



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



## **Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη,  
Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών  
προϊόντων

### **Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία** **Πρωτεολυτικά ένζυμα με έμφαση στην Αισθητική** **Κοσμητολογία**

της

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΠΑΣΤΡΑ**

A.M. 202111

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του Μεταπτυχιακού  
Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών  
του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**Επιβλέπουσα: ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΠΑ**

Ομότιμη καθηγήτρια του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, στη Σχολή  
Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

ΑΘΗΝΑ, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES



## **Master of Science in**

**Advanced Aesthetics and Cosmetic Science: Development-  
Quality Control and Safety of new cosmetic products**

## **Master Thesis**

**Proteolytic enzymes with emphasis on Aesthetic Cosmetology**

by

**AIKATERINI PASTRA**

Registration Number of Student in the Program: 202111

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the Master's Degree in the  
Department of Biomedical Sciences of the University of West Attica

**Supervisor: EVANGELIA PROTOPAPA**

Emeritus Professor of the Department of Biomedical Sciences, School of Health and  
Welfare Sciences, University of West Attica

ATHENS, 2023



## Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιητικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων

### Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

A/A	ΟΝΟΜΑ-ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ-ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1.	Ευαγγελία Πρωτόπαπα	Ομότιμη Καθηγήτρια/ Επιβλέπουσα	
2.	Αθανασία Βαρβαρέσου	Καθηγήτρια/ Υπεύθυνη Μ.Π.Σ	
3.	Μαρία Τράπαλη	Μέλος επιτροπής/ Λέκτορας	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **ΠΑΣΤΡΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ** του **ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ**, με αριθμό μητρώου **202111** φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων» του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».



**Ευαγγέλια Πρωτόπαπα**  
Ομότιμη καθηγήτρια

Η Δηλούσα

**Πάστρα Κατερίνα**

Πνευματική ιδιοκτησία © 2023 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2023 University of West Attica

All rights reserved



# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

## Πρωτεολυτικά ένζυμα με έμφαση στην Αισθητική Κοσμητολογία.

ΠΑΣΤΡΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 2023

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι τύποι υδρολυτικών ενζύμων και η βασική τους δράση είναι η πρωτεόλυση των κυτταρικών πρωτεϊνών, *in vivo* καταλύουν την υδρόλυση ενός πεπτιδικού δεσμού και *in vitro* την υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού. Διαθέτουν την ικανότητα να πραγματοποιούν επιλεκτική τροποποίηση των πρωτεϊνών με διάσπαση συγκεκριμένου δεσμού ή απεριόριστη πρωτεόλυση με μετατροπή μιας πρωτεΐνης στα αμινοξέα που την αποτελούν. Αυτό το γεγονός τα καθιστά εξαιρετικά χρήσιμα στην παγκόσμια βιομηχανία, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη βιοτεχνολογία, δεδομένου ότι η πρωτεολυτική τους δράση αλλάζει τις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Ωστόσο, η χρήση των πρωτεασών στα καλλυντικά είναι λιγότερη και σχετικά πρόσφατη, λόγω της ανεπάρκειας σταθερότητας των ενζύμων στο προϊόν, του ελέγχου της αποτελεσματικότητας, των μελετών ασφάλειας και της περιορισμένης διείσδυσης τους στο δέρμα λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους τους. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση από εμπειριστατωμένες μελέτες και διερευνήθηκε η δράση, η εφαρμογή και η διατήρηση της δραστηριότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων στα κοσμητολογικά σκευάσματα καθώς και ο τρόπος χρήσης και η ιστολογική τους αξιολόγηση μέσα από μια σειρά πειραμάτων στην ενζυμική αποτρίχωση. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η παρουσίαση και η ανάλυση διάφορων μεθόδων ακινητοποίησης και σταθεροποίησης των πρωτεασών στις καλλυντικές συνθέσεις και η σημασία χρήσης τους κυρίως ως ενεργά συστατικά και ως ενισχυτές διείσδυσης βασισμένα σε νανοδομημένους φορείς για βέλτιστο αποτέλεσμα.

**Λέξεις Κλειδιά:** πρωτεάσες, πρωτεολυτικά ένζυμα, καλλυντικά, απολέπιση, ενζυμική αποτρίχωση, παπαΐνη, ακινητοποίηση, νανοφορείς.

# ABSTRACT

## Proteolytic enzymes with emphasis on Aesthetic Cosmetology.

**AIKATERINI PASTRA**

Department of Biomedical Sciences

University of West Attica, 2023

Proteolytic enzymes are types of hydrolytic enzymes and their main activity is the proteolysis of cellular proteins, in vivo they catalyze the hydrolysis of a peptide bond and in vitro the hydrolysis of an ester bond. They have the ability to carry out selective modification of proteins by cleavage of a specific bond or unlimited proteolysis by converting a protein into its constituent amino acids. This fact makes them extremely useful in global industry, playing an important role in biotechnology, since their proteolytic action changes the chemical, physical and biological properties of proteins. However, the use of proteases in cosmetics is scarce and relatively recent, due to insufficient enzyme stability in the product, effectiveness control, safety studies and their limited skin penetration due to their high molecular weight. In this Diplomatic Thesis, a bibliographic review was carried out from in-depth studies and the action, application and maintenance of the activity of proteolytic enzymes in cosmetology preparations as well as the way of use as well as their histological evaluation through a series of experiments in enzymatic hair removal were investigated. The purpose of this work is the presentation and analysis of various methods of immobilization and stabilization of proteases in cosmetic compositions and the importance of using them mainly as active ingredients and as penetration enhancers based on nanostructured carriers for optimal results.

**Keywords:** proteases, proteolytic enzymes, cosmetics, exfoliation, enzymatic depilation, papain, immobilization, nanocarriers.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αποτελεί την ολοκλήρωση ενός στόχου και οφείλεται στην πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη σημαντικών προσώπων.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα μου, κ. Πρωτόπαπα Ευαγγελία, για την συνεχή καθοδήγηση της, για τις πολύτιμες συμβουλές και την υλικότεχνική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής, αλλά κυρίως για το άριστο κλίμα συνεργασίας που διαμόρφωσε, συμβάλλοντας τα μέγιστα στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπεύθυνη καθηγήτρια του μεταπτυχιακού, κ. Βαρβαρέσου Αθανασία για την συμπαράσταση και την άμεση ανταπόκριση της, όταν χρειάστηκα την βοήθειά της.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο «ευχαριστώ» θα ήθελα να μεταφέρω και στην οικογένειά μου, για την ηθική υποστήριξη και κατανόηση τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



# Βιβλιογραφικό CV

## ΠΑΣΤΡΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

### Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών

Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων

Τίτλος: Πρωτεολυτικά ένζυμα με έμφαση στην Αισθητική Κοσμητολογία

Επιστημονικό Πεδίο: Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία

Βιογραφικά Στοιχεία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης

Οικογενειακή κατάσταση: Ελεύθερη

Εκπαίδευση: Πτυχίο του τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας, Τ.Ε.Ι. Αθήνας  
(2006)

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων» στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, ΜΑΡΤΙΟΣ, 2023.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: **ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΠΑ**



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	viii
ABSTRACT.....	ix
Ευχαριστίες.....	x
ΒιβλιογραφικόCV .....	xi
Περιεχόμενα.....	xii
Κατάλογος Πινάκων.....	xiii
Κατάλογος Εικόνων.....	xiii
Συντομογραφίες.....	xiv
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Ένζυμα</b>	
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Χαρακτηριστικά των ενζύμων.....	2
1.3 Κατηγορίες - Ονοματολογία ενζύμων.....	6
1.4 Μηχανισμός δράσης ενζύμων.....	9
1.5 Παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων.....	11
1.6 Ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου.....	14
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Πρωτεολυτικά ένζυμα</b>	
2.1 Εισαγωγή.....	16
2.1.1 Πρωτεόλυση.....	18
2.1.2 Εξειδίκευση πρωτεασών.....	20
2.2 Πηγές πρωτεασών.....	21
2.2.1 Πρωτεάσες από μικρόβια.....	22
2.2.2 Πρωτεάσες από φυτά.....	24
2.2.3 Πρωτεάσες από ζώα.....	25
2.3 Τύποι πρωτεασών.....	26
2.3.1 Εξωπεπτιδάσες.....	27
2.3.2 Ενδοπεπτιδάσες.....	28
2.4 Πρωτεολυτικά ένζυμα παγκρέατος - Φυσιολογικές λειτουργίες.....	31
2.5 Βασικά πρωτεολυτικά ένζυμα.....	34
2.5.1 Θρυψίνη.....	34
2.5.2 Χυμοθρυψίνη.....	36
2.5.3 Παπαΐνη.....	38

2.5.4 Βρωμελίνη.....	43
2.5.5 Κερατινάσες.....	46
2.6 Βιομηχανικές εφαρμογές πρωτεασών.....	52

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Πρωτεάσες και απολέπιση

3.1 Πρωτεασες και δέρμα.....	56
3.2 Καθαρισμός πληγών.....	59
3.3 Διαδικασία απολέπισης στην επιδερμίδα.....	61
3.4 Τα πρωτεολυτικά ένζυμα στην απολεπιστική διαδικασία.....	64

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Νανοκαλλυντικά και νανοϋλικά

4.1 Έννοια του καλλυντικού.....	70
4.2 Εισαγωγή στην Νανοτεχνολογία.....	72
4.3 Νανοςωματίδια στα καλλυντικά.....	74
4.3.1 Οργανικά.....	75
4.3.2. Ανόργανα.....	82
4.4 Ο ρόλος των νανοςωματιδίων σε σχέση με τον δερματικό φραγμό.....	86
4.4.1. Ιδιότητες φραγμού του δέρματος.....	86
4.4.2. Διείσδυση νανοςωματιδίων κατά μήκος του δερματικού φραγμού..	88
4.5 Εφαρμογή των νανοςωματιδίων στα καλλυντικά.....	89
4.6 Τοξικολογική επίδραση των καλλυντικών νανοςωματιδίων στο δέρμα.....	92
4.6.1 Κίνδυνοι για την υγεία που σχετίζονται με τα νανοκαλλυντικά.....	92
4.6.2 Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι από νανοςωματίδια.....	94
4.7 Νομοθετικό πλαίσιο των νανοςωματιδίων στην Κοσμητολογία.....	95
4.7.1 Κανονιστικές Οδηγίες Καλλυντικών.....	96
4.7.2 Πρόσφατες εξελίξεις στον κανονισμό για τα νανοπροϊόντα.....	97

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Πρωτεολυτικά ένζυμα στα καλλυντικά βασισμένα στην νατοτεχνολογία

5.1 Ενσωμάτωση πρωτεασών σε σκευάσματα περιποίησης δέρματος.....	99
5.2 Τρόποι βελτίωσης διαπερατότητας των πρωτεασών στο δέρμα.....	101
5.2.1 Ενισχυτικά διείσδυσης.....	103
5.2.2 Νανοσυστήματα χορήγησης.....	106
5.2.3 Δραστικές ουσίες.....	111

5.3 Ακίνητοποίηση πρωτεασών.....	113
5.3.1 Νανοδιαμόρφωση ενζύμων.....	118
5.3.2 Διάφορα υποστηρίγματα για την ακίνητοποίηση των ενζύμων.....	119
5.4 Ενζυμική τροποποίηση βιοδραστικών ενώσεων για καλλυντική εφαρμογή	124
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Ενζυμική αποτρίχωση</b>	
6.1 Βασικά στοιχεία της Τρίχας.....	126
6.1.1 Ανατομία και Ιστολογία Τρίχας.....	129
6.1.2 Χημική σύσταση των τριχών.....	130
6.1.3 Δομή θυλάκου τρίχας.....	132
6.1.4 Αναγεννητικά - Αρχέγονα κύτταρα τρίχας.....	135
6.2 Διαδερμική απορρόφηση.....	136
6.2.1 Οδοί διέλευσης ουσιών στο δέρμα.....	136
6.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση.....	138
6.3 Διαδικασία εφαρμογής ενζυμικής αποτρίχωσης.....	139
6.3.1 Ιοντοφόρηση.....	139
6.3.2 Στάδια εφαρμογής ενζυμικής αποτρίχωσης.....	142
6.3.3 Δράση ενζύμων.....	144
6.3.4 Ενδείξεις – Αντενδείξεις.....	146
6.4 Μελέτες δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων στην αποτρίχωση.....	147
6.4.1 Πειραματικές μελέτες στο δέρμα πειραματόζωων.....	148
6.4.2 Πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα.....	154
6.4.3 Νεότερες μελέτες.....	157
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	165

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες ενζύμων. (4) .....	8
Πίνακας 6.1 Αντιδράσεις ανάλογα με την πολικότητα του δέρματος (126) .....	141
Πίνακας 6.2 Φυσιολογικό δέρμα και επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7,6 και pH 5.2 (126) .....	149
Πίνακας 6.3 In vivo δράση χυμοθρυψίνης και παπαΐνης (126) .....	151
Πίνακας 6.4 In vivo δράση χυμοθρυψίνης – παπαΐνης και η διαδοχική δράση τους. (126) .....	153
Πίνακας 6.5 Ιοντοφόρηση χυμοθρυψίνης και παπαΐνης 1mg/ml για 4' διαδοχικής και μη δράσης 3 ημερών. (126) .....	155

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1 Γενική αντίδραση υδρόλυσης πεπτιδικού δεσμού από πρωτεολυτικό ένζυμο (A) και υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού (B). (Προσαρμογή από <a href="https://docplayer.gr/12478551-Bioxhmeia-tomos-i-panepisthmiakes-ekdoseis-kphths.html">https://docplayer.gr/12478551-Bioxhmeia-tomos-i-panepisthmiakes-ekdoseis-kphths.html</a> ) .....	19
Εικόνα 6.1 Ιστολογική εικόνα δέρματος αμέσως μετά την λήψη με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης x250 (Αριστερά) και μετά την λήψη με PAS x250 (Δεξιά). (126) .....	149
Εικόνα 6.2 Ιστολογική εικόνα δέρματος in vitro επίδραση θρυψίνης μετά από 60', x 250 με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Αριστερά) και με χρώση PAS (Δεξιά) .....	150
Εικόνα 6.3 Διαδοχική επίδραση παπαΐνης – χυμοθρυψίνης 1mg/ml, 2' αιματοξυλίνη - ιωσίνη x 250. (126) .....	152
Εικόνα 6.4 Control από δέρμα ποντικού όπου έχει επαλειφθεί με λιποσώματα για 3 ημέρες, x250. Τα αναγεννητικά κύτταρα έχουν χρωματισθεί μπλε από τη β-γαλακτοζιτάση και βρίσκονται στο σημείο Bulge. (126) .....	154
Εικόνα 6.5 Αποτελέσματα εισχώρησης χυμοθρυψίνης και παπαΐνης με ιοντοφόρηση x400 από δύο διαφορετικά σημεία. (126) .....	156

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η χρήση των εικόνων έχει πραγματοποιηθεί μετά από άδεια της δημιουργού, καθηγήτριας Πρωτόπαπα Ευαγγελίας.

## Κατάλογος Συντομογραφιών

	ΑΓΓΛΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΡΟΛΟΓΙΑ
<b>FAD</b>	Flavin Adenine Dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο αδενίνης της φλαβίνης
<b>FMN</b>	Flavin Mononucleotide	Μονονουκλεοτίδιο Φλαβίνης
<b>NAD</b>	Nicotinamide Adenine	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
<b>NADP</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
<b>NADH</b>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) + Hydrogen (H)	Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης + Υδρογόνο
<b>IUB</b>	International Union Biochemistry	Διεθνής Ένωση Βιοχημείας
<b>EC</b>	Enzyme Commision	Επιτροπή Ενζύμων (αριθμός)
<b>ES</b>	Enzyme/Substrate complex	Σύμπλοκο ενζύμου/υποστρώματος
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>GRAS</b>	Genetically recognized as safe	Γενετικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή
<b>HIV-1</b>	Human Immunodeficiency Virus type 1	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1
<b>Asp</b>	Aspartate	Ασπαραγινικό οξύ
<b>His</b>	Histidine	Ιστιδίνη
<b>Ser</b>	Serine	Σερίνη
<b>Aps</b>	Aspartate proteases	Ασπαρατικές πρωτεάσες
<b>Cys</b>	Cysteine	Κυστεΐνη
<b>Glu</b>	Glutamate	Γλουταμινικό οξύ
<b>EDTA</b>	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>CTFA</b>	Cert Certified Trust and Fiduciary Advisor	Διεθνές Λεξικό Καλλυντικών Συστατικών
<b>FBM</b>	Fruit Bromelain	Βρωμελίνη Φρούτων
<b>SBM</b>	Stem Bromelain	Βρωμελίνη Στελέχους
<b>KFAPs</b>	Keratin-Associated	Proteins Νημάτια Κερατίνης
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	Διθειοθρεϊτόλη
<b>SC</b>	Stratum Corneum	Κεράτινη στοιβάδα
<b>SG</b>	Stratum Granulosum	Κοκκιώδης στιβάδα
<b>SCCE</b>	Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme	Χυμοτρυπτικό ένζυμο της κεράτινη στοιβάδας
<b>SCTE</b>	Stratum Corneum Tryptic Enzyme	Τρυπτικό ένζυμο της κεράτινης στοιβάδας
<b>KLK</b>	Kallikreins	Καλλικρεΐνες
<b>MT-SP1</b>	Membrane type serine protease 1	Πρωτεάση σερίνης τύπου μεμβράνης 1

<b>TPT</b>	Topical Protease Therapy	Τοπικής Θεραπεία Πρωτεάσης
<b>ECM</b>	Extracellular Matrix	Εξωκυτταρική Μήτρα
<b>CCO</b>	Clostridial Collagenase Ointment	Αλοιφή Κολλαγενάσης Clostridial
<b>CSO</b>	Santyl Collagenase Ointment	Αλοιφή Κολλαγενάσης Santyl
<b>SB</b>	Basement Membrane	Βασική Μεμβράνη
<b>CE</b>	Keratinized Casing	Κερατινοποιημένο Περιβλήμα
<b>LBs</b>	Leafy Bodies	Φυλλώδη Σώματα
<b>CPLD</b>	Cathepsin D-type enzyme	Ενζύμο τύπου καθεψίνης D
<b>TCA</b>	Trichloroacetic Acid	Τριχλωροξικό Οξύ
<b>TEM</b>	Light and Transmission Electron Microscope	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Φωτός και Μετάδοσης
<b>USAFD</b>	US Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
<b>EUCD</b>	European Union Copyright Directive	Οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα πνευματικά δικαιώματα
<b>NPs</b>	Nanoparticles	Νανοσωματίδια
<b>MLVs</b>	Multilamellar Vesicles	Πολυστρωματικά Κυστίδια
<b>SLNs</b>	Solid Lipid Nanoparticles	Στερεά Λιπιδικά Νανοσωματίδια
<b>NLCs</b>	Nanostructured Lipid Carriers	Νανοδομημένοι Φορείς Λιπιδίων
<b>SUVs</b>	Small Unilamellar Vesicles	Μικρά Μονοστρωματικά Κυστίδια
<b>LUVs</b>	Large Unilamellar Vesicles	Μεγάλα Μονοστρωματικά Κυστίδια
<b>TDDS</b>	Transdermal Drug Delivery System	Σύστημα διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων
<b>PLA</b>	Polylactic Acid	Πολυγαλακτικό Οξύ
<b>PLGA</b>	Polylactic-co-Glycolic Acid	Πολυγαλακτικό-συν-Γλυκολικό Οξύ
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Titanium dioxide	Διοξείδιο του Τιτανίου
<b>ZnO</b>	zinc oxide	Οξείδιο του Ψευδάργυρου
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer	Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο
<b>SS</b>	stratum spinous	ακανθώδη στιβάδα
<b>NIOHS</b>	National Institute for Occupational Health and Safety	Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Ασφάλειας στην Εργασία
<b>ICCR</b>	International Cooperation Cosmetics Regulation	Κανονισμός Διεθνούς Συνεργασίας για τα Καλλυντικά
<b>SCCS</b>	Scientific Committee for Consumer Safety	Επιστημονική Επιτροπή για την Ασφάλεια των Καταναλωτών
<b>TEWL</b>	Transepidermal Water Loss	Διαεπιδερμική Απώλεια Νερού
<b>SPEs</b>	Skin Penetration Enhancers	Ενισχυτές Διείσδυσης Δέρματος
<b>SOD</b>	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική Δισμουτάση

<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate	Ισοθειοκυανική Φλουορεσκεΐνη
<b>APr</b>	Alkaline Protease	Αλκαλικής Πρωτεάσης
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine	Φωσφατιδυλοχολίνη
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol	Πολυαιθυλενογλυκόλη
<b>RSM</b>	Response Surface Methodology	Μεθοδολογία Επιφάνειας Απόκρισης
<b>PEL</b>	Papain Elastic Liposomes	Ελαστικά Λιποσώματα Παπαΐνης
<b>GNN</b>	Non-elastic Niosomes	Μη ελαστικά Νιοσώματα
<b>GEN</b>	Elastic Niosomes	Ελαστικά Νιοσώματα
<b>HLB</b>	Hydrophilic-Lipophilic Balance	Υδρόφιλη-Λιπόφιλη Ισορροπία
<b>PG</b>	Propylene Glycol	Προπυλενογλυκόλη
<b>TAS</b>	Therapeutically Active Substances	Θεραπευτικά Δραστικές Ουσίες
<b>MNPs</b>	Magnetic Nanoparticles	Μαγνητικά Νανοσωματίδια
<b>CMC</b>	Carboxymethylcellulose	Καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη
<b>PVA</b>	Polyvinyl Alcohol	Πολυβινυλική Αλκοόλη
<b>NC</b>	Νανοφορείς	Nanocarriers
<b>ANC</b>	Amorphous Nanocarrier	Άμορφος Νανοφορέας
<b>CNC</b>	Crystalline Nanocarrier	Κρυσταλλικός Νανοφορέας
<b>BNC</b>	Bacterial Nanocellulose	Βακτηριακή Νανοκυτταρίνη
<b>ORS</b>	Outer Root Sheath	Εξωτερικό Περίβλημα Ρίζας
<b>Dsg3</b>	Δεσμογλεΐνη 3	Desmoglein 3
<b>PAS</b>	Periodic Acid-Schiff	Υπεριωδικού οξέος- Schiff
<b>H.P.V.</b>	Human papilloma virus	Ιός του ανθρώπινου θηλώματος



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ENZYMA

### 1.1 Εισαγωγή

Το κύτταρο είναι η δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής, το οποίο αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο των ζωντανών συστημάτων. Είναι η περιοχή της τεράστιας βιοχημικής δραστηριότητας, μιας διαδικασίας χημικής και φυσικής αλλαγής που ονομάζεται μεταβολισμός και συνεχίζεται διαρκώς στον ζωντανό οργανισμό. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με τη συσσώρευση νέου ιστού και την αντικατάσταση παλαιού, τη μετατροπή της τροφής σε ενέργεια, την απόρριψη άχρηστων υλικών, την αναπαραγωγή και πάρα πολλές ακόμη, όλες τις δραστηριότητες που χαρακτηρίζουμε ως «ζωή». (1)

Τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν αποτελεσματικά βιοκαταλύτες, γνωστούς ως ένζυμα, οι οποίοι έχουν εξαιρετική καταλυτική απόδοση και υψηλό επίπεδο εξειδίκευσης τόσο στο υπόστρωμα όσο και στην αντίδραση που τα καθιστά κατάλληλα για βιολογικές αντιδράσεις. Είναι ζωτικής σημασίας για τον κυτταρικό μεταβολισμό, αφού κάθε χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα προχωρά με ποσοτικοποιήσιμο ρυθμό ως άμεσο αποτέλεσμα της ενζυμικής κατάλυσης. Το μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της βιοχημείας σχετίζεται άμεσα ή έμμεσα με την ιστορία της έρευνας των ενζύμων. (2)

Η μελέτη των ενζύμων αποτελεί αντικείμενο με ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ο κλάδος που ασχολείται με αυτήν, η Ενζυμολογία, έχει κυρίως αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Οι διεργασίες των ενζύμων ήταν γνωστές από τους αρχαίους χρόνους, αφού τις χρησιμοποιούσαν, χωρίς βέβαια να γνωρίζουν την ύπαρξή τους, στις παρασκευές τυριού, κρασιού, ξυδιού, ψωμιού κ.λπ. Ο όρος ένζυμο προτάθηκε από τον Kühne, το 1878, για να διευκρινίσει ότι εντός της ζύμης (εν ζύμη) βρίσκονται οι ενώσεις που διαθέτουν την καταλυτική ικανότητα να προκαλούν ζύμωση και δεν είναι η ζύμη καθ' αυτή υπεύθυνη για τη συγκεκριμένη δράση. (3)

Όλα τα ένζυμα που έχουν έως τώρα απομονωθεί σε καθαρή μορφή, έχει αποδειχθεί ότι είναι πρωτεΐνες, αλλά και τα μη απομονωμένα ένζυμα διαθέτουν χαρακτηριστικές ιδιότητες πρωτεϊνών π.χ. θερμοευαισθησία. Η γενικά αποδεκτή άποψη είναι ότι η

δράση ενός ενζύμου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρωτεϊνική φύση, αν και τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί μόρια τα οποία δεν είναι πρωτεϊνικά, αλλά καταλυτικά RNA και ονομάζονται ριβοένζυμα. Τα μόρια αυτά έχουν τριτοταγή δομή που μοιάζει με εκείνη των πρωτεϊνικών ενζύμων, μπορούν να υδρολύουν ή να αποκαθιστούν φωσφοεστερικούς δεσμούς σε άλλα μόρια RNA ή στον εαυτό τους. Σε σύγκριση με τους υπόλοιπους καταλύτες, τα ένζυμα υπερτερούν λόγω της μεγαλύτερης δραστικότητάς τους, αφού έχουν την ικανότητα να επιταχύνουν τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν πολύ περισσότερο από τους άλλους καταλύτες και λόγω της υψηλότερης εξειδίκευσής τους ως προς το υπόστρωμα. (3)

Στο κύτταρο, τα ένζυμα βρίσκονται κατανεμημένα σε διάφορα κυτταρικά κλάσματα ανάλογα με το βιολογικό τους ρόλο. Η σύγκριση των ενζύμων στα διάφορα όργανα ή στο ίδιο όργανο, στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και στα διάφορα είδη, οδηγεί σε σημαντικές παρατηρήσεις. Από τη μια παρουσιάζουν αδιαμφισβήτητες διαφορές στο μεταβολισμό, στη χημική σύσταση και δομή ανάμεσα στους διαφορετικούς ιστούς και στα διάφορα είδη, όπου όλες αντικατοπτρίζονται στα ένζυμα. Ενώ από την άλλη εμφανίζουν αξιοσημείωτες ομοιότητες, συγκριτικά με τα κύτταρα από πολύ διαφορετικά είδη. (4)

Αυτά και πολλά άλλα στοιχεία οδηγούν στην υπόθεση, ότι τα ένζυμα έπαιξαν τον πιο σημαντικό ρόλο στην εξελικτική πορεία, που οδήγησε στο σχηματισμό της ζωής στη γη μέχρι τις σημερινές μορφές ζωής. Από όλες τις χημικές διεργασίες που γίνονται μέσα σε ένα ζωντανό κύτταρο, ελάχιστες είναι εκείνες που δεν εξαρτώνται από τη δράση των ενζύμων. Η πρωταρχική σημασία των ενζύμων είναι η σχέση τους με τη ζωή, αφού δεν μπορεί να υπάρξει οποιαδήποτε μορφή ζωής χωρίς αυτά. (4)

## **1.2 Χαρακτηριστικά των ενζύμων**

Όπως αναφέρθηκε οι φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών είναι αποτέλεσμα χημικών αντιδράσεων. Τα κύτταρα συνθέτουν μέσω χημικών αντιδράσεων τα περισσότερα χημικά μόρια που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία τους και στην πλειοψηφία αυτών των αντιδράσεων εμπλέκονται ένζυμα. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα ονομάζονται ενζυμικές αντιδράσεις και συμμετέχουν τρεις παράγοντες: το ένζυμο, το αντιδρών, το οποίο αναφέρεται ως υπόστρωμα και είναι η ουσία που υφίσταται την καταλυτική επίδραση του ενζύμου και το προϊόν της

αντίδρασης. (3) Το ένζυμο είναι ο καταλύτης, αποτελείται από το ενεργό κέντρο, τη θέση όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα και είναι συνήθως ένα πολύ μικρό τμήμα όλου του ενζύμου που αποτελείται από πολλά αμινοξέα, που βρίσκονται σε κάποια απόσταση μεταξύ τους στην πεπτιδική αλυσίδα και πλησιάζονται με την αναδίπλωση που προκύπτει από τη δευτερογενή και τριτοταγή δομή των ενζύμων. (2.4)

Στην κατάλυση μίας ενζυμικής αντίδρασης συμμετέχει μόνο το ενεργό κέντρο όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα και σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και εκεί εντοπίζεται η δραστικότητα του ενζύμου. Το ενεργό κέντρο είναι μία εσοχή στο ένζυμο που σχηματίζεται από τις αναδιπλώσεις της πεπτιδικής αλυσίδας, δηλαδή είναι αποτέλεσμα της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής του ενζύμου. Επιπλέον, όταν το ένζυμο έχει προσθετική ομάδα συνδέεται και αυτή στο ενεργό κέντρο. (7)

Τα ένζυμα έχουν όλα τα χαρακτηριστικά των καταλυτών, δηλαδή δεν αλλάζουν τη θέση της χημικής ισορροπίας και αυτό σημαίνει ότι δεν αυξάνουν την απόδοση σε προϊόν μίας αντίδρασης. Επιπλέον μία χημική αντίδραση που μόνη της δεν πραγματοποιείται, δεν θα πραγματοποιηθεί ούτε παρουσία ενζύμων και αυτό συμβαίνει επειδή μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης. Τα ένζυμα, καθώς και οι υπόλοιποι καταλύτες, δεν καταναλώνονται στις αντιδράσεις και η ποσότητά τους παραμένει σταθερή. Το ίδιο μόριο ενζύμου μπορεί να καταλύσει την ενζυμική μετατροπή χιλιάδων νέων μορίων υποστρώματος σε προϊόν. (3) Στις ενζυμικές αντιδράσεις σπανίως συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις που οδηγούν στον άχρηστο σχηματισμό παραπροϊόντων, συγκριτικά με τις μη καταλυόμενες. (1,3)

Τα ένζυμα μπορούν επίσης να χαρακτηριστούν ως διαλυτοί, κολλοειδείς και οργανικοί καταλύτες που παράγονται από ζωντανά κύτταρα και είναι ικανοί να δρουν ανεξάρτητα από αυτά. Ένα βασικό πλεονέκτημα τους είναι η ικανότητά να λειτουργούν συνεχώς ακόμη και μετά την απομάκρυνση ή τον διαχωρισμό τους από τα κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και μετά τον διαχωρισμό των κυττάρων από *in vivo* περιβάλλοντα, συνεχίζουν να λειτουργούν αποτελεσματικά και σε *in vitro* συνθήκες πιθανότατα παραμένουν σε ενεργή κατάσταση ακόμη και μετά την απομόνωσή τους. (2)

Ως καταλύτες, αυξάνουν την ταχύτητα μίας αντίδρασης, επιταχύνοντας την κατά ένα εκατομμύριο φορές ή περισσότερο, γι αυτό, στα βιολογικά συστήματα οι περισσότερες αντιδράσεις δεν γίνονται σε αντιληπτή ταχύτητα χωρίς την παρουσία ενζύμων. Ακόμη και μια απλή αντίδραση, όπως είναι η ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα,

καταλύεται από ένα ένζυμο, την ανθρακική ανυδράση. Η μεταφορά του CO<sub>2</sub> από τους ιστούς στο αίμα και στη συνέχεια στον κυψελιδικό αέρα χωρίς το ένζυμο αυτό δεν θα ήταν πλήρης. Στην πραγματικότητα, η ανθρακική ανυδράση είναι ένα από τα ταχύτερα ένζυμα που γνωρίζουμε. Κάθε μόριο ενζύμου μπορεί να ενυδατώνει 106 μόρια CO<sub>2</sub> ανά δευτερόλεπτο και η αντίδραση που καταλύεται είναι 107 φορές ταχύτερη από εκείνη που δεν καταλύεται. (5)

Τα ένζυμα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης ως προς την αντίδραση που καταλύουν, δηλαδή συνήθως καταλύουν μια μεμονωμένη χημική αντίδραση ή ένα σύνολο στενά συνδεδεμένων αντιδράσεων όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων. (1,3) Για παράδειγμα τα πρωτεολυτικά ένζυμα *in vivo* καταλύουν την πρωτεϊνόλυση, την υδρόλυση ενός πεπτιδικού δεσμού, αλλά τα περισσότερα από αυτά *in vitro* καταλύουν την υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού, που είναι μια διαφορετική αλλά σχετική αντίδραση. Τέτοιες αντιδράσεις παρακολουθούνται πιο εύκολα από ό,τι η πρωτεϊνόλυση και είναι χρήσιμες στην πειραματική έρευνα των ενζύμων αυτών. (5) Σπάνιες είναι οι περιπτώσεις ενζύμων που καταλύουν δύο διαφορετικές αντιδράσεις του ίδιου ή διαφορετικού υποστρώματος. Τέτοιο ένζυμο είναι η ισοκιτρική αφυδρογονάση που καταλύει την οξειδωση του ισοκιτρικού οξέος και την αποκαρβοξυλίωσή του όπως περιγράφεται στον κύκλο του Krebs. (3)

Επιπλέον τα ένζυμα εμφανίζουν εξειδίκευση και ως προς το υπόστρωμα, αν και υπάρχουν διάφοροι βαθμοί εξειδίκευσης, όπως απόλυτη εξειδίκευση έχουν ένζυμα που καταλύουν τη μετατροπή ενός και μόνο υποστρώματος. Το ένζυμο ουρίαση υδρολύει μόνο την ουρία και καμία άλλη ένωση, υψηλή εξειδίκευση έχουν ένζυμα που οξειδώνουν περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων και στερεοχημική εξειδίκευση έχουν αυτά που καταλύουν την αντίδραση ενός στερεοϊσομερούς. Η οξειδάση L-αμινοξέων οξειδώνει L-αμινοξέα και όχι αμινοξέα που έχουν D-διαμόρφωση, εξειδίκευση ως προς τον δεσμό έχουν ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση ενός είδους δεσμού. Πρόκειται για χαμηλή εξειδίκευση, καθώς υπόστρωμα αυτών των ενζύμων είναι πολλά μόρια τα οποία πρέπει να έχουν συγκεκριμένο είδος δεσμού. (3)

Για παράδειγμα τα πρωτεολυτικά ένζυμα, που είναι και το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας διαφέρουν σημαντικά στον βαθμό εξειδίκευσης που έχουν ως προς το υπόστρωμα. Η σουμπτιλίσίνη, η οποία βρέθηκε σε ορισμένα βακτήρια, θα διασπάσει χωρίς διάκριση οποιονδήποτε δεσμό δίνοντας λίγη σημασία στη φύση των

παρακείμενων πλευρικών αλυσίδων. Η θρυψίνη, ως ένζυμο της πέψης, είναι απολύτως εξειδικευμένη στο να καταλύει μόνο τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυτελικό άκρο των καταλοίπων της λυσίνης και της αργινίνης. Η θρομβίνη, ένα ένζυμο που συμμετέχει στην πήξη του αίματος, είναι περισσότερο εξειδικευμένη από τη θρυψίνη και καταλύει την υδρόλυση των δεσμών αργινίνης-γλυκίνης μόνο σε ειδικές αλληλουχίες πεπτιδίων. Η εξειδίκευση ενός ενζύμου οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου, ως αποτέλεσμα της πολύπλοκης τριδιάστατης δομής της ενζυμικής πρωτεΐνης (5)

Ορισμένα ένζυμα αποτελούνται μόνο από πολυπεπίδια και δεν περιέχουν άλλες χημικές ομάδες εκτός από υπολείμματα αμινοξέων (π.χ. η παγκρεατική ριβονουκλεάση), άλλα απαιτούν ένα συγκεκριμένο, θερμοσταθερό, χαμηλού μοριακού βάρους οργανικό μόριο, γνωστό ως συνένζυμο. Επιπλέον, ένας αριθμός ενζύμων απαιτεί τόσο ένα συνένζυμο όσο και ένα ή περισσότερα μεταλλικά ιόντα για δραστηριότητα. (2) Από άποψη δομής τα ένζυμα διακρίνονται στα απλά, τα οποία είναι καθαρή πρωτεΐνη και στα συζυγιακά, που αποτελούνται από πρωτεΐνη ενωμένη με μη πρωτεϊνικής φύσεως μόριο. Στα συζυγιακά ένζυμα το πρωτεϊνικό μέρος ονομάζεται αποένζυμο, το οποίο μόνο του δεν είναι λειτουργικό και μετουσιώνεται από τη θερμότητα, ενώ το μη πρωτεϊνικό μόριο ονομάζεται συμπαράγοντας. (3)

Ο συμπαράγοντας μπορεί να είναι οργανικό μόριο το οποίο ονομάζεται συνένζυμο (FAD, FMN, NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) και συνήθως σχετίζονται βιοσυνθετικά με τις βιταμίνες, Επιπλέον, ένα συνένζυμο μπορεί να θεωρηθεί ως συνυπόστρωμα, που υφίσταται χημικό μετασχηματισμό σε όλη τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης. Τα συνένζυμα θα μπορούσαν να ταξιδεύουν ενδοκυτταρικά μεταξύ των αποενζύμων αφού μεταφέρουν χημικές ομάδες, να ενσωματώνονται σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες και να είναι σταθερά υπό θέρμανση. (2) Επίσης μπορεί να είναι ανόργανο ιόν (Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> κ.ά.) που λειτουργεί ως ενεργοποιητής ενζύμων και είναι εξίσου σταθερά υπό θέρμανση όπως τα συνένζυμα. Τέλος, όταν ο συμπαράγοντας είναι συνδεδεμένος ομοιοπολικά στο ένζυμο, οπότε δεν μπορεί να απομακρυνθεί, ονομάζεται προσθετική ομάδα και είναι διαλυτή και θερμοσταθερή. Η λειτουργική μορφή του ενζύμου είναι το σύμπλοκο αποένζυμο-συμπαράγοντας και ονομάζεται ολοένζυμο. (3)

Τέλος, τα ένζυμα είναι μη τοξικά, βιοαποδομήσιμα και μπορούν να παραχθούν σε άφθονες ποσότητες από μικροοργανισμούς για βιομηχανικές εφαρμογές. Η επεξεργασία των ενζύμων σε υπερβολική θερμοκρασία ή ακραίο pH ή με επεξεργασία με άλλους παράγοντες μετουσίωσης, έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας. Οι δομικές διαμορφώσεις των ενζυμικών πρωτεϊνών είναι απαραίτητες για την καταλυτική τους δράση και ο βαθμός καταλυτικής δραστηριότητας εξαρτάται κυρίως από την ακεραιότητα της δομής του ενζύμου ως πρωτεΐνης. Ακόμη, για την καταλυτική δράση αρκούν μικρές ποσότητες ενός ενζύμου, όπου αυτή η ποσότητα ενζύμου είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τα υποστρώματά του. (2)

### **1.3 Κατηγορίες – Ονοματολογία ενζύμων**

Σύμφωνα με τη διαμόρφωση κάποιων γενικών αρχών ονοματολογίας, που καθιερώθηκαν διεθνώς, έστω και χωρίς να έχουν επισημοποιηθεί από κάποια διεθνή επιστημονική επιτροπή, το όνομα κάθε ενζύμου έπρεπε να περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικά με τη φύση της αντίδρασης που καταλύει, με την κατάληξη -άση, π.χ. ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις αφυδρογόνωσης ονομάστηκαν αφυδρογονάσες και με την εξειδίκευση του ενζύμου, ως προς το υπόστρωμα π.χ. το ένζυμο που καταλύει την αφυδρογόνωση του γαλακτικού οξέος ονομάστηκε γαλακτική αφυδρογονάση. (4)

Εξαίρεση στους κανόνες αυτούς έγινε μόνο για τα υδρολυτικά ένζυμα, όπου η φύση της αντίδρασης είναι πάντοτε ίδια, η υδρόλυση, αλλά και η εξειδίκευση πάρα πολλών ενζύμων ισχύει για τη φύση του δεσμού που υδρολύουν (π.χ. α-γλυκοζιτικός δεσμός) και όχι για συγκεκριμένο υπόστρωμα. Έτσι, για την ονομασία των υδρολυτικών ενζύμων αρκεί να προστεθεί η κατάληξη -άση είτε στο όνομα του υποστρώματος (π.χ. αμυλάση, λιπάση) είτε στο είδος του δεσμού που υδρολύεται (π.χ. β-γαλακτοζιδάση, α-γαλακτοζιδάση, εστεράση). Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η κατάληξη -ίνη που δηλώνει ένζυμα πέψης (π.χ. θρυψίνη, πεψίνη). (4)

Το 1961, η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας (IUB) υιοθέτησε επίσημα τους κανόνες συστηματικής κατάταξης και ονοματολογίας των ενζύμων, που καθορίστηκαν από τη Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων και συνεχίστηκε από τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας. (4) Η IUB δημιούργησε ένα σύστημα ταξινόμησης και

ταυτοποίησης, βασισμένο σε ένα αριθμητικό σύστημα όπου ταξινομεί τα ένζυμα σε ομάδες σύμφωνα με τους τύπους της αντίδρασης που καταλύονται και τη συστηματική ονομασία που περιγράφει τη χημική αντίδραση που εμπλέκεται. Βρίσκεται σε ευρεία χρήση και ο επίσημος κατάλογος των ταξινομημένων ενζύμων είναι στο ExplorEnz – The Enzyme Database (<http://www.enzyme-database.org>). (1)

Ο αριθμός EC (Enzyme Commission) είναι ένα αναγνωριστικό τεσσάρων συστατικών που ταξινομεί ένα ένζυμο σύμφωνα με την κλάση, την κατηγορία, την υποκατηγορία και το τελικό συστατικό είναι ένας σειριακός αριθμός εντός αυτής της υποκατηγορίας. (1) Ο πρώτος αριθμός υποδηλώνει την κύρια τάξη, ο δεύτερος τη φύση του δότη, ο τρίτος υποδηλώνει το δέκτη ή τη μεταφερόμενη ομάδα και ο τέταρτος αριθμός, υποδηλώνει το υπόστρωμα, αποτελώντας συγχρόνως και τον αύξοντα αριθμό του ενζύμου. (4)

Για παράδειγμα, το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ, κατά την αντίδραση  $\text{Πυροσταφυλικό οξύ} + \text{NADH} \rightleftharpoons \text{γαλακτικό οξύ} + \text{NAD}^+$  έχει τον κωδικό αριθμό EC 1.1.1.27.

1. Είναι οξειδοαναγωγή.

1.(1). Δρα σε =CH-OH (δότης H).

1.1.(1). Δέκτης του H είναι το  $\text{NAD}^+$ .

1.1.1.(27). Έχει σαν υπόστρωμα το γαλακτικό οξύ, που έχει αύξοντα αριθμό 27, στο σύνολο των υποστρωμάτων της αφυδρογονάσης (4)

Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς τα ένζυμα με βάση την αντίδραση που καταλύουν διακρίνονται σε έξι κύριες κατηγορίες (Πίνακας 1.1). Μια νέα τάξη EC δημιουργήθηκε τον Αύγουστο του 2018, οι Μετατοπάσες (Translocases EC7), όπου καταλύουν τη μετατόπιση ιόντων υδρογόνου, ανόργανων κατιόντων και ανιόντων, αμινοξέων, υδατανθράκων ή άλλων ενώσεων. (1)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
<b>EC 1.</b> <b>Οξειδοαναγωγάσες</b>	Μεταφορείς ηλεκτρονίων

<b>EC 3. Τρανσφεράσες</b>	Καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ομάδων
<b>EC 3. Υδρολάσες</b>	Καταλύουν την υδρόλυση δεσμών
<b>EC4. Λυάσες</b>	Καταλύουν την μη-υδρολυτική απόσπαση ή προσθήκη ομάδων από υποστρώματα, δημιουργώντας διπλό δεσμό στο προϊόν
<b>EC5. Ισομεράσες</b>	Καταλύουν ενδομοριακές διευθετήσεις – ισομερειώσεις
<b>EC 6. Λιγάσες</b>	Καταλύουν τη σύνθεση ποικίλων δεσμών, συζευγμένες με αντιδράσεις διάσπασης ενεργειακών μορίων ( ATP)

Πίνακας 1.1 Κατηγορίες ενζύμων. (4)

1. Οξειδοαναγωγάσες, ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση ή αναγωγή του υποστρώματος, δηλαδή καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου, οξυγόνου ή ηλεκτρονίων από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο υπόστρωμα που είναι ο δέκτης. Τα ένζυμα αυτά για να δράσουν απαιτούν την παρουσία ενός ή περισσότερων συμπαραγόντων (μέταλλο, συνένζυμο ή προσθετική ομάδα), οι οποίοι συμπεριφέρονται ως ενδιάμεσοι και μεταβατικοί δέκτες ηλεκτρονίων. (4.6)
2. Τρανσφεράσες, είναι μία μεγάλη ομάδα ενζύμων που καταλύουν έναν επίσης μεγάλο αριθμό αντιδράσεων του ενδιάμεσου μεταβολισμού, όπου μεταφέρεται μία χημική ομάδα (π.χ. ακετυλο-, αμινο- και φωσφορο-) από ένα μόριο σε ένα άλλο και στις οποίες είναι απαραίτητη η συμμετοχή ενός συμπαράγοντα μεταφοράς. (6)
3. Υδρολάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις υδρολυτικής διάσπασης ενός δεσμού με την προσθήκη των ιόντων νερού στα φορτία του υποστρώματος που ελευθερώνονται. Στις αντιδράσεις αυτές, που είναι εύκολα αντιστρεπτές, το μόριο του νερού είναι το δεύτερο υπόστρωμα που υφίσταται και αυτό διάσπαση. Τυπικά παραδείγματα αποτελούν οι υδρολάσες των λιπών και των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την κανονική λειτουργία του οργανισμού. Έτσι, ένα λίπος διασπάται σε γλυκερίδια (ακυλογλυκερόλες) και λιπαρά οξέα υπό την επίδραση μίας



λιπάσης. Μερικά από τα σωματικά ένζυμα που περιλαμβάνονται στις ομάδες αυτές είναι οι λιπάσες, πεπτιδάσες, πρωτεάσες, πηκτινάσες, αμυλάσες κ.ά. (3,6)

4. Λυάσες, ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις απομάκρυνσης μίας χημικής ομάδας ( $H_2O$ ,  $NH^{4+}$ ,  $CO_2$  κ.ά.) από ένα υπόστρωμα με την παράλληλη εμφάνιση ενός διπλού δεσμού ή την προσθήκη μίας χημικής ομάδας στο διπλό δεσμό του υποστρώματος. (6)
5. Ισομεράσες, ένζυμα που καταλύουν ενδομοριακή μετακίνηση ομάδων ώστε το προϊόν που θα σχηματιστεί να είναι ισομερές με το υπόστρωμα.
6. Συνθετάσες ή Λιγάσες, ένζυμα που καταλύουν την ένωση μορίων με σχηματισμό νέων δεσμών (A-C, C-S, C-N και C-C) σε αντιδράσεις με ταυτόχρονη διάσπαση ATP ή ανάλογων ουσιών. (3)

#### 1.4 Μηχανισμός δράσης ενζύμων

Ο μηχανισμός της δράσης του ενζύμου σχετίζεται με τη φύση της αλληλεπίδρασης του ενζυμικού υποστρώματος, η οποία ευθύνεται για την ειδικότητα της αντίδρασης των βιολογικών καταλυτών. Με απλά λόγια, ο μηχανισμός δράσης βασίζεται σε μια χημική αντίδραση, όπου το ένζυμο συνδέεται με το υπόστρωμα σχηματίζοντας τελικά ένα σύμπλεγμα ενζύμου-υποστρώματος, στην ενεργή ή καταλυτική θέση. Οι πλευρικές αλυσίδες υπολειμμάτων αμινοξέων στην καταλυτική θέση προσφέρουν ομάδες για σύνδεση με άλλες ομάδες του υποστρώματος και οι συμπαραγοντες βοηθούν την κατάλυση. (2)

Το υπόστρωμα σχηματίζει δεσμούς με τα υπολείμματα αμινοξέων στην περιοχή δέσμευσης υποστρώματος της ενεργού θέσης, προκαλώντας μια διαμορφωτική αντίδραση σε αυτή τη θέση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, το ένζυμο σχηματίζει ένα σύμπλοκο μεταβατικής κατάστασης και αφού τα προϊόντα της αντίδρασης αποκολληθούν, το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική του κατάσταση. Δύο διαφορετικά μοντέλα που υποβάλλονται για τον μηχανισμό δράσης του ενζύμου παρουσιάζονται παρακάτω. (2)

##### A. Μοντέλο προτύπου Fisher (Μοντέλο κλειδαριάς και κλειδιού)

Αυτό είναι ένα άκαμπτο μοντέλο της καταλυτικής θέσης, που πρότεινε ο Emil Fischer το 1894, όπου εξηγεί την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός υποστρώματος και ενός ενζύμου

με όρους αναλογίας κλειδαριάς και κλειδιού και η καταλυτική θέση θεωρείται ότι έχει προδιαμορφωθεί. (2) Διατύπωσε την υπόθεση ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα είχαν μεταξύ τους ορισμένη σχέση στερεοεξειδίκευσης. Η δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου συμβαίνει μόνο όταν το υπόστρωμα έχει την κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να ταιριάζει απόλυτα στη γεωμετρία του ενεργού κέντρου. Η σύνδεση υποστρώματος-ενζύμου γίνεται με την ανάπτυξη προσωρινών δεσμών, οι οποίοι εξασθενούν τους υφιστάμενους δεσμούς στο μόριο του υποστρώματος και τους καθιστούν ευκολότερα διασπώμενους. (5) Το μοντέλο δεν μπορεί να εξηγήσει αλλαγές στη δομή του ενζύμου παρουσία αλλοστερικών ρυθμιστών και το μειονέκτημα του είναι η ακαμψία της καταλυτικής θέσης. (2)

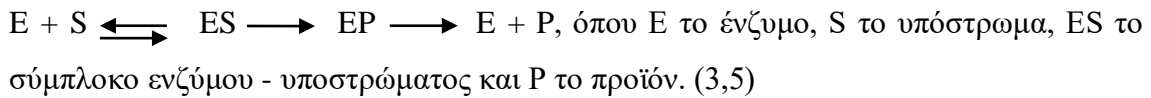
#### B. Μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής του D. Koshland

Αυτό το μοντέλο, σε αντίθεση με το προηγούμενο προτείνει μια ευέλικτη λειτουργία για την καταλυτική θέση. Ο Koshland το 1963 πρότεινε ένα μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής, στο οποίο το υπόστρωμα προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στην ενεργό θέση του ενζύμου ώστε το υπόστρωμα να ταιριάζει στην ενεργό θέση με τον πιο βολικό τρόπο για να προωθεί τη χημική αντίδραση. Αυτή η μέθοδος προτείνει ανταγωνιστική αναστολή, αλλοστερική διαμόρφωση και αδρανοποίηση των ενζύμων κατά τη μετουσίωση. (2)

Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί το ενεργό κέντρο να μεταβάλλει ελαφρά τη γεωμετρία του ώστε να ταιριάζει με το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα συγκρατείται στο ενεργό κέντρο μέσω αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα του ενζύμου που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενεργού κέντρου. Οι δυνάμεις αυτές είναι ίδιες με αυτές που σταθεροποιούν την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, δηλαδή ηλεκτροστατικές δυνάμεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου. (5)

Η θεωρία Michaelis-Menten της ενζυμικής δράσης προσφέρει τη βάση για τις περισσότερες τρέχουσες έρευνες σχετικά με τον μηχανισμό δράσης των ενζύμων. Το σύμπλοκο ενζυμικού υποστρώματος προϋποθέτει τον συνδυασμό του ενζύμου και του υποστρώματος στη φάση ένα (φάση μετάβασης) της ενζυμικής δραστηριότητας και της απελευθέρωσης του ενζύμου και των προϊόντων της κατάλυσης, στη φάση δύο. (2) Σύμφωνα λοιπόν με αυτή τη θεωρία το ένζυμο αντιδρά με το υπόστρωμα και σχηματίζουν το ενδιάμεσο σύμπλοκο ES. Το ES είτε θα ξαναδώσει E και S είτε θα σχηματίσει το ένζυμο και το προϊόν. Μετά τη δέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο,

ακολουθεί χημική μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν το οποίο απελευθερώνεται από το ενεργό κέντρο. Η διαδικασία περιγράφεται από την εξίσωση:



## 1.5 Παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα ενζυμικών αντιδράσεων

Η ενζυμική κινητική ορίζεται ως η μελέτη του ρυθμού των αντιδράσεων, δηλαδή, πώς η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης και περιλαμβάνει τη βελτιστοποίηση των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων για να επιτραπεί ο αποτελεσματικότερος σχεδιασμός των διάφορων διαδικασιών. Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος ή αυξάνεται η συγκέντρωση του προϊόντος (μεταβολή συγκέντρωσης στη μονάδα του χρόνου). (2)

Η γνώση της βασικής ενζυμικής κινητικής θεωρίας είναι σημαντική για την ανάλυση ενζύμων, ώστε να κατανοηθεί ο βασικός ενζυμικός μηχανισμός και να επιλεγθεί η κατάλληλη μέθοδος για την ενζυμική ανάλυση. Οι συνθήκες που επιλέγονται για τη μέτρηση της δραστηριότητας ενός ενζύμου δεν θα είναι οι ίδιες με εκείνες που επιλέγονται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος του. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τον ρυθμό με τον οποίο προχωρούν οι ενζυμικές αντιδράσεις, η συγκέντρωση ενζύμου, η συγκέντρωση υποστρώματος, η θερμοκρασία και το pH και η παρουσία οποιονδήποτε αναστολέων ή ενεργοποιητών. (2)

### Συγκέντρωση ενζύμου

Για να μελετηθεί η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του ενζύμου στον ρυθμό αντίδρασης, το υπόστρωμα πρέπει να υπάρχει σε περίσσεια ποσότητα. δηλαδή, η αντίδραση πρέπει να είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Οποιαδήποτε αλλαγή στην ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται σε μια καθορισμένη χρονική περίοδο θα εξαρτηθεί από το επίπεδο του ενζύμου που υπάρχει. (1) Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνει γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου. (3)

## **Συγκέντρωση υποστρώματος**

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι εάν η ποσότητα του ενζύμου διατηρηθεί σταθερή και η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξηθεί σταδιακά, η ταχύτητα της αντίδρασης θα αυξηθεί μέχρι να φτάσει στο μέγιστο. Θεωρείται ότι η μέγιστη ταχύτητα έχει επιτευχθεί, όταν όλο το διαθέσιμο ένζυμο έχει μετατραπεί στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Μετά από αυτό το σημείο, οι αυξήσεις στη συγκέντρωση του υποστρώματος δεν θα αυξήσουν την ταχύτητα. (1.3)

Αυτό συμβαίνει διότι, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος, τόσο περισσότερα μόρια του συνδέονται στα ενεργά κέντρα των μορίων του ενζύμου και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται. Όταν όλα τα μόρια του ενζύμου έχουν συνδεθεί με το υπόστρωμα η αντίδραση γίνεται με μέγιστη ταχύτητα (σημείο κορεσμού). Από το σημείο κορεσμού και μετά η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν οδηγεί σε επιπλέον αύξηση της ταχύτητας, διότι δεν υπάρχουν άλλα ελεύθερα μόρια ενζύμου για να συνδεθούν με τα επιπλέον μόρια υποστρώματος. (3)

## **Επίδραση θερμοκρασίας**

Όπως οι περισσότερες χημικές αντιδράσεις, ο ρυθμός μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένζυμα αυξάνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία. Μια αύξηση της θερμοκρασίας κατά δέκα βαθμούς Κελσίου θα αυξήσει τη δραστηριότητα των περισσότερων ενζύμων κατά 50 έως 100% και μικρές διακυμάνσεις 1 ή 2 βαθμών μπορεί να επιφέρουν αλλαγές από 10 έως 20% στα αποτελέσματα. (2) Στις ενζυμικές αντιδράσεις η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται μέχρι μία ορισμένη τιμή, επειδή η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι μία βέλτιστη θερμοκρασία. Λίγο πάνω από αυτή τη θερμοκρασία συμβαίνει αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου, οπότε μειώνεται η δραστηριότητα του και η ταχύτητα της αντίδρασης. Σε πολύ μεγαλύτερες θερμοκρασίες συμβαίνει μετουσίωση του ενζύμου, οπότε η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης μειώνεται δραστικά. Τα περισσότερα ένζυμα έχουν βέλτιστη θερμοκρασία 37°C. (3) Η αποθήκευση ενζύμων σε θερμοκρασία 5°C ή χαμηλότερη είναι γενικά η καταλληλότερη, επίσης ορισμένα ένζυμα χάνουν τη δραστηριότητά τους όταν καταψύχονται. (1)

## **Επίδραση pH**

Εφόσον τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, το pH επιδρά στη διαμόρφωσή τους και αποτελεί παράγοντα για τη σταθερότητα τους. Τα ένζυμα έχουν μέγιστη δραστηριότητα σε στενή περιοχή pH, αλλά το κάθε ένα έχει μέγιστη δραστηριότητα σε συγκεκριμένο pH που ονομάζεται βέλτιστο, στο οποίο η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι η μέγιστη. Όταν η τιμή του pH διαφέρει σημαντικά από τη βέλτιστη τιμή, η ταχύτητα της αντίδρασης μειώνεται δραματικά διότι συμβαίνει μετουσίωση του ενζύμου. (3) Η βέλτιστη τιμή pH ποικίλλει πολύ από το ένα ένζυμο στο άλλο, με αποτέλεσμα οι φυσικές (θερμοκρασία) και χημικές (pH) παράμετροι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να βελτιστοποιηθούν, προκειμένου μια ενζυμική αντίδραση να είναι ακριβής και αναπαραγώγιμη. (1)

## **Παρουσία αναστολέων ή ενεργοποιητών**

Σύμφωνα με αναφορές, παράγοντες που επηρεάζουν τις αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα επηρεάζουν επίσης και την ταχύτητα μιας αντίδρασης. Αυτοί οι παράγοντες ονομάζονται τροποποιητές των αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα και χωρίζονται στους ανόργανους τροποποιητές (ενεργοποιητές ενζύμων) και στους οργανικούς τροποποιητές (αναστολείς ενζύμων). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να έχουν διαφορετικούς τύπους επιδράσεων στην ταχύτητα της αντίδρασης. Ωστόσο, το πιο ζωτικό αποτέλεσμα είναι ότι προσφέρουν πολλές οδούς στα προϊόντα, π.χ. όταν ένας τροποποιητής συνδέεται με ένα ένζυμο, μεταβάλλει τον ρυθμό αντίδρασης και έτσι σχηματίζει δύο σταθερές ρυθμούς. (2)

## **1.6 Ρύθμιση δραστηριότητας ενζύμου**

Από τις άπειρες αντιδράσεις που μπορούν να γίνουν στη φύση, έχει επιλεγεί πεπερασμένος αριθμός για να φέρονται εις πέρας οι λειτουργίες του μεταβολισμού. Έτσι ελέγχεται και ρυθμίζεται ο μεταβολισμός με κατάλληλη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ενζύμων, με ρύθμιση της δραστηριότητας τους και με ενεργοποίηση-απενεργοποίηση των ενζύμων, ώστε να μετατρέπεται από ενεργή σε αδρανή μορφή και αντίστροφα, η οποία επιτυγχάνεται με τους παρακάτω τρόπους. (3)

### 1. Με αναστολείς στην ενζυμική δραστηριότητα.

Οι αναστολείς ενζύμου είναι ουσίες που μεταβάλλουν την καταλυτική δράση του ενζύμου με αποτέλεσμα να επιβραδύνουν ή σε ορισμένες περιπτώσεις να σταματούν την κατάλυση. Οι μηχανισμοί αναστολής βασίζονται στην ύπαρξη του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος και αναφέρονται τρεις τύποι αναστολής ενζύμων. Πρώτη είναι η ανταγωνιστική αναστολή που συμβαίνει όταν το υπόστρωμα και μια ουσία που μοιάζει με το υπόστρωμα προστίθενται στο ένζυμο. Δεύτερη είναι η μη ανταγωνιστική αναστολή που πραγματοποιείται όταν προστεθούν στο ένζυμο ουσίες που το αλλοιώνουν με τρόπο που δεν μπορεί πλέον να δεχτεί το υπόστρωμα και τελευταία η αναστολή του υποστρώματος θα συμβεί μερικές φορές όταν υπάρχουν υπερβολικές ποσότητες υποστρώματος. (1)

### 2. Με τροποποίηση της δομής του ενζύμου.

Η τροποποίηση της δομής του ενζύμου όπου επιτυγχάνεται με ομοιοπολική μεταβολή στη πρωτοταγή δομή που είναι συνήθως μη αμφίδρομη πορεία, υπάρχουν όμως και περιπτώσεις αμφίδρομες, στις ποίες, μπορεί να ενεργοποιείται και στη συνέχεια να απενεργοποιείται ένα ένζυμο, τέτοιες περιπτώσεις είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η αδενοσυλίωση, η ουριδυλίωση κ.α. Ένας ακόμη τρόπος διαμόρφωσης της δομής του ενζύμου είναι η αλλοστερική μεταβολή, κατά την οποία η δέσμευση ενός ρυθμιστή (αλλοστερικός αναστολέας ή αλλοστερικός ενεργοποιητής) στο ένζυμο επηρεάζει θετικά ή αρνητικά τη δέσμευση του υποστρώματος. (1) Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες με ένα ή περισσότερα ενεργά κέντρα η καθεμία και έχουν δύο θέσεις δέσμευσης, το ενεργό κέντρο που δεσμεύεται το υπόστρωμα και μία περιοχή στην οποία δεσμεύεται το μόριο ρυθμιστή. Όταν το μόριο ρυθμιστή συνδεθεί στο ένζυμο επάγει αλλαγές στη διαμόρφωσή του και στο ενεργό κέντρο με αποτέλεσμα να ευνοείται ή να αναστέλλεται η δέσμευση του υποστρώματος. (3)

### 3. Επιλεκτική πρωτεόλυση στη δημιουργία των καταλυτικών θέσεων των ενζύμων.

Διάφορα ένζυμα, κυρίως τα πρωτεολυτικά. ορμόνες και άλλες φυσιολογικά ενεργές πρωτεΐνες παράγονται ως ανενεργοί πρόδρομοι που ονομάζονται ζυμογόνα ή

προένζυμα και μετασχηματίζονται στην πορεία στην ενεργή μορφή τους με περιορισμένη πρωτεόλυση πεπτιδικών δεσμών. (2, 3) Το τελικό στάδιο για την ενεργοποίηση της ενζυμικής λειτουργίας είναι η περιορισμένη πρωτεόλυση, είτε σε ένα μόνο βήμα ενεργοποίησης είτε σε διαδοχικές σειρές (καταρράκτη). Η ειδικότητα κάθε αντίδρασης ενεργοποίησης αξιολογείται από τη συμπληρωματικότητα του υποστρώματος ζυμογόνου και της ενεργού θέσης της επιτιθέμενης πρωτεάσης. Η ενεργοποίηση του ζυμογόνου παράγει μια άμεση και μη αναστρέψιμη απόκριση σε ένα φυσιολογικό ερέθισμα που είναι ικανό να εκκινήσει νέες φυσιολογικές λειτουργίες. (2)

Κλασικά παραδείγματα είναι οι διαδικασίες παραγωγής ορμονών, ινωδόλυσης, ενεργοποίησης συμπληρώματος, πήξης αίματος, γονιμοποίησης και πέψης. Τα ζυμογόνα των παγκρεατικών πρωτεασών σερίνης, συγκεκριμένα, έχουν λειτουργήσει ως μοντέλα για λεπτομερείς μελέτες της φύσης των μοριακών αλλαγών που εμπλέκονται στην έντονη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας που έχει ως αποτέλεσμα την ατελή πρωτεόλυση του ζυμογόνου. (2)

#### 4. Με τα ισοένζυμα.

Είναι πρωτεΐνες με διαφορετική δομή, που καταλύουν την ίδια αντίδραση, με διαφορετική όμως ταχύτητα (χημική συγγένεια-τάση σύνδεσης μεταξύ υποστρώματος και ενζύμου). Όταν ένα ένζυμο έχει τεταρτοταγή δομή με ανόμοιες υπομονάδες, τότε από τους συνδυασμούς αυτών των υπομονάδων μπορούν να προκύψουν ένζυμα με ίδια εξειδίκευση, αλλά διαφορετική δραστηριότητα, τα “ισοένζυμα”. Πρέπει να τονισθεί ότι, αν διασπασθεί η τεταρτοταγής δομή, οι υπομονάδες ξεχωριστά είναι ανενεργές. (3)

#### 5. Με αλληλεπίδραση του ενζύμου με άλλη πρωτεΐνη.

Ενεργοποιείται ή αναστέλλεται όταν συνδεθεί με μια άλλη πρωτεΐνη. (3)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

#### 2.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεάσες, εναλλακτικά πρωτεολυτικά ένζυμα ή πρωτεϊνάσες, αναφέρονται σε μια ομάδα ενζύμων, τις υδρολάσες, των οποίων η καταλυτική λειτουργία τους είναι να διασπάσουν τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Βρίσκονται παντού στη φύση και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά τις εφαρμογές τους τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε εμπορικούς τομείς. Αυτά τα ένζυμα είναι ευρέως κατανεμημένα σχεδόν σε όλα τα φυτά, τα ζώα και τους μικροοργανισμούς. Παραδοσιακά θεωρούνται ως αποικοδομητικά ένζυμα που είναι ικανά να διασπούν πρωτεϊνούχα τρόφιμα, απελευθερώνοντας μικρά πεπτίδια και αμινοξέα που χρειάζεται ο οργανισμός. (8)

Οι πρωτεάσες βρίσκονται σε πολλούς ζωντανούς οργανισμούς, παρέχουν ζωτική φυσιολογική δραστηριότητα σε ένα πλήθος αντιδράσεων και εμπλέκονται σε πολλά συστήματα οργάνων. Οι δραστηριότητες των πρωτεασών στον άνθρωπο περιλαμβάνουν τη γαστρεντερική οδό (π.χ. πέψη πρωτεϊνών τροφής), αιματολογικά και ανοσολογικά συστήματα (πήξη αίματος, σύστημα συμπληρώματος, καταρράκτες απόπτωσης, ενεργοποίηση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου της καθελικιδίνης) και λειτουργία επιδερμικού φραγμού (δηλαδή, διαπερατότητα, απολέπιση). (9)

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς περίπου το 5% του γονιδιώματος παρέχει κωδικοποίηση για ένζυμα πρωτεόλυσης. Υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και τα σωματικά υγρά και ο γονότυπος των οργανισμών εκφράζεται στον φαινότυπο, δηλαδή στα φάσματα των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες διασπώνται πρωτεολυτικά για να παρέχουν τις πιο σημαντικές λειτουργίες των κυττάρων, των ιστών και του σώματος. Σύμφωνα με τη διεθνή βάση δεδομένων MEROPS, οι πεπτιδάσες και οι πρωτεάσες υποδιαιρούνται σε επτά οικογένειες με βάση τη φύση των καταλυτικών τους κέντρων: ασπαρτικό - τύπου A (1993), κυστεΐνη - τύπος C (1993), σερίνη - τύπος S (1993), μέταλλο - τύπος M (1993), θρεονίνη - τύπος T (1997), γλουταμίνη - τύπος G (2004), λυάσες ασπαραγίνης-πεπτιδίου (2010). (10)



Αυτά τα πρωτεολυτικά ένζυμα διασφαλίζουν τη συμμετοχή τους στον εντοπισμό, στη δραστηριότητα και στον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων πολλών πρωτεϊνών, στη δημιουργία νέων βιοδραστικών μορίων και στην επεξεργασία της κυτταρικής πληροφορίας ή ακυρώνοντας μοριακά σήματα. Ως άμεσο αποτέλεσμα αυτών των πολλαπλών δράσεων, οι πρωτεϊνάσες επηρεάζουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA, τη μορφογένεση και την αναδιαμόρφωση των ιστών. Επίσης λαμβάνουν μέρος σε διεργασίες όπως, το θερμικό σοκ, την αγγειογένεση και την νευρογένεση, την ωορρηξία, την γονιμοποίηση, την επούλωση πληγών, την κινητοποίηση βλαστοκυττάρων, την ανοσία, την αυτοφαγία, την γήρανση, την νέκρωση και την απόπτωση. (10)

Οι πρωτεάσες είναι ζωτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό και τη διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων, την περίοδο ανάπτυξης, την πέψη των πρωτεϊνών των τροφίμων, την κυτταρική διαίρεση, τους καταρράκτες που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος και την αιμόσταση, την επεξεργασία πολυπεπτιδικών ορμονών, τη μεταγωγή σήματος και στο κύκλο ζωής πολλών ασθενειών ή οργανισμών που προκαλούν μόλυνση. (11,12) Επίσης έχουν ευρείες εφαρμογές σε χημικές και βιοχημικές διεργασίες με κύρια πλεονεκτήματα χρήσης τη στερεοειδικότητα, την εξειδίκευση, τη βιοαποδομησιμότητα, τη δυνατότητα παραγωγής φυσικών προϊόντων και η δραστηριότητα υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης. (12)

Λόγω του ρόλου τους στον κύκλο ζωής πολλών ξενιστών και παθογόνων μικροοργανισμών έχουν μεγάλη ιατρική, φαρμακευτική και ακαδημαϊκή σημασία. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου το 2% των ανθρώπινων γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεολυτικά ένζυμα και λόγω της αναγκαιότητάς τους σε πολλές βιολογικές διεργασίες έχουν γίνει σημαντικοί θεραπευτικοί στόχοι. Επιπλέον μελετώνται οι σχέσεις δομής και λειτουργίας τους, οι αλληλεπιδράσεις τους με τα υποστρώματα και τους αναστολείς, ώστε να βελτιωθεί η θερμοσταθερότητα τους, η αποτελεσματικότητά τους και να αλλάξει η ειδικότητά τους με τη μηχανική πρωτεϊνών για βιομηχανικούς σκοπούς. (11)

Η μελέτη των πρωτεολυτικών ενζύμων δικαιολογείται σε μεγάλο βαθμό από τον βασικό τους ρόλο σε αρκετούς τομείς της βιομηχανίας και της βιοτεχνολογίας, όπου εφαρμόζονται εκτενώς. (11) Οι πρωτεάσες αποτελούν μια σημαντική ομάδα βιομηχανικών ενζύμων και αναφέρονται για σχεδόν το 60% της συνολικής αγοράς

ενζύμων και αντιπροσωπεύουν επίσης το 40% της συνολικής παγκόσμιας πώλησης ενζύμων. (12)

### **2.1.1 Πρωτεόλυση**

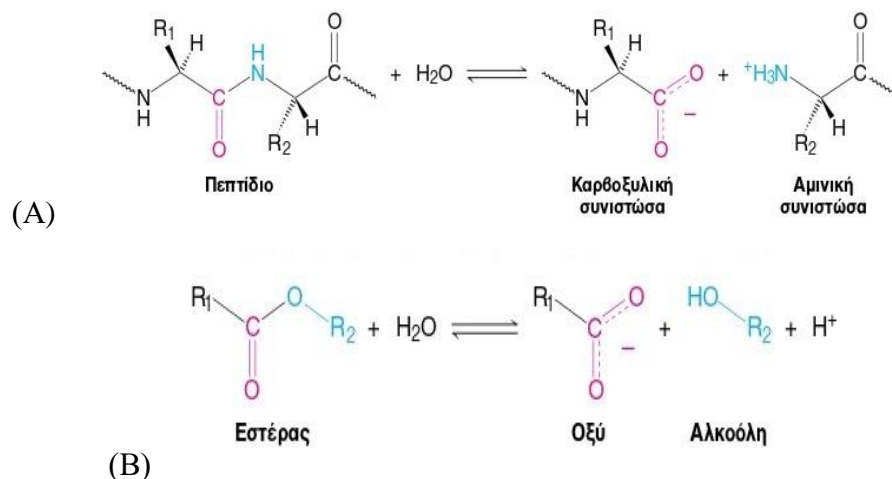
Ως γνωστόν τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στην αντίδραση που καταλύουν όσο και στην επιλογή των αντιδρώντων και συνήθως καταλύουν μια απλή χημική αντίδραση ή μια σειρά από πολύ συγγενικές αντιδράσεις. Στις ενζυμικές αντιδράσεις σπανίως συμβαίνουν παράπλευρες αντιδράσεις που οδηγούν στον άχρηστο σχηματισμό παραπροϊόντων, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις που δεν καταλύονται. (6) Ανάλογα με την αλληλουχία αμινοξέων μιας δεδομένης πρωτεΐνης, οι πρωτεάσες μπορούν να προκαλέσουν περιορισμένη πρωτεόλυση με διάσπαση συγκεκριμένου δεσμού ή μπορεί να προκαλέσουν απεριόριστη πρωτεόλυση με μετατροπή μιας πρωτεΐνης στα αμινοξέα που την αποτελούν. (9)

Η ειδική πρωτεόλυση είναι ένα κοινό μέσο ενεργοποίησης ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών σε βιολογικά συστήματα. Ένας αριθμός πρωτεϊνών κατασκευάζεται και απελευθερώνεται με τη μορφή ανενεργών πρόδρομων πρωτεϊνών που ονομάζονται προπρωτεΐνες. Τα ένζυμα αποκτούν πλήρη ενζυμική δραστηριότητα όταν αναδιπλώνονται στις χαρακτηριστική τρισδιάστατη μορφή τους ή όταν παράγονται ως ανενεργά πρόδρομα, γνωστά ζυμογόνα ή προένζυμα, που ενεργοποιούνται διαδοχικά με διάσπαση ενός ή λίγων συγκεκριμένων πεπτιδικών δεσμών όπου δεν απαιτείται πηγή ενέργειας (ATP) για διάσπαση. Έτσι, σε σύγκριση με την αναστρέψιμη ρύθμιση με φωσφορυλίωση, ακόμη και πρωτεΐνες που βρίσκονται έξω από τα κύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν με αυτό το μέσο. (2)

Μια επιπλέον αξιοσημείωτη διαφορά είναι ότι η πρωτεολυτική ενεργοποίηση, σε σύγκριση με τον αλλοστερικό έλεγχο και την αναστρέψιμη ομοιοπολική τροποποίηση, συμβαίνει μόνο μία φορά στη ζωή ενός μορίου ενζύμου. Ο μετασχηματισμός μιας προπρωτεΐνης στην ώριμη πρωτεΐνη περιλαμβάνει εκλεκτική πρωτεόλυση, η οποία μετατρέπει τις πρωτεΐνες με ένα ή περισσότερα διαδοχικά πρωτεολυτικά στιγμιότυπα σε μια διάταξη, όπου εκφράζεται η ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν, η ινσουλίνη (προϊνσουλίνη), το πεπτικό ένζυμο χυμοθρυψίνη (χυμοθρυψινογόνο), μια σειρά από παράγοντες για την πήξη του αίματος και για τη λύση του θρόμβου του αίματος (φιμπρίνη) και η πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού κολλαγόνο (προκολλαγόνο). (2)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν επιλεκτική τροποποίηση πρωτεϊνών με περιορισμένη διάσπαση και η τεράστια ποικιλία τους, σε αντίθεση με την ιδιαιτερότητα της δράσης τους, έχει προσελκύσει την παγκόσμια προσοχή σε μια προσπάθεια να αξιοποιηθούν οι φυσιολογικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους. (8) Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μια πρωτεάση μπορεί να είναι η αναστολή της λειτουργίας μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης μέσω της διάσπασής της σε ανενεργά συστατικά, η μετατροπή μιας ανενεργής πρόδρομης πρωτεΐνης σε ενεργό φυσιολογικό πεπτίδιο και η χρησιμότητα της ως παράγοντας σηματοδότησης για μετενεργοποίηση της ανοδικής ρύθμισης μιας συγκεκριμένης διαδικασίας. (9)

Κατά την πρωτεϊνόλυση διασπώνται οι πεπτιδικό δεσμοί στις πρωτεϊνικές τροφές και απελευθερώνονται τα αμινοξέα που χρειάζεται ο οργανισμός, γι αυτό, είναι πολύ σημαντικά στη διαδικασία της πέψης. Αυτά τα ένζυμα οδηγούν επίσης στην έναρξη του πρωτεϊνικού καταβολισμού κατά τον οποίο οι μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών διασπώνται από υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών, δηλαδή με προσθήκης ενός μορίου ύδατος. Επίσης τα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού, που είναι μια διαφορετική αλλά σχετική αντίδραση. (13) (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.1 Γενική αντίδραση υδρόλυσης πεπτιδικού δεσμού από πρωτεολυτικό ένζυμο (A) και υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού (B).

