



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Ακαδημαϊκό Έτος: 2020-2021
Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών
Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

Διπλωματική εργασία

Επίδραση της παρουσίας ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή στους βιοχρωματογραφικούς δείκτες φαρμάκων με χρήση χρωματογραφίας ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής

Κατσάρας Φοίβος-Φώτιος

Επιβλέπων καθηγητής

Τσόπελας Φώτιος, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, 2021

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Μαρτίου 2021 – Σεπτεμβρίου 2021, στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα (I) Χημικών Επιστημών.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα πρωτίστως να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου και την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου προς τον επιβλέποντα καθηγητή, Δρ. Φώτιο Τσόπελα, τόσο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, όσο και την συνεχή υποστήριξη και ουσιαστική καθοδήγηση και ενθάρρυνση που μου παρείχε, καθ' όλη την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων και της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα, για την ουσιαστική βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την συνεχή στήριξη, την κατανόηση, καθώς και την ψυχολογική συμπαράσταση που μου προσέφεραν, όχι μόνο την περίοδο της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά σε όλη την φοιτητική μου σταδιοδρομία.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	8
Abstract	9
1. Θεωρητικό μέρος	10
1.1. Εισαγωγή	10
1.2. Φάρμακα	10
1.2.1. Γενικά.....	10
1.2.2. Ιστορική αναδρομή	10
1.2.3. Φαρμακοχημεία και ανάπτυξη νέων φαρμάκων.....	11
1.2.3.1. Κλινικές δοκιμές	12
1.2.4. Φαρμακοκινητική.....	14
1.2.4.1. Απορρόφηση (absorption)	14
1.2.4.2. Κατανομή (Distribution)	17
1.2.4.3. Μεταβολισμός (Metabolism)	18
1.2.4.4. Απέκκριση (Excretion).....	19
1.2.4.5. Τοξικότητα.....	19
1.2.5. Φαρμακοδυναμική.....	20
1.3. Λιποφιλία: Βασική φυσικοχημική ιδιότητα στον σχεδιασμό φαρμάκων.....	21
1.3.1. Διπλή φύση της λιποφιλίας.....	21
1.3.2. Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας	22
1.3.3. Ποσοτική έκφραση λιποφιλίας	23
1.3.3.1. Συντελεστής μερισμού P	23
1.3.3.2. Συντελεστής κατανομής D.....	23
1.3.3.3. Σύστημα n-οκτανόλης/νερού.....	24
1.3.4. Λιποφιλία αμφολυτών	25
1.4. Στατιστικές μέθοδοι	25
1.4.1. Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA)	26
1.4.2. Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	28
1.4.3. Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS).....	29
1.4.4. Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANN)	29
1.5. Χρωματογραφία	30
1.5.1. Γενικά.....	30

1.5.2. Λειτουργία.....	31
1.5.3. Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών.....	32
1.5.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	34
1.5.5. Βιομιμητική χρωματογραφία.....	36
1.5.5.1. Εισαγωγή.....	36
1.5.5.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM).....	37
1.5.5.3. Μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC).....	40
1.5.5.4. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (Immobilized Protein Chromatography).....	41
1.6. Human Serum Albumin (HSA).....	46
1.6.1. Γενικά-λειτουργία.....	46
1.6.2. Δομή.....	46
1.6.3. Δομικές περιοχές (domains).....	46
1.6.4. Μελέτες πρόβλεψης φαρμακοκινητικών παραμέτρων με χρήση υδροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών.....	47
1.6.4.1. Όγκος κατανομής.....	47
1.6.4.2. Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.....	48
1.6.4.3. Πρωτεϊνική σύνδεση.....	49
2. Πειραματικό μέρος.....	51
2.1. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας.....	51
2.1.1. Σκοπός.....	51
2.1.2. Πειραματική διαδικασία.....	51
2.1.2.1. Παρασκευή κινητής φάσης.....	51
2.1.2.2. Χρωματογραφική διαδικασία.....	51
2.2. Υλικά και μέθοδοι.....	52
2.2.1. Αντιδραστήρια.....	52
2.2.2. Οργανολογία.....	52
2.2.2.1. Χρωματογραφικό σύστημα.....	52
2.2.2.2. Σύστημα καθαρισμού νερού.....	53
2.2.3. Στατική φάση.....	54
2.2.4. Κινητή φάση.....	54
2.2.5. Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν.....	54
2.3 Βιβλιογραφικά δεδομένα.....	58
2.3.1. Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των μορίων.....	58

2.3.2. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών τύπου IAM.DD2 και ακινητοποιημένης A1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης.....	58
2.3.3. Δεδομένα για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων.....	61
2.4. Στατιστική ανάλυση.....	69
3. Αποτελέσματα.....	70
3.1 Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης $\log k$ με διαλύτη περιεκτικότητας, 0, και 5% ακετονιτρίλιο.....	70
3.2. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με φυσικοχημικά δεδομένα.....	72
3.2.1. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{wHSA}$ με τον συντελεστή $\log P$	72
3.2.2. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{5HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$	73
3.2.3. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{10HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$	74
3.2.4. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{wHSA}$ με τον συντελεστή $\log D$	76
3.2.5. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{5HSA}$ με τον συντελεστή $\log D$	77
3.2.6. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{10HSA}$ με τον συντελεστή $\log D$	78
3.3. Σύγκριση χρωματογραφικών συντελεστών $\log k_{wHSA}$ με αντίστοιχους συντελεστές άλλων ειδών βιομιμητικής χρωματογραφίας.....	80
3.3.1. Συσχέτιση με χρωματογραφική στήλη ακινητοποιημένων μεμβρανών τύπου IAM.DD2.....	80
3.3.2. Συσχέτιση με χρωματογραφική στήλη ακινητοποιημένης A1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP).....	82
3.4. Εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων.....	83
3.4.1. Πρόβλεψη έκτασης (ποσοστού) πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB (Plasma Protein Binding).....	83
3.4.1.1. Χρήση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας (apparent affinity constant) για 0%, 5% και 10% οργανικό διαλύτη.....	84
3.4.1.2. Χρήση μη γραμμικού μοντέλου για 0%, 5% και 10% οργανικό διαλύτη.....	88
3.4.1.3. Χρήση της τεχνικής PLS (Partial Least Square Analysis, Μερικά ελάχιστα τετράγωνα) για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	93
3.4.2. Πρόβλεψη του όγκου κατανομής (V_d).....	94
3.4.2.1. Συσχέτιση $\log V_d$ με τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_{wHSA}$ (για 100% υδατική φάση).....	95
3.4.2.2. Συσχέτιση $\log V_d$ με συντελεστή κατακράτησης χρωματογραφίας μεμβρανών $\log k_{IAM.DD2}$ και συντελεστή κατανομής $\log D$	97

3.4.2.3. Χρήση της τεχνικής PLS (Partial Least Square Analysis, Μερικά ελάχιστα τετράγωνα) για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής	98
4. Συμπεράσματα	100
5. Προτάσεις.....	102
6. Βιβλιογραφία.....	103

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1. Πορεία ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου ⁷	13
Εικόνα 2. Απεικόνιση του μνημονικού κανόνα των 5 του Lipinski ¹⁶	17
Εικόνα 3. Η φαρμακοκινητική φάση των φαρμάκων ²⁵	19
Εικόνα 4. Κωδωνοειδής καμπύλη logD/pH αμφολύτη που σχηματίζει εσωτερικό άλας ³	25
Εικόνα 5: (α) Διάγραμμα που εξηγεί τις δύο βασικές συνιστώσες PC1 και PC2 για τις δυο μεταβλητές X1 και X2. (β) Σημεία στους άξονες: τα γαλάζια δηλώνουν τα αρχικά σημεία και τα λευκά τις προβολές τους στους άξονες. ³⁷	29
Εικόνα 6. Απλό νευρωνικό δίκτυο ³	30
Εικόνα 7. Το πείραμα του Tswett ³⁹	31
Εικόνα 8. Αρχή διαχωρισμού συστατικών μείγματος με την τεχνική της χρωματογραφίας, Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αχιστείας των συστατικών με την κινητή και στατική φάση. Αναπαρίστανται η πορεία μορίων δύο διαφορετικών ουσιών διαμέσου μίας στήλης. Το μπλε μόριο κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και συνεπώς παρασύρεται από αυτήν ταχύτερα, διότι δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση. Αντίθετα το κίτρινο μόριο αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται. Κατά συνέπεια το κίτρινο συστατικό θα κινείται βραδύτερα από το μπλε, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. ⁴⁰	32
Εικόνα 9. Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC. ⁴⁰	36
Εικόνα 10. Δομές στατικών φάσεων των εμπορικά διαθέσιμων στηλών IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2. Για λόγους σύγκρισης απεικονίζεται και η δομή της στήλης IAM.PC.DD, η οποία δεν είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμη. ⁴⁷	39
Εικόνα 11. Αναπαράσταση της δομής της HSA. ⁷⁰	47
Εικόνα 12. Υγροχρωματογραφικό σύστημα Flexar (Perkin Elmer)	53
Εικόνα 13. Σύστημα καθαρισμού νερού ThermoScientific BarnsteadEasypurell ⁷⁸	54

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Ανάπτυξη της Φαρμακευτικής Έρευνας ³	11
Πίνακας 2. Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους ^{80,81}	55
Πίνακας 3. Δεδομένα λιποφιλίας (logP, logD ^{7,4}) και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου (F ⁺ , F ⁻)	58
Πίνακας 4. Πρόσθετα δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών σε στήλη IAM.PC.DD2 και ακινητοποιημένης πρωτεΐνης AGP	59
Πίνακας 5. Πρόσθετα δεδομένα συντελεστών κατακράτησης στηλών HSA και AGP	61
Πίνακας 6. Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από διαφορετικά είδη μικυλλιακής χρωματογραφίας (100% υδατική φάση).....	64

Πίνακας 7. Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης, όγκου κατανομής, συντελεστών μερισμού και κατανομής, σταθερών A και B (Abraham), τοπολογικής πολικής επιφάνειας TPSA, μοριακού βάρους, κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου	67
Πίνακας 8. Συντελεστές κατακράτησης, $\log k$, για συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου 0, 5 και 10% στην κινητή φάση και συντελεστές κατακράτησης από γραμμική προεκβολή, $\log k_w(extr.)HSA$	71
Πίνακας 9. Πειραματικοί και από γραμμική προεκβολή χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$	71
Πίνακας 10. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.15) στα δεδομένα ελέγχου	85
Πίνακας 11. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.16) στα δεδομένα ελέγχου	86
Πίνακας 12. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.17) στα δεδομένα ελέγχου	87
Πίνακας 13. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.19) στα δεδομένα ελέγχου.....	89
Πίνακας 14. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.20) στα δεδομένα ελέγχου.....	91
Πίνακας 15. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.21) στα δεδομένα ελέγχου.....	92
Πίνακας 16. Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου πρόβλεψης πρωτεϊνικής σύνδεσης μέσω χρήσης τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων	94
Πίνακας 17. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.22) στα δεδομένα ελέγχου.....	96
Πίνακας 18. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.23) στα δεδομένα ελέγχου.....	98
Πίνακας 19. Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου όγκου κατανομής μέσω χρήσης τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων.....	99

Ευρετήριο διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Γραφική παράσταση $\log k_w HSA$ συναρτήσεως του $\log P$	73
Διάγραμμα 2. Γραφική παράσταση $\log k_5 HSA$ συναρτήσεως του $\log P$	74
Διάγραμμα 3. Γραφική παράσταση $\log k_{10} HSA$ συναρτήσεως του $\log P$	75
Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση $\log k_w HSA$ συναρτήσεως του $\log D$	76
Διάγραμμα 5. Γραφική παράσταση $\log k_5 HSA$ συναρτήσεως του $\log D$	77
Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση $\log k_{10} HSA$ συναρτήσεως του $\log D$	78
Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση $\log k_w HSA$ συναρτήσεως του $\log k_{IAM}$	81
Διάγραμμα 8. Γραφική παράσταση $\log k_w HSA$ συναρτήσεως του $\log k_{AGP}$	82
Διάγραμμα 9. Συσχέτιση $\log V_{d,train}$ με $\log k_w HSA$	96

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η έκλυση 23 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης με χρήση υγρής χρωματογραφίας ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης ορού (HSA). Ως κινητή φάση, χρησιμοποιήθηκε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) σε pH= 7,0 , παρουσία ακετονιτριλίου σε συγκεντρώσεις 5 και 10%. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση PBS χωρίς ακετονιτρίλιο (100% κινητή φάση). Υπολογίστηκαν, στην συνέχεια, οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k$ με βάση τα πειραματικά δεδομένα, καθώς και οι συντελεστές $\log k_{w(\text{extr.})}^{\text{HSA}}$ που προέκυψαν μέσω γραμμικής προεκβολής. Έπειτα, οι συντελεστές κατακράτησης συγκρίθηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής σε σύστημα οκτανόλης/νερού, $\log P$ και $\log D$, αντίστοιχα, οι οποίοι εκφράζουν την λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων. Διαπιστώθηκε πως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις έχουν σημαντική επίδραση στην κατακράτηση των φαρμάκων από την χρωματογραφική στήλη. Παράλληλα, η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων διερευνήθηκε μέσω της εισαγωγής των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , στις εξισώσεις συσχέτισης με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής. Επίσης, βρέθηκε ότι οι συντελεστές $\log k$ συσχετίζονται καλύτερα με το συντελεστή $\log P$, συγκριτικά με το συντελεστή $\log D$, καθώς ο δεύτερος λαμβάνει υπόψη και τον ιονισμό των φαρμακευτικών ενώσεων. Εν συνεχεία, οι χρωματογραφικοί συντελεστές της HSA συσχετίστηκαν με χρωματογραφικούς δείκτες χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (τύπου IAM.DD2) και ακινητοποιημένης πρωτεΐνης AGP. Επιβεβαιώθηκε, από τις σχέσεις που προέκυψαν, πως ο μηχανισμός έκλυσης από τις στήλες είναι κοινός και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την λιποφιλία. Τέλος, αναπτύχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων με χρήση δεδομένων συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία HSA. Ειδικότερα, μελετήθηκε το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης (PPB%) και ο όγκος κατανομής (V_d). Ένα από τα μοντέλα σε κάθε περίπτωση, προέκυψε μέσω χρήσης της τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Τελικά, για το PPB%, τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει το μοντέλο που βασίζεται στη φαινόμενη σταθερά συγγένειας ($\log K$). Όσον αφορά τον V_d , καλύτερο ποσοστό σωστών προβλέψεων έχει το μοντέλο που χρησιμοποιεί δεδομένα συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία HSA, για 100% υδατική φάση.

Λέξεις κλειδιά: βιομιμητική χρωματογραφία, χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού, χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης, λιποφιλία, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής

Abstract

In the present diploma thesis, the retention behaviour of 23 diverse, in structure and pharmacological activity, drugs was unraveled using liquid chromatography on a human serum albumin (HSA) stationary phase. The mobile phase consisted of phosphate buffer saline (PBS) at pH=7.0, with the addition of acetonitrile at concentrations 0, 5 and 10% as the organic modifier. The $\log k$ values were then calculated based on the experimental data, while retention factors corresponding to pure (100%) aqueous phase were obtained by actual measurement or/ and by linear extrapolation using different acetonitrile fractions. Retention factors were then correlated with n-octanol/ water partition ($\log P$) and distribution ($\log D$) coefficient. It was found that hydrophobic interactions have a crucial effect in drugs' retention by the chromatographic column. The effect of ionization and the contribution of electrostatic interactions in the underlying elution mechanism was explored upon inclusion of positively and negatively charged molecular fraction, F^+ and F^- respectively, in the $\log k/\log P$ and $\log k/\log D$ relationships. It was also found that the $\log k$ coefficients correlated better with the $\log P$ coefficient, compared to the $\log D$ coefficient, as the latter takes into account the ionization of the pharmaceutical compounds. Subsequently, the $\log k$ coefficients of immobilized HSA chromatography were correlated with the corresponding ones measured on an immobilized artificial membrane (IAM.DD2) as well on an immobilized alpha-1 acid glycoprotein (AGP) stationary phase. It was confirmed that the elution mechanism from the columns is common and depends largely on lipophilicity. Finally, models for predicting pharmacokinetic properties were developed using retention coefficient data from HSA chromatography. In particular, the percentage of plasma protein binding (PPB%) and the volume of distribution (V_d) were studied. One of the models in each case, emerged through the use of Partial Least Square Analysis (PLS) technique. As for %PPB, the model based on the apparent affinity constant ($\log K$) shows the best results, and as for V_d , the model that uses HSA chromatography retention coefficient data in the absence of an organic modifier (100% aqueous phase) has a better predictive performance.

Keywords: biomimetic chromatography, immobilized protein chromatography, human serum albumin, chromatographic retention coefficients, lipophilicity, protein binding, volume of distribution

1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως αντικείμενο τη διερεύνηση της επίδρασης του οργανικού διαλύτη στους χρωματογραφικούς δείκτες κατά τη βιομηχανική χρωματογραφία ανθρώπινης λευκωματίνης. Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων αποτελεί μια πολυβηματική διαδικασία που συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά αποτυχίας των υποψήφιων φαρμάκων. Επομένως, είναι ανάγκη να αναπτυχθούν τρόποι και τεχνικές εκτίμησης των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων φαρμακευτικών ενώσεων, ώστε να υποψήφια φάρμακα που πρόκειται να αποτύχουν, να απορρίπτονται σε όσο το δυνατόν πιο πρώιμο στάδιο και να μην συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές, οι οποίες ανεβάζουν κατακόρυφα το συνολικό κόστος. Ένα παράδειγμα τέτοιας τεχνικής αποτελεί η βιομηχανική χρωματογραφία ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού, η οποία και εκτελέστηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και στηρίζεται στην υπόθεση πως η ανθρώπινη λευκωματίνη προσδεδεμένη σε υπόστρωμα πυριτίας διατηρεί την ίδια διαμόρφωση και την ίδια ειδικότητα να δεσμεύει χημικές ενώσεις σε συγκριτικά με την φυσική λευκωματίνη που βρίσκεται διαλυμένη στο πλάσμα του αίματος.

1.2. Φάρμακα

1.2.1. Γενικά

Ως φάρμακο χαρακτηρίζεται κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που έχει θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες έναντι ασθενειών που εμφανίζονται στον άνθρωπο, αλλά και σε ζώα και φυτά. Κατ' επέκταση, φάρμακο θεωρείται κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που δύναται να χορηγηθεί σε άνθρωπο, με σκοπό να γίνει ιατρική διάγνωση ή να αποκατασταθούν, να βελτιωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες στον άνθρωπο. Κυκλοφορεί κατόπιν έγκρισης από τις αρμόδιες αρχές και διανέμεται σε τυποποιημένη μορφή με φύλλο οδηγιών χρήσης και περίληψη με τα χαρακτηριστικά του.¹

1.2.2. Ιστορική αναδρομή

Ο άνθρωπος, από τα αρχαιότερα χρόνια, επιχείρησε να θεραπεύσει διάφορες ασθένειες χρησιμοποιώντας φυσικά προϊόντα που προέρχονταν από ζώα ή φυτά, μασώντας για παράδειγμα, χόρτα, καρπούς, ρίζες ή και φλοιούς δέντρων, διαφόρων ειδών. Επομένως, η θεραπευτική ήταν κατά κύριο λόγο εμπειρική. Κάποιες από αυτές τις θεραπείες ήταν επιτυχείς, ωστόσο πολλά από τα φυσικά προϊόντα εμφάνιζαν υψηλή τοξικότητα. Μόλις πριν από 150 χρόνια ο άνθρωπος ξεκίνησε να αποκτά γνώσεις σχετικά με τα δραστικά συστατικά που περιέχονται σε φυσικά προϊόντα, οπότε και μπόρεσε αργότερα να συνθέσει φαρμακευτικές ενώσεις στο εργαστήριο.²

Σταθμό στην ιστορία των φαρμάκων αποτέλεσε η δημοσίευση το 1806 του ερασιτέχνη φαρμακοποιού Friedrich Sertürner (1783-1841) σχετικά με την απομόνωση ενός αλκαλοειδούς σε κρυσταλλική μορφή από το όπιο, το κόμμα δηλαδή που εκκρίνεται από ένα είδος παπαρούνας, το *Papaver somniferum*.³

Στο δεύτερο μισό του 19^{ου} αιώνα άρχισαν να απομονώνονται βιολογικά ενεργά μόρια, σε σχετικά καθαρή μορφή για ιατρική χρήση. Για παράδειγμα, ο πρόδρομος της ασπιρίνης, το σαλικυλικό οξύ, απομονώθηκε το 1874 από τον φλοιό μιας ιτιάς. Στο διάστημα αυτό, ανακαλύφθηκαν τα πρώτα συνθετικά φάρμακα, γεγονός που αποτέλεσε την βάση τόσο για την ανάπτυξη της ιατρικής ως προς τη συμπτωματική αντιμετώπιση των ασθενειών, όσο και της φαρμακευτικής βιομηχανίας.

Στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα η σύνθεση οργανικών ενώσεων ως πιθανών υποψήφιων φαρμάκων γνώρισε ραγδαία εξέλιξη, με την ίδρυση της σύγχρονης φαρμακευτικής βιομηχανίας να τοποθετείται στο 1930, αν και πολλές πολυεθνικές εταιρείες είχαν ξεκινήσει ήδη από τα μέσα του 1800 ως τοπικά φαρμακεία. Ταυτόχρονα, ξεκίνησαν τα πειράματα για τη φαρμακολογική δράση σε ζώα και στη συνέχεια, με την εξέλιξη της βιολογίας, σε απομονωμένα όργανα, κυτταροκαλλιέργειες, ένζυμα ή μεμβράνες, προκειμένου ένα υποψήφιο φάρμακο να κριθεί κατάλληλο για κλινικές μελέτες στον άνθρωπο.

Την δεκαετία του 1950 έγινε αποκωδικοποίηση του DNA (1953), γεγονός που αποτέλεσε την βάση για την ανακάλυψη αντικών φαρμάκων, ενώ η δεκαετία του 1960 αποτέλεσε την φαρμακευτική δεκαετία του αιώνα. Η ενίσχυση της τεχνολογίας της πληροφορικής και η κατανόηση της αιτιολογίας των ασθενών, συνέβαλαν στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων, με πιο επιστημονικό τρόπο.⁴

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται συνοπτικά η ραγδαία εξέλιξη της φαρμακευτικής έρευνας ως προς τα χρησιμοποιούμενα υλικά για την παρασκευή φαρμάκων, αλλά και ως προς τα συστήματα ελέγχου της δράσης τους.³

Πίνακας 1. Ανάπτυξη της Φαρμακευτικής Έρευνας³

Χρονολογία	Υλικά	Συστήματα Έλεγχου
Αρχαιότητα	Φυτά, δηλητήρια, ορυκτά	Άνθρωπος
1806	μορφίνη	Άνθρωπος, ζώα
1899	ασπιρίνη	
1920	Συνθετικές ενώσεις	Ζώα, απομονωμένα όργανα
1970		Ένζυμα, μεμβράνες
1990	Συνδυαστική Χημεία Βιβλιοθήκες ενώσεων Βιολογικά προϊόντα	Ανθρώπινες πρωτεΐνες, HTS, VS, χημειοπληροφορική, βιοπληροφορική

1.2.3. Φαρμακοχημεία και ανάπτυξη νέων φαρμάκων

Η συντριπτική πλειοψηφία των νέων φαρμάκων είναι αποτέλεσμα έρευνας από την φαρμακευτική βιομηχανία και βασίζεται στην εκτεταμένη προσπάθεια κατανόησης των μηχανισμών των νόσων. Η διαδικασία ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου διαρκεί πολλά χρόνια (10-15 έτη κατά μ.ό.) και απαιτεί σημαντικούς οικονομικούς πόρους.

Ειδικότερα, τα υποσχόμενα νέα μόρια, αρχικά υποβάλλονται σε δοκιμές σε ζωικά πειραματικά πρότυπα (αλλά όλο και περισσότερο σε *in vitro* συστήματα προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός των πειραματόζων) και προσδιορίζονται οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητές τους, καθώς και πιθανή τοξικότητα. Ο στόχος αυτής της προκλινικής ανάπτυξης είναι να εκπληρωθούν όλες οι προϋποθέσεις που πρέπει να τηρούνται, προκειμένου μια νέα φαρμακευτική ουσία να θεωρηθεί έτοιμη, ώστε να δοκιμαστεί για πρώτη φορά στον άνθρωπο.⁵ Δηλαδή, καθώς οι μελέτες στα πειραματόζα δεν προβλέπουν πάντα την δράση στους ανθρώπους, τα φάρμακα που έχουν παρουσιάσει πιθανότητα θεραπευτικού οφέλους εξετάζονται στη συνέχεια σε ανθρώπους.⁶ Έτσι, η πιο πολύπλοκη, χρονοβόρα και ακριβή φάση ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου είναι η διαδικασία των κλινικών δοκιμών σε υγιείς και ασθενείς εθελοντές.

1.2.3.1. Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές αποτελούν μια σημαντική και εξαιρετικά εξειδικευμένη μορφή βιολογικού προσδιορισμού, οι οποίες έχουν στόχο να μετρήσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα.⁵ Όταν κατοχυρωθεί η πατέντα ενός νέου υποψηφίου φαρμάκου, ξεκινά η διαδικασία των κλινικών δοκιμών σε ανθρώπους, η οποία περιλαμβάνει γενικά τέσσερις φάσεις, η ακριβής διάρκεια και το μέγεθος των οποίων καθορίζονται από την φύση του φαρμάκου και τις προτεινόμενες θεραπευτικές ενδείξεις.

Στη **Φάση I** το φάρμακο δοκιμάζεται σε μικρό αριθμό υγιών εθελοντών (20-100 εθελοντές) και κύριος στόχος είναι να διαπιστωθεί αν είναι ασφαλές για τον άνθρωπο. Ακόμα οι δοκιμές αυτές εξετάζουν τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του φαρμάκου και περιλαμβάνουν τη χρήση διάφορων δόσεων. Έπειτα, μελετάται χορήγηση επαναλαμβανομένων δόσεων, καθώς και άλλοι παράγοντες όπως η επίδραση των τροφίμων στην απορρόφηση.^{6,7}

Στη **Φάση II** οι μελέτες διεξάγονται σε μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών ασθενών - συνήθως από 100 έως 500 ασθενείς- και σχεδιάζονται έτσι, ώστε να ελέγξουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στην κλινική κατάσταση για την οποία προορίζεται και, αν αυτό επιβεβαιωθεί, να καθορίσουν τη δόση που θα χρησιμοποιηθεί στην τελική μελέτη φάσης III. Αξίζει να σημειωθεί πως όταν μελετώνται φάρμακα που δρουν σε έναν μοριακό στόχο, η ερευνητική ομάδα δεν μαθαίνει, παρά μόνο όταν τελειώσει το στάδιο αυτό, εάν η αρχική της υπόθεση ήταν σωστή, ενώ η απουσία της αναμενόμενης αποτελεσματικότητας αποτελεί συχνή αιτία αποτυχίας του φαρμάκου στο στάδιο αυτό.^{5,7}

Οι μελέτες της **Φάσης III** είναι οι καθοριστικές, τυχαιοποιημένες και ελεγχόμενες, διπλές τυφλές, κλινικές δοκιμές, που διενεργούνται σε χιλιάδες ασθενείς (συνήθως από 1.000 έως 5.000 ασθενείς ή και περισσότερων) και έχουν ως στόχο τη σύγκριση του νέου φαρμάκου με τα ήδη χρησιμοποιούμενα στην κλινική πράξη εναλλακτικά φάρμακα. Σε αυτή την φάση διεξάγεται επίσης μελέτη σε ειδικές ομάδες ασθενών, π.χ. ηλικιωμένοι, ασθενείς με νεφρική νόσο, κ.λπ.. Ακόμα, οι ερευνητές διερευνούν και επιζητούν να αποδείξουν, με σαφή κλινικά και στατιστικά δεδομένα, αν το

φάρμακο πληροί τις προϋποθέσεις ασφάλειας και αποτελεσματικότητας, προκειμένου να εγκριθεί από τις αρμόδιες υπηρεσίες υγείας. Δεν είναι σπάνιο ένα φάρμακο που φαινόταν πολύ αποτελεσματικό στη μικρή ομάδα ασθενών της φάσης II να αποδειχθεί πολύ λιγότερο εντυπωσιακό με τα αυστηρότερα κριτήρια των κλινικών δοκιμών της φάσης III.^{5,6,7}

Αίτηση χορήγησης άδειας κυκλοφορίας : Στο τέλος της φάσης III, εάν όλες οι μελέτες δείξουν ότι το φάρμακο είναι αποτελεσματικό και ασφαλές συγκρινόμενο με τις υπάρχουσες θεραπείες, η φαρμακοβιομηχανία υποβάλλει τον φάκελο του φαρμάκου στην αρμόδια αρχή που θα χορηγήσει την άδεια κυκλοφορίας. Ο απαιτούμενος φάκελος περιλαμβάνει με κάθε λεπτομέρεια όλα τα στοιχεία που προέκυψαν από τις προκλινικές και κλινικές μελέτες. Η αύξηση του ποσοστού των σκευασμάτων που εισέρχονται στη φάση I και τελικά εγκρίνονται, αποτελεί μία από τις κύριες προκλήσεις για την φαρμακευτική βιομηχανία.⁵

Μετά την κυκλοφορία ενός φαρμάκου στην αγορά, συνεχίζουν να διεξάγονται κλινικές μελέτες **Φάσης IV (φαρμακοεπαγρύπνηση)** , με σκοπό την ανίχνευση σπάνιων ή καθυστερημένης εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών, που αναδύονται όταν το φάρμακο χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη σε πολλές χιλιάδες ασθενών. Για παράδειγμα, καθώς ο μέσος αριθμός ατόμων που μελετώνται πριν κυκλοφορήσει ένα νέο φάρμακο είναι περίπου 3.000, οι σπανιότερες παρενέργειες, όπως μια επίπτωση 1 σε 10.000, δεν θα έχουν προσδιοριστεί. Η εμφάνιση τέτοιων ενεργειών είναι πιθανό να έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρήσης του φαρμάκου σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών ή ακόμη και την απόσυρση του φαρμάκου από την αγορά. Επίσης, στη φάση IV ελέγχεται η ασφάλεια (κυρίως) και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε συνθήκες συνήθους κλινικής πρακτικής.^{6,7}

Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται σχηματικά όλη η πορεία της ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου:



Εικόνα 1. Πορεία ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου⁷

1.2.4. Φαρμακοκινητική

Απαραίτητες προϋποθέσεις για την εμφάνιση κάποιας συστηματικής φαρμακολογικής δράσης είναι η διάλυση και η απορρόφηση των δραστικών συστατικών ενός φαρμακευτικού προϊόντος. Έτσι, για να είναι αποτελεσματικό ένα φάρμακο, πρέπει παραμένει κατάλληλο χρόνο μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό, προκειμένου να επιδράσει με τον αντίστοιχο φαρμακολογικό στόχο. Οι πρωτεύοντες φαρμακολογικοί στόχοι ανήκουν σε τέσσερα βασικά είδη ρυθμιστικών πρωτεϊνών: υποδοχείς, ένζυμα, μεταφορικά μόρια (μεταφορείς) και κανάλια ιόντων. Ακόμα, πολλά φάρμακα δεσμεύονται σε πρωτεΐνες του πλάσματος (εκτός των πρωτευόντων στόχων τους) και άλλες ιστικές πρωτεΐνες, χωρίς να προκαλούν εμφανείς φυσιολογικές επιδράσεις.

Ανεξάρτητα από τον τρόπο χορήγησης, η τελική είσοδος του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος καθορίζεται από την διάβαση ποικίλων φραγμών, με την μορφή κυρίως βιολογικών μεμβρανών. Αυτό ισχύει και για την ενεργητική ή παθητική απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό.^{7,8} Η διαχείριση των μορίων ενός φαρμάκου από τον οργανισμό (που περιλαμβάνει και τους προαναφερόμενους φραγμούς), αφορά στο πεδίο της φαρμακοκινητικής και χωρίζεται σε τέσσερα στάδια:

- Απορρόφηση από το σημείο χορήγησης
- Κατανομή στον οργανισμό
- Μεταβολισμός
- Απέκκριση

Οι παραπάνω ιδιότητες περιγράφονται συνοπτικά με το ακρωνύμιο ADME, από τα αρχικά των αντίστοιχων όρων, και η κατανόησή τους για μια ένωση αποτελεί την βάση στο σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων.⁹

Ειδικότερα, η φαρμακοκινητική μπορεί να οριστεί ως η μέτρηση και η ερμηνεία των μεταβολών τη συγκέντρωσης ενός φαρμάκου με την πάροδο του χρόνου σε μια ή περισσότερες περιοχές του σώματος, ανάλογα με την δοσολογία («τι κάνει ο οργανισμός στο φάρμακο») και περιλαμβάνει:

- τον ρυθμό και τον βαθμό στον οποίο τα φάρμακα απορροφώνται στο σώμα και κατανέμονται στους ιστούς του σώματος
- τον ρυθμό και τις οδούς με τις οποίες τα φάρμακα αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω μεταβολισμού και απέκκρισης
- η σχέση μεταξύ χρόνου και συγκέντρωσης φαρμάκου στο πλάσμα.¹⁰

1.2.4.1. Απορρόφηση (*absorption*)

Η απορρόφηση ορίζεται ως η μεταφορά του μη μεταβολισμένου φαρμάκου από τη θέση χορήγησης του στο σύστημα κυκλοφορίας του αίματος.¹¹ Η ταχύτητα και η αποδοτικότητα της απορρόφησης εξαρτώνται από την οδό χορήγησης.¹² Οι κύριες οδοί χορήγησης είναι:

- Από του στόματος
- Υπογλώσσια
- Από το ορθό
- Με εφαρμογή σε άλλες επιθηλιακές επιφάνειες (π.χ. δέρμα)
- Εισπνοή
- Ένεση (υποδόρια, ενδομυϊκή, ενδοφλέβια, ενδοθηκική, ενδοϋλώδης)

Τα περισσότερα φάρμακα λαμβάνονται από του στόματος με κατάποση, καθώς είναι ο πλέον αποδεκτός από τους ασθενείς τρόπος λήψης φαρμακευτικών ουσιών. Ωστόσο, είναι και ο πιο περίπλοκος για να μελετηθεί ένα φάρμακο. Ειδικότερα, κατά τη λήψη ενός φαρμάκου από το στόμα, αυτό διαλυτοποιείται από την φαρμακοτεχνική μορφή του και μετακινείται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, ξεκινώντας από τον οισοφάγο, στο ισχυρά όξινο στομάχι, στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ, φτάνοντας τελικά στην κυκλοφορία του αίματος. Πρέπει να σημειωθεί, πως το μη διαλυτοποιημένο φάρμακο δεν απορροφάται. Ακόμα, παρατηρείται το φαινόμενο πρώτης διόδου, δηλαδή ο μεταβολισμός που υφίσταται το φάρμακο κατά την διέλευσή από το εντερικό τοίχωμα και κυρίως από το ήπαρ πριν την απορρόφησή του.¹² Όπως είναι λογικό, το φάρμακο καλείται να διαπεράσει τις ημιπερατές λιπιδικές κυτταρικές μεμβράνες προκειμένου να απορροφηθεί. Αυτά τα βιολογικά εμπόδια υπάρχουν για να επιτρέπουν ή να αναστέλλουν επιλεκτικά τη διέλευση φυσικών και ξένων ουσιών.¹³ Επομένως, ένας παράγοντας που επηρεάζει το ρυθμό και τον βαθμό απορρόφησης είναι η λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου, η οποία καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από παράγοντες όπως το μοριακό βάρος και η δομή. Έτσι, τα μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος (π.χ. πρωτεΐνες) και τα πολύ πολικά μόρια, δεν περνούν εύκολα μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό εξηγείται από την δομή της εσωτερικής επιφάνειας των μεμβρανών, η οποία αποτελείται από αλυσίδες υδρογονανθράκων και λιπιδίων, τα άκρα των οποίων είναι μη πολικά και δημιουργούν ένα υδρόφοβο φράγμα, αδιαπέραστο από πολικά μόρια.¹⁴ Επιπρόσθετα, καθώς τα περισσότερα φάρμακα είναι ασθενή οξέα ή βάσεις, ο ιονισμός τους εξαρτάται από το pH στο οποίο βρίσκονται. Ο γαστρεντερικός σωλήνας εμφανίζει διαβάθμιση pH, οπότε και οι ασθενείς βάσεις προβλέπεται να απορροφώνται καλύτερα από το λεπτό έντερο, ενώ τα ασθενή οξέα από το στομάχι.

