ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΔΕ «Κοσμητολογία - Δερματοφαρμακολογία»

Διπλωματική Εργασία

Dioscorea communis (L.) Caddick & Wilkin (Dioscoreaceae): Φαρμακογνωστική μελέτη

&

Ανάπτυξη ζωικού προτύπου ακμής για τον έλεγχο θεραπευτικών παραγόντων

Γεώργιος Λαδόπουλος, Φαρμακοποιός

Αθήνα, 2020

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ελένη Σκαλτσά

Καθηγήτρια, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ελένη Σκαλτσά

Καθηγήτρια, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αγγελική Κουρουνάκη

Καθηγήτρια, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μιχαήλ Ράλλης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους καθηγητές μου. Την Καθηγήτρια Σκαλτσά Ελένη, του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου προσέφερε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ράλλη Μιχαήλ, του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, για τη βοήθεια και τη συνεχή καθοδήγησή του για την επιτυχή υλοποίηση της μελέτης. Την Καθηγήτρια Κουρουνάκη Αγγελική, του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής, για την ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας μου ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου της Καθηγήτριας Σκαλτσά Ελένης και ιδιαίτερα στην υποψήφια διδάκτορα Μπάρδα Χριστίνα για τη σημαντική της βοήθεια στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τη μικροβιολόγο Ιβοπούλου Όλγα για τις γνώσεις και την καθοδήγηση που μου παρείχε απλόχερα σχετικά με τις βακτηριακές καλλιέργειες και την ενεργό συμμετοχή της στην υλοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον κύριο Ζώταλη για τη συλλογή και παροχή του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στον κύριο Σφηνιαδάκη Ιωάννη, διευθυντή του Παθολογοανατομικού Τμήματος του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών (ΝΝΑ) και στο υπόλοιπο ιατρικό προσωπικό, για τη σημαντική συμβολή τους στην ιστοπαθολογική αξιολόγηση των δειγμάτων δέρματος.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Καραλή Ευάγγελο, του τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής, για την καθοδήγηση του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου του καθηγητή Ράλλη Μιχαήλ. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Θεοδωράκη Ελισάβετ, Κωστάκη Μαρία και Ιωαννίδου Βάγια για την εξαιρετική συνεργασία, τις ευχάριστες στιγμές και τη βοήθεια τους στην περάτωση των πειραμάτων καθώς και στον υποψήφιο διδάκτορα Βίτσο Ανδρέα για την τεχνική υποστήριξη.

Ευχαριστώ τις φίλες μου Αλμπάνη Χαρά και Σαρίκα Αλεξάνδρα για την ψυχολογική και επιστημονική υποστήριξή τους και το φίλο μου Βουρβουκέλη Αλέξιο για τη σημαντική βοήθεια του με τα λογισμικά στατιστικής επεξεργασίας και επεξεργασίας εικόνων.

Τέλος, ευχαριστώ για τη βοήθειά τους τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Αντωνάρα Λευκή και Κατσικάρη Ευριδίκη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 11

ABSTRACT 12

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 13

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΔΕΡΜΑ 14

1.1 Γενικά στοιχεία για το δέρμα 14

1.2 Δομή του δέρματος 14

1.2.1 Επιδερμίδα 15

1.2.2 Φραγμοί της επιδερμίδας 19

1.2.3 Δερμοεπιδερμιδική συμβολή 20

1.2.4 Δερμίδα 20

1.2.5 Υποδόριος ιστός 21

1.3 Εξαρτήματα του δέρματος 21

1.3.1 Τρίχες 21

1.3.2 Σμηματογόνοι Αδένες 22

1.3.3 Ιδρωτοποιοί Αδένες 23

1.3.4 Όνυχες 23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΙΝΗ ΑΚΜΗ 24

2.1 Γενικά στοιχεία 24

2.2 Ετυμολογία 25

2.3 Επιδημιολογικά στοιχεία 25

2.4 Κατηγοριοποίηση και συστήματα κατάταξης 26

2.5 Αιτιοπαθογένεια 29

2.5.1 Ενδοκρινικό σύστημα 30

2.5.2 Σμήγμα 31

2.5.3 Οξειδωτικό stress 31

2.5.4 Φλεγμονή 32

2.5.5 Νευροενδοκρινικό σύστημα 32

2.5.6 Διατροφή 33
2.5.7 *Cutibacterium acnes* & ανοσοποιητικό σύστημα 33
2.6 Ο ρολος του μικροβιώματος 34
2.6.1 Μικροβίωμα δέρματος 34
2.6.2 Το μικροβίωμα στην ακμή 35
2.6.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την κοινή ακμή 36
2.6.4 Φλεγμονή 37
2.6.5 Βιοϋμένιο 37
2.7 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ 38
2.7.1 Τοπικές θεραπείες 38
2.7.2 Συστηματικές θεραπείες 41
2.7.3 Μηχανικές θεραπείες 45
2.7.4 Φωτοθεραπεία (light therapy) 46
2.7.5 Σχεδιασμός & ανάπτυξη νέων φαρμάκων 46
2.7.6 Φυσικά προϊόντα στην ακμή 47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [Syn. *Tamus communis* (L.)] - Dioscoreaceae 49
3.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ - ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ 49
3.1.1 Οικογένεια Dioscoreaceae R. Br. 49
3.1.2 Το γένος *Dioscorea* L. 50
3.1.3 Βοτανική περιγραφή του είδους *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin 51
3.2 ΔΡΟΓΟΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ 57
3.2.1 Προέλευση της επιστημονικής ονομασίας 57
3.2.2 Κοινά ελληνικά ονόματα 57
3.2.3 Κοινά ονόματα σε άλλες γλώσσες 58
3.2.4 Ο όρος yam 58
3.3 ΕΘΝΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ-ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ 58
3.3.1 Παραδοσιακή χρήση της δρόγης 58
3.3.2 Φαρμακολογικές δράσεις της δρόγης 59

3.4 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ 60
3.4.1 Παράγωγα φαινανθρενίου και διυδροφαινανθρενίου 61
3.4.2 Φλαβονοειδή 64
3.4.3 Τριτερπένια, στερόλες και σαπωνίνες 65
3.4.4 Καροτενοειδή 67
3.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ 68
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 70
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 71
ΜΕΡΟΣ Α: Φαρμακογνωστική μελέτη του είδους *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [Syn. *Tamus communis* (L.)] - Dioscoreaceae 76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 77
4.1 Συλλογή και προεργασία της δρόγης 77
4.2 Εκχύλιση της δρόγης 77
4.2.1 Φύλλα 77
4.2.2 Χυμός 77
4.3 Χρωματογραφικές μέθοδοι 77
4.3.1 Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μάζας (GC-MS) 77
4.4 Φασματοσκοπικές μέθοδοι 78
4.4.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 79
5.1 Κυκλοεξανικό εκχύλισμα 79
5.2 Αιθανολικά εκχυλίσματα 80
ΜΕΡΟΣ Β: ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΚΜΗΣ 82
ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 86
6.1 Μύες 86
6.2 Υλικά 87
6.2.1 Καλλιέργειες 87
6.2.2 Παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος 87

6.2.3 Πρόκληση αναισθησίας 87
6.2.4 Ενδοδερμικές ενέσεις 88
6.2.5 Ποσοτικοποίηση του βακτηριακού εναιωρήματος 88
6.2.6 Μετρήσεις 88
6.2.7 Ευθανασίες 89
6.2.8 Λογισμικά 89
6.3 Μέθοδοι 90
6.3.1 Καλλιέργειες 90
6.3.2 Παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος 92
6.3.3 Πρόκληση αναισθησίας 93
6.3.4 Ενδοδερμικές ενέσεις 93
6.3.5 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού εναιωρήματος 94
6.3.6 Ψηφιακές φωτογραφίες 95
6.3.7 Τρισδιάστατες φωτογραφίες 95
6.3.8 Μέτρηση βάρους 96
6.3.9 Μέτρηση θερμοκρασίας 96
6.3.10 Μέτρηση πάχους δέρματος 97
6.3.11 Μέτρηση άδηλης απώλειας ύδατος 97
6.3.12 Μέτρηση σμήγματος 97
6.3.13 Μέτρηση pH 97
6.3.14 Μέτρηση μελανίνης και ερυθήματος 98
6.3.15 Μέτρηση ενυδάτωσης 98
6.3.16 Αιμοληψίες 98
6.3.17 Μέτρηση γλυκόζης 98
6.3.18 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας 99
6.3.19 Μέτρηση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων 99
6.3.20 Ευθανασία των μυών 100
6.3.21 Λήψη δέρματος 100
6.3.22 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση 100

6.3.23 Στατιστική επεξεργασία 100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 103
7.1 Κλινική αξιολόγηση με βάση το φωτογραφικό υλικό 104
7.1.1 Σύγκριση των ομάδων μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης 114
7.1.2 Ομάδα 2: SKH-hr1 - Ακμή 114
7.1.3 Ομάδα 4: SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή 114
7.1.4 Ομάδα 6: SKH-hr2+ApoE - Ακμή 115
7.2 Στατιστική επεξεργασία 116
7.2.1 Ανυψώσεις δέρματος 116
7.2.2 Επίπεδα αιμοσφαιρίνης 123
7.2.3 Βάρος 133
7.2.4 Θερμοκρασία 136
7.2.5 Πάχος δέρματος 141
7.2.6 Άδηλη απώλεια ύδατος (TEWL) 146
7.2.7 Σμήγμα 150
7.2.8 pH δέρματος 152
7.2.9 Μελανίνη 156
7.2.10 Ερύθημα 160
7.2.11 Ενυδάτωση 165
7.2.12 Γλυκόζη 169
7.2.13 Αντιοξειδωτική ικανότητα 172
7.2.14 Τριγλυκερίδια 175
7.2.15 Χοληστερόλη 176
7.3 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση 177
7.3.1 Δείγματα βλαβών της Ημέρας 4 177
7.3.2 Δείγματα βλαβών της Ημέρας 9 177
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 191
8.1 Φωτογραφικό υλικό - Κλινική αξιολόγηση 191
8.2 Ανυψώσεις δέρματος 195

8.3 Επίπεδα αιμοσφαιρίνης 195
8.4 Βάρος 196
8.5 Θερμοκρασία 196
8.6 Πάχος δέρματος 197
8.7 Άδηλη απώλεια ύδατος 197
8.8 Σμήγμα 198
8.9 pH δέρματος 198
8.10 Μελανίνη 198
8.11 Ερύθημα 199
8.12 Ενυδάτωση 199
8.13 Γλυκόζη 200
8.14 Αντιοξειδωτική ικανότητα 200
8.15 Τριγλυκερίδια και χοληστερόλη 201
8.16 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση 202
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 205
ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΚΜΗΣ 205
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ *Dioscorea communis* 205
Επόμενα βηματα 205
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 206
Ελληνική βιβλιογραφία 225
Διαδικτυακοί τόποι 225

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κοινή ακμή είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος με ποικιλία κλινικών εκδηλώσεων, που πλήττει τις τριχοσμηγματογόνους μονάδες και επηρεάζει μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού. Η αιτιοπαθογένεια της είναι πολυπαραγοντική και δεν έχει αποσαφηνιστεί. Οι περισσότερες συμβατικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται δε στοχεύουν πολλαπλούς παράγοντες παθογένειας και παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενέργειες που δυσχεραίνουν τη συμμόρφωση. Δημιουργείται έτσι ανάγκη εύρεσης νέων φαρμάκων, με το ενδιαφέρον της έρευνας να στρέφεται, μεταξύ άλλων, στα φυσικά προϊόντα.

Τα φυσικά προϊόντα με υποσχόμενα αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της κοινής ακμής, έχουν συνήθως αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Οι περισσότερες μελέτες, ωστόσο στηρίζονται σε ατελή προκλινικά μοντέλα και στερούνται επαρκούς τεκμηρίωσης. Σημαντική κρίνεται επομένως η ανάπτυξη μοντέλων που προσομοιώνουν την ανθρώπινη ακμή.

Η βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων του είδους *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [syn. *Tamus communis* (L.)] (Dioscoreaceae) έχει μελετηθεί αρκετά και τα αποτελέσματα έχουν δείξει κυρίως αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, που δικαιολογούνται και από το χημικό τους φορτίο. Οι δράσεις αυτές έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στοχεύουν αρκετούς από τους μηχανισμούς παθογένειας της ακμής.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός επαναλήψιμου και αξιόπιστου ζωικού προτύπου ακμής για τον έλεγχο θεραπευτικών παραγόντων και ειδικότερα εκχυλισμάτων του φυτού *D. communis* με πιθανή εφαρμογή στην ακμή, βάσει της χημικής τους σύστασης.

Χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ενδοδερμικής ένεσης στη ράχη μυών, εναιωρήματος του βακτηρίου *Cutibacterium acnes*, το οποίο και εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου. Εργαστηριακά, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά συγκριτική μελέτη πρόκλησης ακμής σε τρία διαφορετικά είδη άτριχων μυών - SKH-hr1, SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE (υβριδικό είδος με αυξημένη χοληστερόλη) - για να διαπιστωθεί ποιο προσομοιώνει καλύτερα την ανθρώπινη νόσο. Η αξιολόγηση και ο χαρακτηρισμός του μοντέλου έγιναν με φωτοτεκμηρίωση, εμβιομηχανικές και αιματολογικές μετρήσεις και ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Ενώ όλα τα είδη εμφάνισαν ακνεϊκές βλάβες, λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική εικόνα, το είδος SKH-hr1 κρίθηκε το αποτελεσματικότερο πρότυπο.

Λήφθηκαν εκχυλίσματα φύλλων και καρπών *D. communis*, τα οποία αναλύθηκαν με χρωματογραφικές και φασματοσκοπικές μεθόδους. Μέσω GC/MS ανάλυσης βρέθηκε πως το κυκλοεξανικό εκχύλισμα των φύλλων περιέχει κυρίως υδρογονάνθρακες, ενώ μέσω ανάλυσης του ^{1}H-NMR φάσματος σε συνδυασμό με βιβλιογραφική ανασκόπηση βρέθηκε πως τα αιθανολικά εκχυλίσματα περιέχουν κυρίως τριτερπενικές σαπωνίνες και φαινολικά παράγωγα απιγενίνης και καμφερόλης.

ABSTRACT

Acne vulgaris is a chronic, inflammatory disease with a high prevalence worldwide, that affects the pilosebaceous unit and manifests with various clinical symptoms. Acne pathogenesis is multifactorial and to this date has not been fully elucidated. Conventional treatment options do not adequately target multiple pathogenetic mechanisms and are accompanied by adverse effects that reduce compliance. Natural products are therefore increasingly being researched for new drug development.

Natural products with antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities have shown promising results for the treatment of acne vulgaris. Most studies, however, are of limited translational value since they are primarily based on incomplete preclinical models. Thus, acne models that simulate human disease are essential.

Extracts of *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [syn. *Tamus communis* (L.)] (Dioscoreaceae) have been found to exhibit mainly anti-inflammatory and antioxidant effects, which are in accordance with their chemical composition. Such effects could be useful for the treatment of acne since they target multiple pathogenetic factors of the disease.

The aim of this study was to develop a reproducible and reliable animal model of acne, to be subsequently used for screening therapeutic agents and specifically *D. communis* extracts selected according to their chemical compositions.

A murine acne model involving intradermal injection of a *Cutibacterium acnes* bacterial suspension was chosen. *C. acnes* is implicated in acne pathogenesis and this model combines multiple pathogenetic mechanisms. A comparative study of three hairless mice species - SKH-hr1, SKH-hr2 (brown) and SKH-hr2+ApoE (hybrid species with increased cholesterol levels) - was performed for the first time, to determine which species better simulates human acne. The model was evaluated and characterized by photodocumentation, biomechanics, blood work and histopathology. While all three species presented acne-like lesions, SKH-hr1 mice were deemed the most appropriate.

Extracts of *D. communis* leaves and fruits were prepared and analyzed via chromatographic and spectroscopic methods. GC/MS analysis of the cyclohexane extract of the leaves revealed mainly hydrocarbons. Ethanolic extracts of the leaves were found to contain mainly triterpene saponins and phenolic derivatives of apigenin and kaempferol, as determined by ^{1}H NMR and literature review.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΔΕΡΜΑ

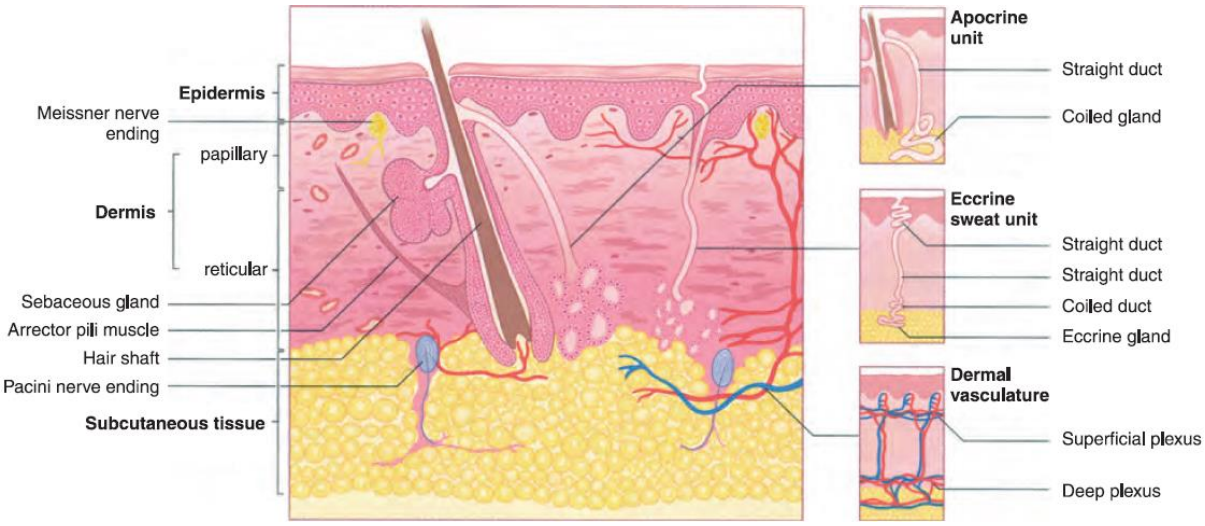
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΔΕΡΜΑ

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος. Στο δέρμα αναλογεί περίπου το 15% του συνολικού σωματικού βάρους κατά την ενήλικη ζωή. Είναι ένας συνεχόμενος ιστός, οι βλεννογόνοι του οποίου καλύπτουν όλη την επιφάνεια του σώματος. Το δέρμα μαζί με τα εξαρτήματά του συνιστούν το καλυπτήριο σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού.

Το δέρμα επιτελεί ένα ρόλο απόλυτα απαραίτητο για τη ζωή. Είναι υπεύθυνο για σημαντικές λειτουργίες όπως η προστασία από εξωτερικούς φυσικούς-μηχανικούς και χημικούς παράγοντες, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει την υπέρμετρη απώλεια ύδατος από το ανθρώπινο σώμα και συμμετέχει στη ρύθμιση της θερμοκρασίας του (Kolarsick et al., 2011). Συντηρεί επίσης μια μεγάλη ποικιλία συμβιωτικών βακτηρίων τα οποία εμποδίζουν τον αποικισμό του δέρματος από άλλα, παθογόνα βακτήρια.

Η υγεία του δέρματος αντικατοπτρίζει τη γενική υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι παθήσεις που πλήττουν το δέρμα έχουν πολύ συχνά ισχυρό αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής των ασθενών, αφού επηρεάζουν ιδιαίτερα και την ψυχική τους υγεία και κατά συνέπεια την καθημερινή τους λειτουργικότητα (Menon, 2015).

1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ



Εικόνα 1 Δομή του ανθρώπινου δέρματος (Kolarsick et al., 2011).

Το ανθρώπινο δέρμα αποτελείται από τρεις επιμέρους στιβάδες, που από έξω προς τα μέσα είναι η επιδερμίδα (epidermis), η δερμίδα ή αλλιώς χόριο (dermis) και ο υποδόριος ιστός (subcutaneous tissue). Η δερμίδα και η επιδερμίδα έχουν μεταξύ τους μια επιφάνεια που ονομάζεται δερμοεπιδερμιδική συμβολή (dermal-epidermal junction). Το πάχος αυτών των στιβάδων δεν είναι σταθερό αλλά

μεταβάλλεται ανάλογα με την ανατομική περιοχή του σώματος στην οποία βρίσκεται το δέρμα (Kolarsick et al., 2011).

1.2.1 Επιδερμίδα

Η εξωτερική στιβάδα του δέρματος είναι η επιδερμίδα η οποία είναι μια στρωματοποιημένη, φολιδωτή δομή που αποτελείται κατά 80% από κερατινοκύτταρα (keratinocytes). Η επιδερμίδα είναι ένας δυναμικός ιστός που χαρακτηρίζεται από συνεχή ανανέωση. Τα κύτταρα που την απαρτίζουν υφίστανται μια διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης που ονομάζεται κερατινοποίηση (keratinization). Η διαδικασία αυτή ξεκινά από την κατώτερη στιβάδα και ολοκληρώνεται στην ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα βρίσκονται έτσι σε μια διαρκή, ασύγχρονη κίνηση, τόσο μεταξύ τους όσο και με τα υπόλοιπα κύτταρα της επιδερμίδας, καθώς μεταναστεύουν προς την επιφάνειά της. Η μετανάστευση των κυττάρων από το κατώτερο μέχρι το πιο εξωτερικό τμήμα της επιδερμίδας διαρκεί περίπου 28 ημέρες. Η μορφογένεση και η διαφοροποίηση της επιδερμίδας ρυθμίζεται από τη δερμίδα και τη δερμοεπιδερμιδική συμβολή.

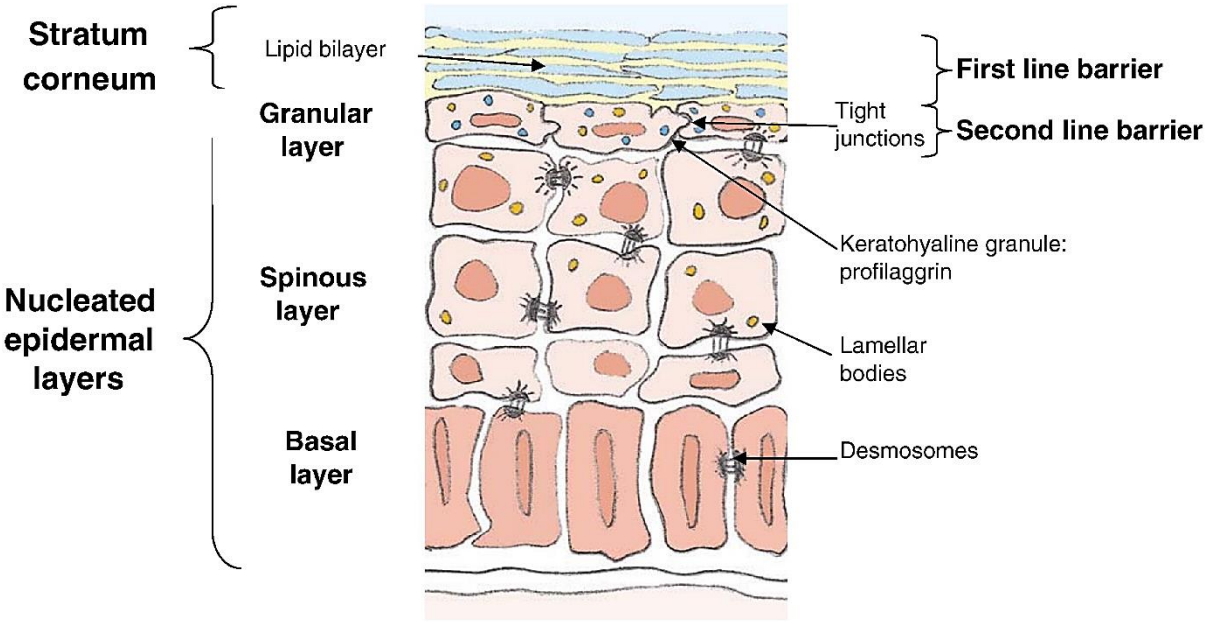
Στη διάρκεια της κερατινοποίησης, τα κερατινοκύτταρα περνούν πρώτα από μια φάση σύνθεσης (synthetic phase) και στη συνέχεια από μια φάση αποδόμησης (degradative phase). Κατά τη συνθετική φάση, αποθηκεύουν στο κυτταρόπλασμά τους αποθέματα από την πρωτεΐνη κερατίνη (keratin). Η κερατίνη έχει μορφή νηματίων, οργανώνεται σε διάταξη α-έλικας και αποτελεί μέρος του κυτταρικού σκελετού. Τα ινίδια κερατίνης οργανώνονται επίσης σε δεσμίδες, οι οποίες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και σχηματίζουν συνδετικές πλάκες μεταξύ των κερατινοκυττάρων που ονομάζονται δεσμοσωμάτια (desmosomes). Κατά τη φάση αποδόμησης, τα κύτταρα χάνουν τα οργανίδιά τους και τα περιεχόμενά τους συμπυκνώνονται σε ένα μείγμα ινιδίων και άμορφων κυτταρικών φακέλων. Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί το τελικό βήμα αυτής της διαδικασίας διαφοροποίησης (terminal differentiation) που ξεκινά από τη βασική στιβάδα και ολοκληρώνεται με τη δημιουργία των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας (corneocytes) (Kolarsick et al., 2011).

Τα κερατινοκύτταρα, εκτός από την κερατίνη, παράγουν και άλλες δομικές πρωτεΐνες όπως τον φυσικό ενυδατικό παράγοντα (natural moisturizing factor, NMF) και μεταφέρουν νερό, γλυκερόλη και ουρία διαμέσου καναλιών που ονομάζονται ακουαπορίνες (aquaporins). Παράγουν επίσης τα λιπίδια της επιδερμίδας και αντιμικροβιακά πεπτίδια (antimicrobial peptides, AMPs) δημιουργώντας τον επιδερμικό φραγμό που περιορίζει τη διαπερατότητα της και την προστατεύει από μικροοργανισμούς. Λόγω της έλλειψης αιματικής κυκλοφορίας, η μεταφορά θρεπτικών συστατικών στη στιβάδα της επιδερμίδας γίνεται μέσω κυτταρικής διάχυσης, αφού πρώτα περάσουν τη μεμβράνη που τη διαχωρίζει από τη δερμίδα (Menon, 2015).

Από τις σημαντικότερες λειτουργίες της επιδερμίδας είναι η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων της αλλά και με τα κύτταρα της δερμίδας. Η επικοινωνία αυτή πραγματοποιείται μέσω των χημειοκινών (chemokines) και των αυξητικών παραγόντων (growth factors) που εκκρίνει. Επιπλέον, η επιδερμίδα

μπορεί να κινητοποιήσει την παραγωγή αλλά και την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας της δερμίδας, όταν αυτό είναι απαραίτητο. Αισθητήριες νευρικές ίνες εκτείνονται στην επιδερμίδα και εκκρίνουν τροφικά νευροπεπτίδια (neuropeptides) τα οποία επιδρούν στη φυσιολογία των κερατινοκυττάρων και σχετίζονται με τις διαταραχές του ευαίσθητου δέρματος (Menon, 2015).

Η επιδερμίδα διακρίνεται, με βάση τη μορφολογία των κερατινοκυττάρων, σε τέσσερεις επιμέρους στιβάδες. Οι τρείς κατώτερες στιβάδες περιλαμβάνουν ζωντανά, εμπύρηνα κερατινοκύτταρα (Kolarsick et al., 2011). Αντίθετα, η ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας αποτελείται από απύρηνα κερατινοκύτταρα που πρακτικά θεωρούνται νεκρά. Οι στιβάδες αυτές, από την κατώτερη προς την ανώτερη, είναι οι εξής:



Εικόνα 2 Δομή και φραγμοί της ανθρώπινης επιδερμίδας (Baroni et al., 2012).

<u>Βασική στιβάδα</u> (basal cell layer, stratum germinativum)

Πρόκειται για μονοστιβάδα που περιέχει κερατινοκύτταρα σε σχήμα στήλης. Αυτά προσαρτώνται στη ζώνη της βασικής μεμβράνης (basement membrane zone) μέσω των ημιδεσμοσωματίων (hemidesmosomes) (Menon, 2015) και διατηρούνται συνδεδεμένα μεταξύ τους και με τα ανώτερα κύτταρα της ακανθωτής στιβάδας μέσω των συνδέσμων των δεσμοσωματίων (desmosomal junctions). Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας διαθέτουν πεπλατυσμένους, ελλειψοειδείς πυρήνες, οι οποίοι καλύπτονται με ένα στρώμα από τη χρωστική μελανίνη (melanin) που μεταφέρεται από τα γειτονικά μελανινοκύτταρα (melanocytes) (Kolarsick et al., 2011), με σκοπό την προστασία του γενετικού τους υλικού (Menon, 2015).

Ακανθωτή στιβάδα (squamous cell layer, stratum spinosum)

Επάνω από τη βασική στιβάδα βρίσκεται η ακανθωτή στιβάδα, με πάχος 5-10 κυττάρων. Το όνομα της στιβάδας αυτής οφείλεται στην ακανθωτή εμφάνιση που της δίνει ο μεγάλος αριθμός δεσμοσωματίων με τα οποία συνδέονται μεταξύ τους τα κερατινοκύτταρα που την απαρτίζουν, παρέχοντας έτσι αντοχή στις μηχανικές πιέσεις. Τα κύτταρα αυτά διαφέρουν σε μορφή, δομή και ιδιότητες ανάλογα με τη θέση τους. Στο κατώτερο τμήμα της ακανθωτής στιβάδας απαντώνται κύτταρα με πολυεδρικό σχήμα και στρογγυλούς πυρήνες. Στο ανώτερο τμήμα, τα κύτταρα είναι μεγαλύτερα, πεπλατυσμένα και περιέχουν ελασματοειδή κοκκία (lamellar granules). Αυτά είναι μεμβρανικά οργανίδια που έχουν στο εσωτερικό τους γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια, φωσφολιπίδια, ελεύθερες στερόλες και υδρολυτικά ένζυμα, όπως λιπάσες, πρωτεάσες, όξινες φωσφατάσες και γλυκοσιδάσες. Αποτελούν δηλαδή ένα είδος λυσοσώματος και δραστηριοποιούνται κυρίως σε ανώτερες στιβάδες της επιδερμίδας. Λειτουργούν, όμως, και στο άνω τμήμα της ακανθωτής στιβάδας παράγοντας και μεταφέροντας στον μεσοκυττάριο χώρο πρόδρομες ενώσεις των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας (Kolarsick et al., 2011).

Κοκκιώδης στιβάδα (granular cell layer, stratum granulosum)

Πρόκειται για την ανώτερη ζώσα στιβάδα που αποτελεί και την κερατογενή ζώνη της επιδερμίδας (Kolarsick et al., 2011). Διαθέτει την υψηλότερη συνθετική δραστηριότητα από όλες τις στιβάδες της επιδερμίδας, αφού σε αυτήν παράγονται δομικές πρωτεΐνες αλλά και λιπίδια που συνεισφέρουν στον επιδερμιδικό φραγμό (Menon, 2015). Το πάχος της στιβάδας αυτής μεταβάλλεται αναλογικά με το πάχος της κεράτινης στιβάδας που την καλύπτει, που διαφέρει ανάλογα με την ανατομική περιοχή και μπορεί να είναι από 1-3 κυτταρικές στιβάδες έως και 30. Η στιβάδα αυτή αποτελείται από επίπεδα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την περαιτέρω παραγωγή και τροποποίηση των απαραίτητων πρωτεϊνών για την κερατινοποίηση και περιέχουν μεγάλο αριθμό κοκκίων κερατοϋαλίνης (keratohyaline granules). Αυτά έχουν ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος, είναι βασεόφιλα και μέσω της ενζυμικής δράσης που ασκούν, τεμαχίζουν τα νημάτια κερατίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή κερατίνης στην επιδερμίδα (Kolarsick et al., 2011). Τα οργανίδια αυτά περιέχουν πρωτεΐνες όπως την προ-φιλαγκρίνη (profilaggrin), που μετατρέπεται μέσω πρωτεασών σε φιλαγκρίνη (filaggrin) που συμμετέχει στην οργάνωση των νηματίων κερατίνης, καθώς και λορικρίνη (loricrin) και ινβολουκρίνη (involucrin) που συμμετέχουν στη δημιουργία του κερατινοποιημένου φακέλου των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας. Στα ανώτερα στρώματα της κοκκιώδους στιβάδας, το 20% του συνολικού όγκου των κυττάρων καταλαμβάνεται από τα ελασματοειδή σωμάτια. Εκεί βρίσκεται και ο φραγμός των στενοσυνδέσμων (tight junctions), που αποτελεί ένα επιπλέον εμπόδιο στη διαπερατότητα της επιδερμίδας και βρίσκεται ακριβώς κάτω από την κεράτινη στιβάδα (Menon, 2015).

Κεράτινη στιβάδα (cornified cell layer, stratum corneum)

Η τελική διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων που ξεκινά από τη βασική στιβάδα της επιδερμίδας ολοκληρώνεται στην κεράτινη στιβάδα με τη δραστηριότητα ενζύμων όπως οι κασπάσες που οδηγούν

στην αποδόμηση των κυτταρικών οργανιδίων (Menon, 2015). Τα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας που προκύπτουν είναι μεγάλα, πεπλατυσμένα, με πολυεδρικό σχήμα, έχουν χάσει τους πυρήνες τους και θεωρούνται πρακτικά νεκρά. Είναι πλούσια σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο και φτωχά σε λιπίδια. Περιβάλλονται ωστόσο από μια συνεχή ελασματοειδή μήτρα λιπιδίων (Kolarsick et al., 2011), που περιλαμβάνει κεραμίδια (ceramides), χοληστερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται εκκρινόμενα από τα ελασματοειδή σωμάτια και συνθέτουν τον επιδερμιδικό φραγμό (Menon, 2015). Η λειτουργία των κυττάρων της κεράτινης στιβάδας είναι να παρέχουν μηχανική προστασία στην επιδερμίδα, καθώς και προστασία από την εισβολή εξωγενών παραγόντων (Kolarsick et al., 2011). Προστατεύουν επιπλέον από την απώλεια ύδατος χάρη στον NMF που αποτελεί μίγμα αμινοξέων που προέρχονται από την περαιτέρω διάσπαση της φιλαγκρίνης (Menon, 2015). Οι φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες των κυττάρων αυτών διαφέρουν ανάλογα με τη θέση τους στην κεράτινη στιβάδα, ώστε να διευκολύνεται η απόσπασή τους προχωρώντας προς το εξωτερικό της τμήμα. Έτσι, τα κύτταρα που βρίσκονται χαμηλότερα είναι πιο συμπαγώς οργανωμένα, με μεγαλύτερο αριθμό συνδέσμων μεταξύ τους. Στην πορεία προς το ανώτερο τμήμα της κεράτινης στιβάδας, τα δεσμοσωμάτια υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση, με αποτέλεσμα την απολέπιση των επιφανειακών κυττάρων (Kolarsick et al., 2011).

Η κεράτινη στιβάδα διαθέτει λοιπόν μια δομή που έχει χαρακτηριστεί ως «τούβλο και κονίαμα» (“brick and mortar”), χωρίς όμως να αποτελεί έναν άκαμπτο φραγμό. Αντίθετα, συμπεριφέρεται ως ένα σύνθετο υλικό, με ιδιότητες που υπερβαίνουν αυτές των επιμέρους συστατικών της, αλλά και ως ένα «έξυπνο» υλικό το οποίο αντιλαμβάνεται περιβαλλοντικές αλλαγές και ανταποκρίνεται σε αυτές (Menon, 2015).

Στην επιδερμίδα παρατηρούνται και άλλοι κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως τα μελανινοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans (Langerhans cells) και τα κύτταρα του Merkel (Merkel cells) (Kolarsick et al., 2011).

Τα **μελανινοκύτταρα** είναι δενδριτικά κύτταρα, υπεύθυνα για την παραγωγή της χρωστικής μελανίνης. Η μελανίνη παράγεται σε ειδικά σφαιρικά κυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται μελανοσώματα (melanosomes), διαμέσου μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων που ρυθμίζονται από διάφορες ορμόνες και υποδοχείς (Kolarsick et al., 2011). Βασικό βήμα στη βιοσύνθεση της μελανίνης είναι η οξείδωση του αμινοξέος τυροσίνη από το ένζυμο τυροσινάση (Riley, 1997). Η μελανίνη είναι υπεύθυνη για τη χρώση του ανθρώπινου δέρματος και λειτουργεί προστατευτικά, απορροφώντας ευρύ φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet radiation, UV) και ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, παγιδεύοντας ελεύθερες ρίζες (Brenner and Hearing, 2008). Τα μελανινοκύτταρα εντοπίζονται κυρίως στη βασική στιβάδα, μπορούν όμως να εκτείνουν τις απολήξεις τους και στις πιο επιφανειακές στιβάδες της επιδερμίδας. Τέλος, τα κύτταρα αυτά μπορούν και μεταφέρουν τα μελανοσώματά τους στα κερατινοκύτταρα (Kolarsick et al., 2011).

Τα **κύτταρα του Langerhans** είναι δενδριτικά κύτταρα, που προέρχονται από το μυελό των οστών. Μεταναστεύουν στην επιδερμίδα σε πρώιμο στάδιο της εμβρυικής ανάπτυξης και συνεχίζουν να την αποικίζουν κατά τη διάρκεια της ζωής. Αποτελούν περίπου το 2-8% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων της επιδερμίδας και ο αριθμός τους και η διασπορά τους διατηρούνται σχετικά σταθερά στις διάφορες ανατομικές περιοχές του δέρματος. Παρατηρούνται κυρίως στην ακανθωτή και στην κοκκώδη στιβάδα και λιγότερο στη βασική στιβάδα. Τα κύτταρα αυτά εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση και ο κύριος ρόλος τους είναι η αναγνώριση των αντιγόνων που βρίσκονται στους ιστούς της επιδερμίδας και η παρουσίαση τους στα Τ-λεμφοκύτταρα, με σκοπό την ενεργοποίησή τους.

Τα **κύτταρα του Merkel** είναι μηχανοϋποδοχείς τύπου Ι με ελλειψοειδές σχήμα, που συνδέονται με τα κερατινοκύτταρα της βασικής στιβάδας μέσω δεσμοσωματίων. Βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές μεγάλης απτικής ευαισθησίας, όπως τα δάχτυλα και τα χείλη και πολλές φορές οργανώνονται σε δομές που ομοιάζουν με δίσκους. Τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται στα μηχανικά ερεθίσματα των γύρω κερατινοκυττάρων, εκκρίνοντας χημικά σήματα που παράγουν δυναμικά ενέργειας, τα οποία μεταφέρονται από τους γειτονικούς νευρώνες στον εγκέφαλο (Kolarsick et al., 2011).

1.2.2 Φραγμοί της επιδερμίδας

Ο βασικότερος φραγμός του δέρματος που έχει συντελέσει στην επιτυχή προσαρμογή του ανθρώπινου οργανισμού στη ζωή στη Γη είναι ο φραγμός διαπερατότητας της επιδερμίδας. Το δέρμα, ωστόσο, έχει εξελιχθεί και μπορεί να εκμεταλλεύεται τα δομικά και βιοχημικά μονοπάτια που οδηγούν στη δημιουργία αυτού του φραγμού, ώστε να παράγει επιπλέον φραγμούς για την προστασία του από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Ένας επιπλέον μηχανικός φραγμός, εκτός από αυτόν που δημιουργείται από τα λιπίδια της κεράτινης στιβάδας, είναι ο φραγμός των στενοσυνδέσμων. Αυτός εντοπίζεται στο ανώτερο στρώμα της κοκκιώδους στιβάδας και περιορίζει ακόμα περισσότερο τη διαπερατότητα της επιδερμίδας από εξωγενείς παράγοντες.

Τα ελασματοειδή σωμάτια, εκτός από τα λιπίδια του επιδερμικού φραγμού, παράγουν και μεταφέρουν στην κεράτινη στιβάδα και αντιμικροβιακά πεπτίδια, όπως β-ντεφενσίνες (beta defensins) και καθελισιδίνες (cathelicidins). Σχηματίζεται έτσι ένας αντιμικροβιακός φραγμός, στενά συνδεδεμένος με το φραγμό της διαπερατότητας.

Για να είναι δυνατή η επιβίωση και η λειτουργικότητα του δέρματος, απαραίτητη είναι και η προστασία από τις βλάβες που προκαλεί η υπεριώδης ακτινοβολία. Για το σκοπό αυτό, το δέρμα έχει αναπτύξει, εκτός από το φραγμό που αποτελεί η μελανίνη, επιπλέον αμυντικούς μηχανισμούς. Αυτοί συνίστανται από βιοχημικά μονοπάτια που οδηγούν στην παραγωγή ενδογενών αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη Ε και το συνένζυμο Q10, αλλά και από φυσιολογικά μονοπάτια όπως αυτά που ελέγχονται από την πρωτεΐνη p53 και δρουν προστατευτικά ενάντια σε γονιδιακές βλάβες. Για ακόμη μια φορά παρατηρείται στενή σύνδεση μεταξύ των επιδερμικών φραγμών, αφού από το μονοπάτι παραγωγής της

χοληστερόλης, η οποία συμμετέχει στο λιπιδικό φραγμό της κεράτινης στιβάδας, προκύπτει και το αντιοξειδωτικό συνένζυμο Q10.

Η επιδερμίδα αλλά και η δερμίδα παρέχουν επίσης προστασία ενάντια σε ξενοβιοτικούς παράγοντες, όπως είναι οι περιβαλλοντικοί ρύποι που έχουν βλαπτική επίδραση στην υγεία του δέρματος. Η προστασία επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μεταβολικών ενζύμων, όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, τα οποία περιέχονται στα κύτταρα αυτών των στιβάδων και καταλύουν τη μετατροπή και την αποβολή των επικίνδυνων αυτών παραγόντων.

Τέλος, στη στιβάδα της επιδερμίδας υπάρχει αυστηρή «εποπτεία» από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα του Langerhans εγκλείουν τα αντιγόνα που καταφέρνουν να φτάσουν στις ζώσες στιβάδες της επιδερμίδας, αλλά έχουν τη δυνατότητα να προεκτείνουν τους δενδρίτες τους και στην κεράτινη στιβάδα. Στη συνέχεια, μεταναστεύουν από την επιδερμίδα στη δερμίδα και μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας στους λεμφαδένες. Εκεί, έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν ανοσοαπόκριση, παρουσιάζοντας τα αντιγόνα και ενεργοποιώντας με τον τρόπο αυτό τα Τ-λεμφοκύτταρα (Menon, 2015).

1.2.3 Δερμοεπιδερμιδική συμβολή

Η επιφάνεια μεταξύ της επιδερμίδας και της δερμίδας αποτελείται από μια πορώδη ζώνη βασικής μεμβράνης που περιλαμβάνει το διαυγή υμένα (lamina lucida) και τον πυκνό υμένα (lamina densa). Η επιφάνεια αυτή είναι ημιπερατή, επιτρέπει την ανταλλαγή κυττάρων και υγρών (Kolarsick et al., 2011) και διατηρεί τις δύο στιβάδες συνδεδεμένες αλλά ταυτόχρονα διακριτές, επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή τους ώστε να διατηρούν τις ιδιότητές τους . Λειτουργεί ως «άγκυρα» για την επιδερμίδα (Menon, 2015), παρέχοντάς της στήριξη, καθορίζει την κατεύθυνση ανάπτυξής της παράγοντας σήματα ανάπτυξης, καθώς και την πολικότητα των κυττάρων της βασικής στιβάδας και την οργάνωση του κυτταρικού τους σκελετού. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη δερμοεπιδερμιδική συμβολή είναι κυρίως τα κύτταρα της βασικής στιβάδας και λιγότερο οι ινοβλάστες (fibroblasts) της δερμίδας.(Kolarsick et al., 2011).

1.2.4 Δερμίδα

Η στιβάδα της δερμίδας συνίσταται από ινώδη, νηματοειδή και άμορφο συνδετικό ιστό και είναι η κυριότερη δομή του ανθρώπινου δέρματος (Kolarsick et al., 2011), αφού αποτελεί το 90% του συνολικού του βάρους (Menon, 2015). Ο βασικός της ρόλος είναι να παρέχει πλαστικότητα, ελαστικότητα και μηχανική στήριξη στο δέρμα. Επιπλέον λειτουργίες τής είναι η κατακράτηση ύδατος, η θερμορύθμιση και η λήψη ερεθισμάτων. Τα κύρια συστατικά που συνθέτουν τη μήτρα της δερμίδας είναι το κολλαγόνο και σε μικρότερο βαθμό οι ελαστικές ίνες. Η δερμίδα στεγάζει απολήξεις του νευρικού συστήματος, αιμοφόρα αγγεία καθώς και τα εξαρτήματα του δέρματος που πηγάζουν από την επιδερμίδα. Στη στιβάδα αυτή κατοικοεδρεύουν μια ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών που περιλαμβάνει τους ινοβλάστες (fibroblasts), τα μακροφάγα και τα ιστιοκύτταρα ή σιτευτικά κύτταρα

(mast cells). Άλλα κύτταρα αιματικής προέλευσης, όπως λεμφοκύτταρα, κύτταρα του πλάσματος και άλλα λευκά αιμοσφαίρια μεταναστεύουν στη δερμίδα ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (Kolarsick et al., 2011).

Στη δερμίδα παρατηρούνται δύο διακριτές ζώνες. Η θηλώδης (papillary) δερμίδα βρίσκεται αμέσως κάτω από τη βασική μεμβράνη και αποτελείται από ένα αραιό δίκτυο συνδετικού ιστού, με λεπτά ινίδια κολλαγόνου. Η στιβάδα που ακολουθεί, ονομάζεται δικτυωτή (reticular) και αποτελείται από ένα συμπαγές, πυκνό δίκτυο συνδετικού ιστού, με παχιές δεσμίδες ινιδίων οι οποίες ακολουθούν συγκεκριμένη οργάνωση. Το δίκτυο οργάνωσης της δερμίδας καλείται εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix, ECM) και τα δομικά του στοιχεία (πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες) παράγονται κυρίως από τους ινοβλάστες. Η εξωκυττάρια μήτρα επιτρέπει τη συγκράτηση ύδατος που είναι απαραίτητο για τη λειτουργεία των κυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία του δέρματος αλλά και στην αιτιοπαθογένεια των δερματικών νόσων (Menon, 2015).

Οι ινοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή και αναδιαμόρφωση όλων των βασικών συστατικών που συνθέτουν τη δερμίδα: ίνες κολλαγόνου, ίνες ελαστίνης (elastin) και γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans, GAGs) όπως το υαλουρονικό οξύ (hyaluronic acid). Αυτός ο κυτταρικός τύπος ρυθμίζει διεργασίες καίριες για την ομοιόσταση, την επανόρθωση και την αναγέννηση του δέρματος (Menon, 2015).

1.2.5 Υποδόριος ιστός

Ο υποδόριος λιπώδης ιστός (panniculus adiposus) αποτελείται από λοβία λιποκυττάρων (lipocytes) που διαχωρίζονται μεταξύ τους με ινώδη διαφράγματα που συντίθενται από κολλαγόνο και μεγάλα αιμοφόρα αγγεία. Το πάχος του υποδόριου λίπους διαφέρει ανάλογα με την ανατομική περιοχή του σώματος. Ο ιστός αυτός παρέχει στο ανθρώπινο σώμα πλευστότητα και αποθέματα ενέργειας. Θεωρείται όργανο του ενδοκρινικού συστήματος, στο οποίο συμβαίνουν διεργασίες όπως η ενζυμική μετατροπή της ανδροστενεδιόνης σε οιστρόνη, καθώς και η παραγωγή της ορμόνης λεπτίνης, η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση του σωματικού βάρους (Kolarsick et al., 2011).

1.3 ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Από την επιδερμίδα προέρχονται και προκύπτουν διάφορα εξαρτήματα του δέρματος, όπως οι τριχοσμηγματογόνοι μονάδες, οι όνυχες, και οι ιδρωτοποιοί αδένες (Kolarsick et al., 2011).

1.3.1 Τρίχες

Οι τρίχες είναι επιμήκεις, κερατινοποιημένες δομές που προβάλλουν στην επιφάνεια του δέρματος. Απαντώνται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος εκτός από τα πέλματα, τις παλάμες, την πόσθη και την ονυχοφόρο φάλαγγα των δακτύλων. Η μορφολογία και η κατανομή τους διαφέρει από άτομο σε άτομο και ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και την ανατομική περιοχή του σώματος.

Η τρίχα αποτελείται από δύο κύρια τμήματα, τη ρίζα και το στέλεχος. Η ρίζα είναι το μη ορατό τμήμα της τρίχας το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του τριχοθυλακίου. Στέλεχος ονομάζεται το τμήμα της τρίχας άνωθεν της εκβολής του σμηγματογόνου αδένα. Το στέλεχος της τρίχας περιβάλλεται από λεπτά και επίπεδα κύτταρα (Kolarsick et al., 2011; Menon, 2015).

1.3.2 Σμηματογόνοι Αδένες

Οι σμηγματογόνοι αδένες βρίσκονται στο χόριο και απαντώνται στο μεγαλύτερο μέρος του σώματος εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα. Αποτελούν μέρος της τριχοσμηγματογόνου μονάδας. Είναι ολοκρινείς αδένες, δηλαδή το έκκριμά παράγεται στο κυτταρόπλασμά τους και απελευθερώνεται με διάσπαση της κυτταρικής τους μεμβράνης. Αποτελούνται από το αδενικό σώμα και τον εκφορητικό πόρο. Ο πόρος είναι βραχύς και ευρύς και συνήθως καταλήγει στην άνω μοίρα ενός τριχοθυλακίου. Οι σμηγματογόνοι αδένες αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία, καθώς πολλαπλασιάζονται, υφίστανται λιπώδη εκφύλιση. Στο τέλος τα κύτταρα αυτά διαρρηγνύονται και το προϊόν της διεργασίας αυτής είναι το σμήγμα. Ο ρόλος του σμήγματος είναι η λίπανση των τριχών, ώστε να διατηρείται η ελαστικότητά τους, η λίπανση του δέρματος για να προστατεύεται από τη τριβή καθώς και η αδιαβροχοποίησή του (Kolarsick et al., 2011; Menon, 2015).

Εικόνα 3 Τομή τριχοσμηγματογόνου μονάδας, μεγέθυνση x20 (Tsatsou and Zouboulis, 2014)

Παλαιότερα υπήρχε η θεώρηση ότι οι σμηγματογόνοι αδένες δεν επιτελούν κάποια σημαντική λειτουργία και δεν είναι παρά εξελικτικό κατάλοιπο του ανθρώπινου δέρματος. Πλέον, η άποψη αυτή

έχει καταρριφθεί πλήρως και έχει αναδειχθεί η σημασία τους ως καίρια για τη φυσιολογική λειτουργία του δέρματος. Συμμετέχουν ενεργά στην αιτιοπαθογένεια πολλών δερματικών ασθενειών, εκ των οποίων η πιο χαρακτηριστική είναι η κοινή ακμή (acne vulgaris) (Zouboulis, 2004). Ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της ακμής θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

Ο σμηγματογόνος αδένας έχει χαρακτηριστεί ως «ο εγκέφαλος του δέρματος» (Zouboulis, 2015). Οι σμηγματογόνοι αδένες επιτελούν σημαντικό προστατευτικό ρόλο, και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγουν πληθώρα αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs, Antimicrobial Peptides), νευροπεπτιδίων (neuropeptides) και λιπιδίων με αντιμικροβιακή δράση. Κάθε σμηγματογόνος αδένας λειτουργεί σαν ένα ανεξάρτητο όργανο, που επικοινωνεί και επηρεάζεται από το ενδοκρινικό σύστημα, γεγονός που πιθανόν μεσολαβεί στη σχέση μεταξύ του άγχους και των εξάρσεων της ακμής (McInturff and Kim, 2005).

1.3.3 Ιδρωτοποιοί Αδένες

Το δέρμα διαθέτει δύο τύπους ιδρωτοποιών αδένων, τους εκκρινείς και τους αποκρινείς. Ο αριθμός τους υπολογίζεται σε πάνω από δυο εκατομμύρια. Ανευρίσκονται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος εκτός από το ερυθρό των χειλέων, τον έξω ακουστικό πόρο, την κοίτη των ονύχων, τα έσω χείλη του αιδοίου, τη βάλανο και την έσω επιφάνεια της ακροποσθίας. Η φυσιολογική λειτουργία των ιδρωτοποιών αδένων αφορά την παραγωγή του ιδρώτα ώστε να ελαττώνει τη θερμοκρασία του σώματος, μέσω της εξάτμισης (Kolarsick et al., 2011; Menon, 2015).

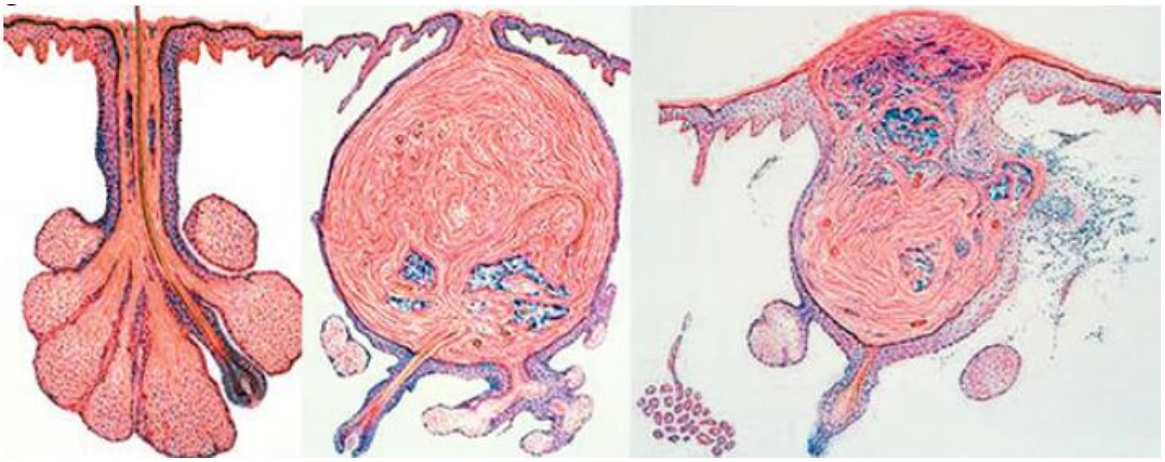
1.3.4 Όνυχες

Τα νύχια είναι αποπλατυσμένες, ελαφρώς κυρτές, κερατινοποιημένες πλάκες που καλύπτουν το μεγαλύτερο τμήμα της ραχιαίας επιφάνειας της τελικής φάλαγγας των δακτύλων των χεριών και των ποδιών. Το νύχι αποτελείται από τη ρίζα, την ονυχαία πλάκα και το ελεύθερο άκρο. Ο ρόλος τους είναι η προστασία των ευαίσθητων άκρων των δακτύλων και η συμμετοχή τους στην αίσθηση της αφής (Kolarsick et al., 2011; Menon, 2015).

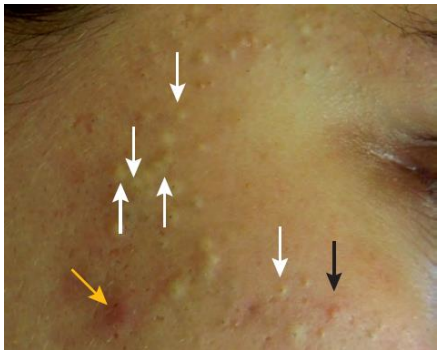
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΙΝΗ ΑΚΜΗ

2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η **κοινή ακμή (Acne Vulgaris, AV)** είναι μια **χρόνια, φλεγμονώδης δερματοπάθεια που πλήττει τις τριχοσμηγματογόνους μονάδες**, εξαρτήματα του δέρματος που αποτελούνται από τους τριχικούς θύλακες και τους σμηγματογόνους αδένες που τους συνοδεύουν. Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν αυξημένη σμηγματόρροια, μη φλεγμονώδεις βλάβες (ανοιχτούς και κλειστούς φαγέσωρες) καθώς και φλεγμονώδεις βλάβες (βλατίδες, φλύκταινες, οζίδια, κύστες) (Εικόνα 4, Εικόνα 5) και δημιουργία ουλών (Williams et al., 2012). Η νόσος συχνά συνοδεύεται από ψυχοκοινωνικές επιπτώσεις και μπορεί να προκαλέσει ή να επιβαρύνει σοβαρές ψυχιατρικές διαταραχές, όπως κατάθλιψη και αυτοκτονικές τάσεις (Bhate and Williams, 2013; Tan and Bhate, 2015).



Εικόνα 4 Αριστερά: φυσιολογική τριχοσμηγματογόνος μονάδα. Κέντρο: φαγεσωρική βλάβη ακμής. Δεξιά: φλεγμονώδης βλάβη ακμής με διάρρηξη του θυλακικού τοιχώματος (Moradi Tuchayi et al., 2015).



Εικόνα 5 Κλινική εικόνα κοινής ακμής. Λευκά βέλη: φαγεσωρικές βλάβες. Κίτρινο βέλος: βλατίδα. Μαύρο βέλος: φλυκταινίδιο (Moradi Tuchayi et al., 2015).

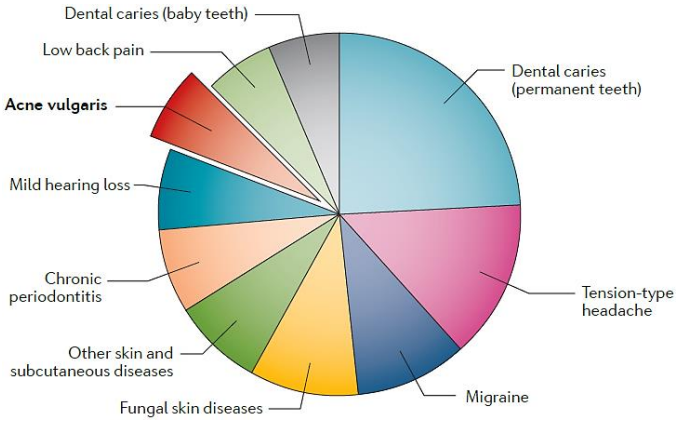
Η παρούσα διατριβή αφορά την περισσότερο συνήθη μορφή ακμής, την κοινή ακμή (*acne vulgaris*). Άλλες μορφές ακμής συνιστούν ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες και δε θα αναφερθούν.

2.2 ΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ

Η αρχαία ελληνική ονομασία της ακμής ήταν «ἴονθος» και η λατινική ήταν "*varus*". Οι ονομασίες αυτές χρησιμοποιούνταν κυρίως στον πληθυντικό. Η ετυμολογία του όρου «ακμή» είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Ο όρος "*acne*" αναφέρεται για πρώτη φορά από τον Αέτιο τον Αμιδηνό, θεραπευτή του αυτοκράτορα Ιουστινιανού, περί τον 6ο αιώνα μ.Χ. και εκλατινίζεται σε "*acnae*". Συγκεκριμένα στην ελληνική γλώσσα, υπάρχουν διάφορες εκδοχές σχετικά με την ετυμολογία του όρου «ακμή». Μια εκδοχή είναι ότι χρησιμοποιούνταν ο όρος "*acne*", γραφόμενος στα λατινικά, ως σύντμηση του όρου "*acnae*" ο οποίος προαναφέρθηκε. Μια αντίθετη εκδοχή υποστηρίζει ότι ο όρος "*akme*", γραμμένος στα ελληνικά ως «ακμή», χρησιμοποιούνταν έως και τα τέλη του 18ου αιώνα, για να περιγράψει μία «ανύψωση», ένα «υπερυψωμένο σημείο». Έχει προταθεί λοιπόν ότι ο όρος "*acne*" αποτελεί μια λανθασμένη μεταφορά στα λατινικά, του ελληνικού όρου "*akme*" / «ακμή» που χρησιμοποιήθηκε από τον 3ο αιώνα μ.Χ. ως μεταφορική αναφορά στην εφηβική ηλικία. Εναλλακτικές ετυμολογικές ερμηνείες είναι ότι ο όρος αποτελεί σύντμηση της λέξης «άκνησις», η οποία σημαίνει «ένα εξάνθημα που δεν προκαλεί κνησμό», ή ότι προέρχεται από τη λέξη «άκουν», που σημαίνει «σημείο», με ρίζες στον αιγυπτιακό όρο "*aku-t*", ο οποίος αναφέρεται στον Πάπυρο του Ebers (Plewig et al., 2019a).

2.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της ακμής υπολογίστηκε με βάση το Global Burden of Disease Project στο 9,4%. Κατατάσσεται έτσι ως η 8η συχνότερα εμφανιζόμενη νόσος παγκοσμίως (Γράφημα 1) (Hay et al., 2014; Tan and Bhate, 2015). Πιο συγκεκριμένα, η ακμή κατατάσσεται στις τρεις συχνότερα εμφανιζόμενες δερματικές παθήσεις, σύμφωνα με εκτεταμένες μελέτες που έχουν γίνει στη Γαλλία, στο Ηνωμένο Βασίλειο και τις Η.Π.Α. (Bhate and Williams, 2013).



Γράφημα 1 Οι 10 συχνότερα εμφανιζόμενες νόσοι παγκοσμίως, σύμφωνα με μελέτη του Global Burden of Disease (2010). Η κοινή ακμή (acne vulgaris) αποτελεί την 8η πιο συχνή (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Η ακμή πλήττει περίπου το 85% των ατόμων κατά την εφηβική ηλικία (12-24 έτη). Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου σημειώνεται στην ηλικία των 15 ετών. Τα τελευταία χρόνια, η πρώτη εμφάνιση της νόσου παρατηρείται πλέον σε όλο και μικρότερες ηλικίες και οι συχνότητα της μεταεφηβικής ακμής αυξάνει. Η μεταεφηβική ακμή παρατηρείται περίπου στο 60% και στο 40% των

ατόμων που έχουν περάσει τα 20 και τα 30 έτη ηλικίας, αντίστοιχα. Διακρίνεται στην παραμένουσα ακμή, η οποία συνεχίζει από την εφηβική ηλικία και στην ακμή όψιμης εμφάνισης, η οποία εμφανίζεται μετά την ηλικία των 25 ετών. Η μεταεφηβική ακμή επηρεάζει κυρίως τις γυναίκες και συχνά σχετίζεται με ορμονικές διαταραχές (Plewig et al., 2019b).

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της ακμής και η χρονιότητα που την χαρακτηρίζει, είναι μερικοί μόνο από τους λόγους που δικαιολογούν τον σοβαρότατο κοινωνικό και οικονομικό αντίκτυπο της νόσου. Στις Η.Π.Α. περισσότερα από 3 δις δολάρια δαπανώνται ετησίως στη θεραπευτική αντιμετώπισή της, αλλά και λόγω της απώλειας παραγωγικότητας που αυτή προκαλεί (Bhate and Williams, 2013).

Ο χαρακτηρισμός της ακμής ως χρόνιας νόσου δικαιολογείται από την παρατεταμένη διάρκειά της, την υψηλή συχνότητα υποτροπής και την εκδήλωσή της είτε ως οξεία-κεραυνοβόλος είτε ως σταδιακή-αργής έναρξης. Παρόλο που η νόσος δε χαρακτηρίζεται από θνησιμότητα, η σωματική και ψυχολογική νοσηρότητα, καθώς και οι επιπτώσεις της στην ποιότητα ζωής του ασθενούς χρίζουν εξαιρετικής σημασίας. Για την αποφυγή τους, απαιτείται επομένως έγκαιρη και επιθετική θεραπευτική προσέγγιση (Tuchayi et al., 2015).

Αξίζει να σημειωθεί πως η ακμή θεωρείται πλέον μια ασθένεια του Δυτικού πολιτισμού, αφού εμφανίζεται πολύ συχνότερα στις ανεπτυγμένες κοινωνίες. Σε έρευνα που διεξήχθη σε μεγάλο πληθυσμό ιθαγενών στη Νέα Γουινέα και στην Παραγουάη, οι οποίοι δεν ακολουθούν το Δυτικό τρόπο ζωής και διατροφής, δεν παρατηρήθηκε κανένα περιστατικό ακμής, σε καμία ηλικία, συμπεριλαμβανομένης και της εφηβικής. Η εντυπωσιακή αυτή διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου στους ιθαγενείς σε σύγκριση με πληθυσμούς που ακολουθούν το σύγχρονο τρόπο ζωής οδηγεί στο συμπέρασμα πως η εμφάνιση της ακμής δε μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά σε γενετικούς παράγοντες. Αντιθέτως, φαίνεται πως διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η διατροφή, διαδραματίζουν και αυτοί σημαντικό ρόλο (Cordain et al., 2002a).

2.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑΤΑΞΗΣ

Η κοινή ακμή μπορεί να κατηγοριοποιηθεί **βάσει της σοβαρότητας των βλαβών**, σε:

- ήπια (mild)
- μέτρια (moderate)
- σοβαρή (severe)

Βάσει του είδους των βλαβών που εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον ασθενή κατηγοριοποιείται σε:

- φαγεσωρική (comedonal)
- βλατιδοφλυκταινώδη (papulopustular)
- οζώδη (nodular)

- οζοκυστική (nodulocystic)
- συζευγμένη (Acne conglobata)

Τέλος, **βάσει της ηλικίας εκδήλωσης** της νόσου, η ακμή μπορεί να κατηγοριοποιηθεί περαιτέρω σε:

- βρεφική (neonatal): <4w
- παιδική (infantile): 3-16m
- μέση παιδική (mid-childhood): 1-7y
- προεφηβική (prepubertal): 7-9y
- εφηβική (adolescent): 10-18y
- ενήλικη (adult): >25y

Στις κλινικές μελέτες, για την κατάταξη της ακμής χρησιμοποιείται κυρίως ο αριθμός των βλαβών και η φωτοτεκμηρίωση. Ο αριθμός των βλαβών αποτελεί ένα αντικειμενικό κριτήριο που ενισχύει την ομοιογένεια των μελετών και διευκολύνει τη σύγκριση μεταξύ θεραπειών. Ωστόσο, υπάρχουν ευρέως διαδεδομένα **συστήματα κατάταξης της ακμής** (**acne grading systems**) (Πίνακας 1) ως συμπληρωματικά εργαλεία στις κλινικές μελέτες, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας χρήσης τους καθώς και της χρησιμότητάς τους στην επιλογή των εθελοντών.

Επί του παρόντος, κανένα από τα συστήματα κατάταξης της ακμής δεν είναι κοινώς αποδεκτό και χρησιμοποιούμενο παγκοσμίως. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται στην έρευνα μπορεί να διαφέρουν κατά πολύ μεταξύ των μελετών, δυσχεραίνοντας τη σύγκριση μεταξύ θεραπειών, και η χρησιμότητα τους περιορίζεται από τη σχετική υποκειμενικότητα που διέπει την κατάταξη της ακμής από τον κάθε ερευνητή (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Ωστόσο, γίνονται προσπάθειες για την καθιέρωση ενός πρότυπου συστήματος κατάταξης της ακμής. Η χρήση ενός σταθερού συστήματος κατάταξης από τους θεράποντες ιατρούς θα βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων και στην καλύτερη αξιολόγηση της απόκρισης στη θεραπεία. Για να είναι ένα τέτοιο σύστημα επιτυχημένο, θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από αναπαραγωγιμότητα, ευκολία στη χρήση και να χαίρει κοινής αποδοχής από τη δερματολογική κοινότητα (Moradi Tuchayi et al., 2015; Tan et al., 2006; Zaenglein et al., 2016).

Πίνακας 1 Συστήματα κατάταξης της ακμής (acne grading systems) (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Leeds grading technique*

- 0.25–1: physiological acne
- 1.5–10: clinical acne

Revised Leeds grading technique‡

- 1–3: non-inflamed acne on the face
- 1–12: acne on the face
- 1–8: acne on the chest
- 1–8: acne on the back

Plewig and Kligman numerical grading of comedonal acne§

- I: <10 comedones
- II: 10–25 comedones
- III: 25–50 comedones
- IV: >50 comedones

Plewig and Kligman numerical grading of papulopustular acne§

- I: <10 inflammatory lesions
- II: 10–20 inflammatory lesions
- III: 20–30 inflammatory lesions
- IV: >30 inflammatory lesions

Global Evaluation Acne scale‖

- 0: no acne lesions; residual pigmentation and erythema may be seen
- 1: almost no lesions, with a few scattered open or closed comedones and very few papules
- 2: mild acne, in which <50% of the face is involved with a few comedones, papules and pustules
- 3: moderate acne, in which >50% of the face is involved with many papules, pustules, comedones and a maximum of one nodule
- 4: severe acne, in which the entire face is involved, covered with many papules, pustules, comedones and rare nodules
- 5: Very severe acne with highly inflammatory lesions covering the whole face with the presence of nodules

US FDA's Investigator's Global Assessment for acne vulgaris¶

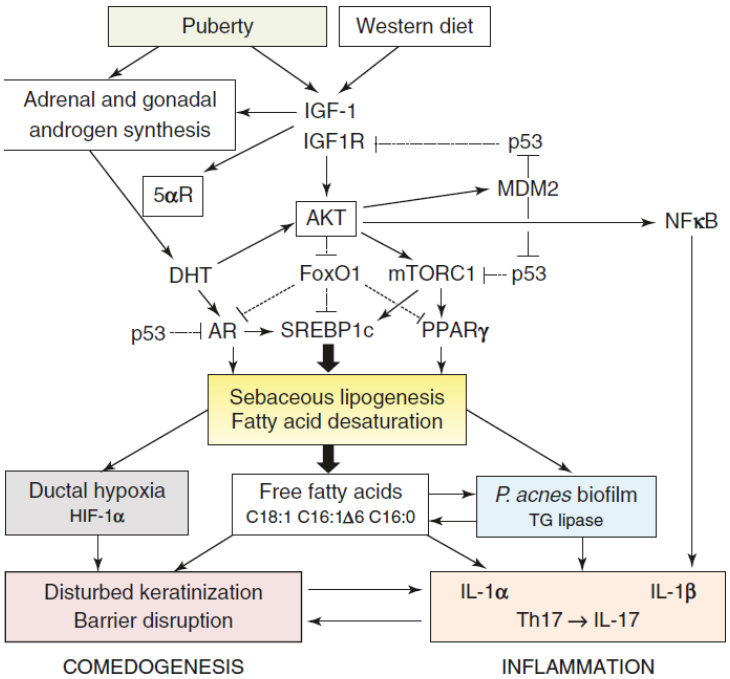
- 0: no acne lesions
- 1: almost clear skin with rare non-inflammatory lesions and no more than one papule
- 2: mild acne with some non-inflammatory lesions and no more than a few papules or pustules
- 3: moderate acne with many non-inflammatory lesions, some inflammatory lesions, and no more than one nodule
- 4: severe acne with many non-inflammatory lesions and inflammatory lesions, but no more than a few nodular lesions

2.5 ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η κοινή ακμή είναι μια πολυπαραγοντική (Εικόνα 6) φλεγμονώδης νόσος που επηρεάζει τους τριχοσμηγματογόνους θύλακες. Η κατανόηση για την παθογένεια της ακμής εξελίσσεται διαρκώς. Οι παθογενετικοί μηχανισμοί που οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι, όμως τέσσερεις παράγοντες φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο (χωρίς να συμβαίνουν απαραίτητα με τη συγκεκριμένη σειρά):

- υπερβολική παραγωγή **σμήγματος** και αλλαγές στη λιπιδική σύσταση του, που σχετίζονται με διαταραχή του ορμονικού μικροπεριβάλλοντος (ανδρογόνα, κορτικοστεροειδή κ.α.)
- αυξημένος ρυθμός **κερατινοποίησης** των κυττάρων του θύλακα που οδηγεί σε **απόφραξή** του
- επαγωγή πολύπλοκων μηχανισμών **φλεγμονής**, που εμπλέκουν και τη φυσική και την ειδική ανοσία
- αποικισμός του λιπόφιλου περιβάλλοντος του θύλακα από τον αναερόβιο μικροοργανισμό ***Cutibacterium acnes***, που σε συνδυασμό με άλλα βακτηριακά αντιγόνα επιτείνει τις φλεγμονώδεις διεργασίες

Άλλοι μηχανισμοί που πιθανολογείται ότι συνεισφέρουν στην εκδήλωση της νόσου και βρίσκονται υπό διερεύνηση είναι η ρύθμιση του **νευροενδοκρινικού συστήματος**, **παράγοντες κληρονομικότητας** (κυρίως μέσω μελετών σε ομοζυγωτικά δίδυμα), **περιβαλλοντικοί παράγοντες** (π.χ. έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία), η **διατροφή**, το **κάπνισμα**, το **άγχος** και ο σύγχρονος τρόπος ζωής (Moradi Tuchayi et al., 2015; Zaenglein et al., 2016).