Πηγή: Προσαρμογή από <https://docplayer.gr/12478551-Bioxhmeia-tomos-i-panepisthmiakes-ekdoseis-kphths.html>

Αν και η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών ευνοείται θερμοδυναμικά, οι αντιδράσεις αυτές είναι πάρα πολύ αργές, αν και σε μερικές βιοχημικές διαδικασίες οι πεπτιδικοί δεσμοί πρέπει να υδρολυθούν σε χιλιοστά του δευτερολέπτου για να εξασφαλίσουν για την κινητική τους σταθερότητα. Η δομή συντονισμού εξηγεί το λόγο που οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι ανθεκτικοί στην υδρόλυση και προικίζει τον πεπτιδικό δεσμό με χαρακτήρα μερικού διπλού δεσμού. Ο δεσμός άνθρακα-αζώτου ισχυροποιείται από τον χαρακτήρα του διπλού δεσμού και το καρβονυλικό άτομο άνθρακα είναι λιγότερο ηλεκτρονιόφιλο και επιδεκτικό στην πυρηνοφιλική προσβολή από ότι είναι τα καρβονυλικά άτομα άνθρακα σε ενώσεις όπως οι καρβοξυλικοί εστέρες. Επομένως, για να προαχθεί η διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, ένα ένζυμο πρέπει να διευκολύνει την πυρηνοφιλική προσβολή σε μια κανονικά μη ενεργό καρβονυλική ομάδα. (3)

Ο ρυθμός μετατροπής των πρωτεϊνών είναι μια σημαντική πορεία στους ζώντες οργανισμούς και αυτές που εκπλήρωσαν την αποστολή τους πρέπει να αποδομηθούν έτσι ώστε τα αμινοξέα τους να ανακυκλωθούν για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που προσλαμβάνονται με τις τροφές πρέπει να διασπαστούν σε μικρά πεπτίδια και αμινοξέα για να απορροφηθούν στο έντερο. Όλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες σε σχέση με το pH και τη θερμοκρασία, τις απαιτήσεις σε ιόντα, την εξειδίκευση, τη δραστηριότητα και τη σταθερότητα. Αυτές οι βιομηχανικοί παράμετροι καθορίζουν την χρήση μιας πρωτεάσης και ο καταλυτικός μηχανισμός της σχετίζεται με τις χημικές ομάδες που είναι υπεύθυνες για την κατάλυση τους από την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού. (3)

### **2.1.2 Εξειδίκευση πρωτεασών**

Διαφορετικές κατηγορίες πρωτεασών πραγματοποιούν την ίδια αντίδραση με εντελώς διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς. Υπάρχουν διάφοροι τύποι πρωτεολυτικών ενζύμων των οποίων η ταξινόμηση βασίζεται στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο σημείο, που καταλύεται από τα ένζυμα αυτά. (14) Ανάλογα με τη θέση των πεπτιδικών δεσμών που υδρολύουν, οι πρωτεάσες διακρίνονται σε ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες δρουν στο εσωτερικό των πρωτεϊνών και σε εξωπεπτιδάσες, οι οποίες δρουν στα άκρα τους (15).

Οι ενδοπεπτιδάσες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς προς το εσωτερικό του μορίου με αποτέλεσμα τα προϊόντα υδρόλυσης να είναι κυρίως ολιγοπεπτίδια. Πολλά από αυτά τα

ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη φύση των αμινοξέων που συμμετέχουν στον πεπτιδικό δεσμό που υδρολύεται. Οι πρωτεάσες σερίνης χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας ομάδας σερίνης και μιας ιστιδίνης στο ενεργό κέντρο τους και η εξειδίκευση τους ποικιλεί πολύ. Τα ένζυμα μικροβιακής προέλευσης έχουν συχνά μικρότερη εξειδίκευση. (16)

Για παράδειγμα η θρυψίνη υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς που η καρβονυλομάδα (βασική πλευρική ομάδα) ανήκει στα αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη. Η χυμοθρυψίνη προτιμά στην ίδια θέση, τους δεσμούς με φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη κυρίως αλλά και δεσμούς που γειτονεύουν με λευκίνη, μεθειονίνη, ασπαραγίνη και ιστιδίνη. (Εκόνα 2.2) Η πεψίνη έχει παρόμοια εξειδίκευση όπως και η χυμοθρυψίνη, ενώ η παπαΐνη υδρολύει όλους σχεδόν τους δεσμούς και αποφεύγει εκείνους μόνο που γειτονεύουν με όξινα αμινοξέα. (3,16)

Οι εξωπεπτιδάσες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς με την προϋπόθεση ότι η αμινομάδα ή η καρβοξυλομάδα ενός εκ των δύο αμινοξέων που συμμετέχουν στον πεπτιδικό δεσμό θα είναι ελεύθερη. Αν απαιτούν την αμινομάδα ελεύθερη ονομάζονται αμινοπεπτιδάσες και υδρολύουν πεπτίδια αποσπώντας από ένα αμινοξύ το N-τελικό άκρο, ενώ εάν απαιτούν ελεύθερη καρβοξυλομάδα ονομάζονται καρβοξυπεπτιδάσες και υδρολύουν πεπτίδια με σταδιακή απόσπαση ενός αμινοξέος από το C-τελικό άκρο. Εξειδίκευση ως προς τη φύση του αμινοξέος παρουσιάζουν και οι εξωπεπτιδάσες, έτσι ενώ η καρβοξυπεπτιδάση A υδρολύει όλα τα C-τελικά αμινοξέα πλην της αργινίνης, της λυσίνης και της προλίνης, η καρβοξυπεπτιδάση B υδρολύει μόνο την αργινίνη και τη λυσίνη. (16)

## **2.2 Πηγές πρωτεασών**

Οι πρωτεάσες είναι ευρέως κατανομημένες σε κάθε τμήμα της βιολογικής ζωής και η φυσιολογική λειτουργία τους είναι απαραίτητη για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, από τους ιούς μέχρι τον άνθρωπο. Με βάση την προέλευσή τους, μπορούν να διακριθούν σε μικροβιακές (βακτηριακές, μυκητιακές και ιικές), φυτικές, ζωικές και ανθρώπινες. (11)

### **2.2.1 Πρωτεάσες από μικρόβια**

Λόγω της αδυναμίας των ζωικών και φυτικών πρωτεασών να ικανοποιήσουν τις πρόσφατες απαιτήσεις του παγκόσμιου βιομηχανικού τομέα, οι επιστήμονες βρήκαν μια εναλλακτική λύση με τη μορφή μικροβιακών πηγών. Αυτό οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως ο υψηλός ρυθμός παραγωγής, η περιορισμένη απαίτηση χώρου καλλιέργειας, η μεγάλη βιοχημική ποικιλότητα, ο εύκολος γενετικός χειρισμός και τα ελκυστικά χαρακτηριστικά τα καθιστούν κατάλληλα για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. (12) Οι πρωτεάσες που προέρχονται από μικρόβια αντιπροσωπεύουν περίπου το 40% της συνολικής παγκόσμιας πώλησης ενζύμων καθώς διαθέτουν σχεδόν όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά για τις βιοτεχνολογικές τους εφαρμογές. Οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή τόσο των ενδοκυτταρικών όσο και των εξωκυτταρικών πρωτεασών λόγω της ευρείας βιοχημικής ποικιλομορφίας τους και της ευαισθησίας τους σε γενετικούς χειρισμούς. (8, 12)

Οι ενδοκυτταρικές πρωτεάσες είναι ζωτικής σημασίας για πολλά μεταβολικά τελικά προϊόντα κυτταρικών διεργασιών όπως διαφοροποίηση, ανακύκλωση πρωτεΐνης, σπορίωση, επεξεργασία ορμονών και πρωτεϊνών, απομάκρυνση περιττής πρωτεΐνης, ενώ οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες είναι σημαντικές για την κατανάλωση και την υδρόλυση των πρωτεϊνικών θρεπτικών συστατικών. Οι πρωτεάσες απομονώνονται από διαφορετικά μικρόβια όπως μύκητες, βακτήρια και μαγιά. (12)

#### **1. Βακτήρια**

Οι περισσότερες εμπορικές πρωτεάσες είναι ουδέτερες και αλκαλικές. Οι βακτηριακές ουδέτερες πρωτεάσες είναι ενεργές σε pH (5 έως 8) και έχουν σχετικά χαμηλή θερμοανοχή, που αποτελεί πλεονέκτημα για τον έλεγχο της αντιδραστικότητάς τους, με χαμηλό βαθμό υδρόλυσης από ό,τι οι ζωικές πρωτεϊνάσες και για αυτό είναι πολύτιμες για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων. Οι βακτηριακές ουδέτερες πρωτεάσες χαρακτηρίζονται από την υψηλή τους συγγένεια για υδρόφοβα ζεύγη αμινοξέων και μερικές από αυτές ανήκουν στον τύπο της μεταλλοπρωτεάσης και απαιτούν δισθενή μεταλλικά ιόντα για τη δράση τους, ενώ οι πρωτεϊνάσες σερίνης δεν επηρεάζονται από χηλικούς παράγοντες. (8)

Η αλκαλικής φύσεως βακτηριακές πρωτεάσες, έχουν οικονομική σημασία σε διαφορετικές βιομηχανίες όπως η βιομηχανία δέρματος, τροφίμων, πλυντηρίων,

μεταξιού και απορρυπαντικών λόγω των υψηλότερων καταλυτικών τους δραστηριοτήτων και παραγωγικών ικανοτήτων. Διακρίνονται μέσω της υψηλότερης δραστηριότητάς τους σε pH (αλκαλικό) 8 έως 12 με ευρεία εξειδίκευσή τους στο υπόστρωμα και η βέλτιστη θερμοκρασία τους είναι περίπου 60°C. (12)

Οι περισσότερες εμπορικές πρωτεάσες, κυρίως ουδέτερες και αλκαλικές, παράγονται από οργανισμούς που ανήκουν στο γένος Βάκιλος. (12) Επιπλέον η ψευδομονάδα είναι ένα gram-αρνητικό βακτήριο που παράγει κατά κύριο λόγο πολλά πρωτεολυτικά ένζυμα, με κυρίαρχες τις αλκαλικές πρωτεάσες *Pseudomonas aeruginosa*, που έχουν καθαριστεί και χαρακτηριστεί από πολλαπλά στελέχη. (8)

## 2. Μύκητες

Οι πρωτεάσες που απομονώνονται από μύκητες εμφανίζουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος, σταθερότητα κάτω από δυσμενείς συνθήκες, υψηλή ποικιλομορφία και διαχωρισμό των μικκυλίων με τη διαδικασία της απλής διόγκωσης. Χρησιμοποιούνται στην τροποποίηση των πρωτεϊνών των τροφίμων, έχουν ανώτερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πρωτεάσες που παράγονται από βακτηριακές πηγές και αναγνωρίζονται ως γενετικά ασφαλή στελέχη (GRAS). (12) Οι μύκητες επεξεργάζονται μια ευρύτερη ποικιλία ενζύμων από τα βακτήρια, όπως για παράδειγμα, ο *Aspergillus oryzae* που παράγει όξινες, ουδέτερες και αλκαλικές πρωτεάσες. Οι μυκητιακές πρωτεάσες είναι ενεργές σε ένα φάσμα pH 4 έως 11 και μπορούν να παραχθούν εύκολα σε μια διαδικασία ζύμωσης σε στερεά κατάσταση, παρόλο που έχουν χαμηλότερο ρυθμό αντίδρασης και μικρότερη ανοχή στη θερμότητα από τα βακτηριακά ένζυμα. (8)

Οι μυκητιακές όξινες πρωτεάσες έχουν βέλτιστο pH μεταξύ 4 και 4,5 και είναι σταθερές μεταξύ pH 2,5 και 6,0. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στη βιομηχανία τυροκομίας λόγω του στενού pH και των θερμοκρασιακών ιδιοτήτων τους. Οι μυκητιακές ουδέτερες πρωτεάσες είναι μεταλλοπρωτεάσες, ενεργές σε pH 7,0 και αναστέλλονται από χηλικούς παράγοντες. (8) Μεταξύ αυτών των μυκητιακών στελεχών, το *Aspergillus* είναι η διάσημη ομάδα για την παραγωγή πρωτεάσης και μικροβιακά στελέχη όπως *Mycococcus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Ophiostoma* και *Rhizopus* είναι επίσης συχνόι παραγωγοί πρωτεάσης. Το *Cheotomium globosum* είναι ένα νέο γηγενές στέλεχος, το οποίο παράγει καλή αλκαλική πρωτεάση (12).

## 3. Ιοί

Οι ιογενείς πρωτεάσες έχουν αποκτήσει σημασία λόγω της λειτουργικής εμπλοκής τους στην επεξεργασία πρωτεϊνικών ιών που προκαλούν ορισμένες θανατηφόρες ασθένειες όπως το AIDS και ο καρκίνος. Οι πεπτιδάσες σερίνης, ασπαρτικής και κυστεΐνης βρίσκονται σε διάφορους ιούς. Οι ρετροϊκές ασπαρτυλικές πρωτεάσες που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση και την αντιγραφή του ιού είναι ομοδιμερή και εκφράζονται ως μέρος του προδρόμου πολυπρωτεΐνης. (8)

### **2.2.2 Πρωτεάσες από φυτά**

Η παραγωγή πρωτεασών από φυτά είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και η χρήση τους διέπεται από διάφορους παράγοντες όπως η διαθεσιμότητα της γης για καλλιέργεια και η καταλληλότητα των κλιματικών συνθηκών για ανάπτυξη. Η παπαΐνη, η βρωμελίνη, οι κερατινάσες και η φικίνη αντιπροσωπεύουν μερικές από τις γνωστότερες πρωτεάσες φυτικής προέλευσης. (8,12) Η παπαΐνη είναι μια παραδοσιακή φυτική πρωτεάση, παράγεται από φρούτα παπάγιας (*Carica papaya*), τα οποία καλλιεργούνται σε υποτροπικές περιοχές της δυτικής και κεντρικής Αφρικής και της Ινδίας. Η ακατέργαστη παρασκευή του ενζύμου έχει ευρύτερη ειδικότητα λόγω της παρουσίας αρκετών ισοενζύμων πρωτεΐνάσης και πεπτιδάσης, είναι ενεργό μεταξύ pH 5 και 9 και σταθερό περίπου στους 80 ή 90°C παρουσία υποστρωμάτων. (8)

Η βρωμελίνη λαμβάνεται από το φύλλο, το χυμό, το στέλεχος και τη φλούδα του ανανά και χαρακτηρίζεται ως πρωτεάση κυστεΐνης. Είναι ενεργό από pH 5 έως 9 και η θερμοκρασία αδρανοποίησής του είναι 70°C. (8) Οι κερατινάσες παράγονται από βοτανικές ομάδες φυτών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αποτρίχωση. Η πέψη του μαλλιού και των τριχών είναι σημαντική για το σχηματισμό της κρίσιμης λυσίνης που μοιάζει με αμινοξέα που χρησιμοποιούνται για την αποφυγή απόφραξης των συστημάτων αποχέτευσης. (12)

Μερικά παραδείγματα φυτικών πρωτεασών είναι η θερμοσταθερή πρωτεάση σερίνης με το όνομα «wrightin» από το λατέξ του φυτού *Wrightia tinctoria*, η 'Carnein' από το λατέξ του ζιζανίου *Ipomoea carnea* spp. *fistulosa* (Morning glory) και η 'Milin' από το λατέξ του *Euphorbia milii*, που έχουν πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και σε άλλες βιομηχανίες βιοτεχνολογίας. Μια πρωτεάση σερίνης 70 kDa αναγνωρίστηκε από τεχνητά γηρασμένα φύλλα μαϊντανού και η δραστηριότητα της είναι χαμηλή στα νεαρά φύλλα, ενώ βρέθηκε να αυξάνεται σημαντικά με την πρόοδο της γήρανσης και τη μείωση της περιεκτικότητας στη πρωτεΐνη των φύλλων. Ενδοπρωτεάσες



απομονώθηκαν επίσης από γηρασμένα φύλλα βρώμης και κριθαριού που εμπλέκονται στη διαδικασία αποικοδόμησης πρωτεΐνης κατά τη γήρανση των φυλλωμάτων (8)

### **2.2.3 Πρωτεάσες από ζώα**

Οι πιο γνωστές πρωτεάσες ζωικής προέλευσης είναι η παγκρεατική θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η πεψίνη και οι ρενίνες. Παρασκευάζονται σε καθαρή μορφή και η παραγωγή τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ζώων για σφαγή, η οποία με τη σειρά της διέπεται από πολιτικές και γεωργικές πολιτικές. Η θρυψίνη είναι το κύριο εντερικό πεπτικό ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση των πρωτεϊνών των τροφίμων. (8)

Η χυμοθρυψίνη βρίσκεται στο ζωικό παγκρεατικό εκχύλισμα και η καθαρή μορφή της είναι ένα ακριβό ένζυμο που χρησιμοποιείται σε διαγνωστικές και αναλυτικές εφαρμογές. Χρησιμοποιείται εκτενώς στην αποαλλεργοποίηση των υδρολυμάτων πρωτεΐνης γάλακτος. Αποθηκεύεται στο πάγκρεας με τη μορφή ενός προδρόμου, του χυμοθρυψινογόνου και ενεργοποιείται από τη θρυψίνη σε μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων. (8)

Η πεψίνη είναι μια όξινη ασπαρτυλική πρωτεάση που βρίσκεται στο στομάχι σχεδόν όλων των σπονδυλωτών και καταλύει την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ δύο υδρόφοβων αμινοξέων. Το ενεργό ένζυμο απελευθερώνεται από το ζυμογόνο του, δηλαδή το πεψινογόνο, με αυτοκατάλυση παρουσία υδροχλωρικού οξέος. Μοιάζει με την πρωτεάση του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) και είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση του. Παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα μεταξύ pH 1 και 2, ενώ αδρανοποιείται πάνω από pH 6,0. (8)

Στη γαλακτοβιομηχανία, χρησιμοποιείται ευρέως για τον σχηματισμό σταθερού τυροπήγματος με εύνοια υψηλής ποιότητας. Ήδη από το 1913, η χρήση της πεψίνης ήταν στα απορρυπαντικά, τα οποία τώρα αντικαθίστανται από έναν συνδυασμό μικροβιακών μεταλλοπρωτεασών και πρωτεασών σερίνης, οι οποίες γίνονται ανθεκτικές στην αποικοδόμηση μέσω αλκαλικών συνθηκών, απορρυπαντικών και υψηλών θερμοκρασιών. (12)

Η πυτιά είναι μια πρωτεάση που μοιάζει με πεψίνη (ρεννίνη, χυμοσίνη), παράγεται ως ανενεργός πρόδρομος, προ-ρεννίνη στο στομάχι όλων των θηλαστικών και μετατρέπεται σε ενεργή ρεννίνη με τη δράση της πεψίνης ή με την αυτοκατάλυσή της.

Χρησιμοποιείται εκτενώς στη γαλακτοβιομηχανία για την παραγωγή σταθερού τυροπήγματος με καλή γεύση. (8)

### 2.3 Τύποι πρωτεασών

Οι πρωτεάσες είναι πανταχού παρούσες και έχουν εξελιχθεί με πολλαπλούς τρόπους, αφού πραγματοποιούν την ίδια αντίδραση με εντελώς διαφορετικούς καταλυτικούς μηχανισμούς. Η ταξινόμηση των πρωτεολυτικών ενζύμων βασίζεται στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε ένα συγκεκριμένο σημείο, που καταλύεται από τα ένζυμα αυτά. (14) Έχουν διαφορετικές ιδιότητες όπως η καταλυτική δραστηριότητα, η ειδικότητα του υποστρώματος, το pH, η θερμοκρασία, η ειδικότητα της ενεργού θέσης και τα προφίλ σταθερότητας. Οι πρωτεάσες αποτελούνται όχι μόνο από ένα μεμονωμένο ένζυμο αλλά περιέχουν μια κοινοπραξία ενζύμων που περιλαμβάνει πρωτεϊνάσες, πεπτιδάσες και αμιδάσες. Οι πρωτεϊνάσες εμπλέκονται στην υδρόλυση ολόκληρων μορίων πρωτεΐνης απελευθερώνοντας πεπτόνες και αμινοξέα. Οι πεπτιδάσες προκαλούν υδρόλυση πεπτονών και απελευθερώνουν αμινοξέα, ενώ οι αμιδάσες καταλύουν την υδρόλυση των αμινοξέων και απελευθερώνουν αμμωνία. (12)

Με βάση το pH, οι πρωτεάσες μπορούν να ταξινομηθούν ως όξινες (pH 2,0–6,0), ουδέτερες (pH 6,0–8,0) και αλκαλικές (pH 8,0–13,0). Με βάση τον καταλυτικό μηχανισμό και την παρουσία υπολειμμάτων αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, οι πρωτεάσες μπορούν να ομαδοποιηθούν ως ασπαρτικές πρωτεάσες, πρωτεάσες κυστεΐνης, γλουταμικές πρωτεάσες, μεταλλοπρωτεάσες, πρωτεάσες ασπαραγίνης, πρωτεάσες σερίνης, πρωτεάσες θρεονίνης ή μικτές πρωτεάσες. Υπάρχουν όμως και πρωτεάσες που δεν ταιριάζουν με ακρίβεια στην τυπική ταξινόμηση, π.χ. πρωτεάσες εξαρτώμενες από ATP. (8,11)

Το τρέχον σύστημα ταξινόμησης ταξινομεί περαιτέρω τις πρωτεάσες σε οικογένειες με βάση τις ομοιότητες αλληλουχίας και οι ομόλογες οικογένειες ομαδοποιούνται σε φυλές χρησιμοποιώντας μια ταξινόμηση βασισμένη στη δομή. Η ταξινόμηση και η ονοματολογία των πρωτεολυτικών ενζύμων καθώς και μια λεπτομερής περιγραφή των μεμονωμένων πρωτεασών είναι διαθέσιμα στη βάση δεδομένων MEROPS. Οι πρωτεάσες έχουν μοριακό βάρος από 18 έως 90 kDa, ανήκουν στην κατηγορία των ενζύμων υδρολάσης (EC 3) και ομαδοποιούνται στην υποκατηγορία των πεπτιδικών υδρολασών ή πεπτιδασών (EC 3.4). Επίσης, ανάλογα με τη θέση δράσης του ενζύμου,

οι πρωτεάσες μπορούν επίσης να υποδιαιρεθούν σε δύο μεγάλες ομάδες, σε εξωπεπτιδάσες ή ενδοπεπτιδάσες. (11)

### **2.3.1 Εξωπεπτιδάσες**

Οι εξωπεπτιδάσες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς με την προϋπόθεση ότι η αμινομάδα ή η καρβοξυλομάδα ενός εκ των δύο αμινοξέων που συμμετέχουν στον πεπτιδικό δεσμό θα είναι ελεύθερη. (17) Διασπούν τους χαρακτηριστικούς πεπτιδικούς δεσμούς πρωτεΐνης δίπλα στα καρβοξυλικά ή αμινο άκρα που ενσωματώνονται στο υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών κοντά στα N- ή C- τελικά άκρα του υποστρώματος και ανάλογα με την ακρίβειά τους σχετικά με τη θέση δράσης τους, ταξινομούνται επιπλέον στις αμινοπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες, αντίστοιχα. (12)

#### **1. Αμινοπεπτιδάσες**

Οι αμινοπεπτιδάσες δρουν σε ένα ελεύθερο N άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και απελευθερώνουν ένα μόνο υπόλειμμα αμινοξέος (EC 3.4.11), ένα διπεπτίδιο ή ένα τριπεπτίδιο (EC 3.4.14). Μετά την αναγνώριση, προσπαθούν να αφαιρέσουν τη N-τερματική μεθειονίνη που μπορεί να υπάρχει σε πρωτεΐνες, οι οποίες είναι ετερόλογες στην έκφρασή τους αλλά δεν υπάρχουν σε πολλές φυσικές πρωτεΐνες. Οι αμινοπεπτιδάσες απαντώνται σε ένα ευρύ φάσμα μικροβιακών στελεχών συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων και των βακτηρίων και γενικά συμπεριφέρονται ως ενδοκυτταρικά ένζυμα. (8,12)

#### **2. Καρβοξυπεπτιδάσες**

Οι καρβοξυπεπτιδάσες επιδεικνύουν τις καταλυτικές τους δραστηριότητες σε ένα ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο του πολυμερούς αμινοξέων με απελευθέρωση διπεπτιδίου και μεμονωμένων αμινοξέων και οι πεπτιδυλοδιπεπτιδάσες απελευθερώνουν το Ο-τελικό άκρο μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μεταξύ της μεταλλοκαρβοξυπρωτεάσης, η καρβοξυπεπτιδάση τύπου Α αφαιρεί κυρίως τον κλάδο ή την αρωματική πλευρική αλυσίδα που αποτελείται από ένζυμο, ενώ ο τύπος Β τίθεται σε δράση για βασικά αμινοξέα. (12) Η καρβοξυπεπτιδάση Α υδρολύει όλα τα C-τελικά αμινοξέα πλην της αργινίνης, της λυσίνης και της προλίνης και η καρβοξυπεπτιδάση Β υδρολύει μόνο την αργινίνη και τη λυσίνη. Η λευκιναμινοπεπτιδάση πάλι προτιμά

αμινοξέα με υδρόφοβα R. (11. 17) Οι καρβοξυπεπτιδάσες χωρίζονται σε τρεις μεγάλες ομάδες, τις καρβοξυπεπτιδάσες σερίνης, τις μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες και τις καρβοξυπεπτιδάσες κυστεΐνης, με βάση τη φύση των υπολειμμάτων αμινοξέων στην ενεργό θέση των ενζύμων. (8)

### **2.3.2 Ενδοπεπτιδάσες**

Οι ενδοπεπτιδάσες διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς εντός και σε απόσταση από τα άκρα μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, δηλαδή μακριά από τα άκρα του υποστρώματος. (11) Υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς προς το εσωτερικό του μορίου με αποτέλεσμα τα προϊόντα υδρόλυσης να είναι κυρίως ολιγοπεπτίδια. Πολλά από αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς τη φύση των αμινοξέων που συμμετέχουν στην υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών. Για παράδειγμα η θρυψίνη υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς όπου η καρβονυλομάδα ανήκει στα αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη. Η χυμοθρυψίνη προτιμά στην ίδια θέση, αλλά και δεσμούς που γειτνιάζουν με λευκίνη, μεθειονίνη, ασπαργίνη και ιστιδίνη. Η πεψίνη έχει παρόμοια εξειδίκευση όπως και η χυμοθρυψίνη, ενώ η παπαΐνη υδρολύει όλους σχεδόν τους δεσμούς και αποφεύγει εκείνους μόνο που γειτνιάζουν με όξινα αμινοξέα. (17)

Οι ενδοπεπτιδάσες χαρακτηρίζονται από την προτιμώμενη δράση τους στους πεπτιδικούς δεσμούς στις εσωτερικές περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μακριά από τα N και C άκρα,. Ωστόσο, παρουσία της ελεύθερης αμινομάδας ή καρβοξυλικής ομάδας έχει αρνητική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου. (8) Οι ενδοπεπτιδάσες κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες με βάση τον καταλυτικό τους μηχανισμό, σε πρωτεάσες σερίνης, σε ασπαρτικές πρωτεάσες, σε πρωτεάσες κυστεΐνης και σε μεταλλοπρωτεάσες. (12,17)

### **1. Πρωτεάσες σερίνης**

Οι πρωτεάσες σερίνης απολαμβάνουν ποικιλομορφία στη φύση, είναι πολυάριθμες και ευρέως διαδεδομένες σε όλους τους κυτταρικούς οργανισμούς και σε πολλά ιικά γονιδιώματα,. Το ένα τρίτο από τα γνωστά πρωτεολυτικά ένζυμα είναι πρωτεάσες σερίνης και το όνομά τους προέρχεται από το υπόλειμμα Ser, το οποίο είναι πυρηνόφιλο και βρίσκεται στην ενεργό θέση του ενζύμου. Ένα ενδιάμεσο ακυλενζύμου σχηματίζεται από την προσβολή του υπολείμματος σερίνης στο καρβονυλικό άκρο του επερχόμενου πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος. Η πυρηνόφιλη δράση του

οφείλεται στο τριαδικό σύμπλεγμα των υπολειμμάτων «Asp», «His» και «Ser», τη χαρακτηριστική καταλυτική τριάδα. (12)

Συνήθως είναι ενδοπεπτιδάσες αν και μερικές από αυτές είναι εξωπεπτιδάσες, που αποσπών αμινοξέα από το τελείωμα της πολυπεπτιδικής αλληλουχίας και κάποιες άλλες βρίσκονται στις ομάδες ολιγοπεπτιδάσης και ωμέγα πεπτιδάσης. (12) Η εξειδίκευση των ενδοπεπτιδασών σερίνης ποικιλλεί πολύ και με βάση την ειδικότητα του υποστρώματος τους. Για αυτό το λόγο μπορούν να υποδιαιρεθούν στην ομάδα που μοιάζει με θρυψίνη, όπου διασπά αποκλειστικά τους δεσμούς αμινοξέων με μια πλευρική αλυσίδα, στην ομάδα που μοιάζει με χυμοθρυψίνη (προτίμηση για αρωματικά ή ογκώδη μη πολικά αμινοξέα) και την ομάδα που μοιάζει με ελαστάση, όπου προτιμά τα μικρά έως μεσαία υδρόφοβα υπολείμματα. (16,18)

Οι πρωτεάσες σερίνης είναι γενικά ενεργές σε ουδέτερο και αλκαλικό pH, με βέλτιστο μεταξύ 7 - 11 και ορίζονται ως αλκαλικές πρωτεάσες. Έχουν ευρείες ειδικότητες υποστρώματος και χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι από ζωϊκές πηγές είναι οι θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση, πλασμίνη και θρομβίνη. (16) Οι αλκαλικές πρωτεάσες σερίνης παράγονται από διάφορα βακτήρια, όπως Στρεπτομύκητες, μούχλες, ζύμες και μύκητες.(8) Επίσης, παράγονται από βακτήρια του γένους *Bacillus*, ενώ παρόμοια ένζυμα σερίνης μπορούν να παραχθούν από άλλα βακτήρια, όπως *Thermus caldophilus* και *Desulfurococcus mucosus*, *Streptomyces*, *Aeromonas* και *Escherichia*. Τα είδη μυκήτων όπως ο *Aspergillus oryzae* παράγουν ομοίως αρκετές πρωτεάσες σερίνης και οι σουμπτιλισίνες, προέλευσης *Bacillus* αντιπροσωπεύουν τη δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια πρωτεασών σερίνης. (19)

## **2. Ασπαρτικές πρωτεάσες**

Οι ασπαρτικές πρωτεάσες ή ασπαρτυλοπρωτεϊνάσες ή όξινες πρωτεάσες, δομικά, είναι δίλοβες, αφού έχουν μια κεντρική καταλυτική θέση, η οποία αποτελείται από δύο εξαιρετικά διατηρημένα κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp32 και Asp215, αρίθμηση πεψίνης), τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την καταλυτική τους δραστηριότητα. Οι περισσότερες ασπαρτικές πρωτεάσες (Aps) παρουσιάζουν την καλύτερη δραστηριότητα σε pH 3-4 και έχουν ισοηλεκτρικά σημεία στην περιοχή από pH 3 έως 4,5. (8, 20) Οι ασπαρτικές πρωτεάσες τείνουν κυρίως προς τα υδρόφοβα αμινοξέα που γειτνιάζουν με τον διπεπτιδικό δεσμό και εμφανίζονται σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς. (12)

Οι μικροβιακές όξινες πρωτεάσες παρουσιάζουν εξειδίκευση έναντι αρωματικών ή ογκωδών αμινοξικών καταλοίπων και στις δύο πλευρές του πεπτιδικού δεσμού, η οποία είναι παρόμοια με την πεψίνη, αλλά η δράση τους είναι λιγότερο αυστηρή. (8, 20) Οι όξινες πρωτεάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις οικογένειες, (α) ένζυμα που μοιάζουν με πεψίνη και παράγονται από *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* και νευρόσπορα, (β) ένζυμα που μοιάζουν με ρενίνη και παράγονται από *Endothia* και *Mucor spp.* (8) και (γ) τα ένζυμα από παραρετροϊούς που αντιπροσωπεύουν μια βασική ομάδα ενζύμων, που χρησιμοποιούνται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων. (20)

### **3. Πρωτεάσες κυστεΐνης / θειόλης**

Οι πρωτεάσες κυστεΐνης έχουν φυσική προέλευση τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και έχουν αναγνωριστεί περίπου 20 οικογένειες. Η δραστηριότητα όλων των πρωτεασών κυστεΐνης εξαρτάται από μια καταλυτική δυάδα που αποτελείται από κυστεΐνη και ιστιδίνη. (8) Η σειρά των καταλοίπων Cys και His (Cys-His ή His-Cys) ποικίλλει μεταξύ των οικογενειών. (21) Η παπαΐνη είναι η πιο γνωστή πρωτεάση κυστεΐνης και άλλοι εκπρόσωποι είναι η βρωμελίνη και η φικίνη. (8)

Το κύριο χαρακτηριστικό των κυστεϊνικών πρωτεϊνών είναι η παρουσία στο μεγαλομόριό τους της θειολικής ομάδας. Οι συνθήκες που απαιτούνται για τη δράση των κυστεϊνικών πρωτεϊνών ποικίλουν για τα διάφορα ένζυμα και υποστρώματα και έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητάς τους στην περιοχή όξινου pH. Ένας παράγοντας που συμβάλει στην εμφάνιση του βέλτιστου pH στην όξινη περιοχή είναι το “ξεδίπλωμα” ορισμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων σε όξινες τιμές pH. (21)

Το βέλτιστο pH για την πρωτεολυτική τους δράση κυμαίνεται από 6 έως 8 και η βέλτιστη θερμοκρασία είναι 50–70 °C. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης καταλύουν την υδρόλυση των παραγώγων καρβοξυλικού οξέος μέσω μιας οδού διπλής μετατόπισης που περιλαμβάνει γενικό σχηματισμό οξέος-βάσης και υδρόλυση ενός ενδιάμεσου ακυλοθειόλης. (8) Με βάση την εξειδίκευσή τους στην πλευρική αλυσίδα, κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις ομάδες: (i) παρόμοιες με την παπαΐνη, (ii) παρόμοιες με τη θρυψίνη κατά προτίμηση με διάσπαση στο κατάλοιπο αργινίνης, (iii) εξιδεικευμένες στο γλουταμινικό οξύ και (iv) άλλες. (8,21).

#### **4. Μεταλλοπρωτεάσες**

Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι εξαιρετικά διαφοροποιημένοι τύποι πρωτεασών και για τη δράση τους, απαιτούν ιόν δισθενούς μετάλλου που συντίθεται από τρία συντηρημένα υπολείμματα αμινοξέος που μπορεί να είναι His, Asp, Glu ή Lys. Περιέχουν ένζυμα διαφορετικής προέλευσης, όπως κολλαγενάσες από ανώτερους οργανισμούς, αιμορραγικές τοξίνες από δηλητήρια φιδιών και θερμολυσίνη από βακτήρια. (8,22) Έχουν καταγραφεί συνολικά περίπου 30 οικογένειες μεταλλοπρωτεασών, από τις οποίες οι 17 περιέχουν μόνο ενδοπεπτιδάσες, οι 12 περιέχουν μόνο εξωπεπτιδάσες και 1 (M3) περιέχει τόσο ενδοπεπτιδάσες όσο και εξωπεπτιδάσες. (22)

Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι κυρίως ενδοπεπτιδάσες από μύκητες και βακτήρια που περιέχουν ψευδάργυρο. Αναρίθμητα μεταλλικά ιόντα, για παράδειγμα, το κοβάλτιο, το ασβέστιο και ο ψευδάργυρος εμπλέκονται στην επανενεργοποίησή τους, που υπάρχουν στους μύκητες. Αυτά τα ένζυμα έχουν βέλτιστο pH που κυμαίνεται από 5 έως 9 και είναι ευαίσθητα σε χηλικούς παράγοντες μετάλλων όπως το EDTA, αλλά δεν είναι ευαίσθητα στους αναστολείς κυστεΐνης ή στο σουλφυδρύλιο. (12) Με βάση την ειδικότητα της δράσης τους, οι μεταλλοπρωτεάσες μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες, ουδέτερες, αλκαλικές, Mycobacter I και Mycobacter II. Οι ουδέτερες πρωτεάσες δείχνουν εξειδίκευση για τα υδρόφοβα αμινοξέα, ενώ οι αλκαλικές πρωτεάσες έχουν πολύ ευρεία ειδικότητα. (8)

#### **2.4 Πρωτεολυτικά ένζυμα παγκρέατος**

Το πάγκρεας είναι ένας μικτός αδένας και τοποθετείται οπισθοπεριτοναϊκά, στο ύψος του υπερπλωρικού επιπέδου. Βρίσκεται στο αριστερό υποχόνδριο, πίσω από το στομάχι, μπροστά από τον αριστερό νεφρό, προς τα έσω του σπλήνα και πολλές φορές σε επαφή με αυτόν μέσω της ουράς του. Έχει σχήμα σφύρας, φέρεται οριζόντια και προς τα πάνω και εκτείνεται κατά μήκος του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος από τον δωδεκαδάκτυλο έως το σπλήνα. Περιγραφικά διαιρείται στην κεφαλή, τον αυχένα, το σώμα και την ουρά. (23)

Η κεφαλή βρίσκεται μέσα στην αγκύλη του δωδεκαδάκτυλου, σε σχήμα C και προεκβάλλεται σχηματίζοντας την αγκιστροειδή απόφυση, η οποία κρέμεται προς τα πίσω στα άνω μεσεντέρια αγγεία. Προς τα πίσω του οργάνου βρίσκεται η κάτω κοίλη

φλέβα, η αορτή, τα άνω μεσεντέρια αγγεία, τα σκέλη του διαφράγματος, το κοιλιακό πλέγμα και το αριστερό νεφρό. Η σπληνική αρτηρία πορεύεται κατά μήκος του άνω χείλους του παγκρέατος και η σπληνική φλέβα πίσω από τον αδένα, όπου ενώνεται με την άνω μεσεντέρια φλέβα προς σχηματισμό της πυλαίας φλέβας πίσω από τον αυχένα του παγκρέατος. Στο οπίσθιο μέρος του βρίσκεται ο κοινός χοληδόχος πόρος προκειμένου να εκβάλλει στη δεύτερη μοίρα του δωδεκαδάκτυλου. (24)

Ο αυχένας συνδέει την κεφαλή με το σώμα, το οποίο έχει σχήμα τρίγωνο πρισματικό και η πρόσθια πλευρά καλύπτεται από περιτόναιο, ενώ η οπίσθια όχι και παρουσιάζει στο πρόσθιο χείλος του μικρό έπαρμα, το επιπλοϊκό φύμα. (7) Προς τα εμπρός βρίσκεται το στομάχι και η ουρά του παγκρέατος η οποία καταλήγει σε οξύ ή αμβλύ άκρο και επεκτείνεται μέχρι τις πύλες του σπλήνα. (24) Η νεύρωση του παγκρέατος προέρχεται από το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό κοιλιακό και άνω μεσεντέριο νευρικό πλέγμα. (23)

Φυσιολογικά, έχει μήκος περίπου 15cm, αν και το βάρος του είναι λιγότερο από 110gr. Το πάγκρεας μακροσκοπικά αποτελείται από λοβία, τα οποία περιβάλλονται από μία λεπτή κάψα (έλυτρο) και αποτελούνται από αδενοκυψέλες, επαλειφόμενες από ορώδη εκκριτικά κύτταρα, που προεκβάλλουν διαμέσου των μικρών των πόρων στους κύριους πόρους. Μεταξύ αυτών των αδενοκυψελών βρίσκονται σωροί αδενικών κυττάρων, τα (α-κύτταρα) και η σωματοστατίνη F. Αυτός είναι ο μηχανισμός της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. (25)

Το πάγκρεας φέρει δύο πόρους, που συμμετέχουν στην εξωκρινή μοίρα του: α) ο κύριος παγκρεατικός πόρος ή πόρος του Wirsung πορεύεται κατά μήκος του αδένα και συνήθως εκβάλλει στη θηλή του Vater μαζί με τον κοινό χοληδόχο πόρο και β) ο επικουρικός πόρος ή πόρος του Santorini διέρχεται από το κατώτερο μέρος της κεφαλής μπροστά από τον κύριο πόρο και εκβάλλει πάνω από αυτόν. Στη συνέχεια οι πόροι των δύο τμημάτων επικοινωνούν μεταξύ τους και αυτός του μικρότερου τμήματος αναλαμβάνει κυρίως την παγκρεατική ροή σχηματίζοντας τον κύριο παγκρεατικό πόρο, ενώ ο αρχικός πόρος του μεγαλύτερου τμήματος παραμένει σαν επικουρικός. (23)

Καθημερινά απεκκρίνονται περίπου 1500mL παγκρεατικού υγρού. Το εξωκρινές πάγκρεας είναι ένα αδενικό όργανο το οποίο εκκρίνει ουσίες στο έντερο μέσω ενός συστήματος πόρων, οι οποίες εμπλέκονται στην αποδόμηση της τροφής στον αυλό του δωδεκαδακτύλου. Τα παγκρεατικά κύτταρα των αδενοκυψελών παράγουν και



εκκρίνουν πρόδρομες μορφές πολλών πρωτεολυτικών ενζύμων, με σημαντικότερα τα παγκρεατικά ένζυμα θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και καρβοξυλιπολυπεπτιδάση. Η θρυψίνη που υπερέχει ποσοτικά και η χυμοθρυψίνη διασπούν πλήρως τις πρωτεΐνες σε πεπτίδια διαφόρων μεγεθών, χωρίς όμως να προκαλούν απελευθέρωση μεμονωμένων αμινοξέων. Αντίθετα, η καρβοξυλιπολυπεπτιδάση διασπά τα πεπτίδια σε απλά αμινοξέα και με αυτόν τον τρόπο συμπληρώνεται η πέψη των περισσοτέρων πρωτεϊνών προς μεμονωμένα αμινοξέα. (26)

Όταν συντίθεται τα κύτταρα του παγκρέατος, τα πρωτεολυτικά ένζυμα βρίσκονται υπό ανενεργή μορφή, δηλαδή ως θρυψινογόνο, χυμοθρυψινογόνο και προκαρβοξυπολυπεπτιδάση, που είναι όλα αδρανή από ενζυμική άποψη. Το θρυψινογόνο ενεργοποιείται από την εντεροκινάση, ένα ένζυμο που εκκρίνεται από τον εντερικό βλεννογόνο όταν ο χυμός έρχεται σε επαφή με τον βλεννογόνο ή με αυτοκατάλυση από τη θρυψίνη που έχει ήδη σχηματιστεί από το θρυψινογόνο. Επιπλέον, το χυμοθρυψινογόνο ενεργοποιείται από τη θρυψίνη και μετατρέπεται σε χυμοθρυψίνη και η προκαρβοξυπολυπεπτιδάση ενεργοποιείται με παρόμοιο τρόπο. (27)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα του παγκρεατικού υγρού δεν ενεργοποιούνται παρά μόνο μετά την έκκριση τους προς τον αυλό του εντέρου, γιατί σε διαφορετική περίπτωση θα έπεπταν το ίδιο το πάγκρεας. Ταυτόχρονα από τα ίδια κύτταρα που εκκρίνονται τα πρωτεολυτικά ένζυμα προς τις αδενοκυψελίδες του παγκρέατος εκκρίνεται και ο αναστολέας θρυψίνης. Η ουσία αυτή παράγεται στο κυτόπλασμα των αδενικών κυττάρων και παρακωλύει την ενεργοποίηση της θρυψίνης τόσο στα εκκριτικά κύτταρα όσο και στις αδενοκυψέλες και στους εκφορητικούς πόρους. Επειδή η θρυψίνη ενεργοποιεί και τα άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα του παγκρέατος, ο αναστολέας της θρυψίνης παρακωλύει και την επακόλουθη ενεργοποίηση όλων των ενζύμων. (27)

Η παγκρεατική έκκριση είναι αλκαλική κάτι που οφείλεται στην επιλεκτική έκκριση διττανθρακικών ιόντων και πραγματοποιείται από το σύστημα των πόρων. Ο έλεγχος των παγκρεατικών εκκρίσεων επιτελείται κυρίως από ορμόνες, όπως είναι η εκκριματίνη, που διεγείρει την παραγωγή υγρού πλουσίου σε διττανθρακικά και η χολοκυστοκινίνη, η οποία διεγείρει τα αδενοκυψελικά κύτταρα για να απελευθερώσουν τα ένζυμα τους. Η είσοδος του όξινου γαστρικού περιεχομένου στο δωδεκαδάκτυλο αποτελεί ερέθισμα για την παραγωγή αυτών των ορμονών από τα ενδοκρινή κύτταρα του βλεννογόνου του πεπτικού σωλήνα. (26)

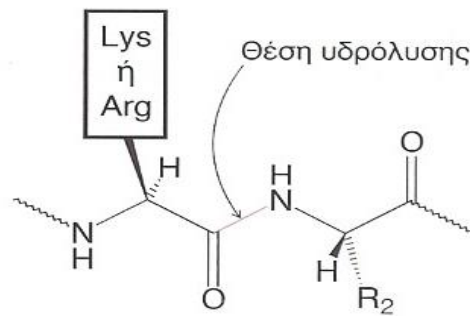
## 2.5 Βασικά πρωτεολυτικά ένζυμα

### 2.5.1 Θρυψίνη

Η θρυψίνη (EC 3.4.21.4) ανήκει στις πρωτεάσες σερίνης, του πεπτικού συστήματος που παράγεται στο πάγκρεας ως ανενεργό πρόδρομο, το θρυψινογόνο, στη συνέχεια εκκρίνεται στο λεπτό έντερο, όπου η πρωτεολυτική διάσπαση της εντεροκινάσης την ενεργοποιεί σε θρυψίνη. Η ενεργή θρυψίνη που προκύπτει είναι σε θέση να ενεργοποιήσει περισσότερα θρυψινογόνα με αυτοκατάλυση. Αυτός ο μηχανισμός ενεργοποίησης, είναι παρόμοιος με της πεψίνης, κοινός για τις περισσότερες πρωτεάσες σερίνης και σκοπός του είναι η πρόληψη της αυτοπέψης του παγκρέατος. (28)

Η θρυψίνη ανακαλύφθηκε το 1876 από τον Wilhelm Kühne και πήρε το όνομα της από την αρχαία ελληνική λέξη για το τρίψιμο, καθώς απομονώθηκε για πρώτη φορά με τρίψιμο του παγκρέατος με γλυκερίνη. Η θρυψίνη, ως ένζυμο της πέψης, είναι απολύτως εξειδικευμένη στο να καταλύει μόνο τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στο καρβοξυ-τελικό άκρο των καταλοίπων της λυσίνης και της αργινίνης σε συνθήκες ελαφρά αλκαλικές, με ιδανική τιμή pH 8. (Εικόνα 2.2) Το ενεργό μόριο της θρυψίνης αποτελείται από μια μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα, στην οποία τα καταλυτικά κατάλοιπα γεφυρώνουν δύο περιοχές και έχει μοριακό βάρος 25KDa. (29)

Από την αρχική της ανακάλυψη, η θρυψίνη έχει εντοπιστεί σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων, των ψαριών και των θηλαστικών. Η θρυψίνη από κάθε πηγή μπορεί να διαφέρει ελαφρώς στη δραστηριότητα, αλλά το φυσικό υπόστρωμα για το ένζυμο είναι γενικά οποιοδήποτε πεπτίδιο που περιέχει Lys ή Arg. Η ιδιαιτερότητα της θρυψίνης της επιτρέπει να εξυπηρετεί τόσο πεπτικές όσο και ρυθμιστικές λειτουργίες. Ως πεπτικός παράγοντας, αποικοδομεί μεγάλα πολυπεπτίδια σε μικρότερα θραύσματα και ως ρυθμιστικός, ενεργοποιεί άλλες πρωτεΐνες μέσω πρωτεόλυσης σε συγκεκριμένους δεσμούς Lys ή Arg. (30)



Εικόνα 2.2 Εξειδίκευση θρυψίνης. Διασπά τους δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο των καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης.

Πηγή: Προσαρμογή από <https://docplayer.gr/12478551-Bioxhmeia-tomos-i-panepisthmiakes-ekdoseis-kphths.html>

Πολλές άλλες πρωτεάσες σερίνης όπως οι καλικρεΐνες, η ελαστάση και η χυμοθρυψίνη αποτελούν την οικογένεια της θρυψίνης και είναι παρόμοιες δομικά και μηχανιστικά με τη θρυψίνη, αλλά διαφέρουν στις προτιμήσεις υποστρώματος και στη συνολική βιολογική τους λειτουργία. Εκτός από τη διατήρηση της τρισδιάστατης πτυχής σε όλες τις γνωστές θρυψίνες, η καταλυτική τριάδα His 57 – Asp 102 - Ser195 και τα αμινοξέα που προσεγγίζουν αυτά τα υπολείμματα διατηρούνται πλήρως. (31)

Ο καταλυτικός μηχανισμός είναι ίδιος με της χυμοθρυψίνης, όπου το οξυγόνο της Ser 195 προσβάλλει πυρηνόφιλα το υπόστρωμα δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο ακυλοενζύμου. Στην καταλυτική τριάδα το His57 δρα σαν μια βάση και δέχεται το πρωτόνιο από την -OH της Ser 195. Ο ρόλος της ομάδας -COO του Asp 102 έγκειται στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης της θετικά φορτισμένης His 57 και στη σταθεροποίηση του σωστού ταυτομερούς της. Αντικατάσταση οποιουδήποτε από τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας συνεπάγεται με μείωση περισσότερο από 104 φορές της δραστηριότητας του ενζύμου. Όπως αποδεικνύεται από πειράματα με μεταλλαξιγένεση θέσης, υπάρχουν και άλλες θέσεις αμινοξέων που διαδραματίζουν ρόλο στην κατάλυση, ενώ αρκετά μέρη του μορίου της θρυψίνης συμβάλλουν στη σωστή αναγνώριση του υποστρώματος. (29)

Κατά την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος, το υπόστρωμα σχηματίζει ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο με τη θέση πρόσδεσης της πρωτεΐνης και η εξειδίκευση του υποστρώματος καθορίζεται από την πλευρική αλυσίδα του Asp 189, που βρίσκεται στη βάση της S1 θέσης πρόσδεσης. Ο σχηματισμός του ενδιάμεσου ακυλοενζύμου είναι

συνήθως το καθοριστικό βήμα για την διάσπαση των αμιδικών δεσμών από την θρυψίνη, ενώ η υδρόλυση του είναι το καθοριστικό βήμα για τη διάσπαση του εστέρα. Ο μηχανισμός κατάλυσης της θρυψίνης είναι ίδιος με της χυμοθρυψίνης, με την ίδια καταλυτική τριάδα να έχει τον ίδιο ρόλο. (29)

Ήδη από το 1941, οι ερευνητές συνειδητοποίησαν την ικανότητα ορισμένων πρωτεολυτικών ενζύμων να διαχωρίζουν επιλεκτικά την επιδερμίδα από το χόριο. Από τότε, κυρίως η θρυψίνη, έχει εντοπιστεί και χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακές ρυθμίσεις για την απομόνωση βιώσιμων πληθυσμών κερατινοκυττάρων από δείγματα δέρματος. Η μοναδική ικανότητα των πρωτεασών να προκαλούν επιλεκτικό επιδερμικό διαχωρισμό έχει εν μέρει εξηγηθεί από την ικανότητά τους να αφομοιώνουν τις δεσμοσωμικές πρωτεΐνες. (32)

### **2.5.2 Χυμοθρυψίνη**

Η χυμοθρυψίνη (EC 3.4.21.1) είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο, της οικογένειας των πρωτεασών σερίνης, βρίσκεται στο πεπτικό σύστημα των θηλαστικών και άλλων οργανισμών και συμμετέχει στη διάσπαση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα η χυμοθρυψίνη διασπά επιλεκτικά τους πεπτιδικούς δεσμούς στο καρβοξυ-τελικό άκρο ενός μεγάλου υδρόφοβου αμινοξέος όπως είναι η θρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η φαινυλαλανίνη και η μεθειονίνη, δηλαδή στην C-τερματική πλευρά ενός δεσμού αμιδίου, ο οποίος περιέχει μια αρωματική πλευρική αλυσίδα. Το ένζυμο χρησιμοποιεί ένα ισχυρό πυρηνόφιλο (ομάδα υδροξυλίου σερίνης) για να επιτεθεί σε μια μη ενεργό καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος και προσκολλάται ομοιοπολικά στο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. (5, 33)

Η χυμοθρυψίνη είναι μέλος μιας οικογένειας ενζύμων που περιλαμβάνει τα παγκρεατικά ένζυμα χυμοθρυψίνη, θρυψίνη και ελαστάση καθώς και μια ποικιλία άλλων πρωτεασών, τα οποία εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας στη συνολική τριτοταγή δομή τους, αλλά έχουν διαφορετικές ειδικότητες υποστρώματος που καθορίζονται από μια συγκεκριμένη θέση δέσμευσης υποστρώματος σε κάθε ένζυμο. (2, 34)

Η χυμοθρυψίνη αρχικά συντίθεται ως ένας αδρανής πρόδρομος 245 αμινοξέων που ονομάζεται χυμοθρυψινογόνο και η ενεργοποίηση του περιλαμβάνει πρωτεολυτική διάσπαση σε δύο θέσεις. Οι προκύπτουσες τρεις αλυσίδες συγκρατούνται μεταξύ τους

με πέντε δισουλφιδικούς δεσμούς και το μόριο της χυμοθρυψίνης διπλώνεται σε δύο περιοχές διατεταγμένες ως αντιπαράλληλα φύλλα που σχηματίζουν μια κυκλική δομή. Τα υπολείμματα της ενεργού θέσης απέχουν πολύ μεταξύ τους στην πρωτογενή αλληλουχία αλλά συγκεντρώνονται σε μια σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ των δύο πρωτεϊνικών περιοχών. Η ενεργή θέση της χυμοθρυψίνης αποτελείται από καταλυτική τριάδα που σχηματίζεται από ασπαρτικό 102 τοποθετημένο κοντά στην ιστιδίνη 57 και τη σερίνη 195. (34)

Η χυμοθρυψίνη περιέχει 28 εξαιρετικά ενεργά κατάλοιπα σερίνης, όπου τροποποιήθηκε μόνο ένα, η σερίνη 195, με αποτέλεσμα τη συνολική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτή η αντίδραση χημικής τροποποίησης υποδηλώνει ότι αυτό το ασυνήθιστα ενεργό κατάλοιπο σερίνης παίζει κεντρικό ρόλο στον καταλυτικό μηχανισμό της χυμοθρυψίνης. Η κινητική της ενζυμικής δράσης συχνά καταγράφεται βάζοντας το ένζυμο να δράσει σε ένα ανάλογο του υποστρώματος το οποίο σχηματίζει ένα έγχρωμο προϊόν (N-ακετυλο-L-φαινυλαλανυλο-π-νιτροφαινυλο-εστέρας). (5)

Η υδρόλυση προχωρά σε δύο βήματα, που εξηγούνται από την αντίδραση της πυρηνόφιλης σερίνης με το υπόστρωμα για να σχηματιστεί ένα ομοιοπολικό συνδεδεμένο ενδιάμεσο ενζύμου-υποστρώματος (Εικόνα 2.9). Πρώτον, η υδροξυλική ομάδα της πάρα πολύ ενεργού σερίνης 195 προσβάλλει την καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος για να σχηματίσει το ενδιάμεσο του ακυλοενζύμου, απελευθερώνοντας την π-νιτροφαινόλη (ή μια αμίνη εάν το υπόστρωμα είναι ένα αμίδιο και όχι εστέρας). Δεύτερον, το ενδιάμεσο του ακυλοενζύμου υδρολύεται για να απελευθερώσει το καρβοξυλικό οξύ του υποστρώματος και να αναπαραγάγει το ελεύθερο ένζυμο. Έτσι, με την προσθήκη του υποστρώματος το π-νιτροφαινολικό παράγεται γρήγορα καθώς σχηματίζεται το ενδιάμεσο του ακυλοενζύμου. (5)

Ο γενικός μηχανισμός αντίδρασης για την υδρόλυση ενός εστέρα ή αμιδίου από χυμοθρυψίνη ή άλλη πρωτεάση σερίνης είναι ο ακόλουθος. Η ιστιδίνη-57 δρα ως καταλύτης βάσης για να επιτρέψει στο οξυγόνο της σερίνης-195 να κάνει μια πυρηνόφιλη επίθεση στην καρβοξυλική ομάδα του δεσμευμένου με ένζυμο υποστρώματος. Στην πορεία σχηματίζεται ένα ασταθές τετραεδρικό ενδιάμεσο του οποίου το αρνητικά φορτισμένο άτομο οξυγόνου μπορεί να σταθεροποιηθεί με δεσμό υδρογόνου με τη γλυκίνη-193. Ομοίως, το θετικό φορτίο στον δακτύλιο ιμιδαζόλης της ιστιδίνης-57 σταθεροποιείται με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το ασπαρτικό-102.

Η ομάδα ιμιδαζολίου της ιστιδίνης-57 δρα στη συνέχεια ως όξινο καταλύτης για να διευκολύνει την απελευθέρωση του πρώτου προϊόντος, αφήνοντας πίσω το ένζυμο ακυλίου (ακυλομάδα να συνδέεται ομοιοπολικά με τη σερίνη-195). Το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, όπως και το πρώτο, ξεκινά από μια πυρηνόφιλη επίθεση, αυτή τη φορά από το νερό και η απελευθέρωση του προϊόντος (RCOOH) υποβοηθείται και πάλι από όξινη κατάλυση. (35)

Καθώς ξεκινά η αντίδραση, το χυμοθρυψινογόνο μετατρέπεται σε ένα πλήρως ενεργό ένζυμο, όταν ο πεπτιδικός δεσμός που ενώνει την αργινίνη 15 και την ισολευκίνη 16 διασπάται από τη θρυψίνη, εξαλείφονται δύο διπεπτίδια για να σχηματιστεί η α-χυμοθρυψίνη, η σταθερή μορφή του ενζύμου. Οι τρεις επόμενες αλυσίδες στην α-χυμοθρυψίνη παραμένουν διασυνδεδεμένες μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των αλυσίδων. Το εξαιρετικό χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι ότι η διάσπαση ενός μόνο συγκεκριμένου πεπτιδίου δεσμεύει την πρωτεΐνη από μια καταλυτικά ανενεργή μορφή σε μια πλήρως ενεργή μορφή. (2)

Η διαδικασία διάσπασης αυτού του πεπτιδίου δημιουργεί ένα ενδιάμεσο είδος, γνωστό ως π-χυμοθρυψίνη, το οποίο έχει μια ατελώς σχηματισμένη ενεργή θέση και αποτελεί έναν αδύναμο καταλύτη. Στη συνέχεια η π-χυμοθρυψίνη υφίσταται αυτοκατάλυση και σχηματίζει ένα δεύτερο πλήρως ενεργό μόριο χυμοθρυψίνης, το οποίο αποτελείται από τρία πολυπεπτίδια που συνδέονται με δισουλφίδια. Η πλήρως ενεργή χυμοθρυψίνη διαθέτει μια «τρύπα οξυ-ανιόντος» που φιλοξενεί τα αρνητικά φορτισμένα τετραεδρικά ενδιάμεσα, παρέχοντας έτσι έναν ακόμη τρόπο προώθησης της κατάλυσης σταθεροποιώντας ένα υποχρεωτικό ενδιάμεσο αντίδρασης. (36)

### **2.5.3 Παπαΐνη**

Το ένζυμο κυστεϊνικής πρωτεάσης φυτικής προέλευσης είναι γνωστό ως παπαΐνη (EC. 3.4.22.2), προέρχεται από το γαλακτώδες υγρό (latex) του δέντρου *Carica papaya* L., και αποτελείται από ένα μείγμα ενζύμων, που περιλαμβάνει ουσιαστικά έναν συνδυασμό παπαΐνης και χυμοπαπαΐνης, αμύλου και εστέρων, ειδικά σε δεσμούς αλκαλικών αμινοξέων, λευκίνης ή γλυκίνης, που παράγει πεπτίδια με χαμηλό μοριακό βάρος. (38,39) Επίσης περιέχει πεπτιδάση Α παπάγιας, γνωστή ως Caricaain και ένα άλλο κλάσμα που δρα έναντι του εστέρα γλυκίνης, η πεπτιδάση Β της παπάγιας που ονομάζεται πρωτεΐνάση IV ή γλυκυλενδοπεπτιδάση. (39)

Η παπαΐνη ήταν το πρώτο ένζυμο σουλφυδρυλίου που ανακαλύφθηκε και αποτελείται από 212 αμινοξέα με μία ελεύθερη σουλφυδρική ομάδα στην κυστεΐνη του ενεργού κέντρου και τρεις ενδομοριακές δισουλφιδικές γέφυρες. Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) του συγκεκριμένου ενζύμου έχει προσδιοριστεί ίσο με 8.75 και η μοριακή μάζα του 23.350 Da. Το ένζυμο είναι πολύ σταθερό σε ουδέτερο pH, ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες. (39,40).

