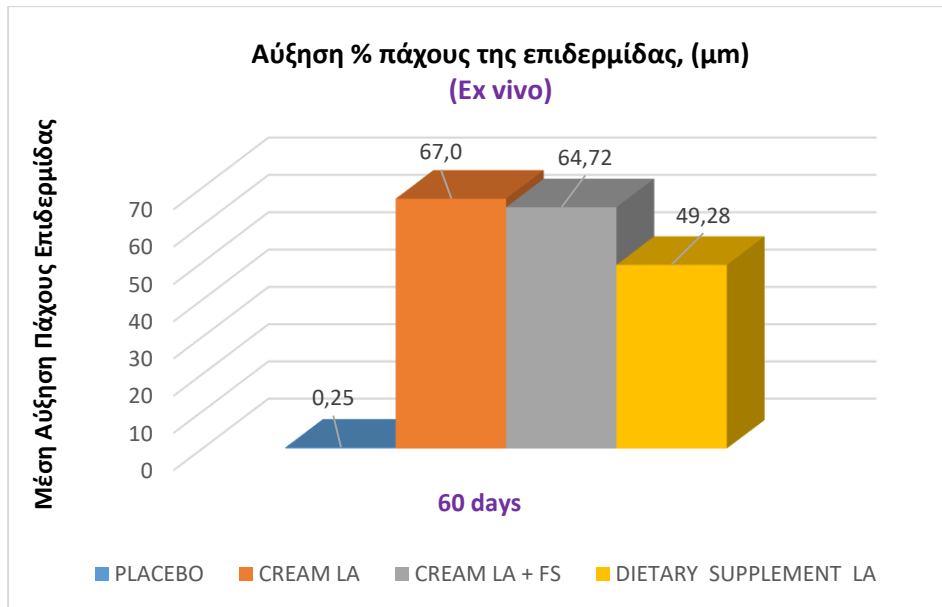
T0-T60 days (Ex vivo)

ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ (n=2)	ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΕΡΑΤΙΝΗ ΣΤΟΙΒΑΔΑ ΕΩΣ ΤΟΝ ΔΕΡΜΟΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟ ΣΥΝΔΕΣΜΟ Mean \pm St. Dev (μm)		
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΓΩΓΗ (PRE)	ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΓΩΓΗ (POST)	% ΑΥΞΗΣΗ
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α -LA (n=2)	32,06 \pm 5,70	53,53 \pm 7,35	67,0
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α -LA (n=2)	30,94 \pm 5,38	46,19 \pm 5,51	49,28
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α -LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α -LA (n=2)	31,52 \pm 6,33	51,92 \pm 8,39	64,72
Δ: ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α -LA) (n=2)	35,10 \pm 3,14	35,18 \pm 5,44	0,25

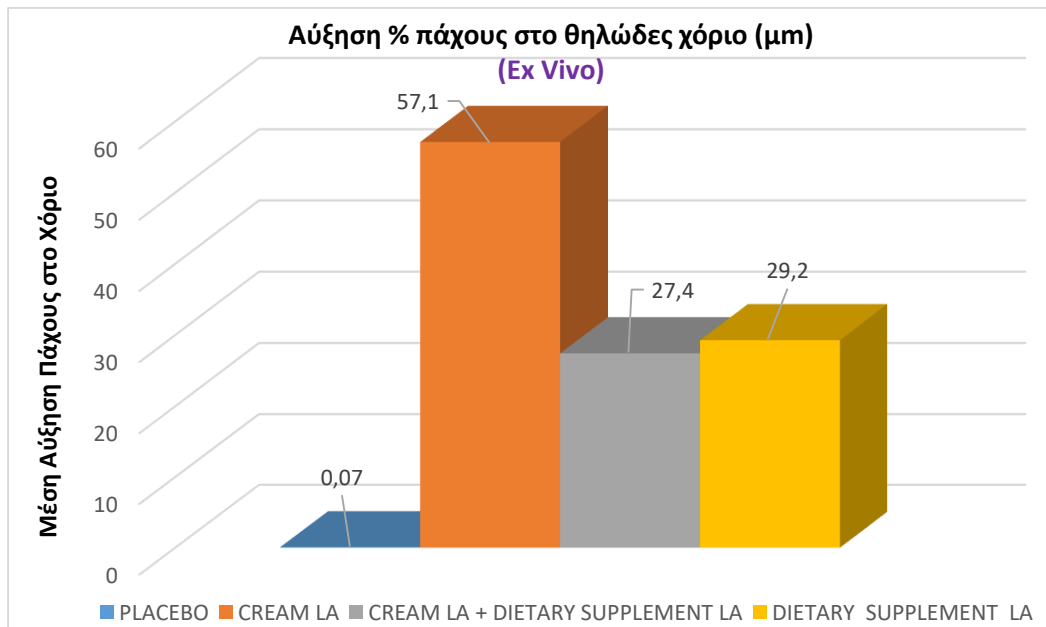
Πίνακας 12.2. Μέση % αύξηση του πάχους του θηλώδους χορίου (μm)

T0-T60 days (Ex vivo)

ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ (n=2)	ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΑΠΟ ΤΗ ΒΑΣΙΚΗ ΜΕΒΡΑΝΗ ΕΩΣ ΤΟ ΘΗΛΩΔΕΣ ΧΟΡΙΟ Mean \pm St. Dev (μm)		
ΟΜΑΔΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΓΩΓΗ (PRE)	ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΓΩΓΗ (POST)	% ΑΥΞΗΣΗ
A: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α -LA (n=2)	50,46 \pm 15,42	79,27 \pm 8,34	57,09
B: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α -LA (n=2)	56,90 \pm 16,05	73,56 \pm 9,90	29,27
Γ: ΚΡΕΜΑ ΜΕ α -LA & ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΜΕ α -LA	55,94 \pm 19,84	71,28 \pm 11,28	27,42
Δ: ΚΡΕΜΑ PLACEBO (ΧΩΡΙΣ α -LA) (n=2)	81,16 \pm 9,15	81,23 \pm 6,71	0,07



Σχήμα 12.1. Αύξηση % του πάχους της επιδερμίδας μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T60 μέρες, (Ex vivo)



Σχήμα 12.2. Αύξηση % του πάχους του θηλώδους χορίου μεταξύ των ομάδων εθελοντών, T0-T60 μέρες, (Ex vivo)

12.3 Αποτελέσματα των βιοψιών

Στην αρχή της αγωγής (pre), T=0 μέρες, ελήφθησαν οι βιοψίες του δέρματος από το αντιβράχιο των εθελοντών (δύο από κάθε ομάδα εθελοντών) και αφού μετρήθηκε το πάχος της επιδερμίδας και του δέρματος (θηλώδες χόριο) συγκρίθηκαν αντίστοιχα με εκείνες που ελήφθησαν στο τέλος της αγωγής (post) T=60 μέρες και μετρήθηκε η μέση ποσοστιαία αύξηση (μm).

Πρέπει να σημειωθεί, ότι λόγω του μικρού αριθμού του δείγματος (δύο εθελοντές έδωσαν βιοψία από κάθε group) δεν έγινε στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα κριτήρια Repeated measurement Anova ή Student's t-test ή Kruskal-Wallis, σε αντίθεση με τις μετρήσεις των βιοφυσικών μεθόδων, για αυτό και δεν υπολογίστηκε το p-value. Η μέση αύξηση δείχνει την τάση βελτίωσης της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής θεραπείας σε σχέση με το placebo group (ομάδα που έλαβε την κρέμα χωρίς α-λιποϊκό οξύ και δεν έλαβε συμπλήρωμα διατροφής με α-LA), συγκρίνει τα αποτελέσματα μεταξύ των ομάδων που έλαβαν την αντιγηραντική αγωγή και επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των βιοφυσικών μετρήσεων, όσον αφορά την θετική επίδραση της αγωγής στη μείωση των ρυτίδων.

Ένα ακόμη, σημαντικό αποτέλεσμα από την μέτρηση της αύξησης του πάχους της επιδερμίδας και του θηλώδους χορίου με τη λήψη βιοψιών του δέρματος είναι το εξής: Αποδεικνύεται ότι η επίδραση της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής δράσης του α-λιποϊκού οξέος επιτυγχάνεται όχι μόνο επιφανειακά (στην κερατίνη στοιβάδα), όπως μπορεί να συμβεί κάποιες φορές λόγω της αύξησης των εξωτερικών παραμέτρων της υφής του δέρματος (αύξηση της εντροπίας, ομοιογένειας, φωτεινότητας), μέσω του προσδιορισμού με τις βιοφυσικές μεθόδους, αλλά και στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας και φτάνει μέχρι το κυρίως δέρμα (χόριο). Επέρχεται τελικά αύξηση του κολλαγόνου (I, III) εντός δύο μηνών (60 μέρες) από την έναρξη της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής αγωγής και αύξηση τόσο του πάχους της επιδερμίδας, όσο και του κυρίως δέρματος (χόριο).

- ✓ Στο τέλος της αγωγής (60 μέρες) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση του πάχους της επιδερμίδας κατά 67 % και του θηλώδους χόριου κατά 57 %, στην ομάδα των εθελοντών Α : εθελοντές που εφάρμοσαν κρέμα με α-LA.
- ✓ Ακολουθεί η ομάδα Γ : εθελοντές που εφάρμοσαν κρέμα με α-LA και έλαβαν συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, με αύξηση 64,7 % στην επιδερμίδα. Στο χόριο το πάχος αυξήθηκε κατά 29,3 % στην ομάδα Β : εθελοντές που έλαβαν συμπλήρωμα διατροφής α-LA, που είναι οριακά ίδια 27,4% με την ομάδα Γ.
- ✓ Αύξηση 49,3 % στο πάχος της επιδερμίδας επέρχεται στην ομάδα Β, τρίτη στη σειρά μετά την ομάδα Α και Γ, ενώ η κρέμα Placebo δεν έδειξε καμία ουσιαστική αύξηση στο πάχος της επιδερμίδας και στο χόριο.
- ✓ Η κρέμα με α-LA φαίνεται ότι συντελεί στη μεγαλύτερη βελτίωση της μικροτοπογραφίας του δέρματος και ακολουθεί το συμπλήρωμα διατροφής, οριακά με το συνδυασμό της κρέμας και του λιποϊκού οξέος.
- ✓ Η λήψη ταυτόχρονα της κρέμας του α-LA και του συμπληρώματος με α-LA, αν και είχε θετική επίδραση στην αύξηση του πάχους της επιδερμίδας και του κυρίως δέρματος (χόριο), δεν δείχνει μεγαλύτερο όφελος, σε σχέση με τα άλλα σχήματα και δεν δρα συνεργιστικά, όπως αποδείχτηκε και στις μετρήσεις με τις βιοφυσικές μεθόδους. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ανοχή των υποδοχέων του δέρματος μετά από τη συνεχή χρήση με την ταυτόχρονη λήψη και των δύο προϊόντων (per-os και τοπικά) και στη μείωση της ευαισθητοποίησής τους. Το α-λιποϊκό οξύ, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επηρεάζει μέσω της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών τον πυρηνικό υποδοχέα NF-kβ, που ρυθμίζει τη δράση των προ-φλεγμονωδών κιτοκινών και την έκφραση στις μεταλλοπρωτεΐνες στο χόριο, που συντελούν στην αύξηση του κολλαγόνου στο δέρμα. Απαιτείται, όμως, να γίνει μεγαλύτερης έκτασης κλινική μελέτη, για την επιβεβαίωση των παραπάνω ισχυρισμών.
- ✓ Τέλος, η μετρήσεις που έγιναν στις βιοψίες, αν και δεν έγινε στατιστική επεξεργασία λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων, βρίσκονται κοντά σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις βιοφυσικές μεθόδους και επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική-αντιγηραντική δράση του α-λιποϊκού οξέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟΥΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

13.1 Εισαγωγή.

Κατά τη διεξαγωγή της κλινικής μελέτης στις ομάδες των εθελοντών όπου έλαβαν τα σκευάσματα της κρέμας με α-LA (1.5 w/w) δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ (ομάδα Α), το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg/καψάκι μία φορά την ημέρα (ομάδα Β), την εφαρμογή κρέμας με α-LA και λήψη συμπληρώματος με α-LA (Ομάδα Γ) και την κρέμα Placebo, χωρίς α-LA (ομάδα Δ), εξετάστηκαν στην αρχή, κατά τη διάρκεια και στο τέλος της αγωγής των δύο μηνών (60 μέρες), οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η ενδεχόμενη τοξικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες, σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό φαρμάκων (ΕΟΦ), τον Ευρωπαϊκό κανονισμό των καλλυντικών (EC Regulation 1223/2009), την οδηγία για τα συμπληρώματα διατροφής (Directive 2002/46/EC) και τον EFSA (European Food Safety Authority) μπορούν να ταξινομηθούν ως τα εξής :

- Ανεπιθύμητη ενέργεια (Adverse event) : κάθε δυσμενές ιατρικό συμβάν που συμβαίνει σε έναν εθελοντή ή ασθενή (φάρμακα) κατά τη συμμετοχή του στη μελέτη, ανεξάρτητα αν σχετίζεται με την ερευνητική ουσία μέσα στο σκεύασμα (καλλυντικό, συμπλήρωμα διατροφής, φάρμακο).
- Σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια (Serious adverse event) : κάθε δυσμενές ιατρικό συμβάν που έχει ως αποτέλεσμα μία απειλητική κατάσταση για τη ζωή του εθελοντή ή ασθενούς (φάρμακο), την εισαγωγή του στο νοσοκομείο ή την παράταση της νοσηλείας του, ή μία μόνιμη/σοβαρή αναπηρία ή ακόμη και τον θάνατο.

Όλες οι ανεπιθύμητες ενέργειες καταγράφονται σε ειδικές φόρμες (αρχείο ανεπιθύμητων ενεργειών) και προωθούνται στο αρμόδιο τμήμα της Καλλυντικο-επαγρύπνησης (Cosmetovigilance) ή Φαρμακοεπαγρύπνησης (Pharmacovigilance)

των παραγωγών εταιριών. Στην περίπτωση των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών γνωστοποιούνται τα περιστατικά υποχρεωτικά, το συντομότερο δυνατόν στον ΕΟΦ.