Εικόνα 6 Πολύπλοκοι παθογενετικοί μηχανισμοί διέπουν την εκδήλωση της κοινής ακμής (Plewig et al., 2019c)

2.5.1 Ενδοκρινικό σύστημα

Όπως αναφέρθηκε, η συνηθέστερη ηλικία εκδήλωσης της ακμής είναι η εφηβική. Κατά την περίοδο αυτή, παρατηρείται δραματική αλλαγή στην ορμονική ισορροπία του οργανισμού. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η αιτιολογία εμφάνισης ακμής έγκειται στα επίπεδα των ορμονών στη γενική κυκλοφορία ή στην επεξεργασία των ορμονών στους περιφερικούς ιστούς.

Μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει εμπλοκή των **ανδρογόνων** στην παθογένεια της ακμής. Ανδρογόνα που έχουν βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα σε μεγάλο αριθμό ασθενών με ακμή είναι ή δεϋδροεπιανδροστενόνη (dehydroepiandrosterone, DHEA), η τεστοστερόνη (testosterone) και η ανδροστενεδιόνη (androstenedione).

Εκτός από συστηματικές διαταραχές στην ισορροπία των ορμονών, παρατηρείται υπερπαραγωγή στεροειδών ορμονών, ιδίως ανδρογόνων, σε τοπικό επίπεδο. Τα κύτταρα του δέρματος ρυθμίζουν ένα τοπικό σύστημα παραγωγής ορμονών, το οποίο ομοιάζει με το υποθαλαμικό και βρίσκεται σε αλληλεπίδραση με αυτό. Παράγουν έτσι κορτικοεκλυτίνη (corticotropin releasing hormone, CRH), κορτικοτροπίνη (adrenocorticotropic hormone, ACTH) και κυτταροκίνες. Οι παράγοντες αυτοί με τη σειρά τους ρυθμίζουν την τοπική παραγωγή στεροειδών ορμονών από τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων: ανδρογόνων (τεστοστερόνη και 5α-διϋδροτεστοστερόνη), οιστρογόνων (οιστραδιόλη και οιστρόνη) και γλυκοκορτικοειδών (κορτιζόλη και κορτικοστερόνη) (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Η 5α-διϋδροτεστοστερόνη (5α-dihydrotestosterone, 5α-DHT), που βρίσκεται επίσης σε αυξημένα επίπεδα στο δέρμα ασθενών με ακμή, επάγει την παραγωγή σμήγματος από τα κύτταρα του σμηγματογόνου αδένα.

Τα **γλυκοκορτικοειδή** φαίνεται επίσης να εμπλέκονται στην ακμή, αφού ρυθμίζουν και αυτά την παραγωγή σμήγματος. Ένζυμα που καταλύουν τη μετατροπή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη έχουν βρεθεί να υπερεκφράζονται στα κερατινοκύτταρα, στους σμηγματογόνους αδένες και στις ακνεϊκές βλάβες.

Σε ενήλικους ασθενείς με ακμή, έχουν βρεθεί επίσης αυξημένα επίπεδα του αυξητικού παράγοντα **IGF-1** (**insulin-like growth factor 1**). Συγκεκριμένα στις γυναίκες, ο IGF-1 έχει συσχετιστεί με τον αριθμό των ακνεϊκών βλαβών, την έκκριση σμήγματος στο πρόσωπο και τα επίπεδα 5α-DHT και DHEA στον ορό.

Ο IGF-1 αυξάνει το ρυθμό της κερατινοποίησης και τη σύνθεση λιπιδίων στους ανθρώπους, αφού επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein 1) μέσω των μονοπατιών των κινασών PI3K και MAPK. Επαγωγή του SREBP-1 προκαλούν και τα γλυκοκορτικοειδή.

Τέλος, επίδραση στους σμηγματογόνους αδένες και κατ' επέκταση στην παθογένεια της ακμής φαίνεται να έχουν και οι **PPARs** (**peroxisome-proliferator activated receptors**) και τα προσδέματά τους (εικοσανοειδή) (Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.5.2 Σμήγμα

Το σμήγμα είναι το λιπαρό έκκριμα των σμηγματογόνων αδένων. Η παραγωγή του ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες που ενεργοποιούν μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό, στη λιπογένεση, στον ορμονικό μεταβολισμό και στην απελευθέρωση κυτταροκινών και χημειοκινών (χημειοτακτικοί παράγοντες, chemokines). Η διαδικασία αυτή φαίνεται πλέον πολύ πιο περίπλοκη σε σχέση με τις αρχικές επιστημονικές υποθέσεις.

Lipid class	Range weight, %	Mean weight, %
Triglycerides	20–60	45
Wax esters	23–29	25
Squalene	10–14	12
Free-fatty acids	5–40	10
Cholesterol and sterol esters	1–5	4
Diglycerides	1–2	2

Εικόνα 7 Λιπιδική σύσταση ανθρώπινου σμήγματος (Pappas, 2015).

Η αντίληψη ότι η υπερβολική παραγωγή σμήγματος οδηγεί σε εκδήλωση ακμής είναι αρκετά παγιωμένη. Ωστόσο, δεν παρατηρείται σε όλους τους ασθενείς με ακμή υπερέκκριση σμήγματος. Φαίνεται πως η συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής σμήγματος και της σοβαρότητας της ακμής εξαρτάται από τους παράγοντες της ηλικίας και του φύλου: στους άνδρες, η εμφάνιση ακμής έχει πιο ισχυρή συσχέτιση με την παραγωγή σμήγματος απ' ότι στις γυναίκες.

Η λιπιδική σύσταση του σμήγματος των ατόμων με ακμή διαφέρει σε σχέση με το σμήγμα φυσιολογικών ατόμων. Το σμήγμα των ακνεϊκών ατόμων περιέχει μικρότερο ποσοστό απαραίτητων λιπαρών οξέων (essential fatty acids, EFAs) και μεγαλύτερα ποσοστά **μονοακόρεστων λιπαρών οξέων** (**mono-unsaturated fatty acids, MUFAs**) και **προϊόντων λιπιδικής υπεροξείδωσης** (**lipoperoxides**) του σκουαλένιου (squalene). Τα υπεροξείδια και τα MUFAs επιδρούν στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και συμβάλλουν στον αυξημένο ρυθμό κερατινοποίησης που παρατηρείται στην ακμή (Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.5.3 Οξειδωτικό stress

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress και των αντιοξειδωτικών στην ακμή αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος αρκετά σύγχρονο. Μελέτες υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό stress, που έχει παρατηρηθεί σε τοπικό και συστηματικό επίπεδο σε ασθενείς με ακμή, καθώς και η επακόλουθη λιπιδική υπεροξείδωση, αποτελούν εναρκτήριο γεγονός του φλεγμονώδους καταρράκτη που χαρακτηρίζει την παθογένεια της νόσου (Bowe and Logan, 2010).

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) που παράγονται από ουδετερόφιλα συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διεργασία της ακμής, ενώ η ενδογενής άμυνα του οργανισμού δε μπορεί να ανταπεξέλθει, αφού αντιοξειδωτικά όπως η καταλάση (catalase) και η υπεροξειδική δισμουτάση

(SOD, Superoxide Dismutase) φαίνεται να βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με ακμή σε σχέση με υγιείς ανθρώπους. Ταυτόχρονα, στους ασθενείς με ακμή, δείκτες οξειδωτικού stress όπως η μηλονική διαλδεΰδη (malondialdehyde) και οξειδάση της ξανθίνης (XO, xanthine oxidase) βρίσκονται αυξημένα (Abdel Fattah et al., 2008; Arican et al., 2005; Bowe et al., 2010; Sarici et al., 2009).

2.5.4 Φλεγμονή

Δεν είναι εντελώς ξεκάθαρο αν προηγούνται της υπέρμετρης κερατινοποίησης, φλεγμονώδεις διεργασίες, ή το αντίστροφο. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η φλεγμονή δίνει το έναυσμα ώστε τα κερατινοκύτταρα να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται με αυξημένο ρυθμό.

Στις ακνεϊκές βλάβες βρίσκεται ενεργοποιημένος ο φλεγμονώδης μεταγραφικός παράγοντας **NF-κB** (nuclear factor-κB), καθώς και **κυτταροκίνες** που ρυθμίζονται από αυτόν, όπως οι ιντερλευκίνες (interleukins) IL-1β, IL-8, IL-10 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrotizing factor, TNF) (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Στις ακνεϊκές βλάβες παρατηρούνται επίσης αυξημένα επίπεδα λιπιδίων που δρούν ως μεσολαβητές φλεγμονής. Τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων διαθέτουν και τις δύο ισομορφές του ενζύμου **κυκλοοξυγονάση** (**cyclooxygenase, COX**), COX1 και COX2, με την COX2 να υπερεκφράζεται στους σμηγματογόνους αδένες ατόμων με ακμή. Η COX2 επάγεται επίσης μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων PPARγ. Ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιπιδικών προφλεγμονωδών παραγόντων όπως οι **προσταγλανδίνες** (**prostaglandins**) που γενικότερα ονομάζονται **προστανοειδή** (**prostanoids**).

Στα προστανοειδή ανήκουν και τα **λευκοτριένια** (**leukotrienes**), που είναι χημειοτακτικοί παράγοντες των ουδετερόφιλων και παράγονται από διάφορα ένζυμα και κυρίως από τις **λιποοξυγονάσες** (**lipooxygenases, LOX**). Τα κύτταρα των ανθρώπινων σμηγματογόνων αδένων διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα για τη σύνθεση λευκοτριενίων. Μάλιστα, ένζυμα όπως η 5-LOX βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα στις ακνεϊκές βλάβες σε σχέση με το υγιές δέρμα και αποτελούν πιθανό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της ακμής (Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.5.5 Νευροενδοκρινικό σύστημα

Η παλιά θεώρηση ότι οι σμηγματογόνοι αδένες δεν ασκούν λειτουργικό ρόλο και αποτελούν απλώς εξελικτικό κατάλοιπο στον άνθρωπο φαίνεται σήμερα εντελώς παρωχημένη. Έχει πλέον βρεθεί ότι τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων εκφράζουν πληθώρα υποδοχέων για πολλά **νευροπεπτίδια**, όπως είναι η CRH, οι μελανοκορτίνες (melanocortins), η β-ενδορφίνη (β-endorphin), το πεπτίδιο VIP (vasoactive intestinal polypeptide), το νευροπεπτίδιο Y (neuropeptide Y) και η ουσία P (substance P). Ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων, που μπορεί να συμβεί για πολλούς λόγους (π.χ. επαγωγή της ουσίας P από το άγχος), φαίνεται ότι ρυθμίζει την παραγωγή κυτταροκινών, τη διαφοροποίηση και τον

πολλαπλασιασμό, τη λιπογένεση και το μεταβολισμό των ανδρογόνων σε τοπικό επίπεδο (Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.5.6 Διατροφή

Οι Δυτικού τύπου διατροφικές συνήθειες (Western diet), που χαρακτηρίζονται από **υψηλό γλυκαιμικό δείκτη** και **αυξημένη κατανάλωση γαλακτοκομικών** έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση και επίταση των συμπτωμάτων της ακμής. Η υπόθεση αυτή φαίνεται να έχει πραγματικές βάσεις, αφού η συγκεκριμένη διατροφή σχετίζεται με επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού του IGF-1 που αναφέρθηκε παραπάνω. Επιπλέον, επάγεται και το σηματοδοτικό μονοπάτι του συμπλέγματος mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Το σύμπλεγμα αυτό συμμετέχει ενεργά στην απορρόφηση των λιπιδίων και στη διαφοροποίηση των κυττάρων του σμηγματογόνου αδένα μέσω δράσης στον PPARγ, αλλά και στην επαγωγή της λιπογένεσης μέσω του παράγοντα SREBP1.

Η πλήρης απουσία της ακμής που βρέθηκε σε έρευνα σε ιθαγενείς πληθυσμούς (non-Westernized) των περιοχών Papua New Guinea (N=1200) και Paraguay (N=115) ενισχύει την υπόθεση ότι η διατροφή Δυτικού τύπου ευθύνεται ή/και επιδεινώνει την ακμή (Cordain et al., 2002b).

Τα επίπεδα χοληστερόλης, LDL, HDL και απολιποπρωτεΐνης A1 (apolipoprotein A1), καθώς και τα κλάσματά τους έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με ακμή σε σχέση με φυσιολογικά άτομα (αν και ήταν εντός φυσιολογικών ορίων). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη δυσλιπιδαιμίας στα άτομα με ακμή. Χαμηλότερος δείκτης μάζας σώματος σχετίζεται επίσης με ελάττωση του κινδύνου εμφάνισης ακμής. Επιπλέον παράγοντας κινδύνου για κάποιους ασθενείς, που έχει υποτεθεί ότι εμπλέκεται στην ακμή, είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη (Del Prete et al., 2012; Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.5.7 *Cutibacterium acnes* & ανοσοποιητικό σύστημα

Ο κυριότερος μικροοργανισμός που εμπλέκεται στην παθογένεια της ακμής είναι το *Propionibacterium acnes*. Πρόκειται για αναερόβιο, θετικό κατά Gram βακτηρίδιο. Γονιδιωματικές και μεταγονιδιωματικές έρευνες οδήγησαν πρόσφατα στην αλλαγή της ονομασίας από *Propionibacterium acnes* σε *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), αντιπροσωπεύοντας καλύτερα τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του να αποικίζει το δέρμα, όσο και στον χαρακτηρισμό των διαφορετικών φυλοτύπων.

Είναι σημαντικό να τονιστεί πως έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις ακμής ακόμα και χωρίς τη συμμετοχή του *C. acnes*. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι φλεγμονώδεις διεργασίες που εμπλέκονται στην ακμή προηγούνται του αποικισμού των τριχικών θυλάκων από το βακτήριο. Τα παραπάνω ανάγουν τη φλεγμονή σε παράγοντα παθογένειας της ακμής μεγαλύτερης σημασίας από το ίδιο το *C. acnes* (Jeremy et al., 2003; Shaheen and Gonzalez, 2013).

Αφού το *C. acnes* αρχίσει να πολλαπλασιάζεται στο θύλακα, προκαλεί και μια σειρά φλεγμονωδών δράσεων, όπως παραγωγή κυτταροκινών και ενεργοποίηση της φυσικής ανοσιακής απόκρισης από τον

ξενιστή μέσω ενεργοποίησης Toll-like υποδοχέων (Toll-like Receptors, TLRs) (Holland and Jeremy, 2005; Kim et al., 2002).

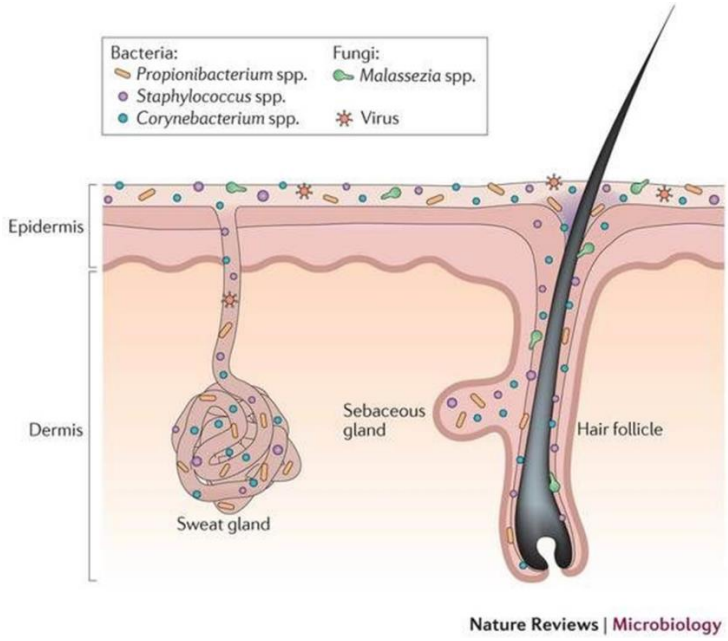
Ο μικροβιολογικός έλεγχος στην κοινή ακμή δεν είναι απαραίτητος στην πλειονότητα των περιπτώσεων, καθώς δεν επηρεάζει την αντιμετώπιση της νόσου και συνήθως η επιτυχία της αντιβιοτικής θεραπείας δεν προκύπτει από την ελάττωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Είναι ωστόσο χρήσιμος σε περιπτώσεις που απαιτείται διαφορική διάγνωση, όπως στη θυλακίτιδα που προκαλείται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *Klebsiella* sp. και *Serratia* sp., καθώς και στις δερματικές λοιμώξεις που προκαλούνται από *Staphylococcus aureus* (Zaenglein et al., 2016).

Στην ενότητα που ακολουθεί θα αναπτυχθεί πιο διεξοδικά το θέμα του δερματικού μικροβιώματος. Το μικροβίωμα αποτελεί τον παράγοντα παθογένειας της ακμής στον οποίο επικεντρώνονται οι πιο σύγχρονες έρευνες και ανοίγει νέες, πολλά υποσχόμενες διόδους για την καλύτερη κατανόηση και θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου.

2.6 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ

2.6.1 Μικροβίωμα δέρματος

Το δέρμα, όπως και άλλοι ιστοί του σώματος, αποικίζεται από μια πυκνή κοινότητα συμβιωτικών μικροοργανισμών. Το μικροβιώμα, δηλαδή η σύνθετη κοινότητα βακτηρίων, ιών και μυκήτων, εντοπίζεται σε όλες τις επιθηλιακές επιφάνειες και προσδίδει μοναδικές λειτουργίες στο δέρμα. Αυτή η συμβιωτική σχέση μεταξύ του δέρματος και της μικροβιακής κοινότητας, αποτελεί ισχυρό φραγμό έναντι εξωτερικών προσβολών, με διαφορές να σημειώνονται μεταξύ του μικροβιώματος της επιφάνειας του δέρματος και των εξαρτημάτων του (Dreno, 2017).

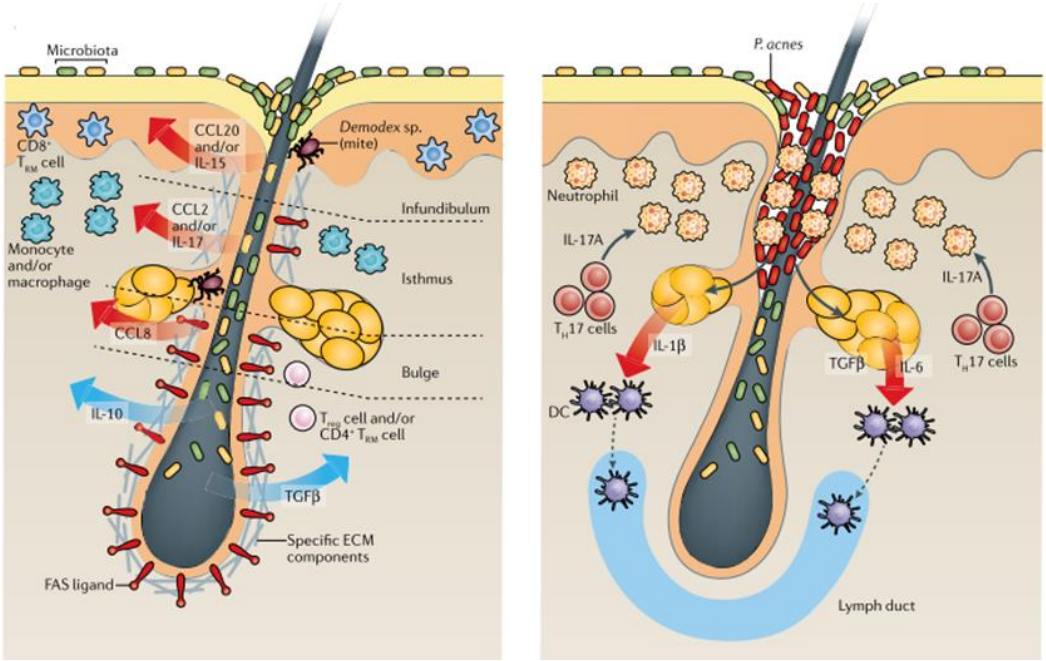


Εικόνα 8 Διάφορες οικοθέσεις των μικροοργανισμών του δέρματος (Byrd et al., 2018).

Σε σύγκριση με το πλουσιότερο περιβάλλον του εντέρου, το δέρμα στερείται πολλών θρεπτικών συστατικών πέρα από τις βασικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Για να επιβιώσουν σε ένα τέτοιο κρύο, όξινο και αποξηραμένο περιβάλλον, οι μικροοργανισμοί του δέρματος πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να αξιοποιούν τους πόρους που υπάρχουν στον ιδρώτα, το σμήγμα και την κεράτινη στιβάδα (Εικόνα 8).

Μελέτες αλληλούχησης σε δέρμα υγιών ενηλίκων καταδεικνύουν πως η σύνθεση του μικροβιώματος εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και τη χημική σύνθεση των διαθέσιμων οικοθέσεων. Ενώ τα βακτήρια του δέρματος ανήκουν σε τέσσερα μόνο φύλα (Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes και Bacteroidetes), ανάλογα με την τοπογραφία του δέρματος και την ξεχωριστή χημική σύνθεση του σημείου αλλά και του ατόμου, η σύνθεση και η ποικιλία των μόνιμων αυτών συμβιωτών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά.

Μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του συμβιωτικού μικροβιώματος φαίνεται να υπάρχει μια σχέση "ανοχής", κατά την οποία συνυπάρχουν σε μια ισορροπία που ρυθμίζεται από τη σύσταση και την παθογονικότητα των μικροοργανισμών και την ανοσιακή κατάσταση του ξενιστή.



Εικόνα 9 Τριχικό θυλάκιο, μικροβίωμα και ανοσιακή απάντηση στην ακμή (Kabashima et al., 2018)

2.6.2 Το μικροβίωμα στην ακμή

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών του μικροβιώματος διαμορφώνουν τη μόνιμη μικροβιακή κοινότητα και αποτρέπουν τον αποικισμό από παθογόνα βακτηρία σε μια διαδικασία που ονομάζεται «αντίσταση αποικισμού». Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, τα βακτηρία που είναι συνήθως ευεργετικά για τους ξενιστές μπορούν να μετατραπούν σε παθογόνα.

Πολλές κοινές ασθένειες του δέρματος συνδέονται με αλλαγές στο μικροβίωμα, κατάσταση η οποία ορίζεται ως **δυσβίωση (dysbiosis)**. Η δυσβίωση προκαλείται συχνά από τα κοινά συμβιωτικά είδη και σχετίζεται με νόσους όπως η ακμή, η ατοπική δερματίτιδα και οι χρόνιες πληγές. Τόσο οι σπάνιες όσο και οι συνήθεις δερματικές διαταραχές πιστεύεται ότι έχουν υποκείμενες συνεισφορές τόσο από μεμονωμένα είδη όσο και από αλλοιώσεις στη μικροβιακή κοινότητα.

Στην ακμή, η δυσβίωση προκαλείται από την ποιοτική και ποσοτική μεταβολή του σμήγματος και την επικράτηση ενός τροποποιημένου προφίλ του *C. acnes*. Πιο συγκεκριμένα, στην ακμή οι μεταγονιδιωματικές αναλύσεις στο μικροβίωμα του θύλακα δείχνουν ότι η ισορροπία μεταξύ των ειδών, είναι εκείνη που οδηγεί από την υγιή κατάσταση στην ασθένεια. Παρατηρήθηκε πως όταν υπάρχουν λιγότερα μικροβιακά στοιχεία που συνδέονται με την ακμή- ή αντίστοιχα περισσότερα στοιχεία που σχετίζονται με την υγιή κατάσταση, ένα άτομο έχει υγιές δέρμα. Από την άλλη μεριά, όταν η ισορροπία μετατοπίζεται προς περισσότερα στοιχεία παθογένειας, επικρατεί η κατάσταση της ασθένειας (Fitz-Gibbon et al., 2013).

Αυτή η έννοια μιας διαταραγμένης ισορροπίας στα μεταγονιδιωματικά στοιχεία του μικροβιώματος που συμβάλλει στην ασθένεια και η δυνητική σοβαρότητα της ασθένειας είναι σε μεγάλο βαθμό διαφορετική από τον παραδοσιακό ορισμό των ασθενειών που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς. Οι ασθένειες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς συνδέονται τυπικά με την παρουσία ενός συγκεκριμένου είδους ή στελεχών, αγνοώντας τη μικροβιακή ομοιοστασία.

Η σύγχρονη άποψη ως προς τους μικροβιακούς παράγοντες της ακμής είναι ότι η παθογένεια δεν οφείλεται στην παρουσία ενός συγκεκριμένου είδους ή στελέχους, αλλά στην ισορροπία της συνολικής μικροβιακής κοινότητας, η οποία τελικά οδηγεί είτε στην υγεία του δέρματος ή στην ανάπτυξη της κοινής ακμής. Η απλή παρουσία ενός είδους ή στελέχους ή ενός γενετικού στοιχείου που συνδέεται με τη νόσο δεν μπορεί κατ’ ανάγκη να προκαλέσει τη νόσο (Barnard et al., 2016).

Η αποσαφήνιση του οικολογικού ρόλου των συμβιωτών του δέρματος μπορεί να θέσει τις βάσεις για μελλοντική ανάπτυξη εξατομικευμένων και στοχευμένων θεραπειών στη θεραπεία της ακμής. Πιο συγκεκριμένα, αν αποσαφηνιστούν οι σχέσεις ανταγωνισμού και συνέργειας που οδηγούν σε οικολογική ισορροπία, η διατήρηση της υγείας του δέρματος θα είναι εφικτή με τη συμπλήρωση συγκεκριμένων στελεχών/προβιοτικών ή και των μεταβολιτών τους.

2.6.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την κοινή ακμή

Μεταξύ των κοινών συμβιωτικών μικροοργανισμών που συνιστούν τη φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος, το *Cutibacterium acnes* είναι ένα βακτήριο που ανήκει στο φύλο Actinobacteria και εντοπίζεται βαθιά μέσα στον τριχοσμηγματογόνο θύλακα σε επαφή με τα κερατινοκύτταρα (Christensen and Brueggmann, 2014).

Αντίθετα, στην επιφάνεια του δέρματος τα προπιονιβακτήρια είναι λιγότερο αντιπροσωπευτικά (<2% όλων των βακτηρίων) με τους σταφυλόκοκκους, ιδιαιτέρως το *Staphylococcus epidermidis*, να συνιστούν περισσότερο από το 27% του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων (Dreno et al., 2017). Βακτήρια του είδους *C. acnes* έχουν εντοπισθεί επίσης σε άλλους ιστούς όπως το έντερο, το στομάχι, τους πνεύμονες, το στόμα, τον επιπεφυκότα, τον προστάτη και την ουροφόρο οδό (Delgado et al., 2011; Fehri et al., 2011).

Ειδικά μεταβολικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν στο *C. acnes* να αποικίσει το ξεχωριστό περιβάλλον των τριχοθυλακίων και να προστατεύσει το δέρμα από άλλα επιβλαβή παθογόνα συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη διατήρηση της ισορροπίας του μικροβιώματος. Αν η ομοιοστασία αυτή διαταραχθεί, το *C. acnes* μπορεί από συμβιωτικός μικροοργανισμός να μετατραπεί σε δυνητικά παθογόνο.

Νέα ευρήματα ως προς την παθογονικότητα του *C. acnes* αποκαλύπτουν ότι αντίθετα με ό,τι θεωρήθηκε παλαιότερα, ο ίδιος ο πολλαπλασιασμός του δεν είναι η αιτία της ακμής. Αντίθετα, η στενή ισορροπία μεταξύ των μελών της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των διαφόρων φυλοτύπων *C. acnes* φαίνεται να διαδραματίζει έναν πιο κρίσιμο ρόλο στην έναρξη της νόσου (Beylot et al., 2014). Ακόμη, η απώλεια της μικροβιακής ποικιλότητας μπορεί πράγματι να οδηγήσει σε χρόνιες φλεγμονώδεις δερματικές παθήσεις.

2.6.4 Φλεγμονή

Το βακτήριο *C. acnes* εκκρίνει λιπάσες, χημειοτακτικούς παράγοντες, μεταλλοπρωτεάσες και πορφυρίνες. Όλες αυτές οι ουσίες αλληλεπιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου και ελεύθερες ρίζες, προκαλώντας βλάβη στα κερατινοκύτταρα.

Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η έκφραση του TLR-2 αυξάνει με τη σοβαρότητα της νόσου και ότι οι κυτοκίνες παράγονται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του *C. acnes* και των TLR-2, ντεφενσινών και των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος μέσω ενεργοποίησης του PAR-2R μονοπατιού.

2.6.5 Βιοϋμένιο

Στο παρελθόν, η μελέτη της συσχέτισης μεταξύ του *C. acnes* και της κοινής ακμής βασίστηκε στις καλλιέργειες. Τέτοιες μελέτες κατέδειξαν την ικανότητα του *C. acnes* να σχηματίζει βιοϋμένιο, όμως η κλινική σημασία αυτών τω παρατηρήσεων ήταν δύσκολο να εξακριβωθεί (Coenye et al., 2007). Μόνο πρόσφατα οι ερευνητές ανέπτυξαν τα κατάλληλα εργαλεία για να αποκαλύψουν τη σχέση μεταξύ αυτού του μικροοργανισμού και του ανθρώπου, in vivo.

Τα *C. acnes* είναι σε θέση να δημιουργήσουν ένα βιοϋμένιο κατασκευασμένο από εξωκυττάριους πολυσακχαρίτες. Αυτή η βιολογική κόλλα αυξάνει την προσκόλληση του *C. acnes* στα τοιχώματα της τριχοσμηγματογόνου μονάδας, ευνοώντας το σχηματισμό ιντεγκρινών. Επιπλέον, ρυθμίζει την

ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των βακτηρίων, προκαλεί την ανάπτυξη αποικιών *C. acnes* και προσδίδει στο βακτήριο αντοχή ενάντια σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και φλεγμονώδη στοιχεία του ξενιστή (Alexeyev and Jahns, 2012).

2.7 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

2.7.1 Τοπικές θεραπείες

Τα σκευάσματα για την τοπική αντιμετώπιση της κοινής ακμής που έχουν την έγκριση του Food and Drug Administration (FDA) και διαθέτουν καλά τεκμηριωμένες μελέτες στη βιβλιογραφία είναι τα: **υπεροξείδιο του βενζολίου**, **αντιβιοτικά**, **ρετινοειδή** (καθώς και συνδυασμοί δύο εκ των τριών παραπάνω), **σαλικυλικό οξύ**, **αζελαϊκό οξύ** και σουλφονικά παράγωγα όπως η **δαψόνη**.

Οι θεραπευτικοί αυτοί παράγοντες είναι διαθέσιμοι σε συνταγογραφούμενα ή μη σκευάσματα. Η επιλογή του κατάλληλου παράγοντα εξαρτάται από την ηλικία, την πάσχουσα περιοχή, την έκταση και τη σοβαρότητα των βλαβών καθώς και την προτίμηση του ασθενούς. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τις τοπικές ή συστηματικές θεραπείες, τόσο για τον αρχικό περιορισμό της νόσου όσο και μετέπειτα, ως θεραπεία συντήρησης (Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.1 Υπεροξείδιο του βενζολίου (Benzoyl Peroxide, BP)

Το υπεροξείδιο του βενζολίου έχει αντιβακτηριακή δράση ενάντια στο *C. acnes*, και συγκεκριμένα βακτηριοκτόνο, μέσω της τοπικής απελευθέρωσης δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη αντοχής. Επιπλέον, έχει ήπια φαγεσωρολυτική δράση (Fulton et al., 1974).

Χρησιμοποιείται σε τοπικά σκευάσματα εκπλενόμενα και μη (καθαριστικά, αφρούς, κρέμες, γέλες) σε συγκεντρώσεις από 2.5% έως 10%. Σε περιπτώσεις ήπιας ακμής, χρησιμοποιείται είτε ως μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με τοπικά αντιβιοτικά (κυρίως ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη). Για τη μέτρια έως σοβαρή ακμή συνδυάζεται με συστηματικά αντιβιοτικά και τοπικά ρετινοειδή. Ο συνδυασμός με τα αντιβιοτικά έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα και μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη αντοχής (Zaenglein et al., 2016).

Η κυριότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι ο τοπικός ερεθισμός, ο οποίος εξαρτάται από την περιεκτικότητα του σκευάσματος. Η θεραπεία μπορεί να γίνει καλύτερα ανεκτή χρησιμοποιώντας είτε σκευάσματα με μικρότερη περιεκτικότητα σε υπεροξείδιο του βενζολίου, είτε σκευάσματα βασισμένα στο νερό, είτε εκπλενόμενα σκευάσματα (Fyrand and Bang Jakobsen, 1986; Mills et al., 1986).

2.7.1.2 Αντιβιοτικά (Topical Antibiotics)

Τα τοπικά αντιβιοτικά συσσωρεύονται στους τριχοσμηγματογόνους θήλακες, και ασκούν δράση κυρίως αντιβακτηριακή (με διάφορους μηχανισμούς). Κάποιες κατηγορίες αντιβιοτικών εμφανίζουν και ήπια αντιφλεγμονώδη δράση (Jr et al., 2002).

Η χρήση τους ως μονοθεραπεία αντενδείκνυται λόγω του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός τους με υπεροξείδιο του βενζολίου ενισχύει την αποτελεσματικότητα τους και περιορίζει την ανάπτυξη αντοχής. Διατίθενται και συνδυαστικά σκευάσματα τα οποία είναι σταθερά και βοηθούν στην καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών (Zaenglein et al., 2016).

Το προτιμώμενο σκεύασμα είναι **κλινδαμυκίνη** σε διάλυμα ή γέλη 1%. Είναι επίσης διαθέσιμα σκευάσματα με **ερυθρομυκίνη** 2% (κρέμες, γέλες, λοσιόν, γάζες-επιθέματα), είναι όμως λιγότερο αποτελεσματικά λόγω ευκολότερης ανάπτυξης αντοχής από τους μικροοργανισμούς του δέρματος (*Staphylococcus* sp., *Cutibacterium acnes*) (Jr et al., 2002).

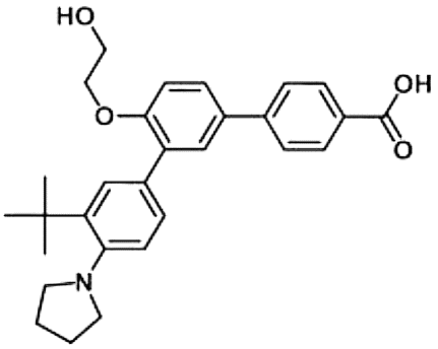
Τα τοπικά αντιβιοτικά είναι σε γενικές γραμμές πολύ καλά ανεκτά. Υπάρχει μικρή πιθανότητα πρόκλησης διάρροιας ή κολίτιδας που σχετίζεται με το *Clostridium difficile*, από τη χρήση τοπικών σκευασμάτων κλινδαμυκίνης (Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.3 Ρετινοειδή (Retinoids)

Πρόκειται για συνταγογραφούμενα φάρμακα, παράγωγα της βιταμίνης Α (ρετινόλης). Η χρήση τους στην ακμή υποστηρίζεται από πολλές διπλές τυφλές κλινικές μελέτες. Τα τρία κυρίως χρησιμοποιούμενα είναι η **τρετινοΐνη (tretinoin)**, η **αδαπαλένη (adapalene)** και η **ταζαροτένη (tazarotene)** (Cunliffe et al., 1997; Lucky et al., 1998; Shalita et al., 1996).

Αποτελούν τον πυρήνα της θεραπευτικής αντιμετώπισης της ακμής, αφού επιδρούν σε πολλούς από τους παράγοντες που συμβάλουν στην παθογένεια της νόσου. Έχουν φαγεσωρολυτική δράση, καθώς και δράση επί των μικροφαγεσώρων, που αποτελούν την πιο πρώιμη εκδήλωση της ακμής. Είναι επομένως ιδανικά για την ακμή που χαρακτηρίζονται από φαγέσωρες. Επιπλέον, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση. Τα ρετινοειδή ενισχύουν κάθε θεραπευτικό σχήμα για την αντιμετώπιση της ακμής και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συντήρηση μετά τη διακοπή της συστηματικής θεραπείας. Οι συνδυασμοί τους με υπεροξείδιο του βενζολίου ή αντιβιοτικά συνιστούν θεραπευτικές επιλογές για οποιαδήποτε μορφή ακμής (Dréno et al., 2014; Zaenglein et al., 2016).

Ένα νέο ρετινοειδές, η **τριφαροτένη/CD5789** (**trifarotene**) (Εικόνα 10), σχεδιάστηκε ορθολογικά ώστε να στοχεύει εκλεκτικά στον υποτύπο γ του υποδοχέα ρετινοειδών RAR που είναι και ο πιο διαδεδομένος στο δέρμα. Δύο μεγάλου εύρους (N=1208, N=1212) κλινικές μελέτες φάσης 3 (#NCT02566369, #NCT02556788, www.clinicaltrials.gov), με τυχαιοποιημένο, διπλό τυφλό σχεδιασμό, διάρκειας 12 εβδομάδων, απέδειξαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα κρέμας με 50 μg/g τριφαροτένης, σε άτομα άνω των 9 ετών με ακμή μετρίου βαθμού στο πρόσωπο και στον κορμό (Tan et al., 2019; Thoreau et al., 2018).



Εικόνα 10 Χημική δομή της τριφαροτένης (Thoreau et al., 2018).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται κατά τη χρήση τοπικών ρετινοειδών είναι εντοπισμένες στην περιοχή εφαρμογής και περιλαμβάνουν ξηρότητα, απολέπιση, ερύθημα και ερεθισμό. Μπορούν να περιοριστούν με ελάττωση της συχνότητας χορήγησης. Σκευάσματα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχουν αυξημένη αποτελεσματικότητα, αλλά και αυξημένη βαρύτητα των ανεπιθύμητων ενεργειών.

Τέλος, αξίζει να γίνει αναφορά στην τερατογόνο δράση των ρετινοειδών, που είναι κυρίως γνωστή από την συστηματικώς χορηγούμενη ισοτρετινοΐνη. Η τρετινοΐνη και η αδαπαλένη ανήκουν στην κατηγορία C (μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει κάποια τερατογόνο δράση άλλα τα οφέλη μπορεί να υπερτερούν των κινδύνων σε ορισμένες περιπτώσεις) και το ταζαροτένιο στην κατηγορία X (μελέτες σε πειραματόζωα ή ανθρώπους έχουν δείξει τερατογόνο δράση και ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος από τα οφέλη) σχετικά με τη χορήγηση τους κατά την εγκυμοσύνη. Θα πρέπει επομένως να ενημερώνονται οι γυναίκες που είναι ή σκοπεύουν να μείνουν έγκυοι για τους πιθανούς κινδύνους από τη χρήση αυτών των φαρμάκων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.4 Αζελαϊκό οξύ (Azelaic Acid)

Πρόκειται για έναν αρκετά αποτελεσματικό παράγοντα κατά της ακμής. Έχει δράση φαγεσωρολυτική, αντιβακτηριακή και αντιφλεγμονώδη. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε ασθενείς με ευαίσθητο δέρμα και σε φωτότυπους από IV και πάνω κατά την κλίμακα Fitzpatrick, καθώς έχει λευκαντική δράση στις δυσχρωμίες που προκαλούνται από τις ακνεϊκές βλάβες. Χρησιμοποιείται σε περιεκτικότητα 20% (Katsambas et al., 1989; Kircik, 2011; Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.5 Δαψόνη (Dapsone)

Είναι σουλφονικό παράγωγο που έχει δείξει σχετική αποτελεσματικότητα σε κάποιες κλινικές μελέτες για την ακμή, μέσω αντιφλεγμονώδους δράσης. Ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι πλήρως κατανοητός και η επίδρασή του στο *C. acnes* δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένη. Φαίνεται να είναι περισσότερο ωφέλιμο στις γυναίκες παρά στους άνδρες (Draelos et al., 2007; Tanghetti et al., 2012; Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.6 Σαλικυλικό οξύ (Salicylic Acid)

Είναι ένα β-υδροξυ-οξύ (Beta Hydroxy-Acid, BHA) που είναι αποτελεσματικό στην ακμή λόγω της φαγεσωρολυτικής, κερατολυτικής του δράσης. Διαθέτει περιορισμένο αριθμό κλινικών μελετών. Διατίθεται σε μη συνταγογραφούμενα προϊόντα σε περιεκτικότητα από 0.5% έως 2%, και είναι καλά ανεκτό σε εκπλενόμενα και μη σκευάσματα (Zaenglein et al., 2016).

2.7.1.7 Άλλοι παράγοντες κατά της ακμής

Το **θείο (Sulfur)** και η **ρεσορκινόλη (Resorcinol)**, αν και χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια στην αντιμετώπιση της ακμής, υπάρχει έλλειψη τεκμηρίων σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους (Zaenglein et al., 2016).

Ο **ψευδάργυρος (Zinc)**, χορηγούμενος τοπικά ως μονοθεραπεία, δεν βρέθηκε αποτελεσματικός (Bojar et al., 1994; J. Stainforth et al., 1993).

Το **νικοτιναμίδιο (Niacinamide)** είναι η αμιδική μορφή της βιταμίνης Β3 (νιασίνη ή νικοτινικό οξύ). Είναι διαθέσιμο σε μη συνταγογραφούμενα προϊόντα με τη μορφή γέλης 2% έως 4%. Κάποιες μελέτες έδειξαν αποτελεσματικότητα παρόμοια με τοπική κλινδαμυκίνη σε γέλη 1% (Khodaeiani et al., 2013; Shalita et al., 1995).Συστηματικές θεραπείες

2.7.2 Συστηματικές θεραπείες

2.7.2.1 Αντιβιοτικά (Oral Antibiotics)

Τα από του στόματος χορηγούμενα αντιβιοτικά αποτελούν μια θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση της ακμής που έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον, ιδιαίτερα σε μέτριες έως σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου. Ωστόσο, είναι γνωστό πλέον ότι η χρήση τους ως μονοθεραπεία θα πρέπει να αποφεύγεται λόγω του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τους μικροοργανισμούς. Συνιστάται λοιπόν η συγχορήγησή τους με τοπικά ρετινοειδή ή/και με υπεροξείδιο του βενζολίου. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε θεραπευτικό σχήμα συντήρησης μετά τη διακοπή της συστηματικής αντιβιοτικής θεραπείας (Gold et al., 2010; Poulin et al., 2011; Thiboutot et al., 2006).

Η ανάπτυξη ανθεκτικών μικροοργανισμών από τη λανθασμένη χρήση συστηματικών αντιβιοτικών αποτελεί καίριο πρόβλημα. Το Centers for Disease Control and Prevention (CDC) επισημαίνει την αναγκαιότητα να τηρείται η αντιμικροβιακή επιστασία (antimicrobial stewardship), δηλαδή να χορηγείται το κατάλληλο αντιβιοτικό, στη σωστή δόση και χρονική στιγμή και για τη μικρότερη δυνατή διάρκεια. Ο περιορισμός της ανάπτυξης αντοχής μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλα δοσολογικά σχήματα (χορήγηση κατά ώσεις ή σε υποαντιμικροβιακές δόσεις). Η συγχορήγηση τοπικών παραγόντων για την ακμή μπορεί να βοηθήσει στην ελάττωση της διάρκειας της αντιβιοτικής θεραπείας (Gold et al., 2010; Thiboutot et al., 2006; Zaenglein et al., 2016).

Στη συνέχεια θα αναφερθούν οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες κατηγορίες αντιβιοτικών που χορηγούνται συστηματικά στην ακμή και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους.

Οι **τετρακυκλίνες** (**tetracyclines**) και συγκεκριμένα η **δοξυκλίνη** (**doxycycline**), η **μινοκυκλίνη** (**minocycline**), η **τετρακυκλίνη** (**tetracycline**) και το νεότερο φάρμακο **σαρεκυκλίνη** (**sarecycline**) (που εγκρίθηκε από τον FDA το 2018), αποτελούν αντιβιοτικά πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της μέτριας έως σοβαρής ακμής (Deeks, 2019).

Δρουν αντιμικροβιακά μέσω αναστολής της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης, αφού δεσμεύουν την 30S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος. Εμφανίζουν επίσης ήπια αντιφλεγμονώδη δράση μέσω αναστολής της χημειοταξίας και περιορίζοντας τη δραστηριότητα των μεταλλοπρωτεϊνασών (metalloproteinases, MPs) (Zaenglein et al., 2016).

Αναφορικά με τις ανεπιθύμητες ενέργειές τους, μπορεί να προκαλέσουν φωτοευαισθησία και γαστρεντερικές διαταραχές (περισσότερο η δοξυκυκλίνη παρά η μινοκυκλίνη). Ωστόσο, περισσότερες αλλά και πιο σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες έχουν παρατηρηθεί με τη μινοκυκλίνη: εμβοές, ίλιγγος, χρωματισμός του δέρματος, των βλεννογόνων και των δοντιών, αλλά και σπανιότερες όπως DRESS (Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms), φαρμακευτικός λύκος (drug induced lupus), ψευδοόγκο εγκεφάλου (pseudotumor cerebri) και αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Garner et al., 2011; Lebrun-Vignes et al., 2012).

Τα **μακρολίδια** (**macrolides**) που χρησιμοποιούνται στην ακμή είναι η **ερυθρομυκίνη** (**erythromycin**) και η **αζιθρομυκίνη** (**azithromycin**). Ο μηχανισμός δράσης τους είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω πρόσδεσης στην 50S υπομονάδας του βακτηριακού ριβοσώματος. Έχουν επίσης κάποιες αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, χωρίς να είναι κατανοητός ο μηχανισμός. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούν περιλαμβάνονται γαστρεντερικές διαταραχές (κυρίως η ερυθρομυκίνη), διαταραχές στην καρδιακή αγωγιμότητα, ηπατοτοξικότητα (σπάνια) και δερματικές εκδηλώσεις υπερευαισθησίας (η αζιθρομυκίνη).

Η **τριμεθοπρίμη** (**trimethoprim**) χρησιμοποιείται στην ακμή είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με τη **σουλφαμεθοξαζόλη** (**sulfamethoxazole**). Δρούν συνεργιστικά περιορίζοντας την παραγωγή φολικού οξέος από τους μικροοργανισμούς και εμποδίζουν έτσι τη σύνθεση νουκλεοτιδίων και αμινοξέων.

Τέλος, αν και υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για τη χρήση τους στην ακμή (κυρίως case reports), οι **πενικιλλίνες** (**penicillins**) και οι **κεφαλοσπορίνες** (**cephalosporins**) αποτελούν χρήσιμες εναλλακτικές σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης ή αν υπάρχουν αλλεργίες στις υπόλοιπες κατηγορίες αντιβιοτικών. Δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Zaenglein et al., 2016).

2.7.2.2 Ορμονική θεραπεία (hormonal agents)

Τα **συνδυαστικά αντισυλληπτικά** φάρμακα (**combined oral contraceptives, COCs**) περιέχουν συνδυασμό ενός οιστρογόνου με ένα προγεστογόνο. Η αντιανδρογόνος δράση τους μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση της ακμής και αποτελούν μια θεραπευτική επιλογή για τις γυναίκες που επιθυμούν ταυτόχρονα και αντισύλληψη. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ελάττωσης της παραγωγής

ανδρογόνων από τις ωοθήκες αλλά και μέσω αύξησης της δεσμευτικής σφαιρίνης των φυλετικών ορμονών (sex hormone-binding globulin) που εμποδίζει την ελεύθερη τεστοστερόνη (testosterone) να προσδεθεί στον υποδοχέα των ανδρογόνων. Επιπλέον μηχανισμοί είναι η ελάττωση της δραστικότητας του ενζύμου 5^{α}-αναγωγάση (5a-reductase) που μετατρέπει την τεστοστερόνη στην ενεργό της μορφή διυδροτεστοστερόνη (dihydrotestosterone, DHT), καθώς και η πρόσδεση στον ανδρογονικό υποδοχέα (Arowojolu et al., 2011; Arrington et al., 2012; Harper, 2009; Rabe et al., 2000; Zaenglein et al., 2016).

Η χρήση τους συνιστάται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις γυναικών όπου υπάρχουν στοιχεία ορμονικής αιτιολογίας της ακμής, όπως βλάβες εντοπισμένες στο πιγούνι και στο λαιμό, δασυτριχισμός και επιδείνωση των συμπτωμάτων πριν την έμμηνο ρύση, χωρίς όμως να περιορίζεται σε αυτές. Αν και οι γυναίκες με κλινικά συμπτώματα και εργαστηριακά στοιχεία υπερανδρογονισμού έχουν μεγαλύτερο όφελος από τη χορήγηση συνδυαστικών αντισυλληπτικών, τα φάρμακα αυτά μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα και σε περιπτώσεις γυναικών που δεν έχουν αυτή την εικόνα (Zaenglein et al., 2016).

Επί του παρόντος, έχουν πάρει έγκριση από τον FDA για χρήση στην ακμή τέσσερα συνδυαστικά αντισυλληπτικά:

- εθινυλοιστραδιόλη/νοργεστιμάτη
- εθινυλοιστραδιόλη/οξική νορεθινδρόνη/φουμαρικός σίδηρος (ferrous fumarate)
- εθινυλοιστραδιόλη/δροσπιρενόνη
- εθινυλοιστραδιόλη/δροσπιρενόνη/λεβομεθυλοφολικό οξύ (levomefolate)

Διάφορες τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα των συνδυαστικών αντισυλληπτικών στην αντιμετώπιση της ακμής, αφού προκαλούν ελάττωση στον αριθμό τόσο των φαγεσώρων όσο και των φλεγμονωδών βλαβών. Χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλους αντιακνεϊκούς παράγοντες. Η βελτίωση της νόσου επέρχεται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (Maloney et al., 2008; Plewig et al., 2009; Zaenglein et al., 2016).

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνονται κυρίως διαταραχές του καρδιαγγειακού συστήματος, όπως αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης, εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς και ισχαιμικού και αιμορραγικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Υπάρχει πιθανώς συσχέτιση των αντισυλληπτικών με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και του τραχήλου σε κάποιες γυναίκες. Τέλος, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται στην εφηβεία, μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην οστική μάζα. Πρέπει επομένως να γίνεται σωστή επιλογή των ασθενών με ακμή που μπορούν να επωφεληθούν από τη θεραπεία με συνδυαστικά αντισυλληπτικά (λήψη λεπτομερούς ιστορικού, καρδιαγγειακός έλεγχος) (Stewart et al., 2001; Zaenglein et al., 2016).

Ένα άλλο φάρμακο που μπορεί να είναι χρήσιμο στην ακμή επειδή δρα στο ενδοκρινικό σύστημα είναι η **σπιρονολακτόνη** (**spironolactone**). Πρόκειται για ανταγωνιστή της αλδοστερόνης που ασκεί ισχυρή αντιανδρογόνο δράση μέσω ελάττωσης της παραγωγής τεστοστερόνης και μέσω ανταγωνισμού της

τεστοστερόνης και της διυδροστερόνης για την πρόσδεση στον ανδρογονικό υποδοχέα. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί δράσης είναι η αναστολή της 5^{α}-αναγωγάσης και η επαγωγή της δεσμευτικής σφαιρίνης των φυλετικών ορμονών (Boisselle et al., 1979; Menard et al., 1974; Serafini et al., 1985; Zouboulis et al., 1994).

Αν και η σπιρονολακτόνη έχει δείξει κάποια αποτελεσματικότητα σε μελέτες που έχουν γίνει για τη χρήση της στην ακμή, δεν έχει λάβει έγκριση από τον FDA για αυτή την ένδειξη, καθώς τα τεκμήρια που υπάρχουν δε θεωρούνται επαρκή (Brown et al., 2009; Shaw and White, 2002; Zaenglein et al., 2016).

Η **φλουταμίδη** (**flutamide**) είναι εκλεκτικός αποκλειστής του ανδρογονικού υποδοχέα, μη στεροειδικής δομής, που συνήθως χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη. Δεν έχει έγκριση από τον FDA για χρήση στην ακμή, όμως έχει βρεθεί αποτελεσματικό σε κάποιες κλινικές μελέτες. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών, όπως διαταραχές του γαστρεντερικού, κεφαλαλγία, εξάψεις, ξηροδερμία και μειωμένη libido, κάνουν δύσκολη τη συμμόρφωση των ασθενών. Τέλος, σημαντικότερος όλων είναι ο κίνδυνος κεραυνοβόλου ηπατίτιδας (idiosyncratic fatal hepatotoxicity) που φαίνεται να εξαρτάται από την ηλικία και από τη δόση (Adalatkhah, 2011; Calaf et al., 2007; Carmina and Lobo, 2002; Castelo-Branco et al., 2009; Cusan et al., 1990; Müderris et al., 2000; Wysowski et al., 1993; Zaenglein et al., 2016).

2.7.2.3 Ισοτρετινοΐνη (isotretinoin)

Είναι ισομερές του ρετινοϊκού οξέος (13-cis-retinoic acid) που έχει έγκριση από τον FDA για χρήση σε σοβαρές εκδηλώσεις ακμής. Χρησιμοποιείται στις Η.Π.Α. για περισσότερα από 30 χρόνια και η χρήση του οδηγεί στις περισσότερες περιπτώσεις σε επιτυχή θεραπεία της νόσου, αφού ελαττώνει την παραγωγή σμήγματος και τον αριθμό των ακνεϊκών βλαβών και ουλών, καθώς και τις ψυχολογικές συννοσηρότητες όπως είναι οι αγχώδεις διαταραχές και η κατάθλιψη (Amichai et al., 2006; Chivot and Midoun, 1990; Goldstein et al., 1982; Jones et al., 1983; King et al., 1982; Layton et al., 1993; Lehucher-Ceyrac and Weber-Buisset, 1993; Lester et al., 1985; Peck et al., 1982; Rubinow et al., 1987; J. M. Stainforth et al., 1993; Strauss et al., 2001; Strauss and Stranieri, 1982; Zaenglein et al., 2016).

Η ισοτρετινοΐνη έχει φανεί επίσης αποτελεσματική σε μέτρια ακμή που δεν ανταποκρίνεται στην αντιβιοτική θεραπεία ή υποτροπιάζει μετά τη διακοπή της. Ενδείκνυται σε περιπτώσεις μέτριας ακμής ανθεκτικής στη θεραπεία, ή/και η οποία προκαλεί ουλές ή σοβαρή ψυχολογική κατάπτωση (Akman et al., 2007; Borghi et al., 2011; Choi et al., 2011; Kaymak and İlter, 2006; Zaenglein et al., 2016).

Ο μηχανισμός δράσης είναι μέσω των πυρηνικών υποδοχέων RAR και RXR. Η ισοτρετινοΐνη όμως είναι το μοναδικό φάρμακο για την ακμή το οποίο δρα και στους τέσσερεις άξονες παθογένειας της νόσου.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση της ισοτρετινοΐνης είναι καλά καταγεγραμμένες, αφού αποτελούν ένα θέμα που έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους ασθενείς και την ιατρική κοινότητα. Συχνότερα εμφανίζονται συμπτώματα στους βλεννογόνους, στο μυοσκελετικό σύστημα και στους οφθαλμούς, τα οποία ομοιάζουν με αυτά της υπερβιταμίνωσης Α. Αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες χορήγησης είναι προσωρινά και υποχωρούν μετά τη διακοπή του φαρμάκου.

Πιθανή συσχέτιση της ισοτρετινοΐνης, που δεν έχει αποδειχθεί σε όλες τις περιπτώσεις, υπάρχει και με διάφορες σοβαρότερες καταστάσεις, της φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, άγχος-κατάθλιψη-αλλαγές στη διάθεση, διαταραχές του καρδιαγγειακού συστήματος, ασβεστοποίηση των οστών, ουλές και αποικισμός από *Staphylococcus aureus*.Αναφορικά με τις δύο πρώτες, η επιτροπή θεωρεί ότι δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία ώστε να αποδεικνύεται θετική συσχέτιση. Κάποιοι εργαστηριακοί δείκτες, όπως η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια ορού και οι ηπατικές τρανσαμινάσες, μπορεί να αυξηθούν κατά τη θεραπεία. Κρίνεται επομένως ωφέλιμο οι εξετάσεις αυτές να γίνονται ως έλεγχοι ρουτίνας (Zaenglein et al., 2016).

Τέλος, η τερατογόνος δράση του φαρμάκου είναι γνωστή από όταν κυκλοφόρησε για πρώτη φορά στην Αμερική το 1982. Απαιτείται λοιπόν από τον FDA, συμμετοχή από άνδρες και γυναίκες που λαμβάνουν ισοτρετινοΐνη και συμμόρφωση με το πρόγραμμα προστασίας iPLEDGE, το οποίο πλέον βρίσκεται στην Τρίτη του υλοποίηση. Παρόλα αυτά, τα περιστατικά τερατογένεσης δεν έχουν ελαττωθεί σημαντικά από την εκκίνηση του προγράμματος, αφού πολλοί ασθενείς δε συμμορφώνονται με την αποχή από τις ερωτικές επαφές και τη χρήση δύο μεθόδων αντισύλληψης. Πρέπει λοιπόν κάθε γυναίκα που λαμβάνει τη θεραπεία και μπορεί εν δυνάμει να συλλάβει, να ενημερώνεται για τις διαθέσιμες μεθόδους αντισύλληψης, καθώς και για τις απαιτήσεις του προγράμματος iPLEDGE, σε κάθε επίσκεψη στο θεράποντα ιατρό (Collins et al., 2014; Dai et al., 1992; Shin et al., 2011; Zaenglein et al., 2016).

2.7.3 Μηχανικές θεραπείες

2.7.3.1 Μηχανική εξαγωγή φαγεσώρων (comedone extraction) και μικροαπόξυση του δέρματος (microdermabrasion)

Αν και η μηχανική διάρρηξη και εξαγωγή των φαγεσώρων είναι μια πρακτική που ακολουθείται εδώ και πολλά χρόνια, η βιβλιογραφία που υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα της είναι αρκετά περιορισμένη. Η μέθοδος αυτή μπορεί να έχει όφελος σε βλάβες που δεν ανταποκρίνονται στις υπόλοιπες θεραπείες (Zaenglein et al., 2016).

Όσον αφορά τη μικροαπόξυση (απολέπιση με τη χρήση μικροκρυστάλλων), επίσης δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες που να αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της στην αντιμετώπιση της ακμής (Moradi Tuchayi et al., 2015).

2.7.3.2 Χημική απολέπιση (chemical peeling)

Δεν έχουν γίνει διπλές τυφλές κλινικές μελέτες με μεγάλο δείγμα για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των χημικών peeling με ***α*- και *β*-υδροξυ-οξέα(*α*-hydroxy-acids, AHAs & *β*-hydroxy-acids, BHAs**). Επιπλέον, απαιτούνται πολλές θεραπείες και τα όποια αποτελέσματα είναι σχετικά παροδικά. Μερικές μελέτες έχουν γίνει για το AHA **γλυκολικό οξύ** (**glycolic acid**) και το BHA **σαλικυλικό οξύ** (**salicylic acid**) που έχουν δείξει κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τα χημικά peeling μπορεί να προκαλέσουν ήπια βελτίωση στη φαγεσωρική ακμή (Atzori et al., 1999; Dréno et al., 2011; Levesque et al., 2011; Zaenglein et al., 2016).

2.7.4 Φωτοθεραπεία (light therapy)

Η χρήση συσκευών laser και φωτός στην αντιμετώπιση της ακμής έχει δείξει αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα. Κρίνεται λοιπόν μια θεραπευτική επιλογή που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, αλλά ακόμα απαιτούνται πολλές μελέτες. Οι μέθοδοι φωτοθεραπείας που έχουν μελετηθεί είναι τα **laser** διαφόρων ειδών, οι **ραδιοσυχνότητες**, το **έντονο παλμικό φως** (**intense pulsed light, IPL**), η **φωτοπνευματική θεραπεία** (**photopneumatic therapy**) και η **φωτοδυναμική θεραπεία** (**photodynamic therapy**). Περισσότερα στοιχεία υπάρχουν για τη φωτοδυναμική θεραπεία. Σε αυτήν, χορηγείται στον ασθενή ένας φωτοευαισθητοποιητής (photosensitizer) που απορροφάται από τις τριχοσμηγματογόνους μονάδες και ιδιαίτερα από τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων. Στη συνέχεια αυτός ενεργοποιείται από κάποια πηγή φωτός και παράγονται δραστικές μορφές οξυγόνου που προκαλούν βλάβη στους σμηγματογόνους αδένες και ελαττώνουν τον πληθυσμό του *C. acnes* (Pollock et al., 2004; Wang et al., 2010; Zaenglein et al., 2016).

2.7.5 Σχεδιασμός & ανάπτυξη νέων φαρμάκων

Η τεράστια επίπτωση της ακμής στον παγκόσμιο πληθυσμό δημιουργεί την ανάγκη για πιο αποτελεσματικά και καλύτερα ανεκτά φάρμακα. Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι περιορισμένη λόγω της ιδιαίτερης πολυπλοκότητας που χαρακτηρίζει την παθογένεια της νόσου. Αν και έχει γίνει πρόοδος στην κατανόηση των μηχανισμών που τη διέπουν, καθώς και των μηχανισμών δράσεως των διαθέσιμων φαρμάκων, υπάρχουν ακόμα πολλά αναπάντητα ερωτήματα.

Οι νεότερες εξελίξεις στη θεραπευτική αντιμετώπιση της ακμής περιλαμβάνουν νέες μορφές χορήγησης και απόδοσης των φαρμάκων, τροποποιήσεις στους ήδη υπάρχοντες θεραπευτικούς παράγοντες, αλλά και νέες θεραπείες, που έχουν ως στόχο τα ρυθμιστικά μονοπάτια της παθοφυσιολογίας της νόσου και όχι τη συμπτωματική αντιμετώπιση των τελικών αποτελεσμάτων αυτών των μονοπατιών (Moradi Tuchayi et al., 2015).

Συγκεκριμένα για τη θεραπευτική κατηγορία των αντιβιοτικών, η χρήση τους στην ακμή τα τελευταία χρόνια έχει φθίνει και αναμένεται να ελαττωθεί ακόμα περισσότερο, λόγω του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικότητας από τους μικροοργανισμούς. Τα αντιβιοτικά φάρμακα προβλέπεται να αντικατασταθούν από παράγοντες όπως δότες μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide, NO),

αντιμικροβιακά πεπτίδια (antimicrobial peptides, AMPs), προβιοτικά και παράγοντες καταστροφής βιοϋμενίων. Οι παράγοντες αυτοί ασκούν ρυθμιστική ή αντικροβιακή δράση στο *C. acnes*, χωρίς να επάγουν την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών (Valente Duarte De Sousa, 2019).

2.7.6 Φυσικά προϊόντα στην ακμή

Λίγα από τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κλασική θεραπευτική αντιμετώπιση της κοινής ακμής έχουν δράση σε πολλούς από τους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, και η χρήση τους συνδέεται με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά, οι δερματικές αντιδράσεις που προκαλούν τα τοπικά ρετινοειδή και οι πολυάριθμες συστηματικές παρενέργειες που προκαλεί η ισοτρετινοΐνη (Leyden, 1995; Yang et al., 2017).

Είναι λοιπόν επιτακτική η ανάγκη εύρεσης νέων θεραπευτικών επιλογών που θα είναι καλύτερα ανεκτές, δεδομένου της υψηλής συχνότητας εμφάνισης της ακμής και των βαρύτατων επιπτώσεων της στον ψυχισμό των ασθενών. Παρατηρείται έτσι μια στροφή προς τα φυσικά προϊόντα ως εναλλακτικές θεραπείες αλλά και ως υποψήφια πηγή εύρεσης νέων φαρμάκων, που συνάδει με τη γενικότερη τάση προς το "φυσικό" που επικρατεί την τελευταία 20ετία. Αυτό συμβαίνει και λόγω της αφθονίας τους αλλά κυρίως λόγω της αντίληψης ότι τα προϊόντα αυτά είναι ασφαλέστερα. Η αντίληψη αυτή, αν και δεν ισχύει πάντοτε στην πράξη, έχει παγιωθεί σημαντικά και επομένως τα φυσικά προϊόντα έχουν αρχίσει να απασχολούν και μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας.

Η χρήση των εναλλακτικών θεραπειών, ειδικά στην περίπτωση της ακμής, φαίνεται να αυξάνεται, ενώ ταυτόχρονα η ηλικία στην οποία γίνεται η πρώτη χρήση τέτοιων θεραπειών μικραίνει.

Ιδιαίτερα στα καλλυντικά προϊόντα, μεγάλο μέρος των οποίων στοχεύει επικουρικά στην αντιμετώπιση της ακμής, έχει αυξηθεί η χρήση φυτικών συστατικών. Αυτά χαίρουν μεγάλης δημοτικότητας, σε σχέση με τα ζωικά, η χρήση των οποίων τα τελευταία χρόνια έχει περιοριστεί λόγω περιστατικών όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών, και τα χημικά, που για την πλειονότητα του καταναλωτικού κοινού θεωρείται ότι ενέχουν μεγαλύτερη τοξικότητα και επικινδυνότητα.

Συγκεκριμένα για την περίπτωση των φυτικών εκχυλισμάτων, πολλές φορές η χρήση τους ως θεραπεία στηρίζεται μόνο σε δεδομένα παραδοσιακής ιατρικής, χωρίς περαιτέρω διερεύνηση των βιολογικών τους δράσεων και της καταλληλότητάς τους. Συχνά, δεν είναι καλά καθορισμένα ως προς τη μέθοδο εκχύλισης, την αναλογία των διαλυτών και τα δραστικά τους συστατικά (Aburjai and Natsheh, 2003).

Παρότι οι «φυσικές» εναλλακτικές για την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων επί του παρόντος είναι ευρέως αποδεκτές και χρησιμοποιούμενες από το κοινό, αντιμετωπίζονται από τη δερματολογική κοινότητα με επιφύλαξη, αφού γενικά δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες που να υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά τους (Aburjai and Natsheh, 2003).

Οι ήδη υπάρχουσες μελέτες που διερευνούν την αποτελεσματικότητα των εναλλακτικών θεραπειών στην ακμή, συχνά πάσχουν από μεθοδολογικά προβλήματα. Η έρευνα σε αυτό το πεδίο αρκετές φορές

στερείται επαρκούς τεκμηρίωσης, ενώ συχνά οι ερευνητές φαίνεται να στηρίζονται σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα in vitro προκλινικών μελετών.

Ωστόσο, πολλές εξ αυτών των θεραπειών, κρίνοντας από τα βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα, φαίνεται να έχουν κάποια βιολογική βάση και θα μπορούσαν να είναι υλοποιήσιμες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της ακμής. Επιπλέον μελέτες πρέπει επομένως να διεξαχθούν για να εκτιμηθεί το κλινικό όφελος αυτών των θεραπειών και το φάσμα των ανεπιθύμητων ενεργειών τους. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα τοπικώς εφαρμοζόμενα προϊόντα, λόγω της πολύ διαδεδομένης χρήσης τους και της ελλιπώς προσδιορισμένης ωφέλειας σε σχέση με την επικινδυνότητα (Magin et al., 2006).

Οι περισσότερες in vitro μελέτες διερευνούν την αντιμικροβιακή δράση των διαφόρων φυσικών προϊόντων. Ύστερα από εκτενή ανασκόπηση της βιβλιογραφία της τελευταίας 10ετίας, φαίνεται πλέον να επικρατεί η θεώρηση ότι δεν αρκεί ένα φυσικό προϊόν να παρουσιάζει μόνο αντιμικροβιακή δράση, για να δικαιολογηθεί η χρησιμότητά του στην ακμή, αφού όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική μια θεραπεία ενάντια στην ακμή, θα πρέπει να στοχεύει περισσότερους από έναν από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Επιπλέον, ειδικά στην περίπτωση της ακμής, in vitro αντιμικροβιακά δεδομένα δε συνεπάγονται και αντίστοιχα in vivo, λόγω των βιοϋμενίων που σχηματίζονται από το μικροβίωμα των ακνεϊκών βλαβών.

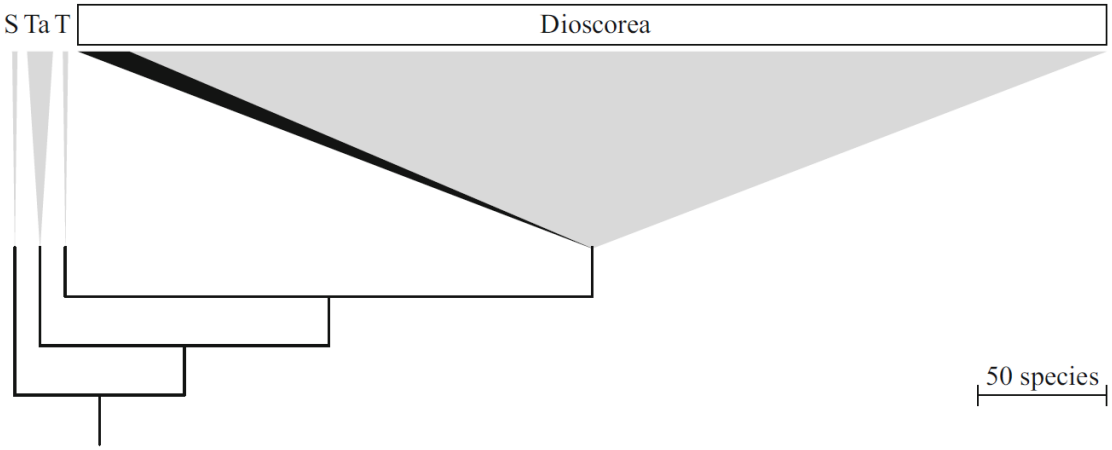
Παρατηρείται επίσης τα τελευταία χρόνια μια στροφή προς μεθόδους αντιμετώπισης της ακμής που αν και δεν προέρχονται από φυτικούς οργανισμούς, ανήκουν στην ευρύτερη σφαίρα των φυσικών προϊόντων ή παραγώγων φυσικής προέλευσης. Τέτοιες είναι τα προβιοτικά (τοπικώς εφαρμοζόμενα ή συστηματικώς χορηγούμενα), ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και ζωικούς οργανισμούς, καθώς και η θεραπεία με βακτηριοφάγους. Οι θεραπείες αυτές ανοίγουν εντελώς νέες προοπτικές για την αντιμετώπιση της νόσου, ενώ αποτελούν απόρροια της μεγαλύτερης κατανόησης της παθογένειας που έχει πλέον αποκτηθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. *Dioscorea communis* (L.) CADDICK & WILKIN [SYN. *Tamus communis* (L.)] - DIOSCOREACEAE

3.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ - ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

3.1.1 Οικογένεια Dioscoreaceae R. Br.

Η οικογένεια Dioscoreaceae R. Br. (Διοσκορεοειδή) είναι μία εκ των τριών οικογενειών που περιλαμβάνονται στην τάξη μονοκοτυλήδονων Dioscoreales Hooker F. Καλείται αλλιώς και οικογένεια των *yam*. Χαρακτηρίζεται από ευρεία εξάπλωση σε τροπικές περιοχές και εμφανίζει την εντονότερη ποικιλομορφία σε γένη στην Νοτιοανατολική Ασία (Burkill, 1960; Ferrer-Gallego and Boisset, 2016). Μικρός αριθμός ειδών, ωστόσο, εκτείνεται και μέχρι τις εύκρατες περιοχές (Rowley and Eggli, 2020). Η οικογένεια φαίνεται να σχηματίζει έναν κλάδο που αποτελείται από 4 γένη, όπως προκύπτει από μορφολογικά δεδομένα και μοριακές αναλύσεις. Εξ αυτών, το πολυπληθέστερο είναι το δίοικο γένος *Dioscorea* L. που περιλαμβάνει τα προαναφερθέντα *yams*. Στο γένος αυτό κατατάσσονται το 95% των ειδών της οικογένειας των Διοσκορεοειδών (Εικόνα 11), ενώ τα υπόλοιπα γένη είναι μόνοικα (ερμαφρόδιτα) και συνιστούν τα: *Stenomeris* Planch., *Tacca* J.R. Forst. & G. Forst. και *Trichopus* Gaertn (καθώς και το ενδημικό της Μαδαγασκάρης *Avetra* H. Perrier) (Caddick et al., 2002b, 2002a; Ferrer-Gallego and Boisset, 2016; Rowley and Eggli, 2020). Ωστόσο, ως προς την ταξινομική αυτή προσέγγιση υπάρχουν διαφωνίες.