Βιοδιαθεσιμότητα

Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο κλάσμα της δόσης ενός φαρμάκου που περνά αναλλοίωτο στη συστηματική κυκλοφορία μετά από χορήγηση από του στόματος, συνυπολογίζοντας τόσο την απορρόφηση, όσο και τον μεταβολισμό πρώτης διόδου που προαναφέρθηκε. Όταν ένα φάρμακο χορηγείται ενδοφλέβια, εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία το 100% της δόσης και η βιοδιαθεσιμότητα

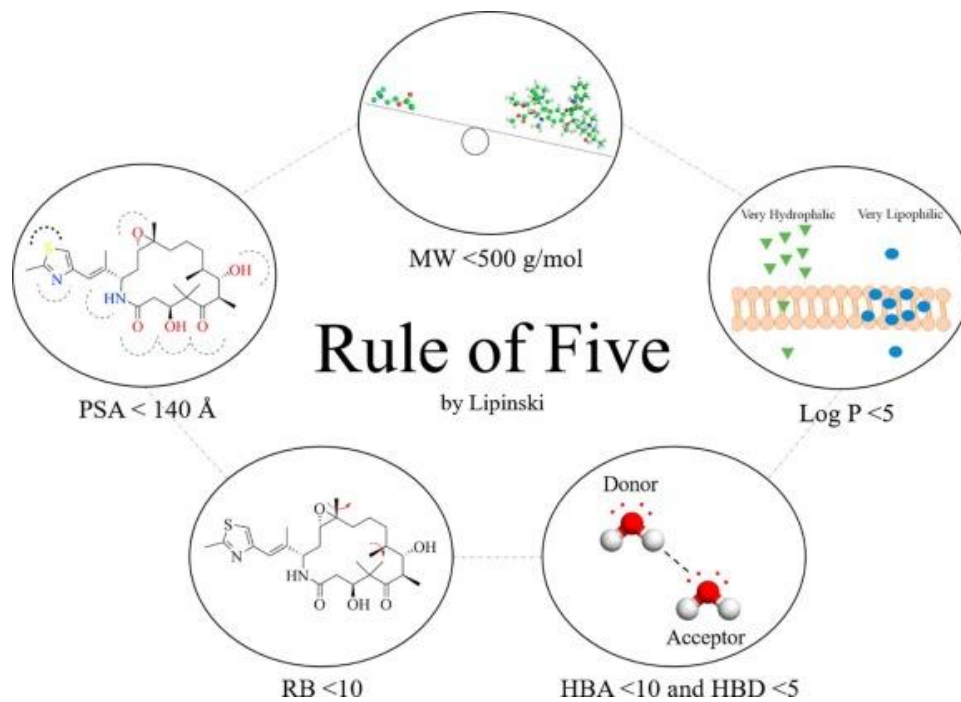
ισούται με 1.0 . Έτσι, η βιοδιαθεσιμότητα φαρμάκου μετά από χορήγηση από το στόμα ισούται με το εμβαδό κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης του φαρμάκου (Area Under Curve, AUC) προς την AUC μετά την ενδοφλέβια χορήγηση. Η βιοδιαθεσιμότητα δεν είναι απόλυτο χαρακτηριστικό του φαρμακευτικού παρασκευάσματος, αλλά επηρεάζεται και από διαφοροποιήσεις της ενζυμικής δραστηριότητας του εντερικού τοιχώματος ή του ήπατος, του γαστρικού pH και της κινητικότητας του γαστρεντερικού. Ουσιαστικά, αποτελεί έναν ποσοτικό προσδιορισμό της ικανότητας απορρόφησης κάθε φαρμάκου.¹⁵

Κανόνας των 5 του Lipinski

Όπως έχει προαναφερθεί, ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης φαρμάκων είναι από το στόμα. Για αυτό και έχει βρεθεί ένας εμπειρικός (μνημονικός) κανόνας, γνωστός ως κανόνας των 5 του Lipinski, σύμφωνα με τον οποίο, για μια ένωση αποτελούν ευνοϊκά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση από το στόμα τα εξής:

- Έχει μοριακό βάρος (MW) μικρότερο από 500.
- Έχει λιγότερους από 5 δότες δεσμών υδρογόνου (HBD).
- Έχει λιγότερους από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA).
- Έχει συντελεστή μερισμού logP στο σύστημα οκτανόλης νερού μικρότερο από 5 (δηλαδή υψηλή λιποφιλία). (βλ. Ενότητα 1.3.3.1)

Σε περίπτωση που μία ένωση αντιτίθεται σε τουλάχιστον 2 από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τότε αναμένεται να παρουσιάσει πρόβλημα στην απορρόφηση, την διαλυτότητα και γενικότερα στην βιοδιαθεσιμότητα. Ο κανόνας του Lipinski είναι σημαντικός στην αποφυγή δαπανηρών προκλινικών και κλινικών μελετών, οι οποίες δεν θα οδηγούσαν σε αποτελεσματικά φάρμακα.¹⁶



Εικόνα 2. Απεικόνιση του μνημονικού κανόνα των 5 του Lipinski ¹⁶

1.2.4.2. Κατανομή (Distribution)

Όταν ένα φάρμακο απορροφηθεί και έχει εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, ακολουθεί η κατανομή του στους ιστούς του σώματος και ειδικότερα σε αυτούς που πρόκειται να παρουσιάσει την δράση του. Η κατανομή είναι άνιση ανάμεσα στα υδατικά διαμερίσματα του σώματος (διαμέρισμα πλάσματος, εξωκυττάριο υγρό, συνολικό ύδωρ), λόγω των διαφορών που έχουν στον ρυθμό αιμάτωσης, στη σύνθεση των ιστών (π.χ. την περιεκτικότητα σε λιπίδια), στο pH, αλλά και στη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμα, ο ρυθμός εισόδου ενός φαρμάκου σε ένα ιστό εξαρτάται από παράγοντες όπως ο ρυθμός ροής του αίματος προς τον ιστό, η μάζα του ιστού και η λιποφιλία του φαρμάκου.¹⁷

Σχετικά με την σύνδεση ενός φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος, η δέσμευση είναι αντιστρεπτή και τα κλάσματα δεσμευμένου και ελεύθερου φαρμάκου βρίσκονται σε ισορροπία. Το ελεύθερο φάρμακο είναι ικανό να διαπερνά τις μεμβράνες, οπότε και διαχέεται στους ιστούς και φτάνει στα σημεία δράσης του, επομένως το φαρμακολογικό αποτέλεσμα οφείλεται στο μη δεσμευμένο φάρμακο. Τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται κυρίως από την λευκωματίνη (αλβουμίνη του ορού), ενώ τα βασικά φάρμακα κυρίως από την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη.^{5, 18}

Ένα χρήσιμο μέγεθος για την κατανομή των φαρμάκων είναι ο όγκος κατανομής, που εκφράζει τον υποθετικό όγκο στον οποίο διαλύονται τα φάρμακα εντός του οργανισμού και ισούται με τον λόγο του ποσού ενός φαρμάκου στο σώμα προς την συγκέντρωσή του στο πλάσμα. Αν ο όγκος κατανομής είναι μεγάλος σημαίνει ότι το φάρμακο παρουσιάζει ισχυρή σύνδεση στους ιστούς, ενώ αν η τιμή του τείνει στον όγκο του πλάσματος, συμβαίνει το αντίθετο. Η έννοια του όγκου κατανομής στηρίζεται στην υπόθεση πως τα φάρμακα κατανέμονται ομοιόμορφα σε ένα μόνο διαμέρισμα, κάτι που δεν ισχύει, ωστόσο χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη του

ποσοστού δέσμευσης φαρμάκων στους ιστούς και στον υπολογισμό της δόσης που πρέπει να χορηγηθεί για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου το αίμα.^{12, 19}

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην κατανομή των φαρμάκων παίζει ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, ο οποίος εξυπηρετεί την ομοιοστάση του εγκεφάλου και επιτρέπει την εκλεκτική μεταφορά μόνο εκείνων των μορίων που είναι απαραίτητα για την λειτουργία του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα, για να εισέλθει ένα φάρμακο στον εγκέφαλο δεν πρέπει να είναι ιονισμένο, πολικό ή πολύ μεγάλο μόριο.^{12, 18}

1.2.4.3. Μεταβολισμός (Metabolism)

Τα φάρμακα αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ξενοβιοτικών, δηλαδή χημικών ενώσεων που δεν παράγονται φυσιολογικά από τον οργανισμό και δεν αναμένεται να βρίσκονται σε αυτόν.²⁰ Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα για την απομάκρυνση τέτοιου είδους ενώσεων. Έτσι, μετά την απορρόφηση και την κατανομή τους, οι φαρμακευτικές ουσίες υφίστανται μεταβολές που ονομάζονται μεταβολισμός ή βιομετασχηματισμοί, με σκοπό τον σχηματισμό παραγώγων (μεταβολιτών) που είναι πιο υδατοδιαλυτά από τις αρχικές ουσίες, ώστε να αποβάλλονται ευκολότερα από τον οργανισμό. Το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, ενώ άλλες θέσεις που μπορεί επίσης να αδρανοποιηθεί ένα ξενοβιοτικό είναι το πλάσμα, ο εντερικός βλενογόνος, οι νεφροί, οι πνεύμονες ή και το δέρμα. Οι αντιδράσεις βιομετασχηματισμού μπορεί να μεταβολίσουν ένα φάρμακο με τέσσερις τρόπους:

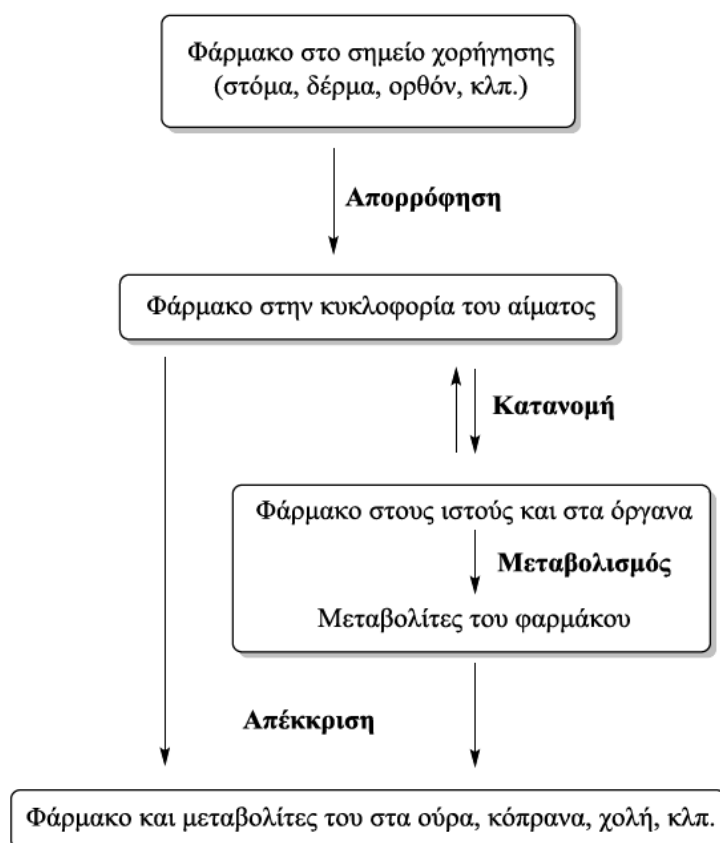
- Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε αδρανή προϊόντα
- Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε ενεργό μεταβολίτη
- Μετατροπή ανενεργού φαρμάκου σε ενεργό μεταβολίτη
- Μετατροπή ενεργού φαρμάκου σε τοξικό μεταβολίτη

Οι χημικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια του μεταβολισμού είναι πολυάριθμες και ταξινομούνται ευρύτερα σε αντιδράσεις φάσης I και φάσης II. Σημειώνεται, πως αυτό δεν σημαίνει υποχρεωτικά ότι η φάση I προηγείται ή ακολουθείται από τη φάση II, καθώς μπορούν να συμβαίνουν διαδοχικά, ανεξάρτητα ή και ταυτόχρονα. Οι διαδικασίες της φάσης I είναι αντιδράσεις που συντελούν μια αλλαγή στο ξενοβιοτικό, όπως αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης. Η φαρμακολογική δράση του παραγόμενου μεταβολίτη μπορεί να είναι ίδια, μικρότερη ή και μεγαλύτερη σε σχέση με την αρχική ουσία. Οι διαδικασίες της φάσης II περιλαμβάνουν την πρόσδεση στο ξενοβιοτικό (δηλαδή στο φάρμακο) μια ενδογενούς ουσίας, όπως γλυκουρονιδικές, θειικές ομάδες ή ένα αμινοξύ. Το προϊόν που προκύπτει από την σύζευξη είναι σχεδόν πάντα πολικό, υδατοδιαλυτό και φαρμακολογικά αδρανές.^{21, 22, 23}

1.2.4.4. Απέκκριση (Excretion)

Στο τελευταίο στάδιο της διαδρομής ενός φαρμάκου στο σώμα γίνεται η απέκκρισή του από τον οργανισμό. Τα φάρμακα απεκκρίνονται είτε αμετάβλητα (χωρίς μεταβολισμό), είτε μετά από την μετατροπή τους σε μεταβολίτες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η απέκκριση πραγματοποιείται μέσω διαφόρων οδών, κυριότερες από τις οποίες είναι αυτές των νεφρών και των ούρων, ενώ φάρμακα απομακρύνονται και από τους πνεύμονες, τον ιδρώτα, τους μαστούς και το σάλιο.

Οι πολικές ουσίες απεκκρίνονται γενικά (εξαιρέση οι πνεύμονες) πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τις λιποδιαλυτές, οι οποίες πρέπει να μετατραπούν σε περισσότερο υδρόφιλους μεταβολίτες, προκειμένου να απομακρυνθούν. Η απέκκριση από τους πνεύμονες πραγματοποιείται κυρίως σε πτητικές ουσίες και αέριους μεταβολίτες τοξικών ουσιών, ενώ η απεκκριτική οδός μέσω του μητρικού γάλακτος χρήζει ιδιαίτερης προσοχής γιατί είναι πιθανό να εμφανιστεί φαρμακολογική δράση στο βρέφος.^{21, 24}



Εικόνα 3. Η φαρμακοκινητική φάση των φαρμάκων²⁵

1.2.4.5. Τοξικότητα

Μία ακόμα πολύ χρήσιμη φαρμακοκινητική παράμετρος αποτελεί η τοξικότητα του φαρμάκου. Η ασφάλεια της χορήγησης ενός φαρμάκου καθορίζεται από την ένταση των ανεπιθύμητων ενεργειών ή παρενεργειών που αυτό εμφανίζει, δηλαδή από τις δευτερεύουσες ενέργειες, οι οποίες δεν εντάσσονται στα πλαίσια του επιδιωκόμενου

βιολογικού αποτελέσματος. Η τοξικότητα είναι υπεύθυνη για την απόρριψη πολύ μεγάλου ποσοστού υποψήφιων φαρμάκων, επομένως συμβάλλει σημαντικά στο συνολικό κόστος ανάπτυξης των φαρμάκων και ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που αναγνωρίζεται σε προχωρημένο στάδιο της ανάπτυξης ενός φαρμάκου ή μετά την κυκλοφορία. Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη βιοδεικτών και σύντομων δοκιμών για την ανίχνευση πιθανής τοξικότητας στα φάρμακα είναι ένας σημαντικός στόχος.

Τοξικότητα μπορεί να εμφανιστεί λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου τόσο με το μόριο-στόχο (υπερβολική τροποποίηση), όσο και με διαφορετικό μόριο, αλλά και με πρωτεΐνες που σχετίζονται και ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το μόριο-στόχο. Ακόμα, εκτός από την ίδια την φαρμακευτική ουσία, τοξικότητα μπορεί να εμφανίζουν οι μεταβολίτες που παράγονται από αυτή.²⁶

1.2.5. Φαρμακοδυναμική

Εκτός από το «τι κάνει ο οργανισμός στο φάρμακο» που μελετήθηκε, είναι σημαντικό να υπάρχει πλήρης γνώση για το «τι κάνει το φάρμακο στον οργανισμό». Έτσι λοιπόν, η φαρμακοδυναμική περιλαμβάνει τις φυσιολογικές και βιοχημικές επιδράσεις των φαρμάκων σε ολόκληρο τον οργανισμό και στο επίπεδο των ιστών ή στο μοριακό επίπεδο.⁶ Ειδικότερα, αφορά την σχέση μεταξύ της δόσης/συγκέντρωσης ενός φαρμάκου και της φαρμακολογικής/κλινικής/τοξικής απάντησης που αυτό εμφανίζει.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα περισσότερα φάρμακα ασκούν τη δράση τους αλληλοεπιδρώντας με μακρομοριακούς «στόχους» που βρίσκονται στην επιφάνεια ή το εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίοι μπορεί να είναι υποδοχείς, ένζυμα ή δομικές πρωτεΐνες.

Σχετικά με την σύνδεση σε υποδοχείς, όταν ένα φάρμακο προσδεθεί στον αντίστοιχο υποδοχέα, σχηματίζεται σύμπλοκο φαρμάκου-υποδοχέα, το οποίο είναι υπεύθυνο για το φαρμακολογικό αποτέλεσμα, καθώς μπορεί να προκαλέσει άνοιγμα ή κλείσιμο ενός καναλιού ιόντων, ενεργοποίηση δευτερογενούς σήματος (π.χ. αλυσίδα αντιδράσεων), καθώς και αναστολή ή ενεργοποίηση κυτταρικής λειτουργίας. Ακόμα, λιποδιαλυτά φάρμακα συχνά μεταβάλλουν την κυτταρική λειτουργία μέσω του παρεμποδισμού της ενζυμικής δραστηριότητας. Το φάρμακο μπορεί είτε να μοιάζει με το φυσιολογικό υπόστρωμα του ενζύμου, το οποίο και ανταγωνίζεται στην δέσμευση, είτε να δεσμεύεται μη αντιστρεπτά με το δραστικό κέντρο του ενζύμου.

Σημαντικές έννοιες στην φαρμακοδυναμική αποτελούν οι αγωνιστές, που είναι οι ενώσεις που προσδέονται στους υποδοχείς και τους διεγείρουν, καθώς και οι ανταγωνιστές, οι οποίοι δεσμεύονται από τους υποδοχείς χωρίς όμως να τους διεγείρουν. Οι ανταγωνιστές μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τους συναγωνιστικούς και τους μη συναγωνιστικούς. Οι πρώτοι συναγωνίζονται με τον αγωνιστή για την κατάληψη των ίδιων θέσεων πρόσδεσης και με την αύξηση της συγκέντρωσης του αγωνιστή τα αποτελέσματά τους εξαφανίζονται. Οι δεύτεροι σχηματίζουν δεσμούς με τον υποδοχέα συνήθως σε άλλες θέσεις από τις «φυσικές» θέσεις δέσμευσης του αγωνιστή, οπότε και εμποδίζουν την πρόσδεσή του στον

υποδοχέα ή εμποδίζουν την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον αγωνιστή. Το αποτέλεσμα σε αυτή την περίπτωση δεν μπορεί να ανατραπεί πλήρως όσο και αν αυξηθεί η συγκέντρωση του αγωνιστή.

Συμπεραίνεται πως η επίδραση κάθε φαρμάκου δεν είναι της φύσης «όλα ή καθόλου», αφού η ένταση της δράσης του εξαρτάται από την συγκέντρωσή του στην περιοχή του υποδοχέα, στην οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο η δόση και οι ιδιότητες ADME που προαναφέρθηκαν. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί, πως αν η δόση που έχει καθοριστεί για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου θεραπευτικού αποτελέσματος αυξηθεί επαρκώς, τότε είναι πιθανό να αναπτυχθούν ανεπιθύμητες ή τοξικές επιδράσεις.

Υπάρχουν δύο κύριες φαρμακοδυναμικές αιτίες για την διακύμανση της απόκρισης των φαρμάκων μεταξύ των ατόμων. Η πρώτη είναι η διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των ενδογενών αγωνιστών, ενώ η δεύτερη είναι η διαφοροποίηση στους υποδοχείς, καθώς τα άτομα που εκτίθενται συνεχώς σε έναν αγωνιστή/ανταγωνιστή προβλέπεται ότι θα χρειάζονται μεγαλύτερες δόσεις για να επιτύχουν ένα δεδομένο φαρμακολογικό αποτέλεσμα σε σχέση με έναν παρθένο στο φάρμακο οργανισμό.^{6, 12}

1.3. Λιποφιλία: Βασική φυσικοχημική ιδιότητα στον σχεδιασμό φαρμάκων

Η λιποφιλία- σύμφωνα με τον ορισμό της International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) – εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα πρωταρχικής σημασίας για τη βιολογική δράση, καθώς υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική συμπεριφορά.²⁵ Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φαρμάκων καθώς συμβάλλει κατά πολύ στις ιδιότητες ADME και την τοξικότητα και αποτελεί γενικά, την πιο αξιόπιστη πηγή πληροφοριών και φυσικοχημική ιδιότητα στην φαρμακευτική χημεία. Γενικά, χαμηλές τιμές λιποφιλίας για ένα φάρμακο σημαίνουν και ταυτόχρονα φτωχές ιδιότητες ADME, ενώ υψηλές τιμές συνεπάγονται χαμηλή διαλυτότητα και φτωχή απορρόφηση.²⁷

1.3.1. Διπλή φύση της λιποφιλίας

Η λιποφιλία αποτελεί μια σύνθετη ιδιότητα με διπλό χαρακτήρα, αποτελούμενη από δύο συνιστώσες, την υδροφοβία και την πολικότητα των ενώσεων, δηλαδή ισχύει η εξίσωση:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad (1.1)$$

Επομένως, η λιποφιλία και η υδροφοβία δεν είναι ταυτόσημοι όροι, αλλά έννοιες που αλληλοσυμπληρώνονται. Από την μία, με το όρο λιποφιλία εκφράζεται η ενεργητική κίνηση μιας ουσίας προς το περισσότερο λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ από την άλλη, η υδροφοβία ορίζεται ως η παθητική απομάκρυνση της ουσίας από το υδρόφιλο περιβάλλον. Ειδικότερα, υδροφοβία είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μόρια μη πολικών ουσιών, κατά την ύπαρξή τους σε υδατικό περιβάλλον, προσεγγίζουν μεταξύ

τους ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας άπωσής τους από το νερό, με σκοπό να καταλαμβάνουν όσο το δυνατόν μικρότερη επιφάνεια.

Οι συνιστώσες τη σχέσης (1.1) μπορούν να περιγραφούν με θεμελιώδεις μοριακές παραμέτρους. Η υδροφοβία μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους που εκφράζουν όγκο, όπως ο μοριακός όγκος ή το εμβαδόν μοριακής επιφάνειας, το μοριακό βάρος και η πολωσιμότητα. Η πολικότητα εκφράζει την ισχύ και την κατεύθυνση των διαμοριακών επαγωγικών δυνάμεων και μπορεί να εκτιμηθεί με τη διπολική ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, καθώς και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους.²⁸

1.3.2. Αρχή ελάχιστης λιποφιλίας

Εκτός από τον καθοριστικό ρόλο που παίζει στις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες των φαρμάκων, η λιποφιλία σχετίζεται και με ανεπιθύμητα φαινόμενα. Πιο συγκεκριμένα, αυξημένη λιποφιλία οδηγεί στα παρακάτω φαινόμενα:

- Παρατεταμένη παραμονή μιας ουσίας στον οργανισμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων.
- Αύξηση της τοξικότητας. Ο Richer διαπίστωσε μέσα από μελέτες πως όσο λιγότερο διαλυτές είναι οι ουσίες- δηλαδή όσο περισσότερο λιπόφιλες – τόσο μεγαλύτερη τοξικότητα εμφανίζουν.
- Επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων (που μπορεί να εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών) , λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα έναντι λιπόφιλων ουσιών, με απρόβλεπτες πιθανές συνέπειες.
- Προβλήματα στη μορφοποίηση των τελικών προϊόντων.

Στηριζόμενος στις παραπάνω παρατηρήσεις, ο Hansch το 1987 διατύπωσε την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας. Δηλαδή, ανέφερε ότι ο σχεδιασμός των φαρμάκων πρέπει να στοχεύει σε ενώσεις που από την μία προκαλούν την επιθυμητή φαρμακολογική δράση, από την άλλη ωστόσο, εμφανίζουν την ελάχιστη λιποφιλία.

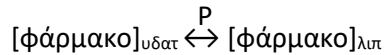
Η αρχή αυτή, έχει ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις που οι ενώσεις δρουν στην περιφέρεια και είναι επιθυμητός ο αποκλεισμός τους από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), καθώς ανεπιθύμητες ενέργειες σχετικές με τις υποδοχείς του ΚΝΣ μπορεί να είναι πολύ σοβαρές για την υγεία του ανθρώπου.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο μνημονικός κανόνας του Lipinski- που περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 1.2.4.1. και αφορά σε μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση φαρμάκων από την στοματική οδό- διατυπώθηκε δέκα χρονιά μετά την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας. Έτσι, εξηγείται η προϋπόθεση που εμπεριέχει ο κανόνας του Lipinski, πως ο συντελεστής μερισμού, που είναι ποσοτικοποίηση της λιποφιλίας και εκφράζεται ως logP, έχει ανώτατη τιμή ίση με 5.^{3, 29}

1.3.3. Ποσοτική έκφραση λιποφιλίας

1.3.3.1. Συντελεστής μερισμού P

Τα φάρμακα κατανέμονται στις λιποειδικές (μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) και τις υδατικές φάσεις μέσα στο σώμα. Η κατανομή ανάμεσα σε αυτές τις δύο φάσεις εκφράζεται από την ισορροπία:



όπου P η σταθερά ισορροπίας και εκφράζεται με το πηλίκιο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιποειδική φάση ως προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση, δηλαδή:

$$P = \frac{[\text{φάρμακο}]_{\text{λιπ}}}{[\text{φάρμακο}]_{\text{υδατ}}} \quad (1.2)$$

Η σταθερά ισορροπίας P καλείται συντελεστής μερισμού (partition coefficient), χρησιμοποιείται κυρίως στην λογαριθμική της μορφή και αποτελεί ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας.

Αν οι λιποειδικές φάσεις του οργανισμού προσομοιωθούν με κατάλληλο οργανικό διαλύτη, τότε ισχύει η σχέση:^{3, 30}

$$P = \frac{C_{\text{οργ}}}{C_{\text{υδατ}}} \quad (1.3)$$

1.3.3.2. Συντελεστής κατανομής D

Ο συντελεστής μερισμού P αφορά την ουδέτερη μονομερή (μη ιονισμένη) μορφή της ένωσης. Ωστόσο, τα περισσότερα φαρμακομόρια, και ανάλογα με το pKa τους και το pH του βιολογικού περιβάλλοντος, είναι κατά ένα σημαντικό ποσοστό ιονισμένα. Έτσι, ένας διαφορετικός τρόπος ποσοτικής προσέγγισης της λιποφιλίας τους είναι ο συντελεστής κατανομής D (ή φαινόμενος συντελεστής P' κατά παλαιότερη ορολογία), ο οποίος χρησιμοποιείται – όπως και ο συντελεστής μερισμού – στην λογαριθμική του μορφή (logD). Ο συντελεστής κατανομής ισούται με τον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένης μορφής (μίας ή και περισσότερες μορφές) και αδιάστατης μορφής στην οργανική και την υδατική φάση αντίστοιχα, δηλαδή:³⁰

$$D (P') = \frac{\Sigma C_{\text{οργ}}}{\Sigma C_{\text{υδατ}}} \quad (1.4)$$

Επομένως, σε αντίθεση με το logP, που είναι χαρακτηριστική σταθερά για μια μοναδική ηλεκτρονιακή μορφή, το logD αναφέρεται τη λιποφιλία του μίγματος όλων των υφιστάμενων ηλεκτρονικών μορφών της ένωσης σε συγκεκριμένο pH.

Έτσι, στην περίπτωση ιοντιζόμενων ουσιών, η κατανομή σε ένα διφασικό σύστημα (όπως για παράδειγμα οκτανόλης/νερού) προσδιορίζεται από περισσότερες σταθερές ισορροπίας:

- $\log P^N$, που αφορά στην κατανομή της αδιάστατης μορφής μεταξύ των δύο φάσεων
- $\log P^1$, που αφορά στην κατανομή της ιοντισμένης μορφής $\log P^1$
- pK_a που αποτελεί την σταθερά ιοντισμού
- οκτανολικό pK_a^{oct} , το οποίο αποτελεί σχετική σταθερά και ορίζεται ως το pH της υδατικής φάσης που συνυπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις της αδιάστατης και της ιοντισμένης μορφής.

Με αυτό τον τρόπο ο συντελεστής κατανομής D λαμβάνει υπόψη την ενδογενή λιποφιλία των διαφόρων μοριακών μορφών (ουδέτερης και ιοντισμένης μορφής, όταν υπάρχει ένα ιοντιζόμενο κέντρο) και των σχετικών συγκεντρώσεών τους στο διάλυμα.

Ακόμα, ο συντελεστής κατανομής $\log D$ είναι πάντα μικρότερος από τον συντελεστή μερισμού $\log P$ για μια ένωση, καθώς ισχύει η σχέση:

$$\log P = \log D + Q \quad (1.5)$$

όπου Q διόρθωση, η οποία εξαρτάται από την pK_a της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος και έχει διαφορετική μορφή ανάλογα με την φύση της ουσίας (μονοπρωτικό οξύ ή βάση, διπρωτικό οξύ ή βάση, ενώσεις με μια όξινη και μια βασική ομάδα).

Η σχέση (1.5) δεν ισχύει για τιμές pH , όπου υπάρχει υψηλός βαθμός ιοντισμού ή και πλήρης ιοντισμός, καθώς τότε διαπιστώνεται πως μικρό ποσοστό της ιοντικής μορφής κατανέμεται στην οργανική φάση, υπό μορφή ιοντικών ζευγών με τα αντισταθμιστικά ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος, οπότε και σε αυτή την περίπτωση ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται επιπρόσθετα από τη φύση και τη συγκέντρωση του αντισταθμιστικού ιόντος.³

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το σύστημα που έχει καθιερωθεί σήμερα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων, είναι αυτό της n -οκτανόλης/νερού.

1.3.3.3. Σύστημα n -οκτανόλης/νερού

Το συγκεκριμένο σύστημα επιλέχθηκε και καθιερώθηκε για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας, καθώς πληροί ποικίλα κριτήρια. Πιο συγκεκριμένα:

- Η οκτανόλη έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, ιδιότητα που προσομοιάζει σε πολλά βιολογικά συστήματα (όπως μεμβράνες και πρωτεΐνες)
- Η οκτανόλη δεν απορροφά στο υπεριώδες φάσμα, κάτι που διευκολύνει τον πειραματικό προσδιορισμό
- Ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού είναι σχετικά εύκολος
- Η οκτανόλη δεν είναι τοξική (παρά την έντονη και χαρακτηριστική της οσμή)

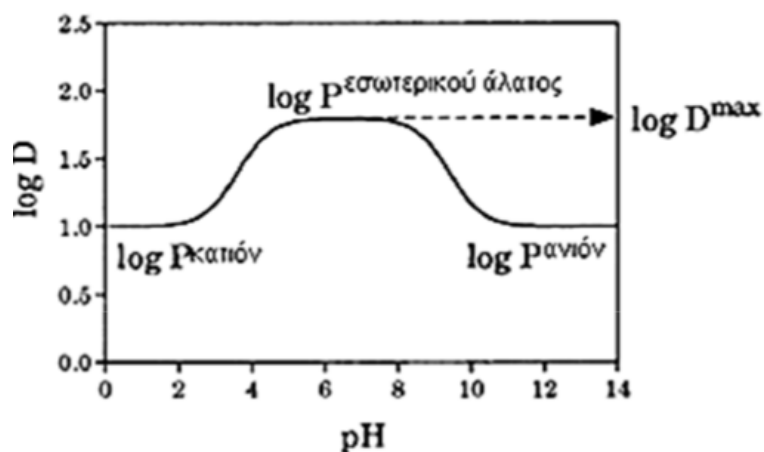
- Η οκτανόλη παρουσιάζει μέτρια ικανότητα κορεσμού σε νερό (0,25 mol%)
- Το κόστος της οκτανόλης είναι χαμηλό

Το σύστημα οκτανόλης/νερού προσομοιώνει ικανοποιητικά την πρωτεϊνική σύνδεση και τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, αλλά για άλλους τύπους μεμβρανών ή υποδοχέων, είναι πιθανό να προτιμώνται διαφορετικά συστήματα διαλυτών.³

1.3.4. Λιποφιλία αμφολυτών

Οι αμφολύτες είναι χημικές ενώσεις που φέρουν μια ή περισσότερες όξινες και μια ή περισσότερες βασικές ομάδες. Επομένως, μπορούν να εμφανίζονται ως εσωτερικά άλατα (zwitterions) σε εύρος pH εκατέρωθεν του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Στα εσωτερικά άλατα παρατηρείται μερική εξουδετέρωση των αντιθέτων φορτίων του αμφολύτη, ενώ η δυνατότητα σχηματισμού τους εξαρτάται από τις τιμές pKa της όξινης και βασικής ομάδας και τη δομή του μορίου.

Η λιποφιλία των αμφολυτών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ο υπολογισμός του συντελεστή μερισμού ($\log P$) είναι εφικτός μόνο στην περίπτωση που δεν συνυπάρχουν το θετικό και αρνητικό φορτίο στο μόριο, δηλαδή όταν δεν λαμβάνει χώρα σχηματισμός εσωτερικού άλατος. Στην περίπτωση αμφολυτών-εσωτερικών αλάτων (δηλαδή όταν δεν προσδιορίζεται τιμή $\log P$) παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών $\log D$ σε εύρος pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο, δείχνοντας δηλαδή, πως εντός συγκεκριμένου εύρους pH, δεν υπάρχει μεταβολή της λιποφιλίας (εικόνα 4). Έτσι, οι αμφολύτες-εσωτερικά άλατα μπορούν να λειτουργούν ως “buffer” λιποφιλίας, συμπεριφορά που τους προσδίδει ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά.^{3,31}



Εικόνα 4. Κωδωνοειδής καμπύλη $\log D/\text{pH}$ αμφολύτη που σχηματίζει εσωτερικό άλας³

1.4. Στατιστικές μέθοδοι

Οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες ενός φαρμακομορίου δεν εξαρτώνται μόνο από την λιποφιλία, αλλά είναι αποτέλεσμα ποικίλων διαδικασιών και παραγόντων. Ο πιο βασικός τρόπος βελτίωσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και του φαρμακολογικού προφίλ για ένα μόριο είναι η σύνθεση σειρών δομικών

ενώσεων. Καθώς ο αριθμός των δυνητικών νέων ενώσεων είναι πολύ μεγάλος, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη να εφαρμοσθεί ορθολογικός σχεδιασμός μέσω ποσοτικοποίησης της διαφοροποίησης που επιφέρουν στη δράση οι δομικές αλλαγές. Αυτό είναι δυνατό μέσω της εφαρμογής της Υπολογιστικής Χημείας, η οποία επιτρέπει την περιγραφή της δομής των μορίων και αξιοποίησης πληθώρας πληροφοριών μέσω στατιστικής επεξεργασίας δεδομένων.

Έτσι, κατασκευάζονται μοντέλα γνωστά ως μοντέλα Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης. Τα μοντέλα αυτά- που καλούνται QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) - είναι μαθηματικά μοντέλα που μπορούν να χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των ενώσεων με βάση τη χημική δομή τους. Επομένως, στόχος των QSAR είναι η εξαγωγή εξισώσεων ή μοντέλων που συσχετίζουν την βιολογική δράση με την δομή των ενώσεων. Ακόμα, τα μοντέλα QSPR (Quantitative Structure-Property Relationships) είναι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Ιδιοτήτων στοχεύουν στην εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων για επιμέρους βιολογικές διεργασίες, όπως συγκεκριμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες.

Τα μοντέλα αυτά συνεισφέρουν στην ελαχιστοποίηση των πειραμάτων, την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φαρμακομορίων, αλλά και κατευθύνουν προς την σύνθεση των κατάλληλων ενώσεων για επίτευξη βελτιωμένων φαρμακομορίων. Οι QSAR πρέπει να αντιμετωπίζονται ως εργαλείο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και πάντα με κριτικό πνεύμα.^{3, 12 32, 33}

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες στατιστικές μέθοδοι σε μελέτες QSAR/QSPR είναι οι εξής:

- Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA)
- Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)
- Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)
- Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANN)

1.4.1. Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA)

Η στατιστική μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης επιτρέπει την εξαγωγή εξισώσεων που συσχετίζουν μια εξαρτημένη μεταβλητή με περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές (παραμέτρους). Αυτές οι εξισώσεις είναι της μορφής:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_ix_i + \varepsilon, i = 1, 2, \dots, n \quad (1.6)$$

όπου $x_1 - x_n$: παράμετροι που περιγράφουν την δομή / ανεξάρτητες μεταβλητές

$\beta_1 - \beta_n$: συντελεστές που εξάγονται με στατιστική επεξεργασία

Σημασιολογικά, ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης συλλαμβάνει το γεγονός ότι κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή επηρεάζει και συνεισφέρει στην αναμενόμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής με κάποιο συντελεστή (ή βάρος) β , και η συνεισφορά των ανεξάρτητων μεταβλητών είναι αθροιστική. Δηλαδή, οι συντελεστές β καθορίζουν το πόσο συνεισφέρει κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή.³⁴

Μέτρο για την αξιολόγηση της εξίσωσης παλινδρόμησης αποτελεί ο συντελεστής συσχέτισης r , ο οποίος πρέπει να τείνει στο $|1|$, δηλαδή $-1 < r < 1$. Στις περισσότερες περιπτώσεις, και ιδιαίτερα όταν εξετάζεται σχετικά μεγάλος αριθμός ανεξάρτητων μεταβλητών, ως μέτρο αξιολόγησης χρησιμοποιείται το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης r^2 (προσαρμοσμένος συντελεστής), το οποίο πρέπει και αυτό να τείνει στην μονάδα. Ο συντελεστής r^2 είναι γενικά μικρότερος από τον συντελεστή συσχέτισης και αυξάνει με την εισαγωγή νέας παραμέτρου μόνο στην περίπτωση που η βελτίωση του μοντέλου είναι μεγαλύτερη από αυτή που θα προέκυπτε τυχαία.

Η διασπορά των σημείων γύρω από την ευθεία προσαρμογής καθορίζεται από την τυπική απόκλιση (standard deviation s , ή SD). Η τυπική απόκλιση s είναι η τετραγωνική ρίζα της διακύμανσης s^2 και πρέπει να τείνει στο μηδέν. Το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης, δηλαδή το $2s$, καθορίζει το όριο ανοχής σφάλματος του μοντέλου. Με άλλα λόγια, για να θεωρηθεί ότι οι ενώσεις προσαρμόζονται στο μοντέλο πρέπει η διαφορά Δ των υπολογιζόμενων τιμών $Y_{\text{υπολ}}$ από τις πειραματικές (δηλαδή $\Delta = y_{\text{υπολ}} - y_{\text{πειρ}}$) να είναι μικρότερη από $2s$, επομένως πρέπει να ισχύει: $\Delta < 2s$. Στην περίπτωση που αυτό δεν ισχύει, οι ενώσεις πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω ώστε να ερμηνευτεί ο λόγος για τον οποίο πρέπει να αποκλειστούν από το μοντέλο.

Η σημαντικότητα κάθε παραμέτρου καθορίζεται από το Student test t , το οποίο σχετίζεται με το λόγο του συντελεστή της παραμέτρου προς το τυπικό της σφάλμα. Προκειμένου μια παράμετρος να είναι σημαντική πρέπει να ισχύει $t > |2|$. Ένα ακόμα χρήσιμο στατιστικό στοιχείο είναι η δοκιμασία Fisher (Fisher test), η οποία καθορίζει τη σημαντικότητα των εξισώσεων παλινδρόμησης.^{35,36}

Η μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης εμφανίζει συγκεκριμένους περιορισμούς στην εφαρμογή της, όπως:

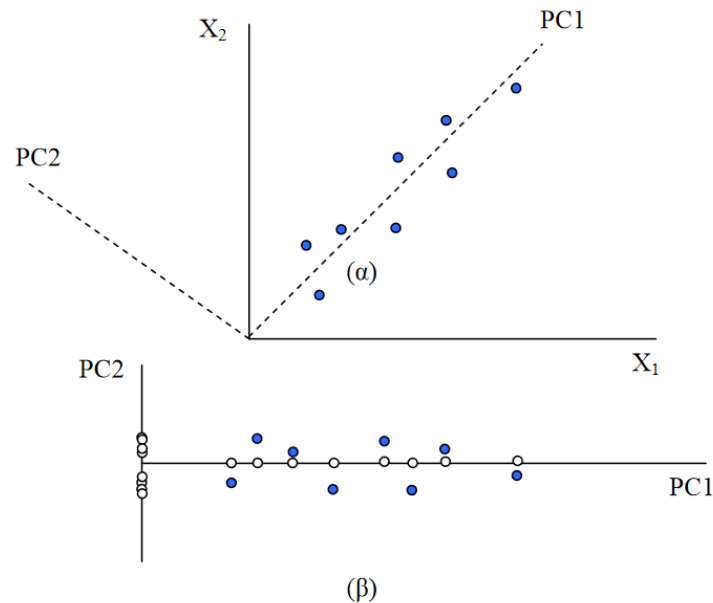
- Περιορίζεται σε μία μόνο εξαρτημένη μεταβλητή x
- Οι μεταβλητές x πρέπει να είναι πραγματικά ανεξάρτητες, δηλαδή να μην συσχετίζονται μεταξύ τους. Αν υπάρχουν αλληλοσυσχετιζόμενες παράμετροι θα πρέπει να επιλεγεί μόνο μία από αυτές, με αποτέλεσμα να μην αξιοποιείται πλήρως η πληροφορία.
- Το τελικό μοντέλο πρέπει να έχει λίγες παραμέτρους, δηλαδή ο τελικός πίνακας να αποτελείται από μεγάλο αριθμό σειρών (ενώσεις) και μικρό αριθμό στηλών (μεταβλητών x).³

1.4.2. Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών ανήκει στην κατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων (MVDA), η οποία επιτρέπει τη διαχείριση μεγάλου αριθμού αλληλοσυσχετιζόμενων περιγραφικών μεταβλητών.