Η συμβατότητα του δέρματος και του καλλυντικού προϊόντος ορίζεται ως η απουσία ενός ερεθισμού, υπό κανονικές συνθήκες χρήσης και για την λογικά προβλεπόμενη χρήση, λαμβάνοντας υπόψη τις αντιδράσεις του κάθε ατόμου αναφορικά με το αίσθημα νυγμού (stinging), ή καύσου (burning) ή κνησμού (itching), που μπορεί να εμφανίσει. Ο ερεθισμός του δέρματος θεωρείται ως μία μη ανοσολογική τοπική φλεγμονή του δέρματος και μπορεί να εκφραστεί και ποσοτικά, διαμέσου μιας αριθμητικής κλίμακας, αξιολογώντας την ένταση των εξής παραμέτρων : ερύθημα (erythema), οίδημα (oedema), ξηρότητα (dryness), απολέπιση (desquamation), κυστίδια (vesicles) [170-174].

Κατά τη διενέργεια της κλινικής μελέτης με την εφαρμογή της κρέμας και της λήψης του συμπληρώματος διατροφής με α-λιποϊκό οξύ συντάχθηκε μία φόρμα αναφοράς και εκτίμησης των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών στους εθελοντές.

13.2 Αποτελέσματα των ανεπιθύμητων ενεργειών των ομάδων εθελοντών.

Πίνακας 13.1. Παράμετροι αξιολόγησης και βαθμολόγηση δερματικών αντιδράσεων

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ		
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	ΒΑΘΜΟΛΟΓΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	
ΕΡΥΘΗΜΑ (ERYTHEMA)	ΚΑΜΜΙΑ ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΕΡΥΘΗΜΑΤΟΣ	0
	ΕΛΑΧΙΣΤΟ Η ΑΜΦΙΒΟΛΟ ΕΡΥΘΗΜΑ	0,5
	ΕΛΑΦΡΑ ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ, ΣΤΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΥΤΟ	1
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΗ ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ	2
	ΙΣΧΥΡΗ ΟΜΟΙΟΜΟΡΦΗ ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ	3
	ΙΣΧΥΡΗ ΔΙΑΧΥΤΗ ΕΡΥΘΡΟΤΗΤΑ	4
ΞΗΡΟΤΗΤΑ (SCALING)	ΚΑΜΜΙΑ ΑΠΟΔΕΙΞΗ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗΣ	0
	ΞΗΡΟ ΧΩΡΙΣ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗ	0,5
	ΕΛΑΦΡΙΑ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗ	1
	ΜΕΤΡΙΑ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗ	2
	ΣΟΒΑΡΗ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗ ΜΕ ΜΕΓΑΛΕΣ ΦΟΛΙΔΕΣ	3

ΟΙΔΗΜΑ (OEDEMA)	ΑΠΟΥΣΙΑ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ	--
	ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΙΔΗΜΑΤΟΣ	+

Πίνακας 13.2. Αναφορά πληροφοριών ανεπιθύμητων ενεργειών των εθελοντών.

ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΩΝ									
(TEST REPORT)									
ΕΘΕΛ	ΗΛΙΚ	ΦΥΛΛΟ	ΕΡΥΘΗΜΑ/ ΞΗΡΟΤΗΤΑ			ΟΙΔΗΜΑ			ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΑΝΑΦΕΡΘΕΙΣΑ ΑΠΟ ΕΘΕΛΟΝΤΗ
			ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ ΠΡΟΙΟΝΤΟΣ						
			30 min	24h	48h	30 min	24h	48h	
1	Θ	60	0	0	0	0	0	0	Καμία
2	Θ	55	0	0	0	0	0	0	Καμία
3	Θ	50	0	0	0	0	0	0	Καμία
4	Θ	48	0	0	0	0	0	0	Καμία
5	Θ	51	0	0	0	0	0	0	Καμία
6	Θ	56	0	0	0	0	0	0	Καμία
7	Θ	45	0	0	0	0	0	0	Καμία
8	Θ	46	0	0	0	0	0	0	Καμία
9	Θ	48	0	0	0	0	0	0	Καμία
10	Θ	47	0	0	0	0	0	0	Καμία
11	Θ	46	0	1	0	0	0	0	Ερυθρότητα ελαφριά που υποχώρησε μετά την δεύτερη ημέρα

12	Θ	55	0	0	0	0	0	0	Καμία
13	A	54	0	0	0	0	0	0	Καμία
14	Θ	58	1	1	0	0	0	0	Αίσθημα νυγμού, που υποχώρησε μετά από μία μέρα
15	Θ	65	0	0	0	0	0	0	Καμία
16	Θ	50	0	0	0	0	0	0	Καμία
17	Θ	66	0	0	0	0	0	0	Καμία
18	Θ	40	0	0	0	0	0	0	Καμία
19	A	51	0	0	0	0	0	0	Καμία
20	Θ	48	0	0	0	0	0	0	Καμία

13.3 Συμπεράσματα σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων α-λιποϊκού οξέος

Το άθροισμα του αποτελέσματος (score) του ερυθήματος, της ξηρότητας και του οιδήματος ορίζεται ως δείκτης ερεθισμού (irritation index). Η τιμή του δείκτη ερεθισμού για την κρέμα με α-LA που εφαρμόστηκε στους εθελοντές μόνη της, ή σε συνδυασμό με το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, υπολογίστηκε κατά ανάλογο με τρόπο με εκείνο του επιδερμικού τεστ δοκιμασιών πρόβλεψης του ερεθισμού και της πιθανής αλλεργικής δερματίτιδας εξ' επαφής (Patch test 48h) [175-194].

Έτσι, εκτιμήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά το ενδεχόμενο ερύθημα ή οίδημα, τόσο αμέσως μετά την εφαρμογή του προϊόντος, όσο και μετά από 24h και 48h, κατά τη χρήση (in use test). Υπολογίστηκε ο μέσος όρος του δείκτη ερεθισμού του συνόλου των επιδερμικών δοκιμασιών για όλους τους εθελοντές ως ακολούθως:

Μέσος Όρος Δείκτης Ερεθισμού :
$$\frac{[\sum (\text{βαθμών } T48h) \text{ εθελ } 1 - \text{εθελ } 20]}{\text{αριθμό των αναγνώσεων}}$$

(Average Irritation Index)

Αριθμό Εθελοντών

Πίνακας 13.3. Ταξινόμηση τοπικής δράσης με βάση το Μ.Ο Δείκτη Ερεθισμού

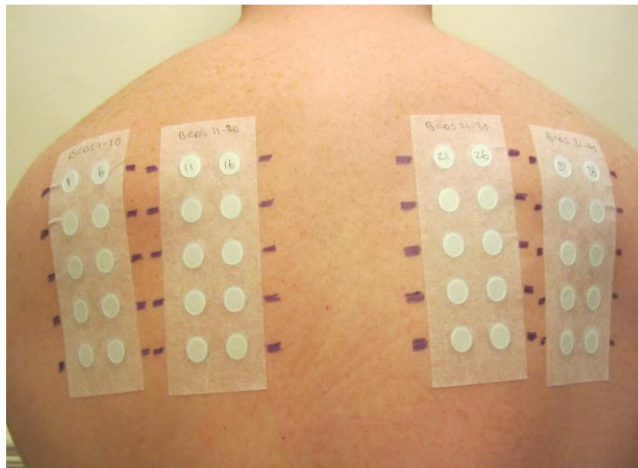
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΤΟΠΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	
ΜΕΣΟΣ ΟΡΟΣ ΔΕΙΚΤΗ ΕΡΕΘΙΣΜΟΥ (Average Irritation Index)	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ (Class)
0.0 - 0.08	Μη Ερεθιστικό (Non irritant)
0.08 - 0.16	Πολύ ελαφρώς Ερεθιστικό (Very slightly irritant)
0.16 - 0.56	Ελαφρώς Ερεθιστικό (Slightly irritant)
0.56 - 1.0	Μέτρια Ερεθιστικό (Moderately irritant)
1.0 - 1.16	Ερεθιστικό (Irritant)
> 1.16	Πολύ Ερεθιστικό (Very irritant)

Επιπλέον, προκειμένου να ενισχυθεί και να διασταυρωθεί η δερματολογική εκτίμηση ως προς την ασφάλεια του παρασκευασθέντος προϊόντος (κρέμα α-LA 1,5% w/w) στους εθελοντές της παρούσας μελέτης (in use test), έγινε εφαρμογή ενός «Patch test 48h» για την κρέμα σε είκοσι άλλους εθελοντές (εκτός της παρούσης μελέτης).

Τα αποτελέσματα του Δείκτη Ερεθισμού, τόσο με το (in use test), όσο και με το (Patch test) έδειξαν Δείκτη Ερεθισμού 0,00. Αυτό δηλώνει ότι το προϊόν μπορεί να θεωρηθεί ως Μη Ερεθιστικό και Δερματολογικά Ελεγχόμενο.

Τα ασθενή ανεπιθύμητα συμπτώματα που παρουσίασαν δύο εθελοντές, όπως ασθενές ερύθημα και νυγμός, υποχώρησαν γρήγορα μέχρι την επόμενη μέρα και δεν παρουσίασαν καμία επιπλοκή ή επιδείνωση. Όλοι οι εθελοντές έκριναν ικανοποιητικό έως πολύ ικανοποιητικό το αποτέλεσμα της αίσθησης και της εμφάνισης του δέρματος

του προσώπου, με τη χρήση της κρέμας με α-LA, του συμπληρώματος διατροφής αλλά και με τον συνδυασμό κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA. Οι περισσότεροι αισθάνθηκαν βελτίωση στην φωτεινότητα, το δέρμα τους πιο μαλακό, ενυδατωμένο και απαλό (λείο). Κανένας εθελοντής δεν αισθάνθηκε ερεθισμό ή κάποια αλλεργική αντίδραση, εκτός από την αρχή σε δύο άτομα (ήπια δυσανεξία κατά την πρώτη εφαρμογή), που όμως εξαφανίστηκε μετά. Τέλος, κανένας εθελοντής δεν χρειάστηκε να σταματήσει την αγωγή και όλοι δήλωσαν πρόθυμοι να τη συνεχίσουν, όπως και έγινε.



Εικόνα 13.1. Patch test, πηγή: <https://www.bsuh.nhs.uk>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

14.1 Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια)

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μία αναλυτική μέθοδος με υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή UV για τον προσδιορισμό του α-LA σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκι 120 mg). Η μέθοδος ήταν γρήγορη, ακριβής, ανθεκτική, εκλεκτική, επαναλήψιμη και αξιόπιστη και επικυρώθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες της ICH Q2 (R1): International Conference on Harmonization. (2005).

Στα συμπληρώματα διατροφής οι επικυρωμένες μέθοδοι που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος είτε μόνο του, είτε παρουσία άλλων ενώσεων, με υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ανιχνευτή UV, έχουν χρησιμοποιήσει διάφορα μήκη κύματος (210 - 332), τιμές pH (2,5-6,0) και η γραμμικότητα της μεθόδου έχει ελεγχθεί σε μεγάλα εύρη συγκεντρώσεων (10,0-1000 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). Οι περισσότερες έχουν μικρό σχετικά όριο ανίχνευσης, LOD (0,5-4,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) και ποσοτικοποίησης, LOQ (1,3-13,8 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), μικρό σχετικά χρόνο κατακράτησης, αλλά στις περισσότερες ο αριθμός των θεωρητικών πλακών και η συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής είναι μικρή, αφού δεν υπάρχει ισχυρή χρωμοφόρα ομάδα.

Στην παρούσα εργασία η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με τη χρήση χρωματογραφικού συστήματος RP-HPLC με ανιχνευτή UV-Vis σε χρωματογραφική στήλη Luna® C18, με διαστάσεις 150 mm x 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm , και κινητή φάση μίγμα ακετονιτριλίου/υδατικό διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου 50 mM (ρυθμιστικό διάλυμα σε pH : 4.5 με ο-φωσφορικό οξύ 85% w/w) σε αναλογία 60:40 v/v και ταχύτητα ροής 1 mL.min⁻¹. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα. Η εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD) βρέθηκε μικρότερη του 1,56 % και μεταξύ των ημερών (inter day % RSD) βρέθηκε μικρότερη του 0,95 %. Το ποσοστό του σχετικού τυπικού

σφάλματος (Er %) βρέθηκε μικρότερο κατά απόλυτη τιμή από 3,3 %. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους.

Σε αντίθεση με τις άλλες προαναφερθείσες μεθόδους η αναπτυχθείσα μέθοδος έχει πολύ καλή ευαισθησία, με χαμηλό χρόνο κατακράτησης ($t_r = 7,2 \text{ min}$), ικανοποιητικό αριθμό θεωρητικών πλακών και πολύ καλή συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι $1,26 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ και το όριο ποσοτικοποίησης $3,8 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ του διαλύματος του περιεχομένου του καψακίου, που αντιστοιχούν σε 0,3 mg και 0,9 mg του περιεχομένου στο καψάκι. Επιπλέον, η ανίχνευση UV στην παρούσα μέθοδο έγινε στα 340 nm.

Αυτό βοηθάει στην ανάπτυξη και την εφαρμογή της ίδιας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό του α -λιποϊκού οξέος και σε κρέμες τοπικής χρήσης (καλλυντικές), αφού στα 210 nm ή στα άλλα χαμηλά μήκη κύματος τα πολλά είδη εκδόχων που περιέχονται στις κρέμες απορροφούν και δρουν παρεμποδιστικά στον προσδιορισμό του αναλύτη και επομένως στην βελτιστοποίηση και την επικύρωση της ίδιας αναλυτικής μεθόδου, τόσο στα συμπληρώματα διατροφής, όσο και στις κρέμες με α -λιποϊκό οξύ.

Την ανάπτυξη και την αξιολόγηση της μεθόδου προσδιορισμού του συμπληρώματος διατροφής ακολούθησαν δοκιμασίες σταθερότητας σε διάφορες συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης και μακροχρόνιας φύλαξης, σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων. (ICH Topic Q1 A (R2). Stability Testing of new Drug Substances and Products. CPMP/ICH/2736/99 (2003).

Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν τα εξής: Η όξινη υδρόλυση (αποικοδόμηση) επέφερε την δημιουργία παραπροϊόντων μετά από 1 ώρα στο δραστικό συστατικό (α -λιποϊκό οξύ), χωρίς όμως να παρεμποδίζεται η χρωματογραφική ανάλυση του σε σχέση με τους χρόνους κατακράτησης. Η βασική υδρόλυση δεν επηρεάζει καθόλου για χρονικό διάστημα 8 ωρών, σε αντίθεση με την οξειδωτική διάσπαση που, όπως αναμένονταν, επέφερε σημαντική μείωση στην κορυφή από τα πρώτα 30 min, ενώ μετά από 8 ώρες δεν ανιχνεύεται καθόλου σήμα. Κατά την επιταχυνόμενη θερμική

αποικοδόμηση του προϊόντος του συμπληρώματος διατροφής (καψάκια 120 mg) στους 42⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v δεν επέφερε καμία σημαντική αλλοίωση στον προσδιορισμό του δραστικού.

Σε αντίθεση με τη θερμική διάσπαση στους 50⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v, που ενώ στον 1 μήνα ήταν σταθερό, στους 2 μήνες αυξήθηκε η αποικοδόμηση του δραστικού και στους 3 μήνες μειώθηκε η ανάκτηση του α-λιποϊκού οξέος σε 43,9%. Κανένα, όμως, παραπροϊόν δεν δημιουργήθηκε. Τέλος, κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση στους 25⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 40 % v/v, το δραστικό παραμένει σταθερό, χωρίς καμία αλλοίωση μετά από 12 μήνες.

Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις φαρμακευτικών συμπληρωμάτων της εταιρίας Solgar (120 mg/καψάκι), καθώς και σε καψάκια άλλων εταιριών σε διαφορετικές δοσολογίες α-λιποϊκού οξέος (60, 250, 500 mg). Τα παραπάνω αποτελέσματα από την εργασία σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο ανάλυσης που επιτεύχθηκε (7,2 λεπτά) μπορούν να προσφέρουν τα εξής:

- ✓ Καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για την εφαρμογή της σε αναλύσεις ρουτίνας στον ποιοτικό έλεγχο στην φαρμακευτική βιομηχανία, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος, τόσο ως πρώτη ύλη, όσο και στα τελικά προϊόντα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της ΕΕ και του ΕΟΦ [195].
- ✓ Οι μελέτες σταθερότητας μπορούν να βοηθήσουν στην επιτυχή ανάπτυξη, παραγωγή, μεταφορά και αποθήκευση των τελικών προϊόντων, προκειμένου να διασφαλιστεί η αποτελεσματική δόση και το φαρμακοδυναμικό αποτέλεσμα στους ασθενείς, κατά τη διάρκεια της ζωής του προϊόντος και της χρήσης του.

Απώτερος στόχος είναι η αναπτυχθείσα αναλυτική μέθοδος να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον στον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε βιολογικά υγρά (πλάσμα, ορό, αίμα). Αρχικά είχε συνδεθεί με το σύστημα υδροχρωματογραφίας ένας ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (εταιρία Waters), λόγω της υψηλής ευαισθησίας που μπορούσε να επιτευχθεί με αυτόν. Ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, όμως, παρουσίασε πρόβλημα κατά τη σταθεροποίηση της γραμμής βάσης (drift), επειδή το ηλεκτρόδιο εργασίας χρυσού (Au) που είχε επιμολύνονταν συνεχώς κατά την οξειδοαναγωγική

αντίδραση του α-LA στην κυψελίδα, λόγω των σουλφιδρικών ομάδων που περιέχει, με αποτέλεσμα ο συνεχής καθαρισμός και η ανασύσταση που απαιτούνταν για την ολοκλήρωση της μεθόδου να μην επέτρεπε την βελτιστοποίηση και την επικύρωση της μεθόδου. Η χρήση στο μέλλον ενός πιο ανθεκτικού ηλεκτροδίου εργασίας και η εξάλειψη της επιμόλυνσης της κυψελίδας, όπου πραγματοποιείται η οξειδοαναγωγική αντίδραση, μπορεί να συντελέσει στην περαιτέρω ανάπτυξη της μεθόδου στα βιολογικά υγρά.

Η πρωτοτυπία της αναπτυχθείσας μεθόδου της παρούσας εργασίας έγκειται στα εξής :

- ✓ Με την νέα αναπτυχθείσα μέθοδο έχει επιτευχθεί μία καλή ευαισθησία, με χαμηλό χρόνο κατακράτησης ($t_r = 7,2 \text{ min}$), σε συνδυασμό όμως με ικανοποιητικό αριθμό θεωρητικών πλακών και πολύ καλή συμμετρία της χρωματογραφικής κορυφής, σε μήκος κύματος $\lambda=340 \text{ nm}$, που επιτρέπει την εφαρμογή της μεθόδου και σε άλλες μορφές, όπως οι κρέμες.
- ✓ Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για πρώτη φορά μία αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε συμπλήρωμα διατροφής (καψάκια), που μπορεί να εφαρμοστεί με τις ίδιες ακριβώς χρωματογραφικές συνθήκες και σε προϊόντα τοπικής εφαρμογής, όπως οι καλλυντικές κρέμες με α-λιποϊκό οξύ.
- ✓ Μελετήθηκε για πρώτη φορά σε συμπληρώματα διατροφής (καψάκια) η σταθερότητα του α-LA τόσο σε εξαναγκασμένες συνθήκες διάσπασης, αλλά και σε συνθήκες επιταχυνόμενης και μακροχρόνιας γήρανσης.

14.2 Ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντική κρέμα

Η αναλυτική μέθοδος, που αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε για τον προσδιορισμό του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντικές κρέμες, χρησιμοποίησε τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες, όπως και στο προσδιορισμό του α-LA στα συμπληρώματα διατροφής (καψάκια), με διαφορετική κατεργασία όμως, πράγμα πολύ σημαντικό για τη φαρμακευτική βιομηχανία, την έρευνα και παραγωγή νέων προϊόντων (formulation). Ο χρόνος κατακράτησης του α-λιποϊκού οξέος είναι 7,2 λεπτά, που είναι ίδιος και κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-LA στα συμπληρώματα διατροφής.

Έγινε μελέτη για τη βέλτιστη κατεργασία της κρέμας, που είναι μεγάλης σημασίας λόγω των πολλών και διαφορετικών εκδόχων, που υπάρχουν μέσα και εμποδίζουν την ανάκτηση του αναλύτη. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι $0,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ και $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ διαλύματος κρέμας, που αντιστοιχούν σε 0,001% και 0,004% α-LA στην κρέμα. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα, ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα. Η εντός της ημέρας % σχετική τυπική απόκλιση (intra day % RSD) βρέθηκε μικρότερη του 6,9 % και η μεταξύ των ημερών (inter day % RSD) βρέθηκε μικρότερη του 10 %. Το ποσοστό του σχετικού τυπικού σφάλματος (E_r %) βρέθηκε μικρότερο κατά απόλυτη τιμή από 2,9 %. Η μέθοδος κρίθηκε ανθεκτική καθώς μικρές και σταδιακές μεταβολές κάποιων παραμέτρων επέφεραν ελάχιστες μόνο διακυμάνσεις στις υπόλοιπες παραμέτρους.

Την ανάπτυξη και την αξιολόγηση της μεθόδου ακολούθησαν δοκιμασίες σταθερότητας της κρέμας σε διάφορες συνθήκες επιταχυνόμενης διάσπασης, φωτόλυσης και μακροχρόνιας φύλαξης. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν τα εξής: Η όξινη υδρόλυση (αποικοδόμηση) επέφερε την δημιουργία παραπροϊόντων μετά από 2 ώρες στο δραστικό συστατικό (α-λιποϊκό οξύ), χωρίς όμως να παρεμποδίζεται η χρωματογραφική ανάλυση του σε σχέση με τους χρόνους κατακράτησης. Η ανάκτησή του όμως μειώθηκε στο 75,4 %. Η βασική υδρόλυση επέφερε και αυτή δύο παραπροϊόντα μετά από 2 ώρες, που δεν επηρεάζει όμως και αυτή τον προσδιορισμό

του αναλύτη. Σε αυτή την περίπτωση, όμως, σε αντίθεση με την όξινη υδρόλυση, η ανάκτηση δεν μειώθηκε πολύ, αλλά ήταν μετά από 2 ώρες 91%. Αντίθετα, κατά την οξειδωτική διάσπαση του δραστικού επέφερε άμεσα σημαντική μείωση στην κορυφή, με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται καθόλου σήμα μετά από τα πρώτα 30 λεπτά.

Η φωτόλυση (ακτινοβολία με UV στα 254 nm), που στην περίπτωση των καλλυντικών προϊόντων είναι κρίσιμη λόγω της χρήσης τους από τους καταναλωτές, της συνθήκης μεταφοράς και αποθήκευσης, έδειξε ότι σε αυτόν τον περιέκτη που ήταν μέσα η κρέμα (σωληνάριο αλουμινίου-πλαστικού) δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση. Η ανάκτηση του δραστικού μετά από 6 ώρες ακτινοβολίας ήταν στο 88 %, ενώ δύο προϊόντα διάσπασης που εμφανίστηκαν δεν παρεμποδίζουν την χρωματογραφική ανάλυση.

Η επιταχυνόμενη θερμική αποικοδόμηση του προϊόντος της καλλυντικής κρέμας με α-λιποϊκό οξύ 1,5 % w/w, στους 42⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v, έδειξε μικρή αλλοίωση στο δραστικό συστατικό, αφού μετά από 3 μήνες η ανάκτηση ήταν 77,6 %, χωρίς όμως να ανιχνεύεται κάποιο προϊόν διάσπασης. Κατά τη θερμική διάσπαση στους 50⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 75 % v/v μετά από 3 μήνες, η ανάκτηση ήταν περίπου ίδια 81,7%, χωρίς πάλι να ανιχνεύεται κανένα προϊόν διάσπασης. Τέλος, κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση στους 25⁰ C παρουσία σχετικής υγρασίας 40 % v/v, το δραστικό παραμένει σταθερό, χωρίς καμία αλλοίωση μετά από 12 μήνες, αφού η ανάκτηση του α-λιποϊκού οξέος ήταν 95 %, χωρίς κανένα παραπροϊόν. Η αναπτυχθείσα μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε αναλύσεις καλλυντικών προϊόντων (κρέμες και γαλακτώματα), που αναπτύχθηκαν και παρασκευάστηκαν για αυτό το σκοπό. Τα παραπάνω αποτελέσματα από την εργασία σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο ανάλυσης που επιτεύχθηκε (7,2 λεπτά) μπορούν να προσφέρουν τα εξής:

- ✓ Καθιστούν τη μέθοδο κατάλληλη για την εφαρμογή της σε αναλύσεις ρουτίνας στον ποιοτικό έλεγχο των καλλυντικών προϊόντων και μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων προς τους καταναλωτές.

- ✓ Οι μελέτες της σταθερότητας μπορούν να βοηθήσουν στον καθορισμό των απαιτούμενων φυσικοχημικών προδιαγραφών και στη βελτίωση των νέων προϊόντων, προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του α-λιποϊκού οξέος στα προϊόντα τοπικής εφαρμογής, όπως τα καλλυντικά, καθώς και η ασφάλεια κατά τη διάρκεια του χρόνου ζωής τους και της χρήσης τους από τους καταναλωτές.

Η πρωτοτυπία της αναπτυχθείσας μεθόδου έγκειται στα εξής :

- ✓ Είναι η πρώτη φορά που έχει αναπτυχθεί και επικυρωθεί μία αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του α-λιποϊκού οξέος σε καλλυντικές κρέμες και έχει εφαρμοστεί και σε άλλα προϊόντα (γαλακτώματα), που αναπτύχθηκαν για αυτό το σκοπό.
- ✓ Στη διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, δεν έχει αναφερθεί καμία επικυρωμένη αναλυτική μέθοδος, που να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-LA σε προϊόντα τοπικής εφαρμογής, όπως οι καλλυντικές κρέμες, που να μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και σε συμπληρώματα διατροφής.
- ✓ Μελετήθηκε για πρώτη φορά σε καλλυντικές κρέμες η σταθερότητα του α-LA τόσο σε εξαναγκασμένες συνθήκες διάσπασης, σε συνθήκες επιταχυνόμενης και μακροχρόνιας γήρανσης, αλλά και μετά από φωτόλυση με UV ακτινοβολία.
- ✓ Παρασκευάστηκε για πρώτη φορά μία σταθερή καλλυντική κρέμα σε ποσοστό α-LA 1,5 % w/w, που αποδείχτηκε σταθερή μέσα στο περιέκτη συσκευασίας από αλουμίνιο-πλαστικό, ελέγχθηκε δερματολογικά και αποδείχτηκε ασφαλής, υπό κανονικές συνθήκες χρήσεις.

14.2 Δερματοκοσμητολογική δράση του α-λιποϊκού οξέος

Η διεξαγωγή της τυχαιοποιημένης, διπλά τυφλής, σε παράλληλες ομάδες κλινικής μελέτης (Randomized double blide study, parallel groups), στις ομάδες των εθελοντών όπου εφάρμοσαν τα σκευάσματα της κρέμας με α-LA (1,5 w/w) δύο φορές την ημέρα πρωί-βράδυ (ομάδα Α), έλαβαν per-os το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA 120 mg/καψάκι, μία φορά την ημέρα (Ομάδα Β), το συνδυασμό κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA (ομάδα Γ) και την κρέμα placebo, χωρίς α-LA και χωρίς λήψη συμπληρώματος διατροφής με α-LA (ομάδα Δ), για διάρκεια δύο μηνών (60 μέρες) στο πρόσωπο (παρειά και άκρη του οφθαλμού), για την μελέτη της αντιγηραντικής δράσης του α-λιποϊκού οξέος οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα, τόσο με τη χρήση των βιοφυσικών μεθόδων, όσο και με τη χρήση των ιστολογικών μεθόδων (μελέτη βιοψιών δέρματος).

