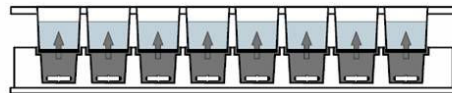
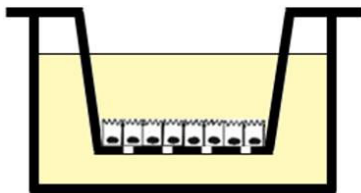


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ - ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**In vitro μελέτες διαπερατότητας φαρμάκων από
εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά
περιεχόμενα**



Κωνσταντίνος Μαρκόπουλος

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ - ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Χ. Ρέππας, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)
- Γ. Ιμανίδης, Καθηγητής, Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Εφαρμοσμένων Επιστημών Βορειοδυτικής Ελβετίας / Καθηγητής, Τμήμα
Φαρμακευτικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Βασιλείας, Ελβετία
- Μ. Συμιλλίδου, Επ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
- Σ. Αντιμησιάρη, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Π. Μαχαίρας, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
- Α.Λ. Σκαλτσούνης, Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ
- Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Όνομα: **Κωνσταντίνος Μαρκόπουλος**

Ημερομηνία γέννησης: 27 Σεπτεμβρίου 1980

e-mail: cmarkopoulos@pharm.uoa.gr

Δραστηριότητες πριν από την έναρξη εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής

Πτυχίο Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2004).
Βαθμός: Λίαν Καλώς (7.68)

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Βιομηχανική Φαρμακευτική», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (2007). Βαθμός: Άριστα (8.87)

Τίτλος διπλωματικής εργασίας: «Συμβολή στη διαδικασία απορρόφησης της ελευρωπεΐνης μετά από per os χορήγηση» (Επιβλέπων: Χ.Ρέππας)

Δημοσιεύσεις:

Markopoulos C, Vertzoni M, Agalias A, Magiatis P, Reppas C. Stability of oleuropein in the human proximal gut. *J Pharm Pharmacol* ; 61:143-9 (2009) (Impact factor: 1.918)

(Η δημοσίευση περιέχει αποκλειστικά ευρήματα της διπλωματικής εργασίας)

Χρονοδιάγραμμα Δραστηριοτήτων από την έναρξη εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής

4 Ιουλίου 2007: Έναρξη εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής στο Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ

Νοέμβριος 2007 – Δεκέμβριος 2009: Εκπόνηση μέρους της Διατριβής (πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες) στο εργαστήριο του Ινστιτούτου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Εφαρμοσμένων Επιστημών Βορειοδυτικής Ελβετίας (FHNW), Βασιλεία, Ελβετία

9-12 Σεπτεμβρίου 2008: Παρουσίαση μέρους της Διατριβής με τη μορφή poster στο συνέδριο του GPEN (Globalization of Pharmaceutics Education Network), Leuven, Βέλγιο.

Τίτλος poster: «Permeation of danazol from human duodenal aspirates in fed state through Caco-2 cell line: Preliminary data»

15 Ιανουαρίου – 6 Φεβρουαρίου 2009: Παρακολούθηση σεμιναρίου “Key Issues on Drug Discovery and Development”, Πανεπιστήμιο Βασιλείας, Ελβετία

Εαρινό εξάμηνο 2009: Επιτυχής παρακολούθηση του μαθήματος “Scientific writing”, Πανεπιστήμιο Βασιλείας, Ελβετία

14-18 Νοεμβρίου 2010: Παρουσίαση μέρους της Διατριβής με τη μορφή poster στο συνέδριο PSWC 2010 (Pharmaceutical Sciences World Conference), Νέα Ορλεάνη, ΗΠΑ.

Τίτλος poster: “Biorelevant media for use in transport experiments with Caco-2 cell cultures and their usefulness in evaluating passive permeability of danazol in the fasted and in the fed state”

23-27 Οκτωβρίου 2011: Παρουσίαση μέρους της Διατριβής με τη μορφή poster στο συνέδριο του AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists), Ουάσινγκτον, ΗΠΑ.

Τίτλος poster: “Intestinal absorption of danazol from micellar and non-micellar lipid phases after oral administration of a triglyceride solution to healthy adults”

20 Ιουνίου 2011: Σύγκλιση της τριμελούς επιτροπής παρακολούθησης της Διατριβής και παρουσίαση του έργου από τον υποψήφιο Διδάκτορα

27 Ιουνίου 2011: Οριστικοποίηση του τίτλου της Διατριβής και ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής

29 Σεπτεμβρίου 2011: Κατάταξη στον Ελληνικό Στρατό (Υγειονομικό Σώμα) για εκπλήρωση της στρατιωτικής θητείας

Δημοσιεύσεις:

Vertzoni M, Markopoulos C, Symillides M, Goumas C, Imanidis G, Reppas C. Luminal lipid phases after administration of a triglyceride solution of danazol in the fed state and their contribution to the flux of danazol across Caco-2 cell monolayers. *Mol. Pharmaceutics*, 9:1189-98 (2012) (Impact factor 2010: 5.400)

(Η δημοσίευση περιέχει κατά 50% ευρήματα της Διδακτορικής Διατριβής)

Αφιερώνεται στους γίγαντες, στον οποίων τους ώμους στάθηκα.
(έμπνευση για την αφιέρωση αποτέλεσε η γνωστή φράση του Νεύτωνα – 17ος αι.)

“We live on an island surrounded by a sea of ignorance. As our island of knowledge grows, so does the shore of our ignorance.”

John A. Wheeler, Αμερικανός φυσικός (1911-2008)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση αυτής της διατριβής βοήθησαν αρκετοί άνθρωποι, στους οποίους οφείλω ειλικρινείς ευχαριστίες.

Καταρχάς, είμαι ευγνώμων στον Καθηγητή Χρήστο Ρέππα, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με την παρούσα διδακτορική διατριβή και ως υπεύθυνός της με καθοδηγούσε με πολύτιμες συμβουλές, δείχνοντας υπομονή και συνεχές ενδιαφέρον. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Γιώργο Ιμανίδη, ο οποίος με δέχτηκε στο εργαστήριό του στην Ελβετία, μου παρείχε άριστες συνθήκες πραγματοποίησης των πειραμάτων και αφιέρωσε πολύ χρόνο βοηθώντας με ουσιαστικά. Ευχαριστώ ακόμα την Επίκουρη καθηγήτρια Μοίρα Χριστοφόρου-Συμυλλίδου, η οποία ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής είχε ενεργό ρόλο στη διατριβή με καίριες συμβουλές. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τη Sonja Reutlinger, τη Fabienne Thoenen και τον Marcel Schneider, οι οποίοι ήταν συνεχώς δίπλα μου και με βοήθησαν αποτελεσματικά στα πειράματά μου στο εργαστήριο της Ελβετίας. Ανεκτίμητη ήταν και η συνεργασία με τη Δρ. Μαρία Βερτζώνη, την οποία ευχαριστώ για την καθημερινή βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια.

