



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Ακαδημαϊκό Έτος 2021-2022

Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

Διπλωματική Εργασία

Ανάπτυξη μεθόδου πρόβλεψης δερματικής απορρόφησης
φαρμάκων

Αγαθοκλέους Χρίστος

Επιβλέπων Καθηγητής

Τσόπελας Φώτιος, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ 2022

Περιεχόμενα

Πρόλογος	4
Περίληψη	5
Abstract.....	6
1. Θεωρητικό μέρος.....	7
1.1. Πορεία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου	7
1.2 Φαρμακοκινητική (ADME).....	9
1.2.1 Απορρόφηση (absorption).....	10
1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα.....	11
1.2.3 Κανόνας των 5 του Lipinski	11
1.2.4 Κατανομή (Distribution).....	12
1.2.5 Μεταβολισμός (Metabolism).....	13
1.2.6 Απέκκριση(Excretion)	13
1.2.7 Τοξικότητα	14
1.3 Φαρμακοδυναμική	15
1.4 Ο ρόλος της λιποφιλίας στο σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων.....	16
1.4.1 Συντελεστής Μερισμού	18
1.4.2 Συντελεστής κατανομής.....	18
1.4.3 Λιποφιλία Αμφολυτών.....	20
1.5 Στατιστικές μέθοδοι.....	21
1.5.1 Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης(Multiple Linear Regression Analysis, MLRA) ...	21
1.5.2 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	22
1.5.3 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)	23
1.6 Εισαγωγή στη χρωματογραφία	24
1.6.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)	25
1.6.2 Βιομημητική χρωματογραφία	28
1.6.2.1 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC).....	29
1.6.2.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography).....	30
1.6.2.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized Protein Chromatography).....	31
1.7 Δερματική Απορρόφηση.....	33
1.7.1 Δέρμα-Γενικά στοιχεία.....	33
1.7.2 Δέρμα-Δομή.....	33
1.7.3 Το δέρμα ως οδός απορρόφησης.....	34

1.7.2 Τοπική χορήγηση φαρμάκων	34
1.7.3 Διαδερμική χορήγηση.....	35
1.7.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τοπικής ή διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων	35
1.7.5 Μηχανισμοί διείσδυσης φαρμάκων μέσω του ανθρώπινου δέρματος	36
1.7.6 Βασικά χαρακτηριστικά φαρμάκου για τοπική-διαδερμική χορήγηση [slide φαρμακευτικής χημείας)	36
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	37
2.1 Σκοπός.....	37
2.2 Αντιδραστήρια	37
2.3 Οργανολογία.....	37
2.4 Πειραματική Διαδικασία.....	39
2.4.1 Παρασκευή κινητής φάσης.....	39
2.4.3 Χρωματογραφική Διαδικασία.....	40
2.4.4 Φάρμακα που μελετήθηκαν	40
2.4.5 Πειραματικά δεδομένα συντελεστών κατακράτησης στις στήλες IAM και HSA	45
3. Βιβλιογραφικά δεδομένα	46
3.1 Φυσικοχημικά δεδομένα	46
3.2 Δεδομένα δερματικής απορρόφησης-συντελεστής διαδερμικής απορρόφησης (logkP)	47
4.Αποτελέσματα-Επεξεργασία	48
4.1 Απλή Γραμμική Παλινδρόμηση.....	48
4.2 Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση	51
5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων-Σχολιασμός.....	52
5.1 Διαγράμματα απλής γραμμικής παλινδρόμησης.....	52
5.2 Μοντέλο πρόβλεψης δερματικής απορρόφησης με πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση	52
6. Συμπεράσματα.....	53
7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	54
8.Βιβλιογραφία.....	55

Πρόλογος

Η διπλωματική μου εργασία με τίτλο “Ανάπτυξη μεθόδου πρόβλεψης δερματικής απορρόφησης φαρμάκων” εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π κατά τη διάρκεια των 2021-2022 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Τσόπελα Φώτιο.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Τσόπελα Φώτιο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα όπως επίσης και για τις απίστευτες γνώσεις που έλαβα κατά την διάρκεια της ερευνητικής και συγγραφικής περιόδου της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Τσακανίκα Λαμπρινή-Αρετή για τις χρήσιμες υποδείξεις της και τη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της όλης πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου που ήταν συνέχεια στο πλάι μου κατά την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια το δέρμα χρησιμοποιείται με επιτυχία ως τοπική και συστηματική οδός απορρόφησης δερματικών προϊόντων, το γεγονός αυτό αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που καλούνται να αντιμετωπίσουν οι φαρμακευτικές βιομηχανίες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζεται η συσχέτιση της δερματικής απορρόφησης συγκεκριμένων φαρμάκων με βιοχρωματογραφικούς δείκτες, συντελεστές λιποφιλίας και φυσικοχημικές ιδιότητες.

Αρχικά γίνεται μια εκτενής περιγραφή του θεωρητικού υπόβαθρου των φαρμάκων, την πορεία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου καθώς και τα στάδια που πρέπει να πραγματοποιηθούν μέχρι να κυκλοφορήσει στην αγορά. Στην συνέχεια γίνεται αναφορά στη γενική διαχείριση του φαρμάκου από τον οργανισμό πεδίο που ασχολείται η φαρμακοκινητική και περιλαμβάνει την απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και τέλος απέκκριση από τον οργανισμό.

Επιπροσθέτως, περιγράφονται κάποιες φυσικοχημικές και μοριακές παράμετροι οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δερματική απορρόφηση ενός φαρμάκου. Ακόμη αναλύονται οι αρχές που διέπουν τη χρωματογραφία καθώς και οι κατηγορίες της βιομιμητικής χρωματογραφίας οι οποίες είναι η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) ,η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (HSA,AGP) και η μικκυλιακή χρωματογραφία . Το θεωρητικό μέρος ολοκληρώνεται εφόσον αναλυθούν οι στατιστικές μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται για την επεξεργασία των δεδομένων.

Η βιβλιογραφική αναζήτηση ξεκινάει με σκοπό τη συλλογή δεδομένων που αφορούν φάρμακα που μπορούν να απορροφώνται διαδερμικά. Μετέπειτα αναζητούνται οι συντελεστές δερματικής διαπερατότητας επιλεγμένων φαρμάκων ($\log k_p$) , οι συντελεστές λιποφιλίας $\log P$ - $\log D$ καθώς και φυσικοχημικές και μοριακές παράμετροι. Ακολουθούν επεξεργασίες των δεδομένων με στατιστικές μεθόδους ανάμεσα τους είναι, η απλή γραμμική παλινδρόμηση και η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση. Τα αποτελέσματα τα οποία εξάγονται δεν υποδεικνύουν κάποια άμεση συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης των στηλών IAM και HSA και δερματικής απορρόφησης οποιουδήποτε φαρμάκου το οποίο μελετήθηκε. Επιπλέον διαφαίνεται κάποια εξάρτηση κυρίως με φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου όπως ο συντελεστής μερισμού ($\log P$), η τοπολογική πολική επιφάνεια(TPSA), το μοριακό βάρος(MW) και η βασικότητα δεσμού υδρογόνου κατά Abraham(B). Τέλος εξήχθηκε ένα μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης που συσχετίζει τη δερματική απορρόφηση με τις παραμέτρους με τις παραμέτρους $\log P$ και B, το οποίο παρείχε αξιόλογες συσχετίσεις.

Λέξεις-Κλειδιά: Δερματική Απορρόφηση, Βιομιμητική Χρωματογραφία, Στήλες Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών, Ανθρώπινη Λευκωματίνη, Συντελεστής μερισμού.

Abstract

In the latest and modern years, the skin has been successfully used as a local and systematic route for absorption of skin products, which is one of the biggest challenges the pharmaceutical industry is currently facing. In this thesis, we examine the correlation of skin absorption of specific drugs with biochromatographic indicators, lipophilicity coefficients and physicochemical properties.

Firstly, there is an extensive description of the theoretical background of the drugs, the discovery process of a new drug as well as the stages that must be carried out until it is released on the market. Afterwards, there is a reference to the general management of the drug by the body which is the field that deals with pharmacokinetics and includes absorption, distribution, metabolism and finally excretion by the body. In addition, some physicochemical and molecular parameters are described which play a very important role in the skin absorption of a drug. The principles governing chromatography are also analyzed as well as the categories of biomimetic chromatography which are immobilized membrane chromatography (IAM), immobilized protein chromatography (HSA, AGP) and micellar chromatography. Furthermore, the theoretical part is completed once the statistical methods applied to the processing of data are analyzed.

The literature search begins with the aim of collecting data concerning drugs that can be absorbed transdermally. Subsequently, the skin permeability coefficients of selected drugs ($\log k_p$), the lipophilicity coefficients $\log P$ - $\log D$ as well as physicochemical and molecular parameters are explored. The data are then processed with statistical methods, among them simple linear regression and multiple linear regression. The results extracted do not indicate any direct correlation between the retention coefficient of the IAM and HSA columns and dermal absorption of any drug studied. Lastly, some dependence is evident mainly with physicochemical properties of the drug such as the partition coefficient ($\log P$), the topological polar surface area (TPSA), the molecular weight (MW) and finally the hydrogen bond basicity according to Abraham (B). All in all, a multiple linear regression model relating skin absorption to $\log P$ and B parameters was derived, which provided significant correlations.

Key- Words: Skin Absorption, Biomimetic Chromatography, Immobilized Artificial Membrane Columns, Human Albumin, Partition Coefficient.

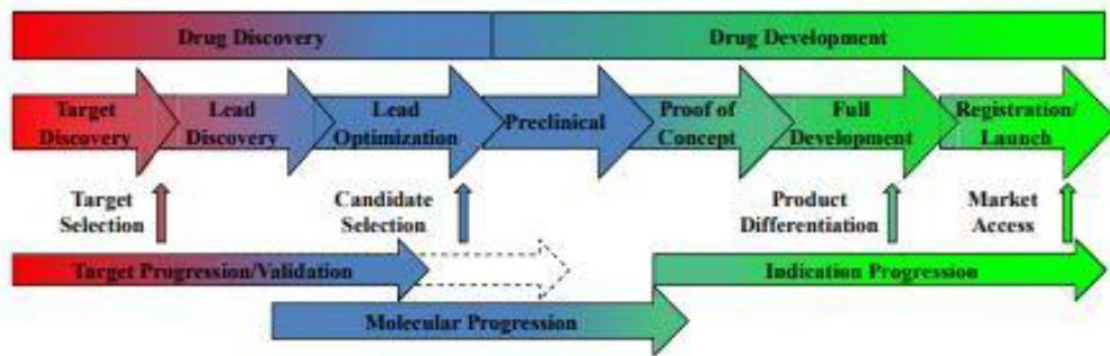
1. Θεωρητικό μέρος

1.1. Πορεία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου

Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών που προσβάλλουν την ζωή ανθρώπου[1]. Γενικά φάρμακο ορίζεται ένα είδος χημικής ουσίας η οποία όταν χορηγείται σε ένα ζωντανό οργανισμό προκαλεί ένα βιολογικό αποτέλεσμα. Ένα φαρμακευτικό σκεύασμα μπορεί να περιέχει μία η και περισσότερες δραστικές φαρμακευτικές ενώσεις και έχει ως στόχο τη θεραπεία του προβλήματος που έχει ο ασθενής. Εκτός από τις δραστικές ενώσεις τα φαρμακευτικά σκευάσματα περιέχουν και άλλες ενώσεις όπως έκδοχα, σταθεροποιητές, διαλύτες κλπ.[2].

Παλιά η διαδικασία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου στηριζόταν στην δομή γνωστών δραστικών ενώσεων (ενδογενείς η φυσικά προϊόντα) που αναγνωρίζονταν και τροποποιούνταν με τη μέθοδο δοκιμής και σφάλματος. Σήμερα η ανακάλυψη και η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου σκευάσματος αποτελεί μια περίπλοκη ακριβή και ταυτόχρονα χρονοβόρα διαδικασία. Ωστόσο αυτή η διαδικασία κρίνεται απαραίτητη για την αντιμετώπιση μια νέας ασθένειας η για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας ενός υπάρχοντος φαρμακευτικού σκευάσματος[3]. Συγκεκριμένα η ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου βασίζεται στην εξέλιξη της βιοχημείας και της γενετικής ενώ έχει επιτευχθεί η κατασκευή βιβλιοθηκών ενώσεων καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων ταχείας διαλογής υψηλής απόδοσης (HTS, High Throughput Screening) και εικονικής διαλογής (VS, Virtual Screening)[1 3] . Η εύρεση ενός νέου φαρμάκου γίνεται ολοένα και πιο δύσκολη λόγω των αυστηρών κανονισμών και προδιαγραφών που απαιτούνται με αποτέλεσμα να αυξάνεται τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος της διαδικασίας σχεδιασμού ενός νέου φαρμάκου[1 4 5]. Απαραίτητη προϋπόθεση που πρέπει να πληροί ένα φάρμακο είναι να είναι ασφαλές, αποτελεσματικό και συγχρόνως εύληπτο και φθηνό[1].

Η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός ενός νέου φαρμάκου αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που αν όμως χωριστεί σε επιμέρους στάδια μπορεί να καταστεί διαχειρίσιμη. Η διαδικασία χωρίζεται σε δύο μεγάλα στάδια, την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου και την ανάπτυξη του φαρμάκου αυτού. Το πρώτο στάδιο χωρίζεται στην ανακάλυψη του βιολογικού στόχους (target discovery), την ανακάλυψη μιας ένωσης-οδηγού (lead discovery) και την βελτιστοποίηση της ένωσης-οδηγού (lead optimization). Το στάδιο της ανάπτυξης του φαρμάκου περιλαμβάνει τον προ-κλινικό έλεγχο, τις τρεις κλινικές φάσεις και τέλος της κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά. Στην πιο κάτω εικόνα φαίνεται η πορεία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου [6]

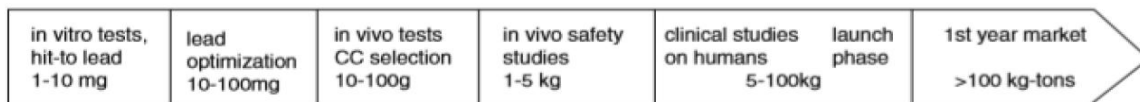


Εικόνα 1: Στάδια ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός νέου φαρμακευτικού προϊόντος[6]

Γενικά το πρώτο βήμα αποτελεί η ταυτοποίηση της ασθένειας και η ανακάλυψη του μορίου-στόχου στο οποίο θα δράσει η φαρμακευτική ένωση (target discovery). Ο βιολογικός στόχος μπορεί να είναι ένα ένζυμο ή ένας υποδοχέας όπως υποδοχείς ορμονών, κινάσες και κανάλια ιόντων. Στην συνέχεια γίνεται η εύρεση μια ένωσης-οδηγού η οποία θα αλληλεπιδρά με το μόριο-στόχο για επιθυμητή βιολογική δραστηριότητα για αυτό προσδιορίζονται σύνολα δομικά σχετικών ενώσεων από ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων (lead discovery). Ακολουθεί η φάση της βελτιστοποίησης ένωσης οδηγού (lead optimization). Σε αυτό το σημείο οι ενώσεις-οδηγοί υφίστανται κάποιες μετατροπές ούτως ώστε να προσδιορισθεί το μέρος του μορίου που είναι αναγκαίο για την επιθυμητή βιολογική δράση. Στο στάδιο αυτό φαίνεται αν οι ενώσεις που επιλέχθηκαν παρουσιάζουν ανεπιθύμητες ενδείξεις διαλυτότητας, διαπερατότητας, πρωτεϊνικής σύνθεσης κτλ. Η διάρκεια μια τυπικής βελτιστοποίησης μπορεί να φτάσει τα 2 χρόνια και περιλαμβάνει in vitro δοκιμές[3]

Έρευνες δείχνουν ότι από τα 5000-10000 υποψήφια φάρμακα που βρίσκονται στη προκλινική φάση μόνο το ένα είναι επιτυχές και τελικά εγκρίνεται. Πιο συγκεκριμένα οι κλινικές δοκιμές περιλαμβάνουν τρεις φάσεις. Στην Φάση I πραγματοποιείται έλεγχος της ασφάλειας και της δοσολογίας σε μικρό αριθμό υγιών εθελοντών (20-100). Στη Φάση II ελέγχεται η αποτελεσματικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών εθελοντών(500), ενώ στη Φάση III ελέγχεται πάλι η αποτελεσματικότητα και οι μακροχρόνιες ανεπιθύμητες επιπτώσεις που μπορεί να έχει στον ανθρώπινο οργανισμό σε ένα πιο μεγάλο εύρος ασθενών εθελοντών (5000)[1]. Τέλος το φάρμακα που εγκρίνεται και θα κυκλοφορήσει βρίσκεται σε φάση φαρμακοεπαγρύπνησης, η φάση αυτή καλείται και ως Φάση IV όπου ελέγχεται σε ακόμα πιο μεγάλο εύρος ασθενών η εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών[6 α][7]. Γενικά μόνο το 10% των φαρμάκων καταφέρνει να περάσει τις κλινικές δοκιμές και να βγει στην αγορά.[8].

Στην εικόνα 2 παρουσιάζονται οι εκθετικές απαιτήσεις μια ουσίας για χρονικό διάστημα 10 ετών. Αρχικά η ποσότητας της ουσίας είναι σε mg, στο διάστημα όμως ανάμεσα στην επιλογή της ένωσης-οδηγού και της κλινικά υποψήφιας ουσίας πραγματοποιείται κλιμάκωση σε kg[4].



Εικόνα 2: Αναγκαίες ποσότητες δραστικής ουσίας κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης[4]

Είναι ευρέως γνωστό ότι η αποτελεσματικότητα ενός νέου υποψήφιου φαρμάκου καθορίζεται από δύο σημαντικές συνιστώσες την φαρμοκοδυναμική και την φαρμακοκινητική. Η φαρμακοδυναμική εστιάζει στον τρόπο που επηρεάζει το φάρμακο τον ανθρώπινο οργανισμό, συγκεκριμένα τη σύνδεση των φαρμάκων με τον κατάλληλο υποδοχέα και εκδήλωση της φαρμακολογικής και θεραπευτικής του δράσης. Από την άλλη πλευρά η φαρμακοκινητική αναφέρεται στον τρόπο που επηρεάζει ο ανθρώπινος οργανισμός το φάρμακο, αναλύει δηλαδή την πορεία του φαρμάκου από την είσοδο μέχρι και την έξοδο του από το ανθρώπινο σώμα(απορρόφηση,κατανομή,μεταβολισμός, απέκκριση).[9]

Το γεγονός ότι ένας πάρα πολύ μικρός αριθμός υποψήφιων ενώσεων καταφέρνει να εγκριθεί και να κατανεμηθεί στην αγορά έγκειται στην εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών στον άνθρωπο, την εμφάνιση τοξικότητας σε ζώα, είτε λόγω εμπορικών και φαρμακοκινητικών περιπτώσεων[1 9]. Παράλληλα από οικονομικής πλευράς το κόστος ανάπτυξης είναι εξαιρετικά αυξημένο. Μελέτες δείχνουν ότι το κόστος ανάπτυξης κυμαίνεται από 161 εκατομμύρια έως και 1,8 δισεκατομμύρια δολάρια[10]. Η ιδέα του “fail fast, fail cheap” αποκτά ιδιαίτερη σημασία και υποδηλώνει πως μια υποψήφια ένωση πρέπει να απορρίπτεται στα αρχικά στάδια πριν τις κλινικές δοκιμές για εξοικονόμηση χρημάτων[1].

Για την μείωση των πιο πάνω αποτελεσμάτων είναι αναγκαία η εύρεση πολυπαραμετρικών προσεγγίσεων βελτιστοποίησης (Multi-Parameter Optimization). Η προσεγγίσεις αυτές επιτυγχάνονται μέσω ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης(Quantitative Structure Activity Relationship,QSAR), αναφέρεται στην αλληλεπίδραση της βιολογικής δράσης με τη δομή, ατλώντας όσο το δυνατό περισσότερες πληροφορίες με λιγότερα πειράματα. Η παραπάνω σχέσεις ασχολούνται με πληθώρα βιολογικών και χημικών δεδομένων κάνοντας εκτίμηση τόσο φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων όσο και παραμέτρων που ασχολούνται με την ασφάλεια και την τοξικότητα. Γενικά αυτές οι μέθοδοι έχουν προταθεί στο τομέα σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ενώσεων και έχουν αποκτήσει μεγάλη αποδοχή. Κυριότερο ρόλο κατέχουν οι φυσικοχημικές και οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες, καθώς οι εκτίμηση τους στα αρχικά στάδια αυξάνει σημαντικά τις πιθανότητες ενός υποψήφιου φαρμάκου να βγει στην αγορά[5].

