



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**" Ανάπτυξη Φυσιολογικού Φαρμακοκινητικού Μοντέλου για την ουσία
της κροκετίνης σε ποντίκια. "**



ΤΣΟΥΤΣΗ ΔΑΦΝΗ

Αθήνα
Ιούλιος 2017

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Α. Δοκουμετζίδης

Επίκουρος καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήματος Φαρμακευτικής, Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας (επιβλέπων καθηγητής)

2. Γ. Βαλσαμή

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήματος Φαρμακευτικής, Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

3. Ε. Καραλής

Επίκουρος καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Τμήματος Φαρμακευτικής, Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 στο Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του κ. Αριστείδη Δοκουμετζίδη, Επίκουρου Καθηγητή, τον οποίο θέλω να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την άψογη συνεργασία, καθοδήγηση και υποστήριξη που μου παρείχε, τόσο στο επίπεδο της διπλωματικής εργασίας όσο και στη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ο κ. Δοκουμετζίδης μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τις επιστημονικές μου γνώσεις και τον τρόπο σκέψης μου, ιδιαίτερα σε έναν επιστημονικό τομέα που εξαρχής γνώριζα ελάχιστα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη κα. Γεωργία Βαλσαμή για την πολύτιμη βοήθεια της σε θέματα που αφορούσαν την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή και τον χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν την παρούσα διπλωματική εργασία.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, που μοιράστηκαν μαζί μου σκέψεις και προβληματισμούς.

Περίληψη

Στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας γίνεται μία ανασκόπηση για τον κρόκο, τις θεραπευτικές του ιδιότητες και την χημική του σύσταση. Ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών, αναδεικνύει τις ευεργετικές επιδράσεις του κρόκου και των συστατικών του σε διάφορα συστήματα και σε ποικίλες παθήσεις. Η παραγωγή του κρόκου έχει απασχολήσει έντονα τη βιομηχανία φαρμάκων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, από χημική άποψη, εμφανίζουν τα στίγματα του άνθους. Η χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού απέδειξε πως τα βασικά δρώντα συστατικά του σαφράν είναι τα καροτενοειδή, κροκετίνη και κροκίνη, στα οποία οφείλεται το έντονο χρώμα του και οι μονοτερπενικές αλδεΐδες, πικροκροκίνη και σαφρανάλη, όπου η πρώτη είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση του και η δεύτερη παρέχει στο μπαχαρικό την ιδιαίτερη μυρωδιά του.

Οι κροκίνες αποτελούν ασυνήθιστα υδατοδιαλυτά καροτενοειδή λόγω του υψηλού γλυκοζιτικού περιεχομένου τους. Προϊόντα υδρόλυσης της κροκίνης είναι η γεντιοβιόζη και η κροκετίνη. Η κροκετίνη είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ το οποίο είναι υδρόφοβο. Όταν όμως εστεροποιείται προκύπτει ένα υδατοδιαλυτό προϊόν. Οι κροκίνες είναι trans-γλυκοζίτες της κροκετίνης. Η γλυκοζυλίωση γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων όπου ουσιαστικά μετατρέπουν την κροκετίνη σε υδατοδιαλυτή και σταθερή μορφή, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη βιοδιαθεσιμότητά της. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στην κατανομή της κροκετίνης στους ιστούς. Ωστόσο, μελέτες αποδεικνύουν τη δέσμευση της κροκετίνης στην αλβουμίνη του πλάσματος, υποδεικνύοντας ένα πιθανό μηχανισμό μεταφοράς της κροκετίνης στους ιστούς.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στα φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα, στις κατηγορίες που χωρίζονται καθώς και στην ανάπτυξη ενός τέτοιου μοντέλου και το σκοπό που χρησιμοποιήθηκαν. Η φαρμακοκινητική μελετά ποσοτικά τις διαδικασίες της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης των φαρμακευτικών μορίων μέσα στο σώμα. Σκοπός είναι να υπολογιστούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι, από την ανάλυση πειραματικών δεδομένων, ώστε να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων μορίων και για τη βελτίωση της θεραπευτικής αγωγής. Η κλιμάκωση μεταξύ των ειδών αποτελεί μια ακόμη εφαρμογή των PBPK μοντέλων. Στόχος είναι η πρόβλεψη της κατανομής του μορίου σε ένα είδος για το οποίο δεν υπάρχουν συγκέντρωσης-χρόνου από τους ιστούς, με βάση ένα PBPK μοντέλο που αναπτύσσεται για ένα άλλο είδος από το οποίο έχουν ληφθεί τέτοια δεδομένα. Με την επέκταση ενός PBPK μοντέλου από ένα είδος σε ένα άλλο, μπορεί να προβλεφθεί η φαρμακοκινητική του μορίου στο δεύτερο είδος και έτσι διευκολύνεται ο καθορισμός της αρχικής δόσης κατά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου σε ανθρώπους και μειώνεται η πιθανότητα χορήγησης υποθεραπευτικής ή τοξικής δόσης.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η υλοποίηση ενός PBPΚ μοντέλου της κροκετίνης στο υπολογιστικό πακέτο Phoenix και Berkeley Madonna, με δεδομένα από ποντίκια. Αρχικά γίνεται μία πρώτη εκτίμηση της δομής του μοντέλου, στη συνέχεια λαμβάνονται υπόψη οι εξισώσεις του μοντέλου όπου περιγράφουν τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του μορίου στο σώμα και τέλος γίνεται εκτίμηση των απαιτούμενων παραμέτρων τόσο για το πλάσμα, όσο και για κάθε έναν ιστό ξεχωριστά. Στόχος είναι να προβλεφθεί η χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα και στους ιστούς. Στην παρούσα εργασία σε 80 αρσενικά ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων, χορηγήθηκε υδατικό εκχύλισμα κρόκου. Η δόση προσδιορίστηκε σε 60 mg / kg σωματικού βάρους του λυοφιλοποιημένου εκχυλίσματος. Οι ποντικοί σε κάθε ομάδα χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες των πέντε. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν και στη συνέχεια συλλέχθηκαν δείγματα αίματος στα 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά τη χορήγηση μέσω καρδιοπαρακέντησης. Η δειγματοληψία ιστών (καρδιάς, ήπατος, πνευμόνων και νεφρών) διεξήχθη επίσης στα ίδια χρονικά σημεία.

Στο τέταρτο και τελευταίο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δεδομένων ακολουθήθηκε αρχικά προσαρμογή εμπειρικού μοντέλου στα δεδομένα από το πλάσμα και προσομοιώθηκε το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου στο πλάσμα (serum) μέσω του προγράμματος Phoenix. Στη συνέχεια έγινε εκτίμηση των παραμέτρων του πλάσματος, για ενδοφλέβια χορήγηση (IV) και για από του στόματος χορήγηση (per os), τόσο για την κροκετίνη, όσο και για τον μεταβολίτη της, δηλαδή το γλυκουρονίδιο της κροκετίνης. Το προφίλ αυτό χρησιμοποιείται ως συνάρτηση εισόδου για την εκτίμηση των παραμέτρων K_p , CL και PS με μοντέλα ανοιχτού βρόγχου για κάθε έναν από τους ιστούς, τόσο με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, όπου ο ιστός θεωρείται ενιαίο μοντέλο, όσο και με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών.

Το μοντέλο που περιέγραψε καλύτερα τα δεδομένα ήταν το μονοδιαμερισματικό μοντέλο με πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης. Τα μοντέλα αξιολογήθηκαν ως προς την προσαρμογή τους στα πειραματικά δεδομένα, τη σταθερότητά τους και τις προβλεπτικές τους ικανότητες. Τέλος, γίνεται επιλογή του καταλληλότερου και πιο αξιόπιστου μοντέλου.

Abstract

In the first chapter of the paper, a review is made of crocus Sativus L., its healing properties and its chemical composition. An increasing number of studies highlight the beneficial effects of crocus and its components on various systems and a variety of conditions. The production of saffron has been a major concern for the drug industry.

Of particular interest, from a chemical point of view, are the spots of the flower. The chemical analysis of plant extracts has shown that the main active ingredients of saffron are carotenoids, crocetin and crocin, which are due to its intense color and monoterpenic aldehydes, picrocrocin and saffranal, where the first is responsible for the characteristic flavor of and the second gives the spice its special smell.

The crocins are unusually water soluble carotenoids due to their high glycosidic content. Hydrolysis products of crocin are gentiobiose and crocetin. Crocetin is a dicarboxylic acid which is hydrophobic. However, when esterified a water-soluble product results. The crocins are trans-glycosides of crocetin. Glycosylation occurs with the aid of enzymes which substantially convert the crocetin into a water-soluble and stable form, thereby improving its bioavailability. Until today, there are no data on the distribution of crocetin in the tissues. However, studies show the binding of crocetin to plasma albumin, indicating a possible mechanism of transfer of crocetin to the tissues.

In the second chapter, reference is made to the physiologically based pharmacokinetic models, the categories that are divided, in the development of such a model and the purpose used. Pharmacokinetics quantifies the processes of absorption, distribution, metabolism and excretion of pharmaceutical molecules into the body. The aim is to calculate the pharmacokinetic parameters, from the experimental data of analysis, to be used for the development of new molecules and for the improvement of the treatment. Scaling between species is another application of PBPK models. The aim is to predict the distribution of the molecule to a species for which there is no concentration-time data from tissues, based on an empirical model developed for another species from which such data has been obtained. By extending a PBPK model from one species to another, it is possible to predict the pharmacokinetics of the molecule in the second species and thus it is easier to determine the initial dose at the first administration of the drug to humans and reduce the likelihood of administering a subtherapeutic or toxic dose.

The third chapter presents the methods used to prepare this study. The purpose of this paper is to implement a PBPK model of crocetin in the Phoenix and Berkeley Madonna computational package, with data from mice. Initially, a first estimate of the structure of the model is made, then the equations of the model are described, describing the temporal change in the concentration of the molecule in the body, and finally, the required parameters are assessed for

both the plasma and each tissue individually. The aim is to predict the temporal change in the concentration of the drug in blood and tissues. In the present study, 80 male 8-week-old mice received aqueous crocus extract. The dose was determined at 60 mg / kg of body weight of the lyophilized extract. The mice in each group were randomly assigned to groups of five. Animals were anesthetized and blood samples were collected at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes after cardioversion. Tissue sampling (heart, liver, lungs and kidneys) was also conducted at the same time points.

The fourth and final chapter presents the results and conclusions. During the data analysis process, the PBPK model was initially adapted to plasma data and the serum concentration-time profile was simulated through the Phoenix program. Thereafter, plasma parameters were evaluated for intravenous administration (IV) and for oral administration (per os), both for crocetin and for its metabolite, namely, crocetin glucuronide. This profile is used as an input function for the estimation of Kp, CL and PS parameters with open loop models for each of the tissues, both with the perfusion limited tissue model, where the tissue is considered a single model, and with the permeability limited tissue model.

The model that best described the data was the one-compartment model with first-class removal kinetics. The models were evaluated for their adaptation to experimental data, their stability and their foresight abilities. Finally, the most suitable and most reliable model is selected.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:	11
1. ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ	11
1.1. Μορφολογία του κρόκου	11
1.2. Καλλιέργεια	12
1.3. Παραγωγή	13
1.4. Χρήσεις και βιολογικές δράσεις	13
1.5. Χημική σύσταση	14
1.6. Φαρμακοκινητική	17
1.7. Τοξικότητα	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:	20
2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ (PBPK)	20
2.1. Ορισμός	20
2.2. Σκοπός – χρήση των PBPK μοντέλων	21
2.3. Ανάπτυξη ενός PBPK μοντέλου	22
2.4. Γενική δομή μοντέλου και μοντέλο ιστού	22
2.4.1. Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση (perfusion limited tissue model)	23
2.4.2. Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών (permeability limited tissue model)	23
2.5. Εξισώσεις του μοντέλου	24
2.6. Παράμετροι PBPK μοντέλου	25
2.6.1. Μοντέλο ανοιχτού βρόγχου - Open loop model	25
2.6.2. Μη γραμμική παλινδρόμηση	26
2.7. Επέκταση ενός PBPK μοντέλου	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:	29
ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1. Κατανομή στο αίμα	30
3.2. Κατανομή στους ιστούς	30
3.3. Παράμετροι μοντέλου	32
3.3.1. Φυσιολογικές παράμετροι	32
3.3.2. Παράμετροι που εξαρτώνται από το μόριο	37
3.3.2.1. Συντελεστής κατανομής ιστού:αίματος (tissue to blood Partition coefficient)	37
3.3.2.2. Κάθαρση (Clearance)	37
3.4. Υπολογιστικό πακέτο για την ανάπτυξη του PBPK μοντέλου	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:	40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
4.1. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για το πλάσμα	40
4.1.1. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με ενδοφλέβια χορήγηση (IV)	41
4.1.2. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με ενδοφλέβια χορήγηση (IV)	42
4.1.3. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με από του στόματος χορήγηση (PO)	43
4.1.4. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με από του στόματος χορήγηση (PO)	44
4.2. Εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στους ιστούς	45
4.2.1. ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (IV)	45
4.2.1.1. Κατανομή στην καρδιά	45
4.2.1.2. Κατανομή στα νεφρά	48
4.2.1.3. Κατανομή στους πνεύμονες	51
4.2.1.4. Κατανομή στο ήπαρ	53
4.2.2. ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (PO)	56
4.2.2.1. Κατανομή στην καρδιά	56
4.2.2.2. Κατανομή στα νεφρά	58
4.2.2.3. Κατανομή στους πνεύμονες	62
4.2.2.4. Κατανομή στο ήπαρ	64
4.3. Συμπεράσματα	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:	69
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	75

1. ΚΡΟΚΟΣ ΚΟΖΑΝΗΣ

1.1. Μορφολογία του κρόκου

Ο *Crocus sativus* Linneaus, ή αλλιώς κρόκος ο ήμερος, ανήκει στην οικογένεια Iridaceae της τάξης των Liliales. Η λέξη κρόκος προέρχεται από την ελληνική λέξη «κρόκη» και φαίνεται πως αυτή έχει τις ρίζες της στην Βαβυλωνιακή λέξη *kurkanu* και στην αραμαϊκή *kurkema*. Ο κρόκος απασχολεί τους ερευνητές εδώ και αρκετούς αιώνες λόγω των στιγμάτων του, από την αποξήρανση των οποίων προκύπτει το μπαχαρικό σαφράν. Το σαφράν αποτελεί προϊόν υψηλής φαρμακευτικής, χρωστικής, αρτυματικής και μυρεφικής αξίας. Εκτός από τον *Crocus sativus* L. έχουν αναγνωρισθεί πολλά είδη κρόκου. Ορισμένα από αυτά είναι ο *Crocus cartwrightians*, ο *Crocus moabiticus*, ο *Crocus palasii*, ο *Crocus dispathaceus*, ο *Crocus thomasii*, ο *Crocus hadriaticus* και ο *Crocus niveus* (Mathew, 1977).

Ο *Crocus sativus* L. ανήκει στην κατηγορία των φυτών και το συνολικό του ύψος δεν ξεπερνάει τα 40 cm. Τα χαρακτηριστικά του κρόκου είναι: α) οι βολβοί του φυτού (κορμοί), όπου έχουν διάμετρο 2-3 cm, σχήμα σφαιρικό και προστατεύονται από δικτυωτούς χιτώνες, β) τα άνθη του φυτού, όπου αποτελούνται από έξι βιολετί πέταλα, τρεις κίτρινους στήμονες, και μία ωθήκη με τον στύλο που χωρίζεται σε τρία στίγματα. Τα στίγματα, που αποτελούν και τη δρόγη του φυτού, έχουν πορτοκαλοκόκκινο χρώμα, χαρακτηριστικό άρωμα και μήκος 40-50 mm και γ) τα φύλλα του φυτού, όπου έχουν πράσινο χρώμα, βγαίνουν απευθείας από τον βολβό/ κορμό, είναι γραμμωτά και το μήκος τους φτάνει τα 40-50 cm. (Εικόνα 1) (Carmona et al., 2006).



Εικόνα 1: Το άνθος του κρόκου.

1.2. Καλλιέργεια

Πρόκειται για ένα τριπλοειδές, ποώδες φυτό, δηλαδή δεν παράγει σπόρους καθώς και δεν αναπτύσσει καρπούς. Η αναπαραγωγή του γίνεται μέσω της διάσπασης και σποράς των βολβών/κορμών του. Η διαδικασία καλλιέργειάς του εξαρτάται από τις εδαφικές και κλιματικές συνθήκες της κάθε περιοχής. Ο κρόκος καλλιεργείται σε χώρες όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ελλάδα, η Γαλλία, η Τουρκία, η Λιβύη, η Αλγερία, το Μαρόκο, η Αίγυπτος, το Πακιστάν, η Κίνα, η Ιαπωνία, η Ινδία, το Ιράν και το Αζερμπαϊτζάν (Giaccio, 2004). Στην Ελλάδα κροκοκαλλιεργούμενη περιοχή του φυτού αποτελεί ο νομός Κοζάνης και συγκεκριμένα τα χωριά Κρόκος, Καρυδίτσα, Κώμη, Λευκοπηγή και Πετρανά. Η καλλιέργεια του φυτού στην συγκεκριμένη περιοχή καλύπτει σήμερα γύρω στα 3000 στρέμματα.

Η καλλιέργεια του φυτού απαιτεί ξηρό και θερμό κλίμα το καλοκαιρινούς μήνες, καθώς και ψυχρές θερμοκρασίες τους χειμερινούς μήνες. Το έδαφος πρέπει να είναι ξηρό και χωρίς δέντρα. Η σπορά του κρόκου γίνεται τους καλοκαιρινούς μήνες και το φυτό ανθίζει μια φορά το χρόνο, περίπου στα μέσα Οκτωβρίου, όπου είναι και η περίοδος συλλογής με διάρκεια 20 έως 25 ημέρες. Το πρώτο βήμα είναι η συγκομιδή του φυτού, η απομάκρυνση των πετάλων από τα στίγματα (Εικόνα 2), η αποξήρανση των σιγμάτων και των στημόνων και τέλος η διαλογή του κρόκου με διαχωρισμό των πορτοκαλοκόκκινων σιγμάτων. Η αποξήρανση γίνεται σε σκοτεινά δωμάτια που θερμαίνονται με θερμοκρασία έως τους 40°C για 8 έως 12h και υγρασία 50%. Η διαδικασία της αποξήρανσης έχει ιδιαίτερη σημασία διότι καθορίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Η σωστή αποξήρανση διατηρεί αναλλοίωτες τις χαρακτηριστικές του ιδιότητες (χρώμα και άρωμα) ενώ ταυτοχρόνως βελτιώνεται η ποιότητα του, χωρίς να αποβάλλει τη χρωστική του δύναμη και το αιθέριο έλαιο του. Τα στίγματα πρέπει να αποθηκεύονται σωστά ώστε να προστατεύονται από την υγρασία, την ηλιακή ακτινοβολία και τη θερμότητα, καθώς μόνο έτσι διατηρούνται αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά τους (Carmona et al., 2006).



Εικόνα 2: Τα στίγματα του κρόκου.

1.3. Παραγωγή

Κατά την αποξήρανσή του, ο κρόκος χάνει τα μεγάλο μέρος του αρχικού του βάρους. Η ποσότητα των άνθων που απαιτούνται για την παραγωγή 1 kg σαφράν, ορίζεται σε 100.000 έως 150.000 άνθη. (Chen et al., 2003). Τα γεγονόσ αυτό σε συνάρτηση με τη δυσκολία να καλλιεργηθεί σε οποιοδήποτε έδαφος, καθώς απαιτεί συγκεκριμένες κλιματικές συνθήκες και την ανάγκη χειρωνακτικής εργασίας (κροκοσυλλέκτες), καθιστούν τον κρόκο ως το ακριβότερο μπαχαρικό στην παγκόσμια αγορά (Soeda et al., 2007).

Η ετήσια παραγωγή σαφράν παγκοσμίως ανέρχεται στους 200 τόνους, το 90% των οποίων είναι ιρανικής προέλευσης (Caballero-Ortega et al., 2007). Η νόθευση του σαφράν είναι συχνό φαινόμενο, με ένα ποσοστό της τάξεως του 30% των δειγμάτων να μην πληρούν τα κριτήρια ποιότητας που έχουν θεσπιστεί από το ISO (Schmidt et al., 2007). Για τη νόθευση συνήθως χρησιμοποιούνται τρία φυτά: το *Curcuma longa* L. (οικογένεια Zingiberaceae), το *Colchicum autumnale* L. (οικογένεια Liliaceae) και το *Carthamus tinctorium* L. (οικογένεια Compositae). (Basker and Negbi, 1983).

Άμεση λύση στο κοστολογικό πρόβλημα που δημιουργεί η παραγωγή του κρόκου αποτελεί η συνθετική παραγωγή των συστατικών του. Έτσι θα μπορούσε να εξασφαλιστεί μέγιστη απόδοση, σωστή ποιότητα και μειωμένο κόστος (Abdullaev and Espinosa-Aguirre, 2004).

1.4. Χρήσεις και βιολογικές δράσεις

Στο παρελθόν ο κρόκος χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της κεφαλαλγίας, του πυρετού και των κρυολογημάτων γενικότερα. Θεωρείται πως διευκόλυνε την πέψη, ανακούφιζε από γαστρεντερικές διαταραχές και αύξανε την όρεξη.

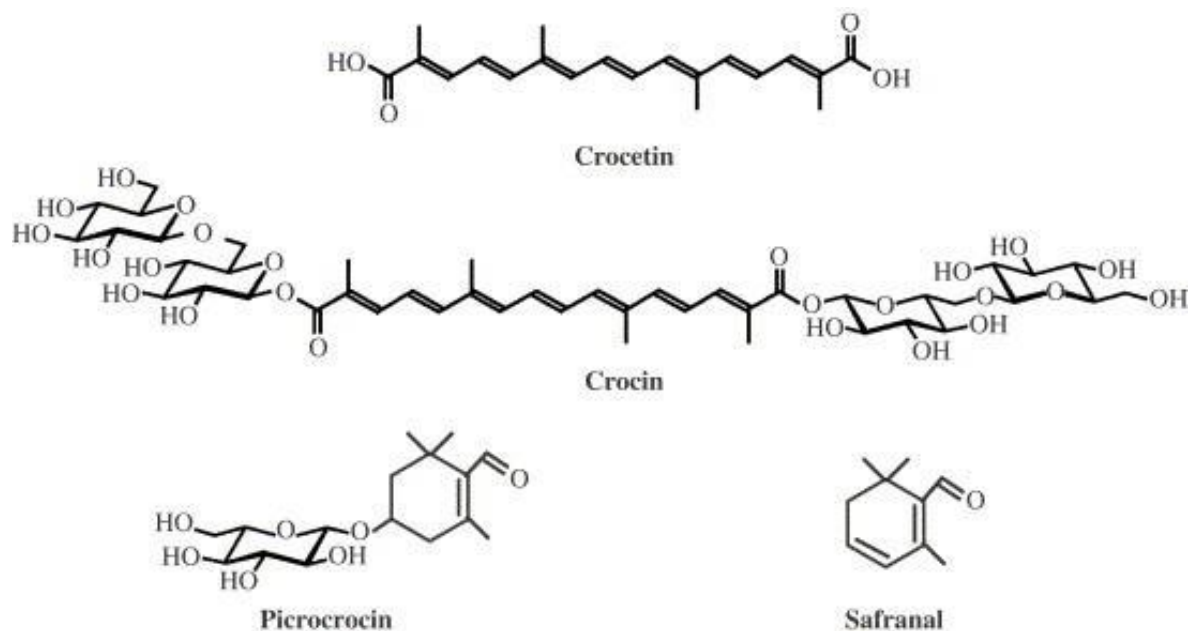
Στη σημερινή εποχή χρησιμοποιείται ως άρτυμα στη μαγειρική και στη ζαχαροπλαστική, καθώς δίνει μια χαρακτηριστική γεύση και χρώμα σε φαγητά, ροφήματα, ποτά και τυροκομικά. Οι Άραβες το χρησιμοποιούν για να αρωματίσουν το αρνί, το κοτόπουλο και το ρύζι. Είναι βασικό συστατικό διάσημων πιάτων όπως της γαλλικής bouillabaisse, του ιταλικού risotto και της ισπανικής paella. Στην Ινδία χρησιμοποιείται ως θυμίαμα σε θρησκευτικές τελετές και ως χρωστικό μέσο για τη βαφή των μανδύων των ιερέων. Οι χρωστικές του ιδιότητες αξιοποιούνται και σε ιστολογικές τεχνικές για τη χρώση του συνδετικού ιστού.

Η πορεία του κρόκου, με έναν διαρκώς αυξανόμενο αριθμό μελετών τόσο σε προκλινικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο, αναδεικνύει τις ευεργετικές επιδράσεις του και των συστατικών του σε ποικίλες παθήσεις. Η παραγωγή του κρόκου έχει απασχολήσει έντονα τη βιομηχανία φαρμάκων και έχει υπάρξει αντικείμενο πολλών επιστημονικών ερευνών λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων και δράσεων.