Ο Δημοσθένης είχε πει «δεῖ δὲ χρημάτων, καὶ ἄνευ τούτων οὐδὲν ἔστι γενέσθαι τῶν δεόντων». Έτσι, θα ήθελα να αναφέρω και τις πηγές χρηματοδότησης της διατριβής, χωρίς τη συμβολή των οποίων δεν θα ήταν εφικτή η πραγματοποίησή της. Ευχαριστώ την εταιρεία Roche για την οικονομική υποστήριξη των πειραμάτων με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Επίσης, ευχαριστώ και την ελβετική επιτροπή υποτροφιών για αλλοδαπούς φοιτητές ESKAS (Eidgenössische Stipendienkommission für ausländische Studierende), η οποία με υποστήριξε με υποτροφία για εννέα μήνες. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (IKY), το οποίο για 3,5 χρόνια μου παρείχε υποτροφία, συμβάλλοντας τα μέγιστα στην επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή είχε σκοπό να απαντήσει σε δύο ερωτήματα. Το πρώτο ήταν πώς λιπιδικές δομές που υπάρχουν στα εντερικά περιεχόμενα επηρεάζουν την πρόσβαση ενός λιπόφιλου μικρομορίου στο εντερικό επιθήλιο και τη ροή του μέσω των επιθηλιακών κυττάρων. Το δεύτερο ερώτημα ήταν πώς επηρεάζεται η τιμή του συντελεστή διαπερατότητας μικρομορίων με ποικίλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και μηχανισμούς μεταφοράς μέσω του εντερικού επιθηλίου από τις συνθήκες που επικρατούν στη μικκυλιακή φάση των ενδοαυλικών περιεχομένων κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά τη διάρκεια της πέψης.

Για να απαντηθεί το πρώτο ερώτημα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εντερικών περιεχομένων από υγιείς εθελοντές, στους οποίους είχε χορηγηθεί γεύμα που περιείχε μια δόση δαναζόλης διαλυμένη στη λιπιδική του φάση. Μέρος κάθε δείγματος υπερφυγοκεντρήθηκε και ελήφθη η μικκυλιακή τους φάση, που περιείχε κυρίως μικτά μικύλια. Τα εντερικά περιεχόμενα και οι μικκυλιακές τους φάσεις χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA και, μετά από κατάλληλη αραίωση, με χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων. Για τη διερεύνηση του δεύτερου ερωτήματος, χρησιμοποιήθηκαν μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση κατά τη διαπεπτική περίοδο και την περίοδο πέψης και μελετήθηκε η διαπερατότητα έξι μικρομορίων με την τεχνική PAMPA και με χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων. Τα προσομοιωμένα εντερικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Όσον αφορά στο πρώτο ερώτημα, τα πειράματα και με τις δύο τεχνικές έδειξαν ότι οι συντελεστές διαπερατότητας ήταν γενικά μεγαλύτεροι όταν χρησιμοποιήθηκε η μικκυλιακή φάση σε σχέση με τα εντερικά περιεχόμενα. Η ροή μεταφοράς της δαναζόλης μέσω του εντερικού επιθηλίου ήταν όμως παρόμοια ή μεγαλύτερη από τα εντερικά περιεχόμενα. Αυτό σημαίνει ότι οι λιπιδικές δομές που δημιουργούνται ενδοαυτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση της λιπόφιλης δαναζόλης μετά από χορήγησή της σε λιπιδική φάση. Η απάντηση στο δεύτερο ερώτημα ήταν ότι ο συντελεστής διαπερατότητας για λιπόφιλα μόρια είναι μικρότερος χρησιμοποιώντας μέσο που προσομοιώνει τη μικκυλιακή φάση κατά τη διαπεπτική

περίοδο από ότι απλό υδατικό μέσο μεταφοράς (που κατά κανόνα χρησιμοποιείται σήμερα σε σχετικές μελέτες) και ακόμα μικρότερος χρησιμοποιώντας μέσο που προσομοιώνει τη μικκυλιακή φάση κατά την περίοδο πέψης. Η τάση αυτή ήταν περισσότερο εμφανής στα πειράματα με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Για υδρόφιλα μόρια η σύσταση του μέσου μεταφοράς δεν παίζει ρόλο στη διαπερατότητα. Για τα λιπόφιλα μόρια η διαφορετική σύσταση των προσομοιωμένων εντερικών περιεχομένων αλλάζει το ελεύθερο κλάσμα, ενώ στα υδρόφιλα μόρια το ελεύθερο κλάσμα είναι συνέχεια ίδιο.

ABSTRACT

Two were the objectives of this study. The first was to investigate how lipid structures that are present in intestinal fluids affect the transport of a lipophilic molecule to the intestinal epithelium and the flux through the epithelial cells. The second was to investigate how the intraluminal micellar phase in the fasted and in the fed state affects the permeability coefficient of molecules with various physicochemical characteristics and mechanisms of transport through the intestinal epithelium.

To achieve the first objective, one dose of the lipophilic model molecule, danazol, was dissolved in the lipid phase of a meal that was administered to healthy adults. Samples of intestinal contents were aspirated from the end of duodenum. Part of these aspirates was ultracentrifugated, so that their micellar phases were obtained. Aspirates and their micellar phases were used in permeability experiments with Caco-2 cell monolayers (after appropriate dilution with buffer) and with the PAMPA technique. To achieve the second objective, fluids simulating the micellar phase of the intestinal fluids in the fasted and in the fed state were used in permeability experiments using six model molecules. Again, Caco-2 cell lines and the PAMPA technique were used. The simulated intestinal fluids used in the Caco-2 experiments were developed in this study.

Regarding the first objective, experiments with both techniques showed that estimated values of the permeability coefficients were higher when micellar phases were used. However, calculated flux of danazol was similar or bigger for the aspirates. This means that after administration of the dose dissolved in the lipid phase, the intraluminal lipid structures play an important role on the absorption of the lipophilic molecule danazol. Regarding the second objective, the permeability coefficient for the lipophilic molecules was smaller when using fluid simulating the fasted state conditions compared to simple aqueous transport medium and even smaller when using fluid simulating the fed state conditions. This trend was more obvious in experiments with Caco-2 cell lines. The composition of the transport medium did not play a role on the permeability of hydrophilic molecules. The composition of the simulated intestinal fluids affects the free fraction of lipophilic molecules, whereas it does not change the free fraction of hydrophilic molecules.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΑΛ: απλά λιπίδια

ΓΕ: γαστρεντερικός

ΕΠ: εντερικά περιεχόμενα

ΜιΛ: μικκυλιακά λιπίδια

ΜΛΣ: μεγάλοι λιπιδικοί σχηματισμοί

ΜΜ: απλό υδατικό μέσο μεταφοράς

ΜΦ: μικκυλιακή φάση

Φ/Μ: φαρμακοτεχνική μορφή

ABC: ATP-binding cassette

ABL: aqueous boundary layer

ACAT: advanced compartmental absorption and transit

A-PAMPA: anionic parallel artificial membrane permeation assay

ASB: acceptor sink buffer

BCRP: breast cancer resistant protein

BCS: Biopharmaceutics classification system

BDDCS: Biopharmaceutics drug disposition classification system

BLMs: black lipid membranes

BM-PAMPA: biomimetic parallel artificial membrane permeation assay

CAT: compartmental absorption and transit

CMC: critical micellar concentration

CYP: cytochrome P450

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO: dimethylsulfoxide

DOPC-PAMPA: dioleoylphosphatidylcholine parallel artificial membrane permeation assay

DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline

DS-PAMPA: double sink parallel artificial membrane permeation assay

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EMA: European Medicines Agency