- ✓ Η παράμετρος (Sesm) της λείανσης (απαλότητας) των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο (παρειά και άκρη του οφθαλμού), που μετρήθηκε με τις βιοφυσικές μεθόδους (UV-A Light Video κάμερα υψηλής ανάλυσης Visioscan® VC 20, εταιρία Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany), αυξήθηκε σημαντικά τόσο στη μέση της αγωγής (T=30 μέρες), όσο και στο τέλος (T=60 μέρες) σε σχέση με την τιμή που ελήφθησε στην αρχή T=0 μέρες (baseline) και ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05) σε όλες τις ομάδες.
- ✓ Στο τέλος της αγωγής (T=60 μέρες), τη μεγαλύτερη αύξηση στην απαλότητα του δέρματος παρουσίασε η ομάδα Β (εθελοντές που έλαβαν per-os το συμπλήρωμα διατροφής) με 46,3 % σε σχέση πάντα με την τιμή στην αρχή (T=0), μετά η ομάδα Γ (συνδυασμός κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA κατά 23,18 % και μετά η ομάδα Α (κρέμα με α-LA) κατά 19,9 % και τελευταία η ομάδα Δ (κρέμα Placebo, χωρίς α-LA) με 13,01 %. Όλες οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές (Anova p<0.05), εκτός της ομάδας Δ.
- ✓ Η αύξηση της λείανσης του προσώπου στις πρώτες 30 ημέρες σε όλες τις ομάδες φαίνεται να είναι καθοριστική και στατιστικά σημαντική, αφού η

περαιτέρω αύξηση στις 60 ημέρες (στο τέλος), παρόλο που υπάρχει, είναι μικρότερη αναλογικά. Κανένα σχήμα, όμως, δεν άλλαξε την σειρά μετά τις 30 μέρες και παρέμεινε στις 60 ημέρες η ίδια μεταβολή, όσον αφορά τις ομάδες, αν και παρατηρήθηκε μικρή αύξηση μεταξύ των 30 και 60 ημερών στις περισσότερες ομάδες.

- ✓ Ο συνδυασμός εφαρμογής κρέμας και λήψης per-os του συμπληρώματος διατροφής του λιποϊκού οξέος φαίνεται, αν και βελτίωσε στατιστικά σημαντικά τη λείανση των ρυτίδων σε σχέση με την αρχή T=0, ότι δεν έδρασε συνεργιστικά και δεν οδήγησε στη μεγαλύτερη αύξηση, σε σχέση με το απλό συμπλήρωμα διατροφής με α-LA που έδωσε τη μεγαλύτερη αύξηση, αν και βελτίωσε περισσότερο συγκριτικά με την εφαρμογή μόνο της κρέμας με α-LA.
- ✓ Η παράμετρος (Sew) του συνολικού αριθμού και του πλάτους των ρυτίδων του δέρματος στο πρόσωπο, που μετρήθηκε με τις βιοφυσικές μεθόδους, μειώθηκε σημαντικά τόσο στη μέση της αγωγής (T=30 μέρες), όσο και στο τέλος (T=60 μέρες) σε σχέση με την τιμή που ελήφθησε στην αρχή T=0 μέρες (baseline), αλλά ήταν στατιστικά σημαντική (Anova p-value <0.05) μόνο στην ομάδα Β (συμπλήρωμα διατροφής) και στην ομάδα Γ (συνδυασμός κρέμας και συμπληρώματος α-LA). Η ομάδα Α (κρέμα α-LA) ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 10 % (p<0.1), ενώ η ομάδα Placebo δεν ήταν (p>0,1).
- ✓ Στο τέλος της αγωγής (T=60 μέρες), τη μεγαλύτερη μείωση παρουσίασε η ομάδα Β (εθελοντές που έλαβαν per-os το συμπλήρωμα διατροφής) με -13,4 % σε σχέση πάντα με την τιμή (baseline) T=0, μετά η ομάδα Γ (συνδυασμός κρέμας με α-LA και συμπλήρωμα διατροφής με α-LA) με -6,5 %. Οι διαφορές ήταν, όμως, στατιστικά σημαντικές (p<0.5), αφού παρόλο που η ομάδα Α (κρέμα με α-LA) ελάττωσε κατά -11,4 % δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 5%, αλλά σε επίπεδο 10 % (p<0.1). Τέλος, η ομάδα Δ (κρέμα Placebo, χωρίς α-LA) δεν έδωσε στατιστικά σημαντική διαφορά (p>0.1).
- ✓ Η μείωση του Sew στις 60 ημέρες, στις ομάδες Β και Γ, που ήταν στατιστικά σημαντικές (p<0.05), ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των 30 ημερών. Φαίνεται και εδώ ότι η πρώτη σημαντική διαφορά στη βελτίωση της

μικροτοπογραφίας του δέρματος συντελείται με την αγωγή στις πρώτες 30 ημέρες. Ίσως, οι υποδοχείς του δέρματος να συνηθίζουν και να εξισορροπείται, πλέον, η μεταβολή μετά τις 30 ημέρες και να μην επέρχεται σημαντικά μεγαλύτερη βελτίωση στις 60 ημέρες, σε σχέση με αυτή στις πρώτες 30 ημέρες, όπως και στην περίπτωση της λείανσης (απαλότητας) του δέρματος (Sesm).

- ✓ Ο συνδυασμός εφαρμογής κρέμας και λήψης ret-os του συμπληρώματος διατροφής του λιποϊκού οξέος φαίνεται, αν και βελτίωσε στατιστικά σημαντικά τη μείωση των ρυτίδων σε σχέση με την αρχή T=0, ότι δεν έδρασε συνεργιστικά και δεν οδήγησε, όπως και στην περίπτωση της λείανσης του δέρματος, στη μεγαλύτερη μεταβολή (μείωση των ρυτίδων). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ανοχή των υποδοχέων του δέρματος μετά από τη συνεχή χρήση με την ταυτόχρονη λήψη και των δύο προϊόντων (ret-os και τοπικά) και στη μείωση της ευαισθητοποίησής τους, αν και χρειάζεται να γίνουν και άλλα πειράματα για να επιβεβαιώσουν αυτή την εκδοχή.
- ✓ Η λήψη του απλού συμπληρώματος διατροφής με α-LA, επιβεβαιώθηκε και εδώ, ότι υπερτερεί στην αντιγηραντική δράση έναντι των υπολοίπων σχημάτων και ακολουθεί ο συνδυασμός μαζί με την κρέμα και ύστερα η κρέμα μόνο με α-LA, αφού δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.1$), όπως τα άλλα στην περίπτωση της μείωσης του συνολικού αριθμού των ρυτίδων.

Επειδή δεν υπήρχε κανονική κατανομή στις μετρήσεις μεταξύ των ομάδων και ο αριθμός του δείγματος των εθελοντών σε κάθε ομάδα ήταν σχετικά μικρός (5 άτομα ανά ομάδα) εφαρμόστηκε για τη σύγκριση όλων των ομάδων μεταξύ τους, το μη παραμετρικό μοντέλο του Kruskal Wallis. Έτσι, ελήφθησαν συμπεράσματα με βάση τις διάμεσες τιμές (median) όλων των groups μεταξύ τους, για να επιβεβαιωθούν ή όχι τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που ελήφθησαν για τις παραμέτρους Sesm & Sew, με βάση τις μετρήσεις στην αρχή (T=0) με την ανάλυση της Anova, όπου υπήρχαν κανονικές κατανομές.

- ✓ Όλες οι ομάδες των εθελοντών σε σύγκριση με την ομάδα (control), δηλαδή την ομάδα με την κρέμα Placebo, έδειξαν να έχουν σημαντική διαφορά ως προς

την λείανση-απάλυνση του δέρματος του προσώπου (παρεία και άκρη του οφθαλμού). Μεγαλύτερη βελτίωση με 39,7% έδειξε η ομάδα B των ατόμων που έλαβαν per-os το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, ειδικά τις πρώτες 30 ημέρες που έχουμε δει ότι αποτελεί το καθοριστικό στάδιο εμφάνισης της αποτελεσματικότητας της αγωγής. Ακολουθεί η κρέμα με α-LA κατά 30,5 % οριακά πολύ κοντά με το συνδυασμό κρέμας και συμπληρώματος διατροφής per-os με 28,5 %. Όλες οι διαφορές στις 30 ημέρες ήταν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο 6% (Kruskal Wallis $p < 0.06$), ενώ παρόλο που στις 60 ημέρες το συμπλήρωμα διατροφής παρουσιάζει, όπως και στο διάστημα T=30, την μεγαλύτερη διαφορά τόσο από τα υπόλοιπα, όσο και από το Placebo group (control) και ακολουθούν η κρέμα και ο συνδυασμός της με το συμπλήρωμα, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, αφού δεν ήταν στατιστικά σημαντικές οι διαφορές ($p > 0.1$).

- ✓ Φαίνεται ότι επιβεβαιώνεται και μεταξύ των ομάδων, όπως και στις παραμέτρους Sesm (λείανση προσώπου) και Sew (αριθμός ρυτίδων), που συγκρίθηκαν στην αρχή (T=0, baseline) και βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές οι διαφορές ($p < 0.05$), η ικανή αντιγηραντική δράση του α-λιποϊκού οξέος, όταν λαμβάνεται πρωτίστως per-os το συμπλήρωμα α-LA και μετά οριακά η κρέμα με α-LA και ο συνδυασμός της κρέμας με το συμπλήρωμα α-LA.
- ✓ Η διαφορές μεταξύ των ομάδων σχετικά με τον αριθμό των ρυτίδων Sew δεν μπορούν να αξιολογηθούν με ασφάλεια, αφού δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($p > 0,1$). Παρόλο αυτά, φαίνεται ειδικά στις 60 ημέρες να απεικονίζεται πάλι η θετική επίδραση του συμπληρώματος διατροφής με α-LA, ως η μεγαλύτερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα σχήματα και την control ομάδα (κρέμα Placebo), με την κρέμα να ακολουθεί οριακά και εδώ με τον συνδυασμό κρέμας και συμπληρώματος διατροφής μαζί.

Η λήψη των βιοψιών διάτρησης από δύο άτομα από κάθε ομάδα πριν την έναρξη της αγωγής T=0 και στο τέλος T=60 μέρες, από το εσωτερικό μέρος του αντιβράχιου και η ειδική ιστοχημική χρώση με το σύστημα Αιματοξυλίνης-

Ηωσίνης και Masson's Trichrome επιβεβαιώνει πλήρως τα αποτελέσματα της αντιγηραντικής θεραπείας με τις βιοφυσικές μεθόδους, αφού μετρήθηκαν το πάχος της επιδερμίδας και του θηλώδους χορίου. Ειδικότερα, έχουν εξαχθεί τα εξής συμπεράσματα :

- ✓ Η κρέμα με το α-λιποϊκό οξύ (1,5 % w/w), το συμπλήρωμα διατροφής (120 mg/καψάκι) και ο συνδυασμός κρέμας με α-LA και συμπληρώματος διατροφής με α-LA, αύξησαν το πάχος της επιδερμίδας και του θηλώδους χόριου, σε σχέση τόσο με τις αρχικές μετρήσεις (T=0, baseline), όσο και με τις μετρήσεις της κρέμας Placebo (χωρίς α-LA) και χωρίς λήψη συμπληρώματος με α-LA.
- ✓ Παρόλο, που δεν μπορούν να αξιολογηθούν στατιστικά οι διαφορές, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων (δύο βιοψίες από κάθε ομάδα), φαίνεται ότι η κρέμα με α-LA να επιφέρει μεγαλύτερη αύξηση στο κολλαγόνο (τύπος I, III) και επομένως στο πάχος της επιδερμίδας και του χορίου. Ακολουθούν κοντά το συμπλήρωμα διατροφής με α-LA και ο συνδυασμός κρέμας και συμπληρώματος με α-LA. Δεν μπορούν όμως να συγκριθούν ποσοτικά με τα αποτελέσματα των βιοφυσικών μετρήσεων, όπου εκεί έγινε στατιστική επεξεργασία λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος.
- ✓ Η λήψη των βιοψιών από τους εθελοντές (ex vivo) αποτελεί ισχυρή απόδειξη για τη σαφή αύξηση του πάχους της επιδερμίδας και του κυρίως δέρματος (χόριο) με τη χρήση της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής θεραπείας με α-λιποϊκό οξύ, τόσο στην κρέμα (1,5 % α-LA), όσο και στο συμπλήρωμα διατροφής (120 mg α-LA/καψάκι). Ακόμη, επιβεβαιώνουν τα θετικά αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις βιοφυσικές μεθόδους, σχετικά με την αύξηση της απαλότητας του δέρματος, όσο και της μείωσης του αριθμού και του πλάτους των ρυτίδων, μέσω της αύξησης του κολλαγόνου (I, III), χωρίς να μπορούν να ξεχωρίσουν μεταξύ τους οι δύο τύποι.
- ✓ Ο συνδυασμός κρέμας με α-LA και συμπληρώματος με α-LA δείχνει, παρόλη την αύξηση του κολλαγόνου σε σχέση τόσο με την αρχή (T=0 μέρες) όσο και με την κρέμα Placebo (χωρίς α-LA), ότι όπως και στις μετρήσεις με τις βιοφυσικές μεθόδους δεν δρα συνεργιστικά και δεν επιφέρει μεγαλύτερη

αύξηση σε σχέση με τα υπόλοιπα σχήματα, λόγω πιθανής ανοχής των υποδοχέων του δέρματος, αν και πρέπει αυτό να επιβεβαιωθεί με τη διενέργεια στο μέλλον μεγαλύτερης έκτασης κλινική μελέτη και άλλα πειράματα.

Η αξιολόγηση των σκευασμάτων σχετικά με τις ανεπιθύμητες ενέργειες από τους εθελοντές και της ασφάλειας της λήψης per-os του συμπληρώματος διατροφής με α-LA μία φορά την ημέρα, της τοπικής εφαρμογής της κρέμας α-LA πρωί-βράδυ στην παρειά και στην άκρη των οφθαλμού του συνδυασμού και των δύο προϊόντων (συμπλήρωμα διατροφής per-os και κρέμας με α-LA), κατά τη διενέργεια της κλινικής μελέτης, έδειξε τα εξής :

- ✓ Υπό τους κανόνες ορθής και λογικά προβλεπόμενης χρήσης, τα προϊόντα ήταν μη ερεθιστικά, αφού ο δείκτης ερεθισμού (μέσος όρος ερυθήματος και οιδήματος των εθελοντών) ήταν $<0,5$. Έτσι, η κρέμα που παρασκευάστηκε ειδικά για αυτή τη μελέτη, με συγκέντρωση του α-λιποϊκού οξέος 1,5 % w/w (δραστική αντιοξειδωτική-αντιγηραντική ουσία), καθώς και ο συνδυασμός της με τη λήψη per-os του συμπληρώματος του α-λιποϊκού οξέος 120 mg/καψάκι, αποδείχτηκαν δερματολογικά ασφαλή, αφού κανένα σοβαρό ή άλλο ανεπιθύμητο περιστατικό δεν σημειώθηκε (ερεθιστική ή αλλεργική δερματίτιδα εξ' επαφής, φωτοαλλεργική δερματίτιδα κνίδωση κ.α.).