Με άλλα λόγια, αποτελεί μια στατιστική διαδικασία η οποία μετατρέπει μία ομάδα τιμών (παρατηρήσεων) δυνητικά συσχετιζόμενων μεταβλητών σε μία ομάδα νέων τιμών μη γραμμικά συσχετιζόμενων μεταβλητών, οι οποίες καλούνται κύριες συνιστώσες. Ο αριθμός των νέων μεταβλητών που προκύπτει είναι ίσος ή και συχνότερα πολύ μικρότερος από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών.³ Η πρώτη κύρια συνιστώσα είναι μια ευθεία στο χώρο των X , η οποία προσαρμόζει το σύνολο των δεδομένων μέσω της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα, είναι επίσης μια ευθεία στο χώρο των X , κάθετη στην πρώτη κύρια συνιστώσα και αποσκοπεί στη βελτίωση της προσαρμογής των X . Οι δύο κύριες συνιστώσες αποτελούν τους δύο άξονες στο νέο σύστημα αξόνων που εκείνες ορίζουν, πάνω στο οποίο γίνεται προβολή των αρχικών περιγραφικών μεταβλητών X . Οι νέες μεταβλητές (Principal Components ή PCs) προκύπτουν πολλαπλασιάζοντας τις αρχικές μεταβλητές με τις φορτίσεις (loadings), δηλαδή τις γωνίες που σχηματίζουν οι κύριες συνιστώσες ως προς τις αρχικές μεταβλητές. Ακόμα, καθώς είναι ιεραρχικά οργανωμένες (αρχίζοντας από τη συνιστώσα που περιγράφει τη μέγιστη διακύμανση), η τελική απεικόνιση των δεδομένων παρέχει περισσότερες πληροφορίες από την αρχική με τον ίδιο αριθμό μεταβλητών. Με αυτό τον τρόπο, η ανάλυση κυρίων συνιστωσών μπορεί να “αποκαλύψει” ποιες μεταβλητές είναι περισσότερο σημαντικές, οδηγώντας σε ένα μικρότερο αριθμό από ομαδοποιημένες μεταβλητές.^{3, 37}

Τα μοντέλα PCA αξιολογούνται με βάση το συνολικό συντελεστή συσχέτισης R^2X_{cum} που αποτελεί άθροισμα των επιμέρους R^2X .



Εικόνα 5: (α) Διάγραμμα που εξηγεί τις δύο βασικές συνιστώσες PC1 και PC2 για τις δυο μεταβλητές X_1 και X_2 . (β) Σημεία στους άξονες: τα γαλάζια δηλώνουν τα αρχικά σημεία και τα λευκά τις προβολές τους στους άξονες. ³⁷

1.4.3. Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων ανήκει και αυτή στην κατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων, καθώς αποτελεί επέκταση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών, με εφαρμογή παλινδρόμησης που οδηγεί σε μοντέλα πρόβλεψης. Έχει ως στόχο να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή συσχέτιση μεταξύ δυο μεταβλητών X και Y και την ανάπτυξη ενός μοντέλου που θα προσεγγίζει σε ικανοποιητικό βαθμό τις δυο μεταβλητές. Ουσιαστικά, η μέθοδος PLS εξάγει νέες μεταβλητές, μέσω των μεταβλητών X , τις οποίες και χρησιμοποιεί προκειμένου να προβλέψει τις τιμές των μεταβλητών Y . Η ανάλυση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων εμφανίζει το πλεονέκτημα σε σύγκριση με την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση πως μπορεί να εφαρμόζεται ακόμα και στις περιπτώσεις που οι μεταβλητές X δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους.

Στα μοντέλα PLS, η αξιολόγησή τους γίνεται, σε αντιστοιχία με τα μοντέλα PCA, με βάση τον συντελεστή $R^2 Y_{cum}$.³

1.4.4. Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANN)

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, σε αντίθεση με τις παραπάνω στατιστικές μεθόδους, είναι μη γραμμικές μέθοδοι εκμάθησης μηχανών και εφαρμόζονται τόσο ως μέθοδος παλινδρόμησης, όσο και ως μέθοδος ταξινόμησης. Η δομή των δικτύων αποτελείται από διασυνδεδεμένες βασικές μονάδες, οι οποίες ονομάζονται νευρώνες. Ένα τυπικό τεχνητό νευρωνικό δίκτυο περιλαμβάνει τις μονάδες εισόδου, έναν αριθμό κρυμμένων στιβάδων (hidden layers)-όπου κάθε στιβάδα περιλαμβάνει έναν αριθμό k νευρώνων- και τη στιβάδα εξόδου (output layer). Η δομή ενός απλού νευρωνικού δικτύου φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 6. Απλό νευρωνικό δίκτυο ³

Οι νευρώνες δέχονται σήματα εισόδου (input), τα οποία αποκτούν “βάρος” και στην συνέχεια το μετατρέπουν σε σήματα εξόδου (output) μέσω μιας μη γραμμικής συνάρτησης, συνήθως της σιγμοειδούς.

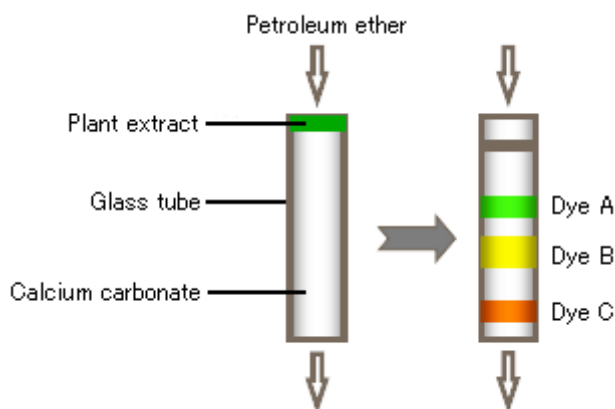
Αντίστοιχα με τους βιολογικούς νευρώνες, τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα μαθαίνουν μέσω παραδειγμάτων, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εκπαίδευση (training). Σε αυτή την διαδικασία, η «εκμάθηση» γίνεται μεταβάλλοντας τα βάρη των νευρώνων. Η εκπαίδευση μπορεί να είναι είτε επιβλεπόμενη, είτε μη επιβλεπόμενη. Στην μη επιβλεπόμενη εκπαίδευση παρόμοια σημεία των δεδομένων επιδιώκεται να καταταχθούν στον ίδιο ή γειτονικούς νευρώνες. Από την άλλη, κατά την επιβλεπόμενη εκπαίδευση, το σήμα εξόδου από το δίκτυο συγκρίνεται με την πραγματική τιμή απόκρισης και προκύπτει μια τιμή σφάλματος δ. Έπειτα, τα βάρη των νευρώνων προσαρμόζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιηθεί η τιμή του σφάλματος δ. ^{3,37}

1.5. Χρωματογραφία

1.5.1. Γενικά

Η χρωματογραφική ανάλυση, γνωστή συνήθως ως χρωματογραφία, περιλαμβάνει σειρά τεχνικών φυσικού διαχωρισμού και προσδιορισμού μείγματος ανόργανων ή οργανικών ουσιών. Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903), στην προσπάθειά του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Αυτός εκχύλισε τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα από στήλη από κονιοποιημένο ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), οπότε τα συστατικά (χλωροφύλλες) διαχωρίστηκαν σε διακριτές έγχρωμες ζώνες. Λόγω αυτού του γεγονότος, η τεχνική ονομάστηκε διεθνώς “χρωματογραφία”, από τις ελληνικές λέξεις χρώμα και γράφω, αν και τα χρώματα είναι συμπτωματικά και δεν έχουν σχέση με τις αρχές της τεχνικής. Με το πέρασμα των χρόνων, η τεχνική έχει βελτιωθεί και έχουν διαμορφωθεί και άλλες τεχνικές, με αποτέλεσμα σήμερα η χρωματογραφία να αποτελεί την καλύτερη τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης πολύπλοκων μειγμάτων και απομονώσεως ευπαθών ουσιών, έγχρωμων ή άχρωμων. Βρίσκει εφαρμογές όχι μόνο στην Χημεία, αλλά και σε άλλες επιστήμες, όπως Βιολογία, Ιατρική, Φαρμακευτική, κλπ. Έτσι, ειδικότερα, η χρωματογραφία αποτελεί το αναγκαίο προκαταρκτικό στάδιο όχι μόνο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό των

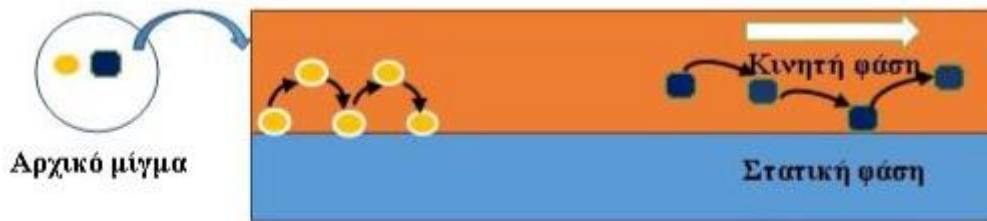
διαχωριζόμενων ουσιών μεταβολιτών φαρμάκων κ.α. Σπουδαιότεροι σταθμοί στην ανάπτυξη της χρωματογραφίας είναι-μεταξύ άλλων- η ανάπτυξη της υγρής-υγρής χρωματογραφίας κατανομής από τους Martin και Synge το 1941, η ανάπτυξη της αεριοχρωματογραφίας από τους Martin και James το 1952, και η ανάπτυξη τη υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως τα τελευταία χρόνια.³⁸



Εικόνα 7. Το πείραμα του Tswett³⁹

1.5.2. Λειτουργία

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος – μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση. Ειδικότερα, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω των διαφορών που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιονικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.α. Έτσι, η κινητή φάση, διερχόμενη μέσα από την στατική, προκαλεί μετατόπιση πάνω σε αυτή των συστατικών του μείγματος, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους και συνήθως εξέρχονται από την στήλη, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανιχνεύσεως και καταμετρήσεως της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός από τον διαχωρισμό και παράλληλα με αυτό, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών.^{38, 40, 41}



Εικόνα 8. Αρχή διαχωρισμού συστατικών μείγματος με την τεχνική της χρωματογραφίας, Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει της διαφορετικής αγκιστείας των συστατικών με την κινητή και στατική φάση. Αναπαρίστανται η πορεία μορίων δύο διαφορετικών ουσιών διαμέσου μίας στήλης. Το μπλε μόριο κατανέμεται πιο σημαντικά στην κινητή φάση και συνεπώς παρασύρεται από αυτήν ταχύτερα, διότι δεν αλληλεπιδρά ισχυρά με τη στατική φάση. Αντίθετα το κίτρινο μόριο αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη στατική φάση, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται. Κατά συνέπεια το κίτρινο συστατικό θα κινείται βραδύτερα από το μπλε, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους.⁴⁰

1.5.3. Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

Η διαφοροποίηση των χρωματογραφικών τεχνικών καθιστά δύσκολη την ταξινόμησή τους με βάση ένα μόνο κριτήριο. Οι τεχνικές αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης, τη φύση και την μορφή της στατικής φάσης, ως προς τον μηχανισμό, στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός, και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση και κινήσεώς του μέσα από αυτή. Έτσι, κατηγοριοποίηση των χρωματογραφικών τεχνικών μπορεί να γίνει:

- Με βάση τη φύση της κινητής και στατικής φάσεως, όπου διακρίνονται οι εξής κατηγορίες και υποκατηγορίες ειδών χρωματογραφίας:
 - Υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC), όπου η κινητή φάση είναι υγρή και έχει τις υποκατηγορίες, ανάλογα με το με την φύση της στατικής φάσης, που μπορεί να είναι στερεή ή υγρή πάνω σε στερεό αδρανή φορέα:
 - Υγρή-στερεή χρωματογραφία (LSC)
 - Υγρή-υγρή χρωματογραφία (LLC)
 - Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC), όπου η κινητή φάση είναι αέρια και έχει τις αντίστοιχες υποκατηγορίες με βάση τη φύση της στατικής φάσης:
 - Αέρια-στερεή χρωματογραφία (GSC)
 - Αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC)

➤ Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού, δηλαδή με τον τρόπο με τον οποίο τα συστατικά του μείγματος κατακρατούνται από τη στατική φάση και γίνεται δυνατός ο διαχωρισμός:

- Χρωματογραφία προσρόφησης: Τα συστατικά του μείγματος αλληλεπιδρούν (προσροφούνται) στην επιφάνεια ή σε ορισμένες θέσεις της επιφάνειας στερεής (συνήθως) στατικής φάσης. Η ισορροπία που αποκαθίσταται μεταξύ προσροφημένων σωματιδίων και σωματιδίων στην κινητή φάση (υγρή ή αέρια), πετυχαίνει τον διαχωρισμό.
- Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής: Χρησιμοποιούνται ιονανταλλακτικές ρητίνες ως στερεή στατική φάση και τα συστατικά του μείγματος συγκρατούνται ηλεκτροστατικά σε διάφορο βαθμό από τις ιονικές ομάδες της στατικής φάσης με αντίθετο φορτίο.
- Χρωματογραφία κατανομής: Τα συστατικά του μείγματος κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης, που σχηματίζεται στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος, και μιας υγρής κινητής φάσης. Όταν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση, πρόκειται για χρωματογραφία κανονικής φάσεως, ενώ στην αντίθετη περίπτωση για χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως.
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού: Η υγρή ή αέρια κινητή φάση διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή, το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετά μικρό, ώστε να επιτρέπει την είσοδο στο δίκτυο της πηκτής μόνο μορίων μικρού μεγέθους, αποκλείοντας τα μόρια μεγάλου μεγέθους. Τα μικρά μόρια μπαίνοντας στο δίκτυο αργούν να εξέλθουν από την στήλη, αφού χρειάζονται μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης για να τα παρασύρει. Έτσι, ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των μορίων, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα.
- Χρωματογραφία συγγένειας: Βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο, που έχει χημικά δεσμευθεί (ακινητοποιηθεί) στη στερεή στατική φάση.

➤ Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσεως:

- Χρωματογραφία στήλης: Η στατική φάση συγκρατείται σε μια στενή κυλινδρική στήλη μέσα από την οποία η κινητή φάση διαβιβάζεται με πίεση ή ρέει λόγω βαρύτητας.
- Επίπεδη χρωματογραφία: Η στατική φάση είναι μια λωρίδα χάρτη ή μια στιβάδα στερεού επιστρωμένη σε υάλινη, ή από άλλο υλικό,

πλάκα. Η υγρή κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στατική με τη βοήθεια τριχοειδών δυνάμεων ή της βαρύτητας.^{38, 40}

1.5.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η χρωματογραφία HPLC αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Στην κλασική υγρή χρωματογραφία στήλης, η ταχύτητα μερισμού των συστατικών του μείγματος μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης εξαρτάται κυρίως από την διάχυση, η οποία όμως στα υγρά είναι εξαιρετικά αργή. Για την ελαχιστοποίηση του χρόνου, που απαιτείται για τη μετακίνηση των συστατικών του μείγματος από και προς τις θέσεις αλληλεπίδρασης της στατικής φάσεως, πρέπει να τηρούνται δύο προϋποθέσεις. Η πρώτη είναι το υλικό πληρώσεως της στήλης να είναι λεπτότατου διαμερισμού (σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου) και να έχει υψηλή σφαιρική κανονικότητα. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Η δεύτερη αφορά τις περιπτώσεις διαχωρισμών κατανομής (που είναι και η πλειοψηφία στην υγρή χρωματογραφία), όπου η υγρή στατική φάση πρέπει να είναι της μορφής λεπτότατου ομοιόμορφου υμένα, χωρίς λιμνάζοντες χώρους. Με αυτές τις προϋποθέσεις, η στήλη χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση και οι κορυφές που λαμβάνονται είναι μικρού εύρους και μεγάλου ύψους, δηλαδή κατάλληλες για ποσοτική ανάλυση. Ωστόσο, η υψηλή πυκνότητα πληρώσεως με τα πολύ μικρά σωματίδια, μειώνει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης μέσα από την στήλη και για να επιτευχθεί μια λογική ταχύτητα ροής απαιτείται η εφαρμογή υψηλής πίεσης στην κινητή φάση. Για αυτό τον λόγο, χρησιμοποιούνται αντλίες υψηλής πίεσης για την ροή της κινητής φάσης. Έτσι, η χρωματογραφία HPLC επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά.^{38, 40, 43}

Σήμερα, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης είναι ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία στην αναλυτική χημεία. Έχει την ικανότητα να διαχωρίζει, να αναγνωρίζει και να ποσοτικοποιεί τις ενώσεις που υπάρχουν σε οποιοδήποτε δείγμα που μπορεί να διαλυθεί σε ένα υγρό. Ειδικότερα, μέσω αυτής μπορούν να αναγνωριστούν ενώσεις σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές, που φτάνουν τα επίπεδα ppt (μέρη στο τρισεκατομμύριο). Βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα, διατροφικά προϊόντα, καλλυντικά, ιατροδικαστικά δείγματα και βιομηχανικά χημικά.⁴²

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει τα εξής επιμέρους μέρη:

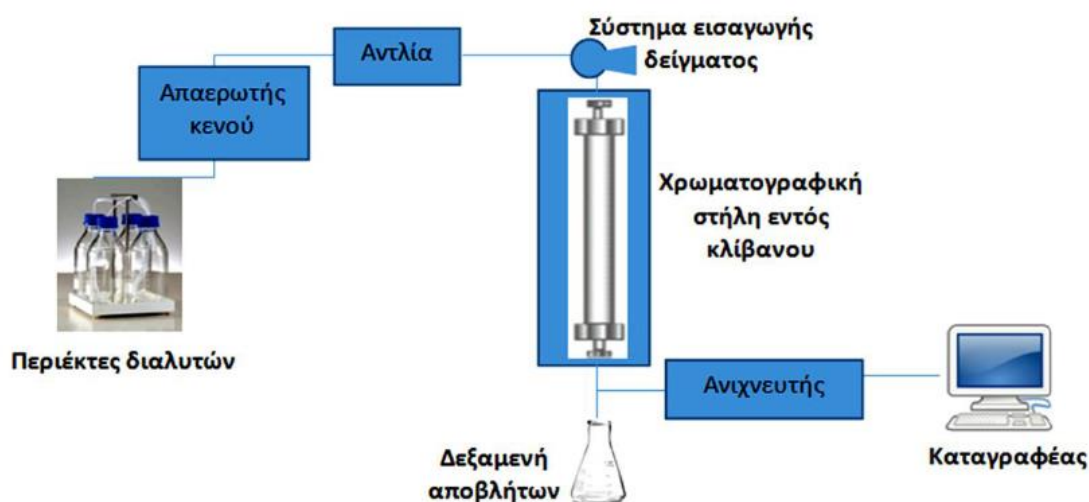
- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Αντλία: Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος: περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- Χρωματογραφική στήλη: στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο.
- Ανιχνευτής: Κάνει ορατό τον διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση.

Οι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην HPLC είναι οι παρακάτω:

- Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis)
- Παράταξης φωτοδιόδων
- Αγωγιμομετρικοί
- Δείκτη διάθλασης
- Φασματογράφοι μάζας
- Ηλεκτροχημικοί
- Φθορισμομετρικοί
- Ραδιενέργειας
- Σκεδασμού φωτός
- Φλόγας (ιονισμού φλόγας, εκπομπής, φωτομετρικοί ανιχνευτές)

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής είναι ο UV-Vis, καθώς ο συνδυασμός HPLC-UV/Vis παρέχει μια ακριβή, επαναλήψιμη και ανθεκτική μέθοδο για την ποσοτική ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων. Είναι αδιάφορος σε μεταβολές

της θερμοκρασίας, σχετικά φθηνός και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη βαθμιδωτή έκλυση.⁴⁰



Εικόνα 9. Διάγραμμα εργαστηριακής διάταξης υγρής χρωματογραφίας HPLC.⁴⁰

1.5.5. Βιομηχανική χρωματογραφία

1.5.5.1. Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί και σε παραπάνω ενότητα, πολύ μεγάλος αριθμός υποψήφιων ενώσεων συνθέτονται και μελετώνται, προκειμένου να βρεθεί τελικά μία ένωση που θα αποτελέσει φάρμακο (στατιστικά, επιλέγεται 1 ένωση από τις 10.000). Ταυτόχρονα, απαιτείται σημαντικός χρόνος και υπέρογκα ποσά μέχρι την κυκλοφορία ενός νέου φαρμάκου στην αγορά. Εδώ αξίζει να σημειωθεί, πως περίπου το 75% του κόστους ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου οφείλεται σε προηγούμενες αποτυχίες στην ανάπτυξή του. Επομένως, όσο γρηγορότερα αποτύχει μια υποψήφια ένωση, τόσο μικρότερο είναι το οικονομικό κόστος. Από τους κυριότερους λόγους αποτυχίας υποψήφιων φαρμάκων αποτελούν οι ελλιπείς φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, οι οποίες έχουν αναλυθεί παραπάνω και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μορίων. Έτσι, παρουσιάστηκε η χρήση της βιομηχανικής χρωματογραφίας για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην ομοιότητα μεταξύ χρωματογραφικών και βιολογικών διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα, όπως η υγροχρωματογραφία στηρίζεται σε μια δυναμική ισορροπία των χημικών ενώσεων του δείγματος ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση και ο χρόνος έκλυσης τους εκφράζει την κατανομή τους μεταξύ των δύο φάσεων, έτσι και πολλές φαρμακοκινητικές ιδιότητες είναι το αποτέλεσμα μιας δυναμικής ισορροπίας των φαρμάκων μεταξύ υδατικών φάσεων (κυρίως κυκλοφορίας του αίματος) και στατικών φάσεων (όπως κυτταρικές μεμβράνες και ιστοί). Επομένως, μέσω της μίμησης βιολογικών παραγόντων (στήλες με επιφάνεια που παρουσιάζει ομοιότητα

με βιολογικές μεμβράνες ή στήλες που περιέχουν μια πρωτεΐνη του αίματος) υπό κατάλληλες συνθήκες, είναι δυνατό η υγρή χρωματογραφία να αξιοποιηθεί για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων. Η μέθοδος της βιομιμητικής χρωματογραφίας εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως το ότι είναι απλή στην χρήση και γρήγορη, είναι φθηνή και έχει επαναληψιμότητα.⁴⁴ Σήμερα, διακρίνονται τρία είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας:

- Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM)
- Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (Immobilized Protein Chromatography)
- Μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC).

Στις επόμενες παραγράφους πρόκειται να αναλυθούν αυτοί οι τρεις τύποι, και ιδιαίτερα η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος, η οποία μελετάται στην παρούσα εργασία.³⁸

1.5.5.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM)

Η μέθοδος της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο στη φαρμακευτική χημεία και τον σχεδιασμό φαρμάκων, καθώς δίνει την δυνατότητα για ταχεία αξιολόγηση της ικανότητας των υποψήφιων φαρμάκων να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες και της αλληλεπίδρασής τους με αυτές. Έχουν γίνει πολλές μελέτες, οι οποίες συσχετίζουν τους παράγοντες κατακράτησης σε αυτό το είδος χρωματογραφίας, με φαρμακοκινητικές ιδιότητες όπως ο μη δεσμευμένος όγκος κατανομής, η πρόσδεση στους ιστούς, η ικανότητα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και η απορρόφηση φαρμάκων από την στοματική οδό.⁴⁴

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 80', ως μια εναλλακτική στο σύστημα οκτανόλης νερού, το οποίο ναι μεν χρησιμοποιείται για τη διαμόρφωση μια πρότυπης κλίμακας λιποφιλίας που προσομοιώνει τις βιολογικές μεμβράνες, αλλά έχει δεχτεί πολλές κριτικές ως προς την ικανότητά του να προσομοιώνει τη διαπερατότητα μέσω αυτών. Η χρωματογραφία IAM προσομοιώνει το αμφιφιλικό περιβάλλον των μεμβρανών, ενώ παράλληλα διατηρεί τα πλεονεκτήματα της χρωματογραφίας HPLC.⁴⁶

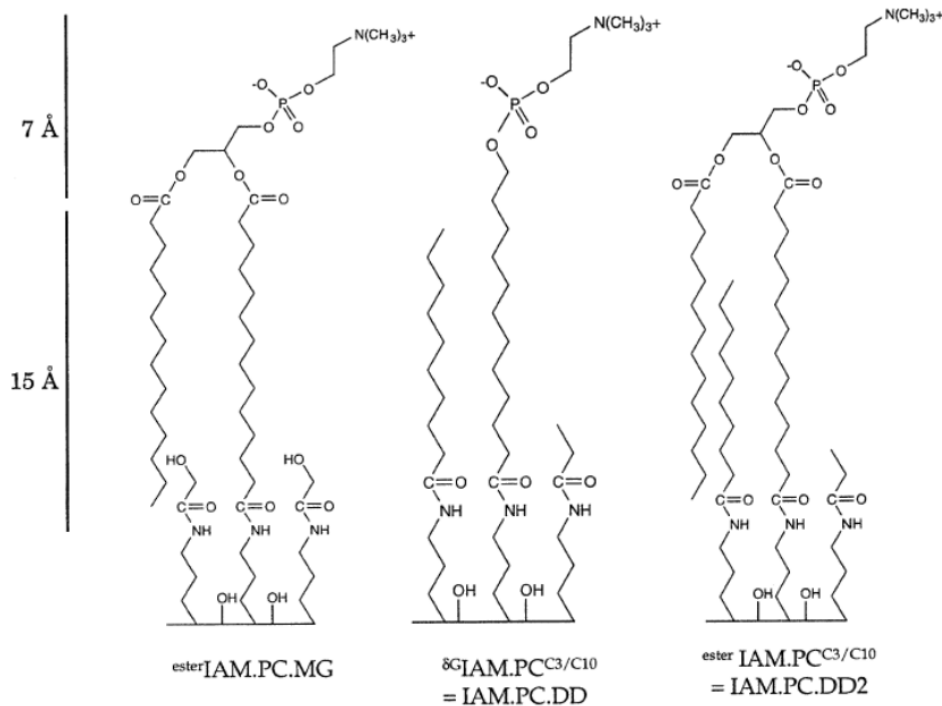
Οι βιομιμητικές στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών αποτελούν μονοστοιβάδες φωσφολιπιδίων, συνδεδεμένων με ομοιοπολικό δεσμό σε μηχανικά σταθερό σκελετό πηγματος πυριτίας (SiO₂) με πόρους 300 Å. Η πρώτη στατική φάση ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών παρασκευάστηκε από τον Pidgeon με ακινητοποίηση της φωσφατιδυλοχολίνης (το κυριότερο φωσφολιπίδιο που συναντάται στις κυτταρικές μεμβράνες) σε υπόστρωμα πηγματος οξειδίου του

πυριτίου μέσω ομάδας προπυλαμίνης, η οποία αντιδρά με την ω- καρβοξυλομάδα στη C-2 θέση της αλυσίδας του λιπαρού οξέος προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Οι στατικές φάσεις αυτού του είδους αναφέρονται ως IAM.PC (PC από τα αρχικά της Phosphatidyl Choline). Ωστόσο, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης, μόνο το ένα τρίτο των ομάδων προπυλαμίνης αντιδρούν με τα φωσφολιπίδια.⁴⁷ Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα δεύτερο επίπεδο επιφάνειας με βασικές ιδιότητες και η παρουσία υπολειπόμενων μορίων προπυλαμίνης στην στήλη IAM.PC επηρεάζει τη χρωματογραφική συμπεριφορά, αυξάνοντας την κατακράτηση όξινων ενώσεων και μειώνοντας την κατακράτηση βασικών ενώσεων, ενώ μπορεί να προκαλέσει και μείωση της χημικής σταθερότητας της στατικής φάσης. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, οι υπολειπόμενες ομάδες προπυλαμίνης επικαλύπτονται με μικρά μόρια, όπως γλυκιδόλη και μεθυλο-γλυκολικό οξύ (MG). Η εμπορικά διαθέσιμη στατική φάση αυτού του τύπου είναι η IAM.PC.MG.⁴⁶

Καθώς οι φυσικές βιολογικές μεμβράνες δεν περιέχουν ελεύθερες ομάδες υδροξυλίου κοντά στο κέντρο τους, δημιουργήθηκε ένας δεύτερος τύπος χρωματογραφικών στηλών IAM, όπου απουσίαζε ο σκελετός της γλυκερόλης και η κάλυψη των υπολειπόμενων ομάδων προπυλαμίνης έγινε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιείται δεκανοϊκό ανυδρίτη, μετατρέποντας περίπου το 85% της προσβάσιμης υπολειπόμενης αμίνης σε αμιδικές ομάδες. Οι υπόλοιπες ομάδες καλύπτονται στο δεύτερο στάδιο, με την χρήση προπιονικού ανυδρίτη. Έτσι, αυξάνεται η επιφανειακή πυκνότητα των φωσφολιπιδίων και κυρίως η πυκνότητα των πολικών κεφαλών και η σταθερότητα της στήλης σε όξινες συνθήκες. Η εμπορικά διαθέσιμη στήλη αυτού του τύπου ήταν η IAM.PC.DD (DD από τα αρχικά Drug Discovery).

Ωστόσο, ερευνητές ανακάλυψαν πως οι στήλες IAM.PC.DD παρουσίαζαν πρόωρη γήρανση, η οποία εκφραζόταν από σημαντική διεύρυνση των κορυφών και μειωμένους χρόνους κατακράτησης, αποτέλεσμα που ίσως οφείλεται στην αφαίρεση ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων από την υδατική κινητή φάση. Έτσι, αναπτύχθηκε ένα τρίτο είδος στατικής φάσης, γνωστό ως IAM.PC.DD2, το οποίο αποτελεί συνδυασμό των προηγούμενων δύο στο βαθμό που επί της προπυλαμίνης της πυριτίας ακινητοποιείται δισακυλιωμένη φωσφαδιτυλοχολίνη, ενώ η επικάλυψη των υπολειπόμενων αμινικών ομάδων (που δεν αντέδρασαν) γίνεται με ακυλίωσή τους, με την χρήση δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη.^{47, 48}

Οι δομές των τριών στατικών φάσεων (IAM.PC.MG, IAM.PC.DD, IAM.PC.DD2), για την χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών, απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 10. Δομές στατικών φάσεων των εμπορικά διαθέσιμων στήλων IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2. Για λόγους σύγκρισης απεικονίζεται και η δομή της στήλης IAM.PC.DD, η οποία δεν είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμη.⁴⁷

Η συγκράτηση των ουσιών στη στατική φάση, άρα και η συγγενείά τους με τις τεχνητές μεμβράνες εκφράζεται από τον παράγοντα χωρητικότητας k , ο οποίος ορίζεται:

$$k = \frac{n_{\text{στατ}}}{n_{\text{κιν}}} \quad (1.7)$$

Όπου $n_{\text{στατ}}$ τα μόρια της ουσίας που κατανέμονται στη στατική φάση και $n_{\text{κιν}}$ τα μόρια στην κινητή φάση μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας.⁴⁸

Έτσι, ο προσδιορισμός των συντελεστών κατανομής μεταξύ της υδατικής κινητής φάσης και της στατικής φάσης IAM απαιτεί μόνο μετρήσεις του χρόνου συγκράτησης (t_r) της διαλυμένης ουσίας και του νεκρού χρόνου (t_0) της στήλης ή του κενού όγκου. Ο νεκρός χρόνος προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μια ένωση που δεν συγκρατείται από την στήλη, όπως μεθανόλη ή (συνήθως) κιτρικό οξύ, όπως συνίσταται για στήλες IAM από τους κατασκευαστές. Ο παράγοντας χωρητικότητας χρησιμοποιείται στην λογαριθμική του μορφή και προσδιορίζεται τότε, σύμφωνα με την εξίσωση (50):

$$\log k_{IAM} = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_r} \right) \quad (1.8)$$

Έχει αποδειχθεί πως η κατακράτηση σε στήλες IAM προσομοιάζουν τον διαχωρισμό σε σύστημα οκτανόλης/νερού και η συσχέτιση τιμών $\log k_{IAM}$ με τις τιμές $\log P$ είναι ικανοποιητική. Στην συσχέτιση, λαμβάνεται υπόψη η μερική αντιστάθμιση του ιοντισμού λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι παράγοντες κατακράτησης IAM είναι γενικά χαμηλότεροι από τις τιμές $\log P$, λόγω της μειωμένης υδροφοβικότητας της

στατικής φάσης IAM. Δηλαδή, οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM αποτελούν διαφορετική κλίμακα λιποφιλίας.⁴⁶

1.5.5.3. Μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC)

Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (τασιενεργά) είναι αμφίφιλα μόρια που περιλαμβάνουν ένα υδρόφοβο τμήμα- που είναι συνήθως μια ανθρακική αλυσίδα μεγάλου σχετικά μεγέθους- και ένα υδρόφιλο, που περιλαμβάνει μια πολική ή ιοντική χαρακτηριστική ομάδα. Όταν προστεθούν στο νερό, ελαττώνουν την επιφανειακή τάση, λόγω εξασθένησης των δυνάμεων μεταξύ των μορίων του διαλύτη. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το φορτίο της χαρακτηριστικής ομάδας, σε ανιονικά τασιενεργά, κατιονικά τασιενεργά, αμφιτεριονικά, και μη ιονικά τασιενεργά. Ακόμα, μπορούν να διαχωριστούν ανάλογα με την φύση της υδρόφοβης χαρακτηριστικής ομάδας, σε υδρογονάνθρακες, χολικά άλατα, και τασιενεργά φλοράνθρακα.

Οι γραφικές παραστάσεις των φυσικών ιδιοτήτων (όπως η ηλεκτρική αγωγιμότητα, η πυκνότητα, η οσμωτική πίεση κ.α.) αραιών διαλυμάτων ορισμένων επιφανειοδραστικών ουσιών συναρτήσει της συγκεντρώσεως του διαλύματος παρουσιάζουν απότομη μεταβολή. Αυτό συμβαίνει διότι πάνω από μια κρίσιμη συγκέντρωση, τα τασιενεργά σχηματίζουν συσσωματώματα που είναι γνωστά ως μικκύλια, για αυτό και η συγκέντρωση αυτή καλείται κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίου (CMC). Η μεταβολή πραγματοποιείται στην ίδια περίπου συγκέντρωση ανεξάρτητα από την ιδιότητα που μελετάται. Τα μικκύλια είναι έχουν κατά κύριο λόγο σφαιρικό σχήμα, αλλά μπορούν να μετατραπούν και σε κυλινδρικά, ελλειψοειδή, δισκοειδή ή και να σχηματίζουν διπλοστιβάδες. Επίσης, ο αριθμός των μονομερών της επιφανειοδραστικής ουσίας που αποτελούν τα μικκύλια, καθώς και τα μεγέθη τους, ποικίλουν ανάλογα με το τασιενεργό από το οποίο σχηματίζονται.^{50, 51}

Η μικυλλιακή υγρή χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, όπου η κινητή φάση συνίσταται από υδατικά διαλύματα επιφανειοδραστικών ουσιών πάνω από την CMC. Ουσιαστικά, η βασική διαφορά από το σύστημα οργανικού-διαλύτη-νερού που χρησιμοποιείται στις άλλες τεχνικές βιομηχανικής χρωματογραφίας, είναι η προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα επιφανειοδραστικά μονομερή προσροφώνται στην επιφάνεια της μη πολικής στατικής φάσης δημιουργώντας ένα στρώμα που τροποποιεί τις ιδιότητές του. Η ιδέα της χρήσης καθαρών μικκυλλιακών διαλυμάτων ως κινητή φάση έχει μεγάλη προοπτική και είναι ελκυστική, αφού έχει χαμηλό κόστος, μικρή τοξικότητα και μικρότερο αντίκτυπο στο περιβάλλον. Ωστόσο, στην πράξη απαιτείται και η προσθήκη μικρής ποσότητας οργανικού διαλύτη στο μικκυλλιακό διάλυμα, ώστε να επιτυγχάνεται η συγκράτηση των ενώσεων σε πρακτικά χρονικά διαστήματα και να βελτιωθεί η απόδοση. Παράλληλα η χρωματογραφία MLC δίνει την δυνατότητα άμεσης έγχυσης δειγμάτων στον χρωματογράφο, κάτι που απλοποιεί και επιταχύνει την διαδικασία, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ακρίβεια και να μειώνεται το κόστος.⁵²

Μια ειδική κατηγορία της μικκυλιακής χρωματογραφίας αποτελεί η Μικκυλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC). Σε αυτό τον τύπο χρωματογραφίας χρησιμοποιείται διάλυμα με τον επιφανειοδραστικό παράγοντα Brij-35 (σε συγκέντρωση πάνω από την CMC) για την κινητή φάση και η στήλη αντιστρόφου φάσεως C-18 για την στατική φάση. Η ουσία Brij-35 έχει μοριακό τύπο C₅₈H₁₁₈O₂₄ και πρόκειται για έναν ουδέτερο τύπο μικκυλίου. Είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό όλων των ειδών ενώσεων, καθώς οι χρόνοι κατακράτησης είναι πολύ χαμηλότεροι σε σχέση με την περίπτωση των ιοντικών τύπων μικκυλίων, οι οποίοι συνδέονται με διαλυμένες ουσίες αντίθετου φορτίου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος κατακράτησης. Ακόμα, το συγκεκριμένο τασιενεργό παρουσιάζει χαμηλή τιμή κρίσιμης συγκέντρωσης μικκυλιοποίησης (CMCBrij-35 = 9*10⁻⁵ M), αφού δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις διότι πρόκειται για μη ιονισμένη ουσία. Έτσι, η BMC βρίσκει πολλές εφαρμογές και χρησιμοποιείται για την βιομίμηση πολλών διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα, είναι δυνατό να αξιοποιηθεί για προβλέψεις όπως της απορρόφησης φαρμάκων από την στοματική οδό, της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και του δέρματος, αλλά και της κατανομής των φαρμάκων σε ποικίλα βιολογικά συστήματα. Ωστόσο, ένα κύριο μειονέκτημα της μικκυλιακής χρωματογραφίας κατανομής είναι πως ο ρυθμός ανάλυσης ισχυρά υδρόφοβων διαλυμένων ουσιών είναι πιθανό να είναι αργός, με αποτέλεσμα να πρέπει να προστεθεί ποσότητα οργανικού διαλύτη.^{53, 54, 55}

1.5.5.4. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος (Immobilized Protein Chromatography)

Η δέσμευση των φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα, ο οποίος επηρεάζει τις φαρμακοκινητικές ιδιότητές του, δηλαδή την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση. Για αυτό τον λόγο, κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων γίνεται, σε προκλινικό στάδιο, μελέτη των ποσοστών δέσμευσής τους. Εξάλλου, είναι γνωστό πως μόνο το ελεύθερο (μη δεσμευμένο) φάρμακο μπορεί να διέρχεται από τους βιολογικούς φραγμούς και να κατευθύνεται στον ιστό-στόχο για την εκδήλωση της φαρμακολογικής του δράσης. Επομένως, αν υποψήφια φαρμακευτικά μόρια εμφανίζουν εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση, είναι πολύ πιθανό να έχουν μικρή κατανομή στους ιστούς, άρα και περιορισμένο φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Από την άλλη, πολύ μεγάλη πρωτεϊνική σύνδεση μπορεί να συνεπάγεται δυσχερή μεταβολισμό των φαρμάκων στο ήπαρ ή δυσκολία στην νεφρική τους απέκκριση. Γίνεται αντιληπτό πως η έκταση της δέσμευσης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες παίζει σημαντικό ρόλο στην φαρμακοκινητική του συμπεριφορά. Κάποιες από τις φαρμακοκινητικές παραμέτρους που εξαρτώνται άμεσα από το μη δεσμευμένο κλάσμα φαρμάκου (λόγος μη δεσμευμένου προς δεσμευμένο φάρμακο) είναι ο ρυθμός μεταβολισμού στο ήπαρ, ο ρυθμός νεφρικής απέκκρισης, ο ρυθμός κατανομής στις βιολογικές μεμβράνες και ο όγκος κατανομής σε σταθερή κατάσταση (steady state). Ιδανικά, για την αξιολόγηση του διαθέσιμου φαρμάκου για φαρμακολογική δράση, είναι

απαραίτητος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τόσο του συνολικού, όσο και του μη δεσμευμένου φαρμάκου.⁵⁶

Τα φάρμακα μπορεί να συνδεθούν με παραπάνω από 60 διαφορετικές πρωτεΐνες του αίματος όπως τη λευκωματίνη (αλβουμίνη), την α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη, τις λιποπρωτεΐνες ή τις γλοβουλίνες. Ωστόσο, οι δύο κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος που σχετίζονται με τη δέσμευση των φαρμάκων είναι η λευκωματίνη ανθρωπίου ορού (Human Serum Albumin, HSA) και η α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha1-Acid Glycoprotein, AGP).