1.2 Φαρμακοκινητική (ADME)

Αρχικά για την εμφάνιση κάποιας συστηματικής φαρμακολογικής δράσης πρέπει να πραγματοποιηθεί διάλυση και απορρόφηση των δραστικών συστατικών ενός φαρμακευτικού σκευάσματος. Το γεγονός αυτό προαπαιτεί την παραμονή του φαρμάκου για ένα χρονικό διάστημα στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι πρωτεύοντες φαρμακολογικοί

στόχοι ανήκουν σε τέσσερα βασικά είδη ρυθμιστικών πρωτεϊνών: υποδοχείς, ένζυμα, μεταφορικά μόρια(μεταφορείς) και τέλος κανάλια ιόντων.

Μπορεί να υπάρχουν πολλοί τρόποι χορήγησης ενός φαρμάκου(λήψη από το στόμα, από το ορθό, διαδερμικά), η τελική είσοδος του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος δεν αποτελεί απλή διαδικασία, καθορίζεται από την διάβαση ποικίλων φραγμών, με τη μορφή κυρίως βιολογικών μεμβρανών. Η πιο πάνω διατύπωση ισχύει τόσο για ενεργητική όσο και για παθητική απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό[11 12]. Η γενική διαχείριση του φαρμάκου από τον οργανισμό αφορά το πεδίο που ασχολείται η φαρμακοκινητική και χωρίζεται σε τέσσερα στάδια:

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

Η παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται συνοπτικά με το ακρωνύμιο ADME, από τα αρχικά των αντίστοιχων όρων, η κατανομή τους για μια ένωση αποτελεί την βάση στον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων[13].

Συγκεκριμένα η φαρμακοκινητική ορίζεται ως η μεταβολή της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου σε μία ή περισσότερες περιοχές του σώματος ("τι κάνει ο οργανισμός στο φάρμακο"), περιλαμβάνει:

- Τον ρυθμό και το ποσοστό στον οποίο τα φάρμακα απορροφώνται και κατανέμονται στο στους ιστούς του σώματος
- Τον ρυθμό και τους οδούς με τις οποίες τα φάρμακα αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω μεταβολισμού και απέκκρισης
- Η σχέση μεταξύ χρόνου και συγκέντρωσης φαρμάκου στο πλάσμα[14]

1.2.1 Απορρόφηση (absorption)

Απορρόφηση ορίζεται η μεταφορά του μη μεταβολισμένου φαρμάκου από τη θέση χορήγησης του στη κυκλοφορία του αίματος[15]. Η ταχύτητα και η αποδοτικότητα της απορρόφησης εξαρτώνται από την οδό χορήγησης[16]. Οι κυριότερες οδοί χορήγησης είναι οι εξής:

- Από του στόματος
- Υπογλώσσια
- Από το ορθό
- Επιδερμικά
- Εισπνοή
- Ένεση (υποδόρια, ενδομυϊκή, ενδοφλέβια, ενδοθηκική, ενδοϋλώδης)

Η πλειοψηφία των φαρμάκων χορηγούνται από του στόματος με κατάποση, καθώς είναι ο πλέον αποδεκτός από τους ασθενής τρόπος λήψης φαρμακευτικών ουσιών. Παράλληλα είναι και ο πιο περίπλοκος. Αρχικά το φάρμακο λαμβάνεται από το στόμα, διαλυτοποιείται

από την φαρμακοτεχνική του μορφή και μετακινείται μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, ξενικά από τον οισοφάγο, στο ισχυρά όξινο στομάχι, στο λεπτό έντερο και στο ήπαρ, φτάνοντας τελικά στην κυκλοφορία του αίματος. Η ποσότητα του φαρμάκου που δεν διαλυτοποιείται δεν απορροφάται. Ακόμη παρατηρείται το φαινόμενο πρώτης δόδου, δηλαδή ο μεταβολισμός του φαρμάκου κατά τη διέλευση από το εντερικό τοίχωμα και το ήπαρ πριν την απορρόφηση του[16]. Το φάρμακο πρέπει να διαπεράσει τις ημιπερατές λιπιδικές κυτταρικές μεμβράνες προκειμένου να απορροφηθεί. Ο ρόλος της λιπιδικής μεμβράνης είναι να ελέγχει τη διέλευση φυσικών και ξένων ουσιών[17]. Έτσι, ένας παραγόντας που επηρεάζει το ρυθμό και τον βαθμό απορρόφησης είναι η λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου η οποία εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος και τη δομή του φαρμάκου. Μακρομόρια με μεγάλο μοριακό βάρος όπως π.χ πρωτεΐνες και τα πολύ πολικά μόρια δεν διαπερνούν με ευκολία τις κυτταρικές μεμβράνες. Η εσωτερική δομή των μεμβρανών αποτελείται από αλυσίδες υδρογονανθράκων και λιπιδίων, τα άκρα των οποίων είναι μη πολικά αδιαπέραστα από ισχυρά πολικά μόρια[18]. Τέλος οι ασθενείς βάσεις απορροφούνται καλύτερα στο λεπτό έντερο, ενώ τα ασθενή οξέα από το στομάχι, αυτό οφείλετε στο γεγονός ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας εμφανίζει διαβάθμιση pH.

1.2.2 Βιοδιαθεσιμότητα

Ο όρος βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο ποσοστό της δόσης του φαρμάκου που καταφέρνει τελικά να φθάσει αναλλοίωτο στη συστηματική κυκλοφορία μετά από τη χορήγηση του από το στόμα. Η ενδοφλέβια χορήγηση ενός φαρμάκου επιτυγχάνει το 100% της δόσης του να φθάσει στη συστηματική κυκλοφορία και η βιοδιαθεσιμότητα ισούται με 1,0. Η βιοδιαθεσιμότητα δεν είναι ένα απόλυτο χαρακτηριστικό κάθε φαρμάκου καθώς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως οι διαφοροποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας του εντερικού τοιχώματος ή του ήπατος, του γαστρικού pH και της κινητικότητας του γαστρεντερικού. Αποτελεί εν μέρει ένα μέτρο ποσοτικού προσδιορισμού της ικανότητας απορρόφησης κάθε φαρμάκου[19].

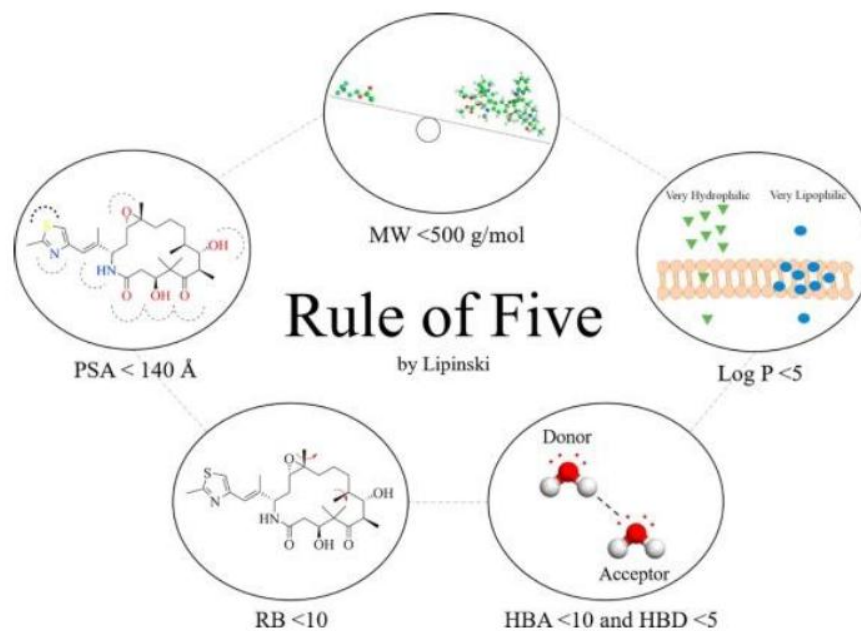
1.2.3 Κανόνας των 5 του Lipinski

Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης ενός φαρμάκου είναι από το στόμα. Ο κανόνας των 5 του Lipinski είναι ένας μνημονικός κανόνας ο οποίος αναφέρεται στα ευνοϊκά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένα φαρμακευτικό σκεύασμα για την καλύτερη απορρόφηση του από το στόμα.

Συγκεκριμένα θα πρέπει να :

- Έχει μοριακό βάρος (MB) μικρότερο από 500.
- Έχει λιγότερους από 5 δότες δεσμών υδρογόνου (HBD).
- Έχει λιγότερους από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA).
- Έχει συντελεστή μερισμού $\log P$ στο σύστημα οκτανόλης-νερού μικρότερο από 5 (δηλαδή υψηλή λιποφιλία).

Αν μια ένωση διαθέτει τα πιο πάνω χαρακτηριστικά τόσο πιο υψηλή απορρόφηση, διαλυτότητα, και γενικά βιοδιαθεσιμότητα θα παρουσιάζει. Ο κανόνας του Lipinski χρησιμοποιείται για την αποφυγή δαπανηρών προκλινικών και κλινικών μελετών οι οποίες δεν θα ευοδωθούν[20].



Εικόνα 3: Απεικόνιση του μνημονικού κανόνα των 5 του Lipinski [20]

1.2.4 Κατανομή (Distribution)

Μετά την απορρόφηση του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος ακολουθεί η κατανομή του στους ιστούς του σώματος και ειδικότερα σε αυτούς που πρόκειται να παρουσιάσει τη δράση του. Ανάμεσα στα υδατικά διαμερίσματα του σώματος (διαμέρισμα πλάσματος, εξωκυττάριο υγρό, συνολικό ύδωρ), υπάρχει άνιση κατανομή λόγω του διαφορετικού ρυθμού αιμάτωσης, στο pH αλλά και στη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Προφανώς ο ρυθμός εισόδου ενός φαρμάκου σε ένα ιστό εξαρτάται αλληλένδετα με το ρυθμό αιμάτωσης του ιστού, τη μάζα του ιστού, και τη λιποφιλία του φαρμάκου[21].

Η σύνδεση του φαρμάκου και τις πρωτείνες του πλάσματος είναι αντιστρεπτή και τα κλάσματα δεσμευμένου και ελεύθερου φαρμάκου βρίσκονται σε ισορροπία. Το ελεύθερο φάρμακο έχει την ιδιότητα να διαχέεται διαμέσου των ιστών και να φθάνει στα σημεία δράσης του. Γενικά τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται κυρίως από την λευκωματίνη (αλβουμίνη του ορού), ενώ τα βασικά φάρμακα κυρίως από την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη.[5 22 17].

Ο όγκος κατανομής αποτελεί ένα χρήσιμο μέγεθος για την περιγραφεί της κατανομής ενός φαρμάκου στον οργανισμό, 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 συγκέντρωση του στο πλάσμα. Αν ο όγκος κατανομής είναι μεγάλος τότε το φάρμακο εμφανίζει ισχυρή σύνδεση στους ιστούς, ενώ αν η τιμή του τείνει στον όγκο του

πλάσματος, συμβαίνει το αντίθετο. Ο όγκος κατανομής χρησιμοποιεί ως παραδοχή ότι τα φάρμακα κατανέμονται ομοιόμορφα σε ένα μόνο διαμέρισμα, το γεγονός αυτό δεν ισχύει αλλά χρησιμοποιείται κυρίως για τον υπολογισμό της απαιτούμενης δόσης που πρέπει να χορηγηθεί για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου στο αίμα.[16 24]

Στην κατανομή ενός φαρμάκου εμπλέκεται και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός ο οποίος διατηρεί την ομοιόσταση του εγκεφάλου και επιτρέπει την εκλεκτική μεταφορά μόνο εκείνων των μορίων που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του εγκεφάλου. Ιονισμένα, πολικά ή πολύ μεγάλα μόρια δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

1.2.5 Μεταβολισμός (Metabolism)

Τα φάρμακα ανήκουν στην κατηγορία των ξενοβιοτικών, δηλαδή είναι χημικές ενώσεις που δεν παράγονται αυθόρμητα από τον οργανισμό και δεν αναμένεται να βρίσκονται σε αυτόν[25]. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα με σκοπό να μεταβολίσει αυτές τις ενώσεις σε μεταβολίτες (παράγωγα πιο υδατοδιαλυτά από τις αρχικές ενώσεις), έτσι ώστε να διευκολύνεται η αποβολή τους όταν απαιτείται από τον οργανισμό. Η διαδικασία του μεταβολισμού πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ, ενώ άλλες θέσεις που μπορεί επίσης να αδρανοποιηθεί ένα ξενοβιοτικό είναι το πλάσμα, ο εντερικός βλεννογόνο, οι νεφροί, οι πνεύμονες ή και το δέρμα. Οι αντιδράσεις μεταβολισμού μπορούν να μεταβολίσουν ένα φάρμακο με τους εξής 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

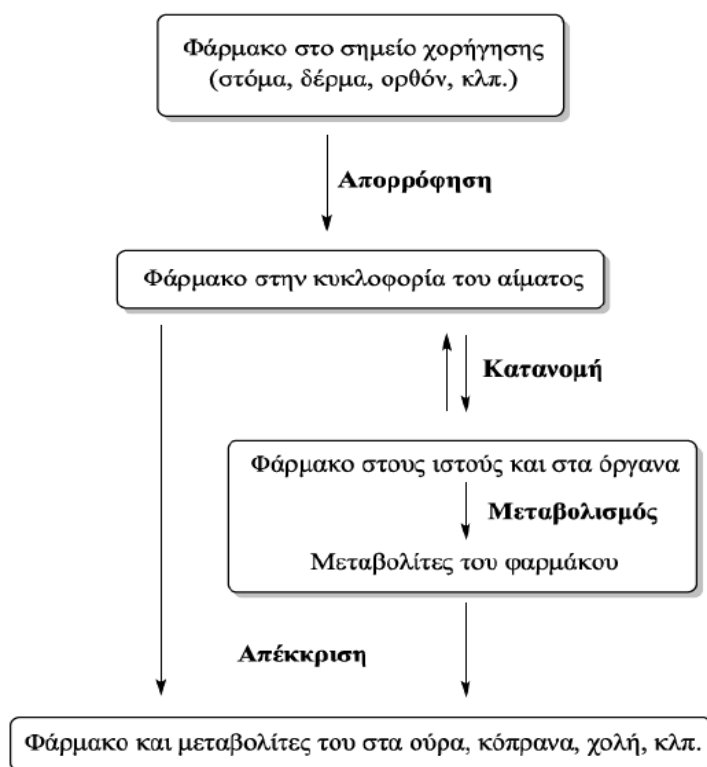
Η χημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια του μεταβολισμού χωρίζονται σε δύο φάσεις σε αντιδράσεις φάσης I και φάσης II. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη σειρά που πραγματοποιούνται οι δύο φάσεις καθώς μπορούν να πραγματοποιηθούν και ταυτόχρονα. Οι αντιδράσεις της φάσης I είναι κυρίως αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, και υδρόλυσης. Από την άλλη πλευρά οι διαδικασίες της φάσης II περιλαμβάνουν την πρόσδεση στο φάρμακο μιας ενδογενούς ουσίας, όπως γλυκουρονιδικές, θειικές ομάδες ή ένα αμινοξύ. Το προϊόν που προκύπτει είναι πολικό, υδατοδιαλυτό και φαρμακολογικά αδρανές[26 27 28].

1.2.6 Απέκκριση(Excretion)

Τελευταίο στάδιο αποτελεί η απέκκριση του φαρμάκου από τον οργανισμό. Συνήθως τα φάρμακα απεκκρίνονται είτε αμετάβλητα (χωρίς μεταβολισμό), είτε μετά από μετατροπή του σε μεταβολίτες. Οι κυριότεροι οδοί απέκκρισης είναι μέσω των νεφρών και των ούρων ενώ άλλα φάρμακα αποβάλλονται από τον οργανισμό μέσω των πνευμόνων, τον ιδρώτα, τους μαστούς και το σάλιο.

Γενικά οι πολικές ενώσεις αποβάλλονται πιο εύκολα από τις λιποδιαλυτές οι οποίες πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε υδρόφιλες για να απομακρυνθούν. Η απέκκριση από τους πνεύμονες πραγματοποιείται κυρίως από πτητικές ουσίες και αέριους μεταβολίτες τοξικών

ουσιών, ενώ η απεκκριτική οδός μέσω του μητρικού γάλακτος χρήζει ιδιαίτερη προσοχή γιατί είναι πιθανό να εμφανιστεί φαρμακολογική δράση στο βρέφος.[26 29].



Εικόνα 4: Η φαρμακοκινητική φάση των φαρμάκων[30]

1.2.7 Τοξικότητα

Μια ακόμη ευρέως διαδομένη φαρμακοκινητική παράμετρος αποτελεί η τοξικότητα του φαρμάκου. Η ασφάλεια χορήγησης ενός φαρμάκου σε ένα ασθενή εξαρτάται άμεσα από την ένταση των ανεπιθύμητων ενεργειών η παρενεργειών που αυτό παρουσιάζει. Το ποσοστό τοξικότητας ενός φαρμακευτικού σκευάσματος είναι υπεύθυνο για το μεγάλο αριθμό απόρριψης υποψήφιων φαρμάκων. Έτσι η εφαρμογή βιοδεικτών και σύντομων δοκιμών για την ανίχνευση πιθανής τοξικότητας στα φάρμακα είναι ένας σημαντικός στόχος.

Τοξικότητα εμφανίζεται είτε λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με το μόριο-στόχο, όσο και με διαφορετικό μόριο, αλλά και με πρωτεΐνες που σχετίζονται και ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το μόριο-στόχο. Επίσης, εκτός από την ίδια την φαρμακευτική ουσία τοξικότητα μπορεί να εμφανιστεί και από τους μεταβολίτες που παράγονται από αυτήν[31].

1.3 Φαρμακοδυναμική

Γενικά η φαρμακοδυναμική επικεντρώνεται στο «τι κάνει το φάρμακο στον οργανισμό», περιλαμβάνει τις φυσιολογικές και βιοχημικές επιδράσεις των φαρμάκων σε ολόκληρο τον οργανισμό[32]. Συγκεκριμένα σχετίζεται με την σχέση μεταξύ της δόσης/συγκέντρωσης ενός φαρμάκου και της φαρμακολογικής-κλινικής-τοξικής απάντησης που αυτό παρουσιάζει. Τα πλείστα φάρμακα ασκούν την δράση τους αλληλοεπιδρώντας με μακρομόρια που συνήθως βρίσκονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίοι μπορεί να είναι υποδοχείς, ένζυμα ή δομικές πρωτεΐνες.

Στην περίπτωση που ένα φάρμακο αλληλεπιδρά με ένα υποδοχέα, σχηματίζεται το σύμπλοκο φαρμάκου-υποδοχέα, το οποίο είναι υπεύθυνο για το φαρμακολογικό αποτέλεσμα, προκαλώντας άνοιγμα ή κλείσιμο ενός καναλιού ιόντων, ενεργοποίηση δευτερογενούς σήματος καθώς και αναστολή ή ενεργοποίηση κυτταρικής λειτουργίας.

Καθοριστικής σημασίας έννοιες στην φαρμακοδυναμική αποτελούν οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές. Οι αγωνιστές αποτελούν ενώσεις που προσδένονται στους υποδοχείς και του διεγείρουν, ενώ οι ανταγωνιστές δεσμεύουν τους υποδοχείς χωρίς όμως να τους διεγείρουν. Οι ανταγωνιστές διακρίνονται σε δύο κατηγορίες τους συναγωνιστές και τους μη συναγωνιστές. 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. Σε αυτή την περίπτωση το αποτέλεσμα δεν μπορεί να ανατραπεί πλήρως όσο και αν αυξηθεί η συγκέντρωση του αγωνιστή.

Συμπερασματικά η επίδραση ενός φαρμάκου εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την συγκέντρωση του στην περιοχή του υποδοχέα. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι η παρατεταμένη αύξηση της δόσης ενός φαρμάκου με απώτερο σκοπό την επίτευξη ενός θεραπευτικού αποτελέσματος μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση ανεπιθύμητων ή τοξικών επιδράσεων.

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[32 16].