FaSSIF: fasted state simulating intestinal fluid

FBS: foetal bovine serum

FDA: Food and Drug Administration

FeSSIF: fed state simulating intestinal fluid

GMO: glycerol monooleate

GOF: goodness of fit

GSTs: glutathione S-transferases

HBD: hydrogen bond donor

HBSS: Hank's balanced salt solution

HDM-PAMPA: hexadecane membrane parallel artificial membrane permeation assay

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

LDH: lactate dehydrogenase

LLC-PK1: Lewis lung carcinoma - porcine kidney 1

lysoPC: lysophosphatidylcholine

MDCK: Madin-Darby canine kidney

MRP2: multidrug resistance-associated protein 2

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaTC: sodium taurocholate

NEAA: non essential amino acids

OA: oleic acid

OATPs: organic anion-transporting polypeptides

PAMPA: parallel artificial membrane permeation assay

PC: phosphatidylcholine

PEG: polyethylene glycol

P-gp: P-glycoprotein

PSA: polar surface area

PVDF: polyvinylidene fluoride

PVPA: phospholipid vesicle-based permeation assay

p.o.: per os

PTFE: polytetrafluoroethylene

QSPR: quantitative structure-property relationship

SEM: scanning electron microscopy

SIF: simulated intestinal fluid

SLC: solute carriers

STELLA: structural thinking experimental learning laboratory with animation

SULTs: sulfotransferases

TEER: transepithelial electrical resistance

TEM: transmission electron microscopy

TPGS: d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate

UGTs: UDP-glucuronosyl transferases

UWL: unstirred water layer

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
A.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ Ρ.Ο. ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	1
A.1.1 Ο ρόλος του στομάχου στην απορρόφηση p.o. χορηγούμενων φαρμάκων .	1
A.1.2 Το φάρμακο από τα εντερικά περιεχόμενα στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου	3
A.1.3 Διαδικασία της μεταφοράς μέσω του εντερικού επιθηλίου.....	4
A.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	8
A.2.1 Πρόβλεψη της εντερικής διαπερατότητας από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	8
A.2.2 In vitro τεχνικές μελέτης της εντερικής διαπερατότητας φαρμάκων	10
A.2.2.1 Τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες	10
<i>PAMPA</i>	11
A.2.2.2 Συνεχείς κυτταρικές σειρές	16
<i>Caco-2</i> κυτταρικές σειρές	18
<i>Υγρά μέσα που χρησιμοποιούνται σε πειράματα μεταφοράς με Caco-2</i> <i>κυτταρικές σειρές</i>	23
A.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	30
A.3.1 Τεχνική ανεστραμμένων σάκων	30
A.3.2 Κύτταρα Ussing	31
A.3.3 In situ τεχνικές διαπότισης	33
A.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ Ή ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ	35
A.5 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ	37
A.5.1 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας	37
A.5.2 Χρησιμότητα του συντελεστή διαπερατότητας.....	40
A.6 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	41
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	49
B.1 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ	49
B.2 ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ	50

B.2.1 Πειράματα με την τεχνική PAMPA.....	50
B.2.2 Πειράματα με Caco-2 κυτταρικές σειρές.....	52
B.3 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ PAMPA	58
B.3.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε Prisma™ HT.....	58
B.3.2 Πειράματα διαπερατότητας με τη δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)	59
B.3.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων	60
B.3.4 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας	61
B.3.4.1 Προσαρμογή απλού διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα	62
<i>Δειγματοληψίες από το διαμέρισμα-δέκτης</i>	63
<i>Δειγματοληψίες από το διαμέρισμα-δότης</i>	64
B.3.4.2 Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου σε πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν στα αρχικά στάδια της μεταφοράς	65
B.4 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ CACO-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΩΝ.....	66
B.4.1 Καλλιέργεια κυττάρων – σχηματισμός κυτταρικών μονοστιβάδων στα φρεάτια	66
B.4.2 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε απλό υδατικό μέσο μεταφοράς (ΜΜ).....	67
B.4.2.1 Πειράματα με δαναζόλη.....	67
B.4.2.2 Πειράματα με τα υπόλοιπα μικρομόρια.....	71
B.4.3 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)	72
B.4.3.1 Αντοχή κυττάρων στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ.....	72
B.4.3.2 Σύσταση των περιεχομένων στο διαμέρισμα-δέκτης όταν στο διαμέρισμα-δότης έχει τοποθετηθεί δείγμα ΕΠ ή ΜΦ.....	74
B.4.3.3 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ).....	76
B.4.4 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων	77
B.4.4.1 Ανάπτυξη μέσων κατάλληλων για χρήση σε πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες	77
B.4.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων για το διαμέρισμα-δότης.....	80
B.4.4.3 Παρασκευή διαλυμάτων για το διαμέρισμα-δέκτης	81

B.4.4.4 Πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιώντας <i>FaSSIF_{Caco}</i> και <i>FeSSIF_{Caco}</i>	81
B.4.5 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας	82
B.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	84
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
Γ.1 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΡΑΜΡΑ	87
Γ.1.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε	87
Γ.1.2 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)	90
Γ.1.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων	97
Γ.2 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ CACO-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΩΝ.....	100
Γ.2.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε MM.....	100
Γ.2.1.1 Δαναζόλη σε MM	100
Γ.2.1.2 Υπόλοιπα μικρομόρια σε MM.....	101
Γ.2.2 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)	104
Γ.2.2.1 Σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταφοράς μετά από διάφορες αραιώσεις των αναρροφηθέντων δειγμάτων.....	104
Γ.2.2.2 Σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταφοράς χρησιμοποιώντας δείγματα αραιωμένα 1:16 με MM	105
Γ.2.2.3 Σχέση μεταξύ φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και συγκέντρωσης λιπιδίων	112
Γ.2.2.4 Ροή δαναζόλης από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ.....	115
Γ.2.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων	117
Γ.2.3.1 Σχέση μεταξύ φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και συγκέντρωσης λιπιδίων στα πειράματα με <i>FaSSIF_{Caco}</i> και <i>FeSSIF_{Caco}</i>	121
Δ. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	123
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 – Περίληψη της κλινικής μελέτης από την οποία προέκυψαν τα εντερικά περιεχόμενα που χρησιμοποιήθηκαν στα in vitro πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική ΡΑΜΡΑ και με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων	127
Π1.1 Εθελοντές - Άδειες	127
Π1.2 Σύσταση του χορηγηθέντος γεύματος.....	127

Π1.3 Πρωτόκολλο	128
Π1.4 Χειρισμός αναρροφηθέντων δειγμάτων	128
Π1.5 Αναλυτικές μέθοδοι.....	129
Π1.6 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εντερικών περιεχομένων	130
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 - Εύρεση της κατάλληλης σύστασης των περιεχομένων στο διαμέρισμα-δέκτης των φρεατίων PAMPA και του καταλληλότερου χειρισμού των πρωτογενών πειραματικών δεδομένων.....	135
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 - Χρωματογραφικές συνθήκες για την ποσοτικοποίηση των μικρομορίων που μελετήθηκαν.....	147
Π3.1 Πειράματα διαπερατότητας με τη μέθοδο PAMPA.....	147
Π3.2 Πειράματα διαπερατότητας σε Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες.....	158
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 - Διαφορικές εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων	165
Π4.1 Επεξήγηση συμβόλων	165
Π4.2 Γενική μορφή διαφορικών εξισώσεων	167
Π4.3 Οι διαφορικές εξισώσεις για κάθε υπό μελέτη ουσία	176
Π4.3.1 Δαναζόλη σε MM	176
Π4.3.2 Δαναζόλη σε ΕΠ, ΜΦ, FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	177
Π4.3.3 Μικρομόριο Α σε MM	177
Π4.3.4 Μικρομόριο Α σε FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	177
Π4.3.5 Μικρομόριο Β σε MM	177
Π4.3.6 Μικρομόριο Β σε FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	177
Π4.3.7 Μικρομόριο Γ σε MM.....	178
Π4.3.8 Μικρομόριο Γ σε FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	178
Π4.3.9 Λεβοβιρίνη σε MM	178
Π4.3.10 Λεβοβιρίνη σε FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	178
Π4.3.11 Ριμπαβιρίνη σε MM.....	178
Π4.3.12 Ριμπαβιρίνη σε FaSSIF _{Caco} και FeSSIF _{Caco}	179
Π4.3.13 Αμοξικιλίνη σε MM	179
Π4.3.14 Ρανιτιδίνη σε MM	179
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5 – Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων μεταφοράς και των καλύτερα προσαρμοσμένων καμπυλών με την τεχνική PAMPA	181
Π5.1 Μικρομόρια σε Prisma™ HT (n=3)	181
Π5.2 Δαναζόλη σε ΕΠ και ΜΦ	184