Η πρωτοτυπία, της δερματοκοσμητολογικής μελέτης της παρούσας εργασίας συνοψίζεται στα εξής :

- ✓ Είναι η πρώτη φορά που έγινε περιορισμένης έκτασης κλινική μελέτη για την σύγκριση της αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής δράσης μίας τοπικά εφαρμοζόμενης κρέμας (καλλυντικό) με α-LA (1,5 % w/w), που αναπτύχθηκε για αυτό το σκοπό, με ένα per-os χορηγούμενο συμπλήρωμα διατροφής α-LA (120 mg/καψάκι) και μελετήθηκε η πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ τους.

- ✓ Μετρήθηκε για πρώτη φορά με βιοφυσικές μεθόδους (in vivo) η αντιοξειδωτική-αντιγηραντική δράση του α-λιποϊκού οξέος σε μία κρέμα με ποσοστό 1,5 % w/w και σε ένα συμπλήρωμα διατροφής με περιεκτικότητα (120 mg/καψάκι).
- ✓ Είναι η πρώτη φορά που ελήφθησαν βιοψίες και μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του λιποϊκού οξέος (αύξηση του πάχους) τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο θηλώδες χόριο σε μία καλλυντική κρέμα και αξιολογήθηκε (ex vivo) η αποτελεσματικότητα μεταξύ διαφορετικών σχημάτων μιας αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής αγωγής, όπως της τοπικής εφαρμογής της κρέμας με α-LA (cosmetic), της per-os χορήγησης του α-LA ως συμπλήρωμα διατροφής (nutraceutical), καθώς και του συνδυασμού κρέμας και συμπληρώματος διατροφής με α-λιποϊκό οξύ (cosmetic & nutraceutical).
- ✓ Αξιολογήθηκε δερματολογικά η ενδεχόμενη τοπική τοξική δράση των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν στην κλινική μελέτη στους εθελοντές στα διάφορα σχήματα και δοσολογίες του α-λιποϊκού οξέος (τοπική εφαρμογή κρέμας α-LA 1,5% w/w, per-os χορήγηση συμπληρώματος διατροφής 120 mg/καψάκι και συνδυασμός και των δύο).

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής- αντιγηραντικής δράσης της κρέμας με α-LA 1.5 % και του συμπληρώματος διατροφής (α-LA 120 mg), καθώς και των πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών, κατά τη χρήση τους, προσφέρει στην επιστημονική κοινότητα τα εξής:

- i) Την καλύτερη γνώση σχετικά με την αξιολόγηση της δράσης του συμπληρώματος διατροφής με α-λιποϊκό οξύ μόνο του, ως αντιοξειδωτικό-αντιγηραντικό προϊόν (nutraceutical).
- ii) Την γνώση για την αποτελεσματικότητα της κρέμας με μικρότερο ποσοστό ενσωμάτωσης της δραστικής ουσίας του α-LA (1,5 % w/w), σε σχέση με το

προηγούμενο αναφερθέν ποσοστό α-LA (5% w/w) στη διεθνή βιβλιογραφία, σχετικά με την αντιγηραντική της δράση, μέσω της διενέργειας κλινική μελέτης.

iii) Την μελέτη της συνεργιστικής αντιοξειδωτικής-αντιγηραντικής δράσης από την ταυτόχρονη χρήση και των δύο προϊόντων (per-os λήψη του συμπληρώματος διατροφής και τοπική εφαρμογή κρέμας α-LA), που δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα.

iv) Την αξιολόγηση των ενδεχόμενων ανεπιθύμητων ενεργειών κατά την χρήση των προϊόντων από τους εθελοντές μόνα τους ή σε συνέργεια μεταξύ τους.

Περισσότερο εκτεταμένες δερματοκοσμητολογικές μελέτες με διάφορα καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής, που περιέχουν α-λιποϊκό οξύ θα τεκμηριώσουν με μεγαλύτερο αριθμό παρατηρήσεων τις αντιοξειδωτικές-αντιγηραντικές του ιδιότητες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το α-λιποϊκό οξύ (α-lipoic acid ή α-LA) γνωστό και ως lipoic acid (LA) ή θειοκτικό οξύ (thioctic acid) είναι απαραίτητο για τον αερόβιο μεταβολισμό και συμμετέχει ως συμπράγοντας (cofactor) σε πολλά ενζυμικά συστήματα. Μπορεί να λειτουργήσει ως χειλικό αντιδραστήριο. Αλληλεπιδρά με άλλα αντιοξειδωτικά και μπορεί να τα αναγεννήσει, όπως η βιταμίνη C, η γλουταθειόνη και η βιταμίνη E. Για αυτό το λόγο το α-LA ονομάζεται και ως καθολικό (universal) αντιοξειδωτικό. Η θεραπευτική του δράση βασίζεται στις μοναδικές αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει διερευνηθεί η προληπτική και επικουρική θεραπευτική επίδραση του λιποϊκού οξέος, μετά από per-os χορήγηση ως συμπλήρωμα διατροφής, σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, η διαβητική νευροπάθεια, οι καρδιαγγειακές, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η παχυσαρκία, τον καρκίνο και το AIDS.

Ακόμη, έχει μελετηθεί η αντιοξειδωτική του δράση στα βιομόρια όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA, που το οξειδωτικό stress μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλιστικές αλλοιώσεις και στη φωτογήρανση. Δεν έχει παρουσιάσει, μέχρι σήμερα, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Διατίθεται ακόμη σε κάποιες χώρες ως φάρμακο (Γερμανία) για την ενδοφλέβια θεραπεία στην διαβητική νευροπάθεια και ως δραστικό συστατικό κατά της γήρανσης στα καλλυντικά προϊόντα. Η αντιοξειδωτική δράση του α-λιποϊκού οξέος στα καλλυντικά προϊόντα και ιδιαίτερα η δράση του κατά της φωτογήρανσης έχει μελετηθεί μετά από χορήγηση μίας κρέμας με α-LA 5 % w/w στο πρόσωπο, καθώς και σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E.

Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της χορήγησης του α-λιποϊκού οξέος per-os σε σειρά δερμοκοσμητολογικών παραμέτρων. Διεξήχθη μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, σε παράλληλες ομάδες κλινική μελέτη (Randomized double blind study, parallel groups), για χρονικό διάστημα δύο μηνών, όπου μελετήθηκε η επίδραση του α-λιποϊκού οξέος (α-LA) σε είκοσι εθελοντές, σε σειρά δερματοκοσμητολογικών παραμέτρων με τη χρήση *in-vivo* μεθόδων (βιοφυσικές) και με *ex-vivo* μεθόδους (βιοψίες). Χρησιμοποιήθηκαν οι βιοφυσικές

μέθοδοι για την αξιολόγηση της μικροτοπογραφίας του δέρματος (απαλότητα και μείωση των λεπτών γραμμών) και ελήφθησαν βιοψίες, προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή αύξηση του κολλαγόνου στο χόριο (θηλώδεις) του δέρματος, στην αρχή και στο τέλος της θεραπείας :

- i) Μετά από την τοπική εφαρμογή στο πρόσωπο δύο φορές την ημέρα της αντιοξειδωτικής κρέμας με α-λιποϊκό οξύ (1,5 % w/w).
- ii) Μετά από τη χορήγηση per-os στους εθελοντές του συμπληρώματος διατροφής του α-λιποϊκού οξέος (120 mg α-LA, εταιρία Solgar, μία φορά την ημέρα).
- iii) Με το συνδυασμό λήψης per-os συμπληρώματος διατροφής και τοπικής εφαρμογής της κρέμας με α-λιποϊκό οξύ.
- iv) Μετά την τοπική εφαρμογή στο πρόσωπο της κρέμας Placebo (κρέμας που δεν περιείχε α-LA και δεν λάμβαναν οι εθελοντές συμπλήρωμα διατροφής με α-λιποϊκό οξύ).

Επιπλέον, μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν κλινικά οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες στους εθελοντές, από τοξικολογικής πλευράς, πριν την μελέτη με εφαρμογή με «Patch test 48h» και κατά την διενέργειά της. Τέλος, μελετήθηκε η σταθερότητα του δραστικού συστατικού (α-LA) στα προϊόντα, τόσο της κρέμας, όσο και του συμπληρώματος διατροφής, μετά από εξαναγκασμένες συνθήκες διάσπασης, επιταχυνόμενης και μακροχρόνιας γήρανσης.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μία αναλυτική μέθοδος με υδροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή UV για τον προσδιορισμό, τόσο του α-LA στο συμπλήρωμα διατροφής (καψάκι 120 mg), όσο και στην κρέμα με α-LA 1.5 % w/w. Η μέθοδος ήταν γρήγορη, ακριβής, ανθεκτική, εκλεκτική, επαναλήψιμη και αξιόπιστη και για τα δύο είδη προϊόντων και επικυρώθηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες της ICH Q2 (R1): International Conference on Harmonization. (2005).

Η μέθοδος αυτή, παρόλη τη δυσκολία απομόνωσης των εκδόχων της κρέμας, αποδείχτηκε πρακτική και αξιόπιστη και μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στον ποιοτικό έλεγχο, τόσο των συμπληρωμάτων διατροφής, όσο και των καλλυντικών

προϊόντων με α-λιποϊκό οξύ, αφού επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του στα τελικά προϊόντα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της ΕΕ & του ΕΟΦ για τη φαρμακευτική βιομηχανία.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με όσο το δυνατόν καλύτερα γνωρίζουμε, δεν έχει αναφερθεί καμία επικυρωμένη αναλυτική μέθοδος, που να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό του α-LA σε καλλυντικές κρέμες και να μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και στα δύο είδη προϊόντων (συμπλήρωμα διατροφής και κρέμα τοπικής εφαρμογής).

Τα συμπεράσματα που ελήφθησαν από την κλινική μελέτη στους εθελοντές συνοψίζονται ως εξής:

- ✓ Στο τέλος της αγωγής (60 μέρες) παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση του πάχους της επιδερμίδας κατά 67 % και του θηλώδους χόριου κατά 57 %, στην ομάδα των εθελοντών (Α) που εφάρμοσαν κρέμα με α-LA.
- ✓ Ακολουθεί η ομάδα Γ : εθελοντές που εφάρμοσαν κρέμα με α-LA και έλαβαν συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, με αύξηση 64,7 % στην επιδερμίδα. Στο χόριο το πάχος αυξήθηκε κατά 29,3 % στην ομάδα Β : εθελοντές που έλαβαν συμπλήρωμα διατροφής με α-LA, που είναι οριακά ίδια 27, 4% με την ομάδα Γ. Αύξηση 49,3 % στο πάχος της επιδερμίδας επέρχεται στην ομάδα Β, τρίτη στη σειρά μετά την ομάδα Α και Β.
- ✓ Η κρέμα Placebo, χωρίς α-λιποϊκό οξύ, δεν έδειξε καμία ουσιαστική αύξηση τόσο στο πάχος της επιδερμίδας, όσο και στο χόριο, πριν (pre) και μετά (post) την αγωγή.
- ✓ Η κρέμα με α-LA φαίνεται ότι συντελεί στη μεγαλύτερη βελτίωση της μικροτοπογραφίας του δέρματος και ακολουθεί το συμπλήρωμα διατροφής, οριακά με το συνδυασμό της κρέμας και του λιποϊκού οξέος.
- ✓ Η λήψη ταυτόχρονα της κρέμας του α-LA και του συμπληρώματος με α-LA δεν οδηγεί στη μεγαλύτερη αύξηση του πάχους της επιδερμίδας και του κυρίως δέρματος (χόριο) και δεν δρα συνεργιστικά, όπως αποδείχτηκε και στις μετρήσεις με τις βιοφυσικές μεθόδους.

- ✓ Οι μετρήσεις που έγιναν στις βιοψίες, αν και δεν έγινε στατιστική επεξεργασία λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που ελήφθησαν από τους εθελοντές, βρίσκονται πολύ κοντά σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις βιοφυσικές μεθόδους και επιβεβαιώνουν την αντιοξειδωτική-αντιγηραντική δράση του λιποϊκού οξέος.

Τέλος, τα προϊόντα, κατά την κλινική μελέτη, αποδείχτηκαν δερματολογικά ασφαλή (μη ερεθιστικά), ως προς τις ανεπιθύμητες ενέργειες (ερεθισμός, αλλεργία, φωτοαλλεργία) τόσο με την χρήση επιδερμικών δοκιμασιών «Patch test 48h», όσο και με την κλινική αξιολόγηση.

SUMMARY

α -Lipoic acid or α -LA known as lipoic acid (LA) or thioctic acid is necessary to aerobic metabolism and participates as a cofactor in a lot of enzymic systems. It may act as a chelating agent. It interacts with other antioxidants and may regenerate them such as vitamin C, glutathione and vitamin E. For this reason is considered as a universal antioxidant. Its therapeutic action is based on unique antioxidant properties. In international literature the preventing and ancillary therapeutic treatment of α -LA has been investigated after per-os administration as a dietary supplement in diseases such as : diabetes, diabetic neuropathy, cardiovascular, neurodegenerative autoimmune diseases, the obesity, the cancer and AIDS.

Furthermore, the antioxidant efficacy of α -LA has been investigated in biomolecules such as lipids, proteins, and DNA, where the oxidative stress may cause degenerative lesions and photoaging. It has not referred serious adverse events until now. It is administrated as a medicine in some countries such as Germany for the intravenous therapy for diabetic neuropathy and as an active ingredient against aging in cosmetic products. The antioxidant action of α -LA in cosmetic products and especially against photoaging has been investigated by a topical use of cream with 5% w/w α -LA on the face and with combination with other antioxidants such as vitamins C and E.

The aim of this doctoral thesis was the research of effect of per-os administration of α -lipoic acid in a series of dermocosmetic parameters. A randomized double blide study, parallel groups, clinical study conducted for two months, where the efficacy of α -Lipoic acid was studied in twenty subjects, for the evaluation of dermatocosmetic parameters by *in-vivo* (biophysical) and *ex-vivo* methods (biopsies). Biophysical methods were used for the evaluation of microtopography of skin (smoothness, decrease of fine lines) and biopsies were received, in order to study the possible increase of collagen in dermis (papillary) of skin, at the beginning of study and at the end as follows :

- i) After the topical use on the face of the antioxidant cream with α -lipoic acid (1,5 % w/w) twice a day.