1.4 Ο ρόλος της λιποφιλίας στο σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων

Μια από τις σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική δράση ενός φαρμακευτικού σκευάσματος είναι η λιποφιλία η οποία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου η ενός τμήματος του σε ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Η λιποφιλία αποτελεί σημαντική ιδιότητα γιατί συνδέεται αλληλένδετα με άλλες ιδιότητες των φαρμάκων όπως π.χ τη βιοδιαθεσιμότητα, τη διαλυτότητα, τη διαπερατότητα μέσω μεμβρανών και την υδρόφοβη σύνδεση του φαρμάκου με διάφορα μακρομόρια (π.χ με υποδοχείς-στόχους, πρωτεΐνες του πλάσματος, μεταφορείς, ένζυμα του μεταβολισμού) με αποτέλεσμα να επηρεάζει τόσο τη φαρμακοκινητική όσο και το φαρμακοδυναμικό και το τοξικολογικό προφίλ των φαρμακευτικών ενώσεων.[1 5 8 33]

Η δημοσίευση των εργασιών Meyer και Overton στις αρχές του 20^{ου} αιώνα προβάλλει τη σημασία της διαλυτότητας των φαρμακευτικών ενώσεων στις λιπιδικές μεμβράνες που συνδέεται με τη βιολογική δραστηριότητα. Ωστόσο η πραγματική αξία της λιποφιλίας φάνηκε μέσα από το έργο των Hansch, Fujita και Leo, οι οποίοι κατάφεραν να συσχετίσουν αυτή την ιδιότητα τόσο με την δυνατότητα ενός φαρμάκου να φτάσει στη μέγιστη φαρμακολογική του δράση μέσα στον οργανισμό μέσω μιας “τυχαίας διαδρομής” όσο και με την υδροφοβική σύνδεση του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος.[5]

Ιδιαίτερα στη κλινική χημεία η λιποφιλία αποτελεί μια σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμακευτικών ενώσεων. Χαμηλές τιμές λιποφιλίας συνεπάγεται και χαμηλές ADMET ιδιότητες, ενώ υψηλές τιμές λιποφιλίας προκαλεί χαμηλή διαλυτότητα και φτωχή απορρόφηση[7^α][8]. Επίσης οι υψηλές τιμές λιποφιλίας δεν ευνοούν τη βιοδιαθεσιμότητα, ενώ σχετίζονται με την παρατεταμένη παραμονή του φαρμάκου στον οργανισμό, αποθήκευση στα ουδέτερα λίπη και ως εκ τούτου με αθροιστικά φαινόμενα και τοξικότητα. Ακόμη αυξημένη λιποφιλία οδηγεί σε επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων με τον οργανισμό να “οργανώνεται” με στόχο τη βιομετατροπή του λιποφορου “εισβολέα” σε περισσότερο υδρόφιλο μόριο και την τελική απέκκριση του. Επιπλέον κατά την ανάπτυξη ενός λιπόφιλου φαρμάκου μπορούν να δημιουργηθούν προβλήματα μορφοποίησης, ενώ οι πολύ λιπόφιλες ενώσεις τείνουν να δεσμεύονται σε υδρόφοβους στόχους που μπορεί να είναι διαφορετική από τους επιθυμητούς στόχους με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος ασυμβατότητας. Ένα τρανταχτό παράδειγμα παρατεταμένης παραμονής που οδηγεί στην αλληλεπίδραση με στόχους διαφορετικούς από τους επιθυμητούς αλλά και στην εμφάνιση τοξικότητας λόγω υψηλών τιμών λιποφιλίας είναι η παρατεταμένη σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, όπου παρεμποδίζεται η κυκλοφορία των φαρμάκων στο αίμα και κατά συνέπεια στον υπόλοιπο οργανισμό.[5 33]

Για την αποφυγή λοιπών των πιο πάνω ανεπιθύμητων φαινομένων που μπορεί να προκαλέσει η υψηλή λιποφιλία διατυπώθηκε η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας από τον Hansch το 1987, σύμφωνα με την οποία ο σχεδιασμός των φαρμάκων θα πρέπει να στοχεύει σε ενώσεις με επιθυμητή φαρμακολογική δράση που θα έχουν όμως την ελάχιστη λιποφιλία. Πιο πάνω αναφέρθηκαν κάποιοι κανόνες του Lipinski γνωστοί και ως κανόνες των πέντε του Lipinski. Αν μια ένωση ακολουθεί αυτούς του κανόνες θα είναι αρκετά

δραστική όταν χορηγείται από το στόμα.[1 3] Η λιποφιλία μπορεί να αξιοποιηθεί ως οδηγός για την βελτιστοποίηση της επιλογής της ένωσης-οδηγού.[34]

Η λιποφιλία αποτελεί το καθαρό αποτέλεσμα όλων των ενδομοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ μίας διαλυμένης ουσίας και των δύο φάσεων μεταξύ των οποίων κατανέμεται. Έχει αποδειχθεί πως η λιποφιλία αποτελεί μία σύνθετη ιδιότητα με διπλό χαρακτήρα. Η διπλή φύση της λιποφιλίας εκφράζεται μέσα από την παρακάτω σχέση:[1 35]

Λιποφιλία=Υδροφοβία-Πολικότητα[1.1]

Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω σχέση φαίνεται πως η λιποφιλία δεν αποτελεί ταυτόσημη έννοια με την υδροφοβία. Αντιθέτως η υδροφοβία αποτελεί μία από τις συνιστώσες της λιποφιλίας και ουσιαστικά περιγράφει την ένωση των μη πολικών ομάδων ή μορίων σε ένα υδατικό περιβάλλον ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας άπωσης του από το νερό έτσι ώστε να καταλαμβάνουν τη μικρότερη δυνατή επιφάνεια[36]. Η υδροφοβία μπορεί να προσδιορισθεί με κάποιες παραμέτρους που συνδέονται με το μέγεθος της ένωσης π.χ μοριακός όγκος, μοριακό βάρος, ενώ η πολικότητα εκφράζεται κυρίως μέσω της παραμέτρου της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.[1 5]

Μια άλλη παράμετρος που μπορεί να επηρεάζει αποτελεσματικά τη λιποφιλία είναι η διαμόρφωση των μορίων, οπότε οι παραπάνω εξίσωση τροποποιείται ως εξής:

Λιποφιλία=Υδροφοβία-Πολικότητα±Διαμόρφωση[1.2]

Λαμβάνοντας υπόψη το αμφίφιλο περιβάλλον των βιολογικών μεμβρανών στον ορισμό της λιποφιλίας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις (είτε είναι ελκτικές είτε είναι απωστικές). Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις αλληλεπιδράσεις η λιποφιλία μπορεί να περιγραφεί από την παρακάτω σχέση[35]:

Λιποφιλία=Υδροφοβία-Πολικότητα+Ιοντικές αλληλεπιδράσεις [1.3]

Κατά το σχεδιασμό νέων φαρμάκων, το ευρέως σύνηθες διφασικό σύστημα που χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς για την πειραματική εκτίμηση της λιποφιλίας είναι το διφασικό σύστημα n-οκτανόλης-νερο[5]. Το συγκεκριμένο σύστημα προσομοιώνει ικανοποιητικά την πρωτεϊνική σύνδεση και τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Η επιλογή του συγκεκριμένου συστήματος βασίστηκε στα παρακάτω κριτήρια[1]:

- Στην ικανότητα της n-οκτανόλης να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, ιδιότητα που προσομοιάζει σε πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεΐνες).
- Η n-οκτανόλη δεν απορροφά στο υπερίωδες, γεγονός που διευκολύνει τον πειραματικό προσδιορισμό.
- Είναι σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού, συγκριτικά με άλλα συστήματα διαλυτών.
- Η n-οκτανόλη δεν είναι τοξική, έχει ωστόσο δυσάρεστη γλυκερή οσμή.
- Η n-οκτανόλη είναι φτηνή.

Η ποσοτική έκφραση της λιποφιλίας περιγράφεται από τον συντελεστή μερισμού (logP) και τον συντελεστή κατανομής (logD), οι οποίοι θα αναλυθούν παρακάτω.

1.4.1 Συντελεστής Μερισμού

Η κατανομή του φαρμάκου μεταξύ λιπιδικής και υδατικής φάσης περιγράφεται από την ισορροπία:



Όπου P είναι η σταθερά ισορροπίας και εκφράζεται με το πηλίκο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιπιδική προς τη υδατική φάση. Η σταθερά P είναι ο συντελεστής μερισμού (partition coefficient) και αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας[B].

Οι λιπιδικές φάσεις όπως π.χ(μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) παριστάνονται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη, ο συντελεστής μερισμού εκφράζεται από τον λόγο της συγκέντρωσης της μη διασπώμενης μονομερούς μορφής της ουσίας στην οργανική φάση ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση αυτής στο νερό: [B].

$$P = \frac{[\text{φάρμακο}]_{\text{λιπ}}}{[\text{φάρμακο}]_{\text{υδατ}}}$$

Ο συντελεστής P χρησιμοποιείται σε λογαριθμική μορφή (logP) και αναφέρεται στο σύστημα αναφοράς οκτανόλης-νερού. Ο συντελεστής μερισμού αναφέρεται στην ισορροπία ενός μη ιοντισμένου φαρμάκου μεταξύ της οργανικής και υδατικής φάσης χωρίς να λαμβάνει υπόψη την ιονισμένη μορφή του [1 5].

Μεγαλύτερες τιμές του logP αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη λιποφιλία. Ωστόσο, πολύ μεγάλες τιμές logP δεν είναι αποτελούν ευνοϊκές για τη φαρμακολογική δράση. Για αυτό το λόγο στη βιβλιογραφία υπάρχουν για κάποιες ιδιότητες βέλτιστα επιθυμητά εύρη τιμών των logP. Συγκεκριμένα για την βιοδιαθεσιμότητα, το βέλτιστο εύρος logP είναι μεταξύ του 0 και του 3 το οποίο συνάδει με το εύρος λιποφιλίας όπου μπορεί να επιτευχθεί καλή ισορροπία μεταξύ διαλυτότητας και διαπερατότητας. Για αποτελεσματική απορρόφησης το εύρος logP κυμαίνεται από -1 έως 5,9, ενώ όταν οι τιμές του logP είναι μεγαλύτερες του 3 αυξάνεται η πιθανότητα μιας ουσίας να εμφανίσει τοξικότητα. Ωστόσο, υπάρχουν επιτυχημένες φαρμακευτικές ενώσεις που μπορεί να μην εμπίπτουν σε αυτά τα εύρη λιποφιλίας, με αποτέλεσμα να διαπιστώνεται πως τα εύρη λιποφιλίας αποτελούν προτάσεις και θα πρέπει να δίνεται προσοχή όταν χρησιμοποιούνται.[1].

1.4.2 Συντελεστής κατανομής

Ένα μεγάλο εύρος φαρμακευτικών ενώσεων διαθέτουν κέντρα ιονισμού και ανάλογα με το pH βρίσκονται περισσότερο ή λιγότερο ιονισμένα.

Όταν πρόκειται για ιονισμένα μόρια δεν χρησιμοποιείται ο συντελεστής μερισμού P αλλά ο συντελεστής κατανομής D. Ο συντελεστής κατανομής D (distribution coefficient) χρησιμοποιείται για να περιγράψει την λιποφιλία μιας ένωσης σε δεδομένο pH λαμβάνοντας

υπόψη τόσο την εγγενή λιποφιλία όσο και το βαθμό ιονισμού της. Ο συντελεστής κατανομής D εκφράζει το λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων των ιονισμένων μορφών και της αδιάστατης μορφής στην οργανική και υδατική φάση[1].

$$D = \frac{\sum C_{οργ}}{\sum C_{υδατ}}$$

Ο συντελεστής κατανομής D εξαρτάται από το pH της υδατικής φάσης και την οξύτητα ή αλκαλικότητα (pKa) της ιονισμένης ουσίας. Για ένα μοσπρωτικό οξύ (HA) δίνεται από τη σχέση :

$$D = \frac{[HA]_{organic}}{[HA]_{aqueous} + [A^-]_{aqueous}}$$

Όπου [HA] και [A⁻] αντιπροσωπεύουν τις συγκεντρώσεις του οξέος στη μη ιονισμένη και ιονισμένη φάση αντίστοιχα.

Τις πλείστες περιπτώσεις ο συντελεστής κατανομής εκφράζεται σε λογαριθμική μορφή για δεδομένο pH από την παρακάτω σχέση:

$$\log D = \log [f^N P^N + \sum (f^I P^I)]$$

Όπου f^N και f^I είναι τα κλάσματα της ουδέτερης και ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν συνάρτηση του pH και της pKa και P^N και P^I είναι οι συντελεστές μερισμού της αδιάστατης και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα. Οι συντελεστές μερισμού των ιοντισμένων μορφών είναι πολύ μικρότερες συγκριτικά με τον συντελεστή μερισμού της αδιάστατης μορφής, ενώ πρακτικά θεωρείτε ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η αδιάστατη φάση, έτσι η παραπάνω εξίσωση απλοποιείται ως εξής:

$$\log D = \log(f^N P^N) = \log(f^I P^I)$$

Γενικά ο συντελεστής μερισμού είναι πάντα μεγαλύτερος ή ίσος από το συντελεστή κατανομής, δηλαδή logP ≥ logD. Θεωρώντας ότι στην n-οκτανόλη κατανέμεται μόνο η αδιάστατη μορφή, ισχύει η σχέση:

$$\log P = \log D + Q$$

Όπου Q είναι ένας διορθωτικός παράγοντας που εξαρτάται από το pKa της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος.

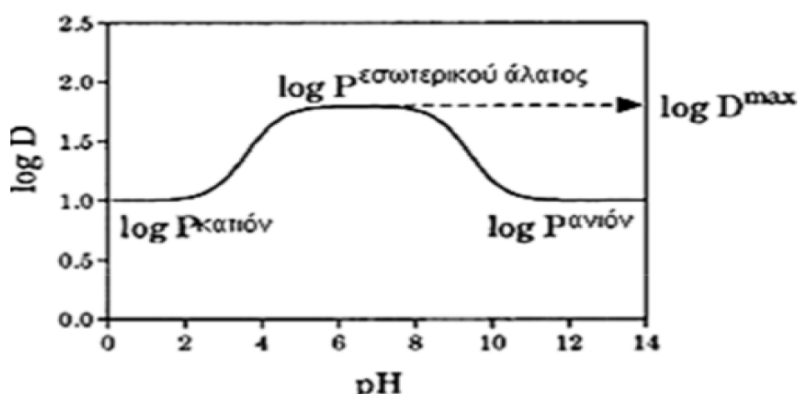
Στις φαρμακευτικές ενώσεις σημασία συνήθως έχει το $\log D$ στο φυσιολογικό pH του αίματος, δηλαδή στην τιμή $\text{pH}=7,4$.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές υπάρχουν ορισμένα εύρη $\log D$ έτσι ώστε μία φαρμακευτική ένωση να εμφανίζει επιθυμητές ιδιότητες. Η βέλτιστη περιοχή λιποφιλίας κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών $\log D$ μεταξύ 1-3. Η ιδιότητα των μεμβρανών εξαρτάται τόσο από τη τιμή του $\log D$ όσο και από το μοριακό βάρος της ένωσης. Για ενώσεις με μοριακό βάρος 350-400 η τιμή του $\log D$ πρέπει να είναι $>1,7$, για ενώσεις με μοριακό βάρος 400-450 η τιμή του $\log D$ πρέπει να είναι $>3,1$, για ενώσεις με μοριακό βάρος 450-500 η τιμή του $\log D$ πρέπει να είναι $>3,4$ και τέλος για ενώσεις με μοριακό βάρος >500 η τιμή του $\log D$ πρέπει να είναι $>4,5$. Όσον αφορά την βιοδιαθεσιμότητα το βέλτιστο εύρος $\log D$ κυμαίνεται μεταξύ 1-3. Ωστόσο όπως και στην περίπτωση του $\log P$, τα εύρη των τιμών $\log D$ αποτελούν απλά προτάσεις και κατά το σχεδιασμό των φαρμάκων θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις τιμές λιποφιλίας τους[1].

1.4.3 Λιποφιλία Αμφολυτών

Οι αμφολύτες αποτελούν χημικές ενώσεις που φέρουν μια ή περισσότερες όξινες και μια ή περισσότερες βασικές ομάδες. Έχουν την ιδιότητα 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 pK_a της όξινης και βασικής ομάδας και τη δομή του μορίου.

Η λιποφιλία των αμφολυτών παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον. Ο συντελεστής μερισμού ($\log P$) υπολογίζεται μόνο υπό την προϋπόθεση πως δεν συνυπάρχουν το θετικό και αρνητικό φορτίο στο μόριο, δηλαδή όταν δεν σχηματίζεται εσωτερικό άλας. Στην περίπτωση όπου ο αμφολύτης σχηματίζει εσωτερικό άλας 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. Οι αμφολύτες-εσωτερικά άλατα λειτουργούν ως "buffer" λιποφιλίας, παρουσιάζοντας ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά[1].



Διάγραμμα 1: Κωδωνοειδής καμπύλη $\log D/\text{pH}$ αμφολύτη που σχηματίζει εσωτερικό άλας [1]

1.5 Στατιστικές μέθοδοι

Τόσο οι φαρμακοκινητικές όσο και η φαρμακοδυναμικές ιδιότητες ενός φαρμακευτικού σκευάσματος δεν εξαρτώνται μόνο από την λιποφιλία, αλλά είναι αποτέλεσμα ποικίλων διαδικασιών και παραγόντων. Η σύνθεση σειρών δομικών ενώσεων αποτελεί βασικό τρόπο βελτίωσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και γενικά του φαρμακολογικού προφίλ ενός μορίου. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο αριθμός των δυνητικών ενώσεων είναι εξαιρετικά μεγάλος, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη να εφαρμοσθεί ορθολογικός σχεδιασμός μέσω ποσοτικοποίησης της διαφοροποίησης που επιφέρουν στη δράση οι δομικές αλλαγές.

Έτσι κατασκευάζονται μοντέλα γνωστά ως μοντέλα Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης. Τα συγκεκριμένα μοντέλα καλούνται QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) και ο ρόλος τους είναι η πρόβλεψη των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των ενώσεων με βάση τη χημική δομή τους. Απώτερος σκοπός τους είναι η μοντελοποίηση της βιολογικής δράσης με τη δομή των ενώσεων. Ακόμη τα μοντέλα QSPR (Quantitative Structure-Property Relationships) επικεντρώνονται στη σχέση Δομής-Ιδιοτήτων και στοχεύουν στην εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων για βιολογικές διεργασίες συγκεκριμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

Ο ρόλος των πιο πάνω μοντέλων είναι η ελαχιστοποίηση των πειραμάτων, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φαρμακομορίων και η σύνθεση κατάλληλων ενώσεων για επίτευξη βελτιωμένων φαρμακομορίων.[1 16 37 38]

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

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

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

Η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης επιτρέπει την εξαγωγή εξισώσεων που συνδέουν μια εξαρτημένη μεταβλητή με περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές (παραμέτρους). Οι εξισώσεις αυτές είναι της μορφής:

$$y_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n + \epsilon, i=1,2,\dots,n$$

όπου x_1-x_n : παράμετροι που περιγράφουν την δομή/ανεξάρτητη μεταβλητή

b_1-b_n : συντελεστές που εξάγονται μέσω στατιστικής επεξεργασίας

Ένα οποιοδήποτε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης συλλαμβάνει το γεγονός ότι κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή εξαρτάται σημαντικά από την αναμενόμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής με κάποιο συντελεστή b , και οι συνεισφορές των ανεξάρτητων μεταβλητών

είναι αθροιστική. Οι συντελεστές β καθορίζουν το πόσο συνεισφέρει κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή.[39]

Ο συντελεστής r αποτελεί μέτρο αποτελεσματικότητας της πιο πάνω μεθόδου, πρέπει να τείνει στην μονάδα (1), δηλαδή $-1 < r < 1$. Τις περισσότερες φορές και ειδικότερα όταν εξετάζεται μεγάλο εύρος ανεξάρτητων μεταβλητών, ως μέτρο αξιολόγησης χρησιμοποιείται το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης r^2 (προσαρμοσμένος συντελεστής), ο οποίος και

αυτός πρέπει 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 , η 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 $2s$ αποτελεί το όριο ανοχής σφάλματος του συγκεκριμένου μοντέλου. Έτσι 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.

Το πόσο σημαντική είναι μια παράμετρος καθορίζεται από το λεγόμενο Student test, το οποίο εξαρτάται από το συντελεστή της παραμέτρου προς το τυπικό σφάλμα. Για να είναι σημαντική μια παράμετρος πρέπει να ισχύει $t > [2]$. Επίσης ένα άλλο βοηθητικό στατιστικό εργαλείο είναι η δοκιμασία Fisher (Fisher test), η οποία καθορίζει τη σημαντικότητα των εξισώσεων παλινδρόμησης [40 41].

Η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης όπως και άλλες στατιστικές μέθοδοι παρουσιάζει περιορισμούς στην εφαρμογή της, όπως:

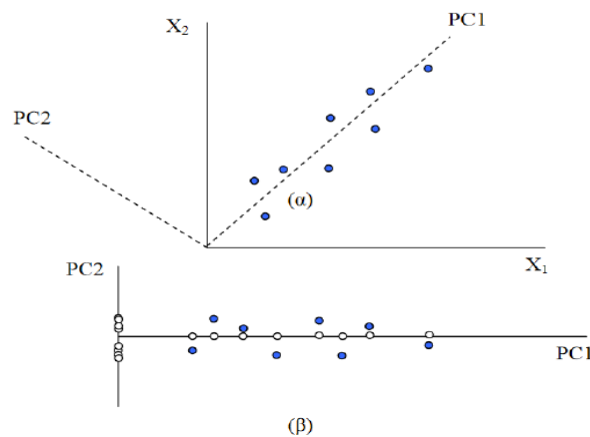
- Περιορίζεται σε μία μόνο εξαρτημένη μεταβλητή x
- Οι x μεταβλητές πρέπει να είναι πραγματικά ανεξάρτητες, δηλαδή να μην πλέκονται με άλλες. Αν υπάρχουν μεταβλητές που συσχετίζονται μεταξύ τους τότε θα πρέπει να επιλεγεί μια μόνο από αυτές, ως αποτέλεσμα να μην αξιοποιείται πλήρως η πληροφορία.
- Το τελικό μοντέλο πρέπει να έχει λίγες παραμέτρους, δηλαδή ο τελικός πίνακας να αποτελείται από μεγάλο αριθμό σειρών (ενώσεις) και μικρό αριθμό στηλών (μεταβλητών x). [1]

1.5.2 Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστώσων ανήκει στην κατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων (MVDA), η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διαχείριση μεγάλου αριθμού αλληλοσχετιζόμενων περιγραφικών μεταβλητών.