Π5.3 Μικρομόρια σε προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα.....	192
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6 – Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων μεταφοράς και των καλύτερα προσαρμοσμένων καμπυλών με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων	195
Π6.1 Μικρομόρια σε ΜΜ και προσομοιωμένες μικκυλιακές φάσεις	195
Π6.2 Δαναζόλη σε ΕΠ και ΜΦ	200
Π.6.2.1 Δαναζόλη σε ΕΠ.....	201
Π6.2.2 Δαναζόλη σε ΜΦ.....	206
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ.....	211

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ Ρ.Ο. ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η per os χορήγηση είναι ο δημοφιλέστερος τρόπος χορήγησης φαρμάκων. Περίπου το 80% των φαρμάκων που κυκλοφορούν χορηγούνται από το στόμα, κυρίως σε φαρμακοτεχνικές μορφές (Φ/Μ) άμεσης αποδέσμευσης (Lennernäs and Abrahamsson, 2005). Αυτό συμβαίνει, επειδή η χορήγηση από το στόμα είναι πιο εύκολη σε σχέση με άλλες οδούς (ενδοφλέβια, ενδομυϊκή, διαδερμική, από τη ρινική κοιλότητα, από τη στοματική κοιλότητα, από το ορθό) και υπάρχει καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς στη θεραπεία. Η δραστική ουσία που περιέχεται στην per os χορηγούμενη Φ/Μ αρχικά θα διαλυθεί στα γαστρεντερικά (ΓΕ) υγρά, στη συνέχεια θα διέλθει μέσω του εντερικού επιθηλίου και του ήπατος (όπου είναι δυνατό να βιομετατραπεί) στη γενική κυκλοφορία, θα κατανεμηθεί στο σώμα και θα φτάσει στις θέσεις δράσης της, ενώ ταυτόχρονα θα αρχίσει να απομακρύνεται από το σώμα (μέσω των νεφρών ή/και του ήπατος). Το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου που θα καταφέρει τελικά να φτάσει στη γενική κυκλοφορία αποτελεί το συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας.

Συνήθως, δύο είναι τα περιοριστικά βήματα για να απορροφηθεί μια φαρμακευτική ουσία: η μοριακή διασπορά της στα ΓΕ υγρά και η μεταφορά της μέσω του ΓΕ επιθηλίου. Μετά από τη χορήγηση μιας στερεής Φ/Μ άμεσης αποδέσμευσης, η διαδικασία της απορρόφησης ξεκινά και συνήθως ολοκληρώνεται στον ανώτερο ΓΕ αυλό, δηλαδή στο στόμαχο και το λεπτό έντερο. Η διαδικασία της μοριακής διασποράς στα υγρά περιεχόμενα του αυλού (συνήθως διάλυση) αρχίζει στο στόμαχο, αλλά πολλές φορές ολοκληρώνεται στο λεπτό έντερο. Η διαδικασία της μεταφοράς μέσω του ΓΕ βλεννογόνου αρχίζει (ουσιαστικά) και ολοκληρώνεται στο λεπτό έντερο. Στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού θα επιχειρηθεί σύνοψη της υπάρχουσας γνώσης σχετικά με τη μεταφορά των φαρμάκων μέσω του ΓΕ επιθηλίου.

A.1.1 Ο ρόλος του στομάχου στην απορρόφηση p.o. χορηγούμενων φαρμάκων

Αφού χορηγηθεί per os, η φαρμακοτεχνική μορφή θα περάσει από τον οισοφάγο σε

λίγα δευτερόλεπτα και θα καταλήξει στο στόμαχο. Ο στόμαχος περιέχει κατά τη διαπεπτική περίοδο λιγότερα από 20 ml γαστρικού υγρού. Η εσωτερική επιφάνεια του στομάχου αποτελείται από τεσσάρων ειδών κύτταρα: α) τα επιθηλιακά κύτταρα, που εκκρίνουν βλέννα (mucus) και διττανθρακικά ιόντα, β) τα τοιχωματικά ή οξεοπαραγωγικά (parietal) κύτταρα, που παράγουν υδροχλωρικό οξύ γ) τα θεμέλια (chief) κύτταρα, που εκκρίνουν λιπάση και πεψινογόνο, και δ) τα κύτταρα G, που παράγουν την ορμόνη γαστρίνη. Σε αντίθεση με άλλες περιοχές του ΓΕ αυλού, δεν παρατηρούνται κανενός είδους προεξοχές του εσωτερικού τοιχώματος και για το λόγο αυτό η έκταση επιφάνειας είναι περιορισμένη. Το γεγονός αυτό, καθώς και η απουσία πρωτεϊνών μεταφοράς στο επιθήλιο, έχουν ως αποτέλεσμα να μην απορροφώνται σε σημαντικό βαθμό τα φάρμακα κατά την παραμονή τους στο στόμαχο, ιδιαίτερα κατά τη διαπεπτική περίοδο κατά την οποία ο χρόνος παραμονής των περιεχομένων στο στόμαχο είναι περιορισμένος. Ο φυσιολογικός ρόλος του στομάχου συνίσταται κυρίως στην έναρξη της πέψης των θρεπτικών συστατικών, στη ρύθμιση της μεταφοράς των περιεχομένων στο λεπτό έντερο (γαστρική κένωση) και στο γεγονός ότι στο γαστρικό υγρό αρχίζει (ή/και ολοκληρώνεται) η διάλυση των φαρμάκων που χορηγούνται σε στερεή μορφή. Το pH στη διαπεπτική περίοδο είναι περίπου 1,6, ενώ φτάνει περίπου 5-6 στην περίοδο πέψης (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997).

Η κινητικότητα του στομάχου διαφοροποιείται ανάλογα με την παρουσία τροφής. Η διαπεπτική περίοδος χαρακτηρίζεται από κύκλους συστολών διάρκειας περίπου 80-120 min. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρεις φάσεις συστολών: τη φάση I, που διαρκεί 45-60 min και χαρακτηρίζεται από ασθενείς συστολές, τη φάση II διάρκειας 30-45 min όπου συμβαίνουν ακανόνιστες συστολές αυξανόμενης έντασης και μέτριας συχνότητας, και τέλος τη φάση III που διαρκεί 2-10 min και χαρακτηρίζεται από έντονες συστολές υψηλής συχνότητας. Αντίθετα, κατά την περίοδο πέψης διακόπτονται οι κύκλοι και οι συστολές είναι υψηλής έντασης και μέτριας συχνότητας. Η γαστρική κένωση υγρών χωρίς θερμίδες και σωματιδίων μικρότερων από 2 mm κατά τη διαπεπτική περίοδο μπορεί να γίνει σε οποιαδήποτε φάση, ανάλογα με τον όγκο του υγρού που (συγ)χορηγείται, ενώ μεγαλύτερων σωματιδίων μόνο κατά τη φάση III. Η παρουσία τροφής αυξάνει το χρόνο παραμονής στο στόμαχο. Ο ρυθμός γαστρικής κένωσης εξαρτάται από τον όγκο του υγρού (διαπεπτική περίοδος) και από το θερμιδικό περιεχόμενο του στομάχου (περίοδος πέψης, μέσος ρυθμός: 2-4 kcal/min). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη γαστρική

κένωση είναι το pH, η ωσμωτικότητα, το ιξώδες των περιεχομένων, καθώς και η πυκνότητα των σωματιδίων (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997).