Έχει αποδειχθεί ότι βοηθάει στην πρόγνωση ή στην αντιμετώπιση πολλών νοσημάτων όπως γαστρεντερολογικές διαταραχές με κυριότερη αυτή του πεπτικού έλκους (Kianbakht and Mozaffari, 2009; Xu et al., 2009), καρδιαγγειακά νοσήματα αφού η κροκετίνη παρουσιάζει ισχυρή αντιλιπιδαιμική δράση (Giaccio, 2004; Christodoulou E. et al., 2015a), ισχαιμία, μυοκαρδία και αθηροσκλήρωση (Christodoulou E. et al., 2015a), στη πρόληψη του διαβήτη (Xi et al., 2005), των αυπνιών (Hosseinzadeh and Noraei, 2009), του άγχους και της κατάθλιψης (Akhondzadeh et al., 2005). Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τις αντιοξειδωτικές ικανότητες των στιγμάτων του κρόκου και την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Martinez-Tome et al., 2001) με άμεσα θετικά αποτελέσματα κατά νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Alzheimer (Abe and Saito, 2000) και κατά ψυχοσικών διαταραχών όπως η σχιζοφρένεια (Georgiadou et al., 2013). Ακόμα, φαίνεται να δρα στην πρόληψη του καρκίνου λόγω των αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων (Carmona et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, οι Tarantilis et al. (1994b) έδειξαν ότι τα καροτενοειδή του κρόκου αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων κάποιων τύπων λευχαιμίας, καθώς επίσης και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Chryssanthi et al., 2007).

1.5. Χημική σύσταση

Η χημική σύσταση του κρόκου παρουσιάζεται λεπτομερώς σε διάφορες επιστημονικές έρευνες (Lewis et al., 1981; Sampathu et al., 1984; Basker 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, από χημική άποψη, εμφανίζουν τα στίγματα του άνθους. Η χημική ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτού έδειξε πως τα βασικά συστατικά του σαφράν είναι τα καροτενοειδή, κροκετίνη και κροκίνη, στα οποία οφείλεται το έντονο χρώμα του και οι μονοτερπενικές αλδεΐδες, πικροκροκίνη και σαφρανάλη (Εικόνα 3). Η πικροκροκίνη είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση του, ενώ η σαφρανάλη παρέχει στο μπαχαρικό την χαρακτηριστική μυρωδιά του. Όσων αφορά την κατανομή του κρόκου, εξαρτώμενη από την ποιότητα των στιγμάτων του, υπάρχει ένα ποσοστό της τάξεως του 30% για τις κροκίνες, 5 έως 15% για την πικροκροκίνη και 2. 5% για τη σαφρανάλη (Schmidt et al., 2007). Σε χαμηλότερες ποσότητες παρατηρούνται στον κρόκο ανθοκυανίνη, β-καροτένιο, τετραϋδρολυκοπένιο, ζεαξανθίνη, φλαβονοειδή, αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, 2-φαινυλαιθανόλη και ναφθαλένιο (Abdullaev and Espinosa-Aguirre, 2004; Papandreou et al., 2006; Giaccio, 2004).

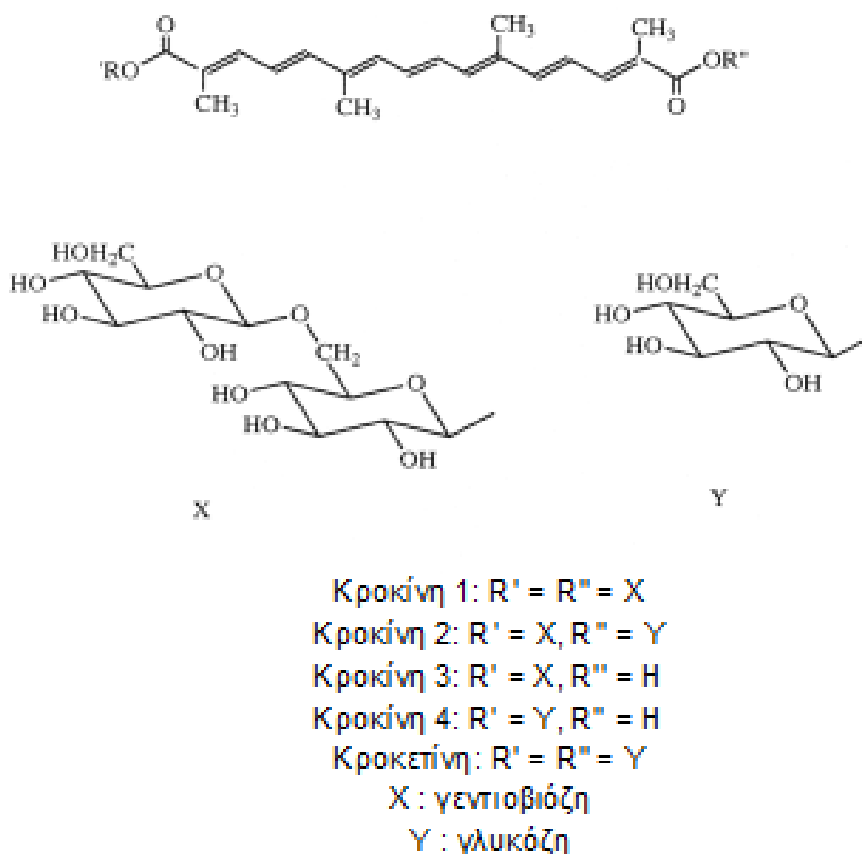


Εικόνα 3: Κύρια συστατικά του κρόκου (κροκετίνη, κροκίνη, πικροκροκίνη, σαφρανάλη).

Η κροκετίνη ($C_{20}H_{24}O_4$) είναι ένα πολυενικό δικαρβοξυλικό οξύ το οποίο είναι υδρόφοβο και επομένως διαλυτό στα έλαια. Ανήκει στα καροτενοειδή και χαρακτηρίζεται από διτερπενική συμμετρική δομή με επτά διπλούς δεσμούς και τέσσερις μεθυλικές ομάδες. Η αλυσίδα της σταθεροποιείται στα άκρα με δύο καρβοξυλικές ομάδες. Ανάλογα με την στερεοδιάταξη στην θέση C-6 απαντάται σε *cis*- ή σε *trans*- διάταξη, ενώ η εστεροποίηση της γίνεται με μονάδες β-D-γλυκόζης και β-D-γεντιοβιόζης. Όταν η κροκετίνη εστεροποιείται με δύο υδατοδιαλυτές γεντιοβιόζες (σάκχαρα), μέσω ενός 1,6-β-γλυκοζιτικού δεσμού προκύπτει ένα υδατοδιαλυτό προϊόν και εμφανίζει υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες. Προέρχεται από το καροτενοειδές ζεαξανθίνη και με γλυκοζυλίωση μετατρέπεται σε κροκίνη (Giaccio, 2004; Asai et al., 2005).

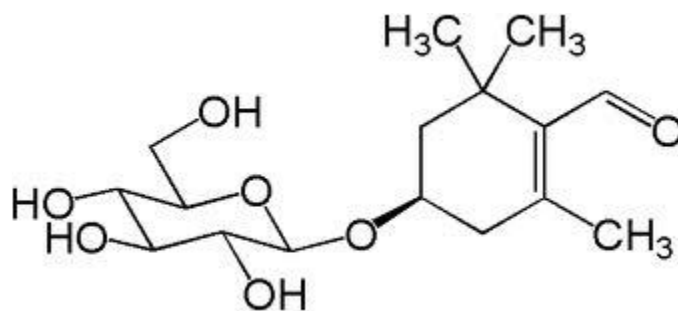
Οι κροκίνες είναι έντονες κίτρινες χρωστικές και αποτελούν τις σημαντικότερες χρωστικές των σύλων. Προϊόντα υδρόλυσης της κροκίνης είναι η γεντιοβιόζη και η κροκετίνη. Είναι μονο-γλυκοζιτικοί ή δι-γλυκοζιτικοί εστέρες της κροκετίνης και αποτελούν ασυνήθιστα υδατοδιαλυτά καροτενοειδή λόγω του υψηλού γλυκοζιτικού περιεχομένου τους. Το προφίλ των κροκινών έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές κατά το πέρασμα των χρόνων, οι οποίοι ανακάλυψαν και ταυτοποίησαν τις διάφορες μορφές τους (Kuhn 1934, Pfandev and Witter, 1975; Dinghra et al., 1975). Οι κροκίνες είναι *trans*-γλυκοζίτες της κροκετίνης. Η γλυκοζυλίωση γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων που λέγονται γλυκοζυλοτρανσφεράσες (GTs), μετατρέποντας την κροκετίνη σε υδατοδιαλυτή και σταθερή μορφή, βελτιώνοντας έτσι τη βιοδιαθεσιμότητά της (Moraga et al, 2004). Ανάλογα με τον αριθμό και το είδος των σακχάρων που φέρουν διακρίνουμε τέσσερα είδη κροκινών: η κροκίνη 1 είναι δισακχαρίτης με δύο

μόρια γεντιοβιόζης, η κροκίνη 2 είναι δισακχαρίτης με ένα μόριο γεντιοβιόζης και ένα μόριο γλυκόζης, η κροκίνη 3 είναι μονοσακχαρίτης με ένα μόριο γεντιοβιόζης και η κροκίνη 4 είναι μονοσακχαρίτης με ένα μόριο γλυκόζης (Εικόνα 4). Αποτελούν ουσίες ευαίσθητες στο οξυγόνο, στη θερμότητα, στην φωτεινή ακτινοβολία και στην β-γλυκοσιδάση και έτσι είναι σταθερές μόνο στη φυσική τους μορφή και αποδομούνται μετά την απομόνωσή τους. Εκτός από τον *Crocus sativus* L. κροκίνες ανευρίσκονται και στο φυτό *Gardenia jasminoides* E. (Li et al., 1999; Tarantilis et al., 1994a; Soeda et al., 2007).



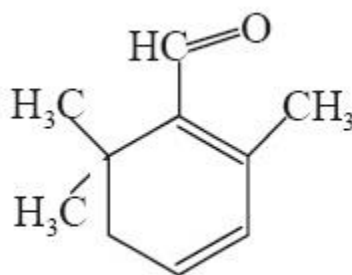
Εικόνα 4: Χημική δομή κροκινών και κροκετίνης.

Η πικροκροκίνη ($C_{60}H_{100}O_{24}$), όπου βρίσκεται υπεύθυνη για την πικρή γεύση του σαφράν, είναι ένας σακχαρίτης, ο οποίος διασπάται με μια β-γλυκοσιδάση σε ένα μόριο γλυκόζης και ένα άγλυκο μόριο (Εικόνα 5). Προϊόντα υδρόλυσης της πικροκροκίνης είναι η γλυκόζη και η σαφρανάλη. Το άγλυκο μόριο όταν χάσει ένα μόριο νερού, με υδρόλυση μετατρέπεται στη σαφρανάλη (Giaccio, 2004).



Εικόνα 5: Χημική δομή πικροκροκίνης.

Η σαφρανάλη ($C_{10}H_{14}O$), όπου αποτελεί το 70% του πτητικού κλάσματος του σαφράν και δίνει στον κρόκο το χαρακτηριστικό του άρωμα, είναι το κύριο συστατικό του αιθέριου ελαίου (Εικόνα 6). Απελευθερώνεται με αφυδάτωση κατά την διαδικασία αποξήρανσης του φυτικού υλικού, για αυτό τα φρέσκα στίγματα είναι άοσμα. Λόγω της μη πολικής της φύσης και του χαμηλού μοριακού της βάρους παρουσιάζει καλύτερη διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και επομένως επιτρέπεται ταχύτερη βιολογική δράση (Giaccio, 2004; Escribano et al., 1996; Carmona et al., 2006).



Εικόνα 6: Χημική δομή σαφρανάλης.

1.6. Φαρμακοκινητική

Η αλβουμίνη είναι η κύρια εξωκυττάρια πρωτεΐνη του πλάσματος και συνδέεται με οργανικά και ανόργανα μόρια που δεν διαλύονται στο νερό, μεταφέροντας τα σε θέσεις στόχους, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη φαρμακολογική και θεραπευτική δράση των μεταφερόμενων παραγόντων.

Μελετήθηκε η απορρόφηση από την κυκλοφορία της κροκετίνης και των κροκινών με από από του στόματος χορήγηση σε ποντίκια. Παρατηρήθηκε πως η κροκετίνη μεταβολίζεται μερικώς σε γλυκουρονικούς εστέρες στο βλεννογόνο του εντέρου και στο ήπαρ. Η κροκετίνη απορροφάται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίματος και εμφανίζεται στο πλάσμα τόσο ως ελεύθερη μορφή όσο και ως μονο- και δι- γλυκουρονίδια της κροκετίνης. Τα επίπεδά της στο πλάσμα φθάνουν στις μέγιστες τιμές τους περίπου 30 λεπτά μετά την χορήγηση και σταδιακά υποχωρούν έως ότου μηδενιστούν 8 ώρες μετά την χορήγηση. Τα

γλυκουρονίδια της κροκετίνης διατηρούνται στο πλάσμα ακόμη και μετά το πέρασμα 8 ωρών. Στα ποντίκια που έλαβαν κροκίνες, εντοπίστηκαν κροκετίνη και τα γλυκουρονίδια της σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αλλά δεν ανιχνεύθηκαν κροκίνες στο πλάσμα. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι κροκίνες υδρολύονται από β-γλυκοσιδάσες σε κροκετίνη στον γαστρεντερικό σωλήνα είτε πριν είτε κατά τη διάρκεια της απορρόφησης και έπειτα ακολουθούν το μεταβολισμό της κροκετίνης (Asai et al, 2005).

Σε επόμενη μελέτη με από του στόματος χορήγηση κροκίνης σε αρουραίους, η ουσία δεν εντοπίστηκε στο πλάσμα μέχρι και 6 ώρες μετά την τελευταία δόση. Παρατηρήθηκε ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής δόσης της κροκίνης να αποβάλλεται στο έντερο μετά από 24 ώρες. Στο πλάσμα ανιχνεύθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις κροκετίνης, οι οποίες έμειναν σταθερές μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση κροκινών. (Xi et al, 2007).

Η πρώτη μελέτη για τη φαρμακοκινητική του κρόκου στους ανθρώπους έδειξε ότι δύο ώρες μετά την από του στόματος κατανάλωση αφεψήματος κρόκου από υγιείς ενήλικες (200 mg/150 ml), παρατηρήθηκαν στο πλάσμα υψηλές τιμές κροκετίνης, ενώ μετά από το πέρασμα 24 ωρών υπάρχει μείωση χωρίς όμως να υπάρχει και εξαφάνισή τους (Chryssanthi et al., 2011).

Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι μετά την από του στόματος χορήγηση μιας έως τριών δόσεων κροκετίνης, υπό την μορφή κάψουλας από υγιείς εθελοντές, η ουσία παρουσίασε ταχεία απορρόφηση της κροκετίνης. Μέσα σε 1 ώρα ήδη ανιχνεύθηκε στο πλάσμα και στις 4 ώρες έφτασε στην μέγιστη τιμή της. Ο χρόνος ημιζωής της βρέθηκε να κυμαίνεται από 6.1 ως 7.5 ώρες και το φαρμακοκινητικό προφίλ παρουσίαζε δοσο- εξάρτηση (Umigai et al., 2011).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στην κατανομή της κροκετίνης στους ιστούς. Ωστόσο, *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν τη δέσμευση της κροκετίνης στην αλβουμίνη του πλάσματος, υποδεικνύοντας ένα πιθανό μηχανισμό μεταφοράς της κροκετίνης στους ιστούς (Miller et al., 1982; Kanakis et al., 2007).

1.7. Τοξικότητα

Μελέτες για την τοξικότητα του εκχυλίσματος του κρόκου έχουν πραγματοποιηθεί ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τόσο για ποντίκια και αρουραίους (Nair et al., 1991; Mousavi et al., 2009; Abdullaev et al., 2003; Hosseinzadeh et al., 2002), όσο και για τον άνθρωπο (WHO, 2007; Giaccio et al., 2004; Modaghegh et al., 2008).

Συγκεντρώσεις από 0.1gr/kg έως 5 gr/kg θεωρούνται μη τοξικές σε ποντίκια (Abdullaev et al., 2003). Παρατηρήθηκε όμως, ότι το εκχύλισμα του κρόκου προκάλεσε αύξηση του σωματικού βάρους σε πειραματόζωα (Mohajeri et al., 2009; Al Mofleh et al., 2006).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ημερήσια δόση κρόκου για τον άνθρωπο μέχρι και 1.5gr θεωρείται ασφαλής, δόσεις πάνω από 5gr μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές επιβλαβείς αντιδράσεις, ενώ δόσεις μεταξύ

12 έως 20gr/ημέρα μπορούν να αποδειχθούν θανατηφόρες (WHO 2007). Σε δόσεις μεγαλύτερες των 10 gr ο κρόκος μπορεί να προκαλέσει, έμετο, αιματουρία, αιμορραγίες του γαστρικού και εντερικού βλεννογόνου, ζάλη και ίλιγγο. Η χορήγηση κρόκου θεωρείται απαγορευτική μόνο σε γυναίκες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καθώς μπορεί να προκαλέσει συστολές της μήτρας και να υπάρξει αποβολή του εμβρύου.

2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ (PBPK)

Η φαρμακοκινητική αποτελεί ένα κλάδο της φαρμακολογίας, όπου μελετά ποσοτικά και ποιοτικά τις μεταβολές των φαρμάκων στον οργανισμό και εξετάζει τις διαδικασίες της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απομάκρυνσης των φαρμακευτικών μορίων μέσα στο σώμα. Στόχος είναι να βρεθούν οι κατάλληλες εξισώσεις, με σκοπό να υπολογιστούν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι από την ανάλυση πειραματικών δεδομένων, ώστε να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων μορίων και για τη βελτίωση της θεραπευτικής αγωγής. Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων γίνεται χρησιμοποιώντας το κατάλληλο φαρμακοκινητικό μοντέλο, το οποίο με τη βοήθεια εξισώσεων περιγράφει τη παρατηρούμενη μεταβολή της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα και/ή στους ιστούς σε σχέση με το χρόνο, με τις χορηγούμενες δόσεις και δοσολογικά σχήματα.

Αντικείμενο της παρούσας εργασία είναι η υλοποίηση ενός φυσιολογικού φαρμακοκινητικού μοντέλου της κροκετίνης, στο υπολογιστικό πρόγραμμα Phoenix για το προφίλ συγκέντρωσης - χρόνου στο πλάσμα και στο Berkeley Madonna για το προφίλ συγκέντρωσης - χρόνου για τους υπόλοιπους ιστούς.

2.1. Ορισμός

Τα φυσιολογικά φαρμακοκινητικά μοντέλα (physiologically based pharmacokinetic, PBPK) είναι μαθηματικά μοντέλα τα οποία αναπτύσσονται σύμφωνα με την ανατομική και φυσιολογική δομή του υπό μελέτη οργανισμού. Τα μοντέλα αυτά χαρτογραφούν τη σύνθετη διαδικασία της μεταφοράς του φαρμάκου σε μία ρεαλιστική διαμερισματική δομή. Τα κύρια δομικά στοιχεία ενός PBPK αποτελούν φυσιολογικοί ιστοί, όργανα, βιολογικά υγρά και/ή συστήματα, τα οποία συνδέονται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας. Η γενική δομή του μοντέλου (Εικόνα 7) είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από το υπό μελέτη φάρμακο. Η κύρια διαφορά των PBPK μοντέλων από τα συμβατικά μοντέλα, είναι πως στα PBPK η δομή του μοντέλου είναι ανεξάρτητη από το υπό μελέτη φάρμακο, ενώ στα συμβατικά μοντέλα η δομή του μοντέλου εξαρτάται από τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα. Τα PBPK μοντέλα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες (Nestoron, 2003):

- τα ολικά (whole body) PBPK μοντέλα, στα οποία μελετάται το σύνολο του υπό μελέτη οργανισμού,
- τα μερικά (partial) PBPK μοντέλα, στα οποία μελετάται ένα συγκεκριμένο σύστημα και/ή όργανο,
- τα μοντέλα μεταβολισμού (liver), τα οποία περιγράφουν την ηπατική εξάλειψη των φαρμάκων, χρησιμοποιώντας φυσιολογικές και βιοχημικές παραμέτρους.

2.2. Σκοπός – χρήση των PBPK μοντέλων

Στόχος των PBPK μοντέλων είναι η δημιουργία ενός μοντέλου, το οποίο θα αποτελείται από φυσιολογικές και βιοχημικές παραμέτρους, οργανώνοντας έτσι όσο το δυνατό μεγαλύτερο μέρος της γνώσης που αφορά το σύστημα φάρμακο – οργανισμός. Στόχος των μοντέλων αυτών είναι η δημιουργία ενός “τεχνητού οργανισμού” για την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών χαρακτηριστικών των μορίων. Υπάρχει η δυνατότητα να γίνει η επιλογή των μορίων με τα επιθυμητά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, με αποτέλεσμα τη μείωση των απαιτούμενων πειραμάτων στα ζώα, την εξοικονόμηση πολύτιμου χρόνου (Germani et al., 2007), καθώς και να προβλεφθεί η φαρμακοκινητική των μορίων αυτών σε προκλινικό επίπεδο. Κατά την ανάπτυξη ενός μοντέλου περιλαμβάνονται πραγματικά όργανα και φυσιολογικά τμήματα του υπό μελέτη οργανισμού. Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να γίνει σύγκριση της προσομοίωσης με τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα, διευκολύνοντας έτσι την εκτίμηση και κατανόηση των παραμέτρων που καθορίζουν το φαρμακοκινητικό προφίλ του μορίου (Lavé et al., 2007).

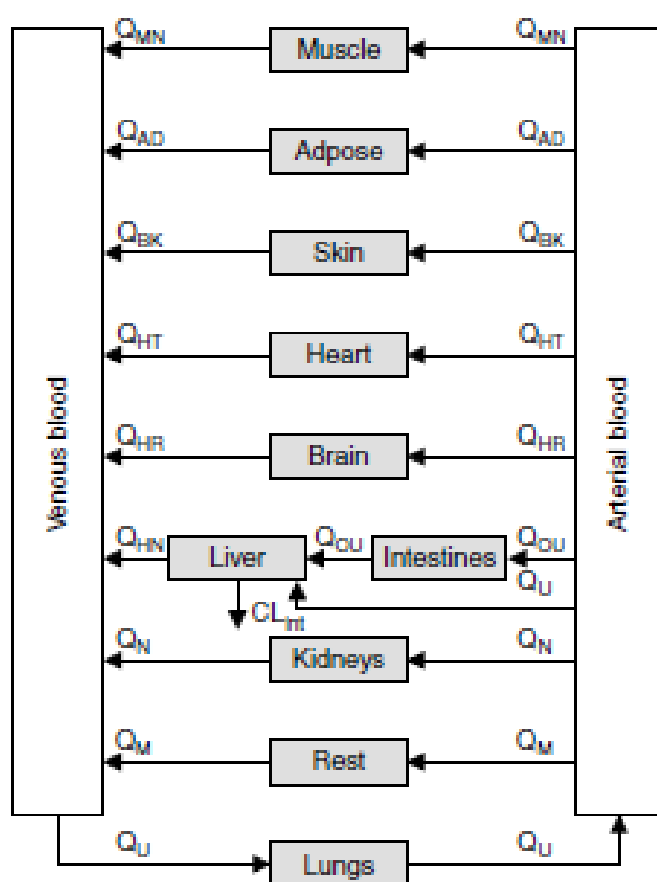
Η προβολή από τα ζώα στον άνθρωπο (inter - species extrapolation) και η προβολή από άνθρωπο σε άνθρωπο (intra – species extrapolation) αποτελεί μια ακόμη σημαντική εφαρμογή των PBPK μοντέλων. Στόχος είναι η πρόβλεψη της κατανομής του μορίου σε ένα είδος, για το οποίο δεν υπάρχουν δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου από τους ιστούς, ακολουθώντας ένα PBPK μοντέλο που αναπτύχθηκε για ένα άλλο είδος από το οποίο όμως έχουν ληφθεί τέτοια δεδομένα. Η συνολική δομή και οι εξισώσεις του μοντέλου βασίζονται στη γνώση της ανατομίας και της φυσιολογίας όλων των θηλαστικών. Το μοντέλο μπορεί να προσομοιώσει τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του μορίου στο αίμα και στους υπόλοιπους ιστούς, υπολογίζοντας κατάλληλα τις τιμές των φυσιολογικών παραμέτρων. Η προβολή στον άνθρωπο διευκολύνει τον καθορισμό της αρχικής δόσης και του δοσολογικού σχήματος κατά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου σε ανθρώπους (Parrott et al., 2005, De Buck and Mackie 2007) και μειώνει την πιθανότητα χορήγησης υποθεραπευτικής ή τοξικής δόσης. Με προσομοίωση της κατανομής σε ανθρώπινους ιστούς, για ιστούς στους οποίους η δειγματοληψία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, μπορεί να προκύψει καλύτερη συσχέτιση δόσης και αποτελέσματος (Gallo et al., 2004).

Επιπροσθέτως, η φαρμακοκινητική μελετά πληθυσμούς με ιδιαίτερα παθολογικά χαρακτηριστικά όπως η μειωμένη νεφρική ή ηπατική λειτουργία (Edginton and Willmann 2008), εγκυμονούσες γυναίκες (Hays 2000; Andrew 2008), παιδιατρικούς πληθυσμούς (Bjorkman 2005; Edginton 2006), πληθυσμούς άθλησης (Hamelin et al., 2005) και πληθυσμούς φύλου (Clewell et al., 2004). Κρίνεται απαραίτητη η πρόβλεψη ενός PBPK μοντέλου, όπου με τη κατάλληλη τροποποίηση στις τιμές των φυσιολογικών παραμέτρων να μπορεί να υπολογιστεί ένα αρχικό δοσολογικό σχήμα.