Η πιο πάνω στατιστική διαδικασία έχει την δυνατότητα να μετατρέπει μία ομάδα τιμών (παρατηρήσεων) δυνητικά συσχετιζόμενων μεταβλητών σε μια ομάδα νέων τιμών μη γραμμικά συσχετιζόμενων μεταβλητών, οι οποίες ονομάζονται κύριες συνιστώσες. Ο αριθμός των νέων μεταβλητών που προκύπτει είναι ίσος ή και συχνότερα πολύ μικρότερος από τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών.[1] 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 κύριες αυτές συνιστώσες αποτελούν τους δύο άξονες στο νέο σύστημα αξόνων που εκείνες ορίζουν, πάνω στο οποίο γίνεται προβολή των αρχικών περιγραφικών μεταβλητών X . Οι καινούργιες μεταβλητές που προκύπτουν (Principal Components ή PCs) προκύπτουν πολλαπλασιάζοντας τις αρχικές μεταβλητές με τις φορτίσεις (loadings), δηλαδή τις γωνιές που σχηματίζουν οι κύριες συνιστώσες ως προς τις αρχικές μεταβλητές. Οι μεταβλητές είναι ταξινομημένες αρχικά από την συνιστώσα που περιγράφει τη μέγιστη διακύμανση), η τελική απεικόνιση των δεδομένων παρουσιάζει πληροφορίες από την αρχική με τον ίδιο πάντα αριθμό μεταβλητών[1 42].

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



Διάγραμμα 2: α) Διάγραμμα με τις δύο βασικές συνιστώσες PC1 και PC2 για τις δύο μεταβλητές X_1 και X_2 . β) Τα γαλάζια σημεία στους άξονες δηλώνουν τα αρχικά σημεία και τα λευκά τις προβολές τους στους άξονες[37][42].

1.5.3 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)

Η ανάλυση των ελαχίστων τετραγώνων ανήκει και αυτή στη κατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων, καθώς αποτελεί επέκταση της ανάλυσης κύριων συνιστώσων, με εφαρμογή παλινδρόμησης που οδηγεί σε μοντέλα πρόβλεψης. Ο κύριος στόχος της είναι όσο το δυνατό η καλύτερη συσχέτιση μεταξύ δύο μεταβλητών X και Y και την ανάπτυξη ενός μοντέλου που θα προσεγγίσει σε υψηλό βαθμό τις δύο μεταβλητές. Συγκεκριμένα, η μέθοδος PLS εξάγει νέες μεταβλητές, μέσω των μεταβλητών X , τις οποίες χρησιμοποιεί για να προσδιορίσει τις μεταβλητές Y . Η μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων υπερτερεί συγκριτικά με την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση γιατί εφαρμόζεται ακόμα και στις περιπτώσεις που οι παράμετροι X δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Στα μοντέλα

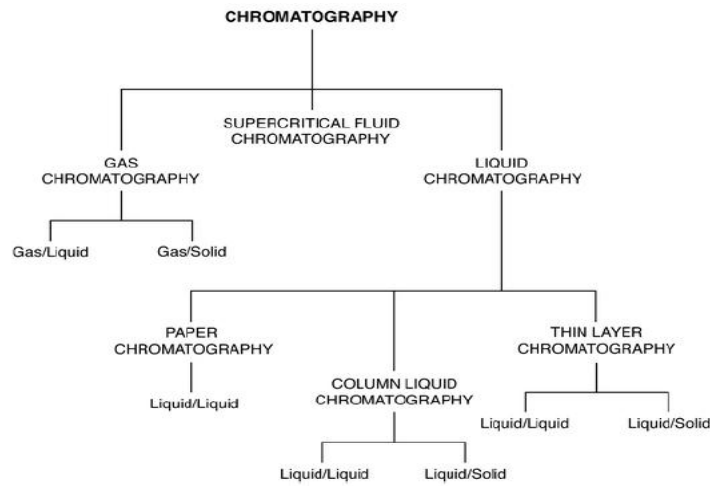
PLS, η αξιολόγησή τους γίνεται, σε αντιστοιχία με τα μοντέλα PCA, με βάση τον συντελεστή R^2Y_{cum} . [1]

1.6 Εισαγωγή στη χρωματογραφία

Γενικά η χρωματογραφία αναλύει μια ομάδα τεχνικών υψηλής σημασίας σε όλους τους τομείς ανάλυσης και στην εξέλιξη της επιστήμης, αφού επιτυγχάνει το διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μείγματα. Η διαφορά της από τις υπόλοιπες μεθόδους διαχωρισμού έγκειται στη μεγάλη ποικιλία υλικών, εξοπλισμού και τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. [43 44]

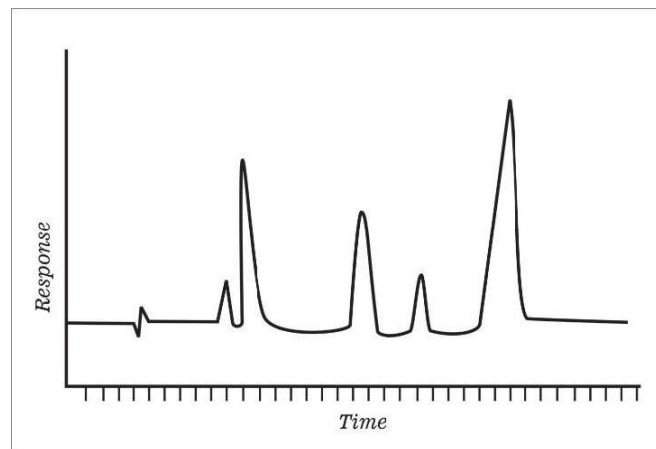
Όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές στηρίζονται στην κατανομή ενός δείγματος μεταξύ μίας κινητής και μιας στατικής φάσης. Το δείγμα διαλύεται σε μια κινητική φάση, η οποία μπορεί να είναι αέρια, υγρή ή υπερκρίσιμο ρευστό. Ακολούθως η κινητική φάση αναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης, η οποία πιθανόν να βρίσκεται εντός μιας στήλης ή σε μία στερεά επιφάνεια. Η επιλογή των δύο φάσεων γίνεται ούτως ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο και η αλληλεπίδραση της διαλυμένης ουσίας με τις δύο φάσεις να είναι δυνατό να περιγραφεί από το συντελεστή μερισμού (P) ή από το συντελεστή κατανομής (D) που αναλύθηκαν πιο πάνω. Συγκεκριμένα συστατικά του δείγματος συλλέγονται ισχυρότερα από τη στατική φάση και άρα κινούνται με αργότερο ρυθμό κατά τη ροή της κινητικής φάσης, ενώ το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει με τα ασθενέστερα συστατικά. Το αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς ταχύτητας των διαφόρων συστατικών είναι η κατανομή τους σε ξεχωριστή ζώνη ούτως ώστε μετέπειτα να επιτευχθεί ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του. [43]

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος βασίζεται στο είδος των στατικών φάσεων, έτσι προκύπτουν δύο κατηγορίες, η χρωματογραφία στήλης και η επιπεδική χρωματογραφία. Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση συγκρατείται σε μια στενή στήλη και η διέλευση της κινητικής φάσης γίνεται με εφαρμογή πίεσης. Στην επιπεδική χρωματογραφία η στατική φάση στηρίζεται σε μια επίπεδη πλάκα και η κινητική φάση πέρνα μέσω αυτής λόγω της βαρύτητας ή τριχοειδών φαινομένων. Γενικά πιο ευρέως διαδεδομένη αποτελεί η χρωματογραφία στήλης. Ο δεύτερος τρόπος ταξινόμησης των χρωματογραφικών τεχνικών βασίζεται στο είδος της κινητής φάσης οπότε προκύπτουν τρεις γενικές κατηγορίες χρωματογραφιών: η υγροχρωματογραφία (LC), η αέρια χρωματογραφία (GC), και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC). Από αυτές τις κατηγορίες μόνο η υγροχρωματογραφία μπορεί να εφαρμοσθεί τόσο σε στήλες όσο και σε επίπεδες επιφάνειες. Η άλλες δύο εφαρμόζονται μόνο σε διαδικασίες στηλών. Στην πιο κάτω εικόνα παρουσιάζονται οι διάφορες κατηγορίες της χρωματογραφίας. [46][43]



Εικόνα 5: Ταξινόμηση των μεθόδων χρωματογραφίας [44]

Στην χρωματογραφία στήλης τοποθετείται στην έξοδο ανιχνευτής (συνήθως ανιχνευτής Υν-Vis ή φασματομετρία μάζας –MS), ο οποίος αποκρίνεται στις συγκεντρώσεις των διαλυμένων ουσιών και το σήμα του καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου, λαμβάνεται μια σειρά κορυφών, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Το πιο κάτω διάγραμμα ονομάζεται χρωματογράφημα και χρησιμοποιείται τόσο στην ποιοτική όσο και στη ποσοτική ανάλυση του δείγματος. Λαμβάνοντας υπόψη τη θέση της κάθε κορυφής στο διάγραμμα γίνεται και ο ποιοτικός προσδιορισμός του δείγματος, από την άλλη το εμβαδόν της κάθε κορυφής αποτελεί το ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού.[43 46]



Διάγραμμα 3: Πρότυπη μορφή χρωματογραφήματος (response=σήμα ανιχνευτή,time=χρόνος)[45 48]

1.6.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

Η Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί την εξέλιξη της απλής Υγρής Χρωματογραφίας (LC). Η υγροχρωματογραφία στηρίζεται σε μια υάλινη στήλη (διαμέτρου 1-5 cm, μήκους 50-500cm), περιβάλλεται με στερεά σωματίδια επικαλυμμένα με ένα προσροφημένο υγρό που σχηματίζει τη στατική φάση. Η διάμετρος αυτών των σωματιδίων

κυμαίνεται συνήθως από 150-200 μm . Η ταχύτητες ροής σε αυτά τα συστήματα ήταν πολύ μικρές και ο χρόνος του διαχωρισμού μπορούσε να φτάσει και τις μερικές ώρες. Έτσι για την αύξηση της αποδοτικότητας της στήλης υπήρξε αναγκαία η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 υπήρχε η δυνατότητα παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με διάμετρο σωματιδίων 3-10 μm . Το νέο σύστημα όμως προαπαιτούσε την επιβολή υψηλής πίεσης, πράγμα αδύνατον με τη χρήση υάλινων στηλών και της βαρυτικής ροής. Η HPLC ως πιο σύγχρονης τεχνική κάνει χρήση αντλιών υψηλής πίεσης για ταχύτερο διαχωρισμό, επαναχρησιμοποιήσιμες και πιο αποτελεσματικές στήλες για καλύτερο έλεγχο της συνολικής διαδικασίας.[43 45 46 48]

Η HPLC αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, αφού διαθέτει αξιοσημείωτη ακρίβεια ανάλυσης $\pm 0,5\%$, εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, ικανότητα διαχωρισμού μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως δυνατότητα εφαρμογής στο προσδιορισμό ουσιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος.[43 46]

Διακρίνονται δύο είδη HPLC: HPLC κανονικής φάσης (Normal Phase HPLC –NP-HPLC) και HPLC αντιστρόφου φάσεως (Reversed Phase HPLC –RP-HPLC) η διαφοροποίηση γίνεται βάση της πολικότητας ανάμεσα στην κινητική και τη στατική φάση.

Στην HPLC κανονικής φάσης, η πολικότητα της στατικής φάσης είναι υψηλότερη από την πολικότητα της κινητικής φάσης. Αυτό συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται ως στατική φάση το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) σε χρωματογραφία προσρόφησης. Η HPLC κανονικής φάσης χρησιμοποιείται κυρίως για δείγματα τα οποία είναι αδιάλυτα στο νερό ή για το διαχωρισμό ισομερών ή και ως προπαρασκευαστική τεχνική. Στην αρχή εκλύονται οι λιγότερο πολικές ενώσεις (εμφανίζουν περισσότερη συγγένεια με τη κινητή φάση) και στο τέλος οι πιο πολικές ενώσεις, αφού αυτές αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τη στατική φάση. Για να επιτευχθεί αύξηση της κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών χρειάζεται να μειωθεί η πολικότητα της κινητής φάσης περαιτέρω.[45 46 48 49]

Για την HPLC αντιστρόφου φάσεως, η πολικότητα της στατικής φάσης είναι μικρότερη από αυτή της κινητικής φάσης. Η στατική φάση αποτελείται κυρίως από οξείδιο του πυριτίου, ο οποίος είναι συζευγμένος με μια μη πολική επίστρωση. Η κινητική φάση αποτελείται από ένα πολικό μείγμα νερού ή υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος με κάποιον οργανικό διαλύτη (π.χ ακετονιτρίλιο). Στην HPLC αντιστρόφου φάσεως πρώτα εκλύονται τα πιο πολικά συστατικά του μείγματος, τα λιγότερα πολικά συστατικά προσροφώνται ισχυρότερα από την υδρόφοβη στατική φάση και έτσι εξέρχονται από την χρωματογραφική στήλη σε μεγαλύτερο χρόνο.[45 46 48 49]

Οι πλείστοι διαχωρισμοί πραγματοποιούνται με στήλες αντιστρόφου φάσης. Ο κυριότερος λόγος είναι οικονομικός αφού υπάρχει η δυνατότητα χρήσης νερού ως κινητική φάση, ελαχιστοποιώντας το κόστος, διαπερατότητα από την υπεριώδη ακτινοβολία και συμβατότητα με βιολογικές ουσίες. Η HPLC γενικά επικεντρώνεται στην δυναμική ισορροπία όταν οι διαλυμένες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και αποκτούν μια μέση ταχύτητα στο σύστημα. Αντλούνται πληροφορίες από το χρωματογραφικό σύστημα οι οποίες σε μεταγενέστερο στάδιο θα αξιοποιηθούν με σκοπό

τον προσδιορισμό συντελεστών κατανομής και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων. Η HPLC θεωρείται ιδανική για την εκτίμηση της λιποφιλίας και την προσομοίωση βιολογικών συστημάτων κατανομής, π.χ φαρμακευτικής ένωσης.[33 45 46]

Οι σημαντικότερες χρονικές παράμετροι που λαμβάνονται από το χρωματογραφικό σύστημα είναι ο χρόνος κατακράτησης (t_R), και ο νεκρός χρόνος (t_0) οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των συστατικών ενός δείγματος.[45 48]

Ο χρόνος κατακράτησης (t_R) αποτελεί το χρόνο που απαιτείται από τη στιγμή της έκχυσης του δείγματος στον χρωματογράφο μέχρι και τη στιγμή που η κορυφή του αντίστοιχου συστατικού φθάσει στον ανιχνευτή. Οφείλεται στην παραμονή των διαλυμένων ουσιών στην στατική φάση εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα.[43 46]

Το δείγμα ή η κινητή φάση περιέχουν ουσίες μη κατακρατούμενες από τη στατική φάση. Έστω και αν δεν υπάρχει κάποια μη κατακρατούμενη ουσία προστίθεται σκοπίμως στο δείγμα ώστε να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση των κορυφών του χρωματογραφήματος. Ο χρόνος που απαιτεί μια μη κατακρατούμενη ουσία για να φθάσει στον ανιχνευτή καλείται νεκρός χρόνος (t_0), και αντιστοιχεί σε μια πολύ μικρή κορυφή. Ο νεκρός χρόνος αποτελεί μέτρο του μέσου ρυθμού μετανάστευσης της κινητής φάσης.[43 46]

Ο χρόνος κατακράτησης και ο νεκρός χρόνος χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του παράγοντα κατακράτησης k . Ο παράγοντας k είναι μια σημαντική πειραματική ποσότητα ευρέως διαδεδομένη που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της μετανάστευσης των διαλυμένων ουσιών στις στήλες. Το μεγάλο πλεονέκτημα του είναι ότι δεν εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης ή τον ογκομετρικό ρυθμό ροής. Αυτό σημαίνει πως για δεδομένο συνδυασμό διαλυμένης ουσίας, κινητής και στατικής φάσης, στήλης οποιασδήποτε γεωμετρίας και με οποιοδήποτε ρυθμό ροής κινητής φάσης θα δώσει το ίδιο παράγοντα κατακράτησης. Ο παράγοντας κατακράτησης k υπολογίζεται ως εξής:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

όπου :

t_R : ο χρόνος κατακράτησης της διαλυμένης ουσίας

t_0 : ο νεκρός χρόνος [43 46]

Αφού οι ποσότητες t_R και t_0 μπορούν εύκολα να υπολογιστούν από το χρωματογράφημα, μπορεί με τη χρήση της παραπάνω εξίσωσης να υπολογιστεί και ο παράγοντας k . Ο παράγοντας κατακράτησης κυμαίνεται μεταξύ του 1 και του 10. Συχνά ο παράγοντας k χρησιμοποιείται με τη λογαριθμική του μορφή ($\log k$), οπότε η εξίσωση [1] διαμορφώνεται ως εξής :[33 43 46]

$$\log k = \log\left(\frac{t_R - t_0}{t_0}\right)$$

Ο συντελεστής κατακράτησης k μιας ένωσης συσχετίζεται άμεσα με το συντελεστή χρωματογραφικής κατανομής (K) της ένωσης μεταξύ των δύο φάσεων. Για τη σύνδεση των

δύο συντελεστών χρησιμοποιείται οι πιο κάτω σχέση όπου V_s προς V_m ο όγκος της στατικής φάσης προς τον όγκο της κινητής φάσης.

$$\log K = \log k \frac{V_s}{V_m}$$

Για το χρωματογραφικό σύστημα που μελετάται ο συντελεστής κατανομής K αποτελεί σταθερά του συστήματος.[3]

Συχνά η κινητή φάση σε HPLC παραμένει σταθερή κατά την διάρκεια των μετρήσεων, όταν όμως πρόκειται για ένα σύνολο ενώσεων με ευρύ φάσμα λιποφυλιών χρειάζονται διαφορετικές συνθέσεις κινητής φάσης. Η μεταβολή της κινητής φάσης πραγματοποιείται μέσω αναμειξεων με οργανικούς διαλύτες όπως π.χ. ακετονιτρίλιο, μεθανόλη. Συγκεκριμένα για την HPLC αντιστρόφου φάσεως η αύξηση της συγκέντρωσης της οργανικής φάσης στην κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου κατακράτησης των περισσότερο λιπόφιλων ενώσεων. Για την αξιοποίηση των μετρήσεων είναι απαραίτητο τα ληφθέντα δεδομένα κατακράτησης να τροποποιηθούν ούτως ώστε να αντιστοιχούν σε καθαρή υδατική κινητή φάση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω γραμμικής σχέσης (linear extrapolation) μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης (k) και της συγκέντρωσης του οργανικού διαλύτη σε ποσοστό όγκου στην κινητή φάση (ϕ):

$$\log k = a \cdot \phi + b$$

όπου a και b , οι σταθερές που προκύπτουν από το γραμμικό τμήμα της συνάρτησης, το οποίο μπορεί να κατασκευαστεί πραγματοποιώντας 3 με 5 μετρήσεις του συντελεστή λιποφιλικότητας $\log k$ για διαφορετικά ποσοστά οργανικού διαλύτη κάθε φορά. Η τιμή $\log k$ που προκύπτει από την παραπάνω παρεκβολή ισούται με τη σταθερά b , αφού το ϕ παίρνει τιμή 0 για απουσία οργανικής φάσης, ενώ η σταθερά a αντιστοιχεί στην κλίση της ευθείας που κατασκευάστηκε. Ο συντελεστής $\log k$ που προκύπτει από την παρεκβολή και αντιστοιχεί στην καθαρή υδατική φάση συμβολίζεται $\log k_w$ και έχει προταθεί από τους αρμόδιους οργανισμούς ως κατάλληλος για δείκτης λιποφιλικότητας. Κατά την εφαρμογή των παραπάνω, απαιτείται προσοχή στη διατήρηση της γραμμικότητας της σχέσης [1.11]. Συνήθως παρατηρείται ικανοποιητική γραμμικότητα μέχρι και ποσοστό οργανικού τροποποιητή ίσο με 30%. [3 33]

1.6.2 Βιομιμητική χρωματογραφία

Η βιομιμητική χρωματογραφία αποτελεί υποκατηγορία της υγρής χρωματογραφίας, με την ιδιαιτερότητα πως στη στατική της φάση ενσωματώνει ακινητοποιημένα βιομόρια ώστε να προσομοιωθεί ο καταμερισμός των διαλυμένων ενώσεων (φάρμακα) στους ιστούς και η αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες.