Η συγκέντρωση της AGP στο πλάσμα υγιών ατόμων είναι 0.4-1.0 g/L (1-2% των συνολικών πρωτεϊνών στο πλάσμα). Η α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη δεσμεύει πολλές ουδέτερες λιπόφιλες ενώσεις και βάσεις. Έχει χαμηλότερη δεσμευτική ικανότητα από την λευκωματίνη, ωστόσο, λόγω του χαμηλότερου ισοηλεκτρικού της σημείου εμφανίζει υψηλή συγγένεια με αλκαλικά φάρμακα. Ακόμα, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να διακρίνει την εναντιοεκλεκτικότητα στην περίπτωση που οι ενώσεις διαθέτουν δύο ομάδες δέσμευσης υδρογόνου και μια άκαμπτη ή ογκώδη δομή κοντά σε ένα χειραλικό κέντρο. Η συγκέντρωσή της μεταβάλλεται λόγω ασθενειών, χρήσης φαρμάκων ή εγκυμοσύνης.^{12, 57}

Από την άλλη, η συγκέντρωση της HSA στο πλάσμα είναι κατά πολύ μεγαλύτερη, αφού φτάνει τα 35-50 g/L (50-60% των συνολικών πρωτεϊνών στο πλάσμα). Η ανθρώπινη λευκωματίνη δεσμεύει κυρίως όξινες ενώσεις. Χαρακτηρίζεται από πολλαπλές θέσεις λιποφιλικής δέσμευσης και σχηματίζει ιοντικούς δεσμούς με τα φάρμακα. Για τον λόγο ότι βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό στο αίμα, είναι η πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί εκτενέστερα, ανάμεσα στις δύο. Η δέσμευση σε πρωτεΐνη HSA είναι και αυτή που μελετάται στην παρούσα εργασία.^{12, 58}

Με το πέρασμα του χρόνου, έχουν μελετηθεί πολλές μεθοδολογίες για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δέσμευσης φαρμάκων από τις πρωτεΐνες. Μεταξύ αυτών, η διαπίδυση ισορροπίας (equilibrium dialysis) και η υπερδιήθηση (ultrafiltration) ακολουθούμενη καθεμιά από ανάλυση HPLC είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες. Η διαπίδυση ισορροπίας διαχωρίζει τα μόρια με μια ημιδιαπερατή μεμβράνη σύμφωνα με το μοριακό μέγεθος (βάρος) τους χρησιμοποιώντας ως κινητήρια δύναμη τη διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ των διαλυμάτων σε κάθε πλευρά της μεμβράνης. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί το γεγονός πως είναι χρονοβόρα. Από την άλλη, η υπερδιήθηση είναι μια μέθοδος που διαχωρίζει γρήγορα (συνήθως εντός 10 λεπτών) τα ελεύθερα μικρά μόρια από αυτά που δεσμεύονται από πρωτεΐνες, με την χρήση μιας μεμβράνης. Σε αυτή την μέθοδο, μειονέκτημα αποτελεί ο κίνδυνος διαρροής δεσμευμένου φαρμάκου μέσω της μεμβράνης, κάτι που την καθιστά μη εφαρμόσιμη σε φάρμακα που παρουσιάζουν υψηλή δέσμευση από πρωτεΐνες. Ακόμα, πρέπει να σημειωθεί πως και οι δύο μέθοδοι απαιτούν ένα επιπρόσθετο βήμα, όπως αέρια ή υγρή χρωματογραφία, ώστε να προσδιοριστεί η πραγματική τελική συγκέντρωση του μη δεσμευμένου φαρμάκου.⁵⁹

Συγκριτικά με τις παραπάνω συμβατικές μεθόδους, η χρωματογραφική μέθοδος είναι απλούστερη και ταχύτερη όσον αφορά την προετοιμασία και την ανάλυση του δείγματος, κάτι που την καθιστά αυτόματα και την πιο ενδιαφέρουσα. Η πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης στηρίζεται στην υπόθεση πως η ανθρώπινη λευκωματίνη προσδεδεμένη σε υπόστρωμα πυριτίας (χρησιμοποιείται για υποστήριξη), διατηρεί την ίδια διαμόρφωση και την ίδια ειδικότητα να δεσμεύει χημικές ενώσεις (χαρακτηριστικά πρόσδεσης) σε σύγκριση με την ειδική λευκωματίνη που βρίσκεται διαλυμένη στο πλάσμα του αίματος.³⁰ Παράλληλα, καθώς αναφερόμαστε σε φαρμακολογικές αναλύσεις, για μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου χρησιμοποιείται φασμαφωτόμετρο μάζας ως ανιχνευτής για την χρωματογραφία.⁶⁰

Έτσι λοιπόν, στην χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών χρησιμοποιεί στη στατική φάση πρωτεΐνες (στην παρούσα εργασία μελετάται η HSA) και υπόκειται στην ευρύτερη κατηγορία των Χρωματογραφιών Συγγένειας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Affinity Chromatography - HPAC). Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται ένα υδατικό διάλυμα που συνήθως περιέχει έναν οργανικό διαλύτη, προκειμένου να έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τις φαρμακευτικές ενώσεις που εξετάζονται και να μειώνεται ο χρόνος κατακράτησής τους, άρα και ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης. Στην περίπτωση ενώσεων με ισχυρή συγκράτηση από τις στήλες είναι δυνατόν να προστεθεί στην κινητή φάση ποσότητα ισοπροπανόλης ή ακετονιτρίλιο.^{47,61} Ακόμα, οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις και το pH μπορεί να επηρεάσουν το χρόνο κατακράτησης των ενώσεων από τις στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, για αυτό και υπάρχουν περιορισμοί στις τιμές του pH. Ενδεικτικά, στις στήλες HSA η κατακράτηση όξινων ενώσεων αυξάνεται με μείωση του pH, ενώ στη στήλη AGP η μείωση του pH οδηγεί σε μειωμένη κατακράτηση βασικών ενώσεων.⁶³ Όπως έχει προαναφερθεί, η επιτυχία της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα της διαλυμένης ουσίας που εγχέεται στο χρωματογραφικό σύστημα να αλληλεπιδρά με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Έτσι, τα φάρμακα που εμφανίζουν χαμηλότερη συγγένεια με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη (HSA στην περίπτωση που πρόκειται να μελετηθεί) θα έχουν και μικρότερους χρόνους έκλουσης, ενώ αυτά που προσδένονται ισχυρότερα στην πρωτεΐνη της στατικής φάσης θα έχουν υψηλότερο χρόνο έκλουσης.⁶³

Η ισχύς δέσμευσης του φαρμάκου από την πρωτεΐνη εκτιμάται με την χρήση του παράγοντα κατακράτησης k , ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της διαλυμένης ουσίας στη στατική φάση προς την διαλυμένη ουσία στην κινητή φάση και προσδιορίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$k = \left(\frac{t_r - t_0}{t_r} \right) \quad (1.9)$$

όπου t_r είναι ο χρόνος κατακράτησης του φαρμάκου και t_0 ο νεκρός χρόνος, δηλαδή ο χρόνος που κατακρατείται μια ένωση που δεν δεσμεύεται από την πρωτεΐνη.⁶⁴

Το ποσοστό του φαρμάκου που βρίσκεται δεσμευμένο με την λευκωματίνη υπολογίζεται μέσω του παράγοντα k , με βάση τον τύπο:

$$\%HSA \text{ bound} = 100 * \frac{k}{1+k} \quad (1.10)$$

Ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως η παραπάνω εξίσωση ισχύει για μη ειδική σύνδεση, κατά την οποία ο χρόνος έκλουσης της φαρμακευτικής ένωσης είναι ανεξάρτητος της ποσότητας που εισάγεται στο χρωματογραφικό σύστημα. Η δέσμευση θεωρείται ως η ισορροπία κατανομής μεταξύ της κινητής φάσης που έχει ελεύθερη ροή και της στατικής φάσης λευκωματίνης που ναι μεν περιέχει και αυτή μόρια προσροφημένου νερού, αλλά δεν ρέουν με την κινητή φάση. Σημειώνεται, πως ο συντελεστής μερισμού είναι ανεξάρτητος από την ποσότητα της ένωσης. Στην χρωματογραφία HPLC που χρησιμοποιεί πρωτεΐνες ως στατική φάση, η συγκέντρωση πρωτεΐνης μπορεί να θεωρηθεί πολύ υψηλότερη από τη συγκέντρωση του προσδέματος, καθώς καταλαμβάνει πολύ μικρό τμήμα της στήλης σε οποιοδήποτε χρονική στιγμή της ανάλυσης χρωματογραφίας. Για την έκφραση της στοιχειομετρικής σταθεράς δέσμευσης (n)- που εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις προσδέματος και πρωτεΐνης- με βάση το ποσοστό δέσμευσης (%HSA bound), χρησιμοποιείται η σχέση⁶⁴:

$$\log k (HSA) = \log \frac{\%HSA \text{ bound}}{100 - \%HSA \text{ bound}} - \log^n [HSA] \quad (1.11)$$

Προκειμένου να επιτυγχάνεται υψηλή αξιοπιστία των μετρήσεων από την ανάλυση πληθώρας φαρμακευτικών ενώσεων που εμφανίζουν διαφορετική λιποφιλία, συνίσταται η επανάληψη των μετρήσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση. Όσο πιο υψηλή είναι η συγκέντρωση, τόσο πιο μικρός είναι ο χρόνος έκλουσης των ενώσεων που μελετώνται. Στο επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται για κάθε ένωση γραμμική προεκβολή (linear extrapolation) των συντελεστών κατακράτησης σε 100% υδατική φάση, δηλαδή με 0% συγκέντρωση οργανικού τροποποιητή. Ο (λογαριθμικός) συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση, συμβολίζεται ως $\log k_w$ και έχει προταθεί ως το πλέον κατάλληλο μέγεθος για τον υπολογισμό της λιποφιλίας, ο οποίος γίνεται μέσω της εξίσωσης:

$$\log k = -S * \varphi + \log k_w \quad (1.12)$$

Όπου φ το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση και S η κλίση της ευθείας που προκύπτει.

Τονίζεται ωστόσο, πως η γραμμικότητα της παραπάνω εξίσωσης περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων του οργανικού τροποποιητή, και συγκεκριμένα μέχρι περίπου 30%.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι κάποιες φορές ο συγκεκριμένος τύπος χρωματογραφίας καλείται και ως χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (high performance affinity chromatography). Παρ' όλα αυτά, κάτι τέτοιο δεν είναι απόλυτα σωστό, καθώς στην χρωματογραφία συγγένειας προηγείται ένα βήμα, κατά το οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά η ένωση ενός μίγματος σε μια πρωτεΐνη και στη συνέχεια γίνεται έκλουση, όπου εκτοπίζεται η δεσμευμένη ουσία με χρήση ισχυρότερου συνδετικού προσδέματος. Όταν απλά μετρείται ο χρόνος κατακράτησης για να

προκύψει ο συντελεστής μερισμού της ένωσης από τη διαδικασία δυναμικής ισορροπίας δεν είναι εξ ορισμού χρωματογραφία συγγένειας.⁶⁴

Σύγκριση ακετονιτριλίου-ισοπροπανόλης

Στην βιομηχανική χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών- και ειδικότερα της ανθρώπινης λευκωματίνης- για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών φαινομένων, χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση ως οργανικοί τροποποιητές κυρίως ακετονιτρίλιο και ισοπροπανόλη.

Το ακετονιτρίλιο (CH_3CN) είναι πολύ καλός διαλύτης για την μετουσίωση/καθίζηση των πρωτεϊνών του πλάσματος, ενώ η ισοπροπανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) είναι ο προτεινόμενος διαλύτης για διαχωρισμό σε στήλη HSA, καθώς διατηρεί τη φυσική θέση πρόσδεσης της ανθρώπινης λευκωματίνης ορού. Επομένως, προτιμάται για την έκλυση ισχυρά δεσμευμένων ενώσεων.

Από την μία, οι Kratochwil et al. έδειξαν ότι η χρήση ισοπροπανόλης ως οργανικό διαλύτη σε στήλη HSA έδωσε αποτελέσματα που συσχετίζονταν καλύτερα με δεδομένα που είχαν προκύψει με συμβατική μέθοδο, σε σχέση με τη χρήση ακετονιτριλίου. Από την άλλη πλευρά, οι Chrysanthakopoulos et al. πρότεινε την χρήση 10% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση για την προσομοίωση δεδομένων δέσμευσης από την HSA πολλών φαρμάκων. Είναι πιθανό η χρήση του ακετονιτριλίου να συνίσταται μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις.^{64, 65}

1.6. Human Serum Albumin (HSA)

1.6.1. Γενικά-λειτουργία

Η ανθρώπινη λευκωματίνη ορού (Human serum albumin, HSA) καλείται αλλιώς και αλβουμίνη, και προέρχεται από την λατινική λέξη 'albus', που σημαίνει 'λευκό'. Συντίθεται στο ήπαρ, αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη στο πλάσμα, και είναι καθοριστικός παράγοντας για την ωσμωτική πίεση του πλάσματος, καθώς και ο βασικός ρυθμιστής της κατανομής των υγρών μεταξύ των διαμερισμάτων του σώματος. Η λευκωματίνη εμφανίζει εξαιρετική ικανότητα δέσμευσης, έχοντας τον ρόλο αποθήκης και φορέα για πολλές ενδογενείς και εξωγενείς ενώσεις. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και από το ότι είναι ο κύριος φορέας λιπαρών οξέων (δεσμεύει και αμινοξέα, μεταβολίτες, ενώσεις φαρμάκων, κ.α.), επηρεάζει την φαρμακοκινητική πολλών φαρμάκων, παρέχει μεταβολική τροποποίηση ορισμένων υποκαταστατών, καθιστά ακίνδυνες πιθανές τοξίνες, αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος και εμφανίζει (ψευδο-)ενζυματικές ιδιότητες. Παράλληλα, η HSA είναι πολύτιμος βιοδείκτης πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, ενώ χρησιμοποιείται ευρέως κλινικά για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.⁶⁶

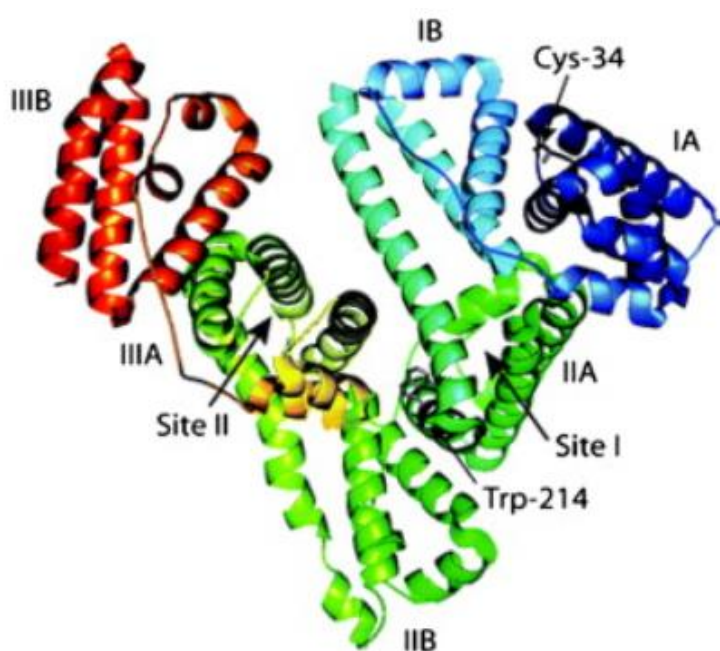
1.6.2. Δομή

Η λευκωματίνη είναι ένα ελικοειδές πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 585 αμινοξέα, με 17 δισουλφιδικές γέφυρες, μια ελεύθερη κυστεΐνη και μια τρυπτοφάνη. Το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου είναι 69000 και το ισοηλεκτρικό του σημείο τιμή ίση με 4,8. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές, οι οποίες είναι πιθανό να προέρχονται από πολλαπλασιασμό γονιδίων. Καθεμία από αυτές, χωρίζεται σε δύο υποπεριοχές, a και b, οι οποίες αποτελούνται από έξι και τέσσερις α-έλικες αντίστοιχα.^{67, 68, 69}

1.6.3. Δομικές περιοχές (domains)

Η δευτεροταγής δομή της HSA αποτελείται από α-έλικες, χωρίς καθόλου β-πτυχωτά φύλλα. Οι τρεις ομόλογες περιοχές που την αποτελούν είναι διατεταγμένες σε σφαιρική διαμόρφωση, σχηματίζοντας μια καρδιά με διαστάσεις (κατά προσέγγιση) 80x80x30 Å. Η περιοχή I περιέχει τα αμινοξέα 1-195, η περιοχή II τα αμινοξέα 196-383 και η περιοχή III τα αμινοξέα 384-585. Η υποπεριοχή I-a συνδέεται με την περιοχή διεπαφής μεταξύ των υποπεριοχών I-a και I-b με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου, χαρακτηριστικό που οδηγεί στη διάταξη σχήματος T των περιοχών I και II, οι οποίοι επομένως είναι σχεδόν κάθετοι μεταξύ τους. Από την άλλη, η περιοχή III προεξέχει από την II-b και δημιουργεί μια γεωμετρία σχήματος Y για τις περιοχές II και III, αλληλεπιδρώντας μόνο με την υποπεριοχή II-b. Παρά την δομική

ομοιότητά τους, καθεμία ομόλογη περιοχή από τις τρεις αλληλεπιδρά με την γειτονική της με διαφορετικούς τρόπους. Επομένως, ο προσανατολισμός μεταξύ των περιοχών I-II και II-III δημιουργεί ένα εξαιρετικά ασύμμετρο περιβάλλον, όπου μπορούν να εντοπιστούν πολλές πιθανές θέσεις πρόσδεσης. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί, πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει την δυνατότητα να αλλάζει εύκολα το μοριακό της σχήμα. Η ευκαμψία αυτή οφείλεται στις σχετικές κινήσεις των δομικών της περιοχών και χαρακτηριστικό της παράδειγμα είναι η μεγάλη μεταβολή στην διάταξη της πρωτεΐνης κατά τη σύνδεσή της με λιπαρά οξέα.⁶⁷ Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται η δομή και το σχήμα της HSA, με τις τρεις ομόλογες περιοχές και τις αντίστοιχες υποπεριοχές να έχουν σχεδιαστεί με διαφορετικό χρώμα, ενώ διακρίνεται και η κυστεΐνη και η τρυπτοφάνη ως δομικά στοιχεία.



Εικόνα 11. Αναπαράσταση της δομής της HSA.⁷⁰

1.6.4. Μελέτες πρόβλεψης φαρμακοκινητικών παραμέτρων με χρήση υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών

Όπως έχει αναφερθεί και σε παραπάνω ενότητα, ο όγκος κατανομής και η διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την κατανομή των φαρμακευτικών ενώσεων, δηλαδή για τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Οι παράμετροι αυτοί, μαζί με την πρωτεϊνική σύνδεση, έχουν μελετηθεί μέσω της διερεύνησης με HSA, και αναλύονται περαιτέρω παρακάτω.

1.6.4.1. Όγκος κατανομής

Ο φαινομενικός όγκος κατανομής, V_d , ορίζεται ως ο όγκος του υγρού που απαιτείται για να βρίσκεται σε αυτό η συνολική ποσότητα, Q , του φαρμάκου στο σώμα στην ίδια συγκέντρωση με αυτήν που βρίσκεται στο πλάσμα, C_p . Με άλλα λόγια, είναι ο υποθετικός όγκος στον οποίο διαλύονται τα φάρμακα εντός του οργανισμού. Έτσι, ορίζεται: $V_d = \frac{Q}{C_p}$ (1.13)

Είναι σημαντικό να αποφεύγεται να συσχετίζεται ένα δεδομένο εύρος V_d υπερβολικά στενά με κάποιο συγκεκριμένο ανατομικό διαμέρισμα. Τα φάρμακα μπορεί να δράσουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στα κομβικά διαμερίσματα που τους δίνουν πρόσβαση οι υποδοχείς τους. Για παράδειγμα, η ινσουλίνη έχει μετρηθέντα V_d παρόμοιο με τον όγκο του νερού του πλάσματος, αλλά ασκεί τη δράση της στους μύες, στο λίπος και στο ήπαρ μέσω υποδοχέων που είναι εκτεθειμένοι στο υγρό του διάμεσου χώρου, αλλά όχι στο πλάσμα.⁵

Όπως έχει προαναφερθεί (βλ. Ενότητα 1.2.4.2.), ο όγκος κατανομής είναι χρήσιμη φαρμακοκινητική παράμετρος για την εύρεση της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο πλάσμα, όταν είναι γνωστή η ποσότητά του στο σώμα, αλλά και τον υπολογισμό της δόσης που απαιτείται για την επίτευξη μιας επιθυμητής συγκέντρωσης φαρμάκου στο πλάσμα.¹² Ειδικότερα, ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις:

- Ποσοστό φαρμάκου στο πλάσμα = $\frac{V_p}{V_d}$ **(1.14)**
- Ποσοστό φαρμάκου στο υπόλοιπο σώμα = $\frac{V_d - V_p}{V_d}$ **(1.15)**

Αξίζει να σημειωθεί, πως οι τιμές του όγκου κατανομής για τα διάφορα φάρμακα μπορούν να ποικίλουν από 7 λίτρα μέχρι 50.000 λίτρα, δηλαδή να υπερβαίνουν κατά πολύ τον όγκο του σώματος.⁷¹

Έτσι, καθώς η δέσμευση στην πρωτεΐνη HSA θεωρείται ότι έχει την σημαντικότερη επίδραση στη μείωση της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο πλάσμα και στους ιστούς, αυτή χρησιμοποιείται ως στατική φάση σε υγροχρωματογραφία και προσδιορίζεται η έκταση της δέσμευσης των φαρμάκων από αυτή. Ακόμα, εξάγονται συμπεράσματα για τη συγκέντρωσή τους στο αίμα και στο υπόλοιπο σώμα, οπότε μπορεί σε επόμενο στάδιο να προβλεφθεί και ο όγκος κατανομής.⁷²

1.6.4.2. Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό

Για μια φαρμακευτική ένωση που δρα στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), είναι βασική απαίτηση να μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. (ΑΕΦ / blood-brain barrier – BBB). Η διείσδυσή του απαιτεί μόρια ικανά να διασχίσουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, και όχι να περνούν απλώς ανάμεσα τους. Γενικά, μόνο μικρά, μη πολικά μόρια μπορούν να διαχυθούν παθητικά κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών. Μερικά νευροδραστικά φάρμακα διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με αυτόν τον τρόπο, ενώ πολλά το επιτυγχάνουν μέσω μεταφορέων, οι οποίοι είτε διευκολύνουν την είσοδο στον εγκέφαλο, είτε τη μειώνουν μέσω άντλησης της ουσίας από το εσωτερικό των ενδοθηλιακών κυττάρων πίσω στη κυκλοφορία του αίματος. Στα φάρμακα που αποκλείονται από τον εγκέφαλο περιλαμβάνονται πολλά αντιβακτηριακά και αντικαρκινικά φάρμακα, ενώ οι συγκεντρώσεις μερικών δρώντων στο ΚΝΣ φαρμάκων μπορεί να περιορίζονται μέσω ενεργού απώθησης από τον εγκέφαλο.⁵

Κοινό μέτρο για τον προσδιορισμό της διέλευσης από τον ΑΕΦ αποτελεί ο λόγος της συγκέντρωσης σε μόνιμη κατάσταση του φαρμακευτικού μορίου στον εγκέφαλο προς την συγκέντρωσή του στο αίμα. Συνήθως εκφράζεται ως $\log(C_{\text{εγκεφ}}/C_{\text{αιμ}})$ ή $\log BB$. Μετρήσεις γίνονται κυρίως με *in vivo* πειράματα, με την διαδικασία να είναι

χρονοβόρα, δαπανηρή και δύσκολη, αλλά και απαραίτητη, διότι προσφέρει καλύτερη πρόβλεψη των τιμών \log_{BB} για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετώνται.⁷³

Η λευκωματίνη ορού έχει βασικό ρόλο στη μεταφορά και διάθεση εξωγενών και ενδογενών ενώσεων που υπάρχουν στο αίμα, καθώς αποτελεί μία από τις κύριες πρωτεΐνες-φορείς φαρμακευτικών ενώσεων, τις οποίες μεταφέρει μέσω του ΑΕΦ. Ειδικότερα, η τρυπτοφάνη που αναφέρθηκε πως περιέχει η HSA βρίσκεται στην περιοχή IIa, στην οποία υπάρχει μια μεγάλη υδρόφοβη κοιλότητα και ο φθορισμός της είναι ευαίσθητος στα προσδέματα που βρίσκονται κοντά. Λόγω αυτής της ιδιότητας, είναι δυνατό να λαμβάνονται πληροφορίες για την σύνδεση HSA-προσδέματος μέσω της μέτρησης της έντασης φθορισμού της τρυπτοφάνης πριν και μετά την προσθήκη του μορίου του φαρμάκου.

1.6.4.3. Πρωτεϊνική σύνδεση

Ο όρος πρωτεϊνική σύνδεση αναφέρεται στην αντιστρεπτή σχέση ενός φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος εξαιτίας των ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Το ποσοστό φαρμάκου που δεν δεσμεύεται από πρωτεΐνες, κυκλοφορεί ελεύθερο και μεταφέρεται από το αίμα σε διάφορα όργανα όπου διαχέεται σε διαφορετικό βαθμό.⁷⁴ Όπως έχει προαναφερθεί, οι πρωτεΐνες του πλάσματος που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα φάρμακα, είναι περισσότερες από εξήντα. Το ποσοστό σύνδεσης κάθε φαρμάκου εξαρτάται από τη συγγένειά του με τις διάφορες πρωτεΐνες, αλλά και τη δεσμευτική χωρητικότητα της κάθε πρωτεΐνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αλλαγή στην ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή ενδέχεται να οφείλεται σε παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών καθώς, επίσης, σε παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης ή στη μετατόπιση του σημείου δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η διαφοροποίηση της ικανότητας δέσμευσης των πρωτεϊνών έχει μεγαλύτερες επιπτώσεις σε φάρμακα με μεγάλη ικανότητα δέσμευσης (<90%) σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και σε φάρμακα με μικρού εύρους θεραπευτικές ενδείξεις. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι μη αναμενόμενες ή μη προβλέψιμες και να οδηγήσουν σε δραστικές αλλαγές στη συγκέντρωση του φαρμάκου σε έναν οργανισμό είτε με αύξηση είτε με μείωση της ελεύθερης συγκέντρωσης που κυκλοφορεί στο αίμα. Δεδομένου ότι το μη δεσμευμένο φάρμακο είναι εκείνο που είναι διαθέσιμο για να προσεγγίσει τους υποδοχείς σε όργανα/κύτταρα, η συγκέντρωσή του είναι πολύ σημαντική και συνδέεται άμεσα με την επίδρασή του στον οργανισμό.

Επομένως, είναι σαφές ότι η χρήση μεθόδων για τον προσδιορισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου στις πρωτεΐνες είναι απαραίτητη. Ως μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δέσμευσης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες αναφέρονται: η διαπίδυση (equilibrium dialysis), η υπερδιήθηση (ultrafiltration) και η διήθηση πηκτής (gel filtration). Οι παραπάνω μέθοδοι μπορεί να είναι χρονοβόρες, επίπονες και μερικές φορές μη συμβατές με το δείγμα ή το διαθέσιμο όγκο. Τα τελευταία χρόνια, για την εκτίμηση του ποσοστού δέσμευσης φαρμάκων από πρωτεΐνες, έχουν αναφερθεί εφαρμογές της χρωματογραφίας συγγένειας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME, Solid Phase Micro-Extraction).

Η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος που ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις για ταχύτητα και αξιοπιστία των μετρήσεων, είναι η υγρή χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, η οποία και μελετάται στην παρούσα εργασία. Οι παράγοντες χωρητικότητας k σχετίζονται άμεσα με την αναλογία του αριθμού των μορίων στη στατική και την κινητή φάση, μέσω της οποίας μπορεί να εξαχθεί το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης στο πλάσμα. Έτσι, οι συντελεστές κατακράτησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης σύμφωνα με τη παραπάνω εξίσωση:

$$\%PPB = 100 * \frac{k}{k+1} \quad (1.16)$$

Η εξίσωση (1.16) ισχύει με την προϋπόθεση ότι η συγκράτηση της ένωσης είναι ανεξάρτητη από την ποσότητα που εγχύθηκε και οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες διατηρούν τις ιδιότητες που έχουν όταν είναι σε διάλυμα.

Ειδικότερα, για την πρωτεΐνη HSA, έχουν βρεθεί δύο θέσεις που δεσμεύουν εναντιοεκλεκτικά φαρμακευτικά μόρια:

- Η «θέση I», που δεσμεύει τη βαρφαρίνη και την και την αζαπροπαζόνη
- Η «θέση II», που δεσμεύει προφενικά οξέα και βενζοδιαζεπίνες⁷⁶

Επιπροσθέτως, η χρωματογραφία με στατική φάση την HSA χρησιμοποιείται σε πειράματα αντικατάστασης (displacement experiments), όπου προσδιορίζεται η θέση σύνδεσης των μορίων στην πρωτεΐνη. Σε αυτά, σε πρώτο στάδιο αναλύεται μια πρότυπη ένωση (π.χ. βαρφαρίνη), με γνωστά χαρακτηριστικά ως προς την πρωτεϊνική σύνδεση, ενώ στην συνέχεια επαναλαμβάνεται η ίδια ανάλυση αλλά με παρουσία, ως προσθετικού στην κινητή φάση, της ένωσης που πρόκειται να μελετηθεί.⁷⁷

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Σχεδιασμός πειραματικής διαδικασίας

2.1.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο) στους δείκτες ανάσχεσης κατά τη βιομιμητική χρωματογραφία ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών φαινομένων.

2.1.2. Πειραματική διαδικασία

2.1.2.1. Παρασκευή κινητής φάσης

Αρχικά, παρασκευάζεται η κινητή φάση, για την οποία λαμβάνονται 0,77 g KH_2PO_4 , 3,44 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g NaCl και 0,1 g KCl. Τα στερεά αυτά, διαλύονται σε ποτήρι ζέσεως σε περίπου 300 ml υπερκάθαρου νερού, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στα 400 rpm, για περίπου 15 λεπτά, μέχρι να διαλυθούν τελείως. Όταν ολοκληρωθεί η διαλυτοποίηση, γίνεται ρύθμιση του pH σε 7.0, με προσθήκη αραιού διαλύματος HCl. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (Mettler Toledo). Έπειτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 ml και πληρώνεται μέχρι την χαραγή με υπερκάθαρο νερό, στην περίπτωση όπου παρασκευάζεται κινητή φάση χωρίς οργανικό τροποποιητή (100% υδατική φάση). Αν παρασκευάζεται κινητή φάση με οργανικό τροποποιητή, τότε προστίθεται πρώτα η κατάλληλη ποσότητα ακετονιτρίλιου, με την χρήση σιφωνίου και πουάρ, και ακολούθως πληρώνεται η ογκομετρική φιάλη με υπερκάθαρο νερό μέχρι την χαραγή. Για τις περιεκτικότητες σε ακετονιτρίλιο 5% και 10% προστίθενται 25 και 50 ml, αντίστοιχα.

2.1.2.2. Χρωματογραφική διαδικασία

Πριν την έναρξη των μετρήσεων, ρυθμίζεται με το πρόγραμμα Chromera v.3.2.0 η ροή της κινητής φάσης (διαλύτης έκλουσης) στο 1.00mL/min καθώς και το μήκος κύματος στο οποίο μετράει ο ανιχνευτής UV-Vis, στα 220nm. Αφού έχει τεθεί σε λειτουργία ο χρωματογράφος, γίνεται απαέρωση του διαλύτη έκλουσης, ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων αέρα. Έπειτα, το σύστημα αφήνεται να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30 λεπτά με την επιλεγμένη ροή κινητής φάσης, προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.

Ακολουθούν, στη συνέχεια, οι μετρήσεις για τις μελετούμενες φαρμακευτικές ενώσεις. Σε πρώτη φάση, γίνεται μέτρηση του νεκρού χρόνου (t_0), για την οποία χρησιμοποιείται ο χρόνος έκλουσης του κιτρικού νατρίου ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Η φαρμακευτική ένωση που πρόκειται να εξεταστεί διαλύεται σε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού, ενώ αν κριθεί απαραίτητο, προστίθενται και μικρή ποσότητα κινητής φάσης ή ακετονιτρίλιου για καλύτερη διαλυτοποίηση. Όταν το σύστημα του

χρωματογράφου μας ειδοποιήσει ότι είναι έτοιμο για μέτρηση, εγχέουμε με χρήση σύριγγας το διαλυτοποιημένο φάρμακο. Όταν παρατηρήσουμε την κορυφή που αντιστοιχεί στην μελετούμενη ένωση, σταματάμε την μέτρηση και καταγράφουμε στην συνέχεια τον αντίστοιχο χρόνο ανάσχεσης (t_r). Για κάθε φάρμακο, γίνονται τρεις διαφορετικές μετρήσεις, από τον μέσο όρο των οποίων προκύπτει τελικά ο χρόνος κατακράτησης. Έτσι, μέσω της εξίσωσης (1.9), υπολογίζονται οι λογαριθμικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k$ για τις αντίστοιχες φαρμακευτικές ενώσεις. Στο τέλος κάθε ημέρας, μετά την διεκπεραίωση των πειραμάτων, καθαρίζεται η στήλη ακινητοποιημένης πρωτεΐνης HSA για τουλάχιστον 45min, ρυθμίζοντας την ροή να έχει σύσταση 50% υπερκάρθο νερό και 50% ακετονιτρίλιο.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν τα εξής:

- Για την παρασκευή κινητής φάσης:
 - ❖ KH_2PO_4 (αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,5\%$, Chem-Lab NV)
 - ❖ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,5\%$, Honeywell)
 - ❖ NaCl (αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,8\%$, Honeywell)
 - ❖ KCl (αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,5\%$, Riedel-de Haen)
 - ❖ CH_3CN (ακετονιτρίλιο αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,9\%$, HPLC Grade, Honeywell)
- Για τον προσδιορισμό του νεκρού χρόνου της στήλης:
 - ❖ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (αναλυτικής καθαρότητας, $\geq 99,0\%$, Mallinckrodt)
- Για άλλες χρήσεις:
 - ❖ HCl (Panreac)
 - ❖ Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water, HPW)

Το νερό υψηλής καθαρότητας πρόκειται για απιονισμένο νερό, το οποίο λαμβανόταν με την βοήθεια συστήματος καθαρισμού νερού που θα αναφερθεί σε παρακάτω παράγραφο, ώστε να αποκτήσει το επιθυμητό επίπεδο καθαρότητας.

2.2.2. Οργανολογία

2.2.2.1. Χρωματογραφικό σύστημα

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα Flexar (Perkin Elmer), το οποίο περιλαμβάνει:

- ❖ Διαχειριστή διαλυτών έκλουσης (Flexar Solvent Manager)
- ❖ Αντλία υψηλής πίεσης (Flexar LC Pump)

❖ Ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους φωτός (Flexar UV-Vis Detector)

Ο όγκος του βρόγχου έγχυσης είναι 20 μL . Για την συλλογή δεδομένων και την καταγραφή των χρωματογραφικών κορυφών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chromera v.3.2.0 (Perkin Elmer).



Εικόνα 12. Υγροχρωματογραφικό σύστημα Flexar (Perkin Elmer)

2.2.2.2. Σύστημα καθαρισμού νερού

Όπως έχει αναφερθεί, το απαιτούμενο υπερκάθαρο νερό λαμβάνεται από σύστημα καθαρισμού νερού. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ThermoScientific BarnsteadEasypurell (εικόνα 13), το οποίο παράγει νερό τύπου I (υπερκάθαρο), αφού τροφοδοτηθεί από ήδη επεξεργασμένο νερό τύπου II, δηλαδή από αντίστροφη ώσμωση, απιονισμένο ή απεσταγμένο. Το νερό που παράγεται έχει εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (<10 ppb) και αντίσταση μέχρι 18,2 megohms-cm.⁷⁸ Η αντίσταση του νερού εμφανίζεται διαρκώς σε μια ψηφιακή οθόνη, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 13. Σύστημα καθαρισμού νερού ThermoScientific BarnsteadEasyPureII⁷⁸

2.2.3. Στατική φάση

Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη ακινητοποιημένης πρωτεΐνης CHIRALPAK-HSA (50x4 mm, 5 μm μέγεθος σωματιδίων) της εταιρείας Daicel Group. Στην στήλη υπήρχε ανθρώπινη λευκωματίνη ορού, προσδεδεμένη σε υπόστρωμα πυριτίας.