2.3. Ανάπτυξη ενός PBPK μοντέλου

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης ενός PBPK μοντέλου, το σώμα διαιρείται σε έναν αριθμό ανατομικών τμημάτων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω του κυκλοφορικού συστήματος του οργανισμού και ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα (Nestorov, 2003):

- προσδιορισμός της συνολικής δομής του μοντέλου και του μοντέλου του κάθε ιστού,
- διατύπωση των εξισώσεων του μοντέλου και
- προσδιορισμός και εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση ενός ολικού PBPK μοντέλου.

2.4. Γενική δομή μοντέλου και μοντέλο ιστού

Ένα PBPK μοντέλο αποτελείται από ένα σύνολο ιστών και οργάνων κατάλληλα συνδεδεμένων μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, σύμφωνα με την ανατομική και φυσιολογική δομή του σώματος που είναι κοινή σε όλα τα θηλαστικά. Ένα PBPK μοντέλο πρέπει να περιλαμβάνει τα όργανα που είναι σημαντικά για τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική του φαρμάκου και

την εξέλιξη της νόσου. Ιστοί που συμπεριλαμβάνονται πάντα σε ένα PBPK μοντέλο είναι οι βασικοί ιστοί, δηλαδή το αίμα, το ήπαρ, οι νεφροί, οι πνεύμονες, η καρδιά και ο λιπώδης ιστός. Επίσης συμπεριλαμβάνονται ιστοί με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το υπό μελέτη φάρμακο, ιστοί όπου πιθανόν γίνεται συσσώρευση σημαντικού κλάσματος της ολικής ποσότητας του φαρμάκου και ιστοί για τους οποίους υπάρχουν πειραματικά δεδομένα.

Στη συνέχεια πρέπει να προσδιοριστεί το μοντέλο του κάθε ιστού ή οργάνου. Η επιλογή γίνεται σύμφωνα με προϋπάρχουσα γνώση σχετικά με τις φυσικοχημικές και βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την κατανομή του μορίου στον ιστό, όπως η διαπερατότητα των μεμβρανών των ιστών και η πρωτεϊνική σύνδεση.

2.4.1. Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση (perfusion limited tissue model)

Το πιο απλό μοντέλο είναι το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση (perfusion limited tissue model), στο οποίο ο ιστός ή το όργανο αναπαρίσταται με ένα ομοιογενές διαμέρισμα. Η ταχύτητα ροής του αίματος αποτελεί το περιοριστικό βήμα στη διαδικασία μεταφοράς του φαρμάκου στο όργανο, καθώς η διάβαση του φαρμάκου μέσω του τοιχώματος των τριχοειδών και της κυτταρικής μεμβράνης είναι ταχύτερη, σε σύγκριση με το ρυθμό διάχυσης του ιστού και μεταφοράς του φαρμάκου στον ιστό από το αίμα. Εξαιτίας της ταχείας κατανομής μεταξύ αίματος και ιστού, ο λόγος της συγκέντρωσης στον ιστό προς τη συγκέντρωση στο εξερχόμενο αίμα είναι σταθερός και ίσος με το συντελεστή κατανομής ιστού:αίματος (K_p). Τα περιοριζόμενα από τη ροή μοντέλα ταιριάζουν καλύτερα σε λιπόφιλα φάρμακα.

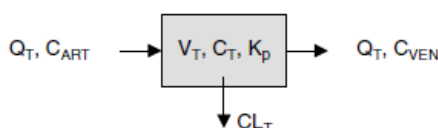
2.4.2. Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών (permeability limited tissue model)

Στις περιπτώσεις που η διαπερατότητα των μεμβρανών αποτελεί το περιοριστικό βήμα για την κατανομή του φαρμάκου στον ιστό, χρησιμοποιείται το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα (permeability limited tissue model). Ο ιστός/ όργανο περιγράφεται από δύο υπο – διαμερίσματα. Η μετακίνηση του φαρμάκου από το αίμα στον ιστό γίνεται σταδιακά και η ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης του ιστού και του εξερχόμενου αίματος δεν είναι άμεση. Αν η μετακίνηση μέσω της μεμβράνης του τοιχώματος των τριχοειδών αγγείων αποτελεί το περιοριστικό βήμα, τα δύο διαμερίσματα είναι το αγγειακό και το εξωαγγειακό τμήμα του ιστού. Αν το περιοριστικό βήμα είναι η διαπέραση της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων του ιστού, τα δύο διαμερίσματα είναι το εξωκυττάριο και το ενδοκυττάριο τμήμα του ιστού. Τα περιοριζόμενα από τη διαπερατότητα των μεμβρανών μοντέλα ταιριάζουν καλύτερα σε φάρμακα με πολικό χαρακτήρα.

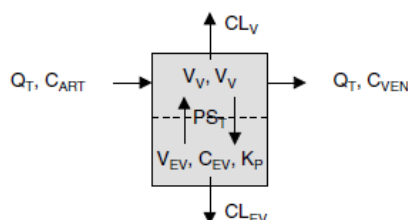
2.5. Εξισώσεις του μοντέλου

Οι εξισώσεις ενός PBPK μοντέλου αποτελούνται από εξισώσεις από την αρχή διατήρησης της μάζας. Για κάθε χρονική στιγμή, το άθροισμα της ποσότητας στα διαμερίσματα του μοντέλου μαζί με την ποσότητα που έχει απομακρυνθεί, πρέπει να παραμένει σταθερό. Το μοντέλο κατά βάση περιγράφεται με διαφορικές εξισώσεις. Αλγεβρικές εξισώσεις χρησιμοποιούνται όταν υπάρχει ταχύτατη εξισορρόπηση των διαδικασιών και μπορούν να θεωρηθούν στατικές .

Τα διαγράμματα και οι διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν ένα μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση και ένα μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, φαίνονται παρακάτω (Nestorov,2003) (Εικόνα 8).



$$\frac{dC_T(t)}{dt} = -\frac{Q_T}{V_T \cdot K_p} \cdot C_T(t) + \frac{Q_T}{V_T} \cdot C_{ART}(t)$$



$$\frac{dC_V(t)}{dt} = -\frac{Q_T + CL_V + PS_T}{V_V} \cdot C_V(t) + \frac{PS_T}{V_V \cdot K_p} \cdot C_{EV}(t) + \frac{Q_T}{V_V} \cdot C_{ART}(t)$$

$$\frac{dC_{EV}(t)}{dt} = \frac{PS_T}{V_{EV}} \cdot C_V(t) - \frac{CL_{EV} + PS_T}{V_{EV} \cdot K_p} \cdot C_{EV}(t)$$

Εικόνα 8: Διάγραμμα και εξισώσεις για μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση (πάνω) και μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών (κάτω), όπου C_T η συγκέντρωση του ιστού, V_T ο όγκος του ιστού,

Q_T η ροή αίματος του ιστού, CL η ηπατική κάθαρση, K_p ο συντελεστής κατανομής και PS_T το γινόμενο διαπερατότητας – επιφάνειας του ιστού. Οι δείκτες ART, EV, T, V και VEN αντιστοιχούν σε αρτηριακό, εξωαγγειακό διαμέρισμα, ιστό, αγγειακό διαμέρισμα και φλεβικό.

2.6. Παράμετροι PBPK μοντέλου

Αφού διατυπωθούν οι εξισώσεις του μοντέλου, στη συνέχεια πρέπει να προσδιοριστούν οι παράμετροί τους. Σε αντίθεση με τα εμπειρικά φαρμακοκινητικά μοντέλα στα οποία όλες οι παράμετροι σχετίζονται με το μόριο που μελετάται, στα PBPK διακρίνονται δυο κατηγορίες παραμέτρων.

Στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι παράμετροι που δεν εξαρτώνται από το φάρμακο (drug independent) και χαρακτηρίζουν την ανατομική δομή και τις φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού. Τέτοιες φυσιολογικές παράμετροι είναι το βάρος του σώματος, τα βάρη και οι όγκοι ιστών/οργάνων/βιολογικών υγρών, η καρδιακή λειτουργία και η ροή αίματος σε διάφορους ιστούς. Οι τιμές τους διαφέρουν μεταξύ των ειδών και λαμβάνονται από τη βιβλιογραφία (ILSI,1994). Στις περιπτώσεις που τα φάρμακα μπορεί να μεταβάλλουν τη φυσιολογία του οργανισμού, όπως συμβαίνει με την καρδιακή παροχή κατά την αναισθησία, η επίδραση των μορίων στις τιμές των παραμέτρων πρέπει να ληφθεί υπόψη.

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν παράμετροι που εξαρτώνται από το φάρμακο (drug dependent), χαρακτηρίζουν τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες και προέρχονται από τα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα. Τέτοιες παράμετροι είναι οι συντελεστές κατανομής ιστού : πλάσματος K_p , οι παράμετροι σύνδεσης, η ηπατική κάθαρση CL, παράμετροι διαπερατότητας και διάχυσης από το τοίχωμα των τριχοειδών και in vitro δεδομένα απορρόφησης. Οι τιμές των παραμέτρων αυτών εκτιμώνται με προσαρμογή του μοντέλου σε κατάλληλα πειραματικά δεδομένα. Επίσης, έχει γίνει μελέτη συγκεκριμένων μεθόδων (Poulin and Theil 2000; Rodgers and Rowland 2006; Schmitt 2008) όπου χρησιμοποιούνται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου (μοριακό βάρος, λιποφιλία, βαθμός ιονισμού) και η σύνθεση του ιστού για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατανομής K_p .

2.6.1. Μοντέλο ανοιχτού βρόγχου - Open loop model

Για την εκτίμηση των παραμέτρων ενός PBPK μοντέλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυο διαφορετικές μέθοδοι (Εικόνα 9).

Με τη μέθοδο εκτίμησης ανοιχτού βρόγχου (open loop), το κλειστό σύστημα κυκλοφορίας αποκόπτεται στο διαμέρισμα αρτηριακού αίματος, το οποίο τροφοδοτεί τα περιφερειακά διαμερίσματα. Σε αυτή την προσέγγιση, το προφίλ συγκέντρωσης αίματος (ή πλάσματος) προσαρμόζεται ξεχωριστά. Από τα δεδομένα από το αρτηριακό αίμα ή πλάσμα, προσαρμόζεται το προφίλ συγκέντρωσης - χρόνου όπου και ακολουθείται ένα εμπειρικό μοντέλο. Επειδή το αίμα αποτελεί πηγή εισόδου του μορίου στους ιστούς, η συγκέντρωση αυτού χρησιμοποιείται ως συνάρτηση εισόδου και με την προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, γίνεται η εκτίμηση των παραμέτρων κάθε ενός ιστού ξεχωριστά. Λόγω της υπολογιστικής και αναλυτικής απλότητας του, αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε κυρίως στις εργασίες μοντελοποίησης PBPK. Το

μοντέλο ανοιχτού βρόγχου αποτελείται από τις εξισώσεις για το εμπειρικό μοντέλο και τις εξισώσεις του περιγράφουν την κατανομή του μορίου σε κάθε έναν ιστό. Η μεταβολή της συγκέντρωσης στο αρτηριακό αίμα είναι προκαθορισμένη από το εμπειρικό μοντέλο και χρησιμοποιείται κατά την προσαρμογή του μοντέλου του ιστού στα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα.

Αντίθετα, στο μοντέλο κλειστού βρόγχου το προφίλ της αρτηριακής συγκέντρωσης είναι αποτέλεσμα της κατανομής στο σύνολο των ιστών. Με τη μέθοδο εκτίμησης κλειστού βρόγχου (closed loop), χρησιμοποιείται το ολικό PBPΚ μοντέλο και όλες οι εξισώσεις προσαρμόζονται ταυτόχρονα σε δεδομένα συγκέντρωσης- χρόνου από το αίμα και τους ιστούς για την εκτίμηση των παραμέτρων. Η κατανομή στα διαμερίσματα γίνεται σύμφωνα με την αρχή διατήρησης της μάζας, έτσι ώστε το άθροισμα της ποσότητας του μορίου σε όλους τους ιστούς για κάθε χρονική στιγμή μαζί με την ποσότητα που έχει απομακρυνθεί μέχρι τότε να παραμένει σταθερό. Με τη μέθοδο αυτή όμως το πλήθος των εξισώσεων και των παραμέτρων που πρέπει να υπολογιστούν είναι μεγάλο. Λόγω της πολυπλοκότητας της μεθόδου, αυτή η προσέγγιση δεν χρησιμοποιείται για την μοντελοποίηση των PBPΚ.

Ένα σοβαρό ελάττωμα της εκτίμησης ανοιχτού βρόγχου, είναι ότι το άνοιγμα του βρόχου κλειστής κυκλοφορίας του μοντέλου ολόκληρου του σώματος, παραβιάζει την ουσιώδη παραδοχή ισορροπίας μάζας και μπορεί να οδηγήσει σε προκαταρκτικές εκτιμήσεις παραμέτρων. Η καλύτερη εφαρμογή της "εκτίμησης ανοιχτού βρόχου" είναι για την εκτίμηση των αρχικών παραμέτρων, να ακολουθείται μία διαδικασία "εκτίμησης κλειστού βρόχου".

2.6.2. Μη γραμμική παλινδρόμηση

Για την προσαρμογή ενός μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιείται η ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis).

Στις περιπτώσεις που η σχέση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μεταβλητών είναι γραμμική, τότε εφαρμόζεται η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (linear regression analysis) και το μοντέλο είναι γραμμικό. Με αυτή τη μέθοδο, οι παράμετροι του μοντέλου υπολογίζονται με αναλυτικό τρόπο (Bonate 2006).

Στις περιπτώσεις των φαρμακοκινητικών μοντέλων, που η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης και χρόνου είναι μη γραμμική, εφαρμόζεται η μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (non-linear regression analysis). Στόχος είναι να εκτιμηθούν οι παράμετροι του μοντέλου, μέσω των πειραματικών δεδομένων με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Υποθέτοντας πως Y είναι τα πειραματικά δεδομένα και $\hat{Y}=f(\beta, x)$ οι προβλεπόμενες τιμές του μοντέλου, όπου f μη γραμμικό μοντέλο, β οι παράμετροι του μοντέλου και x οι ανεξάρτητες μεταβλητές, η προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα γίνεται με εκτίμηση των τιμών των παραμέτρων β , για τις οποίες οι προβλεπόμενες τιμές να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στα πειραματικά δεδομένα. Αυτό γίνεται με την εκτίμηση μιας αντικειμενικής συνάρτησης (objective function), η οποία

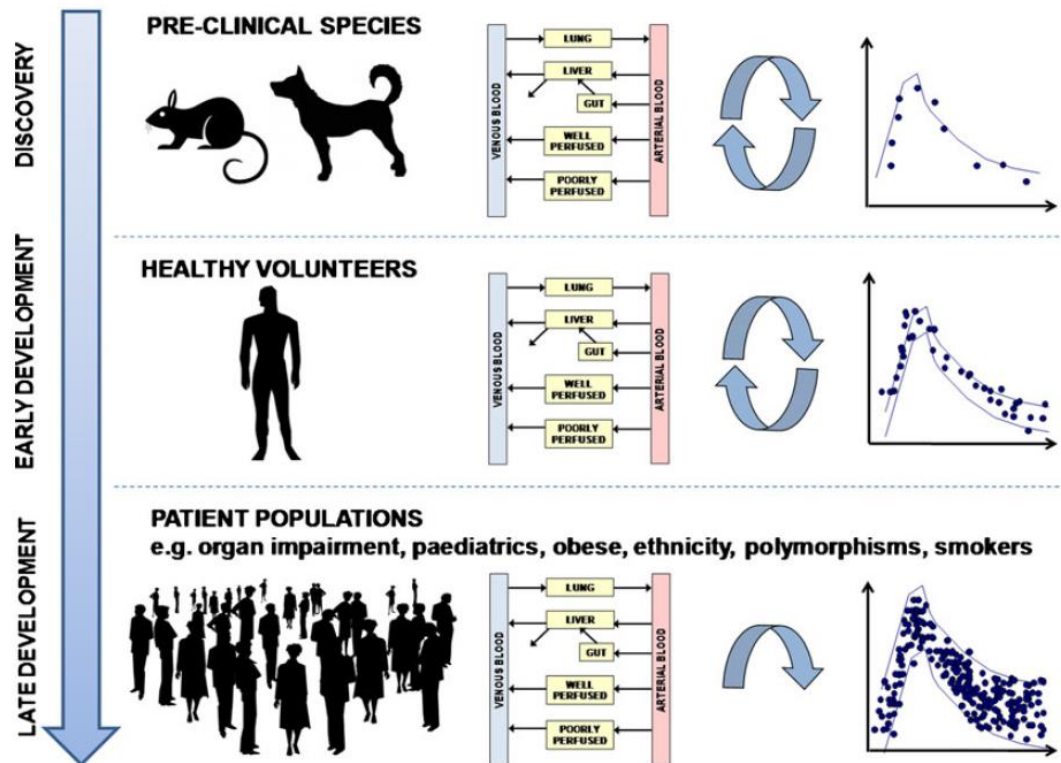
ποσοτικοποιεί την απόσταση των Y και των $\hat{Y}$, και εκτιμά τις τιμές των παραμέτρων β μαζί με το τυπικό σφάλμα, οι οποίες ελαχιστοποιούν την αντικειμενική συνάρτηση. Στη μη γραμμική παλινδρόμηση η ελαχιστοποίηση της αντικειμενικής συνάρτησης γίνεται με επαναληπτικό τρόπο με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος. Το τυπικό σφάλμα εκφράζει την αβεβαιότητα με την οποία έχουν εκτιμηθεί οι παράμετροι, λόγω του προσεγγιστικού τρόπου προσδιορισμού τους. Το πιο γνωστό μοντέλο σφάλματος είναι το προσθετικό και ακολουθούν το αναλογικό, το εκθετικό και το συνδυαστικό. Ανάλογα με το μοντέλο σφάλματος που ακολουθείται η αντικειμενική συνάρτηση μπορεί να πάρει διάφορες μορφές.

2.7. Επέκταση ενός PBPK μοντέλου

Με την επέκταση (extrapolation) ενός PBPK μοντέλου από ένα είδος σε ένα άλλο, μπορεί να προβλεφθεί η φαρμακοκινητική του μορίου στο δεύτερο είδος. Η επέκταση ενός μοντέλου βασίζεται στα χαρακτηριστικά και στις υποθέσεις ανάπτυξης του PBPK μοντέλου. Στόχος είναι η πρόβλεψη της κατανομής του μορίου σε ένα είδος, για παράδειγμα σε υγιείς ανθρώπους, για το οποίο δεν υπάρχουν δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου από τους ιστούς, με βάση ένα PBPK μοντέλο που αναπτύσσεται για ένα άλλο είδος μέσω προκλινικών μελετών, από το οποίο έχουν ληφθεί τέτοια δεδομένα. Η δομή του μοντέλου θεωρείται ίδια, καθώς προκύπτει από τη φυσιολογία και την ανατομία του οργανισμού και θεωρείται ίδια για όλα τα θηλαστικά, καθώς και από τα χαρακτηριστικά του μορίου. Οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου τροποποιούνται κάθε φορά ανάλογα με το είδος για το οποίο γίνεται η επέκταση. Διευκολύνεται έτσι ο καθορισμός της αρχικής δόσης και του δοσολογικού σχήματος κατά την πρώτη χορήγηση του φαρμάκου σε ανθρώπους και μειώνεται με αυτόν τον τρόπο η πιθανότητα χορήγησης υποθεραπευτικής ή τοξικής δόσης. Στη συνέχεια, το μοντέλο μπορεί να επεκταθεί και σε πληθυσμούς ανθρώπων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον μελέτης (Εικόνα 9).

Για τη επέκταση του μοντέλου της κροκετίνης από το ποντίκι στον άνθρωπο, οι τιμές των φυσιολογικών παραμέτρων, όγκος V_T και ροή αίματος Q_T κάθε οργάνου, λαμβάνονται από τη βιβλιογραφία (ILSI,1994) καθώς και ο όγκος του αγγειακού και του εξωαγγειακού χώρου κάθε ιστού, V_n και V_{en} , αντίστοιχα. Ακόμα, η καρδιακή παροχή (Cardiac Output) και η τιμή του αιματοκρίτη (HCT) για την μετατροπή του αίματος σε πλάσμα αναφέρονται στην ίδια βιβλιογραφία. Οι παράμετροι κατανομής στο πλάσμα V_F , K_{01} , και CL_F , όπου V_F είναι ο όγκος του πλάσματος για συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας 1, K_{01} είναι η σταθερά ρυθμού εμφάνισης της κροκετίνης στο αίμα, CL_F η κάθαρση για συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας 1 και οι συντελεστές κατανομής στους ιστούς K_p , η κάθαρση CL_T και ο συντελεστής επιφάνειας διαπερατότητας PS_T θεωρείται ότι είναι ίδιες μεταξύ των ειδών λόγω της παρόμοιας φυσιολογίας και βιοχημικής σύνθεσης. Οπότε, γνωρίζοντας αυτές τις τιμές, είναι δυνατό να

υπολογιστούν οι επιθυμητές τιμές των συγκεντρώσεων της κροκετίνης σε κάθε ιστό, ύστερα από χορήγηση σε άνθρωπο σε κάθε έναν ιστό και στο αίμα ή πλάσμα, ώστε να εκτιμηθεί ένα προφίλ συγκέντρωσης - χρόνου και να προβλεφθεί η φαρμακοκινητική του μορίου αυτού στον άνθρωπο.



Εικόνα 9: Στάδια ανάπτυξης και επέκτασης ενός PBPK μοντέλου

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται συνοπτικά το πρωτόκολλο με βάση το οποίο κινηθήκαμε και εκτελέστηκε το πείραμα, εν συνεχεία η μέθοδος ανάλυσης των δεδομένων του φυσιολογικού φαρμακοκινητικού μοντέλου της κροκετίνης και του μεταβολίτη της, του γλυκουρονιδίου της κροκετίνης. Επιπροσθέτως, παρουσιάζονται οι εξισώσεις των μοντέλων και γίνεται εκτίμηση των παραμέτρων. Ακόμα, παρουσιάζεται η προσαρμογή ενός PBPΚ μοντέλου και η επέκτασή του μεταξύ των ειδών. Τέλος, αναφέρονται κάποια στοιχεία για το πρόγραμμα Phoenix και Berkeley Madonna.

Το εκχύλισμα κρόκου (SFE) παρασκευάστηκε με 1 γραμμάριο των στιγμάτων του και 37.5 mL νερού HPLC σε γυάλινη φιάλη που διατηρείται στο ψυγείο για 3 ημέρες. Το παρασκευασμένο εκχύλισμα διηθήθηκε υπό χαμηλή πίεση και στη συνέχεια καταψύχθηκε για να ακολουθήσει λυοφιλοποίηση, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο Kryodos-50 Telstar lyophilizer.

Σε 80 αρσενικά ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων, χορηγήθηκε υδατικό εκχύλισμα κρόκου. Τα ζώα διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες των 40 και έλαβαν το εκχύλισμα αυτό με ανασυσταμένο σε ενέσιμο ύδωρ διάλυμα λυοφιλοποιημένου SFAE είτε ενδοφλεβίως μέσω της αρτηρίας της ουράς, είτε από το στόμα μέσω της τεχνικής gavage. Η δόση προσδιορίστηκε σε 60 mg / χιλιόγραμμο σωματικού βάρους του λυοφιλοποιημένου εκχυλίσματος. Οι ποντικοί σε κάθε ομάδα χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες των πέντε και κάθε ομάδα αντιπροσώπευε διαφορετικό χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Η λήψη αίματος έγινε με καρδιοπαρακέντηση μετά από αναισθησία με ισοφλουράνιο στα 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά τη χορήγηση. Η δειγματοληψία ιστών (καρδιάς, ήπατος, πνευμόνων και νεφρών) διεξήχθη επίσης στα ίδια χρονικά σημεία μετά από αναισθησία με ισοφλουράνιο και ευθανασία. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν απευθείας και τα δείγματα ορού και ιστού καταψύχθηκαν και φυλάχθηκαν στους -70°C μέχρι την ανάλυση HPLC.

Η αρχική δόση και περιεκτικότητα αναφέρεται σε κροκίνη, όμως κάνοντας αναγωγή με το μοριακό βάρος της κροκετίνης, μετρήσαμε τη δόση σε μονάδες κροκετίνης. Η κροκίνη υδρολύεται σε κροκετίνη και το γλυκουρονίδιο αποτελεί το μεταβολίτη της. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δεδομένων ακολουθήθηκε το παρακάτω πλάνο:

1. Με προσαρμογή εμπειρικού φαρμακοκινητικού μοντέλου στα δεδομένα από το πλάσμα προσομοιώνεται το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου στο πλάσμα (serum) μέσω του προγράμματος Phoenix.
2. Στη συνέχεια γίνεται εκτίμηση των παραμέτρων του πλάσματος, για ενδοφλέβια χορήγηση (IV) και για από του στόματος χορήγηση (per os), τόσο για την κροκετίνη, όσο και για τον μεταβολίτη της, δηλαδή το γλυκουρενίδιο της κροκετίνης. Η κατανομή της κροκετίνης στο αίμα έχει μελετηθεί και δεν παρουσιάζει κάποια σύνδεση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο μεταβολισμός της κροκετίνης συμβαίνει στο ήπαρ.

3. Το προφίλ αυτό χρησιμοποιείται ως συνάρτηση εισόδου για την εκτίμηση των παραμέτρων K_p , CL και PS με μοντέλα ανοιχτού βρόγχου για κάθε έναν από τους ιστούς, τόσο με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, όπου ο ιστός θεωρείται ενιαίο μοντέλο, όσο και με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών.
4. Τέλος, με visual inspection, γίνεται επιλογή του καταλληλότερου και πιο αξιόπιστου μοντέλου.