Για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο 2 τύποι στηλών που διατίθενται στο εμπόριο: α) στήλες με ακινητοποιημένες τεχνητές μεμβράνες (IAM), που χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση της διαπερατότητας των φαρμάκων μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και β) στήλες με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες πλάσματος, που χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση της σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Με βάση τη στήλη που χρησιμοποιείται, δηλαδή τη στατική φάση, ονομάζεται και η χρωματογραφία ως Βιομιμητική Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών και Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών αντίστοιχα.[16]

1.6.2.1 Μικκυλιακή Χρωματογραφία (Micellar Liquid Chromatography, MLC)

Η μικκυλιακή χρωματογραφία αποτελεί μια εναλλακτική έναντι της συμβατικής υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσης (RP-HPLC) με υδατικές – οργανικές κινητές φάσεις. Η ποικιλία των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαλυμένων ουσιών, των μικκυλίων και της στατικής φάσης, προσδίδουν μεγάλη ευελιξία στη μέθοδο και την καθιστούν κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα αναλύσεων διαλυμένων ουσιών. Υπάρχει, επιπλέον, δυνατότητα για διαχωρισμό υδρόφοβων και υδρόφιλων ενώσεων στον ίδιο κύκλο μετρήσεων. Αυτή η προσαρμοστικότητα είναι ίσως το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μικκυλιακής χρωματογραφίας.[47]

Η χρήση διαλυμάτων μικκυλίων οδηγεί στην προσρόφηση μονομερών του επιφανειοδραστικού παράγοντα στη στατική φάση, παρέχοντας έτσι υδρόφοβες θέσεις αλληλεπίδρασης αλλά και θέσεις ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας των επιφανειοδραστικών που προσροφώνται στη στατική φάση, παρέχει στο σύστημα τη δυνατότητα διαλυτοποίησης μη πολικών μορίων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της MLC είναι η μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη που απαιτείται για τη σύνθεση της κινητής φάσης, καθώς μειώνεται η τοξικότητα, η ευφλεκτότητα, το αντίκτυπο στο περιβάλλον και φυσικά το κόστος παρασκευής τους.[47]

Στην MLC μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι τασιενεργών ουσιών, όπως ιοντικές (ανιοντικές και κατιοντικές), μη – ιοντικές και αμφολύτες. Έχει αποδειχθεί ότι η προσρόφηση επιφανειοδραστικού οδηγεί σε ξεχωριστές αλλαγές στην επιλεκτικότητα των στατικών φάσεων. Η υδρόφοβη προσρόφηση των επιφανειοδραστικών μονομερών SDS (ανιοντικό) στη στατική φάση οδηγεί στο σχηματισμό ενός ανιοντικού υδρόφιλου επιφανειακού στρώματος, η στατική φάση γίνεται πιο υδρόφιλη. Αντιθέτως, για τα κατιονικά τασιενεργά (δηλ. CTAB ή DTAB) λαμβάνει χώρα όχι μόνο υδρόφοβη προσρόφηση αλλά και σιλανόφιλη προσρόφηση, οδηγώντας σε αύξηση της υδροφοβίας της στατικής φάσης και στο σχηματισμό ενός κατιονικού υδρόφιλου επιφανειακού στρώματος.[48]

Παρά το πολλά πλεονεκτήματα της, η MLC εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη από εκείνη που παρατηρείται με παρόμοιες στήλες στη συμβατική RP-LC. Επιπλέον, η ικανότητα έκλουσης των μικκυλιακών διαλυμάτων είναι ιδιαίτερα ασθενής. Βέβαια, και τα δύο παραπάνω προβλήματα μπορούν να λυθούν με την προσθήκη στον διαλύτη έκλουσης ενός οργανικού τροποποιητή, όπως μια αλκοόλη (μικρής ανθρακικής αλυσίδας). Η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς από μια τιμή της και πάνω μπορεί να μειωθεί η απορρόφηση των μονομερών του τασιενεργού από τη στατική φάση.[47 49]

Σε τέτοια συστήματα, η κατακράτηση των διαλυμένων ουσιών χωρίζεται σε τρεις διαφορετικές ισορροπίες. Η πρώτη αφορά την κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ των μικκυλίων και του νερού, η δεύτερη αφορά την κατανομή τους μεταξύ της στατικής φάσης και του νερού και η τρίτη ισορροπία αφορά την άμεση μεταφορά μεταξύ των μικκυλίων και της τροποποιημένης από τον επιφανειοδραστικό παράγοντα στατικής φάσης. Η τελευταία ισορροπία μπορεί να αγνοηθεί στις πλείστες καταστάσεις, αλλά είναι σημαντική για ισχυρά μη πολικές (αδιάλυτες στο νερό) ουσίες, οι οποίες παρουσιάζουν συγγένεια τόσο με τη στατική φάση όσο και με τα μικκύλια. Η μείωση του χρόνου

κατακράτησης οφείλετε συνήθως στην αύξηση της συγκέντρωσης των μικκυλίων ή της αύξησης της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή. Ωστόσο, τα διάφορα συστατικά ενός δείγματος μπορεί να αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην αλλαγή της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή ή/και του επιφανειοδραστικού παράγοντα με αποτέλεσμα αλλαγές στην ανάλυση.[49]

Η θέση (κατακράτηση) και το σχήμα (αποδοτικότητα) των χρωματογραφικών κορυφών εξαρτώνται από τη φύση και τη συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού παράγοντα και του οργανικού τροποποιητή, αλλά μπορεί επίσης να εξαρτώνται και από το pH της κινητής φάσης, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Όλες αυτές οι παράμετροι, όταν λαμβάνονται υπόψιν ταυτόχρονα, μπορούν να μοντελοποιηθούν και να βελτιστοποιηθούν για την επιτυχή πρόβλεψη των χρόνων κατακράτησης των ουσιών από τη χρωματογραφική στήλη και για την επίτευξη επαρκούς διαχωρισμού των συστατικών ενός δείγματος. Με τη μεταβολή μόνο ενός από τους παραπάνω παράγοντες κάθε φορά και τη βελτιστοποίηση των υπολοίπων σε δεύτερο χρόνο, είναι πολύ πιθανό η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού να μειωθεί.[51 47 49]

Η κύρια χρήση του συστήματος της MLC είναι η ανάλυση βιολογικών υγρών. Η επιλογή της φύσης της επιφανειοδραστικής ουσίας και της σύστασης της κινητής φάσης αποτελεί ένα σημείο κλειδί για τη προσομοίωση βιολογικών διαδικασιών. Οι κινητές μικκυλιακές φάσεις έχουν την ικανότητα να συγκρατούν πρωτεΐνες σε ένα διάλυμα. Επιτρέπεται λοιπόν, η άμεση έγχυση βιολογικών δειγμάτων στην MLC και το πρωτόκολλο της ανάλυσης είναι εξαιρετικά απλοποιημένο.[22 47]

1.6.2.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane Chromatography)

Οι βιολογικές μεμβράνες ορίζουν τα όρια μεταξύ ή εντός των κυττάρων και των οργανιδίων και αποτελούν τα εμπόδια που πρέπει ένα φάρμακο να διασχίσει ώστε να φτάσει στο μοριακό στόχο του και να ασκήσει τελικά τη φαρμακολογική δράση του. Επομένως, η διαπερατότητα ενός φαρμάκου μέσω των μεμβρανών αυτών και κατά συνέπεια η λιποφιλία, είναι ιδιότητες εξαιρετικής σημασίας κατά το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Ως σύστημα αναφοράς για τη μελέτη του μερισμού των φαρμάκων στις βιολογικές μεμβράνες έχει καθιερωθεί το σύστημα n-οκτανόλης – νερού. [50]

Ωστόσο παρά την ευρέως διαδεδομένη χρήση το συστήματος n-οκτανόλης-νερού αποτελεί μια επιφανειακή και υπεραπλουστευμένη προσέγγιση των βιολογικών μεμβρανών. [5 22 50 60]. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εκτεταμένες προσπάθειες για την τελειοποίηση πιο αντιπροσωπευτικών μοντέλων για την προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών. Η ανάπτυξη της Χρωματογραφίας Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών αποτέλεσε μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, συνδυάζοντας την καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών με την υψηλή ταχύτητα μετρήσεων. Το κύριο χαρακτηριστικό που διακρίνει την χρωματογραφία IAM από το σύστημα n-οκτανόλης – νερού είναι η συμβολή τόσο των λιπόφιλων όσο και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στο μηχανισμό κατακράτησης των διαλυμένων ουσιών, λόγω της παρουσίας μιας μονοστοιβάδας φωσφολιπιδίων.[50]

Η χρωματογραφία IAM έχει αναπτυχθεί ως ένα γρήγορο εργαλείο για την εκτίμηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών από ένα φάρμακο και στηρίζεται στην παραδοχή πως η μεταφορά του φαρμάκου γίνεται μόνο μέσω παθητικής διάχυσης. Η χρωματογραφία IAM είναι ικανή να ανταπεξέλθει σε δείγματα με προσμίξεις και να τα διαχωρίσει από την φαρμακευτική ένωση που μελετάται. Επιπλέον, η χρωματογραφία IAM δίνει πολύ καλή αναπαραγωγιμότητα μετρήσεων, όταν αυτές πραγματοποιούνται κάτω από παρόμοιες πειραματικές συνθήκες, ακόμη και διεργαστηριακά και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί[50]

Η χρωματογραφία IAM μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον υπολογισμό του ποσοστού απορρόφησης ενός φαρμάκου που έχει χορηγηθεί από το στόμα (%HOA – Human Oral Absorption), αφού η απορρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα σχετίζεται από τη διαπερατότητα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών ή μέσω του ενδοκυτταρικού χώρου (μεταξύ των κυττάρων του γαστρεντερικού βλεννογόνου). Επίσης μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στην πρόβλεψη της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου. Οι συντελεστές κατακράτησης που προκύπτουν από τη χρωματογραφία IAM μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της διαπερατότητας του ανθρώπινου δέρματος για ουσίες που δεν ιονίζονται σε φυσιολογικό pH (π.χ. στεροειδείς ορμόνες).[50]

1.6.2.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized Protein Chromatography)

Η Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών ανήκει στην ομάδα Χρωματογραφιών Συγγένειας Υψηλής Απόδοσης (HPAC – High Performance Affinity Chromatography). Ο όρος Χρωματογραφία Συγγένειας Υψηλής Απόδοσης συνδέεται με στατικές φάσεις που περιέχουν ακίνητοποιημένες πρωτεΐνες και βασίζεται στην ικανότητα της διαλυμένης ουσίας, που εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα, να αλληλεπιδράσει με την ακίνητοποιημένη πρωτεΐνη. Φάρμακα που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με την ακίνητοποιημένη πρωτεΐνη θα εμφανίζουν υψηλότερους χρόνους έκλουσης σε σχέση με φάρμακα που παρουσιάζουν λιγότερη ή και καθόλου πρωτεϊνική σύνδεση.[5 22 51]

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται συνήθως στις στατικές φάσεις της HPAC είναι η HSA και η AGP. Η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA – Human Serum Albumin), είναι η πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο πλάσμα και συνήθως η σύνδεση με πρωτεΐνες του πλάσματος αναφέρεται στην HSA. Η HSA δεσμεύει κυρίως ουδέτερα και όξινα φάρμακα και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι οι υπεύθυνες δυνάμεις για τις συνδέσεις αυτές. Η HSA σχετίζεται με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκου – φαρμάκου. Μια άλλη σημαντική πρωτεΐνη είναι η α1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP - Alpha1 Acid Glycoprotein). Η συγκέντρωση της AGP στο αίμα είναι πολύ χαμηλότερη από αυτή της HSA και η δεσμευτική της ικανότητα είναι επίσης χαμηλότερη, ωστόσο, λόγω του χαμηλότερου ισοηλεκτρικού της σημείου εμφανίζει υψηλή συγγένεια με αλκαλικά φάρμακα (ορισμένα όξινα και ουδέτερα φάρμακα μπορούν επίσης να συνδεθούν με την AGP. Ένα άλλο πλεονέκτημα της AGP είναι πως μπορεί να διακρίνει την εναντιοεκλεκτικότητα εάν οι ενώσεις διαθέτουν δύο ομάδες δέσμευσης

υδρογόνου και μια άκαμπτη ή ογκώδη δομή κοντά σε ένα χειραλικό κέντρο. Με αυτόν τον τρόπο, η AGP μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά τόσο των βασικών όσο και των ουδέτερων φαρμάκων. Βέβαια, δεν είναι γνωστές όλες οι ιδιότητες των θέσεων δέσμωσης της AGP. Για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στη στατική φάση της HPAC χρησιμοποιείται υψηλής ποιότητας αμυνοπροπυλικό πυριτικό πήκτωμα [5 11 15 22 52]

Οι στατικές φάσεις με ακινητοποιημένες πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με υδατική κινητή φάση. Συνήθως χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ή διάλυμα οξικού αμμωνίου. Στην περίπτωση ενώσεων που συνδέονται ισχυρά με τη στατική φάση χρειάζεται στην κινητή φάση να προστεθεί κάποιος οργανικός τροποποιητής (ακετονιτρίλιο ή 2-προπανόλη) ώστε να μειωθεί ο χρόνος συγκράτησης της ένωσης. Γενικά, υπάρχει καλή γραμμικότητα μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης $\log k$ και του ποσοστού του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται, οπότε οι τιμές του $\log k_w$ που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση μπορούν να ληφθούν μέσω γραμμικής παρεκβολής (extrapolation). Προτείνεται, από τους κατασκευαστές των στηλών, η χρήση των οργανικών τροποποιητών να μην υπερβαίνει το 30% για στήλες AGP και 10% για στήλες HSA, παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις δεν προκαλούν μη αναστρέψιμες αλλαγές στις στήλες και δεν επηρεάζουν την απόδοσή τους.[11 15]

Συγκριτικά με άλλες μεθόδους όπως π.χ υπερδιήθηση-ultrafiltration και διάλυση ισορροπίας-equilibrium dialysis είναι η υψηλή ακρίβεια, η ευκολία αυτοματοποίησης και η ταχύτητα. Επίσης η HPAC έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί ελάχιστη ποσότητα πρωτεϊνών για μεγάλο αριθμό μετρήσεων αφού μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για μεγάλο αριθμό πειραμάτων. Ωστόσο παρά τα πολλαπλά πλεονεκτήματα της HPAC υπάρχουν και ορισμένα σημεία τα οποία χρήζουν διερεύνησης. Το κυριότερο είναι να εξεταστεί εκτενώς η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στο υλικό στήριξης στη στατική φάση, δηλαδή πρέπει να εξεταστεί σε τι έκταση προσομοιάζει αυτό το σύστημα την πρωτεϊνική σύνδεση στο πλάσμα του αίματος, όπου οι πρωτεΐνες δεν είναι ακινητοποιημένες αλλά σε μορφή διαλύματος. Η διαδικασία της ακινητοποίησης επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών λόγω μετουσίωσής τους, ακατάλληλου προσανατολισμού ή στερεοχημικής παρεμπόδισης στις περιοχές δέσμωσης που μελετώνται. Τέλος είναι πιθανό ορισμένες ενώσεις να αλληλεπιδρούν και με τα υπόλοιπα συστατικά της στατικής φάσης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο χρόνος κατακράτησης τους από την στήλη.[51 59]

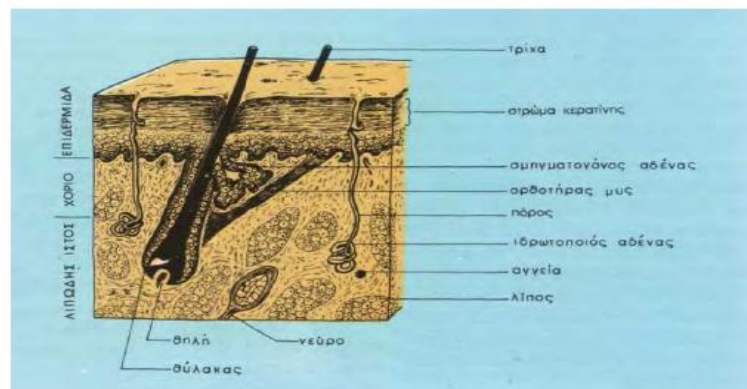
1.7 Δερματική Απορρόφηση

1.7.1 Δέρμα-Γενικά στοιχεία

Το δέρμα καλύπτει όλη την εξωτερική επιφάνεια του σώματος σαν ελαστική ασπίδα. Η εξωτερική στιβάδα του δέρματος ονομάζεται stratum corneum (SC) και λειτουργεί ως φραγμός ενάντια σε οποιαδήποτε εισβολή από μικροοργανισμούς, ιούς, τοξικές χημικές ουσίες, ενάντια στη ζέση ή σε μηχανική επίθεση. Το δέρμα επίσης περιορίζει την απώλεια βασικών συστατικών από το δέρμα, όπως το νερό και οι ηλεκτρολύτες. Η ακεραιότητα του δέρματος και η λειτουργία του ως φραγμός διασφαλίζεται από τη συνεχή ανανέωση της εξωτερικής στιβάδας, του SC. [53]

1.7.2 Δέρμα-Δομή

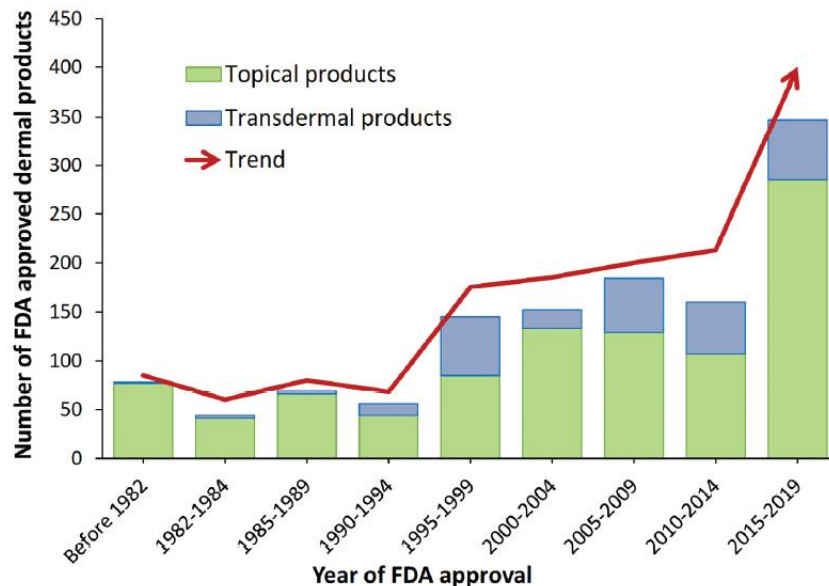
Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος με μέση επιφάνεια περίπου 2m^2 και βάρος περίπου 4 kg. Το δέρμα έχει δύο στιβάδες. Την επιδερμίδα, η οποία είναι η εξωτερική, επιθηλιακή στιβάδα και το χόριο ή κυρίως δέρμα το οποίο αποτελεί την εσωτερική στιβάδα, κάτω από το χόριο υπάρχει χαλαρός συνδετικός ιστός, το υπόδερμα ή υποδόριος ιστός, το οποίο περιέχει άφθονο λίπος. Το δέρμα επίσης έχει και τα εξαρτήματά του, τα οποία είναι οι αδένες (σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί), οι τρίχες και τα νύχια. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται κάθετη τομή δέρματος με διακριτές τις διαφορετικές περιοχές του. [53]



Εικόνα 7: Κάθετη τομή ανθρώπινου δέρματος [53]

1.7.3 Το δέρμα ως οδός απορρόφησης

Τα τελευταία χρόνια το δέρμα χρησιμοποιείται με επιτυχία ως τοπική και συστηματική οδός απορρόφησης δερματικών προϊόντων. Συγκεκριμένα ο αριθμός των δερματικών προϊόντων που έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Ηνωμένων Πολιτειών (ΗΠΑ) έχει αυξηθεί σημαντικά από το 1982 έως το 2019 όπως φαίνεται στην διάγραμμα 4.[54]



Διάγραμμα 4: Δερματικά Προϊόντα που έχουν εγκριθεί κατά την περίοδο 1982-2019 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ[54]

Περίπου το 71% των εγκεκριμένων προϊόντων είναι γενόσημα, τα οποία προορίζονται να μιμηθούν ένα εμπορικό σήμα φαρμάκου σε δοσολογία, ασφάλεια, αντοχή, ποιότητα, απόδοση και προτεινόμενη χρήση.