2.2.4. Κινητή φάση

Ο διαλύτης έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση αποτελούνταν από αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) σε pH=7.0, με και χωρίς την παρουσία ακετονιτρίλιου ως οργανικού τροποποιητή. Ειδικότερα, οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.0, χωρίς παρουσία ακετονιτρίλιου (100% Υδατική φάση)
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.0, περιεκτικότητας 5% σε ακετονιτρίλιο
- PBS ρυθμισμένο σε pH 7.0, περιεκτικότητας 10% σε ακετονιτρίλιο

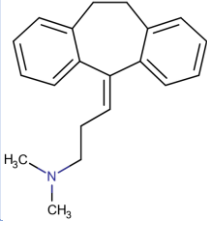
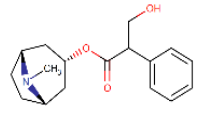
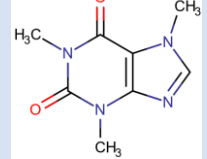
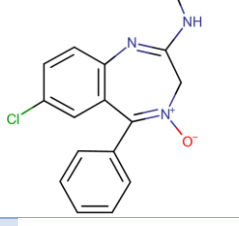
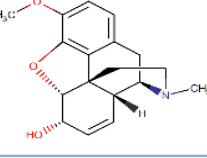
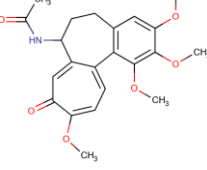
2.2.5. Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν

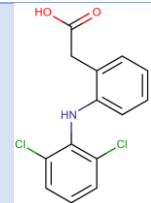
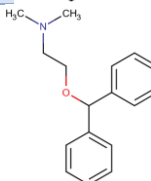
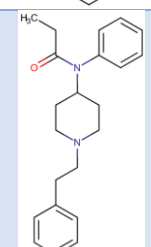
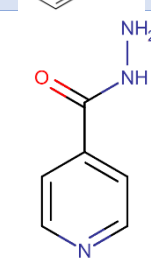
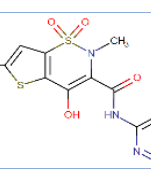
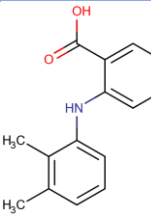
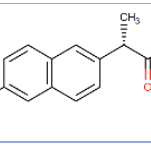
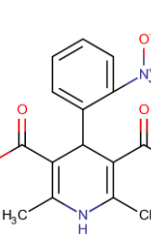
Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε ένας ικανός αριθμός φαρμάκων (24), τα οποία διαφοροποιούνται ως προς την φύση τους (οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα) και την φαρμακολογική τους φράση (π.χ. αντιβιοτικά, καρδιολογικά, αντιφλεγμονώδη κ.ά.). Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα από αυτά ήταν διαθέσιμα ως πρότυπες ενώσεις από την Sigma-Aldrich, αμερικάνικη εταιρεία χημείας, βιοεπιστημών και βιοτεχνολογίας, ενώ άλλα ως φαρμακευτικά

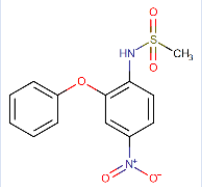
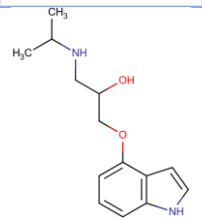
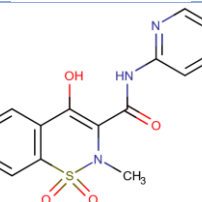
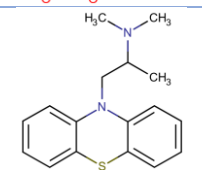
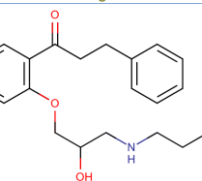
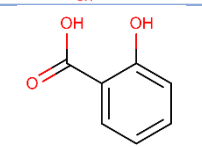
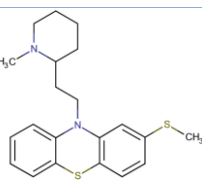
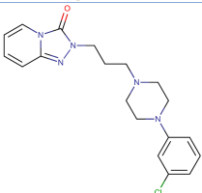
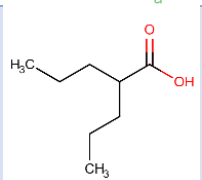
σκευάσματα από φαρμακεία. Στα φάρμακα που δεν ήταν πρότυπες ενώσεις, περιέχονται έκδοχα, τα οποία είναι ουσίες που προστίθενται σε μικρές συνήθως ποσότητες στις διάφορες μορφές φαρμάκων, αλλά δεν έχουν την ίδια φαρμακολογική δράση. Σκοπός της προσθήκης εκδόχων είναι η βελτίωση κάποιου χαρακτηριστικού του φαρμάκου, όπως για παράδειγμα η γεύση, ή η βελτίωση της θεραπευτικής τους δράσης, διευκολύνοντας για παράδειγμα την απορρόφησή τους από τον οργανισμό.⁷⁹

Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται όλα τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 1), σε συνδυασμό με την φύση τους (οξύ, A=Acid/βάση, B=Base /αμφολύτης, Z= Zwitterion / ουδέτερο, N= Neutral), την φαρμακολογική τους δράση και τη χημική δομή τους.

Πίνακας 2. Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους ^{80,81}

A/A	Φαρμακευτική ένωση	Φύση	Φαρμακολογική δράση	Χημική Δομή
1	Amitriptyline	B	Αντικαταθλιπτική δράση	
2	Atropine	B	Αντιχολινεργικό	
3	Caffeine	N	Διεγερτικό ΚΝΣ	
4	Chlordiazepoxide	N	Αγχολυτικό	
5	Codeine	B	Οπιοειδές-αναλγητική δράση	
6	Colchicine	N	Ανακούφιση οξείων προσβολών ουρικής αρθρίτιδας και για την προφύλαξη οξείων προσβολών	

7	Diclofenac	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
8	Diphenhydramine	B	Αντιισταμινικό	
9	Fentanyl	B	Οπιοειδές αναλγητικό	
10	Isoniazide	N	Αντιφυματικό	
11	Lornoxicam	A	Μη στεροειδές Αντιφλεγμονώδες	
12	Mefenamic acid	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
13	Naproxen	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
14	Nifedipine	B	Αναστολή της εισροής ιόντων ασβεστίου στα κύτταρα του μυοκαρδίου και τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων	

15	Nimesulide	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
16	Pindolol	B	Ειδικός παράγοντας αποκλεισμού των β- αδρενεργικών υποδοχέων	
17	Piroxicam	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
18	Promethazine	B	Αντιισταμινικό	
19	Propafenone	B	Αντιαρρυθμικό	
20	Salicylic acid	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
21	Thioridazine	B	Αντιψυχωσικό	
22	Trazodone	B	Αντικαταθλιπτική δράση	
23	Valproic acid	A	Αντιεπιληπτική δράση	

2.3 Βιβλιογραφικά δεδομένα

2.3.1. Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των μορίων

Στον πίνακα 3 παρατίθεται τα δεδομένα για τους συντελεστές μερισμού και κατανομής των φαρμάκων, logP και logD αντίστοιχα, καθώς και για τα κλάσματα θετικού (F⁺) και αρνητικού (F⁻) φορτίου, σε pH=7.4. Τα δεδομένα αυτά, αντλήθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 της εταιρίας Pharma Algorithms Inc.

Πίνακας 3. Δεδομένα λιποφιλίας (logP, logD^{7.4}) και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου (F⁺, F⁻)

A/A	Φαρμακευτική ένωση	logP	logD ^{7.4}	F ^{+(7.4)}	F ^{-(7.4)}
1	Amitriptyline	5,04	2,50	0,982	0,000
2	Atropine	1,83	-0,41	0,996	0,000
3	Caffeine	-0,07	-0,07	0,000	0,000
4	Chlordiazepoxide	2,44	2,44	0,002	0,000
5	Codeine	1,14	0,37	0,848	0,000
6	Colchicine	1,03	1,03	0,000	0,000
7	Diclofenac	4,40	1,34	0,000	1,000
8	Diphenhydramine	3,40	1,29	0,965	0,000
9	Fentanyl	4,05	3,27	0,848	0,000
10	Isoniazide	-0,70	-0,92	0,000	0,000
11	Lornoxicam	2,62	0,61	0,000	0,993
12	Mefenamic acid	5,12	2,00	0,000	0,999
13	Naproxen	3,18	0,33	0,000	0,999
14	Nifedipine	2,20	2,20	0,000	0,000
15	Nimesulide	2,60	1,35	0,000	0,966
16	Pindolol	1,75	-0,33	0,994	0,000
17	Piroxicam	1,76	-0,05	0,000	1,000
18	Promethazine	4,81	2,79	0,989	0,000
19	Propafenone	3,20	1,81	0,992	0,000
20	Salicylic acid	2,26	-1,67	0,000	1,000
21	Thioridazine	5,90	3,34	0,991	0,000
22	Trazodone	2,90	2,54	0,218	0,000
23	Valproic acid	2,75	0,26	0,000	0,996

2.3.2. Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών τύπου IAM.DD2 και ακινητοποιημένης A1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης

Λαμβάνονται δεδομένα για τους συντελεστές κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών IAM.PC.DD2 και ακινητοποιημένης A1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης από μετρήσεις προηγούμενων διπλωματικών εργασιών, καθώς και βιβλιογραφικά^{13,14}. Τα δεδομένα αυτά, παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα. Για όσα φάρμακα δεν υπάρχουν δεδομένα, τα αντίστοιχα κελιά τους στον πίνακα 4 είναι κενά.

Πίνακας 4. Πρόσθετα δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών σε στήλη IAM.PC.DD2 και ακινητοποιημένης πρωτεΐνης AGP

A/A	Φαρμακευτική ένωση	$\log k_{w, IAM.DD2}$	$\log k_{w, AGP}$
1	Acetylsalicylic acid	-0,81	0,00
2	Albendazole	2,08	
3	Allopurinol	-0,28	
4	Amitriptyline	2,99	
5	Amoxicillin	-0,29	0,00
6	Ampicillin	0,04	0,00
7	Caffeine	0,26	
8	Chlordiazepoxide	1,86	1,58
9	Chlorpheniramine	2,03	1,022
10	Chlorpromazine	3,33	
11	Ciprofloxacin	1,31	
12	Diphenhydramine	1,82	1,698
13	Diltiazem	2,65	
14	Enoxacin	0,55	
15	Estradiol	2,59	
16	Flunitrazepam	1,79	1,122
17	Fluoxetine	2,98	1,549
18	Haloperidol	2,65	
19	Ibuprofen	0,87	0,00
20	Indomethacin	2,41	0,00
21	Ketoprofen	0,74	0,00
22	Lidocaine	1,27	1,564
23	Losartan	2,47	0,00
24	Mebendazole	2,44	1,389
25	Mefenamic acid	1,88	0,00
26	Nifedipine	1,66	
27	Nortriptyline	2,83	
28	Ofloxacin	0,81	
29	Paracetamol	0,18	0,00
30	Pentazocine	1,67	
31	Phenobarbital	0,28	0,00
32	Pindolol	1,47	
33	Piroxicam	1,35	0,00
34	Promethazine	2,78	
35	Propafenone	1,46	
36	Propranolol	2,33	
37	Protriptyline	2,79	1,61
38	Pyrimethamine	1,87	1,157
39	Quinidine	2,34	1,531
40	Sulfamethoxazole	-0,04	0,00
41	Tenoxicam	1,2	0,00
42	Terbutaline	0,78	
43	Theophylline	-0,08	0,00
44	Thioridazine	3,98	
45	Trazodone	2,34	1,525
46	Acyclovir	-0,27	

47	Amlodipine	3,4	
48	Atenolol	0,51	
49	Bromazepam	1,44	
50	Enalapril		0,00
51	Metformin	-0,37	0,00
52	Naproxen	0,98	0,00
53	Nimesulide	1,57	0,00
54	Norfloxacin	1,01	
55	Trimethoprim	1,49	0,651
56	Verapamil	2,76	
57	Carbamazepine	1,93	
58	Dexamethazone	1,56	
59	Diclofenac	2,462	0,00
60	Furosemide	1,319	0,471
61	Hydrochlorothiazide	0,909	
62	Lisinopril	-0,567	
63	Metoprolol	0,87	
64	Ranitidine	0,61	
65	Labetalol	2,463	
66	Prednisolone	1,65	
67	Ceftriaxone	-0,52	0,00
68	Chloramphenicol	0,31	
69	Cimetidine	0,84	
70	Cinoxacin	-0,5	0,00
71	Hydrocortisone	0,94	
72	Isoxicam	0,91	0,00
73	Levofloxacin	0,84	
74	Lornoxicam	1,5	0,00
75	Meloxicam	1,4	0,00
76	Methylprednisolone	1,74	
77	Metoclopramide	1,63	
78	Minoxidil	0,73	
79	Nadolol	1,26	
80	Nalidixic acid	0,23	0,00
81	Niflumic acid	1,52	0,00
82	Omeprazole	1,81	
83	Pipemidic acid	0,16	
84	Piperacillin	0,6	0,00
85	Salicylic acid	-0,3	0,00
86	Sulpiride	1,04	
87	Vancomycin	1,23	0,9
88	Warfarin	1,04	0,00
89	Antipyrine	0,309	0,348
90	Atropine	1,12	0,531
91	Clonidine	1,116	0,746
92	Desipramine	3,016	1,762
93	Fluphenazine	4,013	2,536
94	Imipramine	2,883	1,845
95	Nicotine	0,088	0,00
96	Nitrofurantoin	0,314	0,00

97	Primidone	0,656	0,29
98	Promazine	3,051	1,997
99	Rifampicin	1,615	0,955
100	Citalopram	2,569	
101	Codeine	0,953	0,612
102	Colchicine	1,98	
103	Fenofibrate	4,346	2,337
104	Isoniazide	-0,598	0,00
105	Methyldopa	-0,517	
106	Minocycline	0,168	
107	Phenytoin	2,056	0,00
108	Pioglitazone	2,896	2,098
109	Pyrazinamide	-0,503	
110	Retinoic acid	4,585	0,00
111	Valproic acid	1,756	0,00

2.3.3. Δεδομένα για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων
Λαμβάνονται δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης (PPB%) και όγκου κατανομής (V_d) φαρμακευτικών ενώσεων. Για την συσχέτισή τους με χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης, αντλούνται δεδομένα μετρήσεων και από προηγούμενες μετρήσεις προκειμένου να προκύψει μια διευρυμένη βάση δεδομένων. Παράλληλα, για την διεκπεραίωση της τεχνικής PLS (Μερικά ελάχιστα τετράγωνα) που πρόκειται να ακολουθηθεί αντλούνται ποικίλα δεδομένα για την εισαγωγή τους στο μοντέλο. Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τις συσχετίσεις των φαρμακοκινητικών παραμέτρων παρατίθενται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5. Πρόσθετα δεδομένα συντελεστών κατακράτησης στηλών HSA και AGP

A/A	Φαρμακευτική ένωση	$\log k_{w,HSA}$	$\log k_{5,HSA}$	$\log k_{10,HSA}$	$\log k_{5,AGP}$	$\log k_{10,AGP}$
1	Acetylsalicylic acid	-0,7	-0,87	-0,99	0	0
2	Albendazole	1,3	1,03	0,7	0,674	0,571
3	Allopurinol	-0,66			0	0
4	Amitriptyline	1,507	1,227	0,952	1,522	1,292
5	Amoxicillin	-1,055	-1,11	-1,054	0	0
6	Ampicillin	-0,63	-0,82	-0,74	0	0
7	Caffeine	-0,32	-0,508	-0,588	0	0
8	Chlordiazepoxide	1,013	0,761	0,435	1,064	0,632
9	Chlorpheniramine				0,799	0,434
10	Chlorpromazine				1,236	0,871
11	Ciprofloxacin	0,33	0,084	-0,21	0,174	0
12	Diphenhydramine	0,704	0,512	0,371	0,871	0,439
13	Diltiazem	0,39	0,29	0,18	1,073	0,436
14	Enoxacin	0,36	-0,011	-0,26	0,292	0
15	Estradiol	1,7	1,42	1,13	0,914	0,799
16	Flunitrazepam				0,62	0,229
17	Fluoxetine	1,16	0,98	0,81	1,181	0,821
18	Haloperidol				1,225	0,697
19	Ibuprofen	0,73	0,52	0,36	0	0
20	Indomethacin	1,53	1,24	1,058	0	0

21	Ketoprofen	0,67	0,5	0,15	0	0
22	Lidocaine	-0,02			0,705	0,225
23	Losartan	1,53	1,14	0,73	0	0
24	Mebendazole				0,796	0,483
25	Mefenamic acid	1,78	1,535	1,057	0	0
26	Nifedipine	1,537	1,221	0,8		
27	Nortriptyline	1,32			1,476	1,207
28	Ofloxacin	0,43	0,032	-0,15	0,25	0
29	Paracetamol	-0,33	-0,46	-0,57	0	0
30	Pentazocine					
31	Phenobarbital					
32	Pindolol	0,568	0,249	0,145	0,463	0,324
33	Piroxicam	1,103	0,716	0,386	0	0
34	Promethazine	1,496	1,266	1,044	1,562	1,114
35	Propafenone		0,903	0,769		
36	Propranolol	0,79	0,61	0,32	1,186	0,978
37	Protriptyline	1,25			1,22	0,865
38	Pyrimethamine	0,94	0,73	0,48	0,72	0,482
39	Quinidine	0,74	0,56	0,34	0,904	0,552
40	Sulfamethoxazole	-0,12	-0,31	-0,43	0	0
41	Tenoxicam	0,99	0,74	0,56	0	0
42	Terbutaline	-0,13	-0,33	-0,35	0,097	0
43	Theophylline	-0,28			0	0
44	Thioridazine	2,088	1,818	1,623	1,904	0,939
45	Trazodone	1,016	0,735	0,518	1,065	0,659
46	Acyclovir	-0,64	-0,84	-0,96	0,142	0
47	Amlodipine	1,33	1,08	0,7	1,297	0,923
48	Atenolol	-0,21	-0,54	-0,59	0	0
49	Bromazepam	0,48			0,078	0
50	Enalapril	0,45	0,13	-0,2	0	0
51	Metformin	-0,52	-0,62	-0,73	-0,474	-0,485
52	Naproxen	0,556	0,439	0,142	0	0
53	Nimesulide	1,194	1,005	0,603	0	0
54	Norfloxacin	0,29	0,1	-0,12	0,427	0
55	Trimethoprim	0,46		-0,089	0,157	0
56	Verapamil	1,08			0,939	0,66
57	Carbamazepine	0,66			1,333	0,538
58	Dexamethazone	0,52	0,24	0,005	0,478	0,379
59	Diclofenac	1,462	1,277	0,917	0	0
60	Furosemide	0,98			0	0
61	Hydrochlorothiazide	0,3	0,13	-0,04	0,073	0
62	Lisinopril	-0,82	-0,026	-0,95	0	0
63	Metoprolol	0,05	-0,3	-0,44	0,102	0
64	Ranitidine	0,06			0,148	0
65	Labetalol	0,79			0,915	0,507
66	Prednisolone	0,35	0,16	-0,073	0,218	0
67	Ceftriaxone	-0,1	-0,3	-0,49	0	0
68	Chloramphenicol	0,096	-0,035	-0,11	0,103	0
69	Cimetidine	0,01			0	0
70	Cinoxacin	-0,12	-0,42	-0,32	0	0

71	Hydrocortisone	0,33	0,11	-0,14	0,631	0,446
72	Isoxicam	0,87	0,61	0,3	0,295	0
73	Levofloxacin	0,36	-0,034	-0,2	0,078	0
74	Lornixicam	0,206	-0,148	-0,275	0	0
75	Meloxicam	1,44	1,1	0,77	0	0
76	Methylprednisolone	0,54	0,24	0	0,161	0,114
77	Metoclopramide	0,48	0,28	-0,017	0,411	0,142
78	Minoxidil	0,29			0,049	0
79	Nadolol	-0,13	-0,4	-0,75	0,233	0
80	Nalidixic acid	0,2	0,043	-0,092	0	0
81	Niflumic acid	1,12	1,047	0,89	0	0
82	Omeprazole	0,65	0,36	0,048	0,476	0,299
83	Pipemidic acid	0,069	-0,3	-0,5	0,018	0
84	Piperacillin	-0,31	-0,53	-0,7	0	0
85	Salicylic acid	-0,001	-0,129	-0,352	0	0
86	Sulpiride	0,14	-0,04	-0,28	0,056	0
87	Vancomycin	0,69	0,32	0,12	0,58	0,383
88	Warfarin	0,92	0,67	0,33	0	0
89	Antipyrine	-0,18		-0,58	0	0
90	Atropine	0,396		-0,23	0,166	0
91	Clonidine	0,15		-0,089	0,389	0,169
92	Desipramine	1,18		0,75	1,36	0,94
93	Fluphenazine	1,61	1,37	1,26	1,994	1,394
94	Imipramine	1,05	0,86	0,7	1,451	0,938
95	Nicotine	-0,24		-0,41	0	0
96	Nitrofurantoin	-0,21		-0,37	0	0
97	Primidone	-0,19		-0,47	0	0
98	Promazine	1,17	1	0,85	1,551	1,124
99	Rifampicin	0,96	0,7	0,49	0,285	0
100	Citalopram					
101	Codeine	0,37	0,131	0,033	0,228	0,005
102	Colchicine	0,523	0,292	-0,024		
103	Fenofibrate				1,785	1,443
104	Isoniazide	-0,665	-0,561	-0,769	0	
105	Methyldopa					
106	Minocycline					
107	Phenytoin				0	0
108	Pioglitazone				1,439	0,764
109	Pyrazinamide					
110	Retinoic acid				0	0
111	Valproic acid				0	0
112	Fentanyl	0,814	0,667	0,484	1,746	1,184
113	Tramadol					
114	Betamethasone				1,737	0,948
115	Captopril				0	0
116	Fluconazole				0	
117	Metronidazole				0	

Πίνακας 6. Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από διαφορετικά είδη μυκηλλιακής χρωματογραφίας (100% υδατική φάση)

A/A	Φαρμακευτική ένωση	log _{k_w} Tween	log _{k_w} Triton	log _{k_w} Brij-35
1	Acetylsalicylic acid	-0,812	-0,95	-0,416
2	Albendazole	2,066	1,914	1,359
3	Allopurinol	-0,25		-0,04
4	Amitriptyline	2,177	1,798	1,861
5	Amoxicillin	-1,266		-0,784
6	Ampicillin	-0,66	-0,438	-0,298
7	Caffeine	0,054	-0,206	0,096
8	Chlordiazepoxide	1,827		1,36
9	Chlorpheniramine		1,204	1,226
10	Chlorpromazine	2,282		1,93
11	Ciprofloxacin	-0,721	-0,938	-0,232
12	Diphenhydramine	1,762		1,171
13	Diltiazem	2,002		1,538
14	Enoxacin	-0,935	-1,275	-0,373
15	Estradiol	2,008	2,187	1,219
16	Flunitrazepam	1,483		1,253
17	Fluoxetine	1,898	2,012	1,635
18	Haloperidol	1,883	2,09	1,665
19	Ibuprofen	1,188	1,195	1,005
20	Indomethacin	1,712	1,83	1,004
21	Ketoprofen	0,63	0,708	0,639
22	Lidocaine	1,391	1,19	0,851
23	Losartan	1,479	1,782	0,972
24	Mebendazole	1,015	0,977	1,186
25	Mefenamic acid	1,545	1,642	1,227
26	Nifedipine		1,891	1,387
27	Nortriptyline	2,165		1,349
28	Ofloxacin	-0,481	-0,751	0,006
29	Paracetamol	0,301	0,39	0,463
30	Pentazocine			1,208
31	Phenobarbital			1,044
32	Pindolol	0,678	0,333	0,486
33	Piroxicam	1,313	1,304	0,777
34	Promethazine	2,22		1,794
35	Propafenone		1,518	1,302
36	Propranolol	1,729	1,387	1,218
37	Protriptyline	2,245		1,485
38	Pyrimethamine	1,957	2,191	1,364
39	Quinidine		1,336	1,224
40	Sulfamethoxazole	0,19	0,142	0,396
41	Tenoxicam	1,223		0,76
42	Terbutaline	-0,017	-0,302	-0,066
43	Theophylline	-0,469	-0,325	-0,114
44	Thioridazine	2,224	2,017	1,852
45	Trazodone	2,326	2,102	1,37

46	Acyclovir	-0,461	-0,686	-0,536
47	Amlodipine		1,268	1,021
48	Atenolol	-0,549	-0,882	-0,268
49	Bromazepam	1,296	1,586	1,108
50	Enalapril	0,197	0,325	0,195
51	Metformin	-0,634		-0,545
52	Naproxen	0,714	0,897	0,674
53	Nimesulide	1,47	1,777	1,204
54	Norfloxacine	-0,708	-0,93	-0,159
55	Trimethoprim	1,075	0,986	0,714
56	Verapamil	2,021	2,148	1,606
57	Carbamazepine	1,754	1,628	0,973
58	Dexamethazone	1,624	1,554	1,164
59	Diclofenac	1,465	1,89	1,15
60	Furosemide	1,372	1,431	0,856
61	Hydrochlorothiazide	1,003	1,297	0,504
62	Lisinopril	-1,23	-1,555	-0,815
63	Metoprolol	0,463	0,189	0,507
64	Ranitidine	-0,368	-0,553	-0,274
65	Labetalol	1,537	1,772	1,104
66	Prednisolone	1,264	1,756	1,034
67	Ceftriaxone	-0,727	-0,815	-0,624
68	Chloramphenicol	1,345	1,231	0,494
69	Cimetidine	0,335	0,285	0,371
70	Cinoxacin	-0,827	-0,828	-0,568
71	Hydrocortisone	1,36	1,271	0,979
72	Isoxicam	1,396	1,289	0,839
73	Levofloxacin	-0,719	-0,774	-0,022
74	Lornoxicam	1,498	1,686	1,087
75	Meloxicam	1,422	1,729	0,908
76	Methylprednisolone	1,701	1,815	1,157
77	Metoclopramide	0,782	0,568	0,567
78	Minoxidil	0,604	0,666	0,669
79	Nadolol	-0,328	-0,553	-0,366
80	Nalidixic acid	-0,494	-0,223	0,123
81	Niflumic acid	1,517	2,124	1,141
82	Omeprazole	1,484	1,511	1,127
83	Pipemidic acid	-1,02	-0,864	-0,543
84	Piperacillin	-0,282	-0,492	-0,28
85	Salicylic acid	0,152	0,328	0,343
86	Sulpiride	-0,013	-0,263	-0,188
87	Vancomycin	-0,328		-0,296
88	Warfarin	1,064	1,242	0,86
89	Antipyrine	-0,013	0,021	
90	Atropine	0,11		
91	Clonidine		0,64	
92	Desipramine	2,49		
93	Fluphenazine	2,238		
94	Imipramine	1,952		
95	Nicotine	0,41	0,311	

96	Nitrofurantoin	0,137	0,109	
97	Primidone	0,724	0,763	
98	Promazine	1,785	2,114	
99	Rifampicin			
100	Citalopram			
101	Codeine		1,789	

Πίνακας 7. Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης, όγκου κατανομής, συντελεστών μερισμού και κατανομής, σταθερών A και B (Abraham), τοπολογικής πολικής επιφάνειας TPSA, μοριακού βάρους, κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου

A/A	Φαρμακευτική ένωση	%PPB	V _d (L/kg)	logP	logD	A	B	TPSA	MW	F ⁺	F ⁻
1	Acetylsalicylic acid	49,00	0,18	1,19	-2,5	0,49	1	63,6	180,16	0	1
2	Albendazole	70,00	10,60	3,29	3,29	0,71	1,12	92,31	265,33	0,004	0,002
3	Allopurinol	5,00	0,86	-0,55	-0,55	0,7	1,23	70,14	136,11	0	0,01
4	Amitriptyline	94,80	16,80	5,04	2,5	0	1	3,24	277,4	0,982	0
5	Amoxicillin	19,20	0,21	-1,71	-2,56	1,55	2,9	158,26	365,4	0	0,531
6	Ampicillin	20,00	0,38	-1,13	-4	1,06	2,62	138,03	349,4	0	0,53
7	Caffeine	40,00	0,60	-0,07	-0,07	0,05	1,28	58,44	194,19	0	0
8	Chlordiazepoxide	94,00	3,30	2,44	2,44	0,13	0,94	44,47	299,75	0,002	0
9	Chlorpheniramine	69,50	9,00	3,39	1,58	0	1,35	16,13	274,79	0,986	0
10	Chlorpromazine	96,50	20,50	5,35	3,38	0	0,94	31,78	318,86	0,991	0
11	Ciprofloxacin	40,00	2,45	-1,08	-1,11	0,73	1,85	72,88	331,34	0,05	0,033
12	Diphenhydramine	81,50	4,27	3,4	1,29	0	0,95	12,47	255,35	0,965	0
13	Diltiazem	78,00	5,09	2,8	0	0	2,12	84,38	414,52	0,875	0
14	Enoxacin	40,00	2,75	-1,02	-1,02	0,73	1,96	85,77	320,32	0,051	0,033
15	Estradiol	95,00	12,00	4,01	4,01	0,86	1,1	40,46	272,38	0	0,001
16	Flunitrazepam	78,00	4,00	2,06	2,06	0	1,48	81,5	313,28	0	0
17	Fluoxetine	94,00	31,12	4,26	1,82	0,13	0,78	21,26	309,33	0,997	0
18	Haloperidol	92,00	18,00	4,28	2,98	0,4	1,76	40,54	375,86	0,933	0
19	Ibuprofen	99,00	0,12	3,5	1,07	0,59	0,81	37,3	206,28	0	0,999
20	Indomethacin	90,00	0,80	4,27	1,03	0,57	1,57	68,53	357,79	0	0,998
21	Ketoprofen	98,00	0,10	3,12	-0,25	0,55	0,89	54,37	254,28	0	0,999
22	Lidocaine	67,00	1,30	2,26	1,71	0,12	1,21	32,34	234,34	0,779	0
23	Losartan	99,20	0,45	3,09	1,16	0,95	1,68	92,51	422,91	0	0,933
24	Mebendazole	92,50	1,30	2,83	2,83	0,71	1,38	84,08	295,29	0,004	0,002
25	Mefenamic acid	90,00	1,06	5,12	2	0,65	0,7	49,33	241,28	0	0,999
26	Nifedipine	96,00	1,81	2,2	2,2	0,23	1,45	113,46	346,33	0	0
27	Nortriptyline	92,25	22,05	4,04	1,7	0,13	0,72	12,03	263,38	0,998	0
28	Ofloxacin	32,00	2,35	-0,39	-0,44	0,57	2,05	73,32	361,37	0,047	0,096
29	Paracetamol	22,50	0,92	0,51	0,51	1,04	0,86	49,33	151,16	0	0
30	Pentazocine	61,50	5,60	4,64	4,02	0,5	1,04	23,47	285,42	0,778	0
31	Phenobarbital	51,00	0,61	1,47	1,14	0,73	1,15	75,27	232,23	0	0,416
32	Pindolol	40,00	1,86	1,75	-0,33	0,3	1,48	57,28	248,32	0,994	0
33	Piroxicam	99,00	0,13	1,76	-0,05	0,55	1,82	107,98	331,35	0	1
34	Promethazine	93,00	13,40	4,81	2,79	0	1,09	31,78	284,42	0,989	0
35	Propafenone	97,00	3,60	3,2	1,81	0,29	1,67	58,56	341,44	0,992	0
36	Propranolol	87,00	4,00	2,98	1,26	0,17	1,42	41,49	259,34	0,994	0
37	Protriptyline	92,00	23,00	4,89	1,36	0,13	0,73	12,03	263,38	0,875	0
38	Pyrimethamine	87,00	2,90	2,69	2,44	0,45	0,99	77,82	248,71	0,584	0
39	Quinidine	87,00	2,50	3,44	2,41	0,23	1,81	45,59	324,42	0,946	0
40	Sulfamethoxazole	53,00	0,24	0,89	-0,76	0,59	1,21	106,6	253,28	0	0,978
41	Tenoxicam	98,50	11,00	0,84	-0,32	0,72	2,06	136,22	337,38	0	1
42	Terbutaline	19,50	1,60	0,08	-1,35	1,3	1,75	72,72	225,28	0,98	0
43	Theophylline	56,00	0,48	-0,02	-0,02	0,54	1,34	69,3	180,16	0	0
44	Thioridazine	97,90	7,13	5,9	3,34	0	1,13	57,08	370,58	0,991	0
45	Trazodone	92,50	0,89	2,9	2,54	0	1,92	42,39	371,86	0,218	0

46	Acyclovir	18,75	0,70	-1,56	-1,56	0,4	1,88	114,76	225,2	0	0,009
47	Amlodipine	95,75	19,33	2,96	1,66	0,36	2,19	99,88	408,87	0,994	0
48	Atenolol	11,00	1,15	0,16	-1,61	0,69	2	84,58	266,34	0,994	0
49	Bromazepam	70,00	1,15	1,65	1,65	0,33	1,62	54,35	316,15	0	0
50	Enalapril	60,00	1,70	0,71	-2,38	0,71	1,92	95,94	376,45	0	0,986
51	Metformin	,00	1,69	-0,91	-3,91	0,57	1,68	88,99	129,16	1	0
52	Naproxen	99,70	0,16	3,18	0,33	0,6	0,68	46,53	230,26	0	0,999
53	Nimesulide	97,50	0,29	2,6	1,35	0,43	1,1	112,61	308,31	0	0,966
54	Norfloxacin	13,75	2,80	-1,03	-1,03	0,73	1,84	72,88	319,33	0,05	0,033
55	Trimethoprim	41,70	1,34	0,91	0,74	0,28	1,62	105,51	290,32	0,469	0
56	Verapamil	90,00	4,80	3,83	2,57	0	1,89	63,95	454,6	0,982	0
57	Carbamazepine	72,30	1,33	2,3	2,3	0,53	1,1	46,33	236,27	0	0
58	Dexamethazone	70,75	0,58	1,83	1,83	0,71	1,92	94,83	392,46	0	0
59	Diclofenac	99,50	0,16	4,04	1,15	0,63	0,96	49,33	296,15	0	0,999
60	Furosemide	96,80	0,16	2,03	-0,69	1,35	1,45	131,01	330,74	0	1
61	Hydrochlorothiazide	64,60	5,70	-0,07	-0,08	1	1,45	135,12	297,74	0	0,028
62	Lisinopril	2,10	2,05	-1,71	-2,42	1,49	2,47	132,96	405,49	0	0,001
63	Metoprolol	11,30	4,33	1,88	-0,37	0,17	1,76	50,72	267,36	0,994	0
64	Ranitidine	15,00	1,46	0,27	-0,86	0,25	2,33	114,57	314,4	0,933	0
65	Labetalol	50,00	8,95	3,09	1,63	0,77	1,76	95,58	328,4	0,552	0,022
66	Prednisolone	92,50	0,44	1,62	1,62	0,71	1,92	94,83	360,44	0	0
67	Ceftriaxone	95,00	0,14	-0,46	-3,08	1,33	4,36	287,82	554,58	0	0,221
68	Chloramphenicol	54,00	0,96	1,14	1,14	0,7	1,75	118,39	323,13	0	0
69	Cimetidine	18,50	1,12	0,4	0,35	0,67	2,21	114,19	252,34	0,218	0
70	Cinoxacin	66,50	0,23	1,28	-1,16	0,57	1,55	88,43	262,22	0	0,998
71	Hydrocortisone	95,00	0,54	1,6	1,6	0,71	1,9	94,83	362,46	0	0
72	Isoxicam	96,00		2,83	-0,32	0,72	2,01	121,12	335,34	0	1
73	Levofloxacin	32,30	1,38	-0,25	-0,25	0,57	2,05	73,32	361,37	0,047	0,096
74	Lornoxicam	99,00	0,20	2,62	0,61	0,72	2	136,22	371,82	0	0,993
75	Meloxicam	99,30	10,00	3,02	0,09	0,55	1,48	136,22	351,4	0	0,999
76	Methylprednisolone	77,30	1,26	1,95	1,95	0,71	2,04	94,83	374,47	0	0
77	Metoclopramide	33,30	3,30	2,64	0,64	0,5	1,63	67,59	299,8	0,989	0
78	Minoxidil	,00	2,86	1,24	1,23	0,45	1,09	93,63	209,25	0,002	0
79	Nadolol	30,00	2,00	0,81	-1,16	0,85	2,34	81,95	309,4	0,991	0
80	Nalidixic acid	93,00	0,40	1,41	-0,72	0,57	1,34	70,5	232,23	0	0,947
81	Niflumic acid	90,00	0,12	4,81	0,8	0,72	0,77	62,22	282,22	0	0,997
82	Omeprazole	95,00	0,33	2,3	2,3	0,35	2,05	96,31	345,42	0,001	0,054
83	Pipemidic acid	30,00	1,90	-2,15	-2,31	0,73	2,07	98,66	303,32	0,051	0,033
84	Piperacillin	19,00	1,35	0,5	-1,58	1,01	3,55	181,73	517,55	0	1
85	Salicylic acid	95,00	0,15	2,26	-1,67	0,71	0,38	57,53	138,12	0	1
86	Sulpiride	40,00	2,05	0,62	-1,26	0,72	2,15	110,11	341,43	0,984	0
87	Vancomycin	43,30	0,52	2,48	1,94	5,81	10,56	530,49	1449,3	0	0,125
88	Warfarin	98,75	0,15	2,6	0,01	0,35	1,49	63,6	308,33	0	0,997
89	Antipyrine	5,00	0,60	0,38	0,38	0	1,48	23,55	188,23	0	0
90	Atropine	20,00	2,75	1,83	-0,41	0,26	1,73	49,77	289,37	0,996	0
91	Clonidine	27,50	2,30	1,59	0,97	0,55	1,16	36,42	230,09	0,779	0
92	Desipramine	86,25	22,50	4,9	2,28	0,09	0,91	15,27	266,38	0,999	0
93	Fluphenazine	95,00	11,00	4,36	3,82	0,26	1,8	55,25	437,52	0,737	0
94	Imipramine	82,75	17,25	4,8	2,83	0	1,15	6,48	280,41	0,991	0
95	Nicotine	6,50	2,53	1,13	0,26	0	1,08	16,13	162,23	0,875	0

96	Nitrofurantoin	73,75	0,66	-0,47	-0,77	0,24	1,34	123,74	238,16	0	0,473
97	Primidone	38,00	0,64	0,91	0,91	0,51	1,45	58,2	218,25	0	0
98	Promazine	94,00	8,38	4,55	2,58	0	1,01	31,78	284,42	0,991	0
99	Rifampicin	78,00	0,99	2,7	1,99	2,55	4,66	220,15	822,94	0,635	0,041
100	Citalopram	80,00	12,00	3,41	1,44	0	1,08	36,26	324,39	0,991	0
101	Codeine	11,50	3,50	1,14	0,37	0,33	1,78	41,93	299,36	0,848	0
102	Colchicine	39,00	6,50	1,03	1,03	0,26	2,08	83,09	399,44	0	0
103	Fenofibrate	99,00	0,89	4,38	4,38	0	1,13	52,6	360,83	0	0
104	Isoniazide	5,00	0,67	-0,7	-0,92	0,47	1,39	68,01	137,14	0	0
105	Methyldopa	10,00	0,25	-2,74	-2,75	1,56	1,45	103,78	211,21	0	0,018
106	Minocycline	76,00	11,30	0,05	-2,95	1,42	3,15	164,63	457,48	0	0,014
107	Phenytoin	90,00	0,70	2,47	2,41	0,85	1	58,2	252,27	0	0,102
108	Pioglitazone	99,00	0,63	2,94	1,98	0,34	1,67	93,59	356,44	0,001	0,867
109	Pyrazinamide	10,00	0,57	-0,55	-0,55	0,49	1,04	68,87	123,11	0	0
110	Retinoic acid	95,00	1,00	6,3	3,33	0,57	0,8	37,3	300,43	0	0,999
111	Valproic acid	93,00	0,22	2,75	0,26	0,61	0,45	37,3	144,21	0	0,996
112	Fentanyl	83,25	4,00	4,05	3,27	0	1,81	23,55	336,47	0,848	0
113	Tramadol	20,00	2,73			0,31	1,3	32,7	263,37	0,998	0
114	Betamethasone			1,94	1,94	0,71	1,92	94,83	392,46	0	0
115	Captopril	27,50		-0,05	-4,43	0,57	1,13	96,41	217,29	0	1
116	Fluconazole	11,25	0,63	0,5	0,5	0,47	1,62	81,65	306,27	0	0
117	Metronidazole	11,00	0,77	-0,02	-0,02	0,18	1,03	86,88	171,15	0	0

2.4. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των πειραμάτων αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IBM SPSS Statistics 25. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για κάθε σειρά δεδομένων και εξετάζεται καθεμία εξίσωση που προκύπτει, η οποία συνοδεύεται και από τα εξής στοιχεία:

- n: αριθμός δεδομένων
- R²: συντελεστής συσχέτισης
- s: τυπική απόκλιση
- F-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%

Ο συντελεστής παλινδρόμησης κάθε παραμέτρου και η σταθερά κάθε εξίσωσης συνοδεύονται από το τυπικό σφάλμα σε παρένθεση. Η σημαντικότητα κάθε μεταβλητής υποδεικνύεται από την απόλυτη τιμή του t-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Όταν η απόλυτη τιμή του t-test είναι μεγαλύτερη ή ίση από 2 ($|t| \geq 2$), τότε η εκάστοτε παράμετρος θεωρείται σημαντική. Ακόμα, αν η σημαντικότητα του πίνακα ANOVA είναι μικρότερη από 0.05 ($p < 0.005$), τότε η συγκεκριμένη παράμετρος συμπεριλαμβάνεται στην εξίσωση. Σε περίπτωση που δεν εκπληρώνεται ένα από τα παραπάνω κριτήρια, τότε η παράμετρος αφαιρείται από την εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης.