3.1. Κατανομή στο αίμα

Χαρακτηρίστηκε η φαρμακοκινητική της κροκετίνης στον ορό του αίματος (πλάσμα) για 8 χρονικές στιγμές και υπολογίστηκε η μέση μοριακή συγκέντρωση από τα πειραματικά δεδομένα που μας δόθηκαν. Εκτιμήθηκαν τα δεδομένα για ενδοφλέβια χορήγηση του φαρμάκου με την κροκετίνη και τον μεταβολίτη της, καθώς και για από του στόματος χορήγηση με την κροκετίνη και τον μεταβολίτη της. Εν συνεχεία με προσαρμογή εμπειρικού μοντέλου εκτιμήθηκε το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου στο πλάσμα μέσω του προγράμματος Phoenix. Με πρωτοταξική συνάρτηση εισόδου και μονοδιαμερισματικό μοντέλο εκτιμήθηκαν οι παράμετροι V_F , K_{01} και CL_F , όπου V_F είναι ο όγκος του πλάσματος για συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας 1, K_{01} είναι η σταθερά του ρυθμού εμφάνισης της κροκετίνης στο αίμα και CL_F η κάθαρση για συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας 1.

Η συνάρτηση για την κατανομή της συγκέντρωσης της κροκετίνης στο πλάσμα (**Εξίσωση 1**) είναι της μορφής:

$$C_{plasma} = \frac{\frac{D * K_{01}}{V}}{(K_{01} - K_{10})} * (e^{(-K_{10} * time)} - e^{(-K_{01} * time)})$$

$$\text{όπου } K_{10} = \frac{CL_F}{V_F}$$

όπου D είναι η μοριακή δόση ανά βάρος που χορηγήθηκε στα ποντίκια. Επειδή όλα τα ποντίκια έλαβαν την ίδια δόση αλλά έχουν διαφορετικά βάρη, αντί αυτού χρησιμοποιήθηκε η δόση ανά σωματικό βάρος ποντικίου, γεγονός που μας δίνει μία σταθερή και συγκρίσιμη τιμή.

3.2. Κατανομή στους ιστούς

Το μοντέλο που περιγράφει τη συγκέντρωση πλάσματος καθώς και οι παράμετροι αυτού που εκτιμήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ως συνάρτηση εισόδου για την εκτίμηση των παραμέτρων K_p , CL και PS με μοντέλα ανοιχτού βρόγχου για κάθε έναν από τους ιστούς, καρδιά, πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά, τόσο με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, όπου ο ιστός θεωρείται ενιαίο μοντέλο, όσο και με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη

διαπερατότητα των μεμβρανών. (Nestorov, 2003). Η πραγματική δόση που αντιστοιχεί στη μέση μοριακή δόση ανά σωματικό βάρος ποντικίου 25 μg/g, χρησιμοποιήθηκε στη συνάρτηση εισόδου. Και τα δύο μοντέλα ιστών αξιολογήθηκαν και η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου βασίστηκε στην αξιοπιστία της αξιολόγησης με την οπτική εξέταση των προβλεπόμενων τιμών έναντι των δεδομένων.

Για τους ιστούς (T) όπως η καρδιά, τα νεφρά και οι πνεύμονες, ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στον κάθε ιστό δίνεται από την ακόλουθη διαφορική εξίσωση **(Εξίσωση 2)** (Nestorov, 2003; Christodoulou E. et al., 2015b):

$$V_{tissue} * \frac{dC_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} * C_{plasma} - Q_{tissue} * \frac{C_{tissue}}{K_p}$$

Όπου K_p είναι ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, υπολογιζόμενος τοποθετώντας το μοντέλο στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του κάθε ιστού, Q_T είναι η ροή πλάσματος στον κάθε ιστό, V_T είναι ο όγκος του κάθε ιστού και το C_{plasma} είναι το χρονικό προφίλ της συγκέντρωσης της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο πλάσμα, που δίνεται από το εμπειρικό μοντέλο που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο βήμα. Οι τιμές Q_T και V_T λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (ILSI,1994) και μετατράπηκαν για να αντιστοιχούν στη ροή του πλάσματος, αντί της ροής αίματος.

Για τον μόνο ιστό που παρατηρείται μεταβολισμός (ηπατική κάθαρση) το ήπαρ, ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στον ιστό δίνεται από την ακόλουθη διαφορική εξίσωση **(Εξίσωση 3)** (Christodoulou E. et al., 2015b):

$$V_h * \frac{dC_{liver}}{dt} = Q_h * C_p - Q_h * \frac{C_{liver}}{K_{p, liver}} - CL_p * \frac{C_{liver}}{K_{p, liver}} * \frac{Q_h}{Q_h - CL_p}$$

Όπου CL_p είναι η κάθαρση του πλάσματος όπως αυτή εκτιμάται από το PBPK μοντέλο. Προκειμένου να αντληθεί η παραπάνω εξίσωση, γίνεται η υπόθεση είναι ότι η κροκετίνη δεν εισέρχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών εισάγει δύο διαμερίσματα για κάθε ιστό, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο για κάθε ιστό, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας PS_T , που πρέπει να εκτιμηθεί μαζί με το K_p προσαρμόζοντας το μοντέλο στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του κάθε ιστού. Για τους ιστούς της καρδιάς, των νεφρών, των πνευμόνων και του ήπατος, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου της

κροκετίνης και του μεταβολίτη της στον κάθε ιστό δίνεται από τις εξής δύο διαφορικές εξισώσεις (**Εξίσωση 4 και 5**) (Nestorov, 2003):

$$\frac{dC_v(t)}{dt} = -\frac{Q_{tissue} + P_{Stissue}}{V_v} * C_v(t) + \frac{P_{Stissue}}{V_v * K_p} * C_{ev}(t) + \frac{Q_{tissue}}{V_v} * C_p(t)$$

$$\frac{dC_{ev}(t)}{dt} = \frac{P_{Stissue}}{V_{ev}} * C_v(t) - \frac{C_{Lev} + P_{Stissue}}{V_{ev} * K_p} * C_{ev}(t)$$

Το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου του κάθε ιστού, όπου K_p είναι ο συντελεστής κατανομής ιστού:πλάσματος, υπολογιζόμενος τοποθετώντας το μοντέλο στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του κάθε ιστού, Q_t είναι η ροή πλάσματος στον κάθε ιστό, V_v είναι ο όγκος του κάθε ιστού στον αγγειακό χώρο, V_{ev} είναι ο όγκος του κάθε ιστού στον εξωαγγειακό χώρο, C_{Lev} είναι η κάθαρση του εξωαγγειακού χώρου όπως αυτή εκτιμάται από το εμπειρικό μοντέλο, P_{St} είναι ο συντελεστής επιφάνειας διαπερατότητας και το C_p είναι το χρονικό προφίλ της συγκέντρωσης της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο πλάσμα, που δίνεται από το εμπειρικό μοντέλο που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο βήμα. Οι τιμές Q_t , V_v και V_{ev} λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (ILSI,1994) και μετατράπηκαν για να αντιστοιχούν στη ροή του πλάσματος, αντί της ροής αίματος.

3.3. Παράμετροι μοντέλου

Οι παράμετροι του μοντέλου χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τις φυσιολογικές παραμέτρους που είναι ανεξάρτητες του μορίου και τις παραμέτρους που εξαρτώνται από το μόριο.

3.3.1. Φυσιολογικές παράμετροι

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι όγκοι των οργάνων V_t , οι όγκοι των υποδιαμερισμάτων των οργάνων και οι ροές αίματος κάθε ιστού Q_t . Οι τιμές των όγκων V_t και της ροής Q_t των οργάνων για ποντικό (0.250 kg) προέρχονται από τη βιβλιογραφία (ILSI, 1994). Η τιμή του αιματοκρίτη HCT που χρησιμοποιήθηκε είναι 0.46 (River C.,2012).

Οι τιμές για τον όγκο των οργάνων και των ιστών που αντιπροσωπεύονται στα PBPK μοντέλα παρέχονται στον Πίνακα 1, όπου παρουσιάζεται ο όγκος του κάθε ιστού αναλόγως με το επί τις εκατό ποσοστό του συνολικού σωματικού βάρους του ποντικίου (ILSI,1994).

Table 2-4. Relative Organ Weight (% Body Weight) in Mice				
Organ	Mean $\pm$ SD	Range	n	
			Studies	Animals
Adipose Tissue	See text	See text		
Adrenals	0.048		1	5
Bone	10.73 $\pm$ 0.53	10.16 - 11.20	3	30
Brain	1.65 $\pm$ 0.26	1.35 - 2.03	4	419
GI Tract				
Stomach	0.60		1	5
Small Intestine	2.53		1	5
Large Intestine	1.09		1	3
Heart	0.50 $\pm$ 0.07	0.40 - 0.60	4	46
Kidneys	1.67 $\pm$ 0.17	1.35 - 1.88	7	84
Liver	5.49 $\pm$ 1.32	4.19 - 7.98	7	84
Lungs	0.73 $\pm$ 0.08	0.66 - 0.86	5	35
Muscle	38.40 $\pm$ 1.81	35.77 - 39.90	4	40
Pancreas	See text	See text		
Skin	16.53 $\pm$ 3.39	12.86 - 20.80	5	45
Spleen	0.35 $\pm$ 0.16	0.16 - 0.70	5	60
Thyroid	ND	ND		

Πίνακας 1: Τιμές για τον όγκο του κάθε ιστού και οργάνου αναλογικά με το επί τις εκατό ποσοστό του συνολικού σωματικού βάρους του ποντικίου.

Επομένως, για να βρεθεί ο τελικός όγκος του κάθε ιστού, αρκεί να πολλαπλασιαστεί ο όγκος του ιστού που είναι ανάλογος του επί τις εκατό ποσοστού του συνολικού σωματικού βάρους, με το μέσο σωματικό βάρος ενός ποντικίου 0.250kg. Διαμορφώνεται ως εξής σύμφωνα με τον Πίνακα 2:

tissue	organ weight % body weight (ml/gr)	body weight (gr)	Vtissue(ml)
Heart	0.5	25	0.125
Kidney	1.67	25	0.4175
Liver	5.49	25	1.375
Lung	0.73	25	0.1625

Πίνακας 2: Τιμές για τον τελικό όγκο του κάθε ιστού σε ml.

Στα κλασικά φαρμακοκινητικά μοντέλα, η κίνηση μιας ένωσης σε μια μεμβράνη αντιπροσωπεύεται είτε χρησιμοποιώντας όρους μάζας και σταθερές κινητικής ταχύτητας ή όρους συγκέντρωσης και σταθερές μεταφοράς. Ωστόσο, στα PBPK μοντέλα περιοριζόμενης ροής, η σταθερά μεταφοράς είναι ισοδύναμη με τη ροή αίματος προς τον ιστό. Κατά συνέπεια, σε αυτά τα μοντέλα, απαιτούνται τιμές για καρδιακή παροχή και για την περιφερειακή κατανομή της καρδιακής παροχής στα όργανα. Οι τιμές για αυτές τις παραμέτρους παρέχονται για ποντίκια, αρουραίους, σκύλους και ανθρώπους σύμφωνα με τον Πίνακα 3 (ILSI,1994):

Table 3-1. Cardiac Output (ml/min) in Unanesthetized Mice, Rats, Dogs and Humans				
Species	Cardiac Output		n	
	Mean $\pm$ SD	Range	Studies	Animals
Mouse	13.98 $\pm$ 2.85	12-16	2	16
Rat	110.4 $\pm$ 15.60	84-134	5	92
Dog	2,936 ^a	1,300-3,000 ^b	1 ^a	8 ^a
Human	5,200 ^c	4,600-4,600 ^d		

Πίνακας 3: Καρδιακή παροχή για ποντίκια, αρουραίους, σκύλους και ανθρώπους σε μονάδες ml/min.

Η τιμή που μας αφορά, για την καρδιακή παροχή σε ποντίκια 0.250kg είναι 13.98 ml/min. Ο Πίνακας 4 παρέχει τις μέσες τιμές ροής αίματος για τα κύρια συστήματα οργάνων στον ποντικό, σύμφωνα με το επί τις εκατό ποσοστό της καρδιακής παροχής (ILSI,1994).

Table 3-3. Regional Blood Flow Distribution in Mice						
Tissue	Blood Flow Rate ml/min/100g			Blood Flow Distribution % Cardiac Output		
	Mean (SD)	Range	n ^a	Mean (SD)	Range	n ^a
Adipose						
Adrenal						
Bone						
Brain	85 $\pm$ 1	84-85	2	3.3 $\pm$ 0.3	3.1 - 3.5	2
Heart	781 $\pm$ 18	768-793	2	6.6 $\pm$ 0.9	5.9 - 7.2	2
Kidney				9.1	7.0 - 11.1	2
Liver (Total) ^b				16.2		2
Hepatic Artery ^c				2.0		1
Portal Vein ^d				14.1	13.9 - 14.2	2
Lung ^e	35		1	0.5		1
Muscle	24 $\pm$ 6	20-28	2	15.9 $\pm$ 5.2	12.2 - 19.6	2
Skin	18 $\pm$ 12	9-26	2	5.8 $\pm$ 3.5	3.3 - 8.3	2

Πίνακας 4: Μέσες τιμές ροής αίματος για τα κύρια συστήματα οργάνων στον ποντικό, σύμφωνα με το επί τις εκατό ποσοστό της καρδιακής παροχής.

Εάν πολλαπλασιαστεί ο μέσος όρος της ροής αίματος στον κάθε ιστό που είναι αναλογικός με την καρδιακή παροχή, με το ποσοστό 13.98 της καρδιακής παροχής, τότε λαμβάνουμε την τιμή της ροής του αίματος για κάθε ένα ιστό, σε μονάδες ml/min, σύμφωνα με τον Πίνακα 5:

tissue	blood flow distribution % cardiac output	cardiac output (ml/min)	Qblood (ml/min)
Heart	6.6	13.98	0.92268
Kidney	9.1	13.98	1.27218
Hepatic artery of Liver	2.0	13.98	0.2796
Lung	0.5	13.98	13.98

Πίνακας 5: Τιμές ροής αίματος για κάθε έναν ιστό σε μονάδες ml/min.

Για να μετατραπεί σε ροή πλάσματος χρησιμοποιείται ο τύπος:
 $Q_{\text{plasma}} = Q_{\text{blood}} (1 - \text{HCT})$, όπου HCT είναι ο αιματοκρίτης με τιμή 0.46,
 σύμφωνα με τον Πίνακα 6:

tissue	(1-HCT)	Qplasma (ml/min)
Heart	0.54	0.498
Kidney	0.54	0.687
Liver Hepatic	0.54	0.151
Lung	0.54	7.549

Πίνακας 6: Τιμές ροής πλάσματος για κάθε έναν ιστό σε μονάδες ml/min.

Οι τιμές των Vn και Ven υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τα κλάσματα του αγγειακού χώρου και του εξωαγγειακού χώρου (ILSI,1994). Στον Πίνακα 7 παρέχονται μέσες τιμές και κλίμακες για τον υπολειπόμενο όγκο αίματος σε διάφορους ιστούς του ποντικού. Οι τιμές αυτές είναι κλάσματα του όγκου για τον ιστό αυτό, δηλαδή το επί τις εκατό ποσοστό του όγκου του υπολειπόμενου αίματος στο όργανο σε σχέση με τον όγκο του οργάνου. Αυτές οι τιμές δεν είναι αναπαραστάσεις του κλάσματος του συνολικού όγκου αίματος που βρίσκεται σε αυτόν τον ιστό, αλλά αναφέρονται στον αγγειακό χώρο του κάθε ιστού.

Table 4-1 Volume Fraction of Blood in Organs and Tissues												
	Mouse			Rat			Dog			Human		
	Mean (SD)	Range	n	Mean (SD)	Range	n	Mean (SD)	Range	n	Mean (SD)	Range	n
Adrenal	0.03		1	0.24		1				0.02± 0.01	0.02-0.03	3
Adipose										0.04		1
Bone	0.11		1	0.04						0.04± 0.01	0.03-0.10	15
Brain	0.03		1	0.03	0.02-0.04	3	0.01		1			
Heart				0.26		1	0.07		1			
Kidney	0.24	0.12-0.34	3	0.16	0.11-0.27	3	0.08		1	0.36± 0.01	0.22-0.50	4
Liver	0.31	0.23-0.36	3	0.21	0.12-0.27	3	0.15		1	0.11		1
Lung	0.50	0.40-0.62	3	0.36	0.26-0.52	3	0.30		1			
Muscle	0.04	0.03-0.05	2	0.04	0.01-0.09	3	0.01			0.01		1
Skin	0.03		1	0.02		1				0.08		1
Spleen	0.17	0.17-0.19	3	0.22	0.17-0.28	3	0.51		1			
Thyroid				0.18		1						

Πίνακας 7: Κλάσματα του όγκου αίματος σε κάθε έναν ιστό για ποντίκια, αρουραίους, σκύλους και ανθρώπους.

Για να μετατραπεί το κλάσμα του όγκου αίματος του κάθε ιστού για τον αγγειακό χώρο, σε κλάσμα όγκου πλάσματος, σύμφωνα με τον Πίνακα 8, ισχύει η σχέση:

$$Vv \text{ plasma} = Vv \text{ blood} (1-HCT).$$

tissue	Vv blood (%)	(1-HCT)	Vv plasma (%)
Heart	26	0.54	0.1404
Kidney	24	0.54	0.1296
Liver	31	0.54	0.1674
Lung	50	0.54	0.27

Πίνακας 8: Κλάσματα του όγκου πλάσματος για κάθε έναν ιστό.

Για να μετατραπεί το κλάσμα του όγκου πλάσματος του κάθε ιστού για τον αγγειακό χώρο, σε αγγειακό όγκο πλάσματος του κάθε ιστού σε ml, πολλαπλασιάστηκε με τον όγκο του κάθε ιστού V_{tissue} . Οι τιμές διαμορφώνονται σύμφωνα με τον Πίνακα 9:

tissue	Vv plasma (%)	$V_{\text{tissue}}(\text{ml})$	Vv plasma (ml)
Heart	0.1404	0.125	0.01755
Kidney	0.1296	0.4175	0.054108
Liver	0.1674	1.375	0.230175
Lung	0.27	0.1625	0.043875

Πίνακας 9: Τιμές του όγκου πλάσματος του αγγειακού χώρου για τον κάθε ιστό σε ml.

Για να βρεθεί το κλάσμα του όγκου αίματος του κάθε ιστού στον εξωαγγειακό χώρο, ισχύει η σχέση: $Vv + V_{\text{ev}} = V_{\text{tissue}}$. Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τα αποτελέσματα:

tissue	Vv blood (%)	$V_{\text{ev}} = 100 - Vv \text{ blood} (\%)$
Heart	26	74
Kidney	24	76
Liver	31	69
Lung	50	50

Πίνακας 10: Τιμές του όγκου αίματος του εξωαγγειακού χώρου για τον κάθε ιστό σε επί τις εκατό ποσοστό.

Δεν χρειάζεται μετατροπή σε κλάσμα όγκου πλάσματος, αφού στον εξωαγγειακό χώρο υπολογίστηκε μόνο ο εξωαγγειακός όγκος του αίματος του

κάθε ιστού. Για να μετατραπεί το κλάσμα του όγκου αίματος του κάθε ιστού για τον εξωαγγειακό χώρο, σε εξωαγγειακό όγκο αίματος του κάθε ιστού σε ml, πολλαπλασιάζω με τον όγκο του κάθε ιστού V_{tissue} . Οι τιμές διαμορφώνονται σύμφωνα με τον Πίνακα 11:

tissue	V_{ev} (%)	$V_{tissue}(ml)$	$V_{ev} (ml)$
Heart	0.74	0.125	0.0925
Kidney	0.76	0.4175	0.3173
Liver	0.69	1.375	0.94875
Lung	0.50	0.1625	0.08125

Πίνακας 11: Τιμές του όγκου αίματος του εξωαγγειακού χώρου για τον κάθε ιστό σε ml.

3.3.2. Παράμετροι που εξαρτώνται από το μόριο

Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται οι παράμετροι που εξαρτώνται από το μόριο και χαρακτηρίζουν την κατανομή της κροκετίνης στο αίμα και τους ιστούς. Οι τιμές των παραμέτρων K_{rt} , CL_t και PS_t εκτιμώνται με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.

3.3.2.1. Συντελεστής κατανομής ιστού:αίματος (tissue to blood Partition coefficient)

Ο συντελεστής κατανομής ιστού: αίματος ισούται με $K_p = \frac{C_{tissue}}{C_a \cdot (1-E)}$ όπου C_t και C_a η συγκέντρωση στον ιστό και στο αρτηριακό αίμα σε σταθεροποιημένη κατάσταση αντίστοιχα και E ο συντελεστής εξαγωγής για τα όργανα απομάκρυνσης.

3.3.2.2. Κάθαρση (Clearance)

Κάθαρση καλείται ο όγκος του πλάσματος που καθαρίζεται από το φάρμακο στη μονάδα του χρόνου. Οι μονάδες της κάθαρσης είναι ml/min. Όπως ο όγκος κατανομής συσχετίζει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα με την ποσότητά του στο σώμα, έτσι και η κάθαρση συσχετίζει τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα με το ρυθμό απομάκρυνσής του από το σώμα.

Η ηπατική κάθαρση CL_H εξαρτάται από την ενδογενή κάθαρση CL_{int} και την ηπατική ροή αίματος Q :

$$CL_H = Q \cdot E = Q \cdot [CL_{int} / (Q + CL_{int})]$$

α) Για φάρμακα που έχουν ενδογενή κάθαρση η οποία είναι πολύ μικρότερη από την ηπατική ροή αίματος (π.χ. $Q \gg CL_{int}$, $E \rightarrow 0$), η παραπάνω σχέση μπορεί να απλοποιηθεί στην παρακάτω:

$$CL_H = Q \cdot [CL_{int}/Q] = CL_{int}$$

Όπου αυτό σημαίνει ότι η ηπατική κάθαρση, για φάρμακα με μικρό λόγο εκχύλισης, εξαρτάται από την ενδογενή κάθαρση του φαρμάκου, δηλαδή από την ικανότητα των ενζύμων του ήπατος για μεταβολισμό. Έτσι, ενζυμική επαγωγή ή αναστολή θα έχουν σημαντική επίδραση στην ηπατική κάθαρση.

β) Για φάρμακα που έχουν ενδογενή κάθαρση η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από την ηπατική ροή αίματος (π.χ. $Q \ll CL_{int}$, $E \rightarrow 1$), η παραπάνω σχέση απλοποιείται προς:

$$CL_H = Q \cdot [CL_{int}/CL_{int}] = Q$$

Όπου αυτό σημαίνει ότι η ηπατική κάθαρση, για φάρμακα με μεγάλο λόγο εκχύλισης, είναι περίπου ίση με την ηπατική ροή του αίματος και κάθε μεταβολή της ηπατικής ροής του αίματος θα έχει σημαντική επίδραση στην ηπατική κάθαρση αυτών των φαρμάκων.

Όταν λαμβάνεται υπόψη και η πρωτεϊνική σύνδεση, μπορεί να ληφθεί η παρακάτω σχέση που περιγράφει την ηπατική κάθαρση του φαρμάκου:

$$CL_H = Q \cdot E = Q \cdot [(fu \cdot CL_{int}) / (Q + fu \cdot CL_{int})]$$

Η επίδραση της μεταβολής της πρωτεϊνικής σύνδεσης στην ηπατική κάθαρση των φαρμάκων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου:

α) Φάρμακα με μεγάλο λόγο εκχύλισης: Για φάρμακα που έχουν ενδογενή κάθαρση η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από την ηπατική ροή αίματος (π.χ. $Q \ll CL_{int}$, $E \rightarrow 1$), η παραπάνω σχέση απλοποιείται προς:

$$CL_H = Q \cdot [fu \cdot CL_{int} / fu \cdot CL_{int}] = Q$$

Η απομάκρυνση αυτών των φαρμάκων εξαρτάται από την ηπατική ροή του αίματος και η μεταβολή της πρωτεϊνικής σύνδεσης δεν επηρεάζει την ηπατική τους απομάκρυνση.

β) Φάρμακα με μικρό λόγο εκχύλισης: Για φάρμακα που έχουν ενδογενή κάθαρση η οποία είναι πολύ μικρότερη από την ηπατική ροή αίματος (π.χ. $Q \gg CL_{int}$, $E \rightarrow 0$), η παραπάνω σχέση απλοποιείται προς:

$$CL_H = Q \cdot [fu \cdot CL_{int} / Q] = fu \cdot CL_{int}$$

Ο ρυθμός απομάκρυνσης αυτών των φαρμάκων είναι πολύ ευαίσθητος σε μεταβολές της πρωτεϊνικής σύνδεσης (>75% σύνδεση). Μικρή μεταβολή της πρωτεϊνικής σύνδεσης θα προκαλέσει σημαντική μεταβολή της ελεύθερης συγκέντρωσης του φαρμάκου και θα μεταβάλλει την ικανότητα του ήπατος να απομακρύνει το φάρμακο.