Εικόνα 11 Συνοπτικό φυλογενετικό διάγραμμα της οικογένειας Dioscoreaceae.

***Stenomeris* = S, *Trichopus* = T, *Tacca* = Ta**

Copyright U. Eggli (Rowley and Eggli, 2020)

3.1.2 Το γένος *Dioscorea* L.

Το γένος *Dioscorea* L. περιλαμβάνει λιγότερα από 600 είδη και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ποικιλομορφία σε τροπικές περιοχές με περιόδους ξηρασίας. Η κονδυλώδης μορφολογία, που διαθέτει, βοηθά στην επιβίωσή του κατά τις περιόδους αυτές (Caddick et al., 2002b; Ferrer-Gallego and Boisset, 2016). Στην περιοχή της Μεσογείου, το γένος εκπροσωπείται μόνο από τα μέχρι πρότινος αναγνωρισμένα γένη *Borderea* Miégeville και *Tamus* L. (Tutin et al., 1980). Τα δύο αυτά γένη, μαζί με κάποια ακόμη είδη, έχουν πλέον συμπτυχθεί στο γένος *Dioscorea* (Caddick et al., 2002b, 2002a; Ferrer-Gallego and Boisset, 2016). Συγκεκριμένα, το γένος *Tamus* ("Black Bryony") παραδοσιακά θεωρούνταν διαφορετικό, αλλά πλέον πρέπει να περιλαμβάνεται στο γένος *Dioscorea*, καθώς διαθέτουν κοινή μορφολογικά, κονδυλώδη ρίζα. Διαφέρουν μόνο ως προς τους καρπούς, όπου το *Tamus* διαθέτει χυμώδεις ράγες (Rowley and Eggli, 2020).

Στο γένος περιλαμβάνονται πολυετή ή, πολύ σπάνια, μονοετή, φυτά. Τα στελέχη είναι συνήθως ασθενή, ετήσια και περιπλέκονται (συνήθως αριστερόστροφα), καθώς εξέρχονται από τα εξογκωμένα, κονδυλώδη ριζώματα τα οποία έχουν αποθηκευτικό χαρακτήρα. Σπάνια, παρατηρούνται υπέργεια ριζώματα με έντονα χαραγμένο και δομημένο κορμό, ή ξυλώδη ή χυμώδη στελέχη. Μερικές φορές επίσης παρατηρούνται στελέχη ακανθωτά, με εναέριους κονδύλους. Τα φύλλα είναι εναλλασσόμενα, συνήθως απλά και καρδιοειδή, με καλοσχηματισμένους μίσχους, χωρίς παράφυλλα. Οι ταξιανθίες είναι μασχαλιαίες, διαφόρων τύπων (ανθήλη, βότρυς, ακανθωτό σχήμα). Τα άνθη είναι μονογενή (αλλά μερικές φορές έχουν στημονώδη ή υπερώδη), ακτινόμορφα, μικρά, με χρώμα πράσινο-κίτρινο ή πράσινο-λευκό, ή ιώδη. Διαθέτουν 6 τέπαλα σε 2 σειρές, τα οποία ενώνονται σε έναν αυλό στη βάση του άνθους. Οι στήμονες είναι 6 και διατάσσονται σε 2 έλικες. Η ωοθήκη είναι υποφυής. Οι καρποί είναι κάψες, με 3 λοβούς ή 3 φτερά. Τα σπέρματα είναι μεγάλα, επίπεδα, με συμμετρικά ή μονόπλευρα φτερά (Huber, 1998; Rowley and Eggli, 2020).

Στο «Εικονογραφημένον Βοτανικόν - Φυτολογικόν Λεξικόν», ο Καββάδας αναφέρει για το γένος *Tamus* L. (βλ. *Dioscorea* L.) (απόδοση στη Νέα Ελληνική):

«**Τάμος** (*Tamus* L., γαλλικά: Tamier), Μονοκοτυλήδονο της οικογένειας των Διοσκορεοειδών με δυο είδη, εκ των οποίων το ένα φύεται στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης, της Β. Αφρικής και της Ασίας και το δεύτερο στις Κανάριες νήσους. Πολυετής, δίοικη πόα με κονδυλώδη ρίζα και βλαστό μονοετή, αναρριχητικό και περιπλεγμένο. Φύλλα εναλλασσόμενα, καρδιοειδή, ενιαία ή τρίλοβα. Άνθη σε μασχαλιαίους βότρυες-οι αρσενικοί μακριοί, αραιοί, με άνθη μονήρη κατά μήκος του άξονα, οι θηλυκοί πολύ κοντοί, με πολύ λίγα άνθη, συχνά περιορισμένοι σε μία επιφυή, μασχαλιαία δέσμη. Περιγόνιο των αρσενικών ανθέων κωδωνοειδώς σταμνοειδές, εξασχιδές, με έξι στήμονες. Περιγόνιο των θηλυκών ανθέων εξασχιδές, χωρίς στήμονες, μπορεί όμως να έχει μικρά στημονώδη. Ωοθήκη τρίχωρη. Καρπός ράγα, υποσφαιρική, χυμώδης, αδιάρρηκτη. Απαντάται αυτοφυές σε φράχτες, θαμνότοπους, δάση, παντού στην Ελλάδα».

3.1.3 Βοτανική περιγραφή του είδους *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin

Το είδος *D. communis* (L.) Caddick & Wilkin συνιστά δίοικο, πολυετές, αναρριχητικό φυτό το οποίο απαντάται σε περιοχές δασώδεις και θαμνώδεις. Διαθέτει κόνδυλους μεγάλους, σχήματος κυλινδρικού ως ωοειδούς. Τα διακλαδισμένα στελέχη του είναι σαρκώδη και χαρακτηρίζονται από διαμήκεις ραβδώσεις. Τα φύλλα έχουν σκούρο πράσινο χρώμα, διατάσσονται κατ' εναλλαγή και είναι μακρόμισχα, ενιαία, καρδιόσχημα, πλατιά ωοειδή, οξύληκτα, με 3 έως 9 νεύρα ενώ συχνά είναι τρίλοβα. Τα αρσενικά άνθη είναι πολυάριθμα και μπορεί να βρίσκονται απομονωμένα ή να οργανώνονται σε μακριούς μασχαλιαίους βότρυες. Τα θηλυκά άνθη επίσης βρίσκονται είτε απομονωμένα είτε σε βότρυες, οι οποίοι είναι πιο κοντοί και αποτελούνται από λιγότερα άνθη. Οι καρποί είναι ράγες, χρώματος κόκκινου, επιμήκεις, με 1 έως 9 σπέρματα (Ferrer-Gallego and Boisset, 2016; Tutin et al., 1980).

Πίνακας 2 Ταξινόμηση του είδους *D. communis* (L.) Caddick & Wilkin. Πηγή: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=43366#null **(12/09/2020)**

Regnum	**Plantae**
Divisio	Tracheophyta
Classis	Magnoliopsida
Subdivisio	Spermatophytina
Superordo	Lilianae
Ordo	Dioscoreales
Family	Dioscoreaceae
Genus	Dioscorea
Species	*Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [syn. *Tamus communis* (L.)]

Υπάρχει μεγάλος αριθμός συνωνύμων για το συγκεκριμένο είδος, γεγονός που αποδίδεται στην ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει το φαινότυπό του. Η ποικιλομορφία αυτή αντικατοπτρίζεται όχι μόνο στα πολλά διαφορετικά είδη που έχουν καταγραφεί, αλλά και στην ύπαρξη πολυάριθμων ταξινομικών βαθμίδων, χαμηλότερων του είδους. Ειδικότερα, στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, απαντώνται κυρίως φυτά με φύλλα τρίλοβα, στα οποία οι πλευρικοί λοβοί είναι κυκλικού σχήματος και ο μεσαίος είναι λογχοειδής. Τα πιο διαδεδομένα συνώνυμα του είδους με αυτή τη μορφολογία είναι το *Tamus cretica* L. και το *Tamus communis* var. *subtriloba* (Guss.) O.Bolòs & Vigo (Ferrer-Gallego and Boisset, 2016). Περισσότερα συνώνυμα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (

Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του *T. communis* L. (Καββάδας, 1956)

Εικόνα 13 Το είδος *D. communis*. Αριστερά: φύλλα. Πάνω δεξιά: φύλλα και καρποί. Κάτω δεξιά: Άνθη.

Πίνακας 3). Το είδος *D. communis* [syn. *T. communis*], ωστόσο, φαίνεται πως δεν έχει ακόμα ταξινομηθεί σωστά (Jarvis, 2007).

Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του *T. communis* L. (Καββάδας, 1956)

Εικόνα 13 Το είδος *D. communis*. Αριστερά: φύλλα. Πάνω δεξιά: φύλλα και καρποί. Κάτω δεξιά: Άνθη.

Πίνακας 3 Συνώνυμα του *D. communis* (L.) Caddick & Wilkin. Πηγή: http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-239990 (12/09/2020)

Name	Status	Confidence level	Source
Dioscorea canariensis Webb & Berthel.	Synonym	★★★	WCSP
Smilax rubra Willd.	Synonym	★★★	WCSP
Tamus baccifera St.-Lag.	Synonym	★★★	WCSP
Tamus canariensis Willd. ex Kunth	Synonym	★★★	WCSP
Tamus cirrhosa Hausskn. ex Bornm.	Synonym	★★★	WCSP
Tamus communis L.	Synonym	★★★	WCSP
Tamus communis subsp. *cretica* (L.) Nyman	Synonym	★☆☆	WCSP
Tamus communis var. *cretica* (L.) Boiss.	Synonym	★☆☆	WCSP
Tamus communis f. *subtriloba* (Guss.) O.Bolòs & Vigo	Synonym	★☆☆	WCSP
Tamus communis var. *subtriloba* Guss.	Synonym	★☆☆	WCSP
Tamus communis var. *triloba* Simonk.	Synonym	★☆☆	WCSP
Tamus cordifolia Stokes	Synonym	★★★	WCSP
Tamus cretica L.	Synonym	★★★	WCSP
Tamus edulis Lowe	Synonym	★★★	WCSP
Tamus norsa Lowe	Synonym	★★★	WCSP
Tamus parviflora Kunth	Synonym	★★★	WCSP
Tamus racemosa Gouan	Synonym	★★★	WCSP

Ο Καββάδας αναφέρει για το είδος *Tamus communis* L. (βλ. *D. communis*):

«**Τάμος ο κοινός** (*T. communis* L, γαλλικά: Tamier, κν. Herbe aux femmes battues αγγλικά: Black Bryony, γερμανικά: Schmerwurz), γνωστός με τα κοινά ονόματα αβρωνιά, αβρουνιά, αδρανιά, βρυωνιά, οβριά και αναμφίβολα βρυωνία ή άμπελος η λευκή του Διοσκουρίδη. Πολυετής, με βλαστό περιπλεγμένο, 1 έως 3 μέτρα και ρίζωμα ατρακτοειδώς κονδυλώδες, βαθύχρωμο εξωτερικά. Φύλλα μακρώς ωοειδή καρδιοειδή, οξύληκτα, διαφανή, γυαλιστερά, με 5 έως 7 νευρώσεις, με μακρύ μίσχο και με δύο αδένες. Άνθη πρασινοκίτρινα, σε λεπτούς, αραιούς βότρυες-οι αρσενικοί με πολλά άνθη και επιμήκεις, οι θηλυκοί με λίγα άνθη και κοντοί. Ράγα ωοειδής, κόκκινη, γυαλιστερή, τρίχωρη, με σπέρματα σφαιρικά (Εικόνα 13). Οι τρυφεροί της βλαστοί μαζεύονται από παλιά και τρώγονται αφού ξεπικριστούν με βρασμό και αντικατάσταση του νερού που χρησιμοποιήθηκε για το βρασμό, διότι η πικρή ουσία που περιέχεται σε αυτούς, όπως και σε όλα τα μέρη του φυτού και στους κονδύλους, είναι τοξική. Έχει διουρητικές, καθαρτικές και επουλωτικές ιδιότητες. Ακόμα και σήμερα οι κόνδυλοί του χρησιμοποιούνται στην ιατρική υπό μορφή καταπλασμάτων σε περίπτωση εγκαυμάτων και θλάσεων.»

Το είδος αυτό φύεται σε περιοχές με υγρασία και σκιά, όπως στις άκρες των δασών, σε φράχτες, σε θαμνώδεις εκτάσεις, κοντά σε ποτάμια και βρίσκεται συχνά συνδεδεμένο με βάτα. Βρίσκει ευρεία εξάπλωση σε μεγάλο μέρος της Ευρώπης, στη βορειοδυτική Αφρική και στη δυτική Ασία (Πίνακας 4) (De Cortes Sánchez-Mata and Tardío, 2016).

Πίνακας 4. Εξάπλωση του είδους *D. communis* (L.) Caddick & Wilkin. Πηγή: https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=423869 (13/09/2020)

Status	Continent	Subcontinent	Country
Native	Africa	Macaronesia	Portugal
Native	Africa	Macaronesia	Spain
Native	Africa	Northern Africa	Algeria
Native	Africa	Northern Africa	Morocco
Native	Africa	Northern Africa	Tunisia
Native	Asia-Temperate	Caucasus	Armenia
Native	Asia-Temperate	Caucasus	Azerbaijan
Native	Asia-Temperate	Caucasus	Georgia
Native	Asia-Temperate	Caucasus	Russian Federation
Native	Asia-Temperate	Caucasus	Russian Federation-Ciscaucasia
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Iran
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Iraq
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Israel
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Jordan
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Lebanon
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Syria
Native	Asia-Temperate	Western Asia	Turkey
Native	Europe	Eastern Europe	Ukraine
Native	Europe	Middle Europe	Austria
Native	Europe	Middle Europe	Belgium
Native	Europe	Middle Europe	Germany
Native	Europe	Middle Europe	Hungary
Native	Europe	Middle Europe	Switzerland
Native	Europe	Northern Europe	United Kingdom
Native	Europe	Southeastern Europe	Albania
Native	Europe	Southeastern Europe	Bulgaria
Native	Europe	Southeastern Europe	Former Yugoslavia
Native	Europe	Southeastern Europe	Greece
Native	Europe	Southeastern Europe	Italy
Native	Europe	Southeastern Europe	Romania
Native	Europe	Southwestern Europe	France
Native	Europe	Southwestern Europe	Portugal
Naturalized	Africa	Macaronesia	Portugal

3.2 ΔΡΟΓΟΕΤΥΜΟΛΟΓΙΑ

3.2.1 Προέλευση της επιστημονικής ονομασίας

Το 1753, ο Λινναίος δημιούργησε το είδος *Tamus communis*, δανειζόμενος την ονομασία του γένους από ένα φυτό το οποίο ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος ανέφερε ως ***uva taminia*** (δηλαδή ο καρπός του τάμνου).

Το όνομα του γένους *Dioscorea*, δόθηκε από το Γάλλο βοτανικό Charles Plumier, με σκοπό να τιμήσει τη μνήμη του Διοσκουρίδη (Allorge and Ikor, 2003).

3.2.2 Κοινά ελληνικά ονόματα

Αβρωνιά, αβρουνιά, αδρανιά, βρυωνιά, οβριά, και **λευκή άμπελος**, **μαύρη άμπελος**, είναι μερικά από τα κοινά ονόματα του φυτού, τα περισσότερα από τα οποία αναφέρονται και από τον Καββάδα.

Προέλευση του ονόματος βρυωνιά φαίνεται να είναι το αρχαίο ελληνικό ρήμα «βρύω», που χρησιμοποιούνταν για τα φυτά και σημαίνει «είμαι γεμάτος, πλήρης», «αφθονώ» (Mabey, 1996).

Είναι δύσκολο κανείς να ταυτοποιήσει το φυτό με βάση τα κοινά του ονόματα, καθώς υπάρχει μεγάλη σύγχυση μεταξύ διαφόρων ειδών. Το όνομα αβρωνία-βρυωνιά, για παράδειγμα, αποδίδεται και σε ένα άλλο φυτό, στο είδος *Smilax aspera*, με κοινά χαρακτηριστικά, όπως την αναρριχητική του τάση και τη μορφολογία ράγας που εμφανίζουν οι καρποί (Dawkins, 1936).

Με μια απλή διαδικτυακή αναζήτηση των παραπάνω ονομάτων, φαίνεται ότι χρησιμοποιούνται επίσης για είδη του γένους *Bryonia* L., της οικογένειας Cucurbitaceae (κυρίως τα *B. alba*, *B. dioica* και *B. cretica*). Πιθανώς λοιπόν η ονομασία βρυωνιά οφείλεται σε λανθασμένη ταύτιση με το επίσης αναρριχητικό *B. dioica*, που φέρει κόκκινους καρπούς το φθινόπωρο. Τα δύο είδη μπορούν ωστόσο να διακριθούν, αφού το *B. dioica* διαθέτει φύλλα πεντάλοβα, μεγαλύτερα άνθη και βλαστάρια, ενώ το *D. communis* έχει φύλλα καρδιόσχημα, άνθη μικρά και καθόλου έλικες (https://www.rhs.org.uk/advice/profile?PID=783).

Η σύγχυση αυτή φαίνεται να πηγάζει από πολύ παλαιότερα. Ο Διοσκουρίδης, στο έργο του «Περὶ ὕλης ἰατρικῆς» ή Materia Medica, περιγράφει σε ένα σημείο ένα φυτό με το όνομα «άμπελος μέλαινα». Η περιγραφή αυτή, ήδη από την εποχή της Αναγέννησης, ερμηνεύτηκε ως αναφορά στο είδος *Bryonia alba*. Η ερμηνεία αυτή άλλαξε σε μια νεότερη μετάφραση του έργου (Beck, 2005) και έκτοτε αναφέρεται στο *D. communis* (Wilkin et al., 2005). Από το Διοσκουρίδη περιγράφεται επίσης και δεύτερο φυτό με το όνομα «άμπελος λευκή, που φαίνεται να αναφέρεται σε κάποιο από τα είδη *B. cretica* και *B. dioica*. Ανά τους αιώνες λοιπόν, φαίνεται πως τα κοινά ονόματα των φυτών, λόγω της μορφολογικής τους ομοιότητας, χρησιμοποιούνται λανθασμένα και αυτό έχει οδηγήσει στο γεγονός να θεωρούνται αλληλένδετα, αν και οι αρχικές περιγραφές του Διοσκουρίδη ταιριάζουν περισσότερο στα είδη του γένους *Bryonia* (Renner et al., 2008). Τα παραπάνω εξηγούν και το γεγονός ότι ο Καββάδας αναφέρεται στο *D. communis* ως λευκή άμπελος (Καββάδας, 1956).

3.2.3 Κοινά ονόματα σε άλλες γλώσσες

Στα αγγλικά αναφέρεται ως **black bryony** (=μαύρη βρυωνιά), **black bindweed** (=μαύρη περικοκλάδα) και **lady's seal** (=σφραγίδα της κυρίας) (Uphof, 1968).

Στα γαλλικά ονομάζεται **Tamier commun** και αναφέρεται επίσης ως **herbe aux femmes battues** (=βότανο για δαρμένες γυναίκες), **haut liseron** (=ψηλή περικοκλάδα), **racine-vierge** (=παρθένος ρίζα), **raisin du Diable** (=σταφύλι του διαβόλου), **vigne noire** (=μαύρη άμπελος), **sceau de Notre Dame** (=σφραγίδα της Νοτρ Νταμ) (Briane and Durand, 2011).

Στα γερμανικά καλείται **Schmerzwurz** (=ρίζα του πόνου) μαζί με διάφορους χαρακτηρισμούς (όπως **gemeine**=κοινή, **echte**=αληθής, **gewöhnliche**=κανονική), αλλά και **Stickwurz** (=ρίζα-ράβδος), **Feuerwurzel** (=ρίζα της φωτιάς) (Hegi, 1939).

3.2.4 Ο όρος yam

Η ονομασία "yam" προέρχεται από την πορτογαλική λέξη "inhame" ή την ισπανική "ñame". Οι δύο αυτές λέξεις φαίνεται να έχουν κοινή προέλευση, αφού αντλούν από λέξεις της δυτικής Αφρικής, όπως τη λέξη "*nama"*στη γλώσσα Χάουσα, η οποία σημαίνει επίσης «σάρκα», ή τη λέξη "nyama" στη γλώσσα Σουαχίλι, που σημαίνει και «κρέας». Στη γλώσσα Φούλα η λέξη yam σημαίνει «τρώω» (Morton, 2004).

Ο όρος yam χρησιμοποιείται αναφερόμενος όχι μόνο στα είδη του γένους *Dioscorea*, αλλά πολλές φορές και στους ίδιους τους κονδύλους που αποτελούν χαρακτηριστικό των φυτών αυτών. Επιπλέον, η χρήση του έχει επεκταθεί και σε αρκετές περιοχές περιγράφει και άλλα φυτά με κονδυλώδεις ρίζες, που δεν ανήκουν στην οικογένεια Dioscoreaceae.

Μια απόδοση του όρου yam στα ελληνικά που βρέθηκε είναι «ίγναμο» και πιθανώς προέρχεται από τη γαλλική λέξη igname (https://op.europa.eu/el/web/eu-vocabularies/th-concept/-/resource/eurovoc/1285/lang-el).

3.3 ΕΘΝΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ-ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

3.3.1 Παραδοσιακή χρήση της δρόγης

Το φυτό αποτελεί μέρος της παραδοσιακής διατροφής σε πολλές περιοχές της Μεσογείου. Οι νεαροί βλαστοί είναι εδώδιμοι και καταναλώνονται ως ένα είδος άγριου σπαραγγιού στην Πορτογαλία, την Ισπανία, τη Γαλλία, την Ιταλία, τη Σλοβενία, τη Βοσνία-Ερζεγοβίνη, την Κροατία, την Ελλάδα, την Τουρκία και την Παλαιστίνη. Συλλέγονται στις αρχές της άνοιξης, πριν το φυτό ανθίσει (από το Μάρτιο έως τα μέσα του Μαΐου), καθώς πολλοί θεωρούν ότι, αφού ανθίσει, το φυτό είναι δηλητηριώδες. Η ιδιαίτερη, πικρή γεύση των βλαστών είναι χαρακτήρας που καθιστά το φυτό αγαπητό σε πολλές περιοχές, απαιτεί όμως και μια ειδική μεταχείριση κατά το μαγείρεμα. Ο παραδοσιακός τρόπος προετοιμασίας που προτείνεται είναι να βράζονται αμέσως μετά τη συλλογή τους και το νερό στο οποίο βράζουν να αλλάζεται 1-2 φορές. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνονται και οι τοξικές ουσίες. Αφού

βράσουν οι βλαστοί, μπορούν να καταναλωθούν με διάφορους τρόπους, συνήθως ως έχουν, ή μαζί με αυγά, σε ομελέτες (De Cortes Sánchez-Mata and Tardío, 2016). Στην Κρήτη, το νερό του μαγειρέματος πολλές φορές δεν απορρίπτεται αλλά χρησιμοποιείται για την προετοιμασία σούπας (Couplan, 2009a, 2009b).

Το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την καταπολέμηση του πόνου και της φλεγμονής. Οι καρποί και οι ρίζες χρησιμοποιούνται παραδοσιακά κυρίως στην Ισπανία, στην Πορτογαλία και στην Ιταλία, σε μυοσκελετικούς και ρευματικούς πόνους, αλλά και σε δερματοπάθειες, λόγω της ερυθηματογόνου (rubefacient) δράσης τους. Εφαρμόζονται εξωτερικά, είτε ως έχουν, είτε αφού διαβραχούν με οινόπνευμα ή λίπος. Η θεραπεία αυτή αναφέρεται ως επίπονη, συνιστάται ως εκ τούτου να γίνεται με προσοχή γιατί μπορεί να προκληθούν πομφόλυγες (De Cortes Sánchez-Mata and Tardío, 2016; Duke, 2002; Martins et al., 2011).

Η περισσότερο διαδεδομένη παραδοσιακή χρήση του φυτού είναι για την καταπολέμηση των μωλώπων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται και πάλι οι καρποί και οι ρίζες, εξωτερικά. Στη χρήση αυτή οφείλεται και η γαλλική ονομασία του φυτού herbe aux femmes battues (= βότανο για δαρμένες γυναίκες) που προαναφέρθηκε (Schmidt and Moult, 1983).

Οι ρίζες χρησιμοποιούνται επίσης παραδοσιακά σε αφέψημα για την καταπολέμηση φλεγμονών στα πόδια, σε ανθρώπους αλλά και σε ζώα. Για τις ρίζες επιπλέον αναφέρεται δράση διουρητική και καθαρτική και έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση της πλευρίτιδας, της βρογχίτιδας και του κοκκύτη (Capasso et al., 1983b).

3.3.2 Φαρμακολογικές δράσεις της δρόγης

Οι δράσεις του φυτού που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι η αντιφλεγμονώδης, η αντιοξειδωτική και η κυτταροτοξική σε καρκινικές σειρές. Παρακάτω (Πίνακας 5) παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι μελέτες για τις δράσεις του φυτού που βρέθηκαν με αναζήτηση στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 5 Σύνοψη των δράσεων του είδους *Dioscorea communis* [syn. *Tamus communis*] που έχουν μελετηθεί.

YEAR	PLANT	PLANT MATERIAL	BIOACTIVITY	REFERENCES
1983	*Tamus communis*	roots	analgesic in vivo antiinflammatory in vivo (rats-mice)	(Capasso et al., 1983b)
1987	*Tamus communis*	roots	antiinflammatory in vivo (rats)	(Mascolo et al., 1987)
1991	*Tamus communis*	rhizomes	antiviral in vitro:	(Aquino et al., 1991)
2006	*Tamus communis*	fresh rhizomes	cytotoxic in vitro	(Réthy et al., 2006a)

2007	*Tamus communis*	fresh rhizomes	cytotoxic in vitro	(Kovács et al., 2007a)
2007	*Tamus communis*	herb, root	not significant antiinflammatory or antinociceptive activity	(Kupeli et al., 2007)
2009	*Tamus communis* ssp. cretica	aerial parts	antioxidant in vitro	(Shaheen et al., 2009)
2009	*Tamus communis*	roots	antioxidant in vitro	(Boumerfeg et al., 2009)
2011	*Tamus communis*	immature fruits, ripened fruits	antioxidant in vitro	(Rafael et al., 2011)
2011	*Tamus communis*	shoots	antioxidant in vitro	(Martins et al., 2011)
2012	*Tamus communis*	young shoots	antioxidant in vitro	(Morales et al., 2012)
2013	*Tamus communis*	root, berries	cytotoxic in vitro	(Al-khateeb et al., 2013)
2013	*Tamus communis*	ripened fruits	antioxidant in vitro	(Barreira et al., 2013a)
2015	*Tamus communis* ssp. cretica	aerial parts	antioxidant in vitro	(Küçükboyaci et al., 2015)
2015	*Tamus communis*	mature shoots	antioxidant in vitro	(Poljuha et al., 2015)
2015	*Tamus communis*	roots	antioxidant in vitro	(Zerargui et al., 2015)

3.4 ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ

Πραγματοποιήθηκε διεξοδική αναζήτηση προηγούμενων μελετών σε διεθνείς ψηφιακές βάσεις ερευνητικού υλικού (reaxys, pubmed, scopus και google scholar) με λέξεις κλειδιά όπως: ‘’*Dioscorea communis*’’, ‘’*Tamus communis*’’, ‘’Black bryony’’. Συνολικά, συμπεριλήφθηκαν 122 δημοσιεύσεις που περιγράφουν τις βιοδραστικές ενώσεις, τις παραδοσιακές χρήσεις, τις φαρμακολογικές ιδιότητες και την τοξικότητα του είδους ενώ εξαιρέθηκαν τα άρθρα που εστιάζουν στην ταξινόμηση, τη βοτανική και την φυτοπαθολογία του είδους.

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση προκύπτει ότι τα κύρια συστατικά του είδους είναι παράγωγα φαινανθρενίου και διυδροφαινανθρενίου (Aquino et al., 1985c, 1985a; Boudjada et al., 2018; Ireland

et al., 1981; Kovács et al., 2007b; Réthy et al., 2006b), γλυκοσίδες φλαβονοειδών και φαινολικά οξέα (Barreira et al., 2013a; Shaheen et al., 2009) καθώς και τριτερπενια, στερόλες και σαπωνίνες (Aquino et al., 1985b; R. Aquino et al., 1986; Barreira et al., 1970; Blunden et al., 1968a; Capasso et al., 1983a, 1983b; González et al., 1971; Rogowska et al., 2019). Τα απομονωμένα φυσικά προϊόντα και οι αντίστοιχες χημικές δομές τους παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 6-Πίνακας 14).

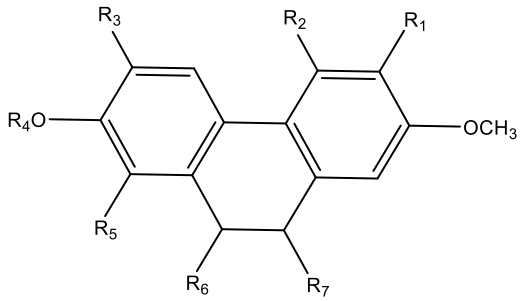
3.4.1 Παράγωγα φαινανθρενίου και διυδροφαινανθρενίου

Πίνακας 6. Φαινανθρένια και διυδροφαινανθρένια του είδους *D. communis*

Τμήμα φυτού	**Ουσίες που απομονώθηκαν**	**Βιβλιογραφία**
Ρίζες	herorensol, 2,3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene, 2,4-dimethoxy-7,8-methylendioxy-3-phenanthrenol, chrysotoxene, 2,4,8-trimethoxy-3,7-phenanthrenediol	(Boudjada et al., 2018)
Ρίζες	6-hydroxy-2,4,7-trimethoxyphenanthrene (batatasin I)	(Ireland et al., 1981)
Ρίζες	2,7,8-trimethoxy-3.4-methylenedioxyphenanthrene, 7-hydroxy-2,8-dimethoxy-3,4-methylenedioxyphenanthrene, 8-hydroxy-2,3,4,7-tetramethoxyphenanthrene, 7-hydroxy-2,4,6-trimethoxyphenanthrene, 4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxyphenanthrene, 4,8-dihydroxy-2,3,7-trimethoxyphenanthrene	(Aquino et al., 1985c)
Ρίζες	4-hydroxy-2,6,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene, 4,7-dihydroxy-2,6-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	(Aquino et al., 1985a)
Νωπές ρίζες	7-hydroxy-2,3,4-trimethoxyphenanthrene, 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (nudol), 2,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyphenanthrene, 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene (confusarin), 3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene	(Réthy et al., 2006a)
Νωπές ρίζες	7-hydroxy-2,3,4,8-tetramethoxyphenanthrene, 2,3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene, 3-hydroxy-2,4-dimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene, 2-hydroxy-3,5,7-trimethoxyphenanthrene, 2-hydroxy-3,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	(Kovács et al., 2007a)
Νωπές ρίζες	herorensol, 2,3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene, 2,4-dimethoxy-7,8-	(Boudjada et al., 2018)

	methylenedioxy-3-phenanthrenol, chrysotoxene, 2,4,8-trimethoxy-3,7-phenanthrenediol, orchinol, lusianthridin	
Ρίζες	Orchinol, lusianthridin	(Boudjada et al., 2018)

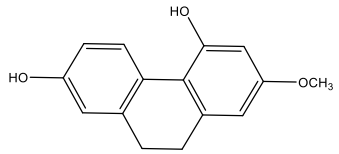
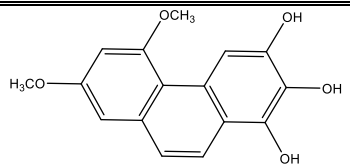
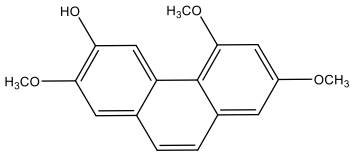
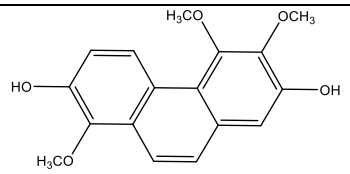
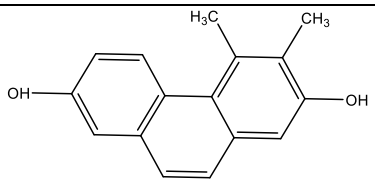
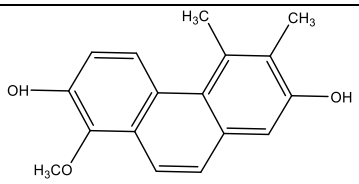
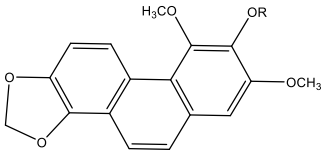
Πίνακας 7. Δομές φαινανθρενίων και διυδροφαινανθρενίων του είδους *D. communis*



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
2,7,8- trimethoxy-3,4-methylendioxyphenanthrene	$-OCH_2O-$		H	CH_3	OCH_3	$\Delta^{9,10}$	
7-hydroxy-2,8-dimethoxy-3,4-methylendioxyphenanthrene	$-OCH_2O-$		H	H	OCH_3	$\Delta^{9,10}$	
8-hydroxy-2,3,4,7-tetramethoxyphenanthrene	OCH_3	OCH_3	H	CH_3	OH	$\Delta^{9,10}$	
7-hydroxy-2,4,6-trimethoxyphenanthrene	H	OCH_3	OCH_3	H	H	$\Delta^{9,10}$	
4,7-dihydroxy2,3-dimethoxyphenanthrene	OCH_3	OH	H	H	H	$\Delta^{9,10}$	
4,8-dihydroxy2,3,7-trimethoxyphenanthrene	OCH_3	OH	H	CH_3	OH	$\Delta^{9,10}$	
chrysotoxene	OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	$\Delta^{9,10}$	
2,4,8-trimethoxy-3,7-phenanthrenediol	OH	OCH_3	H	H	OCH_3	$\Delta^{9,10}$	
2-hydroxy-3,5,7-trimethoxyphenanthrene	H	OCH_3	OCH_3	H	H	$\Delta^{9,10}$	
7-hydroxy-2,3,4,8-tetramethoxyphenanthrene	OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	$\Delta^{9,10}$	
7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyphenanthrene	OCH_3	OCH_3	H	H	H	$\Delta^{9,10}$	
3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene	H	OCH_3	H	H	H	$\Delta^{9,10}$	

2,3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene,	OCH_3	OCH_3	H	$-CH_2-$		$\Delta^{9,10}$	
3-hydroxy-2,4-dimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene	OH	OCH_3	H	-CH2-		$\Delta^{9,10}$	
orchinol	H	OCH_3	H	H	H	H	H
2-hydroxy-3,5,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	H	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H
4,7-dihydroxy-2,6-dimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	OCH_3	OH	H	OH	OH	H	H
4-hydroxy-2,6,7-trimethoxy-9,10-dihydrophenanthrene	H	OCH_3	OH	CH_3	O CH_3	H	H

Πίνακας 8. Δομές φαινανθρενίων και διυδροφαινανθρενίων του είδους *D. communis* (συνέχεια)

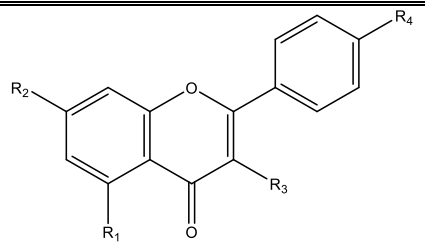
 Lusianthridin	 Herorensol
 6-Hydroxy-2,4,7-trimethoxyphenanthrene	 3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphenanthrene
 2,7-dihydroxy-3,4-dimethoxyphenanthrene (nudol)	 2,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyphenanthrene
	3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene R= CH_3 2,4-dimethoxy-7,8-methylenedioxy-3-phenanthrenol R= H

3.4.2 Φλαβονοειδή

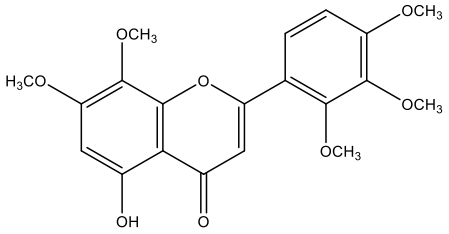
Πίνακας 9. Φλαβονοειδή του είδους *D. communis*

Τμήμα φυτού	Ουσίες που απομονώθηκαν	Βιβλιογραφία
Υπέργεια τμήματα	Kaempferol-3,4'-di-O-α-L-rhamnopyranoside, Kaempferol-4'-O-α-L-rhamnopyranoside, Kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyranoside, Serpyllin	(Shaheen et al., 2009)
Κάρποι	Apigenin-C-hexoside-O-hexoside Apigenin-6-C-glucoside-8-C-glucoside Apigenin-6-C-glucoside-7-O-glucoside Apigenin-C-hexoside-O-hexoside Luteolin-6-C-glucoside-8-C-glucoside Kaempferol-3-O-neohesperidoside Kaempferol-O-pentosyl-rhamnoside Kaempferol-3,4’-di-O-rhamnoside Kaempferol-O-rhamnoside-O-hexoside Quercetin-O-rhamnosyl-rhamnoside Quercetin-3-O-neohesperidoside Quercetin-O-hexoside	(Barreira et al., 2013b)

Πίνακας 10. Δομές φλαβονοειδών του είδους *Dioscorea communis*



Kaempferol-7-O-α-L-rhamnopyranoside	R_1=R_3=R_4 =OH, R_2 =ORha
Kaempferol-4'-O-α-L-rhamnopyranoside	R_1=R_2=R_3 =OH, R_4 =ORha
Kaempferol-3,4'-di-O-α-L-rhamnopyranoside	R_1=R_2= OH, R_3 =R_4 =ORha



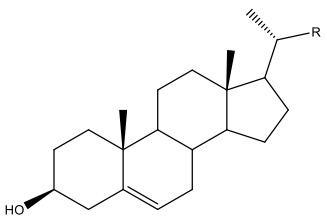
Serpyllin

3.4.3 Τριτερπένια, στερόλες και σαπωνίνες

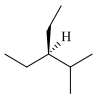
Πίνακας 11. Τριτερπένια, στερόλες, σαπωνίνες του είδους *D. communis*

Τμήμα φυτού	**Ουσίες που απομονώθηκαν**	**Βιβλιογραφία**
Φύλλα, στελεχη	β-sitosterol, stigmasterol, cholesterol, (lanosterol), diosgenin, yamogenin	(Blunden et al., 1968b)
Φύλλα, στελέχη	β-sitosterol, diosgenin, tamusgenin, eduligenin, lowegenin	(Barreira et al., 1970)
Φύλλα, στελέχη	7-ketotamusgenin, 7-ketodiosgenin, 25S-hydroxytamusgenin, afurigenin	(González et al., 1971)
Ρίζες, φύλλα, καρποί	β-sitosterol, stigmasterol, campesterol,	(Capasso et al., 1983a)
Ρίζες	24-ethylcholest-5-en-3-β-ol, 24-ethylcholesta-5,22-dien-3-β-ol, 24-methyl-cholest-5-en-3-β-ol	(Capasso et al., 1983b)
Ρίζες	dioscin, gracillin	(Aquino et al., 1985b)
Ρίζες	methylprotoneodioscin (25S-epimer), methylprotodioscin (25R-epimer), methylprotogracillin	(Rita Aquino et al., 1986)
Φύλλα, ρίζες	diosgenin, yamogenin, stigmasterol, stigmasta-3,5-dien-7-one, isofucosterol, campesterol, cholesterol, cycloartanol, 4-methylcholest-7-en-3-ol, 24-methylenecycloartanol, sitostanol, sitostenone, 2,2-dimethylcholest-7-en-3-ol, β-amyrin, α-amyrin	(Rogowska et al., 2019)

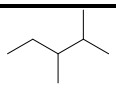
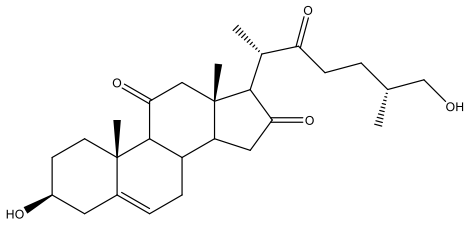
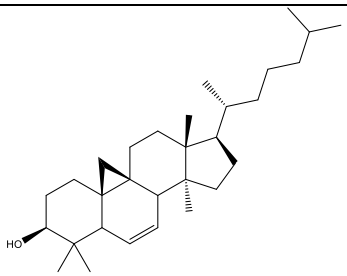
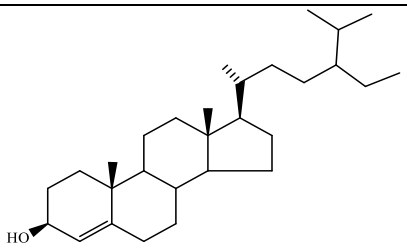
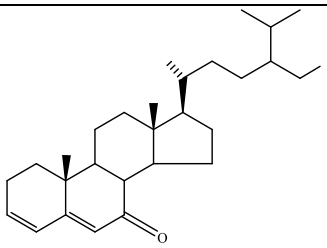
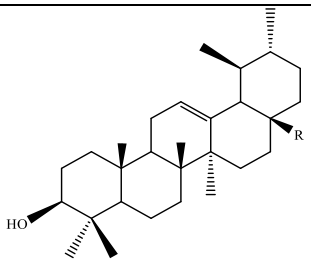
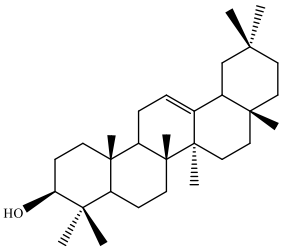
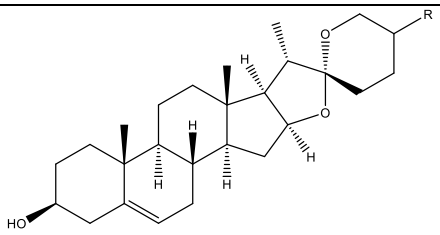
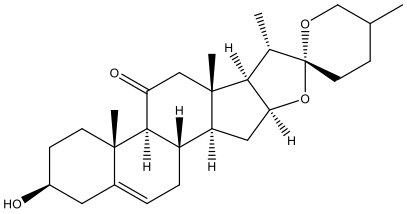
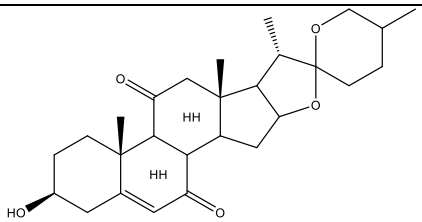
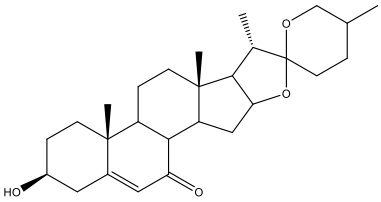
Πίνακας 12. Δομές Τριτερπενίων, στερολών και σαπωνινών του είδους *D. communis*

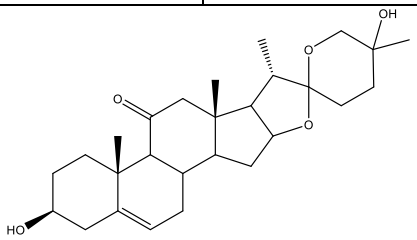
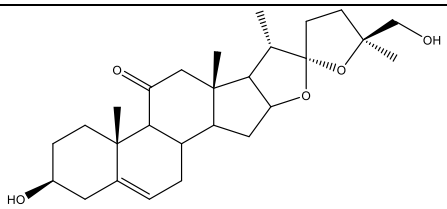
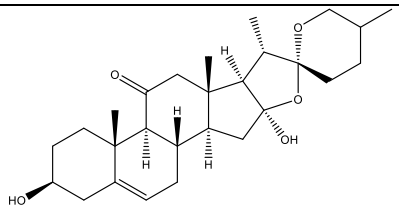
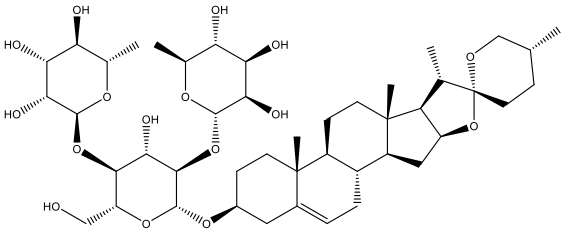
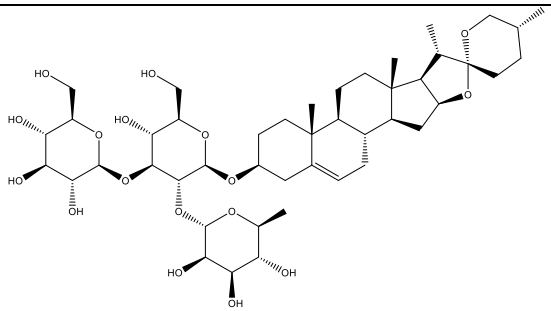


Stigmasterol R=

Sitosterol R= 

Cholesterol R=

Camphesterol R= 	
Isofucosterol R=	
 Eduligenin	 Cycloartanol
 Lawsaritol	 Stigmastan-3,5-dien-7-one
 α-Amyrin R=CH_3	 β-Amyrin
 Diosgenin R=α-CH_3 Yamogenin R= β-CH_3	 Tamusgenin
	

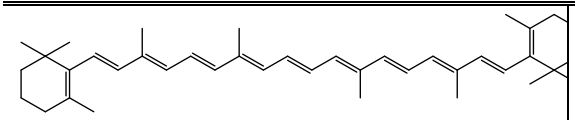
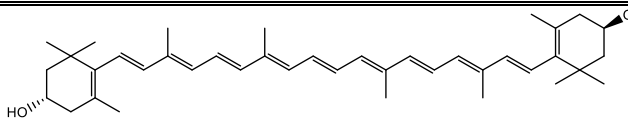
7-Ketotamusgenin	7-Ketodiosgenin
 25S-Hydroxytamusgenin	
 Afurigenin	 Lowegenin
 Dioscin	 Gracillin

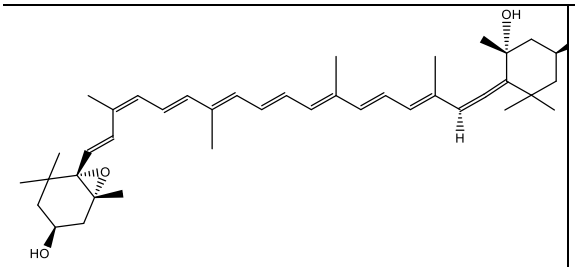
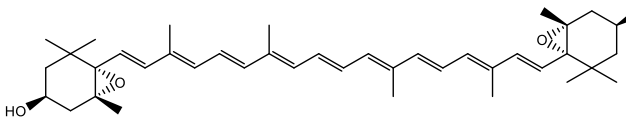
3.4.4 Καροτενοειδή

Πίνακας 13. Καροτενοειδή του είδους *D. communis*

Τμήμα φυτού	**Ουσίες που απομονώθηκαν**	**Βιβλιογραφία**
Νεαροί βλαστοί	Neoxanthin, lutein, violaxanthin, β-carotene	(García-Herrera et al., 2013)

Πίνακας 14. Δομές καροτενοειδών του είδους *D. communis*

 β-Carotene	 Lutein

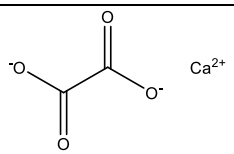
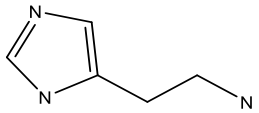
	
Neoxanthin	Violaxanthin

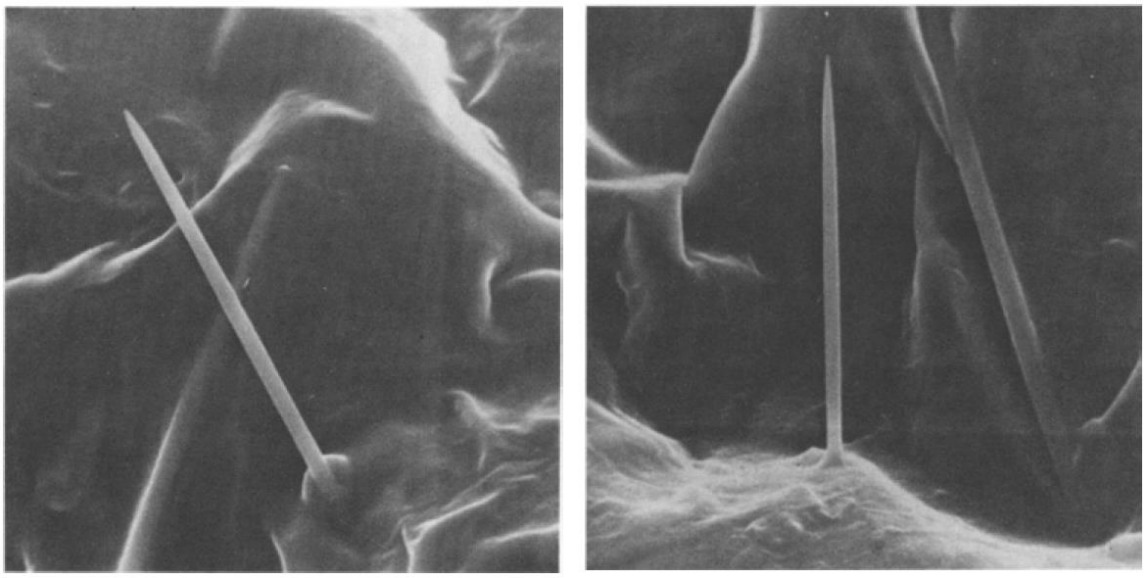
3.5 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Ολόκληρο το φυτό χαρακτηρίζεται από ήπια τοξικότητα, λόγω των περιεχόμενων σαπωνινών. Ωστόσο, στην περίπτωση των βλαστών, αυτές απομακρύνονται με τη διαδικασία του μαγειρέματος. Τα πραγματικά τοξικά τμήματα του φυτού, είναι οι καρποί και οι κόνδυλοι, που, εκτός από σαπωνίνες, περιέχουν και κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου (calcium oxalate). Έτσι, αν καταναλωθούν, μπορούν να προκαλέσουν ερεθισμό των βλεννογόνων και συνεπώς γαστρεντερικές και αναπνευστικές διαταραχές (Couplan, 2009a).

Οι καρποί και οι ρίζες έχουν επίσης ερεθιστική δράση για το δέρμα, δράση που έχει αποδειχθεί και μέσω εφαρμογής σε εθελοντές. Η εφαρμογή του χυμού των καρπών στο δέρμα, με τριβή, προκαλεί ερυθηματώδες, βλατιδώδες εξάνθημα, εντός μερικών μόνο λεπτών (άμεση, τύπου Ι ανοσοαπόκριση). Η αντίδραση αυτή υποχωρεί μέσα σε 24 ώρες και προκαλείται λόγω της μηχανικής τριβής που οδηγεί στη διάτρηση του δέρματος από τους κρυστάλλους οξαλικού ασβεστίου (Εικόνα 14). Το ρίζωμα προκαλεί αντίδραση ίδιας φύσεως, αλλά εντονότερη, πιθανώς λόγω της περιεχόμενης ισταμίνης (histamine) (Πίνακας 15) (Schmidt and Moult, 1983). Αναφέρεται στη βιβλιογραφία και μια περίπτωση καθυστερημένης αντίδρασης υπερευαισθησίας, σε 66χρονο άνδρα με ιστορικό βρογχίτιδας και σπονδυλοαρθρίτιδας, ο οποίος χρησιμοποίησε τους καρπούς στο χέρι του για την καταπολέμηση ερεθισμού. Η αντίδραση ήταν τυπική καθυστερημένη ανοσοαπόκριση (τύπου IV), με εκζεματώδη όψη και παρουσία φυσαλίδων και διήρκεσε περισσότερες από 120 ώρες. Η αιτία της αντίδρασης πιθανολογείται ότι ήταν κάποια υδατοδιαλυτή ουσία, μεγάλου μοριακού βάρους, η διαπερατότητα της οποίας ενισχύθηκε λόγω της παρουσίας των κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου.

Πίνακας 15. Δομές των ουσιών που είναι υπεύθυνες για την τοξικότητα των καρπών και του ριζώματος του *είδους D. communis*

	
Calcium oxalate	Histamine



Εικόνα 14 Απεικόνιση κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου βυθισμένων σε επιδερμίδα χοίρου, με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x1000) (Schmidt and Moult, 1983)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η κοινή ακμή (acne vulgaris) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος που πλήττει τις τριχοσμηγματογόνους μονάδες οδηγώντας σε διάφορες βλάβες όπως φαγέσωρες, φλύκταινες, βλατίδες, κύστεις, οζίδια. Ο μηχανισμός εκδήλωσης της νόσου είναι πολυπαραγοντικός και δεν έχει αποσαφηνιστεί, παρά το γεγονός ότι η ακμή επηρεάζει μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού και απασχολεί εδώ και πολλά χρόνια την ερευνητική κοινότητα.

Έχουν αναφερθεί πολλοί παράγοντες παθογένειας που συνοψίζονται σε 4 κύριους άξονες (Plewig et al., 2019d):

1. αύξηση της παραγωγής καθώς και αλλαγή της σύστασης του σμήγματος
2. μεταγονιδιωματικές αλλαγές στο συμβιωτικό βακτήριο του δέρματος *Propionibacterium acnes* (που πρόσφατα μετονομάσθηκε *Cutibacterium acnes*) που αυξάνουν την παθογονικότητά του και ευνοούν το σχηματισμό βιοϋμενίου (biofilm)
3. διαταραχή της κερατινοποίησης των τοιχωμάτων του τριχικού θύλακα που οδηγεί σε απόφραξη της τριχοσμηγματογόνου μονάδας και στη δημιουργία φαγεσώρων
4. ενεργοποίηση φλεγμονώδους απόκρισης και διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού στη δερμίδα

Οι παραπάνω άξονες επηρεάζονται από το γενετικό υπόβαθρο και από άλλους μηχανισμούς, όπως τα ανδρογόνα, το μεταβολισμό και τη σύνθεση των λιπιδίων, τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, το stress και τη διατροφή. Συνήθως, όμως, η νόσος εξετάζεται ως προς τους επιμέρους μηχανισμούς χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η συνέργεια μεταξύ αυτών (Mirshahpanah and Maibach, 2007; Plewig et al., 2019d).

Λίγα από τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κλασική θεραπευτική αντιμετώπιση της κοινής ακμής έχουν δράση σε πολλούς από τους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, και η χρήση τους συνδέεται με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά, οι δερματικές αντιδράσεις που προκαλούν τα τοπικά ρετινοειδή και οι πολυάριθμες συστηματικές παρενέργειες που προκαλεί η ισοτρετινοΐνη (Leyden, 1995; Yang et al., 2017).

Παρατηρείται έτσι μια στροφή προς τα φυσικά προϊόντα ως εναλλακτικές θεραπείες αλλά και ως υποψήφια πηγή εύρεσης νέων φαρμάκων, που συνάδει με τη γενικότερη τάση προς το “φυσικό” που επικρατεί την τελευταία 20ετία. Αυτό συμβαίνει και λόγω της αφθονίας τους αλλά κυρίως λόγω της αντίληψης ότι τα προϊόντα αυτά είναι ασφαλέστερα. Η αντίληψη αυτή, αν και δεν ισχύει πάντοτε στην πράξη, έχει παγιωθεί σημαντικά και επομένως τα φυσικά προϊόντα έχουν αρχίσει να απασχολούν και μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας.

Πολλά φυσικά προϊόντα, κρίνοντας από τα βιβλιογραφικά και πειραματικά δεδομένα, φαίνεται να έχουν κάποια βάση ως υλοποιήσιμες θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της ακμής. Επιπλέον

μελέτες πρέπει επομένως να διεξαχθούν για να εκτιμηθεί το κλινικό όφελος αυτών των θεραπειών και το φάσμα των ανεπιθύμητων ενεργειών τους. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στα τοπικώς εφαρμοζόμενα προϊόντα, λόγω της πολύ διαδεδομένης χρήσης τους και της ελλιπώς προσδιορισμένης ωφέλειας σε σχέση με την επικινδυνότητα (Magin et al., 2006).

Οι μελέτες συνήθως αφορούν σκευάσματα παραδοσιακής ιατρικής, φυτικά εκχυλίσματα αλλά και καθαρές απομονωμένες ουσίες (phytochemicals). Τα παραπάνω παρουσιάζουν συνήθως δράση αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική ή και συνδυασμούς αυτών. Ο συνδυασμός των δράσεων αυτών είναι εξαιρετικής σημασίας, αφού πλέον φαίνεται να επικρατεί η θεώρηση ότι δεν αρκεί ένα φυσικό προϊόν να παρουσιάζει μόνο αντιμικροβιακή δράση, για να δικαιολογηθεί η χρησιμότητά του στην ακμή. Για να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική μια θεραπεία, φαίνεται ότι πρέπει να στοχεύει περισσότερους από έναν από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου (Fisk et al., 2014; Soleymani et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (3.3.2), η βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων του είδους *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin [syn. *Tamus communis* (L.)] (Dioscoreaceae) έχει μελετηθεί αρκετά και τα αποτελέσματα έχουν δείξει κυρίως αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση, που δικαιολογούνται και από το χημικό τους φορτίο. Οι δράσεις αυτές έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στοχεύουν δύο από τους βασικούς μηχανισμούς παθογένειας της ακμής.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η επίτευξη ικανοποιητικού προτύπου ακμής και η εφαρμογή εκχυλισμάτων του φυτού *D. communis* με πιθανή εφαρμογή στην ακμή, βασιζόμενοι στη χημική τους σύσταση.

Σημαντικό ρόλο στη διερεύνηση των μηχανισμών και στην εύρεση νέων, αποτελεσματικών φαρμάκων για την ακμή, έχει η ανάπτυξη μοντέλων τα οποία προσομοιώνουν όσο το δυνατόν καλύτερα τη νόσο στον άνθρωπο. Ο σχεδιασμός μοντέλων για τη μελέτη της ακμής θα πρέπει να γίνεται με γνώμονα την πολυπαραγοντική φύση της. Όλα τα διαθέσιμα in vitro και in vivo μοντέλα ακμής έχουν περιορισμούς στην προσομοίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πολύπλοκων παθογενετικών μηχανισμών της νόσου (Mirshahpanah and Maibach, 2007; Plewig et al., 2019d).

Για την επιλογή του κατάλληλου μοντέλου ακμής, έγινε εκτενής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και στη συνέχεια παρουσιάζονται συνοπτικά τα μοντέλα ακμής που βρέθηκαν.

Όσον αφορά τα in vitro μοντέλα με ερευνητική σημασία για την ακμή, περιορίζονται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς καλλιέργειες κυττάρων του σμηγματογόνου αδένα (sebocytes). Οι πρώτες διατηρούν κάποια χαρακτηριστικά του αδένα, όμως δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές. Οι δεύτερες, αν και εύχρηστες, έχουν υποστεί αθανατοποίηση και άρα οι αποπτωτικές διεργασίες που συμβαίνουν φυσιολογικά στους σμηγματογόνους αδένες έχουν διακοπεί. Τέλος, και οι δύο τύποι καλλιεργειών έχουν το μειονέκτημα ότι δεν περιλαμβάνουν το μεσεγχυματικό ιστό που στην πραγματική κατάσταση

αλληλεπιδρά με τους σμηγματογόνους αδένες. Γενικότερα, θεωρούνται ως μη επαρκή μοντέλα για μελέτη των μηχανισμών και της θεραπείας της νόσου(Plewig et al., 2019d).

Η ακμή αποτελεί μια ασθένεια μοναδική στον άνθρωπο και οι ελάχιστες εξαιρέσεις όπου εμφανίζεται αυθόρμητα σε ζώα (κυρίως γάτες και σκύλους) δεν έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία. Υπάρχουν in vivo πειραματικά μοντέλα (rhino mouse, mexican hairless dog, syrian golden hamster) που διαθέτουν δομές σχετικά παρόμοιες με τις τριχοσμηγματογόνους μονάδες του ανθρώπου. Τα ζώα αυτά, αν και είναι χρήσιμα για τη μελέτη είτε της φαγεσωρογόνου και φαγεσωρολυτικής δράσης ουσιών είτε του ανδρογονοεξαρτώμενου μεταβολισμού των κυττάρων του σμηγματογόνου αδένα, έχουν αρκετούς περιορισμούς. Επίσης χρησιμοποιείται για τη μελέτη της φαγεσωρογόνου δράσης το μοντέλο επάλειψης ουσιών στα αυτιά των κουνελιών (rabbit ear assay) (Plewig et al., 2019d). Τα μοντέλα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 15.

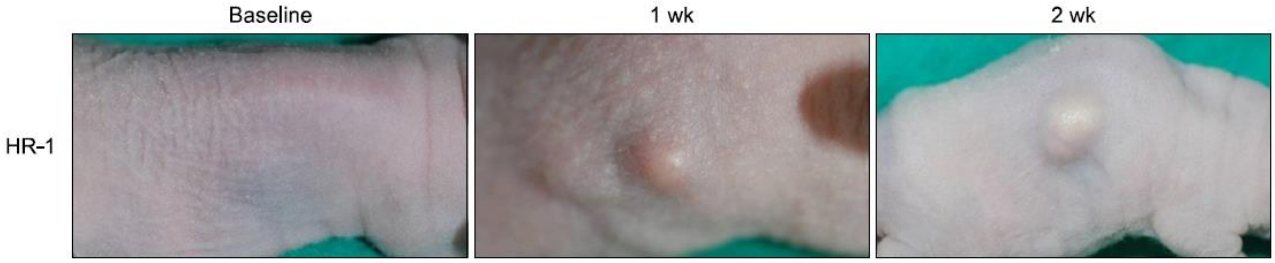
Εικόνα 15 Ζωικά πρότυπα ακμής

Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ένα μοντέλο ακμής που αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1984. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει ενδοδερμική έγχυση του βακτηρίου *Propionibacterium acnes* στα αυτιά επίμυων υπό μορφή εναιωρήματος. Η ένεση με τον μικροοργανισμό προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση χρόνιου τύπου με αύξηση του πάχους του αυτιού και σχηματισμό βλαβών που προσομοιάζουν αρκετά την ακμή (De Young et al., 1984).

Το μοντέλο αυτό (πλέον σε μύες και όχι τόσο σε επίμυες) έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως σε δοκιμασίες αποτελεσματικότητας θεραπευτικών παραγόντων (dos Santos et al., 2019; Fan et al., 2013; Kistowska et al., 2014; Madan et al., 2019; Nakatsuji et al., 2011, 2009; Taleb et al., 2018).

Εικόνα 16 Κλινική εικόνα του αυτιού μυός μετά την έγχυση εναιωρήματος *P. acnes* (αριστερό αυτί) (Taleb et al., 2018)

Λόγω των περιορισμών που εμφανίζει το αυτί ως θέση της έγχυσης, διότι το μικρό πάχος του δέρματος παρακωλύει την παρατήρηση δευτερογενών φλεγμονωδών βλαβών, τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται μια παραλλαγή του αρχικού πρωτοκόλλου, που περιλαμβάνει έγχυση βακτηριακού εναιωρήματος *P. acnes* στη ράχη μυών. Η ερευνητική ομάδα που το εφάρμοσε για πρώτη φορά, το 2015, σε διάφορα είδη μυών, παρατήρησε ότι το άτριχο είδος SKH-hr1 έδωσε μια καλή προσομοίωση της πραγματικής κατάστασης της ακμής, με οξεία φλεγμονώδη αντίδραση, υπερπλασία της επιδερμίδας και σχηματισμό συνοδών βλαβών φαγεσωρικού τύπου (Jang et al., 2015).



Εικόνα 17 Το είδος SKH-hr1 πρίν (αριστερά), 1 εβδομάδα (κέντρο) και 2 εβδομάδες (δεξιά) μετά την έγχυση εναιωρήματος *P. acnes* συγκεντρώσεως 10^8 CFU/μL (Jang et al., 2015)

Το πρωτόκολλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί τόσο σε δοκιμασίες αποτελεσματικότητας θεραπειών για την ακμή, όσο και ως εργαλείο για τη διερεύνηση των παραγόντων παθογένειας της νόσου. Επιλέχθηκε επομένως να χρησιμοποιηθεί στο συγκεκριμένο πείραμα αυτό το πρωτόκολλο, δεδομένου ότι είναι το πιο σύγχρονο με βάση τη βιβλιογραφία και συνδυάζει αρκετούς μηχανισμούς παθογένειας της ακμής (Dinant and Boulos, 2016; Hermsmeier et al., 2019; Kim et al., 2019; Kolar et al., 2019; Lee et al., 2016).

Εργαστηριακά, έγινε για πρώτη φορά συγκριτική μελέτη πρόκλησης ακμής, σε τρία διαφορετικά είδη άτριχων μυών, SKH-hr1, SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE (άτριχο είδος με αυξημένη χοληστερόλη), με σκοπό να διαπιστωθεί ποιο από αυτά θα δώσει βλάβες που προσομοιώνουν κατά το δυνατόν καλύτερα την κλινική και ιστοπαθολογική εικόνα της ακμής που εμφανίζεται στον άνθρωπο.

Λήφθηκαν φωτογραφίες, εμβιομηχανικές μετρήσεις και μετρήσεις αντιοξειδωτικών και άλλων αιματολογικών στοιχείων όπως η γλυκόζη, η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια, με σκοπό να

αξιολογηθεί το συγκεκριμένο πρότυπο ακμής μεταξύ των τριών ειδών μυών και να χαρακτηριστεί κατά το δυνατόν με αντικειμενικό τρόπο. Απώτερος στόχος είναι η μελλοντική χρήση του μοντέλου για τη μελέτη θεραπευτικών σκευασμάτων καθώς και των μηχανισμών παθογένειας της νόσου.

Ταυτόχρονα, λήφθηκαν εκχυλίσματα φύλλων και καρπών *D. communis* τα οποία αναλύθηκαν με χρωματογραφικές (GC-MS) και φασματοσκοπικές (^{1}H NMR) μεθόδους και έγινε εκτενής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, με σκοπό την ανάλυση της χημικής τους σύστασης ώστε να επιλεγεί το καταλληλότερο για την εφαρμογή στο ζωικό πρότυπο ακμής.

ΜΕΡΟΣ Α: ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Dioscorea communis* (L.) CADDICK & WILKIN [SYN. *Tamus communis* (L.)] - DIOSCOREACEAE

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

Το φυτικό υλικό συλλέχθηκε στις συντεταγμένες 38.139539, 23.886071 τον Ιούνιο του 2019. Μετά τη συλλογή το φυτό αφέθηκε να ξηραθεί σε δροσερό, καλώς αεριζόμενο και σκιερό χώρο. Ο χυμός από τους καρπούς του φυτού φυλάχθηκε σε θερμοκρασία 2-8 °C, έως ότου χρησιμοποιήθηκε, για να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Χρησιμοποιήθηκαν 155.0 g φύλλων του φυτού, αδρομερώς τετμημένων. Χρησιμοποιήθηκε επίσης 1L χυμού από τους καρπούς του φυτού.

4.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΗΣ

4.2.1 Φύλλα

Η δρόγη (155.0 g) εκχυλίσθηκε σε θερμοκρασία δωματίου με κυκλοεξάνιο, στη συνέχεια εκχυλίστηκε με αιθανόλη 96° και τέλος με αιθανόλη 60°. Κατά την μελέτη αυτή, τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα εξατμίζοντο σε χαμηλή θερμοκρασία (40ºC) σε περιστροφική συσκευή αποστάξεως υπό κενό. Όλα τα υπολείμματα, διατηρήθηκαν σε ξηραντήρα υπό κενό, που περιείχε γέλη πυριτικού οξέος με δείκτη υγρασίας, καθώς και πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5, Merck, Art. 540).

4.2.2 Χυμός

Στο χυμό από τους καρπούς (1L) έγινε απομάκρυνση της υγρασίας, μέσω λυοφιλοποίησης (Christ ALPHA I-5) και παραλήφθηκε το ξηρό υπόλειμμα.

4.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.3.1 Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μάζας (GC-MS)

Η ανάλυση του κυκλοεξανικού εκχυλίσματος έγινε με αέριο χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Hewlett Packard 7820A-5977B MSD και η μέθοδος παραγωγής ιόντων ήταν ιονισμός με ηλεκτρόνια (70 eV). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη : HP-5MS (30m×0.25mm (i.d.), film thickness: 0.25μm), με το ακόλουθο θερμικό πρόγραμμα: από τους 60 °C (5 min) μέχρι τους 280 °C, με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 4 °C/min. Ο ενέσιμος όγκος κάθε δείγματος ήταν 1μl και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο ήλιο (1.0ml/min).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών βασίστηκε στον ολικό αριθμό θραυσμάτων (total icon count) των μεταβολιτών, όπως αυτά ανιχνεύτηκαν από το φασματογράφο μάζας. Η ταυτοποίηση των χημικών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης κάθε συστατικού (Rt) και με υπολογισμό των συντελεστών KI (Kovats Index) σύμφωνα με την εργασία των Van de Dool et al. (1963), σε σχέση με τους χρόνους κατακράτησης πρότυπων υδρογονανθράκων (C9-C25) στην ίδια στήλη με το ίδιο θερμικό πρόγραμμα, καθώς και με βάση τα φάσματα μάζας, με τη βοήθεια των βιβλιοθηκών Wiley library

Spectra και NIST/NBS (Massada, 1976). Τα πειραματικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας (Adams, 2017).

4.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.4.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Τα εκχυλίσματα κυκλοεξανίου, αιθανόλης 96° και 60° καθώς και ο χυμός από τους καρπούς μελετήθηκαν ως προς το χημικό τους φορτίο και παρουσιάζονται με τη μορφή μονοδιάστατων φασμάτων. Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε Φασματογράφο Bruker DRX 400 (399.95 MHz για ^{1}H-NMR) και Φασματογράφο Bruker AC 200 (200.13 MHz για ^{1}H-NMR και 50.3 MHz για ^{13}C-NMR) με τους ακόλουθους διαλύτες:

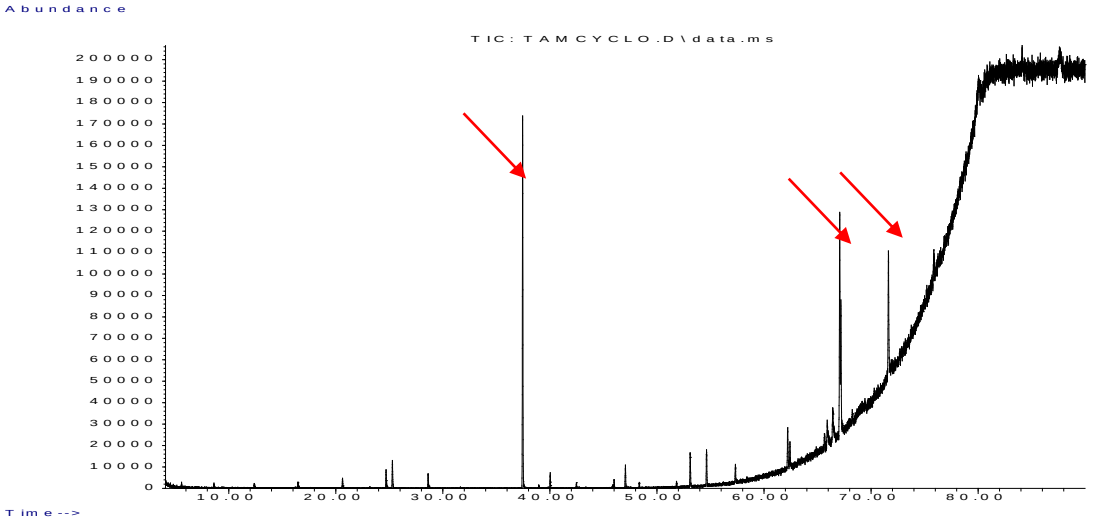
- $CDCl_3$ δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (7.24 ppm για ^{1}H-NMR και 77.0 ppm για ^{13}C-NMR) και
- CD_3OD δίχως εσωτερικό πρότυπο, λαμβάνοντας το σήμα του διαλύτη ως αναφορά (3.31 ppm για ^{1}H-NMR και 49.0 ppm για ^{13}C-NMR).