- ii) After per-os administration to subjects of a dietary supplement with α -lipoic acid (120 mg α -LA, Solgar company, once a day).
- iii) With the combination of per-os administration of the dietary supplement and topical use of cream with α -lipoic acid.
- iv) After the topical use on the phase of placebo cream (cream without α -LA and without administration of dietary supplement of α -LA by subjects).

Moreover, the possible adverse events were studied and evaluated clinically to subjects, from the toxicological point of view, before the study with a Patch test 48h and during the study. Additionally, the stability of active substance (α -LA) was studied in both cream and dietary supplement after forced degradation conditions of accelerated and long term aging.

In this doctoral thesis an analytical method was developed with reversed phase liquid chromatography and UV detection for the determination of both α -LA dietary supplement (capsule 120 mg) and cream with 1,5 % w/w. The method proved to be accurate, robust, selective, precise in both types of products and validated according to ICH Q2 (R1): International Conference on Harmonization. (2005).

The above mentioned method, despite the difficulties of excipients of cream, proved to be practical and reliable and may be applied successfully in quality control in both dietary supplements and cosmetic products with α -Lipoic acid, since can determine the analyte (α -LA) in finished products, according to EE and (National Organization of Medicines, EOF) regulation for the pharmaceutical industry.

In the international literature, to the best of our knowledge, it has not referred a validated analytical method, which can determine quantitatively the α -Lipoic acid in cosmetic creams and may be applied successfully in two types of products (dietary supplement and cream of topical use). The conclusions from the clinical study of subjects are summarized below :

- ✓ In the end of the study (60 days) the biggest increase was remarked in skin epidermis by 67% and 57% in papillary dermis in (A) group of subjects, which applied the cream with α -LA.
- ✓ (C) group is followed : subjects who applied the cream with α -LA and received per-os the dietary supplement of α -LA with an increase by 64,7 % in epidermis. In dermis the density was increased by 29,3% in (B) group : subjects who received per-os the dietary supplement of α -LA, which is almost the same increase, 27,4 %, with (C) group.
- ✓ An increase of 49,3% in density of epidermis is achieved in B group, which is classified as third after the A and C groups.
- ✓ Placebo group, (without α -lipoic acid) did not show a significant increase, neither in density, nor in dermis pro and post treatment.
- ✓ The cream with α -LA proved to be more effective and contributes to bigger improvement of microtopography of skin. The dietary supplement follows, almost equal with the combination of cream and dietary supplement of α -LA.
- ✓ The administration of both cream and dietary supplement with α -LA do not contribute to increase in epidermis and dermis and therefore do not act synergistically, which result was the same proved by biophysical methods.
- ✓ The measurements of biopsies, although they have not been processed statistically, due to small number of subjects, almost agree with the results received by biophysical methods and confirm the antioxidant-antiaging action of α -lipoic acid.

Finally, the products, during the clinical study, proved to be dermatologically safe (not irritant), regarding the toxicity (erythema, allergy, photo-allergy), using both the epidermal Patch test 48h and the clinical evaluation.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Reed L.J, Debusk B.G, Gunsalus I.C, Hornberger C.S. Crystalline α -Lipoic acid : A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*.1951;114, 93-94.
- 2) <http://www.efsa.europa.eu> (accessed 05/11/2019)
- 3) Goraca A, Halina Huk-K, Alekdandra P, etc. Lipoic acid–biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. 2011; 63: 849-858.
- 4) Barky E. I, Hussein A.R, Mohamed S.A. The potent antioxidant alpha lipoic acid. *J Plant Chem Ecophysiol*. 2017; 2:1016.
- 5) Suzuki Y.J, Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun*. 1991; 15: 255–263.
- 6) Scott B.C, Aruoma O.I, Evans P.J, O’Neill C, Van der Vliet A, Cross C.E, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res*. 1994; 20:119–133.
- 7) Islam M.T. Antioxidant activities of dithiol alpha-lipoic acid. Bangladesh. *J Med Sci*. 2009; 8: 34–49.
- 8) Biewenga G.P, Haenen G.R, Bast A. The pharmacology of antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol Vasc Syst*. 1997; 29: 315-331.
- 9) Packer L, Witt E.H, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1995; 19:227-250.
- 10) Bilsk A, Wodek L. Lipoic acid – the drug of the future? *Pharmacological reports*. 2005; 57:570-577
- 11) Bahare S, Yakup B.Y, Gizem A, Tugba B. T, Mohamad F. M, Devina L, Muhammad A, Natália M, William C. Cho and Javad Sharifi-Rad. Insights on the Use of Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules*. 2019; 9: 356
- 12) Raddatz G, Bisswanger H. "Receptor site and stereospecificity of dihydrolipoamide dehydrogenase for R- and S-lipoamide: A molecular modeling study". *Journal of Biotechnology*. 1997; 58 (2): 89–100.

- 13) Carlson DA, Young KL, Fischer SJ, Ulrich H. "Ch. 10: An Evaluation of the Stability and Pharmacokinetics of R-lipoic Acid and R-Dihydrolipoic Acid Dosage Forms in Plasma from Healthy Human Subjects". *Lipoic Acid: Energy Production, Antioxidant Activity and Health Effects*. pp. 235–70. In Packer & Patel 2008.
- 14) Packer L, Kraemer K, Rimbach G, "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications". *Nutrition*. 2001;17 (10): 888–95.
- 15) Fontanella L. "Preparation of optical antipodes of alpha-lipoic acid". *Farmaco; Edizione Scientifica*. 1955;10(12): 1043–5.
- 16) <https://sabinsa.com> (accessed 01/10/2018)
- 17) Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Corvallis. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/lipoic-acid> (accessed 05/11/2019)
- 18) Konrad D, Somwar R, Sweeney G, Yaworsky K, Hayashi M. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation : Potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes*. 2001; 50:1464-1471.
- 19) Chen W-L, Kang C-H, Wang S-G, Lee H-M. A-Lipoic acid regulates lipid metabolism through induction of siruine 1 (SIRT1) and activation of AMP – activated protein kinase. *Diabetologia*. 2012; 55: 1824-1835.
- 20) Park S, Karunakaran U, Jeoung N.H, Jeon J.-H, Lee I.-K. Physiological effect and therapeutic application of alpha lipoic acid. *Cur Med Chem*. 2014; 21: 3636–3645.
- 21) Ziegler D, Nowak H, kempler P, Vargha P & Low P. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid : a meta-analysis. *Diabet Med*. 2004; 24:114-121.
- 22) Suzuki YJ, Aggarwal B, Packer L. Alpha-Lipoic acid is a potent inhibitor of NF-kappa B activation in human T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189: 1709-15.

- 23) Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S and Dhama, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Biomed Res Int.* 2014; 14:1-19
- 24) Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritscher HJ, Packre L: Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 327: 330-334.
- 25) Gerreke B, Guido H and Aalt B. The pharmacology of the Antioxidant Lipoic acid. *Gen Pharmac.* 1997; 29: 315-331.
- 26) Bast A, Haenen GR: a multifunctional antioxidant. *Biofactors.* 2003; 17: 207-213.
- 27) Valko M, Morris H, Cronin MT : Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2006; 12: 1161-1208.
- 28) Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta. Gen Subj.* 2009; 1790:1149-60.
- 29) Wong A, Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Schinzel R, Wiesinger H, Riederer P, et al. Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation end products in murine microglia. *Eur J Neurosci.* 2001; 14:1961-7.
- 30) Busby RW, Schelvis JP, Yu DS, Babcock GT, Marletta MA. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an Iron Sulfur protein. *J Am Chem Soc.* 1999; 121:4706-7.
- 31) Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasarathy S, Rajagopalan S. Evidence that a lipoic acid inhibits NF-kB activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res.* 2011; 60:219-25.
- 32) Ha H, Lee J-H, Kim H-N, Kim H-M, Kwak HB, Lee S, et al. a-Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E2 synthesis *J Immunol.* 2006; 176:111-7.
- 33) Salinthon S, Schillace RV, Marracci GH, Bourdette DN, Carr DW. Lipoic acid stimulates cAMP production via the EP2 and EP4 prostanoid receptors

- and inhibits IFN gamma synthesis and cellular cytotoxicity in NK cells.
J Neuroimmunol. 2008; 199:46-55.
- 34) Schillace RV, Pisenti N, Pattamanuch N, Galligan S, Marracci GH, Bour DN, et al. Lipoic acid stimulates cAMP production in T lymphocytes and NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 354:259-64.
- 35) Chaudhary P, Marracci GH, Bourdette DN. Lipoic acid inhibits expression of ICAM-1 and VCAM-1 by CNS endothelial cells and T cell migration into the spinal cord in experimental autoimmune encephalomyelitis.
J Neuroimmunol. 2006; 175:87-96.
- 36) Sardu C, Santulli G, Santamaria M, Barbieri M, Sacra C, Paolisso P, et al. Effects of alpha lipoic acid on multiple cytokines and biomarkers and recurrence of atrial fibrillation within 1 Year of catheter ablation.
Am J Cardiol. 2017; 119:1382-6.
- 37) Sola S, Mir. M.Q, Cheema F.A, Khan-Merchant N, Menon R.G, Parthasarathy S, Khan B.V. Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation.* 2005; 111: 343–348.
- 38) Mohammadi V, Khalili M, Eghtesadi S. Risk factors in men with chronic spinal cord injury: a clinical trial. *Spinal Cord.* 2015; 53:621-4.
- 39) Gleiter C.H, Schug B.S, Hermann R, Elze M, Blume H.H, Gundert-Remy U. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers.
Eur J Clin Pharmacol. 1996; 50: 513–514.
- 40) Gleiter CH, Schug BS, Hermann R et al. Influence of food intake on the bioavailability of thioctic acid enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996; 50:513-514.
- 41) Hermann R, Niebch G, Borbe H.O, Fieger-Büschges H, Ruus P, Nowak H, Riethmüller-Winzen H, Peukert M, Blume H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of deferent racemic–lipoic acid formulations in healthy volunteers. *Eur J Pharmacol Sci.* 1996; 4: 167–174.

- 42) Teichert J, Tuemmers T, Achenbach H, Preiss C, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. *J Clin Pharmacol.* 2005; 45: 313–328.
- 43) Breithaupt-Grogler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume H.H, Schug B.S, Belz G.G. Dose-proportionality of oral thioctic acid–coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci.* 1999; 8: 57–65.
- 44) Uchida R, Iwamoto K, Nagayama S, Miyajima A, Okamoto H, Ikuta N, Fukumi H, Terao K, Hirota T. Effect of gamma-Cyclodextrin Inclusion Complex on the Absorption of R-alpha-Lipoic Acid in Rats. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 10105–10120.
- 45) Uchida R, Okamoto H, Ikuta N, Terao K, Hirota T. Enantioselective Pharmacokinetics of alpha-Lipoic Acid in Rats. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 22781–94.
- 46) Brufani M. Acido α lipoico farmaco o integratore? Una panoramica sulla farmacocinetica, le formulazioni disponibili e le evidenze cliniche nelle complicanze del diabete. *Progress in Nutrition.* 2014; 15:1-15.
- 47) Bernkop-Schnurch A, Schuhbauer H, Clausen AE and Hanel R. Development of a sustained release dosage form α -lipoic acid. I. Design and in vitro evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2004; 30:27-34.
- 48) Jacob S, Henriksen EJ, Schiemann AL, et al. Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung* 1995; 45:872–4.
- 49) Jacob S, Ruus P, Hermann R, et al. Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27:309–14.
- 50) Chng H.T, New L.S, Neo A.H., Goh C.W, Browne E.R, Chan E.C. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.* 2009; 1251: 80–86.

- 51) Mignini F, Nasuti C, Gioventu G, Napolioni V, Martino P.D. Human bioavailability and pharmacokinetic profile of different formulations delivering alpha lipoic acid. *Open Access Sci Rep.* 2012; 1: 418.
- 52) Panigrahi M, Sadguna B.R, Shivakumar S.V, Kolluri S, Roy L, Packer V. R. alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1996; 717; 184–188.
- 53) Arivazhagan S.S, Kumaran C.P. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Exp Gerontol.* 2002; 37: 803–811.
- 54) Nowak H., Riethmuller-Winzen H., Peukert M., Blume H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic α -lipoic acid formulations in healthy volunteer. *Eur J Pharm Sci.* 1996; 4:167-174.
- 55) Schupke H, Hempel R, Peter G, Hermann R, Wessel K, Engel J, Kronbach T. New metabolic pathways of alpha-lipoic acid. *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29: 855–862.
- 56) Brufani M. Acido -lipoico farmaco o integratore. Una panoramica sulla farmacocinetica, le formulazioni disponibili e le evidenze cliniche nelle complicanze del diabete. *Prog Nutr.* 2014; 16: 62–74.
- 57) Maglione E, Marrese C, Migliaro E, Marcuccio F, Panico C, Salvati C, Citro G, Quercio M, Roncagliolo F, Torello C, et al. Increasing bioavailability of (R)-alpha-lipoic acid to boost antioxidant activity in the treatment of neuropathic pain. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2015; 86: 226–233.
- 58) Brufani M, Figliola R. (R)-lipoic acid oral liquid formulation: Pharmacokinetic parameters and therapeutic efficacy. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* 2014; 85: 108–115.
- 59) Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L: Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009; 54: 391–398.
- 60) Ceriello A, Ihnat MA and Thorpe JE. The “Metabolic Memory”: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications?