Για κάθε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης, ορίζονται ως “outliers”, δηλαδή ως «ακραίες τιμές», αυτές που έχουν διαφορά (residual) μεταξύ πραγματικών τιμών και τιμών που υπολογίζει το μοντέλο μεγαλύτερη από τη διπλάσια τυπική απόκλιση (standard deviation) του μοντέλου (όρια ανοχής σφάλματος του μοντέλου). Έτσι, εμποδίζεται η εκτροπή του αποτελέσματος από πιθανές έκτροπες τιμές, οι οποίες οφείλονται σε λανθασμένες μετρήσεις ή σε διαφορετικό φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ ορισμένων φαρμάκων και βασίζεται στην πρόταση του Miller (1991), εφόσον το μέγεθος του δείγματος είναι μεγαλύτερο από 10. ⁸²

3. Αποτελέσματα

3.1 Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης logk με διαλύτη περιεκτικότητας, 0, και 5% ακετονιτρίλιο

Σε πρώτο στάδιο, υπολογίζονται οι λογαριθμικοί συντελεστές κατακράτησης logk των φαρμακευτικών μορίων που λήφθηκαν για 100% υδατική φάση, αλλά και για συγκεντρώσεις ακετονιτρίλιου 5 και 10%, σε pH=7.0. Για κάθε φάρμακο έγιναν τρεις διαδοχικοί προσδιορισμοί του χρόνου κατακράτησης, υπολογίστηκε ο συντελεστής κατακράτησης (k) μέσω της εξίσωσης (1.9) και ο λογάριθμός του (logk), και στην συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέσος όρος τους. Αξίζει να σημειωθεί, πως δεν μετρήθηκαν όλα τα φάρμακα σε όλες τις περιεκτικότητες διαλύτη (0-15% ACN), αλλά ανάλογα με το πόσο λιπόφιλα είναι, καθορίστηκαν οι αντίστοιχες περιεκτικότητες.

Οι τιμές των συντελεστών κατακράτησης των φαρμακευτικών μορίων που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση συμβολίζονται ως $\log k_{w(act.)}^{HSA}$. Όσον αφορά τις φαρμακευτικές ενώσεις που δεν μελετήθηκαν σε 100% υδατική φάση, κατασκευάστηκε διάγραμμα logk συναρτήσει του ποσοστού περιεκτικότητας του διαλύτη σε ακετονιτρίλιο (logk-% ακετονιτρίλιο) και με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων προσδιορίστηκε η γραμμική εξίσωση που συνδέει τα δύο μεγέθη για κάθε φάρμακο. Έτσι, ο συντελεστής κατακράτησης logk που θα αντιστοιχούσε σε 100% υδατική φάση υπολογίζεται με γραμμική παρεκβολή (αποτέμνουσα) εφαρμόζοντας την εξίσωση (1.12) και συμβολίζεται ως $\log k_{w(extr.)}^{HSA}$. Αξίζει να σημειωθεί, πως ο συντελεστής συσχέτισης R^2 στις περισσότερες περιπτώσεις είχε τιμή, υψηλότερη από 0,980.

Τα αποτελέσματα για τις τιμές logk, μαζί με τα σφάλματά τους, παρατίθενται στον πίνακα 8. Για τα σφάλματα των $\log k_{w(extr.)}^{HSA}$, λήφθηκε το σφάλμα του σταθερού όρου της εξίσωσης 1.12.

Πίνακας 8. Συντελεστές κατακράτησης, $\log k$, για συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου 0, 5 και 10% στην κινητή φάση και συντελεστές κατακράτησης από γραμμική προεκβολή, $\log k_{w(extr.)}^{HSA}$

A/A	Φαρμακευτική ένωση	$\log k_{w(act.)}^{HSA}$	$\log k_{w(extr.)}^{HSA}$	$\log k_5^{HSA}$	$\log k_{10}^{HSA}$
1	Amitriptyline		1,507 ± 0,061	1,227 ± 0,01	0,952±0,000
2	Atropine	0,396 ± 0,01		-	-
3	Caffeine	-0,320 ± 0,02		-0,508 ± 0,005	-0,588 ± 0,009
4	Chlordiazepoxide		1,013 ± 0,013	0,761 ± 0,006	0,435 ± 0,002
5	Codeine	0,370± 0,002		0,131± 0,001	0,033± 0,004
6	Colchicine		0,523 ± 0,012	0,292± 0,007	-0,024± 0,003
7	Diclofenac	1,462± 0,001		1,277± 0,002	0,917± 0,00
8	Diphenhydramine	0,704± 0,003		0,512± 0,001	0,371± 0,001
9	Fentanyl		0,814 ± 0,076	0,667± 0,006	0,484± 0,04
10	Isoniazide	-0,665± 0,02		-0,719± 0,04	-0,769± 0,03
11	Lornoxicam	0,206± 0,03		-0,148± 0,00	-0,275± 0,01
12	Mefenamic acid		1,780 ± 0,120	1,535± 0,016	1,057± 0,002
13	Naproxen	0,556± 0,017		0,429± 0,022	0,142± 0,018
14	Nifedipine		1,537 ± 0,091	1,221± 0,005	0,800± 0,003
15	Nimesulide	1,194± 0,035		1,005± 0,028	0,603± 0,005
16	Pindolol	0,568± 0,014		0,249± 0,009	0,145± 0,006
17	Piroxicam	1,103± 0,010		0,716± 0,014	0,386± 0,008
18	Promethazine		1,500 ± 0,121	1,266± 0,003	1,044± 0,015
19	Propafenone		1,091 ± 0,098	0,903± 0,002	0,769± 0,001
20	Salicylic acid	0,0005± 0,018		-0,129± 0,014	-0,352± 0,005
21	Thioridazine		2,088 ± 0,132	1,818± 0,000	1,623± 0,000
22	Trazodone		1,016 ± 0,097	0,735± 0,004	0,518± 0,001
23	Valproic acid				0,118± 0,007

Παρατηρείται πως ο συντελεστής $\log k$ εμφανίζει ένα εύρος τιμών, από 2,088 έως -0,769, με την πιο λιπόφιλη ένωση που μελετήθηκε να είναι η Thioridazine. Επίσης, ακολουθείται η ίδια διαδικασία ώστε να προσδιοριστούν οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k$ (για 100% υδατική φάση) και για κάποια φάρμακα που έχει υπολογιστεί ήδη πειραματικά. Έτσι, είναι δυνατή η σύγκριση ανάμεσα στους δύο τρόπους προσδιορισμού. Τα αποτελέσματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 9. Πειραματικοί και από γραμμική προεκβολή χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$

A/A	Φαρμακευτική ένωση	$\log k_{w(act.)}^{HSA}$	$\log k_{w(extr.)}^{HSA}$
1	Codeine	0,370± 0,002	0,223 ± 0,010
2	Diclofenac	1,462± 0,001	1,524 ± 0,066
3	Diphenhydramine	0,704± 0,003	0,642 ± 0,013
4	Nimesulide	1,194± 0,035	1,203 ± 0,096
5	Pindolol	0,568± 0,014	0,374 ± 0,009
6	Piroxicam	1,103± 0,010	0,937 ± 0,017

Διαπιστώνεται, τελικά, πως οι αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών τιμών $\log k_{w(act.)}^{HSA}$ και των τιμών που προέκυψαν από την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και την

γραμμική προεκβολή, δεν εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους, καθώς η τιμή της διαφοράς $\Delta \log k_w$ ($\Delta \log k_w = |\log k_w^{HSA(act.)} - \log k_w^{HSA(extr.)}|$) κυμαίνεται από 0,009 έως 0,166. Εξαιρέση αποτελεί η ένωση Pindolol, όπου η αντίστοιχη διαφορά έχει τιμή 0,194, δηλαδή η απόκλιση είναι ελαφρώς μεγαλύτερη.

3.2. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με φυσικοχημικά δεδομένα

Παρακάτω, συσχετίζονται οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης HSA $\log k_w^{HSA}$, $\log k_5^{HSA}$ και $\log k_{10}^{HSA}$, δηλαδή για 100% υδατική φάση, για διαλύτη με 5% και 10% ακετονιτρίλιο, αντίστοιχα, με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$. Τα δεδομένα αντλούνται από τον πίνακα 3. Ακόμα, ελέγχεται αν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- αντίστοιχα, βελτιώνουν την ποιότητα των εξαγόμενων εξισώσεων.

Η συσχέτιση αυτή πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη πως η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ η μελέτη της σημαντικότητας των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου οδηγεί σε συμπεράσματα για την συμβολή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην πρωτεϊνική σύνδεση.

3.2.1. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_w^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$

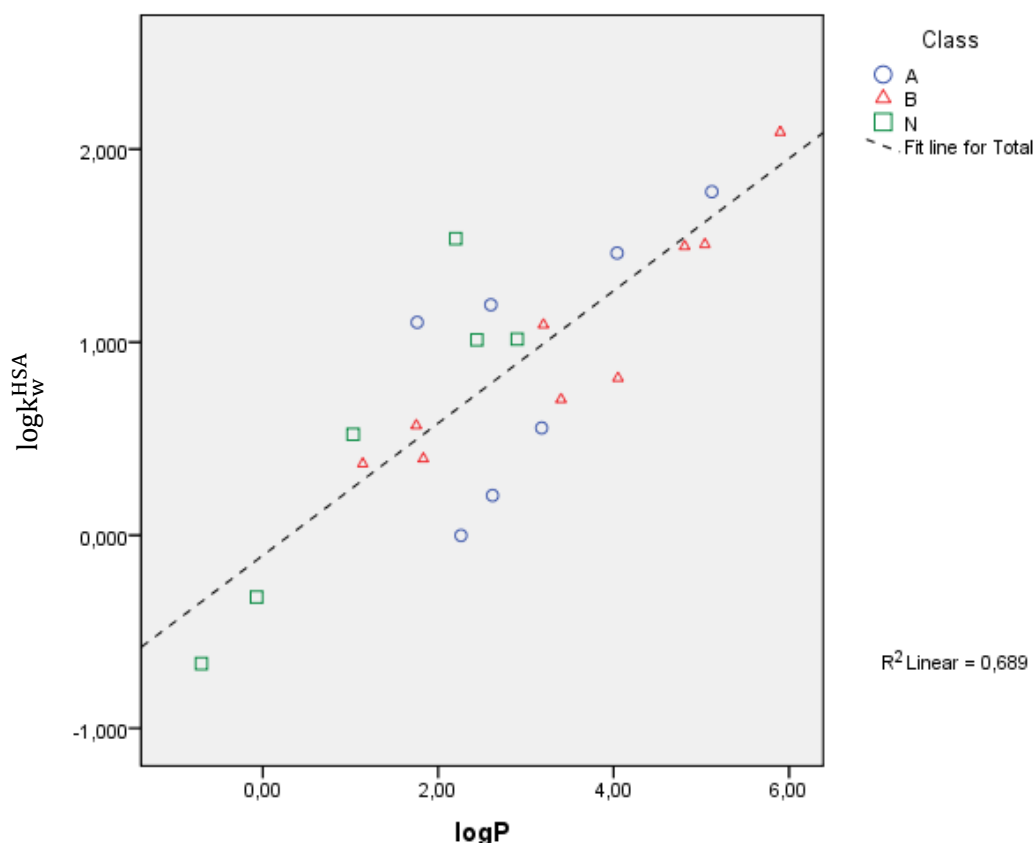
Για την συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης για 100% υδατική φάση, $\log k_w^{HSA}$, με τον συντελεστή μερισμού $\log P$, λήφθηκαν τόσο πειραματικά δεδομένα, όσο και δεδομένα που προέκυψαν μετά από γραμμική προεκβολή, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω. Έτσι, η συσχέτιση του $\log k_w^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$, βρίσκεται ότι εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log k_w^{HSA} = 0.343(\pm 0.052) \cdot \log P - 0.105(\pm 0.165) \quad (3.1)$$

$$(N = 22, R^2 = 0,689, F = 44.2, s = 0.393)$$

Η εξίσωση (3.1) επαληθεύει ότι η κατακράτηση φαρμακευτικών ενώσεων από την στήλη είναι αποτέλεσμα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, καθώς ο συντελεστής παλινδρόμησης του $\log P$ είναι υψηλός.

Στο παρακάτω διάγραμμα, αναπαρίσταται γραφικά η συσχέτιση που προκύπτει για τις τιμές του συντελεστή κατακράτησης ως ανεξάρτητη μεταβλητή και τις τιμές του συντελεστή μερισμού ως εξαρτημένη.



Διάγραμμα 1. Γραφική παράσταση $\log k_w^{HSA}$ συναρτήσει του $\log P$

Πρέπει να σημειωθεί, πως στο παραπάνω διάγραμμα, καθώς και σε αυτά που πρόκειται να ακολουθήσουν, συμβολίζονται με διαφορετικά χρώματα τα οξέα (A), οι βάσεις (B), τα ουδέτερα (N) και οι αμφολύτες (Z).

Οι όροι F^+ και F^- δεν παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα και η εισαγωγή τους δεν βελτίωσε την ποιότητα της εξίσωσης (3.1).

3.2.2. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_5^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$

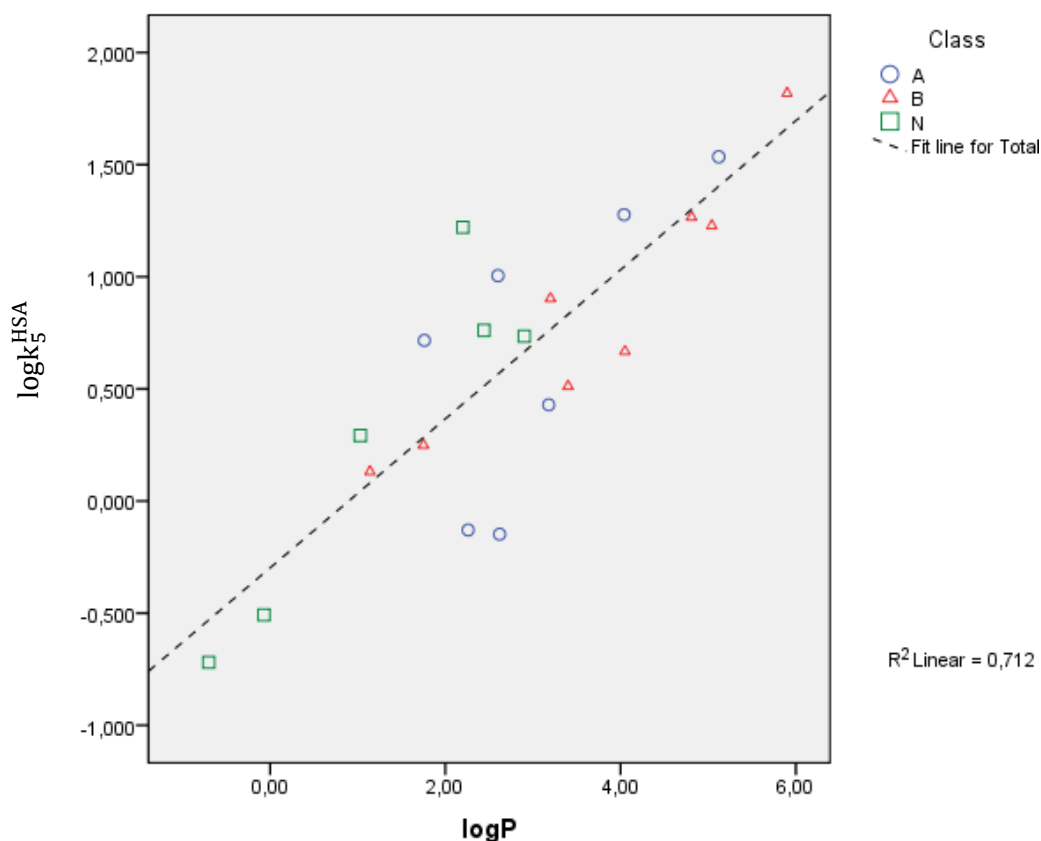
Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατανομής, $\log k_5^{HSA}$, με τον συντελεστή μερισμού, $\log P$, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_5^{HSA} = 0.332(\pm 0.048) \cdot \log P - 0.298(\pm 0.157) \quad (3.2)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.712, F = 47.0, s = 0.366)$$

Ομοίως με την εξίσωση (3.1), επιβεβαιώνεται από την εξίσωση (3.2) πως η κατακράτηση φαρμάκων από την χρωματογραφική στήλη HSA οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη.

Στο διάγραμμα 2 δίνεται η γραφική παράσταση του $\log k_5^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή $\log P$.



Διάγραμμα 2. Γραφική παράσταση $\log k_5^{HSA}$ συναρτήσει του $\log P$

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, οι όροι F^+ και F^- δεν παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα και δεν βελτιώθηκε η ποιότητα της εξίσωσης (3.2) από την εισαγωγή τους.

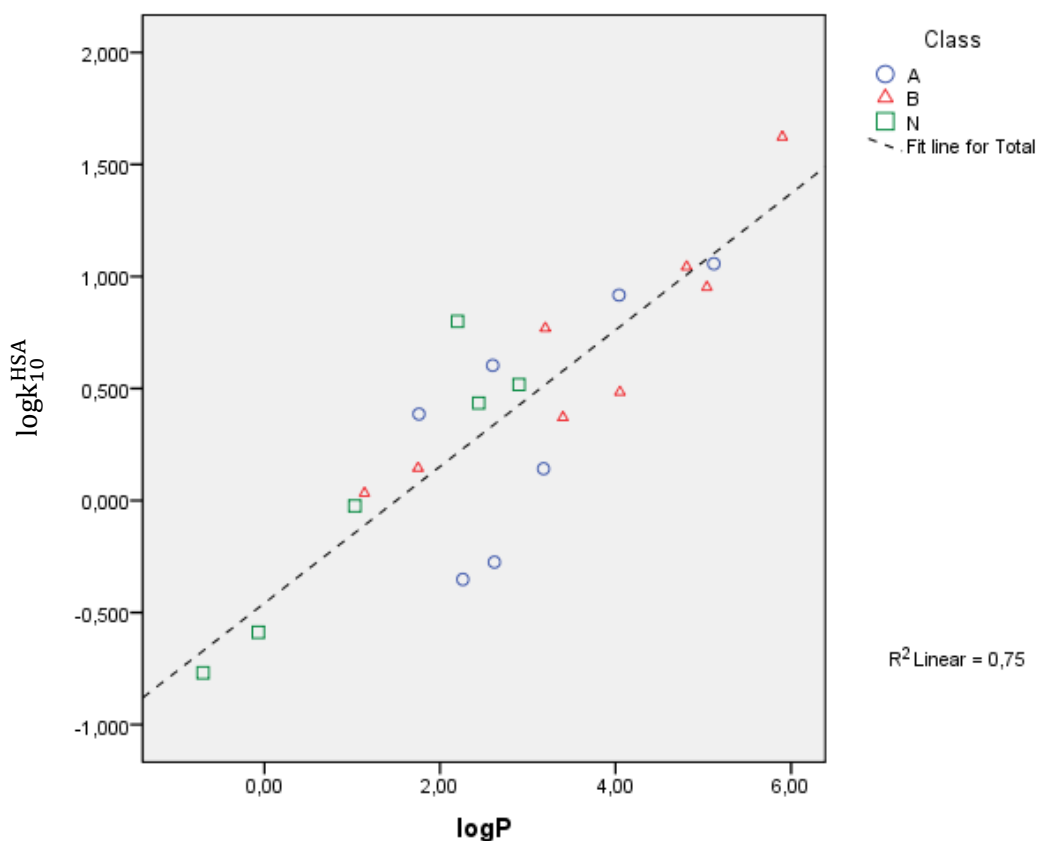
3.2.3. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{10}^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log P$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης για 10% ακετονιτρίλιο, $\log k_{10}^{HSA}$, με τον συντελεστή μερισμού, $\log P$, εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log k_{10}^{HSA} = 0.305(\pm 0.040) \cdot \log P - 0.457(\pm 0.131) \quad (3.3)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.750, F = 57.0, s = 0.305)$$

Στο διάγραμμα 3 δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_{10}^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή μερισμού, $\log P$.



Διάγραμμα 3. Γραφική παράσταση $\log k_{10}^{HSA}$ συναρτήσει του $\log P$

Όμοια με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, οι όροι F^+ και F^- δεν παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα και δεν βελτιώθηκε η ποιότητα της εξίσωσης (3.3) με την εισαγωγή τους.

Συμπερασματικά, για τις τρεις συσχετίσεις που μελετήθηκαν και για τις εξισώσεις (3.1)-(3.3) διαπιστώνεται:

- Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,69-0,75, με τα καλύτερα στατιστικά στοιχεία να προκύπτουν με την χρήση του χρωματογραφικού συντελεστή $\log k_{10}^{HSA}$, κάτι που φαίνεται και από το διάγραμμα 3.
- Η κατακράτηση των φαρμακευτικών ενώσεων βασίζεται κατά κύριο λόγο στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων που εκλύονται και της χρωματογραφικής στήλης. Επίσης, τα κλάσματα των θετικών και αρνητικών φορτίων, F^+ και F^- , δεν παίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς δεν βελτίωναν τις αρχικές εξισώσεις συσχέτισης που προέκυπταν.
- Όπως είναι λογικό, με την αύξηση της περιεκτικότητας ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, μειώνεται ο συντελεστής $\log P$, καθώς μειώνεται η πολικότητα του διαλύτη.

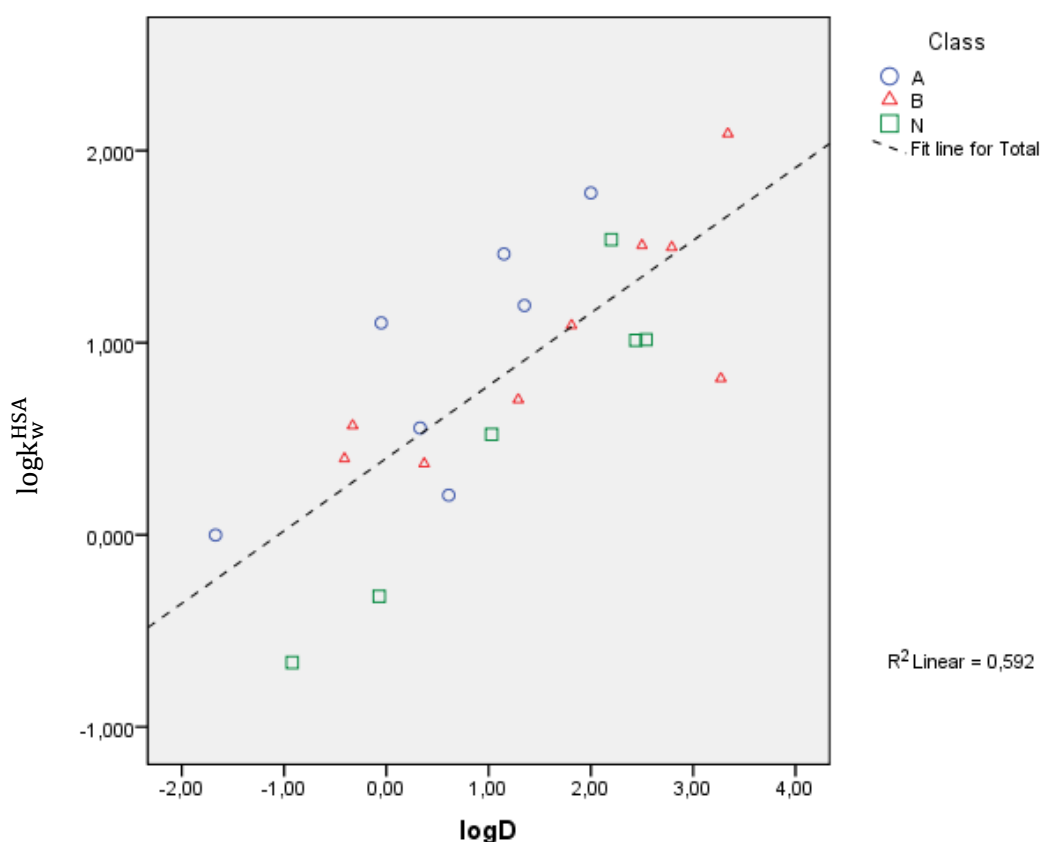
3.2.4. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_w^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log D$

Για την συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης για 100% υδατική φάση, $\log k_w^{HSA}$, με το συντελεστή κατανομής, $\log D$, λήφθηκαν υπόψη όλες οι ενώσεις. Έτσι, εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log k_w^{HSA} = 0.378(\pm 0.070) \cdot \log D + 0.399(\pm 0.126) \quad (3.4)$$

$$(N = 22, R^2 = 0.592, F = 29.0, s = 0.450)$$

Στο παρακάτω διάγραμμα δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή κατανομής $\log D$:



Διάγραμμα 4. Γραφική παράσταση $\log k_w^{HSA}$ συναρτήσει του $\log D$

Τα στατιστικά της εξίσωσης (3.4) μπορούν να χαρακτηριστούν μέτρια. Με την εισαγωγή του αρνητικού κλάσματος F^- βελτιώνονται σε σχετικά καλό βαθμό και η νέα εξίσωση που προκύπτει είναι:

$$\log k_w^{HSA} = 0.431(\pm 0.066) \cdot \log D + 0.494(\pm 0.193) \cdot F^- + 0.181(\pm 0.140) \quad (3.5)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.720, F = 21.8, s = 0.398)$$

Επομένως, το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- εμφανίζει θετική συμβολή, ενώ το κλάσμα θετικού φορτίου, F^+ , εμφανίζεται ως μη στατιστικά σημαντικό στην εξίσωση (3.5).

Σε αντίθεση με τον συντελεστή μερισμού $\log P$ (που μελετά την λιποφιλία ουδέτερων ενώσεων), ο συντελεστής κατανομής $\log D$ εκφράζει την λιποφιλία μιας ένωσης λαμβάνοντας υπόψιν τον ιοντισμό του φαρμάκου σε υδατικό περιβάλλον και σε δεδομένο pH. Ακόμα, είναι δεδομένο ότι ο ιοντισμός είναι αφαιρετικός παράγοντας της λιποφιλίας (εξίσωση 1.1). Ο ιοντισμός εντός της στήλης είναι μικρότερος από ότι σε ένα υδατικό διάλυμα, οπότε αλλάζει η διηλεκτρική σταθερά σε σχέση με το νερό και άρα η λιποφιλία ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή που προβλέπει το $\log D$.

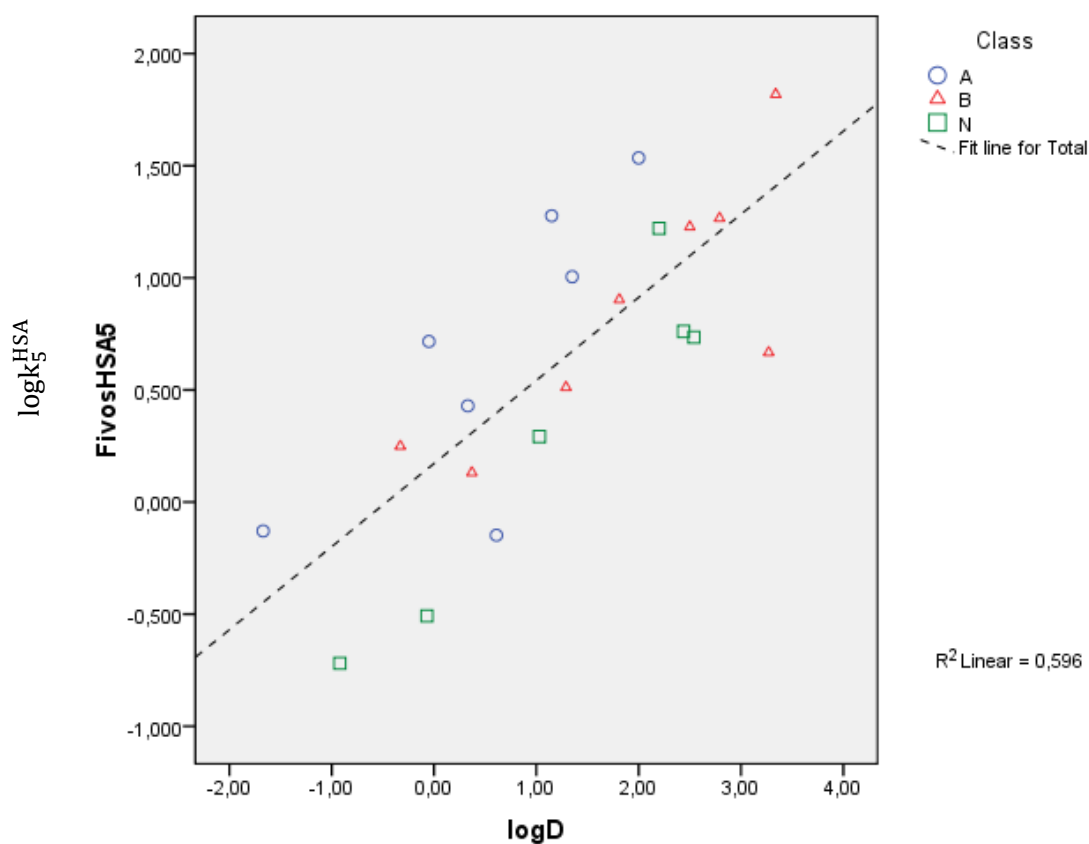
3.2.5. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_5^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log D$

Η εξίσωση που περιγράφει την συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης για περιεκτικότητα 5% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, $\log k_5^{HSA}$, με το συντελεστή κατανομής, $\log D$, είναι η ακόλουθη:

$$\log k_5^{HSA} = 0.371(\pm 0.070) \cdot \log D + 0.172(\pm 0.128) \quad (3.6)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.596, F = 28.0, s = 0.434)$$

Στο διάγραμμα 5 δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_5^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή κατανομής $\log D$.



Διάγραμμα 5. Γραφική παράσταση $\log k_5^{HSA}$ συναρτήσει του $\log D$

Αν εισαχθούν οι τιμές F^- και F^+ στην συσχέτιση, προκύπτει ότι μόνο το F^- είναι στατιστικά σημαντικό -με θετικό πρόσημο - και η παραπάνω εξίσωση λαμβάνει εν τέλει την ακόλουθη μορφή:

$$\log k_5^{HSA} = 0.438(\pm 0.064) \cdot \log D + 0.527(\pm 0.186) \cdot F^- - 0.086(\pm 0.143) \quad (3.7)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.696, F = 23.2, s = 0.371)$$

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, επιβεβαιώνεται ότι ο ιοντισμός στην στήλη είναι μικρότερος από ότι σε υδατικό περιβάλλον.

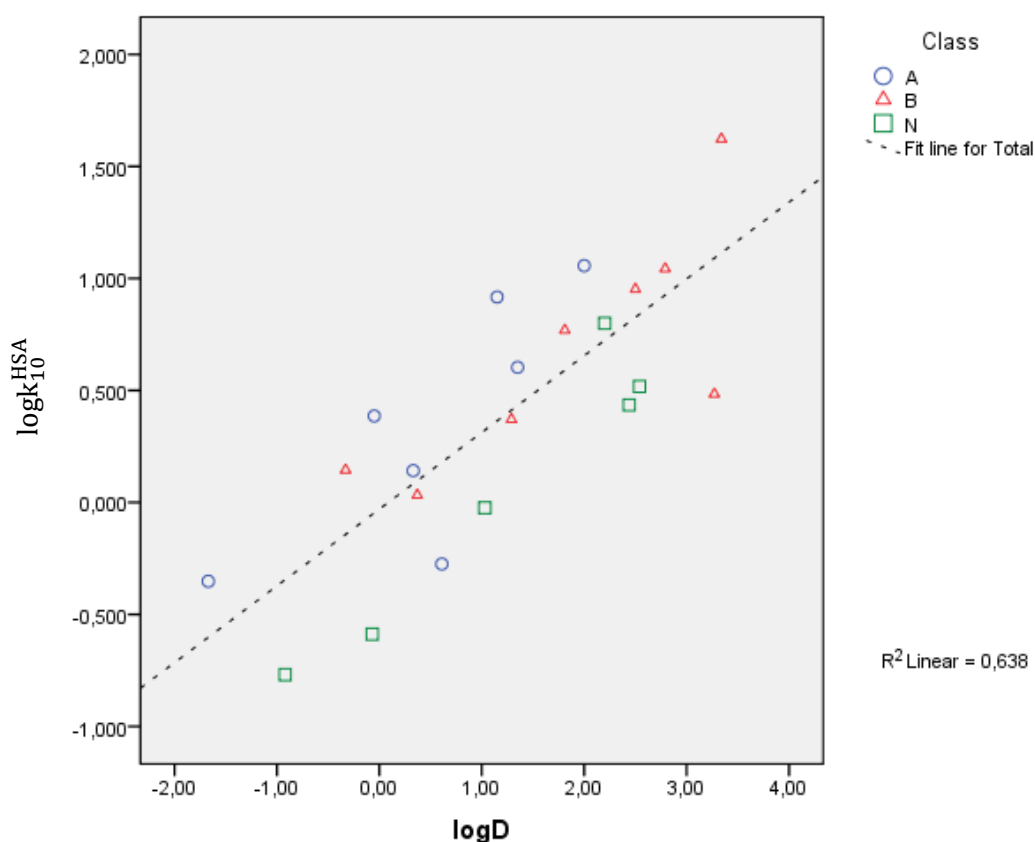
3.2.6. Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{10}^{HSA}$ με τον συντελεστή $\log D$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης για περιεκτικότητα 10% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, $\log k_{10}^{HSA}$, με το συντελεστή κατανομής, $\log D$, εκφράζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{HSA} = 0.343(\pm 0.059) \cdot \log D - 0.030(\pm 0.109) \quad (3.8)$$

$$(N = 21, R^2 = 0.638, F = 33.5, s = 0.367)$$

Στο διάγραμμα 6 δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_{10}^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή κατανομής $\log D$.



Διάγραμμα 6. Γραφική παράσταση $\log k_{10}^{HSA}$ συναρτήσει του $\log D$

Η ποιότητα της εξίσωσης (3.8) μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$\log k_{10}^{HSA} = 0.356(\pm 0.054) \cdot \log D + 0.439(\pm 0.181) \cdot F^+ + 0.568(\pm 0.174) \cdot F^- - 0.398(\pm 0.140)$$

(3.9)

$$(N= 21, R^2= 0.784, F= 20.5, s= 0.300)$$

Στην εξίσωση (3.9) εμφανίζονται στατιστικά σημαντικά και τα δύο κλάσματα φορτίου, και ειδικότερα με θετική συμβολή. Ο συντελεστής του αρνητικού κλάσματος, F^- , είναι μεγαλύτερος από αυτόν του θετικού κλάσματος, F^+ , όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς είναι γνωστό πως η στήλη ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) δείχνει μια «προτίμηση» στην συγκράτηση οξέων, τα οποία ιοντίζονται χάνοντας H^+ και άρα φορτίζονται αρνητικά.

Συμπερασματικά, για τις τρεις συσχετίσεις με τον συντελεστή κατανομής $\log D$ που μελετήθηκαν, και για τις εξισώσεις (3.4)-(3.9) διαπιστώνονται τα εξής:

- Όπως και στην περίπτωση του συντελεστή μερισμού, τα καλύτερα στατιστικά προκύπτουν για τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης για περιεκτικότητα 10% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, $\log k_{10}^{HSA}$. Ωστόσο, συνολικά οι εξισώσεις συσχέτισης των τριών χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με τον συντελεστή $\log D$, εμφανίζουν ελαφρώς χειρότερα στατιστικά στοιχεία από αυτές της συσχέτισης με τον συντελεστή $\log P$. Αυτό φαίνεται και από τον συντελεστή R^2 , ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,59-0,64 (στη συσχέτιση με $\log P$ κυμαινόταν μεταξύ 0,69-0,75). Η σύγκριση αφορά βέβαια, τις εξισώσεις χωρίς την εισαγωγή των θετικών και αρνητικών κλασμάτων φορτίου.
- Κατά την εισαγωγή των κλασμάτων φορτίου στις εξισώσεις για την βελτίωσή τους, το θετικό κλάσμα εμφανίζεται είτε ως μη στατιστικά σημαντικό είτε με μικρότερο παλινδρόμησης από το κλάσμα αρνητικού φορτίου. Αυτό συμβαίνει, καθώς οι πιο σημαντικές ηλεκτροστατικές έλξεις που συμμετέχουν στην κατακράτηση από την στήλη HSA είναι οι ελκτικές δυνάμεις μεταξύ των ανιόντων των όξινων φαρμάκων και των θετικών ομάδων της HSA. Το κλάσμα θετικού φορτίου είναι πιθανό υποδηλώνει την ανάπτυξη απωστικών δυνάμεων μεταξύ των πρωτονιωμένων βάσεων και των θετικών κέντρων της HSA.
- Οι συντελεστές των κλασμάτων θετικού (όποτε είναι στατιστικά σημαντικό) και αρνητικού φορτίου είναι θετικοί, κάτι που εξηγείται από τον ελαττωμένο ιοντισμό στο περιβάλλον της στήλης σε σχέση με αυτόν που προβλέπει ο συντελεστής κατανομής $\log D$ για υδατικό διάλυμα. Ειδικότερα, η διηλεκτρική σταθερά είναι διαφορετική σε σχέση με το νερό, και άρα η λιποφιλία ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή που προβλέπει το $\log D$ (αφού ο ιοντισμός είναι αφαιρετικός παράγοντας της λιποφιλίας).

3.3. Σύγκριση χρωματογραφικών συντελεστών $\log k_w^{HSA}$ με αντίστοιχους συντελεστές άλλων ειδών βιομηχανικής χρωματογραφίας

Για την ανάπτυξη αξιόπιστων συσχετίσεων οι τιμές $\log k_w^{HSA}$ από την στήλη HSA που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία συνδυάστηκαν με άλλες μετρήσεις από προηγούμενες διπλωματικές εργασίες προκειμένου να προκύψει μια όσο το δυνατό πιο διευρυμένη βάση δεδομένων. Οι τιμές για τους διαθέσιμους χρωματογραφικούς συντελεστές $\log k_w^{HSA}$ των άλλων βιομηχανικών χρωματογραφιών αντλήθηκαν από τον Πίνακα 4.