Οι χημικές μετατοπίσεις εκφράζονται σε δ (ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hertz (Hz). Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική: ^{1}H-NMR (Proton nuclear magnetic resonance)

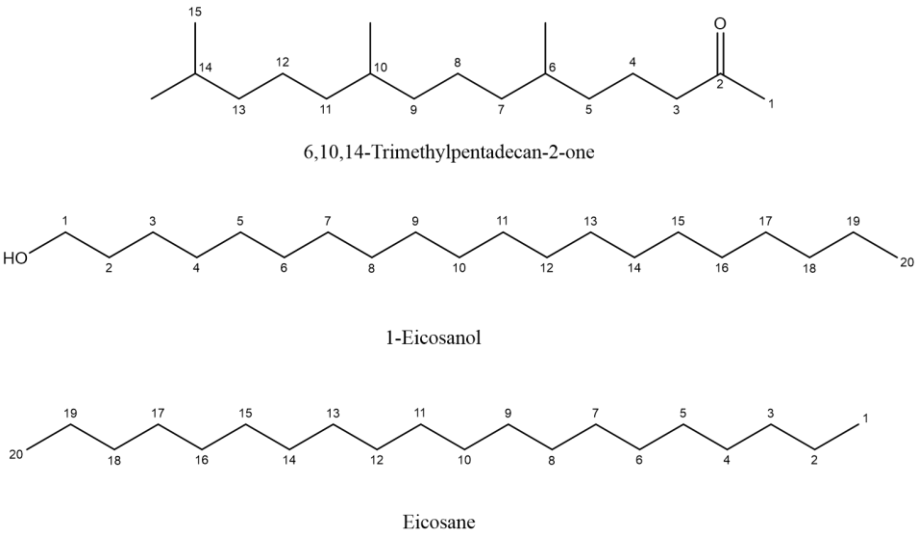
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΚΥΚΛΟΕΞΑΝΙΚΟ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με αέριο χρωματογραφία μάζας του κυκλοεξανικού δείγματος οδήγησε στη ταυτοποίηση των (3) κυριότερων συστατικών. Σε υψηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν οι ουσίες 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one (47.19%), 1-Eicosanol (32.50%) και Eicosane (20.31%) όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 18 (Χρωματογράφημα κυκλοεξανικού εκχυλίσματος). Παρακάτω (Εικόνα 19) παρουσιάζονται οι δομές των ενώσεων αυτών.



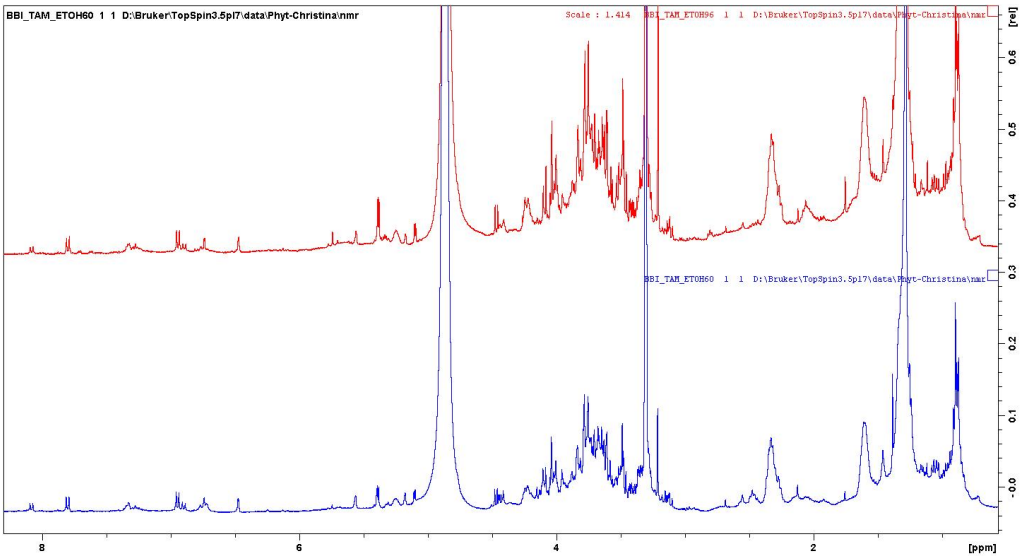
Εικόνα 18 Χρωματογράφημα κυκλοεξανικού εκχυλίσματος



Εικόνα 19 Δομές κύριων συστατικών του κυκλοεξανικού δείγματος μέσω ανάλυση GC-MS

5.2 ΑΙΘΑΝΟΛΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

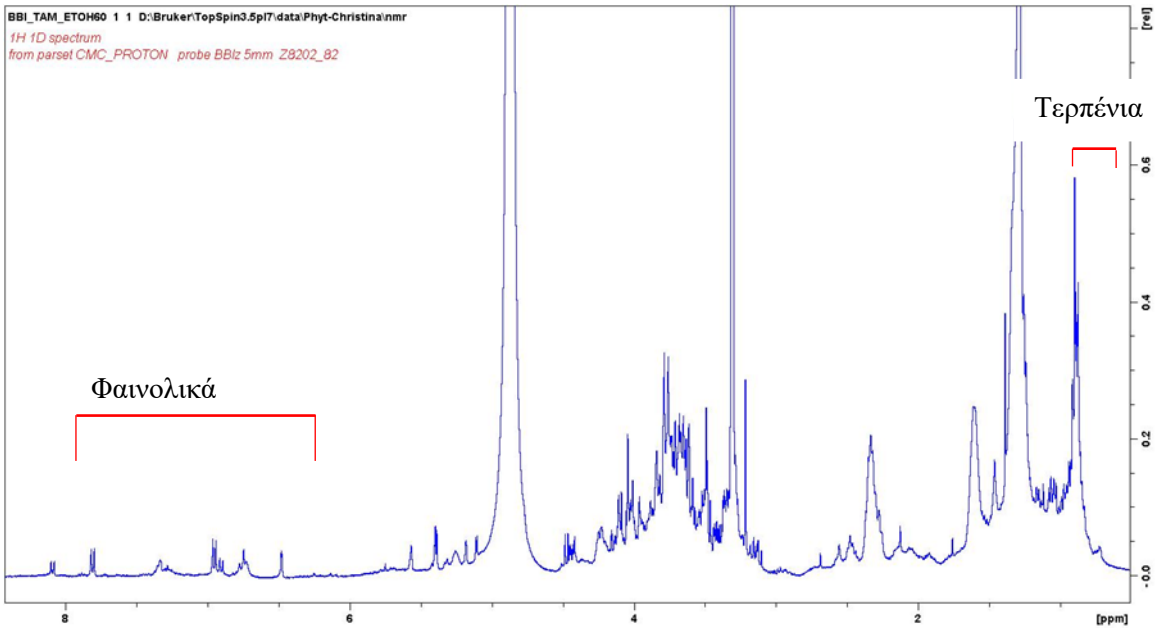
Η φασματοσκοπική εξέταση μέσω ^{1}H NMR όλων των εκχυλισμάτων έδειξε ότι τα εκχυλίσματα αιθανόλης 96° και αιθανόλης 60° ήταν παρόμοια ως προς την χημική τους σύσταση όπως αυτό φαίνεται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20. Φάσμα ^{1}H-NMR των εκχυλισμάτων αιθανόλης 96° (κόκκινο) και αιθανόλης 60° (μπλε) (MeOD, 400 MHz)

Από το ^{1}H-NMR του εκχυλίσματος αιθανόλης 60° συμπεραίνουμε ότι είναι πλούσιο σε τερπενικές ενώσεις που φέρουν μεθύλια τα οποία συντονίζονται σε υψηλά πεδία σε δ^{H} 0.80 έως δ^{H} 1.40. Βάση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης όπως προκύπτει από την δρογοχημεία του φυτού μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι κορυφές αυτές αποδίδονται στα πρωτόνια των μεθυλίων τριτερπενίων και ιδιαίτερα τριτερπενικών σαπωνίνων που εκχυλίζονται σε πιο πολικά κλάσματα όπως αυτό της αλκοόλης 60° (Εικόνα 21)

Αντίστοιχα, σε χαμηλότερα πεδία, στην περιοχή δ^{H} 6.50 εως δ^{H} 8.10 συντονίζονται τα πρωτόνια των φαινολικών ενώσεων του εκχυλίσματος αιθανόλης 60°. Σε αυτήν την περιοχή του φάσματος είναι ευδιάκριτα τα παράγωγα καμφερόλης και απιγενίνης που φέρουν δύο διπλές κορυφές σε δ^{H} 8.09/ 6.90 και δ^{H} 7.80/ 6.95 με σταθερά σύζευξης ≈ 8Hz (πρωτόνια πάρα υποκατάστασης του Β δακτυλίου των φλαβονοειδών). Οι παρουσία αυτών των παραγώγων επιβεβαιώνεται και από τη δρογοχημεία (Εικόνα 21).



Εικόνα 21 Φάσμα ^{1}H-NMR του εκχυλίσματος αιθανόλης 60° (MeOD, 400 MHz)

ΜΕΡΟΣ Β: ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΚΜΗΣ

ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Για το μοντέλο πρόκλησης βλαβών ακνεϊκού τύπου στους μύες έγινε εκτενής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, όπως περιεγράφηκε και παραπάνω. Αποφασίστηκε να εφαρμοστεί το μοντέλο ενδοδερμικής ένεσης βακτηριακού εναιωρήματος *Cutibacterium acnes* στη ράχη των μυών. Με την καθοδήγηση μικροβιολόγου, αποφασίστηκε επίσης για την πραγματοποίηση του μοντέλου, να γίνει συνδυασμός των πρωτοκόλλων που αναφέρονται από τους Jang *et al.* και Kolar *et al.* (Jang et al., 2015; Kolar et al., 2019).

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 45* θηλυκοί μύες, ηλικίας 7 έως 13 εβδομάδων, οι οποίοι χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες:

ΟΜΑΔΑ 1 7 μύες	SKH-hr1 Μάρτυρες: ενδοδερμική ένεση με ζωμό BHI
ΟΜΑΔΑ 2 9 μύες	SKH-hr1 Ακμή: ενδοδερμική ένεση με βακτηριακό εναιώρημα *C. acnes*
ΟΜΑΔΑ 3 7 μύες	SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες: ενδοδερμική ένεση με ζωμό BHI
ΟΜΑΔΑ 4 8 μύες	SKH-hr2 (καφέ) Ακμή: ενδοδερμική ένεση με βακτηριακό εναιώρημα *C. acnes*
ΟΜΑΔΑ 5 7 μύες	SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες: ενδοδερμική ένεση με ζωμό BHI
ΟΜΑΔΑ 6 7 μύες	SKH-hr2+ApoE Ακμή: ενδοδερμική ένεση βακτηριακό εναιώρημα *C. acnes*

*Ο αρχικός αριθμός μυών που είχε υπολογιστεί για το πείραμα ήταν 42 (14 μύες από κάθε είδος, 7 μύες σε κάθε ομάδα). Ωστόσο, επειδή το μοντέλο πρόκλησης ακμής δεν είχε ξαναδοκιμαστεί στο εργαστήριο, αποφασίστηκε να συμπεριληφθούν επιπλέον μύες στις ομάδες που θα λάμβαναν βακτηριακό εναιώρημα. Ο σκοπός ήταν να υπάρχουν αρκετοί μύες ώστε κάποιοι να θυσιαστούν στις πρώτες μέρες του πειράματος για να γίνει ιστοπαθολογική αξιολόγηση των πρώιμων βλαβών. Έτσι, η Ομάδα 2 είχε 2 επιπλέον μύες και η Ομάδα 4 είχε 1 επιπλέον μυ. Στην Ομάδα 6 δε συμπεριλήφθηκαν επιπλέον ζώα λόγω έλλειψης θηλυκών μυών SKH-hr2+ApoE στην κατάλληλη ηλικία.

Πρώτα πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες *C. acnes*, μέχρι να προκύψει καλλιέργεια με επαρκή ανάπτυξη για την παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος. Το σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας που ακολούθησε, η οποία διάρκεσε συνολικά 10 ημέρες, περιγράφεται παρακάτω.

Ημέρα 0

- Λήψη φωτογραφιών (ψηφιακών και Antera 3D)
- Μετρήσεις των παραμέτρων: βάρος, θερμοκρασία, TEWL, σμήγμα, pH, ενυδάτωση, μελανίνη, ερύθημα, πάχος δέρματος
- Λήψη αίματος με κόψιμο της άκρης της ουράς των μυών για μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας και γλυκόζης
- Παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος
- Ενδοδερμικές ενέσεις στη ράχη των μυών

Ημέρες 1-3

- Λήψη φωτογραφιών (ψηφιακών και Antera 3D)
- Αξιολόγηση της κλινικής εικόνας των μυών

Ημέρα 4

- Λήψη φωτογραφιών (ψηφιακών και Antera 3D)
- Αξιολόγηση της κλινικής εικόνας των μυών
- Μετρήσεις των παραμέτρων: βάρος, θερμοκρασία, TEWL, σμήγμα, pH, ενυδάτωση, μελανίνη, ερύθημα, πάχος δέρματος
- Λήψη αίματος με κόψιμο της άκρης της ουράς των μυών για μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας και γλυκόζης
- Ευθανασία 4 μυών (2 μύες από την Ομάδα 2, 1 μυς από την Ομάδα 4 και 1 μυς από την ομάδα 6) για τη λήψη δείγματος από τις βλάβες για ιστοπαθολογική αξιολόγηση

Ημέρες 5-8

- Λήψη φωτογραφιών (ψηφιακών και Antera 3D)
- Αξιολόγηση της κλινικής εικόνας των μυών

Ημέρα 9

- Λήψη φωτογραφιών (ψηφιακών και Antera 3D)
- Αξιολόγηση της κλινικής εικόνας των μυών
- Μετρήσεις των παραμέτρων: βάρος, θερμοκρασία, TEWL, σμήγμα, pH, ενυδάτωση, μελανίνη, ερύθημα, πάχος δέρματος

- Λήψη αίματος από τις παρειές των μυών για μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας, γλυκόζης, χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων.
- Λήψη πλάσματος για ανάλυση λιπιδικής υπεροξείδωσης
- Ευθανασία μυών για τη λήψη δείγματος από τις βλάβες για ιστοπαθολογική αξιολόγηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΜΥΕΣ

Οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία εκτρέφονταν και στεγάζονταν στην Εγκατάσταση Πειραματισμού Μικρών Ζωικών Προτύπων (κωδικός εγκατάστασης: EL 25 BIO 06), στη μονάδα Δερματοφαρμακολογίας-Κοσμητολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν 45 θηλυκοί άτριχοι μύες, τριών διαφορετικών ειδών: SKH-hr1, SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE (υβριδικό είδος με αυξημένη χοληστερόλη, το οποίο δημιουργήθηκε και εκτρέφεται στη μονάδα). Οι μύες ήταν ηλικίας 7-13 εβδομάδων και βάρους 20-30g.

Στη Μονάδα Μικρών Ζωικών Προτύπων της Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ τηρούνται όλες οι προδιαγραφές του ΠΔ 56/2013 που αφορούν στη φροντίδα, την παρακολούθηση και τις εν γένει συνθήκες διαβίωσης των ζώων. Τα ζώα διαβίωναν σε ειδικούς κλωβούς (Tecniplast) διαστάσεων σύμφωνων με την κείμενη Νομοθεσία, εντός των οποίων υπήρχε κατάλληλη καθαρή στρωμνή και απρόσκοπτη πρόσβαση σε καθαρό νερό και τροφή 24 ώρες το εικοσιτετράωρο. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας (θερμοκρασία: 22-25°C και υγρασία 35-55%) είχαν επιλεγεί και διατηρούνταν έτσι ώστε να δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον διαβίωσης για τους συγκεκριμένους μύες όπως προβλέπεται από την αντίστοιχη ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία, αλλά και για να διασφαλίζουν την αξιοπιστία των μετρήσεων του πειράματος. Ο φωτισμός λειτουργούσε με χρονοδιακόπτη και οι κύκλοι φωτός είχαν διάρκεια 12 ώρες. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε εγκρίθηκαν από την επιτροπή έγκρισης πρωτοκόλλων (αριθμός πρωτοκόλλου αίτησης 822470/12-12-2019).

Πριν από την έναρξη του πειράματος προηγήθηκε περίοδος εγκλιματισμού στο θάλαμο πειραματισμού, διάρκειας 14 ημερών. Στην περίοδο αυτή, το δέρμα των μυών ελέγχθηκε οπτικά για τυχόν πληγές, ουλές ή βλάβες άλλης φύσεως, που πιθανώς να δυσχέραιναν την ομαλή διεξαγωγή του πειράματος. Ταυτόχρονα, αλλά και κατά τη διάρκεια του πειράματος, γινόταν αξιολόγηση της γενικής υγείας των μυών, με παρακολούθηση παραμέτρων όπως το βάρος, η θερμοκρασία, η κατανάλωση τροφής και η συμπεριφορά.

6.2 ΥΛΙΚΑ

6.2.1 Καλλιέργειες

- Λυοφιλοποιημένο *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian (ATCC® 6919™)
- Λυοφιλοποιημένο *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian (ATCC® 11827™)
- Τρυβλία για αναερόβιες καλλιέργειες (Anaerobe CDC Blood Agar 90mm, Bioprepare®)
- Τρυβλία για αερόβιες καλλιέργειες (Chocolate Agar 90mm, Bioprepare®)
- Ζωμοί για αναερόβιες καλλιέργειες (Brain Heart Infusion Broth 5mL, Bioprepare®)
- Αεροστεγής φιάλη για αναερόβιες καλλιέργειες (Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5L,Thermo Scientific™)
- Φάκελοι για τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών (Oxoid™ AnaeroGen™ 2.5L Sachet,Thermo Scientific™)
- Δείκτες για την επιβεβαίωση αναερόβιων συνθηκών (Oxoid™ Resazurin Anaerobic Indicator, Thermo Scientific™)
- Επωαστικός κλίβανος (UM 200 Laboratory Oven, Memmert)
- Vortex (MS 1 Shaker, IKA®)
- Σύριγγες 30Gx1/2” (Neoject 0.5mL και 1.0mL, 30Gx1/2”, Neomedic)
- Πλαστικοί κρικοφόροι στυλεοί μιας χρήσης
- Ψαλίδι
- Λαβίδα
- Αναπτήρας

6.2.2 Παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος

- Σύριγγες 30Gx1/2” (Neoject 0.5mL και 1.0mL, 30Gx1/2”, Neomedic)
- Φιαλίδια Falcon (Corning™ Falcon™ 15mL Conical Centrifuge Tubes, Fischer Scientific™)
- Φιαλίδια Eppendorf (Eppendorf Tubes® 1.5mL, Eppendorf)
- Φυγόκεντρος (Mini centrifuge LLG-uniCFUGE 5, LLG® Labware)
- Vortex (MS 1 Shaker, IKA®)
- Αυτόκαυστο (Autoclave Mini, PBI)

6.2.3 Πρόκληση αναισθησίας

- Εμπορικό σκεύασμα Κεταμίνης (Ketamidor, ketamine HCL 100 mg/mL, Neocell Pharmaceuticals)
- Εμπορικό σκεύασμα Ξυλαζίνης (Xylapan, xylazine HCL 20 mg/mL, Vetoquinol)
- Σύριγγες 30Gx1/2” (Neoject 0.5mL και 1.0mL, 30Gx1/2”, Neomedic)
- Υάλινο φιαλίδιο

6.2.4 Ενδοδερμικές ενέσεις

- Σύριγγες 30Gx1/2” (Neoject 0.5mL και 1.0mL, 30Gx1/2”, Neomedic)
- Βακτηριακό εναιώρημα *C. acnes*
- Ζωμοί για αναερόβιες καλλιέργειες (Brain Heart Infusion Broth 5mL, Bioprepare®)
- Επιτραπέζιος μεγεθυντικός φακός πάγκου εργασίας
- Ενέσιμο ύδωρ (ΒΙΟΣΕΡ)
- Βαμβάκι

6.2.5 Ποσοτικοποίηση του βακτηριακού εναιωρήματος

- Υγρή καλλιέργεια *C. acnes*
- Vortex (MS 1 Shaker, IKA®)
- Φασματοφωτόμετρο (UV-PharmaSpec1700, SHIMADZU) και κυψελίδες
- Τρυβλία για αναερόβιες καλλιέργειες (Anaerobe CDC Blood Agar 90mm, Bioprepare®)
- Τρυβλία για αερόβιες καλλιέργειες (Chocolate Agar 90mm, Bioprepare®)
- Ζωμοί για αναερόβιες καλλιέργειες (Brain Heart Infusion Broth 5mL, Bioprepare®)
- Επωαστικός κλίβανος (UM 200 Laboratory Oven, Memmert)
- Πλαστικοί κρικοφόροι στυλεοί μιας χρήσης
- Ψηφιακή Φωτογραφική μηχανή (Nikon D5100 με φακό Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF Aspherical)

6.2.6 Μετρήσεις

- Όργανο μέτρησης εμβιομηχανικών παραμέτρων του δέρματος (Multi Probe Adapter MPA 6®, Courage + Khazaka Electronic), με τους αισθητήρες:
  - Tewameter®, για τη μέτρηση της άδηλης απώλειας ύδατος
  - Sebumeter®, για τη μέτρηση του σμήγματος
  - Skin-pH-meter®, για τη μέτρηση του pH
- Corneometer® CM 820 (Courage + Khazaka Electronic), όργανο μέτρησης της ενυδάτωσης
- Mexameter® MX18 (Courage + Khazaka Electronic), όργανο μέτρησης της μελανίνης και της ερυθρότητας
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας ενός δεκαδικού ψηφίου (Precision balance 440-45, Kern)
- Μετρητής σακχάρου (GlucoMen® areo sensor, A. Menarini Diagnostics)
- Ταινίες μέτρησης γλυκόζης, (GlucoMen areo® , A. Menarini Diagnostics)
- Χειρουργικό ψαλίδι
- Βελόνες (Sterile disposable needle, 18Gx1 1/2”, Berpu®)
- Συσκευή μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας (e-BQC lab Oxidative stress portable device, BioQuoChem)
- Ταινίες μέτρησης αντιοξειδωτικής ικανότητας (e-BQC disposable strips, BioQuoChem)

- Συσκευή μέτρησης χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων (Accutrend GCT, Roche)
- Ταινίες μέτρησης χοληστερόλης (Accutrend Cholesterol, Roche)
- Ταινίες μέτρησης χοληστερόλης (Accutrend Triglycerides, Roche)
- Απιονισμένο ύδωρ
- Φιαλίδια Eppendorf (Eppendorf Tubes® 1.5mL, Eppendorf)
- Φυγόκεντρος (Mini centrifuge LLG-uniCFUGE 5, LLG® Labware)
- Ψηφιακό θερμόμετρο υπερύθρων (Microlife)
- Ψηφιακό παχύμετρο (Powerfix Electronic digital Caliper 150 mm)
- Ψηφιακή Φωτογραφική μηχανή (Nikon D5100 με φακό Nikon Nikkor AF-S Micro 60 mm f/2.8 G ED, SWMED IF Aspherical)
- Τρισδιάστατη φωτογραφική μηχανή (Antera 3D® Skin analysis camera, Miravex)

6.2.7 Ευθανασίες

- Εμπορικό διάλυμα σεβοφλουρανίου (Sevorane 250mLx100% w/w, Abbott)
- Υάλινος δοκιμαστικός σωλήνας
- Βαμβάκι

6.2.8 Λογισμικά

- Miravex Antera 3D CS, για την επεξεργασία των φωτογραφιών Antera 3D
- MPA CTplus και CK Multi Probe, για τις μετρήσεις με το όργανο MPA 6
- NIH imageJ, για τη μέτρηση του αριθμού αποικιών στα τρυβλία
- IBM SPSS Statistics 26, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων
- Graphpad Prism 8, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

6.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

6.3.1 Καλλιέργειες

Για την πρόκληση βλαβών ακνεϊκού τύπου στους μύες, επιλέχθηκαν βάσει της βιβλιογραφίας, τα στελέχη *Cutibacterium acnes* ATCC® 11827™ και ATCC® 6919™, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο στο παρελθόν στο συγκεκριμένο μοντέλο. Τα στελέχη προμηθεύτηκαν απευθείας από την American Type Culture Collection (ATCC), και φυλάχθηκαν σε συνθήκες σύμφωνα με τις οδηγίες τους (στο ψυγείο σε θερμοκρασία 2-8°C) μέχρι την έναρξη της περιόδου πειραματισμού.

Με την έναρξη του εγκλιματισμού των μυών στο χώρο του πειραματισμού, άρχισαν και οι καλλιέργειες του μικροοργανισμού που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος που χρησιμοποιήθηκε στους μύες. Οι αρχικές καλλιέργειες έγιναν με τη συνδρομή μικροβιολόγου. Καλλιεργήθηκαν αρχικά και τα δύο στελέχη, για να παρατηρηθεί η μορφολογία τους και τα χαρακτηριστικά τους όπως ο χρόνος επώασης, ώστε να αποφασιστεί στη συνέχεια ποιο στέλεχος θα χρησιμοποιούνταν στους μύες.

Για την έναρξη των καλλιεργειών των πρότυπων στελεχών, τα οποία βρίσκονταν υπό τη μορφή λυοφιλοποιημένης κόνεως, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της ATCC (American Type Culture Collection (ATCC), 2020a, 2020b), χρησιμοποιώντας όμως διαφορετικό θρεπτικό μέσο από τα προτεινόμενα. Χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο ο ζωμός Brain heart infusion (BHI), που αναφέρεται στη βιβλιογραφία για την καλλιέργεια του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, έχει χρησιμοποιηθεί σε μοντέλο ακμής σε μύες (Kolar et al., 2019) και είναι εύκολα διαθέσιμος. Ο ζωμός BHI είναι ένας θρεπτικός ρυθμιστικός ζωμός, ο οποίος περιέχει εκχύλισμα από ιστό εγκεφάλου και καρδιάς και πεπτόνες που παρέχουν πρωτεΐνες και άλλα θρεπτικά συστατικά, απαραίτητα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Για τις στερεές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με αιματούχο άγαρ για αναερόβιους μικροοργανισμούς.

Αρχικά, έγινε μεταφορά με σύριγγα, σε άσηπτες συνθήκες, περίπου 0.5 mL ζωμού στα φιαλίδια με τα πρότυπα στελέχη *C. acnes* ώστε να διαβραχεί πλήρως η λυοφιλοποιημένη κόνις. Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex μέχρι την ομοιόμορφη κατανομή της κόνεως στο ζωμό. Στη συνέχεια έγινε ποσοτική μεταφορά με σύριγγα, από το φιαλίδιο σε φιάλη με 5 mL ζωμού, έγινε ανάδευση με vortex και τέλος η καλλιέργεια αφέθηκε σε ηρεμία για 15 λεπτά. Από την καλλιέργεια έγινε επίσης μεταφορά με ειδικό κρικοφόρο στυλέο, σε τρυβλία, για να γίνει έλεγχος της μορφολογίας του μικροοργανισμού.

Στη συνέχεια, καθώς το *C. acnes* αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες, τα τρυβλία και οι ζωμοί μεταφέρθηκαν σε ειδικό δοχείο. Στο δοχείο, το οποίο κλείνει αεροστεγώς, τοποθετήθηκε ειδικός φάκελος με καταλύτη που καταναλώνει το οξυγόνο, καθώς και κατάλληλος δείκτης για την επιβεβαίωση της δημιουργίας αναερόβιων συνθηκών. Το δοχείο διατηρεί τις συνθήκες μέχρι την επόμενη φορά που θα ανοιχθεί, οπότε και απαιτείται αλλαγή των αναλώσιμων. Είναι επίσης καίριας σημασίας, στις υγρές καλλιέργειες, τα πώματα των φιαλών να μην κλείνουν ερμητικά, ώστε οι

αναερόβιες συνθήκες που επικρατούν στο δοχείο να υπάρχουν και στο εσωτερικό της φιάλης με την καλλιέργεια.

Το δοχείο τοποθετήθηκε σε κλίβανο επώασης ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C. Στον ίδιο κλίβανο τοποθετήθηκε και τρυβλίο με σοκολατούχο άγαρ, σε αερόβιες συνθήκες, στο οποίο έγινε μεταφορά από τις καλλιέργειες, με κρικοφόρο στυλεό. Αυτό έγινε για να επιβεβαιωθεί ότι τα αρχικά, τυποποιημένα στελέχη *C. acnes* δεν ήταν επιμολυσμένα με κάποιον αερόβιο μικροοργανισμό. Τέλος, οι καλλιέργειες αφέθηκαν να επωαστούν.

Στις 24 ώρες από την έναρξη των καλλιεργειών έγινε έλεγχος του τρυβλίου που βρισκόταν σε αερόβιες συνθήκες και επιβεβαιώθηκε η απουσία ανάπτυξης αερόβιου μικροοργανισμού. Έγινε επίσης έλεγχος των αναερόβιων καλλιεργειών και παρατηρήθηκε (μέσω παρατήρησης της θολερότητας) ανάπτυξη στις υγρές καλλιέργειες, αλλά όχι στις στερεές. Στις 48 ώρες παρατηρήθηκε ανάπτυξη και στις στερεές καλλιέργειες, εντονότερη στο στέλεχος ATCC® 11827™. Στις 72 ώρες η ανάπτυξη και των δύο στελεχών στα τρυβλία έφτασε στο μέγιστο, ενώ η μορφολογία τους ήταν παρόμοια, με μικρές όμως διαφορές. Στο διάστημα αυτό, οι υγρές καλλιέργειες συνέχισαν να αναπτύσσονται, με τη θολερότητά τους να γίνεται πιο έντονη. Μετά τις 72 ώρες, στις στερεές καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε μεγάλη ανάπτυξη ενώ οι υγρές συνέχισαν να θολώνουν. Συμπεράναμε λοιπόν πως ο βέλτιστος χρόνος επώασης του μικροοργανισμού στο τρυβλίο είναι οι 72 ώρες (3 ημέρες), ενώ σε ζωμό η ανάπτυξη συνεχίζεται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Τις επόμενες ημέρες, στην αρχική καλλιέργεια του στελέχους ATCC® 11827™ σε ζωμό, παρατηρήθηκε ιδιαίτερα έντονη θολερότητα, δυσανάλογη με τη θολερότητα του στελέχους ATCC® 6919™. Αυτό πιθανολογήθηκε ότι οφειλόταν σε κάποια επιμόλυνση, η οποία επιβεβαιώθηκε με καλλιέργεια που έγινε σε αερόβιες συνθήκες αλλά και με χρώση Gram, που πραγματοποιήθηκε εξωτερικά από μικροβιολόγο και έδειξε παρουσία *Staphylococcus epidermidis*. Η αρχική καλλιέργεια του στελέχους ATCC® 6919™ ελέγχθηκε με τους ίδιους τρόπους και δεν παρατηρήθηκε καμία επιμόλυνση. Αποφασίστηκε επομένως η πειραματική διαδικασία να συνεχιστεί με το στέλεχος ATCC® 6919™.

Επόμενο βήμα ήταν από τις αρχικές καλλιέργειες να γίνουν δοκιμές μεταφοράς σε νέο θρεπτικό υλικό. Σκοπός ήταν να καλλιεργηθεί κάποιες φορές το βακτήριο, που βρισκόταν σε λυοφιλοποιημένη μορφή, ώστε να ενεργοποιηθεί αλλά και να διατηρηθούν οι καλλιέργειες έως το πέρας του διαστήματος εγκλιματισμού των μυών. Έγιναν λοιπόν διάφορες καλλιέργειες, είτε με μεταφορά 0,5 mL υγρής καλλιέργειας σε νέα φιάλη με ζωμό, είτε με μεταφορά μεμονωμένων αποικιών του βακτηρίου από στερεή καλλιέργεια, με τη χρήση κρικοφόρου στυλεού, σε νέα φιάλη με ζωμό. Οι διαδικασίες για τις καλλιέργειες έγιναν όπως περιεγράφηκαν και παραπάνω.

Όταν πλησίαζε το τέλος της περιόδου εγκλιματισμού των μυών, είχε ληφθεί μέριμνα ώστε να υπάρχουν υγρές καλλιέργειες σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Αυτό έγινε ώστε να υπάρχει η δυνατότητα επιλογής

της πιο κατάλληλης καλλιέργειας για την παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος που θα χρησιμοποιούνταν στους μύες.

6.3.2 Παρασκευή βακτηριακού εναιωρήματος

Την ημέρα έναρξης του πειράματος, ελέγχθηκαν οπτικά οι υγρές καλλιέργειες ως προς τη θολερότητά τους, και λήφθηκε 0.5 mL με σύριγγα από τους 4 περισσότερο θολούς για να γίνει μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού φωτός. Η ποσότητα αυτή αραιώθηκε με 1.5 mL φρέσκου ζωμού και προέκυψαν έτσι δείγματα των 2 mL από κάθε καλλιέργεια (αναλογία καλλιέργειας-ζωμού 1:3). Αυτό έγινε γιατί για τη μέτρηση απαιτούνται τουλάχιστον 2 mL δείγματος, οπότε αν γινόταν απευθείας μέτρηση της θολερότητας στην καλλιέργεια, θα καταναλωνόταν μεγάλη ποσότητα και δε θα έμενε αρκετή ώστε να γίνει εφαρμογή στους μύες.

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε μήκος κύματος 600nm, και χρησιμοποιήθηκε ζωμός BHI ως τυφλό δείγμα (blank) για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου. Η μετρητική αυτή μέθοδος (OD_{600}, Optical Density 600 nm), χρησιμοποιείται ευρέως στη μικροβιολογία για τη συσχέτιση της οπτικής θολερότητας (που εκφράζεται μέσω της μετρούμενης απορρόφησης) με την ποσότητα ζωντανών μικροοργανισμών που υπάρχουν στην καλλιέργεια (Campbell, 2010).

Η μέτρηση απορρόφησης που λήφθηκε για κάθε δείγμα πολλαπλασιάστηκε x4 (λόγω της αραίωσης της καλλιέργειας) και προέκυψε έτσι η πραγματική οπτική πυκνότητα για καθεμιά από τις υποψήφιες καλλιέργειες. Στη συνέχεια, έγινε επιλογή της καλλιέργειας που θα χρησιμοποιούνταν για εφαρμογή στους μύες. Κριτήρια επιλογής ήταν:

- Η πυκνότητα της καλλιέργειας. Στη βιβλιογραφία, τα βακτηριακά εναιωρήματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή του μοντέλου ακμής είναι αρκετά πυκνά, αλλά και ο αριθμός των μυών στα αντίστοιχα πειράματα είναι μικρός. Στη δική μας περίπτωση, ο αριθμός μυών ήταν αρκετά μεγάλος, οπότε η καλλιέργεια έπρεπε να είναι αρκετά πυκνή ώστε κάθε μυς να πάρει επαρκή ποσότητα βακτηρίου ώστε να εμφανίσει βλάβη.
- Ο χρόνος επώασης της καλλιέργειας. Από την παρατήρηση των δοκιμαστικών καλλιεργειών αλλά και από τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε ζωμό συνεχίζεται μέχρι και τις 5 ημέρες μετά την έναρξη τις καλλιέργειας (Hall et al., 1994). Η καλλιέργεια επομένως έπρεπε να είναι $\leq$5 ημέρων για να διασφαλιστεί ότι το βακτήριο βρίσκεται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ή τουλάχιστον σε μια σταθερή κατάσταση, ώστε η μέτρηση OD_{600} που λήφθηκε να μπορεί να αντιστοιχιστεί σε αριθμό ζωντανών βακτηρίων.

Επιλέχθηκε λοιπόν μία καλλιέργεια με $OD_{600} \cong 1.5$, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιστοιχεί περίπου σε τάξη μεγέθους 10^9 CFU/mL καλλιέργειας (Tax et al., 2016). Η καλλιέργεια αυτή είχε προκύψει ως εξής:

1. Το πρωτοκαλλιέργημα (δηλαδή η αρχική καλλιέργεια του τυποποιημένου βακτηρίου) αραιώθηκε (1:10) σε ζωμό.
2. Η καλλιέργεια αυτή επωάστηκε για 5 ημέρες.
3. Η επωασμένη καλλιέργεια αραιώθηκε (1:10) σε ζωμό.
4. Η τελική καλλιέργεια επωάστηκε για 3 ημέρες έως τη στιγμή της μέτρησης.

Η καλλιέργεια που επιλέχθηκε, μεταφέρθηκε ποσοτικά (4.2 mL) σε κατάλληλο αποστειρωμένο σωλήνα Falcon. Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 5400 rpm, για 5 λεπτά η καθεμία. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση έγινε προσεκτική απόρριψη του υπερκείμενου υγρού με σύριγγα και προσθήκη φρέσκου ζωμού. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, στο σφαιρίδιο των βακτηρίων που προέκυψε έγινε προσθήκη 0.6 mL φρέσκου ζωμού, όγκος υπολογισμένος ώστε να επαρκεί για όλες τις ενέσεις στους μύες αλλά να υπάρχει και μικρή περίσσεια για τυχόν απώλειες.

Από την καλλιέργεια που επιλέχθηκε έγινε επίσης μεταφορά με κρικοφόρο στυλεό σε τρυβλίο με σοκολατούχο άγαρ, που τοποθετήθηκε σε αερόβιες συνθήκες, ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία επιμολύνσεων. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη μικροοργανισμού, ούτε στις 24 ούτε στις 48 ώρες.

6.3.3 Πρόκληση αναισθησίας

Για να πραγματοποιηθούν οι ενδοδερμικές ενέσεις ήταν απαραίτητο οι μύες να αναισθητοποιηθούν. Για την αναισθησία παρασκευάστηκε μίγμα διαλυμάτων κεταμίνης-ξυλαζίνης. Η κατάλληλη δοσολογία για τους μύες είναι 100 mg κεταμίνης/kg και 7 mg ξυλαζίνης/kg. Τα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα είχαν συγκέντρωση 100 mg κεταμίνης /mL και 7 mg ξυλαζίνης/mL, επομένως παρασκευάστηκε μίγμα από τα παραπάνω διαλύματα σε αναλογία 3:1. Η αναισθησία χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση και η δοσολογία για κάθε μυ υπολογίστηκε ανάλογα με το βάρος του, όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 16).

Πίνακας 16 Δοσολογία αναισθητικού μείγματος που χορηγήθηκε στους μύες, σύμφωνα με το βάρος τους

Βάρος μυός (g)	Ποσότητα αναισθητικού μίγματος που χορηγήθηκε (mL)
20g	0.01
25g	0.02
30g	0.03

6.3.4 Ενδοδερμικές ενέσεις

Η αναισθησία στους μύες έγινε ανά πειραματική ομάδα, ώστε να δημιουργείται επαρκές χρονικό διάστημα να πραγματοποιηθούν όλες οι ενδοδερμικές ενέσεις στη συγκεκριμένη ομάδα. Για την αποφυγή μεταφοράς μικροοργανισμών από τον ένα μυ στον άλλο, για κάθε ενδοδερμική ένεση χρησιμοποιήθηκε καινούρια σύριγγα. Χρησιμοποιήθηκε επίσης λάμπα με μεγεθυντικό φακό για την

καλύτερη απεικόνιση της περιοχής της ένεσης, η οποία απαιτεί λεπτό χειρισμό. Πριν από κάθε ένεση η πλάτη του μυός καθαριζόταν με βαμβάκι εμποτισμένο με ενέσιμο ύδωρ.

Η μεθοδολογία της ενδοδερμικής ένεσης που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Ως σημείο της ένεσης ορίστηκε η μέση της ράχης (ανάμεσα στα μπροστινά και στα πίσω πόδια).
2. Το δέρμα του μυός σηκώνεται και διατηρείται διπλωμένο και σταθερό ανάμεσα στο δείκτη και τον αντίχειρα του ενός χεριού.
3. Η βελόνα της σύριγγας τοποθετείται (με το άνοιγμα προς τα πάνω και την αιχμηρή πλευρά προς τα κάτω) με ελάχιστη κλίση (σχεδόν παράλληλα με το δέρμα) στο σημείο της ένεσης.
4. Η βελόνα εισέρχεται στο δέρμα και σηκώνεται ελαφρά καθώς προχωρά ώστε να μένει σχεδόν παράλληλα με την επιφάνεια του δέρματος. Η βελόνα πρέπει να εισέλθει μέχρι ένα σημείο που να είναι ακόμα αισθητή η αντίσταση του δέρματος αλλά να υπάρχει και αρκετή απόσταση από το σημείο εισόδου ώστε να μην υπάρχουν απώλειες.
5. Ενίονται 20μL φρέσκου ζωμού BHI ή βακτηριακού εναιωρήματος *C. acnes*.
6. Καθώς εξέρχεται η βελόνα, ασκείται ήπια πίεση στο σημείο της ένεσης για την αποφυγή απωλειών.
7. Η επιτυχία της ένεσης επιβεβαιώνεται οπτικά από τη δημιουργία μιας ωχρής, τεταμένης περιοχής γύρω από το σημείο της ένεσης, η οποία παραμένει για αρκετά λεπτά.

Στις ομάδες μυών που έλαβαν βακτήριο, πριν από κάθε ένεση γινόταν καλή ανάμιξη του βακτηριακού εναιωρήματος με τη σύριγγα ώστε να διασφαλίζεται η ομοιόμορφη κατανομή και η ένεση ίδιας ποσότητας του βακτηρίου σε κάθε μυ.

6.3.5 Ποσοτικοποίηση βακτηριακού εναιωρήματος

Η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο OD_{600}, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το στέλεχος του βακτηρίου, το θρεπτικό μέσο, το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση κ.α., οπότε τα βιβλιογραφικά δεδομένα δεν μπορούσαν να εφαρμοστούν με ασφάλεια για τον υπολογισμό του αριθμού των βακτηρίων στο δικό μας πείραμα. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση OD_{600} που λήφθηκε για την καλλιέργεια που τελικά εφαρμόστηκε στους μύες, χρησιμοποιήθηκε μετά το πείραμα ώστε να γίνει ακριβής προσδιορισμός του αριθμού των βακτηρίων που έλαβε ο κάθε μυς και να μπορεί το πρωτόκολλο να είναι επαναλήψιμο.

Ακολουθώντας τη μεθοδολογία που περιεγράφηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν ξανά υγρές καλλιέργειες *C. acnes*, με συχνές δειγματοληψίες και μετρήσεις OD_{600}, μέχρι να φτάσει κάποια καλλιέργεια σε τιμή OD_{600}=1.5. Σε αυτή την καλλιέργεια έγιναν αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1000 και 1:10000 με φρέσκο ζωμό και από κάθε αραίωση μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα (50μL) σε τρυβλία τα οποία επωάστηκαν για 72 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες.

Στις 72 ώρες, λήφθηκαν φωτογραφίες από τη στερεή καλλιέργεια της αραίωσης η οποία εμφάνισε μετρήσιμο αριθμό σαφώς διαχωρισμένων αποικιών. Οι φωτογραφίες αυτές επεξεργάστηκαν σε ειδική

εφαρμογή (colony counter) του λογισμικού επεξεργασίας φωτογραφίας ImageJ για τη μέτρηση των αποικιών και η συγκέντρωση της αρχικής καλλιέργειας βρέθηκε ~**2.9 x 10^7 CFU/mL**, υπολογίζοντας προς τα πίσω τις αραιώσεις που έγιναν. Στο in vivo πείραμα στους μύες που προηγήθηκε χρησιμοποιήθηκαν 4.2 mL καλλιέργειας με OD_{600}=1.5, οπότε η συνολική ποσότητα βακτηρίων που απομονώθηκε από τις φυγοκεντρήσεις ήταν ~**1.2 x 10^8 CFU**. Η ποσότητα αυτή διαλύθηκε σε 0.6 mL φρέσκου ζωμού, όγκος υπολογισμένος ώστε να επαρκεί για 30 ενέσεις. Άρα η τελική συγκέντρωση της ένεσης που έλαβε κάθε μυς ήταν ~**4.1 x 10^7 CFU/20μL δηλαδή 2.0 x 10^6 CFU/μL.**

6.3.6 Ψηφιακές φωτογραφίες

Για τη λήψη ψηφιακών εικόνων χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή φωτογραφική μηχανή, με προσαρμοσμένο κατάλληλο φακό, η οποία βρισκόταν μόνιμα στερεωμένη κάθετα προς το αντικείμενο φωτογράφησης, ώστε κάθε φωτογραφία να λαμβάνεται από σταθερή, ίδια απόσταση (30 cm). Σαν υπόστρωμα τοποθετήθηκε πλαστικοποιημένο χαρτόνι μωβ χρώματος, για την ελαχιστοποίηση της αντανάκλασης. Στην περιοχή που φωτογραφιζόταν τοποθετήθηκε επίσης, στο ίδιο επίπεδο με τη ράχη των μυών, τετράγωνο αυτοκόλλητο γνωστών διαστάσεων (2x2 cm), ώστε να υπάρχει σε κάθε φωτογραφία μια κλίμακα αναφοράς.

6.3.7 Τρισδιάστατες φωτογραφίες

Η κάμερα Antera 3D® δημιουργήθηκε από το τμήμα Φυσικής του Trinity College στο Δουβλίνο και διατίθεται από την εταιρεία Miravex Ltd. Είναι ένα εύχρηστο και φορητό εργαλείο για ανάλυση φωτογραφιών που παρέχει μια πλήρη εικόνα του ανάγλυφου του δέρματος καθώς και πολλές μετρήσιμες παραμέτρους. Η Antera 3D® χρησιμοποιεί LED φως σε επτά διαφορετικά μήκη κύματος. Το φως αυτό πηγάζει από διάφορες κατευθύνσεις και η κάμερα χρησιμοποιεί πολύπλοκους αλγόριθμους, που υπολογίζουν τη διαφορά μεταξύ των γωνιών ανάκλασης. Κατασκευάζει έτσι τρισδιάστατες εικόνες που επιτρέπουν τη μέτρηση παραμέτρων του δέρματος όπως το βάθος και το μήκος των ρυτίδων, ο αριθμός και το μέγεθος των πόρων, οι ανυψώσεις και οι υφέσεις του δέρματος, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης κ.α. Οι μετρήσεις χαρακτηρίζονται από υψηλή αξιοπιστία (σφάλμα ±5%) αλλά και επαναληψιμότητα, λόγω της κατασκευής της κάμερας χάρη στην οποία κάθε φωτογραφία λαμβάνεται από σταθερή και ίδια απόσταση.

Οι παράμετροι με ενδιαφέρουσα εφαρμογή στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκαν οι ανυψώσεις του δέρματος, για την παρατήρηση του μεγέθους των βλαβών από το βακτήριο, αλλά και τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης για την παρατήρηση της προκαλούμενης φλεγμονής. Για τη μέτρηση των παραμέτρων, οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν με το συνοδευτικό λογισμικό της κάμερας, το πρόγραμμα Antera 3D® CS.

6.3.7.1 <u>Μέτρηση ανυψώσεων δέρματος (παράμετρος “Elevations”)</u>

Για τη μέτρηση των ανυψώσεων του δέρματος, μετά από δοκιμές για την καλύτερη και πιο αξιόπιστη απεικόνιση των βλαβών, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο “Large”. Για την επιλογή της μετρούμενης

περιοχής χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο επιλογής “Circular selection”, με διάμετρο κύκλου 9.1. Με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκε μια ευρύτερη περιοχή γύρω από τη βλάβη, στην οποία ο μόνος παράγοντας συνεισφοράς στην ανύψωση του δέρματος ήταν η ίδια η βλάβη. Στις περιπτώσεις που στην περιοχή επιλογής παρεμβάλλονταν άλλοι παράγοντες ανύψωσης, π.χ. τα πόδια του μυός, χρησιμοποιήθηκε είτε μικρότερη διάμετρος κύκλου στην κυκλική επιλογή, είτε το εργαλείο επιλογής “Freeform selection”, για καλύτερη προσαρμογή στη βλάβη. Σε κάθε μυ, για την αντιστοίχιση της επιλεγμένης περιοχής από τη φωτογραφία μίας ημέρας στις φωτογραφίες όλων των υπόλοιπων ημερών, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο “Automatic selection matching”. Στις περιπτώσεις που το εργαλείο έκανε εμφανώς λανθασμένη επιλογή εφαρμόστηκε χειροκίνητη προσαρμογή της περιοχής επιλογής.

Στις ομάδες των μαρτύρων, όπου δεν παρατηρήθηκε καμία βλάβη, η επιλογή της μετρούμενης περιοχής έγινε στο ίδιο σημείο με τις ομάδες που έλαβαν βακτήριο, ενώ η μέτρηση της παραμέτρου αναφέρεται ουσιαστικά στις ανυψώσεις που δημιουργούνται είτε από το ίδιο το δέρμα είτε από τα πόδια του μυός και δεν έχει κάποια πραγματική σημασία.

Η μέτρηση της παραμέτρου Elevations δίνεται σε όγκο και μετριέται σε mm^3.

6.3.7.2 Μέτρηση επιπέδων αιμοσφαιρίνης (παράμετρος “Hemoglobin”)

Για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης του δέρματος, χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο “Level and Variation”. Για την επιλογή της μετρούμενης περιοχής χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο επιλογής “Circular selection”, με διάμετρο κύκλου 9.1. Με τον τρόπο αυτό επιλέχθηκε μια ευρύτερη περιοχή γύρω από τη βλάβη στις ομάδες που έλαβαν βακτήριο, ενώ στις ομάδες των μαρτύρων επιλέχθηκε το ίδιο σημείο, που όμως δεν παρουσίαζε καμία βλάβη. Σε κάθε μυ, για την αντιστοίχιση της επιλεγμένης περιοχής από τη φωτογραφία μίας ημέρας στις φωτογραφίες όλων των υπόλοιπων ημερών, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο “Automatic selection matching”. Στις περιπτώσεις που το εργαλείο έκανε εμφανώς λανθασμένη επιλογή εφαρμόστηκε χειροκίνητη προσαρμογή της περιοχής επιλογής.

Από την παράμετρο Hemoglobin μετρήθηκαν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, εκφρασμένα σε αυθαίρετες μονάδες.

6.3.8 Μέτρηση βάρους

Το βάρος των μυών μετρήθηκε για την παρακολούθηση της κατάστασης της γενικής τους υγείας. Χρησιμοποιήθηκε απλός ψηφιακός ζυγός ακρίβειας ενός δεκαδικού ψηφίου και τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε γραμμάρια (g).

6.3.9 Μέτρηση θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία των μυών μετρήθηκε για την παρακολούθηση της κατάστασης της γενικής τους υγείας. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των ομάδων πρόκλησης, η θερμομέτρηση ήταν σημαντική για να διαπιστωθεί αν η ένεση με το βακτηριακό εναιώρημα προκάλεσε κάποια γενικευμένη φλεγμονή ή

αντίδραση του ανοσοποιητικού. Χρησιμοποιήθηκε θερμόμετρο υπέρυθρης ακτινοβολίας και τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε βαθμούς κελσίου (°C).

6.3.10 Μέτρηση πάχους δέρματος

Η μέτρηση του πάχους του δέρματος είναι σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση του μεγέθους των προκαλούμενων βλαβών. Η μέτρηση έγινε με ψηφιακό παχύμετρο και οι μονάδες μέτρησης είναι τα χιλιοστά (mm). Για τη μέτρηση του πάχους το δέρμα της ράχης του μυός διπλωνόταν και το παχύμετρο κλεινόταν σταδιακά μέχρι να εφάπτεται ακριβώς στις άκρες του δέρματος, χωρίς να πιέζει την περιοχή. Στην περίπτωση των ομάδων μυών με ακνεϊκές βλάβες, η μέτρηση αντιπροσωπεύει ουσιαστικά τη διάμετρο της βλάβης.

6.3.11 Μέτρηση άδηλης απώλειας ύδατος

Η άδηλη απώλεια ύδατος (TEWL, Transepidermal Water Loss) μέσω διάχυσης διαμέσου της κεράτινης στιβάδας είναι μια μετρήσιμη παράμετρος η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της λειτουργίας του δερματικού φραγμού. Σε περίπτωση που ο φραγμός του δέρματος δεν είναι ακέραιος, η TEWL αυξάνεται, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα ανίχνευσης των αλλαγών στη λειτουργία του φραγμού. Ο υπολογισμός της πυκνότητας εξάτμισης ύδατος γίνεται έμμεσα από τους δύο αισθητήρες που διαθέτει το Tewameter, έναν για την θερμοκρασία και έναν για την σχετική υγρασία μέσα σε έναν κενό κύλινδρο. Η μονάδα μέτρησης των αποτελεσμάτων είναι τα $g/h/m^2$ (Plessis et al., 2013).

Ο χρόνος για κάθε μέτρηση της TEWL που πραγματοποιήθηκε στο πείραμα ήταν τα 60 δευτερόλεπτα.

6.3.12 Μέτρηση σμήγματος

Το όργανο χρησιμοποιεί μια κασέτα που περιέχει αδιαφανή ταινία. Η ταινία μηδενίζεται πριν από κάθε μέτρηση (μετακινείται σε καθαρό σημείο) και στη συνέχεια εφαρμόζεται σταθερά στο δέρμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η ταινία απορροφά τα έλαια της περιοχής εφαρμογής, αυξάνοντας έτσι τη διαφάνειά της, και αξιολογείται στη συνέχεια φωτομετρικά η διαπερατότητά της. Οι μετρήσεις είναι από 0 έως 350, με αβεβαιότητα ±5% και οι μονάδες μέτρησης είναι αυθαίρετες (Crowther, 2016).

Ο χρόνος για κάθε μέτρηση σμήγματος που πραγματοποιήθηκε στο πείραμα ήταν τα 30 δευτερόλεπτα.

6.3.13 Μέτρηση pH

Το όργανο μέτρησης pH επιτρέπει πολύ γρήγορες (<1 δευτερόλεπτο) και αξιόπιστες μετρήσεις, μεμονωμένες αλλά και συνεχόμενες. Η μετρητική κεφαλή του οργάνου είναι επίπεδη για την καλύτερη εφαρμογή στο δέρμα. Το εύρος pH των μετρήσεων είναι από 0 έως 11 και η αβεβαιότητα ±0.1. Η μέτρηση βασίζεται σε ένα υψηλής ποιότητας ηλεκτρόδιο συνδυασμού, που εμπεριέχει και ηλεκτρόδιο υάλου H^+ και ηλεκτρόδιο αναφοράς (Stefaniak et al., 2013).

Οι μετρήσεις pH, που χρησιμοποιήθηκαν στα αποτελέσματα, προέκυψαν από το μέσο όρο τριών διαδοχικών μετρήσεων κοντινών περιοχών.

6.3.14 Μέτρηση μελανίνης και ερυθήματος

Η μέτρηση βασίζεται στην αρχή της απορρόφησης και της διάθλασης. Ο αισθητήρας του οργάνου εκπέμπει τρία συγκεκριμένα μήκη κύματος, ένας δέκτης μετράει πόσο φως διαθλάσθηκε από το δέρμα και έτσι υπολογίζει πόσο απορροφήθηκε από το δέρμα. Το εύρος αβεβαιότητας των μετρήσεων είναι ±5%, οι μονάδες μέτρησης είναι αυθαίρετες και η κλίμακα είναι από 0-999 για την μελανίνη και το ερύθημα (Matias et al., 2015; Park et al., 2006).

Οι μετρήσεις μελανίνης και ερυθήματος, που χρησιμοποιήθηκαν στα αποτελέσματα, προέκυψαν από το μέσο όρο τριών διαδοχικών μετρήσεων κοντινών περιοχών.

6.3.15 Μέτρηση ενυδάτωσης

Ο υπολογισμός της ενυδάτωσης βασίζεται στη διηλεκτρική σταθερά του δέρματος. Οι συνθήκες μέτρησης είναι 20-22°C και η υγρασία 40-60%. Το εύρος αβεβαιότητας των μετρήσεων είναι ±3% και η κλίμακα είναι από 0 έως 12, σε αυθαίρετες μονάδες μέτρησης (Plessis et al., 2013).

Οι μετρήσεις ενυδάτωσης, που χρησιμοποιήθηκαν στα αποτελέσματα, προέκυψαν από το μέσο όρο τριών διαδοχικών μετρήσεων κοντινών περιοχών και αυτό γιατί η μέτρηση στο ίδιο ακριβώς σημείο πιθανώς να οδηγούσε σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω εγκλεισμού.

6.3.16 Αιμοληψίες

6.3.16.1 Αιμοληψίες από την ουρά

Την Ημέρα 0 και την Ημέρα 4 του πειράματος, κόπηκε με χειρουργικό ψαλίδι ένα πολύ μικρό τμήμα από την άκρη της ουράς κάθε μυός. Οι σταγόνες αίματος που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της γλυκόζης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

6.3.16.2 Αιμοληψίες από τις παρειές

Την Ημέρα 9 αμέσως πριν από την ευθανασία των μυών, η αριστερή παρειά κάθε μυός τρυπήθηκε με αποστειρωμένη βελόνα. Το αίμα που προέκυψε συλλέχθηκε σε φιαλίδια Eppendorf και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της γλυκόζης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

6.3.16.3 Λήψη πλάσματος

Την Ημέρα 9, το αίμα που συλλέχθηκε, αφού χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις, φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο υγρό-πλάσμα μεταφέρθηκε σε καινούρια φιαλίδια Eppendorf, τα οποία φυλάχθηκαν για μελλοντική ανάλυση λιπιδικής υποροξείδωσης.

6.3.17 Μέτρηση γλυκόζης

Για τη μέτρηση της γλυκόζης αίματος χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη εμπορική συσκευή (ηλεκτροχημικός μετρητής), με τις αντίστοιχες κατάλληλες ταινίες μέτρησης. Για κάθε μέτρηση, μια νέα ταινία μέτρησης γλυκόζης τοποθετούνταν στην υποδοχή του μετρητή. Η σταγόνα αίματος από την ουρά του μυός εφαρμοζόταν στην άκρη της ταινίας (λευκή περιοχή). Η ταινία μέτρησης λειτουργεί με

τριχοειδικές δυνάμεις τραβώντας το αίμα στο εσωτερικό της. Η μέτρηση ξεκινάει αυτόματα όταν τοποθετηθεί επαρκής ποσότητα αίματος. Η μέτρηση ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα και το αποτέλεσμα εμφανίζεται αυτόματα στην οθόνη του μετρητή, εκφρασμένο σε mg/dL. Το εύρος μέτρησης είναι 20-600 mg/dL.

Πριν από τη μέτρηση της γλυκόζης αίματος δεν πραγματοποιήθηκε νηστεία των μυών.

6.3.18 Μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Η συσκευή μέτρησης λειτουργεί με ταινίες μίας χρήσης και είναι φορητή, εύχρηστη και αξιόπιστη και μπορεί να μετρήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα οποιουδήποτε υγρού δείγματος σε λιγότερο από ένα λεπτό. Η αρχή μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, η οποία είναι εκφρασμένη σε μCoulombs (μC). Η μετρούμενη ένταση φορτίου είναι ανάλογη με την αντιοξειδωτική ικανότητα. Η μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας που δίνεται από το όργανο διακρίνεται στα αντιοξειδωτικά ταχείας δράσης Q1 (π.χ. ασκορβικό οξύ) και βραδείας δράσης Q2 (π.χ. πολυφαινόλες), όπως προκύπτει από το ρυθμό με τον οποίο παγιδεύουν ελεύθερες ρίζες. Παρουσιάζεται επίσης και το άθροισμά τους, η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Hevia, 2018).

Για κάθε μέτρηση, μια νέα ταινία μέτρησης τοποθετούνταν στην υποδοχή της συσκευής, και το αίμα εφαρμοζόταν στην επισημασμένη κυκλική περιοχή της ταινίας. Στη συνέχεια πιεζόταν το πλήκτρο της συσκευής και οι μετρήσεις παρουσιάζονταν σε μερικά δευτερόλεπτα στην οθόνη.

6.3.19 Μέτρηση χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων

Για τη μέτρηση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του αίματος την Ημέρα 9, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη εμπορική συσκευή με τις αντίστοιχες κατάλληλες ταινίες μέτρησης. Για κάθε μέτρηση, μια νέα ταινία μέτρησης χοληστερόλης τοποθετούνταν στο εσωτερικό της συσκευής. Μια μικρή ποσότητα από το αίμα που συλλέχθηκε από κάθε μυ μεταφέρθηκε από το φιαλίδιο Eppendorf με τη χρήση σύριγγας και εφαρμόστηκε στην κίτρινη επισημασμένη περιοχή της ταινίας μέχρι αυτή να διαβραχεί πλήρως. Στη συνέχεια κλεινόταν το καπάκι του οργάνου και μετά από 180 δευτερόλεπτα καταγραφόταν η μέτρηση χοληστερόλης. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν με της ταινίες μέτρησης τριγλυκεριδίων, η οποία όμως διαρκούσε περίπου 30 δευτερόλεπτα.

Οι μετρήσεις εκφράζονται σε mg/dL και το εύρος μέτρησης είναι 150 - 300 mg/dL.

Οι αρχικές μετρήσεις χοληστερόλης στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ) που λήφθηκαν ήταν σταθερά κάτω από το εύρος μέτρησης του οργάνου ή ακριβώς στο κατώτατο όριο. Για το λόγο αυτό, κατά τη διάρκεια των μετρήσεων αποφασίστηκε να μην πραγματοποιηθεί η μέτρηση αυτή στους υπόλοιπους μύες των δύο ειδών. Για το είδος SKH-hr2+ApoE, η μέτρηση χοληστερόλης λήφθηκε για όλους τους μύες, καθώς πρόκειται για ενδογενές χαρακτηριστικό του είδους και είχε σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για το πείραμα.

6.3.20 Ευθανασία των μυών

6.3.20.1 Ημέρα 4

Πραγματοποιήθηκε ευθανασία τεσσάρων μυών, με εισπνοή σεβοφλουρανίου.

6.3.20.2 Ημέρα 9

Πραγματοποιήθηκε ευθανασία όλων των υπόλοιπων μυών, με αυχενική εξάρθρωση.

6.3.21 Λήψη δέρματος

Στο τέλος του πειράματος, μετά την ευθανασία λήφθηκε από τους μύες τμήμα του δέρματος από το σημείο της βλάβης στη ράχη τους στην περίπτωση των ομάδων πρόκλησης και από το αντίστοιχο σημείο στην περίπτωση των ομάδων των μαρτύρων. Τα τμήματα του δέρματος τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκαν στους -80°C. Από μερικά ζώα μέρος του δέρματος φυλάχθηκε σε φορμόλη και στάλθηκε για ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

6.3.22 Ιστοπαθολογική αξιολόγηση

Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση των δερμάτων των μυών πραγματοποιήθηκε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών. Σε τομές δέρματος, διατηρημένου σε φορμόλη, έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και στη συνέχεια βγήκαν συμπεράσματα σχετικά με τη φλεγμονή, τη δημιουργία ουλής, την πάχυνση της επιδερμίδας και την ομοιότητα των βλαβών που προκλήθηκαν με τα μοντέλα ακμής που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία αλλά και με την ιστοπαθολογική εικόνα της ακμής στον άνθρωπο. Έγιναν συγκρίσεις ανά είδος μυός, μεταξύ ομάδων μαρτύρων και ακμής, αλλά και μεταξύ των ειδών, για να διαπιστωθεί ποιο είδος εμφάνισε τις πιο έντονες βλάβες.

6.3.23 Στατιστική επεξεργασία

Για τη διαχείριση και στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά IBM® SPSS® Statistics 26 και GraphPad Prism 8.0.

6.3.23.1 Έλεγχος κανονικότητας

Ο έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό SPSS, ξεχωριστά για κάθε παράμετρο και για κάθε ημέρα μετρήσεων και πειραματική ομάδα. Χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Shapiro-Wilk, το οποίο προτιμάται για στατιστικά δείγματα μικρού μεγέθους ($N<50$).

Για λόγους συντομίας, στα αποτελέσματα του ελέγχου κανονικότητας κάθε παραμέτρου παρουσιάζονται μόνο οι ομάδες που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή (Shapiro-Wilk P-value < 0.05).

6.3.23.2 Στατιστικές συγκρίσεις

Η παρούσα εργασία αποτελεί συγκριτική μελέτη μεταξύ τριών διαφορετικών ειδών μυών, όποτε επιλέχθηκε να γίνουν για κάθε παράμετρο στατιστικές συγκρίσεις:

- μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ώστε να συγκριθούν ανά είδος οι ομάδες των μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης
- μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ώστε να συγκριθούν οι ομάδες πρόκλησης μεταξύ των ειδών
- μεταξύ των ημερών του πειράματος, ώστε να παρατηρηθεί η εξέλιξη της παραμέτρου σε κάθε πειραματική ομάδα

Καθώς κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκαν οι ίδιες παράμετροι στους ίδιους μύες σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, επιλέχθηκε να γίνει ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνει υπόψιν τις επαναληπτικές μετρήσεις (repeated measures). Για την ανάλυση των δεδομένων από τις επαναληπτικές μετρήσεις, το λογισμικό Prism 8.0 παρέχει δύο τρόπους ανάλυσης: την ανάλυση διασποράς (ANOVA, Analysis of Variance) για επαναληπτικές μετρήσεις και την προσαρμογή ενός μικτού μοντέλου ανάλυσης (mixed effects model).

Το μικτό μοντέλο ανάλυσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και δίνει τα ίδια αποτελέσματα (P-value και πολλαπλές συγκρίσεις) με την ANOVA για επαναληπτικές μετρήσεις όταν δε λείπουν τιμές, ενώ όταν λείπουν δίνει πολύ συγκρίσιμα αποτελέσματα. Ουσιαστικά δηλαδή πρόκειται για ένα είδος ANOVA που όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και όταν λείπουν τιμές (Gueorguieva and Krystal, 2004; Wainwright et al., 2007). Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιεί ένα πίνακα συνδιακύμανσης σύνθετης συμμετρίας (compound symmetry covariance matrix) και εφαρμόζεται στα δεδομένα με τη χρήση της μεθόδου Περιορισμένης Μέγιστης Πιθανοφάνειας (REML, Restricted Maximum Likelihood).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, την Ημέρα 4 θυσιάστηκαν 4 μύες για τη λήψη δέρματος για ιστοπαθολογική αξιολόγηση, οπότε από την Ημέρα 5 και μετά, σε όλες τις παραμέτρους λείπουν οι τιμές για τους μύες αυτούς. Δε μπορεί λοιπόν να χρησιμοποιηθεί ANOVA για την ανάλυση των δεδομένων του πειράματος. Για να χρησιμοποιηθεί ANOVA θα έπρεπε είτε να εξαιρεθούν αυτά τα ζώα, εξαιρώντας έτσι πολύτιμα δεδομένα, είτε να αναλυθούν ξεχωριστά τα δεδομένα για τις Ημέρες 1-4 και 5-9, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ανάλυσης και εμποδίζοντας την παρακολούθηση της πορείας κάθε ομάδας μεταξύ αυτών των δύο χρονικών διαστημάτων.

Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν για τις στατιστικές συγκρίσεις το μικτό μοντέλο ανάλυσης, το οποίο δεν επηρεάζεται από τις τιμές που λείπουν, εφόσον οι τιμές αυτές λείπουν για τυχαίους λόγους. Εφόσον τα ζώα που θυσιάστηκαν επιλέχθηκαν τυχαία και όχι για κάποιο λόγο που είχε να κάνει με τις τιμές των μετρήσεων ή την πορεία του πειράματος (δηλαδή π.χ. δεν εξαιρέθηκαν επίτηδες ζώα επειδή θα επηρέαζαν αρνητικά το αποτέλεσμα του πειράματος), το μοντέλο αυτό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί.

Επειδή η μεθοδολογία του πειράματος περιλάμβανε επαναληπτικές μετρήσεις, δεν ήταν πρέπον να υποτεθεί η σφαιρικότητα στο μικτό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε, οπότε χρησιμοποιήθηκε επίσης η διόρθωση Geisser-Greenhouse, όπως προτείνεται από το λογισμικό Prism 8 ("GraphPad Prism 8 Statistics Guide - Repeated-measures one-way ANOVA or mixed effects model," 2020; Maxwell and

Delaney, 2003). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το post-hoc κριτήριο Fisher's LSD για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων.

Για τη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, που λήφθηκαν μόνο την Ημέρα 9 του πειράματος, πραγματοποιήθηκε One Way ANOVA με post-hoc κριτήριο Fisher's LSD για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των συγκρινόμενων ομάδων. Η ανάλυση αυτή έγινε στο λογισμικό Prism, και χρησιμοποιήθηκε η υπόθεση ότι όλες οι ομάδες προέρχονται από πληθυσμούς με ίσες τυπικές αποκλίσεις.

Για λόγους συντομίας, στις πολλαπλές συγκρίσεις κάθε παραμέτρου παρουσιάζονται μόνο οι ομάδες που εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Fisher's LSD P-value < 0.05).

6.3.23.3 Μη παραμετρικός έλεγχος

Για τις ομάδες που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Prism και έγινε μη παραμετρική στατιστική ανάλυση για να ελεγχθούν τα αποτελέσματα των πολλαπλών συγκρίσεων, όπου κρίθηκε αναγκαίο.

Στην περίπτωση που η μη κανονική κατανομή αφορούσε ομάδα μαρτύρων, έγινε μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ της ομάδας αυτής και της ομάδας πρόκλησης του ίδιου είδους.

Στην περίπτωση που η μη κανονική κατανομή αφορούσε ομάδα πρόκλησης, έγινε μη παραμετρικός έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό σχεδιασμό (Wilcoxon matched-pairs signed rank test) για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ των ημερών για την ομάδα αυτή και Mann-Whitney για τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ της ομάδας αυτής και της ομάδας μαρτύρων του ίδιου είδους.