Σήμερα, η ανάπτυξη δερματικών φαρμάκων βασίζεται γενικά σε μια συστηματική εφαρμοσμένη 'επιστημονική προσέγγιση' που εφαρμόζει προγνωστική μοντελοποίηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του δέρματος και της φυσιολογίας ολόκληρου του σώματος με φυσικοχημικές ιδιότητες δραστικής ουσίας-εκδόχου και φυσικοχημικών σκευασμάτων Αυτή η προσέγγιση μπορεί να διευκολύνει την εξαγωγή ασφαλών και αποτελεσματικών φαρμακευτικών προϊόντων ελαχιστοποιώντας τον αριθμό των κλινικών δοκιμών και γενικά των αρνητικών επιπτώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό και τέλος μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στη μείωση του κόστους παραγωγής.[54]

1.7.2 Τοπική χορήγηση φαρμάκων

Η τοπική χορήγηση ορίζεται ως η εφαρμογή μιας φαρμακοτεχνικής (που περιέχει το φάρμακο) στο δέρμα με στόχο την απευθείας θεραπεία δερματικών ανωμαλιών ή την αντιμετώπιση των δερματικών εκδηλώσεων ασθένειας, με τρόπο ώστε να περιοριστούν οι φαρμακολογικές (ή και άλλες) δράσεις του φαρμάκου στην επιφάνεια του δέρματος ή μέσα στο δέρμα. Η τοπική χορήγηση μπορεί ή όχι να προϋποθέτει ενδοδερμική διείσδυση και εναπόθεση. Η συστηματική απορρόφηση μπορεί να μην αποφεύγεται πάντα, είναι όμως πάντα μη επιθυμητή. Τα δυο πιο βασικά συστήματα τοπική χορήγησης αποτελούν οι

αλοιφές και οι κρέμες. Ωστόσο χρησιμοποιούνται επίσης γέλες, αφροί, σπρέι, σκόνες, διαλύματα, λοσιόν, και αυτοκόλλητα συστήματα. Στόχος της τοπικής χορήγησης είναι να επιτευχθεί εκδήλωση φαρμακολογικής δράσης του φαρμάκου κάτω και γύρω από τη θέση εφαρμογής. Αυτό προϋποθέτει απορρόφηση και εναπόθεση στην ευρύτερη περιοχή (regional). Οι συγκεντρώσεις πρέπει να είναι υψηλότερες από αυτές που επιτυγχάνονται μετά από συστηματική χορήγηση ίδιας ποσότητας φαρμάκου. Η χορήγηση σε ευρύτερη περιοχή (regional) επιτυγχάνεται με συμβατικές μορφές χορήγησης (π.χ. αλοιφές και κρέμες), αλλά επίσης και μεγάλα αυτοκόλλητα συστήματα (patches), κλπ.[53]

1.7.3 Διαδερμική χορήγηση

Η διαδερμική χορήγηση περιλαμβάνει εφαρμογή του φαρμάκου στο δέρμα, με στόχο να αντιμετωπιστεί μία συστηματική ασθένεια και στοχεύει στην επίτευξη συστηματικά ενεργών επιπέδων του φαρμάκου. Εδώ, η διαδερμική απορρόφηση μαζί με ικανή συσσώρευση του φαρμάκου στην κυκλοφορία, είναι απολύτως απαραίτητα. Σε ένα ιδανικό σενάριο δε θα έπρεπε να υπάρχει τοπική συσσώρευση του φαρμάκου, το γεγονός αυτό είναι αναπόφευκτο καθώς το φάρμακο αναγκάζεται να διαχυθεί μέσω μιας αρκετά μικρής επιφάνειας επαφής. Ακολουθως, οι υψηλές και συχνά βλαβερές συγκεντρώσεις του φαρμάκου στον ενεργό ιστό που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια επαφής με το αυτοκόλλητο, συσσωρεύονται λόγω της φύσης της διαδικασίας.

1.7.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τοπικής ή διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων

Η χορήγηση φαρμάκων μέσω του δέρματος χρησιμοποιώντας ένα τοπικό –διαδερμικό σύστημα χορήγησης, προσφέρει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων, σε σύγκριση με άλλες συμβατικές οδούς χορήγησης.

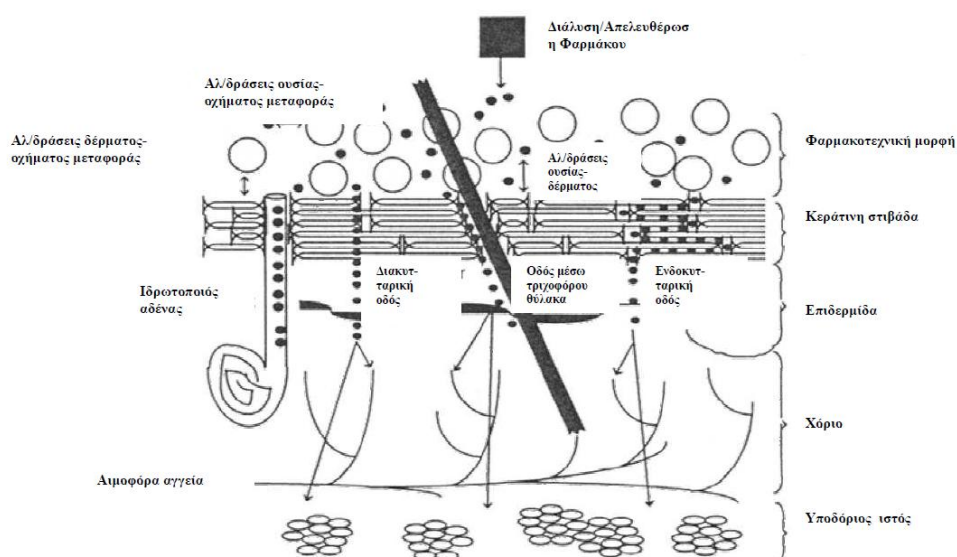
1. Και οι δύο οδοί χορήγησης αποφεύγουν την αλληλεπίδραση των φαρμάκων με το γαστρεντερικό σωλήνα, αποφεύγοντας έτσι μεταβολές στην απορρόφηση του φαρμάκου λόγω αλλαγής του pH, επίδρασης τροφής, μεταβολής του χρόνου εκκένωσης του στομάχου, μεταβολής της εντερικής κινητικότητας και επίδρασης των βακτηριακών ενζύμων.
2. Τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης φαρμάκων(transdermal drug delivery systems-TDDS), ελαχιστοποιούν τους κινδύνους και τις δυσκολίες συνδέονται με ενδοφλέβια θεραπεία.
3. Τα TDDS εισχωρούν το φάρμακο στη γενική κυκλοφορία κατευθείαν μετά την διαδερμική απορρόφηση μέσω του αίματος και έτσι αποφεύγεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου από το ήπαρ.
4. Σταθερός έλεγχος του ρυθμού απόδοσης του φαρμάκου, για μεγάλο χρονικό διάστημα διατηρώντας σταθερά επίπεδα στο πλάσμα, ακόμη και για φάρμακα με μικρό χρόνο ημιζωής.[53]
5. Πρόκειται για μη επεμβατικές μεθόδους χορήγησης με την δυνατότητα εφαρμογής από τον καθένα. Η θεραπεία μπορεί να τερματιστεί αμέσως απλώς απομακρύνοντας τη φαρμακοτεχνική μορφή με το φάρμακο από το δέρμα.

Ωστόσο αν και η τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκων εμφανίζει αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματα, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα που σχετίζονται με αυτό τον τύπο χορήγησης. Τα μειονεκτήματα των οδών αυτών χορήγησης σχετίζονται με το δερματικό

φραγμό και τις αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων με το δέρμα, συμπεριλαμβανομένων του πιθανού ερεθισμού και τοξικών επιδράσεων.[53]

1.7.5 Μηχανισμοί διείσδυσης φαρμάκων μέσω του ανθρώπινου δέρματος

Οι πιο σύνηθες οδοί μέσω των οποίων μία χημική ουσία διαπερνά το ανθρώπινο δέρμα είναι τα διαεπιδερμικά μονοπάτια (μέσω των κερατινοποιημένων στοιβάδων, είτε ενδο- είτε δια-κυτταρικά), οι ιδρωτοποιοί αδένες, και οι δίοδοι μέσω των πόρων των τριχών ή των σμηγματογόνων αδένων (pilosebaceous). Η πιο συχνή οδός είναι η ενδοκυτταρική οδός, όπου το φάρμακο διαχέεται μέσω του στενά τοποθετημένου λιπιδικού στρώματος που περιβάλλει τα κερατινοκύτταρα. Η δια-κυτταρική οδός είναι πολύ σπάνια, αφού απαιτεί φάρμακα με πολύ συγκεκριμένα χαρακτηριστικά λιποφιλικότητας αλλά και υδροφιλικότητας. Η οδός μέσω του τριχοφόρου θύλακα περιλαμβάνει τη διείσδυση μέσω των θυλακών των τριχών, αλλά επειδή οι θύλακες αποτελούν μόνο το 0,1% της συνολικής επιφάνειας του δέρματος στον άνθρωπο, αυτή η οδός δε θεωρείται σημαντική αν και μπορεί να είναι μεγάλης σημασίας σε ορισμένες περιπτώσεις όπου η στόχευση σε αυτή την οδό χορήγησης μπορεί να δημιουργήσει διαδερμική δεξαμενή. Στην εικόνα 12 αναπαρίστανται οι διάφοροι μηχανισμοί διείσδυσης φαρμάκων στο δέρμα.[53]



Εικόνα 8: Μηχανισμοί εισόδου φαρμάκων στο δέρμα

1.7.6 Βασικά χαρακτηριστικά φαρμάκου για τοπική-διαδερμική χορήγηση [slide φαρμακευτικής χημείας]

Παρά των μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων που προσφέρει η τοπική-διαδερμική χορήγηση φαρμάκων, ωστόσο δεν μπορεί να εφαρμοστεί για οποιοδήποτε είδος φαρμακευτικής δραστικής ουσίας.[53]

Συγκεκριμένα:

1. Εφαρμόζεται για μικρή δόση φαρμάκου (<20mg/ημέρα)
2. Το φάρμακο πρέπει να έχει μικρό Μ.Β (Μοριακό Βάρος) (<400)
3. Επαρκής λιποφιλία ($\log P > 1$)
4. Εξαιρούνται τα ερεθιστικά φάρμακα

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η μελέτη του μηχανισμού έκλυσης μιας σειράς φαρμάκων μέσω υγρής χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) και ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) και η συσχέτιση της με την ικανότητα που έχει ένα φάρμακο να απορροφάται διαδερμικά.

2.2 Αντιδραστήρια

Για την παρασκευή της κινητής φάσης(ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) των στηλών HSA και IAM χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενώσεις:

- KH_2PO_4 (ChemLab)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Honeywell-Fluka)
- NaCl (Honeywell-Fluka)
- KCl (Riedel-de Haen)
- Νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water)

Για τον υπολογισμό του νεκρού χρόνου σε κάθε στήλη παρασκευάστηκε διάλυμα κιτρικού νατρίου και κινητής φάσης.

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε καθόλη την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν υπερ-κάθαρο.

2.3 Οργανολογία

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφική διάταξη(HPLC KNAUER) η οποία αποτελείται από τα ακόλουθα επιμέρους όργανα :

- **Αντλία:** Ρυθμισμένη σε ροή 1mL/min της εταιρείας Knauer (HPLC Pump k-1001)
- **Στήλη:** Ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM) και ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) .
- **Ανιχνευτής:** UV Detector K-2501 της εταιρείας Knauer. Ο ανιχνευτής συνδέεται με τον υπολογιστή ο οποίος με βάση το σήμα που λαμβάνει ο ανιχνευτής από το διάλυμα διαμορφώνει το χρωματογράφημα.
- **Απαερωτής:** Vacuum Degasser, της εταιρείας Knauer. Ο ρόλος του απαερωτή είναι να εμποδίζει την συσσώρευση φυσαλίδων αέρα στο σωλήνα της κινητής φάσης, ούτως ώστε να ρέει μόνο ο διαλύτης έκλυσης αποφεύγοντας έτσι τυχόν λανθασμένες μετρήσεις ή και ανωμαλίες στο σύστημα.
- **Διαχειριστής διαλύτη:** Solvent Organizer K-1500 της Knauer. Η παρούσα συσκευή περιλαμβάνει σωλήνες που συνδέουν τα δοχεία των διαλυμάτων με τον απαερωτή, ωστόσο ο διαλύτης έκλυσης είναι ένας, έτσι χρησιμοποιείται ένας σωλήνας για την ροή της κινητής φάσης.



Εικόνα 9: Σύστημα υγροχρωματογραφίας του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της παρούσας διπλωματικής εργασίας



Εικόνα 10: Στήλη IAM.PC.DD.2 της εταιρείας REGIS



Εικόνα 11: Στήλη HSA της εταιρείας CHIRAL

Η ζύγιση των επιμέρους αντιδραστηρίων για την παρασκευή της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε σε ζυγό ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων (Ohaus), η ρύθμιση του pH έγινε με τη χρήση πεχαμέτρου (MP125, Mettler Toledo). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη και καταγραφή των μετρήσεων ήταν το “EuroChrom2000”.

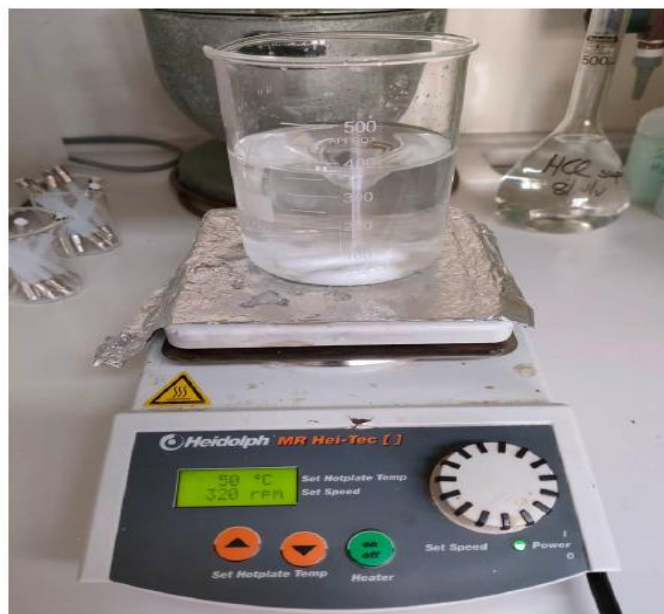
2.4 Πειραματική Διαδικασία

2.4.1 Παρασκευή κινητής φάσης

Για την παρασκευή της κινητής φάσης τελικού όγκου 500mL, αρχικά ζυγίζονται 3.44g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.77g KH_2PO_4 , 4g NaCl, 0.1g KCl διαλύονται σε 300-400mL υπερκάθαρο νερό. Ακολουθεί ανάδευση με ρυθμό 300-350rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί πλήρη διάλυση των αιωρούμενων στερεών το pH ρυθμίζεται στο 5.5 με προσθήκη αραιωμένου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl) 0.1M. Η μέτρηση του pH γίνεται με τη βοήθεια πεχάμετρου. Το αρχικό pH του διαλύματος είναι περίπου ίσο με 7 για αυτό και απαιτείτε όξινο διάλυμα για τη ρύθμιση στο 5.5. Τέλος γίνεται μεταφορά του διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 500mL και προσθήκη υπερκάθαρου νερού μέχρι τη χαραγή.

2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία βρίσκονταν σε μορφή σκόνης, αμπούλας ή δισκίου. Για τις δύο πρώτες περιπτώσεις δεν χρειάστηκε προκατεργασία ενώ στην περίπτωση των δισκίων πραγματοποιήθηκε λειοτρίβιση για να μετατραπούν σε σκόνη. Στην συνέχεια τα φάρμακα διαλύονταν σε μικρή ποσότητα κινητής φάσης ή οργανικών διαλυτών όπως π.χ μεθανόλη, αιθανόλη, τετραυδροφουράνιο ανάλογα με την διαλυτότητα τους.



Εικόνα 12: Ανάδευση κινητής φάσης

2.4.3 Χρωματογραφική Διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιείται ενεργοποίηση των συσκευών του χρωματογραφικού συστήματος και αναμονή μερικών λεπτών μέχρι να σταθεροποιηθούν οι συνθήκες λειτουργίας τους. Ακολουθεί απαέρωση του διαλύματος της κινητής φάσης για 30-40 λεπτά μέχρι να σταθεροποιηθεί η βάση γραμμής (baseline) του συστήματος. Πριν την έναρξη των μετρήσεων καθώς και μετά το πέρας αυτών, λαμβάνονται τρεις μετρήσεις για το νεκρό χρόνο χρησιμοποιώντας κιτρικό νάτριο αραιωμένο με κινητή φάση. Η έκχυση των δειγμάτων γίνεται με τη χρήση σύριγγας των 100μL. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων γίνεται εκ νέου απαέρωση για περίπου 2-3 λεπτά και καθαρισμός της στήλης με διάλυμα νερό-ακετονιτρίλιο, το οποίο ρέει στη στήλη για 40-45 λεπτά ούτως ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα φαρμάκων και οργανικών ουσιών που έχουν συγκερατηθεί στη στήλη. Σε κάθε φαρμακευτική ένωση και στο νεκρό χρόνο έγιναν τρεις μετρήσεις. Για τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής ($\log k$), λήφθηκε ο μέσος όρος των χρόνων και ύστερα εφαρμόστηκε η σχέση:

$$\log k = \log\left(\frac{t_R - t_0}{t_0}\right)$$

όπου t_R = ο χρόνος κατακράτησης της κάθε ένωσης στη στήλη

t_0 = ο νεκρός χρόνος

Γενικά οι υδρόφιλες ενώσεις εκκλύονται γρήγορα, δηλαδή σε μικρούς χρόνους t_R , ενώ οι λιπόφιλες ενώσεις σε μεγαλύτερους χρόνους t_R .

2.4.4 Φάρμακα που μελετήθηκαν

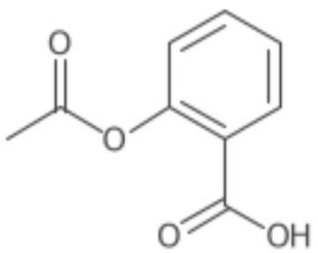
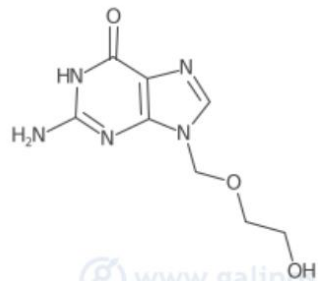
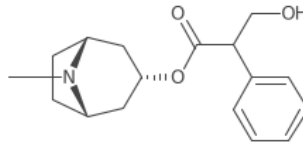
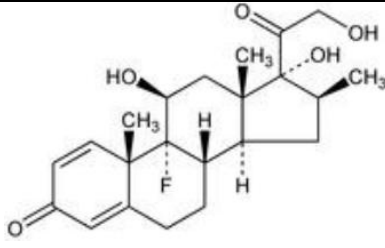
Μελετήθηκαν συνολικά 26 φάρμακα σε pH=5.5. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 5.5 εφόσον το πρόκειται για δερματική απορρόφηση, όπου το ανθρώπινο δέρμα έχει

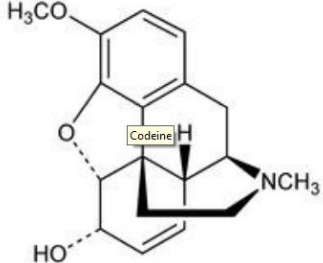
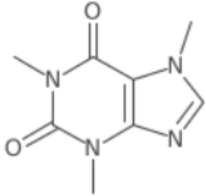
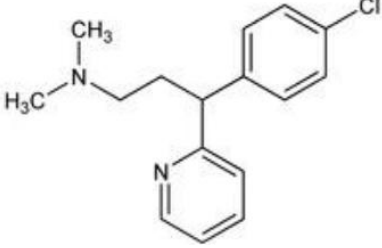
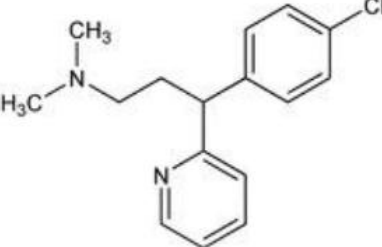
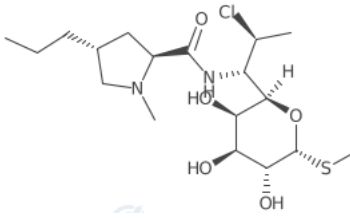
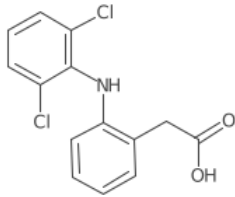
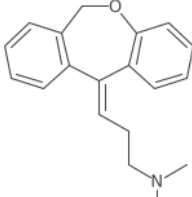
περίπου παρόμοιο pH. Η κατηγοριοποίηση των φαρμάκων βάσει του ιοντισμού τους είναι η εξής:

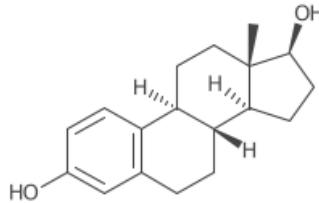
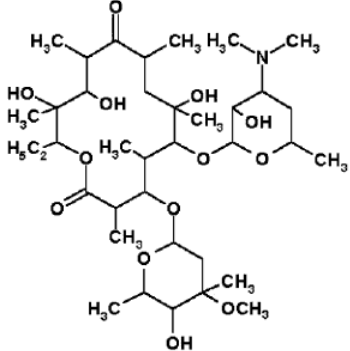
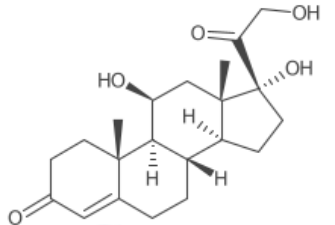
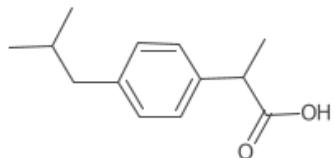
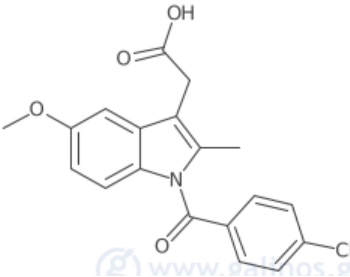
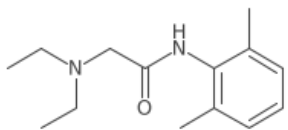
- A: Οξέα (Acids)
- B: Βάσεις(Bases)
- N: Ουδέτερα(Neutrals)
- Z: Αμφολύτες (Zwitterions)

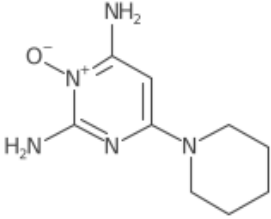
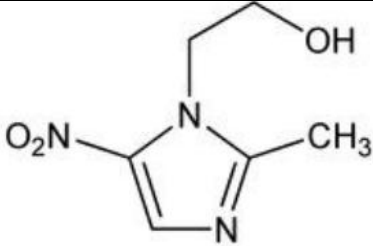
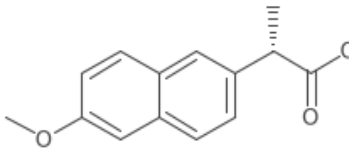
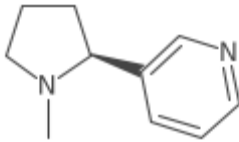
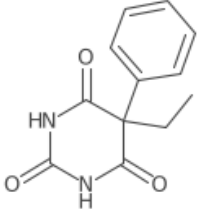
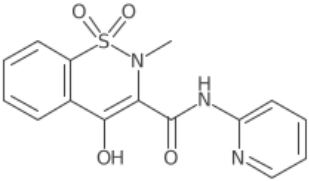
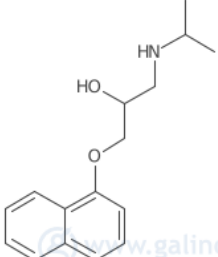
Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται όλα τα φάρμακα που μελετήθηκαν με τον τύπο, τη φαρμακολογική τους δράση και τη δομή τους.