Έχει διπλό ελλειψοειδές σχήμα που αποτελείται από δύο διαφορετικές διακριτές περιοχές διαμόρφωσης, εμφανείς στην τρισδιάστατη δομή της, με μια σχισμή ανάμεσα τους, όπου βρίσκεται η ενεργή θέση του, η οποία περιέχει μια καταλυτική τριάδα, παρομοια με της χυμοθρυψίνης. Περιέχει έξι σουλφυδρύλια και μία ελεύθερη κυστεΐνη, η οποία αποτελεί μέρος της ενεργού θέσης και υδρολύει αμίδια αργινίνης, λυσίνης εύκολα και γλουταμίνη, ιστιδίνη, γλυκίνη και τυροσίνη με μειωμένους ρυθμούς. Η τρισδιάστατη δομή της παπαΐνης έχει προσδιοριστεί με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X. (39)

Στη διεθνή βιβλιογραφία είναι διαθέσιμες και δομές από σύμπλοκα μεταξύ του ενζύμου με διάφορους αναστολείς ή υποκαταστάτες που προσδέονται σε αυτό. Η παπαΐνη αποτελείται από μία ακανόνιστη αλυσίδα με μία μικρή περιοχή β-δομής και τέσσερα μικρά τμήματα α-έλικας που αποτελούν το 20% του μορίου. Εξωτερικά, το μόριο είναι σφαιρικό με δύο διακριτά τμήματα χωρισμένα από μια σχισμή. Το ενεργό κέντρο (κίτρινο χρώμα) βρίσκεται στην επιφάνεια της σχισμής με την κυστεΐνη 25 στα αριστερά και το δακτύλιο ημιδαζόλης της ιστιδίνης στα δεξιά. Είναι πλέον γενικά αποδεκτό ότι η δραστική μορφή της παπαΐνης οφείλεται στο ζεύγος ιόντων που σχηματίζεται μεταξύ της θειολικής ομάδας της κυστεΐνης 25 και της ομάδας του ημιδαζολίου της ιστινιδίνης 159. (40)

Ο μηχανισμός με τον οποίο η παπαΐνη σπάει τους πεπτιδικούς δεσμούς περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση του Cys-25 από το His-159 και το Asn-158 και βοηθά στον προσανατολισμό του δακτυλίου ημιδαζόλης του His-159 ώστε να επιτρέψει την αποπρωτονίωση. Στη συνέχεια, το Cys-25 εκτελεί μια πυρηνόφιλη επίθεση στον άνθρακα καρβονυλίου ενός πεπτιδικού σκελετού και αυτό ελευθερώνει το αμινοτελικό άκρο του πεπτιδίου σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο ομοιοπολικό ακυλο-ένζυμο. Το ένζυμο στη συνέχεια αποακυλιώνεται από ένα μόριο νερού και απελευθερώνει το καρβοξυτελικό τμήμα του πεπτιδίου. (39)

Η ενζυμική δραστηριότητα της παπαΐνης μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το φως, το οξυγόνο, η υγρασία και η συσσώρευση. Το ένζυμο είναι πιο σταθερό και ενεργό σε pH 5,0-7,0. Η σταθερότητα του ενζύμου (τόσο ως στερεό όσο και ως ενσωματωμένο σε ημιστερεά σκευάσματα) έχει διερευνηθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη μείωση της δραστηριότητάς του με την αύξηση της θερμοκρασίας. (37)

### **Ιδιότητες**

Η παπαΐνη είναι μια ενδολυτική πρωτεάση κυστεΐνης που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων, δέρματος, καλλυντικών και κλωστοϋφαντουργίας. (40,41) Προϋπόθεση είναι βέβαια το συγκεκριμένο ένζυμο να είναι σταθερό στις συνθήκες λειτουργίας της εκάστοτε βιομηχανίας, επειδή ένας από τους περιοριστικούς παράγοντες χρήσης της παπαΐνης σε τοπικά σκευάσματα είναι η χημική της σταθερότητα. (40) Μια εναλλακτική λύση για την αύξηση της σταθερότητας της παπαΐνης περιλαμβάνει την τροποποίηση της δομής του ενζύμου για την προστασία της ενεργού θέσης υδρόλυσης. (37)

Είναι ένα εξαιρετικά λειτουργικό πρωτεολυτικό ένζυμο με βακτηριοκτόνο, βακτηριοστατική και αντιφλεγμονώδη ιδιότητα και έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό στη διαδικασία επούλωσης πληγών, βλαβών και ελκών. Η παπαΐνη διασπά το ινώδες υλικό στον νεκρωτικό ιστό και απαιτεί την παρουσία σουλφυδρυλικών ομάδων, όπως η κυστεΐνη, για τη δράση της. (41) Έχει αρκετές θεραπευτικές ιδιότητες όπως αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές δραστηριότητες. Η βακτηριοκτόνος δράση της παπαΐνης δεν έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την πρωτεολυτική της δράση, αλλά με τις δραστικότητες αμιδάσης και εστεράσης. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προστατεύσει τα κύτταρα έναντι του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (42)

Έχει χρησιμοποιηθεί στη δερματολογία για τη θεραπεία τραυμάτων για την αφαίρεση των τραυματισμένων ιστών και την τόνωση της διαδικασίας κυκλοποίησης και πρόσφατα εφαρμόστηκε για θεραπεία ουλής. Ως ενδολυτική πρωτεάση προσφέρεται επίσης, ως αντιπηκτικός και αιμολυτικός παράγοντας, διευκολύνοντας τον καθαρισμό και επιταχύνοντας την ανάκτηση των ιστών. Επιπλέον, η παπαΐνη αναφέρθηκε ως παράγοντας κατά του βιοφίλμ, κατά της πλάκας και κατά της ουλίτιδας. (43)



Η παπαΐνη έχει ισχυρότερη πρωτεολυτική δράση καθώς και μεγάλο εύρος δράσης που περιλαμβάνει τη στέρηση της βασικής πρωτεΐνης των μυοϊνιδιακών μυών (μυοϊνιδικές πρωτεΐνες και κολλαγόνο). Λόγω της κολλαγονολυτικής δραστηριότητας, ενισχύει τον ρυθμό ανανέωσης του δέρματος και φέρνει στην επιφάνεια ένα στρώμα πιο λείου, απαλού δέρματος. Επιπλέον, διευκολύνει τη διάχυση υδρόφιλων ουσιών στην επιδερμική και στο δερματική στιβάδα απολεπίζοντας την κεράτινη στιβάδα αλλάζοντας έτσι τις ιδιότητες φραγμού της. (38) Ωστόσο, ένα σημαντικό εμπόδιο στη χρήση του ως παράγοντα μείωσης της ίνωσης είναι η υπέρβαση του δερματικού φραγμού της κεράτινης στιβάδας μέσω τοπικής εφαρμογής, λόγω της υδρόφιλης και υψηλού μοριακού βάρους και της πρωτεϊνικής φύσης του που είναι επιρρεπής σε αποικοδόμηση. (38, 44)

Έχει χρησιμοποιηθεί και ερευνηθεί εκτενώς για τη θετική επίδραση που έχει στα έλκη του δέρματος, καθώς και για τη βοήθεια ασθενών με σοβαρά εγκαύματα. Όχι μόνο έχει εξαιρετικές αντιβακτηριακές και επουλωτικές ικανότητες, αλλά χρησιμοποιείται επίσης ευρέως στη φροντίδα των πληγών και βοηθά ιδιαίτερα στην αφαίρεση κατεστραμμένου και νεκρού δέρματος. Τα προϊόντα που περιέχουν πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η παπαΐνη αποτελούν κοινή επιλογή, καθώς είναι φυσικό να στερείται δερματικών προβλημάτων που σχετίζονται με τη χρήση συνθετικών και σκληρών χημικών ουσιών. (39)

Η απολεπιστική ιδιότητα της παπάγιας έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε ιατρικές καταστάσεις για να καθαρίσει το δέρμα από ανώμαλη ανάπτυξη του δέρματος και για δερματικές παθήσεις. Ο χημικός καθαρισμός είναι η εφαρμογή ενός τοπικού ενζυματικού ή μη ενζυματικού παράγοντα, ο οποίος διαταράσσει χημικά ή αφομοιώνει το εξουδετερωμένο εξωκυτταρικό υλικό που υπάρχει στο τραύμα. Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας στον τομέα του χημικού καθαρισμού έχει επικεντρωθεί στη χρήση ενζύμων με πρωτεολυτική δράση και η παπαΐνη χρησιμοποιείται ως συστατικό σε διάφορα παρασκευάσματα ενζυματικής απομάκρυνσης. (39)

### **Καλλυντικές Εφαρμογές**

Η παπαΐνη μελετάται σε πεδίο βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας λόγω των φαρμακευτικών και βιομηχανικών εφαρμογών της και έχει εμπλακεί στο σχεδιασμό και τη σύνθεση διάφορων θεραπευτικών στόχων. Η δράση της στο δέρμα έχει διερευνηθεί και τα αποτελέσματα που βρέθηκαν συσχετίστηκαν με την ενυδάτωση, την ενίσχυση

της διείσδυσης των ενεργών ενώσεων και τη μείωση της ταχύτητας ανάπτυξης της τρίχας. (37) Οι κύριες καλλυντικές ιδιότητες της παπαΐνης που χρησιμοποιούνται στα σκευάσματα είναι ως αντιγηραντικός και ως απολεπιστικός παράγοντας. (39)

Η γήρανση στο δέρμα σχετίζεται κυρίως με μειώσεις στο επίπεδο του κολλαγόνου Τύπου I, το οποίο είναι το κύριο δομικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) και εκτελεί κεντρική λειτουργία στη διατήρηση της δομής του δέρματος. Δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με παπαΐνη δείχνουν μια ελαφρώς υψηλότερη περιεκτικότητα σε κολλαγόνο, η οποία οφείλεται στην επίδραση της παπαΐνης στην πρωτεόλυση του κολλαγόνου, υποδηλώνοντας ότι η παπαΐνη μπορεί να βελτιώσει τη σφριγηλότητα και την ελαστικότητα του δέρματος. (39)

Η αύξηση της συγκέντρωσης των οξειδωμένων πρωτεϊνών κατά την γήρανση οφείλεται εν μέρει στη μειωμένη ικανότητα του κυττάρου να τις αποικοδομεί. Η παπαΐνη είναι πολύ ισχυρή στην υδρόλυση της ινώδους πρωτεΐνης και του συνδετικού ιστού και έχει αναφερθεί ότι έχει διαλυτοποιήσει το 15% της πρωτεΐνης του συνδετικού ιστού, ώστε να βελτιώσει την εμφάνιση του δέρματος. Η παπαΐνη έχει προστατευτική αντιοξειδωτική δράση έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας, καλή υδρολυτική και ενυδατική ιδιότητα, βελτιώνει τη λειτουργικότητα του κολλαγόνου, αναζωογονεί και εμφανίζει ανοσολογική απόκριση και έτσι μειώνει τα σημάδια γήρανσης. (39)

Η παπαΐνη είναι υπέροχο απολεπιστικό που επιτρέπει την ενίσχυση της διείσδυσης οποιουδήποτε επιθυμητού φαρμακευτικού παράγοντα ευεργετικού για το δέρμα.. Η χημική απολέπιση βοηθά στη χαλάρωση του δεσμού μεταξύ των νεκρών κυττάρων του δέρματος και των νέων, ώστε να αποκολλώνται πιο εύκολα. Προϊόντα που περιέχουν παπαΐνη και βρωμελίνη είναι κοινές επιλογές σε αυτήν την κατηγορία, καθώς οι σκληρές χημικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στα ζωντανά κύτταρα. (39)

Μία προτιμώμενη μορφή παπαΐνης είναι η Συνδεδεμένη παπαΐνη (καρβομερές παπαΐνης, όπου η παπαΐνη ακινητοποιείται ομοιοπολικά σε 1% πολυακρυλικό οξύ σύμφωνα με το CTFA) σε ποσότητα μεταξύ 2% - 5% και pH 6. Οι συνθέσεις τοπικής χρήσης μπορεί να είναι συνδυασμός ενζύμων με περισσότερα από ένα βιολογικά πρόσθετα. Βοηθά επίσης στη μείωση και την άμβλυση των φακίδων ή των καφέ κηλίδων λόγω της έκθεσης στο ηλιακό φως, λειαίνει το δέρμα και δημιουργεί ένα πιο

υγιές δέρμα. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για το ξεφλούδισμα και την καταπράυνση του δέρματος. (39)

Η εμπορική σημασία της παπαΐνης οφείλεται κυρίως στην ισχυρή πρωτεολυτική της δράση έναντι ενός ευρέος φάσματος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων και διευρυμένων συνθηκών λειτουργίας. Αυτά τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά επέτρεψαν στην παπαΐνη να ηγηθεί στην αγορά πρωτεασών, ξεπερνώντας άλλες πρωτεάσες φυτικής προέλευσης, όπως η βρωμελίνη και η φικίνη, καθώς και πρωτεάσες μυκητιακής προέλευσης. (45)

#### **2.5.4 Βρωμελίνη**

Η βρωμελίνη είναι ένα ακατέργαστο εκχύλισμα που προέρχεται από φυτό ανανά (Ανανάς *Comocus L.*) και περιέχει κυρίως μείγμα πρωτεολυτικών ενζύμων. Μπορεί να βρεθεί σε πολλά μέρη του φυτού, συμπεριλαμβανομένου του στελέχους, των καρπών, των φύλλων και της φλούδας του, μόνο το στέλεχος και ο καρπός, ωστόσο, παράγουν υψηλές ποσότητες βρωμελίνης. (46) Η βρωμελίνη είναι ο γενικός όρος που χρησιμοποιείται για μια ομάδα πρωτεολυτικών ενζύμων που συνδέονται με πιο ειδικές ενδοπεπτιδάσες που υπάρχουν στον ιστό της οικογένειας των φυτών *Bromeliaceae* και αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1876, αν και δεν απομονώθηκε πλήρως, αλλά καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε παρά πολύ αργότερα και από τότε χρησιμοποιείται ως φυτοϊατρική ένωση και έχει ερευνηθεί ευρέως. (47)

Αν και το φυτό ανανά περιέχει μια μικρή ποσότητα άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η αναναΐνη και η κομοζαΐνη, η βρωμελίνη παραμένει το κύριο ένζυμο και υπάρχει σε αφθονία τόσο στο στέλεχος όσο και στον καρπό των φυτών ανανά, με πολύ περισσότερη βρωμελίνη στο στέλεχος του. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι μπορεί επίσης να εξαχθεί σε μικρές ποσότητες από άλλα τμήματα του φοίνικα, όπως το ριζικό σύστημα, τα φύλλα και το φλοιό. (47,48)

Η βρωμελίνη που απομονώθηκε από τον καρπό του ανανά αναφέρεται ως βρωμελίνη φρούτων (FBM) (EC3.4.22.33), ενώ η βρωμελίνη που απομονώθηκε από το μίσχο του ανανά αναφέρεται ως βρωμελίνη στελέχους (SBM) (EC 3.4.22.32) και είναι το πιο συχνά διαθέσιμο εμπορικό προϊόν. Το μοριακό βάρος της καθαρής βρωμελίνης στελέχους είναι 23,40–35,73 kDa και της βρωμελίνης φρούτων 31,00 kDa. Το ισοηλεκτρικό σημείο της βρωμελίνης στελέχους και φρούτων είναι σε pH 9,55 και 4,6,

αντίστοιχα. (46,48) Τόσο η βρωμελίνη του στελέχους όσο και του φρούτου παράγονται εντελώς διακριτά και απομονώνονται ως γλυκοζυλιωμένες, μονομερείς μεμονωμένες πρωτεΐνες με βέλτιστο εύρος pH 6–7. (47)

Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν επτά υπολείμματα κυστεΐνης και τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς και μπορούν να ταξινομηθούν ως πρωτεΐνάσες κυστεΐνης, που ανήκουν στην κοινή ομάδα σουλφυδρυλικών πρωτεολυτικών ενζύμων. Η βρωμελίνη θεωρείται επίσης μια ενδοπεπτιδάση θειόλης (ένζυμο εσωτερικής κάθαρσης), με τη δράση όλων των ενδοπεπτιδασών σουλφυδρυλίου ανάλογα με την ομάδα θειόλης (SH) στο υπόλειμμα κυστεΐνης και είναι σταθερή για μεγάλο χρονικό διάστημα εάν αποθηκεύεται κάτω - 20°C. (47)

Όπως και άλλες πρωτεάσες κυστεΐνης, τα φασματικά χαρακτηριστικά της βρωμελίνης στελέχους υποδηλώνουν ότι αυτό το ένζυμο ανήκει στην κατηγορία πρωτεϊνών με 23% α-έλικα, 5% παράλληλο β-φύλλο, 18% αντιπαράλληλο β-φύλλο, 28% στροφές και υπόλοιπες άλλες δευτερεύουσες δομές. (46) Η βρωμελίνη στελέχους περιέχει 285 αμινοξέα, όπου τα πιο άφθονα αμινοξέα είναι η αλανίνη και η γλυκίνη, ενώ η ιστιδίνη και η μεθειονίνη είναι παρούσες στις χαμηλότερες ποσότητες. (46, 48) Αποτελεί μια ενδοπρωτεάση που σπάει τους πεπτιδικούς δεσμούς μέσα στο μόριο της πρωτεΐνης και ανήκει στην οικογένεια της παπαΐνης και μοιάζει στην ευθυγράμμιση της αλληλουχίας των αμινοξέων της. Επίσης παρατηρείται μια σημαντική ομοιότητα στον μηχανισμό δράσης τους, όπου ο μη ομοιοπολικός δεσμός περιλαμβάνει το ελεύθερο ένζυμο (δομή α) και το υπόστρωμα για να σχηματιστεί το σύμπλοκο (δομή β) (48)

Ως πρωτεάση κυστεΐνης, ο καταλυτικός μηχανισμός της περιλαμβάνει την οξειδωση των σουλφυδρυλικών (-SH) ομάδων στις ενεργές θέσεις για να σχηματιστούν δισουλφιδικές γέφυρες. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε αυτοπρωτεολυτική διάσπαση και σε απώλεια δραστηριότητας, γι αυτό η χρήση χημικών ουσιών, όπως άλατα σουλφιδίων και θεικών αλάτων, μπορεί να προστατεύσει την ομάδα σουλφυδρυλίου, ελαχιστοποιώντας έτσι την οξειδωση στο διάλυμα εκχύλισης, βελτιώνοντας τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών και διατηρώντας τη δραστηριότητα της βρωμελίνης. (49)

### **Εφαρμογές**

Η βρωμελίνη βρίσκεται ευρέως διαδεδομένες εφαρμογές σε πολλούς τομείς και έχει χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανίες τροφίμων, ιατρικής, φαρμακευτικής και καλλυντικών,

για θεραπευτικούς λόγους, για χειρουργική φροντίδα και συναφείς καταστάσεις. (46,50) Επίσης η βρωμελίνη έχει χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανίες, όπως η ζυθοποιία, η ένδυση, σε εμπορικά σκευάσματα, σε συμπληρώματα διατροφής, για την τρυφεροποίηση, την παρασκευή και το ψήσιμο του κρέατος, καθώς και για την παραγωγή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων. Στο μαύρισμα του δέρματος και των υφασμάτων, στην αποτρίχωση, στη μαλακότητα του δέρματος και τις συνθέσεις απορρυπαντικών. (49)

Στα καλλυντικά, η βρωμελίνη χρησιμοποιείται ως ενεργό συστατικό σε προϊόντα περιποίησης δέρματος, λόγω των απολεπιστικών τις ιδιοτήτων. Επίσης εφαρμόζεται αποτελεσματικά στην πρόληψη και θεραπεία τις κυτταρίτιδας, έχει καταπραϋντική δράση σε τραυματισμούς που προκαλούνται από το ξύρισμα, μειώνει την ένταση των δερματικών κηλίδων και προάγει την ανανέωση του δέρματος. Συνιστάται για την αφαίρεση υπολειμμάτων από το καμένο δέρμα, την πρόληψη του σχηματισμού οιδήματος και τη μείωση του υπάρχοντος. (50)

Τα καλλυντικά προϊόντα που έχουν παπαΐνη και βρωμελίνη ως ενεργά συστατικά μπορούν να ανακουφίσουν αποτελεσματικά δερματικά προβλήματα, την ξηροδερμία, τις ρυτίδες και την ακμή. Αυτά τα ένζυμα αφομοιώνουν ήπια την πρωτεΐνη των νεκρών κυττάρων στο ανώτερο στρώμα του δέρματος, με αποτέλεσμα την αντικατάστασή τις από νεότερα κύτταρα. Η βρωμελίνη μπορεί τις να μειώσει τις μώλωπες και το πρήξιμο του δέρματος. (48) Λόγω τις ικανότητάς τις να διασπά πρωτεολυτικά την πρωτεογλυκάνη που συσσωρεύεται στην εξωκυτταρική μήτρα διογκώνοντας τον ιστό και να μειώνει το πρήξιμο, η βρωμελίνη μπορεί να είναι αποτελεσματική στη θεραπεία και την πρόληψη τις κυτταρίτιδας. (49)

Ως φυτοϊατρική ένωση, η βρωμελίνη αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει μια σειρά από ευεργετικές τις. Η βρωμελίνη έχει αποδειχθεί ότι αντιπροσωπεύει έναν κρίσιμο ρόλο ως αντιοιδηματικός, ινωδολυτικός, αντικαρκινικός, αντιφλεγμονώδης, αντιβιοτικός, αντιπηκτικός και αντιθρομβωτικός παράγοντας. Επιπλέον, μπορεί να έχει ευεργετικές ιδιότητες αναλγητικού τύπου που μπορούν να βοηθήσουν στην επούλωση και στην ελαχιστοποίηση του μετεγχειρητικού πόνου και του οιδήματος. Επιπλέον, η βρωμελίνη έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την ανάκτηση μετά από βλάβη των ιστών και ενισχύει την απορρόφηση του φαρμάκου, ιδιαίτερα για τα αντιβιοτικά. (47)

Η αφαίρεση κατεστραμμένου δερματικού ιστού από πληγές ή εγκαύματα δεύτερου/τρίτου βαθμού γίνεται με καθαρισμό και/ή η εξάλειψη τις εσχάρων και είναι ένα σημαντικό βήμα στη θεραπεία των έντονων και πλήρους πάχους εγκαυμάτων. Στοχεύει στη μείωση της βιοφόρτισης του τραύματος και επιτρέπει την πρόωμη επούλωση των πληγών με προσεκτική φροντίδα ή μόσχευμα δέρματος. Η αποτελεσματική αφαίρεση του εσχάρων εντός 72 ωρών πιστεύεται ότι ενισχύει το αποτέλεσμα της θεραπείας του εγκαύματος. (47)

Ένα σύστημα χορήγησης φαρμάκων με βάση τα λιπίδια, όταν εφαρμόζεται ως κρέμα που περιέχει 35% βρωμελίνη σε λιπιδική βάση, μπορεί να είναι ευεργετική στην απομάκρυνση του νεκρωτικού ιστού και να επιταχύνει την επούλωση. Ο ενζυματικός καθαρισμός με βρωμελίνη προτιμάται έναντι του χειρουργικού καθαρισμού καθώς η χειρουργική τομή είναι επώδυνη, μη εκλεκτική και εκθέτει τον ασθενή σε κινδύνους επαναλαμβανόμενης αναισθησίας και σημαντικής αιμορραγίας. Η βρωμελίνη διευκολύνει τον μηχανισμό απομάκρυνσης και παρέχει βελτιωμένη, ταχύτερη επούλωση και αποτελεσματική επαναεπιθηλιοποίηση. (47,50)

Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν την τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA για να παράγουν μεγάλης κλίμακας και καθαρισμένη βρωμελίνη. Η βρωμελίνη απορροφάται αποτελεσματικά στο ανθρώπινο σώμα και επομένως έχει υψηλή βιοδιαθεσιμότητα σε μια *in vitro* μελέτη. Σήμερα οι ερευνητές έχουν εστιάσει τις προσπάθειές τους στην αναζήτηση εναλλακτικών και πιο αποτελεσματικών μεθόδων για την απόκτηση καθαρισμένης βρωμελίνης σε λιγότερα και πιο οικονομικά βήματα. Διαδικασίες μικροπολλαπλασιασμού, αντίστροφα μικκυλιακά συστήματα, διήθηση μεμβράνης και υδατική εκχύλιση δύο φάσεων είναι κάποιες από τις πολλά υποσχόμενες μέθοδοι εκχύλισης της βρωμελίνης. (47)

### **2.5.5 Κερατινάσες**

Η κερατίνη είναι ένα αδιάλυτο μακρομόριο που απαιτεί την έκκριση εξωκυτταρικού πρωτεολυτικού ενζύμου για τη βιοαποδόμησή του και μια από τις πιο άφθονες δομικές πρωτεΐνες στον κόσμο. Ιστορικά, ο όρος «κερατίνη» περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που εξάγονται από τροποποιήσεις του δέρματος, τα κέρατα, τα νύχια και τις οπλές. Στην πορεία, έγινε αντιληπτό ότι η κερατίνη δεν είναι μια ενιαία ουσία, αλλά αποτελείται

από ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών που σχετίζονται με νημάτια κερατίνης (KFAPs) και ένζυμα που εξάγονται από διάφορα επιθήλια. (51)

Επί του παρόντος, ο όρος «κερατίνη» καλύπτει τις ενδιάμεσες πρωτεΐνες που σχηματίζουν νήματα και παράγονται σε οποιοδήποτε επιθήλιο σπονδυλωτών με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Βρίσκεται κυρίως σε ιστούς ερπετών, πτηνών, αμφιβίων και θηλαστικών, αλλά και τις τύπους επιθηλιακών κυττάρων των πεπτικών οργάνων (ήπαρ, πάγκρεας, έντερο και χοληδόχος κύστη). (51)

Η κερατίνη είναι μια σκληρή και χημικά μη αντιδραστική πρωτεΐνη που έχει υψηλή σταθερότητα και χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης υπό συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος. Ο πρωταρχικός της ρόλος είναι να σχηματίζει το εξωτερικό κάλυμμα των ανθρώπινων και ζωικών οργάνων, ώστε να αποφευχθεί η απώλεια σωματικών υγρών από αυτά. Άλλοι ρόλοι της είναι η κυτταρική σηματοδότηση, η ρύθμιση της διαθεσιμότητας άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών και η λειτουργία της ως πρωτεΐνη του στρες (51)

Οι κερατίνες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τις φυσικοχημικές τις ιδιότητες, τη μοριακή της δομή και τα προκύπτοντα επιθηλιακά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη τη δευτερογενή δομή, μπορούν να ταξινομηθούν σε α-κερατίνη και β-κερατίνη. Η α-κερατίνη είναι το κύριο συστατικό των τριχών, των οπλών, των νυχιών, των κεράτων και τις κερατίνης στιβάδας και η β-κερατίνη υπάρχει στα φτερά, στα ράμφη, στα νύχια των πτηνών και των ερπετών και στα λέπια. Η υψηλή περιεκτικότητα της στην κύρια αλληλουχία των κερατινών τις διαφοροποιεί από τις ινώδεις πρωτεΐνες, το κολλαγόνο και την ελαστίνη. (52)

Οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των υπολειμμάτων κυστεΐνης που εμφανίζονται μεταξύ και εντός των πολυπεπτιδίων κερατίνης, των δεσμών υδρογόνου και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, συμβάλλουν στη συμπαγή της διαμόρφωση και στην υψηλή μοριακή της σταθερότητα. (52) Τα ινίδια κερατίνης και για τις δύο διαμορφώσεις συστρέφονται με παράλληλο τρόπο για να σχηματίσουν μικρο και μακρο ινίδια που εγγυώνται σταθερότητα στην ίνα. (53)

Ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε θείο οι κερατίνες ομαδοποιούνται σε σκληρές και μαλακές. Οι σκληρές κερατίνες βρίσκονται στα φτερά, στα μαλλιά, τις οπλές και στα νύχια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε δισουλφιδικούς δεσμούς που τις προσδίδει σκληρότητα και μη εκτατότητα και περιέχουν έως και 1% θείο. Ενώ, οι μαλακές

κερατίνες όπως το δέρμα και ο κάλος έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε δισουλφιδικούς δεσμούς, είναι πιο εύκαμπτες και περιέχουν έως και 5% θείο. (51,53) Ως εκ τούτου, η βιοαποδόμηση από κοινά πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η πεψίνη, η θρυψίνη και η παπαΐνη παρεμποδίζεται, καθώς οι κερατινάσες είναι η μόνη κατηγορία ενζύμων ικανών να αποδομήσουν τις κερατίνες. (10,52.53)

Οι κερατινάσες (EC 3.4.21/24/99.11) είναι ένας συγκεκριμένος τύπος πρωτεολυτικών ενζύμων που έχουν την τάση να υδρολύουν τις ινώδεις, αδιάλυτες και εξαιρετικά σταθερές κερατίνες και να επιτίθενται στον δισουλφιδικό δεσμό ( $-S-S-$ ) των υποστρωμάτων κερατίνης. (51,55) Ανήκουν στην ομάδα των πεπτιδασών και είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση τις κερατίνης και άλλων πρωτεϊνών. Οι περισσότερες από αυτές είναι αλκαλικά ένζυμα σερίνης ή μετάλλων, με λίγες αναφορές σε ασπαρτυλοκερατινάσες από ζυμομύκητες. (52)

Είναι ισχυρά ένζυμα που παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά και ξεχωρίζουν από τις συμβατικές πρωτεάσες επειδή είναι οι μόνες που μπορεί να επιτεθούν και να αποικοδομήσουν πλήρως αυτές τις κερατίνες. Οι κερατινάσες από διάφορους μικροοργανισμούς έχουν μελετηθεί εκτενώς και οι συμβατικές βιοχημικές ιδιότητες όπως το pH, η θερμοκρασία, η μοριακή μάζα, ο καταλυτικός τύπος και η σταθερότητά τους παρουσία διαφόρων απορρυπαντικών και οργανικών διαλυτών έχουν περιγραφεί λεπτομερώς σε διάφορες ανασκοπήσεις. Η πιο σημαντική ιδιότητα των κερατινών είναι η ειδικότητα του υποστρώματος τους και για αυτό το λόγο βρίσκουν τεράστιες εφαρμογές σε διάφορους περιβαλλοντικούς και βιοτεχνολογικούς τομείς όπου οι συμβατικές πρωτεάσες υστερούν. (51, 53)

Γενικά, το μέγιστο εύρος pH κερατινολυτικής δραστηριότητας είναι μεταξύ 7 και 12,5 και η βέλτιστη θερμοκρασία των κερατινών κυμαίνεται από 30 έως 80°C. (52,53) Μια επισκόπηση της βιβλιογραφίας για τη σταθερότητα του pH και της θερμοκρασίας δείχνει ότι οι κερατινάσες είναι γενικά ενεργές και σταθερές σε ένα pH από 5 έως 13, αν και μερικές κερατινάσες διαθέτουν ακραία αλκαλόφιλα βέλτιστα  $pH > 12$ . Έχουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος και είναι δραστικές έναντι τόσο διαλυτών όσο και αδιάλυτων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. (53)

Για να επιτευχθούν υψηλά επίπεδα ενζυμικής αποικοδόμησης της κερατίνης, απαιτούνται κερατινάσες, κάποια άλλα βοηθητικά ένζυμα (πεπτιδάσες και δισουλφιδικές αναγωγάσες) ή/και αναγωγικοί παράγοντες, όπωςθειώδη ιόντα (θειώδη,



διθειώδη και δισουλφίδιο). Δεδομένου ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι απαραίτητοι για την αναδίπλωση τις κερατίνης, το σπάσιμο αυτών των δεσμών είναι ένα κρίσιμο βήμα για τη διευκόλυνση τις πρόσβασης της κερατινάσης στο υπόστρωμα. (52)

Ο πολύπλοκος μηχανισμός της κερατινόλυσης περιλαμβάνει δύο στάδια που δρουν συνεργατικά: τη σουλφόλυση ή μείωση των δισουλφιδικών δεσμών και την πρωτεόλυση. Η σουλφιτόλυση απαιτεί την παρουσία ζωντανών κυττάρων αναγωγικά όπως θειώδες νάτριο, DTT, μερκαπτοαιθανόλη, γλουταθειόνη, κυστεΐνη και θειογλυκολικό ή δισουλφιδικές αναγωγάσες, οι οποίες δρουν σε συνεργασία με τις κερατινολυτικές πρωτεάσες για να επιφέρουν πλήρη αποικοδόμηση τις κερατίνης. (53) Σε αυτή τη διαδικασία, οι κρυσταλλικές και διασυνδεδεμένες δομές τις κερατίνης σπάνε με αποτέλεσμα ένα υδρόλυμα που αποτελείται κυρίως από διαλυτά ολιγοπεπτίδια και αμινοξέα, αποδίδει μια μερικώς τεμαχισμένη πρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την πρωτεάση. (51,52)

Έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και με την παρουσία οξειδοαναγωγής, μόνο οι κερατινάσες μπορούν να διευκολύνουν την αποικοδόμηση της κερατίνης, οι συμβατικές πρωτεάσες δεν μπορούν να την αποικοδομήσουν χωρίς τη βοήθεια κερατινών καθώς η επιφάνεια τις είναι πλούσια σε υδρόφοβα υπολείμματα αμινοξέων που απαιτείται να διασπαστούν από τις κερατινάσες. Ωστόσο, μετά το αρχικό «σκάρωμα», η κερατίνη γίνεται ευάλωτη στην αποικοδόμηση από τις μη κερατινολυτικές πρωτεάσες. (Εικόνα 2.11) (54)

## **Εφαρμογές**

Οι κερατινάσες που δεν μπορούν να προκαλέσουν κολλαγονόλυση είναι πολύ χρήσιμες στη φαρμακευτική και καλλυντική βιομηχανία. Ένας αριθμός καταναλωτικών προϊόντων με βάση τις κερατινάσες είναι διαθέσιμος στην αγορά, από καθαριστικά έως προϊόντα προσωπικής φροντίδας, όπως σαμπουάν, διάφορα καλλυντικά και καλλυντικές εφαρμογές ειδικά για τη θεραπεία ακμής, όπως κερατινάσες από *B. Licheniformis* και *E. Coli*. Ομοίως, οι κερατινάσες χρησιμοποιείται σε παρασκευάσματα απολέπισης προσώπου, τα οποία έχουν βρεθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματικά για τη θεραπεία τις ακμής. (51) Οι κερατινάσες βρίσκουν προοπτικές εφαρμογής σε άλλα προϊόντα προσωπικής φροντίδας συμπεριλαμβανομένης τις καλλυντικής λεύκανσης και λεύκανσης του δέρματος, (51,55)

Επίσης οι κερατινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην περιποίηση μαλλιών με τη χρήση μικροβιακών κερατινασών για τη λήψη προϊόντων υδρόλυσης. Αποδείχτηκε ο ρόλος της υδρόλυσης της κερατίνης που λαμβάνεται από *Stenotrophomonas maltophilia* ως προστατευτικό μαλλιών και η βελτίωση της ελαστικότητας και της δύναμης για τα κανονικά και ταλαιπωρημένα μαλλιά. Ακόμη, παρασκευάστηκε με επιτυχία ένα ήπιο σαμπουάν και ένα κοντίσιονερ με το ενζυμικό υδρόλυμα που φάνηκε να αυξάνει τη φωτεινότητα και την απαλότητα των μαλλιών. Μερικά σαμπουάν κατά τις πιτυρίδας περιέχουν κερατινάσες επειδή η κερατινολυτική τις δράση επιτρέπει στο σαμπουάν να ξεπλένει τα νεκρά κύτταρα που ξεφλουδίζουν. (51)

Οι κερατινάσες έχουν τις εγκριθεί για τη θεραπεία της ψωρίασης από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων, αφού έχουν την ικανότητα να απολεπίζουν το νεκρό δέρμα ενώ αντικαθιστούν τις παραδοσιακές μεθόδους. Προτάθηκε επίσης η δυνατότητα των κερατινασών για την αφαίρεση κάλων και για τον εκφυλισμό του καλυμμένου δέρματος με κερατίνη (σκλήρυνση). (51,52,55). Η Proteos Biotech παράγει δύο τύπους εμπορικών προϊόντων: Keratoclean Hydra PB και Pure100 Keratinase, για την αφαίρεση σκληρύνσεων και κάλων και Keratoclean Sensitive PB και Keatopeel PB για τη θεραπεία της ακμής. (51)

Σε καλλυντικές εφαρμογές, η κερατινάση έχει δοκιμαστεί για την ανάπτυξη σκευασμάτων κρέμας για την αφαίρεση των τριχών και για την περιποίηση του δέρματος και των μαλλιών. Περιγράφηκε ότι η κερατινάση από το *Bacillus subtilis* DP1 επέδειξε συμβατότητα με τη σύνθεση κρέμας, με αποτέλεσμα την επιτυχή αποτρίχωση από τα αυτιά κουνελιού. Σε μια άλλη ανάλυση, η κερατινάση από το *Bacillus subtilis* AMR αξιολογήθηκε για την παραγωγή του προϊόντος υδρόλυσης κερατίνης ενσωματώθηκε σε σύνθεση σαμπουάν, για ενυδατική χρήση. (52)

Στο φαρμακευτικό τομέα, οι κερατινάσες έχουν δοκιμαστεί για αποικοδόμηση του κερατινώδους υλικού για τη βελτίωση της διείσδυσης του φαρμάκου και πιθανώς για εφαρμογή στη θεραπεία της νόσου των νυχιών που είναι ένα πολύ ανθεκτικό φράγμα για τα φάρμακα. (52) Σε πειράματα των Rai et al. (2020) χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) ακινητοποιημένα με β-κερατινάση, όπου παρατηρήθηκε ότι η β-κερατινάση μπορεί να ενισχύσει τη με βακτηριοκτόνο δράση τους. Επίσης έχει αναφερθεί η δράση αντιβιοφίλμ και η δράση διασποράς του βιοφίλμ

για τη κερατινάση *Stenotrophomonas maltophilia* K<sub>b</sub>2 κατά των παθογόνων βακτηρίων *St. Aureus* και *E. Coli*. (56)

Οι κερατινάσες μπορούν να προταθούν για την εκχύλιση κερατίνης που θα χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή βιοϋλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τέτοιο παράδειγμα, είναι η αξιολόγηση της εκχυλισμένης κερατίνης ως προς το δυναμικό της, στην παραγωγή υδρογέλης για την εφαρμογή στην επούλωση πληγών και για την απολύμανση πριόν, η οποία θα μπορούσε να συμβάλει στην αποφυγή τις καύσης ιατρικού εξοπλισμού και δειγμάτων. (52)

Οι κερατινάσες λόγω τις ευρείας δράσης τις θεωρούνται βιώσιμα υποκατάστατα για χημικές και θερμικές επεξεργασίες βιομηχανικών υποπροϊόντων πλούσια σε πρωτεΐνες. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνικών υπολειμμάτων, έχει δοθεί έμφαση στα κερατινώδη υλικά, όπου η απόρριψη τους με μεθόδους σκληρών συνθηκών, δεν θεωρείται οικολογικά ασφαλής. (52)

Η πιο κοινή εφαρμογή είναι η αποικοδόμηση των αποβλήτων κερατίνης από την πτηνοτροφία, τα σφαγεία και γενικά από τις βιομηχανίες δέρματος. Τα απόβλητα πουλερικών έχουν μια ποικιλία παθογόνων παραγόντων που είναι επικίνδυνα για το περιβάλλον και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών. Τα μικροβιακά κερατινολυτικά ένζυμα επιτρέπουν την αποικοδόμηση τις κερατίνης υπό ήπιες συνθήκες, με αποτέλεσμα τα υδρολύματα κερατίνης να περιέχουν άθικτα αμινοξέα και πεπτίδια. Εκτός από τη διαχείριση των απορριμμάτων από τα φτερά, παράγει και πολύτιμα υποπροϊόντα, καθώς τα μετατρέπει σε συμπληρώματα ζωοτροφών και λιπάσματα. (55)

Οι κερατινάσες είναι χρήσιμες στην παραγωγή φιλικών προς το περιβάλλον λιπασμάτων, τα υδροσυλικά, που αποτελούν μια εξαιρετική πηγή αζώτου και αμινοξέων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για να αυξάνουν την ποιότητα του εδάφους. Τα υποπροϊόντα των κερατινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, ως συμπληρώματα διατροφής για ζώα, τις είναι η παραγωγή θρεπτικού, πλούσιου σε πρωτεΐνες, οικονομικά αποδοτικού και φιλοπεριβαλλοντικά καλοήθους φτεράλευρου για πουλερικά,. (53)

Επιπλέον οι κερατινάσες είναι γνωστές για την αποτριχωτική τους ικανότητα, δείχνοντας τις πιθανές εφαρμογές τους στη βιομηχανία δέρματος. Αφαιρούν τις τρίχες

από το δέρμα χωρίς να το καταστρέφουν, ούτε και τη δομή τις τρίχας. Η αποτρίχωση με κερατινάσες είναι πολύ αποτελεσματική, φθηνή και φιλική τις το περιβάλλον τεχνική καθώς δεν απελευθερώνει καμία τοξίνη. Τέλος οι κερατινάσες έχουν υψηλό βαθμό ανοχής σε οργανικούς διαλύτες, επιφανειοδραστικές ουσίες και απορρυπαντικά και γι' αυτό έχουν τις πιθανές εφαρμογές τις βιομηχανίες απορρυπαντικών. (55)

Η αναερόβια χώνευση είναι μια πολλά υποσχόμενη βιολογική διαδικασία για την παραγωγή ανανεώσιμης ενέργειας από μια ποικιλία υποστρωμάτων αποβλήτων, όπως τα φτερά. Αυτά τα υλικά υδρολύονται σε αμινοξέα και στη συνέχεια μετατρέπονται σε οργανικά οξέα, αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, υδρογόνο και μικρές ποσότητες θειούχων ενώσεων. Μεταξύ αυτών, το οξικό οξύ, το διοξείδιο του άνθρακα και το υδρογόνο είναι απαραίτητα για την παραγωγή μεθανίου (μεθανογένεση) και οι α- και β-κερατινάσες, χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή μεθανίου. (52,54)

Η βιοεπεξεργασία των αποβλήτων κερατίνης μπορεί να συμβάλει στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων που σχετίζονται με τη διάθεσή τις, αναζητώντας νέες κερατινάσες. Σε μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει κερατινώδη υπολείμματα ως υπόστρωμα σε διεργασίες ζύμωσης, οι οποίες παρέχουν εξοικονομημένες κερατινάσες χαμηλού κόστους (επεξεργασία δέρματος, σκευάσματα απορρυπαντικών) και οικονομικά βιώσιμα προϊόντα αποδόμησης βιομάζας (βιολιπάσματα και πρόσθετα ζωοτροφών). Αν και αρκετές μελέτες αναφέρουν την επιτυχή παραγωγή, καθαρισμό και εφαρμογή κερατινών σε εργαστηριακή κλίμακα, εξακολουθεί να είναι απαραίτητο να αξιοποιηθούν νέες στρατηγικές για τη βελτίωση των αποδόσεων παραγωγής προκειμένου να ικανοποιηθούν οι αυξανόμενες βιομηχανικές απαιτήσεις. (52)

## **2.6 Βιομηχανικές εφαρμογές πρωτεασών**

Οι πρωτεάσες αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία ενζύμων που χρησιμοποιούνται σήμερα στη βιομηχανία με σημαντικές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων (π.χ. τυροκομία, αρτοποιία, παραγωγή μπύρας και αναψυκτικών, ωρίμανση κρέατος κ.α.), των απορρυπαντικών, στην κλωστοϋφαντουργία, στην κατεργασία δέρματος και στην φαρμακευτική βιομηχανία και στην ιατρική. Κατέχουν την πρώτη θέση στην παγκόσμια αγορά των ενζύμων με πωλήσεις που ξεπερνούν τα τρία δισεκατομμύρια δολάρια. (57) Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοτεχνολογία, δεδομένου ότι η πρωτεολυτική τους δράση αλλάζει τις χημικές, φυσικές και βιολογικές

ιδιότητες των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η μελέτη του μηχανισμού δράσης των συγκεκριμένων ενζύμων σε συνθετικά υποστρώματα μπορεί να οδηγήσει σε νέες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. (58)

Κύρια και παρόμοια εφαρμογή των πρωτεασών υφίσταται στην βυρσοδεψία, όπου το δέρμα παράγεται με την επεξεργασία τις βύρσας (τομάρι, ακατέργαστο δέρμα) των θηλαστικών και αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο. Η διαδικασία της παραγωγής του δέρματος είναι πολύπλοκη και οι τεχνικές επεξεργασίας ποικίλουν ανάλογα με το είδος του δέρματος, την προέλευση αλλά και τον παραγωγό. Αναφορά γίνεται για το δέρμα που εμπίπτει στην κατηγορία «ελαφρύ» δέρμα, όπου κατασκευάζονται γάντια, τσάντες, πορτοφόλια, λουράκια ρολογιών, εσωτερικές επενδύσεις υποδημάτων και δέσιμο βιβλίων. Συνήθως κατασκευάζεται από μοσχάρι, κασίκι ή πρόβατο και πρέπει να ικανοποιεί συγκεκριμένες προδιαγραφές όσον αφορά το πάχος, την ευκαμψία, την αντοχή και τη δυνατότητά του να υποστεί τις επεξεργασίες φινιρίσματος. Έτσι, αυτή η κατηγορία δέρματος απαιτεί εξειδικευμένη διαδικασία παραγωγής, η οποία είναι βασικά η ίδια ανεξάρτητα από την τελική χρήση του δέρματος. (59)

Μια ακατέργαστη δορά ζώου που δεν υφίσταται άμεση επεξεργασία αποσυντίθεται γρήγορα από τη δράση μικροοργανισμών που εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα. Η συντήρηση τις βύρσας με ξήρανση ή και αλάτισμα μπορεί να επιβραδύνει ή και να εμποδίσει την αποσύνθεσή του. Η ξήρανση αφυδατώνει τη βύρσα, ελαττώνοντας σημαντικά τις δυνατότητες επιβίωσης των μικροοργανισμών και προκαλεί απώλεια της ευκαμψίας, κάνοντας την σκληρή και άκαμπτη, αλλά με μια ήπια απολυμαντική δράση. Οι επιθυμητές ιδιότητες του δέρματος (αντοχή, απαλότητα και ευκαμψία) επιτυγχάνονται με τη δέψη, το επόμενο στάδιο της επεξεργασίας του, που το καθιστά ταυτόχρονα απρόσβλητο από τη δράση των μικροοργανισμών. (59)

Το ελαφρά δέρματα που πρέπει να διαθέτουν λεπτό κόκκο και απαλή, εύκαμπτη και ελαστική επιφάνεια υφίστανται επεξεργασία με πρωτεολυτικά ένζυμα μετά την ασβέστωση και την αποσάρκωση, η οποία ονομάζεται ενζυμάτωση (Bating). Οι στόχοι της επεξεργασίας τους είναι περαιτέρω απασβέστωση, διάσπαση του σάπωνα ασβεστίου που δημιουργήθηκε με την ασβέστωση, επιπλέον δράση στις πρωτεϊνικές ίνες ώστε να αυξηθεί η ελαστικότητα του δέρματος και η δημιουργία απαλής επιφάνειας με λεπτό κόκκο. (59)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα προκαλούν μια ελεγχόμενη αποσύνθεση του δέρματος με ταυτόχρονη απομάκρυνση των τελευταίων υπολειμμάτων επιδερμίδας. Σχολαστική ρύθμιση τις δόσης, τις θερμοκρασίας, του pH και της διάρκειας της κατεργασίας, επιτρέπουν τη λεπτομερειακή ρύθμιση της αποτελεσματικότητάς της. Σήμερα, παγκρεατικά ένζυμα έχουν αντικαταστήσει τα παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα περιττώματα σκύλων και πτηνών. Μόλις ολοκληρωθεί η ενζυμάτωση, τα δέρματα ξεπλένονται με νερό και στο τέλος το δέρμα απαλλάσσεται από κάθε υπόλειμμα συνδετικού ιστού, επιδερμίδας, τριχών κ.λπ. (59)

Το βασικό συστατικό του δέρματος είναι το κολλαγόνο, μια ινώδης πρωτεΐνη που αποτελείται από μια τριπλή έλικα περιπλεγμένων μεταξύ τις πεπτιδικών αλυσίδων διαφορετικών μηκών. Οι πεπτιδικές αλυσίδες, αποτελούνται από αμινοξέα που συνδέονται μεταξύ τις με πεπτιδικούς δεσμούς και μέσα στη τριπλή έλικα συνδέονται μεταξύ τις με δεσμούς υδρογόνου. Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί στοιχεία που να δείχνουν ότι τα αμινοξέα τις πεπτιδικές αλυσίδες είναι διευθετημένα με κάποια συγκεκριμένη σειρά. (60)

Οι πεπτιδικοί δεσμοί είναι ευαίσθητοι στη δράση των οξέων, των βάσεων και των πρωτεολυτικών ενζύμων, που μπορούν να τις διασπάσουν μειώνοντας έτσι το μήκος των πεπτιδικών αλυσίδων και την αντοχή των ινών του κολλαγόνου (αποπολυμερισμός). Έτσι, προκαλείται χημική αποικοδόμηση του δέρματος με άμεση συνέπεια την ελάττωση των μηχανικών του αντοχών και την υποβάθμιση των φυσικών του ιδιοτήτων. (30) Την ευαισθησία του δέρματος στη δράση των βάσεων εκμεταλλευόμαστε κατά την παραγωγή του δέρματος στο στάδιο τις ασβέστωσης, κατά το οποίο συμβαίνουν σημαντικές τροποποιήσεις του κολλαγόνου, της υδρόλυση των αμιδίων, τροποποίηση της αργινίνης, υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των αλυσίδων του κολλαγόνου, διόγκωση της ινώδους δομής λόγω όσμωσης και απομάκρυνση άλλων ανεπιθύμητων πρωτεϊνών και ουσιών που συνυπάρχουν στο δέρμα μέσω της υδρόλυσης της. (60,61)

Η ευαισθησία του δέρματος στα πρωτεολυτικά ένζυμα αξιοποιείται στο στάδιο της ενζυμάτωσης, όπου επιτυγχάνεται περαιτέρω ελεγχόμενη αποικοδόμηση του κολλαγόνου και απομάκρυνση ανεπιθύμητων προσμείξεων. Η δέψη του δέρματος με άλατα του τρισθενούς χρωμίου, είναι μια πολύπλοκη φυσικοχημική διαδικασία. Το χρώμιο παρουσιάζει ταυτόχρονα δύο σημαντικά πλεονεκτήματα, πρώτον ότι μπορεί να

σχηματίζει πολυπυρηνικά σύμπλοκα όπου σχηματίζονται γέφυρες του τύπου Cr – O – Cr και δεύτερον ότι μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα άλατα μέσω ημιπολικών δεσμών με τα καρβοξύλια του κολλαγόνου. (61)

Κλείνοντας, οι πρωτεάσες συνεισφέρουν το 60% τις συνολικής αγοράς ενζύμων λόγω των πολυάριθμων εφαρμογών τους στη βιομηχανία. Η παραγωγή καθημερινών προϊόντων, όπως πλακάκια, χαρτί, ζωοτροφές, τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και χημικά προϊόντα χρησιμοποιεί πρώτες ύλες και ενέργεια, απελευθερώνοντας μεγάλο αριθμό αποβλήτων που έχουν αρνητικό αντίκτυπο στο περιβάλλον και την ποιότητα της ζωής. (12)

Ο αυξανόμενος παγκόσμιος πληθυσμός και η βελτιωμένη οικονομία σε διάφορες χώρες αυξάνουν την παγκόσμια κατανάλωση και την πίεση στο περιβάλλον, για αυτό το λόγο είναι επιτακτική ανάγκη να διατηρηθούν οι ανθρώπινες επιθυμίες χωρίς να εξαντλούνται οι φυσικοί πόροι. Βιομηχανίες που αναζητούν ορισμένες εναλλακτικές τεχνολογίες σε όλο τον κόσμο που μπορούν να μεταφέρουν μεγάλο αριθμό προϊόντων για να καλύψουν τη ζήτηση κάθε έτους με λιγότερη κατανάλωση φυσικών πόρων. Η ενζυμική επεξεργασία είναι μία από τις βιώσιμες και πολλά υποσχόμενες εναλλακτικές λύσεις στη συμβατική επεξεργασία. (12)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΛΕΠΙΣΗ

#### 3.1 Πρωτεάσες και δέρμα

Το πρώτο προστατευτικό φράγμα παρέχεται από το δέρμα και χρησιμεύει ως διεπαφή μεταξύ του οργανισμού και του έξω κόσμου, εξυπηρετώντας πολλές διαφορετικές λειτουργίες, όπως η διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος, η κατακράτηση σωματικών υγρών και η προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, η πρόληψη διείσδυσης χημικών και αλλεργιογόνων στο δέρμα. (18,62) Αυτή η ορατή και απτή μεμβράνη είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία του σώματος. Ωστόσο, το φράγμα δεν είναι τέλειο και παραμένει διαπερατό, αφού παρατηρείται ενσωματωμένη απώλεια νερού που διαφεύγει από τη ζώσα επιδερμίδα στο περιβάλλον για να δημιουργήσει μια υδάτινη βαθμιαία δραστηριότητα εντός της SC που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της. Ο ρόλος του νερού είναι να πλαστικοποιεί την κερατίνη εντός των κερατινοκυττάρων της SC για να εξασφαλίσει την ευελιξία τους, έτσι ώστε να μην γίνονται εύθραυστα και ραγίζουν τη δομή του SC. (62)

Επιπλέον, μια ποικιλία ενζυμικών αντιδράσεων, ειδικά πρωτεολυτικών οδών, συμβαίνουν μέσα στον ιστό για να διασφαλιστεί ότι υπάρχει μια ομαλή και μη αντιληπτή απώλεια κερατινοκυττάρων από τα επιφανειακά στρώματα του δέρματος, τα οποία στη συνέχεια αντικαθίστανται με έναν συνεχή μετασχηματισμό διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Αυτή η τακτική διαδικασία απώλειας κερατινοκυττάρων από την επιφάνεια του δέρματος ονομάζεται απολέπιση και μπορεί να πάει στραβά σε περίπτωση που η επιδερμίδα «ξεγελαστεί» από το περιβάλλον δημιουργώντας μια ασθενέστερη και λιγότερο λειτουργική SC που πιθανότατα οφείλεται στις αλλαγές υγρασίας. Η αφυδάτωση μπορεί να βλάψει τα συστατικά μέρη της SC, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεασών, οδηγώντας σε ξηρότητα ή σε ένα λεπτότερο φράγμα, με βαθιές συνέπειες για το δέρμα. Ανεξάρτητα από το πάχος της SC, οι πρωτεάσες είναι αυτές που ελέγχουν τα τελικά στάδια της απολέπισης μέσω της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης των κερατοδεσμοσωμάτων. (62)

Εντός της επιδερμίδας υπάρχουν δύο ενδογενείς πρωτεάσες που μπορεί να διαδραματίσουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία απολέπισης, το χυμοτροπτικό ένζυμο



της κεράτινης στιβάδας (SCCE) και το τρυπτικό ένζυμο (SCTE). Υπάρχουν κανονικά στο κοκκώδες στρώμα της επιδερμίδας και υδρολύουν τις δεσμοσωμικές συμφύσεις των ενδοκεράτιων κυττάρων. (32, 63, 64) Έχει αναφερθεί ότι οι εξωγενείς πρωτεάσες όπως η θρυψίνη και η παπαΐνη είναι ικανές να αφομοιώνουν τις μεσοκυτταρικές δεσμοσωμικές πρωτεΐνες με παρόμοιο τρόπο. Σε μοριακό επίπεδο, προβλέπονται τουλάχιστον 75 πιθανές θέσεις θρυπτικής διάσπασης για τις δεσμοσωμικές πρωτεΐνες δεσμογλεΐνη 1 και 3. Η θρυψίνη μπορεί να διασπάσει πεπτίδια στην καρβοξυτελική πλευρά των υπολειμμάτων αμινοξέων λυσίνης και αργινίνης και μπορεί επίσης να υδρολύσει εστερικούς και αμιδικούς δεσμούς συνθετικών παραγώγων αμινοξέων. Επιπλέον, η *in vitro* ενζυμική πέψη των δεσμοσωμάτων μπορεί να προκαλέσει επιδερμική ακανθόλυση και διάλυση. (32, 64). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ένα ρόλο για τις πρωτεάσες στη φυσιολογική επιδερμική εναλλαγή και ο υδρολυτικός μηχανισμός δράσης των τοπικά εφαρμοζόμενων πρωτεασών παράγει ένα κλινικά διακριτό μοτίβο επιδερμικού τραυματισμού. (32)

Οι πρωτεάσες είναι ήδη γνωστό ότι είναι παρούσες σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που συμμετέχουν στον κύκλο ζωής. Οι ενδογενείς πρωτεάσες όσο και οι αναστολές πρωτεάσης παίζουν ζωτικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής και δομικής ακεραιότητας του δέρματος και των φυσιολογικών λειτουργιών του, όπως την απολέπιση της κεράτινης στιβάδας που συμβάλει στη διατήρηση της υγείας του. Ανωμαλίες στη λειτουργία ή στη δραστηριότητα των πρωτεασών μπορεί να παρουσιαστούν σε ορισμένες ασθένειες, όπως ροδόχρους ακμή, ατοπική δερματίτιδα, ψωρίαση, ανοσολογικές ασθένειες. Η απολέπιση της υγιούς επιδερμίδας ενσωματώνει ένα προς ένα, τον σχηματισμό κερατινοκυττάρων από τη βασική στιβάδα μέχρι την απόπτωση τους, χωρίς να προκύψει βλάβη στη λειτουργία του φραγμού διαπερατότητας της SC. (9)

Η επιδερμική διαφοροποίηση απαιτεί ένα σύστημα πρωτεολυτικών ενζύμων που είναι τόσο καλά συντονισμένα χρονικά και χωροταξικά, ώστε να επιτρέπει τη φυσιολογική αποκόλληση τους. Οι λειτουργίες του επιδερμικού φραγμού και η φυσιολογική απολέπιση εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις αρκετών πρωτεασών και αναστολέων πρωτεάσης, οι οποίοι απαιτούν κατάλληλο μέγεθος, επαρκή περιεκτικότητα σε νερό και κλίση της CS για την επίτευξη βέλτιστης λειτουργίας. Με την πάροδο του χρόνου ο ρυθμός απολέπισης και αντικατάστασης των επιδερμικών κυττάρων μειώνεται σημαντικά. Η αποσύνδεση των χαμένων κερατινοκυττάρων που έχουν αποκολληθεί

έναντι των νέων επιδερμικών κυττάρων αντικατάστασης σχετίζεται μερικώς με μειωμένη δραστηριότητα των ενδογενών πρωτεασών και συνδυάζεται με τη δυσλειτουργία του φραγμού διαπερατότητας και τη δημιουργία ξηροδερμίας. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης, οι ασπαρτικές πρωτεάσες και οι πρωτεάσες θρεονίνης πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη διαδικασία απολέπισης. (9)

Αυτές οι πρωτεάσες ελέγχουν τη διαδικασία απολέπισης, οι οποίες υδρολύουν τα κορνεοδεσμοσώματα απελευθερώνοντας τα νεκρά κύτταρα στην επιφάνεια του δέρματος, όπου ελέγχονται από μια σειρά γεγονότων και έναν μοριακό μηχανισμό που δεν είναι πλήρως γνωστός. Έχει αποδειχθεί ότι αυτά τα συγκεκριμένα ένζυμα παράγονται στα κερατινοκύτταρα και η ομάδα θειόλης που υπάρχει στην ενεργό θέση τους είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού, πιο αποτελεσματικά από το τριγλυκολικό οξύ και την κυστεΐνη. Η πρωτεάση θειόλης, εκφράζεται ως προένζυμο, στα κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας και ενεργοποιείται από έναν μη αναγνωρισμένο μηχανισμό στα ανώτερα στρώματα κατά τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων. (63)

Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1980 οι πρωτεάσες σερίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία απολέπισης, όπως φαίνεται από την ικανότητα των αναστολέων πρωτεάσης σερίνης να αναστέλλουν την αποβολή κυττάρων από το ανθρώπινο πελματιαίο δέρμα *in vitro*. Οι δραστηριότητες της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης μπορούν να ανιχνευθούν στη SC και ανατέθηκαν στο θρυπτικό ένζυμο της κεράτινης στιβάδας (SCTE, γνωστό ως πεπτιδάση 5), που σχετίζεται με την η KLK5, στο χυμοτρυπτικό ένζυμο κεράτινης στιβάδας (SCCE, γνωστό ως KLK7) και στο KLK14, το οποίο εμφανίζει παρόμοια ειδικότητα με την θρυψίνη. Αργότερα, ανακαλύφθηκαν και άλλες καλλικρεΐνες, εκ των οποίων 8 από τις 15 του ανθρώπινου ιστού εκφράζονται στην επιδερμίδα. (18)

Η βιολογική σημασία αυτών των άφθονων υποστρωμάτων πρωτεάσης για την ομοίωση του δέρματος και ο καταρράκτης σηματοδότησης των καλλικρεϊνών οδηγεί σε απολέπιση. Το KLK5 μπορεί να ενεργοποιηθεί αυτόματα ή να ενεργοποιηθεί από το KLK14 και στη συνέχεια να ενεργοποιήσει το KLK7. Μαζί με άλλες πρωτεάσες (KLK5 και KLK8), το KLK7 μπορεί στη συνέχεια να αποικοδομήσει τα κερατοδεσμοσώματα στη SC. Τέλος, η κύρια σημασία του ελέγχου της δραστηριότητας πρωτεάσης στο δέρμα σε ομοιοστατικές και φλεγμονώδεις καταστάσεις απεικονίζεται

από την παρουσία ευρέου φάσματος αναστολέων πρωτεάσης στην επιδερμίδα. Ο καταρράκτης σηματοδότησης μητριπασοπροστασί-νης ελέγχεται, εν μέρει, από τον αναστολέα πρωτεάσης σερίνης HAI-1. (18)

Η μητριπτάση (επίσης γνωστή ως MT-SP1, επιθίνη ή TADG15) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης τύπου II που εκφράζεται στους περισσότερους επιθηλιακούς ιστούς και στο ανώτερο στρώμα της μεσοθυλακικής επιδερμίδας. Η μητριπτάση περιέχει μια N-τερματική ενδοκυτταρική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή, μια περιοχή εξωκυτταρικού στελέχους με πολλαπλές ρυθμιστικές περιοχές και μια C-τερματική περιοχή πρωτεάσης σερίνης παρόμοιας δραστηριότητας με την θρυψίνη. Η δραστηριότητα της εξαρτάται αποκλειστικά από την καταλυτική περιοχή της και ο μηχανισμός που προτείνεται για την ενεργοποίησή της είναι πολύπλοκος. Στους ανθρώπους, οι υποκαταστάσεις αμινοξέων έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια της δραστηριότητας της μητριπτάσης και προκαλούν αυτοσωματική υπολειπόμενη ιχθύωση με υποτρίχωση. (18)

In vitro, η μητριπτάση μπορεί να ενεργοποιήσει την προστασίνη και μέσω ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης αποκαλύφθηκε ότι και οι δυο εντοπίζονται στο ανώτερο στρώμα της SG και στη διεπιφάνεια SG-SC και ότι η αναπτυξιακή έναρξη της έκφρασης και των δύο μεμβρανικών πρωτεασών συσχετίστηκε με την απόκτηση της λειτουργίας του επιδερμικού φραγμού. Η παρατήρηση ότι τα ποντίκια με έλλειψη μητριπτάσης και οι ασθενείς στερούνται ενεργοποιημένης προστασίνης δείχνει ότι η μητριπτάση ενεργοποιεί την προστασίνη in vivo. (18)

### **3.2 Καθαρισμός πληγών**

Για περισσότερα από 50 χρόνια, τα πρωτεολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται σε εργαστηριακά περιβάλλοντα in vitro για επιδερμικό διαχωρισμό και απομόνωση των κερατινοκυττάρων και in vivo για τοπικές φαρμακολογικές ιδιότητες που επί της ουσίας είναι άγνωστες. Προηγούμενες θεραπευτικές χρήσεις για τοπικά εφαρμοζόμενες πρωτεάσες έχουν περιοριστεί στον καθαρισμό πληγών και αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική μέθοδο επιδερμικής αφαίρεσης με αρκετά πιθανά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπάρχουσες τεχνικές. Οι δερματολόγοι για πάνω από έναν αιώνα έχουν υιοθετήσει την έννοια της θεραπευτικής καταστροφής ιστών, όπου αναφέρεται στην

αφαίρεση άρρωστου ιστού, με αποτέλεσμα ο υγιής να αναγεννάται από τις περιβάλλουσες δομές των εξαρτημάτων και να θεραπεύεται. (32)

Οι απεβιωμένοι ιστοί που υπάρχουν στο τραύμα χρησιμεύουν ως δεξαμενή για την ανάπτυξη βακτηρίων και περιέχουν αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών μεσολαβητών που προάγουν τη χρόνια φλεγμονή και εμποδίζουν την κυτταρική μετανάστευση που είναι απαραίτητη για την αποκατάσταση του τραύματος. Ο αποτελεσματικός καθαρισμός του τραύματος είναι απαραίτητος για την κοκκοποίηση και την επαναεπιθηλιοποίηση του ιστού και μια εξαιρετικά επιλεκτική μέθοδος είναι ο ενζυμικός καθαρισμός που χρησιμοποιεί φυσικά πρωτεολυτικά ένζυμα. (41)

Ο ενζυμικός καθαρισμός είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία τραυμάτων εμπνευσμένη από τις πρωτεάσες. Οι πρωτεάσες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αποικοδόμηση των νεκρωτικών υπολειμμάτων που προέρχονται από την κυτταρική διάσπαση και μπορούν να απελευθερώσουν μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη ή με παθογόνους και αυξητικούς παράγοντες που δεσμεύονται από ECM. Η θεραπεία με πρωτεολυτικά ένζυμα μπορεί να διαλύσει μια φυσιολογική πρωτεΐνη σε ανενεργά συστατικά, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία της, να απελευθερώσει ένα ενεργό φυσιολογικό πεπτίδιο από μια ανενεργή πρόδρομη πρωτεΐνη και να ενεργήσει ως μεσολαβητής σηματοδότησης που ενεργοποιεί ή ρυθμίζει προς τα πάνω μια συγκεκριμένη διαδικασία ή μονοπάτι. (65)

Οι πρωτεάσες διασπούν τις αλληλουχίες-στόχους υψηλής συγγένειας που προκαλούν αναρίθμητους καταρράκτες σηματοδότησης και διαμορφώνουν βιολογικά μονοπάτια που διέπουν την ανθρώπινη ανάπτυξη. Από τη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική ανάπτυξη και τη μετανάστευση έως την αγγειογενετική ενεργοποίηση ή την πήξη του αίματος, η ενδογενής πρωτεολυτική επεξεργασία βασικών υποστρωμάτων οδηγεί σε συγκεκριμένες ενδείξεις που ελέγχουν διαφορετικά κυτταρικά και ιστικά φαινόμενα. (65)