Ο χρόνος παραμονής των φαρμάκων στο στόμαχο επηρεάζει το ρυθμό απορρόφησης, αλλά ορισμένες φορές ακόμα και την έκταση της απορρόφησης. Για παράδειγμα, σε περίπτωση που το φάρμακο έχει προβλήματα σταθερότητας στο όξινο περιβάλλον, καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης θα οδηγήσει στην αποικοδόμησή του και άρα στη συνέχεια σε μειωμένη έκταση απορρόφησης. Αντίθετα, η καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης θα αυξήσει την έκταση απορρόφησης φαρμάκων που περιέχονται σε φαρμακοτεχνικές μορφές παρατεταμένης αποδέσμευσης λόγω της παράτασης του χρόνου παραμονής του σκευάσματος σε περιοχές του ΓΕ αυλού από τις οποίες στη συνέχεια είναι δυνατή η απορρόφηση του φαρμάκου.

A.1.2 Το φάρμακο από τα εντερικά περιεχόμενα στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου

Αφού περάσει το πυλωρικό στόμιο, το φάρμακο εισέρχεται στο λεπτό έντερο, την περιοχή από την οποία λαμβάνει χώρα η μεταφορά μέσω του εντερικού επιθηλίου. Το λεπτό έντερο έχει μήκος περίπου 3 m και αποτελείται από τρία τμήματα, τα οποία κατά σειρά είναι το δωδεκαδάκτυλο (μήκος περίπου 25 cm), η νήστιδα (1,1 m) και ο ειλεός (1,6 m). Από το φύμα του Vater στο δωδεκαδάκτυλο εκκρίνονται η χολή και το παγκρεατικό υγρό. Το pH στο δωδεκαδάκτυλο κατά τη διαπεπτική περίοδο είναι 6-7, ελάχιστα αυξημένο σε σχέση με την περίοδο πέψης. Ο μέσος χρόνος διάβασης του λεπτού εντέρου είναι περίπου 3-5 h και δεν επηρεάζεται από την παρουσία τροφής.

Τα μόρια που έχουν υποστεί μοριακή διασπορά στα περιεχόμενα του ΓΕ αυλού για να προσεγγίσουν την επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου πρέπει να διαχυθούν μέσω της μη αναδευόμενης υδάτινης στιβάδας (unstirred water layer – UWL, ονομάζεται και aqueous boundary layer – ABL), η οποία καλύπτει την επιφάνεια ολόκληρου του ΓΕ επιθηλίου. Η μη αναδευόμενη υδάτινη στιβάδα αποτελείται κυρίως από νερό και βλέννα και έχει πάχος 30-100 μm (Lennernäs, 1998). Η μεταφορά μέσω της στιβάδας αυτής γίνεται με παθητική διάχυση, κάτι που μπορεί να αποτελέσει το περιοριστικό βήμα για την απορρόφηση πολύ λιπόφιλων μορίων ($\log P > 3$) και μορίων με μεγάλο μέγεθος. Ένα χαρακτηριστικό της μη αναδευόμενης υδάτινης στιβάδας είναι το pH της (περίπου 5,5-6,0), που είναι ελαφρώς πιο όξινο από το pH που επικρατεί στον κύριο όγκο των εντερικών περιεχομένων, λόγω της παρουσίας της βλέννας. Πάντως, υπάρχει η άποψη ότι η παρουσία της UWL δεν αποτελεί στην πραγματικότητα

σημαντικό εμπόδιο στην απορρόφηση των φαρμάκων (Chiou, 1994 και Lennernäs, 1998).

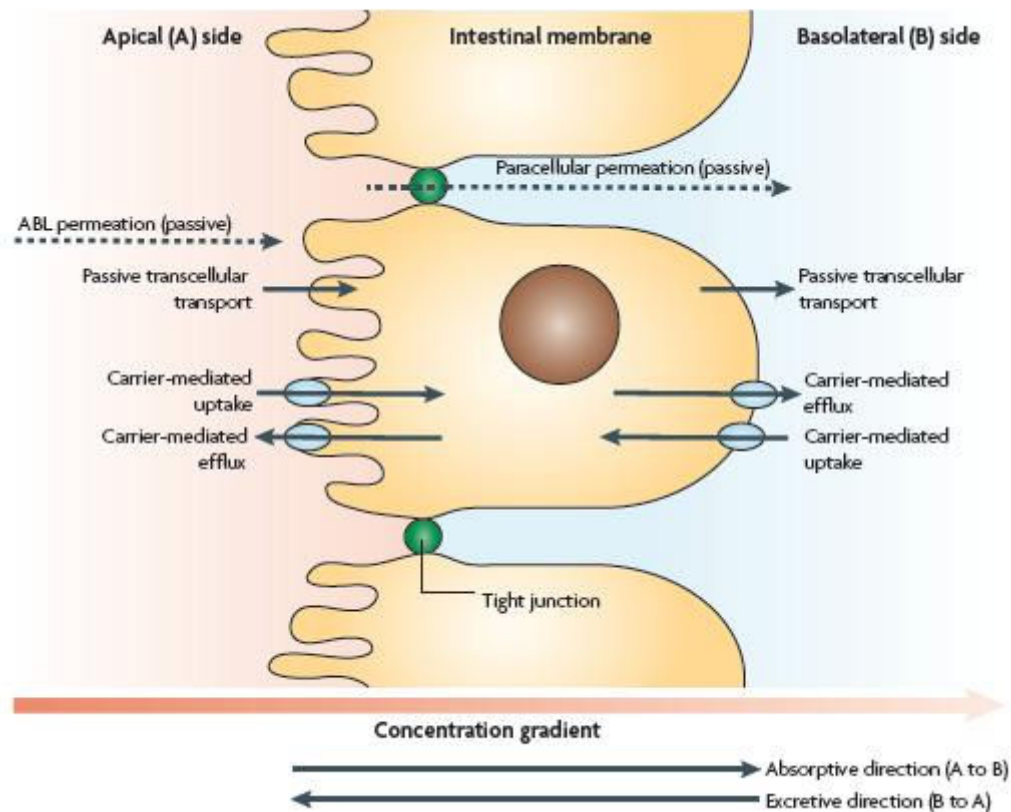
Η βλεννογόνος του λεπτού εντέρου χαρακτηρίζεται από πολυάριθμες πτυχώσεις, οι οποίες αυξάνουν κατά πολύ την έκταση επιφάνειας από όπου μπορεί να γίνει απορρόφηση. Οι μεγαλύτερες προεξοχές είναι οι κυκλοτερείς πτυχές, που αυξάνουν την έκταση επιφάνειας περίπου 3 φορές, πιο μικρές πτυχές είναι οι λάχνες (villi), που προκαλούν αύξηση 8 με 10 φορές και οι μικρότερες είναι οι μικρολάχνες (microvilli), που πολλαπλασιάζουν την έκταση επιφάνειας κατά 20 φορές. Αν και η ακριβής μέτρηση παρουσιάζει διάφορες δυσκολίες, η τελική έκταση επιφάνειας θεωρείται ότι είναι της τάξεως των $2 \times 10^6 \text{ cm}^2$.