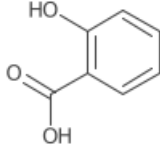
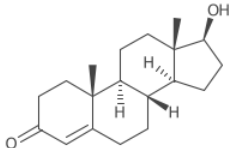
Πίνακας 1: Φάρμακα που μελετήθηκαν και τα χαρακτηριστικά τους[55]

A/A	Φάρμακο	Κατηγορία	Φαρμακολογική Δράση	Δομή
1	Acetylsalicylic acid	A	Αντιπυρετικό, αναλγητικό και αντιφλεγμονώδες	
2	Acyclovir	N	Αντι-ϊικό	
3	Atropine	B	Αντιχολινεργικό	
4	Betamethasone	N	Στεροειδές	

5	Codein	B	Οπιοειδές αναλγητικό	
6	Caffeine	N	Διεγερτικό ΚΝΣ	
7	Chlorpheniramine	B	Αντιισταμινικό	
8	Clonidine	B	Αντιυπερτασικό	
9	Clidamycin	B	Αντιβιοτικό	
10	Diclofenac	A	Μη στεροειδές	
11	Doxepin	B	Αντικαταθλιπτικό	

12	Estradiol	N	Στεροειδές ορμονικό οιστρογόνο	
13	Erythromycin	B	Αντιβιοτικό	
14	Hydrocortisone	N	Στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
15	Ibuprofen	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
16	Indomethacin	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
17	Lidocaine	B	Τοπικό αναισθητικό	

18	Minoxidil	N	Αντιυπερτασικό	
19	Metronidazole	N	Αντιβιοτικό	
20	Naproxen	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
21	Nicotine	B	Διεγερτικό του ΚΝΣ	
22	Phenobarbital	N	Αντιεπιληπτικό	
23	Piroxicam	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
24	Propranolol	B	Καρδιολογικό	

25	Salicylic acid	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
26	Testosterone	N	Ανδρογόνο	

2.4.5 Πειραματικά δεδομένα συντελεστών κατακράτησης στις στήλες IAM και HSA

Στον Πίνακα 2 παρατίθενται τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης για τη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM) και της στήλης Ακίνητοποιημένης Ανθρώπινης Λευκωματίνης του ορού (HSA).

Πίνακας 2: Πειραματικά δεδομένα συντελεστών κατακράτησης (logk)

A/A	Φάρμακο	Κατηγορία	IAM.PC.DD.2	HSA
1	Acetylsalicylic acid	A	-0.81	-0.70
2	Acyclovir	N	-0.27	-0.64
3	Atropine	B	1.12	0.00
4	Betamethasone	N	-	1.93
5	Codein	B	0.95	0.31
6	Caffeine	N	0.26	-0.51
7	Chlorpheniramine	B	2.03	1.00
8	Clidamicin	B	0.93	0.06
9	Clonidine	B	1.12	0.15
10	Diclofenac	A	2.46	2.04
11	Doxepin	B	2.50	1.36
12	Erythromycin	B	-	0.00
13	Estradiol	N	2.59	1.70
14	Hydrocortisone	N	0.94	0.33
15	Ibuprofen	A	0.87	0.73
16	Indomethacin	A	2.41	1.53
17	Lidocaine	B	1.27	-0.02
18	Metronidazole	N	0.33	-0.58
19	Minoxidil	N	0.73	0.29
20	Naproxen	A	0.98	2.00
21	Nicotine	B	0.09	-0.24
22	Phenobarbital	N	0.28	0.24
23	Piroxicam	A	1.35	2.06
24	Propranolol	B	2.33	0.79
25	Salicylic acid	A	-0.30	1.13
26	Testosterone	N	-	1.76

3. Βιβλιογραφικά δεδομένα

Για την διεκπεραίωση της στατιστικής ανάλυσης των πειραματικών μετρήσεων λήφθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από πρόσφατες διπλωματικές εργασίες καθώς επίσης και από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 της εταιρείας Pharma Algorithms.

3.1 Φυσικοχημικά δεδομένα

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα δεδομένα των συντελεστών μερισμού ($\log P$), των συντελεστών κατανομής ($\log D$), κλάσμα θετικού φορτίου σε $\text{pH}=5.5$ (F^+), κλάσμα αρνητικού φορτίου σε $\text{pH}=5.5$, παράμετροι Abraham (A,B), εμβαδόν πολικής επιφάνειας (TPSA), μοριακό βάρος (MW). Τα δεδομένα αντλήθηκαν από το λογισμικό ADME Boxes 3.0 προκειμένου να αξιοποιηθούν ως παράμετροι για την καθόλη επεξεργασία.

Πίνακας 2: Φυσικοχημικά δεδομένα των ενώσεων

A/A	Φάρμακο	$\log P$	$\log D$	F^+	F^-	A	B	TPSA	MW
1	Acetylsalicylic acid	1.19	-2.5	0	1	0.49	1	63.6	180.16
2	Acyclovir	-1.56	-1.56	0	0.009	0.4	1.88	114.76	225.2
3	Atropine	1.83	-0.41	0.996	0	0.26	1.73	49.77	289.37
4	Betamethasone	1.94	1.94	0	0	0.8	1.97	94.83	392.46
5	Codeini	1.14	0.37	0.848	0	0.33	1.78	41.93	299.36
6	Caffeine	-0.07	-0.07	0	0	0.05	1.28	58.44	194.19
7	Chlorpheniramine	3.39	1.58	0.986	0	0	1.35	16.13	274.79
8	Clidamicin	2.16	1.69	0.689	0	1.02	2.56	127.56	424.98
9	Clonidine	1.59	0.97	0.779	0	0.55	1.16	36.42	230.09
10	Diclofenac	4.04	1.15	0	0.999	0.63	0.96	49.33	296.15
11	Doxepin	4.29	3.95	0.982	0	0	0.98	12.47	279.38
12	Erythromycin	2.54	1.32	0.946	0	1.05	4.63	193.91	733.92
13	Estradiol	4.01	4.01	0	0.001	0.86	1.1	40.46	272.38
14	Hydrocortisone	1.6	1.6	0	0	0.71	1.9	94.83	362.46
15	Ibuprofen	3.5	1.07	0	0.999	0.59	0.81	37.3	206.28
16	Indomethacin	4.27	1.03	0	0.998	0.57	1.57	68.53	357.79
17	Lidocaine	2.26	1.71	0.779	0	0.12	1.21	32.34	234.34
18	Metronidazole	-0.02	-0.02	0	0	0.18	1.03	86.88	171.15
19	Minoxidil	1.24	1.23	0.002	0	0.45	1.09	93.63	209.25
20	Naproxen	3.18	0.33	0	0.999	0.6	0.68	46.53	230.26
21	Nicotine	1.13	0.26	0.875	0	0	1.08	16.13	162.23
22	Phenobarbital	1.47	1.14	0	0.416	0.73	1.15	75.27	232.23
23	Piroxicam	1.76	-0.05	0	1	0.55	1.82	107.98	331.35
24	Propranolol	2.98	1.26	0.994	0	0.17	1.42	41.49	259.34
25	Salicylic acid	2.26	-1.67	0	1	0.71	0.38	57.53	138.12
26	Testosterone	3.32	3.32	0	0	0.32	1.19	37.3	288.42

3.2 Δεδομένα δερματικής απορρόφησης-συντελεστής διαδερμικής απορρόφησης (logkP)

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι συντελεστές διαδερμικής απορρόφησης (logkP) κάθε ένωσης οι οποίοι αντλήθηκαν βιβλιογραφικά. [56 57 58]

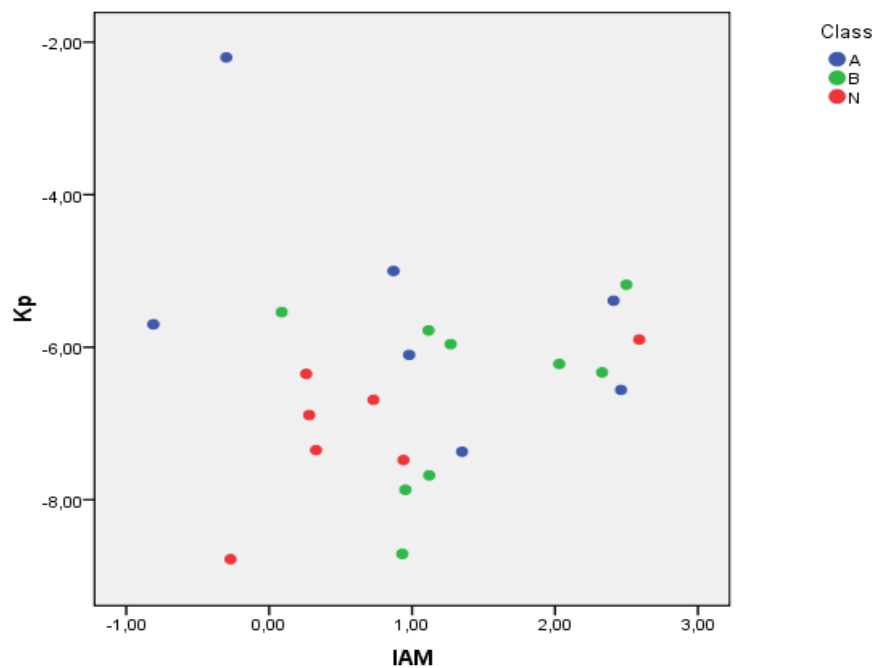
Πίνακας 3: Συντελεστές διαδερμικής απορρόφησης (logkP)

A/A	Φάρμακο	logkP
1	Acetylsalicylic acid	-5.70
2	Acyclovir	-8.78
3	Atropine	-7.68
4	Betamethasone	-6.13
5	Codeini	-7.87
6	Caffeine	-6.35
7	Chlorpheniramine	-6.22
8	Clidamicin	-8.71
9	Clonidine	-5.78
10	Diclofenac	-6.56
11	Doxepin	-5.18
12	Erythromycin	-8.60
13	Estradiol	-5.90
14	Hydrocortisone	-7.48
15	Ibuprofen	-5.00
16	Indomethacin	-5.39
17	Lidocaine	-5.96
18	Metronidazole	-7.35
19	Minoxidil	-6.69
20	Naproxen	-6.10
21	Nicotine	-5.54
22	Phenobarbital	-6.89
23	Piroxicam	-7.37
24	Propranolol	-6.33
25	Salicylic acid	-2.20
26	Testosterone	-5.48

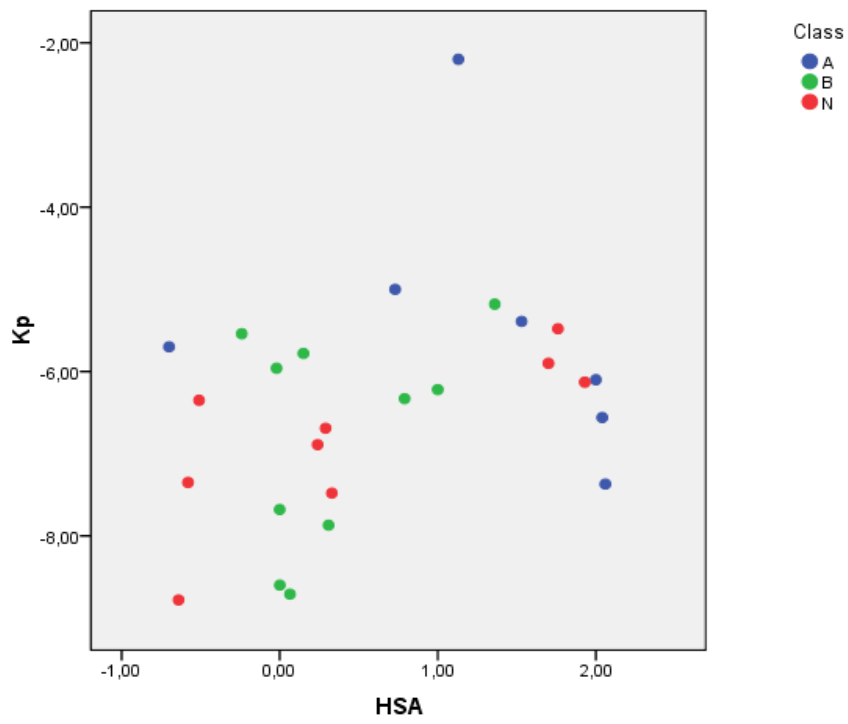
4.Αποτελέσματα-Επεξεργασία

4.1 Απλή Γραμμική Παλινδρόμηση

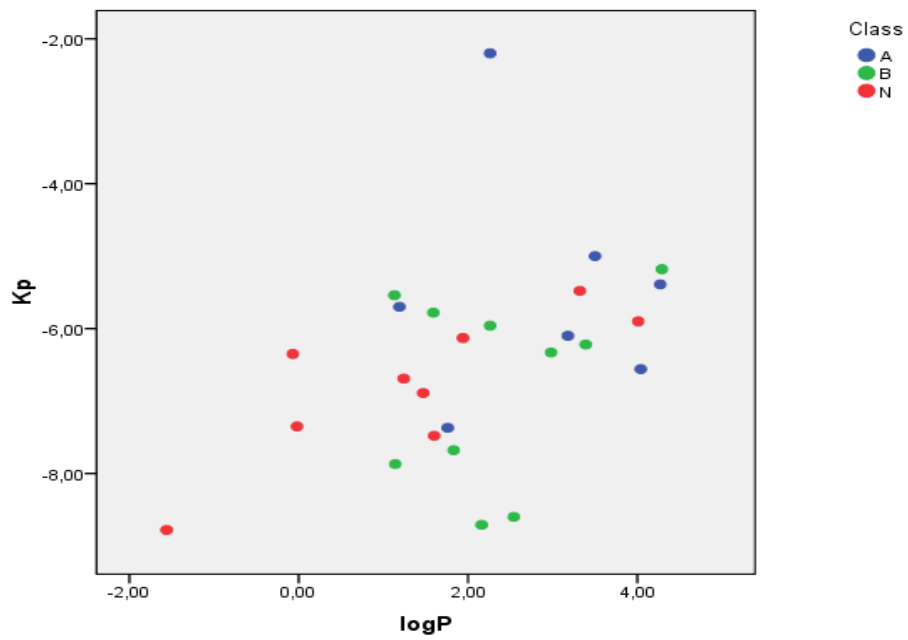
Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν έχουν υποστεί επεξεργασία με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Σκοπός της ακόλουθης επεξεργασίας είναι η συσχέτιση της δερματικής απορρόφησης των φαρμάκων που μελετήθηκαν με τις επιμέρους φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Στην γραμμική παλινδρόμηση που εφαρμόστηκε, ορίστηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή ο συντελεστής διαδερμικής απορρόφησης (K_p) και ως εξαρτημένη μεταβλητή ο συντελεστής κατακράτησης των στηλών IAM και HSA, ο συντελεστής μερισμού ($\log P$), το εμβαδόν πολικής επιφάνειας (TPSA), το μοριακό βάρος (MW) και τέλος οι παράμετροι Abraham A και B. Η μέθοδος εκτελέστηκε σε λογισμικό SPSS. Οι κουκίδες με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύουν τα φάρμακα που είναι οξέα, με πράσινο χρώματα αυτά που είναι βάσεις και με κόκκινο χρώμα αυτά που είναι ουδέτερα.