Η θεραπεία με πρωτεάσες μπορεί να αποτελείται από ειδικές πρωτεάσες που στοχεύουν σε μοναδικές αλληλουχίες αμινοξέων και πεπτιδικούς δεσμούς, χωνεύοντας τα πρωτεϊνικά υποστρώματα με μεγάλη επιλεκτικότητα και ειδικότητα και από μη ειδικές πρωτεάσες, οι οποίες διασπούν πολλαπλούς τύπους πεπτιδικών δεσμών. Ορισμένες θεραπείες εμπνευσμένες από πρωτεάσες υποβαθμίζουν επιλεκτικά τον νεκρωτικό ιστό,

την αποδιοργανωμένη ECM και την εσχάρα των εγκαυμάτων, για να επανεκκινήσουν τη διαδικασία επούλωσης του τραύματος χωρίς να αφομοιώσουν τον υγιή ιστό. (65)

Συνήθως εφαρμόζονται στο τραύμα μετά από μια χειρουργική διαδικασία απομάκρυνσης, κατά την οποία το τραύμα καλύπτεται με επίδεσμους εξισορρόπησης της υγρασίας (π.χ. επίδεσμοι που περιέχουν υδρογέλη) και όπου απαιτείται θεραπεία αρνητικής πίεσης. Η θρυψίνη, η σουμπτιλίσίνη και ένας συνδυασμός στρεπτοκινάσης και στρεπτοδορνάσης έχουν διερευνηθεί ως ενζυμικοί παράγοντες απομάκρυνσης. Η τοπική εφαρμογή ενός σκευάσματος βρωμελίνης που χρησιμοποιείται συνήθως στην Ευρώπη, μια αλοιφή κολλαγενάσης Clostridial (CCO) ή κολλαγενάσης Santyl (CSO) και ένα σκεύασμα παπαΐνης-ουρίας σε βάση κρέμας είναι οι πιο κοινές θεραπείες. Η αλοιφή είναι η μόνη εγκεκριμένη θεραπεία πρωτεάσης από τον FDA που ενδείκνυται για τον καθαρισμό εγκαυμάτων και χρόνιων δερματικών τραυμάτων. (65)

Τα σκευάσματα παπαΐνης-ουρίας έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά για την ενζυμική απομάκρυνση των ελκών πίεσης εδώ και δεκαετίες, αν και έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων που είναι απαραίτητος για την επιθηλιοποίηση. Η παπαΐνη διασπά τους δεσμούς κυστεΐνης, οι οποίοι υπάρχουν στις περισσότερες πρωτεΐνες και η ουρία βοηθά στη μετουσίωση των πρωτεϊνών στο στρώμα του τραύματος και διευκολύνει την πέψη τους με την εφαρμογή της παπαΐνης. Έτσι, διαφορετικές θεραπείες πρωτεάσης μπορεί να επηρεάσουν διαφορετικά τα κύτταρα που εμπλέκονται στην επούλωση του τραύματος (65)

### **3.3 Μηχανισμός απολέπισης**

Η απολέπιση του δέρματος ή peeling είναι μια τεχνική περιποίησης του δέρματος, όπου αφαιρεί το κατεστραμμένο δέρμα μετουσιώνοντας τις πρωτεΐνες της επιδερμίδας και του δέρματος και προάγει ένα επουλωτικό αποτέλεσμα. (66) Αποτελεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία, κατά την οποία η συνοχή μεταξύ των κερατινοκυττάρων καταργείται λόγω της πρωτεόλυσης των κερατοδεσοσωμικών πρωτεϊνών και τα κύτταρα απορρίπτονται στο περιβάλλον. (18) Η απολέπιση διεγείρει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών, την αναδιοργάνωση της δομής της επιδερμίδας και την εναπόθεση νέου κολλαγόνου και ελαστίνης. Μπορεί να ταξινομηθεί ως επιφανειακή, όταν απολεπίζει μόνο την επιδερμική στιβάδα, μεσαίου βάθους, όταν φτάνει στο άνω δικτυωτό χόριο και βαθιά, όταν δρα στο κάτω δικτυωτό

χόριο. Η αύξηση του βάθους της απολέπισης αυξάνει τις πιθανές παρενέργειες και απαιτεί εκπαιδευμένο επαγγελματία για την εκτέλεση της τεχνικής απολέπισης. (66)

Οι απολεπιστικοί παράγοντες μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ως χημικοί, φυσικοί ή ενζυμικοί ανάλογα με τη σύνθεση του προϊόντος. Η ενζυμική απολέπιση βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεασών να αποικοδομούν τις πρωτεΐνες του δέρματος, κυρίως την κερατίνη και τα δεσμοσώματα, που είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση των κυτταρικών συνδεδεμένων μεταξύ τους. Η βαθύτερη απολέπιση μπορεί να απαιτεί υδρόλυση άλλων πρωτεϊνών εκτός της κερατίνης, τόσο το κολλαγόνο όσο και η ελαστίνη παρουσιάζουν επίσης διαφορετικούς τύπους και σχηματίζουν ίνες, δίκτυα ή μπορούν να συσχετιστούν με άλλες δομές. (66)

Η ενζυμική απολέπιση θεωρείται ήπια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική της χημικής απολέπισης για άτομα με ευαίσθητο δέρμα και για όλους τους τύπους και τους τόνους δέρματος. Η χρήση ενζύμων διευκολύνει την εξαγωγή των φραγμένων πόρων και των φαγεσώρων και τα ενζυμικά απολεπιστικά μπορούν να εφαρμοστούν τοπικά στο δέρμα χρησιμοποιώντας φρούτα που τα περιέχουν ή με ενζυμικές σκόνες ή διαλύματα/κρέμες. Τα ένζυμα δρουν μόνο σε επιθυμητές δομές σε σχέση με τα οξέα, είναι βιολογικά και φιλικά προς το περιβάλλον, και επιπλέον, εξαρτώνται από το pH και τη θερμοκρασία, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αδρανοποίησή τους όταν χρειάζεται. Τα μειονεκτήματα της χρήσης απολεπιστικών ενζύμων είναι ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα στη βιβλιογραφία για να διασφαλιστεί η ασφάλειά τους, ότι μπορεί να είναι ερεθιστικά ή να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες, για αυτό το λόγο χρειάζεται σταθεροποίηση. (66)

Στην ενζυματική απολέπιση χρησιμοποιούνται απολεπιστικά ένζυμα που πρέπει να καταλύουν την υδρόλυση των επιθυμητών πρωτεϊνών του δέρματος, όπως της κερατίνης, των δεσμοσώματων, του κολλαγόνου και της ελαστίνης, μιμούμενοι την απολέπιση στο επιθυμητό pH και θερμοκρασία του δέρματος. Γενικότερα τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται ήδη στα καλλυντικά, έχουν εδραιώσει την παραγωγή τους και ερευνώνται για διαφορετικές εφαρμογές. Αυτό συμβαίνει λόγω της μείωσης του κόστους παραγωγής και της ανάγκης για την κατανόηση των ιδιοτήτων των ενζύμων, αν και η σύνθεση προϊόντων που περιέχουν ένζυμα είναι αρκετά δύσκολη αφού ορισμένες ενώσεις μπορούν να αδρανήσουν ή να μειώσουν τη δραστηριότητα αυτών. (66)

Το εξωκυτταρικό pH της επιδερμίδας παραμένει ουδέτερο μέχρι τη μετάβαση μεταξύ κοκκιδώδους και κερατινής στιβάδας και γίνεται πιο όξινο προς την επιφάνεια του δέρματος. Ο σχηματισμός μιας φυσιολογικής επιδερμίδας απαιτεί τη σωστή αλληλεπίδραση πολλαπλών διεργασιών και παραγόντων. Πολλά στοιχεία έχουν συγκεντρωθεί κατά την τελευταία δεκαετία για να αποδειχθεί ότι οι πρωτεάσες σερίνης είναι απαραίτητες σε διάφορες πτυχές της βιολογίας του δέρματος, όπως ο σχηματισμός CE, η κατασκευή λιπιδικού φραγμού και η απολέπιση. Ωστόσο, πρόσφατα ανακαλύφθηκε η ύπαρξη επιδερμικών οδών σηματοδότησης που δρουν μέσω καταρράκτων πρωτεάσης σερίνης. Ένα μονοπάτι εμπλέκεται στον σχηματισμό επιδερμικού φραγμού και στην ενυδάτωση, με την περαιτέρω αποικοδόμηση των μονομερών φιλαγκρίνης που δημιουργεί NMFs. (18)

Οι κερατινάσες είναι τα πιο σημαντικά ένζυμα που δρουν στις πρωτεΐνες κερατινής και είναι πιο δραστικές σε αλκαλικά μέσα με βέλτιστη δράση σε θερμοκρασίες άνω των 40°C. Η πρωτεΐνάση K, η θρυψίνη και η παπαΐνη είναι άλλες πρωτεάσες με κερατινολυτική δράση, έναντι αυτής της δομής. Επιπλέον, οικολλαγενάσες, η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη, η πεψίνη, η αλκαλάση, η προπεράση E, η προνάση, η παπαΐνη και η βρωμελίνη είναι παραδείγματα ενζύμων ικανών να καταλύουν την αποικοδόμηση του κολλαγόνου. Ομοίως, η κατάλυση της αντίδρασης υδρόλυσης ελαστίνης μπορεί να προωθηθεί από ελαστάσες, παπαΐνη, φικίνη, θρυψίνη και χυμοθρυψίνη. Επίσης οι πρωτεάσες του *Bacillus subtilis*, η σουμπτιλίνη και οι κερατινάσες είναι παραδείγματα πρωτεολυτικών ενζύμων που έχουν ήδη αξιολογηθεί ως απολεπιστικά και δεν προκαλεί έκπληξη η εφαρμογή τους στο δέρμα, καθώς τα ενδογενή ένζυμα έχουν μεγάλη σημασία στην αφαίρεση τους από την επιδερμίδα κατά την απολέπιση. (66)

Η λειτουργία του προστατευτικού φραγμού εκτελείται από τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας, οργανωμένα σε διαφορετικά στρώματα ή στιβάδες τα οποία παράγονται συνεχώς από πολλαπλασιαστικά βλαστοκύτταρα της βασικής στιβάδας και διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια ενός ταξιδιού 14 ημερών προς την επιφάνεια. Οι διαφορετικές επιδερμικές στιβάδες μπορούν να διακριθούν με βάση την κατάσταση διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. (18)

Τα κερατινοκύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται όταν εγκαταλείπουν τη βασική στιβάδα, η οποία αποτελείται από αδιαφοροποίητα, μιτωτικά κερατινοκύτταρα

προσαρτημένα στη βασική μεμβράνη (SB). Σχηματίζουν εκτεταμένες επαφές με τα γύρω κερατινοκύτταρα, η οποία χαρακτηρίζεται από ακανθώδεις προεκτάσεις που καταλήγουν στα δεσμοσώματα δημιουργώντας την ακανθώδη στιβάδα (SS), τα κερατινοκύτταρα αποκτούν την τυπική τους εμφάνιση παύουν να πολλαπλασιάζονται, ισοπεδώνονται και αρχίζουν να διαφοροποιούνται. (18)

Στο κοκκώδες στρώμα (SG), τα κύτταρα εξακολουθούν να περιέχουν όλα τα οργανίδια και χαρακτηρίζονται από βασεόφιλα κοκκία κερατοϋαλίνης. Στη ζώνη μετάβασης μεταξύ του κοκκώδους και του κερατινοποιημένου στρώματος (SC), τα κύτταρα χάνουν τους πυρήνες και τα υπόλοιπα οργανίδια τους και γίνονται πεπλατυσμένα πολύεδρα. Αυτά που δημιουργούνται, συνδέονται με τροποποιημένα δεσμοσώματα που περιέχουν κορνεοδεσμοσίνη (κερατοδεσμοσώματα) και από ένα πυκνό συσκευασμένο δίκτυο νημάτων κερατίνης που περιβάλλεται από κερατινοποιημένο περίβλημα (CE) και αποτελείται από δομικές πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τρανσαγλουταμινάσες. (18)

Ο μεσοκυττάριος χώρος της SC είναι γεμάτος με υδρόφοβα λιπίδια που προέρχονται από φυλλώδη σώματα (LBs) που εξωθούν τα περιεχόμενά τους στη μεμβράνη πλάσματος κατά τη μετάβαση SG-SC. Τα LBs αποτελούν μέρος ενός εκτεταμένου ενδοκυτταρικού συστήματος σωληναρίων στην ανώτατη SG. Η διπλή στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης αντικαθίσταται από κεραμίδια, τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά με το CE και τα εξωκυτταρικά λιπίδια οργανώνονται σε διατεταγμένες δομές για να σχηματίσουν το λιπιδικό περίβλημα, ώστε να συμβάλλουν στην δημιουργία του επιδερμικού φραγμού. (18)

### **3.4 Τα πρωτεολυτικά ένζυμα στην απολεπιστική διαδικασία**

Αν και τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν ιστορικό χρήσης σε προϊόντα περιποίησης δέρματος, δεν είναι γνωστό εάν προκαλούν απλώς επιφανειακή απολέπιση ή με συνεχή χρήση μπορούν να αλλάξουν τις ιδιότητες του δέρματος και της επιδερμίδας. (67) Ήδη από το 1941, οι ερευνητές συνειδητοποίησαν την ικανότητα ορισμένων πρωτεολυτικών ενζύμων να διαχωρίζουν επιλεκτικά την επιδερμίδα από το χόριο. Αυτή η μοναδική δυνατότητα τους έχει εν μέρει εξηγηθεί από την ικανότητά τους να αφομοιώνουν τις δεσμοσωμικές πρωτεΐνες που εμφανίζονται εντός της κεράτινης στιβάδας και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απολέπισης των επιδερμικών κυττάρων. (32, 67)



Έχει σημειωθεί εκτεταμένη πρόοδος στην αποσαφήνιση του ρόλου των εντοπισμένων πρωτεασών, για παράδειγμα η θρυψίνη, έχει εντοπιστεί και χρησιμοποιηθεί σε εργαστήρια για την απομόνωση βιώσιμων πληθυσμών κερατινοκυττάρων από δείγματα δέρματος. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε επιφανειακό νερό, το pH και οι ενδογενείς αναστολές φαίνεται να εμπλέκονται στον έλεγχο της καθεψίνης D, των ενζύμων που μοιάζουν με θρυψίνη και χυμοθρυψίνη για τη διασφάλιση της φυσιολογικής απολέπισης. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες για την οριοθέτηση ιδανικών ενζυμικών σκευασμάτων, φορέων και εφαρμογών. (32)

Ενώ τα ΑΗΑ και άλλα απολεπιστικά έχουν μελετηθεί ευρέως, η ικανότητα των αλκαλικών πρωτεασών να προκαλούν απολέπιση έχει εξεταστεί, ωστόσο, η επίδραση των τοπικών πρωτεασών στην απολέπιση, την εμφάνιση και τη δομή του δέρματος έχει σε μεγάλο βαθμό αγνοηθεί. Γι αυτό το λόγο οι Smith et al. (2007) προσπάθησαν να προσδιορίσουν μια συγκέντρωση ενζύμου ικανή να επιτύχει απολέπιση σε σύγκριση με γαλακτικό οξύ 12% που θα βελτίωνε την εμφάνιση και τα δομικά χαρακτηριστικά του δέρματος. Αυτή η μελέτη εξέτασε το δυναμικό απολέπισης και τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις ενός πλήρως χαρακτηρισμένου πρωτεολυτικού ενζύμου τύπου καθεψίνης D (CPLE) που εξάγεται από τον μύκητα (Rhizo) *Mucor miehei* και έχει ισχυρή εξάρτηση από το pH. (67)

Η εφαρμογή του CPLE είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αυξήσεις στα κύτταρα της κεράτινης στιβάδας σε ποσοστά αφαίρεσης, περισσότερο από 30% χωρίς να έχει συγκριθεί με καμία θεραπεία και 20% σε σύγκριση. Παρόμοιες αυξήσεις στην αφαίρεση των κυττάρων με γαλακτικό οξύ 12% έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την εμφάνιση και προκαλούν επιδερμικές και δερματικές αλλαγές. Βρέθηκε ότι το ίδιο ισχύει με τη χρήση του CPLE για 3 μήνες, ενώ τα οφέλη του ήταν συσσωρευτικά. Η απολέπιση από τα ΑΗΑ, όπως και από την πρωτεάση τύπου Cathepsin D, μπορούν να προκαλέσουν γεγονότα που οδηγούν σε επιδερμική και δερματική αναδόμηση. (67)

Η θεραπεία με ένζυμα τύπου καθεψίνης D μιμείται τη δράση του ΑΗΑ και παρουσιάζονται στοιχεία ότι το CPLE δρα απευθείας στη κορνεοδεσμοσίνη. Η αυξημένη δεσμοσωμική διάσπαση εξήγησε τους αυξημένους ρυθμούς ανανέωσης των κυττάρων, τη βελτιωμένη εμφάνιση της επιφάνειας, αλλά όχι τις πιο βαθιές επιδερμικές και δερματικές αλλαγές. Η θεραπεία με ΑΗΑ, η μικροδερμοαπόξεση και τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν άμεση δράση μόνο στην κεράτινη στιβάδα, αν και

αυξάνουν τον επιδερμικό και δερματικό μεταβολισμό με ένα σταθερό αποτέλεσμα επιδιόρθωσης. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν με ή χωρίς διαταραχή του φραγμού και με πρόκληση φλεγμονής μέσω εναλλακτικών μηχανισμών. Σημαντικά οφέλη εμφάνισης μπορούν να προκύψουν από τη χρήση απολεπιστικών πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία είναι εντυπωσιακά παρόμοια με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με υψηλότερες συγκεντρώσεις AHAs. (67)

Τα τελικά στάδια της απολέπισης ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη δεσμοσωμική διάσπαση και την απελευθέρωση των κυττάρων και συντονίζονται με την ωρίμανση των επιδερμικών λιπιδίων, τη λειτουργία φραγμού και τον μεταβολισμό των βασικών κυττάρων, για να εξασφαλιστεί η επιδερμική ομοιόσταση και η φυσιολογική κερατινοποίηση. Η θεραπεία με ΑΗΑ αναστρέφει τη μείωση ρυθμού της κυτταρικής εναλλαγής και τις αλλαγές στη λειτουργία και την εμφάνιση του φραγμού, ενώ πιθανότατα να επηρεάσει την κυτταρική προσκόλληση που σχετίζεται με την πρωτεόλυση, αν και δεν έχει αποδειχθεί. Επιπλέον, μια μεμονωμένη θεραπεία μικροδερμοαπόξεσης, η οποία δεν αλλοιώνει αισθητά την κεράτινη στιβάδα ή τη λειτουργία φραγμού, ρυθμίζει αρκετά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την αναδόμηση και την επισκευή του δέρματος. (67)

Σε μια προσπάθεια να βελτιώσουν τις υπάρχουσες μεθόδους αφαίρεσης ιστών, οι Fein et al (2005) μελέτησαν τις κλινικές και ιστολογικές επιδράσεις της τοπικής εφαρμογής πρωτεασών (TPT) ως μέθοδος θεραπευτικής επιδερμικής αφαίρεσης. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα θρυψίνη, dispase και σουμπτιλίσίνη εκτέθηκαν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ποικίλες συγκεντρώσεις, για διαφορετικές χρονικές περιόδους σε δείγματα άτριχου ποντικού και ανθρώπινου δέρματος. Η έκθεση των δειγμάτων οδήγησε σε τρία διαφορετικά *in vitro* μοτίβα επιδερμικής διάσπασης που παρήχθησαν με εξωγενώς εφαρμοζόμενα διαλύματα πρωτεάσης, την υποκερατοειδή, την ενδοεπιδερμική και την υποεπιδερμική. Επιπλέον, σε μια περιορισμένη μελέτη, η τοπική εφαρμογή διαλύματος θρυψίνης σε ανθρώπινα μοντέλα *in vitro* και *in vivo* είχε ως αποτέλεσμα την απαλοιφή των βλαβών της σμηγματορροϊκής κεράτωσης, χωρίς ουλές. (32)

Η επιδερμική αφαίρεση μπορεί επίσης να επιτευχθεί με διάφορες καυστικές χημικές ουσίες, όπως το τριχλωροξικό οξύ (TCA) και τη φαινόλη ή την ηλεκτροχειρουργική και το laser CO<sub>2</sub>, αν και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στους ιστούς που επεκτείνονται και να οδηγήσουν σε καθυστερημένη επούλωση, σχηματισμό ουλών και αλλοιώσεις

της χρωστικής. Σε αντίθεση με τις υπάρχουσες μεθόδους αφαίρεσης, το TPT προκαλεί καταστροφή του ιστού χωρίς χρήση ψύξης και χωρίς απανθρακοποίηση και καταφέρνει να πετύχει το απόλυτο βάθος ιστικής βλάβης που περιορίζεται σε συγκεκριμένες επιδερμικές ζώνες και πιθανόν να είναι βιολογικά προκαθορισμένο. (32)

Η επιφανειακή ή η ενδοκερατοειδής, επιδερμική αφαίρεση μπορεί θεωρητικά, να επιτευχθεί με την εξωγενή χρήση των φυσικώς απαντώμενων πρωτεασών και για πρώτη φορά έγινε επίδειξη *in vivo* επιδερμικής κατάλυσης υποκερατοειδούς με τη βακτηριακή πρωτεάση σουμπτιλίσίνη. Η δερματική μόλυνση με είδη δερματόφυτων έχει ως αποτέλεσμα ιστολογικά το σχηματισμό μιας υποκερατοειδούς φλύκταινας, η οποία είναι παρόμοια με το μοτίβο τραυματισμού που παράγεται με τη σουμπτιλίσίνη. Η ενδοεπιδερμική ακανθόλυση με τον προκύπτοντα υποεπιδερμικό διαχωρισμό αποδίδεται στην επιλεκτική πέψη του κολλαγόνου IV στη βασική μεμβράνη, μπορεί να επιτευχθεί με dispase, μια πρωτεάση που προέρχεται από Βάκιλος Polymyxa και καταδείχθηκε με παρόμοιο τρόπο σε αυτήν την έκθεση. (32)

Η μοναδική ικανότητα αλλαγής του βάθους της αφαίρεσης ιστού με την επιλογή μιας συγκεκριμένης πρωτεάσης μπορεί να έχει μελλοντική θεραπευτική σημασία. Όσον αφορά την πρωτεολυτική δραστηριότητα σε άθικτο δέρμα, μόνο η σουμπτιλίσίνη, αποδείχθηκε ότι είναι ενεργή σε ένα μοντέλο ποντικού. Ωστόσο, με το πλεονέκτημα της ελαφριάς μηχανικής τριβής από έναν εφαρμοστή με βαμβακερή μύτη, τόσο η θρυψίνη όσο και η dispase οδήγησαν σε επιδερμική αφαίρεση τα μοντέλα ποντικών *in vivo* και τα ανθρώπινα μοντέλα. (32)

Τα πλεονεκτήματα της TPT σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους καταστροφής ιστών περιλαμβάνουν την αποφυγή θερμικής βλάβης, επιβλαβών χημικών ουσιών και δαπανηρών μηχανημάτων. Επιπλέον, η εγγενής ασφάλεια αυτών των ενζύμων καταδεικνύεται από τη φυσική τους παρουσία σε διάφορα φρούτα, όπως η παπάγια (παπαΐνη) και ο ανανάς (βρωμελίνη), καθώς και η ευρεία χρήση τους, όπως για τον καθαρισμό πληγών, έχει αναφερθεί ότι προκαλεί πόνο παρόμοιο με την αλοιφή εικονικού φαρμάκου. Σε αυτήν την περιορισμένη μελέτη, η TPT με θρυψίνη συσχετίστηκε με ήπιο, παροδικό κνησμό στο σημείο της θεραπείας. (32)

Σε μελλοντικές μελέτες, αυτή η φαινομενική αδυναμία μιας συγκεκριμένης πρωτεάσης να διεισδύσει στην κεράτινη στοιβάδα μπορεί να αντιμετωπιστεί είτε με τη χρήση πρωτεασών σε συνδυασμό είτε με ενισχυμένο όχημα παροχής. Οι πιθανές

δερματολογικές εφαρμογές της TPT είναι πιθανώς πολλαπλές και εκτός από την ικανότητα επιλεκτικής αφαίρεσης επιδερμικών νεοπλασμάτων, μπορεί επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη στη θεραπεία αρκετών μη νεοπλασματικών δερματοειδών. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την οριοθέτηση ιδανικών ενζυμικών σκευασμάτων, συγκεντρώσεων και φορέων, ενώ σχεδιάζονται μελέτες για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του TPT. (32)

Η παπαΐνη, ως πρωτεολυτικό ένζυμο θειόλης, θα μπορούσε να δρασει με τον ίδιο τρόπο, αφού χρησιμοποιήθηκε ως ενισχυτής απορρόφησης που κατάφερε να τροποποιήσει το υλικό του πεπτιδίου και της πρωτεΐνης στην περιοχή της διπλής στιβάδας και να αποτελέσει έναν ασφαλή υποψήφιο ενισχυτή διείσδυσης. Οι Lopes et al. (2008) ερευνώντας την ασφάλεια της παπαΐνης χρησιμοποίησαν *in vitro* ανθρώπινο δέρμα που εκτέθηκε σε παπαΐνη σε διαφορετικούς χρόνους: 4, 24 και 48 ώρες. Τα δείγματα εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Φωτός και Μετάδοσης (TEM) και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, μετά από θεραπεία 24 ωρών με χρήση παπαΐνης, εμφανίστηκαν αλλαγές στα κερατινοσώματα και στη συνοχή της κεράτινης στιβάδας, χάνοντας την ακεραιότητά της, ενώ η θεραπεία 48 ωρών δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι η παπαΐνη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στο δέρμα, αφού προώθησε την πρωτεολυτική πέψη των πρώτων στρωμάτων της κεράτινης στιβάδας και προκάλεσε μειωμένη διασύνδεση στην περιοχή των κερατοσωματιδίων. Επίσης στα επεξεργασμένα δείγματα, μετά από 48 ώρες, όπου ανακτήθηκε η κεράτινη στιβάδα, απεδείχθη η ασφαλής χρήση της, λόγω της αναστρεψιμότητας της λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας. (63)

Κατά συνέπεια, η χρήση ενζύμων ως θεραπεία τραυμάτων «εμπνευσμένη από πρωτεάσες» όχι μόνο δεν υποβαθμίζει τα υποπροϊόντα των ιστών, πυροδοτεί αυτοφαγία και καθαρίζει τον νεκρωτικό ιστό, αλλά και μέσω των ειδικών ενδιάμεσων σημάτων που προκύπτουν. Η θεραπεία που βασίζονται σε πρωτεάσες έχει αποδειχθεί ότι έχει σαφή και σημαντική δυνατότητα να μετριάσει τη φλεγμονή, να ενεργοποιήσει την αγγειογένεση, ενώ προάγει τις μεταναστευτικές και πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις στον τραυματισμό και την επιδιόρθωση των ιστών, διεγείροντας την επούλωση. Η θεραπεία με πρωτεάση ως ενζυματικός καθαριστής είναι μια αποτελεσματική συμπληρωματική θεραπεία για την επούλωση πληγών για δεκαετίες. (65)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ως βιολογικοί καταλύτες που μπορούν να συνθέσουν καλλυντικά σκευάσματα αφού είναι ικανά να μιμούνται τη διαδικασία απολέπισης του δέρματος και να βελτιώσουν ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά του. Η παπαΐνη, η βρωμελίνη, οι κερατινάσες και οι μικροβιακές πρωτεάσες είναι μερικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται ήδη ως απολεπιστικά. Η μελέτη του pH, της θερμοκρασίας και της σταθεροποίησης των ενζύμων στα καλλυντικά αποδείχθηκε ότι είναι σημαντικές παράμετροι που πρέπει να αξιολογηθούν, κυρίως για την πρόληψη της απώλειας της ενζυμικής δραστηριότητας και των πιθανών αλλεργιών ή ερεθισμών στο δέρμα. (66)

Αν και η ενζυματική απολέπιση δεν είναι νέα και τα εμπορικά προϊόντα βρέθηκαν εύκολα, υπάρχει έλλειψη επιστημονικής βιβλιογραφίας (μόνο 11 έργα βρέθηκαν σε διαφορετικές βάσεις δεδομένων) και απαιτούνται επιπλέον *in vivo* μελέτες, προτού συσταθεί με ασφάλεια ως μέθοδος θεραπείας. Οι μελέτες της ενζυματικής απολέπισης μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: χρήση γνωστών ενζύμων και αναζήτηση σταθεροποιητών, παραγωγή πρωτεασών και κατάλυση πρωτεϊνών από ανθρώπινη πηγή και *in vivo* μελέτες που εφάρμοσαν τα ένζυμα αξιολόγησαν τις επιδράσεις τους στον άνθρωπο. (66)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΝΑΝΟΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΪΛΙΚΑ

#### 4.1 Έννοια του καλλυντικού

Τα καλλυντικά περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων και ως συνέπεια της παγκοσμιοποίησης, ο ρόλος τους διαφοροποιείται και η χρήση τους θεωρείται όλο και περισσότερο ουσιαστικό μέρος της προσωπικής ευεξίας. Επίσης τα καινούρια πρότυπα ομορφιάς έχουν αλλάξει σε μεγάλο βαθμό τις αντιλήψεις των καταναλωτών για τη ρουτίνα της καθημερινής φροντίδας. Αυτό δημιουργεί την ανάγκη ανάπτυξης εξατομικευμένων και καινοτόμων προϊόντων και νέων τεχνολογιών, βασισμένα σε λεπτομερή επιστημονική γνώση. Αναμένεται ότι η παγκόσμια αξία της αγοράς ομορφιάς και της προσωπικής περιποίησης προβλέπεται να ξεπεράσει τα 716 δισεκατομμύρια δολάρια έως το 2025. Επιπλέον, η πρόσφατη πανδημία του COVID-19 και τα παγκόσμια γεγονότα υποδηλώνουν ότι οι τάσεις της αγοράς για τα καλλυντικά επηρεάζονται έντονα από τις αντιλήψεις των πελατών και αλλάζουν συνεχώς. Η πανδημία έχει τονίσει την ανάγκη για πιο ασφαλή είδη, με τη ζήτηση να προσανατολίζεται προς τα «καθαρά» και φυσικά προϊόντα. (68)

Τα καλλυντικά είναι παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο (και από τα δύο φύλα) εδώ και πολύ καιρό, συνήθως εξωτερικά, κυρίως για αναγεννητικούς σκοπούς και παρασκευάζονται από μία ή συνδυασμό ουσιών που λαμβάνονται είτε από φυσικές είτε από τεχνητές πηγές. (69) Ωστόσο, τα καλλυντικά πρέπει να είναι ασφαλή για τους καταναλωτές και να φέρουν κατάλληλη ετικέτα και οι εταιρείες που τα εμπορεύονται έχουν νομική ευθύνη για την ασφάλεια και την επισήμανση των προϊόντων τους. (70)

Ο νόμος περί φαρμάκων και καλλυντικών του 1940 και οι κανόνες του 1945 ορίζουν ένα καλλυντικό ως «κάθε αντικείμενο που προορίζεται να τρίψει, να χυθεί, να ραντιστεί ή να ψεκαστεί ή να εισαχθεί ή να εφαρμοστεί με άλλο τρόπο στο ανθρώπινο σώμα ή οποιοδήποτε μέρος του για καθαρισμό, ομορφιά, προώθηση της ελκυστικότητας ή αλλοίωση της εμφάνισης και περιλαμβάνει οποιοδήποτε αντικείμενο που προορίζεται για χρήση ως συστατικό καλλυντικών». (69) Από τον FDA τα καλλυντικά ορίζονται ως «αντικείμενα που προορίζονται να εφαρμοστούν στο ανθρώπινο σώμα ή σε οποιοδήποτε μέρος του για τον καθαρισμό, τον καλλωπισμό, την προώθηση της

ελκυστικότητα ή την αλλαγή της εμφάνισης» και δεν έχει τη νομική εξουσία έγκρισης των καλλυντικών πριν κυκλοφορήσουν στην αγορά. (70)

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (USFDA) ορίζει τα καλλυντικά ως ένα σκεύασμα που «προορίζεται να εφαρμοστεί στο ανθρώπινο σώμα για τον καθαρισμό, την ομορφιά, την προώθηση της ελκυστικότητας ή την αλλαγή της εμφάνισης χωρίς να επηρεάζει τη δομή ή τις λειτουργίες του σώματος». (71) Η οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EUCD) ορίζει τα καλλυντικά ως «κάθε ουσία ή παρασκεύασμα που προορίζεται να τεθεί σε επαφή με τα διάφορα εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, σύστημα μαλλιών, νύχια, χείλη και εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με το βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας και τα δόντια, με σκοπό αποκλειστικά ή κυρίως τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, την αλλαγή της εμφάνισής τους ή/και τη διόρθωση των οσμών του σώματος ή/και την προστασία τους ή τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση». (69,70,71) Εκτός από αυτούς τους ορισμούς, η νομική έννοια των καλλυντικών σε πολλά έθνη είναι πιο εκτεταμένη και σε κάποια άλλα, ερμηνεύεται ως προϊόντα ομορφιάς, (όπως κραγιόν, μάσκαρα, eyeliners, κ.α). (69)

Ένα καλλυντικό προϊόν αποτελείται από ένα δραστικό συστατικό και άλλες ουσίες (συστατικά) που αποτελούν τη «βάση» ή το «όχημα» του προϊόντος, όπως κρέμες, λοσιόν και τζέλ. Το όχημα έχει σχεδιαστεί να κάνει το προϊόν κατάλληλο για την αποτελεσματική μεταφορά του δραστικού συστατικού στο σημείο στόχευσης και να διασφαλίσει την παραμονή του στο σημείο δράσης στο χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Ακόμη, το όχημα πρέπει να υποστηρίζει τη φυσική, χημική και μικροβιολογική σταθερότητα του δραστικού συστατικού και ολόκληρης της σύνθεσης. (71)

Πολλές φορές δεν υφίσταται διάκριση μεταξύ των βιοδραστικών παραγόντων και των υπολοίπων συστατικών, επειδή μπορεί να έχουν ορισμένες ιδιότητες που συμβάλλουν στη συνολική επίδραση του τελικού προϊόντος (π.χ. η λεκιθίνη λειτουργεί ως γαλακτωματοποιητής, αλλά εμφανίζει ενυδατική δράση και αυξάνει τη σφριγηλότητα του χορίου). Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην επιδερμίδα ονομάζονται προϊόντα περιποίησης δέρματος και η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τους τύπους των συστατικών και την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους. (68)

Υπάρχει και μια ακόμη κατηγορία προϊόντων, τα cosmeceuticals, τα οποία μπορούν να περιγραφούν ως παρασκευάσματα που περιέχουν θεραπευτικά δραστικά συστατικά που έχουν ειδικά επανορθωτικά αποτελέσματα κατά την επιφανειακή εφαρμογή τους, όπως με τα παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα καλλυντικά. Αυτά τα προϊόντα έχουν ποσοτικά μετρήσιμα επανορθωτικά αποτελέσματα στο δέρμα και τα μαλλιά και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφορετικών καταστάσεων, (όπως ρυτίδες, φωτογήρανση, ξηρότητα, χαλάρωση, υπερμελάγχρωση, τάλαιπωρημένα μαλλιά κ.λπ.), όπου υπόσχονται βελτίωση στην εμφάνιση. (69)

Η λέξη "cosmeceutical" αναφέρεται σε ένα προϊόν που τοποθετείται μεταξύ ενός φαρμάκου και ενός καλλυντικού και χρησιμοποιείται στον τομέα της επαγγελματικής φροντίδας του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα περιγράφει ένα προϊόν με μετρήσιμη βιολογική δράση στο δέρμα, όπως ένα φάρμακο, αλλά ρυθμίζεται ως καλλυντικό αφού ισχυρίζεται ότι επηρεάζει την εμφάνιση. Τα καλλυντικά δεν κατηγοριοποιούνται από τον FDA και ο όρος χρησιμοποιείται από επιστήμονες δέρματος, γιατρούς και επαγγελματίες περιποίησης δέρματος, για να ενθαρρύνουν τους καταναλωτές να συνεχίσουν να αγοράζουν ειδικά καλλυντικά προϊόντα, με επιστημονικούς ισχυρισμούς και φυσική τοποθέτηση ως ένας τρόπος να τονιστεί ότι η χρήση αυτών των προϊόντων δεν είναι μόνο απαραίτητη αλλά και φυσιολογική. (70)

## **4.2 Εισαγωγή στην Ναυτοτεχνολογία**

Τα καλλυντικά θεωρούνται ένα από τα ταχύτερα αναπτυσσόμενα τμήματα της βιομηχανίας προσωπικής φροντίδας και η αγορά τους επεκτείνεται μαζικά με βασικό πρωτεργάτη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη αποτελεσματικών καλλυντικών, την ναυτοτεχνολογία. (70) Το 1986, η εισαγωγή της ναυτοτεχνολογίας χαρακτηρίστηκε ως σημαντική επιστημονική καινοτομία και αντιπροσώπευε μια σημαντική ανακάλυψη προς την ανάπτυξη προϊόντων υψηλής ποιότητας με τη χρήση της να έχει πλέον καθιερωθεί στη βιομηχανία καλλυντικών. Πράγματι, οι λιγότερο απαιτητικοί ρυθμιστικοί περιορισμοί σε σύγκριση με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, μαζί με την τοπική δράση αυτών των προϊόντων, κατέστησαν αρχικά το πεδίο εξαιρετικά υποσχόμενο. (68) Η ναυτοτεχνολογία έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει καινοτόμες συνθέσεις και συστήματα παράδοσης και έχει αξιοποιηθεί ευρέως για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. (69)



Επί του παρόντος, τα νανοϋλικά προσελκύουν την προσοχή στο χώρο της κοσμητολογίας, καθώς προσφέρουν μεγαλύτερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά καλλυντικά και η συγχώνευση τους έχει συμβάλει σημαντικά στην παγκόσμια αύξηση του μεριδίου αγοράς των φαρμακευτικών προϊόντων και των καλλυντικών. Το 2019, το μέγεθος της διεθνούς αγοράς των νανοϋλικών εκτιμήθηκε σε 8,5 δισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ και αναμένεται να αυξηθεί με σύνθετο ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης μέχρι και 13,1% έως το 2027. Αν και η έννοια των νανοϋλικών χρησιμοποιείται στα καλλυντικά εδώ και αρκετά χρόνια, όπως για παράδειγμα τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου, οι εφαρμογές τους έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια. (72) Σήμερα, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η χρήση νανοσωματιδίων (NPs) βελτιώνει σημαντικά την απόδοση των καλλυντικών, λειτουργώντας τόσο ως ενεργό συστατικό όσο και ως φορέας. (68)

Τα καλλυντικά σκευάσματα που ενσωματώνουν τη νανοτεχνολογία είναι ένας σχετικά νέος και άκρως ερευνημένος τομέας, οδήγησε σε προόδους στην κοσμητική επιστήμη, με αποτέλεσμα την αυξημένη ζήτηση των καταναλωτών σε όλο τον κόσμο. Η νανοτεχνολογία και τα συστήματα νανοπαράδοσης περιλαμβάνουν το σχεδιασμό, τον χαρακτηρισμό, την κατασκευή και την εφαρμογή υλικών, συσκευών και συστημάτων σε επίπεδο νανοκλίμακας (1–100 nm). Τα νανοκαλλυντικά και τα nanocosmeceuticals έχουν διερευνηθεί εκτενώς για το δέρμα, τα μαλλιά, τα νύχια, τα χείλη και τα δόντια και η συμπερίληψη νανοϋλικών έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την αποτελεσματικότητα του προϊόντος και την ικανοποίηση των καταναλωτών. (69)

Στον τομέα της αισθητικής, η νανοτεχνολογία έχει παίξει σημαντικό ρόλο, χρησιμοποιώντας νέες τεχνικές για τον χειρισμό της ύλης σε ατομικό ή μοριακό επίπεδο και ανοίγει νέες προοπτικές για το μέλλον της βιομηχανίας καλλυντικών. Τα καλλυντικά που βασίζονται στη νανοτεχνολογία προσφέρουν το πλεονέκτημα της ποικιλομορφίας, της αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας των ενεργών συστατικών και αυξάνουν την αισθητική ελκυστικότητα των προϊόντων με παρατεταμένα αποτελέσματα. (70)

Μερικές από τις καινοτομίες που βασίζονται στη νανοτεχνολογία είναι τα νανογαλακτώματα (διαφανή με μοναδικές ιδιότητες αφής και υφής), οι νανοκάψουλες, οι νανοχρωστικές ουσίες (διαφανείς και αυξάνουν την αποτελεσματικότητα των αντηλιακών προϊόντων), οι συνθέσεις λιποσωμάτων, τα νιοσώματα, τα

νανοκρύσταλλοι, τα στερεά νανοσωματίδια λιπιδίων, οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα φουλερένια και τα δενδριμερή. (73) Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης νανοσωματιδίων στα καλλυντικά περιλαμβάνουν τη βελτίωση της σταθερότητας των συστατικών των καλλυντικών (π.χ. βιταμίνες, ένζυμα, ακόρεστα λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά) με την ενθυλάκωση μέσα στα νανοσωματίδια, τη στόχευση του δραστικού συστατικού στην επιθυμητή τοποθεσία, την αποτελεσματική προστασία του δέρματος από τις επιβλαβείς υπεριώδεις ακτίνες και την ελεγχόμενη απελευθέρωση δραστικών συστατικών για παρατεταμένη δράση. (70)

### **4.3 Νανοσωματίδια στα καλλυντικά**

Σε μια αγορά όπου η καινοτομία είναι η κινητήρια δύναμη των επιχειρηματικών επιλογών, η βιομηχανία καλλυντικών υιοθέτησε τη νανοτεχνολογία, αντλώντας έμπνευση από την πρόωπη εμπλοκή της στη βιοτεχνολογία και τη βιοεπιστήμη. Από τότε, έχουν αναπτυχθεί αρκετά νανοπροϊόντα, αξιοποιώντας μια μεγάλη ποικιλία νανοϋλικών διαφορετικών συνθέσεων, σχημάτων και μεγεθών. (68) Αυτά επιλέχθηκαν κυρίως για την ικανότητά τους να ξεπερνούν τους κοινούς περιορισμούς των καλλυντικών ενισχύοντας τη διείσδυση, βελτιώνοντας τη σταθερότητα των συστατικών, ελέγχοντας την απελευθέρωση των δραστικών συστατικών ή λειτουργώντας τα ίδια ως δραστικοί παράγοντες. Επιπλέον, οι μικροσκοπικές διαστάσεις που παρουσιάζουν μαζί με τη μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, κατάφεραν να βελτιώσουν τη διαλυτότητα, τη διαφάνεια, τη χημική αντιδραστικότητα και την ποιότητα υφής των προϊόντων. (68,69)

Η συμπερίληψη νανοσωματιδίων σε καλλυντικά σκευάσματα δεν αλλάζει τις ιδιότητες των καλλυντικών αλλά βελτιώνει την εμφάνιση, την UV προστασία, τη διείσδυση στο δέρμα, το χρώμα, την κάλυψη, την απελευθέρωση αρώματος, την ποιότητα φινιρίσματος, την αντιγήρανση, την τοξικότητα, το κόστος κ.λπ. Επιμηκύνουν τη διάρκεια της δράσης ελέγχουν την παροχή δραστικών συστατικών, την πρόκληση εξειδίκευσης στη θέση, βελτιώνουν τη βιοσυμβατότητα και ενισχύουν την ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες τα κάνουν πιο δημοφιλή μεταξύ των καταναλωτών, απαιτώντας κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση των ανησυχιών τους για την ασφάλεια. (69)

Τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία καλλυντικών για πολλά χρόνια, είναι υλικά που έχουν τουλάχιστον μία διάσταση στην περιοχή «νάνο»,

σημαντικά διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες και παρουσιάζουν περισσότερα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα καλλυντικά μικρού μεγέθους. (69) Ο όρος «νανοϋλικά» από τη νομοθεσία της ΕΕ, αναφέρεται σε οποιοδήποτε «αδιάλυτο ή βιοανθεκτικό και σκόπιμα κατασκευασμένο υλικό με μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις, εσωτερική δομή, στην κλίμακα από 1 έως 100 nm». (68)

Κατά συνέπεια, μόνο τα παρασκευάσματα που δεν αλλάζουν μετά την εφαρμογή του δέρματος θα πρέπει να θεωρούνται νανοϋλικά και αυτό αποκλείει τα λιποσώματα και τα νανογαλακτώματα, παρόλα αυτά θα αναφέρουμε όλες τις συνθέσεις που εκμεταλλεύονται τη διάσταση «νάνο» για να βελτιώσουν την καλλυντική τους απόδοση. (68) Στις επόμενες παραγράφους παρέχεται μια ανασκόπηση που περιγράφει τα πιο δημοφιλή νανοσωματίδια και συστήματα νανοπαραγωγής ή νανοσκευάσματα που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά και για καλύτερη κατανόηση έχουν ομαδοποιηθεί σε δύο ευρείες κατηγορίες, στα οργανικά και ανόργανα NPs. (69)

#### **4.3.1. Οργανικά νανοσωματίδια**

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα σκευασμάτων νανομεγέθους από φυσικά ή συνθετικά υλικά και η κακή εγγενής σταθερότητα που επιδεικνύουν σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν τα καθιστά ως γνήσια κολλοειδή NP και για αυτό το λόγο σπάνια προσδιορίζονται ως νανοϋλικά στις ετικέτες των προϊόντων. Μεταξύ των οργανικών NPs, οι νανοδομές με βάση τα λιπίδια, τα επιφανειοδραστικά και τα πολυμερή χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανία καλλυντικών ως φορείς ενεργών μορίων, ενώ οι νανοκρύσταλλοι είναι στερεά σωματίδια που παράγονται με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας της ουσίας. (68)

### **1. Νανοσωματίδια που προέρχονται από λιπίδια και τασιενεργά**

#### **A. Φυσαλιδώδη συστήματα.**

Τα κυστίδια NP γενικά ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος και τον αριθμό των διπλών στοιβάδων τους, ως πολυστρωματικά κυστίδια (MLVs), μικρά μονοστρωματικά κυστίδια (SUV) και μεγάλα μονοστρωματικά κυστίδια (LUVs). Τα MLV (0,5–10 μm) μπορούν να ληφθούν εύκολα κατά τη διασπορά των πρώτων υλών σε υδατική φάση, ενώ τα SUV (10–100 nm) και τα LUV (100–500 nm) παράγονται από τα MLV. Το 1986, η ομοιότητα αυτών των συστημάτων με τα φυσικά κυτταρικά κυστίδια και τις

μεμβράνες ενθάρρυναν τη βιομηχανία καλλυντικών να εισαγάγει τη χρήση τους. Τα νανοσωματίδια (κατασκευασμένα κυστίδια) αναμενόταν να ενισχύσουν τη διείσδυση και να παραδώσουν τα ενεργά συστατικά στο βαθύτερο στρώμα του δέρματος, χάρη στον αμφίφιλο χαρακτήρα τους, όπου μπορούν να φιλοξενήσουν τόσο λιπόφιλους όσο και υδρόφιλους βιοδραστικούς παράγοντες. Επιπλέον, τα κύρια συστατικά λιπιδίων και επιφανειοδραστικών αυτών των κυστιδίων είναι βιοσυμβατά και βιοαποδομήσιμα. (68, 74)

Τα **λιποσώματα** αντιπροσωπεύουν το πιο διερευνημένο και συνεχώς εξελισσόμενο νανοϋλικό στα καλλυντικά. Πρόκειται για κυστίδια με ομόκεντρες διπλές στοιβάδες στοιβάδες φωσφολιπιδίων (κυρίως παράγωγα φωσφατιδυλοχολίνης), όπου το υγρό ενθυλακώνεται μέσα τους. Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά, αυτόκλειστα κυστίδια κολλοειδών διαστάσεων, μεταξύ 20nm και μερικών εκατοντάδων μικρομέτρων. Χρησιμοποιούνται ευρέως ως συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης και έχουν καλή ικανότητα διείσδυσης σε στενά αιμοφόρα αγγεία ή στο δέρμα. Είναι ιδανικοί φορείς κυττάρων και βιομεμβρανών και μπορούν να εφαρμοστούν με επιτυχία στο δέρμα επειδή μοιάζουν με τη βιολογική σύνθεση του. Επίσης εφαρμόζονται για τη στερέωση και τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και για τη μετάδοση ευχάριστων αρωμάτων στο πλύσιμο σώματος, στα κραγιόν και στα αντιδρωτικά. (69,72)

Στη βιομηχανία καλλυντικών, χρησιμοποιούνται κυρίως για ενυδατικούς και αντιγηραντικούς σκοπούς σε μια ποικιλία σκευασμάτων επειδή είναι βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα, μη τοξικά και εύκαμπτα κυστίδια και μπορούν να εγκλωβίσουν εύκολα τα ενεργά συστατικά. (69,70) Τα νανολιποσώματα στα καλλυντικά ενισχύουν την ενυδάτωση του δέρματος λόγω του μικρότερου μεγέθους των σωματιδίων, κάνοντας το δέρμα λείο και ελαστικό. (68,69) Αυτά είναι σε θέση να μεταφέρουν ενεργά τμήματα στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος, ακόμη και στη συστηματική κυκλοφορία, και μπορούν να λειτουργήσουν ως σύστημα διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων (TDDS) σε κοσμητικές εφαρμογές. (69)

Επιπλέον παρουσιάζουν την ικανότητα να προστατεύουν το ενθυλακωμένο φάρμακο από το εξωτερικό περιβάλλον και είναι κατάλληλα για την παροχή υδρόφοβων και υδρόφιλων ενώσεων. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν ιδανικά υποψήφια για την παροχή βιταμινών και αντιοξειδωτικών (π.χ. καροτενοειδή, λυκοπένιο και CoQ10), γεγονός που αυξάνει τη φυσική και χημική τους σταθερότητα όταν διασπείρονται στο

νερό. Λιπόφιλες ενώσεις όπως η χοληστερόλη και τα κεραμίδια χρησιμοποιούνται σε τοπικές κρέμες δέρματος για πολλά χρόνια, επειδή είναι τα λιπίδια που βρίσκονται στον φυσιολογικό ιστό του δέρματος και ενσωματώνονται εύκολα σε λιποσώματα. (70) Παρά την πρόοδο στη σύνθεσή τους, υπάρχουν περιορισμοί όσον αφορά την εφαρμογή τους, συμπεριλαμβανομένης της κακής χημικής και φυσικής σταθερότητας, της δυσκολίας στην παραγωγή μεγάλης κλίμακας και της μη βέλτιστης διείσδυσης. (68)

Τα **αιθωσώματα** και τα **τρανσφεροσώματα** είναι υπερπαραμορφώσιμα κυστίδια που παράγονται με τη συμπίληψη αιθανόλης (20–45% w/w). Έχει αποδειχθεί ότι η βελτιωμένη ευελιξία αυτών των νανοφορέων έχει ως αποτέλεσμα ανώτερη διείσδυση μέσω του δερματικού φραγμού. (68) Τα αιθωσώματα που περιέχουν πολύ υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης και λιπιδίων είναι μαλακά και εύκαμπτα κυστίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς για την ενίσχυση της διαδερμικής παροχής μιας ποικιλίας καλλυντικών παραγόντων, όπως αντιοξειδωτικά, αντιρυτιδικούς παράγοντες, σαλικυλικό οξύ και πολλά άλλα. Μπορούν να προσαρμοστούν για την ασφαλή και καλή διείσδυση στο δέρμα και είναι πολύ πιο αποτελεσματικά από τα συμβατικά λιποσώματα στην παροχή τοπικά εφαρμοζόμενων καλλυντικών. (69)

Τα **νιοσώματα** είναι μη ιονικά επιφανειοδραστικά κυστίδια που επινοήθηκαν με τη χρήση μη ιονικών τασιενεργών (π.χ. αλκυλεστέρες, συμπεριλαμβανομένων των Spans, Tweens και αλκυλαιθέρες). Αυτά τα κυστίδια διαθέτουν υψηλή αποτελεσματικότητα παγίδευσης, βελτιωμένη χημική σταθερότητα και ενισχυμένη διείσδυση, καθώς και χαμηλότερο κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τα λιποσώματα. (68,70) Μορφολογικά, ένα νιοσώμα είναι μια νανοδομή με διάμετρο από 100nm έως 2μ, το κέντρο της οποίας είναι μια υδατική κοιλότητα που περιβάλλεται από στρώματα μη ιονικού τασιενεργού σε ελασματική φάση. Αυτά έχουν αξιολογηθεί ως φυσαλιδώδεις φορείς για ποικιλία φαρμάκων και καλλυντικών τοπικά. Τα νιοσώματα έχουν βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικά στην τοπική παροχή δραστικών συστατικών καθώς ενισχύουν τον χρόνο παραμονής των δραστικών συστατικών στην κεράτινη στιβάδα και στην επιδερμίδα, μειώνουν την απορρόφηση του συστήματος και επιτυγχάνουν στοχευμένη χορήγηση για το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα. (70)

## B. Μη φυσαλιδώδη συστήματα.

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει έναν αριθμό διαφορετικών ετερογενών συστημάτων που αποτελούνται από διασπορά μη αναμίξιμων φάσεων (λιπόφιλες και υδατικές) και σταθεροποιούνται από τασιενεργά. Τα στερεά λιπιδικά νανοσωματίδια (SLN) και οι **νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων (NLCs)** αποτελούνται από ένα μόνο στρώμα κελύφους και έναν εσωτερικό λιπιδικό πυρήνα που είναι στερεός στη θερμοκρασία σώματος και συνήθως παρασκευάζονται με μικρογαλάκτωμα και ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. Στα SLN, το μείγμα λιπιδίων σχηματίζεται μόνο από στερεά λιπίδια, ενώ στα NLC η υδρόφοβη μήτρα αποτελείται από έναν συνδυασμό στερεών και υγρών λιπιδίων. (74)

Αυτή η κατηγορία μη φυσαλιδωδών NPs διερευνάται κυρίως για τη δυνατότητά τους ως φορείς χημικά ασταθών μορίων και για τις αποφρακτικές τους ιδιότητες. (70) Τα NLC θεωρούνται ως αναβάθμιση των SLN και η συμπερίληψη ελαίων στη λιπιδική μήτρα μειώνει την κρυσταλλικότητα τους, βελτιώνοντας την ικανότητα φόρτωσης και τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα ενθυλάκωσης του συστήματος. (58,70) Επιπλέον, τα SLN έχουν μικρή διάρκεια ζωής μαζί με πιο αργούς ρυθμούς απελευθέρωσης φαρμάκων σε σύγκριση με τα NLC. (68)

Τα **νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (SLNs)** είναι υπομικροκολλοειδείς φορείς των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 50 έως 1000nm και αποτελούνται από φυσιολογικό λιπίδιο, διασκορπισμένο σε νερό ή σε υδατικό διάλυμα επιφανειοδραστικού. Τα SLN είναι δημοφιλή στα καλλυντικά επειδή αποτελούνται από φυσιολογικά και βιοαποδομήσιμα λιπίδια που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα. Το μικρό μέγεθος τους εξασφαλίζει στενή επαφή με την κεράτινη στοιβάδα, αυξάνοντας τη διείσδυση των ενεργών συστατικών μέσω του δέρματος και παρέχουν αποφρακτικές ιδιότητες που έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένη επιδερμική ενυδάτωση. (70) Χρησιμοποιούνται επίσης για το σχηματισμό φιλμ, το οποίο βοηθά στην επανένταξη και επιδιόρθωση του δερματικού φραγμού, καθιστώντας τα ιδανικά στα καλλυντικά για τη θεραπεία του ερεθισμένου δέρματος και με κνησμό και σε διάφορες δερματίτιδες. (69)

Το 2005 αποκάλυψαν την επιτυχία των νανοσωματιδίων λιπιδίων στον τομέα της αντιγήρανσης. Επίσης ότι τα SLN διαθέτουν χαρακτηριστικά φυσικών αναστολέων υπεριώδους ακτινοβολίας από μόνα τους, προσφέροντας έτσι την επιλογή για την ανάπτυξη ενός πιο αποτελεσματικού αντηλιακού συστήματος με μειωμένες

παρενέργειες. (69,70) Σε in vivo μελέτη έχει φανεί ότι η ενυδάτωση του δέρματος αυξάνεται κατά 31% μετά από 4 εβδομάδες με την προσθήκη 4% SLNs σε μια συμβατική κρέμα. Τα SLN είναι επίσης πλεονεκτούν ως τοπικό όχημα για αρώματα και παρέχουν παρατεταμένο αποτέλεσμα. (74)

Τα **νανογαλακτώματα** είναι διφασικά συστήματα, κολλοειδή, που αποτελούνται από ελαιώδη φάση, υδατική και έναν ή περισσότερους γαλακτωματοποιητές. Το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης είναι στην κλίμακα 20–400nm με τα περισσότερα νανογαλακτώματα μέχρι τώρα να είναι O/W και με ρευστή και διαφανή υφή. (69,72) Γενικά, αυτά τα συστήματα μπορούν να δημιουργηθούν τόσο με τη μέθοδο χαμηλής όσο και με υψηλής ενέργειας και παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά γαλακτώματα όπως ότι είναι πιο σταθερά έναντι συσσωμάτωσης και καθίζησης και ότι η μεγάλη διεπαφή που εμφανίζεται από τα σταγονίδια τους κάνει τη μεταφορά του υλικού ταχύτερη, βελτιώνοντας την απόδοση παράδοσης. (68)

Γενικά, τα νανογαλακτώματα είναι διαφανή και σταθερά, χρησιμοποιούνται για καθαρισμό και ως ισχυρά οχήματα στη βιομηχανία καλλυντικών για τη σύνθεση λοσιόν σώματος, κρεμών, αντηλιακών κ.λπ. Χρησιμοποιούνται επίσης στο σχεδιασμό νέων συστημάτων χορήγησης για φάρμακα και για λιπαρά συστατικά (όπως αιθέρια έλαια, λιπαρά οξέα και χρώματα). Αυτά τα συστήματα είναι κατάλληλα για την παροχή λιπόφιλων ενώσεων, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους στο δέρμα και παίζουν σημαντικό ρόλο στις καλλυντικές συνθέσεις. Η αύξηση της δραστηριότητας υποβολής διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για τα νανογαλακτώματα δείχνει το αναδυόμενο ενδιαφέρον των βιομηχανιών για αυτά. (69,72)

Τα **μικρογαλακτώματα** μοιράζονται πολλά χαρακτηριστικά με τα νανογαλακτώματα, συμπεριλαμβανομένης της ομοιόμορφης διασποράς σωματιδίων, με μέγεθος σταγόνων περίπου 100-200nm και διαφάνεια. Ένα πλεονέκτημα των μικρογαλακτωμάτων έναντι των νανογαλακτωμάτων σχετίζεται με την υψηλή αναλογία τασιενεργού/ελαίου, που τα καθιστά θερμοδυναμικά σταθερά και εύκολα στην παρασκευή τους (σχηματίζονται αυθόρμητα με απλή ανάμειξη). Ωστόσο, η υψηλή αναλογία επιφανειοδραστικών μπορεί συχνά να οδηγήσει σε δυσανεξία του δέρματος, περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή τους στα καλλυντικά. (68)

Εκτός από τα διφασικά σκευάσματα, ένα άλλο μη φυσαλιδώδες σύστημα που έχει βρει ευρεία εφαρμογή στο πεδίο είναι τα **μικκυλιακά νανοσωματίδια**. Αναγνωρίζονται ως ένα από τα πιο αποτελεσματικά σωματίδια όπου προσφέρουν μια ισχυρή και ευέλικτη πλατφόρμα που περιλαμβάνει λιπόφιλα ενεργά συστατικά με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε καλλυντικά σκευάσματα. Το μικρότερο μέγεθος σωματιδίων, η καλύτερη απόδοση ενθυλάκωσης και το λογικό κόστος κατασκευής τα καθιστούν πιο αποτελεσματικά από άλλους νανοφορείς. Συνήθως, χρησιμοποιούνται σε προϊόντα καθαρισμού δέρματος για την αποτελεσματική απομάκρυνση της λιπαρότητας και της βρωμιάς από το δέρμα χωρίς να επηρεάζεται η ακεραιότητα του φραγμού και ως εναλλακτική λύση στα συμβατικά καθαριστικά. Τα γαλακτώματα με βάση τα μικκυλιακά νανοσωματίδια είναι ελκυστικά υποψήφια για συστηματική χορήγηση φαρμάκων μέσω τοπικής εφαρμογής. (72)

## **2. Πολυμερικά νανοσωματίδια**

Τα πολυμερικά NPs μπορούν να συντεθούν χρησιμοποιώντας είτε φυσικά (χιτοζάνη, αλγινικό και ζελατίνη), είτε συνθετικά πολυμερή, που περιλαμβάνουν βιοαποικοδομήσιμους αλειφατικούς πολυεστέρες (π.χ. πολυγαλακτικό οξύ (PLA), πολυγαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ (PLGA) και πολυ-καπρολακτόνη (PCL)), βιοσυμβατά πολυακρυλικά και παράγωγα κυτταρίνης. Τα φυσικά πολυμερή θεωρούνται ασφαλέστερα και φιλικά προς το περιβάλλον αυξάνοντας το ενδιαφέρον, παρά το αυξημένο κόστος παραγωγής, τον υψηλό βαθμό μεταβλητότητας και την χαμηλή καθαρότητα των προϊόντων. Ανάλογα με τα συστατικά της σύνθεσης και τις μεθόδους παρασκευής, μπορούν να ληφθούν δύο διαφορετικά συστήματα: νανοκάψουλες και νανοσφαίρες. (68)

Οι **νανοκάψουλες** είναι δεξαμενές που αποτελούνται από έναν υγρό πυρήνα (γενικά γεμάτο με λάδι και σταθεροποιημένο με επιφανειοδραστική επικάλυψη) που περιβάλλεται από ένα πολυμερές κέλυφος. Συνήθως, ο εσωτερικός πυρήνας, που είναι ενθυλακωμένος σε επίπεδο νανοκλίμακας (10 nm έως 1000 nm), φιλοξενεί τον βιοδραστικό παράγοντα, ενώ το αντίστοιχο πολυμερές ελέγχει την απελευθέρωσή του. (68)

Η πιθανή δερματολογική χρήση των νανοκαψουλών διερευνήθηκε όταν κυκλοφόρησε το πρώτο καλλυντικό προϊόν με βάση τις νανοκάψουλες από τη L'Oreal το 1995. (70) Χρησιμοποιούνται στα προϊόντα περιποίησης ομορφιάς για να προστατεύσουν τα



συστατικά, να καλύψουν τις ανεπιθύμητες οσμές και να μειώσουν τα προβλήματα ασυμβατότητας μεταξύ των συστατικών. Τα εναιωρήματα πολυμερών νανοκάψουλας μπορούν να εφαρμοστούν απευθείας στο δέρμα ή να συντηχθούν σε ημιστερεά συστήματα και να λειτουργήσουν ως φορείς. Το επίπεδο διείσδυσης στο δέρμα μπορεί να ρυθμιστεί με τη χρήση πολυμερών και επιφανειοδραστικών στη σύνθεση. (69)

Οι **νανοσφαίρες** αποτελούνται από μια πολυμερή μήτρα, στην οποία πολλά δραστικά συστατικά μπορούν να παγιδευτούν ή να προσροφηθούν. Μια μεγάλη ποικιλία από υδρόφιλα και υδρόφοβα μόρια μπορούν να φορτωθούν σε αυτά τα NPs και να χρησιμοποιηθούν κυρίως για τη βελτίωση της απόδοσης χημικά ασταθών (π.χ. αντιοξειδωτικά και ρετινοειδή), ελάχιστα υδατοδιαλυτών (π.χ. οργανικά φίλτρα) και πτητικών (π.χ. αρώματα) παραγόντων. Γενικά αυτά τα νανοϋλικά παρέχουν παρατεταμένη απελευθέρωση των φορτωμένων ενεργών μορίων, παρατείνοντας τα ευεργετικά τους αποτελέσματα. (72)

### **3. Νανοκρύσταλλοι**

Οι νανοκρύσταλλοι είναι συσσωματώματα που αποτελούνται από αρκετές εκατοντάδες έως χιλιάδες άτομα που συνδυάζονται σε ένα σύμπλεγμα με μεγέθη που κυμαίνονται από 10-400 nm. Οι νανοκρύσταλλοι εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην αγορά καλλυντικών το 2000 από τη Juvena σε ένα προϊόν που περιείχε νανοκρυστάλλους με ρουτίνη ως βασικό συστατικό. Σε μια μελέτη παρατηρήθηκε ότι, σε σύγκριση με τον υδατοδιαλυτό γλυκοζίτη ρουτίνης (ρουτίνη με συνδεδεμένη γλυκόζη), η νανοκρυσταλλική σύνθεση του αρχικού μορίου ρουτίνης έχει 500 φορές υψηλότερη βιοδραστικότητα. (κ2,κ6)

Η παραγωγή νανοκρυστάλλων προτείνεται συχνά ως πιθανή λύση για τους ελάχιστα υδατοδιαλυτούς παράγοντες, χάρη στη μεγάλη επιφάνεια και στη κακή κρυσταλλικότητα που επιδεικνύουν. Οι νανοκρύσταλλοι, σταθεροποιημένοι με επιφανειοδραστική/πολυμερική επίστρωση, μπορούν να ληφθούν είτε με προσεγγίσεις από κάτω προς τα πάνω είτε από πάνω προς τα κάτω, αν και γενικά προτιμώνται οι τελευταίες (π.χ. υγρή άλεση και ομογενοποίηση υψηλής πίεσης) (68)

### **4. Κυβοσώματα**

Τα κυβοσώματα είναι διακριτά, υπομικρά νανοσωματίδια, ιδιαίτερα ρευστά, ασυνεχούς κυβικής κρυσταλλικής φάσης ενός συγκεκριμένου επιφανειοδραστικού με κατάλληλη

αναλογία νερού σε συνδυασμό σε μια νανοδομή. (Εικόνα 4.3) Το μονογλυκερίδιο γλυκερόλη μονοελαΐνη είναι η πιο κοινή επιφανειοδραστική ουσία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή κυβωσμάτων. (69) Οι πρόσφατες ερευνητικές δραστηριότητες σχετικά με τη χρήση του κυβωσώματος σε τομείς προϊόντων προσωπικής περιποίησης ποικίλλουν από τη φροντίδα του δέρματος έως τη φροντίδα των μαλλιών και τα αντιδρωτικά. Ο αριθμός των ερευνών σε συνεργασία με εταιρείες καλλυντικών όπως η L'Oreal και η Nivea προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν σωματίδια κυβωσώματος για την απορρόφηση ρύπων από τα καλλυντικά και ως σταθεροποιητές για τα γαλακτώματα τύπου O/W. (69,70)

## **5. Δενδριμερή**

Τα δενδριμερή είναι οργανικές χημικές οντότητες με ημιπολυμερή δομή και εμφανίζονται ως τρισδιάστατα νανοδομημένα μακρομόρια εκτενώς διακλαδισμένα που μοιάζουν με δέντρο. Τα τερματικά των κλαδιών παρέχουν μια πλούσια πηγή λειτουργικότητας στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Οι διαστάσεις τους είναι εξαιρετικά μικρές, με διαμέτρους από 2 έως 10nm και αποτελούν μια συναρπαστική νέα κατηγορία μακρομοριακής αρχιτεκτονικής και ένα σημαντικό συστατικό για τη θεραπεία ποικιλιών δερματικών παθήσεων. (70)

Η επιφανειακή κίνηση και οι κλάδοι των δενδριμερών οφείλονται στις υδρόφοβες ιδιότητες των περιφερειακών περιοχών τους σε συνδυασμό με τις υδρόφιλες ιδιότητες των κεντρικών τους περιοχών. Επιπλέον, η σταθερότητα, η μονοδιασπορά, η πολυσθενότητα και η αξιοπιστία, τα καθιστούν ιδανικούς μεταφορείς για τη χορήγηση φαρμάκων και καλλυντικών. (69) Αρκετές εταιρείες καλλυντικών έχουν δημιουργήσει πατέντες για την εφαρμογή δενδριμερών σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών, δέρματος και νυχιών. (70) Τα δενδριμερή της ρεσβερατρόλης έχουν αναπτυχθεί και έχουν βοηθήσει στη βελτίωση της γενικής διαλυτότητας και της διήθησης του δέρματος, το οποίο αργότερα ενθάρρυνε την επέκταση και την εμπορευματοποίηση αυτού του σκευάσματος που βασίζεται σε δομή δενδριμερών. (69)