3.3.1. Συσχέτιση με χρωματογραφική στήλη ακινητοποιημένων μεμβρανών τύπου IAM.DD2

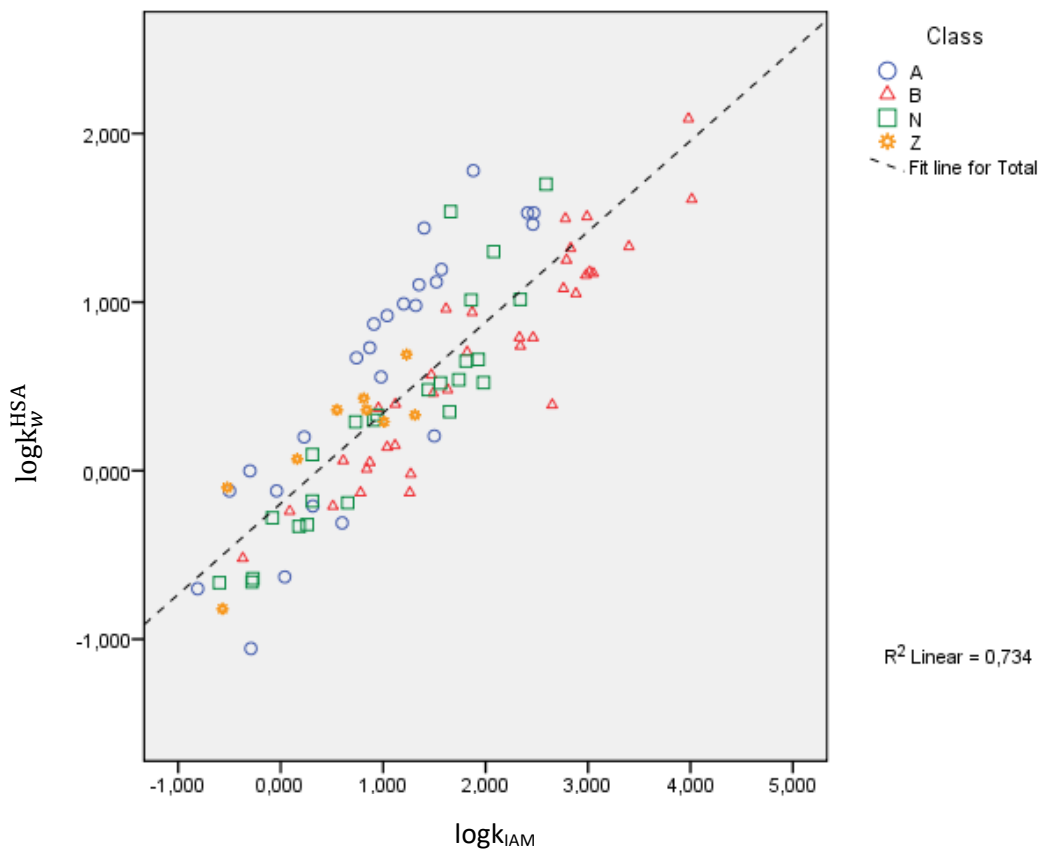
Η συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης HSA για 100% υδατική φάση, $\log k_w^{HSA}$, με τους αντίστοιχους συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών που χρησιμοποιεί στήλη IAM.DD2, εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log k_w^{HSA} = 0.538(\pm 0.034) \cdot \log k_{IAM.DD2} - 0.195(\pm 0.057) \quad \mathbf{(3.10)}$$

$$(N= 93, R^2= 0.734, F= 251, s= 0.355)$$

Φαίνεται πως προκύπτει συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης από τις δυο χρωματογραφικές στήλες. Αυτή εξηγείται από το γεγονός πως οι μηχανισμοί έκλουσης και από τις δυο στήλες έχουν ένα σημαντικό ποσοστό κατανομής (εξαρτώνται δηλαδή σε μεγάλο βαθμό από την λιποφιλία).

Στο ακόλουθο διάγραμμα δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_w^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή $\log k_{IAM}$.



Διάγραμμα 7. Γραφική παράσταση $\log k_{IW}^{HSA}$ συναρτήσει του $\log k_{IAM}$

Στο παραπάνω διάγραμμα διακρίνεται μια τάση οι βάσεις να βρίσκονται κάτω από την γραμμή τάσης, δηλαδή να συγκρατούνται περισσότερο από την στήλη ακινητοποιημένων μεμβρανών. Αυτό εξηγείται από την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωσφορικών ομάδων της στήλης IAM και των πρωτονιωμένων βάσεων (θετικά φορτισμένα ιόντα). Από την άλλη, φαίνεται μια τάση τα οξέα να κατατάσσονται πάνω από την γραμμή τάσης, δηλαδή να συγκρατούνται περισσότερο από την στήλη HSA, γεγονός που είναι γνωστό από την βιβλιογραφία και αναφέρεται παραπάνω στην θεωρία. Επιπρόσθετα, οι ουδέτερες και οι αμφοτερικές ενώσεις βρίσκονται κοντά στην γραμμής τάσης, υποδηλώνοντας πως δεσμεύονται τόσο από τα φωσφολιπίδια της στήλης IAM όσο και από την πρωτεΐνη HSA.

Με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , προκύπτει η παρακάτω νέα εξίσωση συσχέτισης, η οποία και συνοδεύεται από καλύτερα στατιστικά στοιχεία:

$$\log k_{IW}^{HSA} = 0.609(\pm 0.031) \cdot \log k_{IAM} - 0.223(\pm 0.085) \cdot F^+ + 0.382(\pm 0.081) \cdot F^- - 0.311(\pm 0.057) \quad (3.11)$$

$$(N = 93, R^2 = 0.829, F = 144, s = 0.287)$$

Ο ιονισμός έχει διαφορετικό αποτέλεσμα στη δέσμευση ενώσεων από την HSA και από τα φωσφολιπίδια. Από την μία, η παρουσία θετικού φορτίου αυξάνει τη συγγένεια της μεμβράνης ενώ έχει μικρή επίδραση στη δέσμευση από την HSA. Έτσι,

ο αρνητικός συντελεστής του F^+ υποδηλώνει τη μεγαλύτερη συγγένεια των (πρωτονιωμένων) βασικών ενώσεων με τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών, ενώ ο θετικός συντελεστής του F^- υποδηλώνει τη μεγαλύτερη ικανότητα της στήλης HSA στην κατακράτηση (αρνητικά φορτισμένων) οξέων.

3.3.2. Συσχέτιση με χρωματογραφική στήλη ακινητοποιημένης A1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP)

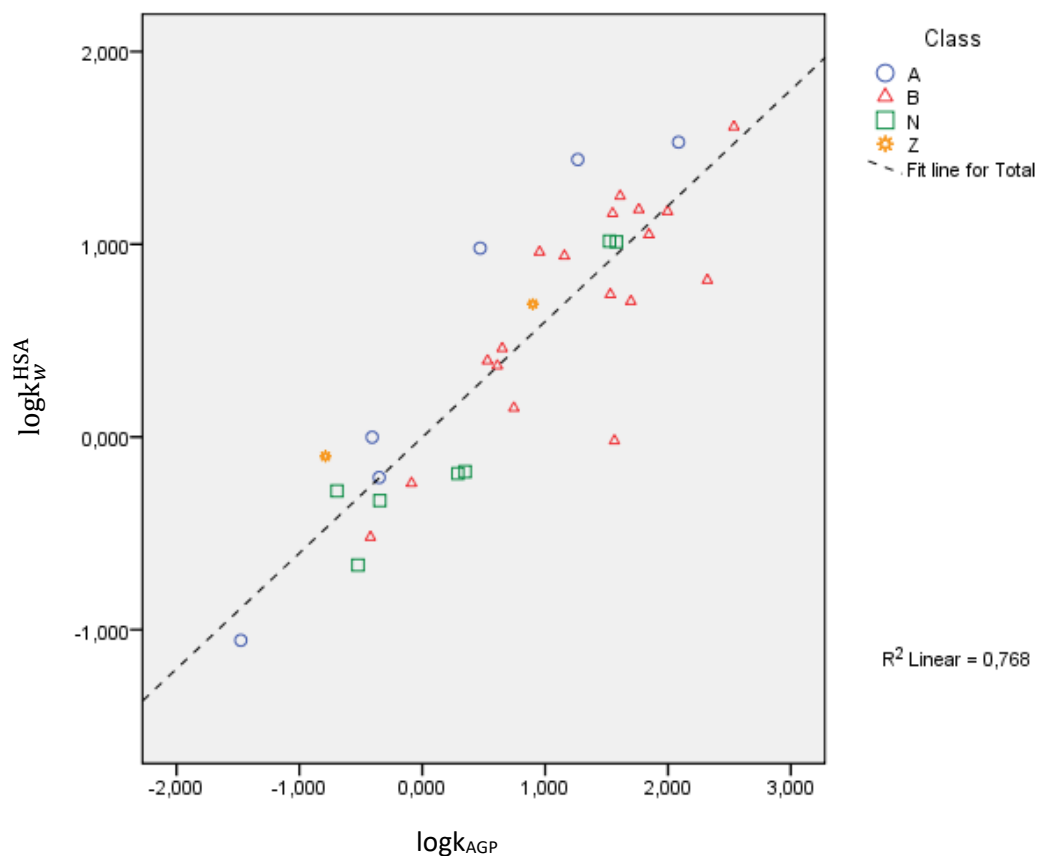
Η συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης της στήλης HSA για 100% υδατική φάση, $\log k_W^{HSA}$, με τους αντίστοιχους συντελεστές χρωματογραφικής στήλης AGP, δίνεται από την εξίσωση:

$$\log k_W^{HSA} = 0.601(\pm 0.059) \cdot \log k_{AGP} - 0.001(\pm 0.077) \quad (3.12)$$

$$(N = 33, R^2 = 0.768, F = 103, s = 0.345)$$

Προκύπτει σχετικά καλή συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης από τις δυο χρωματογραφικές στήλες, η οποία εξηγείται από τον κοινό μηχανισμό κατακράτησης, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Δηλαδή, οι μηχανισμοί έκλουσης και από τις δυο στήλες έχουν ένα σημαντικό ποσοστό κατανομής.

Στο ακόλουθο διάγραμμα δίνεται η γραφική παράσταση του συντελεστή $\log k_W^{HSA}$ συναρτήσει του συντελεστή $\log k_{AGP}$.



Διάγραμμα 8. Γραφική παράσταση $\log k_W^{HSA}$ συναρτήσει του $\log k_{AGP}$

Στο παραπάνω διάγραμμα δεν φαίνεται ξεκάθαρα η τάση της HSA να δεσμεύει όξινες ενώσεις και της AGP βασικές. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην έλλειψη επαρκών δεδομένων (33 συνολικά φάρμακα εκ των οποίων μόνο τα 6 είναι όξινα φάρμακα). Ωστόσο, παρατηρείται πως 4 από τα 6 όξινα φάρμακα βρίσκονται πάνω από την γραμμή τάσης (δηλαδή συγκρατούνται περισσότερο από την HSA), ενώ το 5^ο όξινο φάρμακο βρίσκεται πάνω στην γραμμή τάσης. Σχετικά με τις ουδέτερες ενώσεις και τους αμφολύτες, φαίνεται πως οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται πλησίον στη γραμμή τάσης, κάτι που υποδεικνύει πως δεσμεύονται και από τους δύο τύπους πρωτεϊνών.

Η εξίσωση (3.12) βελτιώνεται περαιτέρω με τη εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου. Η νέα εξίσωση, με αυξημένο συντελεστή συσχέτισης R^2 , που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_W^{HSA} = 0.633(\pm 0.052) \cdot \log k_{AGP} + 0.552(\pm 0.159) \cdot F^- - 0.116(\pm 0.074) \quad (3.13)$$

$$(N = 33, R^2 = 0.834, F = 75.6, s = 0.296)$$

Κατά την εισαγωγή των κλασμάτων φορτίων στην συσχέτιση, το κλάσμα F^+ ήταν στατιστικά μη σημαντικό. Ακόμα, ο θετικός συντελεστής του F^- επαληθεύει και πάλι τη μεγαλύτερη ικανότητα της στήλης HSA στην κατακράτηση (αρνητικά φορτισμένων) οξέων.

3.4. Εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων

Για την αξιοπιστία των μοντέλων και την σωστή αξιολόγησή τους, έγινε συνδυασμός των πειραματικών αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας με προηγούμενες μετρήσεις ώστε να προκύψει μια όσο το δυνατόν πιο διευρυμένη βάση δεδομένων. Ακόμα, έγινε χωρισμός της βάσης δεδομένων σε training set (δεδομένα εκμάθησης, δηλαδή φάρμακα που θα στηριχθεί η ανάπτυξη του μοντέλου) και test set (δεδομένα ελέγχου, δηλαδή φάρμακα που θα εφαρμοσθεί το μοντέλο και θα συγκριθούν οι προβλέψεις με τις πραγματικές τιμές). Η διαίρεση σε αυτά τα δυο σετ ακολουθεί τις προηγούμενες δημοσιεύσεις της ερευνητικής ομάδας.^{83,84}

3.4.1. Πρόβλεψη έκτασης (ποσοστού) πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB (Plasma Protein Binding)

Το ποσοστό δέσμευσης καθενός φαρμάκου σε πρωτεΐνη αποτελεί σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος, καθώς-όπως έχει αναλυθεί και στο θεωρητικό μέρος-μόνο το ελεύθερο μέρος του φαρμάκου είναι δυνατό να κινηθεί, να φτάσει στον κατάλληλο υποδοχέα και να εμφανίσει φαρμακολογικό αποτέλεσμα. Επιπρόσθετα, ένα υπερβολικά μεγάλο ποσοστό σύνδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος, σημαίνει αύξηση του χρόνου που παραμένει το φάρμακο στον οργανισμό, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε φαρμακοκινητικές αλληλεπιδράσεις και πιθανά τοξικά φαινόμενα. Έτσι, στις παρακάτω παραγράφους θα χρησιμοποιηθούν δύο μοντέλα πρόβλεψης της έκτασης πρωτεϊνικής σύνδεσης που έχουν προταθεί με βάση την βιβλιογραφία, ενώ θα γίνει και τρίτη μελέτη πρόβλεψης, με χρήση της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων.

3.4.1.1. Χρήση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας (apparent affinity constant) για 0%, 5% και 10% οργανικό διαλύτη

Το πρώτο μοντέλο που θα μελετηθεί έχει προταθεί από την Valko και τους συνεργάτες της⁸⁵ αφορά την χρήση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας που ορίζεται ως:

$$\log K = \log \left(\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right) \quad (3.14)$$

Όπου %PPB, το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Το 101 στον παρονομαστή (και όχι 100) δικαιολογείται από το γεγονός πως δεν θέλουμε να μηδενιστεί ο παρονομαστής σε περίπτωση που το %PPB γίνει ίσο με 100.

Όπως έχει αναφερθεί, το σύνολο των φαρμάκων που εξετάζονται κάθε φορά (διαφορετικός αριθμός για κάθε περιεκτικότητα οργανικού διαλύτη) χωρίζονται σε δεδομένα εκμάθησης (training set) -δηλαδή στις ενώσεις που θα στηριχθεί η ανάπτυξη του μοντέλου- και σε δεδομένα ελέγχου (test set), δηλαδή τις ενώσεις που θα αξιοποιηθούν για τον έλεγχο των προβλέψεων του μοντέλου που θα αναπτυχθεί. Στα δεδομένα ελέγχου προτιμάται να περιέχονται όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις, οι οποίες να εμφανίζουν μικρή, μεσαία ή μεγάλη πρωτεϊνική απορρόφηση. Γενικά, είναι θεμιτό να υπάρχουν πολλών κατηγοριών φάρμακα, ώστε η εξίσωση που θα προκύψει από το μοντέλο να είναι όσο το δυνατόν πιο γενική. Βέβαια, θα πρέπει να δίνεται προσοχή για να αποφεύγεται το “overfeeding”, όπου μπορεί να έχουμε τελικά μια καλή προσαρμογή, αλλά για άγνωστα φάρμακα να μην δίνει καλά αποτελέσματα.

1^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 0% οργανικό διαλύτη

Χρησιμοποιούνται δεδομένα για τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{HSA}$ τόσο από απευθείας πειραματικές μετρήσεις με 100% υδατική φάση, όσο και μέσω γραμμικής προεκβολής από μετρήσεις παρουσία διαφορετικών ποσοστών ακετονιτριλίου.

Έτσι, αφού υπολογιστούν οι τιμές της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας, η εξίσωση συσχέτισης με τον συντελεστή $\log k_w^{HSA}$, μετά από γραμμική παλινδρόμηση, είναι η ακόλουθη:

$$\log K = 0.627(\pm 0.139) \log k_w^{HSA} + 0.687(\pm 0.134) \cdot F^- - 0.665(\pm 0.233) \cdot B + 0.004(\pm 0.002) \cdot MW - 0.319(\pm 0.174) \quad (3.15)$$

$$(N = 72, R^2 = 0.775, F = 57.6, s = 0.439)$$

,όπου B σταθερά του Abraham (βασικότητα δεσμών υδρογόνου) και MW η μοριακή μάζα. Παρατηρείται ότι το κλάσμα θετικού φορτίου F^+ δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Με βάση την εξίσωση (3.15) υπολογίστηκαν πρώτα οι προβλεπόμενες τιμές $\log K_{pred}$ των δεδομένων ελέγχου (test set), οι οποίες στην συνέχεια μετατράπηκαν σε %PPB μέσω της εξίσωσης (3.14). Τα αποτελέσματα του μοντέλου, καθώς και οι

πειραματικές τιμές των ενώσεων του test set παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.15) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	10,85
2	Chloramphenicol	54,00	42,73
3	Cimetidine	18,50	14,47
4	Cinoxacin	66,50	67,56
5	Hydrocortisone	95,00	54,51
6	Isoxicam	96,00	90,00
7	Levofloxacin	32,30	53,38
8	Lornoxicam	99,00	82,31
9	Meloxicam	99,30	98,96
10	Methylprednisolone	77,30	59,44
11	Metoclopramide	33,30	55,88
12	Minoxidil	0,00	48,88
13	Nadolol	30,00	16,05
14	Nalidixic acid	93,00	76,36
15	Niflumic acid	90,00	98,94
16	Omeprazole	95,00	58,52
17	Pipemidic acid	30,00	27,79
18	Piperacillin	19,00	43,28
19	Salicylic acid	95,00	83,04
20	Sulpiride	40,00	33,71
21	Vancomycin	43,30	8,29
22	Warfarin	98,75	94,75

Θεωρούμε πως επιτυχής πρόβλεψη είναι αυτή με διαφορά το πολύ $\pm 20\%$ σε σχέση με την πειραματική τιμή (όριο ανοχής = 20%). Τότε, βλέπουμε ότι έχουμε 14/22 σωστές προβλέψεις (ποσοστό επιτυχίας 64%) από το μοντέλο που βασίζεται στην φαινόμενη σταθερά συγγένειας. Οι τιμές των ενώσεων που βρίσκονται εκτός του ορίου ανοχής είναι σκιασμένες. Ωστόσο, παρατηρούμε πως από τις 8 ενώσεις που απορρίπτονται, οι 3 (Levofloxacin, Metoclopramide, Piperacillin), βρίσκονται οριακά εκτός ορίων. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί, πως το μοντέλο έδωσε καλές προβλέψεις τόσο για μεγάλες τιμές ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης (π.χ. Warfarin), όσο για χαμηλές τιμές (π.χ. Cimetidine).

Η εμφανής αποτυχία στην πρόβλεψη του %PPB της κεφτριαξόνης (Ceftriaxone) δεν είναι απροσδόκητη, αφού σε προηγούμενη δημοσίευση, παρατηρήθηκαν ανεπιτυχείς προβλέψεις της %PPB μίας σειράς κεφαλοσπορινών χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο βασισμένο σε στατική φάση HSA.⁸⁶ Είναι πιθανό στην σύνδεση της κεφτριαξόνης με πρωτεΐνες, να παίζουν ρόλο πολικές αλληλεπιδράσεις. Ακόμα, σημαντικές διαφορές εμφάνισαν η υδροκορτιζόνη ($\Delta\text{PPB}\% = 40,49\%$) και η μινοξιδίλη ($\Delta\text{PPB}\% = 48,88\%$).

2^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 5% οργανικό διαλύτη

Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται δεδομένα που έχουν προκύψει παρουσία 5% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Τα πειραματικά δεδομένα που θα εισάγονται στο μοντέλο (δηλαδή τα φάρμακα που έχουν μετρηθεί παρουσία 5% ακετονιτριλίου) είναι λιγότερα σε σχέση με την 1^η περίπτωση (για 0% οργανικό διαλύτη).

Με όμοιο τρόπο με την παραπάνω περίπτωση, αφού υπολογιστούν οι τιμές της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας για τα φάρμακα που αποτελούν το training set, η εξίσωση συσχέτισης με τον συντελεστή $\log k_5^{HSA}$, μετά από γραμμική παλινδρόμηση, είναι η εξής:

$$\log K = 1.001(\pm 0.098) \cdot \log k_5^{HSA} + 0.713(\pm 0.159) \cdot F^- - 0.136(\pm 0.089) \quad (3.16)$$

$$(N = 54, R^2 = 0.717, F = 64.6, s = 0.493)$$

Παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση, πως ότι το κλάσμα θετικού φορτίου F^+ δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Έπειτα, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, υπολογίζονται οι προβλεπόμενες τιμές $\log K_{pred}$ των δεδομένων ελέγχου (test set) από την εξίσωση (3.16), οι οποίες στην συνέχεια μετατρέπονται σε %PPB μέσω της εξίσωσης (3.14). Τα αποτελέσματα του μοντέλου για δεδομένα που λήφθηκαν παρουσία 5% ακετονιτριλίου, καθώς και οι πειραματικές τιμές των ενώσεων του test set παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.16) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	34,82
2	Chloramphenicol	54,00	40,69
3	Cimetidine	18,50	
4	Cinoxacin	66,50	59,40
5	Hydrocortisone	95,00	49,00
6	Isoxicam	96,00	94,84
7	Levofloxacin	32,30	44,62
8	Lornoxicam	99,00	73,34
9	Meloxicam	99,30	98,92
10	Methylprednisolone	77,30	56,54
11	Metoclopramide	33,30	58,83
12	Minoxidil	0,00	
13	Nadolol	30,00	22,75
14	Nalidixic acid	93,00	80,04
15	Niflumic acid	90,00	98,65
16	Omeprazole	95,00	65,35
17	Pipemidic acid	30,00	28,16
18	Piperacillin	19,00	53,17
19	Salicylic acid	95,00	74,43
20	Sulpiride	40,00	40,41

21	Vancomycin	43,30	65,90
22	Warfarin	98,75	95,57

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν, φαίνεται ότι το μοντέλο έδωσε 11/20 σωστές προβλέψεις (ποσοστό επιτυχίας 55%). Παράλληλα, για δύο ενώσεις, τις Cimetidine και Minoxidil, το μοντέλο δεν έδωσε αποτέλεσμα. Ακόμα, παρατηρείται ότι 3 ενώσεις, και πιο συγκεκριμένα οι Methylprednisolone, Salicylic acid και Vancomycin, είναι οριακά εκτός του ορίου ανοχής του 20%, με τις διαφορές της προβλεπόμενης από το μοντέλο τιμής και της πειραματικής τους τιμής, να κυμαίνονται σε απόλυτη τιμή μεταξύ 20,57%-22,6%.

3^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 10% οργανικό διαλύτη

Στο μοντέλο χρησιμοποιούνται δεδομένα που έχουν προκύψει παρουσία 10% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Τα πειραματικά δεδομένα σε αυτή την περίπτωση είναι λιγότερα από αυτά που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση (1^η περίπτωση) αλλά περισσότερα από τα αντίστοιχα παρουσία 5% ακετονιτριλίου (2^η περίπτωση).

Όμοια με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, μετά από γραμμική παλινδρόμηση, η συσχέτιση της φαινόμενης σταθεράς με τον χρωματογραφικό συντελεστή για παρουσία 10% ακετονιτριλίου, προκύπτει ότι εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log K = 1.137(\pm 0.093) \cdot \log k_5^{\text{HSA}} + 0.819(\pm 0.144) \cdot F + 0.006(\pm 0.069) \quad (3.17)$$

$$(N = 62, R^2 = 0.763, F = 94.7, s = 0.457)$$

Έτσι, μετά τον υπολογισμό των προβλεπόμενων τιμών $\log K_{\text{pred}}$ των δεδομένων ελέγχου (test set) από την εξίσωση (3.17), και την μετατροπή τους σε %PPB μέσω της εξίσωσης (3.14), προκύπτουν τα αποτελέσματα που παρατίθεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα εφαρμογής εξισώσεων (3.14) και (3.17) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	30,19
2	Chloramphenicol	54,00	43,61
3	Cimetidine	18,50	
4	Cinoxacin	66,50	74,97
5	Hydrocortisone	95,00	41,68
6	Isoxicam	96,00	94,55
7	Levofloxacin	32,30	42,27
8	Lornoxicam	99,00	77,01
9	Meloxicam	99,30	99,02
10	Methylprednisolone	77,30	50,84
11	Metoclopramide	33,30	49,72
12	Minoxidil	0,00	
13	Nadolol	30,00	12,58
14	Nalidixic acid	93,00	83,44
15	Niflumic acid	90,00	99,54

16	Omeprazole	95,00	56,56
17	Pipemidic acid	30,00	22,79
18	Piperacillin	19,00	52,19
19	Salicylic acid	95,00	73,40
20	Sulpiride	40,00	33,08
21	Vancomycin	43,30	64,36
22	Warfarin	98,75	94,98

Όπως και στην περίπτωση για παρουσία 5% ακετονιτριλίου, το μοντέλο δεν δίνει αποτελέσματα για τις ενώσεις Cimetidine και Minoxidil. Παρατηρείται έτσι, ότι οι σωστές προβλέψεις είναι 12/20 (ποσοστό επιτυχίας 60%), ποσοστό ελαφρώς μεγαλύτερο από αυτό της 2^{ης} περίπτωσης. Ακόμα, 3 από τις 8 ενώσεις που βρίσκονται εκτός ορίου ανοχής, παρατηρείται ότι είναι οριακά εκτός. Αυτές είναι οι Lornoxicam, Salicylic acid και Vancomycin.

Συμπερασματικά, για τις 3 περιπτώσεις που μελετήθηκαν μπορούμε να διαπιστώσουμε πως το πιο επιτυχημένο μοντέλο με βάση την εφαρμογή στο test set ήταν αυτό για δεδομένα που λήφθηκαν παρουσία 0% οργανικού διαλύτη.

Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί πως ορισμένες αποκλίσεις από τις πειραματικές τιμές μπορεί να οφείλονται στο γεγονός ότι το προβλεπόμενο ποσοστό υπολογίστηκε με την υπόθεση πως η πρωτεϊνική σύνδεση οφείλεται αποκλειστικά στη πρωτεΐνη HSA, ενώ στην πραγματικότητα μπορεί κάποιες ενώσεις να δεσμεύονται και από άλλες πρωτεΐνες (π.χ. AGP). Επιπρόσθετα, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως η πρωτεϊνική σύνδεση κυμαίνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο και δεν λαμβάνει μόνο μια τιμή.

3.4.1.2. Χρήση μη γραμμικού μοντέλου για 0%, 5% και 10% οργανικό διαλύτη

Το δεύτερο μοντέλο που θα μελετηθεί βασίζεται σε μια μη γραμμική εξίσωση μεταξύ του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης και του συντελεστή κατακράτησης k_{HSA} , η οποία είναι:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(a_0 + a_1 \cdot k_{HSA} + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + \dots)}} \quad (3.18)$$

,όπου: x_2, x_3, \dots : Πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες.

a_1, a_2, a_3, \dots : Συντελεστές που προκύπτουν με μη γραμμική παλινδρόμηση.

Αξίζει να σημειωθεί, πως στις προηγούμενες συσχετίσεις χρησιμοποιούνταν ο λογαριθμικός συντελεστής κατακράτησης $\log k$ για κάθε περιεκτικότητα οργανικού τροποποιητή. Ωστόσο, σε αυτό το μη γραμμικό μοντέλο εισάγεται ο συντελεστής k_{HSA} . Θα μελετηθούν, όπως και στο πρώτο μοντέλο, περιπτώσεις με δεδομένα για τρεις διαφορετικές περιεκτικότητες οργανικού διαλύτη. Λαμβάνονται δεδομένα από τους πίνακες 5 και 7.

1^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 0% οργανικό διαλύτη

Χρησιμοποιούνται δεδομένα για τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης k_w^{HSA} τόσο από απευθείας πειραματικές μετρήσεις με 100% υδατική φάση, όσο και

μέσω γραμμικής προεκβολής από μετρήσεις παρουσία διαφορετικών ποσοστών ακετονιτριλίου.

Η εξίσωση που προέκυψε με βάση τα δεδομένα εκμάθησης, μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση, είναι η εξής:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(0,649 (\pm 0,096) + 0,209 (\pm 0,033) \cdot k_w^{HSA} + 0,600 (\pm 0,176) \cdot F^-)}} \quad (3.19)$$

$$(N = 73, R^2 = 0.767, s = 16.5)$$

Δηλαδή, μόνη πρόσθετη φυσικοχημική παράμετρος (x_2) είναι το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- . Το κλάσμα του θετικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αντιθέτως, η παρουσία του αρνητικού κλάσματος υποδηλώνει την προτίμηση της HSA, της πλέον άφθονης κυκλοφορούσας πρωτεΐνης στο πλάσμα, να δεσμεύει αρνητικά φορτισμένες υδρόφοβες ενώσεις.

Οι συντελεστές είναι:

$$a_0 = -0,649 \pm 0,096 \text{ (Σταθερός όρος)}$$

$$a_1 = 0,209 \pm 0,033 \text{ (Συντελεστής } k_w^{HSA})$$

$$a_2 = 0,600 \pm 0,176 \text{ (Συντελεστής } F^-)$$

Μετά την εφαρμογή της εξίσωσης (3.19) στα δεδομένα ελέγχου, προκύπτουν τα αποτελέσματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, μαζί με τις πειραματικές τιμές των ενώσεων.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.19) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	30,85
2	Chloramphenicol	54,00	29,01
3	Cimetidine	18,50	26,84
4	Cinoxacin	66,50	56,18
5	Hydrocortisone	95,00	38,53
6	Isoxicam	96,00	96,92
7	Levofloxacin	32,30	43,51
8	Lornoxicam	99,00	65,68
9	Meloxicam	99,30	100,00
10	Methylprednisolone	77,30	54,28
11	Metoclopramide	33,30	48,91
12	Minoxidil	0,00	36,41
13	Nadolol	30,00	24,27
14	Nalidixic acid	93,00	63,99
15	Niflumic acid	90,00	99,80
16	Omeprazole	95,00	67,40
17	Pipemidic acid	30,00	29,21
18	Piperacillin	19,00	53,05
19	Salicylic acid	95,00	59,05

20	Sulpiride	40,00	30,34
21	Vancomycin	43,30	73,71
22	Warfarin	98,75	97,97

Όπως και στα αποτελέσματα του πρώτου μοντέλου, τα σκιασμένα αποτελέσματα αφορούν ενώσεις που δεν βρίσκονται εντός του ορίου ανοχής. Παρατηρείται ότι οι προβλέψεις εντός των ορίων του $\pm 20\%$ είναι 11/22 (ποσοστό επιτυχίας 50%), ενώ μόνο η ένωση Methylprednisolone μπορούμε να πούμε πως βρίσκεται οριακά εκτός, με την διαφορά από την πειραματική τιμή ποσοστού σύνδεσης να είναι 23,02%. Ακόμα, είναι ξεκάθαρη και πάλι (όπως και στο μοντέλο της Valko) η αποτυχία πρόβλεψης για την Ceftriaxone, κάτι που ήταν αναμενόμενο όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, ενώ αξιοπρόσεχτη είναι και η αποτυχία στην πρόβλεψη για τη Hydrocortisone, όπου η διαφορά στο ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης προσεγγίζει το 60%.

2^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 5% οργανικό διαλύτη

Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται δεδομένα που έχουν προκύψει παρουσία 5% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Τα πειραματικά δεδομένα που εισάγονται στο μοντέλο (δηλαδή τα φάρμακα που έχουν μετρηθεί παρουσία 5% ακετονιτριλίου) είναι λιγότερα σε σχέση με την 1^η περίπτωση (για 0% οργανικό διαλύτη).

Η εξίσωση που προέκυψε με βάση τα δεδομένα εκμάθησης, μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση, είναι η εξής:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(-0,835 (\pm 0,127) + 0,483 (\pm 0,083) \cdot k_5^{HSA} + 0,602 (\pm 0,176) \cdot F^-)}} \quad (3.20)$$

$$(N= 56, R^2= 0.831, s= 13.5)$$

Όπως και στην 1^η περίπτωση, η μόνη πρόσθετη φυσικοχημική παράμετρος (x_2) είναι το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- , ενώ το κλάσμα του θετικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Οι συντελεστές είναι:

$$a_0 = -0,835 \pm 0,127 \text{ (Σταθερός όρος)}$$

$$a_1 = 0,483 \pm 0,083 \text{ (Συντελεστής } k_5^{HSA})$$

$$a_2 = 0,602 \pm 0,176 \text{ (Συντελεστής } F^-)$$

Τα αποτελέσματα για τις ενώσεις των δεδομένων ελέγχου, μετά από εφαρμογή της εξίσωσης (3.20), παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.20) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	25,75
2	Chloramphenicol	54,00	28,98
3	Cimetidine	18,50	
4	Cinoxacin	66,50	47,08
5	Hydrocortisone	95,00	38,00
6	Isoxicam	96,00	98,20
7	Levofloxacin	32,30	31,84
8	Lornoxicam	99,00	56,08
9	Meloxicam	99,30	100,00
10	Methylprednisolone	77,30	50,27
11	Metoclopramide	33,30	54,92
12	Minoxidil	0,00	
13	Nadolol	30,00	18,54
14	Nalidixic acid	93,00	64,98
15	Niflumic acid	90,00	100,00
16	Omeprazole	95,00	66,84
17	Pipemidic acid	30,00	21,09
18	Piperacillin	19,00	44,80
19	Salicylic acid	95,00	57,19
20	Sulpiride	40,00	28,73
21	Vancomycin	43,30	63,99
22	Warfarin	98,75	99,07

Το μοντέλο δεν δίνει πρόβλεψη για δύο από τις ενώσεις του test set. Έτσι, οι σωστές προβλέψεις είναι μόλις 9/20 (ποσοστό επιτυχίας 45%), ποσοστό που είναι ακόμα μικρότερο από την πρώτη περίπτωση, όπου μελετήθηκαν δεδομένα για 100% υδατική φάση. Ωστόσο, δύο από τις ενώσεις που βρίσκονται εκτός του ορίου ανοχής, οι Metoclopramide και Vancomycin, είναι πραγματικά πολύ κοντά στο όριο του $\pm 20\%$.

3^η περίπτωση: Χρήση δεδομένων για 10% οργανικό διαλύτη

Στο μοντέλο χρησιμοποιούνται δεδομένα που έχουν προκύψει παρουσία 10% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Τα πειραματικά δεδομένα σε αυτή την περίπτωση είναι λιγότερα από αυτά που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση (1^η περίπτωση) αλλά περισσότερα από τα αντίστοιχα παρουσία 5% ακετονιτριλίου (2^η περίπτωση).

Η συσχέτιση που προέκυψε με βάση τα δεδομένα εκμάθησης, μετά από μη γραμμική παλινδρόμηση, εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\%PPB = \frac{100}{1 + 10^{-(0.834 (\pm 0.112) + 0.746 (\pm 0.118) \cdot k_{10}^{HSA} + 0.724 (\pm 0.167) \cdot F^-)}} \quad (3.21)$$

$$(N = 64, R^2 = 0.823, s = 14.2)$$

Όμοια με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, η μόνη πρόσθετη φυσικοχημική παράμετρος (χ_2) είναι το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- , ενώ το κλάσμα του θετικού φορτίου δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

Οι συντελεστές είναι:

$$a_0 = -0.834 \pm 0.112 \text{ (Σταθερός όρος)}$$

$$a_1 = 0.746 \pm 0.118 \text{ (Συντελεστής } k_{10}^{\text{HSA}})$$

$$a_2 = 0.724 \pm 0.167 \text{ (Συντελεστής } F^-)$$

Τα αποτελέσματα για τις ενώσεις των δεδομένων ελέγχου, μετά από εφαρμογή της εξίσωσης (3.21), παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 15. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.21) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	26,96
2	Chloramphenicol	54,00	35,72
3	Cimetidine	18,50	
4	Cinoxacin	66,50	63,77
5	Hydrocortisone	95,00	33,70
6	Isoxicam	96,00	95,99
7	Levofloxacin	32,30	33,69
8	Lornoxicam	99,00	65,63
9	Meloxicam	99,30	99,99
10	Methylprednisolone	77,30	44,94
11	Metoclopramide	33,30	43,31
12	Minoxidil	0,00	
13	Nadolol	30,00	16,58
14	Nalidixic acid	93,00	74,04
15	Niflumic acid	90,00	100,00
16	Omeprazole	95,00	52,19
17	Pipemidic acid	30,00	21,04
18	Piperacillin	19,00	52,24
19	Salicylic acid	95,00	62,49
20	Sulpiride	40,00	26,51
21	Vancomycin	43,30	63,46
22	Warfarin	98,75	96,82

Οι σωστές προβλέψεις στην περίπτωση δεδομένων που λήφθηκαν παρουσία 10% οργανικού διαλύτη είναι 12/20 (ποσοστό επιτυχίας 60%), ενώ η Vancomycin είναι πολύ οριακά εκτός ορίου ανοχής, αφού η απόλυτη τιμή της διαφοράς της υπολογιζόμενης από το μοντέλο τιμής με την πειραματική είναι 20,16%.

Γενικά, διαπιστώνεται πως όσον αφορά το μη γραμμικό μοντέλο, καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται για δεδομένα που έχουν προκύψει παρουσία 10% ακετονιτριλίου, σε σχέση με τις περιεκτικότητες των 0% και 5%. Ωστόσο, συνολικά,

το μοντέλο της Valko κρίνεται καλύτερο από το μη γραμμικό, αφού έχει υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας.

3.4.1.3. Χρήση της τεχνικής PLS (Partial Least Square Analysis, Μερικά ελάχιστα τετράγωνα) για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Το τρίτο μοντέλο πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης προκύπτει μέσω της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, η οποία έχει αναλυθεί πιο διεξοδικά στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας (βλ. Ενότητα 1.4.3.).

Έτσι, αυτή η τεχνική έχει το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό πως επιτρέπει την χρήση μεταβλητών που συσχετίζονται η μια με την άλλη επειδή δημιουργεί καινούργιες μεταβλητές που έχουν προκύψει από ομαδοποίηση των αρχικών μεταβλητών. Αντίθετα, στην κανονική παλινδρόμηση οι μεταβλητές θα πρέπει να είναι «ορθογώνιες», δηλαδή πλήρως ανεξάρτητες η μία από την άλλη. Ακόμα, με την μέθοδο αυτή είναι δυνατή η επεξεργασία δεδομένων ακόμα και όταν λείπουν κάποια δεδομένα, δηλαδή όταν λείπουν κάποιες μετρήσεις.

Για την εκτέλεση της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα Simca-P 10.5 (Umetrics, USA), ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι πριν από την ανάλυση τα δεδομένα κανονικοποιούνται (προεπιλεγμένη λειτουργία του λογισμικού Simca-P 10.5).