Οι κυκλοτερείς πτυχές έχουν μήκος μέχρι 8 mm και βρίσκονται κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα. Οι λάχνες έχουν μήκος 0,5-1,5 mm, πυκνότητα 10-40/mm² και επίσης βρίσκονται κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα. Κάθε λάχνη φέρει στο εσωτερικό της αρτηρίδια, φλεβίδια και λεμφικά αγγεία, ενώ στο εξωτερικό της καλύπτεται από μια στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Το 80-90% είναι απορροφητικά (absorptive) κύτταρα, το 10-20% είναι εκκριτικά λαγνοειδή (goblet) κύτταρα, ενώ υπάρχει και μικρός αριθμός ενδοκρινών και εξωκρινών αδένων. Τα λαγνοειδή κύτταρα εκκρίνουν βλέννα, η οποία δρα προστατευτικά έναντι των ενζύμων και βλαβερών ουσιών. Τα απορροφητικά επιθηλιακά κύτταρα είναι μακρόστενα, με ύψος περίπου 35 μm και συνδέονται με τα διπλανά τους με σφιχτές συνάψεις (tight junctions), οι οποίες σχηματίζονται λόγω αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών (π.χ. claudin, occludin) που βρίσκονται στην πλάγια κυτταρική μεμβράνη. Στη μεμβράνη που βρίσκεται στην πλευρά του εντερικού αυλού φέρουν τις μικροσκοπικές μικρολάχνες. Οι μικρολάχνες σχηματίζουν την ψηκτροειδή παρυφή (brush border), αποτελούνται εσωτερικά από νημάτια ακτίνης και μυοσίνης και εξωτερικά καλύπτονται από την κυτταρική μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη έχει την τυπική δομή της διπλοστιβάδας φωσφολιπιδίων που φέρουν εντός τους γλυκοπρωτεΐνες (μοντέλο υγρού μωσαϊκού). Οι πρωτεΐνες αυτές είτε δρουν ως ένζυμα είτε ως μεταφορείς.

A.1.3 Διαδικασία της μεταφοράς μέσω του εντερικού επιθηλίου

Από την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων, ένα μόριο συνήθως μεταφέρεται στο εσωτερικό της εντερικής βλεννογόνου με έναν ή περισσότερους από τους εξής

μηχανισμούς: α) με παθητική διάχυση μέσω της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων (παθητική ενδοκυττάρια μεταφορά – passive transcellular transport), β) με παρακυττάρια μεταφορά (paracellular transport), και γ) με μεσολάβηση φορέα που βρίσκεται στη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων (ενδοκυττάρια μεταφορά με τη μεσολάβηση φορέα – carrier mediated transcellular transport). Αξίζει να σημειωθεί ότι στη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων υπάρχουν και φορείς που μπορούν να επαναφέρουν το μόριο από το εσωτερικό του κυττάρου στον εντερικό αυλό (εκροή - efflux). Επιπρόσθετα, αν και η μεταφορά από το εσωτερικό του κυττάρου στο μεσοκυττάριο χώρο συνήθως δεν αποτελεί πρόβλημα, ωστόσο, ορισμένες φορές μπορεί να επηρεασθεί από την παρουσία παρόμοιων φορέων μεταφοράς. Οι συνηθέστεροι μηχανισμοί μεταφοράς απεικονίζονται στο Σχήμα Α.1.



Σχήμα Α.1: Οι συνηθέστεροι μηχανισμοί μεταφοράς ενός μορίου στο εσωτερικό της εντερικής βλεννογόνου (Sugano et al., 2010). Ως apical side χαρακτηρίζεται η πλευρά του εντερικού αυλού.

Η παθητική διάχυση μέσω της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων είναι η πιο

συχνή οδός μεταφοράς των ουσιών. Λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα των κυτταρικών μεμβρανών, η μεταφορά με το μηχανισμό αυτό επηρεάζεται από τη λιποφιλία του μεταφερόμενου μορίου και, επομένως, από το βαθμό ιονισμού, εάν πρόκειται για ιονιζόμενη ουσία. Όσο πιο λιπόφιλη είναι η ουσία, τόσο πιο αυξημένος θα είναι ο ρυθμός μεταφοράς. Ο ρυθμός μεταφοράς ανά μονάδα έκτασης επιφάνειας (ροή μεταφοράς, J) δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$J = P \times (C_{extra} - C_{intra}) \quad \text{Εξίσωση A.1}$$

όπου P είναι ο συντελεστής διαπερατότητας (η τιμή του οποίου είναι ανάλογη της λιποφιλίας του), C_{extra} είναι η συγκέντρωση της ουσίας έξω από το επιθηλιακό κύτταρο και C_{intra} η συγκέντρωση εντός του κυττάρου.

Η παρακυττάρια οδός είναι λιγότερο συχνή, γίνεται μέσω των σφιχτών συνάψεων και αποτελεί την οδό μεταφοράς υδρόφιλων ουσιών με μικρό μέγεθος (π.χ. μαννιτόλη). Το πάχος των σφιχτών συνάψεων είναι πολύ μικρό (0,8 nm στη νήστιδα και 0,3 nm στον ειλέο) και η έκταση επιφάνειας τους είναι μικρότερη του 0,1% της συνολικής έκτασης επιφάνειας του εντερικού επιθηλίου.

Η μεταφορά με τη μεσολάβηση φορέα μπορεί να γίνει είτε παθητικά (διευκολυνόμενη διάχυση) είτε ενεργητικά και, όπως αναφέρθηκε, προς τις δύο κατευθύνσεις, τόσο προς το εσωτερικό όσο και προς το εξωτερικό του κυττάρου. Γενικά, υπάρχουν περισσότεροι από 400 φορείς στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και ανήκουν σε δύο βασικές οικογένειες φορέων, την ABC (ATP-binding cassette – πρωτεΐνες μεταφοράς με την παροχή ενέργειας από υδρόλυση ATP) και την SLC (solute carriers – πρωτεΐνες μεταφοράς διαλυμένων μορίων). Από αυτούς, γύρω στους 20 φορείς παίζουν ρόλο στη μεταφορά φαρμάκων μέσω του εντερικού επιθηλίου (International Transporter Consortium, 2010). Η παθητική μεταφορά με μεσολάβηση φορέα καθορίζεται από τη διαφορά συγκεντρώσεων της ουσίας εντός και εκτός κυττάρου, αλλά διαφέρει από την παθητική διάχυση στο ότι είναι διαδικασία που μπορεί να κορεστεί (όταν η συγκέντρωση της ουσίας είναι πολύ μεγαλύτερη από τη σταθερά Michaelis K_m). Επίσης, διαφέρει στο ότι μπορεί να εμποδιστεί με επίδραση αναστολέα. Η ενεργητική μεταφορά γίνεται με κατανάλωση ATP, κάτι που ισχύει για τους φορείς ABC και για πολλούς SLC φορείς (με τη βοήθεια της Na^+/K^+ ATPase). Συνήθως γίνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου, διευκολύνοντας την απορρόφηση αρκετών φαρμάκων. Παραδείγματα τέτοιων φορέων είναι οι φορείς ολιγοπεπτιδίων [π.χ. PepT1 (H^+ -dipeptide transporter 1) (SLC15A1)], οι φορείς αμινοξέων (π.χ. οικογένεια SLC1) και

οι φορείς οργανικών ανιόντων [π.χ. οικογένεια SLC21 (OATPs - organic anion-transporting polypeptides)]. Υπάρχουν όμως και φορείς που μεταφέρουν ενεργητικά ουσίες από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου (εκροή). Οι φορείς αυτοί όταν βρίσκονται την πλευρά του εντερικού αυλού δημιουργούν προβλήματα στην απορρόφηση. Ο πιο γνωστός φορέας εκροής είναι η P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gr, MDR1 – multidrug resistance 1) (ABCB1), αν και υπάρχουν φορείς εκροής που εκφράζονται περισσότερο, όπως η BCRP (breast cancer resistant protein) (ABCG2) και ο MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) (ABCC2) (Taipalensuu et al., 2001). Αξιίζει πάντως να σημειωθεί ότι η πλέον σύγχρονη άποψη υποστηρίζει πως η ενεργητική μεταφορά φαρμάκων από το ΓΕ αυλό στο εντερικό επιθήλιο με μεσολάβηση φορέα σπάνια αποτελεί την αποκλειστική οδό απορρόφησης των φαρμάκων, αλλά συνυπάρχει με την παθητική ενδοκυττάρια μεταφορά, ιδίως στις θεραπευτικές δόσεις (Sugano et al., 2010).