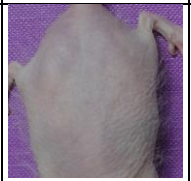
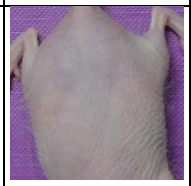
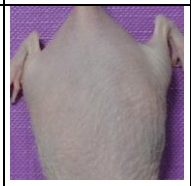
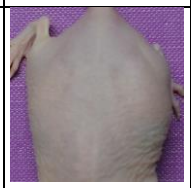
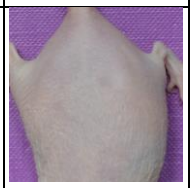
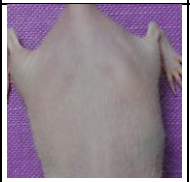
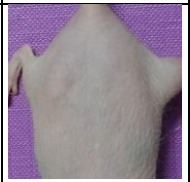
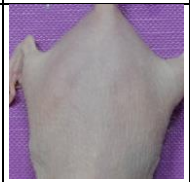
6.3.23.4 Γραφήματα

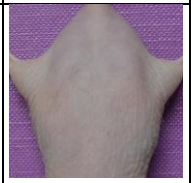
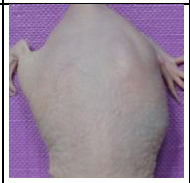
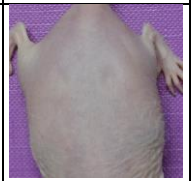
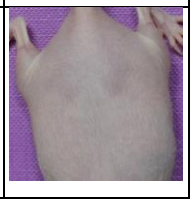
Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Prism.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

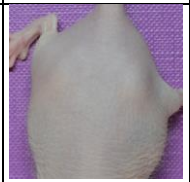
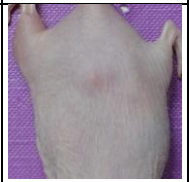
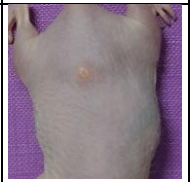
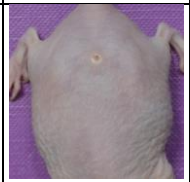
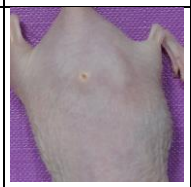
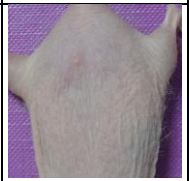
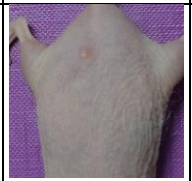
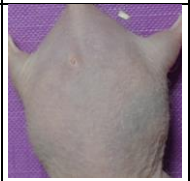
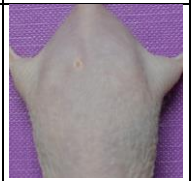
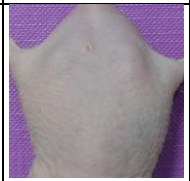
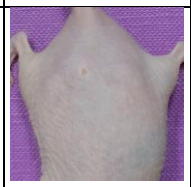
7.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

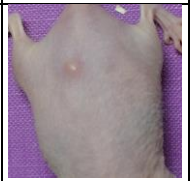
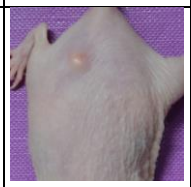
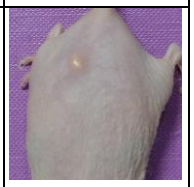
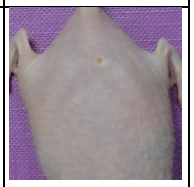
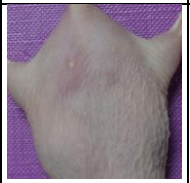
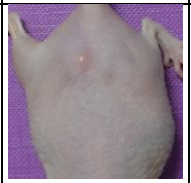
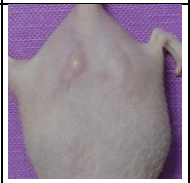
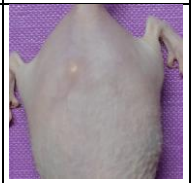
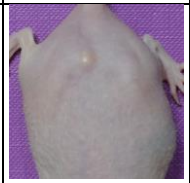
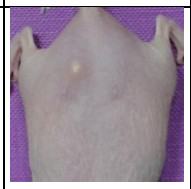
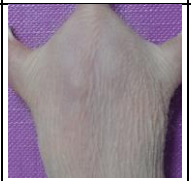
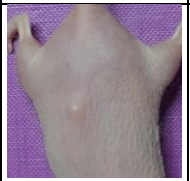
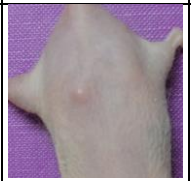
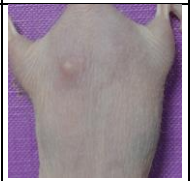
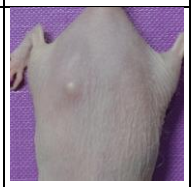
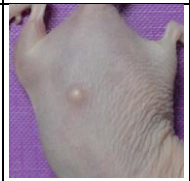
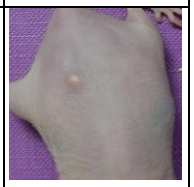
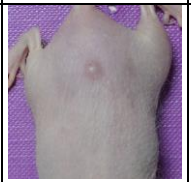
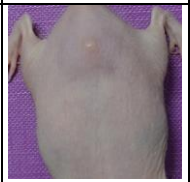
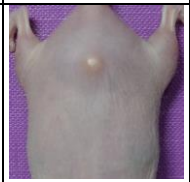
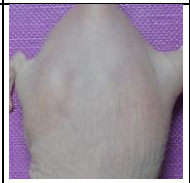
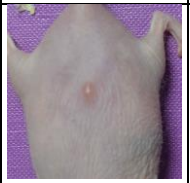
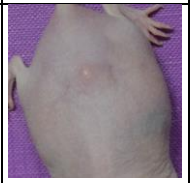
Πίνακας 17 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 1 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

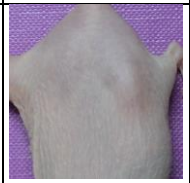
ΟΜΑΔΑ 1: SKH-hr1 ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										
3										
4										
5										

ΟΜΑΔΑ 1: SKH-hr1 ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
6										
7										

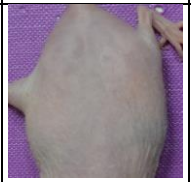
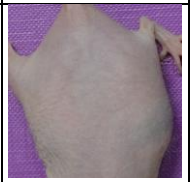
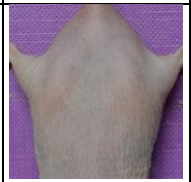
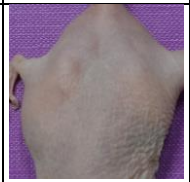
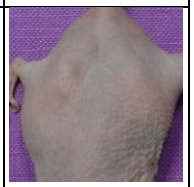
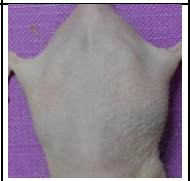
Πίνακας 18 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 2 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

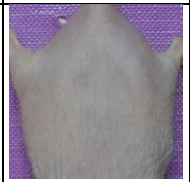
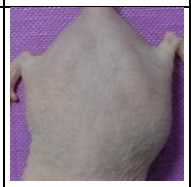
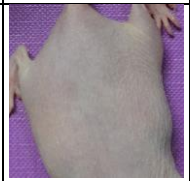
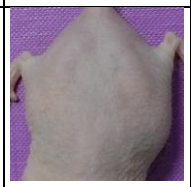
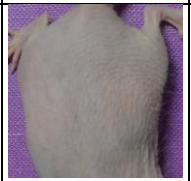
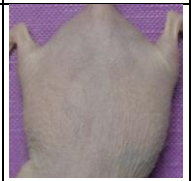
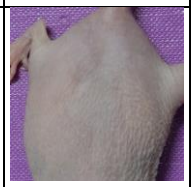
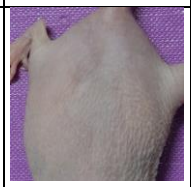
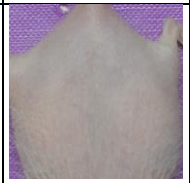
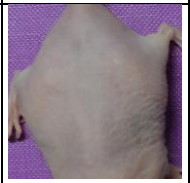
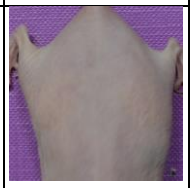
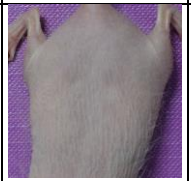
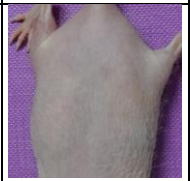
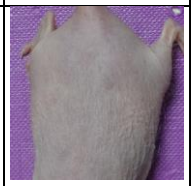
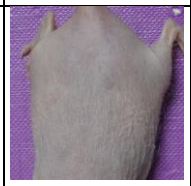
ΟΜΑΔΑ 2: SKH-hr1 ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										

ΟΜΑΔΑ 2: SKH-hr1 ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
3										
4										
5										
6										
7										
8										

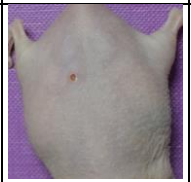
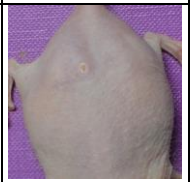
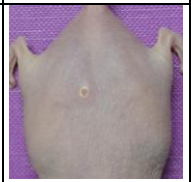
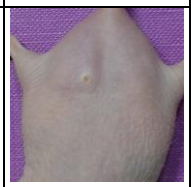
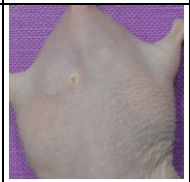
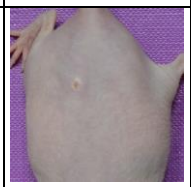
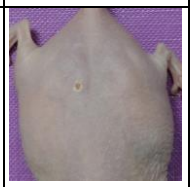
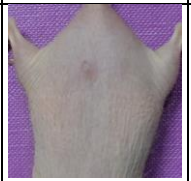
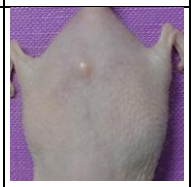
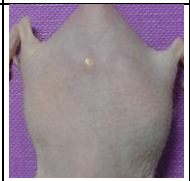
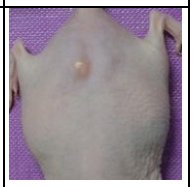
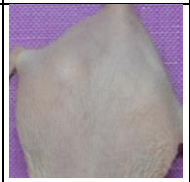
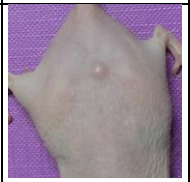
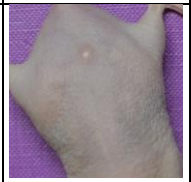
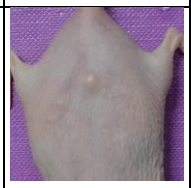
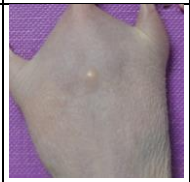
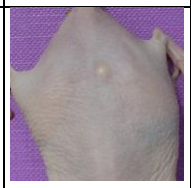
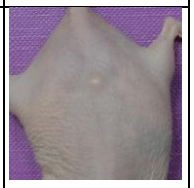
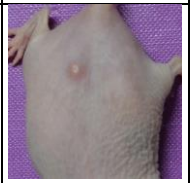
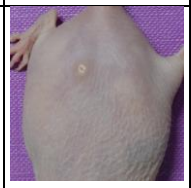
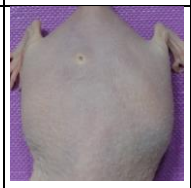
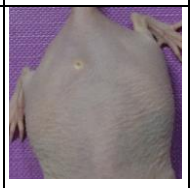
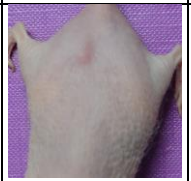
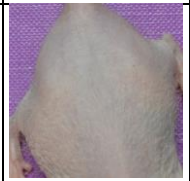
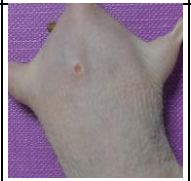
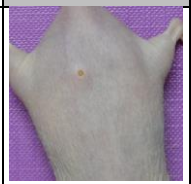
ΟΜΑΔΑ 2: SKH-hr1 ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
9										

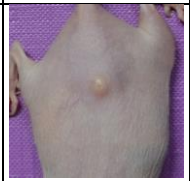
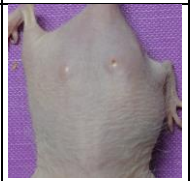
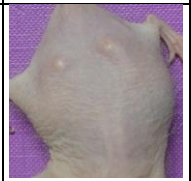
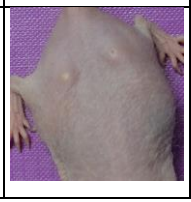
Πίνακας 19 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 3 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

ΟΜΑΔΑ 3: SKH-hr2 (ΚΑΦΕ) ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										
3										

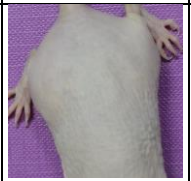
ΟΜΑΔΑ 3: SKH-hr2 (ΚΑΦΕ) ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
4										
5										
6										
7										

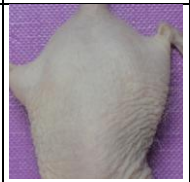
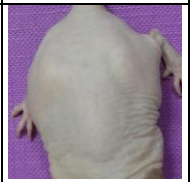
Πίνακας 20 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 4 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

ΟΜΑΔΑ 4: SKH-hr2 (ΚΑΦΕ) ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										
3										
4										
5										
6										

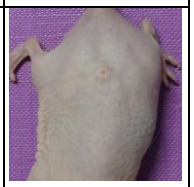
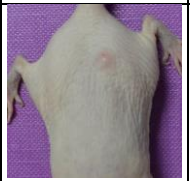
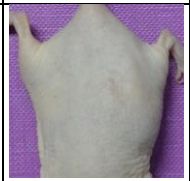
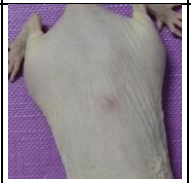
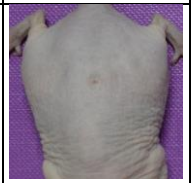
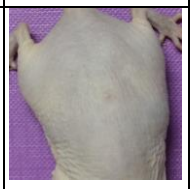
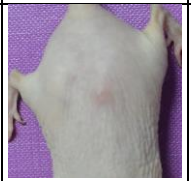
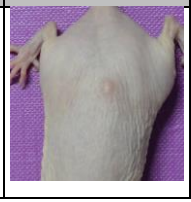
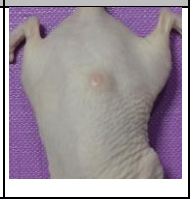
ΟΜΑΔΑ 4: SKH-hr2 (ΚΑΦΕ) ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
7										
8										

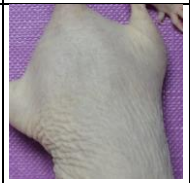
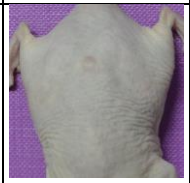
Πίνακας 21 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 5 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

ΟΜΑΔΑ 5: SKH-hr2+ApoE ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										

ΟΜΑΔΑ 5: SKH-hr2+ApoE ΜΑΡΤΥΡΕΣ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
3										
4										
5										
6										
7										

Πίνακας 22 Φωτογραφικό υλικό από τη ράχη των μυών της Ομάδας 6 για όλη τη διάρκεια του πειράματος

ΟΜΑΔΑ 6: SKH-hr2+ApoE ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
1										
2										
3										
4										
5										
6										

ΟΜΑΔΑ 6: SKH-hr2+ApoE ΑΚΜΗ										
Μυς	**Ημέρα 0**	**Ημέρα 1**	**Ημέρα 2**	**Ημέρα 3**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 5**	**Ημέρα 6**	**Ημέρα 7**	**Ημέρα 8**	**Ημέρα 9**
7										

7.1.1 Σύγκριση των ομάδων μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης

Από το φωτογραφικό υλικό που παρουσιάστηκε παραπάνω (Πίνακας 17-Πίνακας 22) είναι εμφανής η διαφορά μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης. Από την Ημέρα 1 του πειράματος, δηλαδή την ακριβώς επόμενη ημέρα μετά τις ενδοδερμικές ενέσεις, όλες οι ομάδες και των τριών ειδών μυών που έλαβαν βακτήριο έχουν εμφανίσει φλεγμονώδεις βλάβες. Οι βλάβες χαρακτηρίζονται από ερύθημα και σε αρκετές περιπτώσεις μυών μοιάζουν φλυκταινώδεις, με επηρμένη όψη και πυώδες περιεχόμενο.

Αντίθετα, στις ομάδες των μαρτύρων, που έλαβαν μόνο ζωμό BHI, παρατηρείται πολύ ήπιο ερύθημα στην περιοχή της ένεσης την Ημέρα 1, το οποίο υποχωρεί πλήρως στις επόμενες ημέρες. Στο τέλος του πειράματος, την Ημέρα 9, καμία από τις ομάδες των μαρτύρων δεν παρουσιάζει εμφανή βλάβη στην περιοχή της ένεσης.

7.1.2 Ομάδα 2: SKH-hr1 - Ακμή

Στην Ομάδα 2, οι περισσότεροι μύες εμφάνισαν φλυκταινώδεις βλάβες. Η ένταση των βλαβών (αξιολογημένη ως προς το ερύθημα, το μέγεθος της βλάβης και την έμπυο κατάσταση), φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά μέχρι τις Ημέρες 3-4, ενώ στις Ημέρες 5-6 παρατηρείται μια σχετικά πτωτική τάση. Από εκεί και πέρα, η τάση αυτή φαίνεται να συνεχίζεται σε κάποιους μύες έως το τέλος της μελέτης, ενώ σε κάποιους άλλους μύες η ένταση των βλαβών αυξάνεται σε επίπεδα μεγαλύτερα σε σχέση με των πρώτων ημερών. Η πορεία που ακολουθούν οι βλάβες καθώς η ένταση τους ελαττώνεται φαίνεται να είναι η διάρρηξη και αποβολή ολόκληρου ή μέρους του πυώδους περιεχόμενου και στη συνέχεια η σταδιακή δημιουργία εφελκίδας και ουλής.

Την Ημέρα 9 του πειράματος, 4 εκ των 7 μυών (57%) της Ομάδας 2 φαίνεται να παρουσιάζουν ακόμα ενεργές φλυκταινώδεις βλάβες.

7.1.3 Ομάδα 4: SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή

Στην Ομάδα 4, οι περισσότεροι μύες εμφάνισαν φλυκταινώδεις βλάβες. Στις βλάβες της ομάδας αυτής παρατηρείται έντονο ερύθημα, ιδιαίτερα τις πρώτες ημέρες μετά τις ενδοδερμικές ενέσεις. Η ένταση των βλαβών φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά μέχρι τις Ημέρες 2-3, ενώ στις επόμενες παρατηρείται μια σχετικά πτωτική τάση που για κάποιους μύες συνεχίζεται έως το τέλος της μελέτης. Σε κάποιους άλλους μύες όμως η ένταση των βλαβών αρχίζει και αυξάνεται πάλι και κορυφώνεται τις Ημέρες 7-9. Η πορεία που ακολουθούν οι βλάβες καθώς η ένταση τους ελαττώνεται φαίνεται να είναι η διάρρηξη και αποβολή ολόκληρου ή μέρους του πυώδους περιεχόμενου και στη συνέχεια η δημιουργία εφελκίδων και σταδιακά ουλής.

Την Ημέρα 9 του πειράματος, 4 εκ των 7 μυών (57%) της Ομάδας 2 φαίνεται να παρουσιάζουν ακόμα ενεργές φλυκταινώδεις βλάβες.

7.1.4 Ομάδα 6: SKH-hr2+ApoE - Ακμή

Στην Ομάδα 6, οι περισσότεροι μύες εμφάνισαν φλυκταινώδεις βλάβες. Η ένταση των βλαβών φαίνεται να αυξάνεται μέχρι τις Ημέρες 2-3, με παρουσία σημαντικού ερυθήματος. Τις επόμενες ημέρες και μέχρι το τέλος του πειράματος, οι βλάβες των περισσότερων μυών ακολουθούν πτωτική τάση. Η πορεία που ακολουθούν οι βλάβες καθώς η ένταση τους ελαττώνεται φαίνεται να είναι η διάρρηξη και αποβολή ολόκληρου ή μέρους του πυώδους περιεχόμενου και στη συνέχεια η δημιουργία εφελκίδων και σταδιακά ουλής. Στην Ομάδα 6 η διαδικασία αυτή γίνεται αρκετά γρήγορα ώστε την Ημέρα 9 του πειράματος παρατηρείται σε μερικά ποντίκια στο σημείο της βλάβης μόνο υπερμελάγχρωση και σχεδόν καθόλου έπαρμα, πύον ή ερύθημα.

Την Ημέρα 9 του πειράματος, 2 εκ των 6 μυών (33%) της Ομάδας 2 φαίνεται να παρουσιάζουν ακόμα ενεργές φλυκταινώδεις βλάβες.

7.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

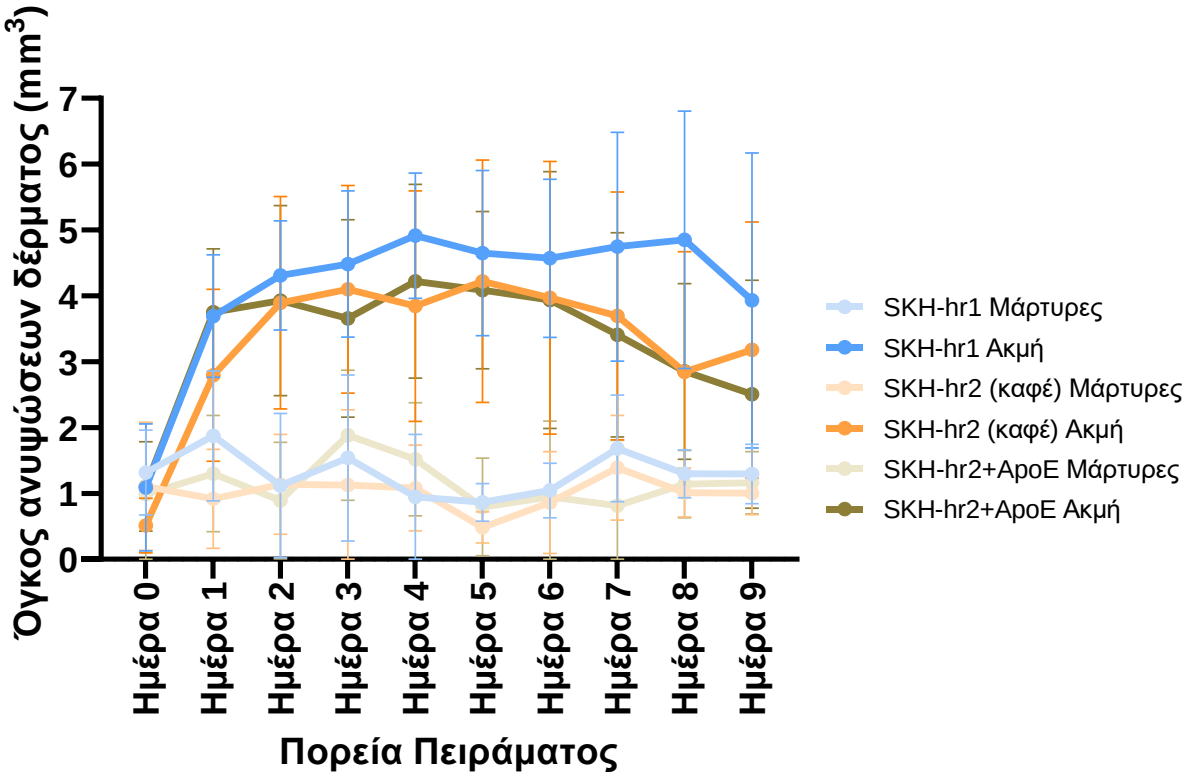
7.2.1 Ανυψώσεις δέρματος

7.2.1.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις του όγκου ανυψώσεων δέρματος των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 23 και Γράφημα 2).

Πίνακας 23 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του όγκου ανυψώσεων για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Όγκος ανυψώσεων Δέρματος (mm^3) - Περιγραφική Στατιστική											
Ομάδα		**Ημέρα**									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.32	1.87	1.12	1.54	0.95	0.86	1.05	1.68	1.30	1.30
	Τυπική Απόκλιση	0.64	0.99	1.09	1.26	0.95	0.28	0.41	0.81	0.36	0.45
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	1.09	3.69	4.31	4.48	4.91	4.65	4.57	4.75	4.85	3.93
	Τυπική Απόκλιση	0.96	0.93	0.83	1.11	0.95	1.25	1.20	1.74	1.95	2.24
SKH-hr2 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.11	0.92	1.14	1.13	1.08	0.48	0.86	1.39	1.01	1.00
	Τυπική Απόκλιση	0.97	0.75	0.76	1.14	0.65	0.24	0.77	0.79	0.37	0.32
SKH-hr2 - Ακμή	Μέση Τιμή	0.51	2.79	3.90	4.10	3.84	4.22	3.97	3.70	2.84	3.18
	Τυπική Απόκλιση	0.41	1.31	1.61	1.58	1.75	1.84	2.07	1.88	1.82	1.94
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	0.98	1.30	0.89	1.88	1.52	0.79	0.95	0.81	1.14	1.16
	Τυπική Απόκλιση	1.09	0.88	0.88	0.99	0.86	0.74	1.15	0.99	0.51	0.47
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	1.11	3.75	3.93	3.66	4.22	4.09	3.94	3.41	2.85	2.51
	Τυπική Απόκλιση	0.68	0.96	1.44	1.50	1.47	1.19	1.95	1.55	1.33	1.73



Γράφημα 2 Απεικόνιση του όγκου ανυψώσεων για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.1.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του όγκου ανυψώσεων έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 24).

Πίνακας 24 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις του όγκου ανυψώσεων δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Όγκος ανυψώσεων δέρματος - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 1	SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	0.010
Ημέρα 3	SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	0.026
	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.040
Ημέρα 6	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.036

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.1.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 25 Συγκρίσεις του όγκου ανυψώσεων των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 6	0.8289	0.002642 to 1.655	Yes	*	0.0495
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-2.602	-3.562 to -1.642	Yes	***	0.0002
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-3.219	-4.220 to -2.217	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 3	-3.393	-4.717 to -2.069	Yes	***	0.0004
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-3.823	-5.044 to -2.602	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 5	-3.558	-4.698 to -2.418	Yes	***	0.0003
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 6	-3.48	-4.768 to -2.192	Yes	***	0.0006
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 7	-3.655	-5.179 to -2.132	Yes	**	0.0011
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 8	-3.761	-5.367 to -2.155	Yes	**	0.0012
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-2.84	-4.395 to -1.284	Yes	**	0.0043
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 2	-0.6167	-1.192 to -0.04140	Yes	*	0.0386
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 3	-0.7911	-1.553 to -0.02913	Yes	*	0.0436
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 4	-1.221	-1.880 to -0.5623	Yes	**	0.0027
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 5	-0.9563	-1.604 to -0.3089	Yes	*	0.0112
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 7	-0.907	-1.790 to -0.02397	Yes	*	0.0457
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 8	-0.5309	-1.034 to -0.02807	Yes	*	0.0416
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 9	-0.5193	-0.9845 to -0.05401	Yes	*	0.0341
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-2.281	-3.636 to -0.9268	Yes	**	0.0053
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-3.384	-4.615 to -2.153	Yes	***	0.0003
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 3	-3.589	-4.764 to -2.414	Yes	***	0.0002
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-3.333	-4.650 to -2.015	Yes	***	0.0006
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 5	-3.71	-5.332 to -2.088	Yes	**	0.0014
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 6	-3.458	-5.483 to -1.434	Yes	**	0.0058
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 7	-3.186	-4.873 to -1.499	Yes	**	0.0036
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 8	-2.333	-3.865 to -0.8018	Yes	**	0.0098
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-2.668	-4.284 to -1.051	Yes	**	0.0068
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 6	-1.177	-2.190 to -0.1647	Yes	*	0.0294
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 8	1.05	0.2535 to 1.847	Yes	*	0.018
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 8	1.255	0.2367 to 2.274	Yes	*	0.0235
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 7	0.5243	0.02688 to 1.022	Yes	*	0.0418
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 8	1.377	0.4410 to 2.313	Yes	*	0.0114
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-2.645	-3.978 to -1.311	Yes	**	0.0028
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-2.822	-4.614 to -1.029	Yes	**	0.0084
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 3	-2.551	-4.429 to -0.6740	Yes	*	0.0159
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-3.116	-5.000 to -1.232	Yes	**	0.0068
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 5	-2.981	-4.586 to -1.376	Yes	**	0.005
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 6	-2.829	-5.419 to -0.2389	Yes	*	0.0377
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 7	-2.301	-4.570 to -0.03245	Yes	*	0.0478
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	1.717	0.1902 to 3.244	Yes	*	0.0342
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 8	1.235	0.03955 to 2.430	Yes	*	0.0451
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					

Παρατηρήσεις:

- Σε όλα τα είδη, στις ομάδες των μαρτύρων παρατηρούνται ελάχιστες στατιστικά σημαντικές διαφορές του όγκου των ανυψώσεων μεταξύ των ημερών του πειράματος και οι διαφορές που παρατηρούνται είναι οπωσδήποτε τυχαίες και δεν αντιπροσωπεύουν κάτι, αφού στην περίπτωση των μαρτύρων ο μετρούμενος όγκος επηρεάζεται πολύ από τη στάση του μυός.
- Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στον όγκο των ανυψώσεων της Ημέρας 0 σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ημέρες του πειράματος. Ο όγκος των βλαβών δηλαδή είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την Ημέρα 0, πριν τις ενδοδερμικές ενέσεις. Αντίθετα, στην ομάδα των μαρτύρων, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της Ημέρας 0 και των υπόλοιπων ημερών ως προς τον όγκο των ανυψώσεων.
- Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή, την Ημέρα 1 ο όγκος των ανυψώσεων είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με τις Ημέρες 2 έως και 5. Δηλαδή, η βλάβη αυξάνεται σημαντικά την Ημέρα 2 σε σχέση με την Ημέρα 1 και παραμένει σημαντικά αυξημένη μέχρι και την Ημέρα 5. Μεταξύ των υπόλοιπων ημερών δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.
- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στον όγκο των ανυψώσεων της Ημέρας 0 σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ημέρες του πειράματος. Ο όγκος των βλαβών δηλαδή είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την Ημέρα 0, πριν τις ενδοδερμικές ενέσεις. Αντίθετα, στην ομάδα των μαρτύρων, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της Ημέρας 0 και των υπόλοιπων ημερών ως προς τον όγκο των ανυψώσεων. Τα p-values στην ομάδα αυτή είναι σχετικά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στον όγκο των ανυψώσεων της Ημέρας 0 σε σχέση τις ημέρες 1 έως και 7. Ο όγκος των βλαβών δηλαδή είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με την Ημέρα 0, πριν τις ενδοδερμικές ενέσεις. Αντίθετα, στην ομάδα των μαρτύρων, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της Ημέρας 0 και των υπόλοιπων ημερών ως προς τον όγκο των ανυψώσεων. Τα p-values στην ομάδα αυτή είναι αρκετά μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή.

7.2.1.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 26 Συγκρίσεις του όγκου ανυψώσεων των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος (Ημέρες 0-4), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	0.8059	0.1737 to 1.438	Yes	*	0.0175
Ημέρα 1					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-1.82	-2.870 to -0.7695	Yes	**	0.0025
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.877	-3.012 to -0.7423	Yes	**	0.0036
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	2.774	1.872 to 3.675	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.392	1.411 to 3.372	Yes	***	0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.874	-3.062 to -0.6858	Yes	**	0.0051
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.831	-3.844 to -1.819	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.492	0.2544 to 2.729	Yes	*	0.022
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.449	1.373 to 3.525	Yes	***	0.0003
Ημέρα 2					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.189	-4.286 to -2.093	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.775	-4.305 to -1.246	Yes	**	0.0019
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.808	-4.312 to -1.303	Yes	**	0.0017
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.171	2.316 to 4.027	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.417	2.477 to 4.357	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.757	-4.174 to -1.341	Yes	**	0.0014
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.79	-4.182 to -1.398	Yes	**	0.0014
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.003	1.551 to 4.455	Yes	***	0.0008
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.035	1.609 to 4.462	Yes	***	0.0008
Ημέρα 3					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-2.945	-4.257 to -1.633	Yes	***	0.0004
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.561	-4.146 to -0.9769	Yes	**	0.004
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.118	-3.735 to -0.5015	Yes	*	0.0146
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.356	2.127 to 4.585	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.599	1.469 to 3.729	Yes	***	0.0002
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.972	-4.500 to -1.445	Yes	**	0.0011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.529	-4.092 to -0.9666	Yes	**	0.0044
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.216	0.7527 to 3.679	Yes	**	0.0064
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.772	0.2694 to 3.275	Yes	*	0.0251
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.967	-5.000 to -2.934	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.897	-4.469 to -1.325	Yes	**	0.0019
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-3.275	-4.743 to -1.807	Yes	***	0.0005
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.831	2.970 to 4.693	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.396	2.421 to 4.371	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.762	-4.264 to -1.260	Yes	**	0.0024
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-3.139	-4.532 to -1.746	Yes	***	0.0008
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.326	0.7801 to 3.873	Yes	**	0.0071
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.704	1.264 to 4.144	Yes	**	0.002

Πίνακας 27 Συγκρίσεις του όγκου ανυψώσεων των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος (Ημέρα 5-9), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Ημέρα 5					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.785	-4.946 to -2.624	Yes	***	0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.3809	0.07587 to 0.6858	Yes	*	0.0187
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-3.358	-5.061 to -1.655	Yes	**	0.0027
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-3.223	-4.471 to -1.976	Yes	***	0.0009
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	4.166	3.006 to 5.326	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.855	2.626 to 5.084	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-3.739	-5.442 to -2.036	Yes	**	0.0016
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-3.604	-4.852 to -2.356	Yes	***	0.0006
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.428	1.695 to 5.161	Yes	**	0.0019
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.293	2.002 to 4.584	Yes	***	0.0004
Ημέρα 6					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.526	-4.649 to -2.403	Yes	***	0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.926	-4.842 to -1.009	Yes	**	0.0091
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.89	-4.931 to -0.8497	Yes	*	0.0142
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.707	2.508 to 4.907	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.625	2.253 to 4.997	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-3.107	-5.048 to -1.167	Yes	**	0.0063
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-3.072	-5.119 to -1.024	Yes	*	0.01
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.025	1.013 to 5.037	Yes	**	0.0077
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.989	0.8902 to 5.088	Yes	*	0.0112
Ημέρα 7					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.064	-4.716 to -1.412	Yes	**	0.0025
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.015	-3.794 to -0.2363	Yes	*	0.0309
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.725	-3.373 to -0.07640	Yes	*	0.0425
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.356	1.707 to 5.006	Yes	**	0.0014
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.933	2.238 to 5.627	Yes	***	0.0005
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.308	-4.084 to -0.5314	Yes	*	0.0171
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.017	-3.663 to -0.3714	Yes	*	0.0229
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.884	1.069 to 4.699	Yes	**	0.0058
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.594	0.9078 to 4.279	Yes	**	0.0073
Ημέρα 8					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-3.553	-5.364 to -1.743	Yes	**	0.0027
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.554	-2.951 to -0.1566	Yes	*	0.0349
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.838	2.027 to 5.649	Yes	**	0.0018
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.71	1.894 to 5.526	Yes	**	0.002
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.831	-3.522 to -0.1406	Yes	*	0.0377
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.838	-3.235 to -0.4412	Yes	*	0.0186
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.703	0.006679 to 3.400	Yes	*	0.0493
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.71	0.3093 to 3.112	Yes	*	0.0241
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-2.634	-4.710 to -0.5586	Yes	*	0.0204
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.883	-3.686 to -0.08030	Yes	*	0.0429
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	2.928	0.8549 to 5.002	Yes	*	0.0132
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.769	0.6926 to 4.846	Yes	*	0.0166
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.177	-3.977 to -0.3776	Yes	*	0.0249
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.018	0.2141 to 3.822	Yes	*	0.0333

Πίνακας 28 Διαφορές μεταξύ των ομάδων πρόκλησης ακμής με τάση στατιστικής σημαντικότητας (p-value<0.08), ως προς τον όγκο ανυψώσεων δέρματος.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 8					
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	2.007	-0.1964 to 4.210	No	ns	0.0705
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	2	-0.03146 to 4.031	No	ns	0.053

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, καμία ομάδα μυών δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά ως προς τον όγκο των ανυψώσεων, εκτός από τις ομάδες SKH-hr1 Μάρτυρες και SKH-hr2 (καφέ) Ακμή. Η διαφορά αυτή οφείλεται στον τυχαίο χαρακτήρα της μέτρησης, όπως περιγράφεται στις Μεθόδους του πειράματος.
- Από την Ημέρα 1 έως και την Ημέρα 9, ανά είδος διαφέρουν στατιστικά σημαντικά οι ομάδες πρόκλησης ακμής με τις ομάδες των μαρτύρων, σε όλα τα είδη μυών, ως προς τον όγκο των ανυψώσεων του δέρματος.
- Σε καμία ημέρα του πειράματος δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά του όγκου ανυψώσεων μεταξύ των ομάδων πρόκλησης ακμής των τριών ειδών μυών. Παρατηρείται όμως τάση στατιστικής σημαντικότητας (p-value <0.08) την Ημέρα 8 (Πίνακας 28), όπου φαίνεται ότι ο όγκος των βλαβών της ομάδας SKH-hr1 Ακμή είναι αρκετά μεγαλύτερος σε σχέση με τις βλάβες των ομάδων SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 2).

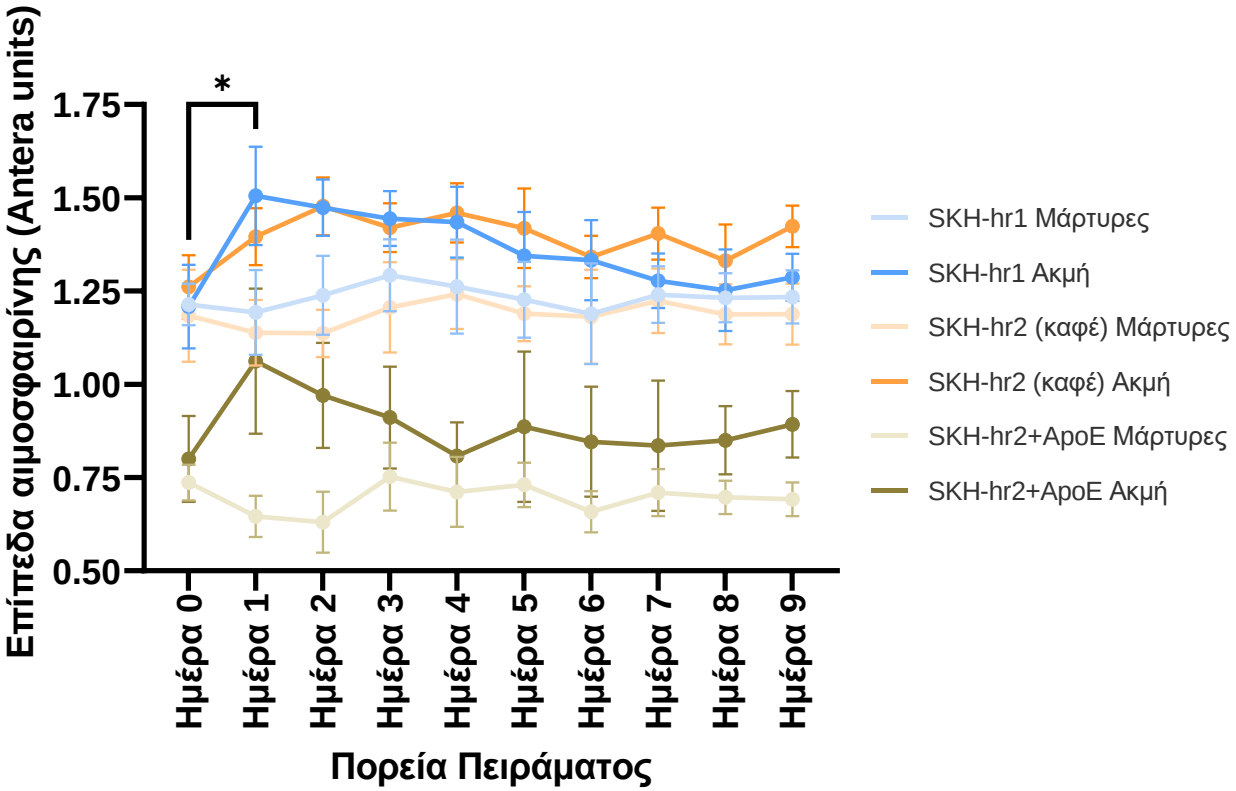
7.2.2 Επίπεδα αιμοσφαιρίνης

7.2.2.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 29 και Γράφημα 3).

Πίνακας 29 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Επίπεδα Αιμοσφαιρίνης (Antera units) - Περιγραφική Στατιστική											
Ομάδα		**Ημέρα**									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.214	1.194	1.239	1.292	1.262	1.227	1.189	1.240	1.232	1.234
	Τυπική Απόκλιση	0.056	0.114	0.106	0.097	0.126	0.102	0.135	0.076	0.065	0.071
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	1.208	1.505	1.475	1.444	1.435	1.344	1.333	1.278	1.252	1.287
	Τυπική Απόκλιση	0.112	0.132	0.076	0.074	0.095	0.118	0.108	0.073	0.110	0.063
SKH-hr2 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.184	1.139	1.136	1.206	1.242	1.189	1.181	1.224	1.188	1.188
	Τυπική Απόκλιση	0.123	0.089	0.063	0.121	0.093	0.073	0.126	0.086	0.081	0.082
SKH-hr2 - Ακμή	Μέση Τιμή	1.261	1.396	1.479	1.420	1.460	1.418	1.341	1.404	1.331	1.423
	Τυπική Απόκλιση	0.085	0.076	0.077	0.065	0.079	0.107	0.057	0.070	0.097	0.056
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	0.737	0.646	0.630	0.752	0.711	0.730	0.658	0.710	0.697	0.692
	Τυπική Απόκλιση	0.048	0.056	0.082	0.091	0.094	0.059	0.055	0.063	0.045	0.045
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	0.800	1.061	0.973	0.911	0.808	0.886	0.846	0.835	0.850	0.893
	Τυπική Απόκλιση	0.115	0.194	0.140	0.136	0.091	0.202	0.148	0.175	0.092	0.089



Γράφημα 3 Απεικόνιση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.2.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο των επιπέδων αιμοσφαιρίνης έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 30).

Πίνακας 30 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Επίπεδα αιμοσφαιρίνης - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 7	SKH-hr1 - Ακμή	0.001
Ημέρα 8	SKH-hr2+ApoE - Ακμή	0.043

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.2.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 31 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, για το είδος SKH-hr1, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 5	0.06543	0.01076 to 0.1201	Yes	*	0.0263
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 6	0.1031	0.01739 to 0.1889	Yes	*	0.0258
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 7	0.05186	0.007070 to 0.09664	Yes	*	0.0298
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 8	0.06025	0.008618 to 0.1119	Yes	*	0.029
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 9	0.05801	0.007638 to 0.1084	Yes	*	0.0304
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-0.297	-0.4021 to -0.1919	Yes	***	0.0002
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-0.2654	-0.3327 to -0.1982	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 3	-0.236	-0.3192 to -0.1528	Yes	***	0.0002
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-0.2269	-0.3050 to -0.1488	Yes	***	0.0002
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 5	-0.1361	-0.2526 to -0.01972	Yes	*	0.0287
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 6	0.1723	0.07399 to 0.2706	Yes	**	0.0052
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 7	0.2274	0.1185 to 0.3364	Yes	**	0.0022
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 8	0.2529	0.1276 to 0.3781	Yes	**	0.0026
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 9	0.218	0.1037 to 0.3323	Yes	**	0.0034
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 5	0.1293	0.01477 to 0.2438	Yes	*	0.0327
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 6	0.1407	0.04868 to 0.2328	Yes	**	0.0096
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 7	0.1959	0.1301 to 0.2616	Yes	***	0.0003
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 8	0.2213	0.08962 to 0.3530	Yes	**	0.0063
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 9	0.1864	0.09354 to 0.2794	Yes	**	0.0027
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 6	0.1113	0.01990 to 0.2027	Yes	*	0.0246
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 7	0.1664	0.07326 to 0.2596	Yes	**	0.0047
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 8	0.1919	0.08477 to 0.2989	Yes	**	0.0046
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 9	0.157	0.08157 to 0.2324	Yes	**	0.0022
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 5	0.09075	0.01460 to 0.1669	Yes	*	0.0268
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 6	0.1022	0.005945 to 0.1984	Yes	*	0.0408
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 7	0.1573	0.05689 to 0.2577	Yes	**	0.0086
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 8	0.1827	0.05307 to 0.3124	Yes	*	0.0137
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	0.1479	0.04505 to 0.2507	Yes	*	0.0125

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται είναι μεταξύ της ημέρας 3 και των Ημερών 5 έως και 9. Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 3), την Ημέρα 3 τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης στην ομάδα αυτή φτάνουν στο μέγιστο σε σχέση με τις υπόλοιπες ημέρες του πειράματος.
- Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή, την Ημέρα 0, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις Ημέρες 1 έως και 5. Παρατηρείται δηλαδή μια έντονη αύξηση την αμέσως επόμενη μέρα από τις ενδοδερμικές ενέσεις, που διαρκεί μέχρι και την Ημέρα 5. Προς το τέλος του πειράματος, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης δε διαφέρουν σημαντικά από τις βασικές μετρήσεις της Ημέρας 0.
- Οι υπόλοιπες στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή είναι μεταξύ των αρχικών και των τελικών ημερών του πειράματος. Δηλαδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι αυξημένα τις αρχικές ημέρες σε σχέση με τις τελικές ημέρες του πειράματος.

Πίνακας 32 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, για το είδος SKH-hr2 (καφέ), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 3	-0.06786	-0.1328 to -0.002884	Yes	*	0.0432
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 4	-0.1034	-0.1407 to -0.06617	Yes	***	0.0005
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 7	-0.08571	-0.1235 to -0.04795	Yes	**	0.0014
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 8	-0.04939	-0.08297 to -0.01581	Yes	*	0.0114
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 9	-0.04983	-0.07364 to -0.02603	Yes	**	0.0022
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 4	-0.1053	-0.1639 to -0.04662	Yes	**	0.0046
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 7	-0.08757	-0.1618 to -0.01332	Yes	*	0.0278
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 8	0.05404	0.01699 to 0.09108	Yes	*	0.0118
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	0.05359	0.02241 to 0.08478	Yes	**	0.0057
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-0.1351	-0.2595 to -0.01073	Yes	*	0.0371
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-0.2165	-0.3354 to -0.09758	Yes	**	0.0035
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 3	-0.1593	-0.2612 to -0.05729	Yes	**	0.0077
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-0.1988	-0.3163 to -0.08124	Yes	**	0.0052
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 5	-0.1577	-0.2714 to -0.04396	Yes	*	0.0146
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 7	-0.1433	-0.2405 to -0.04599	Yes	*	0.0113
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-0.1627	-0.2272 to -0.09815	Yes	***	0.0008
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 2	-0.08138	-0.1505 to -0.01226	Yes	*	0.0271
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 6	0.05488	0.005513 to 0.1042	Yes	*	0.0346
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 3	0.05725	0.01345 to 0.1011	Yes	*	0.0176
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 6	0.1363	0.04113 to 0.2314	Yes	*	0.0127
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 6	0.1185	0.03928 to 0.1977	Yes	*	0.0106
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 8	0.1281	0.01445 to 0.2417	Yes	*	0.0329
Ημέρα 6 vs. Ημέρα 9	-0.08243	-0.1566 to -0.008305	Yes	*	0.0346
Ημέρα 8 vs. Ημέρα 9	-0.092	-0.1561 to -0.02792	Yes	*	0.0126

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται εντοπίζονται κυρίως μεταξύ της Ημέρας 1 και των Ημερών 3 έως και 9 του πειράματος. Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 3), την Ημέρα 1 τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι αρκετά χαμηλότερα από τις επόμενες ημέρες του πειράματος. Μεταξύ της Ημέρας 0 και της Ημέρας 1 δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.
- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, την Ημέρα 0, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις Ημέρες 1 έως και 5 και τις Ημέρες 7 και 9. Παρατηρείται δηλαδή μια έντονη αύξηση την αμέσως επόμενη μέρα από τις ενδοδερμικές ενέσεις, που διαρκεί έως και το τέλος του πειράματος, αν και ενδιάμεσα παρουσιάζονται αυξομειώσεις που εκφράζονται ως σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών.

Πίνακας 33 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, για το είδος SKH-hr2+ApoE, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	0.09086	0.05100 to 0.1307	Yes	**	0.0014
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	0.1066	0.04392 to 0.1692	Yes	**	0.0059
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 6	0.07843	0.01629 to 0.1406	Yes	*	0.0214
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 8	0.03986	0.01568 to 0.06404	Yes	**	0.0069
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	0.04484	0.01764 to 0.07204	Yes	**	0.0069
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 3	-0.1066	-0.1551 to -0.05806	Yes	**	0.0017
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 5	-0.08457	-0.1355 to -0.03364	Yes	**	0.0066
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 7	-0.06386	-0.1090 to -0.01868	Yes	*	0.0135
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 8	-0.051	-0.08725 to -0.01475	Yes	*	0.0138
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 9	-0.04602	-0.08292 to -0.009117	Yes	*	0.0225
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 3	-0.1223	-0.1993 to -0.04523	Yes	**	0.0081
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 5	-0.1003	-0.1444 to -0.05613	Yes	**	0.0014
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 7	-0.07957	-0.1306 to -0.02858	Yes	**	0.0088
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 8	-0.06671	-0.1205 to -0.01289	Yes	*	0.023
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 9	-0.06173	-0.1151 to -0.008336	Yes	*	0.03
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 6	0.09414	0.007542 to 0.1807	Yes	*	0.0375
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 8	0.05557	0.008188 to 0.1030	Yes	*	0.0284
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 9	0.06055	0.01238 to 0.1087	Yes	*	0.0218
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 6	0.07214	0.01195 to 0.1323	Yes	*	0.0262
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 8	0.03357	0.005849 to 0.06129	Yes	*	0.0252
Ημέρα 5 vs. Ημέρα 9	0.03855	0.009884 to 0.06722	Yes	*	0.0166
Ημέρα 8 vs. Ημέρα 9	0.004982	0.001960 to 0.008004	Yes	**	0.0068
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 1	-0.2621	-0.3930 to -0.1313	Yes	**	0.0027
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 2	-0.1703	-0.2794 to -0.06120	Yes	**	0.0088
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-0.0925	-0.1748 to -0.01024	Yes	*	0.0342
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 3	0.1511	0.006613 to 0.2957	Yes	*	0.043
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 4	0.2546	0.1129 to 0.3962	Yes	**	0.0046
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 5	0.1758	0.04395 to 0.3077	Yes	*	0.0187
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 6	0.2161	0.07813 to 0.3542	Yes	*	0.0101
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 7	0.2268	0.08074 to 0.3729	Yes	*	0.0104
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 8	0.2121	0.05401 to 0.3703	Yes	*	0.0183
Ημέρα 1 vs. Ημέρα 9	0.1696	0.02665 to 0.3126	Yes	*	0.0284
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 4	0.1627	0.04658 to 0.2788	Yes	*	0.014
Ημέρα 2 vs. Ημέρα 9	0.07779	0.01008 to 0.1455	Yes	*	0.0318
Ημέρα 3 vs. Ημέρα 4	0.1034	0.02558 to 0.1813	Yes	*	0.0174

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες, οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται εντοπίζονται κυρίως μεταξύ της Ημέρας 1 και των υπόλοιπων ημερών του πειράματος. Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 3), τις Ημέρες 1 και 2 τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι αρκετά χαμηλότερα από τις επόμενες ημέρες του πειράματος. Μεταξύ της Ημέρας 0 και της Ημέρας 1 παρατηρείται στατιστικά σημαντική ελάττωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Μεταξύ της Ημέρας 0 και της Ημέρας 9 δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.
- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, την Ημέρα 0, τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις Ημέρες 1 και 2 του πειράματος. Παρατηρείται δηλαδή μια έντονη αύξηση τις αμέσως επόμενες ημέρες από τις ενδοδερμικές ενέσεις. Το μέγιστο των επιπέδων αιμοσφαιρίνης που εμφανίζεται την Ημέρα 1 (Γράφημα 3), εκφράζεται μέσω των στατιστικά σημαντικών διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ της Ημέρας αυτής και των Ημερών 3 έως και 9. Τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, την Ημέρα 9 δεν έχουν επανέλθει στα αρχικά επίπεδα της Ημέρας 0, όπως φαίνεται και από τη στατιστικά σημαντική διαφορά των ημερών αυτών.

7.2.2.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 34 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος (Ημέρες 0-3), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.414	0.3040 to 0.5240	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4773	0.4167 to 0.5378	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.408	0.2840 to 0.5320	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4713	0.3804 to 0.5621	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.384	0.2451 to 0.5229	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4473	0.3315 to 0.5631	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4608	0.3443 to 0.5772	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.524	0.4470 to 0.6011	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 1					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.3124	-0.4442 to -0.1806	Yes	***	0.0002
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2033	-0.3156 to -0.09101	Yes	**	0.0023
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5467	0.4383 to 0.6551	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.3669	0.2485 to 0.4852	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4429	0.2523 to 0.6334	Yes	***	0.0004
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.8591	0.7524 to 0.9659	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2577	-0.3509 to -0.1645	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4923	0.4049 to 0.5797	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3337	0.1516 to 0.5159	Yes	**	0.0031
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.75	0.6763 to 0.8237	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4163	0.2354 to 0.5971	Yes	***	0.001
Ημέρα 2					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.2347	-0.3396 to -0.1299	Yes	***	0.0005
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2385	-0.3455 to -0.1316	Yes	***	0.0005
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.2684	0.1220 to 0.4148	Yes	**	0.0019
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6086	0.4975 to 0.7196	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.3372	0.2627 to 0.4117	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.5032	0.3691 to 0.6372	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.8433	0.7567 to 0.9299	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.341	-0.4194 to -0.2626	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.166	0.03238 to 0.2996	Yes	*	0.0208
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5061	0.4205 to 0.5918	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.507	0.3717 to 0.6423	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.8471	0.7576 to 0.9366	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.3401	0.2023 to 0.4780	Yes	***	0.0003
Ημέρα 3					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.1519	-0.2488 to -0.05492	Yes	**	0.0055
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1279	-0.2238 to -0.03191	Yes	*	0.0139
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3811	0.2417 to 0.5206	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5397	0.4303 to 0.6491	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.238	0.1213 to 0.3547	Yes	**	0.0012
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.533	0.4031 to 0.6629	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6916	0.5990 to 0.7841	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.214	-0.3300 to -0.09803	Yes	**	0.0024
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.295	0.1446 to 0.4454	Yes	**	0.0011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4536	0.3278 to 0.5793	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.509	0.3796 to 0.6384	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6676	0.5761 to 0.7590	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.1586	0.02123 to 0.2959	Yes	*	0.0276

Πίνακας 35 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος (Ημέρες 4-7), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.1732	-0.2992 to -0.04716	Yes	*	0.0116
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1978	-0.3211 to -0.07445	Yes	**	0.0051
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4541	0.3249 to 0.5834	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5504	0.4199 to 0.6810	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.1933	0.09125 to 0.2954	Yes	**	0.0013
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.6273	0.5269 to 0.7278	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.7236	0.6211 to 0.8261	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2179	-0.3160 to -0.1199	Yes	***	0.0004
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.434	0.3270 to 0.5410	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5303	0.4215 to 0.6391	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.6519	0.5557 to 0.7482	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.7482	0.6497 to 0.8468	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 5					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1917	-0.3130 to -0.07039	Yes	**	0.0049
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3404	0.1265 to 0.5543	Yes	**	0.0069
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4963	0.3968 to 0.5958	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.1549	0.03809 to 0.2716	Yes	*	0.0144
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4578	0.2411 to 0.6745	Yes	**	0.0013
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6137	0.5007 to 0.7268	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2291	-0.3373 to -0.1210	Yes	***	0.0007
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.303	0.09161 to 0.5143	Yes	*	0.0125
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4589	0.3808 to 0.5369	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.5321	0.3174 to 0.7468	Yes	***	0.0006
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.688	0.5843 to 0.7917	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 6					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.1437	-0.2867 to -0.0007668	Yes	*	0.049
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.152	-0.2794 to -0.02457	Yes	*	0.025
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.343	0.1678 to 0.5182	Yes	**	0.0014
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5307	0.4036 to 0.6579	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.1516	0.01464 to 0.2885	Yes	*	0.0329
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4867	0.3223 to 0.6511	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6744	0.5709 to 0.7779	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1599	-0.2796 to -0.04015	Yes	*	0.0149
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3351	0.1639 to 0.5064	Yes	**	0.0014
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5229	0.4035 to 0.6422	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.495	0.3400 to 0.6500	Yes	***	0.0002
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6827	0.6176 to 0.7479	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.1877	0.03286 to 0.3426	Yes	*	0.0249
Ημέρα 7					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1637	-0.2487 to -0.07871	Yes	**	0.0013
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.405	0.2208 to 0.5891	Yes	**	0.0014
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5306	0.4491 to 0.6120	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1264	-0.2096 to -0.04328	Yes	**	0.0062
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4422	0.2584 to 0.6261	Yes	***	0.0009
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5679	0.4884 to 0.6473	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1801	-0.2720 to -0.08833	Yes	**	0.0011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3885	0.2032 to 0.5738	Yes	**	0.0016
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5141	0.4254 to 0.6029	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.5687	0.3850 to 0.7523	Yes	***	0.0002
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6943	0.6168 to 0.7718	Yes	****	<0.0001

Πίνακας 36 Συγκρίσεις των επιπέδων αιμοσφαιρίνης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος (Ημέρες 8 και 9), με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Ημέρα 8					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.09954	-0.1973 to -0.001771	Yes	*	0.0467
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3819	0.2803 to 0.4835	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.535	0.4688 to 0.6013	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4021	0.2793 to 0.5250	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5553	0.4520 to 0.6586	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1439	-0.2481 to -0.03969	Yes	*	0.011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3375	0.2302 to 0.4449	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4907	0.4122 to 0.5691	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.4814	0.3661 to 0.5967	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.6346	0.5425 to 0.7267	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.1531	0.05616 to 0.2501	Yes	**	0.0073
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1893	-0.2642 to -0.1144	Yes	***	0.0002
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3416	0.2402 to 0.4431	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5423	0.4713 to 0.6132	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	0.09902	0.01341 to 0.1846	Yes	*	0.0271
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.1364	-0.2057 to -0.06716	Yes	**	0.0011
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3945	0.2959 to 0.4931	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5951	0.5305 to 0.6597	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.2355	-0.3181 to -0.1528	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.2955	0.1896 to 0.4014	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4961	0.4166 to 0.5756	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.5309	0.4343 to 0.6275	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.7316	0.6722 to 0.7909	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.2006	0.1060 to 0.2953	Yes	**	0.0015

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, ανά είδος, δε διαφέρουν στατιστικά οι ομάδες των μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης ακμής ως προς τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης, σε κανένα είδος μυών.
- Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται την Ημέρα 0, είναι μεταξύ του είδους SKH-hr2+ApoE και των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ). Φαίνεται πως το είδος SKH-hr2+ApoE έχει εγγενώς χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης από τα άλλα δύο είδη (Γράφημα 3). Τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ) δε διαφέρουν σημαντικά ως προς τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.
- Στο είδος SKH-hr1, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής στις Ημέρες 1-4 και 6 του πειράματος. Δηλαδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης της ομάδας πρόκλησης τις ημέρες αυτές είναι αυξημένα σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Τις υπόλοιπες ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.
- Στο είδος SKH-hr2 (καφέ), παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής σε όλες τις ημέρες του πειράματος (Ημέρα 1 έως και 9). Δηλαδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης της ομάδας πρόκλησης τις ημέρες αυτές είναι αυξημένα σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.
- Στο είδος SKH-hr2+ApoE, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής σε όλες τις ημέρες του πειράματος εκτός από τις Ημέρες 4, 5 και 7. Δηλαδή τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης της ομάδας πρόκλησης τις ημέρες αυτές είναι αυξημένα σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων. Τις υπόλοιπες ημέρες δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ως προς τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

- Η ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, ξεκινά την Ημέρα 0 από σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης σε σχέση με τις ομάδες SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, τα οποία παραμένουν χαμηλότερα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- Οι ομάδες SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2 (καφέ) Ακμή δε διαφέρουν σημαντικά ως προς τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις Ημέρες 7 και 9, όπου η ομάδα SKH-hr2 Ακμή εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

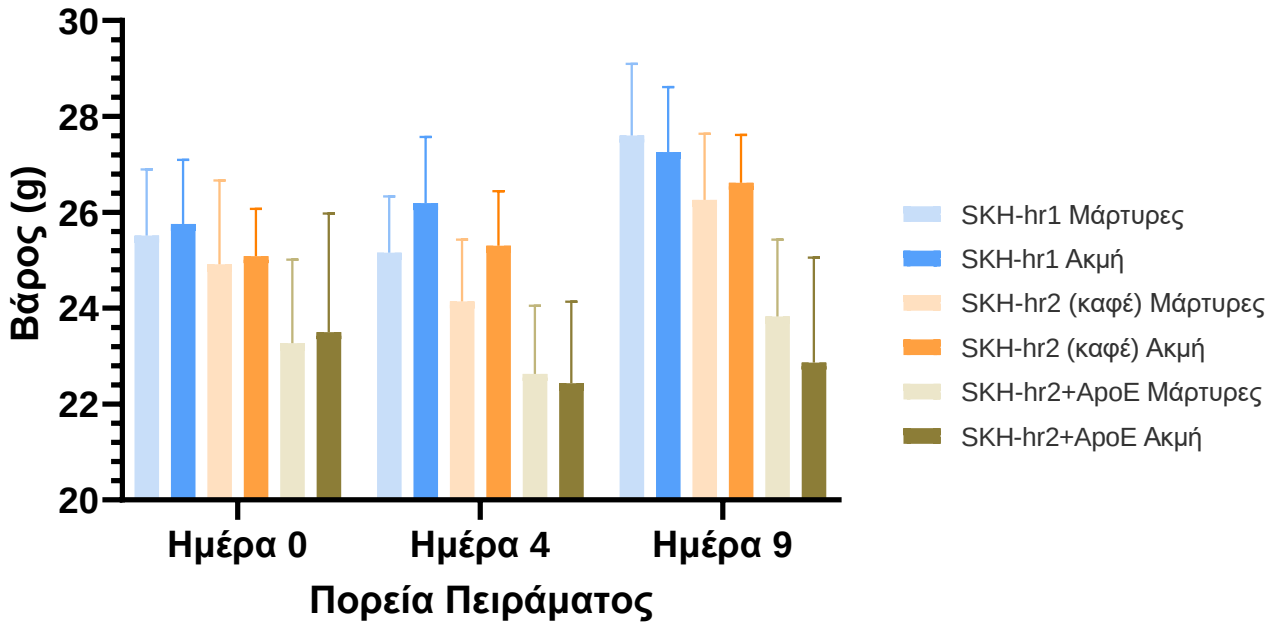
7.2.3 Βάρος

7.2.3.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις βάρους των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 37 και Γράφημα 4).

Πίνακας 37 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του βάρους για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Βάρος (g) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	25.51	25.16	27.60
	Τυπική Απόκλιση	1.38	1.18	1.50
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	25.76	26.19	27.26
	Τυπική Απόκλιση	1.34	1.38	1.36
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	24.91	24.14	26.26
	Τυπική Απόκλιση	1.75	1.29	1.38
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	25.09	25.30	26.61
	Τυπική Απόκλιση	0.99	1.14	1.00
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	23.27	22.63	23.83
	Τυπική Απόκλιση	1.74	1.42	1.60
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	23.50	22.43	22.87
	Τυπική Απόκλιση	2.48	1.70	2.19



Γράφημα 4 Ραβδόγραμμα του βάρους για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.3.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του βάρους έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, επομένως για την ανάλυση των δεδομένων του βάρους χρησιμοποιήθηκαν μόνο παραμετρικές μέθοδοι.

7.2.3.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 38 Συγκρίσεις του βάρους των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-2.086	-2.884 to -1.288	Yes	***	0.0007
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-2.443	-2.966 to -1.920	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.502	-2.097 to -0.9058	Yes	***	0.0008
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-1.068	-1.617 to -0.5200	Yes	**	0.0031
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.7714	1.946e-005 to 1.543	Yes	*	0.05
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.343	-2.242 to -0.4432	Yes	*	0.0107
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-2.114	-2.418 to -1.810	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.527	-1.780 to -1.274	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-1.314	-1.670 to -0.9584	Yes	***	0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	1.067	0.2649 to 1.868	Yes	*	0.0188
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.6429	-0.004220 to 1.290	No	ns	0.0511
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-0.5571	-1.127 to 0.01261	No	ns	0.0538
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-1.2	-1.570 to -0.8301	Yes	***	0.0002

Παρατηρήσεις:

- Σε όλες τις ομάδες των μυών, εκτός από την ομάδα SKH-hr2+ApoE-Ακμή, το βάρος της Ημέρας 9 είναι σημαντικά μεγαλύτερο από το βάρος της Ημέρας 0 και της Ημέρας 4. Αυτό είναι φυσιολογικό διότι οι μύες ήταν μικρής ηλικίας οπότε κατά τη διάρκεια του πειράματος αυξήθηκε το βάρος τους.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE-Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4.

7.2.3.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 39 Συγκρίσεις του βάρους των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.243	0.4040 to 4.082	Yes	*	0.0211
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.484	0.7351 to 4.233	Yes	**	0.0096
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.816	0.1372 to 3.495	Yes	*	0.0369
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	2.724	0.8501 to 4.597	Yes	**	0.0096
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.529	1.005 to 4.053	Yes	**	0.0036
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	2.046	0.6036 to 3.488	Yes	**	0.0089
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	3.756	1.879 to 5.632	Yes	**	0.0014
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.56	2.031 to 5.090	Yes	***	0.0002
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	2.867	1.003 to 4.730	Yes	**	0.0072
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.671	1.164 to 4.179	Yes	**	0.0024
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	4.733	2.329 to 7.138	Yes	**	0.0017
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.771	1.966 to 5.577	Yes	***	0.0007
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	4.39	2.023 to 6.758	Yes	**	0.0027
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.429	1.695 to 5.162	Yes	**	0.0011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	3.39	1.017 to 5.764	Yes	*	0.0108
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.429	0.6829 to 4.174	Yes	*	0.0105
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	3.748	1.440 to 6.055	Yes	**	0.0066
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	2.786	1.197 to 4.374	Yes	**	0.0029

Παρατηρήσεις:

- Σε κανένα είδος μυών και σε καμία ημέρα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στο βάρος μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας πρόκλησης.
- Είναι εμφανές σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, και ιδιαίτερα στην Ημέρα 9, ότι οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στο είδος SKH-hr2+ApoE. Οι μύες τους είδους αυτού έχουν σημαντικά μικρότερο βάρος από τους μύες των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ).

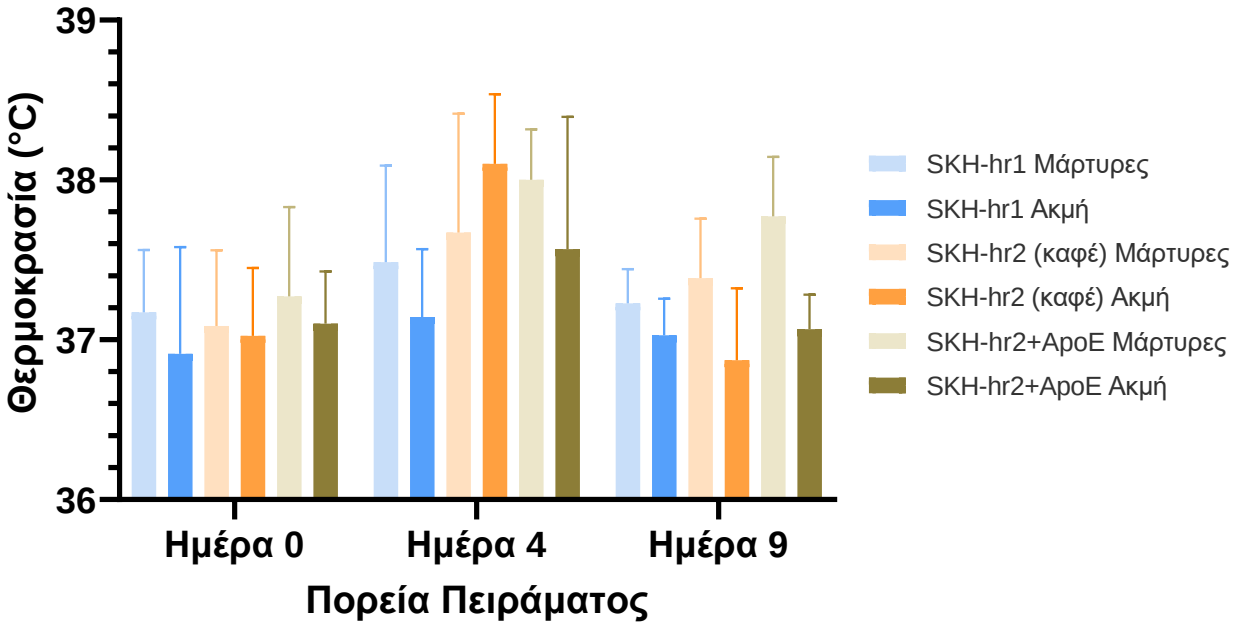
7.2.4 Θερμοκρασία

7.2.4.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις θερμοκρασίας των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 40 και Γράφημα 5).

Πίνακας 40 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της θερμοκρασίας για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Θερμοκρασία (°C) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	37.2	37.5	37.2
	Τυπική Απόκλιση	0.4	0.6	0.2
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	36.9	37.1	37.0
	Τυπική Απόκλιση	0.7	0.4	0.2
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	37.1	37.7	37.4
	Τυπική Απόκλιση	0.5	0.7	0.4
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	37.0	38.1	36.9
	Τυπική Απόκλιση	0.4	0.4	0.4
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	37.3	38.0	37.8
	Τυπική Απόκλιση	0.6	0.3	0.4
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	37.1	37.6	37.1
	Τυπική Απόκλιση	0.3	0.8	0.2



Γράφημα 5 Ραβδόγραμμα της θερμοκρασίας για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.4.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της θερμοκρασίας έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 41).

Πίνακας 41 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις θερμοκρασίας δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Θερμοκρασία - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 4	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.033
Ημέρα 9	SKH-hr1 - Ακμή	0.007

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.4.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 42 Συγκρίσεις της θερμοκρασίας των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-1.075	-1.546 to -0.6041	Yes	**	0.0014
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	1.229	0.6718 to 1.785	Yes	**	0.0017
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-0.7286	-1.259 to -0.1981	Yes	*	0.0152
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-0.5	-0.8996 to -0.1004	Yes	*	0.0222

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ)-Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της θερμοκρασίας της Ημέρας 4 και των Ημερών 0 και 9. Αυτό συμβαίνει γιατί την Ημέρα 4 παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας στην ομάδα αυτή.

7.2.4.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 43 Συγκρίσεις της θερμοκρασίας των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-0.9571	-1.458 to -0.4565	Yes	**	0.0013
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.8571	-1.296 to -0.4178	Yes	**	0.0013
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.5429	-0.9071 to -0.1786	Yes	**	0.0079
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.7429	-1.112 to -0.3742	Yes	**	0.0012
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	0.5143	0.03186 to 0.9967	Yes	*	0.0386
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.9	-1.383 to -0.4170	Yes	**	0.0016
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.7048	-1.076 to -0.3334	Yes	**	0.0018

Παρατηρήσεις:

- Στο είδος SKH-hr1, δεν παρατηρείται σε καμία ημέρα στατιστικά σημαντική διαφορά στη θερμοκρασία μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας πρόκλησης.
- Στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE, την Ημέρα 9 η θερμοκρασία είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στην ομάδα των μαρτύρων σε σύγκριση με την ομάδα πρόκλησης.

7.2.4.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.4.5.1 Ημέρα 4, είδος SKH-hr2 (καφέ) - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 44) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 44 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2 (καφέ) την Ημέρα 4 για την παράμετρο της θερμοκρασίας. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.1259
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40 , 65
Mann-Whitney U	12

7.2.4.5.2 Ομάδα SKH-hr1 Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 0 με την Ημέρα 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 45) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 45 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs μεταξύ των Ημερών 0 και 9 για την ομάδα SKH-hr1 Ακμή και την παράμετρο της θερμοκρασίας. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.9531
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	15.00 , -13.00
Sum of signed ranks (W)	2
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

7.2.4.5.3 Ομάδα SKH-hr1 Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 4 με την Ημέρα 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 46) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 46 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs μεταξύ των Ημερών 4 και 9 για την ομάδα SKH-hr1 Ακμή και την παράμετρο της θερμοκρασίας. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.6563
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	8.000 , -13.00
Sum of signed ranks (W)	-5
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	1

7.2.4.5.4 Ημέρα 9, είδος SKH-hr1 - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 47) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 47 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr1 την Ημέρα 9 για την παράμετρο της θερμοκρασίας. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.1014
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	65.50 , 39.50
Mann-Whitney U	11.5

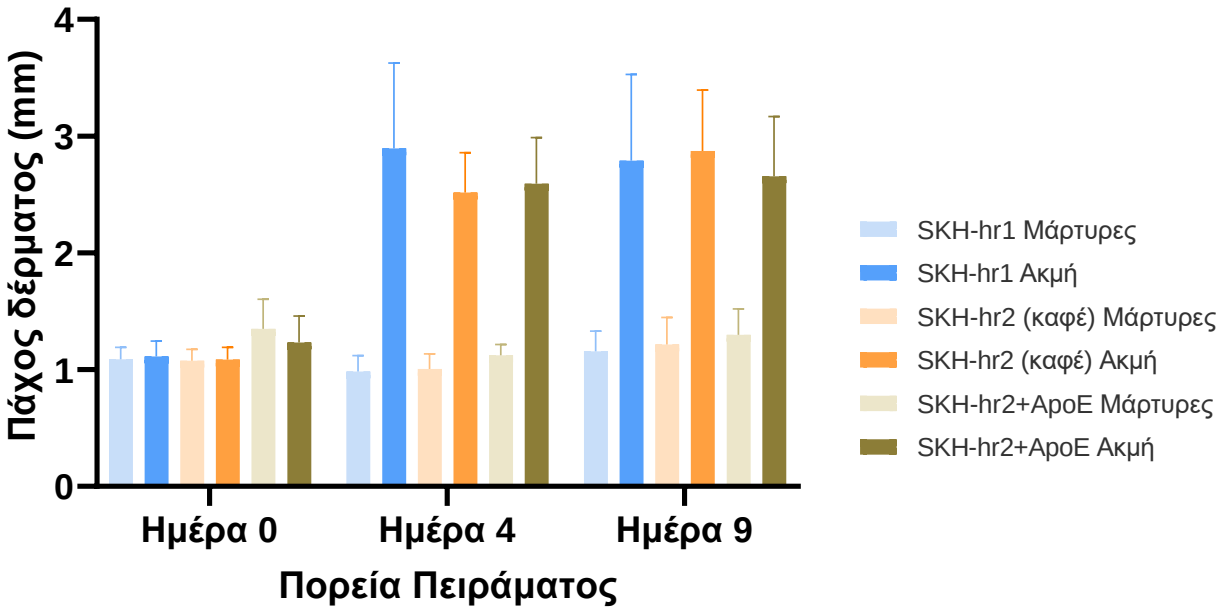
7.2.5 Πάχος δέρματος

7.2.5.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις πάχους δέρματος των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 48 και Γράφημα 6).