3.4. Υπολογιστικό πακέτο για την ανάπτυξη του PBPK μοντέλου

Τόσο το Phoenix, όσο και το Berkeley Madonna, είναι πακέτα λογισμικού μαθηματικών μοντέλων και παρέχουν ένα γραφικό περιβάλλον και προγραμματιστικά εργαλεία για μοντελοποίηση, προσομοίωση και ανάλυση δυναμικών συστημάτων. Η ανάπτυξη του μοντέλου μπορεί να γίνει είτε μέσω του γραφικού περιβάλλοντος είτε μέσω προγραμματισμού. Κατά τη χρήση του γραφικού περιβάλλοντος δημιουργείται αρχικά το μοντέλο, δηλαδή ένα δίκτυο μεταβλητών, που περιγράφουν ένα βιολογικό σύστημα. Ως μεταβλητές

χρησιμοποιούνται τα διαμερίσματα (compartments), τα οποία θεωρούνται ομοιογενώς κατανεμημένα και χαρακτηρίζονται από έναν όγκο κατανομής και οι παράμετροι (parameters).

Αφού δημιουργηθεί το μοντέλο, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση διαφόρων διεργασιών. Η προσομοίωση του βιολογικού συστήματος κάτω από διαφορετικές συνθήκες είναι μια από αυτές. Καθορίζοντας τις αρχικές συνθήκες, οι μεταβλητές του μοντέλου μετατρέπονται σε διαφορικές εξισώσεις, οι οποίες λύνονται αριθμητικά. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης λαμβάνονται υπό τη μορφή γραφικής παράστασης στην οποία απεικονίζεται η χρονική μεταβολή όποιας ποσότητας είναι επιθυμητό.

Μια ακόμη διεργασία που μπορεί να εκτελεστεί είναι η εκτίμηση παραμέτρων. Οι τιμές των παραμέτρων εκτιμώνται με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Τα πειραματικά δεδομένα εισάγονται από αρχείο του Microsoft Excel. Ως αποτελέσματα εξάγονται οι εκτιμημένες τιμές των παραμέτρων και τα αντίστοιχα τυπικά σφάλματα, γραφικές παραστάσεις με τα πειραματικά δεδομένα και την προσομοίωση του μοντέλου με τις τιμές των εκτιμημένων παραμέτρων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη του RBRK μοντέλου της κροκετίνης για ποντίκια. Σε 80 αρσενικά ποντίκια ηλικίας 8 εβδομάδων, χορηγήθηκε υδατικό εκχύλισμα κρόκου. Τα ζώα διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες των 40 και έλαβαν το εκχύλισμα αυτό με ανασυσταμένο σε ενέσιμο ύδωρ διάλυμα λυοφιλοποιημένου SFAE είτε ενδοφλεβίως μέσω της αρτηρίας της ουράς είτε από το στόμα μέσω της τεχνικής gavage. Η δόση προσδιορίστηκε σε 60 mg/χιλιόγραμμο σωματικού βάρους του λυοφιλοποιημένου εκχυλίσματος. Οι ποντικοί σε κάθε ομάδα χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδες των πέντε και κάθε ομάδα αντιπροσώπευε διαφορετικό χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με ισοφλουράνιο και στη συνέχεια συλλέχθηκαν δείγματα αίματος στα 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά τη χορήγηση μέσω καρδιοπαρακέντησης. Η δειγματοληψία ιστών διεξήχθη επίσης στα ίδια χρονικά σημεία μετά από ευθανασία. Ύστερα βρέθηκαν οι μέσες μοριακές τιμές των συγκεντρώσεων ανά πεντάδα ποντικών για τις οχτώ παραπάνω χρονικές στιγμές, με το μοριακό βάρος της κροκετίνης να αντιστοιχεί σε 328.408. Επίσης μετατράπηκε η δόση, σε μοριακή δόση, και εν συνεχεία μέσω των προγραμμάτων Phoenix και Berkeley Madonna, υπολογίστηκαν οι αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων.

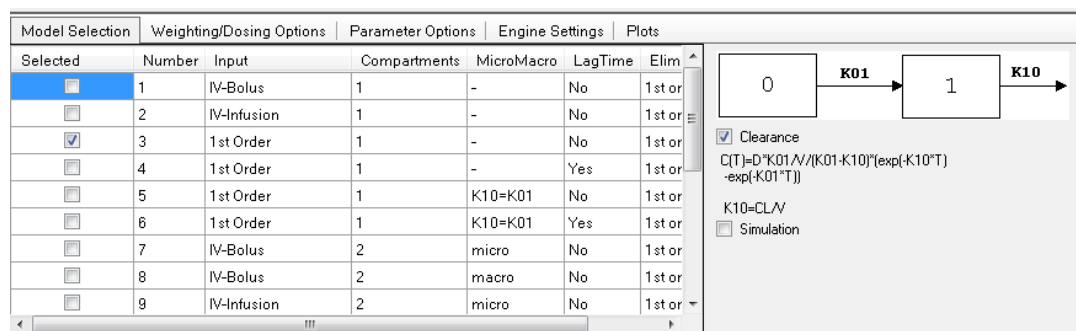
4.1. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για το πλάσμα

Το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για το πλάσμα προβλέφθηκε από τα δεδομένα συγκέντρωσης χρόνου από το πλάσμα των ποντικών. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Phoenix® NLME™ της Pharsight. Έγινε εκτίμηση των παραμέτρων τόσο για το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη και για το μεταβολίτη της, τόσο μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης, όσο και για από του στόματος χορήγηση. Τα επεξεργασμένα δεδομένα των μέσων μοριακών συγκεντρώσεων για την κατανομή του φαρμάκου στο πλάσμα παρατίθενται στον Πίνακα 12:

time (min)	serum IV crocetin (μmol/ml) (SD)	serum IV glucuronide (μmol/ml) (SD)	serum PO crocetin (μmol/ml) (SD)	serum PO glucuronide (μmol/ml) (SD)
5	0.006 (0.0005)	0.0021 (0.0017)	0.0033 (0.0002)	0.003 (0.0002)
15	0.0103 (0.0011)	0.0013 (0.002)	0.0071 (0.0004)	0.001 (0.0003)
30	0.004 (0.0003)	0.0062 (0.0007)	0.0084 (0.0004)	0.0022 (0.0004)
60	0.0026 (0.0004)	0.0041 (0.0004)	0.0041 (0.0004)	0.0021 (0.0004)
90	0.001 (0.0002)	0.0021 (0.0002)	0.0021 (0.0002)	0.0031 (0.0005)
120	0.0002 (0.00004)	0.0021 (0.0001)	0.0006 (0.00008)	0.0034 (0.0003)
180	0.0001 (0.00002)	0.0013 (0.00009)	0.0001 (0.00009)	0.0026 (0.0002)
240	0	0.0011 (0.00008)	0	0.0014 (0.00006)

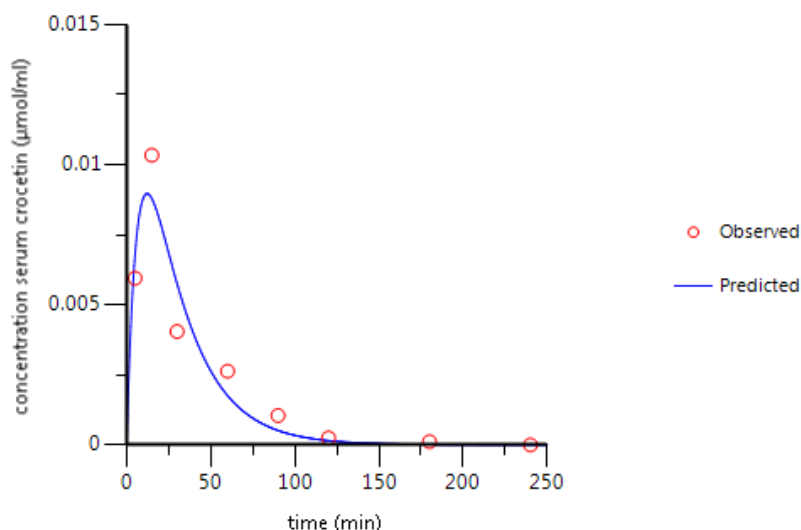
Πίνακας 12: Μέσες μοριακές συγκεντρώσεις για την κατανομή της κροκετίνης και του γλυκουρονιδίου της στο πλάσμα.

Με πρωτοταξική συνάρτηση εισόδου και μονοδιαμερισματικό μοντέλο εκτιμήθηκαν οι παράμετροι V_F , K_{01} και CL_F (Εικόνα 10). Η συνάρτηση για την κατανομή της συγκέντρωσης της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο πλάσμα υπολογίστηκε σύμφωνα με την Εξίσωση 1. Στον άξονα x βρίσκεται ο χρόνος σε λεπτά για οχτώ χρονικές τιμές, ενώ στον άξονα y οι μέσες μοριακές συγκεντρώσεις του πλάσματος, αντίστοιχα.



Εικόνα 10: Επιλογή πρωτοταξικής συνάρτησης εισόδου, μονοδιαμερισματικού μοντέλου και εκτίμηση των παραμέτρων. (Περιβάλλον Phoenix)

4.1.1. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με ενδοφλέβια χορήγηση (IV)



Εικόνα 11: Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με ενδοφλέβια χορήγηση (IV) στο Phoenix.

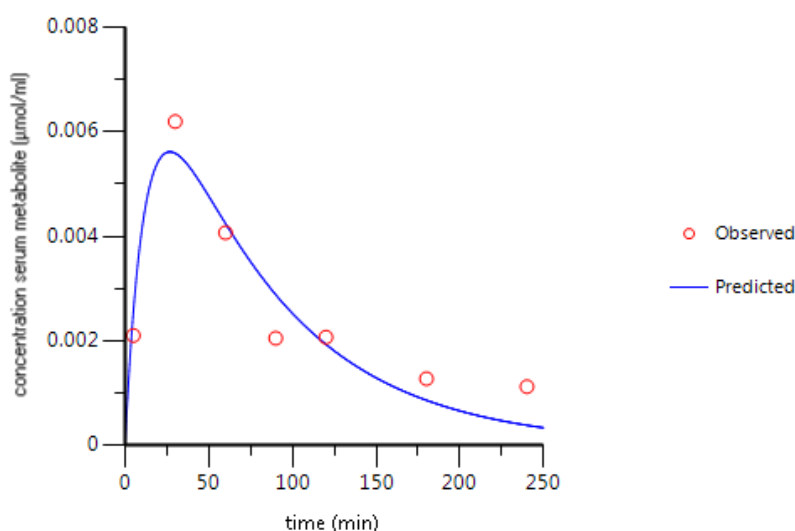
Με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα εκτιμήθηκαν οι παράμετροι που έπειτα θα χρησιμοποιηθούν στις συναρτήσεις εισόδου για την κατανομή στους ιστούς. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα

και η συνεχής γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Είναι η καλύτερη δυνατή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, καθώς δοκιμάστηκαν και άλλα μοντέλα, όμως το συγκεκριμένο έδωσε τις καλύτερες τιμές με όσο το δυνατόν μικρότερα σφάλματα ήταν εφικτό (Εικόνα 12).

	Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
1	V_F		3.0905405	1.0832159	35.049401
2	K01		0.14415393	0.081974278	56.865796
3	CL_F		0.12677698	0.024227303	19.110175

Εικόνα 12: Εκτίμηση παραμέτρων για την κροκετίνη με ενδοφλέβια χορήγηση (IV) στο Phoenix και προσδιορισμός των τυπικών σφαλμάτων.

4.1.2. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με ενδοφλέβια χορήγηση (IV)



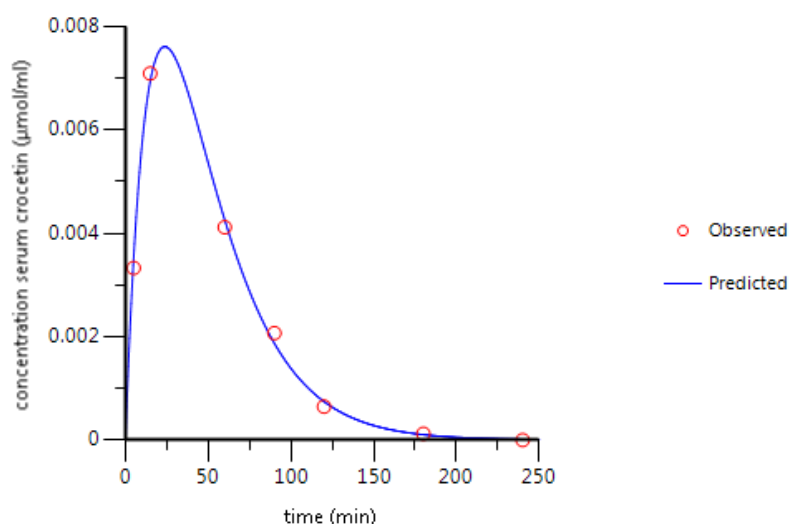
Εικόνα 13: Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με ενδοφλέβια χορήγηση (IV) στο Phoenix.

Με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα εκτιμήθηκαν οι παράμετροι που έπειτα θα χρησιμοποιηθούν στις συναρτήσεις εισόδου για την κατανομή στους ιστούς. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η συνεχής γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλύτερη δυνατή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα με αποδεκτά σφάλματα, ύστερα από την ανάπτυξη και άλλων μοντέλων (Εικόνα 14).

	Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
1	V_F		5.6750774	1.1962793	21.079525
2	K01		0.079823402	0.036488181	45.711133
3	CL_F		0.076146008	0.011384164	14.950441

Εικόνα 14: Εκτίμηση παραμέτρων για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με ενδοφλέβια χορήγηση (IV) στο Phoenix και προσδιορισμός των τυπικών σφαλμάτων.

4.1.3. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με από του στόματος χορήγηση (PO)



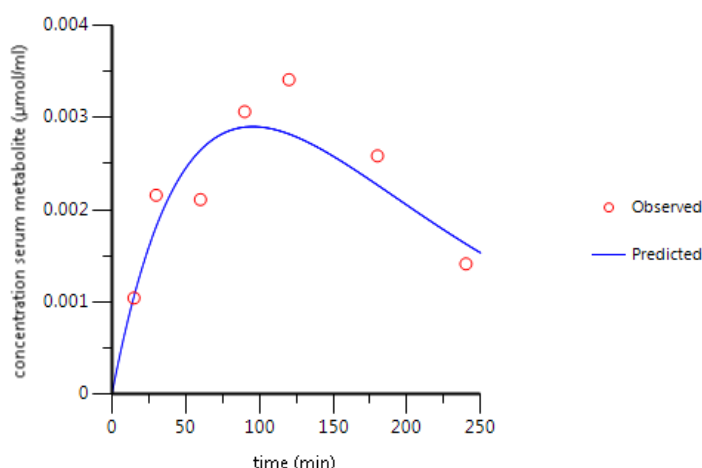
Εικόνα 15: Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για την κροκετίνη με από του στόματος χορήγηση (PO) στο Phoenix.

Με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα εκτιμήθηκαν οι παράμετροι που έπειτα θα χρησιμοποιηθούν στις συναρτήσεις εισόδου για την κατανομή στους ιστούς. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η συνεχής γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Τα τυπικά σφάλματα είναι μικρά (Εικόνα 16).

	Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
1	V_F		2.6357683	0.74013643	28.080482
2	K01		0.050364304	0.015838297	31.447464
3	CL_F		0.090995442	0.0025318889	2.7824348

Εικόνα 16: Εκτίμηση παραμέτρων για την κροκετίνη με από του στόματος χορήγηση (PO) στο Phoenix και προσδιορισμός των τυπικών σφαλμάτων.

4.1.4. Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με από του στόματος χορήγηση (PO)



Εικόνα 17: Προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με από του στόματος χορήγηση (PO) στο Phoenix.

Με προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα εκτιμήθηκαν οι παράμετροι που έπειτα θα χρησιμοποιηθούν στις συναρτήσεις εισόδου για την κατανομή στους ιστούς. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η συνεχής γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Το προφίλ αυτό αποτελεί την καλύτερη δυνατή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, ύστερα από την προσομοίωση και άλλων μοντέλων που δεν έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Εικόνα 18).

	Parameter	Units	Estimate	StdError	CV%
1	V_F		4.6861032	14.805062	315.93546
2	K01		0.0085245394	0.024780306	290.69378
3	CL_F		0.059483776	0.024139794	40.582148

Εικόνα 18: Εκτίμηση παραμέτρων για τον μεταβολίτη της κροκετίνης με από του στόματος χορήγηση (PO) στο Phoenix και προσδιορισμός των τυπικών σφαλμάτων.

4.2. Εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στους ιστούς

Το μοντέλο που περιγράφει τη συγκέντρωση πλάσματος καθώς και οι παράμετροι αυτού που εκτιμήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ως συνάρτηση εισόδου για την εκτίμηση των παραμέτρων K_p , CL και PS με μοντέλα ανοιχτού βρόγχου για κάθε έναν από τους ιστούς, καρδιά, πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά, τόσο με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, όπου ο ιστός θεωρείται ενιαίο μοντέλο, όσο και με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών (Nestorov, 2003). Η πραγματική δόση που αντιστοιχεί στη μέση μοριακή δόση ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους ποντικίου 25 gr, χρησιμοποιήθηκε στη συνάρτηση εισόδου. Παρουσιάζονται μοντέλα τόσο για την ενδοφλέβια χορήγηση, όσο και για την από του στόματος χορήγηση του εκχυλίσματος.

Η εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στους ιστούς πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Berkeley Madonna. Για τους ιστούς με κατανομή περιοριζόμενη από τη διαπότιση εκτιμήθηκαν οι παράμετροι K_{rt} και CL_t . Για τους ιστούς με κατανομή περιοριζόμενη από τη διαπερατότητα των μεμβρανών εκτιμήθηκαν οι παράμετροι K_{rt} , CL_t και PS_t . Ο όρος PS_t αναφέρεται στη διαπερατότητα των μεμβρανών. Ως μέθοδος εκτίμησης επιλέχθηκε η METHOD RK4. Για να εφαρμοστεί το μοντέλο, τα πειραματικά δεδομένα μετατράπηκαν σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις ανά πεντάδα ποντικών για οχτώ χρονικές στιγμές, με το μοριακό βάρος της κροκετίνης να αντιστοιχεί σε 328.408. Για κάθε έναν από τους ιστούς ξεχωριστά αναπτύχθηκε μοντέλο ανοιχτού βρόγχου.

4.2.1. ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (IV)

4.2.1.1. Κατανομή στην καρδιά

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 13:

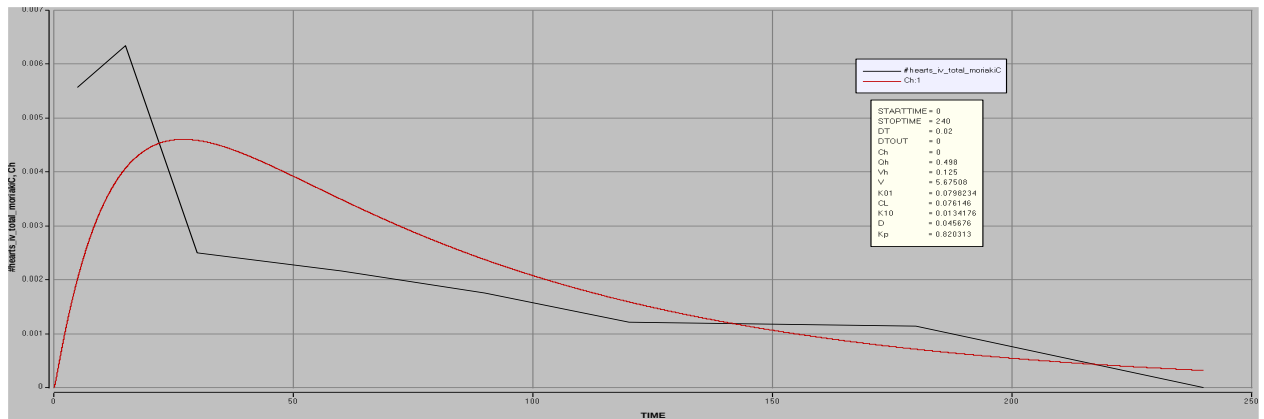
time (min)	concentration heart glucuronide ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)
4.99998	0.0056 (0.0011)
15	0.0063 (0.0015)
30	0.0025 (0.0001)
60	0.0022 (0.0001)
90	0.0018 (0.0002)
120	0.0012 (0.0002)
180	0.0011 (0.0002)
240	0

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στην καρδιά με ενδοφλέβια χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις μόνο για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρενίδιο, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν τιμές για την κροκετίνη. Η αρχική συγκέντρωση στην καρδιά είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό της καρδιάς ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στην καρδιά είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_t και V_t αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_t , V_{v_t} και V_{en_t} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό της καρδιάς έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για ενδοφλέβια χορήγηση (perfusion limited tissue model)

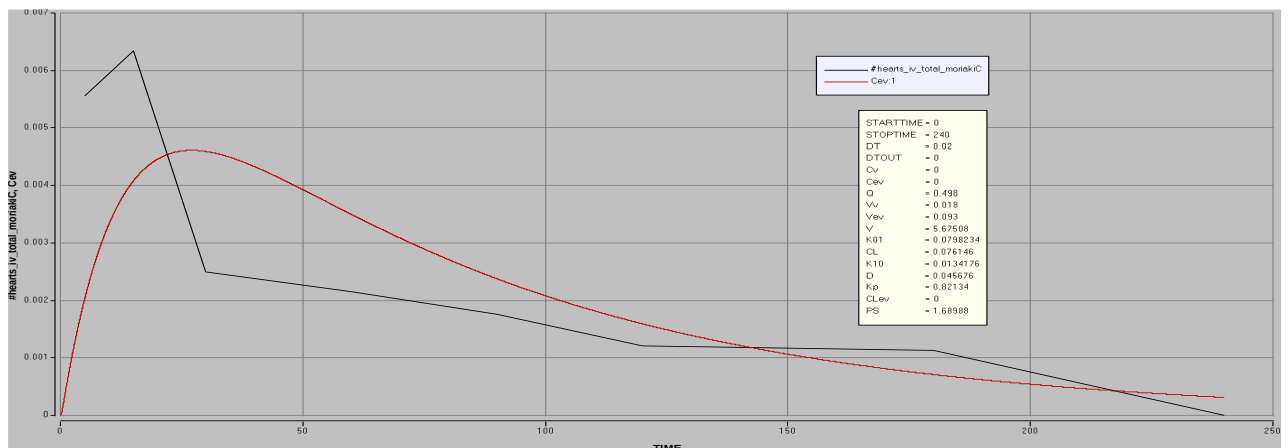
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.82$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για ενδοφλέβια χορήγηση (permeability limited tissue model)

Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου της καρδιάς και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.82$, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS=1.69$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

4.2.1.2. Κατανομή στα νεφρά

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 14:

time (min)	concentration kidney crocetin ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)	concentration kidney glucuronide ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)
4.99998	0.0049 (0.0013)	0.001 (0.0008)
15	0.0063 (0.002)	0.0014 (0.0015)
30	0.0042 (0.001)	0.0021 (0.0014)
60	0.0029 (0.0002)	0.0016 (0.0006)
90	0.0023 (0.0005)	0.0013 (0.0005)
120	0	0.0018 (0.0002)
180	0	0.0007 (0.0002)
240	0	0

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις της ελεύθερης κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά.

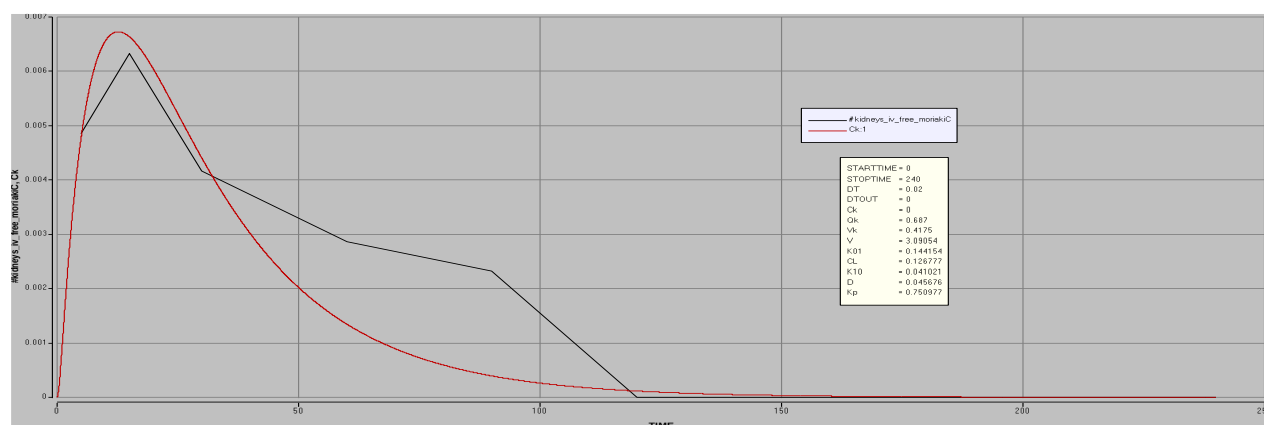
Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στα νεφρά με ενδοφλέβια χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις για την κροκετίνη καθώς και για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρονίδιο. Η αρχική συγκέντρωση στα νεφρά είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό των νεφρών ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στα νεφρά είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_T και V_T αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_T , V_{NT} και V_{ext} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό των νεφρών έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου της

κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για ενδοφλέβια χορήγηση (perfusion limited tissue model)

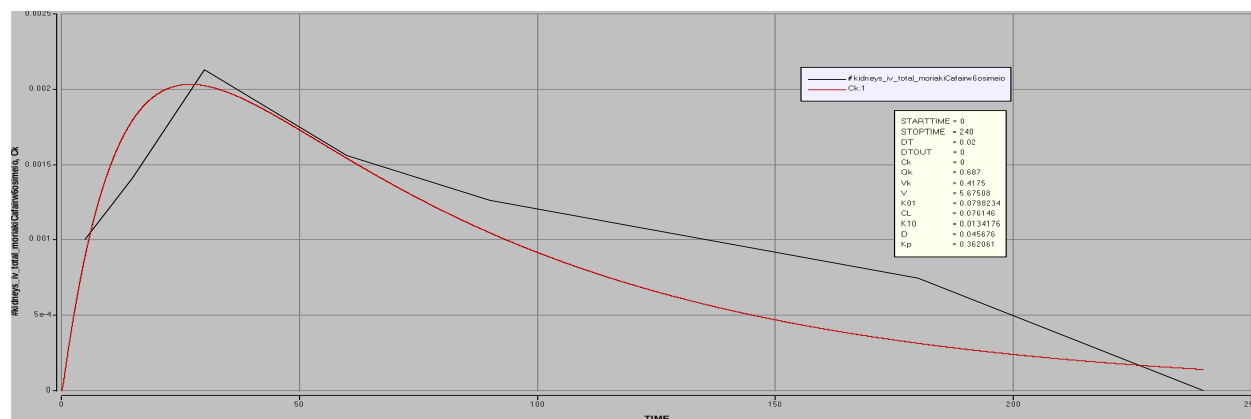
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.75$ για την ελεύθερη κροκετίνη και $K_p=0.36$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Τα datasets της κροκετίνης θεωρούνται πιο αξιόπιστα. Το φάρμακο στα νεφρά απομακρύνεται (Εικόνα 21,22).