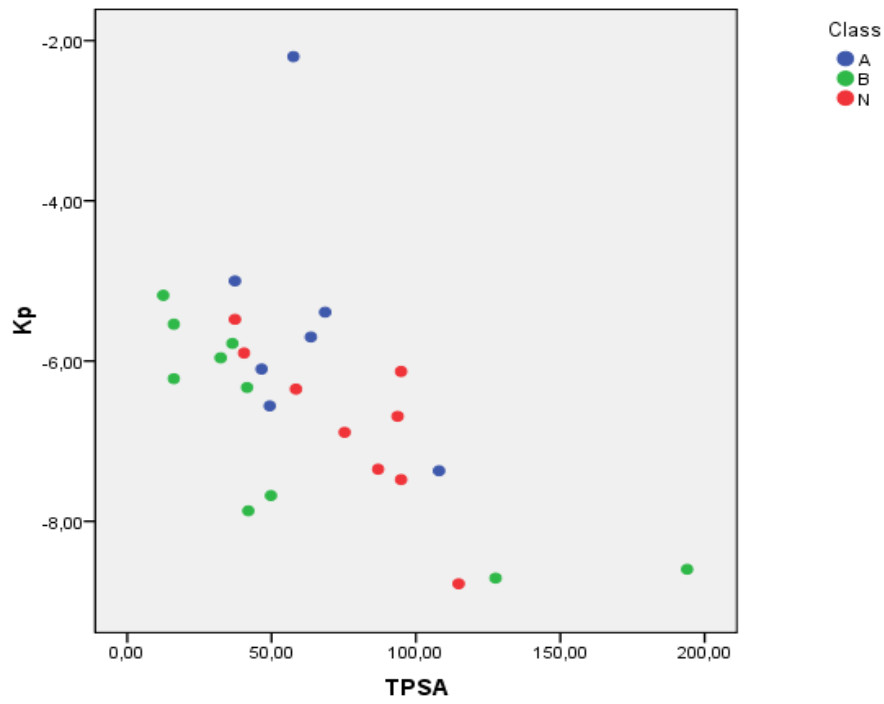
Διάγραμμα 5: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει του συντελεστή κατακράτησης $\log k_w(\text{IAM})$



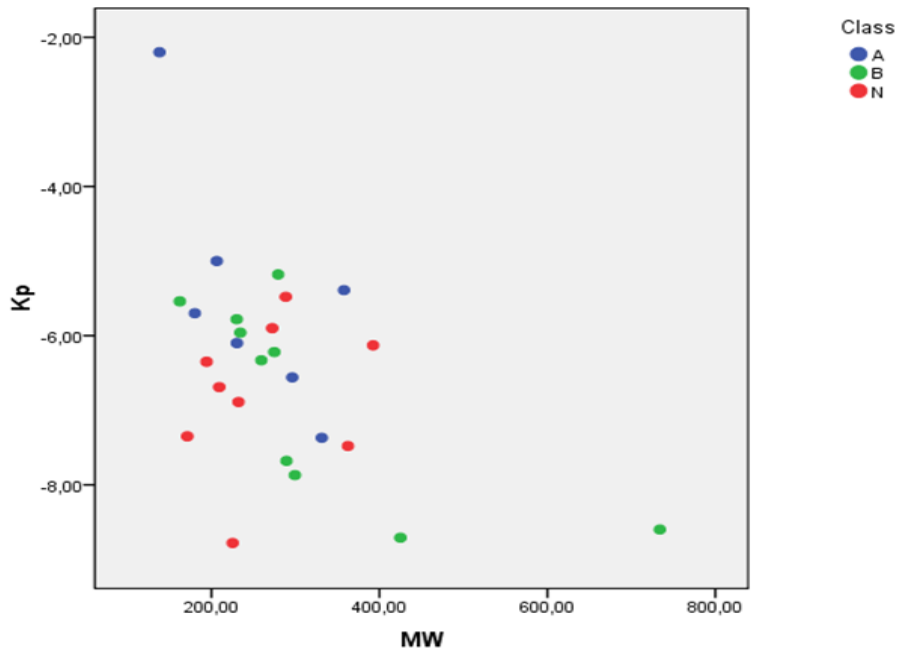
Διάγραμμα 6: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει συναρτήσει του συντελεστή κατακράτησης $\log_{10}(HSA)$



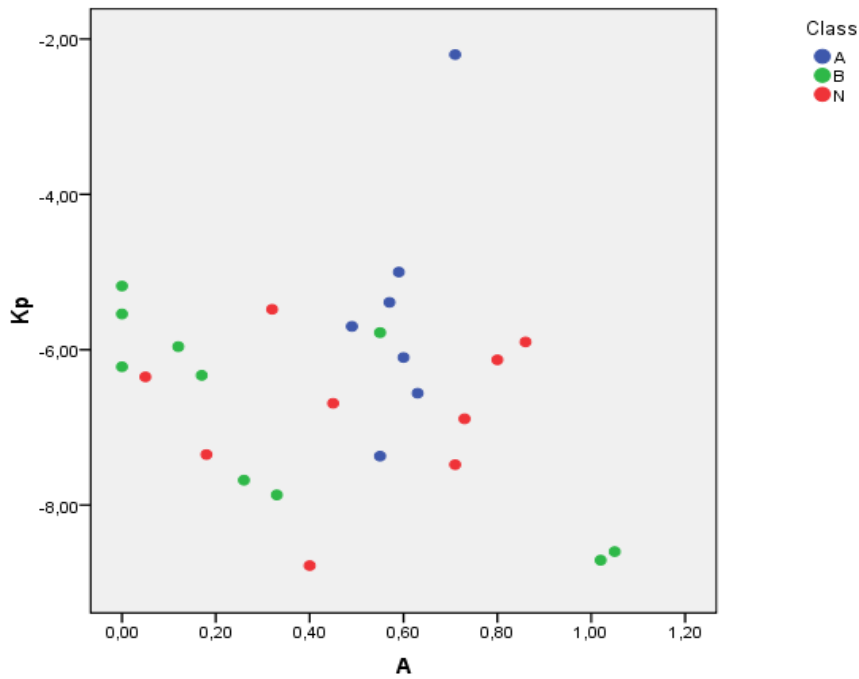
Διάγραμμα 7: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει του συντελεστή μερισμού ($\log P$)



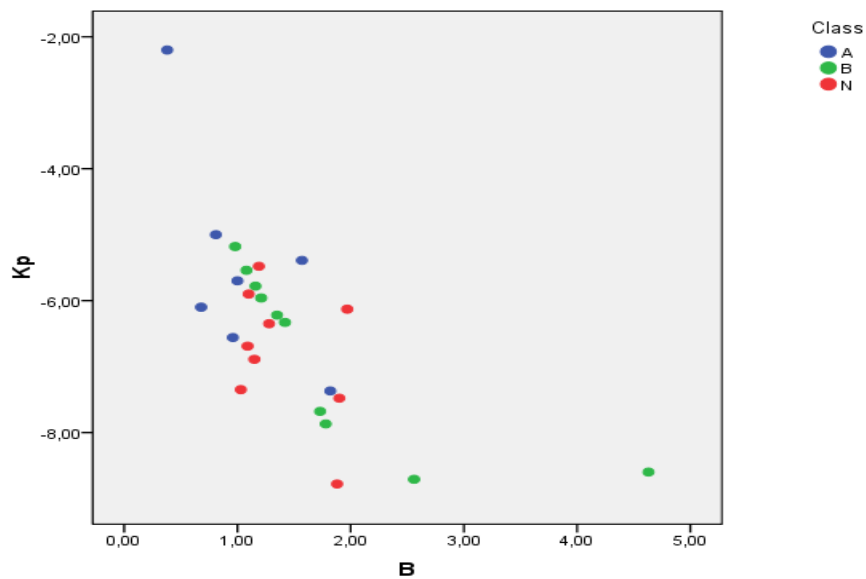
Διάγραμμα 8: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει της τοπολογικής πολικής επιφάνειας (TPSA)



Διάγραμμα 9: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει του μοριακού βάρους(MW)



Διάγραμμα 10: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει οξύτητας δεσμού υδρογόνου κατά Abraham(A)



Διάγραμμα 11: Δερματική απορρόφηση συναρτήσει βασικότητας δεσμού υδρογόνου κατά Abraham (B)

4.2 Πολλαπλή Γραμμική Παλινδρόμηση

Μια άλλη επεξεργασία που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική ήταν αυτή της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Η επεξεργασία αυτή έγινε με τη βοήθεια του SPSS. Ως εξαρτημένη μεταβλητή ορίστηκε ο συντελεστής διαδερμικής απορρόφησης ($\log K_p$) κάθε φαρμάκου ενώ ως ανεξάρτητες μεταβλητές ο συντελεστής μερισμού ($\log P$) και η

βασικότητα δεσμού υδρογόνου κατά Abraham (B). Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για logK_p ως συνάρτηση του logP και B.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα για logK_p ως συνάρτηση του συντελεστή logP και της παραμέτρου B

A/A	Μοντέλο	Παράμετρος	N	R	R ²	S	F
1	logP	B	26	0.762	0.580	0.938	15.9

Η εξίσωση που εξάγεται από την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση είναι η ακόλουθη:

$$\log K_p = 0.340(\pm 0.132) \cdot \log P - 1.108(\pm 0.235) \cdot B - 5.549(\pm 0.500)$$

5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων-Σχολιασμός

5.1 Διαγράμματα απλής γραμμικής παλινδρόμησης

Αρχικά στο διάγραμμα 5 όπου προσομοιάζεται ο συντελεστής διαδερμικής απορρόφησης logK_p συναρτήσει του συντελεστή κατακράτησης logK στη στήλη IAM, παρατηρούμε ότι δεν προκύπτει κάποια συσχέτιση. Ομοίως στο διάγραμμα 6 όπου έγινε προσπάθεια προσαρμογής logK_p συναρτήσει logK στη στήλη HSA δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση. Με λίγα λόγια οι συντελεστές κατακράτησης (logK) των στηλών IAM και HSA φαίνεται να μην συνδέονται άμεσα με την ικανότητα ενός φαρμάκου να απορροφάται διαδερμικά. Ακολούθως στο διάγραμμα 7 όπου αναπαρίσταται ο logK_p συναρτήσει του συντελεστή λιποφιλίας (logP) αβίαστα εξάγουμε το συμπέρασμα πως αύξηση της λιποφιλίας έχει θετική επίπτωση στην δερματική απορρόφηση. Μετέπειτα στο διάγραμμα 8 logK_p συναρτήσει της τοπολογικής πολικής επιφάνειας (TPSA) φαίνεται να υπάρχει μια γενική τάση όταν αυξάνεται η πολική επιφάνεια να προκαλείται μείωση της δερματικής απορρόφησης. Στην συνέχεια στο διάγραμμα 9 logK_p-MW όπως προκύπτει αβίαστα και από την θεωρία όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος μια ένωσης τόσο πιο δύσκολα απορροφάται διαδερμικά. Στο διάγραμμα 10 logK_p-A δεν προκύπτει κάποια εμφανής συσχέτιση μεταξύ A και δερματικής απορρόφησης. Αντίθετα στο διάγραμμα 11 logK_p-B αύξηση του B φέρει μείωση στην δερματική απορρόφηση. Με βάση τις πιο πάνω προσαρμογές συμπεραίνουμε ότι η ικανότητα ενός φαρμάκου να απορροφάται διαδερμικά δεν σχετίζεται με τους συντελεστές κατακράτησης logK των στηλών IAM και HSA αλλά εξαρτάται κυρίως από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου.

5.2 Μοντέλο πρόβλεψης δερματικής απορρόφησης με πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση

Το μοντέλο στόχευε στη συσχέτιση της δερματικής απορρόφησης (logK_p) με το συντελεστή μερισμού (logP), χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος η βασικότητα δεσμών υδρογόνου κατά Abraham (B). Σε γενικές γραμμές παρατηρούμε μια όχι τέλεια αλλά καλή προσαρμογή του μοντέλου αφού έδωσε συντελεστή προσδιορισμού R²=0.580, μια τυπική απόκλιση s=0.938

και $F=15.9$. Το γεγονός αυτό έγκειται στο ότι οι παράμετροι $\log P$ και B συνδέονται άμεσα με την ικανότητα ενός φαρμάκου να απορροφάται διαδερμικά.

6. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τη μελέτη του μηχανισμού έκλουσης των 26 φαρμακευτικών ενώσεων που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία επιβεβαιώθηκε πως ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την κατακράτηση των ενώσεων από τις στήλες στη βιομιμητική χρωματογραφία είναι η υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι ενώσεις με υψηλότερους συντελεστές μερισμού ($\log P$) παρουσίασαν υψηλότερους χρόνους κατακράτησης (t_r) άρα και υψηλότερους συντελεστές κατακράτησης $\log k_w(\text{IAM})$ και $\log k_w(\text{HSA})$. Όσον αφορά τώρα την συσχέτιση δερματικής απορρόφησης και συντελεστών κατακράτησης όπως προκύπτει και από τα διαγράμματα δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια εξάρτηση. Αντίθετα φαίνεται πως αύξηση της λιποφιλίας έχει θετική επίπτωση στην δερματική απορρόφηση.

Από την άλλη πλευρά η συσχέτιση δερματικής απορρόφησης και φυσικοχημικών ιδιοτήτων επέφερε πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα αύξηση της πολικής επιφάνειας κάθε ένωσης (TPSA) όπως επίσης και της βασικότητας δεσμού υδρογόνου κατά Abraham (B) επιφέρει εμφανή μείωση της δερματικής απορρόφησης. Αβίαστα όπως προκύπτει από τη θεωρία αύξηση του μοριακού βάρους έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της δερματικής απορρόφησης. Επίσης ικανοποιητικό αποτέλεσμα έδωσε το μοντέλο πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης όπου συσχετίζει τη δερματική απορρόφηση με το συντελεστή μερισμού ($\log P$) και τη βασικότητα δεσμού υδρογόνου κατά Abraham (B), με $R^2=0.580$ και $s=0.980$.

Εν κατακλείδι μπορεί η συγκεκριμένες στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος να μην έδωσαν κάποια εξάρτηση με δερματική απορρόφηση επιβεβαιώθηκε όμως αυτό που εξάγεται αβίαστα από τη θεωρία, ότι γενικά οι φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε ένωσης παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δερματική απορρόφηση της.

7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Μετά το πέρας της παρούσας διπλωματικής εργασίας και με σκοπό της εξέλιξη της επιστήμης διατυπώνονται κάποιες προτάσεις για μελλοντική έρευνα. Αρχικά προτείνεται η διεύρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων που εκλύονται και η δοκιμή διαφορετικών στηλών με τη μέθοδο της βιομιμητική χρωματογραφίας υπό τις ίδιες συνθήκες, με σκοπό να βρεθεί μια στήλη που να προσομοιάζει καλύτερα το δέρμα ως οδός απορρόφησης και παράλληλα να προκύψει μια εκτενής βιβλιοθήκη τιμών $\log K_p$ ενός ικανού αριθμού φαρμακευτικών ουσιών. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την εξαγωγή βελτιωμένων συσχετίσεων δερματικής απορρόφησης και βιομιμητικών χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης και παράλληλα την ανάπτυξη αξιόπιστων μοντέλων πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Ακόμη θα μπορούσαν να προσομοιαστούν άλλα φαρμακοκινητικά μεγέθη όπως π.χ διέλευση από τον αιμοτοεγκεφαλικό φραγμό αλλά και διάφορα είδη τοξικότητα π.χ νεφρική τοξικότητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να συμβάλει αποφασιστικά στη διαλογή υποψήφιων μορίων στα αρχικά στάδια ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προϊόντων.

8.Βιβλιογραφία

1. Βασίλης Δημόπουλος, Άννα Τσαντίλη -Κακουλίδου, 2015, Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα.
2. H. P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, and G. Henderson, *Rang & Dale's Pharmacology*, 8th ed. Elsevier, 2016.
3. John Wiley and Sons Valko Klara, 2014, Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery: Chromatographic Techniques for Lead Optimisation, ed., Hoboken, New Jersey.
4. Sunjic V., Parnham M.J., 2011, Signposts to Chiral Drugs, *Organic Synthesis in Action*, Springer
5. Fotios Tsopeles, Konstantinos Giaginis, Anna Tsantili-Kakoulidou , 2017, Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9): 885-896
6. B. Blass, *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Philadelphia, USA: Elsevier, 2015.
7. Suvarna V., 2010, Phase IV of Drug Development, *Perspect Clin Res*, 1(2): 57 – 60
8. Arnott John A., Planey Sonia Lobo, 2012, The influence of lipophilicity in drug discovery and design, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10): 863-875
9. Marios Chrysanthakopoulos, Fotios Tsopeles, Anna Tsantili – Kakoulidou , 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
10. Steve Morgan, Paul Grootendorst, Joel Lexchin, Cunningham Colleen, Devon Greyson, 2011, The cost of drug development: A systematic review, *Health Policy*, 100: 4-17
11. 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>
Ημερομηνία Πρόσβασης 10-09-2022
12. Μ.ΜΑΡΣΕΛΟΣ Συνοπτική Φαρμακολογία. Τόμος 1ος. Ιατρική Σχολή Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2006 72.
13. P.Wexler, B.D Anderson., Gad, S. C., P. Hakkinen B., Kamrin, M., De Peyster, A., ... & Shugart, L. R. (Eds.). (2005). *Encyclopedia of toxicology* (Vol. 1). Academic Press.
14. IU PHAR, Pharmacology Education Project: Clinical pharmacokinetics. Ανακτήθηκε από: <https://www.pharmacologyeducation.org/clinical-pharmacology/clinical-pharmacokinetics> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
15. A. Alagga, &V. Gupta (2021). Drug Absorption. *StatPearls [Internet]*.
16. Φαρμακευτική Χημεία και Τεχνολογία, Έγγραφα. Ανακτήθηκε από: <https://helios.ntua.gr/2021-22/course/view.php?id=1330> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
17. Smith Yolonda Pharm (2019). What is Drug Absorption?. *News Medical Life Sciences*. Ανακτήθηκε από: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Drug-Absorption.aspx> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
18. Η.Ηλιόπουλος, Βιολογικές Μεμβράνες και Μεμβρανικές Πρωτεΐνες. Μοριακή Αναγνώριση, 1-36 (2001)

19. Sim D.S.M. (2015) Drug Absorption and Bioavailability. In: Y. Chan Ng K., D. Sim (eds) Pharmacological Basis of Acute Care. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10386-0_3 Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
20. C. Chagas, M., Moss, S., & L. Alisaraie, (2018). Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. *International journal of pharmaceuticals*, 549(1-2), 133-149.
21. Jennifer Le, (2020). Drug Distribution to Tissues. *Merck Manual Professional Version*.
22. H.P. Rang, J. M. Ritter, R. J. Flower, G. Henderson. 'Φαρμακολογία'. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2019)
23. Smith Yolonda, B. Pharm (2019). Drug Distribution. *News Medical Life Sciences*. Ανακτήθηκε από: <https://www.news-medical.net/health/Drug-Distribution.aspx> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
24. IU PHAR, Pharmacology Education Project: Drug Distribution. Ανακτήθηκε από: <https://www.pharmacologyeducation.org/pharmacology/drug-distribution> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
25. Ελένη Ρέκκα (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 Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
26. Π.Στεφάνου (1999). *Εξωγενής και ενδογενής ρύθμιση του ηπατικού μεταβολισμού ξενοβιοτικών* (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; University of Ioannina).
27. Π. Παππάς (2015). ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ.
28. N. Taxak, & P.V Bharatam (2014). Drug metabolism. *Resonance*, 19(3), 259-282.
29. Brunton Laurence, John Lazo, and Keith Parker. McGraw Hill, J.G Cannon (2006). Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Edited by New York. 2005
30. Γ. Κόκοτος Ι., & Β. Μαγκριώτη (2015). Φαρμακοχημεία.
31. F.P Guengerich (2010). Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 1010210090-1010210090.
32. S. Constable, P. Winstanley, T. Walley. 'Ιατρική Φαρμακολογία'. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2011)
33. Y. Gao, C. Gesenberg., W. Zheng., 2017, Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations, in Developing Solid Oral Dosage Forms, p. 455 – 495, Elsevier Inc.
34. Valko Klara L., 2016, Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130: 35-54
35. Liu Xiangli, Testa Bernard, Fahr Alfred, 2010, Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation, *Pharmaceutical Research*, 28: 962-977
36. R. Mannhold, H. Kubinyi., Folkers Molecular G., 2008, Molecular Drug Properties: Methods and Principles in Medical Chemistry, Volume 37, ed. Mannhold Raimud, WILEY – VCH
37. Μοντέλα QSAR. ECHA, *European Chemicals Agency*. Ανακτήθηκε από: <https://echa.europa.eu/el/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/qsar-models> Ημερομηνία Πρόσβασης 10-09-2022
38. F. Liu Cao, C.B, & Cheng, (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.

39. Κεφάλαιο 6: Παλινδρόμηση. *Η επιστήμη των δεδομένων*. Ανακτήθηκε από: <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/ECON1332/Lectures/Lecture%203/06Regression.pdf> Ημερομηνία Πρόσβασης 10-09-2022
40. G. Uyanik, K N., & Güler (2013). A study on multiple linear regression analysis. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 106, 234-240.
41. S. Brown (2009). Multiple linear regression analysis: a matrix approach with MATLAB. *Alabama Journal of Mathematics*, 34, 1-3.
42. Ε. Φαρμάκη (2012). *Εφαρμογές πολυπαραμετρικών στατιστικών τεχνικών στη χημική ανάλυση* (Doctoral dissertation, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας).
43. D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007.
44. B. Ismail and S. S. Nielsen, "Basic Principles of Chromatography," in *Food Analysis*, S. S. Nielsen, Ed. Boston, MA: Springer US, 2010, pp. 473–498.
45. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, 2011.
46. S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by Open Learning)*, 1st ed. Great Britain: John Wiley & Sons, 1987.
47. Επιφανειακή τάση διαλυμάτων. Ανακτήθηκε από: <http://jupiter.chem.uoa.gr/pchem/courses/405/guide-4.pdf> Ημερομηνία Πρόσβασης 10-09-2022
48. Rambla-Alegre, M., Ruiz-Angel, M. J., Berthod, A., & Bose, D. Micellar Liquid Chromatography: Recent Advances and Applications.
49. 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).
50. Y. Cheng, Ho, E., Subramanyam, J. B. & Tseng, . Measurements of drug – protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 809, 67–73 (2004).
51. Y. Cheng,, 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.
52. S. Singh, S., & J. Mehta, . (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.
53. Β. Ντυμένου (2012). Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων : I) Σύγκριση διαφόρων τύπων ελαστικών λιποσωμάτων και μελέτη μηχανισμού αύξησης διαπερατότητας υδατοδιαλυτών φαρμάκων με τη χρήση τους. II) Αύξηση διαπερατότητας αντιυπερτασικών φαρμάκων με συστήματα ενισχυτών διαπέρασης.
54. Cheruvu, Hanumanth Srikanth, et al. 'Modeling Percutaneous Absorption for Successful Drug Discovery and Development'. *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 15, no. 10, Oct. 2020, pp. 1181–98. Taylor and Francis+NEJM,
55. <https://www.galinos.gr> Ημερομηνία Πρόσβασης 10-09-2022
56. Cheruvu, Hanumanth Srikanth, Xin Liu, Jeffrey E. Grice, and S. Michael Roberts. 'Modeling Percutaneous Absorption for Successful Drug Discovery and Development'. *Expert Opinion on Drug Discovery* 15, no. 10 (2 October 2020): 1181–98. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1781085> Ημερομηνία Πρόσβαση 10-09-2022
57. Lian, Guoping, Longjian Chen, and Lujia Han. 'An Evaluation of Mathematical Models for Predicting Skin Permeability'. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97, no. 1 (1 January 2008): 584–98.