- J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:410-415.
- 61) Giacco F and Browlee M. Oxidative stress and diabetic complications.
Circ Res. 2010; 107:1058-1070.
- 62) Nakashima I, Kato M, Akhand AA, Suzuki H, Takeda K, Hossain K, et al.
Redox linked signal transduction pathways for protein tyrosine kinase
activation. *Antioxidants Redox Signal.* 2002; 4:517-31.
- 63) Heinisch BB, Francesconi M, Mittermayer F, Schaller G, Gouya G, Wolzt M,
Pleiner J. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients
with type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized trial.
Eur J Clin Invest. 2010; 40: 148–154.
- 64) Mehran R, Maryam A, Nasrin J, Anahita M..Alpha-lipoic acid (ALA)
supplementation effect on glycemic an inflammatory biomarkers:
A Systematic Review and meta- analysis.
Clinical Nutrition ESPEN. 2019; 32:16-28
- 65) Castro JP, El-Atat FA, McFarlane SI, Aneja A, Sowers JR.
Cardiometabolic syndrome: pathophysiology and treatment.
Curr Hypertens Rep. 2003; 5:393-401.
- 66) Group LAR. Cardiovascular effects of intensive lifestyle intervention in type 2
diabetes. *N Engl J Med.* 2013; 13:145-54.
- 67) Srivastava AK. Challenges in the treatment of cardiometabolic syndrome.
Indian J Pharmacol. 2012; 44:155.
- 68) Ziegler D, Low P.A, Freeman R, Tritschler H.J, Vinik A.I. Predictors of
improvement and progression of diabetic polyneuropathy following treatment
with -lipoic acid for 4 years in the NATHAN 1 trial.
J Diabetes Its Complicat. 2016; 30: 350–356.
- 69) Fahimeh H, Mitra H. Does alpha-lipoic acid affect lipid profile? A meta-
analysis and systematic review on randomized controlled trials.
European Journal of Pharmacology. 2019; 847: 1–10.
- 70) Hosseinpour-Arjmand S, Amirkhizi F, Ebrahimi-Mameghani M. The
effect of alpha-lipoic acid on inflammatory markers and body composition in

- obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther.* 2019; 44: 258–267.
- 71) Hagen T.M, Ingersoll R.T, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr C.M, Vinarsky V, Bartholomew J.C, Ames A.B. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J.* 1999; 13: 411–418.
- 72) Farr S.A, Poon H.F, Dogrukol-Ak, D, Drake J, Banks W.A, Eyerman E, Allan Butterfield D. Morley J.E. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem.* 2003; 84: 1173–1183.
- 73) Ono K, Hirohata M, Yamada M. α -Lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for β -amyloid fibrils in vitro. *Bioch Bioph Res Commun.* 2006; 341:1046–52.
- 74) Holmquist L, Stauchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, Engel J, Münch G. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer’s disease and related demenias. *Pharmacol Ther.* 2007; 113: 154–164.
- 75) Dinicola S, Proietti S, Cucina A, Bizzarri M, Fuso A.J.A. Alpha-Lipoic Acid Downregulates IL-1 and IL-6 by DNA Hypermethylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cells. *Antioxidant.* 2017; 6: 74.
- 76) Feuerecker B, Pirsig S, Seidl C, Aichler M, Feuchtinger A, Bruchelt, G, Senekowitsch-Schmidtke R. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13: 1425–1435.
- 77) Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery P.S, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 2006; 319: 1062–1069.
- 78) Dozio E, Ruscica M, Passafaro L, Dogliotti G, Steani L, Marthyn P, Pagani A, Demartini G, Esposito D, Fraschini F, et al. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27(Kip1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2010; 641: 29–34.

- 79) Joytirmay T, Amit Roy C, Monica P, Kartik M, Nilima P. K, Sony R, Birendranath B, Selvakumar E. α -Lipoic acid prevents the ionizing radiation-induced epithelial mesenchymal transition and enhances the radiosensitivity in breast cancer cells. *Eur J Pharmacology* 2020; 871: 172938.
- 80) Trivedi P.P, Jena G.B. Role of α -lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. *Food Chem Toxicol.* 2013; 59: 339–355.
- 81) Hill A.S, Werner J.A, Rogers, Q.R, O'Neill, S.L, Christopher M.M. Lipoic acid is 10 times more toxic in cats than reported in humans, dogs or rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.)* 2004; 88: 150–156.
- 82) Cremer D.R., Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha-lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46: 29–41.
- 83) Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau K.J, Meissner H.P, Lobisch M, Schutte K, Gries F.A. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN study). *Diabetologia.* 1995; 38; 1425–1433.
- 84) Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau K.J, Hasche H, Lobisch M., Schutte K, Kerum G, Malessa R. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care.* 1999; 22: 1296–1301.
- 85) Singh U, Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev.* 2008; 66: 646-657.
- 86) Ziegler D, Ametov A, Barinov A, Dyck PJ, Gurieva I, Low PA, et al. Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care.* 2006; 29:2365-70.
- 87) NTP (2004) NTP studies on alpha-lipoic acid. National Toxicology Program Database Search. http://ntp-apps.niehs.nih.gov/ntp_tox/index.cfm. and <http://ntp.niehs.nih.gov/?objectid=BDC48DD3-123F-7908-7BE9E4A6735D6757> (accessed 05/11/2019).

- 88) NIEHS (2004) Acetyl-L-Carnitine/Lipoic Acid Supplements - This material was prepared for the National Cancer Institute (NCI) for consideration by the Chemical Selection Working Group (CSWG) by Technical Resources International, Inc. under contract no. N02-07007.
<https://www.cancer.gov/> (accessed 01/11/2018)
- 89) UpToDate. Alpha-lipoic acid: Natural drug information.
<http://www.uptodate.com/contents/alpha-lipoic-acid-natural-drug>
(accessed 05/11/2019)
- 90) Bergqvist-Karlsson A, Thelin I, Bergendorff O. Contact dermatitis to alpha-lipoic acid in an anti-wrinkle cream.
Contact Dermatitis. 2006; 55(1): 56-7.
- 91) RTECS, Registry of Toxic Effects of Chemical_Substances.
http://en.wikipedia.org/wiki/Registry_of_ToxicEffects_of_Chemical_Substances
(accessed 05/11/2019)
- 92) Yadav V, Marracci GH, Munar MY, et al. Pharmacokinetic study of lipoic acid in multiple sclerosis: comparing mice and human pharmacokinetic parameters. *Mult Scler*. 2010; 16:387-397.
- 93) Florenzo M, Valentino S, Daniele T, Enea T, Francesco A.
Comparative crossover, randomized, open-label bioequivalence study on the bioequivalence of two formulations of thioctic acid in healthy volunteers
Clin Exp Hypertens. 2007; 29: 575-586.
- 94) Cremer D.R, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA), *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006; 46: 29-41.
- 95) Parente1A, Colannino G, Picconi O, Monastra G. Safety of oral alpha-lipoic acid treatment in pregnant women: a retrospective observational study.
Eur Rev Med Pharm Scie. 2017; 21: 4219-4227.
- 96) Di Cesare M, Tomassoni D, Amenta F and Ghelardini C. Tossicologia dell'acido tioctico e dei suoi enantiomeri. In R(+): Dalla ricerca di base alle applicazioni cliniche dell'enantiomero naturale di un antiossidante multifunzionale. *Pacini Editore*. 2010: 35-39.

- 97) Foster TS. Efficacy and safety of alpha-lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetes Educ.* 2007; 33:111-7.
- 98) Karaarslan U, İşgüder R, Bağ Ö, Kışla M, Ağın H, Ünal N. Alpha lipoic acid intoxication, treatment and outcome. *Clin Toxicol (Phila).* 2013; 51: 522.
- 99) Tolunay O, Çelik T, Kömür M, Gezgin AE, Kaya MS, Çelik Ü. A rare cause of status epilepticus; alpha lipoic acid intoxication, case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol.* 2015; 19: 730–2.
- 100) Angela R, Eleonora N, Alessandro B, Domenico S. Delayed hypersensitivity to α -lipoic acid: look at dietary supplements. *Cont Dermat Cut Allerg Environ Occup Dermat.* 2015; 73(1) :62-63.
- 101) Hadzik B, Grass H, Mayatepek E, Daldrup T, Hoehn T. Fatal non-accidental aliphatic lipoic acid intoxication in an adolescent girl. *Klin Padiatr.* 2014; 226: 292–4.
- 102) Muge Gulen, Yeliz Simsek, Emre Oner, Salim Satar. First description of the alpha lipoic acid intoxication in an adult patient worldwide following oral administration. *American Journal of Emergency Medicine.* 2018; 36: 1125-6.
- 103) Mahmoud YI, Mahmoud AA, Nassar G. Alpha-lipoic acid treatment of acetaminophen- induced rat liver damage. *Biotech Histochem.* 2015; 90: 594–600.
- 104) Φυσιολογία Δέρματος. Χριστίνα Αντωνίου. Ομότιμος Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ
- 105) Βασικά στοιχεία Ανατομίας και Φυσιολογίας του δέρματος. Ευστ. Ράλλης. Επίκ. Καθηγητής Δερματολογία & Αφροδισιολογίας., ΠΑΔΑ.
- 106) Η Εξωκυττάρια Μήτρα: Δομή & Λειτουργία. Δημήτριος Τζεράνης Ph.D. Εμβιομηχανική και Βιοϊατρική Τεχνολογία, Ε.Μ.Π.
- 107) Σύγχρονα θέματα κυτταρικής βιολογίας. Εξωκυττάρια ουσίες. Μαριάννα Χ. Αντωνέλου, Λέκτορας Τμήματος Βιολογίας, ΕΚΠΑ.
- 108) Το Κύτταρο Μια Μοριακή Προσέγγιση. 7^η Έκδοση. Geoffrey M. Cooper Robert E. Hausman.
- 109) Cristian O, Sreekumar P, Margarita Y, Germain P, David Mc D.

- Antioxidants and Skin Aging : A Review. *Cosmetic Dermatology*. 2009; 22: 563-70
- 110) Farage M. A, Miller K. W, Elsner P and Maibach H. I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008; 30: 87–95.
- 111) Rabe Jessica H, Adam J MD, Mamelak MD, Patrick J. S, McElgunn MD, Warwick L, Morison MD and Daniel N. Sauder. Photoaging: Mechanisms and repair *J Am Acad Dermatol*. 2006; 55:1-19
- 112) Barbara A. Gilchrest, Jean Krutmann. Skin Aging. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- 113) Bosset S, Bonnet-duquennoy M, Barre´ P, Chalon A, Kurfurst R, Bonte F, schne´ bert S, B.le Varlet and Nicolas F.J. Photobiology. Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *British Journal of Dermatology*. 2003; 149: 826–835.
- 114) Esra B, Umit M.S, Cansing Sackesen, Serpil E and Omer K. Oxidative Stress and Antioxidant Defese. *World Allergy Organization*. 2012; 5: 9-19.
- 115) Ramos-e-Silva M, Ramos-e-Silva S, Paula Fucci-da-Costa A. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*. 2013; 31: 750–758.
- 116) Noopur K, Pragati K and Ghanshyam Y. Recent Advances in Anti-Aging – A Review. *Global Journal of Pharmacology*. 2015; 9 (3): 267-271.
- 117) Οξειδωτικό stress, Φωτογήρανση και τοπική εφαρμογή αντιοξειδωτικών ουσιών. Α. Βαρβαρέσου. Καθηγήτρια Κοσμητολογίας. Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών. ΠΑΔΑ.
- 118) Xiaofeng Wanga, Hui Honga, Jianping Wua. Hen collagen hydrolysate alleviates UVA-induced damage in human dermal fibroblasts. *Journal of Functional Foods. Journal of Functional Foods*. 2019; 63: 103574.
- 119) Βασικές Αρχές Κοσμητολογίας. Ευθ.Τσιρίβας, Αθ. Βαρβαρέσου, Σ. Παπαγεωργίου, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ.

- 120) Beitner H. Therapeutics. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. *British J of Dermatology*. 2003; 149: 841-849.
- 121) Jing-Yi Lin, Fu-Hsiung Lin, James A. Burch, Nancy A. Monteiro,-Reviere, James M. Grichnic and Sheldon R. Pinnell. α -Lipoic acid is ineffective as a Topical antioxidant for photoprotection of skin. *The Journal of Invest. Dermatol*. 2004; 5: 996-998.
- 122) Patrícia Maria Berardo Gonc, Alves Maia Campos, Flávio Bueno de Camargo Júnior, Jirrah Pedro de Andrade and Lorena Rigo Gaspa. Efficacy of Cosmetic Formulations Containing Dispersion of Liposome with Magnesium Ascorbyl Phosphate, Alpha-Lipoic Acid and Kine *Photochemistry and Photobiology*. 2012; 88: 748–752.
- 123) Saly Sherif, Ehab R. Bendas, Sabry Badawy. The clinical efficacy of cosmeceutical application of liquid crystalline nanostructured dispersions of alpha lipoic acid as anti-wrinkle. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014; 86: 251–259.
- 124) Zhuang Zhou, Chao Liu, Xiaocao Wan, Liang Fang. Development of a w/o emulsion using ionic liquid strategy for transdermal delivery of anti-aging component α -lipoic acid: Mechanism of different ionic liquids on skin retention and efficacy evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020; 141:105042.
- 125) Μ. Κουπάρης. Σημειώσεις του μαθήματος «Σημειώσεις Διασφάλισης Ποιότητας» 2008.
- 126) <https://www.eof.gr> (accessed 01/01/2020)
- 127) https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/legislation_enEC (accessed 01/01/2020)
- 128) <https://www.iso.org/standard/41082.html> (accessed 01/01/2020)
- 129) ICH Guideline Q2(R1). Validation of analytical procedures: text and methodology in: International Conference on Harmonization. 2005. <http://www.ich.org> (accessed 05/11/2018)
- 130) M.Swartz. Chromatography/Meth Valid Encyclop Sep Science (2007)

- 131) Φαρμακευτική ανάλυση. David G. Watson. M. Κουμπάρης. 2015. Khan, M.I., Iqbal, Z. and Khan, A. Simultaneous Determination of the Endogenous Free α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid in Human Plasma and Erythrocytes by RP-HPLC Coupled with Electrochemical Detector. *Chromatographia*. 2011; 73: 929–939.
- 133) Chwatko, G., Krawczyk, M., Iciek, M., Kaminska, A., Bilska-Wilkosz, A., Marcykiewicz, B. and Głowacki, R. Determination of lipoic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Arab J Chem*. 2016; 12: 4878-4886.
- 134) Satoh, S., Toyooka, T., Fucushima, T. and Inagaki, S. Simultaneous determination of α -lipoic acid and its reduced form by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B*. 2007; 854: 109-115.
- 135) Teichert, J. and Preiss, R. High-performance liquid chromatographic assay for alpha-lipoic acid and five of its metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B*. 2002; 769: 269–281.
- 136) Trivedi, R., Kallem, R., Mamidi, R., Mullangi, R. and Srinivas, N. Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr*. 2004; 8: 681-686.
- 137) Kobayashi, Y. and Saito, K. Enantiomeric determination of α -lipoic acid in urine by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2019; 166: 435-439.
- 138) Campos, P.M., Prac, F.S.G. and Bentley, M.V.L.B. Quantification of lipoic acid from skin samples by HPLC using ultraviolet, electrochemical and evaporative light scattering detectors. *J Chromatogr B*. 2016; 1019: 66–71.
- 139) Durrani, A.I., Schwartz, H., Schmid, W. and Sontag, G. alpha-Lipoic acid in dietary supplements: development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2007; 45: 694-699.