Κροκετίνη



Εικόνα 21: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)

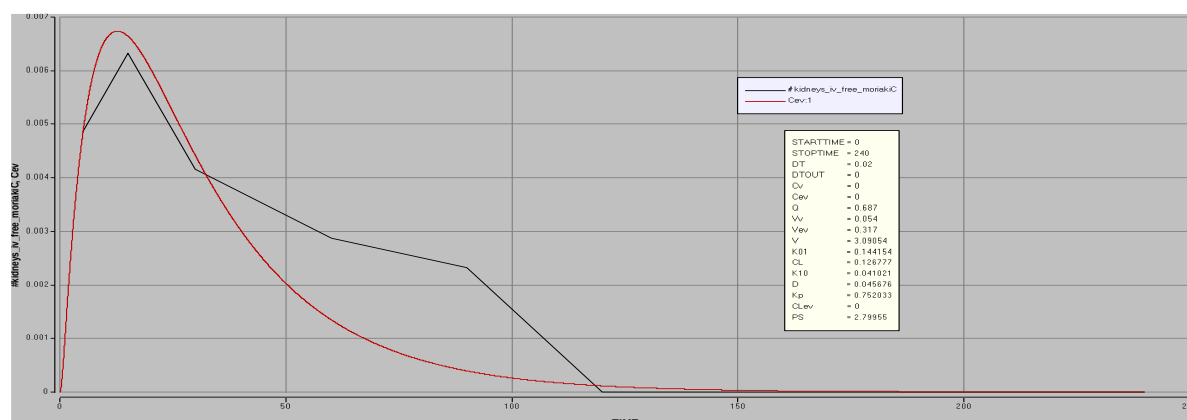


Εικόνα 22: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για ενδοφλέβια χορήγηση (permeability limited tissue model)

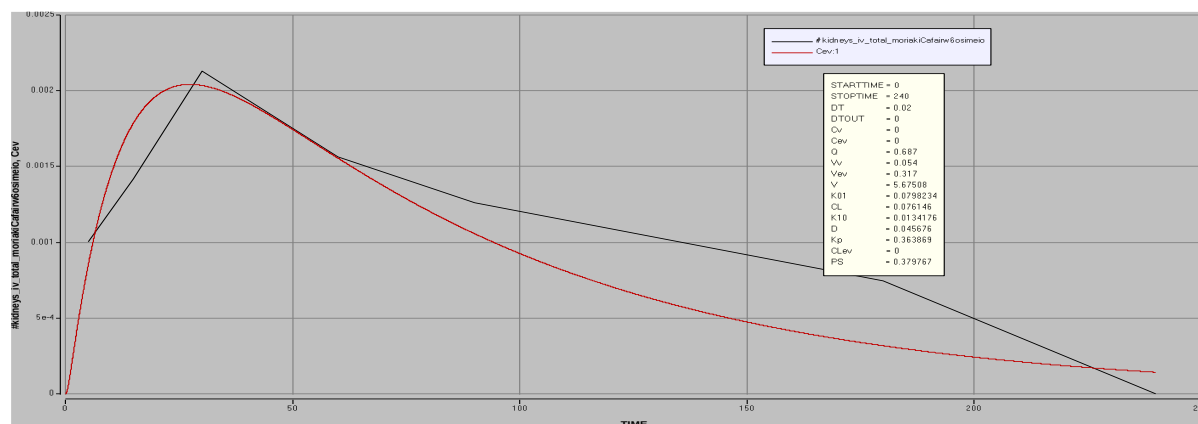
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου των νεφρών και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.75$ για την κροκετίνη και $K_p=0.36$ για τον μεταβολίτη, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS=2.8$ για την κροκετίνη και $PS=0.38$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. (Εικόνα 23,24).

Κροκετίνη



Εικόνα 23: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)



Εικόνα 24: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

4.2.1.3. Κατανομή στους πνεύμονες

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 15:

time (min)	concentration lungs glucuronide ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)
4.99998	0.0066 (0.0026)
15	0.006 (0.001)
30	0.0064 (0.0015)
60	0.004 (0.0014)
90	0.0039 (0.0014)
120	0.0028 (0.0012)
180	0.0012 (0.0003)
240	0.0006 (0.0002)

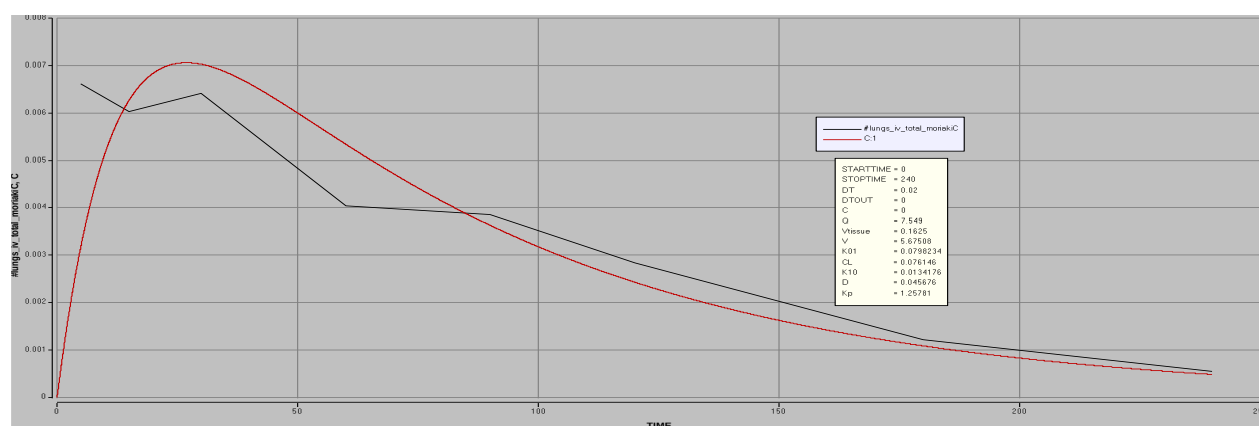
Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στους πνεύμονες με ενδοφλέβια χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις μόνο για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρενίδιο, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν τιμές για την κροκετίνη. Η αρχική συγκέντρωση στους πνεύμονες είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό των πνευμόνων ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στους πνεύμονες είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_t και V_t αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_t , V_{nt} και V_{en} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό των πνευμόνων έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση του μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου του

μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για ενδοφλέβια χορήγηση (perfusion limited tissue model)

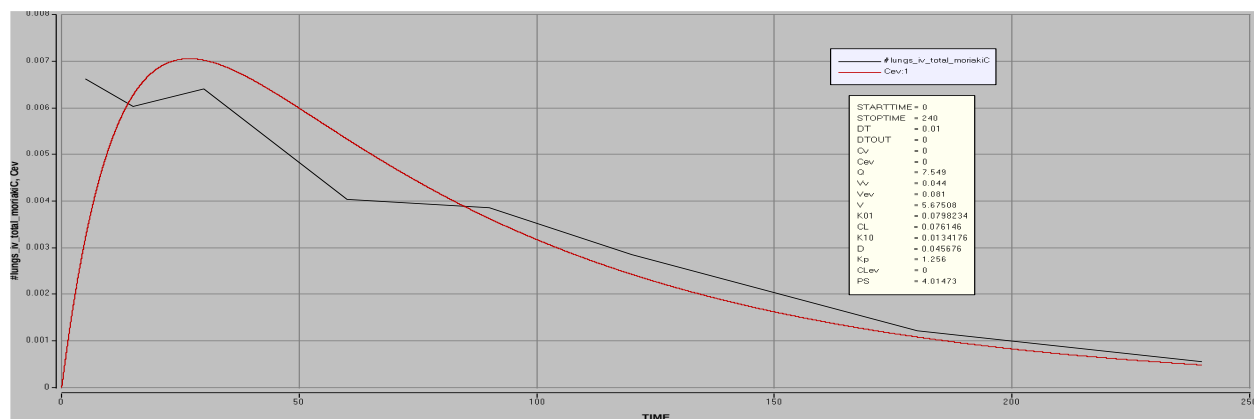
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=1.26$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για ενδοφλέβια χορήγηση (permeability limited tissue model)

Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου των πνευμόνων και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=1.26$, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS=4.01$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

4.2.1.4. Κατανομή στο ήπαρ

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 16:

time (min)	concentration livers crocetin (μmol/ml) (SD)	concentration livers glucuronide (μmol/ml) (SD)
4.99998	0.0067 (0.0005)	0.0015 (0.0006)
15	0.0076 (0.0011)	0.0017 (0.0011)
30	0.0057 (0.0003)	0.002 (0.0002)
60	0.0055 (0.0003)	0.0006 (0.0002)
90	0.0045 (0.0003)	0.0002 (0.0002)
120	0.0039 (0.0006)	0.0003 (0.0002)
180	0.0018 (0.0001)	0.0004 (0.00007)
240	0	0.0008 (0.0003)

Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ.

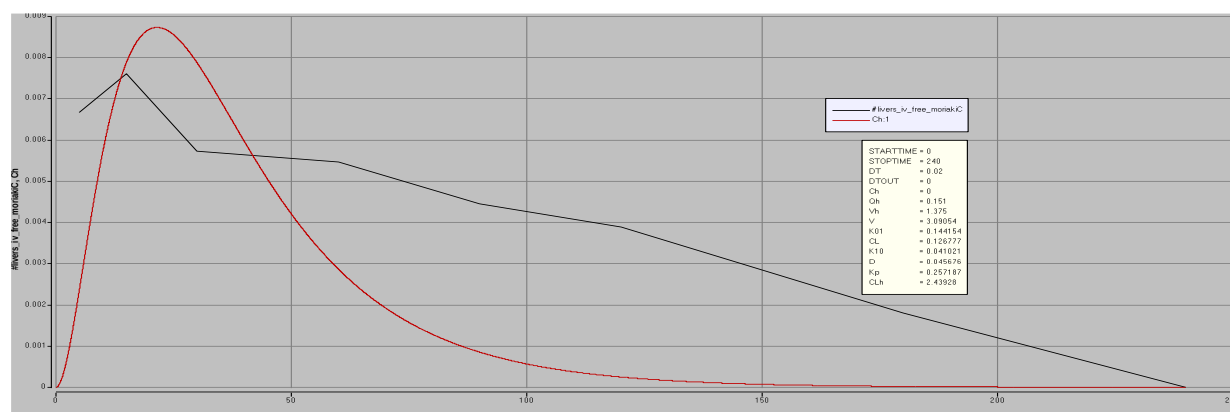
Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στο ήπαρ με ενδοφλέβια χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις για την κροκετίνη καθώς και για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρονίδιο. Η αρχική συγκέντρωση στο ήπαρ είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό του ήπατος ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στο ήπαρ είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_T και V_T αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον

αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_T, V_{ντ} και V_{εντ} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F, K₀₁ και CL_F. Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό του ήπατος έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D. Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για τον μόνο ιστό που παρατηρείται μεταβολισμός (ηπατική κάθαρση) το ήπαρ, η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ δίνεται από την διαφορική εξίσωση 3, όπου CL_p είναι η κάθαρση του πλάσματος όπως αυτή εκτιμάται από το PBPK μοντέλο. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5, όπου CL_{εν} είναι η κάθαρση του εξωαγγειακού χώρου όπως αυτή εκτιμάται από το PBPK μοντέλο.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για ενδοφλέβια χορήγηση (perfusion limited tissue model)

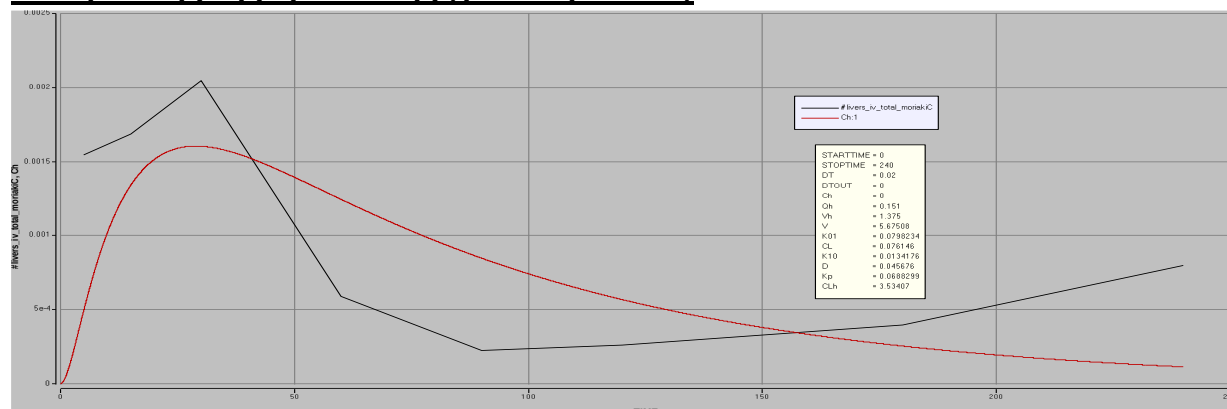
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου K_p=0.26 και CL=2.44 ml/min για την κροκετίνη και K_p=0.07 και CL=3.53 ml/min για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Τα datasets της κροκετίνης θεωρούνται πιο αξιόπιστα (Εικόνα 27, 28).

Κροκετίνη



Εικόνα 27: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)

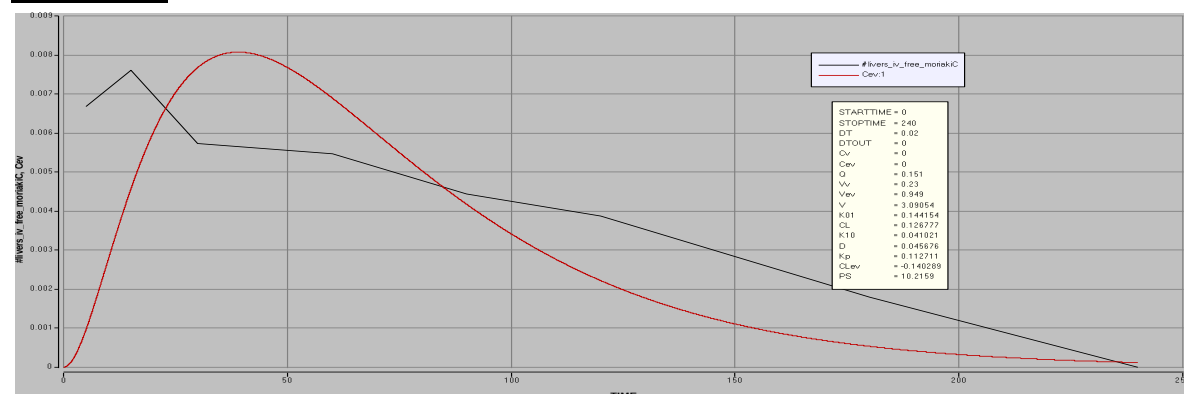


Εικόνα 28: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για ενδοφλέβια χορήγηση (permeability limited tissue model)

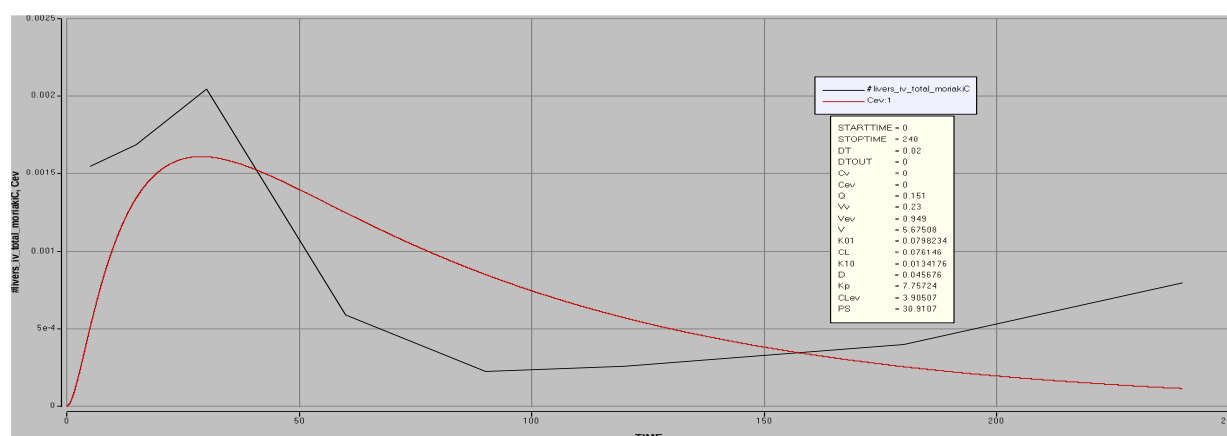
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου του ήπατος και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p = 0.11$ και $CL_{lev} = -0.14$ ml/min για την κροκετίνη και $K_p = 7.76$ και $CL_{lev} = 3.91$ ml/min για τον μεταβολίτη, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS_t = 10.22$ για την κροκετίνη και $PS_t = 30.91$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Δεν παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p δεν έχει φυσική σημασία, ειδικότερα στον μεταβολίτη, καθώς δεν συνδέει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, ούτε την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Από την κροκετίνη γίνεται καλύτερη εκτίμηση του K_p , καθώς τα datasets είναι πιο αξιόπιστα, αλλά η κάθαρση δεν δίνει αναμενόμενη τιμή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα του μοντέλου και οδηγεί στην απόρριψη του (Εικόνα 29,30).

Κροκετίνη



Εικόνα 29: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)



Εικόνα 30: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση.

4.2.2. ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ (PO)

4.2.2.1. Κατανομή στην καρδιά

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 17:

time (min)	concentration heart glucuronide ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)
4.99998	0.0038 (0.00009)
15	0.0052 (0.0006)
30	0.0059 (0.0001)
60	0.0026 (0.00004)
90	0.0017 (0.0001)
120	0.0012 (0.00004)
180	0.0009 (0.00003)
240	0

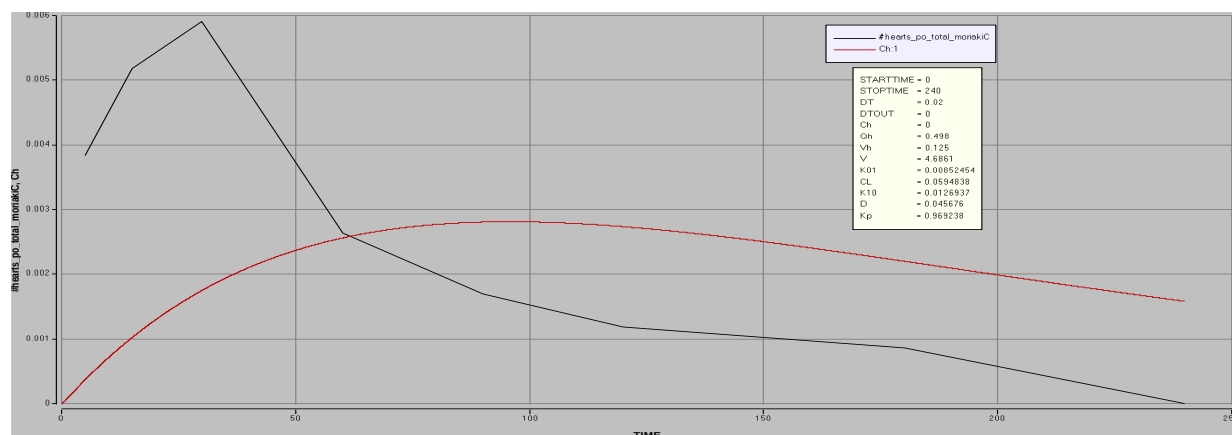
Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στην καρδιά με per os χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις μόνο για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρενίδιο, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν τιμές για την κροκετίνη. Η αρχική συγκέντρωση στην καρδιά είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό της καρδιάς ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στην καρδιά είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου

εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_T και V_T αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_T , V_{V_T} και V_{en_T} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό της καρδιάς έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου του μεταβολίτη της κροκετίνης στην καρδιά δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για από του στόματος χορήγηση (perfusion limited tissue model)

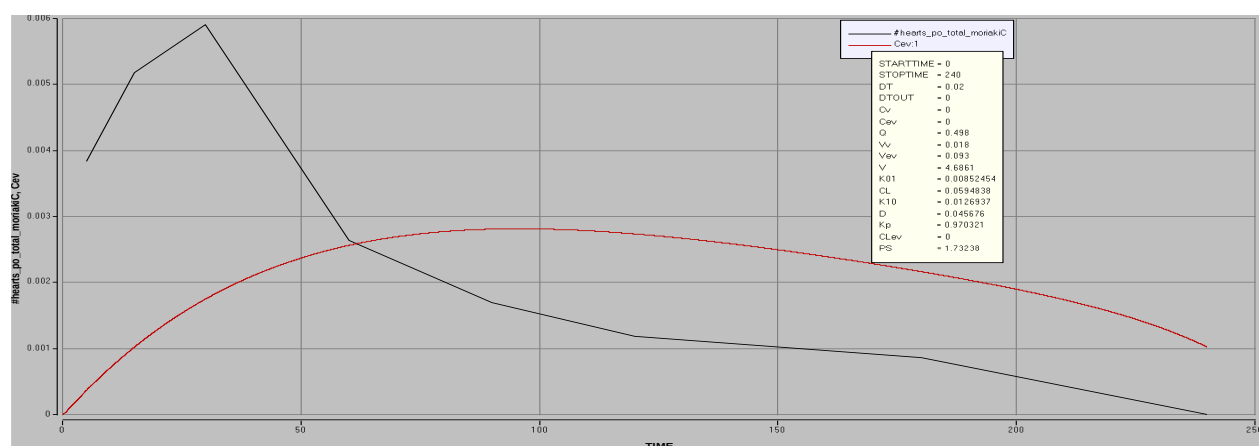
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.97$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για από του στόματος χορήγηση (permeability limited tissue model)

Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου της καρδιάς και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.97$, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS=1.73$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

4.2.2.2. Κατανομή στα νεφρά

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 18:

time (min)	concentration kidney crocetin (μmol/ml) (SD)	concentration kidney glucuronide (μmol/ml) (SD)
4.99998	0.0026 (0.0004)	0.0017 (0.0005)
15	0.0046 (0.0004)	0.0007 (0.0003)
30	0.0072 (0.0003)	0.0006 (0.0003)
60	0.0049 (0.0007)	0.0019 (0.001)
90	0.0038 (0.0007)	0.0011 (0.0007)
120	0.003 (0.0002)	0.0009 (0.0004)
180	0.0019 (0.0002)	0.0005 (0.0003)
240	0	0.001 (0.00009)

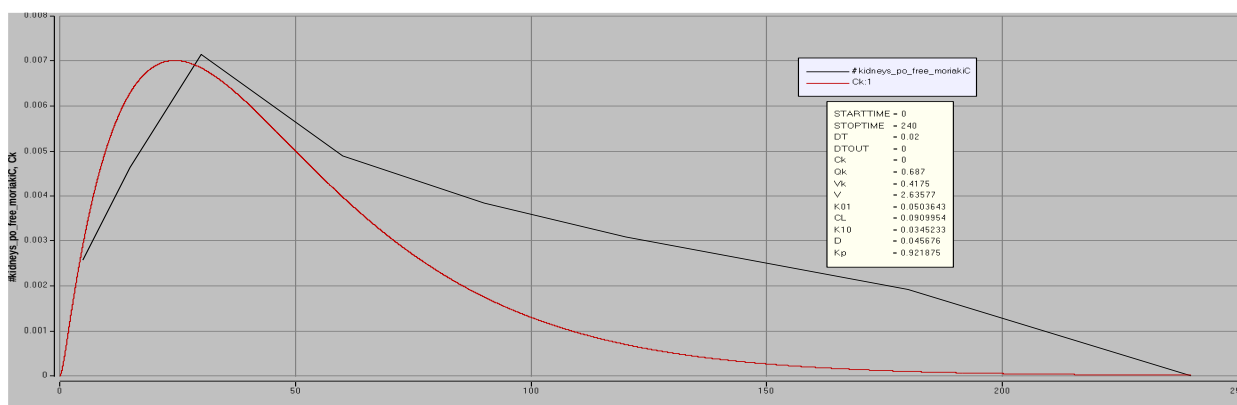
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στα νεφρά με *per os* χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις για την κροκετίνη καθώς και για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρονίδιο. Η αρχική συγκέντρωση στα νεφρά είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό των νεφρών ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στα νεφρά είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_t και V_t αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_t , V_{nt} και V_{ext} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό των νεφρών έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στα νεφρά δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για από του στόματος χορήγηση (perfusion limited tissue model)

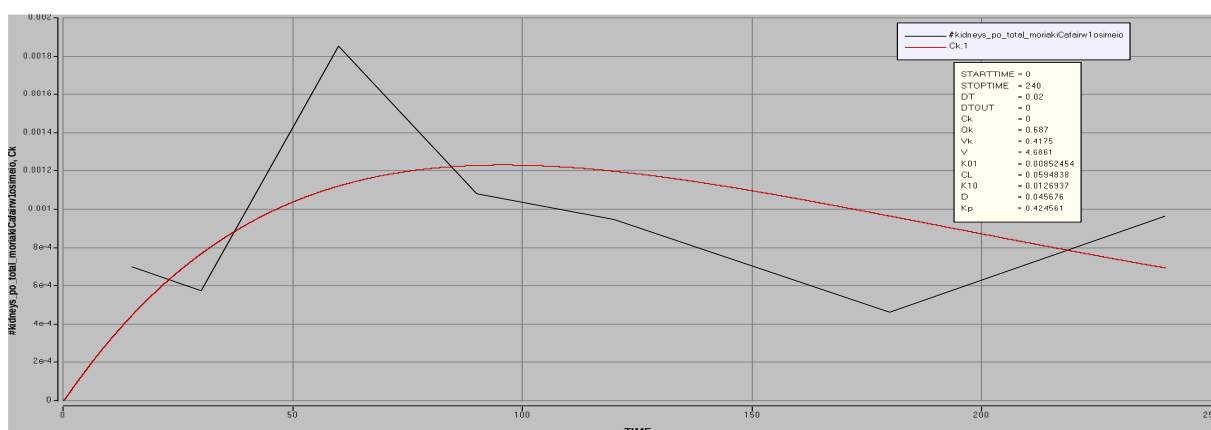
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.92$ για την κροκετίνη και $K_p=0.42$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Τα datasets της κροκετίνης κρίνονται ως πιο αξιόπιστα (Εικόνα 33,34).