### **4.3.2 Ανόργανα νανοσωματίδια**

Τα ανόργανα NPs είναι διαφορετικά από τα οργανικά πολυμερή νανοσυγκροτήματα, αποτελούνται από μέταλλα ή οξειδία μετάλλων και συμπεριφέρονται σαν αδιάλυτα σωματίδια, γι αυτό δεν αναμένεται να αποσυντεθούν ή να αλλάξουν μετά την εφαρμογή

τους στο δέρμα. Η αναπαραγωγίμη σύνθεσή τους, μαζί με τις ιδιότητές τους (μέγεθος, μορφολογία), τα καθιστούν κατάλληλα για μεγάλης κλίμακας κατασκευή και ως εκ τούτου, η εφαρμογή τους στη βιομηχανία καλλυντικών έχει πλέον καθιερωθεί. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως ενεργά συστατικά για σκοπούς αντιμικροβιακής και υπεριώδης προστασίας και βελτιώνουν την καλλυντική απόδοση δρώντας ως φορέας ή τροποποιητής ρεολογίας,. Τα στερεά σωματίδια που εφαρμόζονται για την περιποίηση του δέρματος συνοψίζονται παρακάτω. (68,74)

### **1. Νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου και οξειδίου ψευδαργύρου (TiO<sub>2</sub> και ZnO NPs)**

Τα νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου και οξειδίου ψευδαργύρου παρασκευάζονται με την τεχνική sol-gel και τη μέθοδο καθίζησης, αντίστοιχα. Η ικανότητά τους να αντανακλούν και να διασκορπίζουν την ακτινοβολία UV-A και UV-B τα καθιστά εξαιρετικά ανόργανα φίλτρα UV. (68) Τα νανοσωματίδια TiO<sub>2</sub> και ZnO ξεκινούν από το μέγεθος των 20 nm, παρουσιάζουν καλύτερη διασπορά και παράγουν υψηλή επανορθωτική δράση λόγω της διαφάνειάς τους και ενισχυμένη προστατευτική δράση, χάρη στον υψηλότερο παράγοντα αντηλιακής προστασίας (SPF). Από την άλλη πλευρά, η εισπνοή μεγάλης ποσότητας αυτών έχει αποδειχθεί ότι είναι επιβλαβής, με την εναλλακτική λύση να εστιάζει σε κανονικά συστατικά αντηλιακών, καθώς είναι ασφαλέστερα και δεν υπάρχουν ενδείξεις διείσδυσης τους στην επιδερμίδα ή σημαντικά προβλήματα τοξικότητας. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) ταξινομεί το TiO<sub>2</sub> ως καρκινογόνο της ομάδας 2B της IARC. (69)

### **2. Νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου (Nanogold και Nanosilver)**

Τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου έχουν μελετηθεί ως πολύτιμο υλικό στη βιομηχανία καλλυντικών για τις ισχυρές αντιβακτηριδιακές και αντιμυκητιακές τους ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ευρέως σε αποσμητικά, αντιγηραντικές κρέμες, μάσκες και θεραπείες περιποίησης δέρματος. (69,70)

A) Νανοσωματίδια χρυσού είναι πολύ ευέλικτα νανοσωματίδια με ευρύ φάσμα εφαρμογών, ως χρωστική, συντηρητικό και ως φορέας, λόγω της σταθερότητάς τους, της βιοσυμβατότητας, της υψηλής ικανότητας φόρτωσης και της εύκολης χειραγώγησης των μορφολογικών ιδιοτήτων τους. (68) Τα νανοσωματίδια χρυσού εμφανίζουν αντιγηραντικά οφέλη και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διόρθωση της βλάβης του

δέρματος και στη βελτίωση της επιφάνειας της επιδερμίδας. Οι καταπραϊντικές ιδιότητες τους, τα καθιστούν εξαιρετικό παράγοντα για τη θεραπεία της φλεγμονής του δέρματος, του ηλιακού εγκαύματος και της υπερευαισθησίας. (69)

Ο χρυσός στα προϊόντα περιποίησης δέρματος ονομάζεται κολλοειδής χρυσός ή νανοχρυσός, στην περιοχή μεγεθών από 5nm έως 400nm και το χρώμα του κυμαίνεται από κόκκινο έως μοβ, ανάλογα με το μέγεθος και τη συνολική επιφάνεια. Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν διαφορετικά σχήματα, όπως νανοσφαίρες, νανοράβδοι, νανοσυμπλέγματα, νανοεστέρες, νανοκελύφη, νανοκύβοι και γωνίες νανοτριών και η κατάσταση τους καθορίζει την πρόσληψη από τα κύτταρα και την οπτική τους συμπεριφορά. (72)

B) Νανοσωματίδια αργύρου (Ag NPs) έχουν διερευνηθεί εκτενώς για κοσμητικούς σκοπούς ως ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά και αντιμυκητιακά μέσα και ως έγχρωμες χρωστικές (68) Στην Ευρώπη, η ασφάλεια του κολλοειδούς αργύρου σε νανοδομές όσον αφορά τη χρήση του σε στοματικά και καλλυντικά είδη είναι διφορούμενη. Στις ΗΠΑ, λόγω της έλλειψης κανονισμών του FDA, θεωρείται ότι δεν έχουν πολλά υποσχόμενες αντιβακτηριακές ιδιότητες. Σύμφωνα με έρευνες, η χρήση νανοσωματιδίων αργύρου ως πρόσθετου στα καλλυντικά καθιστά το σκεύασμα σταθερό, χωρίς να παρουσιάζει καθίζηση, για περισσότερο από 1 χρόνο (71)

### **3. Πυρίτιο (SiO<sub>2</sub>)**

Τα νανοσωματίδια πυριτίου υπάρχουν ως νανοδιασπορές με εύρος μεγεθών από 5 έως 100 nm και μπορούν να παραδώσουν τόσο υδρόφιλες όσο και λιπόφιλες οντότητες στους αντίστοιχους στόχους τους με ενθυλάκωση. Τα νανοσωματίδια πυριτίου έχουν υδρόφιλες επιφάνειες που ευνοούν την εκτεταμένη διανομή και το χαμηλό κόστος κατασκευής και (69) περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, που αποτελείται κυρίως από άμορφο πυρίτιο. Χρησιμοποιούνται σε προϊόντα καθαρισμού και σε προϊόντα για τη βελτίωση της υφής τους ή την παροχή ματ φινιρίσματος στη θέση εφαρμογής του προϊόντος. (68) Επίσης γίνεται χρήση του για τη βελτίωση της επάρκειας, της επιφάνειας και της περιόδου πραγματικής χρηστικότητας των καλλυντικών και έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την εμφάνιση των αποχρώσεων στα κραγιόν και την διατήρηση των χρωμάτων. Αν και βρίσκονται σε καλλυντικά για τα μαλλιά, το δέρμα, τα χείλη, το πρόσωπο και τα νύχια, η εμπορική χρήση

νανοσωματιδίων πυριτίου σε καλλωπιστικούς παράγοντες εξακολουθεί να είναι διαφορούμενη, απαιτώντας μακροχρόνιες δοκιμές. (72)

#### **4. Carbon Black**

Η αιθάλη, CI 77266, χρησιμοποιείται συχνά ως χρωστική σε καλλυντικά προϊόντα για τα μάτια και το δέρμα. Η ΕΕ το έχει εγκρίνει για χρήση στη μορφή της νανοδομής ως χρωστική σε μέγιστο ποσοστό 10% και όταν δεν υπάρχει κίνδυνος εισπνοής. Μια αξιολόγηση των νανοσωματιδίων μαύρου άνθρακα έδειξε ότι εμφάνιζαν μεγαλύτερη τάση να προκαλούν κυτταροτοξικότητα, επιδείνωση και αλλαγές στη φαγοκυττάρωση, σε σύγκριση με σωματίδια μεγέθους μικρο. (68)

#### **5. Νανο-υδροξυαπατίτης**

Ο νανο-υδροξυαπατίτης έχει ενσωματωθεί σε ειδικά στοματικά σκευάσματα, όπως οδοντόκρεμες και στοματικά διαλύματα, για τη θεραπεία της ακραίας οδοντικής ευαισθησίας και για τη γυαλιστική επαναμεταλλοποίηση των δοντιών. Τέτοια παρασκευάσματα θα μπορούσαν να προσφέρουν μια εναλλακτική λύση στην οδοντόκρεμα με φθόριο, αφού θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη και ασφαλής επιλογή από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (USFDA). (72)

#### **6. Νανοσωματίδια χαλκού**

Δεδομένου του κεντρικού ρόλου του χαλκού στην παραγωγή της εξωκυτταρικής μήτρας του δέρματος και της βιοκτόνου δράσης του, τα νανοϋλικά με βάση τον χαλκό έχουν διερευνηθεί για αντιγηραντικούς και βιοκτόνους σκοπούς. Ο ρόλος τους όμως, εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενος και η χρήση τους στην περιποίηση της επιδερμίδας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη. (70)

#### **7. Νανοσωματίδια οξειδίου του αλουμινίου**

Τα νανοσωματίδια οξειδίου του αλουμινίου περιλαμβάνονται στον κατάλογο των νανοϋλικών που έχουν εγκριθεί από την ΕΕ, αλλά χρησιμοποιούνται σε προϊόντα μακιγιάζ (π.χ. concealers, foundation και ορυκτά foundation) αντί για περιποίηση δέρματος. (70)

8. Πολλά νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν διερευνηθεί για καλλυντικούς σκοπούς, όπως **νανοδιαμάντια**, **φουλερένια** και **νανοσωλήνες**. Ενώ τα δύο πρώτα

έχουν εφαρμοστεί στην περιποίηση του δέρματος, τα τελευταία, μαζί με άλλους μη τοξικούς και φθηνότερους νανοσωλήνες χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στην περιποίηση των μαλλιών ως φορέας χρωστικής. (68) Τα φουλερένια άνθρακα ή «Bucky Balls» αποτελούνται από δακτυλίους άνθρακα περιττών αριθμών (όπως πεντάγωνο και επτάγωνο), που προσδίδουν ένα τρισδιάστατο σφαιρικό σχήμα. (Εικόνα 4.4) Είναι εξαιρετικά υδρόφοβα και επομένως δεν είναι διαλυτά σε υδατικά διαλύματα, τα οποία αρχικά περιόρισαν τις εφαρμογές τους, αλλά η χρήση επιφανειοδραστικών ή επιφανειακών τροποποιήσεων αύξησε την ικανότητα τους να διαλυτοποιούνται στο νερό. Τέλος, παρουσιάζει ισχυρές ικανότητες σάρωσης έναντι των ελεύθερων ριζών που έχουν ληφθεί υπόψη για τη χρήση τους σε σκευάσματα αναζωογόνησης. (70, 73)

#### **4.4 Ο ρόλος των νανοσωματιδίων σε σχέση με το δερματικό φραγμό.**

Εν περιλήψει, το δέρμα είναι ένα πολύπλοκο όργανο που αποτελείται από πολλαπλά στρώματα με την επιδερμίδα, να αντιπροσωπεύει τον κύριο φυσικοχημικό φραγμό στη διείσδυση βιοδραστικών παραγόντων. Αποτελείται από ένα στρωματοποιημένο, σφιχτό επιθήλιο, αποτελούμενο από κερατινοκύτταρα που βρίσκονται σε σταθερή κατάσταση μετάβασης από τα βαθύτερα στρώματα στα πιο επιφανειακά, συνδεδεμένα μεταξύ τους με δεσμοσώματα, συγκολλητικές συνδέσεις και σφιχτές συνδέσεις, που περιορίζουν τη διάχυση ουσιών στο χόριο. Διαφορετικά στάδια κερατινικής ωρίμανσης καθορίζουν τη φύση των τεσσάρων στιβάδων της επιδερμίδας, οι οποίες, από την επιφάνεια προς τα κάτω έως τη βασική μεμβράνη (BM), περιλαμβάνουν: την κεράτινη στιβάδα (SC), την κοκκιώδη στιβάδα (SG), την ακανθώδη στιβάδα (SS) και η βασική στιβάδα (SB). (75)

##### **4.4.1 Ιδιότητες φραγμού του δέρματος.**

Η SC ως το εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας είναι υπεύθυνη για τη λειτουργία του δερματικού φραγμού. Αποτελείται από εκφυρηγμένα νεκρά κύτταρα (κερατινοκύτταρα) που περιβάλλονται από μια λιπιδική μήτρα οργανωμένη σε μια μη ευθυγραμμισμένη δομή «τούβλου και κονιάματος» και η επιφάνειά του παρουσιάζει πολυάριθμες αυλακώσεις μεταβλητού βάθους που ονομάζονται αυλάκια δέρματος. Ενώ η πλειοψηφία της αμυντικής λειτουργίας της επιδερμίδας ενεργοποιείται από τη SC, η οποία θεωρείται λιπόφιλη στιβάδα, όλα τα άλλα στρώματα ομαδοποιούνται σε ένα ενιαίο, που ονομάζεται βιώσιμη επιδερμίδα και εμφανίζει έναν πιο υδρόφιλο

χαρακτήρα (75% νερό). Το χόριο αποτελείται κυρίως από ινοβλάστες και ένα δίκτυο ινών κολλαγόνου και ελαστίνης σε μια μήτρα με βάση τις πρωτεογλυκάνες και μαζί με το υπόδημα, παρέχει τροφική και μηχανική υποστήριξη στην επιδερμίδα. Τα αιμοφόρα αγγεία και οι νευρώσεις βρίσκονται σε αυτά τα βαθύτερα στρώματα. (74)

Τα μόρια μπορούν να διεισδύσουν σε όλη την επιδερμική στιβάδα από διαφορετικές οδούς ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και με ένα όριο μοριακού βάρους 500Da που επιτρέπεται για τη διείσδυση μορίων στο δέρμα. Αν και η αναγνώριση των κυρίαρχων μονοπατιών είναι ακόμα υπό συζήτηση, γενικά πιστεύεται ότι οι υδρόφοβες ενώσεις διεισδύουν κατά προτίμηση μέσω μιας μεσοκυτταρικής οδού, ενώ τα διαλυτά μόρια επωφελούνται από μια διακυτταρική οδό. (75)

Οι λιπόφιλες ενώσεις εκμεταλλεύονται τα πολλαπλά στρώματα λιπιδίων που βρίσκονται μεταξύ των κερατοκυττάρων, ενώ η διείσδυση υδρόφιλων μορίων λαμβάνει χώρα ως αποτέλεσμα των υδατικών πόρων που οριοθετούνται από τις περιοχές της κεφαλής των λιπιδίων της μήτρας και κατά μήκος των κερατοκυττάρων. Μια εναλλακτική οδός που έχει περιγραφεί καλά είναι η λεγόμενη σκωληκοειδική οδός που αποτελείται από αδένες και τριχοθυλάκια (μόνο το 0,1% της συνολικής επιφάνειας του δέρματος). Γενικά, η παθητική διείσδυση του δέρματος είναι χαρακτηριστική για ουσίες με χαμηλό μοριακό όγκο και μέτριο συντελεστή κατανομής O/W και τα λιπόφιλα μόρια διεισδύουν πιο εύκολα από τα υδρόφιλα στη SC, αλλά είναι δύσκολο να εξέλθουν. (76)

Εκτός από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων, η διείσδυση στο δέρμα επηρεάζεται και από άλλες μεταβλητές, όπως ο μεταβολισμός του δέρματος, η θέση και η κατάσταση των ιστών στο σημείο εφαρμογής, ο τρόπος με τον οποίο οι ουσίες συνδέονται με τη δομή του ιστού και η έκταση της ενσωμάτωσης του οχήματος. (75,76). Η σύνθεση μπορεί να δράσει αλλάζοντας την πολικότητα και την αναλογία λιπόφιλων-υδροφιλικών ενώσεων με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν ενυδάτωση ή/και τροποποίηση του επιδερμικού φραγμού. Επιπλέον, η συμπεριφορά φάσης και το ιξώδες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας τη βιοδραστική μοριακή κατανομή. (75)

Τέλος, αξίζει να αναφέρουμε ότι το αν ένας βιοδραστικός παράγοντας πρέπει να φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία (δηλαδή την απορρόφηση) ή στο χόριο (δηλαδή τη διείσδυση) ή να διασχίσει μερικώς την επιδερμίδα, εξαρτάται αυστηρά από τον τελικό

στόχο. Για καλλυντικούς σκοπούς, η δράση περιορίζεται συχνά στα υψηλότερα στρώματα του δέρματος και επομένως, ο βαθμός διείσδυσης είναι πολύ χαμηλός. (74)

#### **4.4.2. Διείσδυση νανοσωματιδίων κατά μήκος του δερματικού φραγμού**

Η διείσδυση των NPs είναι ένα εξαιρετικά αμφιλεγόμενο θέμα, για δύο βασικούς λόγους, πρώτον για τις τοξικολογικές επιπτώσεις της νανοτεχνολογίας και δεύτερον για την ανάγκη να αποκαλυφθεί ο ρόλος των νανοϋλικών ως φορείς για την ενίσχυση της διείσδυσης του βιοδραστικού παράγοντα. Τα NPs έχουν παρατηρηθεί ότι διεισδύουν στο δέρμα μέσω των ίδιων τριών οδών που περιγράφονται για όλες τις ουσίες, αν και το μέγεθος τους παίζει σημαντικό ρόλο. (68)

Η ανάλυση της δομής του SC υποδηλώνει ότι η διείσδυση μέσω υδατικών πόρων μπορεί να συμβεί για νανοϋλικά κάτω των 36nm, ενώ η πιθανότητα τα NPs να διεισδύσουν μέσω της διακυτταρικής λιπιδικής μήτρας αυξάνεται όταν είναι μικρότερα από 5 - 7nm. Επιπλέον, ο μεγάλος ωοθυλακικός χώρος (10-210μm) επιτρέπει τη συσσώρευση νανοαντικειμένων που είναι σε θέση να διασκορπίζονται στον ιδρώτα και το σμήγμα. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του δέρματος επηρεάζουν τον ρυθμό διείσδυσης των NPs, για παράδειγμα τα αρνητικά φορτισμένα NPs διασχίζουν την επιδερμίδα πιο εύκολα από τα θετικά ή μπορεί να επιτρέπουν μεγαλύτερη διαθεσιμότητα αυτών των συστημάτων στη SC. (77)

Παρόλο που τα NPs έχουν διαφορετική ικανότητα διείσδυσης ανάλογα με το μέγεθος, τη σύσταση, την κολλοειδή σταθερότητα και τις ιδιότητες του οχήματος, μπορούν να γίνουν ορισμένες γενικές παρατηρήσεις διακρίνοντας τα στα αδιάλυτα και στα NPs που βασίζονται σε λιπίδια με επιφανειοδραστικές ουσίες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει στερεά ανόργανα NPs και πολυμερή νανოსύμπλοκα που είναι βιοανθεκτικά μετά την εφαρμογή τους στο δέρμα που συσσωρεύονται κυρίως στην επιφάνεια του ανέπαφου δέρματος και στα ανώτερα στρώματα της SC. Δεδομένου του μικροσκοπικού τους μεγέθους, το τοπικά εφαρμοσμένο ZnO, που χρησιμοποιείται συχνότερα σε αντηλιακά, δεν έδειξε σημαντική διείσδυση στο κανονικό δέρμα και έτσι ο ψευδάργυρος που βρέθηκε στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας και στο χόριο προέκυψε από τη διαλυτοποίηση του NP, όπου δεν διαχέεται στους περιβάλλοντες ιστούς. (77)

Τα τοπικά εφαρμοζόμενα νανοϋλικά που βασίζονται σε λιπίδια και τασιενεργά δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, εξαιτίας της ομοιότητας στις συνθέσεις τους είναι πολύ



δύσκολο έως και αδύνατο να γίνει διάκριση μεταξύ των NPs που έχουν χορηγηθεί και των συστατικών του δέρματος. Γενικά θεωρείται ότι αυτά τα νανοϋλικά δεν παραμένουν ανέπαφα μετά τη διέλευση του επιθηλίου και ότι τα εύκαμπτα σωματίδια διεισδύουν πιο βαθιά από τα άκαμπτα NP. Τα εύκαμπτα NPs, όπως τα λιποσώματα, είναι εγγενώς ασταθή κατά τη χορήγησή τους, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα συστατικά του δέρματος. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί διείσδυσης, με τον επικρατέστερο να εξαρτάται από τις ιδιότητες του νανοαντικειμένου. (68)

Ακόμη πιστεύεται ότι τα υπερπαραμορφώσιμα κυστίδια (π.χ. τρανσφεροσώματα και αιθοσώματα) ακολουθούν τις ίδιες οδούς που περιγράφηκαν προηγουμένως, αν και η ικανότητά τους να συμπιέζονται μέσω των πόρων μπορεί να αυξήσει τη συμβολή των ανέπαφων ή μερικώς ανέπαφων σωματιδίων στη διείσδυση. Από την άλλη πλευρά, τα άκαμπτα νανοϋλικά που χορηγούνται δερματικά (π.χ. SLNs, NLCs) είναι γενικά ενσωματωμένα στα ανώτερα στρώματα του SC, όπου έχουν αποφρακτικό αποτέλεσμα ή υποστηρίζουν τη λειτουργία του φραγμού του δέρματος. (77)

#### **4.5 Εφαρμογή των νανοσωματιδίων στα καλλυντικά**

Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται στην κοσμητολογία ως ενεργά συστατικά, τροποποιητές ρεολογίας και φορείς για βιοενεργά μόρια. Η δυσπιστία που υφίσταται ως προς τη χρήση των NPs στα καλλυντικά καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό και την ταξινόμηση των νανοϋλικών που περιέχονται στα εμπορικά σκευάσματα. Τα νανοσωματίδια πριν από την ενσωμάτωση σε ένα καλλυντικό χαρακτηρίζονται ως προς τη μορφολογία, την κατανομή μεγέθους, το δυναμικό ζήτα, την ενθουλάκωση και την αποτελεσματικότητα φόρτωσης. Ο ρόλος τους παραμένει άγνωστος επειδή αναφέρονται ως συστατικά στην ετικέτα του προϊόντος μόνο όταν συντίθενται σκόπιμα και προστίθενται σε συγκεκριμένα παρασκευάσματα. Γενικά, λίγες λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία παραγωγής των NP αναφέρονται στους τεχνικούς ισχυρισμούς. (68)

Είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί προσεκτικά ολόκληρο το καλλυντικό προϊόν προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωσή του με τις απαιτούμενες παραμέτρους ποιότητας. Η αξιολόγηση οφείλει να ξεκινήσει στη φάση της προκαταρκτικής σύνθεσης με την επιλογή συμβατών συστατικών και την κατάλληλη τεχνική παρασκευής,

ακολουθούμενη από τη διεξαγωγή μελετών σταθερότητας. Η τελική αξιολόγηση ενός προϊόντος περιλαμβάνει τη φυσική, χημική και μικροβιολογική ανάλυση. (68)

Η φυσική ανάλυση λαμβάνει υπόψη τις οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως το χρώμα, την οσμή και την παρουσία διαχωρισμού φάσεων, το pH και το ιξώδες. Εάν το προϊόν περιέχει ενεργά συστατικά, είναι χρήσιμο να αξιολογηθεί η περιεκτικότητά τους και ο ρυθμός απελευθέρωσής τους από τη σύνθεση και στα αντηλιακά σκευάσματα απαιτείται αντηλιακός παράγοντας προστασίας (SPF) και προσδιορισμός της αντοχής στο νερό. Επίσης, η μικροβιολογική σταθερότητα πρέπει να αξιολογείται για να εγγυάται τη συμμόρφωση με τα πρότυπα ποιότητας του προϊόντος, καθώς και κατά την περίοδο αποθήκευσης και χρήσης του από τον καταναλωτή.(68)

#### 1. Τα NPs ως ενεργά συστατικά στα καλλυντικά

Ορισμένα νανοϋλικά έχουν την εγγενή ικανότητα να βελτιώνουν την ευεξία του δέρματος, αυξάνοντας την αξία των νανοκαλλυντικών προϊόντων. Τα NPs κερδίζουν σε δημοφιλία τα ενεργά συστατικά των καλλυντικών, καθώς ενισχύουν την ομορφιά, έχουν θεραπευτικούς ρόλους σε ασθένειες, προστατεύουν από την υπεριώδη ακτινοβολία και περιλαμβάνουν διάφορες δερματοπάθειες (73)

Εκτός από τη χρήση τους ως φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας, δρουν και σαν ενυδατικά και αντιγηραντικά συστατικά. Παράδειγμα τα λιποσώματα τείνουν να διασπώνται μετά την εφαρμογή τους στο δέρμα για να μπορούν τα συστατικά τους να διεισδύσουν βαθιά στη SC, όπου ασκούν ενυδατική δράση, λόγω της εσωτερικής υγροσκοπικότητας των φωσφολιπιδίων και του μεταβολισμού τους. Τα σκευάσματα που περιέχουν τέτοια συστατικά χρησιμοποιούνται σε ερεθισμένο, ευαίσθητο ξηρό δέρμα ως εναλλακτική λύση στα συμβατικά γαλακτώματα. (74)

Τα NPs και τα νανοϋλικά με βάση τον χαλκό, έχουν διερευνηθεί για την αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή τους δράση για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Στα καλλυντικά, ωστόσο μπορούν να συμπεριληφθούν στην τελική σύνθεση ως ενεργό συστατικό για την πρόληψη και τη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων ή εναλλακτικά να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά για να προλάβουν τη μικροβιακή μόλυνση του προϊόντος κατά τη διαδικασία κατασκευής και τη χρήση από τον πελάτη. Επίσης, τα μικκυλιακά συστήματα και τα νανογαλακτώματα έχουν βρει εφαρμογή στον καθαρισμό του προσώπου, με ευρέως χρησιμοποιούμενο το λεγόμενο μικκυλιακό νερό, όπου

περιέχει νερό και μικρές ποσότητες ήπιου επιφανειοδραστικού και απομακρύνει αποτελεσματικά τη βρωμιά χωρίς να αφρίζει ή/και να διαταράσσει τον φραγμό του δέρματος. (74)

## 2. Άλλες χρήσεις για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των σκευασμάτων.

Οι τροποποιητές ρεολογίας, που συχνά αναφέρονται ως πυκνωτικά, περιλαμβάνονται στις συνθέσεις των καλλυντικών για να αυξήσουν το ιξώδες τους, να βελτιώσουν τα αισθητηριακά τους χαρακτηριστικά και να δώσουν στον καταναλωτή την αντίληψη της ποιότητας. Η χρήση νανοϋλικών, κυρίως NP αργίλου και πυριτίου, ως ρεολογικοί τροποποιητές έχουν γίνει πολύ δημοφιλής. Συγκεκριμένα, η χημική αδράνεια των NP του πυριτίου τα καθιστά βέλτιστα για καλλυντικούς σκοπούς, σε τέτοιο βαθμό που σημαντικές εταιρείες καλλυντικών (π.χ. L'Oreal) αναφέρουν τη συστηματική χρήση τους.

Οι νανοκρύσταλλοι μπορούν να βελτιώσουν την απόδοση ορισμένων βιοδραστικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά και προκύπτουν από τη νανονικοποίηση. Αρκετά μόρια και εκχυλίσματα είναι έγχρωμα, δίνοντας στο προϊόν μια δυσάρεστη εμφάνιση και παραμένουν ελάχιστα διαλυτά θέτοντας σε κίνδυνο την ομοιογένεια του προϊόντος και να περιορίζοντας την απορρόφησή του. Η νανονοποίηση των βιοδραστικών παραγόντων έχει προταθεί ως στρατηγική για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, αφού η μεγάλη επιφάνεια των νανοκρυστάλλων αυξάνει τους ρυθμούς διάλυσης και την ικανότητα πρόσφυσης του δέρματος και προάγει τη διείσδυση. (74,78)

## 3. Τα νανοσωματίδια ως οχήματα παράδοσης

Στα καλλυντικά, οι νανοφορείς αξιοποιούνται για την επίλυση ζητημάτων, όπως η κακή σταθερότητα, η χαμηλή διαλυτότητα, η ικανότητα διείσδυσης και η ανάγκη ελέγχου της απελευθέρωσής τους. Ορισμένα ενεργά συστατικά είναι εγγενώς ασταθή υπό συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (π.χ. τα αντιοξειδωτικά και τα ρετινοειδή είναι ευαίσθητα στην υπεριώδη ακτινοβολία, το οξυγόνο και θερμότητα), αλλά η νανοενθυλάκωση μπορεί να τα προστατεύσει από την υποβάθμιση, ενισχύοντας τη διάρκεια ζωής και την *in vivo* αποτελεσματικότητά τους. Οι νανοφορείς μπορεί επίσης να κάνουν πρακτική τη σύνθεση κακώς διαλυτών μορίων, αυξάνοντας τη διαλυτότητα ορισμένων δραστικών συστατικών με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων προϊόντων. (68)

Επίσης, η ενίσχυση της διείσδυσης του βιοδραστικού παράγοντα μπορεί να επιτευχθεί με έναν διαφορετικό μηχανισμό που σχετίζεται αυστηρά με τις ιδιότητες των νανοφορέων. Τα SLN και τα NLC ασκούν αποφρακτική δράση που μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της διάχυσης του δραστικού συστατικού, ενώ τα νανοϋλικά που αποτελούνται από επιφανειοδραστικές ουσίες, φωσφολιπίδια και άλλα αμφιφιλικά μόρια μπορεί να δρουν ως ενισχυτές διείσδυσης επηρεάζοντας την οργάνωση της λιπιδικής μήτρας του δέρματος. Η ενίσχυση της διείσδυσης είναι ζωτικής σημασίας επειδή το δέρμα είναι ένα πολύ επιλεκτικό όργανο και οι φυσικοχημικές ιδιότητες που απαιτούνται για τη διείσδυση στη SC είναι πολύ αυστηρές. (68)

Τέλος, η νανοενθυλάκωση των δραστικών συστατικών μπορεί να τροποποιήσει την κινητική απελευθέρωσή τους σε σύγκριση με τις συμβατικές συνθέσεις, παρέχοντας παρατεταμένη απελευθέρωση. Συνολικά, ένα συγκεκριμένο όφελος της νανοτεχνολογίας απορρέει από την ευελιξία των υλικών που συνθέτουν τον φορέα, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε συγκεκριμένα παρασκευάσματα, σε ένα ή περισσότερα αποτελέσματα και γενικά να αυξήσει την αποτελεσματικότητα του προϊόντος. (72)

#### **4.6 Τοξικολογική επίδραση των νανοσωματιδίων στο δέρμα**

Το θέμα της τοξικολογικής επίδρασης των νανοσκευασμένων «καλλυντικών» στον δέρμα αφορά τη διείσδυσή τους, η οποία σχετίζεται κυρίως με τη διαλυτότητα των NPs, με τις επιφανειακές διαστάσεις, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την ικανότητά τους να υποστούν διάσπαση. Αυτό σημαίνει ότι δεν πρέπει να γενικεύσουμε την τοξικολογική συμπεριφορά των διαφορετικών κατηγοριών νανοϋλικών. Ωστόσο, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η διαπερατότητα των NPs μέσω της SC και η ικανότητά τους να φτάσουν στους βιώσιμους ιστούς διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη δερματολογική ασφάλεια και μπορούν να γίνουν ορισμένες γενικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με τον βιοανθεκτικό και μη χαρακτήρα τους. (76)

##### **4.6.1 Κίνδυνοι για την υγεία που σχετίζονται με τα νανοκαλλυντικά**

Έχει αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων λόγω της πιθανής τοξικότητάς τους, η οποία μπορεί να εξαρτάται από την ποσότητα, την οδό και τον χρόνο έκθεσης των νανοσωματιδίων. Άλλοι παράγοντες

μπορεί να περιλαμβάνουν το σχήμα, τη δομή της επιφάνειας, το επιφανειακό φορτίο, τη χημική σύσταση και τη διαλυτότητα. Λόγω του μικρού τους μεγέθους και σχήματος, τα νανοσωματίδια μπορούν να κινηθούν εύκολα μέσα στο ανθρώπινο σώμα και είναι σε θέση να διασχίσουν τις μεμβράνες και να αποκτήσουν πρόσβαση σε κύτταρα, ιστούς και όργανα. Μπορούν ακόμη και να εισέλθουν στα κύτταρα, προκαλώντας μεγαλύτερη βλάβη ή ακόμη και κυτταρικό θάνατο. (69)

Στη νανοκλίμακα, οι θεμελιώδεις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών μεταβάλλονται και η χημική αντιδραστικότητα και η βιολογική δραστηριότητα είναι συχνά υψηλότερες σε σύγκριση με εκείνες των σωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), όπως των ελεύθερων ριζών. Αυτός είναι ένας από τους βασικούς μηχανισμούς έναρξης τοξικότητας που μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και επακόλουθη βλάβη στις μεμβράνες, τις πρωτεΐνες και το DNA. Τα νανοϋλικά μπορεί να προκαλέσουν τοξικότητα σε διάφορα ανθρώπινα συστήματα, όπως το πνευμονικό, το νευρολογικό και το καρδιαγγειακό σύστημα, και ενδοκρινικές διαταραχές ή ανοσολογικές επιδράσεις. (69)

Η βιομηχανική χρήση των νανοσωματιδίων έχει δημιουργήσει νέες ευκαιρίες, αλλά παρουσιάζει επίσης ορισμένους κινδύνους και αβεβαιότητες. Η αυξανόμενη παραγωγή και χρήση νανοϋλικών οδηγεί σε αυξανόμενο αριθμό εργαζομένων και καταναλωτών που εκτίθενται σε νανοϋλικά. Η είσοδος των νανοσωματιδίων στο σώμα γίνεται κυρίως μέσω τριών διαφορετικών οδών: της εισπνοής, της κατάποσης και μέσω του δέρματος. Η εισπνοή είναι η πιο κοινή οδός έκθεσης σε αιωρούμενα αερομεταφερόμενα νανοσωματίδια, σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Ασφάλειας στην Εργασία (NIOHS). Για παράδειγμα, οι καταναλωτές μπορούν να εισπνεύσουν χρησιμοποιώντας καλλυντικά με αεροζόλ (αποσμητικά, αρώματα ή αντηλιακά σπρέι που αποτελούνται από νανο-TiO<sub>2</sub>). (79)

Η εναπόθεση των νανοσωματιδίων στο αναπνευστικό σύστημα εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη μεμβράνη του αναπνευστικού επιθηλίου, επίσης μπορούν να ταξιδέψουν μέσω των ρινικών νεύρων στον εγκέφαλο και να αποκτήσουν πρόσβαση στο νευρικό σύστημα. Επίσης, μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση στην κυκλοφορία του αίματος με την εισπνοή ή το δέρμα και από εκεί μεταφέρονται στα διάφορα όργανα. Η κατάποση μπορεί να συμβεί από ακούσια μεταφορά νανοσωματιδίων από το χέρι στο στόμα ή από καλλυντικά που εφαρμόζονται κοντά στο στόμα ή τα χείλη (π.χ.

χρώμα χειλιών, lip gloss). Μετά την κατάποση, μια μέτρια ποσότητα των νανοσωματιδίων μπορεί να προσληφθεί από το σώμα και να μετακινηθεί σε ζωτικά όργανα και ιστούς, προκαλώντας παρενέργειες. Η άλλη οδός έκθεσης των νανοσωματιδίων στη συστηματική κυκλοφορία είναι η δερματική απορρόφηση, αφού η πλειονότητα των καλλυντικών εφαρμόζονται στο δέρμα. (79)

Το 2007, σύμφωνα με την Αμερικανική Ένωση για την Έρευνα Ασθενειών, τα νανοσωματίδια μπορούν να βλάψουν το DNA και να οδηγήσουν σε κακοήθεια, είναι αρκετά μικρά ώστε να διεισδύουν στα κυτταρικά στρώματα και αρκετά μεγάλα ώστε να αλλάξουν τις κανονικές λειτουργίες των κυττάρων, σύμφωνα με ερευνητές στο Πανεπιστήμιο της Μασαχουσέτης. Λόγω του μικροσκοπικού τους μεγέθους, είναι δύσκολο να διαχωριστούν με τις παραδοσιακές διαδικασίες διαχωρισμού και όταν συναντήσουν κακοήθη κύτταρα μπορεί να προκαλέσουν σημαντική βλάβη, επίσης είναι δύσκολο να επιβεβαιωθεί πώς ακριβώς αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον και πώς επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία. Αξίζει να αναφερθεί η νεογνική τοξικότητα όπου η έκθεση σε αυτά τα σωματίδια μπορεί να προκαλέσει διάφορες σοβαρές βλάβες σε έγκυες γυναίκες και στο έμβρυο. (69,79)

#### ***4.6.2 Περιβαλλοντικοί κίνδυνοι από νανοσωματίδια***

Στη σύγχρονη εποχή, η νανοτεχνολογία αξιοποιείται ως χρήσιμο εργαλείο για τη βελτίωση της ποιότητας του περιβάλλοντος, όπως το νερό και ο αέρας, μειώνοντας την παραγωγή απορριμμάτων, τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου και την απόρριψη επικίνδυνων χημικών ουσιών στο περιβάλλον. Ωστόσο, υπάρχουν και αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον, που προκαλούν βιοχημικές παρεμβολές συμμετέχοντας σε αντιδράσεις σε βιολογικά συστήματα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους ένα νανοϋλικό μπορεί να προκαλέσει κυτταρικές βλάβες περιλαμβάνει τη βιοσυσσώρευση, το σχηματισμό ROS, το οξειδωτικό στρες, την αυτοφαγία ή τις λυσοσωμικές δυσλειτουργίες κ.λπ. Οι επιδράσεις των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον εξαρτώνται από τον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούνται στο χώρο εργασίας, τον μηχανισμό διαχωρισμού τους σε διάφορα μέσα (αέρας, νερό και έδαφος), την κινητικότητά τους και τη σταθερότητά τους. (69)

Είναι προφανές ότι το νανοσωματίδιο  $TiO_2$ , που αποτελεί βασικό συστατικό του αντηλιακού, απελευθερώνεται σε σημαντικές ποσότητες, προκαλώντας πιθανή βλάβη

στη θαλάσσια ζωή με χρόνια έκθεση. Το  $TiO_2$  όταν εκτίθεται στο νερό, χάνει την αμυντική επίστρωση του, λόγω της επίδρασης του φωτός UV ή της σύνθεσης του θαλασσινού νερού, επηρεάζοντας τελικά τις υδάτινες οικολογικές ισορροπίες. Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν σοβαρές κυτταροτοξικές επιδράσεις και σε άλλα θηλαστικά, καθώς συσσωρεύονται σε διαφορετικά όργανα. (80)

Τέλος τα νανοϋλικά επηρεάζουν τα φυτά μετά την απορρόφηση και τη μετατόπισή τους, προκαλώντας σοβαρά αποτελέσματα. Όπως επιβεβαιώνεται από ερευνητές τα νανοσωματίδια Ag, ZnO, φουλλερένια, διοξείδιο του πυριτίου, κ.λπ., προσλαμβάνονται από τα φυτά και τα φύκια, παράγοντας τοξικότητα που εμποδίζει τη βλάστηση των σπόρων. Επίσης, εμποδίζουν τις μεταβολικές οδούς που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία των κυττάρων και με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα και να βιομεγεθύνονται. (80)

Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν διαθέσιμα ακριβή δεδομένα ή κατευθυντήριες γραμμές για την ποσοτικοποίηση τέτοιων επιπτώσεων. Επιπλέον, είναι σημαντικό να εντοπιστούν οι πηγές, οι περιβαλλοντικές διαδρομές και οι χρήσεις των νανοσωματιδίων, μαζί με τα φυτά και τα ζώα που είναι ευαίσθητα στα νανοσωματίδια, για την εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου. Η πράσινη τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διορθωτική λύση για την οικολογική προστασία, αφού είναι φιλική προς το περιβάλλον και σκοπεύει να παράγει νανοσωματίδια με μειωμένες πρώτες ύλες, ελάχιστη χρήση ενέργειας και λιγότερη παραγωγή αποβλήτων, με στόχο τη διατήρηση των φυσικών πόρων. Τέλος, η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών σχετικά με την τοξικότητα των νανοϋλικών και η χρήση ασφαλών και φιλικών προς το περιβάλλον εναλλακτικών λύσεων, μπορεί να βοηθήσει στην επίλυση του προβλήματος. (80)

#### **4.7 Νομοθετικό πλαίσιο νανοσωματιδίων στην Κοσμητολογία**

Η νομοθεσία για τα καλλυντικά οφείλει να παρέχει μια συγκεκριμένη λίστα συστατικών που προκαλούν ανεπιθύμητες περιβαλλοντικές επιπτώσεις για όλους τους χρήστες, καταναλωτές και επαγγελματίες, ενημερώνοντας έτσι την ασφάλεια τους. Θα πρέπει να διεξάγονται μακροχρόνιες μελέτες τοξικότητας ή καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένων των νανοκαλλυντικών και των nanocosmeceuticals (και των συστατικών τους) πριν από την εμπορευματοποίησή τους. Τα νανοκαλλυντικά θα πρέπει να

κατασκευάζονται ώστε να προσθέτουν αξία στην υγεία των καταναλωτών διεξάγοντας κλινικές δοκιμές παρόμοιες με αυτές που πραγματοποιούνται για τα φάρμακα. (69)

Επιπλέον, θα πρέπει να επιβληθούν αυστηροί κανονισμοί για την κατασκευή, αποθήκευση, εισαγωγή και εμπορία των καλλυντικών και των νανοσωματιδίων που ενσωματώνονται σε αυτά. Απαιτούνται καθολικές προσπάθειες συνεργασίας μεταξύ ερευνητών και παγκόσμιων ρυθμιστικών φορέων για την ανάπτυξη τυπικών κανόνων και κανονισμών για τη χρήση νανοσυστημάτων στα καλλυντικά και για την αντιμετώπιση των υφιστάμενων κενών στα σχετικά δεδομένα. Τέλος, υπάρχει ανάγκη εναρμόνισης των κανονισμών διεθνώς για τη δημιουργία ενός καλύτερου ρυθμιστικού πλαισίου για την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και το μάρκετινγκ, το οποίο τελικά βοηθά τις βιομηχανίες καλλυντικών και επίσης προστατεύει τους καταναλωτές από πιθανούς κινδύνους. Επιπλέον, η ευαισθητοποίηση των καταναλωτών μπορεί επίσης να συμβάλει στη βελτίωση αυτής της κατάστασης. (69)

#### **4.7.1 Κανονιστικές Οδηγίες Καλλυντικών**

Η παγκόσμια αγορά καλλυντικών, αξίας 532,43 δισεκατομμυρίων USD το 2017, προβλέπεται να φτάσει τα 805,61 δισεκατομμύρια δολάρια μέχρι το 2023, με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 7,14%. Εξετάζοντας αυτήν την αυξανόμενη αγοραία αξία, είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί η αγορά καλλυντικών με κατάλληλες νομικές κατευθυντήριες γραμμές που θα συμβάλουν στη διασφάλιση της ευημερίας των καταναλωτών. Αν και είναι δύσκολο να εκπληρωθούν οι νομικές υποχρεώσεις για εξατομικευμένα προϊόντα, μπορεί να επιτευχθεί μια σωστή προσέγγιση για διαρκή συμμόρφωση. Υπάρχουν πολλά κανονιστικά έγγραφα που προορίζονται να βοηθήσουν τη βιομηχανία καλλυντικών και άλλους ενδιαφερόμενους φορείς (ακαδημαϊκούς, ερευνητές, κ.λπ.) στον εντοπισμό και τη διερεύνηση της ασφάλειας των νανοϋλικών στα καλλυντικά. (72)

Επίσης, στη βιβλιογραφία υπάρχουν συλλογές που συνοψίζουν τις νομικές πτυχές των νανοϋλικών ή τη χρήση νανοϋλικών στα καλλυντικά και παρακάτω αναφέρονται ονομαστικά οι κύριες συστάσεις μερικών σημαντικών εγγράφων καθοδήγησης.

1. Καθοδήγηση για τη Βιομηχανική Ασφάλεια των Νανοϋλικών σε Καλλυντικά Προϊόντα: Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA).



2. Έκθεση της Ομάδας Εργασίας ICCR — Safety Approaches to Nanomaterials in Cosmetics: Κανονισμός Διεθνούς Συνεργασίας για τα Καλλυντικά (ICCR).

3. Οδηγίες για την αξιολόγηση της ασφάλειας των νανοϋλικών στα καλλυντικά: Επιστημονική Επιτροπή για την Ασφάλεια των Καταναλωτών (SCCS),

#### **4.7.2 Πρόσφατες εξελίξεις στον κανονισμό για τα νανοπροϊόντα**

Όπως ήδη έχει αναφερθεί υπάρχουν αμφιβολίες για πιθανή μακροπρόθεσμη τοξικότητα, μαζί με τις ανησυχίες για τα πραγματικά πλεονεκτήματα των νανοϋλικών στην απόδοση του προϊόντος και έχουν συχνά οδηγήσει σε γενική δυσπιστία. Εξαιτίας αυτού, στα τέλη του 2009 η Ευρωπαϊκή Ένωση αναδιατύπωσε τις επιμέρους οδηγίες που σχετίζονται με τη χρήση καλλυντικών σε μια ενιαία πλατφόρμα που συγκεντρώνει όλα τα σχετικά προϊόντα. Στη συνέχεια προτάθηκε ότι η παρουσία νανοϋλικών σε αυτά τα προϊόντα θα πρέπει να απαιτεί πρόσθετους περιορισμούς προτού εγκριθούν για χρήση ως συστατικά. Ως αποτέλεσμα, η βιομηχανία καλλυντικών έγινε επιφυλακτική όσον αφορά την δημόσια προώθηση της νανοτεχνολογίας, αποφεύγοντας να αναφέρεται στα συστατικά που αποτελούνται από νανοϋλικά. (68)

Πρόσφατα η USFDA δημοσίευσε μια «Ειδοποίηση εισαγωγής 66-38», για προϊόντα περιποίησης δέρματος που φέρουν την ένδειξη αντιγηραντικές κρέμες. Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχουν πολλά προϊόντα περιποίησης δέρματος στην αγορά που ισχυρίζονται ότι τα προϊόντα εξουδετερώνουν, επιβραδύνουν ή ελέγχουν τη διαδικασία γήρανσης. Σύμφωνα με το USFDA, ένας ισχυρισμός όπως "τα μόρια απορροφούν και διαστέλλονται, ασκώντας ανοδική πίεση για να ανυψώσουν τις ρυτίδες προς τα πάνω" είναι ένας ισχυρισμός για μια εσωτερική δομική αλλαγή που συνήθως θα έκανε ένα προϊόν να είναι φάρμακο. Η FDA έχει δηλώσει ότι τέτοιοι ισχυρισμοί είναι παράνομοι στην επισήμανση καλλυντικών. (70, 81)

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), ο νέος Κανονισμός για τα Καλλυντικά Προϊόντα 1223/2009 επιχειρεί να αντιμετωπίσει με κάποιο τρόπο τις ανησυχίες σχετικά με τα νανοϋλικά. Σύμφωνα με αυτόν τον κανονισμό, όλα τα συστατικά που υπάρχουν ως νανοϋλικά πρέπει να αναγράφονται στη συσκευασία, από τις 11 Ιουλίου 2013, με τη λέξη «nano». Η μορφή διακρίνει ένα νανოსωματίδιο με το επίθημα «nano», άρα το  $TiO_2$  γίνεται  $TiO_2$ -nano. Ο κανονισμός απαιτεί επίσης όλα τα καλλυντικά και τα αντηλιακά που διατίθενται στην αγορά και χρησιμοποιούν νανοςωματίδια να

ελέγχονται ξεχωριστά για ασφάλεια. Τα καλλυντικά προϊόντα που περιέχουν νανοϋλικά πρέπει να κοινοποιούνται με ηλεκτρονικά μέσα στην επιτροπή, έξι μήνες πριν από τη διάθεση στην αγορά, παρέχοντας δεδομένα για την αναγνώριση, τις προδιαγραφές, την ποσότητα, το τοξικολογικό προφίλ, τα δεδομένα ασφάλειας και τις προβλέψιμες συνθήκες έκθεσης. (81)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΒΑΣΙΣΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΝΑΤΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

#### 5.1 Ενσωμάτωση πρωτεασών σε σκευάσματα περιποίησης δέρματος

Η χρήση ενζύμων στα καλλυντικά είναι σχετικά πρόσφατη και επί του παρόντος μόνο περιορισμένος αριθμός προϊόντων είναι διαθέσιμος στην αγορά, επειδή είναι δύσκολο να παραδοθούν σε ένα παρασκεύασμα, παρόλο που έχουν επιδείξει ανώτερη απόδοση σε σύγκριση με τα παραδοσιακά ενεργά συστατικά. Η δραστηριότητά τους στην πραγματικότητα επηρεάζεται από πολλά κοινά συστατικά που αποσταθεροποιούν τη φυσική τους δομή και η διείσδυση τους στο δέρμα περιορίζεται από το υψηλό μοριακό τους βάρος. (68)

Οι βιοϊατρικές εφαρμογές των ενζύμων είναι τόσο εκτεταμένες όσο και οι βιομηχανικές και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως βιοκαταλύτες στην παρασκευή δραστικών συστατικών, μια διαδικασία που καθοδηγείται από σημαντικές προόδους στις τεχνολογίες ενζύμων και την πράσινη χημεία. Ωστόσο, οι δερματολογικές εφαρμογές των ενζύμων έχουν αναπτυχθεί λιγότερο, πιθανότατα εξαιτίας της ανεπάρκειας της σταθερότητας των ενζύμων, του ελέγχου της αποτελεσματικότητας, των μελετών ασφάλειας και της γνώσης των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων φορέα-ενζύμου-δέρματος. (84)

Οι πρωτεάσες χρησιμοποιούνται συνήθως πολλά χρόνια σε δερματολογικά προϊόντα που εφαρμόζονται για την απομάκρυνση νεκρωτικών και εσχαρωτικών πηγών, όπως κατακλίσεις και δερματικά έλκη. Αυτή η κοινή εφαρμογή μπορεί να δώσει την εντύπωση ότι όλες οι πρωτεάσες είναι καυστικές και εξαιρετικά αποικοδομητικές στον ιστό του δέρματος, αν και αυτό είναι ανακριβές. Με την πάροδο του χρόνου, η ποικιλομορφία και οι βιολογικές πηγές των πρωτεασών, οι διάφορες ιδιότητές τους στο δέρμα, οι χημικές τροποποιήσεις για βελτίωση της σταθεροποίησής τους, οι προσαρμογές στις συγκεντρώσεις πρωτεάσης, οι πρόοδοι στα οχήματα για καλύτερη παροχή και μείωση του ερεθισμού έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη σκευασμάτων πρωτεάσης για δερματολογικές χρήσεις. (9)

Τέτοιες εφαρμογές έχουν σχεδιαστεί για να πετύχουν τον καθαρισμό του δέρματος και την ενυδάτωση του, να βελτιώνουν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του και την εμφάνιση της επιδερμίδας, να διατηρούν και να αποκαθιστούν την λειτουργία φραγμού του δέρματος και να βελτιώσουν τη δερματική φλεγμονή. (9)

Το φράγμα της επιδερμικής διαπερατότητας, το οποίο αφορά κυρίως τη SC, διακυβεύεται από μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Οι ενδογενείς παράγοντες περιλαμβάνουν υποκείμενες εγγενείς διαταραχές, όπως ατοπικό δέρμα, ξηρότητα χωρίς ατοπία, ιχθυώσεις, ροδόχρους ακμή, ψωρίαση, φωτοκατεστραμμένο και γερασμένο δέρμα. Οι εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνουν αλλαγές στην υγρασία, κακή φροντίδα του δέρματος (δηλαδή, σκληρά καθαριστικά, στυπτικά, επιθετική απολέπιση), ορισμένα τοπικά φάρμακα (π.χ. ρετινοειδή, υπεροξειδίο του βενζολίου, τοπικά κορτικοστεροειδή) και συστηματικά φάρμακα (στατίνες). (9)

Ο συμβιβασμός του φραγμού διαπερατότητας της SC που υπερβαίνει την ικανότητα αυτοεπισκευής, αναφέρεται ως υπερτονισμένη SC με αποτέλεσμα να οδηγεί σε αυξημένη διαεπιδερμική απώλεια νερού (TEWL), μειωμένη επιδερμική ενυδάτωση και απολέπιση και η κλινική του εικόνα παρουσιάζεται ως ξεφλουδισμένο, φολιδωτό, ξηρό δέρμα, λιγότερο εύκαμπτο και επιρρεπές σε μικρο- και μακρο-σχίσεις. Η εξασθενημένη απολέπιση προκαλεί ατελή διαχωρισμό των μεμονωμένων κερατινοκυττάρων, που οδηγεί στη συσσώρευση τους και εμφανίζεται ως ορατά λέπια και νιφάδες στην επιφάνεια του δέρματος. Σε πειραματικές μελέτες, η οξεία διαταραχή του επιδερμικού φραγμού προκαλείται με μια ποικιλία μεθόδων, ώστε να προσομοιάσει αυτό που μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς το φράγμα διαπερατότητας της SC και να προκαλέσει αύξηση του TEWL. (9)

Τα τοπικά εφαρμοζόμενα ένζυμα όπως οι πρωτεάσες και οι κολλαγενάσες επιδρούν άμεσα και εντοπισμένα στον καθαρισμό πληγών και στη θεραπεία ελκών πίεσης, ουλών και στην καλοήγη ινοπολλαπλασιαστική νόσο. Οι κερατινάσες, χρησιμοποιούνται για την αύξηση της δραστηριότητας των τοπικά εφαρμοζόμενων φαρμάκων ενισχύοντας τη διείσδυση τους στο δέρμα και τα νύχια. Επιπλέον, τα πρωτεολυτικά ένζυμα διερευνώνται για την πρόληψη και τη θεραπεία στοματικών ασθενειών που σχετίζονται με το βιοφίλμ και ως ενεργοί παράγοντες σε προϊόντα προσωπικής περιποίησης, κυρίως για αποτρίχωση, καθαρισμό δέρματος, απολέπιση και λεύκανση καθώς και πρόληψη

βλαβών που προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία με πολλά προϊόντα που βασίζονται σε ένζυμα στην αγορά. (84)

Στα καλλυντικά, τα ένζυμα εφαρμόζονται εδώ και πολλά χρόνια, όπως στην περίπτωση ορισμένων πρωτεολυτικών ενζύμων (βρωμελίνη και παπαΐνη) που χρησιμοποιούνται για το ξεφλούδισμα και τη λείανση του δέρματος, ή η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) γνωστή για την ικανότητά της να απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες για την πρόληψη των σχετικών γήρανση του δέρματος. Ωστόσο, παρά το δυναμικό τους ως δερματοδραστικές ουσίες, τα ένζυμα αντιμετωπίζουν ορισμένα προβλήματα, όπως κακή σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου κατά την παρατεταμένη αποθήκευση ή απενεργοποίηση λόγω διαταραχής της δομής του ενζύμου από έλαια και επιφανειοδραστικές ουσίες που υπάρχουν συνήθως στα καλλυντικά. (85)

## **5.2 Τρόποι βελτίωσης διαπερατότητας των πρωτεασών στο δέρμα**

Όταν ένα σκεύασμα χορηγείται στο δέρμα, ο στόχος είναι να η τοπική θεραπεία ή η διαδερμική διείσδυση. Στην πρώτη περίπτωση, το φάρμακο της σύνθεσης θα δράσει στο δέρμα και στη δεύτερη θα περάσει από τα στρώματα του δέρματος και θα φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία. Και στις δύο περιπτώσεις, είναι σημαντικό το σκεύασμα να διασχίζει την κεράτινη στιβάδα, η οποία περιορίζει αποτελεσματικά τη μοριακή μεταφορά ουσιών. Μία από τις στρατηγικές που έχουν διερευνηθεί είναι η χρήση ενισχυτών διείσδυσης, που μπορεί να περάσουν από όλα τα στρώματα του δέρματος. (42)

Η οργάνωση της κεράτινης στιβάδας όπως έχει αναφερθεί στην ενότητα 4.4.1 περιγράφεται ως «τούβλα και κονίαμα» με τα τούβλα να αντιπροσωπεύουν τα κερατινοκύτταρα και το κονίαμα να αντιπροσωπεύει τα μεσοκυττάρια λιπίδια. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η διάχυση του φαρμάκου είναι δυνατή μέσω δύο οδών, της διακυτταρικής οδού που αναφέρεται στη διέλευση από υδρόφιλες και ασυνεχείς, πλούσιες σε πρωτεΐνες περιοχές της κεράτινης στιβάδας που αντιστοιχούν στα κερατινοκύτταρα και της μεσοκυττάριας οδού που συνίσταται στη διείσδυση μέσω της συνεχούς ενδοκυτταρικής λιπιδικής περιοχής της κεράτινης στιβάδας που παρέχει το κονίαμα. (86)

Επιπλέον οι πρωτεΐνες της κεράτινης στιβάδας είναι πολύ γνωστές για την αδιαλυτότητά τους, η οποία οφείλεται στην εκτεταμένη διασύνδεσή των περιβλημάτων των κερατινοκυττάρων και των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. Οι διαμορφωτικές αλλαγές των πρωτεϊνών της κεράτινης στιβάδας και η ταυτόχρονη μείωση της πυκνότητας διασύνδεσης, αναμένεται να ενισχύσουν τη διάχυση του φαρμάκου μέσω της κεράτινης στιβάδας ανοίγοντας υδατικά κανάλια για τη μεταφορά φαρμάκων. (86)

Καθώς το δέρμα έχει σχετικά χαμηλή πρωτεολυτική δραστηριότητα και μεγάλη επιφάνεια σε σύγκριση με άλλους ιστούς, η διαδερμική οδός για την παροχή πεπτιδίων και πρωτεϊνών φαίνεται να είναι ελκυστική, ωστόσο είναι περιορισμένη λόγω της μοναδικής βιοαρχιτεκτονικής του δέρματος. (87) Προκειμένου να ξεπεραστεί το φράγμα της κεράτινης στιβάδας (SC) και να αυξηθεί η διαδερμική διείσδυση έχουν διερευνηθεί πολλές προσεγγίσεις, τροποποιώντας, είτε την πολική και την μη πολική φύση της δραστικής ουσίας και είτε το συνδυασμό των δύο φυσικοχημικών οδών. (86)

Τα ένζυμα έχουν μεγάλες δυνατότητες για φαρμακευτικές και καλλυντικές εφαρμογές, η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της χαμηλής σταθερότητάς τους σε περιβάλλοντα όπου δεν βρίσκονται φυσικά, καθώς τείνουν να είναι ευαίσθητα στις αλλαγές θερμοκρασίας και pH, καθώς και παρουσία άλλων συστατικών σε ένα καλλυντικό σκεύασμα, το οποίο επηρεάζει τη βιολογική δραστηριότητα των ενζύμων για μια σχετικά σύντομη περίοδο. Αυτό ενισχύει το ενδιαφέρον και τη συνάφεια της απόκτησης πιο σταθερών και «ανθεκτικών» μορίων και μιας κατάλληλα σχεδιασμένης φαρμακευτικής μορφής. Επιπλέον, οι τοξικές επιδράσεις και οι αλλεργιογόνες αντιδράσεις οδήγησαν σε περιορισμό που επιβλήθηκε από τον FDA. (42)

Η ανάπτυξη ενζυμικών νανοσωματιδίων αντιπροσωπεύει μια εναλλακτική λύση για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων. Για παράδειγμα, νανοσωματίδια παπαΐνης έχουν καλύτερες βιοφαρμακευτικές ιδιότητες, όπως ειδική στόχευση στο κύτταρο και βελτιωμένη ικανότητα φόρτωσης των δραστικών ουσιών και μπορεί να παρέχει μια πιθανή λύση για καλλυντικά ή φαρμακευτικά σκευάσματα. Επίσης η παπαΐνη ενθυλακωμένη σε νανοσωματίδια πολυμερών και λιποσωμάτων χρησιμοποιείται ως δραστικό συστατικό. (42)

### 5.2.1 Ενισχυτικά διείσδυσης

Προκειμένου να ξεπεραστεί η εξαιρετική λειτουργία φραγμού του δέρματος, οι επιστήμονες χρησιμοποιούν συχνά ενισχυτές διείσδυσης δέρματος (SPEs) σε τοπικά και διαδερμικά σκευάσματα. Οι επιπτώσεις αυτών των ενώσεων στην υγεία του δέρματος δεν είναι ακόμα καλά κατανοητές σε μοριακό επίπεδο. Τα ενισχυτικά διείσδυσης στο δέρμα (SPEs) χρησιμοποιούνται για την προώθηση της μεταφοράς φαρμάκων και δραστικών ουσιών μέσα στο ανθρώπινο δέρμα. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των χημικών ενισχυτών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες. (88)

A. Ο πρώτος μηχανισμός βασίζεται στην αύξηση της διαλυτότητας του διαπερατού στην κεράτινη στιβάδα (SC) με παροδική αλλαγή της παραμέτρου διαλυτότητας του δέρματος. (88) Τα αποτελέσματά τους περιλαμβάνουν μεταβολή του δυναμικού διαλύτη του βιοχημικού περιβάλλοντος της SC και διαταραχή της ενδοκυτταρικής λιπιδικής μήτρας μετά την εισαγωγή του ενισχυτή στη δομή της διπλής στιβάδας της SC, η οποία ενισχύει τη διείσδυση των φαρμάκων μέσω της μεσοκυτταρικής οδού. (87) Πολλές χημικές ουσίες όπως αλκοόλες, λιπαρά οξέα, εστέρες λιπαρών οξέων, πολυόλες, αμίδια και τασιενεργά έχουν αποδειχθεί ότι ενεργούν με αυτόν τον τρόπο. (86,87)

B. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει μια αλλαγή στη σειρά των δομημένων λιπιδίων της SC, όπου ρευστοποιεί αποτελεσματικά τη λιπιδική περιοχή αυξάνοντας έτσι τον συντελεστή διάχυσης του διαπεραστικού. Εισέρχεται στις λιπιδικές στοιβάδες της SC και μειώνει τη στενή συσσώρευση λιπαρών οξέων μέσα στο δέρμα με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη κινητικότητα των λιπιδίων SC και μειωμένη αντίσταση διάχυσης στη διείσδυση. Η αύξηση της μεταφοράς διαπερατών μέσω της αλλαγής της δομής της SC, αναπόφευκτα σημαίνει αλλαγή στις ιδιότητες φραγμού του δέρματος. (88)

Ωστόσο, αυτοί οι χημικοί ενισχυτές είναι πραγματικά χρήσιμοι μόνο για μικρά μόρια, ενώ για τα μεγάλα πεπτίδια είναι αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί ουσιαστική διείσδυση. (87) Οι μικροί ενισχυτές μοριακού βάρους είναι πιθανό να απορροφηθούν από το δέρμα, οδηγώντας συχνά σε δυσμενείς ερεθισμούς του δέρματος. Προκειμένου να αποφευχθούν αυτές οι παρενέργειες, έχουν προταθεί ως εναλλακτική λύση πολυμερικοί ενισχυτές διείσδυσης που δεν απορροφώνται σχεδόν καθόλου από το δέρμα. (86)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα υπό αυτήν την έννοια αναμένεται να είναι λιγότερο ερεθιστικά, επειδή είναι πολύ μεγάλα για να διαπεράσουν τη βιώσιμη επιδερμίδα και η δράση τους είναι εξαιρετικά ειδική για τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα στη χρήση πρωτεασών ως ενισχυτών διείσδυσης είναι η εγγενής τους αστάθεια στα σκευάσματα. Όταν εκτίθενται σε έλαια ή επιφανειοδραστικά, τα οποία υπάρχουν άφθονα σε δερματολογικά σκευάσματα συμπεριλαμβανομένων και των καλλυντικών, η διαμόρφωσή τους είναι επιρρεπής σε διαταραχή. Έτσι, είναι απαραίτητο να βελτιωθεί η σταθερότητα του ενζύμου για πρακτικές χρήσεις. (86)

Σε μελέτη των Sim et al. (2003) διερευνήθηκε η επίδραση της παπαΐνης, στη διαδερμική απορρόφηση των φαρμάκων και για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του ενζύμου κατά τη διείσδυση στο δέρμα, η παπαΐνη τροποποιήθηκε με τη σύζευξη SC-γλυκάνης. Η ενισχυτική δραστηριότητα της διείσδυσης του φαρμάκου αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας αντιτυρίνη και ινδομεθακίνη ως υδρόφιλα και υδρόφοβα μοντέλα φαρμάκων, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε ένα κύτταρο διάχυσης τύπου Franz και αποδόθηκε στις διαμορφωτικές αλλαγές των πρωτεϊνών της κεράτινης στιβάδας, οι οποίες παρατηρήθηκαν με τη χρήση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μετάδοσης. (86) Η συζευγμένη παπαΐνη SC-γλυκάνης αύξησε τη διαδερμική διείσδυση της αντιτυρίνης και της ινδομεθακίνης αλλά δεν παρουσίασε ερεθισμό του δέρματος, σύμφωνα με τη δοκιμή Draize. (87)

Το σύζευγμα SC-γλυκάνης-παπαΐνης βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματικό για τη διευκόλυνση της διαδερμικής απορρόφησης της αντιτυρίνης. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι το πάχος της κεράτινης στιβάδας και της βιώσιμης επιδερμίδας αυξήθηκε με την επεξεργασία του συζυγούς. Επιπλέον, προκάλεσε διαχωρισμό φάσεων, σχηματισμό κενού και διαταραχή του φύλλου μέσα στα διάκενα της κεράτινης στιβάδας, με αποτέλεσμα τη μεταφορά του υδρόφιλου φαρμάκου όπου διεγέρθηκε από τις δομικές εναλλαγές του μεσοκυττάρου χώρου. Αυτές οι δομικές αλλαγές είναι πιθανό να προκληθούν από την υδρόλυση εκτεταμένης διασύνδεσης περιβλημάτων κερατινοκυττάρων και ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. (86)

Ωστόσο, καμία μελέτη δεν έχει εφαρμόσει τέτοια πρωτεολυτικά ένζυμα για τη διαδερμική διείσδυση μακρομορίων. Για περισσότερα από 50 χρόνια, πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η θρυψίνη χρησιμοποιούνται εκτενώς σε εργαστηριακά περιβάλλοντα για *in-vitro* επιδερμικό διαχωρισμό και απομόνωση κερατινοκυττάρων. Η μοναδική



ικανότητα των πρωτεασών να προκαλούν επιλεκτικό επιδερμικό διαχωρισμό έχει εν μέρει εξηγηθεί από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση των δεσμοσωμικών πρωτεϊνών στη SC, η οποία οδηγεί σε κυτταρική διάσπαση. Σε κλινικές μελέτες, έχουν επιχειρηθεί αρκετές θεραπευτικές εφαρμογές για τον καθαρισμό του τραύματος και την επιδερμική αφαίρεση. (87)

Σε ερευνητική εργασία των Li et. al (2009) παρουσιάστηκε ότι η θρυψίνη επηρεάζει τόσο τη μεσοκυττάρια οδό όσο και την τριχοθύλακτική οδό και μπορεί να αλλάξει τις πρωτεϊνικές δομές της κεράτινης στιβάδας, επιδρώντας στις ιδιότητες φραγμού του δέρματος. Η προκαταρκτική θεραπεία ή η συγχορήγηση θρυψίνης ενίσχυσε σημαντικά τη διαδερμική διείσδυση των δεξτρανών (FDs), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις μοντέλου υδρόφιλων μακρομορίων και της FITC-insulin, μιας πολυπεπτιδικής ορμόνης, όπου εφαρμόστηκε ως μοντέλο μεγάλου πεπτιδίου *in vitro* σε δέρμα αρουραίου ή τρισδιάστατο καλλιεργημένο μοντέλο ανθρώπινης επιδερμίδας. Το μικροσκόπιο φθορισμού αποκάλυψε ότι η FITC-insulin μεταφέρθηκε κατά μήκος της SC στην επιδερμίδα και το χόριο μετά από προεπεξεργασία με θρυψίνη. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνούσε με τα ευρήματα που προέκυψαν με το τρισδιάστατο μοντέλο, δείχνοντας ότι η θρυψίνη θα μπορούσε να ενισχύσει την παθητική διάχυση. (87)