Πίνακας 48 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του πάχους δέρματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Πάχος Δέρματος (mm)- Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.09	0.98	1.16
	Τυπική Απόκλιση	0.10	0.14	0.17
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	1.11	2.90	2.79
	Τυπική Απόκλιση	0.13	0.73	0.74
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.08	1.00	1.21
	Τυπική Απόκλιση	0.10	0.13	0.23
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	1.09	2.52	2.87
	Τυπική Απόκλιση	0.11	0.34	0.52
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.35	1.12	1.30
	Τυπική Απόκλιση	0.25	0.09	0.22
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	1.23	2.59	2.66
	Τυπική Απόκλιση	0.23	0.40	0.51



Γράφημα 6 Ραβδόγραμμα του πάχους δέρματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.5.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του πάχους δέρματος έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 49).

Πίνακας 49 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις πάχους δέρματος δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Πάχος δέρματος - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 0	SKH-hr2+ApoE - Ακμή	0.001
	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.007
Ημέρα 4	SKH-hr2 - Μάρτυρες	0.002

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.5.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 50 Συγκρίσεις του πάχους δέρματος των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.1714	-0.2891 to -0.05378	Yes	*	0.0118
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-1.782	-2.342 to -1.222	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.675	-2.363 to -0.9874	Yes	***	0.001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.21	-0.3423 to -0.07769	Yes	**	0.0081
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-1.431	-1.744 to -1.117	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.788	-2.229 to -1.347	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-1.359	-1.578 to -1.139	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-1.422	-1.882 to -0.9625	Yes	***	0.0005
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.2271	0.01198 to 0.4423	Yes	*	0.0416

Παρατηρήσεις:

- Σε όλες τις ομάδες πρόκλησης ακμής, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά του πάχους του δέρματος, μεταξύ της Ημέρας 0 και των Ημερών 4 και 9. Αυτό συμβαίνει γιατί το πάχος αυξάνεται στις ομάδες αυτές τις Ημέρες. Στις ίδιες ομάδες, μεταξύ των Ημερών 4 και 9 δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά.

- Για τις ομάδες των μαρτύρων, οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι τόσο σημαντικές (χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερα P-value) και πιθανώς οφείλονται στην ενδογενή μεταβλητότητα της μέτρησης, η οποία λαμβάνεται με χειροκίνητο τρόπο.

7.2.5.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 51 Συγκρίσεις του πάχους δέρματος των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.26	-0.4993 to -0.02074	Yes	*	0.0367
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.2714	-0.5100 to -0.03288	Yes	*	0.0306
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-0.2636	-0.5024 to -0.02474	Yes	*	0.0345
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-1.911	-2.477 to -1.345	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.531	-1.854 to -1.209	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.607	-1.977 to -1.238	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	1.891	1.326 to 2.457	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.774	1.211 to 2.338	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.511	-1.833 to -1.190	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.587	-1.956 to -1.218	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.394	1.076 to 1.713	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.47	1.103 to 1.837	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-1.633	-2.319 to -0.9470	Yes	***	0.0009
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.717	-2.203 to -1.231	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.499	-2.037 to -0.9620	Yes	***	0.0005
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	1.574	0.8851 to 2.264	Yes	***	0.001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.491	0.8029 to 2.180	Yes	**	0.0013
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-1.659	-2.152 to -1.165	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-1.441	-1.982 to -0.8997	Yes	***	0.0005
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.576	1.084 to 2.068	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	1.358	0.8177 to 1.898	Yes	***	0.0007

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, ανά είδος δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά οι ομάδες μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης ως προς το πάχος του δέρματος, σε κανένα είδος.
- Τις Ημέρες 4 και 9, διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το πάχος δέρματος όλες οι ομάδες των μαρτύρων με όλες τις ομάδες πρόκλησης, ανά είδος αλλά και μεταξύ των ειδών.
- Μεταξύ των ομάδων πρόκλησης (δηλαδή μεταξύ των ειδών), δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές του πάχους δέρματος σε καμία ημέρα του πειράματος.

7.2.5.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.5.5.1 Ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 0 με τις Ημέρες 4 και 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 52 και Πίνακας 53) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του πάχους στις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0.

Πίνακας 52 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 4 για την ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή και την παράμετρο του πάχους δέρματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0156
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	28.00 , 0.000
Sum of signed ranks (W)	28
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

Πίνακας 53 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 9 για την ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή και την παράμετρο του πάχους δέρματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0156
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	28.00 , 0.000
Sum of signed ranks (W)	28
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

7.2.5.5.2 Ημέρα 0, είδος SKH-hr2+ApoE - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 54) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 54 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2+ApoE την Ημέρα 0 για την παράμετρο του πάχους. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.2448
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	62 , 43
Mann-Whitney U	15

7.2.5.5.3 Ημέρα 4, είδος SKH-hr2 (καφέ) - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 55) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η ομάδα πρόκλησης ακμής έχει αυξημένο πάχος την Ημέρα 4 σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.

Πίνακας 55 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2 (καφέ) την Ημέρα 4 για την παράμετρο του πάχους δέρματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.0006
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	28 , 77
Mann-Whitney U	0

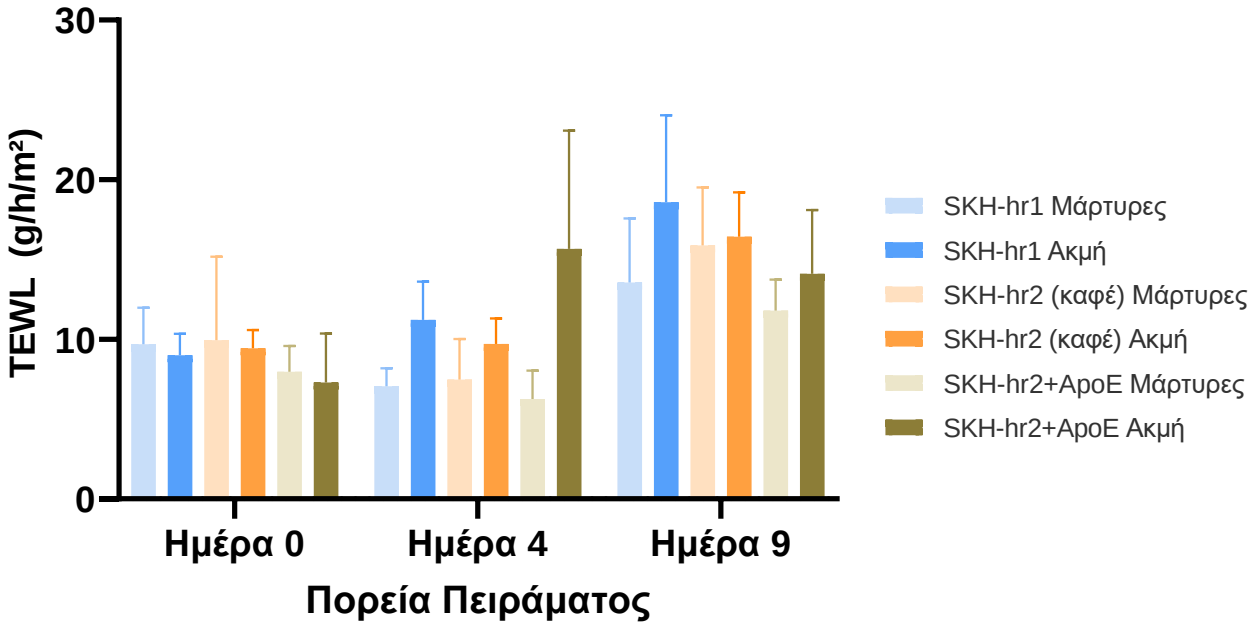
7.2.6 Άδηλη απώλεια ύδατος (TEWL)

7.2.6.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις TEWL των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 56 και Γράφημα 7).

Πίνακας 56 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της TEWL για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Άδηλη απώλεια ύδατος (g/h/m^2) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	9.68	7.06	13.56
	Τυπική Απόκλιση	2.29	1.12	4.02
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	9.00	11.21	18.59
	Τυπική Απόκλιση	1.33	2.40	5.44
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	9.94	7.47	15.88
	Τυπική Απόκλιση	5.23	2.54	3.64
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	9.43	9.71	16.43
	Τυπική Απόκλιση	1.15	1.59	2.77
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	7.97	6.26	11.79
	Τυπική Απόκλιση	1.61	1.78	1.95
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	7.29	15.66	14.11
	Τυπική Απόκλιση	3.08	7.41	3.99



Γράφημα 7 Ραβδόγραμμα της TEWL για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.6.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της TEWL έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 57).

Πίνακας 57 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις TEWL δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Άδηλη απώλεια ύδατος - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 9	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.040

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.6.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 58 Συγκρίσεις της TEWL των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	2.629	0.4588 to 4.798	Yes	*	0.0251
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-6.501	-10.71 to -2.293	Yes	**	0.0092
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-2.21	-4.185 to -0.2347	Yes	*	0.0326
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-9.587	-14.72 to -4.452	Yes	**	0.0038
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-7.377	-12.87 to -1.880	Yes	*	0.0167
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-5.946	-9.525 to -2.367	Yes	**	0.0066
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-8.413	-10.64 to -6.187	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-6.999	-9.698 to -4.300	Yes	***	0.0007
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-6.718	-9.926 to -3.510	Yes	**	0.0022
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-8.374	-15.57 to -1.183	Yes	*	0.0292
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-6.821	-11.67 to -1.977	Yes	*	0.0152
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-3.824	-6.513 to -1.136	Yes	*	0.0131
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-5.531	-7.551 to -3.512	Yes	***	0.0005

Παρατηρήσεις:

- Σε όλες τις ομάδες μαρτύρων, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 7), οι τιμές της TEWL είναι ελαττωμένες την Ημέρα 4 σε σύγκριση με την Ημέρα 0. Η διαφορά αυτή μάλιστα στην περίπτωση της Ομάδας SKH-hr1 Μάρτυρες, είναι στατιστικά σημαντική.
- Αντίθετα, οι ομάδες SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2+ApoE Ακμή, εμφανίζουν στατιστικά σημαντική αύξηση της TEWL από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της παρουσίας οιδήματος στις ομάδες πρόκλησης, επειδή οι μετρήσεις TEWL λήφθηκαν πάνω στις βλάβες των μυών. Η ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά στην TEWL μεταξύ των Ημερών 0 και 4.
- Σε όλες τις ομάδες μυών παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση της TEWL την Ημέρα 9 σε σύγκριση με την Ημέρα 4. Σε όλες τις ομάδες παρατηρείται επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση της TEWL την Ημέρα 9 σε σύγκριση με την Ημέρα 0, εκτός από την ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες. Αυτό συμβαίνει γιατί την Ημέρα 9, το όργανο δε μπόρεσε να κάνει σωστή βαθμονόμηση, οπότε όλες οι μετρήσεις ήταν αυξημένες. Επομένως, δε θα ληφθούν υπόψιν οι συγκρίσεις της Ημέρας αυτής με τις υπόλοιπες ημέρες και θα αξιολογηθούν μόνο οι συγκρίσεις εντός της Ημέρας 9, όπως φαίνεται παρακάτω (Πίνακας 59).

7.2.6.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 59 Συγκρίσεις της TEWL των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-4.159	-6.131 to -2.186	Yes	***	0.0006
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-2.658	-4.181 to -1.135	Yes	**	0.0024
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-8.606	-15.46 to -1.747	Yes	*	0.0216
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	3.743	1.038 to 6.448	Yes	*	0.0106
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	4.956	2.716 to 7.196	Yes	***	0.0003
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-8.19	-15.12 to -1.263	Yes	*	0.0264
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	3.455	1.552 to 5.359	Yes	**	0.0019
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	9.403	2.527 to 16.28	Yes	*	0.0147
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	6.801	1.708 to 11.90	Yes	*	0.0155
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	4.094	0.5776 to 7.611	Yes	*	0.0271
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	4.641	1.814 to 7.469	Yes	**	0.0041

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά καμία ομάδα μυών ως προς την TEWL, ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών ειδών.
- Την Ημέρα 4, η TEWL είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη στις ομάδες πρόκλησης σε σύγκριση με τις ομάδες των μαρτύρων, στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2+ApoE, άλλα όχι στο είδος SKH-hr2 (καφέ).
- Την Ημέρα 9, ανά είδος δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης.
- Μεταξύ των ομάδων πρόκλησης (δηλαδή μεταξύ των ειδών), δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές της TEWL σε καμία ημέρα του πειράματος.

7.2.6.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.6.5.1 Ημέρα 9, είδος SKH-hr2+ApoE - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 60) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 60 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2+ApoE την Ημέρα 9 για την παράμετρο της TEWL. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.2343
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	40 , 51
Mann-Whitney U	12

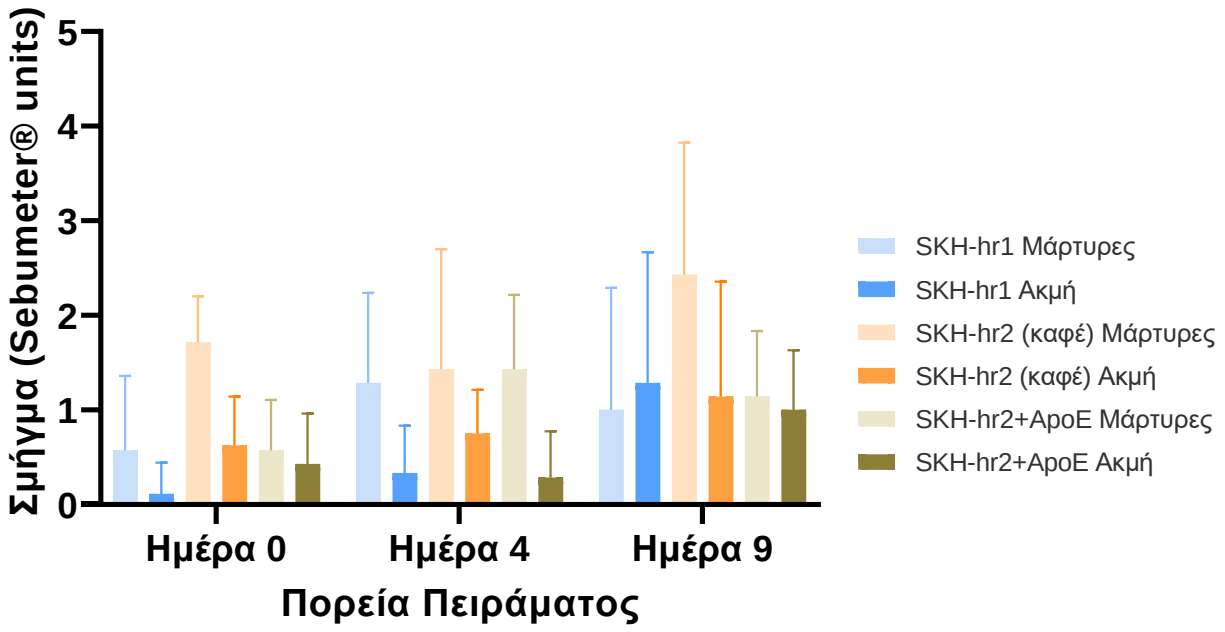
7.2.7 Σμήγμα

7.2.7.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις σμήγματος των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 61 και Γράφημα 8).

Πίνακας 61 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του σμήγματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Σμήγμα (Sebumeter® units) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	0.6	1.3	1.0
	Τυπική Απόκλιση	0.8	1.0	1.3
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	0.1	0.3	1.3
	Τυπική Απόκλιση	0.3	0.5	1.4
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	1.7	1.4	2.4
	Τυπική Απόκλιση	0.5	1.3	1.4
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	0.6	0.8	1.1
	Τυπική Απόκλιση	0.5	0.5	1.2
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	0.6	1.4	1.1
	Τυπική Απόκλιση	0.5	0.8	0.7
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	0.4	0.3	1.0
	Τυπική Απόκλιση	0.5	0.5	0.6



Γράφημα 8 Ραβδόγραμμα του σμήγματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.7.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του σμήγματος έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες ομάδες των μυών δεν ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, όπως παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 62).

Πίνακας 62 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις σμήγματος δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Σμήγμα - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 0	SKH-hr1 - Μάρτυρες	0.020
	SKH-hr1 - Ακμή	0.000
	SKH-hr2 - Μάρτυρες	0.000
	SKH-hr2 - Ακμή	0.000
	SKH-hr2+ApoE - Ακμή	0.001
	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.001
Ημέρα 4	SKH-hr1 - Μάρτυρες	0.008
	SKH-hr1 - Ακμή	0.001
	SKH-hr2 - Ακμή	0.000
	SKH-hr2+ApoE - Ακμή	0.001
	SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	0.020
Ημέρα 9	SKH-hr1 - Μάρτυρες	0.016

7.2.7.3 Παρατηρήσεις για την παράμετρο του σμήγματος

Η παράμετρος του σμήγματος δεν επεξεργάστηκε στατιστικά. Αυτό έγινε γιατί κανονικά το μετρητικό εύρος του οργάνου είναι από 0 έως 350, ενώ στους μύες όλες οι τιμές ήταν πολύ χαμηλές, με μέγιστη τιμή το 5. Επίσης, όπως αναφέρθηκε, στις περισσότερες ομάδες δεν ακολουθεί κανονική κατανομή. Θα γίνει επομένως σύντομος σχολιασμός με βάση τα περιγραφικά στατιστικά δεδομένα.

- Τις υψηλότερες τιμές σμήγματος εμφανίζει η ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες, για όλες τις ημέρες του πειράματος.
- Σε όλες τις ημέρες του πειράματος, στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE οι ομάδες των μαρτύρων εμφανίζουν υψηλότερες τιμές σμήγματος από τις ομάδες πρόκλησης.
- Τις Ημέρες 0 και 4 του πειράματος, στο είδος SKH-hr1 η ομάδα των μαρτύρων εμφανίζει υψηλότερες τιμές σμήγματος από την ομάδα πρόκλησης.
- Την Ημέρα 9 του πειράματος, στο είδος SKH-hr1 η ομάδα πρόκλησης εμφανίζει υψηλότερες τιμές σμήγματος από την ομάδα των μαρτύρων.

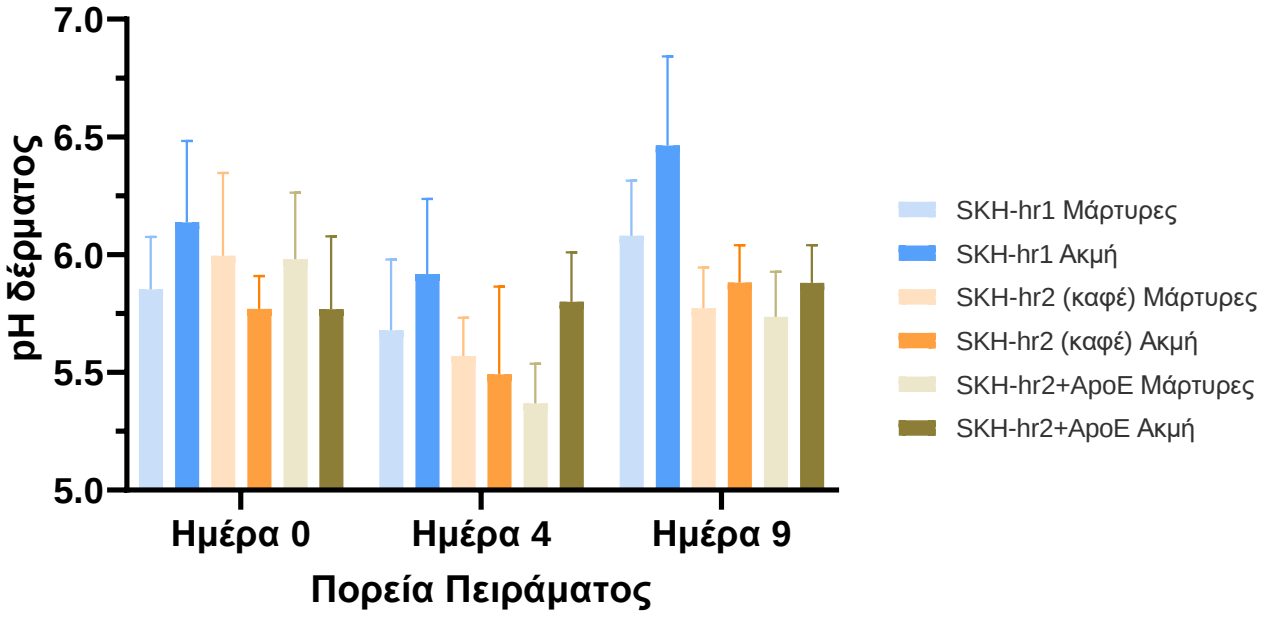
7.2.8 pH δέρματος

7.2.8.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις pH των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 63 και Γράφημα 9).

Πίνακας 63 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του pH για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

pH - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	5.85	5.68	6.08
	Τυπική Απόκλιση	0.22	0.30	0.23
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	6.14	5.92	6.46
	Τυπική Απόκλιση	0.35	0.32	0.38
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	6.00	5.57	5.77
	Τυπική Απόκλιση	0.35	0.16	0.17
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	5.77	5.49	5.88
	Τυπική Απόκλιση	0.14	0.37	0.16
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	5.98	5.37	5.74
	Τυπική Απόκλιση	0.28	0.17	0.19
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	5.77	5.80	5.88
	Τυπική Απόκλιση	0.31	0.21	0.16



Γράφημα 9 Ραβδόγραμμα του pH για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.8.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του pH έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 64).

Πίνακας 64 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις pH δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

pH - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 4	SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	0.009

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.8.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 65 Συγκρίσεις του pH των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-0.2286	-0.4412 to -0.01596	Yes	*	0.039
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.4014	-0.6803 to -0.1225	Yes	*	0.0125
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.5451	-0.7551 to -0.3350	Yes	***	0.0007
SKH-hr2 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.4257	0.01115 to 0.8403	Yes	*	0.0457
SKH-hr2 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.2788	0.006692 to 0.5508	Yes	*	0.0459
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.3902	-0.7080 to -0.07233	Yes	*	0.0239
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	0.6114	0.2569 to 0.9660	Yes	**	0.0056
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-0.3671	-0.5690 to -0.1652	Yes	**	0.0043

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του pH από την Ημέρα 4 στην Ημέρα 9. Στην ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες παρατηρείται επίσης ότι το pH της Ημέρας 9 είναι αυξημένο σε σχέση με τις Ημέρες 0 και 4, όμως τα P-values είναι σημαντικά μεγαλύτερα.
- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, παρατηρείται στατιστικά σημαντική ελάττωση του pH από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4 και στατιστικά σημαντική αύξηση του pH από την Ημέρα 4 στην Ημέρα 9. Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες παρατηρείται μόνο στατιστικά σημαντική ελάττωση του pH από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά στο pH σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

7.2.8.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 66 Συγκρίσεις του pH των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 Ακμή	0.3667	0.09033 to 0.6430	Yes	*	0.014
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.3681	0.01565 to 0.7205	Yes	*	0.0419
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.31	0.01724 to 0.6028	Yes	*	0.0401
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 Μάρτυρες	0.3478	0.08112 to 0.6144	Yes	*	0.0147
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 Ακμή	0.4265	0.06263 to 0.7904	Yes	*	0.0248
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.5492	0.2804 to 0.8180	Yes	***	0.0007
SKH-hr2 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-0.23	-0.4501 to -0.009881	Yes	*	0.042
SKH-hr2 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.2014	0.008708 to 0.3941	Yes	*	0.0419
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.4314	0.2084 to 0.6544	Yes	**	0.0013
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-0.3829	-0.7577 to -0.007993	Yes	*	0.0461
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 Μάρτυρες	0.3086	0.06600 to 0.5511	Yes	*	0.0172
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.3443	0.09400 to 0.5946	Yes	*	0.0113
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 Μάρτυρες	0.6914	0.3313 to 1.052	Yes	**	0.002
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 Ακμή	0.5814	0.2239 to 0.9389	Yes	**	0.0056
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	0.5829	0.2226 to 0.9431	Yes	**	0.0056
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	0.7271	0.3635 to 1.091	Yes	**	0.0015

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, ανά είδος δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το pH οι ομάδες των μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης.
- Την Ημέρα 0, η ομάδα SKH-hr1 Ακμή έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένο pH σε σχέση με τις ομάδες SKH-hr2 (καφέ) Ακμή και SKH-hr2+ApoE Ακμή.
- Την Ημέρα 4, στο είδος SKH-hr2+ApoE, η ομάδα πρόκλησης ακμής έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένο pH σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.
- Την Ημέρα 9, στο είδος SKH-hr1, η ομάδα πρόκλησης ακμής έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένο pH σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.

7.2.8.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.8.5.1 Ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 4 με τις Ημέρες 0 και 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 67 και Πίνακας 68) επιβεβαιώθηκε η στατιστικά σημαντική ελάττωση του pH από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4, ενώ βρέθηκε ότι οι Ημέρες 4 και 9 δε διαφέρουν σημαντικά ως προς το pH.

Πίνακας 67 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 4 για την ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή και την παράμετρο του pH. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0391
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	3.000 , -33.00
Sum of signed ranks (W)	-30
Number of pairs	8
Number of ties (ignored)	0

Πίνακας 68 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs μεταξύ των Ημερών 4 και 9 για την ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή και την παράμετρο του pH. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0781
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	25.00 , -3.000
Sum of signed ranks (W)	22
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

7.2.8.5.2 Ημέρα 4, είδος SKH-hr2 (καφέ) - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 69) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το pH.

Πίνακας 69 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2 (καφέ) την Ημέρα 4 για την παράμετρο του pH. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.281
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	66 , 54
Mann-Whitney U	18

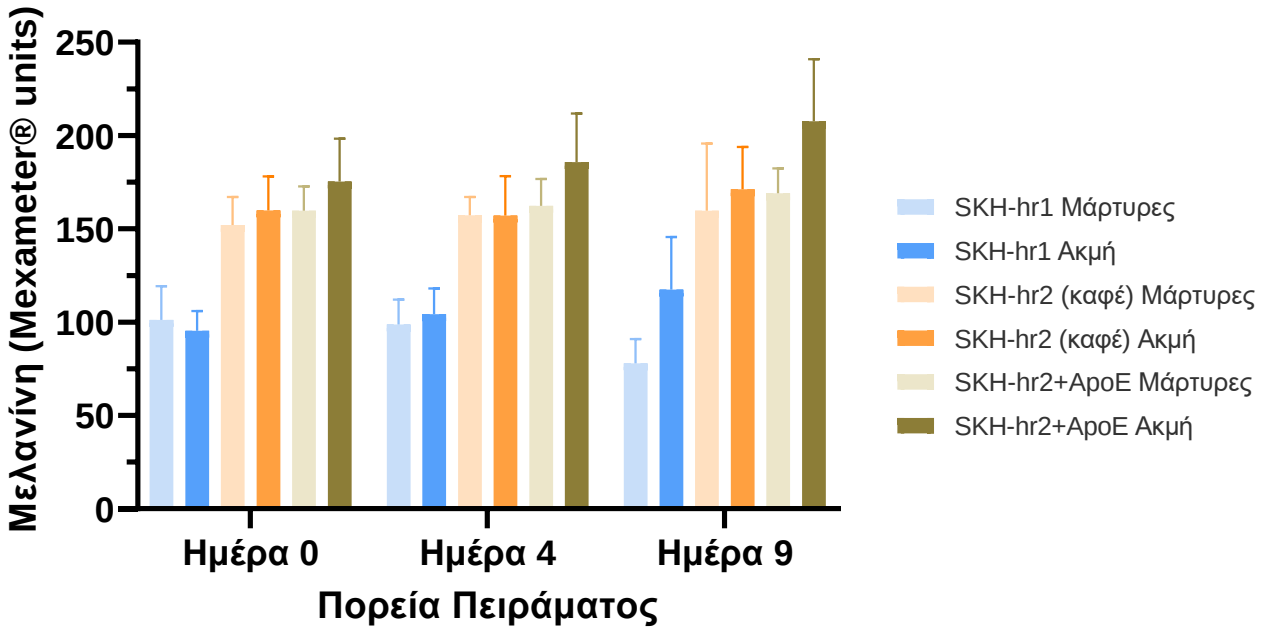
7.2.9 Μελανίνη

7.2.9.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις μελανίνης των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 70 και Γράφημα 10).

Πίνακας 70 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της μελανίνης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Μελανίνη (Mexameter® units) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	101	99	78
	Τυπική Απόκλιση	18	13	13
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	95	104	117
	Τυπική Απόκλιση	11	14	28
SKH-hr2 (καφέ)- Μάρτυρες	Μέση Τιμή	152	157	160
	Τυπική Απόκλιση	15	10	36
SKH-hr2 (καφέ)- Ακμή	Μέση Τιμή	160	157	171
	Τυπική Απόκλιση	18	21	23
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	160	162	169
	Τυπική Απόκλιση	13	14	13
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	175	186	208
	Τυπική Απόκλιση	23	26	33



Γράφημα 10 Ραβδόγραμμα της μελανίνης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.9.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της μελανίνης έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 71).

Πίνακας 71 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις μελανίνης δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Μελανίνη - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 9	SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	0.002

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.9.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 72 Συγκρίσεις της μελανίνης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	23.29	9.561 to 37.01	Yes	**	0.006
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	20.81	6.734 to 34.88	Yes	*	0.0111
SKH-hr1 Ακμή					
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-32.38	-60.43 to -4.333	Yes	*	0.0312
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-21.95	-41.70 to -2.202	Yes	*	0.0355
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					

Παρατηρήσεις:

- Στην ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες, η μέτρηση της μελανίνης είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη την Ημέρα 9 σε σύγκριση με τις Ημέρες 0 και 4.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, η μέτρηση της μελανίνης την Ημέρα 9 είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις Ημέρες 0 και 4.
- Σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μελανίνη κατά τη διάρκεια του πειράματος.

7.2.9.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 73 Συγκρίσεις της μελανίνης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-50.86	-70.35 to -31.37	Yes	***	0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-58.73	-79.03 to -38.44	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-74.14	-98.41 to -49.87	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-58.57	-77.11 to -40.03	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-56.67	-71.55 to -41.78	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-64.54	-80.63 to -48.45	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-79.95	-101.6 to -58.29	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-64.38	-77.57 to -51.19	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-23.29	-46.37 to -0.1969	Yes	*	0.0484
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-58.52	-72.32 to -44.73	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-58.46	-78.11 to -38.81	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-87.05	-112.1 to -62.03	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-63.62	-79.83 to -47.41	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-52.89	-65.51 to -40.28	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-52.83	-71.94 to -33.72	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-81.42	-106.1 to -56.72	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-57.99	-73.39 to -42.59	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-28.52	-52.93 to -4.118	Yes	*	0.0275
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-28.59	-55.58 to -1.594	Yes	*	0.0397
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-39.57	-66.36 to -12.78	Yes	**	0.0089
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-81.86	-115.6 to -48.12	Yes	***	0.0006
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-93.29	-115.4 to -71.14	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-129.8	-164.6 to -94.98	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-91.14	-106.6 to -75.73	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-42.29	-80.16 to -4.409	Yes	*	0.0317
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-53.71	-83.61 to -23.82	Yes	**	0.0022
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-90.24	-128.6 to -51.84	Yes	***	0.0004
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-51.57	-78.41 to -24.73	Yes	**	0.002
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-47.95	-90.24 to -5.668	Yes	*	0.0297
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-36.52	-72.98 to -0.06815	Yes	*	0.0497
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	38.67	3.824 to 73.51	Yes	*	0.0346

Παρατηρήσεις:

- Οι περισσότερες από τις στατιστικά σημαντικές διαφορές της μελανίνης σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών ειδών των μυών. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μύες SKH-hr1 είναι αλφικοί, επομένως έχουν πολύ χαμηλές τιμές μελανίνης, οι SKH-hr2 είναι καφέ οπότε έχουν ενδιάμεσες τιμές και οι SKH-hr2+ApoE προέρχονται από μαύρους άτριχους μύες οπότε έχουν υψηλές τιμές.
- Την Ημέρα 0 και την Ημέρα 4, ανά είδος δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τη μελανίνη οι ομάδες των μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης.
- Την Ημέρα 9, στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2+ApoE, οι ομάδες πρόκλησης ακμής έχουν στατιστικά σημαντικά αυξημένη μελανίνη σε σχέση με τις ομάδες των μαρτύρων.

- Στο είδος SKH-hr2 (καφέ) δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στη μελανίνη μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας πρόκλησης, σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

7.2.9.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.9.5.1 Ημέρα 9, είδος SKH-hr2 (καφέ) - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 74) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη μελανίνη.

Πίνακας 74 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2 (καφέ) την Ημέρα 9 για την παράμετρο της μελανίνης. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.1649
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	41 , 64
Mann-Whitney U	13

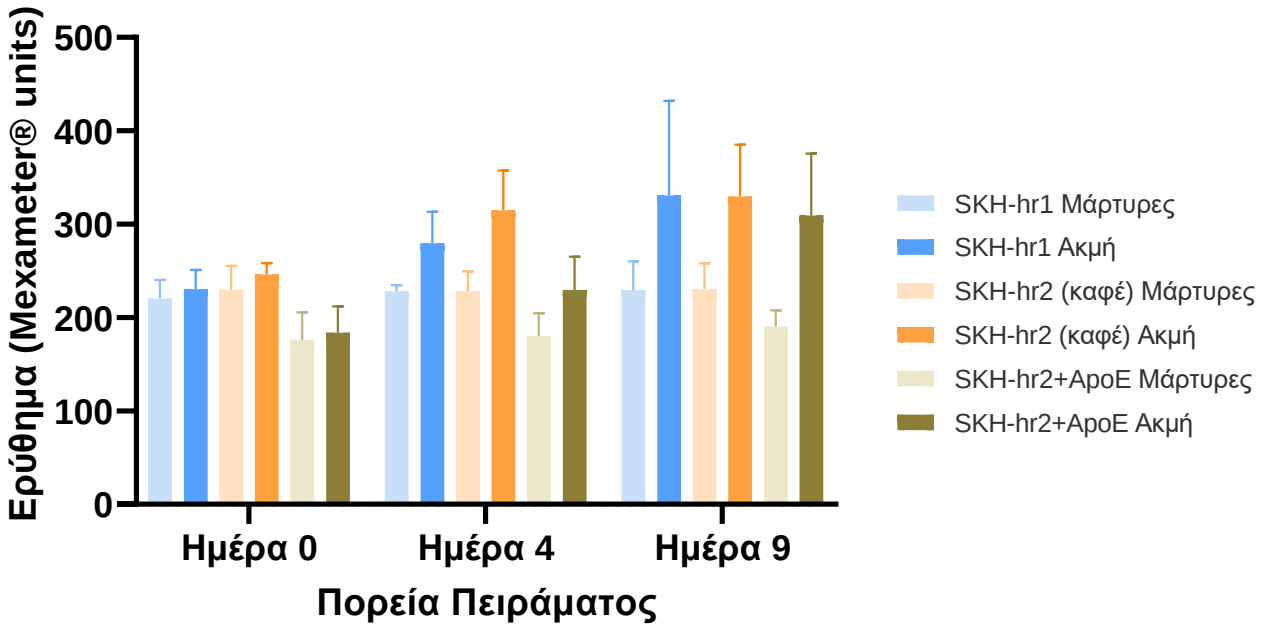
7.2.10 Ερύθημα

7.2.10.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις ερυθήματος των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 75 και Γράφημα 11).

Πίνακας 75 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση του ερυθήματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Ερυθρότητα (Mexameter® units) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	220	228	230
	Τυπική Απόκλιση	20	7	31
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	230	279	331
	Τυπική Απόκλιση	21	34	101
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	230	228	230
	Τυπική Απόκλιση	25	21	28
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	246	315	330
	Τυπική Απόκλιση	12	43	56
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	176	180	190
	Τυπική Απόκλιση	30	24	18
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	184	229	309
	Τυπική Απόκλιση	28	35	66



Γράφημα 11 Ραβδόγραμμα του ερυθήματος για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.10.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο του ερυθήματος έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 76).

Πίνακας 76 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις ερυθήματος δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Ερύθημα - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 0	SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	0.029

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.10.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 77 Συγκρίσεις του ερυθήματος των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-49.07	-78.32 to -19.83	Yes	**	0.0047
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-100.5	-180.4 to -20.54	Yes	*	0.0218
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-68.58	-108.4 to -28.74	Yes	**	0.0047
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-83.53	-133.4 to -33.63	Yes	**	0.0064
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-45.81	-75.90 to -15.71	Yes	**	0.0098
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-125.4	-185.2 to -65.62	Yes	**	0.003
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-79.6	-137.8 to -21.40	Yes	*	0.017
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					

Παρατηρήσεις:

- Σε καμία ομάδα μαρτύρων δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά του ερυθήματος μεταξύ των ημερών σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- Και στα τρία είδη μυών, στις ομάδες πρόκλησης ακμής παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του ερυθήματος στις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή παρατηρείται επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση του ερυθήματος στην Ημέρα 9 σε σχέση με την Ημέρα 4.

7.2.10.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 78 Συγκρίσεις του ερυθήματος των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-25.85	-45.42 to -6.284	Yes	*	0.0149
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	36.43	7.507 to 65.35	Yes	*	0.0182
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	44.1	14.33 to 73.86	Yes	**	0.0077
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	46.61	18.55 to 74.67	Yes	**	0.0039
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	54.27	25.32 to 83.23	Yes	**	0.0018
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	46	14.70 to 77.30	Yes	**	0.0077
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	53.67	21.64 to 85.70	Yes	**	0.0034
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	62.28	35.65 to 88.91	Yes	***	0.0007
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	69.95	42.33 to 97.57	Yes	***	0.0004
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-51.49	-77.72 to -25.27	Yes	**	0.0017
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-86.67	-122.5 to -50.83	Yes	***	0.0006
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	47.81	25.06 to 70.56	Yes	**	0.0017
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	51.68	21.78 to 81.59	Yes	**	0.0024
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	49.87	11.97 to 87.78	Yes	*	0.0139
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	99.3	68.03 to 130.6	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-86.86	-124.8 to -48.92	Yes	***	0.0004
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	47.62	20.72 to 74.52	Yes	**	0.0023
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	85.05	41.42 to 128.7	Yes	**	0.001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	134.5	95.65 to 173.3	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	49.43	13.46 to 85.40	Yes	*	0.0117
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	-101.3	-195.6 to -6.976	Yes	*	0.0387
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-100	-153.9 to -46.08	Yes	**	0.0022
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-79.6	-149.5 to -9.656	Yes	*	0.0312
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	39.43	9.536 to 69.32	Yes	*	0.015
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	100.9	6.712 to 195.0	Yes	*	0.0391
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	140.7	46.96 to 234.5	Yes	*	0.01
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	-99.57	-152.9 to -46.25	Yes	**	0.0023
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-79.17	-148.9 to -9.469	Yes	*	0.0316
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	39.86	11.99 to 67.73	Yes	**	0.0097
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	139.4	87.65 to 191.2	Yes	***	0.0004
SKH-hr2+ApoE Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	119	49.72 to 188.3	Yes	**	0.0061

Παρατηρήσεις:

- Οι περισσότερες από τις στατιστικά σημαντικές διαφορές του ερυθήματος σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, παρατηρούνται μεταξύ των διαφορετικών ειδών των μυών. Από την Ημέρα 0 φαίνεται πως το είδος SKH-hr2+ApoE έχει εγγενώς χαμηλότερα επίπεδα ερυθήματος από τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ).
- Την Ημέρα 0, ανά είδος δε διαφέρουν ως προς το ερύθημα οι ομάδες των μαρτύρων με τις ομάδες πρόκλησης.
- Τις Ημέρες 4 και 9, σε όλα τα είδη μυών, οι ομάδες πρόκλησης εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά αυξημένο ερύθημα σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες μαρτύρων.
- Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, δε διαφέρουν σημαντικά ως προς το ερύθημα οι ομάδες πρόκλησης ακμής στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ).

- Την Ημέρα 9, το ερύθημα στην ομάδα SKH-hr2+ApoE δε διαφέρει από των ομάδων SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2 (καφέ), ενώ τις Ημέρες 0 και 4 διαφέρει. Την Ημέρα 9 παρατηρείται δηλαδή μια έντονη αύξηση του ερυθήματος στην ομάδα αυτή, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 11).

7.2.10.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.10.5.1 Ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 0 με τις Ημέρες 4 και 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 79 και Πίνακας 80) επιβεβαιώθηκε η στατιστικά σημαντική αύξηση του ερυθήματος τις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την ημέρα 0.

Πίνακας 79 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 4 για την ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή και την παράμετρο του ερυθήματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0156
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	35.00 , -1.000
Sum of signed ranks (W)	34
Number of pairs	8
Number of ties (ignored)	0

Πίνακας 80 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 9 για την ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή και την παράμετρο του ερυθήματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0156
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	28.00 , 0.000
Sum of signed ranks (W)	28
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

7.2.10.5.2 Ημέρα 0, είδος SKH-hr2 (καφέ) - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 81) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ερύθημα μεταξύ των δύο ομάδων, με οριακό όμως P-value.

Πίνακας 81 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr2 (καφέ) την Ημέρα 0 για την παράμετρο του ερυθήματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.0496
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	39 , 81
Mann-Whitney U	11

7.2.10.5.3 Ημέρα 0, Ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή - Σύγκριση με τις ομάδες SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2+ApoE Ακμή

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 82 και Πίνακας 83) την Ημέρα 0 η ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά με την ομάδα SKH-hr1 Ακμή ως προς την παράμετρο του ερυθήματος, ενώ έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένο ερύθημα σε σχέση με την ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή.

Πίνακας 82 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney για τη σύγκριση ερυθήματος μεταξύ των ομάδων πρόκλησης στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr1 την Ημέρα 0 του πειράματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.2429
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	45.50 , 74.50
Mann-Whitney U	17.5

Πίνακας 83 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney για τη σύγκριση ερυθήματος μεταξύ των ομάδων πρόκλησης στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE την Ημέρα 0 του πειράματος. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.0003
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	28 , 92
Mann-Whitney U	0

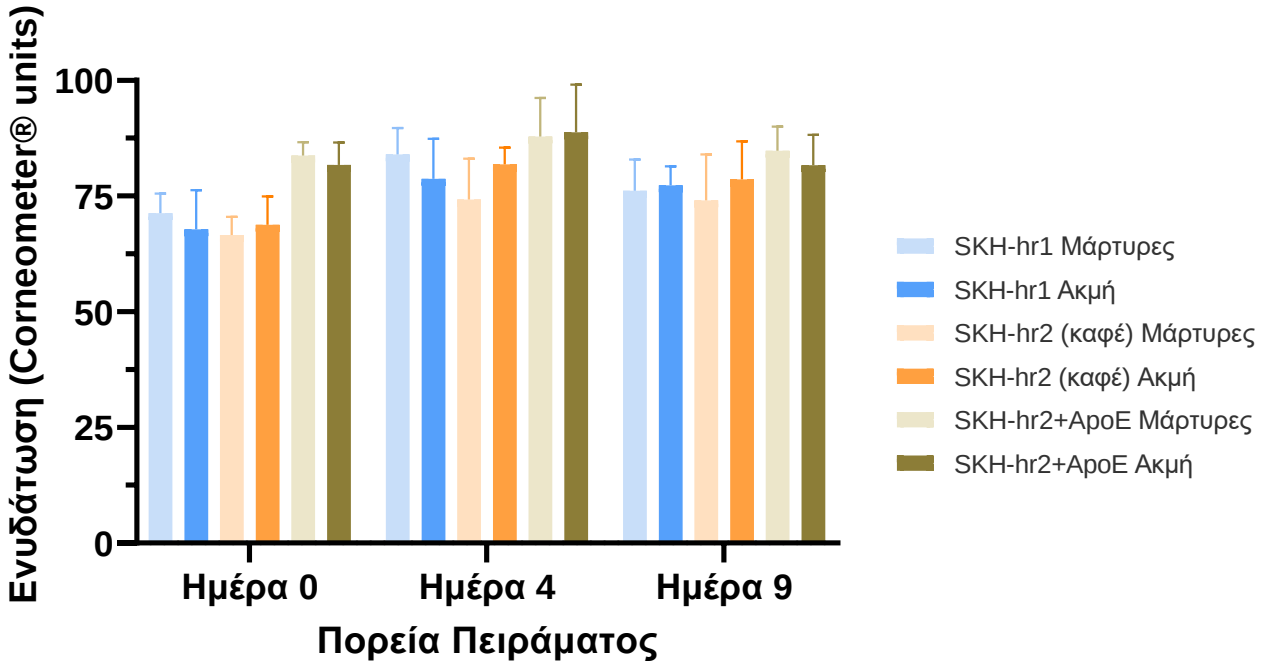
7.2.11 Ενυδάτωση

7.2.11.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις ενυδάτωσης των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 84 και Γράφημα 12).

Πίνακας 84 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της ενυδάτωσης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Ενυδάτωση (Corneometer® units) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	71	84	76
	Τυπική Απόκλιση	4	6	7
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	68	79	77
	Τυπική Απόκλιση	9	9	4
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	67	74	74
	Τυπική Απόκλιση	4	9	10
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	69	82	78
	Τυπική Απόκλιση	6	4	8
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	84	88	85
	Τυπική Απόκλιση	3	8	5
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	82	89	82
	Τυπική Απόκλιση	5	10	7



Γράφημα 12 Ραβδόγραμμα της ενυδάτωσης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.11.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της ενυδάτωσης έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τις ομάδες που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 85).

Πίνακας 85 Πειραματικές ομάδες για τις οποίες οι μετρήσεις ενυδάτωσης δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, σύμφωνα με το κριτήριο Shapiro-Wilk. Κανονική κατανομή θεωρείται ότι δεν ακολουθούν οι ομάδες για τις οποίες P-value<0.05.

Ενυδάτωση - Έλεγχος Κανονικότητας		
Πορεία Πειράματος	**Ομάδα**	**Shapiro-Wilk (Sig.)**
Ημέρα 4	SKH-hr1 - Ακμή	0.010

Για τις ομάδες αυτές οι συγκρίσεις θα επιβεβαιωθούν, όπου χρειάζεται, και με μη παραμετρικές μεθόδους στατιστικής ανάλυσης.

7.2.11.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 86 Συγκρίσεις της ενυδάτωσης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-12.67	-17.84 to -7.493	Yes	***	0.001
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	7.81	1.547 to 14.07	Yes	*	0.0225
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-10.89	-19.57 to -2.209	Yes	*	0.0201
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-9.508	-15.52 to -3.493	Yes	**	0.0083
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	-13	-20.20 to -5.799	Yes	**	0.0037
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-9.78	-16.39 to -3.174	Yes	*	0.0111
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 4, στο είδος SKH-hr1 η ενυδάτωση είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την Ημέρα 0 και στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της πρόκλησης.
- Την Ημέρα 9, σε σύγκριση με την Ημέρα 0, στο είδος SKH-hr1 η ομάδα πρόκλησης έχει σημαντικά αυξημένη ενυδάτωση, ενώ η ομάδα των μαρτύρων δε διαφέρει σημαντικά ως προς την ενυδάτωση.
- Η ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, έχει στατιστικά σημαντικά αυξημένη ενυδάτωση τις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0. Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες, δεν παρατηρείται καμία σημαντική διαφορά στην ενυδάτωση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.
- Στο είδος SKH-hr1+ApoE δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ενυδάτωση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, ούτε στην ομάδα των μαρτύρων ούτε στην ομάδα πρόκλησης ακμής.

7.2.11.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 87 Συγκρίσεις της ενυδάτωσης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-10.43	-15.74 to -5.120	Yes	**	0.0011
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-12.43	-16.72 to -8.138	Yes	****	<0.0001
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-13.94	-21.21 to -6.667	Yes	**	0.0012
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-15.94	-22.66 to -9.209	Yes	***	0.0003
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-15.19	-20.34 to -10.04	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-17.19	-21.24 to -13.14	Yes	****	<0.0001
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-12.92	-19.04 to -6.805	Yes	***	0.0005
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-14.92	-20.30 to -9.549	Yes	****	<0.0001
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	9.762	0.9284 to 18.60	Yes	*	0.0335
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-14.57	-25.75 to -3.391	Yes	*	0.015
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-13.62	-23.62 to -3.615	Yes	*	0.0118
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-8.619	-15.66 to -1.575	Yes	*	0.0208
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-7.476	-12.98 to -1.970	Yes	*	0.0122
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-10.71	-20.27 to -1.162	Yes	*	0.0318

Παρατηρήσεις:

- Όλες οι στατιστικά σημαντικές διαφορές της ενυδάτωσης σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, παρατηρούνται μεταξύ των ειδών. Φαίνεται από την Ημέρα 0 πως το είδος SKH-hr2+ApoE έχει εγγενώς σημαντικά υψηλότερη ενυδάτωση από τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ).
- Σε κανένα είδος μυών και σε καμία ημέρα του πειράματος δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά της ενυδάτωσης μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας πρόκλησης ακμής.

7.2.11.5 Μη παραμετρική στατιστική ανάλυση

7.2.11.5.1 Ομάδα SKH-hr1 Ακμή - Σύγκριση της Ημέρας 4 με τις Ημέρες 0 και 9

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Wilcoxon με ζευγαρωτό (paired) σχεδιασμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 88 και Πίνακας 89) επιβεβαιώνεται ότι η ενυδάτωση την Ημέρα 4 είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την Ημέρα 0, ενώ μεταξύ των Ημερών 4 και 9 δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά.

Πίνακας 88 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 0 και 4 για την ομάδα SKH-hr1 Ακμή και την παράμετρο της ενυδάτωσης. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.0156
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	*
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	28.00 , 0.000
Sum of signed ranks (W)	28
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

Πίνακας 89 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Wilcoxon matched-pairs για σύγκριση μεταξύ των Ημερών 4 και 9 για την ομάδα SKH-hr1 Ακμή και την παράμετρο της ενυδάτωσης. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Wilcoxon matched-pairs signed rank test	
P value	0.375
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of positive, negative ranks	8.000 , -20.00
Sum of signed ranks (W)	-12
Number of pairs	7
Number of ties (ignored)	0

7.2.11.5.2 Ημέρα 4, είδος SKH-hr1 - Σύγκριση ομάδας μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Mann-Whitney. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 90) δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 90 Αποτελέσματα μη παραμετρικού ελέγχου Mann-Whitney μεταξύ της ομάδας μαρτύρων και πρόκλησης στο είδος SKH-hr1 την Ημέρα 4 για την παράμετρο της ενυδάτωσης. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Mann Whitney test	
P value	0.4336
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	59 , 46
Mann-Whitney U	18

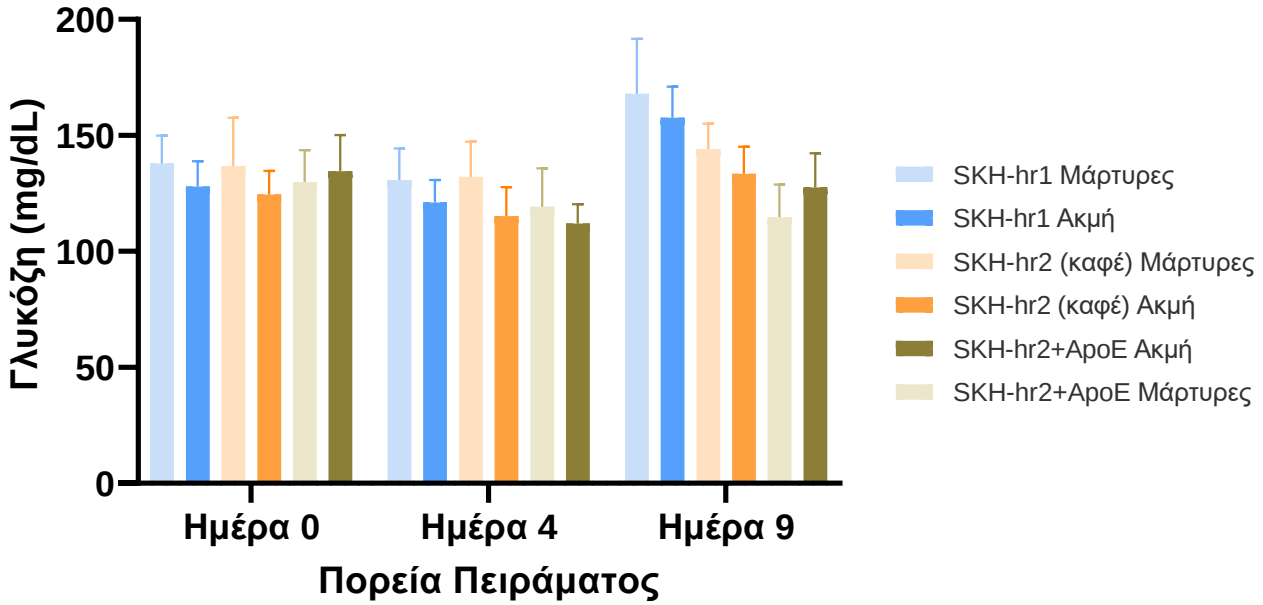
7.2.12 Γλυκόζη

7.2.12.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις γλυκόζης των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 91 και Γράφημα 13).

Πίνακας 91 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της γλυκόζης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Γλυκόζη (mg/dL) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	138	131	168
	Τυπική Απόκλιση	12	14	24
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	128	121	158
	Τυπική Απόκλιση	11	10	13
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	137	132	144
	Τυπική Απόκλιση	21	15	11
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	Μέση Τιμή	125	115	133
	Τυπική Απόκλιση	10	13	12
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	130	119	115
	Τυπική Απόκλιση	14	17	14
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	135	112	128
	Τυπική Απόκλιση	16	8	15



Γράφημα 13 Ραβδόγραμμα της γλυκόζης για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.12.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της γλυκόζης έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, επομένως για την ανάλυση των δεδομένων της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκαν μόνο παραμετρικές μέθοδοι.

7.2.12.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 92 Συγκρίσεις της γλυκόζης των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-30	-55.91 to -4.093	Yes	*	0.0298
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-37.14	-56.18 to -18.10	Yes	**	0.0031
SKH-hr1 Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-29.68	-40.81 to -18.56	Yes	***	0.0006
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-36.57	-51.88 to -21.27	Yes	**	0.0011
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	-8.929	-16.35 to -1.503	Yes	*	0.0259
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	-18.3	-27.73 to -8.873	Yes	**	0.0032
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	22.57	5.951 to 39.19	Yes	*	0.0159
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 4	10.71	0.4473 to 20.98	Yes	*	0.0433
Ημέρα 0 vs. Ημέρα 9	15.14	0.5546 to 29.73	Yes	*	0.0441

Παρατηρήσεις:

- Στο είδος SKH-hr1 η γλυκόζη είναι σημαντικά αυξημένη την Ημέρα 9 σε σχέση με την Ημέρα 0 και την Ημέρα 4, στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα πρόκλησης ακμής.
- Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, η γλυκόζη είναι σημαντικά αυξημένη την Ημέρα 9 σε σχέση με την Ημέρα 0 και την Ημέρα 4. Αντίθετα, η γλυκόζη δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ημερών του πειράματος στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες.
- Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή η γλυκόζη είναι σημαντικά χαμηλότερη την Ημέρα 4 σε σχέση με την Ημέρα 0, ενώ μεταξύ των Ημερών 0 και 9 δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά. Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες, η γλυκόζη είναι σημαντικά χαμηλότερη τις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0.

7.2.12.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 93 Συγκρίσεις της γλυκόζης των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	13.36	0.7190 to 26.00	Yes	*	0.04
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	15.59	0.8027 to 30.38	Yes	*	0.0404
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	18.71	5.202 to 32.23	Yes	*	0.0116
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	17.02	1.178 to 32.86	Yes	*	0.0374
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	20.14	5.399 to 34.89	Yes	*	0.0127
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	23.71	1.147 to 46.28	Yes	*	0.0415
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	34.43	11.71 to 57.14	Yes	**	0.0077
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	40.36	16.31 to 64.40	Yes	**	0.0038
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	53.14	29.81 to 76.48	Yes	***	0.0005
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Ακμή	24.14	9.463 to 38.82	Yes	**	0.0038
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	30.07	12.56 to 47.59	Yes	**	0.0032
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	42.86	26.80 to 58.92	Yes	****	0.0482
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	16.64	0.1623 to 33.12	Yes	*	0.001
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	29.43	14.67 to 44.19	Yes	**	0.0195
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	18.71	3.606 to 33.82	Yes	*	

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0, οι περισσότερες ομάδες μυών δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τις μετρήσεις γλυκόζης, ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών ειδών.
- Τις Ημέρες 0 και 9, σε κανένα είδος μυών δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά της γλυκόζης μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και της ομάδας πρόκλησης ακμής.
- Στο είδος SKH-hr2 (καφέ), την Ημέρα 4 η γλυκόζη της ομάδας πρόκλησης είναι σημαντικά ελαττωμένη σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.
- Την Ημέρα 9, οι μετρήσεις γλυκόζης ελαττώνονται, όπως φαίνεται και παραπάνω (Γράφημα 13), με τη σειρά με την οποία θυσιάστηκαν οι ομάδες των μυών.

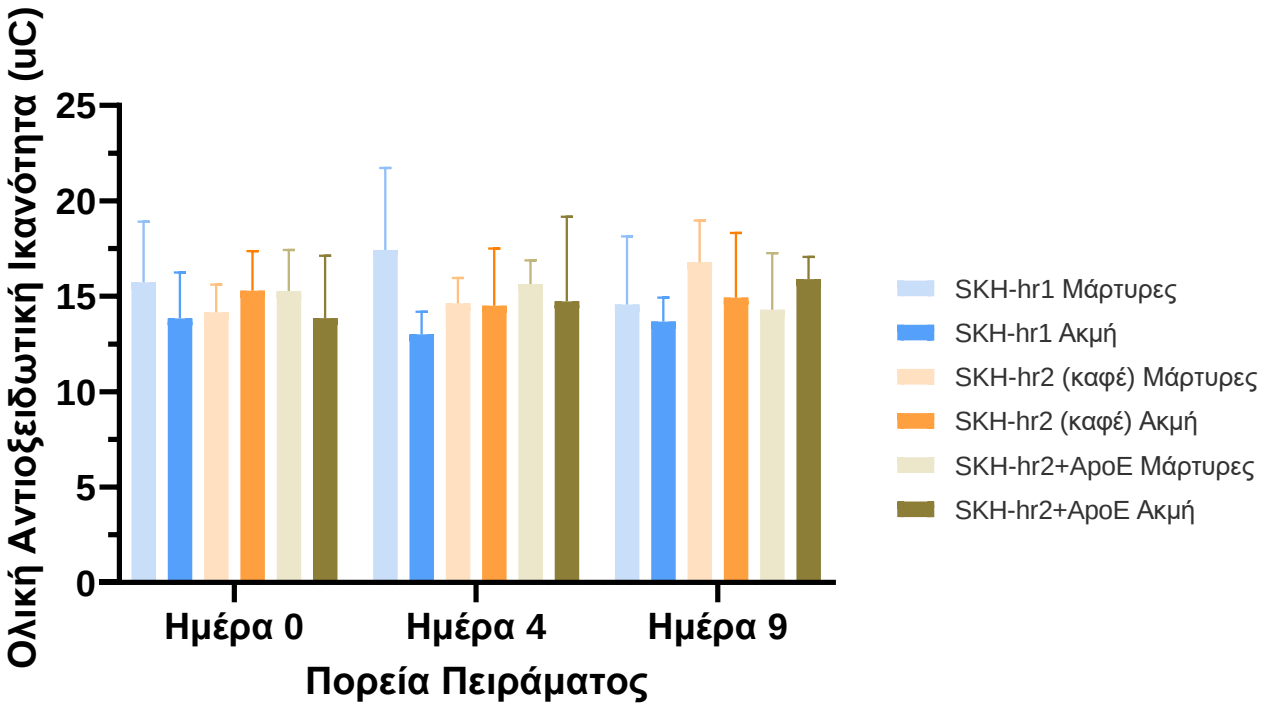
7.2.13 Αντιοξειδωτική ικανότητα

7.2.13.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις αντιοξειδωτικής ικανότητας των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 94 και Γράφημα 14).

Πίνακας 94 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (uC) - Περιγραφική Στατιστική				
Ομάδα		**Ημέρα 0**	**Ημέρα 4**	**Ημέρα 9**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	15.7	17.4	14.6
	Τυπική Απόκλιση	3.2	4.3	3.6
SKH-hr1 - Ακμή	Μέση Τιμή	13.8	13.0	13.7
	Τυπική Απόκλιση	2.4	1.2	1.3
SKH-hr2 - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	14.2	14.6	16.8
	Τυπική Απόκλιση	1.5	1.3	2.2
SKH-hr2 - Ακμή	Μέση Τιμή	15.3	14.5	14.9
	Τυπική Απόκλιση	2.1	3.0	3.4
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	Μέση Τιμή	13.9	14.7	15.9
	Τυπική Απόκλιση	3.3	4.4	1.2
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	Μέση Τιμή	15.3	15.6	14.3
	Τυπική Απόκλιση	2.2	1.2	3.0



Γράφημα 14 Ραβδόγραμμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

7.2.13.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή, επομένως για την ανάλυση των δεδομένων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν μόνο παραμετρικές μέθοδοι.

7.2.13.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ημερών

Πίνακας 95 Συγκρίσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μυών, μεταξύ των ημερών του πειράματος, ανά ομάδα μυών, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες					
Ημέρα 4 vs. Ημέρα 9	2.857	0.2321 to 5.482	Yes	*	0.0374
SKH-hr1 Ακμή					
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες					
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή					
SKH-hr2+ApoE Ακμή					
SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες					

Παρατηρήσεις:

- Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, δεν παρατηρείται σε καμία ομάδα στατιστικά σημαντική διαφορά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των ημέρων, εκτός από την ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες, που εμφανίζουν μία στατιστικά σημαντική ελάττωση από την Ημέρα 4 στην Ημέρα 9.

7.2.13.4 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 96 Συγκρίσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, ανά ημέρα του πειράματος, με εφαρμογή μικτού μοντέλου ανάλυσης και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
Ημέρα 0					
Ημέρα 4					
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr1 Ακμή	4.429	0.4406 to 8.417	Yes	*	0.0343
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-1.629	-3.021 to -0.2360	Yes	*	0.0255
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	-2.643	-3.969 to -1.317	Yes	***	0.0009
Ημέρα 9					
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες	-3.114	-5.253 to -0.9759	Yes	**	0.009
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	-2.229	-3.714 to -0.7435	Yes	**	0.0071

Παρατηρήσεις:

- Την Ημέρα 0 του πειράματος, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων των μύων ως προς την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα.
- Στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE, δεν παρατηρείται σε καμία ημέρα του πειράματος στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής, ως προς την αντιοξειδωτική ικανότητα.
- Την Ημέρα 4 του πειράματος, στο είδος SKH-hr1, η ομάδα πρόκλησης ακμής έχει χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την ομάδα των μαρτύρων. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική. Η ομάδα αυτή διαφέρει επίσης σημαντικά και με τους μάρτυρες των ειδών SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE.
- Την Ημέρα 9 του πειράματος, η ομάδα SKH-hr1 Ακμή δε διαφέρει από την ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες, έχει όμως χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις ομάδες SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες και SKH-hr2+ApoE Ακμή. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

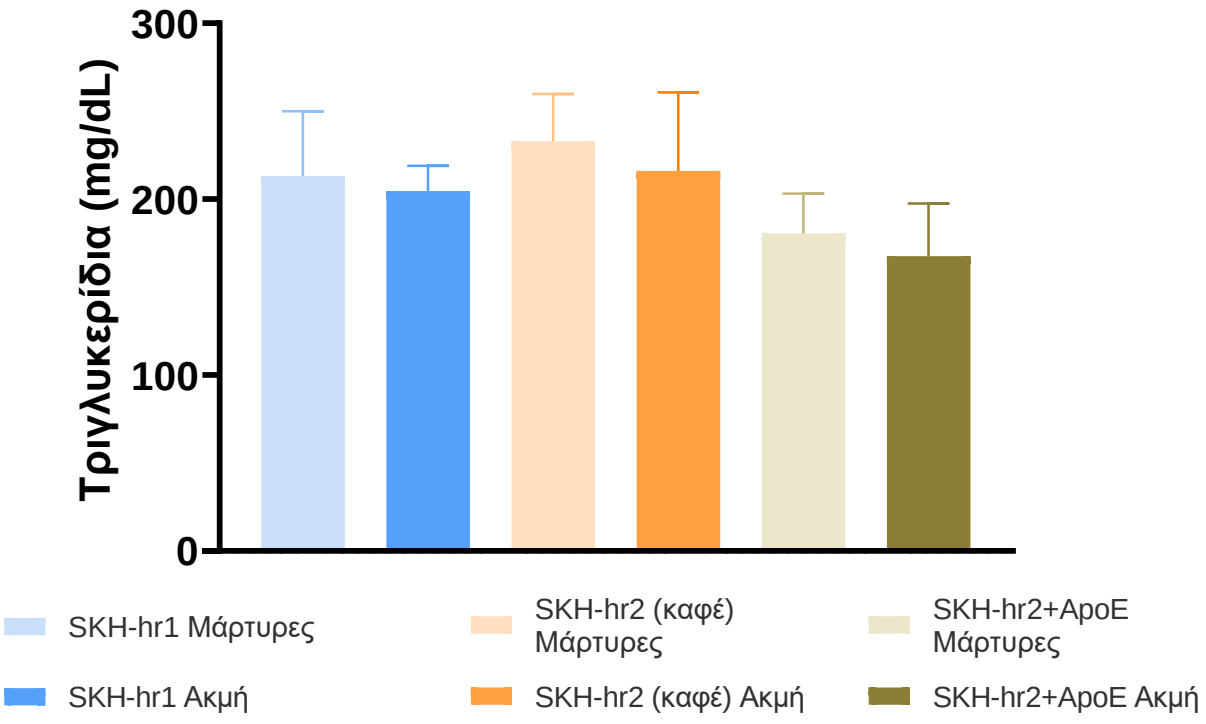
7.2.14 Τριγλυκερίδια

7.2.14.1 Περιγραφική στατιστική

Τα περιγραφικά στατιστικά μεγέθη (μέση τιμή, τυπική απόκλιση) για τις μετρήσεις τριγλυκεριδίων των μύων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 97 και Γράφημα 15).

Πίνακας 97 Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των τριγλυκεριδίων για κάθε ομάδα μυών στη διάρκεια του πειράματος.

Τριγλυκερίδια (Ημέρα 9) (mg/dL) - Περιγραφική Στατιστική		
Ομάδα	**Μέση Τιμή**	**Τυπική Απόκλιση**
SKH-hr1 - Μάρτυρες	213	37
SKH-hr1 - Ακμή	205	14
SKH-hr2 (καφέ) - Μάρτυρες	233	27
SKH-hr2 (καφέ) - Ακμή	216	45
SKH-hr2+ApoE - Μάρτυρες	181	23
SKH-hr2+ApoE - Ακμή	168	30



Γράφημα 15 Ραβδόγραμμα των τριγλυκεριδίων για κάθε ομάδα μυών, την Ημέρα 9 του πειράματος.

7.2.14.2 Έλεγχος κανονικότητας

Στη συνέχεια, για την παράμετρο των τριγλυκεριδίων έγινε έλεγχος κανονικότητας Shapiro-Wilk και διαπιστώθηκε ότι όλες οι ομάδες των μυών ακολουθούν κανονική κατανομή, επομένως για την ανάλυση των δεδομένων των τριγλυκεριδίων χρησιμοποιήθηκαν μόνο παραμετρικές μέθοδοι.

7.2.14.3 Πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων

Πίνακας 98 Συγκρίσεις των τριγλυκεριδίων των μυών, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, την Ημέρα 9 του πειράματος, με εφαρμογή One Way ANOVA και post-hoc κριτήριο Fisher's LSD. Ως στατιστικά σημαντικές διαφορές χαρακτηρίζονται αυτές με P-value<0.05.

Uncorrected Fisher's LSD	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Individual P Value
SKH-hr1 Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	45.48	10.71 to 80.24	Yes	*	0.0118
SKH-hr1 Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	36.9	2.139 to 71.67	Yes	*	0.0381
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	52.43	19.03 to 85.83	Yes	**	0.003
SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	65.33	30.57 to 100.1	Yes	***	0.0005
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες	35.57	2.169 to 68.97	Yes	*	0.0375
SKH-hr2 (καφέ) Ακμή vs. SKH-hr2+ApoE Ακμή	48.48	13.71 to 83.24	Yes	**	0.0076

Παρατηρήσεις:

- Ανά είδος, μεταξύ των ομάδων πρόκλησης και των ομάδων των μαρτύρων, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα τριγλυκερίδια.
- Οι διαφορές στα τριγλυκερίδια παρατηρούνται κυρίως μεταξύ των ειδών. Το είδος SKH-hr2+ApoE φαίνεται να έχει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων από τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2.

7.2.15 Χοληστερόλη

Για τις μετρήσεις χοληστερόλης δεν έγινε στατιστική επεξεργασία. Τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ) έδωσαν μετρήσεις χοληστερόλης είτε πολύ κοντινές είτε χαμηλότερες από το ελάχιστο μετρητικό όριο του οργάνου (150mg/dL). Αντίθετα, στο είδος SKH-hr2+ApoE, οι μετρήσεις χοληστερόλης ήταν είτε πολύ κοντινές είτε υψηλότερες από το μέγιστο μετρητικό όριο του οργάνου (300mg/dL). Δε ήταν δυνατό επομένως να μετρηθεί αποτελεσματικά η παράμετρος της χοληστερόλης ώστε να αξιολογηθεί στατιστικά.

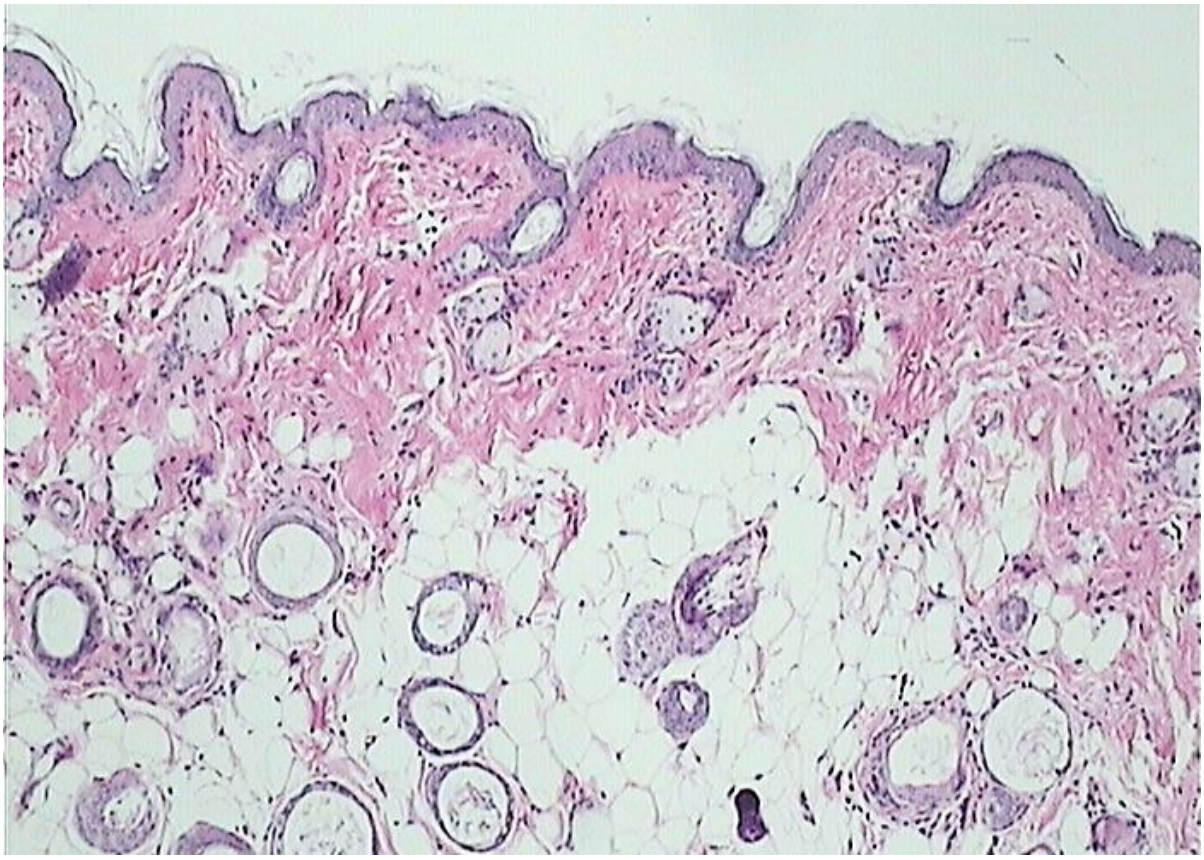
7.3 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

7.3.1 Δείγματα βλαβών της Ημέρας 4

Από τα δείγματα βλαβών της Ημέρας 4 του πειράματος δεν λήφθηκαν ιστοπαθολογικές εικόνες, έγινε όμως ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Όλα τα δείγματα εμφάνισαν πάχυνση της επιδερμίδας και έντονη φλεγμονή, αποστηματοποιημένη και διηθημένη μέχρι και το υποδόριο λίπος. Στο κέντρο της βλάβης παρατηρήθηκε νέκρωση και παρουσία κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως πολυμορφοπύρηνα. Το πόρισμα του ιστοπαθολόγου ήταν ότι η φλεγμονή ήταν εντονότερη στο δείγμα SKH-hr2 (καφέ) (μυς 4.5) σε σχέση με τα δείγματα SKH-hr1 (μύες 7.1, 7.2).