Ένα επιπλέον εμπόδιο στην απορρόφηση φαρμάκων από το εντερικό επιθήλιο είναι η βιομετατροπή, που μπορεί να συμβεί στην περιοχή αυτή. Στα επιθηλιακά κύτταρα (κυρίως στο κυτταρόπλασμα) εκφράζονται ένζυμα βιομετατροπής τόσο Φάσης I (π.χ. κυτόχρωμα P450, καρβοξυλεστεράσες) όσο και Φάσης II (π.χ. σουλφοτρανσφεράσες, N-ακετυλοτρανσφεράσες). Το κυτόχρωμα P450 είναι η συχνότερα απαντώμενη υπεροικογένεια ενζύμων και ο ρόλος τους είναι κυρίως στην υδροξυλίωση, εποξειδίωση, N- και O-απαλκυλίωση. Η εκτενέστερα εκφρασμένη οικογένεια είναι η CYP3A, με κυριότερα ένζυμα το CYP3A4 (70% των ενζύμων CYP που υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα) και το CYP3A5. Η παρουσία του CYP3A4 είναι εντονότερη στο δωδεκαδάκτυλο και μέχρι το μέσο της νήστιδας, ενώ μειώνεται στη συνέχεια. Το CYP3A4 εντοπίζεται μόνο στα απορροφητικά. Αν και το CYP3A είναι μόλις 1% του ηπατικού ενζυμικού περιεχομένου, τα CYP3A ένζυμα του εντερικού επιθηλίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση φαρμάκων. Ειδικά το CYP3A4 βιομετατρέπει περισσότερο από το 50% των φαρμάκων (Benet et al., 1996). Η βιομετατροπή φαρμάκων από τα ένζυμα CYP3A συχνά συνδυάζεται και με εκροή από το φορέα της P-gr, οπότε μειώνεται περαιτέρω η απορρόφηση (Cummins et al., 2002). Η παρουσία συστατικών της τροφής (π.χ. χυμός grapefruit) μπορεί να προκαλέσει μείωση της ενεργότητας των ενζύμων CYP3A και επακόλουθη αύξηση των ποσοστών απορρόφησης συγχωρηγούμενων φαρμάκων που κανονικά βιομετατρέπονται στα επιθηλιακά κύτταρα (Bailey et al., 1998). Αύξηση επιπέδων στο αίμα μπορεί να παρατηρηθεί και με αλληλεπίδραση φαρμάκων, από τα οποία ένα

αναστέλλει τη δράση των CYP3A ενζύμων ή συναγωνίζονται για βιομετατροπή από το ίδιο ένζυμο (π.χ. κετοκοναζόλη, ερυθρομυκίνη).

A.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗΣ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

A.2.1 Πρόβλεψη της εντερικής διαπερατότητας από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Η ανάπτυξη της Συνδυαστικής Χημείας έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη (discovery) μεγάλου αριθμού νέων ενώσεων με πιθανή φαρμακολογική δράση. Η πρόκληση όμως είναι να αναγνωριστούν όσο νωρίτερα γίνεται αυτές που είναι κατάλληλες για ανάπτυξη (development) και να αποκλειστούν αυτές που θα παρουσιάσουν προβλήματα απορρόφησης, εξοικονομώντας έτσι κόπο και χρήματα. Η εκτίμηση της διαπερατότητας μιας νέας ένωσης είναι για το λόγο αυτό πολύ σημαντική για την απόφαση περαιτέρω ανάπτυξης ή εγκατάλειψής της.

Η ίσως πιο γνωστή συσχέτιση χαρακτηριστικών της δομής με τη διαπερατότητα έγινε από τον Lipinski με τον «Κανόνα του 5» (Lipinski et al., 1997). Μετά από ανάλυση 2287 ενώσεων που είχαν φτάσει μέχρι τη Φάση I της ανάπτυξης, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι προβληματική ενδοκυττάρια παθητική μεταφορά θα παρουσιάζουν ενώσεις με $MW > 500$ Da, $clogP > 5$, αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου > 5 και αριθμό δεκτών δεσμών υδρογόνου > 10 . Η προσέγγιση αυτή είναι ποιοτική και χρησιμεύει για μια πρώτη γενική εικόνα στο στάδιο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων.

Λεπτομερή ποσοτική σχέση μεταξύ χαρακτηριστικών της δομής και της διαπερατότητας δίνουν τα μοντέλα ποσοτικής σχέσης δομής-ιδιότητας (quantitative structure-property relationship – QSPR) που αναπτύχθηκαν στη συνέχεια και περιγράφουν με εξίσωση τη σχέση μεταξύ του συντελεστή διαπερατότητας και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της ένωσης. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται στα μοντέλα ονομάζονται μοριακοί περιγραφείς και οι πιο σημαντικοί από αυτούς που θεωρείται ότι έχουν επίδραση στη διαπερατότητα είναι το $\log P$, το pK_a , η έκταση πολικής επιφάνειας (polar surface area – PSA) και οι δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου. Από τις πρώτες προσπάθειες ήταν των Norinder et al. (1997), όπου υπολογίστηκε ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας, P_{app} (κεφ. A.5) για 17 ενώσεις σε Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες και συγκρίθηκε με το

συντελεστή διαπερατότητας που υπολογίστηκε με QSPR μοντέλο, το οποίο χρησιμοποιούσε 13 μοριακούς περιγραφείς (logP, πολικότητα, αριθμό ατόμων δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου μεταξύ άλλων). Η σύγκριση έδειξε ότι το QSPR μοντέλο υπολόγιζε ικανοποιητικά τη διαπερατότητα. Τα επόμενα χρόνια έγιναν πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη QSPR μοντέλων, καθένα από τα οποία χρησιμοποιούσε διαφορετική μέθοδο και διαφορετικούς συνδυασμούς μοριακών περιγραφών (Castillo-Garit et al., 2008).