Επίσης, στην ιστολογική εξέταση παρατηρήθηκε μερική πάχυνση της βιώσιμης επιδερμίδας της SC σε δέρμα αρουραίου, όπου μπορεί να προκληθεί πολλαπλασιασμός κυττάρων επιτάχυνσης και ταυτόχρονη πάχυνση της επιδερμίδας. Η θρυψίνη παρουσίασε τη δυνατότητα να διασπάσει τους δεσμούς των κερατινοκυττάρων στην επιφάνεια, χαλαρώνοντας και διαταράσσοντας τις δευτερεύουσες δομές των κυτταρικών πρωτεϊνών. Αυτά τα ευρήματα υπέδειξαν ότι η θρυψίνη ενεργοποιεί τις μεσοκυτταρικές οδούς και τις μορφολογικές αλλοιώσεις της δομής της SC με άμεση δράση στις πρωτεΐνες της, προκαλώντας την αναδιοργάνωση των περιφερειακών λιπιδίων SC και διαδερμική διείσδυση. Συμπερασματικά, η θρυψίνη αντιπροσωπεύει μια προηγμένη μέθοδο ενίσχυσης με ταχεία δράση και χαμηλό ερεθισμό του δέρματος που θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική ως βιοχημικός ενισχυτής για τη διαδερμική παροχή μακρομορίων. (87)

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα όπως έχει ήδη αναφερθεί, μπορούν να προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες σε τοπικές φαρμακευτικές εφαρμογές με την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες θεραπείας ελέγχονται για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια. Μελετήθηκε ex

νίνο από τους Nounou M.I. et al. (2017) η επίδραση αλκαλικής πρωτεάσης (APr) με σημαντική κερατινολυτική δράση που παράγεται από ανασυνδυασμένο *Bacillus subtilis* σε σχέση με τη διαπερατότητα του δέρματος σε αυτι κουνελιού υπό διαφορετικές συνθήκες ενζυμικής δραστηριότητας και χρόνου έκθεσης. Σύμφωνα με τις ιστοπαθολογικές αλλαγές τα ευρήματα υποδεικνύουν προοδευτική απώλεια της κεράτινης στιβάδας (SC) και διαταραχή της δερμοεπιδερμικής σύνδεσης. Επιπλέον, σε μεγαλύτερη έκθεση παρατηρήθηκε λείανση του δέρματος που συσχετίστηκε με προοδευτική απώλεια τριχών. (84)

Το APr αποδείχθηκε ότι ασκεί σημαντική αποτρίχωση πλήρους πάχους άθικτου δέρματος και το αποτέλεσμα ήταν εξαρτώμενο από το χρόνο έκθεσης με εκτεταμένη αποτρίχωση σε 24ωρη έκθεση. Ωστόσο, *in vivo* μελέτες που διεξήχθησαν υπό παρόμοιες συνθήκες στο εργαστήριο, έδειξαν περιορισμένη αποτρίχωση (μη δημοσιευμένα δεδομένα). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα προκαλούν αποικοδόμηση της ντεκορίνης, της κύριας ουσίας τσιμέντου των ινιδίων κολλαγόνου στο δέρμα και στο χόριο, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των δεσμών των κολλαγόνων ινών, την αφαίρεση του υαλουρονικού οξέος, των θειικών συσσωματωμάτων πρωτεογλυκάνης και των τριχών. (84)

Η μελέτη έδειξε επίδραση στη δομική ακεραιότητα και στην ελεγχόμενη διαπερατότητα του δέρματος, επίσης απόδειξε μια νέα αποτελεσματική και ασφαλή προσέγγιση βελτίωσης της βιολογικής διείσδυσης στο δέρμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης σε συνδυασμό με τις οικονομικές πτυχές της παραγωγής ενζύμων μέσω ανασυνδυασμένων βακτηριακών κυττάρων προσφέρουν μεγάλη υπόσχεση για την επέκταση των τοπικών βιοϊατρικών εφαρμογών των μικροβιακών ενζύμων. Η αλκαλική πρωτεάση προσφέρει υπόσχεση ως φαρμακευτικό ένζυμο για τη βιοενίσχυση της διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων και τις δερματολογικές εφαρμογές. Η φαρμακευτική έρευνα ενθαρρύνεται για τη βελτίωση της παρουσίασης και του προφίλ ασφάλειας των τοπικών ενζύμων χρησιμοποιώντας συμβατικές και νανοτεχνολογικές προσεγγίσεις. (84)

### **5.2.2 *Νανοσυστήματα χορήγησης***

Η νανοτεχνολογία έχει γίνει το επίκεντρο του ενδιαφέροντος στην κοσμητολογία, ειδικά τα νανοκυστίδια (λιποσώματα, νιοσώματα) και τα νανοσωματίδια (νανοσφαίρες PLGA), επειδή η ενθυλάκωση διαφόρων βιοδραστικών ενώσεων σε αυτά τα συστήματα μπορεί να αυξήσει τη φυσικοχημική σταθερότητα, να μειώσει τις σοβαρές παρενέργειες

του ερεθισμού του δέρματος και να ενισχύσει τη διαδερμική απορρόφηση. Για την παροχή συνθετικών και φυσικών προϊόντων μέσω του δέρματος χρησιμοποιούνται διάφοροι νανοφορείς, όπως τα τρανσφεροσώματα, αιθοσώματα, αρχαιοσώματα, οι οποίοι έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα λιποσώματα, τα νιοσώματα και τις νανοσφαίρες PLGA. Υπάρχουν αρκετές μελέτες για ένζυμα που φορτώνονται σε νανοκυστίδια και νανοσωματίδια ως σύστημα διαδερμικής χορήγησης. (89)

Τα τελευταία χρόνια, η νανομηχανική των ενζύμων έχει προσφέρει έναν πιθανό τρόπο για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί της ενζυμικής θεραπείας. Η ενθυλάκωση και η σύζευξη των ενζύμων στα βιοϋλικά νανοκλίμακας γενικά βελτιώνουν τη σταθερότητα, τη δραστηριότητα και τον χρόνο ημιζωής τους υπό κάποιες συνθήκες. Ωστόσο, η διαδικασία σύνθεσης μπορεί να οδηγήσει σε μερική απώλεια ή σε αλλαγές στη δομή και τη λειτουργικότητα των ενζύμων. Έχει βρεθεί ότι το μέγεθος των συντιθέμενων NPs μπορεί να επηρεάσει τη διαμόρφωση και τη δραστηριότητα του ενζύμου. Γι αυτό, οι αλλαγές στο μέγεθος των σωματιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης ενζύμου-επιφάνειας και των καταλυτικών χαρακτηριστικών των συζευγμένων ενζύμων. Με έμφαση στα χαρακτηριστικά βιοσυμβατότητας και βιοαποδομησιμότητας, τα νανολιποσώματα και τα πολυμερή NPs φαίνεται να είναι ανώτερες επιλογές για τη σύνθεση και την παροχή κλινικά σημαντικών ενζύμων. (90)

Τα λιποσώματα είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα σκευάσματα, τα οποία έχουν εγκριθεί για κλινικές εφαρμογές κυρίως λόγω της ασφαλούς φύσης τους και της βιοσυμβατότητας τους. Η εξωτερική επιφάνεια τους μπορεί να τροποποιηθεί με συζυγή πολυμερών, πολυτροπικούς στοχευμένους παράγοντες, συνδέτες και οντότητες για την ανάπτυξη έξυπνων συστημάτων χορήγησης. Ένα πλεονεκτήματα της λιποσωμικής σύνθεσης είναι η διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας αλλά και της συγγενείας τους προς παρόμοια υποστρώματα, αν και η ενζυμική λειτουργία μπορεί να επηρεαστεί από τη χαμηλή διείσδυση των υποστρωμάτων κατά μήκος της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας. Ομοίως, διάφορα λιποσώματα παγιδευμένα σε ένζυμα έχουν αναπτυχθεί για να χρησιμεύουν ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί παράγοντες με αρκετά μεγάλη έμφαση να δίδετε στην ανάπτυξη προϊόντων περιποίησης δέρματος. (90)

Ακόμη, μεταξύ των διαφορετικών πολυμερών, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και το PLGA χρησιμεύουν ως συστήματα παροχής ενζύμων και τα φυσικά υδροκολλοειδή,

όπως η χιτοζάνη, έχουν θεωρηθεί ως προτιμώμενα βιοπολυμερή για την ακινητοποίηση των ενζύμων. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) αποτελεί ένα πολυμερές αυξημένης επιλογής για την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων συστημάτων χορήγησης ή βιοσυζευγμάτων, λόγω της ευελιξίας, της υδροφιλίας, του μεταβλητού μεγέθους και της χαμηλής τοξικότητας της. (90)

Διάφορες προσεγγίσεις αναφέρονται στην ανάπτυξη των συστημάτων χορήγησης που μπορούν να βελτιώσουν την εισχώρηση της παπαΐνης στο δέρμα. Η παπαΐνη φορτωμένη σε λιποσώματα έχει δείξει αποτελεσματική διαδερμική διείσδυση, παρόλο που, τα συμβατικά κυστίδια διπλής στοιβάδας (λιποσώματα και νιοσώματα) δεν είναι αποτελεσματικά, αφού παραμένουν περιορισμένα στο ανώτερο στρώμα της SC. Όμως, τα φυσαλιδώδη συστήματα είναι σε θέση να προάγουν την διαδερμική διείσδυση της με μια ποικιλία μηχανισμών. (40,89) Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει σημαντική συζήτηση για το εάν τα ελαστικά κυστίδια δρουν ως συστήματα μεταφοράς διεισδύοντας ανέπαφα μέσα από το δέρμα. (89)

Ο Manosroi et al.(2010) ανέπτυξαν ένα νέο ελαστικό νιόσωμα που περιέχει NaC χολικό νάτριο ως ενεργοποιητή ακμών το οποίο ήταν ανώτερο από τα συμβατικά νιοσώματα για τοπική χρήση λόγω της ευελιξίας και της παραμόρφωσης του να μπορεί να επιτρέψει στα ελαστικά κυστίδια να συμπιεστούν μέσα από τους πόρους του δέρματος που είναι πολύ μικρότεροι από τη διάμετρό τους. Κατά τη διάρκεια της παραμόρφωσης, τα μόρια του ενεργοποιητή ακμών έτειναν να συσσωρεύονται στη θέση της αυξημένης τάσης, λόγω της προσπάθειας τους να δημιουργήσουν καμπύλες δομές, μειώνοντας έτσι την ενέργεια που απαιτείται για την αλλαγή του σχήματος. (40,91)

Σε μελέτη των Chen Y.et al. (2017) διερευνήθηκαν τα θεραπευτικά αποτελέσματα των ελαστικών λιποσωμάτων παπαΐνης (PEL) στην υπερτροφική ουλή σε μοντέλο κουνελιού in vivo μέσω τοπικής εφαρμογής. Η παπαΐνη, ως υδατοδιαλυτό μακρομόριο, ενσωματώθηκε στο ελαστικά λιποσώματα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο εξάτμισης αντίστροφης φάσης και βελτιστοποιήθηκε με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM). Το διαμορφωμένο PEL δοκιμάστηκε in vitro από κάθετα κύτταρα διάχυσης Franz, είχε σφαιρική δομή, εύρος νανομέτρων, καλή ελαστικότητα, υψηλή απόδοση ενθυλάκωσης και καλή φυσικοχημική σταθερότητα. Η παπαΐνη φορτωμένη σε ελαστικά λιποσώματα έδωσε υψηλότερες αθροιστικές ποσότητες και ροές από το διάλυμα παπαΐνης στο διάλυμα λήψης και έδειξε υψηλή εναπόθεση στο δέρμα. Η υπερτροφική

ουλή αναστάλθηκε μετά από τοπική χορήγηση PEL, ο δείκτης ανύψωσης της ουλής, η μικροαγγειακή πυκνότητα και οι ίνες κολλαγόνου μειώθηκαν σημαντικά. Τα ευρήματα έδειξαν τη δυνατότητα του PEL ως αποτελεσματικό προϊόν τοπικής θεραπείας ουλών. (40)

Η ελαστικότητα είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτών των λιποσωμάτων που τα διαφοροποιεί από τα συμβατικά και η ενσωμάτωση χοληστερόλης στις λιποσωμικές μεμβράνες επηρεάζει τις ιδιότητες της μεμβράνης. Τα συμβατικά λιποσώματα, μη ελαστικά, με ένα άκαμπτο σύστημα διπλής στιβάδας (SPC και χοληστερόλη) βρέθηκε ότι με χρήση επιφανειοδραστικών μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα κυστίδια και να αλλάξουν τη διαμόρφωση τους, προσαρμόζοντας τα λιπόφιλα μέρη τους μεταξύ των αλυσίδων υδρογονάνθρακα, αντισταθμίζοντας τον όγκο των ομάδων κεφαλής, καθιστώντας τα πιο εύκαμπτα. (40)

Σε άλλη μελέτη του Manosroi et al., η παπαΐνη φορτώθηκε σε νανοσφαίρες PLGA και ελαστικά νιοσώματα ενσωματωμένα σε γέλες, τα οποία έδειξαν χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα της παπαΐνης και υψηλότερη φυσικοχημική σταθερότητα από την ελεύθερη παπαΐνη. (40,89) Η παπαΐνη φορτωμένη σε ελαστικά νιοσώματα παρουσίασε τις συσσωρευμένες ποσότητες και ροές σε ολόκληρο το δέρμα του αρουραίου και στο διάλυμα λήψης, που ήταν μεγαλύτερες από αυτές όπου η παπαΐνη ήταν φορτωμένη σε μη ελαστικά νιοσώματα, νανοσφαίρες PLGA και σε διάλυμα, αντίστοιχα. (89)

Το πήκτωμα που περιέχει παπαΐνη φορτωμένο σε νανοκυστίδια (μη ελαστικά νιοσώματα-GNN και ελαστικά νιοσώματα-GEN) και νανοσωματίδια (νανοσφαίρες PLGA, GPN) έδωσε τιμές pH 5,6–6,5 που είναι κατάλληλο για τοπική εφαρμογή. Όλα τα σκευάσματα γέλης δεν προκάλεσαν ερεθισμό στο δέρμα του κουνελιού, εκτός από αυτό που περιέχει ελεύθερη παπαΐνη και η βάση gel (GB), το GNN και το GEN παρουσίασαν καλή φυσική σταθερότητα. Οι συσσωρευτικές ποσότητες και η διαδερμική ροή παπαΐνης που φορτώθηκε σε ελαστικά και μη ελαστικά νιοσώματα και ελεύθερη παπαΐνη (GS) ήταν υψηλότερες από εκείνες που δεν ενσωματώθηκαν σε σκευάσματα γέλης. Η δομή της γέλης μπορεί να προάγει τη διείσδυση της παπαΐνης σε όλο τη SC, ενισχύοντας την ενυδάτωση του δέρματος και κατά συνέπεια αυξάνοντας την απορρόφηση της παπύρινης σε όλο το δέρμα. (89)

Για την ιστολογική εξέταση, ο αριθμός των ινών κολλαγόνου και το ύψος των ουλών που αντιμετωπίστηκαν με GEN μειώθηκαν σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα

ελέγχου. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι τα ελαστικά νιοσώματα έδωσαν ανώτερο σύστημα διαδερμικής χορήγησης παπαΐνης, βελτίωσαν τη διείσδυση και μείωσαν τις υπερτροφικές ουλές. Η υψηλότερη διαδερμική ροή παπαΐνης που φορτώνεται σε νανοφουσαλιδώδη και νανοσωματιδιακά σκευάσματα συγκριτικά με την ελεύθερη παπαΐνη μπορεί να οφείλεται στη συνεργική επίδραση της αύξησης του συντελεστή κατανομής μεταξύ του δέρματος και της παπύρινης, στην αλλοίωση των ιδιοτήτων του φραγμού του δέρματος από την αλληλεπίδραση της χοληστερόλης ή του πολυμερούς PLGA από τα νανοκυστίδια και τα νανοσωματίδια, αντίστοιχα με το λιπιδικό συστατικό του. (89)

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη διαδερμική απορρόφηση είναι το ιξώδες του οχήματος, οι ενώσεις σε ένα όχημα με υψηλό ιξώδες μπορούν να απορροφηθούν πιο αργά από ότι σε ένα όχημα χαμηλού ιξώδους. Η παπαΐνη μπορεί να επιταχύνει τον ρυθμό ανανέωσης του δέρματος και να δημιουργήσει ένα πιο λείο και απαλό δέρμα, αφού τμήματα της κεράτινης στιβάδας υδρολύονται και αφαιρούνται, γεγονός που διευκολύνει τη διάχυση της υδρόφιλης ουσίας, επειδή η βλάβη του φραγμού του δέρματος αυξάνει τη συμπεριφορά διείσδυσης της ένωσης. Ωστόσο, η υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (HLB) των ενώσεων ή των σκευασμάτων θα μπορούσε να τροποποιήσει σημαντικά το προφίλ διείσδυσής τους. (89)

Η αποτελεσματικότητα της ενθυλάκωσης των περισσότερων υδατοδιαλυτών ουσιών στα κυστίδια διπλής στιβάδας είναι χαμηλή (10-20%), αν και η ενθυλάκωση της παπαΐνης σε ελαστικά λιποσώματα είναι υψηλότερη από αυτή την τιμή. Αυτή η επίδραση μπορεί να σχετίζεται με την ενισχυτική επίδραση του υδρόφιλου επιφανειοδραστικού, το φορτίο των φορτωμένων ενζύμων και την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των ενζύμων και των διπλών στιβάδων των κυστιδίων. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των λιποσωμάτων και της παπαΐνης μπορεί να επηρεάσει την κίνηση της ουσίας κατά μήκος της φουσαλιδώδους μεμβράνης, η οποία εξαρτάται από τις συνθέσεις της διπλής στιβάδας αλλά και από τα χαρακτηριστικά των ενζύμων. (40)

Μια ακόμη πρωτεάση, η βρωμελίνη υποστηρίζει εκτεταμένες εφαρμογές σε πολλούς τομείς, εξαιτίας της ισχυρής πρωτεολυτικής της δράσης. Σε ανασκόπηση της διαθέσιμης βιβλιογραφίας για τη χρήση των NPs και της βρωμελίνης, η παροχή και η χρήση της ήταν μια πρόκληση, αφού ως ευαίσθητο ένζυμο σε μετουσίωση και

διαμορφωτικές αλλαγές, έχει περιορισμένη σταθερότητα και μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητά του. Η νανοτεχνολογία έχει ξεπεράσει ορισμένους περιορισμούς της συμβατικής παροχής, όπως τη κακή υδατοδιαλυτότητα και τη περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα λόγω κακής απορρόφησης ή προβλημάτων σταθερότητας. Η ακινητοποίηση ή η ενθυλάκωση της βρωμελίνης έχει αποδειχθεί ένας εξαιρετικός τρόπος για ενίσχυση της ενζυμικής δράσης της, διευρύνοντας τις διαφορετικές της εφαρμογές. Τα NPs έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για τον καθαρισμό και την ποσοτικοποίηση της βρωμελίνης. (46)

Επίσης, η βρωμελίνη έχει διαδραματίσει με επιτυχία διάφορους ρόλους στον τομέα της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας, τροποποιώντας την επιφάνεια των νανοσωματιδίων και χρησιμεύοντας ως παράγοντας μείωσης και κάλυψης για την παραγωγή νανοσωματιδίων. Μαζί με τη νανοτεχνολογία, η βρωμελίνη έχει προσθέσει σημαντικά τις ιδιότητες και τις δραστηριότητές της, οδηγώντας σε καλύτερα αποτελέσματα στις συνθέσεις, χωρίς ακόμα, να έχει δημιουργηθεί ένα κοινό σύστημα νανοσωματιδίων για το συγκεκριμένο ένζυμο. (46)

### **5.2.3 Δραστικές ουσίες**

Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη του Sahu K. et al. (2017), διαμορφώθηκαν λιποσώματα προπυλενογλυκόλης (PG), φορτωμένα με παπαΐνη, ως βιοδραστικό για τοπική χορήγηση στη θεραπεία της ίνωσης και η προπυλενογλυκόλη ως ενισχυτή διείσδυσης. Για να καθορίσει το δυναμικό μείωσης της ίνωσης, έπρεπε να ξεπεραστεί το σημαντικό εμπόδιο, του δερματικού φραγμού της κεράτινης στιβάδας, λόγω της υδροφιλικότητας, του υψηλού μοριακού βάρους και της πρωτεϊνικής φύσης της παπύρινης, η οποία επιρρεπής σε αποικοδόμηση. (38)

Οι συνεργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των λιποσωμάτων και των λιποσωμάτων με τα συστατικά του δέρματος θεωρείται ότι ευθύνονται για την ανώτερη ενίσχυση της διείσδυσης του δέρματος. Τα λιποσώματα ως ενισχυτές διείσδυσης είναι εύκαμπτα λιπιδικά κυστίδια που χρησιμοποιούνται για την παροχή φαρμακευτικών ουσιών στο βαθύτερο στρώμα του δέρματος. Επίσης, η προπυλενογλυκόλη, ενισχύει την αποτελεσματικότητα παγίδευσης και την εναπόθεση του φαρμάκου στο δέρμα, βελτιώνει τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και μειώνει τον δερματικό ερεθισμό. (38)

Η δραστηριότητα της παπαΐνης αυξήθηκε κατά τη φόρτωση της σε PG-λιποσώματα και έδειξε υψηλότερη παγίδευση στα λιποσώματα λόγω της προπυλενογλυκόλης, η οποία επέτρεψε την καλύτερη διαλυτότητα και κατανομή της στα κυστίδια σε σύγκριση με τα συμβατικά λιποσώματα. Τα ιζώδη των PG-λιποσωμάτων φορτωμένων με παπαΐνη αυξήθηκαν σε σύγκριση με τα συμβατικά και ήταν αποτελεσματικότερα για τοπική εφαρμογή, αφού απελευθέρωσαν υψηλό ποσοστό παπαΐνης. Με αυτό τον τρόπο προώθησαν προς τα έξω την παγιδευμένη παπαΐνη στο υδατικό στρώμα λιποσωμάτων, ενώ τα συμβατικά λιποσώματα που παρουσίαζαν ακαμψία μεμβράνης, περιόρισαν την απελευθέρωση παπύρινης από τη φυσαλιδώδη δομή. Η διείσδυση επίσης ενισχύθηκε λόγω της προσκόλλησης των κυστιδίων στην επιφάνεια του δέρματος που ακολουθείται από την αποσταθεροποίηση και τελικά τη σύντηξη με τη μήτρα λιπιδίων της SC. (38)

Η προπυλενογλυκόλη, ως συνδιαλύτης σε τοπικά σκευάσματα αλληλεπιδρά με τις κερατίνες, χωρίς να αλλοιώνεται η λιπιδική οργάνωση της, βελτιώνει την παγίδευση πολλών δραστικών ουσιών και ενισχύει τη διαλυτότητά τους. Είναι ενδιαφέρον ότι το φυσικό μείγμα παπαΐνης-PG, λόγω των χαρακτηριστικών ενίσχυσης της διείσδυσης στην υδρόλυση του κολλαγόνου και του πεπτιδικού δεσμού κερατίνης έδειξε ενισχυμένη εναπόθεση στο δέρμα. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο μειωμένος ερεθισμός του δέρματος που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των συμβατικών λιποσωμάτων και των PG-λιποσωμάτων οφειλόταν στην ενθυλάκωση της παπαΐνης στη διπλή στιβάδα των λιποσωμάτων που μείωσε την άμεση επαφή της ελεύθερης παπύρινης με το δέρμα. (38)

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα λιποσώματα με φορτία παπαΐνης τα οποία αποτελούνταν από υψηλή συγκέντρωση προπυλενογλυκόλης (ή ενισχυτή διείσδυσης) μπορούν να ενισχύσουν τη διείσδυση στο δέρμα και την εναπόθεση της παπαΐνης σε σύγκριση με εκείνη των συμβατικών λιποσωμάτων. Επίσης η δομική ακεραιότητα (δηλ. η πρωτογενής δομή) της παπαΐνης επηρεάστηκε ελαφρώς κατά τη διαδικασία της σύνθεσης, αλλά η ενζυμική δραστηριότητα δεν διακυβεύτηκε. Αυτό οδηγεί σε πολλά υποσχόμενη λύση καθώς μπορεί να μειώσει την ευαισθητοποίηση (ερεθισμό, κάψιμο) του δέρματος και να προσφέρει περισσότερη ποσότητα παπαΐνης στα βαθύτερα στρώματα όπου εμφανίζεται υπερβολική συσσώρευση κολλαγόνου και εξαιτίας της κολλαγονολυτικής της δράσης προάγει την επούλωση χωρίς τον σχηματισμό ουλών. (38)



### 5.3 Ακίνητοποίηση πρωτεασών

Η χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων σε καλλυντικά σκευάσματα έχει διαδοθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια, όπως για παράδειγμα η παπαΐνη και η βρωμελίνη, έχουν χρησιμοποιηθεί και εφαρμόζεται στην Κοσμετολογία για χημικό peeling, ως αποτριχωτικός παράγοντας και ως ενισχυτικά διείσδυσης. Η παπαΐνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται σε τοπικά σκευάσματα ως πρωτεολυτικός παράγοντας καθαρισμού στη θεραπεία μεγάλων ανοιχτών πληγών και εγκαυμάτων, όπου αποδομεί αποτελεσματικά τους νεκρωτικούς ιστούς, χωρίς να επηρεάζει τους υγιείς, λόγω της αδρανοποίησής της από την α1-αντιθρυψίνη. (37)

Ως γνωστόν, διάφορα πεπτίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες, ένζυμα και άλλες θεραπευτικά δραστικές ουσίες (TAS) χρησιμοποιούνται ευρέως σε καλλυντικά και cosmeceuticals, για την αποτελεσματική φροντίδα του δέρματος αν και υπάρχουν ορισμένα προβλήματα που εμποδίζουν την εφαρμογή τους. Το πρώτο πρόβλημα προκαλείται από την αδρανοποίηση των TAS στα υγρά παρασκευάσματα και στα φάρμακα, όπου πολυάριθμα ανασταλτικά συστατικά, δυσμενές pH και αυξημένες θερμοκρασίες προκαλούν επιτάχυνση της διαδικασίας αδρανοποίησης. Για παράδειγμα, τα πρωτεολυτικά ένζυμα λόγω της γρήγορης μετουσίωσης τους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας σε κρέμες και λοσιόν. Το δεύτερο πρόβλημα προκαλείται από πιθανή αποσύνθεση άλλων συστατικών στο προϊόν, υπό την επίδραση των TAS, όπως η παπαΐνη που έχει δράση πρωτεάσης και εστεράσης και για αυτό μπορεί να αποσυνθέσει συστατικά που περιέχουν πεπτιδικούς και εστερικούς δεσμούς. (92)

Ο όρος «ακίνητοποιημένα ένζυμα» αναφέρεται σε «ένζυμα φυσικά περιορισμένα ή εντοπισμένα σε μια συγκεκριμένη καθορισμένη περιοχή του χώρου με διατήρηση των καταλυτικών τους δράσεων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν επανειλημμένα και συνεχώς». Η ακίνητοποίηση διευκολύνει τη διαχείριση του ενζύμου, απλοποιεί σημαντικά τον χειρισμό με τον βιοκαταλύτη και τον έλεγχο της διαδικασίας αντίδρασης, ενώ ενισχύει τη σταθερότητα του ενζύμου σε συνθήκες αποθήκευσης και λειτουργίας. Επίσης συντελεί στην ανακύκλωση του ενζύμου, μειώνοντας το κόστος της βιομηχανικής διαδικασίας και ενισχύει τα χαρακτηριστικά του, καθιστώντας το πιο ελκυστικό για ποικίλες εφαρμογές. (93)

Τα κύρια συστατικά ενός συστήματος ακίνητοποιημένου ενζύμου είναι το ένζυμο, η μήτρα και ο τρόπος προσκόλλησης. Ανάλογα με την επιλογή της μεθόδου

ακίνητοποίησης, τα ένζυμα θα υποστούν αλλαγές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες τους. Κύρια προτεραιότητα της ακίνητοποίησης είναι η σωστή επιλογή μιας μεθόδου προσκόλλησης μεταξύ των αντιδρώντων ομάδων στην επιφάνεια της μήτρας και των υπολειμμάτων εκτός της δέσμευσης του υποστρώματος ή της ενεργού θέσης του ενζύμου. Η διατήρηση της τριτοταγούς δομής του ενζύμου είναι επίσης ένας ουσιαστικός παράγοντας για τη μεγιστοποίηση της σταθερότητας και της αντιδραστικότητας του στην ακίνητοποιημένη του κατάσταση. (93)

Υπάρχουν τρεις θεμελιώδεις παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην ανάπτυξη ακίνητοποιημένων βιοκαταλυτών, η επιλογή στηριγμάτων ακίνητοποίησης, οι συνθήκες και οι μέθοδοι ακίνητοποίησης. Τα χαρακτηριστικά της μήτρας είναι πρωταρχικής σημασίας για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας του ακίνητοποιημένου ενζυμικού συστήματος, αφού οι ιδιότητες του ενζύμου και του υλικού υποστήριξης θα υπαγορεύουν τις ιδιότητες του υποστηριζόμενου ενζυμικού παρασκευάσματος.

Τα στηρίγματα μπορούν να ταξινομηθούν σε οργανικά και ανόργανα ανάλογα με τη χημική τους σύσταση και μπορούν να υποδιαιρεθούν σε φυσικά και συνθετικά πολυμερή. Μία από τις επιθυμητές ιδιότητες της μήτρας στήριξης είναι το μεσοπορώδες υλικό όπου οι μεγάλες επιφάνειες και ο μεγαλύτερος αριθμός πόρων θα οδηγήσουν σε υψηλότερη φόρτιση ενζύμων ανά μονάδα μάζας. Γενικά τα πορώδη στηρίγματα προτιμώνται καθώς η υψηλή επιφάνεια επιτρέπει μεγαλύτερη φόρτιση ενζύμου, το ακίνητοποιημένο ένζυμο προστατεύεται καλύτερα από το περιβάλλον και βελτιώνονται οι ιδιότητες χωρητικότητας και ροής. (94)

Σήμερα χρησιμοποιούνται, νανοδομημένες μορφές όπως τα νανοσωματίδια, οι νανοϊνες, οι νανοσωλήνες και τα νανοςύνθετα ως εξαιρετικά και στιβαρά υλικά υποστήριξης για την ακίνητοποίηση των ενζύμων. Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές ακίνητοποίησης, η ακίνητοποίηση με βάση τα νανοσωματίδια παρείχε εύκολη σύνθεση σωματιδίων νανοενζύμου σε υψηλή περιεκτικότητα χωρίς τη χρήση επιφανειοδραστικών και τοξικών αντιδραστηρίων, προσαρμογή του μεγέθους των σωματιδίων εντός αποτελεσματικών ορίων εργασίας και επίτευξη ομοιογενών και καλά καθορισμένων νανοσωματιδίων πυρήνα με ιδανικό κέλυφος. (94)

Η σταθερότητα των σκευασμάτων που περιέχουν ένζυμα δεν επιτυγχάνεται εύκολα και η τοπική εφαρμογή τους συχνά περιορίζεται, επειδή μπορούν να μετουσιωθούν ή να απενεργοποιηθούν και επίσης είναι αρκετά δύσκολο να ανακτηθούν και να

ανακυκλωθούν, εμποδίζοντας την περαιτέρω βιομηχανική τους εφαρμογή. (43,95) Η αυξημένη αποθήκευση και η λειτουργική σταθερότητα ενός ενζύμου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πρακτική εφαρμογή του, καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες και ένζυμα είναι ευπαθή και ακόμη και μικρές αλλαγές διαμόρφωσης μπορεί να μειώσουν τη δραστηριότητά τους. Η ακινητοποίηση των ελεύθερων ενζύμων είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος επίλυσης αυτών των προβλημάτων. (46)

Αρκετές μέθοδοι έχουν αναφερθεί και χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση των ενζύμων, όπως χημικές τροποποιήσεις ενζύμων, τεχνικές μηχανικής πρωτεϊνών και χρήση συμβατών οσμολυτών. Η χρήση νανοσωματιδίων για την παροχή πρωτεϊνών αυξάνεται εκθετικά, δεδομένου ότι αυτά τα συστήματα σταθεροποιήσουν τις δραστικές ουσίες έναντι της μετουσίωσης μέσω ενζυμικής πέψης. Εκτός από τη βελτίωση της σταθερότητας, οι νανοδομές λειτουργούν ως νανοφορείς για την αντιμετώπιση διάφορων προκλήσεων, όπως η κακή διαλυτότητα, η κακή διαπερατότητα και η υψηλή τοξικότητα. Επιπλέον, αυτοί οι νεφομετρικοί φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης παροχής. (46)

Πρόσθετα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης των ενζύμων περιλαμβάνουν την ενίσχυση των βιοκαταλυτικών ιδιοτήτων τους, αυξάνοντας τη σταθερότητα και την επαναχρησιμοποίηση τους. Τα ακινητοποιημένα βιοκαταλυτικά συμπλέγματα παρέχουν μια ελκυστική βάση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εργαλείων για τη θεραπεία διάφορων παθολογικών καταστάσεων. Σε σύγκριση με άλλα ένζυμα, η ακινητοποίηση των πρωτεασών περιορίζεται από το υψηλό μοριακό βάρος των πρωτεϊνών, από τα υποστρώματα των πρωτεασών, τα οποία περιορίζουν αριθμητικά τα μόρια των ενεργών ενζύμων σε εκείνα που το ενεργό τους κέντρο είναι προσανατολισμένο στο μέσο. Επίσης, οι ακινητοποιημένες πρωτεάσες προστατεύονται από την αυτοπρωτεόλυση, αυξάνοντας έτσι τη σταθερότητά τους τόσο κατά την αποθήκευση όσο και κατά την εφαρμογή. (43)

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σταθεροποίησης της παπαΐνης, συμπεριλαμβανομένης της ομοιοπολικής ακινητοποίησης, της αλληλεπίδρασης με μεταλλικά ιόντα, του συμπολυμερισμού με γλουταραλδεΐδη, της ακινητοποίησης σε αγαρόζη, της ομοιοπολικής σύνδεσης με πολυαιθεροσουλφόνη, της τροποποίησης με ηλεκτρικό ανυδρίτη, της απλής προσρόφησης σε Celite®, της απορρόφησης ιόντων, (37,43) της ακινητοποίησης σε βιοπολυμερές, με ομοιοπολικούς δεσμούς σε πολυαιθεροσουλφόνη,

με σύζευξη σε πολυμερή σακχαρόζης, σε τροποποίηση με απλό υδρογόνο, με ιοντική απορρόφηση σε CM-κυτταρίνη (κατιονική ιοντοανταλλακτική ρητίνη) και σε QAE-Sephadex® (ανιονική ιοντοανταλλακτική ρητίνη) (37) καθώς και ακινητοποίηση σε σεφαρόζη, νανοσωματίδια, ενσωμάτωση σε νιοσώματα, νανοσφαίρες, λιποσώματα και πολλά άλλα. Ενώ οι παραπάνω προσεγγίσεις γενικά ενίσχυσαν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης και τη βέλτιστη θερμοκρασία της, η μείωση της ειδικής δραστηριότητας και η ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης του ακινητοποιημένου ενζύμου σε σύγκριση με τη διαλυτή παπαΐνη φάνηκε να είναι οι κοινοί περιορισμοί τους. (43)

Η συμπεριφορά της ελεύθερης παπαΐνης σε τοπικά σκευάσματα αναφέρεται στη βιβλιογραφία και η δράση της στο δέρμα έχει διερευνηθεί από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι ανακάλυψαν μια εναλλακτική λύση για την αύξηση της σταθερότητας της σχετική με την τροποποίηση της δομής της για την προστασία της ενεργού θέσης υδρόλυσης. (37)

Μια συγκριτική μελέτη που διεξήχθη από τους Pinto et al. (2011) μεταξύ των ελεύθερων και των τροποποιημένων ενζύμων είχε ως στόχο την εφαρμογή των τελευταίων ως πρώτη ύλη σε καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα σε βιομηχανική κλίμακα ώστε να είναι βιώσιμα για εμπορευματοποίηση. Χρησιμοποιήθηκαν γέλες ως παρασκευάσματα αναφοράς και γαλακτώματα με τροποποιημένο ένζυμο, με σκοπό να αυξηθεί η φυσικοχημική σταθερότητα του ενζύμου και να προωθηθεί η σταδιακή απελευθέρωση του στο σημείο δράσης, ενισχύοντας έτσι τη καλλυντική του αποτελεσματικότητα. (37)

Η μέθοδος τροποποίησης της παπαΐνης με πολυαιθυλενογλυκόλη άλλαξε το προφίλ απελευθέρωσης και τη δραστηριότητα του ενζύμου που ενσωματώθηκε στο γαλάκτωμα που περιέχει ακρυλοϋλοδιμεθυλταυρικό αμμώνιο/συμπολυμερές VP, υπό όλες τις συνθήκες. Η σταθερότητα του ενζύμου ήταν υψηλότερη από ό,τι στα σκευάσματα που περιείχαν το μη τροποποιημένο ένζυμο. (37)

Ένας άλλος πολλά υποσχόμενος τρόπος βελτίωσης της σταθερότητας των θεραπευτικά δραστικών ουσιών (TAS) μπορεί να είναι η ένωσή τους σε ειδικούς φορείς. (92) Σε έρευνα της Baidamshina D.R. et al. (2021) παρουσιάστηκε η ακινητοποίηση της παπαΐνης σε μήτρες χιτοζάνης μεσαίου και υψηλού μοριακού βάρους, όπου εμφάνισε δράση κατά του βιοφίλμ και αύξησε την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα έναντι βακτηρίων που είναι ενσωματωμένα σε βιοφίλμ. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι τόσο η

διαλυτή όσο και η ακινητοποιημένη παπαΐνη κατέστρεψαν αποτελεσματικά τα βιοφίλμ που σχηματίστηκαν από *St. Aureaus* και *St. Epidermidis*. (43)

Η χιτοζάνη ως φυσικό πολυμερές, παρουσιάζει ευρέου φάσματος αντιμικροβιακές ιδιότητες, αποτελεί ένα εξαιρετικό προσροφητικό που συνδέεται με πολλές ουσίες οργανικής και ανόργανης προέλευσης και έχει μεγάλες δυνατότητες ως φορέας ακινητοποίησης ενζύμου. Το χαμηλό κόστος, η μεγάλη κλίμακας διαθεσιμότητα, η αντιμικροβιακή δράση, η βιοαποδομησιμότητα και οι βιοσυγκολλητικές ιδιότητες καθιστούν τη χιτοζάνη έναν σημαντικό φορέα για πολλά ένζυμα. ώστε να αποκτήσουν εξαιρετικά ενεργούς και θερμοσταθερά ακινητοποιημένους καταλύτες. Η βιοσυμβατότητα και η μη τοξικότητά της, την καθιστούν πιθανό υποψήφιο τόσο για συμβατικά όσο και για νέα συστήματα χορήγησης TAs. Επιπλέον, η χιτοζάνη είναι απολύτως ασφαλής για τον άνθρωπο και μπορεί να αποικοδομηθεί πλήρως μετά τη χρήση, λαμβάνοντας έτσι προϊόντα φιλικά προς το περιβάλλον. (43)

Ιδιαίτερα, οι μήτρες που βασίζονται σε χιτοζάνη παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη μηχανική ιστών για ελεγχόμενη απελευθέρωση καθώς και αναδιαμόρφωση του ιστού λόγω των ινωδών και πορωδών ιδιοτήτων τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη προσρόφηση παπαΐνης θα μπορούσε να επιτευχθεί σε pH 9.0, όπου η χιτοζάνη χάνει το φορτίο της, υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός ακινητοποίησης μάλλον διέπεται από υδρόφοβη προσρόφηση, χωρίς να είναι απολύτως σαφής. Οι διαμορφωτικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά τις αλληλεπιδράσεις υποστρώματος-ενζύμου και απαιτούνται για την καταλυτική δράση καθορίζονται τόσο από τις προϋπάρχουσες διαμορφώσεις όσο και από τις αυτοπροκαλούμενες αλλαγές του υποστρώματος. (43)

Η ακινητοποίηση αυξάνει τη δομική ακαμψία του ενζύμου με το σχηματισμό πιο σταθερών δεσμών για την υποστήριξη του, οι διαχωριστικοί βραχίονες είναι αρκετά κοντοί και το στήριγμα είναι άκαμπτο, αυτό έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερη ευελιξία της πρωτεϊνικής αλυσίδας και κατά συνέπεια χαμηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα και ειδικότητα. Παρόμοια εξήγηση θα μπορούσε να προταθεί για την αυξημένη θερμοσταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. (43)

Σε ορισμένες από τις πιο πρόσφατες αναλύσεις, έχουν αναφερθεί αντιβακτηριακές δράσεις της ακινητοποιημένης παπαΐνης. Σε μελέτη του Atacan K. et al. (2018), παρήχθησαν μη τοξικά  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) που χρησιμοποιήθηκαν αποτελεσματικά ως μαγνητικός πρόδρομος για την ακινητοποίηση

της παπαΐνης και στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια τροποποιήθηκαν μέσω φόρτωσης άλλων χημικών ή βιολογικών υλικών κατά τη διάρκεια ή μετά τη διαδικασία σύνθεσης για να βελτιωθεί η σταθερότητα, η βιοσυμβατότητα και η βακτηριακή δραστηριότητα πριν από την εφαρμογή τους. (95)

Τα παρασκευασμένα  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  MNPs έχουν παρουσιάσει πολλά πλεονεκτήματα χρήσης, όπως είναι η απόδοση των βιομορίων στόχων, η σταθερότητα, η μονοδιασπορά, η απλότητα, το χαμηλό κόστος και ο γρήγορος διαχωρισμός. Επιπλέον προστέθηκαν νανοσωματίδια αργύρου (Ag) στα  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  MNPs όπου προσέφεραν μεγάλες δυνατότητες χρήσης σε άλλες βιοϊατρικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές, αφού μετά την ακινητοποίηση τους στην παπαΐνη, η αντιβακτηριακή δράση τους αυξήθηκε και δημιουργήθηκε προοπτική για μελλοντική χρήση στη παραγωγή αποτελεσματικών αντιβακτηριακών παραγόντων. (93)

### **5.3.1 Νανοδιαμόρφωση ενζύμων**

Αν και η νανοδιαμόρφωση των ενζύμων αναμένεται να βελτιώσει τη χρησιμότητά τους στα καλλυντικά, μόνο μερικά παραδείγματα μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία μέχρι στιγμής, πιθανότατα επειδή η χρήση τους εξακολουθεί να είναι ασυνήθιστη. (68) Υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές μελέτες αναφερόμενες στη καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη νατρίου (CMC) και στη πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), οι οποίες συνδυάζονται συχνά για τη φόρτωση και την παροχή φαρμάκων. Η CMC είναι ένα φυσικό πολυμερές που λαμβάνεται από κυτταρίνη και εμφανίζει ιδιότητες, όπως βιοσυμβατότητα, βιοαποδομησιμότητα, χαμηλό κόστος και υψηλή ικανότητα διόγκωσης. Όταν για παράδειγμα εφαρμόζεται για τη θεραπεία τραυμάτων παρέχει ένα κατάλληλο περιβάλλον για το σχηματισμό της εξωκυτταρικής μήτρας και την εκ νέου επιθηλιοποίηση της περιοχής θεραπείας. Η PVA είναι ένα βιοσυγκολλητικό, βιοαποικοδομήσιμο και υδατοδιαλυτό πολυμερές με κρυσταλλική δομή. (42)

Σε εργασία των C.S.A. de Lima et. al. (2003) αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε η σταθερότητα πρωτότυπων ημιστερεών σκευασμάτων κατάλληλων για φόρτωση νανοπαπαΐνης για δερματολογική ή τοπική χορήγηση λαμβάνοντας υπόψη τα πλεονεκτήματα της παπαΐνης σε μορφή νανοσωματιδίων. Το πήκτωμα CMC και PVA παρουσίασαν ένα πολύ ευνοϊκό περιβάλλον για το ένζυμο, στη φυσική και στη

νανοσωματιδιακή μορφή του, καθώς η πρωτεολυτική δραστηριότητα του διατηρήθηκε και στις δύο συνθέσεις μετά τη φόρτωση στη μήτρα του πολυμερούς, τα οποία ήταν ικανά να προάγουν την απελευθέρωση νανοσωματιδίων παπαΐνης. (42)

Επιπλέον, τα ευρήματά υποδηλώνουν ότι η νανοσωματιδιακή μορφή είναι ελαφρώς πιο σταθερή στις συνθέσεις από την φυσική μορφή του ενζύμου. Η μήτρα γέλης δεν υπέστη αλλαγές στη μικροδομή της, παρουσία της νανοπαπαΐνης ή του φυσικού ενζύμου, διατηρώντας το χαρακτηριστικό πορώδες της. Η κατανομή του ενζύμου κατά μήκος της μήτρας γέλης ήταν ομοιογενής για όλες τις συνθέσεις και οι δοκιμασίες βιωσιμότητας των κυττάρων δεν αποκάλυψαν κυτταροτοξικότητα. Το αναπτυγμένο σύστημα παρουσίασε τη δυνατότητα για βιοϊατρικές εφαρμογές και θα μπορούσε να μελετηθεί είτε ως όχημα για την ίδια την παπαΐνη ή για τη μεταφορά άλλων δραστικών ουσιών μέσω συμπλοκοποίησης με τα νανοσωματίδια. (42)

### **5.3.2 Διάφορα υποστηρίγματα για την ακινητοποίηση των ενζύμων**

#### **1. Νανοΐνες**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η απόδοση του ακινητοποιημένου ενζύμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δομή του υλικού υποστήριξης. Τα νανοδομημένα στηρίγματα, όπως νανοσωματίδια, νανοσφαίρες, νανοΐνες χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση των ενζύμων και πιστεύεται ότι διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα, εξασφαλίζοντας σε μεγαλύτερο βαθμό αποτελεσματική ακινητοποίηση. Ωστόσο, τα βασικά μειονεκτήματα των νανοσωματιδίων και των νανοσφαιρών είναι η ομοιόμορφη κατανομή, η ανακύκλωση και οι απώλειες κατά την ενθυλάκωση. (41)

Οι νανοΐνες ξεπερνούν αυτά τα μειονεκτήματα και επί του παρόντος κερδίζουν μεγάλη προσοχή και παρέχουν πολλές ελκυστικές πτυχές όπως υψηλό πορώδες, διασυνδεσιμότητα, υψηλή αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο και εύκολο χειρισμό. Λόγω των χρήσιμων ιδιοτήτων τους, όπως τη διαπερατότητα οξυγόνου υψηλού πορώδους, τη μεταβλητή κατανομή μεγέθους πόρων και τη μορφολογική ομοιότητα με τη φυσική εξωκυτταρική μήτρα (ECM) στο δέρμα, προάγουν την κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση και το πολλαπλασιασμό. Η ακινητοποίηση του ενζύμου μπορεί να επιτευχθεί είτε με δέσμευση στην επιφάνεια του υποστηρίγματος, είτε με ενθυλάκωση στη μήτρα στήριξης. (41)

Η ενθυλάκωση του ενζύμου σε μήτρα υποστήριξης φέρνει υψηλή αποτελεσματικότητα φόρτωσης ενζύμου και επιτρέπει τη δυνατότητα ανάμειξης περισσότερων τύπων ενζύμων σε νανοΐνες. Ακινητοποίηση παπαΐνης σε διάφορα στηρίγματα όπως μεσοπορώδες πυρίτιο, μακροπορώδης φορέας σφαιριδίων συμπολυμερούς, μικροσφαίρες πολυακρολεΐνης, ρητίνες ανταλλαγής ανιόντων, εποξειδικό πολυμερές, υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια και πολυμερικές νανοΐνες έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. (41)

Η παπαΐνη σε συνδυασμό με ουρία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αφαίρεση νεκρωτικών/αποβιωμένων ιστών. Σε μελέτη των E. Shoba et al. (2012) ενθυλακώθηκε παπαΐνη και ουρία σε νανοΐνες PVA για παρατεταμένη απελευθέρωση, ώστε να γίνει διάσπαση του ινώδους υλικού στον νεκρωτικό ιστό και να ενισχυθεί η επούλωση των πληγών. Η ουρία μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και τις καθιστά πιο ευαίσθητες στην πρωτεόλυση από την παπαΐνη με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση τους και το PVA επιλέχθηκε ως μήτρα λόγω της βιοσυμβατότητας του και της καλής θερμοχημικής του συμπεριφοράς. (41)

Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των νανοϊνών απεικόνισε την αλληλεπίδραση του ενζύμου με το πολυμερές και επίσης επιβεβαίωσε ότι το ένζυμο ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένο στις νανοΐνες σε άμορφη κατάσταση. Η δομική ακεραιότητα του ενζύμου διατηρήθηκε μετά την ενθυλάκωση και αυτό επιβεβαιώθηκε με την φασματοσκοπία φθορισμού. Οι δοκιμασίες κυτταρικής συμβατότητας και τα αποτελέσματα της αντιβακτηριδιακής δράσης επιβεβαίωσαν τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος μαζί με τη βιοσυμβατότητα της ηλεκτροϊνοποιημένης νανοΐνας. (41)

Η μελέτη επιβεβαίωσε ότι η βιολογική δραστηριότητα της παπαΐνης δεν επηρεάστηκε κατά την ηλεκτροϊνοποίηση αφού σχημάτισε ομοιογενές μίγμα με το υδρόφιλο πολυμερές και δεν μετουσιώθηκε υπό συνθήκες υψηλής ηλεκτρικής τάσης. Πιθανότατα αποτελεί μια βιώσιμη προσέγγιση για την παγίδευση ενζυμικών πρωτεϊνών και άλλων πεπτιδίων σε εξαιρετικά λεπτές ίνες και την παροχή τους μέσω νανοϊνών με διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας τους. (41)



## 2. Κυτταρινικά σκευάσματα ως μήτρες υποστήριξης

Μεταξύ των διαφόρων φυσικών υλικών, η κυτταρίνη είναι η πιο κατάλληλη πρώτη ύλη για την παρασκευή νανοφορέων. Αποτελεί ένα πασίγνωστο και άφθονο βιοπολυμερές παγκοσμίως, το οποίο παρουσιάζει αξιοσημείωτες ιδιότητες, όπως η υδροφιλία, η ικανότητα εκτεταμένης τροποποίησης και η θερμική σταθερότητα του (έως περίπου 200°C) την καθιστούν ελκυστική πηγή νέων βιώσιμων υλικών για πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Η κυτταρίνη λαμβάνεται κυρίως από φυτά, αλλά παράγεται επίσης από βακτήρια, μύκητες, φύκια και θαλάσσια ζώα. Ανεξάρτητα όμως από την πηγή της, είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης μονάδων β-D-γλυκοπυρανόζης που συνδέεται με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς. (94,95) Στις νανοδομές εμφανίζει μοναδικές ιδιότητες όπως χαμηλή πυκνότητα, σκληρότητα και λειαντικότητα, ικανότητα δομικής και χημικής τροποποίησης, βιοσυμβατότητα και βιοαποδομησιμότητα στη φύση. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια κυτταρίνης ικανοποιούν πλήρως τις απαιτήσεις του βέλτιστου βιοφορέα νανοκλίμακας. (92)

Κάποια TAS μπορούν να προσκολληθούν σε όξινες λειτουργικές ομάδες νανοφορέων κυτταρίνης παρουσία αναγωγικών (αλδεϋδών) ομάδων, όπου παρέχει ευκαιρίες για την προσκόλληση τους. Για παράδειγμα, μετά την προσάρτηση κατιόντων Ag σε νανοφορείς (NC) μπορεί να παρασκευαστεί ένας νανοαντιβακτηριακός παράγοντας. Η χυμοθρυψίνη, η παπαΐνη, οι κολλαγενάσες, οι λυσοαμιδάσες και οι λυσοζύμες, μπορούν να προσκολληθούν σε νανοφορείς κυτταρίνης με δυνατότητα ελεγχόμενης βραδείας απελευθέρωσης. Η θρυψίνη έχει συνδεθεί με νανοφορέα με ασταθείς χημικούς δεσμούς για το σχηματισμό σταθεροποιημένης ενζυμικής μορφής. Η περιεκτικότητα των TAS, σε σύζυγή με άμορφο νανοφορέα (ANC) ήταν υψηλότερη από ότι σε σύζυγή με κρυσταλλικό νανοφορέα (CNC), εξαιτίας του διαφορετικού περιεχόμενου συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων. (92)

Τα συζεύγματα που βασίζονται σε κρυσταλλικούς νανοφορείς (CNC-TAS) ανοίγουν ένα νέο μονοπάτι στην ανάπτυξη προηγμένων θεραπειών προσωπικής φροντίδας και καλλυντικών προϊόντων. Χαρακτηρίζονται από νανομέγεθος, υψηλή κρυσταλλικότητα, ανεπτυγμένη επιφάνεια, αυξημένη ικανότητα πάχυνσης και ορισμένες άλλες ειδικές ιδιότητες. Κυρίως στα καλλυντικά και στα προϊόντα υγιεινής προσδίδουν αποτελέσματα όπως επιλεκτική απολέπιση των νεκρών ιστών, χωρίς να βλάπτουν το υγιές δέρμα και αποτελεσματικό καθαρισμό λόγω της υψηλής ειδικής επιφάνειας.

Επιπλέον, λόγω του μεγέθους τους τα συζεύγματα NC-TAS είναι ικανά να διεισδύσουν μέσω της λιπιδικής στιβάδας και της επιδερμίδας στα στρώματα του δέρματος για να θεραπεύσουν βαθιές δερματικές παθήσεις και τραυματισμούς. Ακόμη η υψηλή ικανότητα πήξης τους, επιτρέπει τη μείωση της ποσότητας των συνθετικών παχυντικών και προσδίδει τη σταθερότητα της φάσης σε διάφορα υγρά σκευάσματα. (92)

Αν και η φυτική κυτταρίνη είναι το πιο χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα κυτταρίνης, η βακτηριακή νανοκυτταρίνη (BNC) ή βιοκυτταρίνη, θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη μορφή κυτταρίνης για τα καλλυντικά. Αποτελεί ένα καλά οργανωμένο τρισδιάστατο δίκτυο νανο- και μικροϊνιδίων σε σχήμα κορδέλας με εξαιρετικά μειωμένη διάμετρο σε σύγκριση με τις φυτικές ίνες κυτταρίνης. Παράγεται βιοτεχνολογικά ως εξωπολυσακχαρίτης από ορισμένα αερόβια μη παθογόνα βακτήρια και συνδυάζει τις ιδιότητες της κυτταρίνης με τα χαρακτηριστικά των νανοϋλικών (96,97).

Μια άλλη ιδιότητα της BNC είναι η υψηλή χημική του καθαρότητα, το υπόστρωμα της χαρακτηρίζεται από μια εξαιρετικά πορώδη νανοϊνιδική δομή, με διάμετρο πόρων συνήθως κάτω από 10 μm, που έχει ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτη διαπερατότητα σε αέρια και υγρά και πολύ υψηλή ικανότητα δέσμευσης νερού (>90%). Χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλό δείκτη κρυσταλλικότητας (80-90%) που συμβάλλει στην υψηλή θερμική σταθερότητα και παρουσιάζει υψηλό βαθμό πολυμερισμού και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, λόγω της κρυσταλλικής νανοϊνιδικής δομής του. (98)

Εκτός από τις αξιοσημείωτες φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες, η BNC εμφανίζει υψηλή *in vivo* βιοσυμβατότητα με το δέρμα, το οποίο είναι ένα ιδιαίτερα ελκυστικό χαρακτηριστικό όταν προορίζεται να εφαρμοστεί σε εφαρμογές περιποίησης δέρματος. (85) Η εφαρμογή της BNC στα καλλυντικά έχει διερευνηθεί και αποδειχθεί με την πάροδο των ετών, κυρίως ως υποστηρικτικό υλικό μάσκας προσώπου για την παροχή δραστικών ουσιών στο δέρμα, ως φυσικό απολεπιστικό ή ως δομικός παράγοντας σε σκευάσματα προσωπικής φροντίδας. (95).

Η χρήση του BNC στα καλλυντικά εμφανίζεται κυρίως ως φορέας δραστικών ουσιών του δέρματος, ως ενζυμικός ακινητοποιητής, ως σταθεροποιητής γαλακτώματος ή ως εναλλακτική λύση στα μικροπλαστικά. Το BNC έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή ως σύστημα διανομής λόγω της ιδιόμορφης πορώδους νανοδομής του που ευνοεί την ενσωμάτωση και την απελευθέρωση δραστικών ουσιών στους τομείς της βιοϊατρικής

και της κοσμητολογίας. (85) Τα οφέλη που προσφέρει η δομή της μεμβράνης BC περιλαμβάνουν περιορισμό των ενζύμων με ομοιοπολική σύνδεση ή διάχυση μέσω της στερεής στήριξης, αυξημένη απόδοση ακινητοποίησης, καλύτερη σταθεροποίηση και επαναχρησιμοποίηση βιομορίων. (99)

Η επιτυχής εφαρμογή του BNC στη διαδερμική απελευθέρωση δραστικών ουσιών έχει αποδειχθεί ευρέως τόσο για τα υδρόφοβα όσο και για τα υδρόφιλα φάρμακα. Στην πραγματικότητα, η χρήση της μήτρας BNC για την ακινητοποίηση ενζύμων σε καλλυντικές εφαρμογές είναι σχεδόν ανεξερεύνητη. (85) Μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Vasconcelos et al. (2020) περιγράφει την ομοιοπολική ακινητοποίηση της παπαΐνης σε υγρές μεμβράνες BNC. Στα κυτταρινικά στηρίγματα ο ομοιοπολικός δεσμός προάγει την πιο σταθερή αλληλεπίδραση με τα ένζυμα, με αποτέλεσμα τη πιθανή αύξηση της δραστηριότητας και της θερμοσταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Ωστόσο, οι ομάδες υδροξυλίου BNC δεν αντιδρούν άμεσα με τις ομάδες αμίνης των ενζύμων, έτσι μια πιθανή λύση για να διασφαλιστεί μια πιο σταθερή αλληλεπίδραση είναι η χημική τροποποίηση του BNC. (99)

Ο ομοιοπολικός δεσμός επιτεύχθηκε με σχηματισμό αμίνης μεταξύ των πρωτεϊνικών αμινομάδων και των καρβονυλικών ομάδων BNC που παράγονται από μια οξειδωτική επεξεργασία. Παρατηρήθηκε ότι η ανακτημένη δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου έναντι του ελεύθερου ήταν υψηλότερη, επιβεβαιώνοντας ότι η παπαΐνη παραμένει ενεργή μετά την ακινητοποίηση. Επιπλέον, σε σύγκριση με το μη οξειδωμένο BNC, μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου ακινητοποιήθηκε στην οξειδωμένη μεμβράνη λόγω καλύτερης χημικής αλληλεπίδρασης με το ένζυμο, λόγω του ομοιοπολικού δεσμού αμίνης που δημιουργήθηκε μεταξύ των ομάδων αλδεϋδης (αποτέλεσμα οξείδωσης) του BNC και της αμίνης. (99)

Ωστόσο, η μηχανική αντίσταση εξακολουθεί να είναι επαρκής για καλλυντικές εφαρμογές και η αυξημένη ευελιξία είναι ευεργετική για την προσκόλληση στο δέρμα. Αν και αυτή η μελέτη δεν είναι ειδικά προσανατολισμένη στον καλλυντικό τομέα, καταδεικνύει τη δυνατότητα της μεθόδου να οξειδώνει το υγρό BNC και να το χρησιμοποιεί ως υποστήριξη για την ακινητοποίηση ενός καλλυντικού ενζύμου. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι το BNC αποδείχθηκε βιώσιμη εναλλακτική λύση και σε άλλες καλλυντικές εφαρμογές. Απαιτούνται όμως, πρόσθετες μελέτες σχετικά με τη

σταθερότητα της ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αποθήκευση, αν και η BNC φαίνεται μια πολλά υποσχόμενη και ελκυστική μορφή χρήσης για τα καλλυντικά με βάση τα ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να ξεπεραστεί η χαμηλή αποτελεσματικότητα και η μικρή διάρκεια ζωής, που πολλές φορές συνδέονται με τα συμβατικά προϊόντα. (85)

#### **5.4 Ενζυμική τροποποίηση βιοδραστικών ενώσεων για καλλυντική εφαρμογή**

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία καλλυντικών αναζητά βιοδραστικές ενώσεις που προάγουν οφέλη για την υγεία, όμως η αλληλεπίδραση μεταξύ καλλυντικού και δέρματος είναι πολύπλοκη, υπάρχει ανάγκη τοξικολογικών δοκιμών του τελικού προϊόντος και των βιοδραστικών συστατικών του. Τα συστατικά των καλλυντικών μπορεί να περιλαμβάνουν φυτοχημικά, βιταμίνες, πεπτίδια, ένζυμα και αιθέρια έλαια μεταξύ άλλων. (100)

Για αυτό το λόγο απαιτείται τροποποίηση των βιοδραστικών ενώσεων πριν από την εφαρμογή τους στο τελικό προϊόν, η τροποποίηση με λιπαρές ενώσεις οδηγεί σε περισσότερα λιπόφιλα προϊόντα, ενώ η τροποποίηση με σάκχαρα οδηγεί σε πιο υδρόφιλα παράγωγα. Οι χημικές προσεγγίσεις έχουν πολλά μειονεκτήματα όπως η προστασία και η αποπροστασία ομάδων με αποτέλεσμα πολλά στάδια αντίδρασης, χρήση ισχυρού οξέος ως καταλύτη, υψηλές θερμοκρασίες (150–200 °C), σχηματισμό ανεπιθύμητων προϊόντων και υψηλή κατανάλωση ενέργειας. (100)

Η ενζυματική τροποποίηση χρησιμοποιείται υπό ήπιες συνθήκες, είναι εξαιρετικά επιλεκτική και περιλαμβάνει ένα μόνο βήμα. Οι πιο σημαντικές ενζυμικές τροποποιήσεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνθεση συστατικών με ελκυστικές και τεκμηριωμένες ιδιότητες για τη βιομηχανία καλλυντικών. Ιδιότητες όπως λευκαντικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και φωτοπροστατευτικές επιδράσεις ήταν κριτήρια για την επιλογή των αναφερόμενων αντιδράσεων τροποποίησης.

Μια τροποποίηση μπορεί να ακολουθεί διαφορετικούς μηχανισμούς όπως άμεση εστεροποίηση ή μετεστεροποίηση που εκτελείται από εστεράσες και πρωτεάσες, γλυκοζυλίωση (αντίστροφη υδρόλυση) ή τρανσγλυκοζυλίωση που εκτελείται από

τρανσφεράσες και β-γλυκοσιδάσες και ολιγομερισμός που εκτελείται από λακκάσες. (100)

Σχετικά με τις πρωτεάσες εκτός από την κατάλυση της διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών για την παραγωγή πεπτιδικών καλλυντικών, οι πρωτεάσες βρίσκουν εφαρμογή σε αντιδράσεις μετεστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες, μειώνοντας το κόστος παραγωγής εστέρων και αυξάνοντας την ειδικότητα της αντίδρασης. Η χρήση τους επιτρέπει την τροποποίηση των ενώσεων-στόχων υπό ήπιες συνθήκες, διατηρώντας τη βιολογική τους δραστηριότητα και αποφεύγοντας το σχηματισμό υποπροϊόντων με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά καλλυντικά και την παραγωγή βιολογικά ενεργών συστατικών προκειμένου να αντικατασταθούν οι υπάρχουσες χημικές διεργασίες. (100)

Τα ένζυμα από διαφορετικές πηγές εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, για παράδειγμα η αλκαλική πρωτεάση από *B. Subtilis* εφαρμόστηκε στην τοποεκλεκτική εστεροποίηση της ομάδας υδροξυλίου του kojic acid για την παραγωγή διαφορετικών λιπόφιλων εστέρων, σε διμεθυλοφορμαμίδιο. (100)

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

## ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΤΡΙΧΩΣΗ

### 6.1 Βασικά στοιχεία τρίχας

Οι τρίχες αποτελούν κεράτινα εξαρτήματα του δέρματος, προερχόμενα από μια βαθιά περιγεγραμμένη εσοχή της επιδερμίδας και ακυρώνονται σταθερά στο χόριο από τον θύλακα της τρίχας. Είναι εύκαμπτες, ελαστικές, υγροσκοπικές και δυσθερμαγωγές δομές, με κυλινδρικό και νηματοειδές σχήμα που παράγονται από τα τριχοθυλάκια και αποτελούνται από κερατίνη, που παράγεται από μιτωτικά ενεργά κύτταρα στη βάση του θύλακα. (Εικόνα 6.1) Οι τρίχες του ανθρώπινου σώματος καλύπτουν όλη την επιφάνεια του δέρματος, με εξαίρεση τις παλάμες, τα πέλματα, της πλάγιας επιφάνειας των δακτύλων (χειρών και ποδιών), της ραχιαίας επιφάνειας των νυχιών, της θηλής του μαστού, της βάλανου, της κλειτορίδας και της έσω επιφάνειας των χειλιών του αιδοίου. (101)

Οι τρίχες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, τη χροιά και την πυκνότητα αναλόγως του ατόμου, του φύλου, της ηλικίας, της φυλής, της περιοχής του σώματος που βρίσκονται και της κληρονομικής προδιάθεσης. Ως προς το μέγεθος διακρίνονται σε μακριές και παχιές τρίχες, οι οποίες είναι και οι περισσότεροι ογκώδεις, σε χνοώδεις τρίχες, όπου στερούνται μυελού και είναι λεπτές και κοντές και σε βραχείες τρίχες όπου υπάγονται οι βλεφαρίδες και οι τρίχες των φρυδιών. Το μήκος των τους κυμαίνεται από 0,5mm έως 1,5mm και το πάχος τους μεταξύ 0,007mm-0,17mm. (102)

Ως προς το σχήμα τις διακρίνουμε σε λείες (λευκή φυλή) και σε ούλες (μαύρη φυλή). Οι πρώτες υποδιαιρούνται στις ευθείες, στις βοστρυχοειδείς, στις κυματοειδείς και στις σπειροειδείς. Η χροιά ποικίλλει αναλόγως της ποσότητας της μελανίνης που βρίσκεται εκτός των κυττάρων. Ο αριθμός ποικίλλει από άτομο σε άτομο, η δε πυκνότητα από χώρα σε χώρα. Ο ολικός αριθμός των τριχών είναι 5.000.000 από τις οποίες 1.000.000 βρίσκονται στο κεφάλι. (102)

Οι τρίχες αυξάνονται ασυνεχώς και παρουσιάζουν περιόδους ανάπτυξης που ακολουθούνται από περιόδους ηρεμίας. Αυτή η ανάπτυξη δεν συμβαίνει συγχρόνως σε όλες τις περιοχές του σώματος ή ακόμη και στην ίδια περιοχή, αλλά έχει την τάση να

λαμβάνει χώρα κατά ζώνες. Επίσης, η διάρκεια των περιόδων αύξησης και ηρεμίας ποικίλει ανάλογα με την περιοχή του σώματος. (100) Έτσι, από την εμβρυική περίοδο και σε όλη τη ζωή του ανθρώπου ο σχηματισμός, η ανάπτυξη και η απόπτωση των τριχών διέπεται από ένα κυκλικό ρυθμό. Ο κύκλος της τρίχας περιλαμβάνει τρεις φάσεις ή στάδια. (104)

1. Το αναγενές στάδιο αποτελεί την ενεργητική φάση ανάπτυξης της τρίχας και χαρακτηρίζεται από έντονη δραστηριότητα του θύλακα με αποτέλεσμα το σχηματισμό και την ανάπτυξη νέας τρίχας. Η φάση αυτή αρχίζει πριν ακόμη αποπέσει η τελογενής τρίχα και τα διάφορα διαδοχικά φαινόμενα είναι παρόμοια με εκείνα που συμβαίνουν κατά τη μορφογένεση του θυλάκου στο έμβρυο. Το κατώτατο σημείο του θυλακίου ωθείται πιο βαθιά στο χόριο από το συνεχές τμήμα του κυττάρου. Η νέα τρίχα αρχίζει ως νέα κύτταρα, τα οποία επιμηκύνονται και διαμορφώνονται ως μια λεπτή ίνα και έπειτα ωθούνται προς τα επάνω στο θυλακοειδές κανάλι. (104)

2. Καταγενές στάδιο (φάση παλινδρόμησης). Αποτελεί ένα ενδιάμεσο, μεταβατικό στάδιο, όπου η τρίχα σταματάει να αναπτύσσεται και ο θύλακας προετοιμάζεται για την απόπτωση της. Η τρίχα λεπτύνεται και λευκαίνει, διότι διαταράσσεται η μεταφορά των κοκκίων μελανίνης. Κατά τη διάρκεια αυτού του μεταβατικού σταδίου η κυτταρική διαίρεση σταματά και η βάση του άξονα της τρίχας κερατινοποιείται πλήρως και σχηματίζει έναν χαρακτηριστικό ξηρό, άσπρο κόμβο. (105)

Σε αυτό το στάδιο η κατασκευή του βολβού εξαφανίζεται και η δερματική θηλή ξεχωρίζει και αποκόπτεται από το θύλακα. Οι τρίχες σε αυτό το στάδιο χαρακτηρίζονται από ενιαία διάμετρο ρίζας και στελέχους ή ενίοτε εμφανίζουν τάση για πάχυνση «δίκην ροπάλου» στο εγγύς τμήμα τους. Ένα άλλο χαρακτηριστικό του καταγενούς σταδίου είναι ότι η «υάλινη μεμβράνη» αναπτύσσει πτυχές και «ζαρώνει» αυξάνοντας συγχρόνως κατά πολύ το πάχος. Όταν όμως η «υάλινη μεμβράνη» αποσυντεθεί, συμπληρώνεται η καταγενής φάση και ο θύλακος εισέρχεται στη τελογενή φάση. (105)

3. Το τελογενές στάδιο ή αλλιώς στάδιο αδράνειας ή ηρεμίας, είναι η περίοδος εκείνη κατά την οποία η τρίχα ηρεμεί και τελικά απομακρύνεται καθώς αντικαθίσταται από νέα τρίχα. Στη φάση αυτή ο τριχικός θύλακος αδρανεί και δεν παράγει τρίχα, η τριχοφυΐα αναστέλλεται και η τρίχα αποπίπτει. Ο τελογενής θύλακος είναι κοντός και η βάση του τελειώνει κοντά στο σημηματογόνο αδένα. Στη μικροσκοπική εξέταση των

τριχών παρατηρείται απουσία του μυελού και της κερατογενούς ζώνης και ένα αποχρωματισμένο ωοειδές άκρο. Η τελογενής τρίχα, κατά τη περίοδο αυτή, αποβάλλεται από το τριχικό θύλακο. Από αυτό το σημείο μπορεί να ξεκινήσει μια νέα φάση αναγέννησης. (105)

Οι βασικοί ρόλοι της τρίχας είναι:

- ✓ Προστασία (Φυσικός Φραγμός). Προστατεύουν δηλαδή το σώμα από τις απότομες αλλαγές των καιρικών συνθηκών, τη θερμοκρασία του νερού και από κάποιους μικροοργανισμούς (μικρόβια).
- ✓ Ανοσοπροστασία. Οι τρίχες «προστατεύουν» το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό σημαίνει ότι όταν πέφτουν οι τρίχες, πέφτει και η άμυνα του οργανισμού, άρα ο οργανισμός νοσεί.
- ✓ Θερμική μόνωση. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στην επιφάνεια του δέρματος για τη σωστή λειτουργία του.
- ✓ Αισθητηριακός. Οι τρίχες όλου του σώματος αποτελούν όργανο αφής.
- ✓ Αισθητικός. Ως γνωστόν τα μαλλιά και άλλες τρίχες του σώματος (βλεφαρίδες, φρύδια, γένια), είναι χαρακτηριστικά του φύλου και μας προσδίδουν κύρος και ομορφιά. (102)

Με βάση ορισμένα μορφολογικά κριτήρια, την εντόπιση, το φύλο και την ηλικία, διακρίνονται τέσσερις τύποι τρίχωσης.