- 140) Sittona, A., Schmida, M.G., Gubitza, G. and Aboul-Enein, H.Y. Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Methods*. 2004; 61: 19-124.
- 141) Mohan, A.-J., Rajkumar, B. and Bhavya, T. RP-HPLC method development and validation for the simultaneous quantitation estimation of pregabalin, mecobalamin and alpha lipoic acid in capsules. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 1: 270-277.
- 142) Poongothai, S., Ilavarasan, R. and Karrunakaran, C.-M. Simultaneous and accurate determination of vitamins B1, B6, B12 and alpha-lipoic acid in multivitamin by reversed phase high performance liquid chromatographic method. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010; 2: 133-139.
- 143) Padmaja, V., Prasanthi, M. and Mayuri, P. Stability-Indicated Reversed-Phase High Performance Liquid chromatography method for simultaneous estimation of methylcobalamin, alpha lipoic acid, pyridoxine HCL and folic acid in bulk and combined dosage form. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018; 11 302-307.
- 144) Scalia, S., Marchetti, N. and Bianchi, A. Comparative evaluation of different co-antioxidants on the photochemical- and functional-stability of epigallocatechin-3-gallate in topical creams exposed to simulated sunlight. *Molecules*. 2013; 18: 574-587.
- 145) Segall, A., Sosa, M., Alami, A., Enero, C., Hormaechea, F., Pizzorno, MT., Bregni, C. and Serrao, R. Stability study of lipoic acid in the presence of vitamins A and E in o/w emulsions for cosmetic application. *J Cosm Sci*. 2004; 55:449-461.
- 146) Tsai, CJ., Lin, YC., Chen, YL. and Feng, CH. Chemical derivatization combined with capillary LC or MALDI-TOF MS for trace determination of lipoic acid in cosmetics and integrated protein expression profiling in human keratinocytes. *Talanta*. 2014; 130: 347-355.

- 147) Khan A, Khan M.I, Iqbal Z, Ahmad L, Shad Y and Watson DG. Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid-liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters. *J Chromatogr B*. 2010 ; 878: 2782-2788.
- 148) Durrani AI, Schwartz H, Nagl M and Sontag G. Determination of free a-lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chem*. 2010; 120: 1143–1148.
- 149) Dana L. Sachs, MD, James Varani, PhD, Heather Chubb, MS, Suzanne E. G. Fligel, MD, Yilei Cui, PhD, Ken Calderone, BS, Yolanda Helfrich, MD, Gary J. Fisher, PhD and John J. Voorhees, MD. Atrophic and hypertrophic photoaging: Clinical, histologic, and molecular features of 2 distinct phenotypes of photoaged skin *J Am Acad Dermatol*. 2019; 81(2): 480-488.
- 150) Baumann. How to prevent photoaging? *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 12–13.
- 151) Guida Stefania, PhD, Ciardo Silvana, BS, De Pace Barbara, MD, De Carvalho Nathalie, PhD, Farnetani Francesca, MD, Pezzini Claudia, MD, Chester Johanna, BS, Shaniko Kaleci, PhD, Manganelli Michele, PhD, Guida Gabriella, PhD, Giovanni Pellacani, MD. Atrophic and hypertrophic skin photoaging and MC1R. MC1R, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2020. In Press Pre-roof
- 152) World Medical Doctors Association (1997): Declaration of Helsinki (Revisions 1964-1975-1983-1989-1996).
- 153) <https://cosmeticseurope.eu/> for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008. Colipa guidelines: Cosmetic product test guidelines for the assessment of human skin compatibility. (accessed 05/11/2018)
- 154) <https://www.courage-khazaka.de/de/> (10/12/2019)
- 155) Marjorie J. Area, Sybil J. Biermann, Timothy M. Johnson, Alfred E. Chang. Biopsy Techniques for Skin, Soft-Tissue, and Bone Neoplasms. *Surgical Oncology Clinics of North America*. Volume 4, Issue 1, 1995.

- 156) Crookham,J, Dapson,R, Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory, 2nd ED, 1991, Anatech.
- 157) Ι. Γ. Παναγιωτίδης, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν». Μονιμοποίηση-Χρώσεις.
- 158) Mark R. Wick. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2012; 16 (1):71-78.
- 159) Caetano GF, Fronza M, Leite MN,Gomes A, Frade MA. Comparison of collagen content in skin wounds evaluated by biochemical assay and by computer-aided histomorphometric analysis. *Pharm Biol*. 2016; 54 (11) :2555-2559.
- 160) El-Domyati M, Hosam W, Abdel-Azim E, Abdel-Wahab H, Mohamed E. Microdermabrasion: a clinical, histometric, and histopathologic study. *J Cosmet Dermatol*. 2016; 15(4) :503-513.
- 161) Kiernan J.A. Histological & Histochemical Methods Theory & Practice . Third edition. Arnold 1999. pp 477.
- 162) Mumford S. Heidel J., Smith C.; Morrison J.; MacConnell B.; Blazer V. 2007. Fish Histology and Histopathology Manual USFWS-NCTC pp 357.
- 163) Masson PJ. Some histological methods: trichrome stainings and their preliminary technique. *Tech Methods*. 1929; 12:75-90.
- 164) Goldner J. A modification of the Masson trichrome technique. *Am J Path*. 1938; 14:247-249. Lillie RD. Further experiments with the Masson trichrome modification of Mallory's connective tissue stain. *Stain Technol*. 1940; 15:82.
- 165) Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in histotechnology. Washington D.C., A.F.I.P. 1994.
- 166) Bewick V, Cheek L, Ball J. Statistics review 9: Analysis of variance. *Crit Care*. 2004; 7:451–459.

- 167) Whitely E, Ball J. Statistics review 6: Nonparametric methods. *Crit Care*. 2002;6: 509–513.
- 168) Sprent P, Smeeton NC. Applied Nonparametric Statistical Methods. 3. London, UK: Chapman & Hall/CRC; 2001.
- 169) Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. 3. New York, USA: John Wiley & Sons. 1999.
- 170) Bhawan J, Gonzalez-Serva A, Nehal K, Labadie R; Lufrano ., Thorne E G, Gilchrest B A. Effects of Tretinoin on Photodamaged Skin. A Histologic Study. *Arch Dermatol*. 1991 127(5):666-72.
- 171) “Basic criteria of the protocols for the skin compatibility testing of potentially cutaneous irritant cosmetic ingredients or mixture of ingredients on human volunteers”, SCCNFP/0245/99 Final
- 172) Council of Europe: Recommendation N° R(90)3, adopted 4th February 1990
OECD (1998): development of OECD Test Guidelines for Use in Tests with Human Volunteers ENV/MC/CHEM/RD (98) 27th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee, 11-13 Feb 1998
- 173) Miranda A Farage, Howard I. Maibach, Klaus E. Andersen, Jean-Marie Lachapelle, Petra Kern, Cindy Ryan, Jeanne Ely, and Amita Kanti, Historical perspective on the use of visual grading scales in evaluating skin irritation and sensitization. *Contact Dermatitis*. 2011; 65, 65–75.
- 174) McNamee P M, Api A M, Basketter D A, Gerberick G F, Gilpin D A, Hall B M, Jowsey I, RobinsonM K. A review of critical factors in the conduct and interpretation of the human repeat insult patch test. *Reg Tox Pharm*. 2008; 54:24-34.
- 175) Griffiths H A, Wilhelm K-P, RobinsonM K, Wang X M,McFadden J, York M, Basketter D A. Interlaboratory evaluation of a human patch test for identification of skin irritation potential/hazard. *Food Chem Toxicol*. 1997; 35: 255–260.

- 176) Surber C, Dragicevic N, Kottner J. Skin Care Products for Healthy and Diseased Skin *Curr Probl Dermatol* 2018; 54:183-200.
- 177) Roberts DW, Patlewicz G. Non-animal assessment of skin sensitization hazard: Is an integrated testing strategy needed, and if so what should be integrated? *J Appl Toxicol*. 2018 Jan; 38 (1): 41-50.
- 178) An SM, Ham H, Choi EJ, Shin MK, An SS, Kim HO, Koh JS. Primary irritation index and safety zone of cosmetics: retrospective analysis of skin patch tests in 7440 Korean women during 12 years. *Int J Cosmet Sci*. 2014 Feb; 36 (1):62-7.
- 179) Nishijima C, Sato Y, Chiba T, Umegaki K, Nationwide Online Survey to Complement the Current Voluntary Reporting System for Adverse Events Associated with Dietary Supplements: Application to the Case of Skin Manifestations. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)*. 2018; 64 (4) :277-283.
- 180) Raikou V, Varvaresou A, Panderi I, Papageorgiou E. The efficacy study of the combination of tripeptide-10-citrulline and acetyl hexapeptide-3. A prospective, randomized controlled study. *J Cosmet Dermatol*. 2017 Jun; 16 (2):271-278.
- 181) J.P. Bressler, A. Maertens, P Locke. Alternatives to Conventional Toxicology Testing. *Comprehensive Toxicology*. 2018; Volume 9, 119-126.
- 182) J.C. Lamb. Introduction to Toxicology Testing and Evaluation. *Comprehensive Toxicology*. 2018; Volume 9, 1-2.
- 183) G. Jenkins L. J. Wainwright R. Holland K. E. Barrett J. Casey. Wrinkle reduction in post-menopausal women consuming a novel oral supplement: a double-blind placebo-controlled randomized study. *Inter J Cosm Science*. 2014; 36: 22–31.
- 184) C. Lee H. Yang S. Kim M. Kim H. Kang N. Kim S. An J. Koh H. Jung. Evaluation of the anti-wrinkle effect of an ascorbic acid-loaded dissolving microneedle patch via a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Inter J. Cosm Science*. 2016; 38, 375–381.

- 185) S. Nisbet H. Mahalingam C. F. Gfeller E. Biggs S. Lucas M. Thompson M.R. Cargill D. Moore S. Bielfeldt. Cosmetic benefit of a biomimetic lamellar cream formulation on barrier function or the appearance of fine lines and wrinkles in randomized proof-of-concept clinical studies. *Inter J Cosm Science*. 2019; 41, 1–11.
- 186) P. R. S. Carvalho, J. M. Sumita, J. L. M. Soares A. Sanudo and E. Bagatin. Forearm skin aging: characterization by instrumental measurements. *Inter. J. Cosm Science*. 2017; 39, 564–57.
- 187) Choi, J.W., Kwon, S.H., Huh, C.H., Park, K.C. and Youn, S.W. The influences of skin visco-elasticity hydration level and aging on the formation of wrinkles a comprehensive and objective approach. *Skin Res Technol*. 2013; 19, 349–355.
- 188) Nisbet S, Mahalingam H, Gfeller CF, Biggs E, Lucas S, Thompson M, Cargill MR, Moore D, Bielfeldt S. Cosmetic benefit of a biomimetic lamellar cream formulation on barrier function or the appearance of fine lines and wrinkles in randomized proof-of-concept clinical studies. *Intern. J. Cosmetic Science*. 2019 41(1):1-11.
- 189) Catarina Faria-Silvaa, Andreia Ascenso, Ana M. Costaa, Joana Martoa, Manuela Carvalheiroa, Helena Margarida Ribeiroa, Sandra Simões. Feeding the skin: A new trend in food and cosmetics convergence. *Trends in Food Science & Technology*. 2020; 95: 21-32.
- 190) Žmitek K, Pogačnik T, Mervic L, Žmitek J, Pravst I. The effect of dietary intake of coenzyme Q10 on skin parameters and condition: Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Biofactors*. 2017 Jan 2; 43(1):132-140.
- 191) Jerome Asserin, PhD, Elian Lati, PhD, Toshiaki Shioya, B.Eng., & Janne Prawitt, PhD. The effect of oral collagen peptide supplementation on skin moisture and the dermal collagen network: evidence from an ex vivo model and randomized, placebo-controlled clinical trials. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2015;14, 291-301.

192) Thom E. A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the clinical efficacy of oral treatment with DermaVite on ageing symptoms of the skin.

J Int Med Res. 2005 ; 33(3) : 267-72.

193) Parente E, Colannino G, Picconi O, Monastra G. Safety of oral alpha-lipoic acid treatment in pregnant women: a retrospective observational study.

Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017; 21(18) :4219-4227.

194) Yıldırım Baş F, Bayram D, Arslan B, Armağan I, Yeşilot S, Çiçek E, Yorgancıgil E. Effect of alpha lipoic acid on smoking-induced skin damage

Cutan Ocul Toxicol. 2017; 36 (1) : 67-73.

195) Papageorgiou S, Varvaresou A, Panderi I, Giannakou M, Spiliopoulou C and S. Athanaselis. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation and stability of a-lipoic acid in cosmetic creams. *International Journal of Cosmetic Science.* 2020; 42: 221–228.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΠΟΥ

ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- **International Conference & Expo on Chromatography Techniques (2019) Dublin, Ireland, Conference-poster**
Development and validation of a liquid chromatographic method with UV detection for the quantitation of α -lipoic acid in dietary supplements.
Spyridon Papageorgiou, Maria Giannakou, Athanasia Varvaresou, Irene Panderi, Fotini Mellou, Athanaselis Sotiris
- **19ο Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο, 16-17 Δεκεμβρίου 2019, Αθήνα**
Μελέτη σταθερότητας του α -lipoic acid σε καλλυντικές κρέμες και συμπληρώματα διατροφής με μέθοδο αντίστροφης φάσης HPLC
Σπύρος Παπαγεωργίου, Αθανασία Βαρβαρέσου, Ειρήνη Παντερή, Μαρία Γιαννάκου, Φωτεινή Μέλλου, Χαρά Σπηλιοπούλου, Σωτήρης Αθανασέλης
- **International Journal of Cosmetic Science**
Papageorgiou S, Varvaresou A, Panderi I, Giannakou M, Spiliopoulou C and S. Athanaselis. Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation and stability of α -lipoic acid in cosmetic creams. 2020; 42: 221–228.