Κροκετίνη



Εικόνα 33: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)



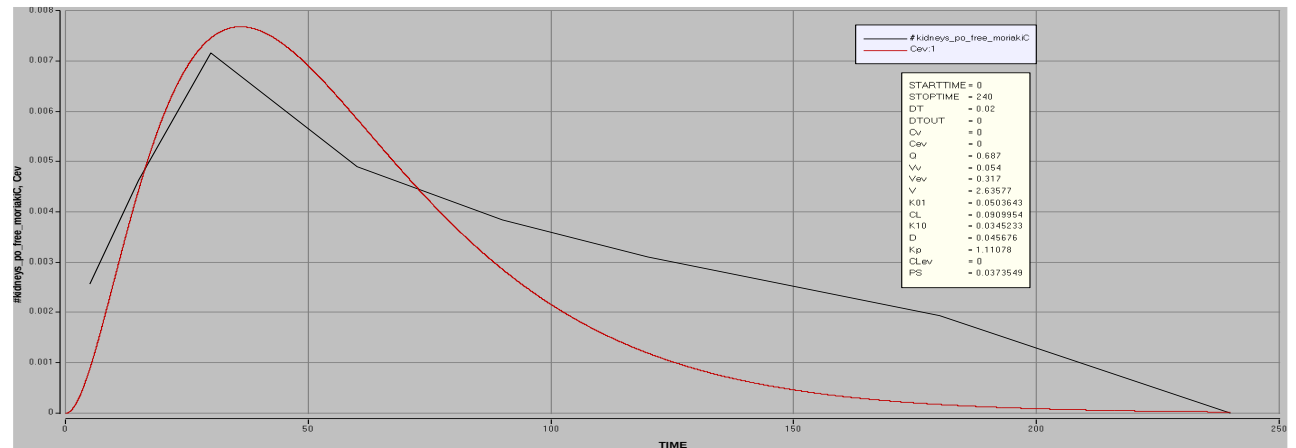
Εικόνα 34: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για από του στόματος χορήγηση (permeability limited tissue model)

Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου των νεφρών και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=1.11$ για την κροκετίνη και $K_p=0.42$ για τον μεταβολίτη, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS_t=0.04$ για την κροκετίνη και $PS_t=5.01$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p

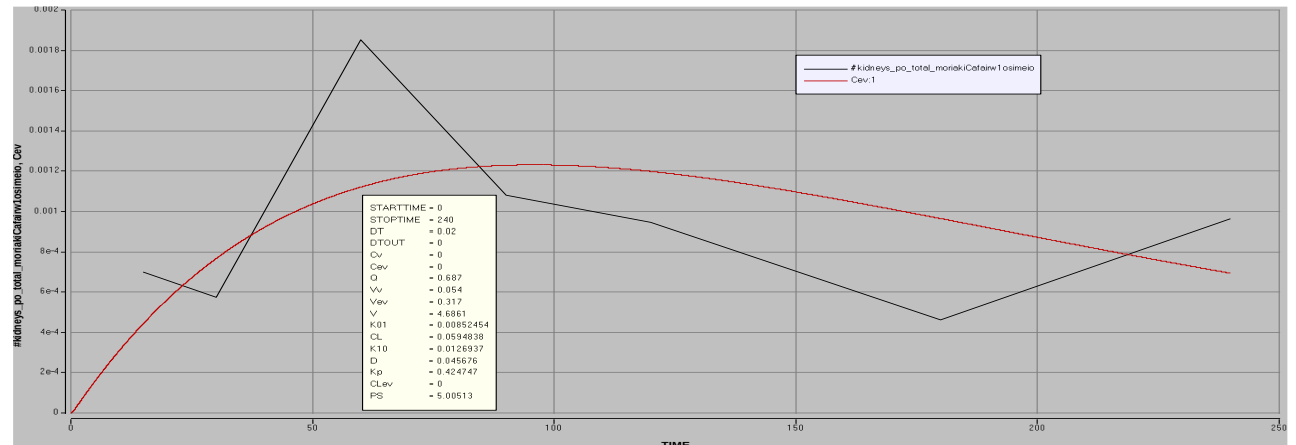
έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Τα datasets της κροκετίνης είναι πιο αξιόπιστα (Εικόνα 35,36).

Κροκετίνη



Εικόνα 35: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)



Εικόνα 36: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

4.2.2.3. Κατανομή στους πνεύμονες

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 19:

time (min)	concentration lungs glucuronide ($\mu\text{mol/ml}$) (SD)
4.99998	0.0046 (0.0008)
15	0.006 (0.0007)
30	0.0075 (0.0002)
60	0.0048 (0.0005)
90	0.0041 (0.0005)
120	0.0031 (0.0003)
180	0.0017 (0.0001)
240	0.0008 (0.00008)

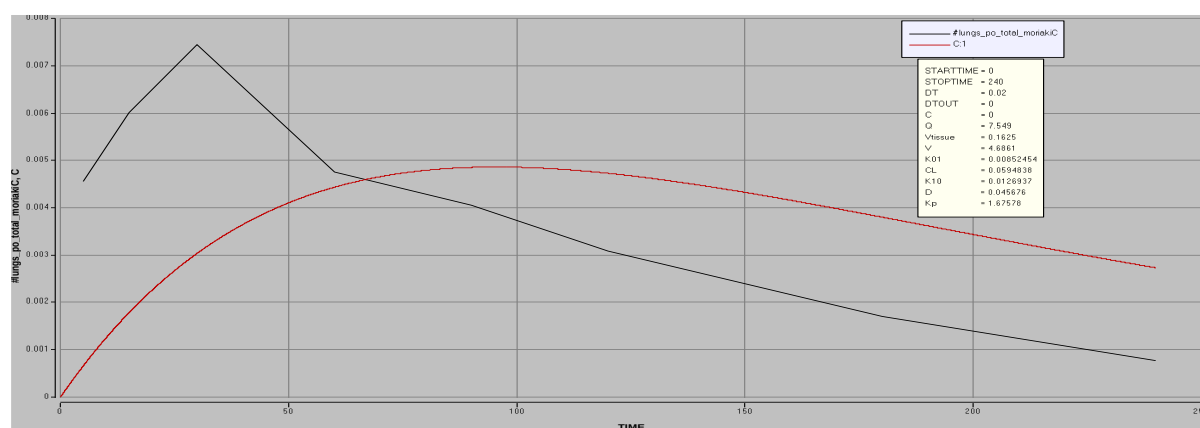
Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στους πνεύμονες με *per os* χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις μόνο για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρενίδιο, καθώς δεν ανιχνεύτηκαν τιμές για την κροκετίνη. Η αρχική συγκέντρωση στους πνεύμονες είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό των πνευμόνων ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στους πνεύμονες είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_t και V_t αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_t , V_{nt} και V_{ent} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό των πνευμόνων έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας τόσο το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, η συγκέντρωση του μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες δίνεται από την διαφορική εξίσωση 2. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου του

μεταβολίτη της κροκετίνης στους πνεύμονες δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για από του στόματος χορήγηση (perfusion limited tissue model)

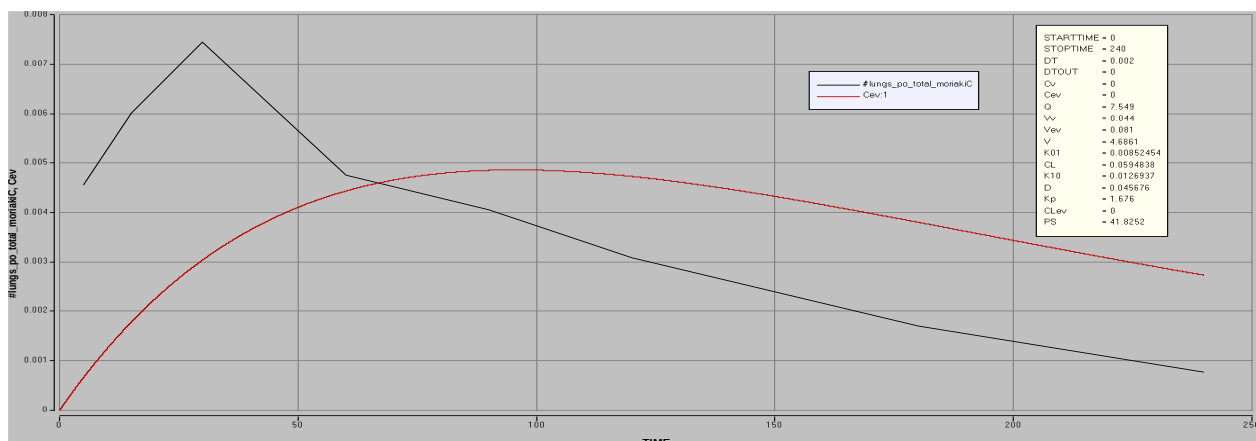
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=1.68$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 37).



Εικόνα 37: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για από του στόματος χορήγηση (permeability limited tissue model)

Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου των πνευμόνων και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=1.68$, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS_t=41.83$. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

4.2.2.4. Κατανομή στο ήπαρ

Τα επεξεργασμένα φαρμακοκινητικά δεδομένα παρατίθενται στον Πίνακα 20:

time (min)	concentration livers crocetin (μmol/ml) (SD)	concentration livers glucuronide (μmol/ml) (SD)
4.99998	0.0009 (0.00009)	0.0002 (0.0001)
15	0.0044 (0.0008)	0.0016 (0.0008)
30	0.0079 (0.0009)	0.0011 (0.0007)
60	0.0043 (0.0005)	0.0017 (0.0006)
90	0.002 (0.0005)	0.0025 (0.0004)
120	0.0011 (0.0003)	0.0013 (0.0002)
180	0.0008 (0.00009)	0.001 (0.0002)
240	0	0.0009 (0.00007)

Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ.

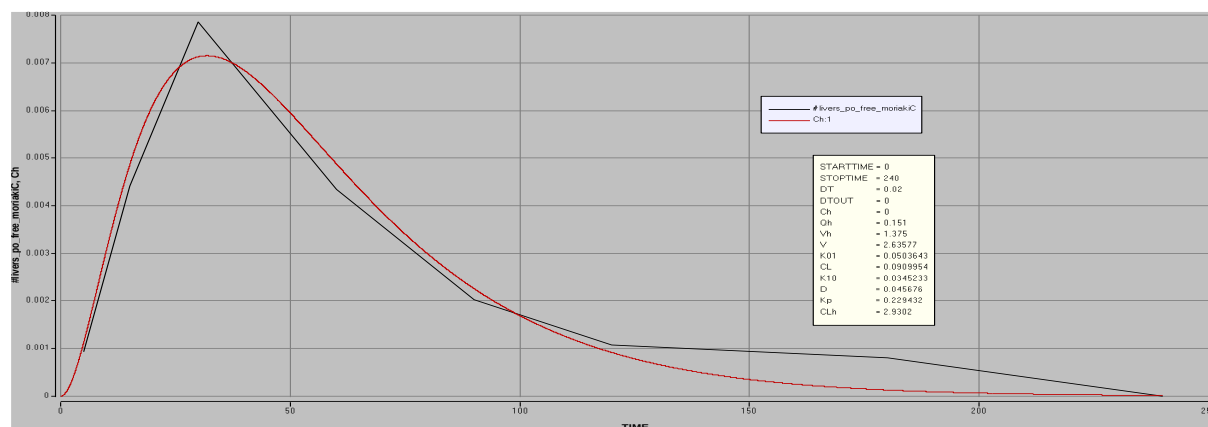
Για την εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής στο ήπαρ με ενδοφλέβια χορήγηση, χρησιμοποιώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, καθώς και το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, δόθηκαν συγκεντρώσεις για την κροκετίνη καθώς και για τον μεταβολίτη της κροκετίνης, δηλαδή το γλυκουρονίδιο. Η αρχική συγκέντρωση στο ήπαρ είναι ίση με μηδέν, για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση όπου θεωρεί τον ιστό του ήπατος ως ένα ενιαίο διαμέρισμα. Επίσης, η αρχική συγκέντρωση στο ήπαρ είναι ίση με μηδέν τόσο για τον αγγειακό, όσο και για τον εξωαγγειακό χώρο ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, όπου εισάγει δύο διαμερίσματα, υποθέτοντας μια διαφορετική συγκέντρωση μεταξύ του αγγειακού (Vascular) και του εξωαγγειακού (Extravascular) χώρου. Οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού, Q_t και V_t αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6 και στον Πίνακα 2 για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση,

ενώ για το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών οι παράμετροι για την ροή του πλάσματος και του όγκου του ιστού για τον αγγειακό και εξωαγγειακό χώρο, Q_T , V_{in} και V_{out} αντίστοιχα, υπολογίστηκαν στον Πίνακα 6, στον Πίνακα 9 και στον Πίνακα 11. Εν συνεχεία, από τα προφίλ συγκέντρωσης χρόνου που εκτιμήθηκαν για το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των παραμέτρων V_F , K_{01} και CL_F . Τα πειραματικά δεδομένα για τον ιστό του ήπατος έχουν μετατραπεί σε μέσες μοριακές συγκεντρώσεις, καθώς και η δόση D . Έχοντας λοιπόν την εξίσωση του πλάσματος (Εξίσωση 1) και ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για τον μόνο ιστό που παρατηρείται μεταβολισμός (ηπατική κάθαρση) το ήπαρ, η συγκέντρωση της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ δίνεται από την διαφορική εξίσωση 3, όπου CL_p είναι η κάθαρση του πλάσματος όπως αυτή εκτιμάται από το PBPK μοντέλο. Ακολουθώντας το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών, η συγκέντρωση του εξωαγγειακού χώρου της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στο ήπαρ δίνεται από τις διαφορικές εξισώσεις 4 και 5, όπου CL_{in} είναι η κάθαρση του εξωαγγειακού χώρου όπως αυτή εκτιμάται από το PBPK μοντέλο.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση για από του στόματος χορήγηση (perfusion limited tissue model)

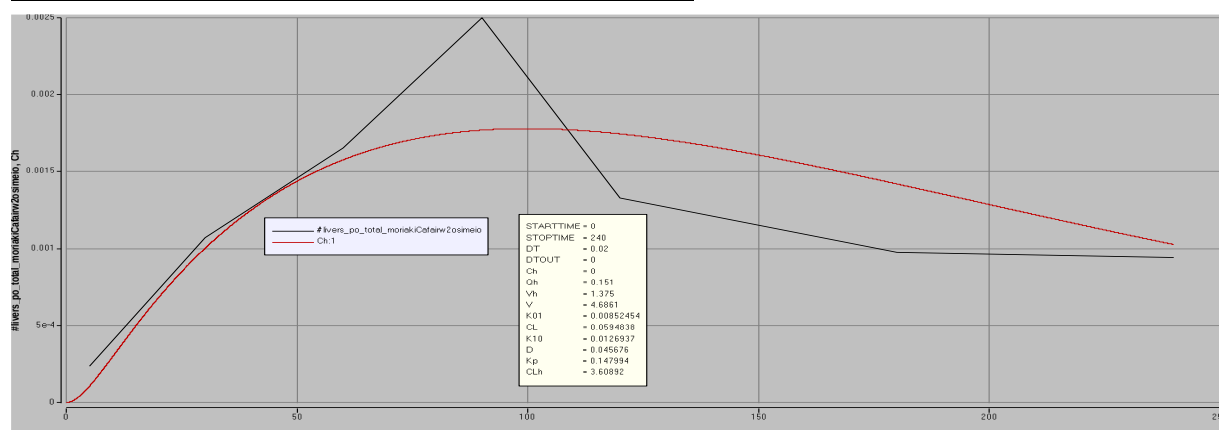
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, έτρεξε το μοντέλο και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p=0.23$ και $CL=2.93$ ml/min για την κροκετίνη και $K_p=0.15$ και $CL=3.61$ ml/min για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p έχει φυσική σημασία, καθώς δείχνει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, καθώς και την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Τα datasets θεωρούνται πιο αξιόπιστα (Εικόνα 39,40).

Κροκετίνη



Εικόνα 39: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)

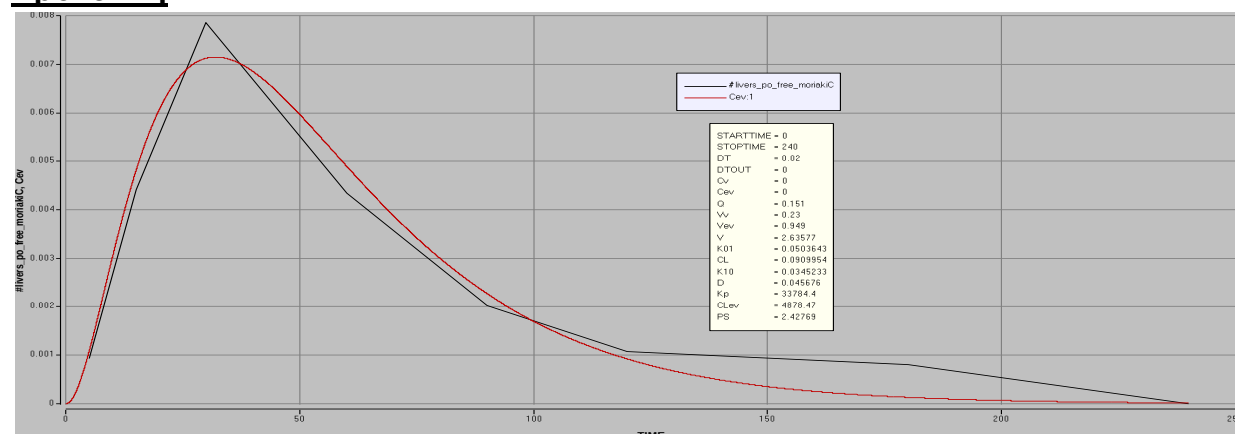


Εικόνα 40: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών για από του στόματος χορήγηση (permeability limited tissue model)

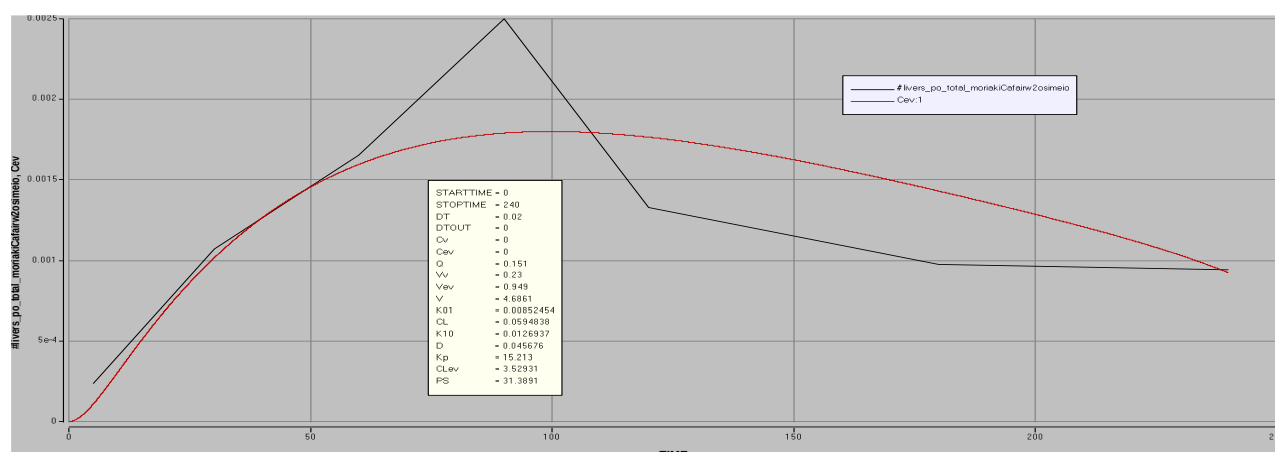
Ύστερα από εφαρμογή των παραπάνω τιμών, το μοντέλο προσαρμόζεται στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του εξωαγγειακού χώρου του ήπατος και υπολογίζεται ο συντελεστής κατανομής ιστού : πλάσματος, όπου $K_p = 33784.4$ και $CL_{ev} = 4878.5$ ml/min για την κροκετίνη και $K_p = 15.21$ και $CL_{ev} = 3.53$ ml/min για τον μεταβολίτη, συμπεριλαμβάνοντας και μία ακόμη παράμετρο, το συντελεστή επιφάνειας διαπερατότητας, όπου $PS = 2.43$ για την κροκετίνη και $PS = 31.39$ για τον μεταβολίτη. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και η κόκκινη γραμμή στην προσομοίωση με το μονοδιαμερισματικό μοντέλο. Δεν παρατηρείται οπτικά η καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα. Το K_p δεν έχει φυσική σημασία, ούτε στην κροκετίνη ούτε στον μεταβολίτη, καθώς δεν συνδέει την σχέση του φαρμάκου με τον ιστό και το αίμα, ούτε την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα του μοντέλου και οδηγεί στην απόρριψη του (Εικόνα 41, 42).

Κροκετίνη



Εικόνα 41: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

Μεταβολίτης της κροκετίνης (γλυκουρονίδιο)



Εικόνα 42: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος, ύστερα από του στόματος χορήγηση.

4.3. Συμπεράσματα

Για να εφαρμοστεί το μοντέλο, για κάθε έναν από τους ιστούς ξεχωριστά αναπτύχθηκε το μοντέλο ανοιχτού βρόγχου. Τα μοντέλα αξιολογήθηκαν ως προς την προσαρμογή τους στα πειραματικά δεδομένα, τη σταθερότητά τους και τις προβλεπτικές τους ικανότητες. Τέλος, έγινε επιλογή του καταλληλότερου και πιο αξιόπιστου μοντέλου. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης των δεδομένων ακολουθήθηκε συνοπτικά το παρακάτω πλάνο:

1. Το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για το πλάσμα (serum) προβλέφθηκε με προσαρμογή εμπειρικού μοντέλου στα δεδομένα συγκέντρωσης χρόνου από το πλάσμα των ποντικών. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Phoenix® NLME™ της Pharsight.

2. Στη συνέχεια εκτιμήθηκαν οι παράμετροι του πλάσματος, τόσο για το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για ενδοφλέβια χορήγηση (IV), όσο και για το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου για από του στόματος χορήγηση (per os), τόσο για την κροκετίνη, όσο και για τον μεταβολίτη της, δηλαδή το γλυκουρονίδιο της κροκετίνης. Η κατανομή της κροκετίνης στο αίμα έχει μελετηθεί και δεν παρουσιάζει κάποια σύνδεση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο μεταβολισμός της κροκετίνης συμβαίνει στο ήπαρ. Με πρωτοταξική συνάρτηση εισόδου και μονοδιαμερισματικό μοντέλο εκτιμήθηκαν οι παράμετροι V_F , K_{01} και CL_F .