- i. Εμβρυική χνοώδη τρίχωση. Είναι η πρώτη μαλακή, πυκνή τρίχωση που παράγεται από τους εμβρυικούς θυλάκους κατά την ενδομήτρια ζωή και καλύπτει το δέρμα του εμβρύου. Αποτελείται από απαλές, λεπτές σε διάμετρο, συνήθως άχρωμες τρίχες, χωρίς μυελώδη ουσία και οι περισσότερες από αυτές αποβάλλονται πριν από τη γέννηση κατά τον 7ο και 8ο μήνα της ενδομήτριας ζωής.
- ii. Χνοώδη τρίχωση. Αποτελείται από πολύ μαλακές, λεπτές τρίχες παχύτερες από αυτές της εμβρυικής τρίχωσης. Καλύπτουν ολόκληρο το σώμα εκτός από τις παλάμες και τα πέλματα και δεν περιέχουν μεγάλες ποσότητες μελανίνης.
- iii. Ενδιάμεση τρίχωση. Περιλαμβάνει όλες τις τρίχες που βρίσκονται ανάμεσα στη χνοώδη και την ώριμη, τελική τρίχωση και όσο πλησιάζει το άτομο στην εφηβεία αντικαθίσταται από την τελική τρίχωση.



- iv. Τελική τρίχωση. Εμφανίζεται προοδευτικά στην εφηβεία, αποτελείται από τρίχες μακριές, έγχρωμες και τραχιές στην υφή και αποτελεί ένα από τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά του φύλου. Η τρίχωση αυτή περιγράφεται ως εμμύελη και οι χνοώδεις τρίχες του σώματος, αρχίζουν να μεταβάλλονται σε τελικές πριν την έναρξη της ήβης. Η τελική τρίχωση σχηματίζει τις βλεφαρίδες, τα φρύδια, το τριχωτό της κεφαλής, την ηβική και μασχαλιαία τρίχωση στα δύο φύλα και το μέρος της τρίχωσης στο σώμα και στο πρόσωπο των ανδρών. (102)

### **6.1.1 Ανατομία και Ιστολογία Τρίχας**

Η βιολογική ανάλυση και ο δομικός προσδιορισμός της τρίχας, έχουν κατανοηθεί και αποκωδικοποιηθεί από την επιστήμη κατά ένα σημαντικό ποσοστό. Στην τρίχα διακρίνουμε δύο τμήματα: το στέλεχος και τη ρίζα.

Το **στέλεχος** (shaft) είναι το ορατό μέρος, αναδύομενο από τον τριχοσηγματικό θύλακα, είναι ελεύθερο και κινητό και εκτείνεται από το σημείο που εκβάλλει ο σημματογόνος αδένας μέσα στο θύλακα, μέχρι την απόληξη του ελεύθερου άκρου της τρίχας, την κορυφή. Αποτελείται από σκληρή κερατίνη και εμφανίζει τρεις ομόκεντρες στοιβάδες κερατινοποιημένων κυττάρων που δημιουργούνται από τα μητρικά κύτταρα (matrix cells) του βολβού. (102)

1. Το περιτρίχιο ή την επιδερμίδα (cuticle) εξωτερικά, που αποτελείται από άχρωμα, επίπεδα κύτταρα σε κυματιστή διάταξη που αλληλεπικαλύπτονται όπως τα κεραμίδια της στέγης κάνοντάς την χημικά αδρανή. Το περιτρίχιο αποτελεί το πιο έντονα κερατινοποιημένο τμήμα της τρίχας, που παρέχει δύναμη και διατηρεί τη στενή επαφή ανάμεσα στις εσωτερικές στοιβάδες της, αφού περιέχει μεγάλη ποσότητα δισουλφιδικών δεσμών. (102, 106)

2. Το φλοιό (cortex) ενδιάμεσα, που περιβάλλει τον μυελό, αποτελείται από ορισμένες στοιβάδες αποπλατυσμένων κυττάρων, περιέχει χρωστική (μελανίνη), η οποία καθορίζει το χρώμα των μαλλιών και τον κυματισμό της τρίχας. Κυρίως όμως περιέχει κερατίνη(σκληρή) σε πολύ υψηλή ποσότητα, η οποία ευθύνεται για την ανάπτυξη του μεγαλύτερου τμήματος του στελέχους. (106)

3. Το μυελό (medulla) εσωτερικά, ο οποίος βρίσκεται στο κέντρο του στελέχους της τρίχας και αποτελείται από μεγάλα κύτταρα ανάμεσα στα οποία υπάρχουν μικρά κενά

με αέρα. Υπάρχει στις τρίχες που έχουν μεγάλη διάμετρο και απουσιάζει στις λεπτές τρίχες. (102) Ο μυελός της τρίχας διαφέρει από είδος σε είδος ως προς τη σύνθεση και τη δομή του. Περιέχει πρωτίστως πρωτεΐνη που περιέχει κιτρουλίνη που αποτελείται από διασταυρούμενες συνδέσεις ε-(γ-γλουταμυλ) λυσίνης. (106)

Η **ρίζα** (follicle) καταδύεται στο δέρμα με κλίση καθώς εσωκλείεται στο τριχοθυλάκιο και περιβάλλεται από διάφορα έλυτρα και όργανα. Το άκρο της ρίζας καταλήγει σε κωνοειδή διόγκωση, το βολβό (bulb), που χρησιμεύει στην διάπλαση και την ανάπτυξη της τρίχας. Στη βάση του τριχοθυλακίου εισχωρεί προσεκβολή του χορίου, που είναι γνωστή ως θηλή. Τα κύτταρα της θηλής αποτελούν βιολογικές δομές οι οποίες είναι πολύ σημαντικές για το τριχοθυλάκιο, αφού περιέχονται σε αυτά τριχοειδή αγγεία τα οποία στέλνουν θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα και σε υποδοχείς των ανδρογόνων μέσω του αίματος. Στη θηλή επίσης βρίσκονται κύτταρα συνεκτικού ιστού (fibroblasts) που διαδραματίζουν ενεργό ρόλο στον κύκλο ζωής και ανάπτυξης της τρίχας επειδή είναι υπεύθυνα για την αναπαραγωγή όλων των στιβάδων της. Η ρίζα επίσης περιβάλλεται από έναν επιθηλιακό θύλακα στον οποίο προσαρτώνται δύο όργανα ο ορθωτήρας μυς της τρίχας και ο σμηγματογόνος αδένας, τα οποία αποτελούν τον τριχοσμηγματογόνο θύλακα. (102, 107)

### **6.1.2 Χημική σύσταση των τριχών**

Η τρίχα αποτελείται από κερατίνη σε ποσοστό από 65% έως 95%, από λιπίδια σε ποσοστό 1% έως 9% και από μικρές ποσότητες νερού. Η κερατίνη ως γνωστόν αναφέρεται σε ένα σύνολο πρωτεϊνών που συντίθενται στην κερατογενή ζώνη του ωοθυλακίου, καθώς τα μητρικά κύτταρα μετακινούνται προς το στέλεχος σχηματίζοντας τα νέα στρώματα της τρίχας. Η επιδερμίδα, ο φλοιός και ο μυελός αποτελούνται κυρίως από κερατίνη, η οποία όμως διαφέρει δομικά σε κάθε στρώμα. Η κερατίνη ανάλογα με την περιεκτικότητα σε θείο χαρακτηρίζεται είτε μαλακή (χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο) είτε σκληρή (μεγάλη περιεκτικότητα σε θείο). (108) Τα κερατινοειδή υλικά κατηγοριοποιούνται ως α-κερατίνη αν αυτά παρουσιάζουν μια ελικοειδή δευτερογενή δομή ή ως β-κερατίνη αν έχουν σχήμα φύλλων. Στις τρίχες επικρατεί η α-κερατίνη. (109)

Οι κερατίνες όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι αδιάλυτες και είναι εξαιρετικά ανθεκτικές στην πέψη από τα συνηθισμένα πρωτεολυτικά ένζυμα. Η αντίσταση των κερατινών

προς την ενζυμική πέψη φαίνεται να οφείλεται στην ινώδη δομή τους που προκύπτει από την σύνδεση των πεπτιδικών αλυσίδων με καθορισμένο τρόπο στο χώρο. Εάν η οργάνωση μιας κερατίνης καταστραφεί μηχανικά ή χημικά, χάνει αυτή την αντίσταση στην ενζυμική υδρόλυση. Επίσης, στην ανθρώπινη τρίχα μπορούν να βρεθούν βασικά ιχνοστοιχεία και βαρέα μέταλλα. (110)

Το λιπιδικό υλικό που βρίσκεται στα μαλλιά προέρχεται από το σμήγμα και τις εκκρίσεις του αποκρινούς αδένα και αποτελείται από ελεύθερα λιπαρά οξέα, μόνο-, δι- και τριγλυκερίδια, υδρογονάνθρακες και αλκοόλες. Οι τρίχες περιέχουν σχετικά μεγάλες ποσότητες αμινοξέων με πλευρική αλυσίδα υδρογονανθράκων (γλυκίνη), πλευρική αλυσίδα υδροξυλίου (θρεονίνη), όξινη πλευρική ομάδα (ασπαραγινικό και γλουταμινικό οξύ), βασική πλευρική ομάδα (λυσίνη), πλευρική ομάδα υδροθειομάδας (κυστεΐνη) και με φαινολική λειτουργική ομάδα (τυροσίνη). (110)

Οι δεσμοί που σταθεροποιούν τη δομή της τρίχας είναι οι:

α) Δεσμοί υδρογόνου, μεταξύ παράλληλων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, οι οποίοι αν και είναι ασθενείς, είναι πολυάριθμοι και παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της δομής των πρωτεϊνών.

β) Δεσμοί ιοντικοί μεταξύ όξινων και βασικών πλευρικών ομάδων των γειτονικών πολυπεπτιδίων και

γ) Δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται εξαιτίας της κυστεΐνης που υπάρχει στην κερατίνη της επιδερμίδας και σταθεροποιούν την επιδερμίδα της τρίχας και δημιουργούν ένα σκληρό στρώμα με ελαστική δομή, για την προστασία του φλοιού της τρίχας από πιθανή καταστροφή. Το αμινοξύ αυτό περιέχει δύο αμινο- και δύο καρβοξυλο-ομάδες, εισέρχεται σε δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες στη συνέχεια συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. (111)

Η κερατίνη είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα αλάτων, σε ασθενή οξέα, σε ασθενείς βάσεις και σε κορεσμένα ουδέτερα διαλύματα ουρίας. Σε όξινα διαλύματα με pH 1 και 2, παρατηρείται μέτρια πλευρική διόγκωση λόγω της καταστροφής των δεσμών υδρογόνου και των ιοντικών δεσμών των πολυπεπτιδίων. Η δομή όμως παραμένει σταθερή, γιατί διατηρούνται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Σε αλκαλικά διαλύματα με pH 10 η πλευρική διόγκωση είναι έντονη για τους ίδιους λόγους και σε pH 12 οι δισουλφιδικοί

δεσμοί αρχίζουν να καταστρέφονται και η πλευρική διόγκωση γίνεται απεριόριστη με αποτέλεσμα την καταστροφή των τριχών. (110)

### **6.1.3 Δομή θύλακου τρίχας**

Ο τριχικός θύλακος παρουσιάζεται ως ένα μοναδικό και σύνθετο βιολογικό σύστημα, το οποίο είναι επιφορτισμένο με την παραγωγή της τρίχας και αποτελεί ινοεπιθλιακό σχηματισμό. Οι ώριμοι αναγενείς τριχικοί θύλακοι διακρίνονται σε οριζόντια ή ομόκεντρα τμήματα και η δομή τους σε κατακόρυφη διατομή περιλαμβάνει από πάνω προς τα κάτω: (112)

1. Τον ανώτερο θύλακο, ο οποίος περιλαμβάνει την υπεραδενική περιοχή και τον ισθμό.

#### **Υπεραδενική μοίρα**

Η υπεραδενική μοίρα του τριχικού θύλακου περιλαμβάνεται μεταξύ της επιδερμίδας και της εκβολής του σημηματογόνου αδένου στον αυλό του τριχικού θύλακου. Το επιθήλιο αυτής της μοίρας είναι συνέχεια της επιδερμίδας, η οποία μπορεί να αναγεννάται από τα κύτταρα του. Η κερατινοποίηση της μοίρας αυτής είναι παρόμοια με εκείνη της μεσοθυλακικής επιδερμίδας, που χαρακτηρίζεται από μια κοκκώδη στιβάδα κάτω από τα περάλια της κεράτινης στιβάδας. (107)

Ο αυλός στην περιοχή αυτή περιέχει υπό φυσιολογικές συνθήκες το τριχικό στέλεχος, κερατίνη, σμήγμα και ορισμένες φορές εκκρίσεις αποκρινών αδένων, λιποφίλους μύκητες, βακτήρια και *Demodex folliculorum*. Παρά το γεγονός ότι το επιθήλιο της υπεραδενικής μοίρας του τριχικού θύλακου μοιάζει μορφολογικά με εκείνο της επιδερμίδας, τα κύτταρα του φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη μιτωτική δραστηριότητα και μπορούν να συμβάλλουν στην ανανέωση της επιδερμίδας μετά την καταστροφή ή απομάκρυνση της. (107)

#### **Ισθμός**

Ο ισθμός εκτείνεται από την εκβολή του σημηματογόνου αδένου μέχρι την πρόσφυση του ανελκτήρα μύ της τρίχας. Ο εξωτερικός επιθηλιακός χιτώνας δεν εμφανίζει κοκκώδη στιβάδα και τα κύτταρα του έχουν ωχροκύτταρο πλασμα εξαιτίας της αυξημένης περιεκτικότητας σε γλυκογόνο. Στο σημείο προσφύσεως του ανελκτήρα μύ

της τρίχας, ο πλήρως κερατινοποιημένος εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας αποδιοργανώνεται και πάνω από αυτό το σημείο παρατηρείται η τριχειλατική κερατινοποίηση του αντίστοιχου εξωτερικού. (107)

Το κατώτερο τμήμα του ισθμού περιλαμβάνει την περιοχή του εξογκώματος του τριχικού θυλάκου, ο οποίος αποτελείται από έναν βιοχημικά ξεχωριστό πληθυσμό κερατινοκυττάρων που έχουν τα χαρακτηριστικά αρχέγονων επιθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται σπάνια και είναι πολυδύναμα αφού είναι σε θέση να διαφοροποιηθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους που περιλαμβάνουν τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα των σμηγματογόνων αδένων και περισσότερους από 7 διαφορετικούς τύπους επιθηλιακών κυττάρων στον κατώτερο θύλακο. Παρόλο που η περιοχή του εξογκώματος είναι κυλινδρική και συχνά αναγνωρίζεται δύσκολα στους αναγενείς τριχικούς θυλάκους των ενηλίκων καθίσταται πιο εμφανής κατά την τελογενή φάση. Η πρόσφυση του ανελκτήρα μυ προσεγγίζει την εντόπιση του εξογκώματος. (108)

2. Τον κατώτερο θύλακο που αποτελείται από μια υπερβολβική και μια βολβική μοίρα. Η περιοχή του εξογκώματος μπορεί να θεωρηθεί ως η μέση μοίρα του τριχικού θυλάκου.

### **Υπερβολβική περιοχή**

Η υπερβολβική περιοχή του θύλακα, κάτω από τον ισθμό και πάνω από τον βολβό αποτελείται από τρεις στοιβάδες, οι οποίες από έξω προς τα μέσα είναι ο εξωτερικός επιθηλιακός χιτώνας, ο εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας και το στέλεχος της τρίχας. Ο εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας αποτελείται από έξω προς τα μέσα, από τη στιβάδα του Henle, τη στιβάδα του Huxley και το περιτρίχιο που κερατινοποιούνται πλήρως.

### **Βολβός**

Ο βολβός είναι το κατώτερο τμήμα του θυλάκου, το οποίο περιβάλλει τη χοριακή θηλή. Περιέχει τα μητρικά κύτταρα, τα οποία εκτείνονται από την βάση του μέχρι το άκρο της μεγαλύτερης διαμέτρου του, γνωστή ως γραμμή Auber. Τα κερατινοκύτταρα της μήτρας πολλαπλασιάζονται ταχέως για να δημιουργήσουν το τριχικό στέλεχος, είναι σχετικά αδιαφοροποίητα με ωοειδή πυρήνα και ελάχιστο κυτταρόπλασμα και καθώς διαιρούνται και διαφοροποιούνται, σχηματίζουν κυτταρικές στήλες, από όπου προκύπτει το στέλεχος και ο εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας. (106,114)

Τα κύτταρα από τα οποία θα προκύψει το τριχικό στέλεχος εντοπίζονται στην κορυφή της χοριακής θηλής και θα σχηματίσουν το μυελό, το φλοιό και το περιτρίχιο. Πλευρικά προς αυτά βρίσκονται τα κύτταρα εκ των οποίων θα προκύψει ο εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας, η αμέσως παρακείμενη μονήρης στιβάδα θα γίνει το περιτρίχιο του εσωτερικού επιθηλιακού χιτώνα, οι επόμενες 2-4 στιβάδες θα γίνουν η στιβάδα του Huxley και η επόμενη μονήρης στιβάδα θα γίνει η στιβάδα του Henle. (113)

### 3. Την χοριακή θηλή

Στο εσωτερικό του βολβού, στην περιοχή του χορίου, προβάλλει ένα θηλόμορφο έπαρμα, η δερματική ή χοριακή θηλή. Η χοριακή θηλή, είναι ένα μόρφωμα μεσεγγυματικής προέλευσης το οποίο περιβάλλεται από το επιθήλιο της μήτρας, αποτελείται από ινοβλάστες, δεσμίδες κολλαγόνου, ένα στρώμα πλούσιο σε βλεννοπολυσακχαρίτες, νευρικές ίνες και μια μονήρη τριχοειδική αγκύλη. Βρίσκεται σε συνέχεια με την περιθυλακική ταινία του συνδετικού ιστού και περιβάλλει τον κατώτερο θύλακο. Πειράματα ιστικού ανασυνδυασμού έχουν δείξει ότι η χοριακή θηλή έχει ισχυρές επαγωγικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητας να προκαλεί σχηματισμό των τριχικών θυλάκων όταν μεταμοσχεύεται κάτω από άτριχη επιδερμίδα. (107)

Ο όγκος της χοριακής θηλής σχετίζεται με τον αριθμό των κυττάρων της μήτρας και το τελικό μέγεθος του τριχικού στελέχους. Πολλοί διαλυτοί αυξητικοί παράγοντες προέρχονται από τη χοριακή θηλή και φαίνεται να επιδρούν με παρακρινή μηχανισμό στα επιθηλιακά κύτταρα της μήτρας. Ειδικά ο αυξητικός παράγοντας των κερατοκυττάρων παράγεται από την αναγεννή χοριακή θηλή και ο υποδοχέας του απαντάται κυρίως στα κερατινοκύτταρα της μήτρας. Όταν η θηλή της τρίχας καταστραφεί από κάποιο τραυματισμό, η ανάπτυξη της τρίχας από το τριχοθυλάκιο σταματά οριστικά. (107)

Τα κύρια τμήματα του τοιχώματος του τριχικού θυλάκου από έξω προς τα μέσα κατά την επιμήκη διατομή περιλαμβάνουν:

- ✓ Το περιφερικό έλυτρο από συνδετικό ιστό (ινώδες έλυτρο), που προέρχεται από το χόριο και σχηματίζει την εξωτερική στοιβάδα του τοιχώματος του τριχοθυλακίου.
- ✓ Τη διαφανή μεμβράνη, που εντοπίζεται στη συμβολή του ινώδους ελύτρου και του επιθηλιακού ελύτρου της ρίζας και αποτελεί τη βασική μεμβράνη του επιθηλίου του τριχοθυλακίου.

- ✓ Το επιθηλιακό έλυτρο της ρίζας, το οποίο προέρχεται από την επιδερμίδα και αποτελείται από δυο στοιχεία: το εξωτερικό έλυτρο της ρίζας, ως άμεση συνέχεια της επιδερμίδας και το εσωτερικό έλυτρο της ρίζας, που προέρχεται από τα κύτταρα της μήτρας.

Τα αρχέγονα επιδερμικά κύτταρα εντοπίζονται στο εσωτερικό μιας προεξοχής στην επιφανειακή περιοχή του εξωτερικού ελύτρου της τρίχας. Από τα κύτταρα αυτά προέρχονται τα κύτταρα της μήτρας, που σχηματίζουν το στέλεχος της τρίχας καθώς και τα νέα επιδερμικά κύτταρα. (102)

#### **6.1.4 Αναγεννητικά - Αρχέγονα κύτταρα τρίχας**

Ο αρχικός βολβός σχηματίζεται από την επιμήκυνση του αρχικού θύλακα, το κατώτερο τμήμα του οποίου περιβάλλει το χοριακό πύκνωμα και σχηματίζει ένα βολβώδες μόρφωμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα μέσα σε αυτό το μόρφωμα γίνονται τα μητρικά κύτταρα του τριχικού θυλάκου από τα οποία προκύπτει το τριχικό στέλεχος και ο εσωτερικός επιθηλιακός χιτώνας. Επιπλέον λειτουργικά ενεργά μελανοκύτταρα μεταναστεύουν στις εσωτερικές στοιβάδες της μήτρας. (114)

Ο εξωτερικός επιθηλιακός χιτώνας σχηματίζει δύο εξογκώματα στην οπίσθια πλευρά του τριχικού θυλάκου. Από το επιφανειακό εξογκωμα αναπτύσσεται ο σμηγματογόνος αδένας και τα κεντρικά κύτταρα αυτού του εξογκώματος συσσωρεύουν λίπος και παράγουν σμήγμα, το οποίο καλύπτει το έμβρυο. Το κατώτερο τμήμα του εξογκώματος σχηματίζει την θέση προσφύσεως του ανελκήρα μυ της τρίχας και σε αυτό ακριβώς το εξογκωμα, εντοπίζονται επιθηλιακά αρχέγονα κύτταρα, τα οποία μπορούν να παράγουν τον κατώτερο θύλακο, την επιδερμίδα και τον σμηγματογόνο αδένα. (115)

Ένα τρίτο εξογκωμα μπορεί να αναπτυχθεί στο οπίσθιο τμήμα του τριχικού θυλάκου, επιφανειακά, πάνω από το εξογκωμα του σμηγματογόνου αδένα από το οποίο θα δημιουργηθεί ο αποκρινής αδένας. Στις περισσότερες περιοχές το τρίτο εξογκωμα υποστρέφει, αλλά ώριμοι αποκρινείς αδένες ανευρίσκονται στην περιγεννητική περιοχή, στις μασχालιαίες κοιλότητες, στην περιθηλαία άλω, στην περιομφαλική χώρα, στις βλεφαρίδες και στους εξωτερικούς ακουστικούς πόρους. (115)

Ο κεντρικός αυλός μέσα στον οποίο θα εκτείνεται το στέλεχος της τρίχας σχηματίζεται από την νέκρωση και την κερατινοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων στην

υπεραδενική μοίρα του τριχικού θυλάκου. Παράλληλα με τον σχηματισμό του τριχικού στελέχους παρατηρείται διαφοροποίηση των εξογκωμάτων στην αρχική καταβολή του βολβού της τρίχας και ο σχηματισμός ενός πλήρως ανεπτυγμένου τριχικού θυλάκου. Αυτή η διεργασία του σχηματισμού του τριχικού θυλάκου επαναλαμβάνεται κατά κύματα με τη δημιουργία δευτερογενών θυλάκων παραπλεύρως του αρχικού. Στο τριχωτό της κεφαλής οι θύλακοι συρρέουν σε ομάδες των 3-6 και περιβάλλονται από μια ταινία περιθυλακικού συνδετικού ιστού, η οποία αποτελείται από μικρές δέσμες κολλαγόνου. (114)

## **6.2 Διαδερμική απορρόφηση**

Το ανθρώπινο δέρμα, όπου ουσιαστικά πρόκειται για μια βιολογική μεμβράνη, αποτελεί το πιο σημαντικό όργανο που έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον, με κύριο σκοπό την προστασία από την είσοδο στον οργανισμό ξеноβιοτικών ουσιών. Η μεγαλύτερη αντίσταση που καθορίζει την κινητική της απορρόφησης ουσιών από το δέρμα, είναι η διαπέραση της κεράτινης στιβάδας. Με τον όρο ημιπερατότητα της επιδερμίδας υποδηλώνεται η διέλευση μιας ουσίας μέσω της επιδερμίδας στο κυρίως δέρμα και η είσοδος της στην κυκλοφορία με συνέπεια την εκδήλωση τοπικών ή γενικότερων φαινομένων. Αρχικά τα μόρια της ουσίας θα πρέπει να εφαρμοστούν στην επιφάνεια της κεράτινης στιβάδας και ακολούθως να διαχυθούν μέσω αυτής στις επόμενες περιοχές διαβάσεως. (115)

Αν και αρκετά αποτελεσματικός, ο φραγμός του δέρματος δεν είναι τέλειος, επιτρέποντας έτσι σε μεγάλο αριθμό ενώσεων να έρθει σε επαφή με τον οργανισμό. Η διαπερατότητα του δέρματος και των υπολοίπων βιολογικών μεμβρανών, θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης. Παθητική διάχυση είναι η διαδικασία μεταφοράς μάζας από μία περιοχή ενός συστήματος σε μία άλλη εξαιτίας αυθόρμητης μοριακής κίνησης. (117)

### **6.2.1 Οδοί διέλευσης ουσιών στο δέρμα**

Οι διάφορες ουσίες ανάλογα με το είδος τους, διεισδύουν στο δέρμα διαμέσου διαφορετικών οδών όπως περιγράφονται παρακάτω.



1. Η διακυττάρια ή ενδοκυττάρια οδός (intracellular or transcellular route). Η διείσδυση των ουσιών γίνεται διαμέσου των κερατινοκυττάρων και των λιπιδικών περιοχών που παρεμβάλλονται. Η αντίσταση που προβάλλουν οι μεμβράνες των κυττάρων θεωρείται αμελητέα και συνεισφέρει ένα πολύ μικρό ποσοστό στη συνολική μεταφορά των ουσιών διαμέσου της κεράτινης στιβάδας. Ο φυσικός φραγμός της διακυττάριας οδού είναι η λιπιδική μήτρα των μεμβρανών. (118)

2. Η παρακυττάρια ή εξωκυττάρια οδός (intercellular or paracellular or extracellular route). Η παρακυττάρια οδός αν και αποτελεί ένα αρκετά περίπλοκο μονοπάτι, θεωρείται ότι είναι η κύρια διαδρομή διείσδυσης ουσιών στο δέρμα και πραγματοποιείται διαμέσου των λιπιδικών στοιβάδων που βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων (μεσοκυττάρια ουσία), επιτρέποντας τη διαπέραση υδρόφιλων ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, ιόντων και λιπόφιλων μορίων. Η παρακυττάρια διαδρομή αποδίδει πολύ ταχύτερη απορρόφηση λόγω του υψηλού συντελεστή διάχυσης των περισσότερων ουσιών. Ο φυσικός φραγμός της παρακυττάριας οδού είναι οι ενδοκυτταρικές συνδέσεις. (118)

3. Τα εξαρτήματα του δέρματος (transappendageal route). Στην απορρόφηση ουσιών από το δέρμα, συμβάλλουν, σε μικρότερο βαθμό, τα εξαρτήματα του δέρματος όπως τα τριχοθυλάκια με τους σμηγματογόνους αδένες και οι ιδρωτοποιοί αδένες. Η διείσδυση στον οργανισμό ουσιών με αυτόν το τρόπο, είναι σημαντική στην περίπτωση ιονικών ή μεγάλων πολικών μορίων. (119,120)

4. Οι μηχανικές μέθοδοι απομάκρυνσης της κεράτινης στιβάδας και αύξησης της διαδερμικής απορρόφησης. (121)

Ωστόσο και για τις δύο πρώτες οδούς διαπέρασης, με βάση τη δομή της κεράτινης στιβάδας, οι ουσίες θα πρέπει να διαχυθούν διαμέσου των λιπιδικών περιοχών μεταξύ των κερατινοκυττάρων. Το σημείο αυτό θεωρείται ότι αποτελεί τον σπουδαιότερο παράγοντα που ρυθμίζει την διαπέραση από το δέρμα. Τέλος, χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μηχανισμών για την ενίσχυση της διαδερμικής διείσδυσης, όπως χρήση επιταχυντών διαβατότητας, ιοντοφόρησης, μικροβελονών, υπερήχων και ηλεκτροδιάτρησης. (121)

Η οδός διέλευσης μιας ουσίας, καθώς και οι μηχανισμοί διείσδυσης εξαρτώνται από το μέγεθος του μορίου (Μοριακό Βάρος), από την κατάσταση της ουσίας (αέρια, υγρή,

στερεή) και από τον λιπόφιλο, υδρόφιλο ή αμφίφιλο χαρακτήρα της. Ειδικότερα, τα μεσοκυττάρια διαστήματα θεωρούνται σημαντικές οδοί διέλευσης των λιποδιαλυτών ουσιών, κυρίως δια μέσου της μεσοκυττάριας ουσίας που είναι πλούσια σε λιποειδή. Οι ηλεκτρολύτες και τα πολικά μόρια διαπερνούν την κεράτινη στιβάδα μέσου των εξαρτημάτων του δέρματος παρακάμπτοντας την λειτουργία φραγμού. Στη συνολική διαδερμική απορρόφηση μιας ουσίας μπορούν να συνεισφέρουν ταυτόχρονα διαφορετικοί μηχανισμοί. Η κεράτινη στιβάδα ενεργεί ως φραγμός διαπέρασης ενδογενών και εξωγενών ουσιών και ως εκ τούτου, αποτελεί το καθοριστικό βήμα της κινητικής της διαδερμικής απορρόφησης μορίων. (120)

Γενικά ισχύει ότι οι ουσίες διαπερνούν ευκολότερα το δέρμα όταν βρίσκονται στη μη ιονισμένη μορφή τους. Αρχικά τα μόρια της εισαγομένης ουσίας, αφού περάσουν το δερματοεπιδερμικό φραγμό προσλαμβάνονται από την ζώσα επιδερμίδα όπου εκεί η αντίσταση τους είναι ασήμαντη. Κατά την παραμονή τους στη ζώσα επιδερμίδα οι ξενοβιοτικές ουσίες μπορεί να υποστούν βιομετατροπή που καθορίζεται κυρίως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της εκάστοτε ουσίας και οφείλεται στα ένζυμα της επιδερμίδας. (122)

Στη συνέχεια ακολουθεί η διάχυσή τους στο θηλώδες τμήμα του χορίου, όπου σχηματίζει το κατώτερο όριο του στρώματος, που πρέπει να διαβεί μια ουσία και λόγω της μεγάλης διαβατότητας του, τα μόρια της ουσίας φτάνουν στο αγγειακό δίκτυο. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η αιματική ροή είναι επαρκής και η διαβατότητα στα τριχοειδή αρκετά υψηλή, ώστε οι διαβαίνουσες ουσίες να εισάγονται γρήγορα στην κυκλοφορία μόλις φτάσουν στο χόριο. (122)

### **6.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση**

Αν εξαιρέσουμε τις καθαρά φυσικές αλληλεπιδράσεις, οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση των μορίων, διακρίνονται στους:

#### **✓ Κατάσταση του δέρματος**

Η ουσία μπορεί να διεισδύει καλύτερα ή χειρότερα στην ίδια δερματική περιοχή, ανάλογα με το επίπεδο της υδάτωσης και την θερμοκρασία της κεράτινης στιβάδας. Η κυκλοφορία του αίματος, ο μεταβολισμός από το δέρμα, η ηλικία αλλά και η ψυχική διάθεση επηρεάζουν την διαδερμική απορρόφηση της ουσίας. (122)

### ✓ **Συνθήκες εφαρμογής του καλλυντικού**

Ορισμένοι παράμετροι, όπως είναι η περιοχή, ο τρόπος και η συχνότητα εφαρμογής του προϊόντος στο δέρμα, επιδρούν στην διαδερμική απορρόφηση των δραστικών του ουσιών. Η μάλαξη, η απολέπιση, ο καθαρισμός του μανδύα, η μάσκα και η ιοντοφόρηση αυξάνουν την διαβατότητα του δέρματος. Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι καθαρά ενεργειακοί τρόποι, όπως η αρωματοθεραπεία και η μουσικοθεραπεία, αυξάνουν κατά πολύ την διείσδυση.

### ✓ **Σύσταση του καλλυντικού**

Ο φορέας της ουσίας, δηλαδή η σύσταση του καλλυντικού, επηρεάζει αισθητά την διείσδυση της δραστικής ουσίας μεταβάλλοντας τον ρυθμό απελευθέρωσης και την βιοδιαθεσιμότητα αυτής και/ή τροποποιώντας την δομή της κεράτινης στιβάδας. Σε αυτό το σημείο βρίσκεται η διαφορά ανάμεσα σε δύο νέα προϊόντα που έχουν την ίδια ποσότητα της ίδιας δραστικής ουσίας, αλλά με διαφορετική σύνθεση. Η όλη σύνθεση του καλλυντικού πρέπει να διευκολύνει τη συγκεκριμένη δραστική ουσία να έρθει κατ' αρχήν σε επαφή με το δέρμα (δηλαδή πρέπει να έχει άμεση συνάφεια με τα συστατικά του μανδύα) αλλά και να συντελεί στην διείσδυση αυτής στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας κατά τρόπο μη ερεθιστικό. Δεδομένου ότι για το τελικό αποτέλεσμα της διαβατότητας, εκτός από την συγκέντρωση της ουσίας στο καλλυντικό ή το φάρμακο φορέα, σημαντικό ρόλο παίζει και η συγγένεια του εκδόχου προς την ουσία. (122)

### ✓ **Φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας**

Ο τελευταίος και πιο καθοριστικός από τους πολλούς παράγοντες της διείσδυσης είναι η χημική δομή της ουσίας και συγκεκριμένα η κατάσταση της ουσίας (αέρια, υγρή, στερεά), το Μοριακό Βάρος της, ο συντελεστής κατανομής ελαίου/ύδατος και η πολικότητα της ουσίας. (122)

## **6.3 Διαδικασία εφαρμογής ενζυμικής αποτρίχωσης**

### **6.3.1 Ιοντοφόρηση**

Η ιοντοφόρηση είναι η εισαγωγή ουσιών υπό μορφή ιόντων στο δέρμα με την βοήθεια του συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος (γαλβανικό) και με ρυθμιζόμενη ένταση. Η ιοντοφόρηση βασίζεται στην ιδιότητα των ιόντων που βρίσκονται σε ηλεκτρικό πεδίο,

να μετακινούνται προς τους ετερόνυμους πόλους της ηλεκτρικής πηγής. Σύμφωνα με την ιδιότητα που έχουν τα μόρια νερού να φορτίζονται θετικά, απωθούνται από το θετικό ηλεκτρόδιο και κατευθύνονται προς το αρνητικό, μέσω του σώματος του ατόμου, συμπαρασύροντας τα ιόντα ή τα μόρια της ένωσης που βρίσκεται στο διάλυμα, λόγω του φαινομένου της ηλεκτροενδοσμώσεως. (120,121)

Την κύρια συνεισφορά στο φαινόμενο την έχει η συνιστώσα διάδοσης που οφείλεται στην ηλεκτρική δύναμη που θα ασκηθεί στα ιόντα της ουσίας. Η ενίσχυση της παθητικής διάχυσης επιτυγχάνεται δημιουργώντας ηλεκτρικό πεδίο, με τη χρήση δύο ηλεκτροδίων στα οποία εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρόδιο κάτω από το οποίο βάζουμε την ουσία ονομάζουμε ενεργό και δημιουργώντας ηλεκτρικό πεδίο με ηλεκτρική δύναμη, ωθεί τα ιόντα της ουσίας δυνητικά προς τα μέσα στο δεύτερο ηλεκτρόδιο. Για να ασκηθεί ηλεκτρική δύναμη στην ουσία πρέπει να έχει σπάσει σε θετικά και αρνητικά φορτισμένα ιόντα. (123) Με την ιοντοφόρηση η ενέργεια είναι τοπική, γρήγορη και υπάρχει η δυνατότητα να διοχετευθεί και αποθηκευτεί στην περιοχή που επιθυμούμε μεγάλη ποσότητα προϊόντος. (125)

Κατά την τοποθέτηση του θετικού πόλου μιας ηλεκτρικής πηγής στο δέρμα, το νερό που βρίσκεται σε επαφή με αυτό, αποκτά πολικότητα (φορτίζεται θετικά), απωθείται από το θετικό πόλο της πηγής και εισέρχεται στο δέρμα οδεύοντας προς τον αρνητικό πόλο που έχει τοποθετηθεί σε αντίθετη θέση. Όταν τα μόρια του νερού εισχωρήσουν στο δέρμα, παρασύρουν μαζί τους ιόντα ή/και μόρια της ουσίας που είχαν διαλυθεί στο νερό. Ο τρόπος αυτός είναι η βασική διαδικασία εισαγωγής θεραπευτικών ουσιών στον οργανισμό, ενώ δευτερευόντως εισέρχονται και τα κατιόντα, τα οποία υπάρχουν στο διάλυμα. Η ποσότητα των υγρών που μπορούν να μεταφερθούν με την ηλεκτροενδόσμωση εξαρτάται από την ένταση του ρεύματος, την διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη και το ιξώδες του διαλύματος, από την ειδική ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος, το μέγεθος της διαφοράς δυναμικού μεταξύ ακίνητων και κινητών τμημάτων της ηλεκτρικής διπλοστιβάδας και τον χρόνο εφαρμογής. (126)

Σπουδαίο ρόλο στην ιοντοφόρηση παίζουν οι θύλακες των τριχών, οι ιδρωτοποιοί και οι σμηγματογόνοι αδένες, που το εσωτερικό τους τοίχωμα φορτίζεται αρνητικά σε σχέση με τα μόρια του νερού που ακουμπούν στα εσωτερικά τοιχώματα των εξαρτημάτων του δέρματος. Κατά την πρακτική εφαρμογή της ιοντοφόρησης υπάρχει κίνδυνος δημιουργίας εγκαυμάτων, λόγω του έντονου αλκαλικού περιβάλλοντος που

σχηματίζεται στην κάθοδο. Τοπικά στην θέση επαφής των δύο πόλων συμβαίνουν τα φαινόμενα που αναφέρονται στον Πίνακα 6.1. (126)

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

Πίνακας 6.1 Αντιδράσεις ανάλογα με την πολικότητα του δέρματος (126)

Το βάθος διείσδυσης των ιόντων στους ιστούς θεωρείται ότι θα είναι μικρότερο από 1mm δημιουργώντας ένα «απόθεμα» μορίων, το οποίο μέσω φυσιολογικών μηχανισμών του οργανισμού θα διαχυθεί σε γειτονικές περιοχές. Οποιαδήποτε βαθύτερη παρουσία της ουσίας θεωρείται ότι οφείλεται στην διάχυσή της μέσω του εξωκυττάριου υγρού ή στην είσοδο της στο κυκλοφορικό σύστημα. Η εξάπλωση της ουσίας πέρα από την περιοχή στην οποία τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο και όπου δημιουργήθηκε το παραπάνω απόθεμα μπορεί να είναι θεμιτή ή όχι, αναλόγως αν η θεραπεία γίνεται τοπικά ή συστηματικά. (120)

Συμπερασματικά, η ιοντοφόρηση διενεργεί την διαδερμική χορήγηση μιας ουσίας μέσω τριών μηχανισμών:

- Την ηλεκτρική δύναμη που ασκείται στα φορτισμένα ιόντα λόγω του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου.
- Την παθητική διάχυση, δηλαδή μεταφορά ουσίας και διαλύτη λόγω διαφορετικών περιεκτικότητων των ουσιών έξω και μέσα από το δέρμα.
- Η ροή του διαλύτη λόγω των προηγούμενων φαινομένων μπορεί με μικρή πιθανότητα να παρασύρει την δραστική ουσία. (125)

### **6.3.2 Στάδια εφαρμογής ενζυμικής αποτρίχωσης**

Η αποτρίχωση που γίνεται με την είσοδο κατάλληλων ενζύμων σε πρόσφατα αποτριχωμένους τριχικούς θύλακες, είναι γνωστή ως βιολογική ή ενζυμική αποτρίχωση. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην ενζυμική αποτρίχωση, ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεολυτικών ενζύμων και είναι η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η παπαΐνη και η εισχώρησή τους γίνεται με ιοντοφόρηση. Η δράση τους βασίζεται στην επίδραση των ενζύμων στα αναγεννητικά κύτταρα της τρίχας στα οποία προκαλούν διάλυση των πεπτιδικών δεσμών τους, αφού πρωτεολύονται οι πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην διασύνδεσή τους. Με την διάσπαση αυτών των δεσμών, των πρωτεϊνών που βρίσκονται στη θηλή της τρίχας, αδρανοποιούνται τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό, την ανάπτυξη και τη θρέψη της τρίχας. (126) Η μέθοδος αυτή απαιτεί μια διαδικασία που διακρίνεται στα παρακάτω στάδια:

Στο **πρώτο στάδιο** εφαρμόζεται η μέθοδος της αποτρίχωσης, με τη χρήση ενός κεριού θερμού τύπου. Αρχικά απομακρύνεται το μακιγιάζ και καθαρίζεται προσεκτικά με τη χρήση αντισηπτικού προϊόντος που απομακρύνει λίπη, βακτηρίδια και ιδρώτα και προετοιμάζεται για την τοποθέτηση του κεριού, αφού ελεγχθεί η θερμοκρασία του. Ο έλεγχος γίνεται συνήθως με τοποθέτηση μικρής ποσότητας κεριού στην εσωτερική πλευρά του καρπού του. (126)

Τα κεριά θερμού τύπου είναι αποτριχωτικά προϊόντα που σε συνθήκες περιβάλλοντος βρίσκονται σε στερεή μορφή και για να χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται σε χαμηλή θερμοκρασία, μέχρι να γίνουν παχύρρευστα. Η θέρμανσή τους γίνεται με τη χρήση ειδικών ηλεκτρικών συσκευών, που ονομάζονται κάδοι θερμού κεριού ή κεριέρες και παρέχουν τη δυνατότητα διατήρησής της θερμοκρασίας σε σταθερά επίπεδα, χωρίς να καταστρέφουν τις κολλητικές ιδιότητες του κεριού. Χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό συγκόλλησης στη δομή της τρίχας, ενώ προσκολλώνται ελάχιστα στην επιφάνεια του δέρματος και η διείδυσή τους στους δερματικούς πόρους και στις μικρές εγκοπές της επιδερμίδας, είναι μηδαμινή. (126,127)

Η σύνθεσή τους βασίζεται στο κεριό μέλισσας, στο κολοφώνιο και στην προσθήκη παραφίνης, βαζελίνης ή λανολίνης, οι οποίες παρέχουν στο σκεύασμα την απαραίτητη ευλυγισία για την εφαρμογή τους. Επίσης άλλα συστατικά που προστίθενται είναι άρωμα και ίσως καμφορά, που προσδίδει αίσθηση δροσιάς, (127) Μετά την αφαίρεση των τριχών, τα τυχόν υπολείμματα του κεριού στο δέρμα, αφαιρούνται με τη χρήση

ειδικών προϊόντων σε μορφή λαδιού. Η αποτρίχωση γίνεται σταδιακά, σε μικρά τμήματα, ώστε να είναι δυνατή η εκμετάλλευση της ιδιότητας των θερμών κεριών, να λειτουργούν σαν ζεστά επιθέματα, στην περιοχή που εφαρμόζονται. (126)

Στο **δεύτερο στάδιο** γίνεται η εφαρμογή του ενζύμου με απλή τοποθέτηση στο δέρμα ή με τη χρήση γαλβανικού ρεύματος, όπου οι συνθήκες της ιοντοφόρησης καθορίζονται από το κάθε επιλεγμένο προϊόν. Στην πρόσφατα αποτριχωμένη περιοχή, οι πιθανότητες διείσδυσης των ενζύμων, αυξάνονται, καθώς οι τριχικοί θύλακες αποτελούν το κανάλι μεταφοράς των προϊόντων αυτών από έξω προς τα μέσα. Το προϊόν αυτό στοχεύει στον εκφυλισμό του τριχικού θύλακα, με αποτέλεσμα την σταδιακή εξαφάνιση των ανεπιθύμητων τριχών. (126)

Επίσης, απαιτείται προσοχή στο χρόνο εφαρμογής του ηλεκτρικού ρεύματος γιατί μπορεί η παρατεταμένη του χρήση να προκαλέσει παρενέργειες (π.χ. ηλεκτρολυτικά εγκαύματα) και στις εντάσεις του ρεύματος που χρησιμοποιούνται, οι οποίες θα πρέπει να είναι μικρές (0.5-2 mA). Πριν από κάθε συνεδρία απομακρύνουμε τα μεταλλικά αντικείμενα τόσο από το άτομο που δέχεται την περιποίηση, όσο και από την αισθητικό, γιατί δημιουργούν ανομοιομορφίες στο ηλεκτρικό πεδίο με αποτέλεσμα η πυκνότητα του ρεύματος στο σημείο εκείνο να είναι πολύ μεγαλύτερη και να ενοχληθεί το άτομο. (126)

Το προϊόν για ιονισμό είναι σε υγρή μορφή, απλώνεται στο πρόσωπο με απαλές κινήσεις ή ελαφρύ μασάζ. Η εφαρμογή του ρεύματος είναι 3'-5' και η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος εξαρτάται από την αντίσταση του δέρματος. Έτσι αν η επιδερμίδα είναι λεπτή υπάρχει μικρότερη αντίσταση. Αποφεύγεται η χρήση ρεύματος σε περιοχές τραυματισμένες ή σε άτομα που έχουν πάρει αγγειοδιασταλτικά φάρμακα η επαφή των ηλεκτροδίων, γιατί δημιουργείται δυσάρεστο συναίσθημα. Στην αρχή το προϊόν ιονίζεται αμέσως, όσο όμως περνά η ώρα ιονίζεται όλο και δυσκολότερα. (127)

Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην ενζυμική αποτρίχωση, ανάλογα με την εταιρία παρασκευής, μπορεί να διατίθενται σε μορφή ορού (αμπούλας) ή λοσιόν ή κρέμας αλλά και συνδυασμένες οι παραπάνω μορφές σε μια συσκευασία. Επίσης ο χρόνος εφαρμογής τους και η πολικότητά τους δίνονται από την κατασκευάστρια εταιρεία. Τη διείσδυση του ενζυμικού προϊόντος, ακολουθεί επάλειψη της αποτριχωμένης περιοχής με σκευάσματα τα οποία συνήθως περιέχουν υπεροξείδιο του υδρογόνου, που έχει

απολυμαντική δράση, ουρία που δρα ως κερατολυτικό και βιταμίνες Α και Ε, που επιδρούν θετικά όσον αφορά τον μεταβολισμό των επιθηλιακών κυττάρων. (126)

Μετά την εφαρμογή της αποτρίχωσης συνιστάται η χρήση προϊόντος με καταπραϋντικές και ενυδατικές ιδιότητες ή μια κρέμα με ήπια αντισηπτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Σε περιπτώσεις όπου ακολουθεί έκθεση στον ήλιο, επιβάλλεται το δέρμα να προστατεύεται με τη χρήση αντηλιακού. Τέλος συστήνεται συμπληρωματικό προϊόν για το σπίτι, όπου η καθημερινή εφαρμογή του στις περιοχές που αποτριχώθηκαν, βοηθάει στο σταδιακό εκφυλισμό των τριχικών θυλάκων τοπικά. Τα προϊόντα που διατίθενται για τέτοιου είδους περιποιήσεις, κυκλοφορούν σε πολλές παραλλαγές, ανάλογα με την παρασκευάστρια εταιρία. (126)

Η ιοντοφόρηση των ενζύμων πρέπει να γίνει 4 φορές για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποιο αποτέλεσμα, αλλιώς το τρίχωμα παραμένει το ίδιο. Στο χνοώδες τρίχωμα η ιοντοφόρηση έχει αμέσως αποτέλεσμα και σε περίπτωση που δεν απομακρυνθούν οι τελογενείς τρίχες, θα μετατραπούν σε χνοώδες τρίχωμα. Εφαρμόζεται 4' σε ένταση 2mA (2' για κάθε ένζυμο) και τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το αίτιο που προκαλεί την υπερτρίχωση, από την ύπαρξη ή όχι ορμονικού προβλήματος και από το γεγονός αν το τρίχωμα έχει πειραχθεί ή όχι σε παλαιότερο χρόνο. (126)

Επιπλέον η μέθοδος της ενζυμικής αποτρίχωσης μπορεί να συνδυαστεί με θερμόλυση, ηλεκτρόλυση, μέθοδο blend και Laser με άριστα αποτελέσματα. Στην περίπτωση του Laser η ενζυμική αποτρίχωση χρησιμοποιείται μόλις πέσουν οι τρίχες, για να μπορέσουμε να έχουμε εισχώρηση των ενζύμων. Στην ηλεκτρική αποτρίχωση με βελόνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά, αφού βέβαια το δέρμα δεν έχει παρουσιάσει ερεθισμό από τη χρήση της βελόνας και τον τρόπο επιλογής του ρεύματος. (126)

### **6.3.3 Δράση ενζύμων**

Η τρίχα είναι αγκυστρωμένη μέσα σε ένα εξωτερικό περίβλημα ρίζας (ORS) που μπορεί να αφαιρεθεί γενετικά με αποτέλεσμα την απώλεια της από το θύλακα. Στους ανθρώπους, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν την παρουσία συγκεκριμένων ενζύμων μέσα ή γύρω από την ρίζα, οι οποίοι μπορεί να διαδραματίζουν ρόλο στη διατήρηση της και μεταξύ του ωοθυλάκιου και του περιβάλλοντος επιθηλιακού σάκου, υπάρχει μια αφθονία δεσμοσωμικών συμπλεγμάτων. (128)



Τα δεδομένα από τις δοκιμασίες ενζύμων υποδηλώνουν την παρουσία πρωτεάσης στην περιοχή που περιβάλλει τις όψιμες ρίζες των τριχών. Οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αποκόλληση της ρίζας μειώνουν την αγκύστρωση στο ωοθυλάκιο. Τα δεσμοσώματα στο δέρμα έχει αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην κυτταρική συνοχή στην κεράτινη στιβάδα και μπορεί επίσης να εμπλέκονται στην αγκύρωση της τρίχας. Η δεσμογλεΐνη 3 (Dsg3) είναι μια δεσμοσωμική διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται και συναρμολογείται σε δεσμοσώματα στα κερατινοκύτταρα. (128)

Αν και δεν είναι σαφής ο ρόλος των πρωτεασών σε αυτήν την περιοχή, προσδιορίστηκαν τα αντιγόνα στις πρωτεάσες σερίνης (συγκεκριμένα KLK5, KLK7 και KLK14) που υπήρχαν μέσα και γύρω από το τριχοθυλάκιο. Οι KLK5, KLK7 και KLK14 συμμετέχουν στον πρωτεολυτικό καταρράκτη στο δέρμα και διάφορες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία πρωτεΐνης και έκφρασης mRNA των καλλικρεϊνών στους θύλακες των τριχών. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία, βρέθηκε έκφραση τους σε τελογενείς τρίχες ανθρώπινου τριχωτού της κεφαλής. Αυτά τα ευρήματα σχετικά με τα μοτίβα έκφρασης των τριών KLKs υποδηλώνουν ότι μπορεί να παίζουν ρόλο στη βιολογία των τριχοθυλακίων κατά τη διάρκεια των τελογενούς φάσης. Διάφορες πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων της σερίνης, της κυστεΐνης και των ασπαρτικών έχουν εντοπιστεί στην κεράτινη στιβάδα και έχει προταθεί ότι παίζουν ρόλο στην απολέπιση και πιθανόν και στην απελευθέρωση της τρίχας από το θύλακα. (128)

Η δράση των ενζύμων συνίσταται στην αύξηση της ταχύτητας μιας αντίδρασης, χωρίς να μετατοπίζουν τη θέση της χημικής ισορροπίας και να ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Η ενζυμική δράση εξαρτάται επίσης από τη θερμοκρασία, το χημικό περιβάλλον και από τη συγκέντρωση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του. Τα ένζυμα δρουν μέσω της εκλεκτικής καταστροφής των αναγεννητικών κυττάρων της τρίχας και όχι στέρεων δομών, όπως της κερατίνης. Η δράση τους αφορά την πρωτεόλυση των κυτταρικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες στην αύξηση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά και στη διατήρησή τους στη ζωή. (126)

Ακόμη είναι πιθανή η καταστροφή και άλλων ουσιών πρωτεϊνικής φύσης που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και με τον τριχικό θύλακα. Ο βαθμός δράσης των ενζύμων εξαρτάται από τον χρόνο ιοντοφόρησης

τους. Ιοντοφόρηση ενός λεπτού, οδηγεί σε ασθενείς βλάβες, ενώ, ιοντοφόρηση δύο λεπτών, προκαλεί ιστολογικές αλλοιώσεις. Η δράση των ενζύμων εξαρτάται από: (126)

- ✓ Από τη συγκέντρωση των ενζύμων που φθάνουν στον ιστό-στόχο και αυτό εξαρτάται από την ευκολία που έχει το ένζυμο να φτάσει στο χώρο αυτό, αφού μέσα στον εκφορητικό πόρο γίνεται ευκολότερη διάβαση των ουσιών, λόγω του ότι ο πόρος έχει άμεση δίοδο προς τον εξωτερικό χώρο.
- ✓ Από τη φύση των πρωτεϊνών που υφίστανται πρωτεόλυση (π.χ. η κερατίνη είναι ανθεκτική).
- ✓ Από την ποσότητα της πρωτεΐνης. Μπορεί η πρωτεΐνη να είναι ευαίσθητη στην υδρόλυση αλλά να υπάρχει σε πολύ μεγάλες ποσότητες ώστε να μην έχουμε πλήρη αποικοδόμησή της. (126)

#### **6.3.4 Ενδείξεις – Αντενδείξεις**

##### **1. Ενδείξεις για την εφαρμογή της μεθόδου**

Οι τρίχες επανεμφανίζονται αρχικά περίπου στις 20 ημέρες, αλλά όσο θα επαναλαμβάνονται οι εφαρμογές, η τρίχα θα αποδυναμώνεται και η τριχοφυΐα θα μειώνεται σημαντικά. Δεν είναι τόσο ακριβή σε σχέση με τις μεθόδους μόνιμης αποτρίχωσης, ο ερεθισμός που προκαλείται είναι προσωρινός και ελαχιστοποιείται η πιθανότητα για εμφάνιση θυλακίτιδας. Χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων τριχών και τη σταδιακή μείωση του τριχώματος με καλύτερα αποτελέσματα στο χνοώδες τρίχωμα. Είναι μια καλή λύση για περιοχές με λεπτό τρίχωμα, στο πρόσωπο, την κοιλιά, την οσφυϊκή χώρα και τα χέρια, ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλο το σώμα. Οι τρίχες στις ορμονοεξαρτώμενες περιοχές (π.χ. πρόσωπο, λαιμός, στήθος, μέση, κοιλιά και λιγότερο στα χέρια) μπορούν να απομακρυνθούν χωρίς να επιδεινωθεί η τριχοφυΐα. (126)

##### **2. Αντενδείξεις για την εφαρμογή της μεθόδου**

Είναι επώδυνη στην πρώτη φάση της (όπου οι τρίχες αφαιρούνται με το κερί), ειδικά στο άνω χείλος, αλλά μειώνεται σταδιακά με τη συνεχόμενη επανάληψη σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στην έντονη τριχοφυΐα δεν επιτυγχάνει οριστική εξάλειψη των τριχών. Αντενδείκνυται σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη εκτός αν υπάρξει σύμφωνη γνώμη ιατρού, επειδή το δέρμα των διαβητικών χάνει την υγρασία του, εμφανίζει μικρή

αναγεννητική ικανότητα και αυτιάται δύσκολα. Σαν συνέπεια η αποτρίχωση με κερί δεν συνιστάται επειδή μπορεί να επιδεινώσει την κατάσταση του δέρματος.

Το κερί θερμού τύπου όταν εφαρμόζεται στο δέρμα, έχει υψηλή θερμοκρασία και επομένως λειτουργεί σαν ζεστό επίθεμα. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο πρέπει να αποφεύγεται η χρησιμοποίηση του σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαγορεύονται τα ζεστά επιθέματα και συνήθως αφορούν ευρυαγγείες, φλεβίτιδες, κιρσούς και γενικότερα κυκλοφορικά προβλήματα των κάτω άκρων. (126) Σε σχέση με την χρήση του γαλβανικού ρεύματος, οι κυριότερες αντενδείξεις του ιονισμού είναι:

- i. Μεταλλικά προθέματα που μπορεί να συγκεντρώσουν το ρεύμα πάνω τους με κίνδυνο να προκληθεί έγκαυμα. Τα σφραγίσματα και οι μεταλλικές γέφυρες συνήθως δεν δημιουργούν τέτοια προβλήματα, αλλά δημιουργούν αίσθηση έντονης μεταλλικής γεύσης στο στόμα και η ύπαρξή τους πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Ακόμη είναι απαραίτητη η αφαίρεση των μεταλλικών κοσμημάτων από την περιοχή εφαρμογής γαλβανικού ρεύματος.
- ii. Περιοχές με δερματικές βλάβες ή αλλοιώσεις αποτελούν αντένδειξη στην τοποθέτηση των ηλεκτροδίων επάνω τους.
- iii. Αλλεργικές αντιδράσεις που μπορεί να προκληθούν αν το άτομο είναι αλλεργικό σε κάποια από τις ουσίες που ιοντοφορούνται.
- iv. Ευρυαγγείες και ευαίσθητα δέρματα.
- v. Ιστορικό επιληψίας ή υπερβολικής νευρικότητας του ατόμου, όπου μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό των αισθητικών νεύρων (τσιμπήματα). (126)

#### **6.4 Μελέτες δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων στην αποτρίχωση**

Η βάση για την ανάπτυξη της ενζυμικής αποτρίχωσης στον άνθρωπο αποτέλεσαν πειραματικές μελέτες όπου εξετάστηκε η δράση των θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και παπαΐνη *in vivo* στο δέρμα ινδικών χοιριδίων και *in vitro* σε τεμάχια δέρματος, όσο και μελέτες σε δέρμα διαγονιδιακών ποντικών. Αυτές μελέτες αναφέρονται λεπτομερέστατα και αποτέλεσαν πρότυπο ερευνητικής δραστηριότητας. (126)

#### **6.4.1 Πειραματικές μελέτες στο δέρμα πειραματόζων**

Συστηματική μελέτη των επιδράσεων των ενζύμων στο θύλακα της τρίχας, έγινε από τον Yates (1972) σχετικά με την αφαίρεση μαλλιού των προβάτων και έδειξε ότι η βασική μεμβράνη που χρωματίζεται θετικά με PAS, παραμένει δομικά και χημικά ανέπαφη κατά τη διάρκεια της διεργασίας. Από τις μελέτες αυτές, είναι φανερό ότι η θέση επαφής της επιδερμίδας με το χόριο είναι μία από τις κύριες θέσεις δράσης κατά την αποτρίχωση και ένας από τους κύριους στόχους της είναι να καταστραφεί η συνάφεια των κυττάρων του έξω θύλακα της τρίχας, καθώς και των επιδερμικών κυττάρων προς τη βασική μεμβράνη. (129)

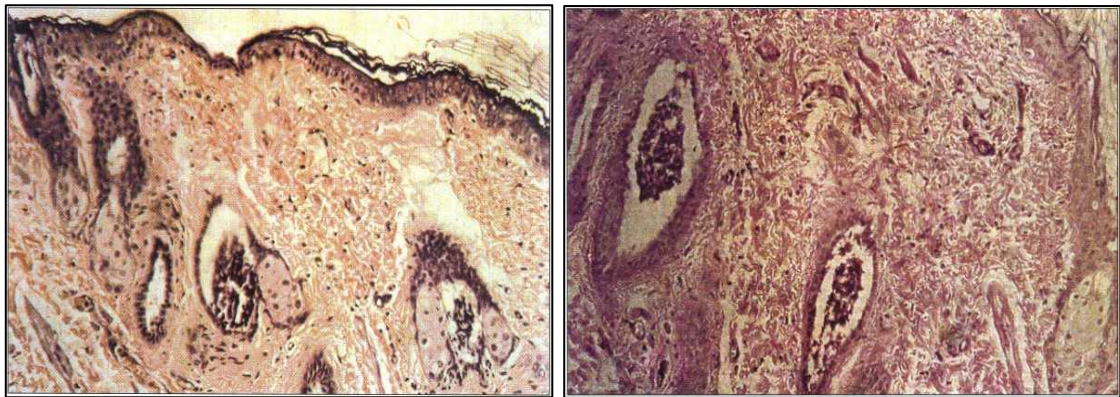
Μεταγενέστερα πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες που αποσκοπούσαν στην αξιολόγηση της επίδρασης των παραπάνω πρωτεολυτικών ενζύμων στο δέρμα ινδικού χοιριδίου σε ιστολογικό επίπεδο και εξετάστηκε η δράση ενός εμπορικού ιδιοσκευάσματος, που περιείχε παπαΐνη και είχε χρησιμοποιηθεί στην βιολογική αποτρίχωση. (129) Το ινδικό χοιρίδιο επιλέχθηκε ως πειραματόζωο επειδή παρουσίαζε σχετική ομοιότητα με την δομή του ανθρώπινου δέρματος. Η επίδραση των ενζύμων μελετήθηκε αφού προηγήθηκε μηχανική αφαίρεση των τριχών με ειδικό κερί και εκτελέστηκαν δύο κύκλοι πειραμάτων, που θα αναλυθούν παρακάτω. (130)

#### **1. Επίδραση ενζύμων στο δέρμα ινδικού χοιριδίου in vitro**

Στον πρώτο κύκλο χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια δέρματος από την ράχη ινδικών χοιριδίων, τα οποία αφαιρέθηκαν με ειδικό ζεστό κερί και επώαστηκαν in vitro με θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και παπαΐνη καθώς και με το ιδιοσκεύασμα σε διάφορους χρόνους (5', 15', 30', 60') και στη συνέχεια εξετάστηκαν ιστολογικά με τις χρώσεις ηωσίνης-αιματοξυλίνης και PAS. Αμέσως μετά την αφαίρεση δέρματος από το ζώο πραγματοποιήθηκε ιστολογική εξέταση (Εικόνα 6.7) όπως και στο δέρμα που επώαστηκε σε ρυθμιστικά διαλύματα απουσία ενζύμων, σε δύο διαφορετικά pH, στο pH 7,6 για την επώαση με θρυψίνη-χυμοθρυψίνη και στο pH 5,25 για την επώαση με παπαΐνη. (Πίνακας 6.2) (131)

Σε αυτά τα πειράματα τα τεμάχια δέρματος τοποθετήθηκαν με την κεράτινη στοιβάδα στο πυθμένα τρυβλίων Petri, στη συνέχεια προστέθηκαν τα διαλύματα ενζύμων, επώαστηκαν στους 37°C και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης.