7.3.2 Δείγματα βλαβών της Ημέρας 9

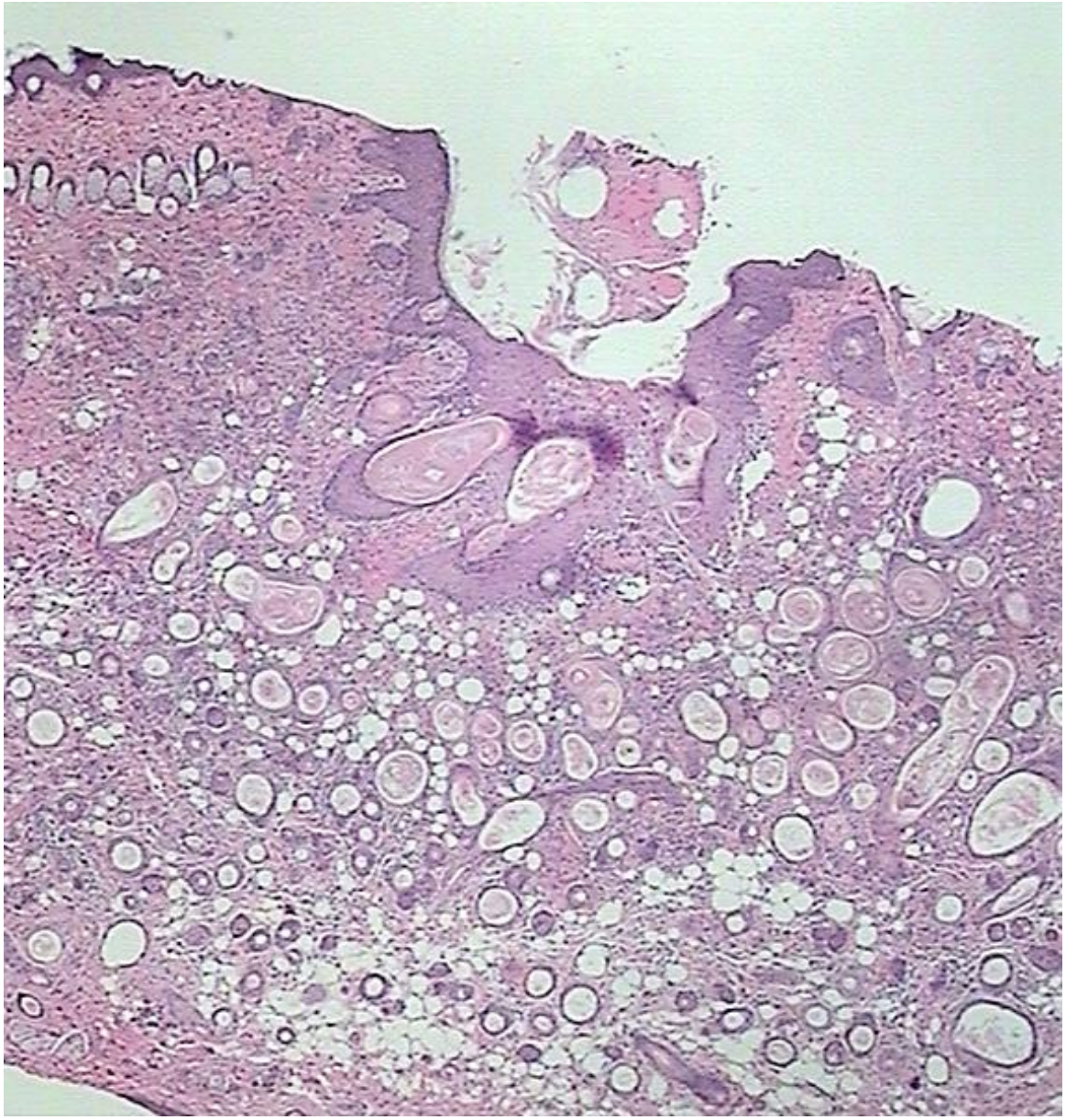
7.3.2.1 Ομάδα 1: SKH-hr1 Μάρτυρες



Εικόνα 22 Μυς 1.4 (μεγέθυνση x100)

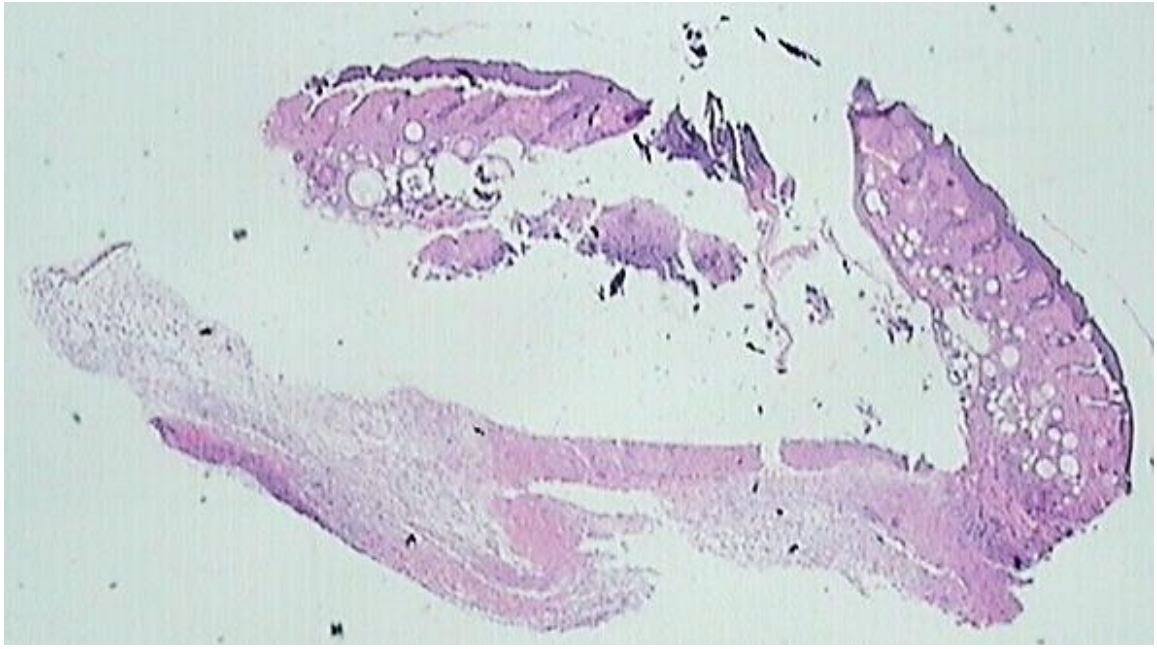
Στην ομάδα των μαρτύρων παρατηρείται μια τυπική εικόνα φυσιολογικού δέρματος (Εικόνα 22).

7.3.2.2 Ομάδα 2: SKH-hr1 Ακμή

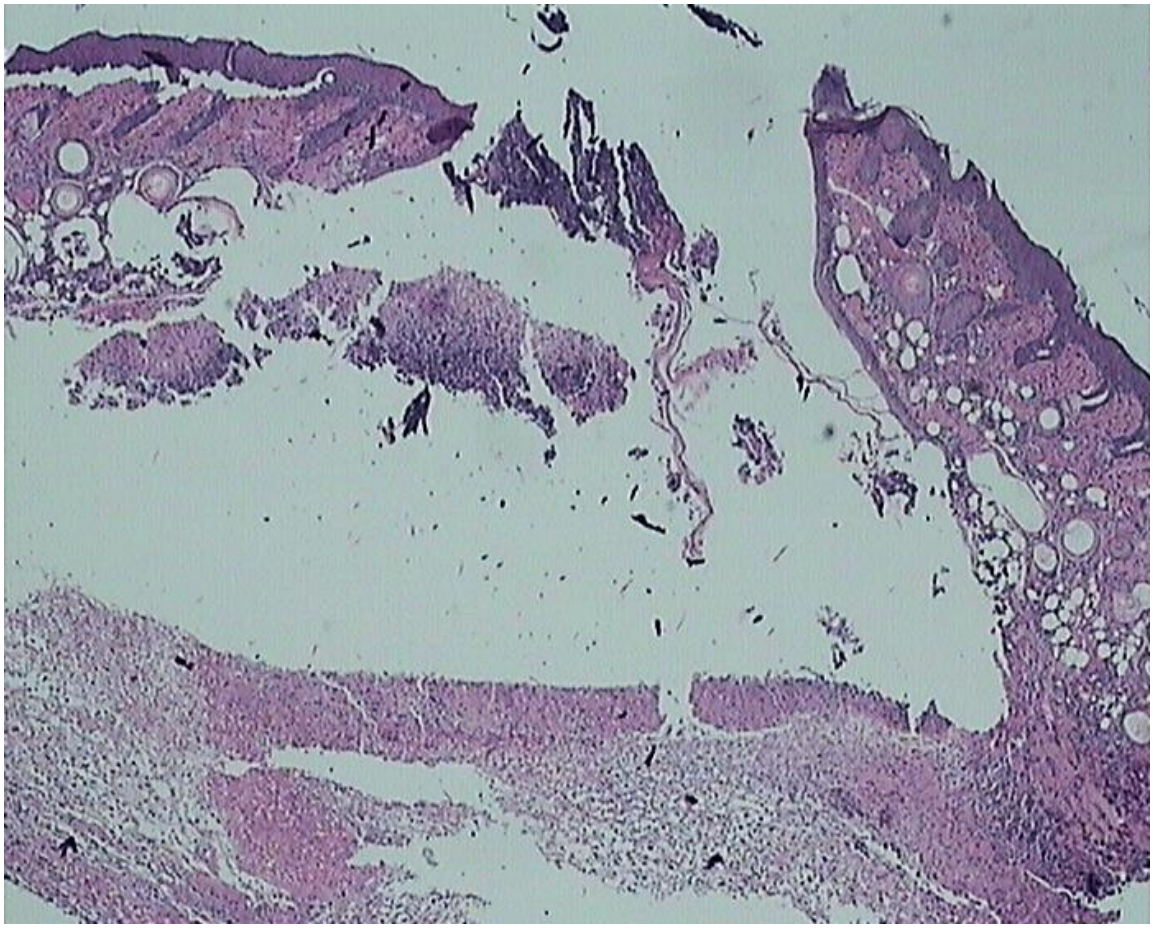


Εικόνα 23 Μυς 2.2 (μεγέθυνση x100)

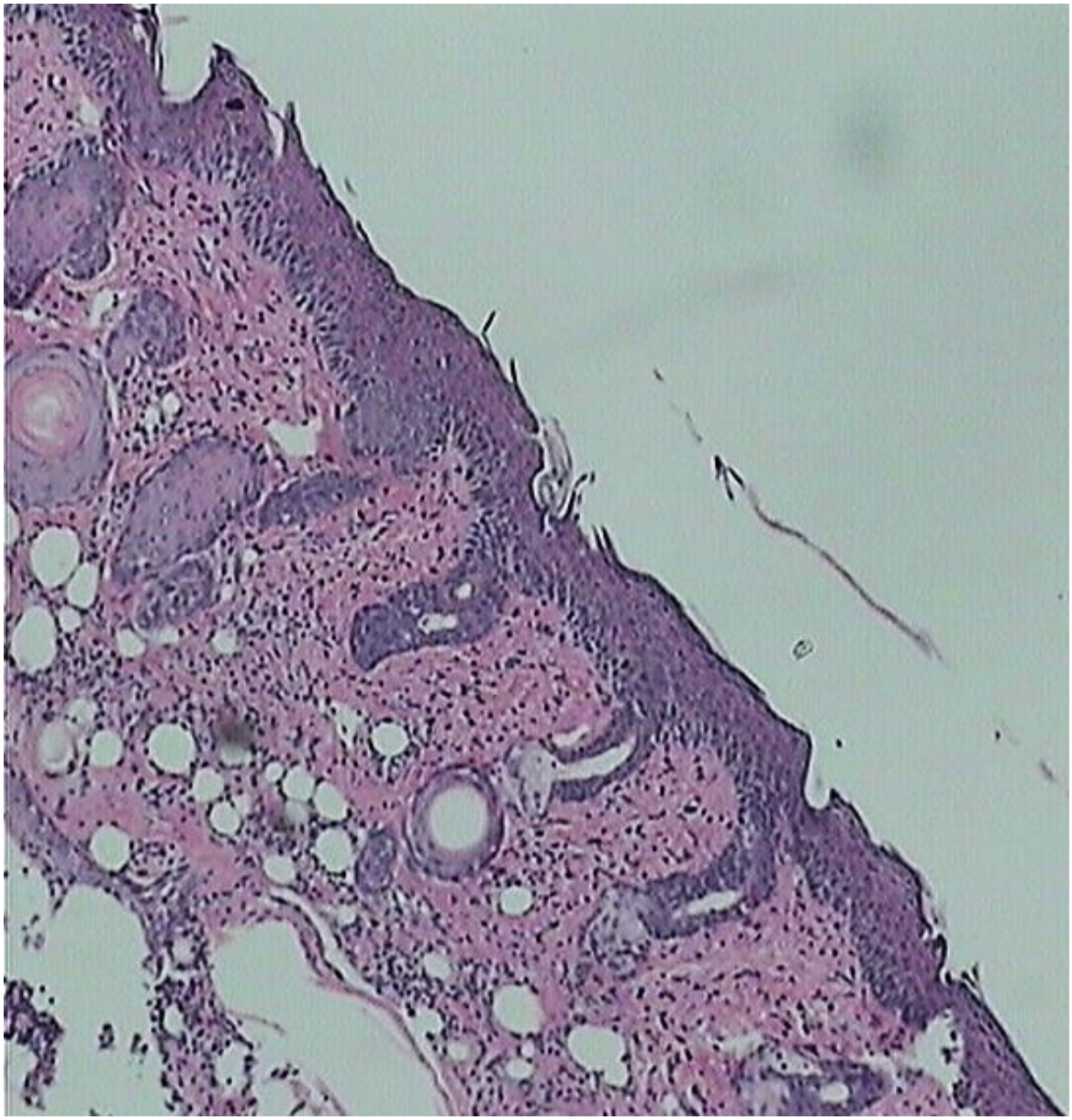
Η βλάβη, πριν τη θυσία του μυός 2.2, είχε διαρρηχθεί. Στην ιστοπαθολογική εικόνα (Εικόνα 23) φαίνεται πως το περιεχόμενο της βλάβης έχει πράγματι αποβληθεί και απομένει η επιδερμίδα, στην οποία παρατηρείται έντονη, υπερπλαστική πάχυνση. Παρατηρείται επίσης έντονη φλεγμονή με διήθηση στη δερμίδα.



Εικόνα 24 Μυς 2.7 (μεγέθυνση x20)



Εικόνα 25 Μυς 2.7 (Μεγέθυνση x40)



Εικόνα 26 Μυς 2.7 (μεγέθυνση x100)

Ο μυς 2.7 είχε την πιο έντονη κλινική εικόνα στην Ομάδα 2 πριν τη θυσία. Στην ιστοπαθολογική εικόνα φαίνεται πως το εσωτερικό της βλάβης έχει απομακρυνθεί με την τομή που έγινε για την προετοιμασία της χρώσης. Ωστόσο, η έκταση της βλάβης κρίθηκε πράγματι μεγαλύτερη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες βλάβες που εξετάστηκαν από τον ιστοπαθολόγο.

Στις περιοχές που απέμειναν από την τομή, παρατηρείται (Εικόνα 24, Εικόνα 25) έντονη φλεγμονή με νεοαγγείωση και παρουσία νεκροβιωτικού υλικού (πιθανώς τμήματα του εσωτερικού της βλάβης). Διακρίνονται ινοβλάστες καθώς και κύτταρα που σχετίζονται με τη φλεγμονή (πολυμορφοπύρηνα και λεμφοκύτταρα).

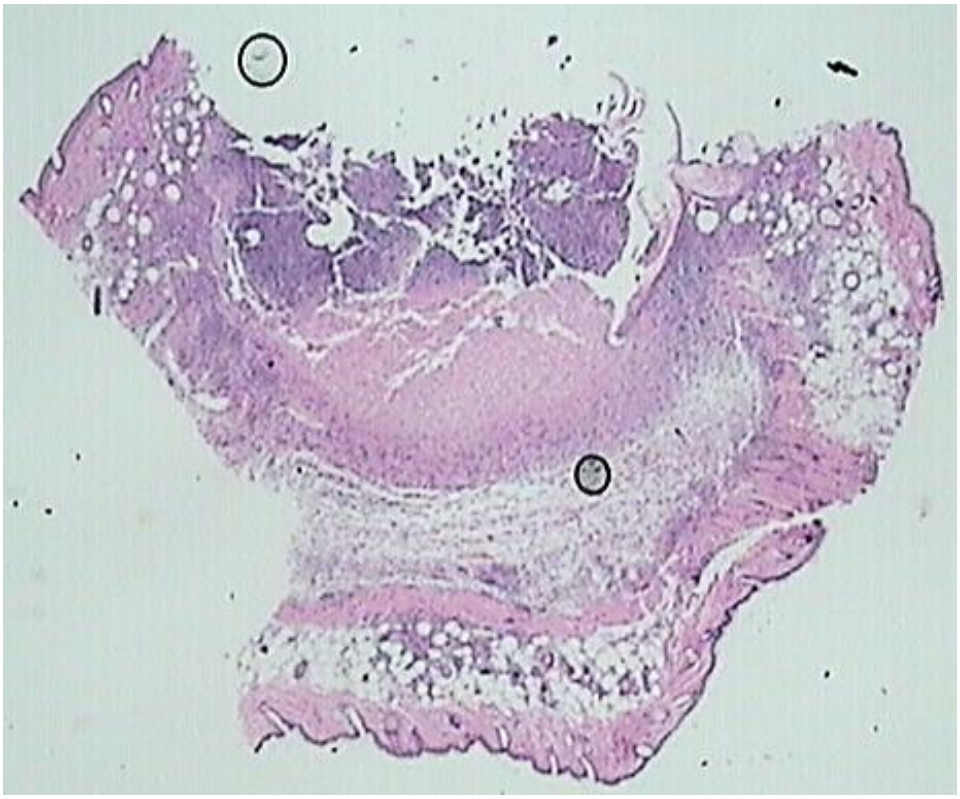
Στη μεγαλύτερη δυνατή μεγέθυνση (Εικόνα 26), είναι ευδιάκριτη η πάχυνση της επιδερμίδας και η διάχυτη φλεγμονή στη δερμίδα.

7.3.2.3 Ομάδα 3: SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες

Εικόνα 27 Μυς 3.4 (μεγέθυνση x100)

Στην ομάδα των μαρτύρων παρατηρείται μια τυπική εικόνα φυσιολογικού δέρματος (Εικόνα 27).

7.3.2.4 Ομάδα 4: SKH-hr2 (καφέ) Ακμή



Εικόνα 28 Μυς 4.8 (μεγέθυνση x20)

Εικόνα 29 Μυς 4.8 (μεγέθυνση x40)

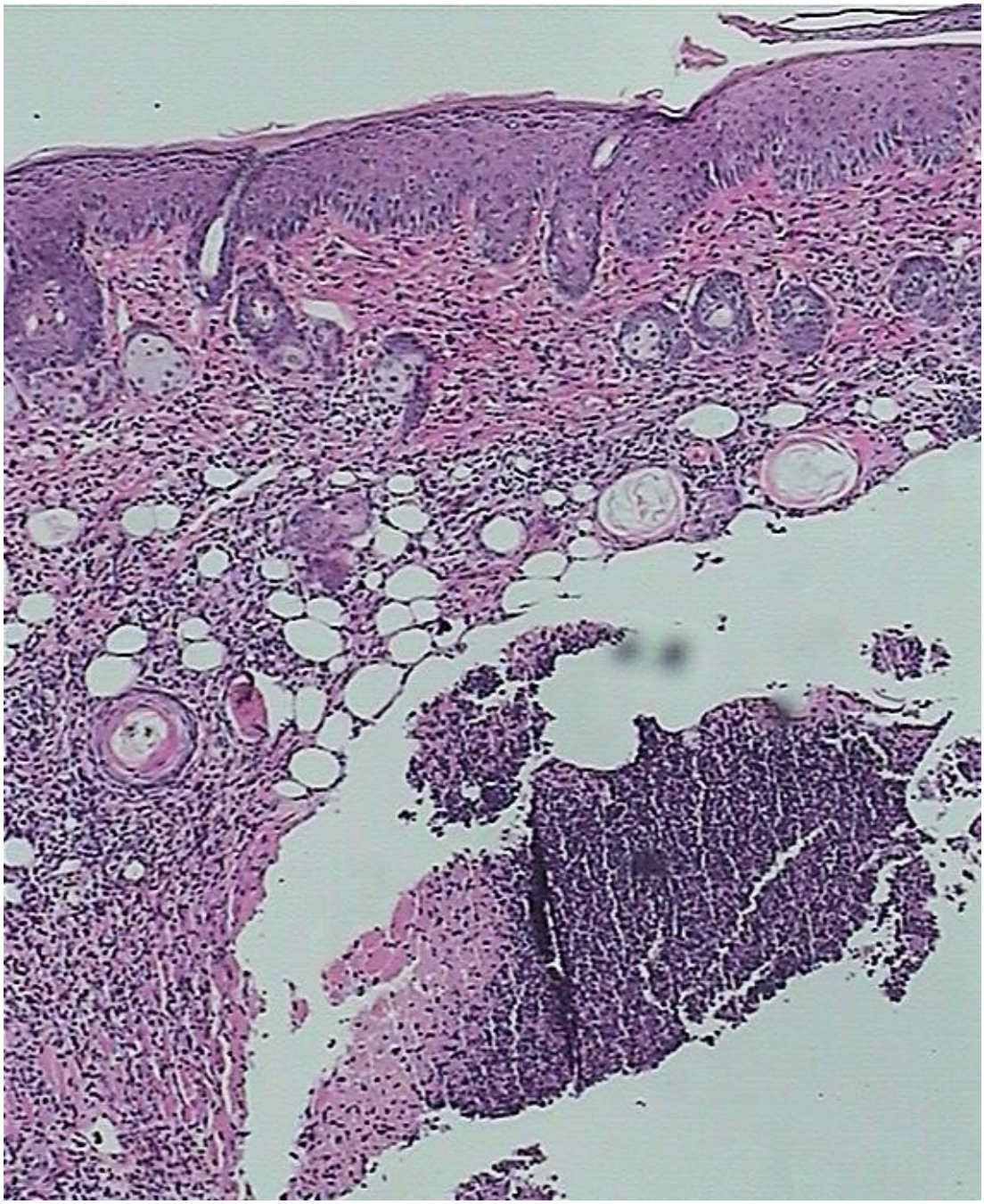
Ο μυς 4.8 πριν τη θυσία έφερε ενεργή βλάβη που χαρακτηρίστηκε ως αντιπροσωπευτική της ομάδας SKH-hr2 (καφέ) Ακμή. Πράγματι, στο τμήμα της βλάβης στο οποίο έγινε η χρώση διακρίνεται πάχυνση της επιδερμίδας και ενεργή, διηθημένη φλεγμονή φαγεσωρικού τύπου με πυκνή διήθηση και στη δερμίδα (Εικόνα 28).

Στη μεγέθυνση x40 διακρίνεται καλύτερα το εσωτερικό της αποστηματοποιημένης, φαγεσωρικού τύπου βλάβης η οποία έχει διηθηθεί μέχρι τα κατώτερα στρώματα της δερμίδας (Εικόνα 29).

Εικόνα 30 Μυς 4.2 (μεγέθυνση x20)

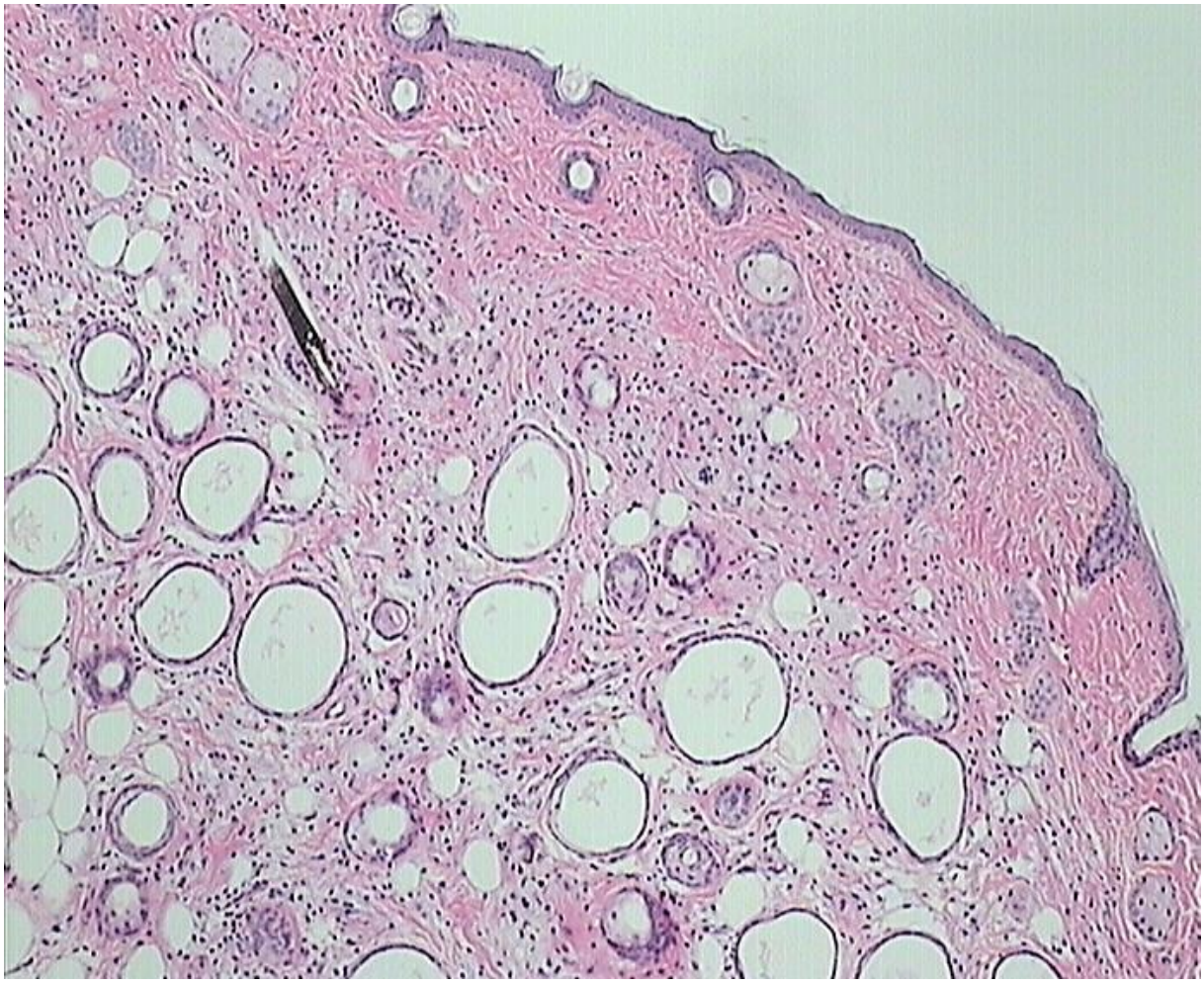
Ο μυς 4.2 είχε την εντονότερη βλάβη στην ομάδα των SKH-hr2. Διακρίνεται ολόκληρο το περίγραμμα της βλάβης και μέρος του εσωτερικού της. Μεγάλο τμήμα του εσωτερικού της βλάβης έχει απομακρυνθεί από την τομή του ιστού για την προετοιμασία της χρώσης. Και αυτή η βλάβη χαρακτηρίστηκε από τον ιστοπαθολόγο ως «φαγεσωρικού τύπου (comedo)» (Εικόνα 30).

Στη μεγέθυνση x100 διακρίνεται έντονη πάχυνση της επιδερμίδας και διάχυτη φλεγμονή στη δερμίδα. Διακρίνεται επίσης τμήμα του εσωτερικού της αποστηματοποιημένης, φαγεσωρικής βλάβης (Εικόνα 31).



Εικόνα 31 Μυς 4.2 (μεγέθυνση x100)

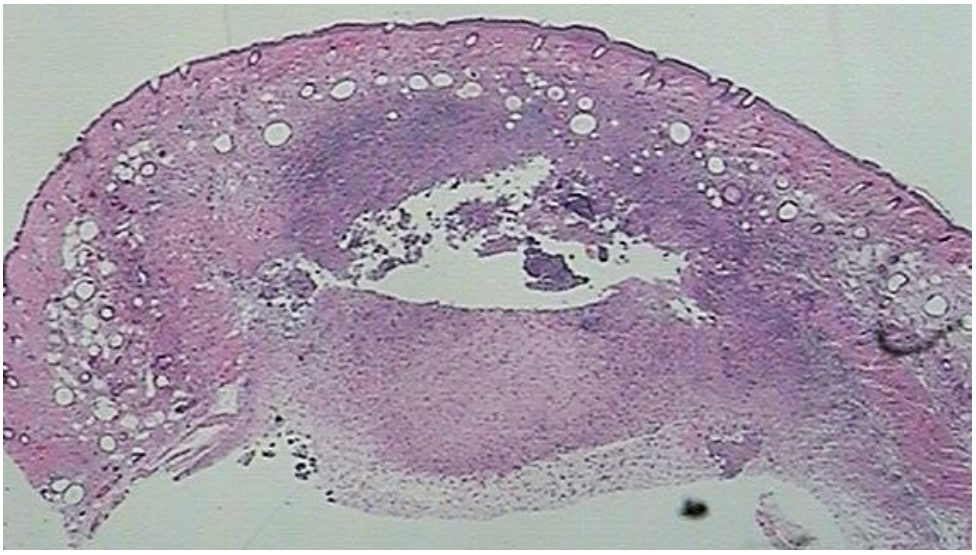
7.3.2.5 Ομάδα 5: SKH-hr2+ApoE Μάρτυρες



Εικόνα 32 Μυς 5.6 (μεγέθυνση x100)

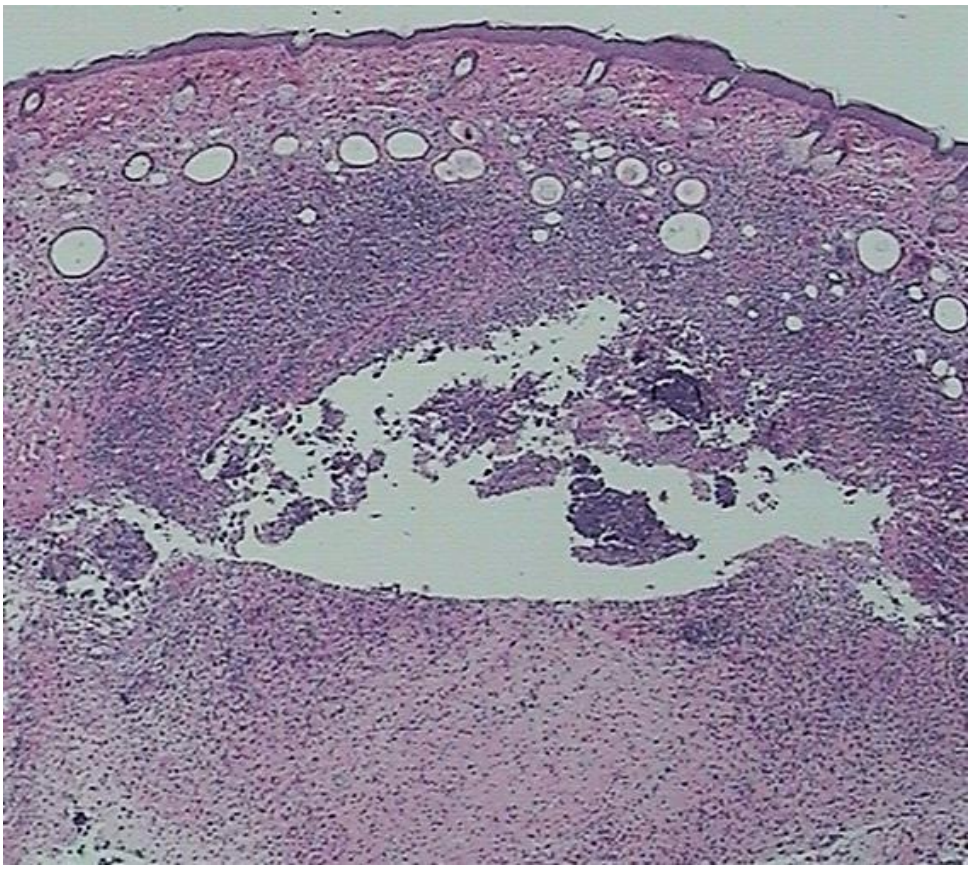
Η επιδερμίδα των μαρτύρων φαίνεται φυσιολογική, ωστόσο το συγκεκριμένο είδος μυός φαίνεται να έχει εγγενώς μια διάχυτη φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από την αραιή παρουσία λεμφοκυττάρων στη δερμίδα (Εικόνα 32). Η εικόνα αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο δείγματα από μάρτυρες SKH-hr2+ApoE που εξετάστηκαν από τον ιστοπαθολόγο.

7.3.2.6 Ομάδα 6: SKH-hr2+ApoE Ακμή

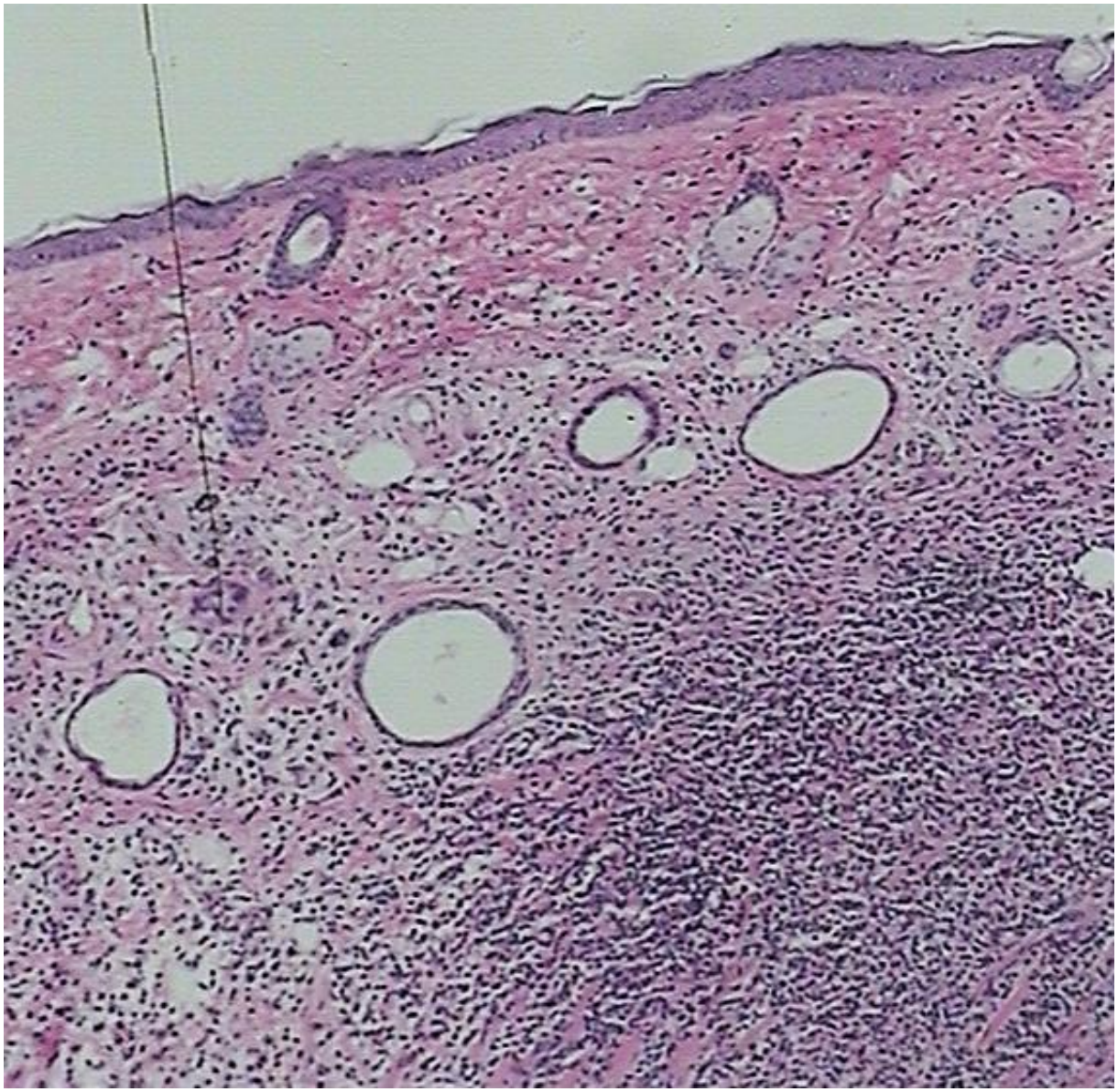


Εικόνα 33 Μυς 6.7 (μεγέθυνση x20)

Η βλάβη του μυός 6.7 φαινόταν να μην είναι έμπυος πριν τη θυσία και φαινόταν να προσομοιάζει ουλή τύπου χηλοειδούς. Ωστόσο, στην ιστοπαθολογική εικόνα φαίνεται πως η βλάβη είχε ακόμη ενεργή φλεγμονή, με αποστηματοποιημένο, φαγεσωρικού τύπου εσωτερικό (Εικόνα 33).



Εικόνα 34 Μυς 6.7 (μεγέθυνση x40)

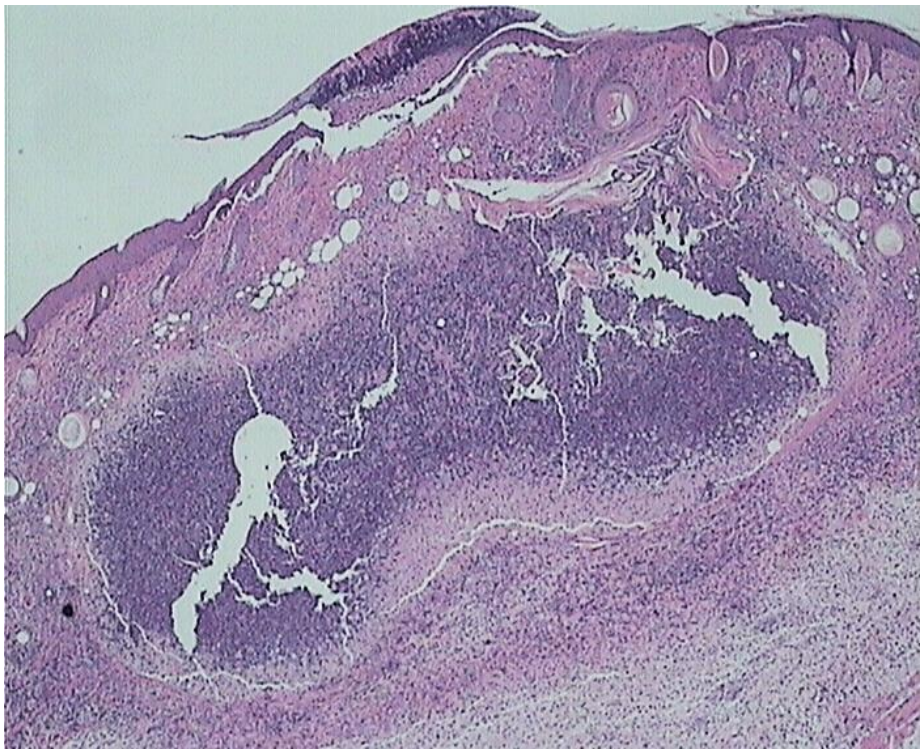


Εικόνα 35 Μυς 6.7 (μεγέθυνση x100)

Στη μεγέθυνση x40 διακρίνεται καλύτερα η πεπαχυμένη επιδερμίδα του μυός 6.7 και η φλεγμονή που εντοπίζεται ιδιαίτερα στο εσωτερικό του αποστήματος (Εικόνα 34). Στη μεγέθυνση x100 είναι εμφανής ο διαχωρισμός των στιβάδων του δέρματος και η παρουσία έντονης φλεγμονής στο αποστηματοποιημένο εσωτερικό της βλάβης (Εικόνα 35).

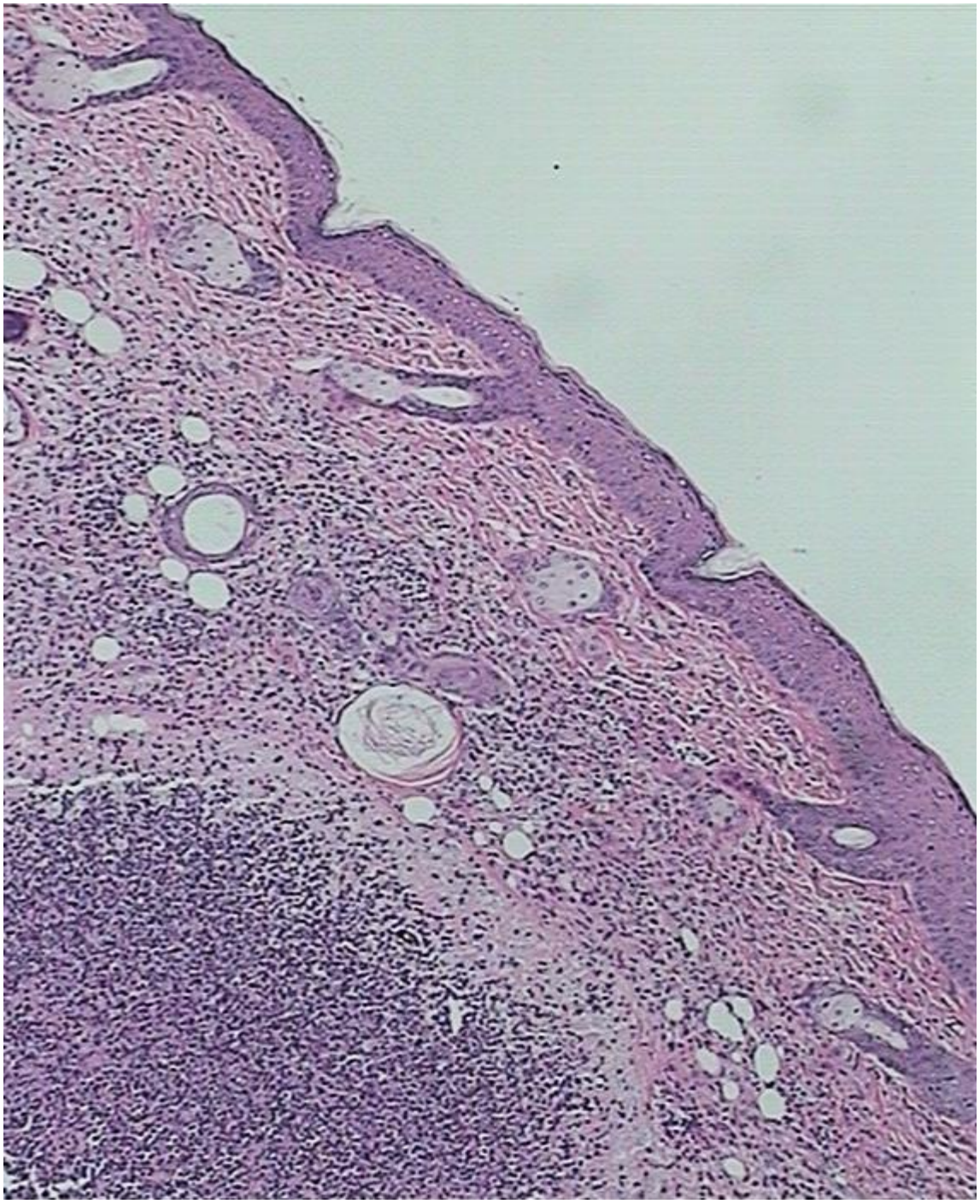
Εικόνα 36 Μυς 6.6 (μεγέθυνση x20)

Ο μυς 6.6 είχε την πιο έντονη κλινική εικόνα στην ομάδα των SKH-hr2+ApoE Ακμή. Πράγματι, και σε αυτό το δείγμα παρατηρήθηκε ενεργή φλεγμονή, φαγεσωρικού τύπου. Επιπλέον, στο άνω τμήμα του δέρματος παρατηρείται επιφανειακή εξέλκωση της επιδερμίδας (Εικόνα 36).



Εικόνα 37 Μυς 6.6 (μεγέθυνση x40)

Στη μεγέθυνση x40 δίνεται μια συνολική άποψη της βλάβης και των στιβάδων του δέρματος. Η εξέλκωση της επιδερμίδας διακρίνεται στο άνω τμήμα της εικόνας (Εικόνα 37).



Εικόνα 38 Μυς 6.6 (μεγέθυνση x100)

Στη μεγέθυνση x100 είναι εμφανής η πάχυνση της επιδερμίδας, η διάχυτη φλεγμονή στη δερμίδα καθώς και το αποστηματοποιημένο εσωτερικό της φαγεσωρικής βλάβης (Εικόνα 38).

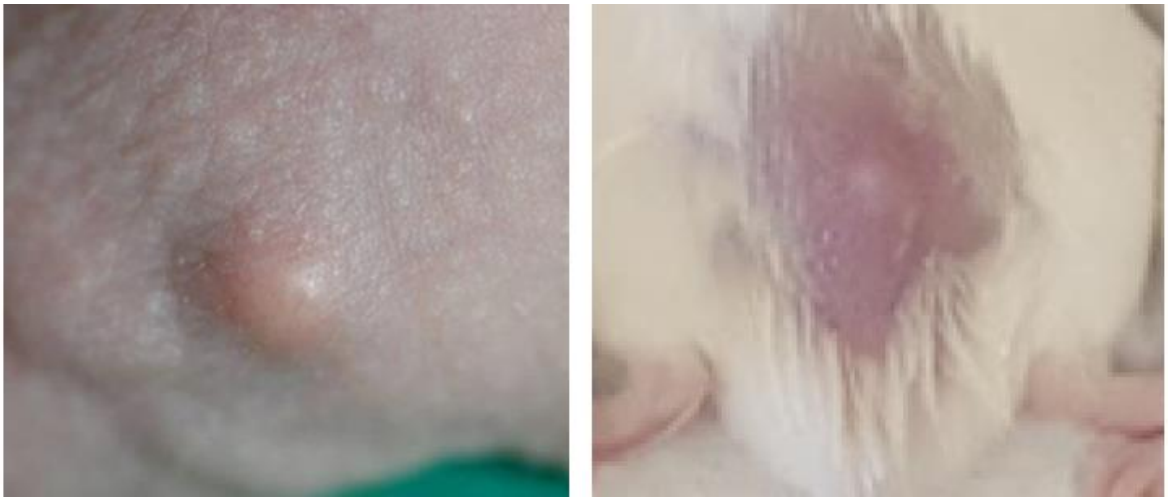
7.3.2.7 Παρατηρήσεις

Από τα δείγματα που ελήφθησαν την τελευταία ημέρα του πειράματος, η μεγαλύτερη σε έκταση βλάβη που παρατηρήθηκε από τον ιστοπαθολόγο ανήκε στο είδος SKH-hr1 (μυς 2.7), συμπέρασμα που συμφωνεί με την κλινική παρατήρηση που έγινε κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όσον αφορά την ένταση της φλεγμονής, στο συγκεκριμένο δείγμα δεν ήταν δυνατό να χαρακτηριστεί με ακρίβεια λόγω απώλειας του εσωτερικού της βλάβης κατά την προετοιμασία του δείγματος για τη χρώση. Πάντως, ήταν σαφής η πάχυνση των στιβάδων της επιδερμίδας και η διάχυτη φλεγμονή στη δερμίδα, που παρατηρήθηκε και στους υπόλοιπους μύες του είδους SKH-hr1. Μεταξύ των ειδών SKH-hr2 και SKH-hr2+ApoE, ο ιστοπαθολόγος βρήκε τις βλάβες παρόμοιες ως προς τη φλεγμονή και την επιδερμική πάχυνση.

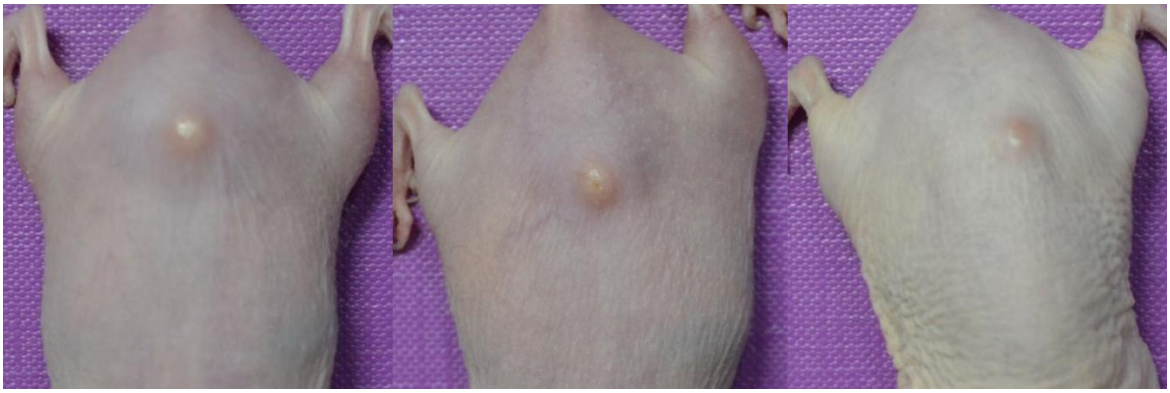
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Από το φωτογραφικό υλικό που λήφθηκε και την κλινική αξιολόγηση που γινόταν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, είναι σαφές ότι το βακτηριακό εναιώρημα *Cutibacterium acnes* που παρασκευάστηκε ήταν αποτελεσματικό στην πρόκληση βλαβών που στη μορφολογία προσομοιάζουν την εικόνα που παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία στην οποία βασιστήκαμε και στα τρία είδη μυών που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνεται και παρακάτω (Εικόνα 39, Εικόνα 40).



Εικόνα 39 Εικόνες πρόκλησης ακμής σε μύες από πρωτόκολλα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, 7 ημέρες μετά την ενδοδερμική ένεση βακτηριακού εναιωρήματος *C. acnes*. Αριστερά: είδος SKH-hr1, βακτηριακό εναιώρημα σε PBS (Jang et al., 2015). Δεξιά: είδος BALB/c, βακτηριακό εναιώρημα σε ζωμό BHI (Kolar et al., 2019).



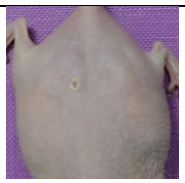
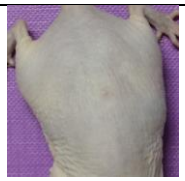
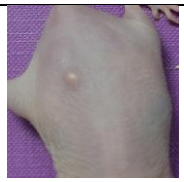
Εικόνα 40 Εικόνες πρόκλησης ακμής στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε, 7 ημέρες μετά την ενδοδερμική ένεση βακτηριακού εναιωρήματος *C. acnes* σε ζωμό BHI. Αριστερά: είδος SKH-hr1. Κέντρο: είδος SKH-hr2 (καφέ). Δεξιά: είδος SKH-hr2+ApoE.

Όλοι οι μύες που έλαβαν βακτηριακό εναιώρημα εμφάνισαν βλάβες από την πρώτη κιόλας ημέρα, σε αντίθεση με τους μάρτυρες, που δεν εμφάνισαν βλάβες πέρα από ήπιο παροδικό ερύθημα που οφείλεται στην ίδια την ενδοδερμική ένεση. Ωστόσο, στις ομάδες πρόκλησης ακμής, στην πορεία του πειράματος παρατηρήθηκαν διαφορές στην εξέλιξη των βλαβών μεταξύ των τριών ειδών μυών.

Το είδος SKH-hr1 εμφάνισε βλάβες με ιδιαίτερα μεγάλο μέγεθος, μεγαλύτερο από τα άλλα δύο είδη μυών. Στο είδος SKH-hr2 (καφέ) παρατηρήθηκαν επίσης βλάβες ικανού μεγέθους, με έντονο ερύθημα. Το είδος SKH-hr2+ApoE εμφάνισε βλάβες μικρότερου μεγέθους σε σχέση με τα άλλα δύο είδη, αλλά με έντονο ερύθημα. Η πορεία των βλαβών ήταν γρηγορότερη και σε μερικές περιπτώσεις μυών έφτασε μέχρι την αυτοΐαση εντός της διάρκειας του πειράματος. Στις περιπτώσεις αυτές, οπτικά παρατηρήθηκε στο σημείο της βλάβης υπερμελάγχρωση.

Όπως φαίνεται και παρακάτω (Πίνακας 99), την τελευταία ημέρα του πειράματος στις ομάδες πρόκλησης ακμής των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ), μεγάλο μέρος των μυών παρουσιάζει παραμένουσες, έντονες φλεγμονώδεις βλάβες. Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή οι βλάβες της Ημέρας 9 είναι πολύ ηπιότερες και παραμένουν σε μικρότερο ποσοστό μυών της ομάδας.

Πίνακας 99 Εικόνα των βλαβών στις ομάδες πρόκλησης ακμής την Ημέρα 9 του πειράματος.

Ημέρα 9 - Ομάδες πρόκλησης ακμής.		
SKH-hr1	**SKH-hr2 (καφέ)**	**SKH-hr2+ApoE**
		
		
		

Άξιο αναφοράς για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι ότι μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλές ενέσεις στον ίδιο μυ, όπως φαίνεται στην περίπτωση του μυός 4.8 (Εικόνα 41).

Εικόνα 41 Στον μυ 4.8 πραγματοποιήθηκε 2η ενδοδερμική ένεση με βακτηριακό εναιώρημα, σε συμμετρικό σημείο, γιατί υπήρχε υποψία ότι η 1η ένεση δεν έγινε σωστά. Ωστόσο και τα δύο σημεία τελικά εμφάνισαν βλάβη που εξελίχθηκε στην πορεία του πειράματος. Παρουσιάζεται η εικόνα του μυός την Ημέρα 7 του πειράματος.

Η μεθοδολογία αυτή αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Jang et al., 2015), και αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα του πρωτοκόλλου. Είναι δυνατό, με τον τρόπο αυτό, να χρησιμοποιηθεί σημαντικά μικρότερος αριθμός μυών, αφού μπορεί ο ίδιος μυς να λειτουργήσει ως μάρτυρας αλλά και να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή διαφορετικών θεραπειών, εφόσον οι ενέσεις γίνουν σε συμμετρικά σημεία με ικανή απόσταση μεταξύ τους.

Παρατηρήθηκε επίσης σε αρκετούς μύες, ιδιαίτερα στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ), ένα μοτίβο στην εξέλιξη των βλαβών. Μια αρχική αύξηση των βλαβών, ακολουθούμενη από ελάττωση και ύστερα μια δεύτερη, εντονότερη αύξηση. Αυτό πιθανώς να αντικατοπτρίζει μια άμεση απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος στον ενοφθαλμισμό με το μικροοργανισμό *C. acnes* που ακολουθείται από μια δεύτερη αντίδραση καθώς το βακτήριο εγκλιματίζεται στις συνθήκες και αναπτύσσεται πιο έντονα.

8.2 ΑΝΥΨΩΣΕΙΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Η σύγκριση μεταξύ των ειδών μυών με τις μετρήσεις που δίνονται από την επεξεργασία των εικόνων Antera 3D είναι αντικειμενική καθώς όλες οι φωτογραφίες λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Αυτό είναι ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της κάμερας Antera 3D, που την καθιστά ανεκτίμητο εργαλείο στο χαρακτηρισμό του συγκεκριμένου ζωικού προτύπου ακμής.

Είναι ξεκάθαρο ότι στο είδος SKH-hr1 οι βλάβες που προκλήθηκαν ήταν μεγαλύτερες σε όγκο σε σχέση με τα δύο άλλα είδη μυών, σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Μεταξύ των δύο άλλων ειδών οι διαφορές στον όγκο των βλαβών είναι μικρότερες. Το είδος SKH-hr2+ApoE εμφανίζει μεγάλες βλάβες σε συντομότερο χρονικό διάστημα, οι οποίες όμως ελαττώνονται σε όγκο πιο γρήγορα σε σχέση με το είδος SKH-hr2 (καφέ), του οποίου οι βλάβες έχουν πιο βραδεία εξέλιξη και παραμένουν για περισσότερο χρόνο.

Αξιοσημείωτο είναι ότι το μοτίβο που παρατηρήθηκε στην αξιολόγηση του φωτογραφικού υλικού, παρατηρείται και στην παράμετρο των ανυψώσεων δέρματος.

Τα αποτελέσματα των στατιστικών συγκρίσεων επιβεβαιώνουν την κλινική παρατήρηση ότι οι βλάβες στις ομάδες πρόκλησης ακμής των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ) διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με την ομάδα πρόκλησης ακμής του είδους SKH-hr2+ApoE. Μεταξύ των ομάδων πρόκλησης όλων των ειδών μυών, οι διαφορές που παρατηρούνται στον όγκο των βλαβών δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Παρατηρείται όμως τάση στατιστικής σημαντικότητας στις τελευταίες ημέρες του πειράματος, όπου φαίνεται ότι το είδος SKH-hr1 διατηρεί ακόμα βλάβες με μεγαλύτερο όγκο από τα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE.

Είναι πολύ σημαντικό να σχολιαστεί ο σχετικά σταθερός όγκος βλαβών που φαίνεται να διατηρείται έως και την Ημέρα 8 του πειράματος στο είδος SKH-hr1. Η σταθερή εικόνα αυτή είναι ιδεώδης για ένα πειραματικό μοντέλο, αφού παρέχει ένα ικανό χρονικό διάστημα ώστε να μπορούν να παρατηρηθούν διαφορές σε περίπτωση εφαρμογής θεραπείας.

8.3 ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Τα αποτελέσματα και αυτής της παραμέτρου από τις φωτογραφίες Antera 3D έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η παράμετρος αυτή αντιπροσωπεύει την κατανομή της αιμοσφαιρίνης στο δέρμα και μπορεί να συσχετιστεί με την αιματική κυκλοφορία και συνεπώς με τη φλεγμονή.

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι οι μύες του είδους SKH-hr2+ApoE έχουν ενδογενώς χαμηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης στο δέρμα τους ή η μορφολογία του δέρματός τους παρεμποδίζει κάπως τον τρόπο με τον οποίο η κάμερα Antera 3D μετράει τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

Είναι επίσης εμφανές τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αυξάνονται σε όλες τις ομάδες πρόκλησης σε σχέση με τους μάρτυρες. Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή παρατηρείται μια άμεση, έντονη αύξηση αμέσως μετά τις ενέσεις, που στη συνέχεια ακολουθεί πτωτική τάση μέχρι και το τέλος του πειράματος, όπου η

αιμοσφαιρίνη φαίνεται να έχει επανέλθει στα αρχικά επίπεδα. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και η ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, με τη διαφορά ότι προς το τέλος του πειράματος τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης αρχίζουν πάλι να αυξάνονται. Τέλος, στην ομάδα SKH-hr2+ApoE παρατηρείται μια πιο σταδιακή αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, τα οποία όμως διατηρούνται σταθερά υψηλά σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν και με την κλινική παρατήρηση ότι το είδος SKH-hr2 (καφέ) οπτικά εμφάνισε εντονότερο ερύθημα στη διάρκεια του πειράματος.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνονται και με τις στατιστικές συγκρίσεις. Μεταξύ των ομάδων πρόκλησης ακμής στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ), τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μόνο τις τελευταίες ημέρες του πειράματος, όπου είναι υψηλότερα στο δεύτερο είδος.

8.4 ΒΑΡΟΣ

Στις περισσότερες ομάδες μυών παρατηρήθηκε μια αύξηση του βάρους στις τελευταίες σε σχέση με τις αρχικές ημέρες του πειράματος. Αυτό είναι αναμενόμενο και μπορεί να αποδοθεί στη μικρή ηλικία των μυών, οι οποίοι μεγάλωναν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά του βάρους σε κανένα είδος μυών και σε καμία ημέρα του πειράματος.

Φαίνεται λοιπόν πως οι ενδοδερμικές ενέσεις σε γενικές γραμμές δεν επηρέασαν τη γενική υγεία των μυών. Μόνη αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή το βάρος μειώθηκε σημαντικά από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4 και παρέμεινε χαμηλό έως και την Ημέρα 9, γεγονός που θα μπορούσε πιθανώς να αποδοθεί στην προσβολή με το βακτήριο.

8.5 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Η παράμετρος αυτή μετρήθηκε για να διαπιστωθεί αν το πρωτόκολλο πρόκλησης ακμής προκαλεί κάποια γενικευμένη αντίδραση του ανοσοποιητικού-συστηματική φλεγμονή. Ωστόσο, από την Ημέρα 0 λήφθηκαν σχετικά υψηλές μετρήσεις θερμοκρασίες, υψηλότερες του αναμενόμενου, και γενικά οι θερμοκρασίες παρέμειναν υψηλές σε όλες τις ομάδες μυών κατά τη διάρκεια του πειράματος. Επομένως, οι παρατηρήσεις που ακολουθούν δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Παρατηρήθηκε πάντως σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας την Ημέρα 4 στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή, σχέση με τις Ημέρες 0 και 9. Μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης, στο είδος SKH-hr1, η θερμοκρασία δε διαφέρει σημαντικά σε καμία ημέρα του πειράματος, ενώ στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE, μόνο την Ημέρα 9, οι μάρτυρες έχουν σημαντικά αυξημένη θερμοκρασία σε σχέση με την αντίστοιχη ομάδα πρόκλησης ακμής.

8.6 ΠΑΧΟΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το πάχος δέρματος, όπως αναφέρθηκε στις μεθόδους, στην περίπτωση των ομάδων πρόκλησης ακμής, με τον τρόπο που λήφθηκε ουσιαστικά αποτελεί μια προσέγγιση της διαμέτρου της βλάβης. Αποτελεί λοιπόν άλλο ένα μέγεθος για την αξιολόγηση του μεγέθους των βλαβών, όχι ίδιας σημασίας με την τρισδιάστατη απεικόνιση που παρέχει η κάμερα Antera, αλλά με λειτουργία συμπληρωματική προς αυτή.

Στις ομάδες πρόκλησης ακμής, είναι εμφανής η σημαντική αύξηση του πάχους σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες μαρτύρων, αλλά και η αύξηση στις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0. Μεταξύ των Ημερών 4 και 9 το πάχος παραμένει σχετικά σταθερό. Μεταξύ των ομάδων αυτών δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το πάχος του δέρματος σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Συμπερασματικά, από την παράμετρο του πάχους φαίνεται χονδροειδώς ότι προκλήθηκε βλάβη σε όλες τις ομάδες που έλαβαν βακτηριακό εναιώρημα. Ωστόσο, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφορά στις βλάβες μεταξύ των τριών ειδών. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι όλες οι ενδοδερμικές ενέσεις έγιναν κατά το δυνατόν με τον ίδιο τρόπο (ίδια γωνία, ίδια ποσότητα ένεσης), οπότε η κατά πλάτος εξάπλωση των βλαβών, η οποία μετρήθηκε με το παχύμετρο, είναι σχετικά παρόμοια, σε αντίθεση με την τρισδιάστατη εξέλιξη της βλάβης που απεικονίζεται με την κάμερα Antera.

8.7 ΆΔΗΛΗ ΑΠΩΛΕΙΑ ΥΔΑΤΟΣ

Η άδηλη απώλεια ύδατος (TEWL) είναι μια παράμετρος που από τη βιβλιογραφία φαίνεται να βρίσκεται αυξημένη στα άτομα με ακμή (Meyer et al., 2015). Αυτό οφείλεται στη διαταραχή του επιδερμικού φραγμού που παρατηρείται στην ακμή λόγω των αλλαγών της λιπιδικής σύστασης της κεράτινης στιβάδας (Yamamoto et al., 1995).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, μετρούμενη ακριβώς πάνω στη βλάβη, η TEWL πιθανώς αποτελεί μια ένδειξη διαταραχής του επιδερμικού φραγμού, σαφώς όμως επηρεάζεται και από την έντονη φλεγμονή που σε πολλές περιπτώσεις συνοδευόταν από παρουσία πύου-οιδήματος. Θα μπορούσε επομένως να χαρακτηριστεί και ως μια ένδειξη του κατά πόσο η μετρούμενη βλάβη είναι έντονη-πυώδης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ όλων των ομάδων δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην TEWL κατά την έναρξη του πειράματος, πέρα από μια τάση του είδους SKH-hr2+ApoE να έχει χαμηλότερες τιμές TEWL. Επομένως, μπορούν να συγκριθούν και οι ομάδες πρόκλησης ακμής μεταξύ τους, τουλάχιστον στα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ).

Πράγματι, η TEWL βρίσκεται σημαντικά αυξημένη στις ομάδες πρόκλησης ακμής των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2+ApoE, την Ημέρα 4 σε σχέση με την Ημέρα 0, αλλά και σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες μαρτύρων την Ημέρα 4. Στο είδος SKH-hr2 (καφέ) οι αντίστοιχες διαφορές δεν είναι σημαντικές.

Στο τέλος του πειράματος, οι ομάδες πρόκλησης και οι ομάδες μαρτύρων δε διαφέρουν ως προς την TEWL σε κανένα είδος μυός. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι μεγάλο ποσοστό μυών από την ομάδα πρόκλησης κάθε είδους δεν είχε πλέον τόσο έντονα πυώδεις βλάβες.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί επίσης πώς μεταξύ των ομάδων πρόκλησης ακμής δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην TEWL σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

8.8 ΣΜΗΓΜΑ

Από την παράμετρο του σμήγματος δε μπορούμε να εξάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα, καθώς οι μετρήσεις ήταν ιδιαίτερα χαμηλές (κοντά στο ελάχιστο του μετρητικού εύρους του οργάνου) και δε διέφεραν ιδιαίτερα μεταξύ των μυών.

8.9 pH ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Είναι γνωστό πως οι φλεγμονώδεις δερματοπάθειες που συνοδεύονται από διαταραχή του επιδερμικού φραγμού γενικά χαρακτηρίζονται από αυξημένο pH του δέρματος (Proksch, 2018). Αυτό φαίνεται πως συμβαίνει και στην περίπτωση της κοινής ακμής (Prakash et al., 2017).

Στην ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά με την αντίστοιχη ομάδα μαρτύρων σε καμία ημέρα του πειράματος. Στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, το pH είναι σημαντικά αυξημένο στην ομάδα πρόκλησης ακμής σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων την Ημέρα 4. Στην ομάδα SKH-hr1 Ακμή, την Ημέρα 9, το pH είναι επίσης σημαντικά αυξημένο σε σχέση με την ομάδα των μαρτύρων.

Φαίνεται λοιπόν πως σε γενικές γραμμές το πρότυπο ακμής που προκλήθηκε συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για το pH του ακνεϊκού δέρματος.

8.10 ΜΕΛΑΝΙΝΗ

Όσον αφορά την παράμετρο της μελανίνης, δε θα γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των ειδών γιατί έχουν ενδογενείς διαφορές στη μελανίνη. Θα εξεταστεί λοιπόν η παράμετρος μόνο ανά είδος.

Στο είδος SKH-hr2 (καφέ) δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ μαρτύρων και ομάδας πρόκλησης, αλλά ούτε και στην ομάδα πρόκλησης στην πάροδο του χρόνου. Η ομάδα SKH-hr1 Ακμή εμφανίζει μόνο την τελευταία ημέρα του πειράματος σημαντική αύξηση της μελανίνης σε σύγκριση με την ομάδα SKH-hr1 Μάρτυρες. Η ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή εμφανίζει σημαντική αύξηση της μελανίνης από την Ημέρα 4 στην Ημέρα 9. Η μελανίνη την Ημέρα 9 είναι σημαντικά αυξημένη στην ομάδα αυτή και σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Φαίνεται λοιπόν να επιβεβαιώνεται η κλινική παρατήρηση η εξέλιξη της βλάβης καταλήγει σε υπερμελάγχρωση, όπως συμβαίνει άλλωστε και στην ανθρώπινη ακμή (Abad-Casintahan et al., 2016). Αυτό παρατηρείται πιο έντονα στο είδος SKH-hr2+ApoE, πιθανώς λόγω της ενδογενώς αυξημένης

μελανίνης που διαθέτουν, ενώ είναι ιδιαίτερα εμφανές την Ημέρα 9, που το μεγαλύτερο ποσοστό της ομάδας πρόκλησης ακμής έχει ξεπεράσει το φλυκταινώδες στάδιο της βλάβης.

Άξιο αναφοράς είναι επίσης η μελανίνη φαίνεται να έχει σημαντικότερη αύξηση στο είδος SKH-hr1 και όχι στο είδος SKH-hr2 (καφέ), που έχει ενδογενώς αυξημένη μελανίνη.

8.11 ΕΡΥΘΗΜΑ

Η εμβιομηχανική μέτρηση του ερυθήματος, πάνω στην περιοχή της βλάβης, αποτελεί μια ακόμη εκτίμηση της φλεγμονής, που συμπληρώνει τα δεδομένα από τις φωτογραφίες Antera 3D για τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης.

Το είδος SKH-hr2+ApoE φαίνεται και εδώ να έχει ενδογενώς χαμηλότερα επίπεδα ερυθήματος από τα άλλα δύο είδη μυών, όπως παρατηρήθηκε και στην παράμετρο των επιπέδων αιμοσφαιρίνης. Τα είδη SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ), στη βασική τους κατάσταση δε φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά ως προς το ερύθημα.

Σε όλα τα είδη μυών, στις ομάδες πρόκλησης ακμής αυξάνεται το ερύθημα τις Ημέρες 4 και 9 σε σχέση με την Ημέρα 0 του πειράματος. Στις ομάδες αυτές, τις Ημέρες 4 και 9 το ερύθημα είναι επίσης σημαντικά αυξημένο σε σχέση με τις αντίστοιχες ομάδες μαρτύρων.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος μεταξύ των ομάδων SKH-hr1 Ακμή και SKH-hr2 (καφέ) Ακμή δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά ως προς το ερύθημα. Η ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή, αν και ξεκινά από πολύ χαμηλότερα επίπεδα ερυθήματος, στο τέλος του πειράματος έχει αυξηθεί τόσο που δε διαφέρει από τις ομάδες πρόκλησης ακμής των δύο άλλων ειδών μυών.

Συμπερασματικά, σαφώς προκαλείται μια φλεγμονώδης αντίδραση από την ενδοδερμική ένεση με το βακτηριακό εναιώρημα, όπως φαίνεται από την παρατηρούμενη αύξηση του ερυθήματος στις ομάδες πρόκλησης. Προς το τέλος του πειράματος, το ερύθημα είναι συγκρίσιμο και στα τρία είδη μυών. Ιδιαίτερη αύξηση του ερυθήματος παρατηρήθηκε στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή.