3. Το μοντέλο που περιγράφει τη συγκέντρωση πλάσματος καθώς και οι παράμετροι αυτού που εκτιμήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ως συνάρτηση εισόδου για την εκτίμηση των παραμέτρων K_p , CL και PS με μοντέλα ανοιχτού βρόγχου για κάθε έναν από τους ιστούς, καρδιά, πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά, τόσο με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση, όπου ο ιστός θεωρείται ενιαίο μοντέλο, όσο και με το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Η πραγματική δόση που αντιστοιχεί στη μέση μοριακή δόση ανά σωματικό βάρος ποντικού 25 mg/gr, χρησιμοποιήθηκε στη

συνάρτηση εισόδου. Παρουσιάζονται μοντέλα συγκέντρωσης - χρόνου ύστερα από την χορήγηση του εκχυλίσματος για την ενδοφλέβια χορήγηση, καθώς και για την από του στόματος χορήγηση. Η εκτίμηση των παραμέτρων κατανομής της κροκετίνης και του μεταβολίτη της στους ιστούς πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Berkeley Madonna, προσαρμόζοντας το μοντέλο στα φαρμακοκινητικά δεδομένα του κάθε ιστού. Ως μέθοδος εκτίμησης επιλέχθηκε η METHOD RK4. Για τους ιστούς με κατανομή περιοριζόμενη από τη διάχυση εκτιμήθηκαν οι παράμετροι K_{rt} και CL_t . Για τους ιστούς με κατανομή περιοριζόμενη από τη διαπερατότητα των μεμβρανών εκτιμήθηκαν οι παράμετροι K_{rt} , CL_t και PS_t .

4. Τέλος, έγινε επιλογή του καταλληλότερου και πιο αξιόπιστου μοντέλου. Και τα δύο μοντέλα ιστών αξιολογήθηκαν και η επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου βασίστηκε στην αξιοπιστία της αξιολόγησης με την οπτική εξέταση των προβλεπόμενων τιμών έναντι των δεδομένων. Προτιμήθηκε το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση και για τους τέσσερις ιστούς όπου έγινε ανάλυση των δεδομένων για την ενδοφλέβια χορήγηση, καθώς και για την από του στόματος χορήγηση. Το μοντέλο αυτό κρίθηκε καταλληλότερο και πιο αξιόπιστο, καθώς είχε καλύτερη εφαρμογή από το μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Το μοντέλο προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα, και τόσο ο συντελεστής κατανομής K_p , όσο και η κάθαρση CL είχαν πιο λογικές και συγκρίσιμες τιμές. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάποιους ιστούς τα πειραματικά δεδομένα ήταν λιγότερα, και σε συνδυασμό με την πολυπλοκότητα του μοντέλου, αυτό δεν κατάφερε να εκτιμήσει τις παραμέτρους, δεδομένου ότι κλήθηκε να υπολογίσει τρεις παραμέτρους και όχι δύο, όπως έγινε στο μοντέλο ιστού περιοριζόμενο από τη διάχυση. Ο συντελεστής κατανομής έχει φυσική σημασία, καθώς ορίζει την κατανομή του φαρμάκου στον συγκεκριμένο ιστό, δείχνει δηλαδή την σχέση που έχει το φάρμακο με τον ιστό και το αίμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. (2004). Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*, 28:426-32

Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R, Espinosa-Aguirre JJ. (2003). Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *Toxicol In Vitro*, 17:731-6.

Abe K., Saito H. (2000). Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytotherapy Research*, 14(3), 149-152.

Akhondzadeh S., Tahmacebi-Pour N., Noorbala A., Amini H., Fallah-Pour H., Jamshidi A., et al. (2005). *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: A double-blind, randomized and placebo controlled trial. *Phytotherapy Research*, 19, 148-151.

Al-Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sohaibani MO, Qureshi S, Rafatullah S. (2006). Antigastric ulcer studies on 'saffron' *crocus sativus* L. in rats. *Pak J Biol Sci*, 9:1009-13

Andrew MA, Hebert MF and Vicini P (2008). "Physiologically based pharmacokinetic model of midazolam disposition during pregnancy," in *Proceedings of the 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 5454–5457.

Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. (2005). Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem*, 53:7302-6

Basker D, Negbi M. (1983). Uses of saffron. *Econom Botany*, 37:228-36

Basker D. (1999). Saffron chemistry. En: *Saffron. Crocus sativus* L. Medicinal and aromatic plants. Negbi M. Ed., Harwood Academic publishers, Amsterdam, Holanda, 45-42.

Bjorkman S (2005), Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling: theophylline and midazolam as model drugs, *Br J Clin Pharmacol*, 59:691–704.

Bonate PL (2006), *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*. Springer. New York.

Caballero-Ortega H, Pereda-Miranda R. Abdullaev FI. (2007). HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chem*, 100:1126-31

Carmona M., Zalacain A., Salinas M. R., & Alonso G. L. (2006). A new approach to saffron aroma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 145-159.

Chen S, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y. (2003). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnol Lett*, 25:1235-8

Christodoulou E., Kadoglou N. PE, Kostomitsopoulos N., Valsami G. (2015a). Saffron: a natural product with potential pharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Christodoulou E., Kechagia I-A., Tzimas S., Balafas E., Kostomitsopoulos N., Archontaki H., Dokoumetzidis A., Valsamia G. (2015b). Serum and tissue pharmacokinetics of silibinin after per os and i.v. administration to mice as a HP- β -CD lyophilized product. *International Journal of Pharmaceutics*, 493: 366–373

Chryssanthi D. G., Lamari F. N., Iatrou G., Pylara A., Karamanos N. K., Cordopatis P. (2007). Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. - *Anticancer Res*. 27: 357-362.

Chryssanthi DG, Lamari FN, Georgakopoulos CD, Cordopatis P. (2011). A new validated SPE-HPLC method for monitoring crocetin in human plasma--application after saffron tea consumption. *J Pharm Biomed Anal*, 55:563-8

Clewell HJ, Gentry PR, Covington TR, Sarangapani R and Teeguarden JG (2004), Evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry, *Toxicol Sci*, 79:381–393.

De Buck SS and Mackie CE (2007), Physiologically based approaches towards the prediction of pharmacokinetics: in vitro-in vivo extrapolation, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3:865–878.

Dinghra V. K., Seshadri T. R., Mukerjee S. K. (1975). Minor carotenoid glycosides from saffron (*Crocus sativus* L). *Ind. J. Chem*. 13(4): 339-341.

Edginton AN and Willmann S (2008). Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis, *Clin Pharmacokinet*, 47:743–752

Edginton AN, Schmitt W and Willmann S (2006). Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children, *Clin Pharmacokin*, 45:1013–1034.

Escribano J, Alonso G, Coca-Prados M, Fernández J. (1996). Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett*, 100:23-30

Gallo JM, Vicini P, Orlansky A et al. (2004), Pharmacokinetic model-predicted anticancer drug concentrations in human tumors, *Clin Cancer Res*, 10:8048–8058.

Georgiadou G., Grivas V., Tarantilis P. A., Pitsikas N. (2013). Crocins, the active constituents of *Crocus sativus* L., counteracted ketamine- induced behavioural deficits in rats. *Psychopharmacology*, 1-10.

Germani M, Crivori P, Rocchetti M et al. (2007), Evaluation of a basic physiologically based pharmacokinetic model for simulating the first-time-in-animal study, *Eur J Pharm Sci*, 31:190–201.

Giaccio M. (2004). Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44:155-72

Hamelin G, Charest-Tardif G, Truchon G and Tardif R (2005), Physiologically based modeling of n-hexane kinetics in humans following inhalation exposure at rest and under physical exertion: impact on free 2,5-hexanedione in urine and on n-hexane in alveolar air, *J Occup Environ Hyg*, 2:86–97.

Hays SM, Elswick BA, Blumenthal GM, Welsch F, Conolly RB and Gargas M.L (2000), Development of a physiologically based pharmacokinetic model of 2-methoxyethanol and 2- methoxyacetic acid disposition in pregnant rats, *Toxicol Appl Pharmacol*, 163: 67–74.

Hosseinzadeh H, Younesi HM. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol*, 2:7

Hosseinzadeh H., Noraei N. B. (2009). Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytotherapy Research*, 23(6), 768-774.

ILSI (1994). Physiological Parameter Values for PBPK models.

Kanakis CD, Tarantilis PA, Tajmir-Riahi HA, Polissiou MG. (2007). Crocetin, dimethylcrocetin, and safranal bind human serum albumin: Stability and antioxidative properties. *J Agric Food Chem*, 55:970-7

Khun R., Winterstein A. (1934). Die Dihydroverbindung der isomeren Bixine und die Elektronen- Konfiguration der Polyene. Ber. Deustsch. Chem. Ges. 67: 344-347.

Kianbakht S., Mozaffari K. (2009). Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and non diabetic rats. Journal of Medicinal Plants, 8(5), 30-38.

Lavé T, Parrott N, Grimm HP, Fleury A and Reddy M (2007), Challenges and opportunities with modelling and simulation in drug discovery and drug development, Xenobiotica, 37:1295–1310.

Lewis Y. S., Sampathu S. R., Shivashankar S., Natarajan C. P. (1981). Quality evaluation of shaffron. Arecanuth species and Cacao J., 4: 113-117.

Li N, Lin G, Kwan Y, Min Z. (1999). Simultaneous quantification of five major biologically active ingredients of saffron by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 849:349-55

Martinez-Tome M., Jimenez A. M., Ruggieri S., Frega N., Strabbioli R., Murcia M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives, J Food Prot. 64(9): 1412-9.

Mathew B. (1977). Crocus sativus and its allies (iridaceae). Plant Systematics and Evolution, 128:89-103

Miller TL, Willet SL, Moss ME, Miller J, Belinka BA Jr. (1982). Binding of crocetin to plasma albumin. J Pharm Sci 71:173-177.

Modaghegh M, Shahabian M, Esmaeili H, Rajbai O, Hosseinzadeh H. (2008). Safety evaluation of saffron (crocus sativus) tablets in healthy volunteers. Phytomedicine, 15:1032-7

Mohajeri D, Mousavi G, Doustar Y. (2009). Antihyperglycemic and pancreas-protective effects of crocus sativus L. (saffron) stigma-ethanolic extract on rats with alloxan-induced diabetes. J Biol Sci, 9:302-10

Moraga AR, Nohales PF, Pérez JAF, Gómez-Gómez L. (2004). Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from crocus sativus stigmas. Planta, 219:955-66

Mousavi SH, Tavakkol-Afshari J, Brook A, Jafari-Anarkooli I. (2009). Role of caspases and bax protein in saffron-induced apoptosis in MCF-7 cells. Food Chem Toxicol, 47:1909-13

Nair SC, Salomi MJ, Panikkar B, Panikkar KR. (1991). Modulatory effects of crocus sativus and nigella sativa extracts on cisplatin-induced toxicity in mice. *J Ethnopharmacol*, 31:75-83

Nestorov Ivan (2003). Whole Body Pharmacokinetic Models. *Clin Pharmacokinet*, 42 (10): 883-908

Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margarity M, Lamari FN. (2006). Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of crocus sativus stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem*, 54:8762-8

Parrott N, Jones H, Paquereau N and Lavé T (2005), Application of full physiological models for pharmaceutical drug candidate selection and extrapolation of pharmacokinetics to man, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96:193–199.

Pfander H., Wittwer F. (1975). Carotenoid- glycosides. Investigation of carotenoid- composition of saffron. *Helv Chim Acta*. 58(6): 1608-20.

Poulin P and Theil FP (2000), A priori prediction of tissue: plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery, *J Pharm Sci*, 89:16–35.

River C. (2012). C57BL/6 Mouse Hematology

Rodgers T and Rowland M (2006), Physiologically based pharmacokinetic modeling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions, *J Pharm Sci*, 95:1238–1257.

Sampathu S. R., Shirashankar S., Lewis Y. S. (1984). Saffron (*Crocus Sativus* L.)- Cultivation, Processing, Chemistry and Standardisation. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20: 123-157.

Schmidt M, Betti G, Hensel A. (2007). Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr*, 157:315-9

Schmitt W. (2008). General approach for the calculation of tissue to plasma partition coefficients, *Toxicol In Vitro*, 22:457-467.

Soeda S, Ochiai T, Shimeno H, Saito H, Abe K, Tanaka H, Shoyama Y. (2007). Pharmacological activities of crocin in saffron. *J Nat Med*, 61:102-11

Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. (1994a). Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A*, 664:55-61

Tarantilis PA, Morjani H, Polissiou M, Manfait M. (1994b). Inhibition of growth and induction of differentiation of promyelocytic leukemia (HL-60) by carotenoids from crocus sativus L. *Anticancer Res*,14:1913-18

Umigai N, Murakami K, Ulit MV, Antonio LS, Shirotori M, Morikawa H, Nakano T. (2011). The pharmacokinetic profile of crocetin in healthy adult human volunteers after a single oral administration. *Phytomedicine* 18:575-578.

WHO (2007). Monographs on Selected Medicinal Plants. World Health Organization 3:126-135.

Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. (2007). Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine*, 14:633-36

Xi L., Qian Z. Y., Shen X. C. Wen, N., Zhang, Y. B. (2005). Crocetin prevents dexamethasone- induced insulin resistance in rats. *Planta Medica*, 71(10), 917-922.

Xu G. L., Li G., Ma H. P., Zhong H., Liu F., Ao G. Z. (2009). Preventive effect of crocin in inflamed animals and in LPS- challenged RAW 264.7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18): 8325-8330.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- **ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΣΤΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΠΟΤΙΣΗ ΥΣΤΕΡΑ
ΑΠΟ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ**

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ch=0

Qh=0.498

Vh=0.125

V=5.6750774

K01=0.079823402

CL=0.076146008

K10=0.0134176158

D=0.0456760049

Kp=1

$Ch' = ((Qh * C_{plasma}) - (Qh * (Ch / Kp))) / Vh$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (exp(-K10 * time) - exp(-K01 * time))$

**Παράρτημα 1: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για
τον ιστό της καρδιάς.**

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ck=0

Qk=0.687

Vk=0.4175

V=3.0905405

K01=0.14415393

CL=0.12677698

K10=0.0410209735

D=0.0456760049

Kp=1

$Ck' = ((Qk * C_{plasma}) - (Qk * (Ck / Kp))) / Vk$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (exp(-K10 * time) - exp(-K01 * time))$

**Παράρτημα 2: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των
νεφρών.**

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init Ck=0
Qk=0.687
Vk=0.4175
V=5.6750774
K01=0.079823402
CL=0.076146008
K10=0.0134176158
D=0.0456760049
Kp=1
 $Ck' = ((Qk * C_{plasma}) - (Qk * (Ck / Kp))) / V_k$
 $C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 3: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init C=0
Q=7.549
Vtissue=0.1625
V=5.6750774
K01=0.079823402
CL=0.076146008
K10=0.0134176158
D=0.0456760049
Kp=1
 $C' = ((Q * C_{plasma}) - (Q * (C / Kp))) / V_{tissue}$
 $C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 4: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ch=0

Qh=0.151

Vh=1.375

V=3.0905405

K01=0.14415393

CL=0.12677698

K10=0.0410209735

D=0.0456760049

Kp=1

CLh=1

$Ch' = (Qh * C_{plasma}) - (Qh * (Ch/Kp)) - (CLh * (Ch/Kp) * (Qh/(Qh - CLh))) / Vh$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 5: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ch=0

Qh=0.151

Vh=1.375

V=5.6750774

K01=0.079823402

CL=0.076146008

K10=0.0134176158

D=0.0456760049

Kp=1

CLh=1

$Ch' = (Qh * C_{plasma}) - (Qh * (Ch/Kp)) - (CLh * (Ch/Kp) * (Qh/(Qh - CLh))) / Vh$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 6: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος.

- **ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΣΤΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΕΝΔΟΦΛΕΒΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ**

METHOD RK4

STARTTIME = 0
 STOPTIME=240
 DT = 0.02

Init Cv=0
 Init Cev=0
 Q=0.498
 Vv=0.018
 Vev=0.093
 V=5.6750774
 K01=0.079823402
 CL=0.076146008
 K10=0.0134176158
 D=0.0456760049
 Kp=1
 CLev=0
 PS=1
 $Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$
 $Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$
 $Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time) - exp(-K01*time))$

Παράρτημα 7: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς.

METHOD RK4

STARTTIME = 0
 STOPTIME=240
 DT = 0.02

Init Cv=0
 Init Cev=0
 Q=0.687
 Vv=0.054
 Vev=0.317
 V=3.0905405
 K01=0.14415393
 CL=0.12677698
 K10=0.0410209735
 D=0.0456760049
 Kp=1
 CLev=0
 PS=1
 $Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$
 $Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$
 $Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time) - exp(-K01*time))$

Παράρτημα 8: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.687

Vv=0.054

Vev=0.317

V=5.6750774

K01=0.079823402

CL=0.076146008

K10=0.0134176158

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=0

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 9: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=7.549

Vv=0.044

Vev=0.081

V=5.6750774

K01=0.079823402

CL=0.076146008

K10=0.0134176158

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=0

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 10: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.151

Vv=0.230

Vev=0.949

V=3.0905405

K01=0.14415393

CL=0.12677698

K10=0.0410209735

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=1

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 11: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκεΐνης για τον ιστό του ήπατος.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.151

Vv=0.230

Vev=0.949

V=5.6750774

K01=0.079823402

CL=0.076146008

K10=0.0134176158

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=1

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 12: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκεΐνης για τον ιστό του ήπατος.

- **ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΣΤΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΠΟΤΙΣΗ ΥΣΤΕΡΑ
ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ**

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init Ch=0
Qh=0.498
Vh=0.125
V=4.6861032
K01=0.0085245394
CL=0.059483776
K10=0.0126936547
D=0.0456760049
Kp=1
 $Ch'=((Qh \cdot C_{plasma}) - (Qh \cdot (Ch/Kp)))/Vh$
 $C_{plasma}=D \cdot K01/V/((K01-K10) \cdot (\exp(-K10 \cdot time) - \exp(-K01 \cdot time)))$

**Παράρτημα 13: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για
τον ιστό της καρδιάς.**

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init Ck=0
Qk=0.687
Vk=0.4175
V=2.6357683
K01=0.050364304
CL=0.090995442
K10=0.0345233084
D=0.0456760049
Kp=1
 $Ck'=((Qk \cdot C_{plasma}) - (Qk \cdot (Ck/Kp)))/Vk$
 $C_{plasma}=D \cdot K01/V/((K01-K10) \cdot (\exp(-K10 \cdot time) - \exp(-K01 \cdot time)))$

**Παράρτημα 14: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των
νεφρών.**

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ck=0

Qk=0.687

Vk=0.4175

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

$Ck' = ((Qk * C_{plasma}) - (Qk * (Ck / Kp))) / Vk$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 15: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init C=0

Q=7.549

Vtissue=0.1625

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

$C' = ((Q * C_{plasma}) - (Q * (C / Kp))) / V_{tissue}$

$C_{plasma} = D * K01 / V / (K01 - K10) * (\exp(-K10 * time) - \exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 16: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό των πνευμόνων.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ch=0

Qh=0.151

Vh=1.375

V=2.6357683

K01=0.050364304

CL=0.090995442

K10=0.0345233084

D=0.0456760049

Kp=1

CLh=1

$Ch' = (Qh * Cplasma) - (Qh * (Ch / Kp)) - (CLh * (Ch / Kp) * (Qh / (Qh - CLh))) / Vh$

$Cplasma = D * K01 / V / (K01 - K10) * (exp(-K10 * time) - exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 17: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Ch=0

Qh=0.151

Vh=1.375

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

CLh=1

$Ch' = (Qh * Cplasma) - (Qh * (Ch / Kp)) - (CLh * (Ch / Kp) * (Qh / (Qh - CLh))) / Vh$

$Cplasma = D * K01 / V / (K01 - K10) * (exp(-K10 * time) - exp(-K01 * time))$

Παράρτημα 18: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό του ήπατος.

- **ΜΟΝΤΕΛΟ ΙΣΤΟΥ ΠΕΡΙΟΡΙΖΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΤΟΥ ΣΤΟΜΑΤΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗ**

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init Cv=0
Init Cev=0
Q=0.498
Vv=0.018
Vev=0.093
V=4.6861032
K01=0.0085245394
CL=0.059483776
K10=0.0126936547
D=0.0456760049
Kp=1
CLev=0
PS=1
 $Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*C_{plasma}$
 $Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$
 $C_{plasma} = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 19: Ανάπτυξη PBPΚ μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για τον ιστό της καρδιάς.

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=240
DT = 0.02

Init Cv=0
Init Cev=0
Q=0.687
Vv=0.054
Vev=0.317
V=2.6357683
K01=0.050364304
CL=0.090995442
K10=0.0345233084
D=0.0456760049
Kp=1
CLev=0
PS=1
 $Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*C_{plasma}$
 $Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$
 $C_{plasma} = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 20: Ανάπτυξη PBPΚ μοντέλου της κροκετίνης για τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.687

Vv=0.054

Vev=0.317

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=0

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 21: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για
τον ιστό των νεφρών.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.002

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=7.549

Vv=0.044

Vev=0.081

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=0

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 22: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκετίνης για
τον ιστό των πνευμόνων.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.151

Vv=0.230

Vev=0.949

V=2.6357683

K01=0.050364304

CL=0.090995442

K10=0.0345233084

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=1

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 23: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου της κροκεΐνης για τον ιστό του ήπατος.

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=240

DT = 0.02

Init Cv=0

Init Cev=0

Q=0.151

Vv=0.230

Vev=0.949

V=4.6861032

K01=0.0085245394

CL=0.059483776

K10=0.0126936547

D=0.0456760049

Kp=1

CLev=1

PS=1

$Cv' = -((Q+PS)/Vv)*Cv + (PS/(Vv*Kp))*Cev + (Q/Vv)*Cplasma$

$Cev' = (PS/Vev)*Cv - ((CLev+PS)/(Vev*Kp))*Cev$

$Cplasma = D*K01/V/(K01-K10)*(exp(-K10*time)-exp(-K01*time))$

Παράρτημα 24: Ανάπτυξη PBPK μοντέλου του μεταβολίτη της κροκεΐνης για τον ιστό του ήπατος.

- **C57BL/6 Mouse Hematology & Biochemistry**



C57BL/6 Mouse Hematology

North American Colonies*
January 2008 - December 2012

C57BL/6NCrl		WBC (K/ μ L)	NEUT (K/ μ L)	LYMPH (K/ μ L)	MONO (K/ μ L)	EOS (K/ μ L)	BASO (K/ μ L)	NEUT (%)	LYMPH (%)	MONO (%)	EOS (%)
Male (σ)	Mean	8.90	1.44	6.87	0.41	0.14	0.03	15.89	77.41	4.61	1.55
	95% interval										
	Low	4.45	0.53	3.24	0.15	0.01	0.00	7.36	61.26	2.18	0.13
	High	13.96	3.09	11.15	0.94	0.42	0.13	28.59	87.18	11.02	4.42
	N	123	123	123	123	123	123	123	121	121	121
Female (φ)	Mean	8.44	1.19	6.71	0.36	0.15	0.03	14.00	79.55	4.37	1.69
	95% interval										
	Low	3.90	0.42	2.88	0.17	0.01	0.00	7.44	70.19	2.19	0.20
	High	13.94	2.55	10.92	0.69	0.50	0.14	22.67	87.82	7.06	4.51
	N	125	125	125	125	125	125	125	123	123	123

C57BL/6NCrl		BASO (%)	RBC (M/ μ L)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)	PLT (K/ μ L)	MPV (fL)
Male (σ)	Mean	0.38	9.48	14.2	46.6	49.2	14.8	30.2	17.9	1347	5.0
	95% interval										
	Low	0.01	7.14	10.8	37.3	42.7	11.7	24.6	15.9	841	4.3
	High	1.24	12.20	19.2	62.0	56.0	16.3	34.9	20.3	2159	6.1
	N	121	121	121	121	121	121	121	121	115	115
Female (φ)	Mean	0.34	9.24	13.8	45.4	49.2	15.0	30.7	17.9	1167	4.9
	95% interval										
	Low	0.02	7.37	10.9	37.2	42.6	13.0	26.0	16.1	565	4.3
	High	1.26	11.50	18.1	58.0	55.6	16.8	35.9	21.1	1849	5.6
	N	123	123	123	123	123	123	123	123	117	117

*Non-fasted samples were collected from animals housed in Charles River's standard production setting and analyzed with Drew Scientific HemaVet analyzer. Age: 8-10 weeks.

C57BL/6 Mouse Biochemistry

North American Colonies*
January 2008 - December 2012

C57BL/6NCrl		CHOL (mg/dL)	TRG (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALK (U/L)	TBIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)	PHOS (mg/dL)	TPR (g/dL)
Male (σ)	Mean	114	157	68	131	195	0.3	259	11.1	5.6
	95% interval									
	Low	69	67	28	46	111	0.2	172	7.9	4.8
	High	169	278	129	392	275	0.6	372	14.5	7.0
	N	162	161	148	156	158	153	158	159	156
Female (φ)	Mean	104	160	57	133	228	0.3	240	10.5	5.7
	95% interval									
	Low	55	75	27	43	105	0.2	177	7.3	4.8
	High	164	289	195	397	370	0.6	348	13.5	7.2
	N	167	167	158	161	160	156	159	161	159

C57BL/6NCrl		CAL (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	ALB (g/dL)	NA (meq/L)	K (meq/L)	CL (meq/L)	GGT U/L
Male (σ)	Mean	11.0	14	0.3	3.2	157.5	9.39	117.0	3
	95% interval								
	Low	9.7	7	0.2	2.8	145.2	7.59	110.7	0
	High	12.5	28	0.5	3.8	176.2	11.18	129.8	8
	N	156	157	141	154	90	90	90	53
Female (φ)	Mean	11.1	14	0.3	3.4	158.7	8.83	118.4	3
	95% interval								
	Low	9.7	5	0.2	2.4	147.5	7.27	111.9	0
	High	12.3	26	0.5	4.3	181.2	10.82	134.0	9
	N	155	159	141	157	66	66	66	49

*Non-fasted samples were collected from animals housed in Charles River's standard production setting and analyzed with Alfa-Wassermann Ace Alera clinical analyzer. Age: 8-10 weeks.