Μετά την αφυδάτωση και έγκλιση των τεμαχίων σε παραφίνη, οι τομές χρωματίστηκαν με ηωσίνη - αιματοξυλίνη και PAS. (127)



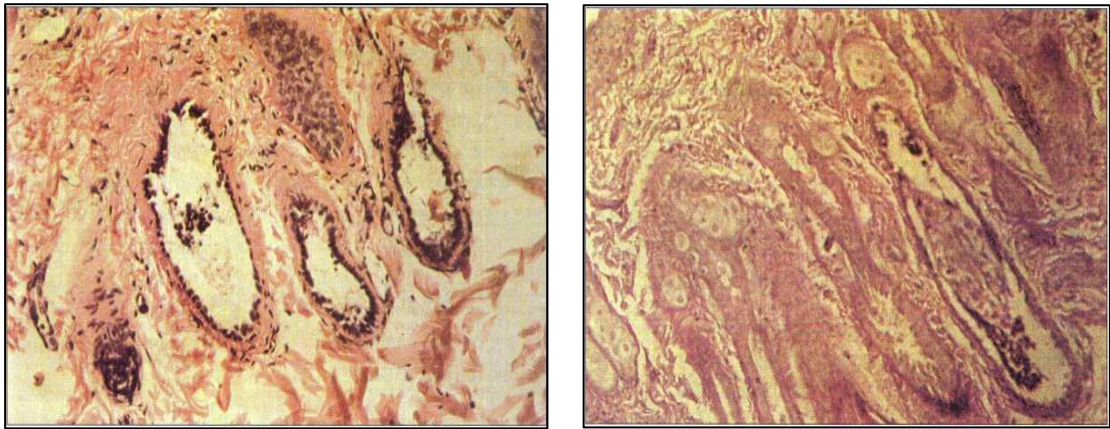
Εικόνα 6.1 Ιστολογική εικόνα δέρματος αμέσως μετά την λήψη με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης x250 (Αριστερά) και μετά την λήψη με PAS x250 (Δεξιά). (126)

	0'		5'		15'		30'		60'	
	pH7,6/pH5,2		pH7,6/pH5,2		pH7,6/pH5,2		pH7,6/pH5,2		pH7,6/pH5,2	
Αποκόλληση κερατίνης	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Ακανθόλυση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Διεύρυνση κεντρικού αυλού	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+/-	+
Αποκόλληση έσω επιθηλιακού ελύτρου	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Επιθηλιακά κυττ, εντό κεντρικού αυλού	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+
Παρουσία δυστροφικών θυλάκων	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 6.2 Φυσιολογικό δέρμα και επώαση του σε ρυθμιστικό διάλυμα, pH 7,6 και pH 5,2 αντίστοιχα. (126)

Γενικά από τα in vitro πειράματα, διαπιστώθηκε ότι και τα τρία πρωτεολυτικά ένζυμα προκαλούν ιστολογικές αλλοιώσεις στο δέρμα, με κυριότερο χαρακτηριστικό την ύπαρξη επιθηλιακών κυττάρων στους θύλακες και με το καθένα από αυτά τα ένζυμα να

εμφανίζει συγκεκριμένη δράση. (130) Τελειώνοντας τα αποτελέσματα του ιδιοσκευάσματος είναι παρόμοια με αυτά της παπαΐνης. (131)



Εικόνα 6.2 Ιστολογική εικόνα δέρματος *in vitro* επίδραση θρυψίνης μετά από 60', x 250 με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (Αριστερά) και με χρώση PAS (Δεξιά). (126)

Από τα παραπάνω ευρήματα, αρχικά αποδεικνύεται ότι οι αλλοιώσεις είναι εντονότερες με την αύξηση του χρόνου επίδρασης των ενζύμων, αφού στα πρώτα 15' η δράση είναι ασθενής, στη συνέχεια, στα 30' και κυρίως στα 60' παρατηρήθηκαν έντονες ιστολογικές αλλοιώσεις. Επιπλέον, το γλυκογόνο αρχίζει να εξαφανίζεται σταδιακά από τα 15' και πάνω, όπως διαπιστώνεται με τη χρώση PAS. (131)

Δεύτερον απεδείχθη έντονη δράση όλων των ενζύμων στην ιστολογική εικόνα του δέρματος και στο μέσο του αυλού των θυλάκων παρατηρήθηκαν μεμονωμένα ή ομαδοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα με υπερχρωματικούς πυρήνες. Ακόμη φάνηκε ότι μεγάλα τμήματα της κερατίνης στιβάδας αποκολλήθηκαν από την κοκκιώδη και ειδικά μετά από παρατεταμένη δράση των ενζύμων. Η δράση της θρυψίνης οδήγησε σε αλλοιώσεις στα ακροτελεύτια τμήματα του επιθηλίου, που έμοιαζαν με αυτές που εμφανίζονται στον πέμφυγα. Συγκρίνοντας τη δράση των τριών ενζύμων αποδεικνύεται ότι την ισχυρότερη δράση παρουσιάζει η χυμοθρυψίνη, αφού οδήγησε σε ακανθολυτικές διεργασίες στην επιδερμίδα, που εκτείνονται και στους γειτονικούς θυλάκους των τριχών. (131)

## **2. Επίδραση ενζύμων και ιδιοσκευάσματος στο δέρμα ινδικού χοιριδίου *in vivo***

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά οι μελέτες προχώρησαν στην εκτέλεση ενός δεύτερου κύκλου πειραμάτων, *in vivo* αυτή την φορά, όπου χορηγήθηκαν τα ένζυμα διαλυμένα

στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα όπως και στο ιδιοσκεύασμα, με επάλειψη ή με ιοντοφόρηση. Στη συνέχεια, λήφθηκαν κυκλικά τεμάχια δέρματος από την αποψιλωμένη περιοχή και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10% ουδέτερης φορμόλης για μονιμοποίηση. (131) Έπειτα έγιναν τομές παραφίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις, μεμονωμένα ή διαδοχικά για διάφορα χρονικά διαστήματα (1', 2' και 5') και στα 30' μετά την χορήγηση των ενζύμων ελήφθησαν τεμάχια δέρματος για ιστολογική εξέταση με τις ίδιες χρώσεις. (130)

Στην περίπτωση της ιοντοφόρησης με χυμοθρυψίνη σε συγκέντρωση 1 mg/ml επί 2' σε τομές που αφορούν τον βολβό του θύλακα παρατηρήθηκαν σημεία αρχόμενου διαχωρισμού και απώλειας της συνάφειας των επιθηλιακών κυττάρων. Στα 5' η κεράτινη στιβάδα στο μεγαλύτερο τμήμα της είχε αποκολληθεί από την υπόλοιπη επιδερμίδα και οι θύλακες περιείχαν δυστροφικές τρίχες ή καθόλου τρίχες που εμφανίζονταν σαν κυστικές κοιλότητες, περιβαλλόμενες από μία ή δύο σειρές επιθηλιακών κυττάρων. Σχετικά με την επίδραση της παπαΐνης στην ίδια συγκέντρωση επί 2' και 5' παρατηρήθηκε επί πλέον απώλεια της συνοχής των κυττάρων του βολβού και ακανθόλυση των επιθηλιακών κυττάρων. Η ποσότητα βλεννοπολυσακχαριτών και γλυκογόνου είναι φτωχή έως ανύπαρκτη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6.3. (130)

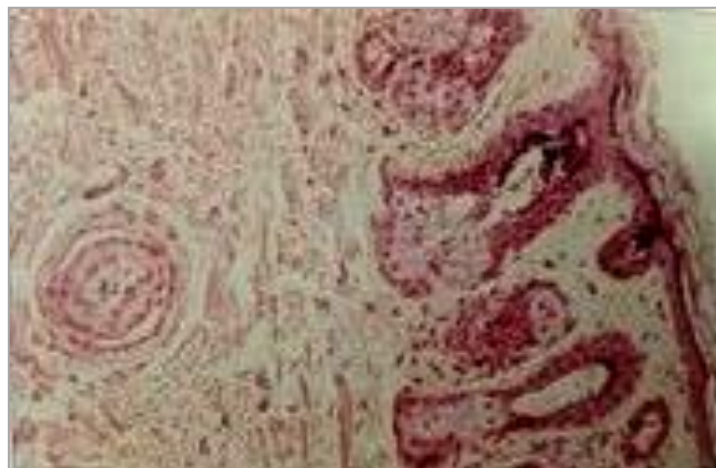
	Χυμοθρυψίνη			Παπαΐνη		
	1'	2'	5'	1'	2'	5'
Αποκόλληση κερατίνης	+	+	++	++		+++
Ακανθόλυση	-	-	-	-	-	-
Διεύρυνση κεντρικού αυλού	+	+	++	+	++	++
Αποκόλληση έσω επιθηλιακού ελύτρου	+	+	+	-	+	++
Παρουσία επιθ. κυττάρων εντός κεντρικού αυλού	-	+	++	+	+	++
Παρουσία δυστροφικών θυλάκων	+	+	+	+	++	++

Πίνακας 6.3 In vivo δράση χυμοθρυψίνης και παπαΐνης (126)



Ο βαθμός της δράσης των ενζύμων εξαρτάται από το χρόνο ιοντοφόρησης τους, όπου μετά από 1' χρήση γαλβανικού ρεύματος προκαλούνται ασθενείς βλάβες, ενώ μετά από 2' παρατηρούνται έντονες ιστολογικές αλλοιώσεις. Όμως επιπλέον αύξηση του χρόνου ιοντοφόρησης, οδηγεί σε πολύ μικρή αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Τέλος ο διαδοχικός συνδυασμός δράσης πρώτα της χυμοθρυψίνης επί 2' και μετά της παπαΐνης για αλλά 2', προκάλεσε έντονες ιστολογικές αλλοιώσεις. (130)

Επίσης παρατηρήθηκαν έντονες εκφυλιστικές, ακανθολυτικές αλλοιώσεις στο σημείο που αναδύεται η τρίχα και καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων στο μέσο και κατώτερο τμήμα των θυλάκων. Ακόμη δημιουργήθηκε οίδημα με συνέπεια την απομάκρυνση των επιθηλιακών κυττάρων από τον βολβό. Οι ιστολογικές αυτές αλλοιώσεις παρατηρούνται ακόμη και σε συγκεντρώσεις 0,1mg/ml χυμοθρυψίνης και παπαΐνης εφόσον και τα δύο ένζυμα χορηγήθηκαν διαδοχικά. (Εικόνα 6.3) Η συγκέντρωση αυτή παριστάνει το 1/10 της συγκεντρώσεως της παπαΐνης στο ιδιοσκεύασμα που μελετήθηκε. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6.4. (130)



Εικόνα 6.3 Διαδοχική επίδραση παπαΐνης – χυμοθρυψίνης 1mg/ml, 2' αιματοξυλίνη - ιωσίνη x 250. (126)

Συγκρίνοντας την εικόνα δέρματος ινδικού χοιριδίου με δέρμα αμέσως μετά την αποτρίχωση με κερί, διαπιστώθηκε ότι, η μηχανική αυτή διεργασία διατηρεί τους βολβούς των τριχικών θυλάκων σε καλή κατάσταση και εμφανίζονται μόνο ελάχιστοι διευρυμένοι θύλακες στα ανώτερα στρώματα του χορίου. Στη χρώση PAS η βασική στιβάδα διαγράφεται με σαφήνεια και η παρουσία γλυκογόνου είναι εμφανής. Επίσης είναι φανερό ότι η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων μετά τη μηχανική αποτρίχωση



επέφερε, ουσιαστικές βλάβες στο δέρμα και στον βολβό του θύλακα της τρίχας, γεγονός που εξηγεί, τη θετική δράση του ιδιοσκευάσματος στην αποτρίχωση. (130)

	Χυμοθρυψίνη			Παπαΐνη			X+Π	X+Π
	1mg	0.5mg	0.1mg	1mg	0.5mg	0.1mg	1mg	0.5mg
Αποκόλληση κερατίνης	+	+	+	+	+	+	+	+
Ακανθόλυση	-	-	-	+/-	-	-	+	+
Διεύρυνση κεντρικού αυλού	+	+	+	+	+	+	++	++
Αποκόλληση έσω επιθηλιακού ελύτρου	+	+	+	+	+	+	+	+
Επιθηλιακά κύτταρα εντός κεντρικού αυλού	+	+	+	+	+	+	+	+
Παρουσία δυστροφικών θυλάκων	+	+	+	+	+	+	++	++

Πίνακας 6.4 In vivo δράση χυμοθρυψίνης – παπαΐνης και η διαδοχική δράση τους.

(126)

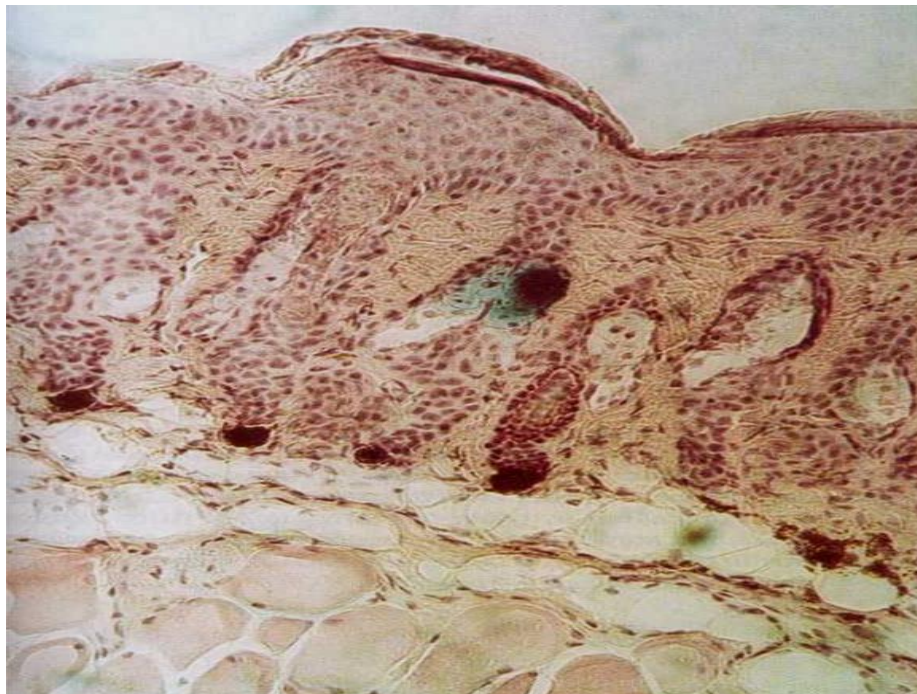
Σε αυτή την μελέτη φάνηκε ότι η βασική μεμβράνη παρέμεινε ανέπαφη, τόσο από δομική, όσο και από χημική άποψη, η οποία συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών. (129) Πιστοποιήθηκε η αντοχή της στα πρωτεολυτικά ένζυμα, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα υπεύθυνα ένζυμα για τις αλλοιώσεις του θύλακα της τρίχας πρέπει να περάσουν μέσω της βασικής μεμβράνης προς τη θέση δράσεως τους. Ακόμη διαπιστώθηκε, ότι η επάλειψη των ενζύμων, δεν οδήγησε σε ορατές ιστολογικές επιδράσεις και αυτό αποδίδεται στην αδυναμία εισόδου των ενζύμων μέσω της επιδερμίδας, σε αντίθεση με την ιοντοφόρηση, που ως γνωστόν, επιτρέπει την διαδερμική μεταφορά μακρομορίων. (130)

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδωσαν εξηγήσεις σε ιστολογικό επίπεδο για την αποτριχωτική ικανότητα της παπαΐνης, της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, που σε γενικές γραμμές έχουν παρόμοια δράση, με μερικές ποιοτικές και κυρίως ποσοτικές διαφορές. Αποδείχτηκε η υπεροχή της παπαΐνης και της χυμοθρυψίνης, όπως και ο συνδυασμός τους, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, σχετικά με την επίδραση τους στον βολβό της τρίχας, διευρύνοντας την προοπτική για τη χρησιμοποίησή τους στην ενζυμική αποτρίχωση. (126)

Από παρατηρήσεις, κατά την εφαρμογή ενζυμικής αποτρίχωσης σε ανθρώπους διαπιστώθηκε μόνιμη δράση των ενζύμων αυτών, υποθέτοντας ότι τα ένζυμα θα πρέπει να καταστρέφουν τα αναγεννητικά κύτταρα της τρίχας, τα οποία εμφανίζουν αυξημένο αριθμό πολλαπλασιασμού και η υπόθεση αυτή διερευνήθηκε σε διαγονιδιακά ζώα. (126)

#### **6.4.2 Πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα**

Στην προσπάθεια διερεύνησης της υπόθεσης, ότι τα πρωτεολυτικά ένζυμα επιδρούν βλαπτικά στα αναγεννητικά, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια, όπου εισήχθη το γονίδιο της β-γαλακτοζιτάσης συνδεδεμένο με τον πρωταγωγέα του ιού του ανθρώπινου θηλώματος (H.P.V.). Έχει ήδη αποδειχθεί ότι αυτό το γονίδιο με τον συγκεκριμένο πρωταγωγέα εκφράζεται επιλεκτικά στα κύτταρα της περιοχής Bulge, τα οποία αντιστοιχούν στα αναγεννητικά κύτταρα της τρίχας (σπανιότερα στους σμηγματογόνους αδένες). Τα κύτταρα της περιοχής Bulge ανιχνεύονται εύκολα όταν επωαστούν με κατάλληλη χημική ουσία, την οποία διασπά η β-γαλακτοζιτάση και χρωματίζονται μπλε. Σκοπός των πειραμάτων ήταν ναδειχθεί η ευαισθησία των κυττάρων αυτών στα συγκεκριμένα πρωτεολυτικά ένζυμα. (130)



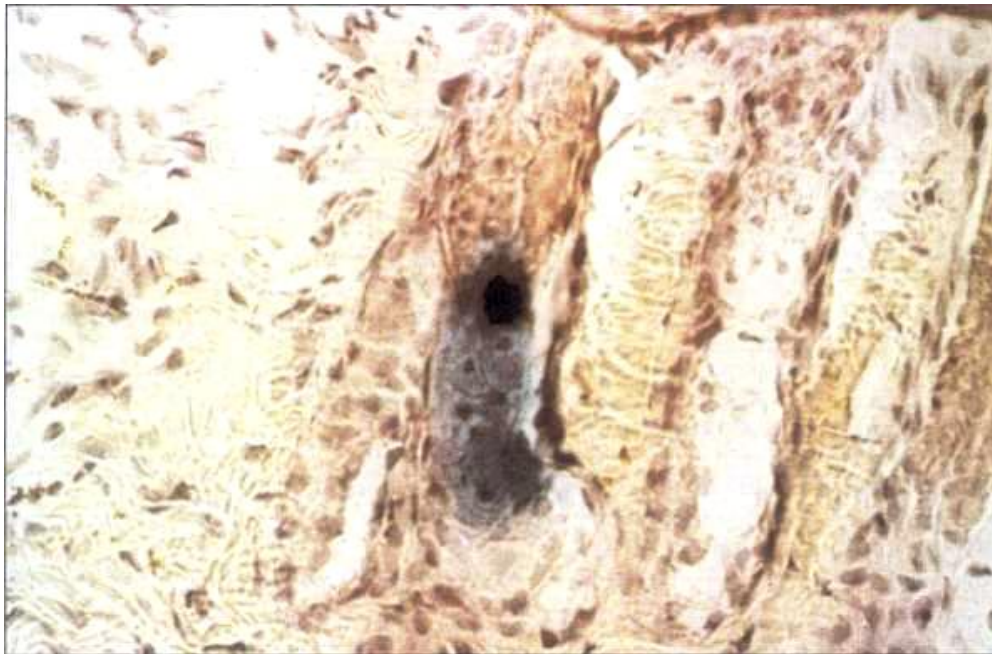
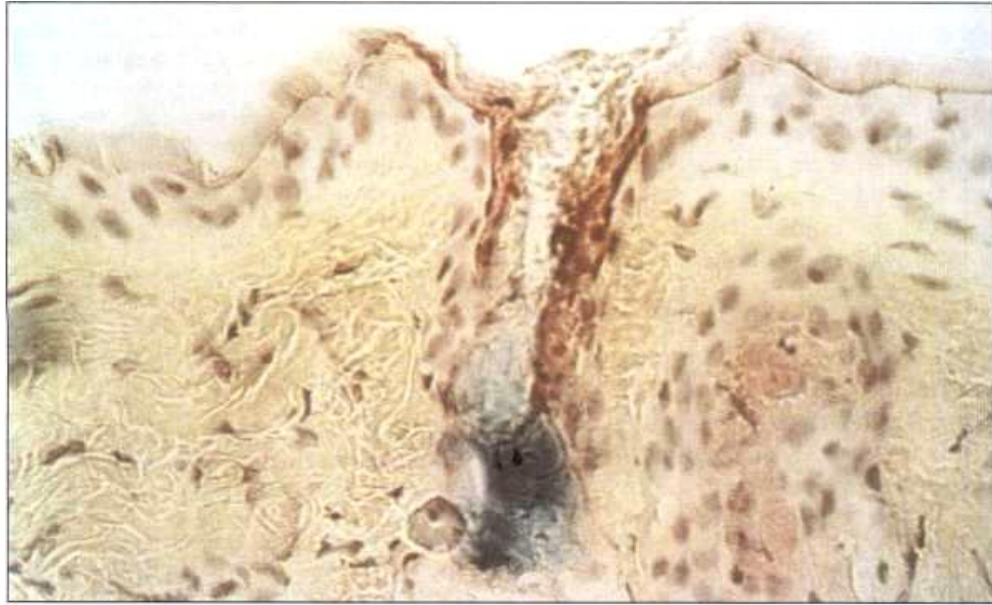
Εικόνα 6.4 Control από δέρμα ποντικού όπου έχει επαλειφθεί με λιποσώματα για 3 ημέρες, x250. Τα αναγεννητικά κύτταρα έχουν χρωματισθεί μπλε από τη β-γαλακτοζιτάση και βρίσκονται στο σημείο Bulge. (126)

Στα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν 20 θηλυκά ποντίκια, σε 5 ποντίκια χορηγήθηκε παπαΐνη και θρυψίνη με ιοντοφόρηση, σε άλλα 5 έγινε επάλειψη με λιποσώματα που περιείχαν θρυψίνη και στα υπόλοιπα 10, που κατέληξαν μάρτυρες εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία, χωρίς την παρουσία ενζύμων. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ketalar και έγινε αποτρίχωση στο κάτω μέρος του ζώου. Στη δεξιά πλευρά χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς ένζυμο, ενώ στην αριστερή εφαρμόστηκε η ενζυμική θεραπεία. Η ιοντοφόρηση έγινε με ρεύμα έντασης 2 MA επί 4' και η επάλειψη με λιποσώματα έγινε για 2 μέρες 8' κάθε φορά ή για 3 μέρες, 4' κάθε φορά. (132)

Μελετήθηκε η επίδραση των πρωτεολυτικών ενζύμων στο θύλακα της τρίχας και ιδιαίτερα στα αναγεννητικά κύτταρα. Αποδείχθηκε ότι προκαλούν σημαντικές βλάβες όπως φαίνεται από την παρουσία κυττάρων που χρωματίζονται μπλε εντός του κυστικά διευρυμένου θύλακα και έχουν αποσπασθεί από την περιοχή Bulge. Παρατηρήθηκαν επίσης οι υπόλοιπες βλάβες που έχουν περιγραφεί στις προηγούμενες μελέτες με ινδικά χοιρίδια. Στην περίπτωση εφαρμογής της θρυψίνης υπό μορφή λιποσωμάτων οι βλάβες αφορούσαν το 2ο και 3ο τεταρτημόριο του θύλακα, ενώ στα βαθύτερα στρώματα, ιδίως γύρω από τη θηλή όπου υπήρχε πολύ μελανίνη, δεν εμφανίστηκε ιδιαίτερη βλάβη. (130)

	<sup>3</sup> H Ιοντοφόρηση x 4' Χυμοθρυψίνη+Παπαΐνη  1mg/ml (διαδοχική δράση)	<sup>3</sup> H Ιοντοφόρηση x 4' Χυμοθρυψίνη+Παπαΐνη  1mg/ml
Αποκόλληση κερατίνης	+/-	+/-
Επιδερμίδα	Αλλοιώσεις	
Ακανθόλυση	+	+
Διεύρυνση κεντρικού αυλού	Ναι	+
Αποκόλληση έσω επιθηλιακού ελύτρου	Ναι	+
Παρουσία επιθ. κυττάρων εντός κεντρικού αυλού	Ναι	+
Παρουσία δυστροφικών θυλάκων	Ναι	+

Πίνακας 6.5 Ιοντοφόρηση χυμοθρυψίνης και παπαΐνης 1mg/ml  
για 4' διαδοχικής και μη δράσης 3 ημερών. (126)



Εικόνα 6.5 Αποτελέσματα εισχώρησης χυμοθρυψίνης και παπαΐνης με ιοντοφόρηση x400 από δύο διαφορετικά σημεία. (126)

Συνοψίζοντας, με τα πειράματα σε διαγονιδιακά ζώα πράγματι αποδείχθηκε ότι τα αναγεννητικά κύτταρα, κατόπιν δράσης των ενζύμων αποσπώνται από τις δομές τους και ως αποτέλεσμα χάνουν την λειτουργικότητά τους. Τα αναγεννητικά κύτταρα κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους και λόγω της ανάγκης δράσης παραγόντων να συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, κυρίως πρωτεϊνών, είναι πιο ευαίσθητα στην πρωτεολυτική δράση των ενζύμων από κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία και είναι πλήρως διαφοροποιημένα. (130)

### **6.4.3 Νεότερες μελέτες**

Οι τελευταίες μελέτες σχετικά με την χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων αναφέρονται στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ενός αποτριχωτικού προϊόντος, μέσω ιστολογικής ανάλυσης με χρήση μικροσκοπίου φωτός. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση τοπικών σκευασμάτων, τζέλ και κρέμας με παπαΐνη στη μείωση της τρίχας σε ένα ζωικό μοντέλο, ως αβλαβή θεραπεία για την υπερτρίχωση. (133)

Παρασκευάσματα τζέλ και κρέμας που περιείχαν 0,8% (w/w) 450 παπαΐνη (W.P.A., Wallerstein) παρήχθησαν (η ουσία διαλύθηκε σε αποσταγμένο νερό και το διάλυμα προστέθηκε βαθμιαία στον κατάλληλο φορέα). Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά ποντίκια, ηλικίας 60 ημερών, με μέσο βάρος 35gr και χωρίστηκαν σε 2 ομάδες των 10 (ομάδα τζελ και ομάδα κρέμας). Το αποτριχωτικό αποτέλεσμα παρακολούθηθηκε κατά τη διάρκεια της θεραπείας με μακροσκοπική αξιολόγηση. (133)

Εφαρμόστηκε καθημερινά, μία φορά ημερησίως, 1gr από κάθε τοπικό παρασκεύασμα στην δεξιά πλευρά της πλάτης και η αριστερή πλευρά χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος για 31 ημέρες. Την ημέρα 32, τα ποντίκια θανατώθηκαν χρησιμοποιώντας διοξείδιο του άνθρακα και ελήφθησαν θραύσματα δέρματος που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης, ενσωματωμένο σε παραφίνη και τεμαχίστηκαν οριζόντια και κατακόρυφα. Οι τομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάστηκαν με μικροσκόπιο φωτός, όπου αξιολογήθηκαν οι ιστολογικές αλλοιώσεις στο δέρμα και στο θύλακα της τρίχας τους. (133)

Το αποτριχωτικό αποτέλεσμα της φόρμουλας τζέλ που εφαρμόστηκε στην πρώτη ομάδα ήταν λιγότερο εμφανές. Η ποιοτική ανάλυση οριζόντιων και κάθετων τμημάτων του δέρματος και του θύλακα της τρίχας που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τζελ δεν έδειξε καμία διαφορά σε σύγκριση με τον έλεγχο. Από την άλλη πλευρά, η δεύτερη ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία με τη φόρμουλα κρέμας παρουσίασε έντονο αποτριχωτικό αποτέλεσμα, σημαντικά υψηλότερο από το τζελ. Η μορφομετρική ανάλυση έδειξε διαστολή του αυλού του τριχοθυλακίου (περίπου 55%), αύξηση του πάχους της επιδερμίδας και επιπλέον λεύκανση των τριχών. Η αλλαγή του χρώματος και το αποτριχωτικό αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί από τη δράση της παπαΐνης, καθώς είναι μια πρωτεολυτική ουσία που υδρολύει τα πολυπεπίδια. (133)

Μετά τη μακροσκοπική αξιολόγηση, τα θραύσματα δέρματος που αναλύθηκαν μέσω ιστολογικών τεχνικών, δεν έδειξαν να υπάρχουν ιστολογικές αλλοιώσεις στην ομάδα

που υποβλήθηκε σε θεραπεία με τζελ. Η ομάδα που έλαβε θεραπεία με κρέμα εμφάνισε αύξηση στο πάχος της επιδερμίδας, μείωση των τριχοθυλακίων και επιπλέον διαστολή του αυλού του θύλακα της τρίχας. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της διαμέτρου του αυλού του τριχοθυλακίου και ιστογράμματα. Το έντονο αποτριχωτικό αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στην ομάδα της κρέμας συνοδεύτηκε και από ιστολογικές αλλοιώσεις. Αν και το τζελ χρησιμοποιείται συχνά σε φαρμακευτικά σκευάσματα και καλλυντικά λόγω της εύκολης χρήσης και αφαίρεσης του, η κρέμα θα πρέπει να επιλέγεται για αποτριχωτικό σκευάσμα. Η υψηλότερη αποτελεσματικότητα της κρέμας σε σύγκριση με τη σύνθεση τζελ θα μπορούσε να οφείλεται στις επιφανειοδραστικές ουσίες που λειτουργούν ως ενισχυτικό διεύδωσης και έχουν τη δυνατότητα να διαλυτοποιήσουν τα λιπίδια, που καλύπτουν την επιφάνεια της τρίχας και να ενισχύσουν τη δράση της παπαΐνης. Καθώς και στα υδρόφιλα και λιπόφιλα στοιχεία που αποτρέπουν την απώλεια νερού, σχηματίζοντας ένα υδρόφοβο φράγμα και μπορούν να ενισχύσουν τη βιοδιαθεσιμότητα της παπαΐνης στις τρίχες. Το τζέλ δεν περιέχει ελαιώδη φάση και δεν έχει ομοιότητα με το υλικό που καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος και των τριχών. (133)

Καθώς η αποτριχωτική δράση είναι μακροχρόνια, είχε προταθεί η υπόθεση ότι τα βλαστοκύτταρα των τριχοθυλακίων θα μπορούσαν να είναι μεταξύ των κυττάρων που επηρεάζονται από την παπαΐνη. Η αύξηση του πάχους της επιδερμίδας ως αποτέλεσμα της εφαρμογής της σύνθεσης κρέμας παπαΐνης επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση. Η παπαΐνη παρεμβαίνει στα βλαστοκύτταρα του ωοθυλακίου, τα οποία απαιτούνται για τον κύκλο των τριχοθυλακίων και για τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός έναντι της τερματικής διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων του τριχοθυλακίου στο δέρμα και τα εξαρτήματά του, μπορεί να θεωρηθεί ανταγωνιστικός. (133)

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης χρήσης είναι πιθανό να φτάσει λιγότερη παπαΐνη στα βλαστοκύτταρα του θύλακα της τρίχας, κάτι που μπορεί να σημαίνει λιγότερη πάχυνση ακόμη και λιγότερη αποτρίχωση. Με βάση τα αποτελέσματά, η φόρμουλα κρέμας πρέπει να χορηγείται συνεχώς και για μεγάλο χρονικό διάστημα και δεν είναι δυνατόν να γνωρίζουμε εάν αυτό το αποτέλεσμα είναι μη αναστρέψιμο. Ίσως με συνεχή χρήση η αποδυνάμωση του θύλακα της τρίχας μπορεί να αναστείλει οριστικά την ανάπτυξη των τριχών. Θα πρέπει να γίνει περαιτέρω εργασία για να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός πάχυνσης και διεύδωσης της παπαΐνης. (133)



Εκτός όμως από τον κλάδο της Αισθητικής - Κοσμετολογίας η ενζυμική αποτρίχωση συναντάται και στον κλάδο της επεξεργασίας δέρματος, όπου παρουσιάζεται πλούσιο ερευνητικό έργο, ως μέρος των προσπαθειών για πιο πράσινη επεξεργασία δέρματος, έχοντας σημειώσει πρόοδο σε σχέση με την παραδοσιακή βιομηχανία, η οποία είναι πλέον πιο δεκτική σε καθαρότερες μεθόδους επεξεργασίας λόγω της αυξανόμενης πίεσης από περιβαλλοντικές ομάδες. Ο μηχανισμός αποτρίχωσης είναι κατανοητός από την άποψη της ενζυμικής εξειδίκευσης, η οποία χρειάζεται μια συνεπή και ικανοποιητική αποτρίχωση χωρίς επιβλαβή επίδραση στην ποιότητα του δέρματος. Η απόκτηση γνώσεων σχετικά με την ιδιαιτερότητα της αποτρίχωσης θα βοηθούσε στην υπογραφή αποτελεσματικής διαδικασίας αποτρίχωσης. (106)

Συγκεκριμένα η χρήση βιοκαταλυτών για την υποκατάσταση του ανόργανου σουλφιδίου, που ήταν η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική αποτρίχωσης σε περασμένες δεκαετίες, έδειξε εξαιρετικά πλεονεκτήματα στην προστασία του περιβάλλοντος και στην αποτελεσματικότητα της αποτρίχωσης. Οι κερατινολυτικές πρωτεάσες είναι εξαιρετικοί βιοκαταλύτες, αφού μπορούν να υδρολύουν τις πλούσιες σε δισουλφιδικούς δεσμούς πρωτεΐνες της τρίχας και να προκαλούν λιγότερη ζημιά στο δέρμα. Η βιολογική επεξεργασία με κερατινολυτικές πρωτεάσες θα μπορούσε να μειώσει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα και την τοξικότητα των λυμάτων από τη βιομηχανία δέρματος. (134)

Επιπροσθέτως, άλλες έρευνες που σχετίζονται με ορισμένους τύπους πρωτεασών, που ονομάζονται κερατινάσες και είναι σε θέση να διασπάσουν τους πεπτιδικούς δεσμούς μέσα στη δομή της κερατίνης. Ωστόσο, η διαδικασία της ενζυμικής αποικοδόμησης της κερατίνης είναι ελάχιστα κατανοητή, επηρεάζοντας την ανάπτυξη βιομηχανικών ενζυμικών σκευασμάτων που μπορεί να απαιτούν πλήρη ή μόνο μερική τροποποίηση ή αποδυνάμωση. (135)

Έχει διερευνηθεί και έχει εξεταστεί με μηχανικές, βιοχημικές και μικροσκοπικές τεχνικές, η δυναμική της αποδυνάμωσης και η υδρόλυση της κερατίνης, δείχνοντας ότι η μείωση της μηχανικής αντοχής της τρίχας σχετίζεται με την αφαίρεση της επιδερμίδας και τη βλάβη στον φλοιό και η πλήρης διάσπαση εξαρτάται από αναγωγικούς παράγοντες (κυρίως θειογλυκολικού νατρίου, που ξεπερνούσε το 90% της αποικοδόμησης εντός 16 ωρών από την ενζυμική επεξεργασία). Συνολικά, τα αποτελέσματα παρέχουν πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τη διαδικασία αποδόμησης της

κερατίνης από ένζυμα για τη βελτιστοποίηση καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων και για την ανακύκλωση ζωικών απορριμμάτων μεταξύ άλλων σημαντικών εφαρμογών. (135)



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι πρωτεάσες, τα υποστρώματα και οι αναστολείς τους έχουν μεγάλη σημασία για τη βιολογία, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία. Αποτελούν τη μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη ομάδα ενζύμων στη βιομηχανία και εξαιτίας της ιδιαίτερης δράσης τους, έχουν προσελκύσει την παγκόσμια προσοχή για την εκμετάλλευση των φυσιολογικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών τους. Η παγκόσμια βιομηχανία καλλυντικών αξίζει δεκάδες δισεκατομμύρια δολάρια και αναζητά συνεχώς και με ραγδαίους ρυθμούς νέα και πιο αποτελεσματικά προϊόντα και συστατικά που να παρέχουν στοχευμένη δράση. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα θα μπορούσαν να είναι μια τέτοια κατηγορία δραστικών συστατικών εξαιτίας της εξειδικευμένης μηχανικής τους στα φυσιολογικά υποστρώματα για θεραπευτικούς και καλλυντικούς σκοπούς.

Παρόλο που τα πρωτεολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται εδώ και μισό αιώνα στο εργαστήριο, όπου κατάφεραν να διαχωρίσουν επιλεκτικά την επιδερμίδα από το χόριο, να απομονώσουν τα κερατινοκύτταρα, καθώς και να εφαρμοστούν τοπικά, κυρίως στον καθαρισμό πληγών, βασισμένα στις αποικοδομητικές ιδιότητές τους. Αυτό το γεγονός αποτέλεσε το έναυσμα για την χρήση ορισμένων πρωτεασών στα απολεπιστικά προϊόντα, τα οποία αφομοιώνουν τις δεσμοσωμικές πρωτεΐνες εντός της κεράτινης στιβάδας, ρυθμίζοντας την απολεπιστική διαδικασία με απώτερο σκοπό να ανανεώσουν το δέρμα και να βελτιώσουν τις βλάβες της επιδερμίδας. Η παπαΐνη, η βρωμελίνη, οι κερατινάσες και οι μικροβιακές πρωτεάσες είναι μερικά βασικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται ήδη ως κοσμητολογικά απολεπιστικά και η χρήση τους αποτελεί εναλλακτική λύση για την δημιουργία καλλυντικών σκευασμάτων και θεραπειών, έναντι των ερεθιστικών οξέων φρούτων.

Σε βιβλιογραφική ανασκόπηση για της χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων ως απολεπιστικών παραγόντων που πραγματοποιήθηκε το 2021 από τους Trevisol et al. βρέθηκαν μόνο 11 άρθρα, εκ των οποίων, λίγες ήταν οι μελέτες με κλινικές δοκιμές. Απαιτούνται όμως περαιτέρω *in vivo* μελέτες, προτού συσταθεί με ασφάλεια ως μέθοδος θεραπείας και επιβάλλεται να αξιολογηθούν συγκεκριμένες παράμετροι (pH, θερμοκρασία και σταθερότητα) για την εφαρμογή τους στα καλλυντικά, κυρίως για την πρόληψη απώλειας της ενζυμικής δραστηριότητας και την μείωση πιθανότητας πρόκλησης δερματικών ερεθισμών. Σε αντίστοιχη περίπτωση στην Αισθητική, στον τομέα της αποτρίχωσης υπάρχουν λεπτομερέστερες πειραματικές μελέτες, οι οποίες

αποτελέσαν πρότυπο ερευνητικής δραστηριότητας όπου εξετάστηκε η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων, θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και παπαΐνη in vivo και in vitro. Η ενζυμική αποτρίχωση βασίστηκε στην επίδραση αυτών των τριών ενζύμων στα αναγεννητικά κύτταρα της τρίχας, όπου παρατηρήθηκε μόνιμη καταστροφή της αναγεννητικής ικανότητας της τρίχας.

Επίσης, η κοσμητολογική χρήση των πρωτεασών, εκτός των απολεπιστικών σκευασμάτων, είναι σχετικά πρόσφατη και υπάρχει μικρή διαθεσιμότητα προϊόντων στην αγορά. Σε βιομηχανικό επίπεδο εφαρμογής, όπως διαπιστώθηκε, αυτό οφείλεται στην ανεπάρκεια της σταθερότητας των ενζύμων, στην έλλειψη ελέγχου της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας, στη μειωμένη γνώση των αλληλεπιδράσεων φορέα, ενζύμου και δέρματος και στην τεχνικά δύσκολη διαδικασία ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης τους. Συνοψίζοντας μετά από όλα τα προαναφερθέντα, προκύπτει ότι η αστάθεια των ενζύμων στις καλλυντικές συνθέσεις είναι μια σημαντική ανησυχία που επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου ή τη δομή του και απαιτείται σωστή επιλογή του σκευάσματος για να διασφαλιστεί ότι το ένζυμο θα παρουσιάσει πρωτεολυτική δράση.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η νανοτεχνολογία αποτελεί εξαιρετικό εργαλείο στη σταθεροποίηση των πρωτεασών για την παρασκευή καινοτόμων προϊόντων και έχει γίνει το επίκεντρο του ενδιαφέροντος στην κοσμητολογία για διαφορετικούς λόγους. Αρχικά, επειδή τα νανοσωματίδια απορροφώνται πιο εύκολα στο δέρμα, διαπερνώντας τον επιδερμικό φραγμό, δευτερευόντως, επειδή οι διάφορες νανομορφές συμβάλλουν στην ενθυλάκωση και στη σύζευξη των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα και τρίτον, η ανάπτυξη νανοπρωτεασών που συμπεριφέρονται ως δραστικά συστατικά για στοχευμένη αποτελεσματικότητα. Με αυτόν τον τρόπο και για τους παραπάνω λόγους επιτυγχάνεται η αύξηση της φυσικοχημικής σταθερότητας τους και του χρόνου ημιζωής τους υπό κάποιες συνθήκες, η βελτίωση της δραστηριότητάς τους, η μείωση των παρενεργειών ερεθισμού του δέρματος και η ενίσχυση της διαδερμικής απορρόφησης.

Απαιτείται όμως, συνεχής έρευνα για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων ως νανοφορείς επειδή η χρήση τους αυξάνεται εκθετικά, δεδομένου ότι σταθεροποιούν τις δραστικές ουσίες έναντι της μετουσίωσης. Το προφίλ ασφάλειας και τοξικότητας των νανοϋλικών είναι υπό συζήτηση, επειδή το μικρό μέγεθος, η αυξημένη επιφάνεια και το θετικό επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων

βελτιώνουν την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν βιολογικά με το μικροπεριβάλλον. Ακόμη, μια σημαντική ανησυχία για την πρόοδο των νανοκατασκευασμάτων είναι ότι μπορεί να ενισχύσουν τη συγκέντρωση των δραστικών συστατικών που φθάνουν στο αίμα και να επηρεάσουν την τοξικότητα.

Επιπροσθέτως, ένας άλλος σημαντικός και ενδιαφέρον τρόπος διαχείρισης των πρωτεασών όπως παρουσιάστηκε, είναι η χρήση τεχνικών ακινητοποίησης, η οποία περιλαμβάνει μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση των βιολογικών καταλυτών σε ένα υλικό υποστήριξης. Η χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων έχει ήδη προσελκύσει σημαντικά την βιομηχανία καλλυντικών, αφού αποτελεί την τελευταία εξέλιξη ενσωμάτωσης τους στις συνθέσεις προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Είναι μια τεχνική εξαιρετικά αποτελεσματική, φιλική προς το περιβάλλον και μπορεί ενδεχομένως να εξοικονομήσει κόστος όταν γίνει περαιτέρω έρευνα για την αναζήτηση ή την κατασκευή νέων μητρών ή στηριγμάτων που είναι φθηνότερες και πιο στιβαρές.

Μελλοντικά θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες για να ξεπεραστούν τα τρέχοντα μειονεκτήματα στην χρήση νέων νανοσυστημάτων και στις τεχνικές ακινητοποίησης για τη δημιουργία εξατομικευμένων και νέας τεχνολογίας προϊόντων. Τέτοια παραδείγματα θα μπορούσαν να είναι τα συζεύγματα που βασίζονται σε κρυσταλλικούς νανοφορείς (CNC-TAS) ανοίγοντας ένα νέο μονοπάτι στην ανάπτυξη προηγμένων θεραπειών προσωπικής φροντίδας και καλλυντικών συνθέσεων και η BNC, η οποία φαίνεται μια πολλά υποσχόμενη και ελκυστική μορφή χρήσης για τα καλλυντικά με βάση τις πρωτεάσες. Στην πραγματικότητα, η χρήση της μήτρας BNC για την ακινητοποίηση ενζύμων σε καλλυντικές εφαρμογές είναι σχεδόν ανεξερεύνητη εκτός από μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Vasconcelos et al. (2020) και περιγράφει την ομοιοπολική ακινητοποίηση της παπαΐνης σε υγρές μεμβράνες BNC.

Αξίζει να σημειωθεί ότι με την πάροδο του χρόνου, η ποικιλομορφία και οι βιολογικές πηγές των πρωτεασών, οι διάφορες ιδιότητές τους στο δέρμα, οι χημικές τροποποιήσεις για βελτίωση της σταθεροποίησης τους, οι προσαρμογές στις συγκεντρώσεις πρωτεάσης, οι πρόοδοι στα οχήματα για καλύτερη παροχή και η μείωση του ερεθισμού, οδηγούν σταδιακά στην ανάπτυξη σκευασμάτων πρωτεάσης για ασφαλή και αποτελεσματική καλλυντική χρήση. Άλλωστε οι παγκόσμιες εξελίξεις

στην υγεία, στο περιβάλλον και στην οικονομία, τα τελευταία χρόνια, καθορίζουν τις ανάγκες και συμβάλλουν στη δημιουργία νέων απαιτήσεων των καταναλωτών, οι οποίοι επηρεάζονται ποικιλοτρόπως και διαμορφώνουν τις τάσεις της αγοράς για τα καλλυντικά.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Worthington C. C., Worthington V., Worthington A. Introduction to Enzymes. [online] 2018 [Accessed 10 April 2018]. Available at: <http://www.worthington-biochem.com/introbiochem/Enzymes.pdf>.
2. Bhatia S. Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Enzymes, proteins and bioinformatics, Volume 2: IOP Publishing Ltd; 2018. p.1-29. doi:10.1088/978-0-7503-1302-5ch1
3. Ξαπλαντέρη, Μ. Χημεία. (Ενζύμα. Κεφάλαιο Συγγραμματος). [online] Αθήνα: Σύλλογος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. σ. 354 - 366. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/915>
4. Δημόπουλος Κ., Αντωνοπούλου Σ. Βασική Βιοχημεία. 3η Έκδοση. Αθήνα: Νέον, 2020. σ. 51 – 62
5. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.. Βιοχημεία (1η έκδοση). Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2014. σ. 209 - 221.
6. Διαμαντίδης, Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία (2η έκδοση). Θεσσαλονίκη: University Studio Press, 1994. σ. 155 - 161.
7. Bettelheim, F. A., Brown, W. H., Campbell, M. K., Farrell, S. O. Introduction to Organic and Biochemistry. 7th edition. Belmont: Brooks/Cole Engage learning, 2010.
8. Rani K., Rana, R., Datt, S. Review on latest overview of proteases. International Journal of Current Life Sciences (2249- 1465) 2012 30 January 2(1): 12 – 18 Available online: <https://www.researchgate.net/publication/265865007>
9. Del Rosso, J.Q. Application of protease technology in dermatology: rationale for incorporation into skin care with initial observations on formulations designed for skin cleansing, maintenance of hydration, and restoration of the epidermal permeability barrier.. [J Clin Aesthet Dermatol](#). 2013;6(6):14–22 PMID: 23882305
10. Chirkin A. A., Balaeva-Tikhomirova O. M., Dolmatova V. V., Semenov I. O. Molecular-structural homology of proteolytic enzymes in the studying of proteolysis mechanism and its regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series. 2021; 57(2):206–217. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-206-217>
11. Mótyán J. A., Tóth F., Tózsér J. Review Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. Biomolecules 2013;3:923-942 Available online: [www.mdpi.com/journal/biomolecules](http://www.mdpi.com/journal/biomolecules) doi:10.3390/biom3040923
12. Naveed M., Nadeem F., Mehmood T., Bilal M., Anwar Z., Amjad F. Protease – A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. Catalysis Letters 2020; 151:307–323 <https://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>

13. Ward, O. P. Proteases. *Comprehensive Biotechnology Elsevier Public Health Emergency Collection*. 2011; 571–582. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1>
14. Rodarte, M., Dias, D., Vilela, D. M., Schwan, R. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea - 166 -rabica L.*). *Acta Scientiarum Agronomy* 2011; 33:457–464. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i3.6734>
15. Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., Del Rio L.A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 2002; 40(6-8):521-530. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)
16. Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. Χημεία τροφίμων. 3<sup>η</sup> Έκδοση. Θεσσαλονίκη: Τζιόλα; 2006.
17. Γεωργάτσος Ι.Γ. Εισαγωγή στη Βιοχημεία. Πέμπτη έκδοση. Θεσσαλονίκη: Γιαχούδη-Γιαπούλη; 2001.
18. Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P., Declercq, W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in Biochemical Sciences* 2009; 34(9):453-463 doi:10.1016/j.tibs.2009.08.001
19. Owen, C. A. SERINE PROTEINASES. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. G. J. Laurent & S. D. Shapiro (Eds.). Academic Press: 2005. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00264-7>
20. Dunn, B. M. Aspartic Proteases. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Second Edition. Academic Press; 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00003-7>
21. Rábade N.G., Corona A.B., Barradas S.A., Salvador C.O. Production of plant proteases in vivo and in vitro – A review. *Biotechnology Advances* 2011;29(6):983-996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
22. Auld, D. S. Metalloproteases. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2nd Edition. W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), Academic Press; 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00018-9>
23. Ellis, H. *Clinical anatomy: a revision and applied anatomy for clinical students*. 8th edn. Oxford: WileyBlackwell; 2007.
24. Andreoli, T. E., Cecil, R. L., Carpenter, C. C. J., Griggs, R. C., Benjamin, I. J., Mistik Selçuk. *Andreoli and Carpenters Cecil essentials of medicine*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
25. Hammer, G. D., & McPhee, S. J. *Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine*. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
26. Stevens, A., & Lowe, J. S. *Human Histology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2013.
27. Hall, J. E., & Guyton, A. C. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Philadelphia (PA): Elsevier; 2016.

28. Preedy, V. R., Watson, R. R. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 1<sup>st</sup> edn London: Elsevier Academic Press; 2010.
29. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. Handbook of proteolytic enzymes. 2<sup>nd</sup> edn. London: Elsevier academic press; 2004.
30. Maloy S., Hughes, K. Brenner's Encyclopedia of Genetics. 2<sup>nd</sup> edition. London: Elsevier academic press; 2013.
31. Rawlings, N. D., Salvesen, G. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3<sup>rd</sup> Edition, London: Elsevier academic press; 2013.
32. Fein, H., Maytin, E.V., Mutasim, D.F., Bailin, P.L. Topical Protease Therapy as a Novel Method of Epidermal Ablation: preliminary Report. *Dermatol Surg.* 2005;31(2):139-47; discussion 147-8. doi:10.1111/j.1524-4725.2005.31034
33. Morrison, H. Enzyme Active Sites and their Reaction Mechanisms. London: Elsevier academic press; 2021 <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03090-7>
34. Murray, M-Y. Comprehensive Biotechnology. Second Edition, London: Elsevier academic press; 2011.
35. Palmer, T., Bonner P. L. Enzymes-Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry. Second Edition. Woodhead Publishing; 2011.
36. Purich D. L. Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. A Reference of Theory and Best-Practice Methods. London: Elsevier academic press; 2010 <https://doi.org/10.1016/C2009-0-61154-5>.
37. Pinto, C.A.S. O, Lopes, P.S., Sarruf, F.D., Polakiewicz, B., Kaneko, T.M., Baby, A.R., Velasco, M.V.R. Comparative study of the stability of free and modified papain incorporated in topical formulations. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2011;47(4). doi: 10.1590/S1984-82502011000400012
38. Sahu K, Kaurav M, Pandey RS. Protease loaded permeation enhancer liposomes for treatment of skin fibrosis arisen from second degree burn. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 94:747-757. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.141.
39. Banchhor, M., Saraf, S. Potentiality of Papain as an Antiaging Agent in cosmetic formulation. *Pharmacognosy Reviews.* 2008; 2(4):266–270 Available online: <http://www.phcogrev.com>
40. Storer, A.C., Menard, R. Catalytic mechanism in the papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994; 244:486-500. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44035-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44035-2)
41. Shoba, E., Lakra, R., Kiran, M.S., Korrapati, P.S. Design and development of Papain/Urea loaded PVA nanofibers for wound debridement. *Journal Name* 2012;00:1-3 DOI: 10.1039/x0xx00000x
42. Lima, C. S. A., Varca, J. P. R. O., Nogueira, K. M., Fazolin, G. N., Freitas, L. F., Souza. E. W., Lugão, A.B., Varca, G. H. C. Semi-Solid Pharmaceutical Formulations

for the Delivery of Papain Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2020; 12(12): 1170. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121170>.

43. Baidamshina D.R., Koroleva, V.A, Olshannikova S.S., Trizna E.Y., Bogachev M.I., Artyukhov, V.G., Holyavka M.G., Kayumov A.R. Biochemical Properties and Anti-Biofilm Activity of Chitosan-Immobilized Papain. *Mar. Drugs*. 2021; 19(4):197. doi: 10.3390/md19040197.

44. Chen YY, Lu YH, Ma CH, Tao WW, Zhu JJ, Zhang X. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. *Biomed. Pharmacother*. 2017; 87:82-91. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.076.

45. Nitsawang, S., Hatti-Kaul, R., Kanasawud, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39:1103–1107. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.013>

46. Ataide, J.A, Gérios, E.F., Mazzola, P.G, Souto, E.B. Bromelain-loaded nanoparticles: A comprehensive review of the state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science* 2018; 254: 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.03.006>

47. Varilla, C., Marcone, M., Paiva, L., Baptista, J. Bromelain, a Group of Pineapple Proteolytic Complex Enzymes (*Ananas comosus*) and Their Possible Therapeutic and Clinical Effects. A Summary. *Foods* 2021; 10(10), 2249. <https://doi.org/10.3390/foods10102249>

48. Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., Loke, S.P. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98:7283–7297 doi: 10.1007/s00253-014-5889-y

49. Spir, L.G., Ataide, J.A., Novaes, L.C.D.L, Gurpilhares, D.D.B., Moriel, P., Silveira, E., Pessoa Jr., A., Tambourgi, E.B, Mazzola, P.G. Application of an aqueous two-phase micellar system to extract bromelain from pineapple (*Ananas comosus*) peel waste and analysis of bromelain stability in cosmetic formulations *Biotechnol. Prog.*, May 15, 2015: 31(4) Available online in wileyonlinelibrary.com <https://doi.org/10.1002/btpr.2098>

50. Lourenço, C.B., Ataide, J.A., Cefali, L.C., Novaes, L.C.D.L., Moriel, P., Silveira, E., Tambourgi, E.B, Mazzola, P.G. Evaluation of the enzymatic activity and stability of commercial bromelain incorporated in topical formulations. *International Journal of Cosmetic Science* 2016; 38:535–540 <https://doi.org/10.1111/ics.12308>

51. Sharma, R., Devi, S. Versatility and commercial status of microbial keratinases: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2018; 17:19–45 <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9454-x>

52. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. Menezes, C.L.A., Santos, R.D.C Santos, M. V., Boscolo, M., Silva, R., Gomes, E., Silva. R.R. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2021; 37:86. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03052-z>



53. Gupta, R., Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 70: 21–33 doi:10.1007/s00253-005-0239-8
54. Gupta, R., Sharma, R., Beg, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012; 33(2): 216–228. doi:10.3109/07388551.2012.68505
55. Ghaffar, I. Imtiaz, A., Hussain, A., Javid, A., Jabeen, F., Akmal, M., Qazi, J.I. Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. *International Microbiology* 2018; 21:163–174 <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0022-1>
56. Rai S.K., Roy J.K., Mukherjee A.K. Application of poly (vinyl alcohol)-assisted silver nanoparticles immobilized  $\beta$ -keratinase composite as topical antibacterial and dehairing agent. *J Proteins Proteom.* 2020; 11:119–134. <https://doi.org/10.1007/s42485-020-00034-x>
57. Walsh G. *Proteins, Biochemistry and Biotechnology.* West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.; 2002.
58. Silva S.V., Malcata F.X. Partial identification of watersoluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J Dairy Sci.* 2005; 88(6):1947–54 doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72870-8
59. Smit, W. J., Porck, H. J. *Guidelines for the conservation of leather and parchment bookbindings.* Koninklijke Bibliotheek – Netherlands: Institute for Cultural Heritage; 1997.
60. Mann, B. R., McMillan, M. M. *The Chemistry of the Leather Industry.* The New Zealand Institute of Chemistry; 2008 Retrieved from <http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/animal/5C.pd>
61. Florian, M. L. E. *The mechanism of deterioration in leather. Conservation of leather and related materials.* Amsterdam: Butterworth-Heinemann, Elsevier; 2006.
62. Rawlings, A.V., Voegeli, R. Stratum corneum proteases and dry skin conditions. *Cell Tissue Res.* 2013;351(2):217-235. doi: 10.1007/s00441-012-1501-x
63. Lopes, P. S., Ruas, G. W., Baby, A. R., Pinto, C. A. S. O., Watanabe, I., Velasco, M. V. R., Kaneko, T. M. In vitro safety assessment of papain on human skin: A qualitative Light and Transmission Electron Microscopy (TEM) study. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008;44(1) <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000100017>
64. Li, Y., Quan, Y., Zang, L., Jin, M., Kamiyama, F., Katsumi, H., Tsutsumi, S., Yamamoto, A. Trypsin as a novel potential absorption enhancer for improving the transdermal delivery of macromolecules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2009;61(8) 1005-1012, <https://doi.org/10.1211/jpp.61.08.0003>
65. Bagchi, D., Daw, A., Roy, S. *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes.* Academic press; 2020: 357-391. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00312-6>

66. Trevisol T.C., Henriques R.O., Souza A.J.A., Furigo A.Jr. An overview of the use of proteolytic enzymes as exfoliating agents. *J Cosmet Dermatol.* 2021;00:1–8. doi:10.1111/jocd.14673
67. Smith, W.P, Bishop, M., Gillis, G., Maibach, H. Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. *Int. J. Cosmet Sci.* 2007;29(1):15-21. doi: 10.1111/j.1467-2494.2007.00354.x.
68. Salvioni L., Morelli L., Ochoa E., Labra M., Fiandra L., Palugan L., Prospero D., Colombo M. The emerging role of nanotechnology in skincare. - Historical Perspective. *Advances in Colloid and Interface Science* 2021;293. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102437>
69. Gupta V, Mohapatra S, Mishra H, Farooq U, Kumar K, Ansari MJ, Aldawsari MF, Alalaiwe AS, Mirza MA, Iqbal Z. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals-A Review of Latest Advancements. *Gels.* 2022; 8(3):173. <https://doi.org/10.3390/gels8030173>
70. Lohani A., Verma A., Joshi H., Yadav N., Karki N. Review Article Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology* 2014;Article ID 843687. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/843687>
71. Tripathy, S.; Dureja, H. Cosmetics: Regulatory Scenario in USA, EU and India. *J. Pharm. Technol. Res. Manag.* 2015, 3, 127–139. DOI: 10.15415/jprm.2015.32010
72. Oliveira C., Coelho C., Teixeira J.A., Ferreira-Santos P., Botelho C.M. Nanocarriers as Active Ingredients Enhancers in the Cosmetic Industry-The European and North America Regulation Challenges. *Molecules.* 2022;27(5):1669. <https://doi.org/10.3390/molecules27051669>
73. Ganesan P. , Choi D.K.Current application of phytocompound - based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. *International Journal of Nanomedicine.* 2016;11:1987-2007. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S104701>
74. Khezri K, Saeedi M, Maleki Dizaj S. Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations. *Biomed Pharmacother.* 2018; 106:1499–505. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.084>
75. Bos J.D., Meinardi M.M.H.M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* 2000;9(3):165–169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x>
76. Bolzinger, M.A., Brianc,S., Pelletier, J., Chevalier, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2012;17(3):156–165. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.02.001>
77. Ghasemiyeh P., Mohammadi-Samani S. Potential of nanoparticles as permeation enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:3271–89. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S264648>
78. Costa R., Santos L. Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technol.* 2017;322:402–416. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086>

79. Schulte, P., Geraci, C., Zumwalde, R., Hoover, M., Kuempe, E. Occupational risk management of engineered nanoparticles. *J. Occup. Environ. Hyg.* 2008;5(4):239–249. doi: 10.1080/15459620801907840.
80. Taghavi, S.M., Momenpour, M., Azarian, M., Ahmadian, M., Souri, F., Taghavi, S.A., Sadeghain, M., Karchani, M. Effects of Nanoparticles on the Environment and Outdoor Workplaces. *Electron. Physician* 2013;5(4):706–712. doi: 10.14661/2013.706-712
81. “Nanomaterials and the EU Cosmetics Regulation: Implications for Your Company”. <http://www.gcimagazine.com/business/management/regulation/143553126.html?pa>.
82. Mihranyan A., Ferraz N., Stromme M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Prog Mater Sci.* 2012;57:875–910. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.10.001>
83. Bruusgaard-Mouritsen M.A, Johansen J.D., Zachariae C., Kirkeby C.S., Garvey L.H. Natural ingredients in cosmetic products—A suggestion for a screening series for skin allergy. *Contact Dermatitis.* 2020;83:251–70. <https://doi.org/10.1111/cod.13550>
84. Nounou M.I., Zaghloul T.I., Ahmed N.A., Eid A.A., El-Khordagui L.K. Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: Application to transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):423-432. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.06.057.
85. Almeida T., Silvestre A.J.D., Vilela C., Freire C.S.R. Bacterial Nan cellulose toward Green Cosmetics: Recent Progresses and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(6):2836. <https://doi.org/10.3390/ijms22062836>
86. Sims Y.C., Nam Y.S., Shin Y.H., Shin E., Kim S., Chang I.S., Rhee J.S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glean as an enzymatic transversal drug penetration enhancer. *Pharmacies.* 2003;58(4):252-6. PMID: 12749407
87. Li Y.Z., Quant Y.S., Zing L., Jin M.N., Koriyama F., Katsumi H., Tsutsumi S., Yamamoto A. Trypsin as a novel potential absorption enhancer for improving the transversal delivery of macromolecules. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(8):1005-12. doi: 10.1211/jpp/61.08.0003
88. Mohammed D., Hirata K., Hadgraft J., Lane M.E. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Sciences Euro J Pham Sci.* 2014;51:118–122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.09.009>
89. Manors, A. Chankhampan C., Manors W., Manors J. Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013;48 (3):474–483. doi:10.1016/j.ejps.2012.12.010
90. Safary A., Akbarzadeh M., Barar J., Omid Y. Biomedical Applications of Nano-Engineered Enzymes: Current Status and Future Direction. Chapter 13. 2021 <https://doi.org/10.1002/9783527832095.ch30>

91. Manors, J., Lohcharoenkal, W., Götz, F., Werner, R.G., Manors, W., Manors, A. Transdermal absorption enhancement of n-terminal tat-GFP fusion protein (TG) loaded in novel low-toxic elastic anionic niosomes. *J. Pharm. Sci.* 2011;100(4):1525–1534 doi:10.1002/jps.22355
92. Ioelovich M. Preparation and application of nanoscale cellulose biocarriers. *CIBTech Journal of Biotechnology* ISSN: 2319–3859 (Online) An Open Access, Online International Journal Available at <http://www.cibtech.org/cjb.htm> 2015;4(3):19-24.
93. Mohamada N.R, Marzukia N.R.C, Buanga N.A., Huyopb F., Wahab R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2015;29(2):205-220, <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
94. Reis C.L.B, de Sousa E.Y.A, de França Serpa J., Oliveira R.C., dos Santos J.C.S. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. *Quím. Nova* 2019;42(7):1-16 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>
95. Atacana K., Özacar M., Özacar M. Investigation of antibacterial properties of novel papain immobilized on tannic acid modified Ag/CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018;109:720–731 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.066>
96. Klemm, D., Cranston, E.D., Fischer, D., Gama, M., Kedzior, S.A., Kralisch, D., Kramer, F., Kondo, T. et al. Nan cellulose as a Natural Source for Groundbreaking Applications in Materials Science: Today's State. *Mater. Today* 2018;21(7):720–748. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.02.001>
97. Shoda M., Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2005;10:1–8. <https://doi.org/10.1007/BF02931175>
98. Cacicedo, M.L., Castro, M.C., Servetas, I., Bosnea, L., Boura, K., Tsafrakidou, P., Dima, A. et al. Progress in Bacterial Cellulose Matrices for Biotechnological Applications. *Bioresour. Technol.* 2016;213:172–180 doi:10.1016/j.biortech.2016.02.071
99. Vasconcelos, N.F., Andrade, F.K., Vieira, L.d.A.P., Vieira, R.S., Vaz, J.M., Chevallier, P., Mantovani, D. et al. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose* 2020;27:3055–3083 <https://doi./10.1007/s10570-020-02966-5>
100. Antonopoulou I., Varriale S., Topakas E., Rova U., Christakopoulos P., Faraco V, Enzymatic synthesis of bioactive compounds with high potential for cosmeceutical application. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:6519–6543. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7647-9>
101. Montagna W., Van Scott E. J. The anatomy of the hair follicle. In the *Biology of Hair Growth*. New York: Academic Press; 1958
102. Χρυσομάλλης Φ. και συνεργάτες, *Δερματολογία Αφροδισιολογία, Θεσσαλονίκη: University Studio Press; 2005.*

103. Junqueira, L., Carneiro, J. Βασική ιστολογία. 7<sup>η</sup> Ελληνική έκδοση. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης; 2004
104. Botchkarev VA, et al: Molecular biology of hair morphogenesis: development and cycling. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 2003;298:(1):164-180 doi:10.1002/jez.b.33.
105. Stenn K. S., Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001;81(1):449-494 doi:10.1152/physrev.2001.81.1.449.
106. Sujitha P., Kavitha S., Shakilani S., Babu N.K.C, Shanth C. Enzymatic dehairing: A comprehensive review on the mechanistic aspects with emphasis on enzyme specificity. *Inter. J. of Biol. Macromolec.* 2018;118:168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.081>
107. Paus R, Costarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1999;341(7):491-497. doi:10.1056/NEJM199908123410706
108. Wang, B., Yang W., McKittrick J., Meyers M.A. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Prog. Mater. Sci.* 2016;76:229–318 <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
109. Kreplak L., Doucet J., Briki F. Unraveling double stranded  $\alpha$ helical coiled coils: An X-ray diffraction study on hard  $\alpha$ -keratin fibers. *Biopolymers* 2001;158(5):526–533. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(20010415\)58:5%3C526:AID-BIP1028%3E3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(20010415)58:5%3C526:AID-BIP1028%3E3).
110. Robbins C.R. *Chemical and Physical Behavior of Human Hair*. New York: Springer-Verlag; 1988.
111. Swift J.A., Bews. B. The chemistry of human hair cuticle. II. The isolation and amino acid analysis of the membranes and A-layer. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1974;25(7):1-15,
112. Poblet E, F., Jiménez F. The arrector pili muscle and the follicular unit of the scalp: a microscopic anatomy study. *Dermatol Surg* 2002;\_28(9):800-3. doi:10.1046/j.1524-4725.2002.02038.x
113. Stenn K.S., Sundberg J.P., Sperling L.C. Hair follicle biology, the sebaceous gland, and scarring alopecias. *Arch Dermatol* 1999;135(8):973-4. doi:10.1001/archderm.135.8.973
114. Chang H. Y. , Costarelis G. (2007). Turning skin into embryonic stem cells, *Nature Medicine* vol. 13(7):783–4 doi:10.1038/nm0707-783
115. Costarelis G. (2006). Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric View, *Journal of Investigative Dermatology* 126(7):1459-68 doi:10.1038/sj.jid.5700376
116. Jasti B.R., Abraham W., T. K. Ghosh T.K. 1st Edition *Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutics*. CRC Press; 2005
117. Maibach H., Honari G., *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*, Academic Press, Amsterdam, Boston, etc., 2014;1

118. Pagliara A., Reist M., Geinoz S., Carrupt PA., Testa B., Evaluation and Prediction of Drug Permeation. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999;51(12):1339-57. doi: 10.1211/0022357991777164
119. Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N., Sterry W. Hair Follicles—A Long-Term Reservoir for Drug Delivery. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006;19(4):232-6 doi: 10.1159/000093119
120. Otto A., Plessis J., Wiechers J.W. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *Int J Cosmet Sci.* 2009;31(1):1-19. doi: 10.1111/j.1468-2494.2008.00467.x
121. Prausnitz M.R., Mitragotri S., Langer R., Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(2):115-24. doi:10.1038/nrd1304
122. Wester R.C., Maibach H.I. Cutaneous Pharmacokinetics:10 Steps to percutaneous absorption, *Drug Metab Rev.* 1983;14(2):169-205. doi:10.3109/03602538308991388
123. Γιόκαρης Π. Θεραπευτικά Σχήματα - Κλινική Ηλεκτροθεραπεία. Αθήνα: Εκδόσεις Γράμμα Α.Ε. 2007.
124. Del Terzo S., Behl C.R., Nash R.A. Iontophoretic transport of a homologous series of ionized and nonionized model compounds: influence of hydrophobicity and mechanistic interpretation, *Pharm Res.* 1998;6(1):85-90. doi: 10.1023/a:1015812005467
125. Pikal M.J. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis, *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):281-305 doi:10.1016/s0169-409x(00)00138-1
126. Πρωτόπαπα, Ε. Φυσιοπαθολογία και Θεραπευτική Διαταραχών της Τριχοφυΐας. Αθήνα:εκδόσεις Παπαζήση; 2004
127. Gerson, J. Αποτρίχωση. Εργαστηριακός Οδηγός. Μετάφραση: Χατήρης Γ., Αθήνα: Ίων; 2004
129. Bhogal R.K., Mouser P.E., Higgins C.A., Turner G.A. Protease activity, localization and inhibition in the human hair follicle. *Int J Cosmet Sci.* 2014;36(1):46-53. doi: 10.1111/ics.12091
130. Yates, J. R. Studies in depilation. Part X: The mechanism of the enzyme depilation process. *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 1972;56:158-177. <http://hdl.handle.net/102.100.100/314613?index=1>
131. 76. Protopapa E., Gaissert H., Xenakis A., Avramiotis S., Stavrianeas N., Sekeris C.E., Schenkel J., Alonso A.: The effect of proteolytic enzymes on hair follicles of transgenic mice expressing the lac Z-protein in cells of the bulge region. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 1999;13(1):28-35. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.1999.tb00840.x>
132. Protopapa E., Tsigonia-Primikiriou A., Stavrianeas N.G. In vitro effects of trypsin, chymotrypsin and papain on the histopathology of guinea pig skin. *Rev Clinical Pharmacol Pharmacokin Internat Ed* 1994;8:134-136

133. Protopapa E., Xenakis A., Avramiotis S., Prodromou E.V., Koukaki, S.M. The epilatory effects of trypsin on human skin, applied via lecithin reverse micelles. *Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes International Edition* 1988;12:101-104.
134. Traversa E., Machado-Santelli G.M., Velasco MVR. Histological evaluation of hair follicle due to papain's depilatory effect. *Int. Jour. Pharm.* 2007;335:163-166. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.01.020
135. Fang Z., Yong Y., Zhang J., Du G., Chen J. Keratinolytic protease: a green biocatalyst for leather industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101(21):7771–7779 doi: 10.1007/s00253-017-8484-1