Τα απαραίτητα δεδομένα για την μέθοδο αντλήθηκαν από τους πίνακες 5, 6 και 7. Οι μεταβλητές που εισήχθησαν στο μοντέλο ήταν πολλές και ήταν οι εξής: Συντελεστές κατακράτησης (100% υδατική φάση) από στήλη IAM.DD2, μικυλλιακή χρωματογραφία (100% υδατική φάση) παρουσία των ουδέτερων τασενεγών Triton X100, Tween και Brij-35, κατακράτηση από στήλες HSA και AGP παρουσία 0, 5% και 10% ακετονιτριλίου, συντελεστές μερισμού/ κατανομής κ-οκτανόλης/ νερού logP και logD, σταθερές A και B (Abraham), τοπολογική πολική επιφάνεια TPSA, μοριακό βάρος (MW), και κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου F⁺ και F⁻.

Προκύπτουν τελικά, οι δύο κύριες συνιστώσες του μοντέλου: R²= 0.760, Q²= 0.742

Η κύρια συνιστώσα R² ονομάζεται συντελεστής προσδιορισμού και εκφράζει το ποσοστό της διακύμανσης που ερμηνεύεται από τις κύριες συνιστώσες, ενώ η κύρια συνιστώσα Q²: καλείται διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης και εκφράζει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Οι δύο κύριες συνιστώσες περιέχουν ουσιαστικά τις πληροφορίες όλων των μεταβλητών που εισήχθησαν. Παρατηρήθηκε, πως από τις μεταβλητές που έχουν εισαχθεί την μεγαλύτερη σημαντικότητα έχουν οι εξής: κλάσμα αρνητικού φορτίου F⁻, συντελεστές κατακράτησης σε στήλη HSA παρουσία 0-5-10% ακετονιτριλίου, συντελεστής μερισμού logP και οι συντελεστές κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία παρουσία ουδέτερων τασενεγών Tween, Brij και Triton.

Μετά την εξαγωγή των κυρίων συνιστωσών, το μοντέλο εφαρμόζεται στα δεδομένα ελέγχου (test set) και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου πρόβλεψης πρωτεϊνικής σύνδεσης μέσω χρήσης τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή %PPB	Τιμή %PPB μοντέλου
1	Ceftriaxone	95,00	42,82
2	Chloramphenicol	54,00	62,36
3	Cimetidine	18,50	39,02
4	Cinoxacin	66,50	45,04
5	Hydrocortisone	95,00	70,44
6	Isoxicam	96,00	94,68
7	Levofloxacin	32,30	39,06
8	Lornoxicam	99,00	91,48
9	Meloxicam	99,30	98,34
10	Methylprednisolone	77,30	81,31
11	Metoclopramide	33,30	51,39
12	Minoxidil	0,00	54,80
13	Nadolol	30,00	15,86
14	Nalidixic acid	93,00	62,11
15	Niflumic acid	90,00	98,42
16	Omeprazole	95,00	80,69
17	Pipemidic acid	30,00	18,15
18	Piperacillin	19,00	61,62
19	Salicylic acid	95,00	63,43
20	Sulpiride	40,00	28,87
21	Vancomycin	43,30	99,26
22	Warfarin	98,75	92,50

Παρατηρείται πως οι σωστές προβλέψεις για τις τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι 13/22 (ποσοστό επιτυχίας 59%). Παράλληλα, 2 από τις 8 ενώσεις που απορρίπτονται, η Cimetidine και η Cinoxacin, βρίσκονται για πολύ μικρό ποσοστό διαφοράς εκτός του ορίου ανοχής του $\pm 20\%$. Επομένως, διαπιστώνεται πως η χρήση της τεχνικής PLS, με την εισαγωγή ποικίλων μεταβλητών, έδωσε ένα αρκετά ικανοποιητικό μοντέλο πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων.

3.4.2. Πρόβλεψη του όγκου κατανομής (V_d)

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος, ο όγκος κατανομής αποτελεί μια σημαντική φαρμακοκινητική ιδιότητα που δείχνει κατά πόσο το φάρμακο είναι συνδεδεμένο με τους ιστούς ή το πλάσμα του αίματος. Ο όγκος κατανομής μιας φαρμακευτικής ένωσης εξαρτάται από τον όγκο του πλάσματος και των ιστών, καθώς και από την αναλογία μεταξύ του δεσμευμένου και μη δεσμευμένου φαρμάκου στο πλάσμα και στους ιστούς. Έτσι, γίνεται αντιληπτό πως η πρόβλεψη του κατέχει σημαντική θέση κατά τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη μιας νέας φαρμακευτικής ουσίας. Στις παρακάτω παραγράφους θα εξεταστούν τρία διαφορετικά μοντέλα πρόβλεψης του όγκος κατανομής V_d . Στα μοντέλα αυτά, επαναλαμβάνεται η διαδικασία που εφαρμόστηκε στην περίπτωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, δηλαδή η βάση δεδομένων χωρίζεται σε δεδομένα εκμάθησης (training set) και δεδομένα ελέγχου (test set).

3.4.2.1. Συσχέτιση $\log V_d$ με τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{HSA}$ (για 100% υδατική φάση)

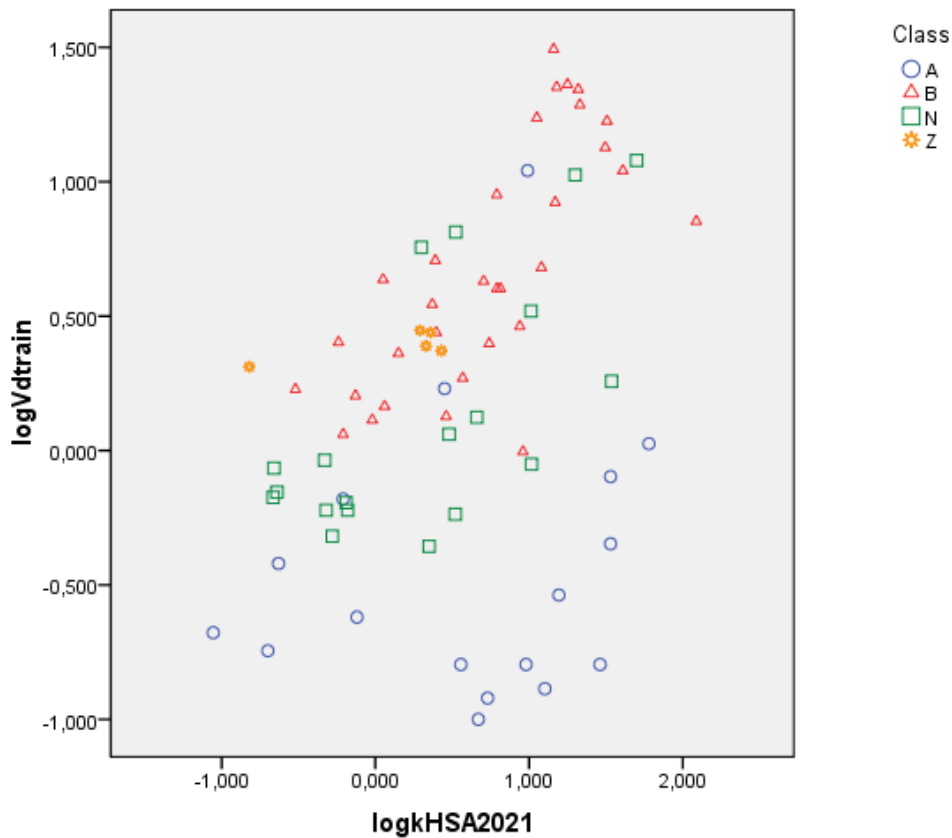
Για την εξαγωγή του πρώτου μοντέλου, χρησιμοποιείται η συγκράτηση από στήλη HSA απουσία ακετονιτριλίου, δηλαδή για 100% υδατική φάση. Η συσχέτιση μεταξύ του λογαρίθμου του συντελεστή κατανομής ($\log V_d$) και του συντελεστή κατακράτησης $\log k_w^{HSA}$ περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\log V_d = 0.620(\pm 0.110) \cdot \log k_{IAM.DD2} - 0.495(\pm 0.172) \cdot \log k_w^{HSA} - 0.367(\pm 0.104) \quad (3.22)$$

$$(N = 71, R^2 = 0.437, F = 26.4, s = 0.489)$$

Παρατηρείται ότι το μοντέλο δεν συνοδεύεται από ιδιαίτερα καλά στατιστικά μεγέθη, αν και οι δυο παράμετροι είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$). Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί πως περιγράφει μια αληθινή διαδικασία, καθώς όγκος κατανομής είναι λογικό να αυξάνει με την αύξηση της συγκράτησης IAM (εκφράζει μεταξύ άλλων και κυτταρική διαπερατότητα, δηλαδή το φάρμακο μπορεί να μετακινηθεί από το αίμα προς τους ιστούς) και μειώνεται με την αύξηση της συγκράτησης από HSA (σημαίνει πως το φάρμακο δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και καθλώνεται εκεί). Για αυτό και ο συντελεστής του $\log k_{IAM.DD2}$ είναι θετικός, και αυτός του $\log k_w^{HSA}$ αρνητικός.

Στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται σχηματικά η συσχέτιση του λογαρίθμου του όγκου κατανομής για τα δεδομένα εκμάθησης με τον συντελεστή κατακράτησης από στήλη HSA για 100% υδατική φάση.



Διάγραμμα 9. Συσχέτιση $\log V_{d,train}$ με $\log k_w^{HSA}$

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση πως τα οξέα δεν φαίνεται να εμφανίζουν καλή συσχέτιση, αντίθετα δηλαδή με τις βάσεις, τα ουδέτερα, και τους αμφολύτες, που εμφανίζουν καλύτερη συσχέτιση. Το γεγονός αυτό πιστώνεται στην αυξημένη κατακράτηση των φορτισμένων οξέων στην λευκωματίνη του ορού (HSA), η οποία δεσμεύει περισσότερο τα όξινα φάρμακα, δεσμεύοντάς τα στο πλάσμα και εμποδίζοντας την μεταφορά τους σε άλλα διαμερίσματα του οργανισμού.

Με την εφαρμογή της εξίσωσης (3.22) στα δεδομένα ελέγχου -και αφού Τα $\log V_d$ μετατραπούν σε V_d -προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα, τα οποία συνοδεύονται -όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις- με τις πειραματικές τιμές των ενώσεων που εξετάζονται.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.22) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή V_d	Τιμή V_d μοντέλου
1	Ceftriaxone	0,14	0,23
2	Chloramphenicol	0,96	0,60
3	Cimetidine	1,12	1,41
4	Cinoxacin	0,23	0,24
5	Hydrocortisone	0,54	1,13
6	Isoxicam		0,58
7	Levofloxacin	1,38	0,95
8	Lornoxicam	0,20	2,89
9	Meloxicam	10,00	0,61

10	Methylprednisolone	1,26	2,79
11	Metoclopramide	3,30	2,55
12	Minoxidil	2,86	0,88
13	Nadolol	2,00	3,01
14	Nalidixic acid	0,40	0,47
15	Niflumic acid	0,12	1,05
16	Omeprazole	0,33	2,72
17	Pipemidic acid	1,90	0,50
18	Piperacillin	1,35	1,44
19	Salicylic acid	0,15	0,28
20	Sulpiride	2,05	1,62
21	Vancomycin	0,52	1,13
22	Warfarin	0,15	0,66

Στην περίπτωση της πρόβλεψης του όγκου κατανομής, επιλέγεται να λαμβάνονται ως επιτυχείς οι προβλέψεις που ικανοποιούν την σχέση: $0,50 \cdot V_{d, \text{περι}} \leq V_{d, \text{προβλ}} \leq 2,0 \cdot V_{d, \text{περι}}$. Οι σκιασμένες τιμές ανήκουν στις ενώσεις που βρίσκονται εκτός των ορίων ανοχής. Έτσι, οι σωστές προβλέψεις είναι 12/21 (ποσοστό επιτυχίας 57%), ωστόσο 3 από τις 9 μη αποδεκτές τιμές, είναι οριακά εκτός ορίων. Πρόκειται για τις Vancomycin, Methylprednisolone και Hydrocortisone. Συμπεραίνεται πως αν και το μοντέλο δεν συνοδεύεται από ιδιαίτερα καλά στατιστικά στοιχεία (μέτριο R^2), η εφαρμογή του στο test set οδηγεί σε σχετικά ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς μόνο 6 προβλεπόμενες τιμές όγκου κατανομής βρίσκονται ουσιαστικά αρκετά μακριά από τις όρια ανοχής.

3.4.2.2. Συσχέτιση $\log V_d$ με συντελεστή κατακράτησης χρωματογραφίας μεμβρανών $\log k_{IAM,DD2}$ και συντελεστή κατανομής $\log D$

Το δεύτερο μοντέλο συσχέτισης που εξετάζεται, εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log V_d = 0.373(\pm 0.063) \cdot \log k_{IAM,DD2} - 0.107(\pm 0.043) \cdot \log D - 0.935(\pm 0.111) \cdot I_{acid} - 0.013(\pm 0.064) \quad (3.23)$$

$$(N = 88, R^2 = 0.600, F = 42.0, s = 0.413)$$

Η μεταβλητή I_{acid} που περιλαμβάνει η εξίσωση συσχέτισης (3.23) αποτελεί ένας δείκτη που παίρνει τιμή 1 εάν το φάρμακο είναι οξύ, και 0 σε κάθε άλλη περίπτωση (βάση, αμφολύτης, ουδέτερο). Τέτοιου είδους μεταβλητές χρησιμοποιούνται όταν μια κατηγορία ενώσεων εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά από τις υπόλοιπες. Έτσι, καθώς στην παραπάνω παράγραφο φάνηκε πως τα οξέα εμφανίζουν αποκλίνουσα συμπεριφορά, έγινε εισαγωγή αυτής της μεταβλητής στο μοντέλο.

Αφού εφαρμοστεί η εξίσωση (3.23) στα δεδομένα ελέγχου, προκύπτουν τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 18. Αποτελέσματα εφαρμογής της εξίσωσης (3.23) στα δεδομένα ελέγχου

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή V_d	Τιμή V_d μοντέλου
1	Ceftriaxone	0,14	1,326
2	Chloramphenicol	0,96	0,956
3	Cimetidine	1,12	1,832
4	Cinoxacin	0,23	0,098
5	Hydrocortisone	0,54	1,467
6	Isoxicam		0,267
7	Levofloxacin	1,38	2,125
8	Lornoxicam	0,20	0,352
9	Meloxicam	10,00	0,367
10	Methylprednisolone	1,26	2,677
11	Metoclopramide	3,30	3,364
12	Minoxidil	2,86	1,342
13	Nadolol	2,00	3,815
14	Nalidixic acid	0,40	0,164
15	Niflumic acid	0,12	0,342
16	Omeprazole	0,33	2,608
17	Pipemidic acid	1,90	1,968
18	Piperacillin	1,35	0,279
19	Salicylic acid	0,15	0,131
20	Sulpiride	2,05	3,237
21	Vancomycin	0,52	1,731
22	Warfarin	0,15	0,275

Ως όριο ανοχής για τις σωστές προβλέψεις επιλέχθηκε και πάλι η ικανοποίηση της σχέσης: $0,50 \cdot V_{d, \text{πειρ}} \leq V_{d, \text{προβλ}} \leq 2,0 \cdot V_{d, \text{πειρ}}$. Με την εφαρμογή του δεύτερου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής, οι σωστές προβλέψεις είναι 10/21 (ποσοστό επιτυχίας 48%). Επομένως, παρατηρείται πως αν και συνοδεύεται από καλύτερα στατιστικά στοιχεία σε σχέση με το πρώτο μοντέλο που εξετάστηκε (η εξίσωση 3.23 εμφανίζει υψηλότερο R^2 από την 3.22), η εφαρμογή του στο test set οδηγεί σε χειρότερα αποτελέσματα, με μικρότερο ποσοστό επιτυχιών προβλέψεων.

3.4.2.3. Χρήση της τεχνικής PLS (Partial Least Square Analysis, Μερικά ελάχιστα τετράγωνα) για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής

Το τρίτο μοντέλο πρόβλεψης του όγκου κατανομής προκύπτει μέσω της τεχνικής των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, η οποία χρησιμοποιήθηκε και σε παραπάνω παράγραφο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Έτσι, με την χρήση του στατιστικού προγράμματος Simca-P 10.5 (Umetrics, USA) και μετά την κανονικοποίηση των δεδομένων, οι μεταβλητές που εισήχθησαν στην ανάλυση είναι: Συντελεστές κατακράτησης (100% υδατική φάση) από στήλη IAM.DD2, μικυλλιακή χρωματογραφία (100% υδατική φάση) παρουσία των ουδέτερων τασενεγών Triton X100, Tween και Brij-35, κατακράτηση από στήλες HSA και AGP παρουσία 0, 5% και 10% ακετονιτριλίου, συντελεστές μερισμού/ κατανομής κ-οκτανόλης/ νερού logP και logD, σταθερές A και B (Abraham), τοπολογική πολική

επιφάνεια TPSA, MW, και κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου F⁺ και F⁻. Δηλαδή, είναι οι ίδιες που εισήχθησαν και στην ανάλυση για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Προκύπτουν τελικά, οι δύο κύριες συνιστώσες του μοντέλου: R²= 0.616, Q²= 0.541

Παρατηρήθηκε, πως από τις μεταβλητές που έχουν εισαχθεί την μεγαλύτερη σημαντικότητα έχουν οι εξής: Κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F⁺ και F⁻, συντελεστές κατακράτησης σε στήλη AGP παρουσία 0-5-10% ακετονιτριλίου, συντελεστής μερισμού logP και οι συντελεστές κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία παρουσία ουδέτερων τασενεργών Tween, Brij και Triton.

Το μοντέλο εφαρμόζεται στα δεδομένα ελέγχου (test set) και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα εφαρμογής μοντέλου όγκου κατανομής μέσω χρήσης τεχνικής μερικών ελαχίστων τετραγώνων

A/A	Ένωση	Πειραματική τιμή V _d	Τιμή V _d μοντέλου
1	Ceftriaxone	0,14	0,545
2	Chloramphenicol	0,96	0,945
3	Cimetidine	1,12	1,322
4	Cinoxacin	0,23	0,308
5	Hydrocortisone	0,54	1,606
6	Isoxicam		0,370
7	Levofloxacin	1,38	0,821
8	Lornoxicam	0,20	0,343
9	Meloxicam	10,00	0,375
10	Methylprednisolone	1,26	1,339
11	Metoclopramide	3,30	3,478
12	Minoxidil	2,86	1,104
13	Nadolol	2,00	2,568
14	Nalidixic acid	0,40	0,417
15	Niflumic acid	0,12	0,385
16	Omeprazole	0,33	1,707
17	Pipemidic acid	1,90	0,816
18	Piperacillin	1,35	0,322
19	Salicylic acid	0,15	0,300
20	Sulpiride	2,05	2,190
21	Vancomycin	0,52	1,057
22	Warfarin	0,15	0,415

Σε αυτή την μελέτη, οι σωστές προβλέψεις είναι 12/21 (ποσοστό επιτυχίας 57%), δηλαδή όσες και στο πρώτο μοντέλο πρόβλεψης του όγκου κατανομής. Διαπιστώνεται τελικά, πως η φαρμακοκινητική ιδιότητα του όγκου κατανομής είναι δύσκολο να προβλεφθεί με κάποιο συγκεκριμένο μοντέλο. Σε αυτό παίζει ρόλο και το γεγονός που η τιμή του όγκου κατανομής για μια φαρμακευτική ένωση που βρίσκεται βιβλιογραφικά είναι πιθανόν να ποικίλει.

4. Συμπεράσματα

Από την μελέτη έκλουσης ενός ικανοποιητικού αριθμού φαρμάκων, επιβεβαιώθηκε πως ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων από την χρωματογραφική στήλη HSA είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, γεγονός που φαίνεται από τις σχέσεις που αναπτύχθηκαν μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης από την στήλη και των μεγεθών λιποφιλίας ($\log P$, $\log D$). Ακόμα, στην κατακράτηση των ενώσεων συμβάλλουν και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αλλά με δευτερεύοντα ρόλο. Αυτό, επίσης επιβεβαιώνεται από την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στις σχέσεις μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης και των δεικτών λιποφιλίας.

Επιπρόσθετα, μέσα από τις εξισώσεις που αναπτύχθηκαν, φανερώθηκε η σημαντικότητα των θετικά φορτισμένων κέντρων της στήλης, τα οποία δρουν απωθώντας τα θετικά φορτισμένα βασικά φάρμακα και έλκοντας τα αρνητικά φορτισμένα όξινα φάρμακα. Δηλαδή, η στήλη HSA δεσμεύει κυρίως όξινα φάρμακα. Παράλληλα, επαληθεύτηκε το γεγονός πως ο ιονισμός εντός της χρωματογραφικής στήλης είναι μικρότερος από τον ιονισμό σε ένα υδατικό διάλυμα. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός πως στην συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k$ με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$, παρουσιάζεται καλύτερη συσχέτιση με τον πρώτο, ο οποίος δεν λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό. Ακόμα, καλύτερη συσχέτιση με τα μεγέθη λιποφιλίας, παρατηρείται ότι παρουσιάζει ο χρωματογραφικός συντελεστής $\log k_{10}^{HSA}$, συγκριτικά με τους $\log k_w^{HSA}$ και $\log k_5^{HSA}$.

Κατά την σύγκριση της χρωματογραφίας HSA με άλλα είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας (IAM.DD2, AGP), προέκυψε συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης, καθώς οι μηχανισμοί έκλουσης από τις δυο στήλες εξαρτώνται δηλαδή σε μεγάλο βαθμό από την λιποφιλία. Παράλληλα, επαληθεύεται ότι οι βάσεις συγκρατούνται περισσότερο από την στήλη IAM, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωσφορικών ομάδων της στήλης μεμβρανών και των πρωτονιωμένων βάσεων.

Από τα μοντέλα πρόβλεψης του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων, διαπιστώνεται πως τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίζει αυτό που βασίζεται στη φαινόμενη σταθερά συγγένειας ($\log K$), με 14/22 σωστές προβλέψεις (ποσοστό επιτυχίας 64%). Από την άλλη, στο μη γραμμικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε, καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν για την περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα προέκυψαν παρουσία 10% ακετονιτριλίου, με 12/20 σωστές προβλέψεις (ποσοστό επιτυχίας 60%), καθώς και μια ένωση που ήταν οριακά εκτός ορίου ανοχής.

Τέλος, κατά την εξαγωγή μοντέλων για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής, παρατηρήθηκε πως στα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα οδηγεί αυτό της συσχέτισης με χρωματογραφικό συντελεστή από στήλη HSA, για 100% υδατική φάση, παρά το ότι δεν συνοδεύεται από ιδιαίτερα καλά στατιστικά μεγέθη.

Κλείνοντας, διαπιστώνεται πως η χρωματογραφία ακινητοποιημένης πρωτεΐνης HSA εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα και είναι δυνατό να αξιοποιηθεί για τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμάκων, παρέχοντας πληροφορίες για την λιποφιλία και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες.

5. Προτάσεις

Από την παρούσα διπλωματική εργασία προκύπτουν προτάσεις για περαιτέρω έρευνα και βελτίωση της βιομηχανικής υδροχρωματογραφίας ακινητοποιημένης λευκωματίνης ορού. Αρχικά, θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύ χρήσιμο να γίνει μελέτη των φαρμακευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και με παρουσία 15% ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, ώστε να υπολογιστούν οι αντίστοιχοι συντελεστές κατακράτησης $\log k$ και να γίνουν οι αντίστοιχες συσχετίσεις με τους δείκτες λιποφιλίας, $\log P$ και $\log D$.

Έπειτα, η μελέτη όσο το δυνατόν περισσότερων φαρμάκων υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, στατικής και κινητής φάσης, θα βοηθούσε ώστε να μια «βιβλιοθήκη» τιμών συντελεστών κατακράτησης, η οποία πιθανώς θα οδηγήσει σε πιο αξιόπιστα μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, αλλά και βελτιωμένες συσχετίσεις μεταξύ χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης και δεικτών λιποφιλίας.

Ακόμα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ισοπροπανόλη αντί για ακετονιτρίλιο στην κινητή φάση, ως οργανικός τροποποιητής. Έτσι, θα γίνει συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης που προκύπτουν για κάθε διαλύτη και θα είναι δυνατό να συγκριθούν οι δύο κύριοι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στο εν λόγω είδος χρωματογραφίας.

Επίσης, εκτός από τη πρωτεϊνική σύνδεση και τον όγκο κατανομής, θα μπορούσε να αναπτυχθεί μοντέλο πρόβλεψης της διαπερατότητας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, που αποτελεί μια ακόμα σημαντική φαρμακοκινητική ιδιότητα. Ένα τέτοιο μοντέλο θα αξιοποιούνταν για την ανάπτυξη φαρμάκων που πρόκειται να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τέλος, ένα άλλο φαρμακοκινητικό μέγεθος που θα μπορούσε να προβλεφθεί, εφόσον έχει σχηματιστεί επαρκής αριθμός δεδομένων, είναι η τοξικότητα (ηπατοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα, νευροτοξικότητα) των φαρμάκων. Ένα μοντέλο πρόβλεψης της τοξικότητας θα ήτα πολύ χρήσιμο εργαλείο στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, καθώς θα βοηθούσε να απορριφθούν υποψήφιες ενώσεις, από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων.

6. Βιβλιογραφία

1. Οδηγία 2001/83/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, Άρθρο 1, παρ. 2, Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών κοινοτήτων. Ανακτήθηκε από: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&rid=1>
2. Sneader, W. (2005). *Drug discovery: a history*. John Wiley & Sons.
3. Δημόπουλος, Β., & Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. (2011). Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων. Αποθετήριο Κάλλιπος.
4. Σκαλτσά, Ε. (2015). Ιστορία της φαρμακευτικής.
5. H.P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, G. Henderson. 'Φαρμακολογία'. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2019)
6. S. Constable, P. Winstanley, T. Walley. 'Ιατρική Φαρμακολογία'. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2011)
7. Pfizer: Διαδικασία ανάπτυξης. Ανακτήθηκε από: <https://www.pfizer.gr/el/%CE%B4%CE%B9%CE%B1%CE%B4%CE%B9%CE%BA%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%B1-%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%80%CF%84%CF%85%CE%BE%CE%B7%CF%83-0>
8. ΜΑΡΣΕΛΟΣ, Μ. Συνοπτική Φαρμακολογία. Τόμος 1ος. Ιατρική Σχολή Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2006 72.
9. Wexler, P., Anderson, B. D., Gad, S. C., Hakkinen, P. B., Kamrin, M., De Peyster, A., ... & Shugart, L. R. (Eds.). (2005). *Encyclopedia of toxicology* (Vol. 1). Academic Press.
10. IU PHAR, Pharmacology Education Project: Clinical pharmacokinetics. Ανακτήθηκε από: <https://www.pharmacologyeducation.org/clinical-pharmacology/clinical-pharmacokinetics>
11. Alagga, A. A., & Gupta, V. (2021). Drug Absorption. *StatPearls [Internet]*.
12. Φαρμακευτική Χημεία και Τεχνολογία, Έγγραφα. Ανακτήθηκε από: http://mycourses.ntua.gr/document/document.php?cmd=exChDir&file=%2F%D6%FE%F4%E7%F2_%D4%F3%FC%F0%E5%EB%E1%F2-%C4%E9%E1%F6%DC%ED%E5%E9%E5%F2
13. Yolonda Smith, B. Pharm (2019). What is Drug Absorption?. *News Medical Life Sciences*. Ανακτήθηκε από: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Drug-Absorption.aspx>
14. Ηλιόπουλος, Η. Βιολογικές Μεμβράνες και Μεμβρανικές Πρωτεΐνες. Μοριακή Αναγνώριση, 1-36 (2001)
15. Sim D.S.M. (2015) Drug Absorption and Bioavailability. In: Chan Y., Ng K., Sim D. (eds) *Pharmacological Basis of Acute Care*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10386-0_3
16. Chagas, C. M., Moss, S., & Alisaraie, L. (2018). Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. *International journal of pharmaceutics*, 549(1-2), 133-149.

17. Jennifer Le, (2020). Drug Distribution to Tissues. *Merck Manual Professional Version*.
18. Yolonda Smith, B. Pharm (2019). Drug Distribution. *News Medical Life Sciences*. Ανακτήθηκε από: <https://www.news-medical.net/health/Drug-Distribution.aspx>
19. IU PHAR, Pharmacology Education Project: Drug Distribution. Ανακτήθηκε από: <https://www.pharmacologyeducation.org/pharmacology/drug-distribution>
20. Ρέκκα Α. Ελένη (2011). Μέρος του μαθήματος 'Ιστορία και αντικείμενα της φαρμακευτικής' . Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Ανακτήθηκε από: https://users.auth.gr/hadjipav/istoria_kai_antikeimena_farmakeytikis-rekka.pdf
21. Στεφάνου, Π. (1999). *Εξωγενής και ενδογενής ρύθμιση του ηπατικού μεταβολισμού ξενοβιοτικών* (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; University of Ioannina).
22. Παππάς, Π. (2015). ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ.
23. Taxak, N., & Bharatam, P. V. (2014). Drug metabolism. *Resonance*, 19(3), 259-282.
24. Cannon, J. G. (2006). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Edited by Laurence Brunton, John Lazo, and Keith Parker. McGraw Hill, New York. 2005.
25. Κόκοτος, Γ. Ι., & Μαγκριώτη, Β. (2015). Φαρμακοχημεία.
26. Guengerich, F. P. (2010). Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 1010210090-1010210090.
27. Dr. Surat P, Ph.D. (2021). Importance of Solubility and Lipophilicity in Drug Development. *Azo Life Sciences*. Ανακτήθηκε από: <https://www.azolifesciences.com/article/Importance-of-Solubility-and-Lipophilicity-in-Drug-Development.aspx>
28. Δημόπουλος Ι. Βασίλης (2013). Επισημάνσεις Χημικής Βιολογίας στη Φαρμακοχημεία. Ανακτήθηκε από: https://users.auth.gr/vdem/OFX_epiloghs_8o_examhno.pdf
29. Arnott, J. A., & Planey, S. L. (2012). The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*, 7(10), 863-875.
30. Τσόπελας, Φ. (2019). Εργαστηριακή άσκηση 5: Φυσικοχημικές ιδιότητες στο σχεδιασμό φαρμάκων- Σχέσεις δομής-δράσης. In Εργαστηριακός οδηγός Φαρμακευτικής Χημείας και Τεχνολογίας.
31. Testa, B., Crivori, P., Reist, M., & Carrupt, P. A. (2000). The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 19(1), 179-211.

32. Μοντέλα QSAR. ECHA, European Chemicals Agency. Ανακτήθηκε από: <https://echa.europa.eu/el/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/qsar-models>
33. Liu, F., Cao, C., & Cheng, B. (2011). A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of aliphatic alcohols by the method of dividing the molecular structure into substructure. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2448-2462.
34. Κεφάλαιο 6: Παλινδρόμηση. *Η επιστήμη των δεδομένων*. Ανακτήθηκε από: <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/ECON1332/Lectures/Lecture%203/06Regression.pdf>
35. Uyanik, G. K., & Güler, N. (2013). A study on multiple linear regression analysis. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 106, 234-240.
36. Brown, S. H. (2009). Multiple linear regression analysis: a matrix approach with MATLAB. *Alabama Journal of Mathematics*, 34, 1-3.
37. Φαρμάκη, Ε. (2012). *Εφαρμογές πολυπαραμετρικών στατιστικών τεχνικών στη χημική ανάλυση* (Doctoral dissertation, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας).
38. Χατζηιωάννου Θ.Π. , Κουππάρη Μ.Α. . *Ενόργανη ανάλυση*. Πανεπιστημίου Αθηνών (1990)
39. Principle of Chromatography. Hitachi High-Tech Global. Ανακτήθηκε από: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course1.html>
40. Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Ά., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., ... & Φούντζουλα, Χ. (2015). Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα.
41. Principles of chromatography. Khan Academy. Ανακτήθηκε από: <https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xfbb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic-compounds/a/principles-of-chromatography>
42. What Is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)?. Waters: The Science of What's Possible. Ανακτήθηκε από: https://www.waters.com/waters/it_IT/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=it_IT
43. Valko, K. L. (2019). Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds. *Future Drug Discovery*, 1(1), FDD11.
44. Valkó, K. L. (2016). Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 35-54.
45. Tsopeles, F. *et al.* Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases. *J. Chromatogr. A* 1396, 25–33 (2015).

46. Tsopeles, F., Vallianatou, T., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2016). Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 11, Issue 5, pp. 473–488). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1160886>
47. Τσόπελας, Φ. (2019). Εργαστηριακή άσκηση 6: Χρήση βιομμητρικής υγροχρωματογραφίας για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. In *Εργαστηριακός οδηγός Φαρμακευτικής Χημείας και Τεχνολογίας*.
48. Tsopeles, F., Malaki, N., Vallianatou, T., Chrysanthakopoulos, M., Vrakas, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2015). Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 1396, 25-33.
49. Taillardat-Bertschinger, A., Carrupt, P. A., Barbato, F., & Testa, B. (2003). Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. *Journal of medicinal chemistry*, 46(5), 655-665.
50. Khaledi, M. G. (1997). Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective. *Journal of Chromatography A*, 780(1-2), 3-40.
51. Επιφανειακή τάση διαλυμάτων. Ανακτήθηκε από:
<http://jupiter.chem.uoa.gr/pchem/courses/405/guide-4.pdf>
52. Rambla-Alegre, M., Ruiz-Angel, M. J., Berthod, A., & Bose, D. Micellar Liquid Chromatography: Recent Advances and Applications.
53. Ke, J., Yun, X., Xiao, D., Liu, F. & Ming, Y. Isocratic micellar liquid chromatography using mixed anionic and non - ionic surfactants as mobile phase additives for separation of 17 free amino acids. *Springer-Chemical Pap.* 73, 2417–2426 (2019).
54. Stepnik, K. E., & Malinowska, I. (2013). The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood-brain barrier penetration of phenols. *Journal of Chromatography A*, 1286, 127–136.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.071>
55. Escuder-Gilabert, L., Martínez-Pla, J. J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., & Medina-Hernández, M. J. (2003). Biopartitioning micellar separation methods: Modelling drug absorption. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 797, Issues 1–2, pp. 21–35). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00606-8)
56. Singh, S. S., & Mehta, J. (2006). Measurement of drug–protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration. *Journal of Chromatography B*, 834(1-2), 108-116.
57. Colombo, S. *et al.* Orosomucoid (α 1-acid glycoprotein) plasma concentration and genetic variants: Effects on human immunodeficiency virus protease inhibitor clearance and cellular accumulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 80, 307–318 (2006).

58. Volpp, M. & Holzgrabe, U. European Journal of Pharmaceutical Sciences
Determination of plasma protein binding for sympathomimetic drugs by. *Eur. J. Pharm. Sci.* 127, 175–184 (2019).
59. Cheng, Y., Ho, E., Subramanyam, B., & Tseng, J. L. (2004). Measurements of drug–protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 809(1), 67-73.
60. Cheng, Y., Ho, E., Subramanyam, B. & Tseng, J. Measurements of drug – protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 809, 67–73 (2004).
61. Cudina, O., Markovic, B., Karljickovic-Rajic, K. & Vladimirov, S. Biopartitioning Micellar Chromatography- Partition Coefficient Micelle / Water as a Potential Descriptor for Hydrophobicity in Prediction of Oral Drug Absorption. *Anal. Lett.* 45, 677–688 (2012).
62. Chrysanthakopoulos Marios, Fotios Tsopelas, Tsantili – Kakoulidou Anna, 2014, Biomimetic Chromatography: A Useful Tool in The Drug Discovery Process, in Advances in Chromatography, Volume 51, ed. Grushka Eli, Grinberg Nelu, p. 91 – 115, CRC Press
63. Hage, D. S. (2002). High-performance affinity chromatography: A powerful tool for studying serum protein binding. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 768, Issue 1, pp. 3–30). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00482-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00482-0)
64. Valkó, K. L. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130, 35–54 (2016).
65. Tsopelas, F., Giaginis, C. & Tsantili-kakoulidou, A. Expert Opinion on Drug Discovery Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 885–896 (2017).
66. Fanali, G., Di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular aspects of medicine*, 33(3), 209-290.
67. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S. & Noda, M. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. Oxford Univ. Press 12, 439–446 (1999).
68. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, 12(6), 439-446.
69. He, X. M., & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358(6383), 209-215.
70. Barbosa, S., Taboada, P., & Mosquera, V. (2014). Fibrillation and polymorphism of human serum albumin. In *Bio-nanoimaging* (pp. 345-362). Academic Press.
71. Κατανομή Φαρμάκων. Τμήμα Φαρμακευτικής, Α.Π.Θ. Ανακτήθηκε από: https://www.pharm.auth.gr/old_pharm/gr/anakoinoseis_mathimatwn/ClinicalPharmacokineticsPowerPoint/Distribution.ppt

72. Valko, K. L. Estimating Unbound Volume of Distribution and Tissue Binding by In Vitro HPLC-Based Human Serum Albumin and Immobilised Artificial Membrane-Binding Measurements. *J. Pharm. Sci.* 100, 849–862 (2011).
73. Vrieze, M. De, Lynen, F., Chen, K., Szucs, R. & Sandra, P. Predicting drug penetration across the blood – brain barrier : comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography. *Springer-Analytical Bioanal. Chem.* 405, 6029–6041 (2013).
74. Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P. & Franks, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat. Am. Inc.* 5, 827–835 (1998).
75. Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α. Σ., & Σαμανίδου, Β. (2015). Βιο-φαρμακευτική Ανάλυση.
76. Barbato, F., Martino, G., Grumetto, L., Immacolata, M. & Rotonda, L. Retention of quinolones on human serum albumin and α_1 -acid glycoprotein HPLC columns : Relationships with different scales of lipophilicity. *Eur. J. Pharmaceutical Sci.* 30, 211–219 (2007).
77. Χρυσανθακόπουλος, Μ. Αξιολόγηση πειραματικών/υπολογιστικών παραμέτρων λιποφιλικότητας σε Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης και εκτίμηση φαρμακοκινητικών διεργασιών στη βάση βιοχρωματικών δεικτών. Εφαρμογή σε όξινα παράγωγα του πυρρολίου, αναστολείς της Αναγωγής της Αλδόζης. (2011).
78. Thermoscientific. EASYpure II Reservoir Feed Water Purification System. Ανακτήθηκε από: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LED/manuals/D01318~.pdf>.
79. Μανώλας, Α. (2017). Συσχέτιση κρίσιμων χαρακτηριστικών ποιότητας φαρμακευτικού δισκίου με περιεκτικότητα σε βασικά έκδοχα και κοκκομετρία δραστικής ουσίας.
80. Γαληνός, Οδηγός φαρμάκων. Ανακτήθηκε από: <https://www.galinos.gr/>.
81. DrugBank. Ανακτήθηκε από: <https://www.drugbank.ca/>.
82. Miller, J. Short report : Reaction time analysis with outlier exclusion : Bias varies with sample size. *Q. J. Exp. Psychol.* 4987, (2007).
83. Tsopeles, F., Vallianatou, T., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2016). The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 82-93.
84. Tsopeles, F., Danias, P., Pappa, A., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2020). Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461027.
85. Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M. H., & Reynolds, D. P. (2003). Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(11), 2236-2248.

86. Chrysanthakopoulos Marios, Giaginis Costas, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2010, Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding, *Journal of Chromatography A*, 1217: 5761-5768