8.12 ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ

Η παράμετρος της ενυδάτωσης, που στις ομάδες πρόκλησης ακμής λήφθηκε ακριβώς πάνω στις βλάβες, έχει παρόμοια ερμηνεία με την παράμετρο της TEWL που αναφέρθηκε παραπάνω. Καταδεικνύει δηλαδή την ικανότητα του επιδερμικού φραγμού, αφού η μετρούμενη παράμετρος είναι ουσιαστικά το περιεχόμενο της κεράτινης στιβάδας σε νερό. Η μέτρηση ωστόσο επηρεάζεται και από τις βαθύτερες στιβάδες του δέρματος, οπότε το οίδημα-πύον συχνά αντικατοπτρίζεται σε αυξημένες τιμές ενυδάτωσης. Το όργανο μέτρησης της ενυδάτωσης όμως έχει σημαντικά μικρότερη ευαισθησία από το όργανο μέτρησης της TEWL.

Αξιοσημείωτο είναι ότι το είδος SKH-hr2+ApoE φαίνεται να έχει εγγενώς αυξημένη ενυδάτωση της κεράτινης στιβάδας σε σχέση με τα άλλα δύο είδη.

Συνολικά στην παράμετρο της ενυδάτωσης δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Αν και οι ομάδες πρόκλησης των ειδών SKH-hr1 και SKH-hr2 (καφέ) στην πορεία του πειράματος παρουσιάζουν αύξηση της ενυδάτωσης σε σχέση με την αρχική τους κατάσταση, σε κανένα είδος μυών και σε καμία ημέρα του πειράματος δε διαφέρει σημαντικά η παράμετρος της ενυδάτωσης μεταξύ των ομάδων πρόκλησης ακμής και των ομάδων των μαρτύρων.

8.13 ΓΛΥΚΟΖΗ

Από τη βιβλιογραφία σκιαγραφείται κάποια σύνδεση μεταξύ του συστήματος μεταβολισμού της γλυκόζης και την κοινή ακμή. Φαίνεται πως η υπερινσουλιναιμία που προκαλείται από την ινσουλινοαντίσταση σε κάποιους ασθενείς πιθανώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του ορμονικού καταρράκτη που οδηγεί στην ανάπτυξη ακνεϊκών βλαβών. Διατροφές με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη φαίνεται επίσης να επιδεινώνουν την κατάσταση της ακμής σε πολλούς ασθενείς (Bowe et al., 2010; Bronsnick et al., 2014).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και η γλυκόζη αίματος λήφθηκε σε όλες τις ομάδες μυών με τον ίδιο τρόπο, δεν είναι γλυκόζη νηστείας, οπότε δε μπορούμε από τις μετρήσεις να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα.

Από την Ημέρα 0 στην Ημέρα 4 παρατηρείται μια ελάττωση της γλυκόζης σε όλες τις ομάδες πρόκλησης ακμής, που όμως είναι σημαντική μόνο στην ομάδα SKH-hr2+ApoE Ακμή.

Την Ημέρα 9, οι μετρήσεις γλυκόζης είναι αρκετά αυξημένες σε όλες τις πειραματικές ομάδες, και πιθανώς αυτό σχετίζεται με το αυξημένο stress των μυών καθώς τη μέρα εκείνη έγιναν αιμοληψίες από τις παρειές των μυών. Είναι αξιοσημείωτο ότι η γλυκόζη της Ημέρας 9 ξεκινά ιδιαίτερα αυξημένη στην πρώτη ομάδα στην οποία έγιναν οι αιμοληψίες και στη συνέχεια ακολουθεί πτωτική πορεία που συμφωνεί με τη σειρά που έγιναν οι αιμοληψίες στις υπόλοιπες ομάδες μυών. Αυτό πιθανώς συμβαίνει γιατί όσο προχωρούσε η διαδικασία, ο χειρισμός των μυών γινόταν πιο ήρεμος και σταθερός λόγω συνήθειας.

Η μόνη σημαντική διαφορά που παρατηρείται στην παράμετρο της γλυκόζης μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης ακμής, είναι την Ημέρα 4, στο είδος SKH-hr2 (καφέ), όπου η ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Ακμή έχει χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης από την ομάδα SKH-hr2 (καφέ) Μάρτυρες.

8.14 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Ο ρόλος του οξειδωτικού stress και των αντιοξειδωτικών στην ακμή αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος αρκετά σύγχρονο και έχουν γίνει παρατηρήσεις μεγάλης σημασίας που υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό stress αποτελεί εναρκτήριο γεγονός της παθογένειας της νόσου.

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) που παράγονται από ουδετερόφιλα συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διεργασία της ακμής, ενώ η ενδογενής άμυνα του οργανισμού δε μπορεί να ανταπεξέλθει, αφού αντιοξειδωτικά όπως η καταλάση (catalase) και η υπεροξειδική δισμουτάση

(SOD, Superoxide Dismutase) φαίνεται να βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με ακμή σε σχέση με υγιείς ανθρώπους. Ταυτόχρονα, στους ασθενείς με ακμή, δείκτες οξειδωτικού stress όπως η μηλονική διαλδεΰδη (malondialdehyde) και οξειδάση της ξανθίνης (XO, xanthine oxidase) βρίσκονται αυξημένα (Abdel Fattah et al., 2008; Arican et al., 2005; Bowe et al., 2010; Sarici et al., 2009).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι την Ημέρα 4, στο είδος SKH-hr1, έχει σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα η ομάδα πρόκλησης ακμής σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων. Στα άλλα δύο είδη, σε καμία άλλη ομάδα πρόκλησης και σε καμία ημέρα του πειράματος δεν παρατηρείται αντίστοιχη διαφορά.

8.15 ΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ

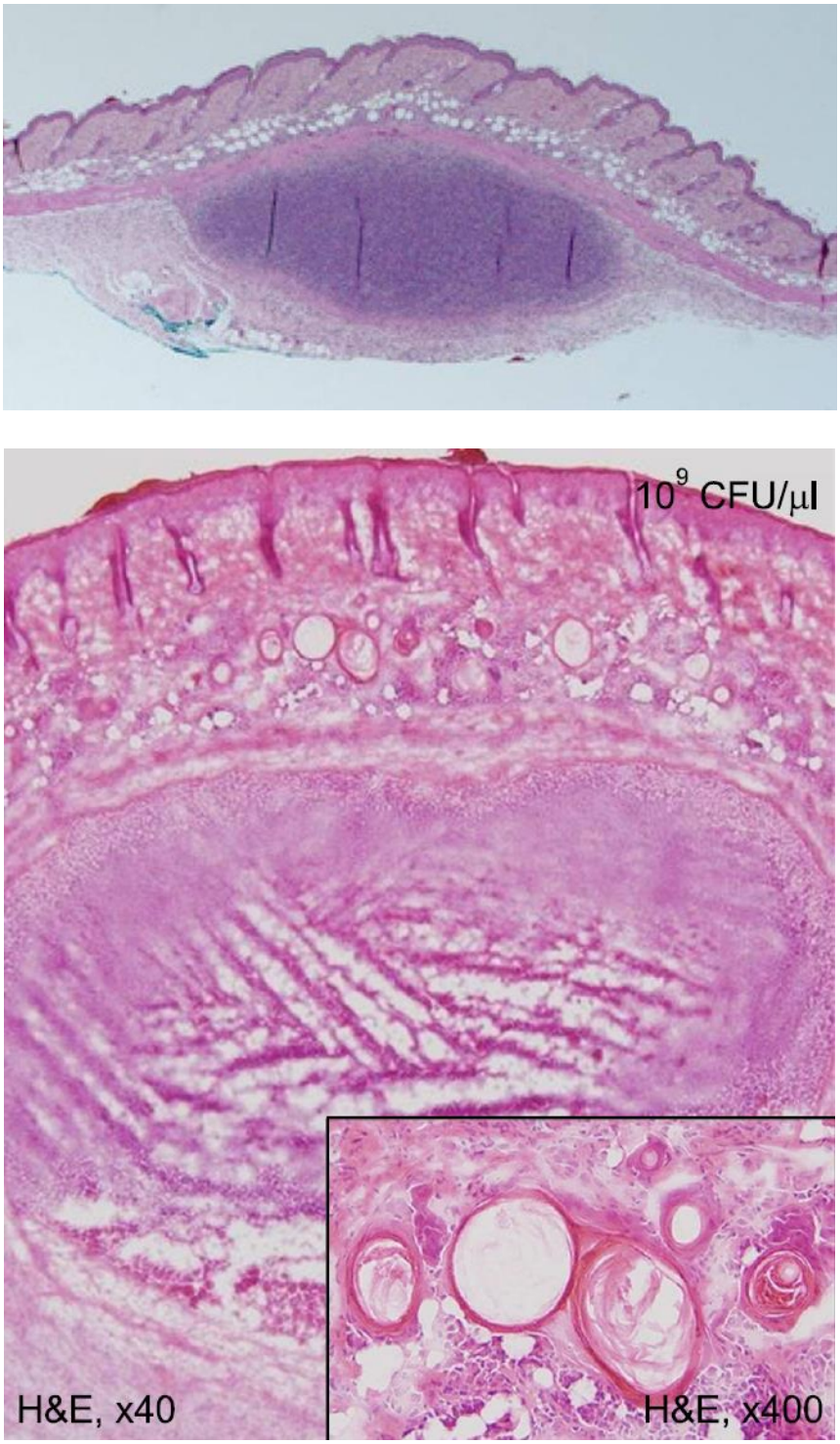
Ο ρόλος των λιπιδικού προφίλ του αίματος στην παθογένεια της ακμής δεν έχει αποσαφηνιστεί, έχουν, όμως, γίνει κάποιες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης φαίνεται να είναι αυξημένα στους ασθενείς με ακμή, ενώ τα επίπεδα HDL χοληστερόλης ελαττωμένα. Επίσης, υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων φαίνεται να συσχετίζονται με αυξημένη σοβαρότητα της νόσου (Bakry et al., 2014; El-Akawi et al., 2007; Kataria Arora et al., 2010).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, όσον αφορά τα τριγλυκερίδια, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μαρτύρων και των ομάδων πρόκλησης σε κανένα είδος μυών. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι το γεγονός ότι το είδος SKH-hr2+ApoE, έχει σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα άλλα δύο είδη και ταυτόχρονα είναι το είδος που εμφάνισε τις πιο ήπιες και παροδικές βλάβες.

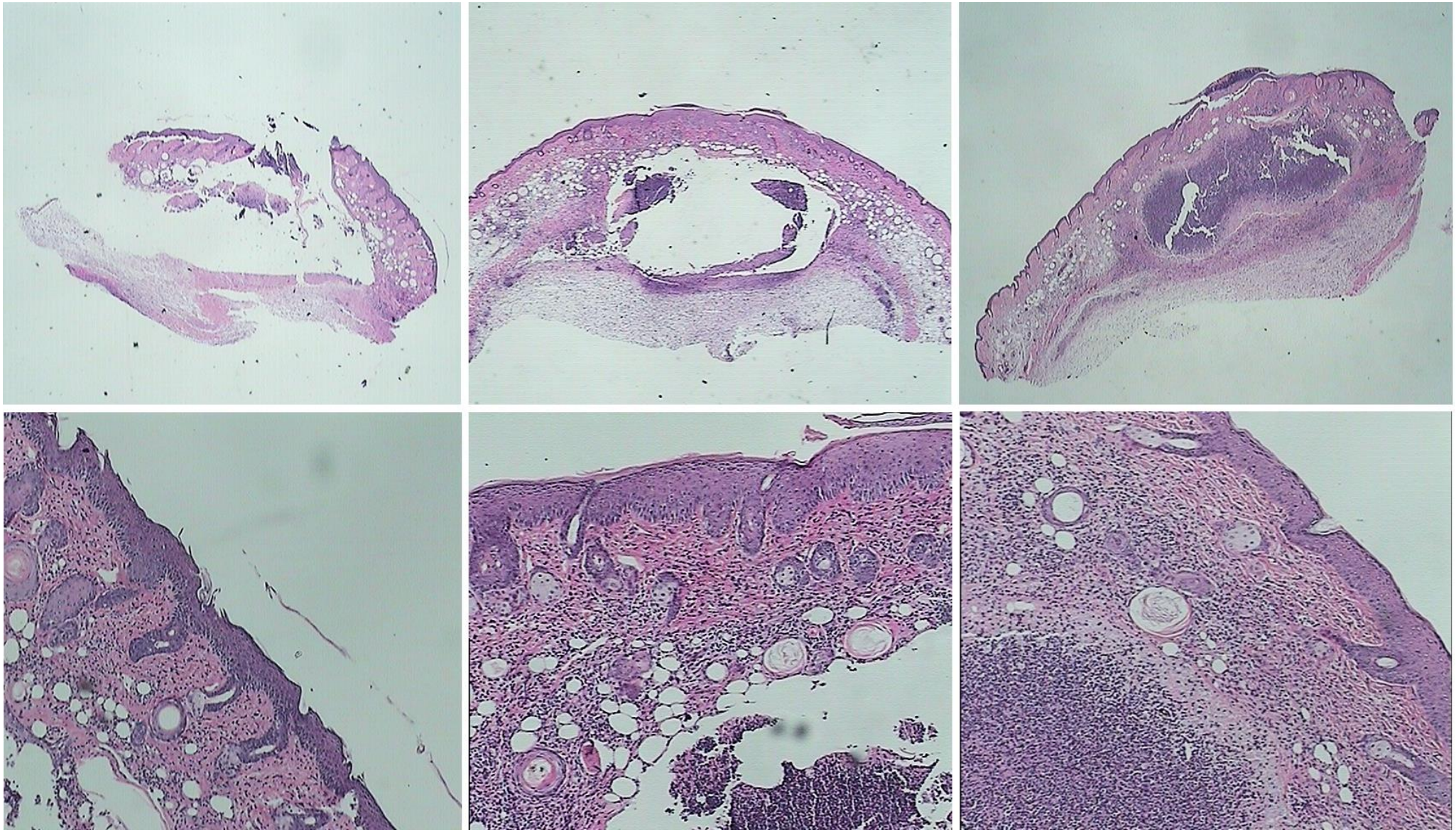
Η παράμετρος της χοληστερόλης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί αποτελεσματικά ώστε να αξιολογηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

8.16 ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η μορφολογία των βλαβών που παρατηρήθηκε στην ιστοπαθολογική αξιολόγηση, όπως φαίνεται και παρακάτω (Εικόνα 42, Εικόνα 43), συμφωνεί με αυτή που απεικονίζεται στα πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας.



Εικόνα 42 Ιστοπαθολογικές εικόνες από το μοντέλο ακμής με ενδοδερμική ένεση βακτηριακού εναιωρήματος στη ράχη μυών. Πάνω: μεγέθυνση x100 (Kolar et al., 2019). Κάτω: μεγέθυνση x40 (Jang et al., 2015).



Εικόνα 43 Ιστοπαθολογικές εικόνες που λήφθηκαν την τελευταία ημέρα του πειράματος από τις ομάδες πρόκλησης ακμής και των τριών ειδών μυών. Πάνω: μεγέθυνση x20. Κάτω: Μεγέθυνση x100. Αριστερά: είδος SKH-hr1. Κέντρο: είδος SKH-hr2 (καφέ). Δεξιά: είδος SKH-hr2+ApoE.

Όλα τα δείγματα από τις ομάδες πρόκλησης ακμής που αξιολογήθηκαν από τον ιστοπαθολόγο έδειξαν ενεργή φλεγμονή, ακόμα και από τις βλάβες μυών που στην κλινική παρατήρηση είχαν φαινομενικά πιο ήπια εικόνα. Παρατηρήθηκε επίσης πάχυνση της επιδερμίδας σε όλα τα δείγματα των βλαβών. Στις ιστοπαθολογικές εικόνες που απεικονίζεται ολόκληρη η βλάβη με το εσωτερικό της, παρατηρείται πολύ παρόμοια μορφολογία και στα τρία είδη μυών, που χαρακτηρίστηκε από τον ιστοπαθολόγο ως αποστηματοποιημένη-φαγεσωρικού τύπου.

Γενικά, μεταξύ των ειδών δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφορά. Η μεγαλύτερη σε έκταση βλάβη ανήκε στο είδος SKH-hr1, ενώ στα είδη SKH-hr2 (καφέ) και SKH-hr2+ApoE παρατηρήθηκε σχετικά εντονότερη φλεγμονή. Η πάχυνση της επιδερμίδας ήταν παρόμοια μεταξύ των τριών ειδών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΖΩΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΑΚΜΗΣ

1. Το μοντέλο πρόκλησης ακμής με ενδοδερμική ένεση βακτηριακού εναιωρήματος *Cutibacterium acnes* στη ράχη μυών είναι αποτελεσματικό και επαναλήψιμο στην πρόκληση βλαβών ακνεϊκής μορφολογίας.
2. Το πρότυπο αυτό είναι δυνατό να εφαρμοστεί σε περισσότερα του ενός σημείου στον ίδιο μυ, δίνοντας τη δυνατότητα δοκιμής πολλών θεραπειών και συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του αριθμού πειραματοζώων.
3. Η σοβαρότητα των βλαβών που προκύπτουν φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη, σύμφωνα και με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.
4. Το είδος SKH-hr1 κρίνεται, λαμβάνοντας υπόψιν συνολικά την κλινική εικόνα, τις μετρήσεις και την ιστοπαθολογική αξιολόγηση, το καταλληλότερο είδος άτριχου μυός για την εφαρμογή του μοντέλου ακμής.
5. Η χρήση ζωμού BHI ως φορέα επιτρέπει τη χρήση βακτηριακού εναιωρήματος μικρότερης συγκέντρωσης, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία.
6. Η κάμερα Antera 3D® και συγκεκριμένα η μέτρηση του όγκου των βλαβών, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην αξιολόγηση της πορείας των βλαβών.
7. Στο είδος SKH-hr1 διατηρήθηκε σχετικά σταθερός ο όγκος των βλαβών από την Ημέρα 2 έως και την Ημέρα 8. Το χρονικό διάστημα αυτό κρίνεται ικανό για την εφαρμογή θεραπειών.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ *Dioscorea communis*

1. Στο κυκλοεξανικό εκχύλισμα των φύλλων ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-one (47.19%), 1-Eicosanol (32.50%) και Eicosane (20.31%).
2. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα περιέχουν τριτερπενικά παράγωγα, ιδιαίτερα τριτερπενικές σαπωνίνες, και φαινολικά παράγωγα καμφερόλης και απιγενίνης.

ΕΠΟΜΕΝΑ ΒΗΜΑΤΑ

Με βάση τα θετικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε επόμενο στάδιο θα ήταν καλό να μελετηθεί η διάρκεια του μοντέλου ακμής μέχρι την επίτευξη αυτοΐασης και να δοκιμαστούν σε αυτό θεραπευτικοί παράγοντες με καλά τεκμηριωμένη δράση στην ακμή. Στα εκχυλίσματα του *D. communis* πρέπει να γίνει περεταίρω ταυτοποίηση της χημικής σύστασης ώστε να επιλεγεί το καταλληλότερο για εφαρμογή στο μοντέλο ακμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abad-Casintahan, F., Chow, S.K.W., Goh, C.L., Kubba, R., Hayashi, N., Noppakun, N., See, J., Suh, D.H., Xiang, L.H.F., Kang, S., 2016. Frequency and characteristics of acne-related post-inflammatory hyperpigmentation. J. Dermatol. 43, 826–828. https://doi.org/10.1111/1346-8138.13263

Abdel Fattah, N.S.A., Shaheen, M.A., Ebrahim, A.A., El Okda, E.S., 2008. Tissue and blood superoxide dismutase activities and malondialdehyde levels in different clinical severities of acne vulgaris. Br. J. Dermatol. 159, 1086–1091. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08770.x

Aburjai, T., Natsheh, F.M., 2003. Plants used in cosmetics. Phyther. Res. 17, 987–1000. https://doi.org/10.1002/ptr.1363

Adalatkhah, H., 2011. Flutamide versus a cyproterone acetate-ethinyl estradiol combination in moderate acne: a pilot randomized clinical trial. Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. 4, 117. https://doi.org/10.2147/ccid.s20543

Akman, A., Durusoy, C., Senturk, M., Koc, C.K., Soyturk, D., Alpsoy, E., 2007. Treatment of acne with intermittent and conventional isotretinoin: A randomized, controlled multicenter study. Arch. Dermatol. Res. 299, 467–473. https://doi.org/10.1007/s00403-007-0777-2

Al-khateeb, E., Adkar, A., Al-ani, H., 2013. Cytotoxicity studies of *Tamus communis* root and berries extracts on human HEp-2 and AMN-3 carcinoma cells cell. J. Drugs Med. 4, 1–5.

Alexeyev, O.A., Jahns, A.C., 2012. Anaerobe Sampling and detection of skin *Propionibacterium acnes* : Current status. Anaerobe 18, 479–483. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.07.001

Allorge, L., Ikor, O., 2003. La fabuleuse odyssée des plantes : les botanistes voyageurs, les Jardins des Plantes, les herbiers. JC Lattès, Paris.

Amichai, B., Shemer, A., Grunwald, M.H., 2006. Low-dose isotretinoin in the treatment of acne vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. 54, 644–646. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.11.1061

Aquino, R., Behar, I., De Simone, F., D'Agostino, M., Pizza, C., 1986. Furostanol Oligosides from *Tamus communis*. J. Nat. Prod. 49, 1096–1101. https://doi.org/10.1021/np50048a021

Aquino, Rita, Behar, I., De Simone, F., D'Agostino, M., Pizza, C., 1986. Furostanol Oligosides from *Tamus communis*. J. Nat. Prod. 49, 1096–1101. https://doi.org/10.1021/np50048a021

Aquino, R., Behar, I., De Simone, F., Pizza, C., 1985a. Natural Dihydrophenanthrene Derivatives from *Tamus communis*. J. Nat. Prod. 48, 811–813. https://doi.org/10.1021/np50041a017

Aquino, R., Behar, I., De Simone, F., Pizza, C., D'Agostino, M.D., 1985b. Dioscin and gracillin from *Tamus communis*. J. Nat. Prod. 48, 502. https://doi.org/10.1021/np50039a035

Aquino, R., Behar, I., De Simone, F., Pizza, C., Senatore, F., 1985c. Phenanthrene derivatives from *Tamus communis*. Biochem. Syst. Ecol. 13, 251–252. https://doi.org/10.1016/0305-1978(85)90033-X

Aquino, R., Conti, C., De Simone, F., Orsi, N., Pizza, C., Stein, M.L., 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. J. Chemother. 3, 305–309. https://doi.org/10.1080/1120009X.1991.11739110

Arican, O., Kurutas, E.B., Sasmaz, S., 2005. Oxidative stress in patients with acne vulgaris. Mediators Inflamm. 2005, 380–384. https://doi.org/10.1155/MI.2005.380

Arowojolu, A.O., Gallo, M.F., Lopez, L.M., Grimes, D.A., Garner, S.E., 2011. Cochrane Review: Combined oral contraceptive pills for treatment of acne. Evidence-Based Child Heal. A Cochrane Rev. J. 6, 1340–1433. https://doi.org/10.1002/ebch.841

Arrington, E.A., Patel, N.S., Gerancher, K., Feldman, S.R., 2012. Combined oral contraceptives for the treatment of acne: A practical guide. Cutis 90, 83–90.

Atzori, L., Brundu, M.A., Orru, A., Biggio, P., 1999. Glycolic acid peeling in the treatment of acne. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 12, 119–122. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.1999.tb01000.x

Bakry, O., El Shazly, R.A., El Farargy, S., Kotb, D., 2014. Role of hormones and blood lipids in the pathogenesis of acne vulgaris in non-obese, non-hirsute females. Indian Dermatol. Online J. 5, 9. https://doi.org/10.4103/2229-5178.144506

Barnard, E., Shi, B., Kang, D., Craft, N., Li, H., 2016. The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. Sci. Rep. 6. https://doi.org/10.1038/srep39491

Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R., 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin. Dermatol. 30, 257–262. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007

Barreira, J.C.M., Pereira, E., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013a. *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits: Characterization in phenolic compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application. Ind. Crops Prod. 49, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.057

Barreira, J.C.M., Pereira, E., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013b. Bryonia dioica, *Tamus communis* and Lonicera periclymenum fruits: Characterization in phenolic

compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application. Ind. Crops Prod. 49, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.057

Barreira, R.F., González, A.G., Rocío, J.A.S., López, E.S., 1970. Eduligenin and lowegenin, two new steroidal sapogenins from *Tamus edulis*. Phytochemistry 9, 1641–1646. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85289-9

Beck, L., 2005. De materia medica: Translated and edited by Lily Y. Beck.

Beylot, C., Auffret, N., Poli, F., Claudel, J.P., Leccia, M.T., Del Giudice, P., Dreno, B., 2014. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 28, 271–278. https://doi.org/10.1111/jdv.12224

Bhate, K., Williams, H.C., 2013. Epidemiology of acne vulgaris. Br. J. Dermatol. 168, 474–485. https://doi.org/10.1111/bjd.12149

Blunden, G., Briggs, C.J., Hardman, R., 1968a. Steroidal constituents of the aerial parts of *Dioscorea* and *Tamus* species. Phytochemistry 7, 453–458. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90887-2

Blunden, G., Briggs, C.J., Hardman, R., 1968b. Steroidal constituents of the aerial parts of Dioscorea and Tamus species. Phytochemistry 7, 453–458. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90887-2

Boisselle, A., Dionne, F.T., Tremblay, R.R., 1979. Interaction of spironolactone with rat skin androgen receptor. Can. J. Biochem. 57, 1042–1046. https://doi.org/10.1139/o79-131

Bojar, R.A., Eady, B.A., Jones, C.E., Cunliffe, W.J., Holland, K.T., 1994. Inhibition of erythromycin-resistant propionibacteria on the skin of acne patients by topical erythromycin with and without zinc. Br. J. Dermatol. 130, 329–336. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb02929.x

Borghi, A., Mantovani, L., Minghetti, S., Giari, S., Virgili, A., Bettoli, V., 2011. Low-cumulative dose isotretinoin treatment in mild-to-moderate acne: efficacy in achieving stable remission. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 25, 1094–1098. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03933.x

Boudjada, A., Touil, A., Bensouici, C., Bendif, H., Rhouati, S., 2018. Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities. Nat. Prod. Res. 6419, 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468328

Boumerfeg, S., Baghiani, A., Messaoudi, D., Khennouf, S., Arrar, L., 2009. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. Phyther. Res. 23, 283–288. https://doi.org/10.1002/ptr.2621

Bowe, W.P., Joshi, S.S., Shalita, A.R., 2010. Diet and acne. J. Am. Acad. Dermatol. 63, 124–141. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.07.043

Bowe, W.P., Logan, A.C., 2010. Clinical implications of lipid peroxidation in acne vulgaris : old wine in new bottles. Lipids Health Dis. 9. https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-141

Brenner, M., Hearing, V.J., 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochem. Photobiol. 84, 539–549. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x

Briane, G., Durand, P., 2011. Le " reponchon " (*Tamus communis*), La vraie " raiponce " (*Campanula rapunculus*), La vraie " asperge sauvage " (*Asparagus acutifolius*) et autres salades. Rev. Patrim. 4–7.

Bronsnick, T., Murzaku, E.C., Rao, B.K., 2014. Diet in dermatology: Part I. Atopic dermatitis, acne, and nonmelanoma skin cancer. J. Am. Acad. Dermatol. 71, 1039.e1-1039.e12. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.06.015

Brown, J., Farquhar, C., Lee, O., Toomath, R., Jepson, R.G., 2009. Spironolactone versus placebo or in combination with steroids for hirsutism and/or acne. Cochrane Database Syst. Rev. https://doi.org/10.1002/14651858.CD000194.pub2

Burkill, I.H., 1960. The organography and the evolution of Dioscoreaceae, the family of the yams. J. Linn. Soc. Bot. 56, 319–412.

Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A., 2018. The human skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157

Caddick, L.R., Rudall, P.J., Wilkin, P., Hedderson, T.A.J., Chase, M.W., 2002a. Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. Bot. J. Linn. Soc. 138, 123–144. https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.138002123.x

Caddick, L.R., Wilkin, P., Rudall, P.J., Hedderson, T.A.J., Chase, M.W., 2002b. Yams reclassified: a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscoreales. Taxon 51, 103–114. https://doi.org/10.2307/1554967

Calaf, J., López, E., Millet, A., Alcañiz, J., Fortuny, A., Vidal, O., Callejo, J., Escobar-Jiménez, F., Torres, E., Espinós, J.J., 2007. Long-Term Efficacy and Tolerability of Flutamide Combined with Oral Contraception in Moderate to Severe Hirsutism: A 12-Month, Double-Blind, Parallel Clinical Trial. J. Clin. Endocrinol. Metab. 92, 3446–3452. https://doi.org/10.1210/jc.2006-2798

Campbell, J., 2010. High-Throughput Assessment of Bacterial Growth Inhibition by Optical Density Measurements. Curr. Protoc. Chem. Biol. 2, 195–208. https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch100115

Capasso, F., De Simone, F., Senatore, F., 1983a. Sterol constituents of *Tamus communis* L. J. Ethnopharmacol. 8, 327–329. https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90070-3

Capasso, F., Mascolo, N., Autore, G., De Simone, F., Senatore, F., 1983b. Anti-inflammatory and analgesic activity in alcoholic extract of *Tamus communis* L. J. Ethnopharmacol. 8, 321–325. https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90069-7

Carmina, E., Lobo, R.A., 2002. A comparison of the relative efficacy of antiandrogens for the treatment of acne in hyperandrogenic women. Clin. Endocrinol. (Oxf). 57, 231–234. https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2002.01594.x

Castelo-Branco, C., Moyano, D., Gómez, O., Balasch, J., 2009. Long-term safety and tolerability of flutamide for the treatment of hirsutism. Fertil. Steril. 91, 1183–1188. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.046

Chivot, M., Midoun, H., 1990. Isotretinoin and Acne – A Study of Relapses. Dermatology 180, 240–243. https://doi.org/10.1159/000248038

Choi, C., Lee, D., Kim, H., Kim, B., Park, K., Youn, S., 2011. The clinical features of late onset acne compared with early onset acne in women. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 25, 454–461. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03813.x

Christensen, G.J.M., Brueggmann, H., 2014. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. Benef. Microbes 5, 201–215. https://doi.org/10.3920/bm2012.0062

Coenye, T., Peeters, E., Nelis, H.J., 2007. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. Res. Microbiol. 158, 386–392. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.02.001

Collins, M.K., Moreau, J.F., Opel, D., Swan, J., Prevost, N., Hastings, M., Bimla Schwarz, E., Korb Ferris, L., 2014. Compliance with pregnancy prevention measures during isotretinoin therapy. J. Am. Acad. Dermatol. 70, 55–59. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.08.034

Cordain, L., Lindeberg, S., Hurtado, M., Hill, K., Eaton, S.B., Brand-Miller, J., 2002a. Acne Vulgaris. Arch. Dermatol. 138, 398–400. https://doi.org/10.1001/archderm.138.12.1584

Cordain, L., Lindeberg, S., Hurtado, M., Hill, K., Eaton, S.B., Brand-Miller, J., 2002b. Acne vulgaris: A disease of western civilization. Arch. Dermatol. 138, 1584–1590. https://doi.org/10.1001/archderm.138.12.1584

Couplan, F., 2009a. Le régal végétal: plantes sauvages comestibles. Encyclopedie des plantes comestibles de l'Europe. Éditions Sang de la Terre, Paris.

Couplan, F., 2009b. Le véritable régime crétois. Les éditions Ellébore, Paris.

Crowther, J.M., 2016. Method for quantification of oils and sebum levels on skin using the Sebumeter®. Int. J. Cosmet. Sci. 38, 210–216. https://doi.org/10.1111/ics.12258

Cunliffe, W.J., Caputo, R., Dreno, B., Forstrom, L., Heenen, M., Orfanos, C.E., Privat, Y., Aguilar, A.R., Meynadier, J., Alirezai, M., Jablonska, S., Shalita, A., Weiss, J.S., Chalker, D.K., Ellis, C.N., Greenspan, A., Katz, H.I., Kantor, I., Millikan, L.E., Swinehart, J.M., Swinyer, L., Whitmore, C., Czernielewski, J., Verschoore, M., 1997. Clinical efficacy and safety comparison of adapalene gel and tretinoin gel in the treatment of acne vulgaris: Europe and U.S. multicenter trials. J. Am. Acad. Dermatol. 36, S126–S134. https://doi.org/10.1016/s0190-9622(97)70056-2

Cusan, L., Dupont, A., Bélanger, A., Tremblay, R.R., Manhes, G., Labrie, F., 1990. Treatment of hirsutism with the pure antiandrogen flutamide. J. Am. Acad. Dermatol. 23, 462–469. https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70241-9

Dai, W.S., LaBraico, J.M., Stern, R.S., 1992. Epidemiology of isotretinoin exposure during pregnancy. J. Am. Acad. Dermatol. 26, 599–606. https://doi.org/10.1016/0190-9622(92)70088-W

Dawkins, R.M., 1936. The semantics of Greek names for plants. J. Hell. Stud. 56, 1–11. https://doi.org/10.2307/626030

De Cortes Sánchez-Mata, M., Tardío, J., 2016. Mediterranean wild edible plants: Ethnobotany and food composition tables, Mediterranean Wild Edible Plants: Ethnobotany and Food Composition Tables. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3329-7

De Young, L.M., Young, J.M., Ballaron, S.J., Spires, D.A., Madli Puhvel, S., 1984. Intradermal Injection of *Propionibacterium acnes*: A Model of Inflammation Relevant to Acne. J. Invest. Dermatol. 83, 394–398. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12264715

Deeks, E.D., 2019. Sarecycline: First Global Approval. Drugs 79, 325–329. https://doi.org/10.1007/s40265-019-1053-4

Del Prete, M., Mauriello, M.C., Faggiano, A., Di Somma, C., Monfrecola, G., Fabbrocini, G., Colao, A., 2012. Insulin resistance and acne: A new risk factor for men? Endocrine 42, 555–560. https://doi.org/10.1007/s12020-012-9647-6

Delgado, S., Suárez, A., Mayo, B., 2011. International Journal of Food Microbiology Identi fi cation , typing and characterisation of Propionibacterium strains from healthy mucosa of the human stomach. Int. J. Food Microbiol. 149, 65–72. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.028

Dinant, A., Boulos, R.A., 2016. Zolav®: A new antibiotic for the treatment of acne. Drug Des. Devel. Ther. 10, 1235–1242. https://doi.org/10.2147/DDDT.S106462

dos Santos, Z.M.Q., dos Santos, M.Q., Zancanaro, V., Bellaver, E.H., Nardi, G.M., Gelinski, J.M.L., Locatelli, C., 2019. Topical application of phenolic compounds suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses in mice with ear edema. Naunyn. Schmiedebergs. Arch.

Pharmacol. 392, 529–540. https://doi.org/10.1007/s00210-018-01604-z

Draelos, Z.D., Carter, E., Maloney, J.M., Elewski, B., Poulin, Y., Lynde, C., Garrett, S., 2007. Two randomized studies demonstrate the efficacy and safety of dapsone gel, 5% for the treatment of acne vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. 56, 439.e1-439.e10. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.10.005

Dréno, B., 2017. What is new in the pathophysiology of acne, an overview. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 31, 8–12. https://doi.org/10.1111/jdv.14374

Dréno, B., Bettoli, V., Ochsendorf, F., Layton, A.M., Perez, M., Dakovic, R., Gollnick, H., 2014. Efficacy and safety of clindamycin phosphate 1.2%/tretinoin 0.025% formulation for the treatment of acne vulgaris: Pooled analysis of data from three randomised, double-blind, parallel-group, phase III studies. Eur. J. Dermatology 24, 201–209. https://doi.org/10.1684/ejd.2014.2293

Dréno, B., Fischer, T., Perosino, E., Poli, F., Viera, M., Rendon, M., Berson, D., Cohen, J., Roberts, W., Starker, I., Wang, B., 2011. Expert Opinion: Efficacy of superficial chemical peels in active acne management - what can we learn from the literature today? Evidence-based recommendations. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 25, 695–704. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03852.x

Dréno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J.B., Khammari, A., Seite, S., 2017. Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. Exp. Dermatol. 26, 798–803. https://doi.org/10.1111/exd.13296

Duke, J.A., 2002. Handbook of Medicinal Herbs, Second. ed. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420040463

El-Akawi, Z., Abdel-Latif, N., Abdul-Razzak, K., Al-Aboosi, M., 2007. The Relationship between Blood Lipids Profile and Acne. J. Heal. Sci. 53, 596–599. https://doi.org/10.1248/jhs.53.596

Fan, X., Xing, Y.-Z., Liu, L.-H., Liu, C., Wang, D.-D., Yang, R.-Y., Lapidoth, M., 2013. Effects of 420-nm intense pulsed light in an acne animal model. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 27, 1168–1171. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04487.x

Fehri, L.F., Mak, T.N., Laube, B., Brinkmann, V., Ogilvie, L.A., Mollenkopf, H., Lein, M., Schmidt, T., Meyer, T.F., Brueggemann, H., 2011. Prevalence of *Propionibacterium acnes* in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells. Int. J. Med. Microbiol. 301, 69–78. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.014

Ferrer-Gallego, P.P., Boisset, F., 2016. Typification of *Dioscorea communis* and its synonym *Tamus communis* var. subtriloba (Dioscoreaceae). Phytotaxa 260, 258–266.

https://doi.org/10.11646/phytotaxa.260.3.5

Fisk, W.A., Lev-Tov, H.A., Sivamani, R.K., 2014. Botanical and Phytochemical Therapy of Acne: A Systematic Review. Phyther. Res. 28, 1137–1152. https://doi.org/10.1002/ptr.5125

Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M., Li, H., 2013. *Propionibacterium acnes* Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. J. Invest. Dermatol. 133, 2152–2160. https://doi.org/10.1038/jid.2013.21

Fulton, J.E., Farzad-Bakshandeh, A., Bradley, S., 1974. Studies on the Mechanism of Action of Topical Benzoyl Peroxide and Vitamin A Acid in Acne Vulgaris. J. Cutan. Pathol. 1, 191–200. https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1974.tb00628.x

Fyrand, O., Bang Jakobsen, H., 1986. Water-Based versus Alcohol-Based Benzoyl Peroxide Preparations in the Treatment of Acne vulgaris. Dermatology 172, 263–267. https://doi.org/10.1159/000249352

García-Herrera, P., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Tardío, J., Olmedilla-Alonso, B., 2013. Carotenoid content of wild edible young shoots traditionally consumed in Spain (Asparagus acutifolius L., Humulus lupulus L., Bryonia dioica Jacq. and *Tamus communis* L.). J. Sci. Food Agric. 93, 1692–1698. https://doi.org/10.1002/jsfa.5952

Garner, S.E., Eady, A., Popescu, C.M., Newton, J., Li Wan Po, A., 2011. Cochrane Review: Minocycline for acne vulgaris: efficacy and safety. Evidence-Based Child Heal. A Cochrane Rev. J. 6, 1440–1544. https://doi.org/10.1002/ebch.853

Gold, L., Cruz, A., Eichenfield, L., Tan, J., Jorizzo, J., Kerrouche, N., Dhuin, J.-C., 2010. Effective and safe combination therapy for severe acne vulgaris: a randomized, vehicle-controlled, double-blind study of adapalene 0.1%-benzoyl peroxide 2.5% fixed-dose combination gel with doxycycline hyclate 100 mg. undefined.

Goldstein, J.A., Socha-Szott, A., Thomsen, R.J., Pochi, P.E., Shalita, A.R., Strauss, J.S., 1982. Comparative effect of isotretinoin and etretinate on acne and sebaceous gland secretion. J. Am. Acad. Dermatol. 6, 760–765. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(82)70066-0

González, A.G., Freire, R., Salazar, J.A., Suárez, E., 1971. 7-Ketotamusgenin, 7-ketodiosgenin, 25S-hydroxytamusgenin and afurigenin, four new steroidal sapogenins from *Tamus edulis*. Phytochemistry 10, 1339–1346. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84338-1

Gueorguieva, R., Krystal, J.H., 2004. Move over ANOVA: Progress in Analyzing Repeated-Measures Data and Its Reflection in Papers Published in the Archives of General Psychiatry. Arch. Gen.

Psychiatry 61, 310–317. https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.3.310

Hall, G.S., Pratt-Rippin, K., Meisler, D.M., Washington, J.A., Roussel, T.J., Miller, D., 1994. Growth curve for *Propionibacterium acnes*. Curr. Eye Res. 13, 465–466. https://doi.org/10.3109/02713689408999875

Harper, J.C., 2009. Should dermatologists prescribe hormonal contraceptives for acne? Dermatol. Ther. 22, 452–457. https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01261.x

Hay, R.J., Johns, N.E., Williams, H.C., Bolliger, I.W., Dellavalle, R.P., Margolis, D.J., Marks, R., Naldi, L., Weinstock, M.A., Wulf, S.K., Michaud, C., J.l. Murray, C., Naghavi, M., 2014. The global burden of skin disease in 2010: An analysis of the prevalence and impact of skin conditions. J. Invest. Dermatol. 134, 1527–1534. https://doi.org/10.1038/jid.2013.446

Hegi, G., 1939. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 2. Aufl., Band II.

Hermsmeier, M., Sawant, T., Chowdhury, K., Nagavarapu, U., Chan, K.F., 2019. First Use of Optical Coherence Tomography on In Vivo Inflammatory Acne-Like Lesions: A Murine Model . Lasers Surg. Med. https://doi.org/10.1002/lsm.23140

Hevia, D., 2018. Fast and Accurate Electrochemical Measurement of Total Antioxidant Capacity as an Alternative to Spectrophotometrical Methods. Biomed. J. Sci. Tech. Res. 11, 001–003. https://doi.org/10.26717/bjstr.2018.11.002069

Holland, D.B., Jeremy, A.H.T., 2005. The role of inflammation in the pathogenesis of acne and acne scarring. Semin. Cutan. Med. Surg. 24, 79–83. https://doi.org/10.1016/j.sder.2005.03.004

Huber, H., 1998. Dioscoreaceae, in: Flowering Plants · Monocotyledons. Springer Berlin Heidelberg, pp. 216–235. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_28

Ireland, C.R., Schwabe, W.W., Coursey, D.G., 1981. The occurrence of batatasins in the Dioscoreaceae. Phytochemistry 20, 1569–1571. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)98532-7

Jang, Y.H., Lee, K.C., Lee, S.J., Kim, D.W., Lee, W.J., 2015. HR-1 mice: A new inflammatory acne mouse model. Ann. Dermatol. 27, 257–264. https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.3.257

Jarvis, C.E., 2007. Order out of chaos. Linnean Society of London in association with the Natural History Museum, London.

Jeremy, A.H.T., Holland, D.B., Roberts, S.G., Thomson, K.F., Cunliffe, W.J., 2003. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. J. Invest. Dermatol. 121, 20–27. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12321.x

Jones, D.H., King, K., Miller, A.J., Cunliffe, W.J., 1983. A dose-response study of 13-cis-retinoic acid

in acne vulgaris. Br. J. Dermatol. 108, 333–343. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1983.tb03973.x

Jr, O.M., Thornsberry, C., Cardin, C.W., Smiles, K.A., Leyden, J.J., 2002. Bacterial Resistance and Therapeutic Outcome Following Three Months of Topical Acne Therapy with 2% Erythromycin Gel Versus Its Vehicle. Acta Derm. Venereol. 82, 260–265. https://doi.org/10.1080/000155502320323216

Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., Egawa, G., 2018. The immunological anatomy of the skin. Nat. Rev. Immunol. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0084-5

Kataria Arora, M., Seth, S., Dayal, S., 2010. The relationship of lipid profile and menstrual cycle with acne vulgaris. Clin. Biochem. 43, 1415–1420. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.09.010

Katsambas, A., Graupe, K., Stratigos, J., 1989. Clinical studies of 20% azelaic acid cream in the treatment of acne vulgaris. Comparison with vehicle and topical tretinoin. Acta Dermato-Venereologica, Suppl. 69, 35–39. https://doi.org/10.2340/000155551433539

Kaymak, Y., İlter, N., 2006. The effectiveness of intermittent isotretinoin treatment in mild or moderate acne. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 20, 1256–1260. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01784.x

Khodaeiani, E., Fouladi, R.F., Amirnia, M., Saeidi, M., Karimi, E.R., 2013. Topical 4% nicotinamide vs. 1% clindamycin in moderate inflammatory acne vulgaris. Int. J. Dermatol. 52, 999–1004. https://doi.org/10.1111/ijd.12002

Kim, J., Ochoa, M.-T., Krutzik, S.R., Takeuchi, O., Uematsu, S., Legaspi, A.J., Brightbill, H.D., Holland, D., Cunliffe, W.J., Akira, S., Sieling, P.A., Godowski, P.J., Modlin, R.L., 2002. Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Triggers Inflammatory Cytokine Responses. J. Immunol. 169, 1535–1541. https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1535

Kim, M.J., Eun, D.H., Kim, S.M., Kim, J., Lee, W.J., 2019. Efficacy of bacteriophages in *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in mice. Ann. Dermatol. 31, 22–28. https://doi.org/10.5021/ad.2019.31.1.22

King, K., Jones, D.H., Daltry, D.C., Cunliffe, W.J., 1982. A double-blind study of the effects of 13-cis-retinoic acid on acne, sebum excretion rate and microbial population. Br. J. Dermatol. 107, 583–590. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1982.tb00410.x

Kircik, H.L., 2011. Efficacy and safety of azelaic acid (AzA) gel 15% in the treatment of post-inflammatory hyperpigmentation and acne: a 16-week, baseline-controlled study - PubMed. J. Drugs Dermatology 10, 586–590.

Kistowska, M., Gehrke, S., Jankovic, D., Kerl, K., Fettelschoss, A., Feldmeyer, L., Fenini, G., Kolios, A., Navarini, A., Ganceviciene, R., Schauber, J., Contassot, E., French, L.E., 2014. IL-1β drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo. J. Invest. Dermatol. 134, 677–685. https://doi.org/10.1038/jid.2013.438

Kolar, S.L., Tsai, C., Torres, J., Fan, X., Li, H., Liu, G.Y., 2019. *Propionibacterium acnes*–induced immunopathology correlates with health and disease association. JCI Insight 4. https://doi.org/10.1172/jci.insight.124687

Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., Goodwin, C., 2011. Anatomy and Physiology of the Skin. J. Dermatol. Nurses. Assoc. 3, 203–213. https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98

Kovács, A., Forgo, P., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Szabó, P., Hohmann, J., 2007a. Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. Phytochemistry 68, 687–691. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.028

Kovács, A., Forgo, P., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Szabó, P., Hohmann, J., 2007b. Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. Phytochemistry 68, 687–691. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.028

Küçükboyaci, N., Turan Dural, N.N., Köroğlu, A., İşcan, G., Aydin, A., 2015. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Tamus communis* L. ssp. *cretica* (L.) Kit Tan and Its Mineral Composition. Turkish J. Pharm. Sci. 12, 113–122. https://doi.org/http://eds.b.ebscohost.com/abstract?site=eds&scope=site&jrnl=1304530X&AN=109211347&h=hkLJdOg2Sgl1LczjjxIQXOd3oCt9v83xmNrOtDI2cCmaK%2Fxss%2B31vFJS6ma3Zc7EmGj1SRRYcWUN7s%2F72YApUg%3D%3D&crl=c&resultLocal=ErrCrlNoResults&resultNs=Ehost&crlhashurl=login.aspx%3Fdirect%3Dtrue%26profile%3Dehost%26scope%3Dsite%26authtype%3Dcrawler%26jrnl%3D1304530X%26AN%3D109211347

Kupeli, E., Orhan, I., Yesilada, E., 2007. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine for their anti-inflammatory and antinociceptive activities. Pharm. Biol. 45, 547–555. https://doi.org/10.1080/13880200701498895

Layton, A.M., Knaggs, H., Taylor, J., Cunliffe, W.J., 1993. Isotretinoin for acne vulgaris - 10 years later: A safe and succesful treatment. Br. J. Dermatol. 129, 292–296. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1993.tb11849.x

Lebrun-Vignes, B., Kreft-Jais, C., Castot, A., Chosidow, O., 2012. Comparative analysis of adverse drug reactions to tetracyclines: results of a French national survey and review of the literature. Br. J. Dermatol. 166, 1333–1341. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10845.x

Lee, W.J., Lee, K.C., Kim, M.J., Jang, Y.H., Lee, S.J., Kim, D.W., 2016. Efficacy of red or infrared

light-emitting diodes in a mouse model of *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. Ann. Dermatol. 28, 186–191. https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.2.186

Lehucher-Ceyrac, D., Weber-Buisset, M.J., 1993. Isotretinoin and Acne in Practice: A Prospective Analysis of 188 Cases over 9 Years. Dermatology 186, 123–128. https://doi.org/10.1159/000247322

Lester, R.S., Schachter, G.D., Light, M.J., 1985. Isotretinoin and Tetracycline in the Management of Severe Nodulocystic Acne. Int. J. Dermatol. 24, 252–257. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1985.tb05458.x

Levesque, A., Hamzavi, I., Seite, S., Rougier, A., Bissonnette, R., 2011. Randomized trial comparing a chemical peel containing a lipophilic hydroxy acid derivative of salicylic acid with a salicylic acid peel in subjects with comedonal acne. J. Cosmet. Dermatol. 10, 174–178. https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2011.00566.x

Leyden, J.J., 1995. New understandings of the pathogenesis of acne. J. Am. Acad. Dermatol. 32. https://doi.org/10.1016/0190-9622(95)90416-6

Lucky, A.W., Cullen, S.I., Funicella, T., Jarratt, M.T., Jones, T., Reddick, M.E., 1998. Double-blind, vehicle-controlled, multicenter comparison of two 0.025% tretinoin creams in patients with acne vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. 38, S24–S30. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70142-2

Mabey, R., 1996. Flora britannica. Sinclair-Stevenson.

Madan, S., Nehate, C., Barman, T.K., Rathore, A.S., Koul, V., 2019. Design, preparation, and evaluation of liposomal gel formulations for treatment of acne: in vitro and in vivo studies. Drug Dev. Ind. Pharm. 45, 395–404. https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1546310

Magin, P.J., Adams, J., Pond, C.D., Smith, W., 2006. Topical and oral CAM in acne: A review of the empirical evidence and a consideration of its context. Complement. Ther. Med. 14, 62–76. https://doi.org/10.1016/j.ctim.2005.10.007

Maloney, J.M., Dietze, P., Watson, D., Niknian, M., Lee-Rugh, S., Sampson-Landers, C., Korner, P., 2008. Treatment of Acne Using a 3-Milligram Drospirenone/20-Microgram Ethinyl Estradiol Oral Contraceptive Administered in a 24/4 Regimen. Obstet. Gynecol. 112, 773–781. https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318187e1c5

Martins, D., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., 2011. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. Food Chem. 125, 488–494. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.038

Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F., 1987. Local anti-inflammatory activity of *Tamus communis*. J.

Ethnopharmacol. 19, 81–84. https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90138-3

Matias, A.R., Ferreira, M., Costa, P., Neto, P., 2015. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: Comparison study between Antera 3D, Mexameter and Colorimeter. Ski. Res. Technol. 21, 346–362. https://doi.org/10.1111/srt.12199

Maxwell, S.E., Delaney, H.D., 2003. Designing Experiments and Analyzing Data, Designing Experiments and Analyzing Data. Routledge. https://doi.org/10.4324/9781410609243

McInturff, J.E., Kim, J., 2005. The Role of Toll-Like Receptors in the Pathophysiology of Acne. Semin. Cutan. Med. Surg. 24, 73–78. https://doi.org/10.1016/j.sder.2005.03.002

Menard, R.H., Stripp, B., Gillette, J.R., 1974. Spironolactone and Testicular Cytochrome P-450: Decreased Testosterone Formation inSeveral Species and Changes in Hepatic Drug Metabolism. Endocrinology 94, 1628–1636. https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1628

Menon, G.K., 2015. Skin basics; structure and function, in: Lipids and Skin Health. Springer International Publishing, pp. 9–23. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09943-9_2

Meyer, K., Pappas, A., Dunn, K., Cula, G., Seo, I., Ruvolo, E., Batchvarova, N., 2015. Evaluation of Seasonal Changes in Facial Skin With and Without Acne. J. Drugs Dermatology 14, 593–601.

Mills, O.H., Kligman, A.M., Pochi, P., Comite, H., 1986. Comparing 2.5%, 5%, and 10% Benzoyl Peroxide on Inflammatory Acne Vulgaris. Int. J. Dermatol. 25, 664–667. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1986.tb04534.x

Mirshahpanah, P., Maibach, H.I., 2007. Models in acnegenesis. Cutan. Ocul. Toxicol. 26, 195–202. https://doi.org/10.1080/15569520701502815

Moradi Tuchayi, S., Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., Dessinioti, C., Feldman, S.R., Zouboulis, C.C., 2015. Acne vulgaris. Nat. Rev. Dis. Prim. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.29

Morales, P., Carvalho, A.M., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Molina, M., Ferreira, I.C.F.R., 2012. Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables. Genet. Resour. Crop Evol. 59, 851–863. https://doi.org/10.1007/s10722-011-9726-1

Morton, M., 2004. Cupboard Love 2: A Dictionary of Culinary Curiosities. Insomniac Press.

Müderris, I.I., Bayram, F., Güven, M., 2000. A prospective, randomized trial comparing flutamide (250 mg/d) and finasteride (5 mg/d) in the treatment of hirsutism. Fertil. Steril. 73, 984–987. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00470-2

Nakatsuji, T., Kao, M.C., Fang, J.Y., Zouboulis, C.C., Zhang, L., Gallo, R.L., Huang, C.M., 2009. Antimicrobial property of lauric acid against *Propionibacterium acnes*: Its therapeutic potential

for inflammatory acne vulgaris. J. Invest. Dermatol. 129, 2480–2488. https://doi.org/10.1038/jid.2009.93

Nakatsuji, T., Tang, D. chu C., Zhang, L., Gallo, R.L., Huang, C.M., 2011. *Propionibacterium acnes* camp factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: Potential targets for inflammatory acne treatment. PLoS One 6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014797

Pappas, A., 2015. Sebaceous Lipids, in: Lipids and Skin Health. Springer International Publishing, Cham, pp. 127–138. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09943-9_9

Park, E.S., Na, J.I., Kim, S.O., Huh, C.H., Youn, S.W., Park, K.C., 2006. Application of a pigment measuring device - Mexameter® - for the differential diagnosis of vitiligo and nevus depigmentosus. Ski. Res. Technol. 12, 298–302. https://doi.org/10.1111/j.0909-752X.2006.00187.x

Peck, G.L., Olsen, T.G., Butkus, D., Pandya, M., Arnaud-Battandier, J., Gross, E.G., Windhorst, D.B., Cheripko, J., 1982. Isotretinoin versus placebo in the treatment of cystic acne: A randomized double-blind study. J. Am. Acad. Dermatol. 6, 735–745. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(82)70063-5

Plessis, J. du, Stefaniak, A., Eloff, F., John, S., Agner, T., Chou, T.C., Nixon, R., Steiner, M., Franken, A., Kudla, I., Holness, L., 2013. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 2. transepidermal water loss and skin hydration. Ski. Res. Technol. 19, 265–278. https://doi.org/10.1111/srt.12037

Plewig, G., Cunliffe, W.J., Binder, N., Höschen, K., 2009. Efficacy of an oral contraceptive containing EE 0.03 mg and CMA 2 mg (Belara®) in moderate acne resolution: a randomized, double-blind, placebo-controlled Phase III trial. Contraception 80, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.contraception.2009.02.016

Plewig, G., Melnik, B., Chen, W., 2019a. History of Acne and Rosacea, in: Plewig and Kligman´s Acne and Rosacea. Springer International Publishing, Cham, pp. 609–658. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49274-2_18

Plewig, G., Melnik, B., Chen, W., 2019b. Acne Epidemiology and Genetics, in: Plewig and Kligman´s Acne and Rosacea. Springer International Publishing, Cham, pp. 35–44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49274-2_2

Plewig, G., Melnik, B., Chen, W., 2019c. Acne Pathogenesis, in: Plewig and Kligman´s Acne and Rosacea. Springer International Publishing, Cham, pp. 45–61. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49274-2_3

Plewig, G., Melnik, B., Chen, W., 2019d. Plewig and Kligman´s Acne and Rosacea. Springer International Publishing, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49274-2

Poljuha, D., Šola, I., Bilić, J., Dudaš, S., Bilušić, T., Markić, J., Rusak, G., 2015. Phenolic composition, antioxidant capacity, energy content and gastrointestinal stability of Croatian wild edible plants. Eur. Food Res. Technol. 241, 573–585. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2486-y

Pollock, B., Turner, D., Stringer, M.R., Bojar, R.A., Goulden, V., Stables, G.I., Cunliffe, W.J., 2004. Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: A study of clinical efficacy and mechanism of action. Br. J. Dermatol. 151, 616–622. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06110.x

Poulin, Y., Sanchez, N.P., Bucko, A., Fowler, J., Jarratt, M., Kempers, S., Kerrouche, N., Dhuin, J.-C., Kunynetz, R., 2011. A 6-month maintenance therapy with adapalene-benzoyl peroxide gel prevents relapse and continuously improves efficacy among patients with severe acne vulgaris: results of a randomized controlled trial. Br. J. Dermatol. 164, 1376–1382. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10344.x

Prakash, C., Bhargava, P., Tiwari, S., Majumdar, B., Bhargava, R.K., 2017. Skin surface pH in acne vulgaris: Insights from an observational study and review of the literature. J. Clin. Aesthet. Dermatol.

Proksch, E., 2018. pH in nature, humans and skin. J. Dermatol. 45, 1044–1052. https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489

Rabe, T., Kowald, A., Ortmann, J., Rehberger-Schneider, S., 2000. Inhibition of skin 5α-reductase by oral contraceptive progestins in vitro. Gynecol. Endocrinol. 14, 223–230. https://doi.org/10.3109/09513590009167685

Rafael, M., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., 2011. Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica, Tamus communis and Lonicera periclymenum* fruits. Ind. Crops Prod. 34, 1447–1454. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.021

Renner, S., Scarborough, J., Schaefer, H., Paris, H., 2008. Dioscorides's Bryonia melaina is *Bryonia alba*, not *Tamus communis*, and an illustration labeled Bruonia melaina in the Codex Vindobonensis is *Humulus lupulus* not *Bryonia dioica*.

Réthy, B., Kovács, A., Zupkó, I., Forgo, P., Vasas, A., Falkay, G., Hohmann, J., 2006a. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. Planta Med. 72, 767–770. https://doi.org/10.1055/s-2006-941505

Réthy, B., Kovács, A., Zupkó, I., Forgo, P., Vasas, A., Falkay, G., Hohmann, J., 2006b. Cytotoxic

phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. Planta Med. 72, 767–770. https://doi.org/10.1055/s-2006-941505

Riley, P.A., 1997. Melanin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 29, 1235–1239. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00013-7

Rogowska, A., Styczyński, M., Pączkowski, C., Szakiel, A., Pinheiro de Carvalho, M.Â.A., 2019. GC-MS analysis of steroids and triterpenoids occurring in leaves and tubers of *Tamus edulis* Lowe. Phytochem. Lett. 30, 231–234. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.012

Rowley, G.D., Eggli, U., 2020. *Dioscorea* DIOSCOREACEAE, in: Monocotyledons. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1201–1208. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56486-8_44

Rubinow, D.R., Peck, G.L., Squillace, K.M., Gantt, G.G., 1987. Reduced anxiety and depression in cystic acne patients after successful treatment with oral isotretinoin. J. Am. Acad. Dermatol. 17, 25–32. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(87)70166-2

Sarici, G., Cinar, S., Armutcu, F., Altınyazar, C., Koca, R., Tekin, N., 2009. Oxidative stress in acne vulgaris. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. 24, 763–767. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03505.x

Schmidt, R.J., Moult, S.P., 1983. The dermatitic properties of black bryony (*Tamus communis* L.). Contact Dermatitis 9, 390–396. https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1983.tb04435.x

Serafini, P.C., Catalino, J., Lobo, R.A., 1985. The effect of spironolactone on genital skin 5α-reductase activity. J. Steroid Biochem. 23, 191–194. https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90236-5

Shaheen, B., Gonzalez, M., 2013. Acne sans *P. acnes*. J. Eur. Acad. Dermatology Venereol. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2012.04516.x

Shaheen, F., Ali, L., Ali, S., Erdemoglu, N., Sener, B., 2009. Antioxidant flavonoids from *Tamus communis* ssp. *cretica*. Chem. Nat. Compd. 45, 346–349. https://doi.org/10.1007/s10600-009-9348-4

Shalita, A., Weiss, J.S., Chalker, D.K., Ellis, C.N., Greenspan, A., Katz, H.I., Kantor, I., Millikan, L.E., Swinehart, T., Swinyer, L., Whitmore, C., Baker, M., Czernielewski, J., 1996. A comparison of the efficacy and safety of adapalene gel 0.1% and tretinoin gel 0.025% in the treatment of acne vulgaris: A multicenter trial. J. Am. Acad. Dermatol. 34, 482–485. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(96)90443-0

Shalita, A.R., Smith, J.G., Parish, L.C., Sofman, M.S., Chalker, D.K., 1995. Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris. Int. J. Dermatol. 34, 434–437. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb04449.x

Shaw, J.C., White, L.E., 2002. Long-term safety of spironolactone in acne: Results of an 8-year followup study. J. Cutan. Med. Surg. 6, 541–545. https://doi.org/10.1007/s10227-001-0152-4

Shin, J., Cheetham, T.C., Wong, L., Niu, F., Kass, E., Yoshinaga, M.A., Sorel, M., McCombs, J.S., Sidney, S., 2011. The impact of the iPLEDGE program on isotretinoin fetal exposure in an integrated health care system. J. Am. Acad. Dermatol. 65, 1117–1125. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.09.017

Soleymani, S., Farzaei, M.H., Zargaran, A., Niknam, S., Rahimi, R., 2020. Promising plant-derived secondary metabolites for treatment of acne vulgaris: a mechanistic review. Arch. Dermatol. Res. 312, 5–23. https://doi.org/10.1007/s00403-019-01968-z

Stainforth, J., Macdonald-Hull, S., Papworth-Smith, J., Eady, E., Cunliffe, W., Norris, J., Simpson, N., Cork, M., 1993. A single-blind comparison of topical erythromycin/zinc lotion and oral minocycline in the treatment of acne vulgaris. J. Dermatolog. Treat. 4, 119–122. https://doi.org/10.3109/09546639309080548

Stainforth, J.M., Layton, A.M., Taylor, J.P., Cunliffe, W.J., 1993. Isotretinoin for the treatment of acne vulgaris: which factors may predict the need for more than one course? Br. J. Dermatol. 129, 297–301. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1993.tb11850.x

Stefaniak, A.B., Plessis, J. du, John, S.M., Eloff, F., Agner, T., Chou, T.C., Nixon, R., Steiner, M.F.C., Kudla, I., Linn Holness, D., 2013. International guidelines for the in vivo assessment of skin properties in non-clinical settings: Part 1. pH. Ski. Res. Technol. 19, 59–68. https://doi.org/10.1111/srt.12016

Stewart, F.H., Harper, C.C., Ellertson, C.E., Grimes, D.A., Sawaya, G.F., Trussell, J., 2001. Clinical breast and pelvic examination requirements for hormonal contraception: Current practice vs evidence. J. Am. Med. Assoc. 285, 2232–2239. https://doi.org/10.1001/jama.285.17.2232

Strauss, J.S., Leyden, J.J., Lucky, A.W., Lookingbill, D.P., Drake, L.A., Hanifin, J.M., Lowe, N.J., Jones, T.M., Stewart, D.M., Jarratt, M.T., Katz, I., Pariser, D.M., Pariser, R.J., Tschen, E., Chalker, D.K., Rafal, E.S., Savin, R.P., Roth, H.L., Chang, L.K., Baginski, D.J., Kempers, S., McLane, J., Eberhardt, D., Leach, E.E., Bryce, G., Hong, J., 2001. A randomized trial of the efficacy of a new micronized formulation versus a standard formulation of isotretinoin in patients with severe recalcitrant nodular acne. J. Am. Acad. Dermatol. 45, 187–195. https://doi.org/10.1067/mjd.2001.115965

Strauss, J.S., Stranieri, A.M., 1982. Changes in long-term sebum production from isotretinoin therapy. J. Am. Acad. Dermatol. 6, 751–755. https://doi.org/10.1016/S0190-9622(82)80055-8

Taleb, M.H., Abdeltawab, N.F., Shamma, R.N., Abdelgayed, S.S., Mohamed, S.S., Farag, M.A.,

Ramadan, M.A., 2018. Origanum vulgare L. Essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion—in vitro and in vivo study. Molecules 23. https://doi.org/10.3390/molecules23092164

Tan, J., Thiboutot, D., Popp, G., Gooderham, M., Lynde, C., Del Rosso, J., Weiss, J., Blume-Peytavi, U., Weglovska, J., Johnson, S., Parish, L., Witkowska, D., Sanchez Colon, N., Alió Saenz, A., Ahmad, F., Graeber, M., Stein Gold, L., 2019. Randomized phase 3 evaluation of trifarotene 50 μg/g cream treatment of moderate facial and truncal acne. J. Am. Acad. Dermatol. 80, 1691–1699. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.02.044

Tan, J., Bhate, K., 2015. A global perspective on the epidemiology of acne. Br. J. Dermatol. 172, 3–12. https://doi.org/10.1111/bjd.13462

Tan, J., Fung, K., Bulger, L., 2006. Reliability of dermatologists in acne lesion counts and global assessments. J. Cutan. Med. Surg. 10, 160–165. https://doi.org/10.2310/7750.2006.00044

Tanghetti, E., Harper, J.C., Oefelein, M.G., 2012. The efficacy and tolerability of dapsone 5% gel in female vs male patients with facial acne vulgaris: Gender as a clinically relevant outcome variable. J. Drugs Dermatology 11, 1417–1421.

Tax, G., Urbán, E., Palotás, Z., Puskás, R., Kónya, Z., Bíró, T., Kemény, L., Szabó, K., 2016. Propionic Acid Produced by *Propionibacterium acnes* Strains Contri-butes to Their Pathogenicity. Acta Derm. Venereol. 96, 43–49. https://doi.org/10.2340/00015555-2154

Thiboutot, D.M., Shalita, A.R., Yamauchi, P.S., Dawson, C., Kerrouche, N., Arsonnaud, S., Kang, S., 2006. Adapalene gel, 0.1%, as maintenance therapy for acne vulgaris: A randomized, controlled, investigator-blind follow-up of a recent combination study. Arch. Dermatol. 142, 597–602. https://doi.org/10.1001/archderm.142.5.597

Thoreau, E., Arlabosse, J.M., Bouix-Peter, C., Chambon, S., Chantalat, L., Daver, S., Dumais, L., Duvert, G., Feret, A., Ouvry, G., Pascau, J., Raffin, C., Rodeville, N., Soulet, C., Tabet, S., Talano, S., Portal, T., 2018. Structure-based design of Trifarotene (CD5789), a potent and selective RARγ agonist for the treatment of acne. Bioorganic Med. Chem. Lett. 28, 1736–1741. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.036

Tsatsou, F., Zouboulis, C.C., 2014. Anatomy of the Sebaceous Gland, in: Pathogenesis and Treatment of Acne and Rosacea. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 27–31. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69375-8_4

Tuchayi, S.M., Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., Dessinioti, C., Feldman, S.R., Zouboulis, C.C., 2015. Acne vulgaris. Nat. Rev. Dis. Prim. 1, 15029. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.29

Tutin, E.D., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., 1980. Flora Europaea, Volume 5: Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones). Flora Eur. Vol. 5 Alismataceae to Orchid. (Monocotyledones).

Uphof, J.C.T., 1968. Dictionary of economic plants. Stechert-hafner Service Agency, Inc.

Valente Duarte De Sousa, I.C., 2019. New and emerging drugs for the treatment of acne vulgaris in adolescents. Expert Opin. Pharmacother. https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1584182

Wainwright, P.E., Leatherdale, S.T., Dubin, J.A., 2007. Advantages of mixed effects models over traditional ANOVA models in developmental studies: A worked example in a mouse model of fetal alcohol syndrome. Dev. Psychobiol. 49, 664–674. https://doi.org/10.1002/dev.20245

Wang, X.L., Wang, H.W., Zhang, L.L., Guo, M.X., Huang, Z., 2010. Topical ALA PDT for the treatment of severe acne vulgaris. Photodiagnosis Photodyn. Ther. 7, 33–38. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.01.003

Wilkin, P., Schols, P., Chase, M.W., Chayamarit, K., Furness, C.A., Huysmans, S., Rakotonasolo, F., Smets, E., Thapyai, C., 2005. A plastid gene phylogeny of the yam genus, Dioscorea: Roots, fruits and Madagascar. Syst. Bot. 30, 736–749. https://doi.org/10.1600/036364405775097879

Williams, H.C., Dellavalle, R.P., Garner, S., 2012. Acne vulgaris. Lancet 379, 361–372. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60321-8

Wysowski, D.K., Freiman, J.P., Tourtelot, J.B., Horton, M.L., 1993. Fatal and nonfatal hepatotoxicity associated with flutamide. Ann. Intern. Med. 118, 860–864. https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-11-199306010-00006

Yamamoto, A., Takenouchi, K., Ito, M., 1995. Impaired water barrier function in acne vulgaris. Arch. Dermatol. Res. 287, 214–218. https://doi.org/10.1007/BF01262335

Yang, J.H., Yoon, J.Y., Kwon, H.H., Min, S., Moon, J., Suh, D.H., 2017. Seeking new acne treatment from natural products, devices and synthetic drug discovery. Dermatoendocrinol. 9, e1356520. https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1356520

Zaenglein, A.L., Pathy, A.L., Schlosser, B.J., Alikhan, A., Baldwin, H.E., Berson, D.S., Bowe, W.P., Graber, E.M., Harper, J.C., Kang, S., Keri, J.E., Leyden, J.J., Reynolds, R. V., Silverberg, N.B., Stein Gold, L.F., Tollefson, M.M., Weiss, J.S., Dolan, N.C., Sagan, A.A., Stern, M., Boyer, K.M., Bhushan, R., 2016. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. J. Am. Acad. Dermatol. 74, 945-973.e33. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.12.037

Zerargui, F., Boumerfeg, S., Charef, N., Baghiani, A., Djarmouni, M., Khennouf, S., Arrar, L., Abu Zarga, M., Mubarak, M., 2015. Antioxidant Potentials and Xanthine Oxidase Inhibitory Effect of

Two Furanocoumarins Isolated from *Tamus communis* L. Med. Chem. (Los. Angeles). 11, 506–513. https://doi.org/10.2174/1573406411666150130145246

Zouboulis, C.C., 2015. The brain of the skin: Sebaceous gland, in: Lipids and Skin Health. Springer International Publishing, pp. 109–125. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09943-9_8

Zouboulis, C.C., 2004. Acne and sebaceous gland function. Clin. Dermatol. 22, 360–366. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.03.004

Zouboulis, C.C., Akamatsu, H., Stephanek, K., Orfanos, C.E., 1994. Androgens Affect the Activity of Human Sebocytes in Culture in a Manner Dependent on the Localization of the Sebaceous Glands and Their Effect Is Antagonized by Spironolactone. Skin Pharmacol. Physiol. 7, 33–40. https://doi.org/10.1159/000211271

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Καββάδας Δ., 1956. Εικονογραφημένον Βοτανικόν - Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Η΄, Αθήνα, σελ. 3859-3860.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΟΙ ΤΟΠΟΙ

American Type Culture Collection (ATCC), 2020a. *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian ATCC ® 6919™ [WWW Document]. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/6919.aspx?geo_country=gr#generalinformation (accessed 9.15.20).

American Type Culture Collection (ATCC), 2020b. *Cutibacterium acnes* Scholz and Kilian ATCC ® 11827™ [WWW Document]. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/11827.aspx?geo_country=gr#generalinformation (accessed 9.15.20).

GraphPad Prism 8 Statistics Guide - Repeated-measures one-way ANOVA or mixed effects model [WWW Document], 2020. URL https://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/how_repeated-measures_anova_works.htm (accessed 9.20.20).

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=43366#null

http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-239990

https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=423869

https://www.rhs.org.uk/advice/profile?PID=783

https://op.europa.eu/el/web/eu-vocabularies/th-concept/-/resource/eurovoc/1285/lang-el