Ενδεικτικά, οι Winiwarter et al. (1998) ανέπτυξαν τρεις εξισώσεις που συσχετίζουν την PSA, το clogP, το logD_{5,5} και τον αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου (hydrogen bond donors - HBD) με το συντελεστή διαπερατότητας. Η σύγκριση με πειραματικά μετρημένες τιμές P_{eff} (κεφ. Α.5) στην ανθρώπινη νήστιδα έδειξε ότι οι εξισώσεις αυτές ήταν καλά εργαλεία για την πρόβλεψη της διαπερατότητας.

$$\log P = -2,883 - 0,010PSA + 0,192 \log D_{5,5} - 0,239HBD \quad \text{Εξίσωση A.2}$$

$$\log P = -2,546 - 0,011PSA - 0,278HBD \quad \text{Εξίσωση A.3}$$

$$\log P = -3,067 + 0,162CLOGP - 0,010PSA - 0,235HBD \quad \text{Εξίσωση A.4}$$

Οι Fujikawa et al. (2005) συνέκριναν το P_{app} που υπολογίστηκε με την τεχνική PAMPA για 57 φάρμακα με την τιμή P που υπολογίστηκε από μια εξίσωση που περιελάμβανε το logP, το pKa και την έκταση επιφάνειας που καταλάμβαναν τα άτομα δότες (SA_{HD}) και τα άτομα δέκτες (SA_{HA}) δεσμών υδρογόνου. Η εξίσωση αυτή ήταν η εξής (r²=0,78):

$$\log P = 0,42(\pm 0,09) \log P - 0,26(\pm 0,07)(pKa - pH) - 1,11(\pm 0,47)SA_{HA} - 1,01(\pm 0,41)SA_{HD} - 4,93(\pm 0,30) \quad \text{Εξίσωση A.5}$$

Με τη σύγκριση μεταξύ των μετρημένων και των υπολογισμένων τιμών διαπερατότητας θεωρήθηκε ότι το QSPR μοντέλο ήταν αποτελεσματικό στην πρόβλεψη της διαπερατότητας. Οι Gozalbes et al. (2011) ανέπτυξαν μοντέλο υπολογισμού της διαπερατότητας βασισμένοι σε 14 μοριακούς περιγραφείς (π.χ. logP, αριθμός ατόμων αζώτου σε διπλούς δεσμούς, αριθμός ατόμων θείου σε δακτυλίους, αριθμός ομάδων υδροξυλίου κλπ.) και συνέκριναν το υπολογισμένο P για 138 ενώσεις με τιμές P_{app} από πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες, παίρνοντας ικανοποιητική συσχέτιση.

Η ικανότητα πρόβλεψης των QSPR μεθόδων είναι σημαντική και πολλές φορές σε περιπτώσεις παθητικής μεταφοράς οι QSPR μέθοδοι ίσως είναι πιο αξιόπιστες από τις άλλες τεχνικές μέτρησης της διαπερατότητας (Linnankoski et al., 2008).

Συγκεκριμένα, επτά QSPR μοντέλα συγκρίθηκαν με τρία μοντέλα τεχνητών μεμβρανών, Caco-2 κυτταρικές σειρές, 2/4/A1 κυτταρικές σειρές και in vivo δεδομένα σε αρουραίους. Τρία από τα υπολογιστικά μοντέλα βρέθηκαν να είναι πιο αξιόπιστα στην πρόβλεψη της παθητικής απορρόφησης από τα μοντέλα τεχνητών μεμβρανών, δύο ήταν τόσο αξιόπιστα όσο και οι κυτταρικές σειρές και ένα σχεδόν το ίδιο καλό με in vivo πειράματα σε αρουραίους. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν τη χρησιμότητα διαφόρων QSPR μοντέλων στο αρχικό στάδιο της ανακάλυψης νέων ενώσεων και σε περιπτώσεις παθητικής μεταφοράς μέσω του βλεννογόνου.

A.2.2 In vitro τεχνικές μελέτης της εντερικής διαπερατότητας φαρμάκων

A.2.2.1 Τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες

Η χρήση τεχνητών λιπιδικών μεμβρανών για τη μελέτη της διαπερατότητας φαρμάκων έχει ιστορία αρκετών ετών και σήμερα αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική. Οι τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες προσομοιώνουν τη δομή της λιπιδικής διπλοστιβάδας της κυτταρικής μεμβράνης, οπότε η μεταφορά φαρμάκων μέσω αυτών προσομοιώνει την παθητική μεταφορά μέσω της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Λόγω της συγκεκριμένης δομής τους, οι τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες δεν επιτρέπουν τη μελέτη της μεταφοράς ουσιών που μεταφέρονται με τη μεσολάβηση φορέα ή παρακυττάρια.

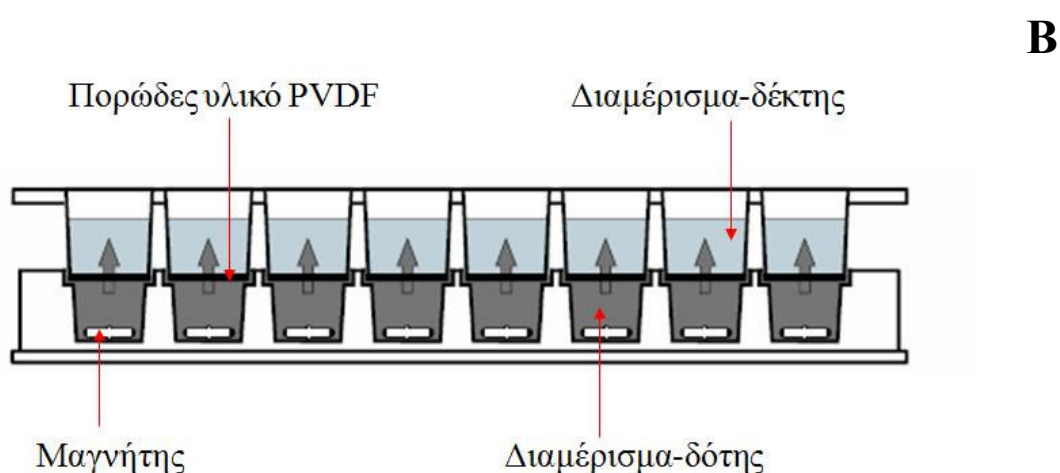
Στις αρχές της δεκαετίας του '60 (Mueller et al., 1962) περιγράφηκαν για πρώτη φορά οι μαύρες λιπιδικές μεμβράνες (BLMs – black lipid membranes). Όταν διάλυμα φωσφολιπιδίου διαλυμένο σε οργανικό διαλύτη (n-αλκάνιο ή σκουαλένιο) προστεθεί σε οπή διαμέτρου 0.5 mm ανοιγμένη σε λεπτό φύλλο Teflon, σχηματίζεται εντός της μαύρη λιπιδική μεμβράνη που αποτελείται από δύο στιβάδες λιπιδίου. Οι μαύρες λιπιδικές μεμβράνες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό συντελεστών διαπερατότητας (Walter and Gutknecht, 1984), αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι είναι εξαιρετικά εύθραυστες. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι σταθερή απλή λιπιδική διπλοστιβάδα μπορεί να σχηματιστεί στους πόρους πολυκαρβονικού υλικού, όταν σε αυτό προστεθεί διάλυμα φωσφατιδυλοχολίνης-χοληστερόλης σε n-αλκάνιο (Thompson et al., 1982). Με βάση το γεγονός αυτό, αναπτύχθηκε στη συνέχεια η μέθοδος του κυττάρου διάχυσης. Τα κύτταρα διάχυσης αποτελούνται από δύο διαμερίσματα (δότης και δέκτης) που χωρίζονται μεταξύ τους με πορώδες υλικό,

μέσω του οποίου μεταφέρεται το φάρμακο. Όταν το πορώδες υλικό εμποτιστεί με διάλυμα λιπιδίων, σχηματίζονται στους πόρους του τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες. Έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλα κύτταρα διάχυσης, πορώδη υλικά και διαλύματα λιπιδίων για τη μελέτη της εντερικής διαπερατότητας φαρμάκων. Παραδείγματα είναι ο προσομοιωτής απορρόφησης Sartorius (μοντέλο SM 16750), όπου σε πορώδες υλικό νιτροκυτταρίνης προστίθεται μίγμα καπρυλικού οξέος και δωδεκανοϊκής αλκοόλης (Lassoued et al., 2011), το κύτταρο διάχυσης με πορώδες υλικό εστέρων κυτταρίνης εμποτισμένο με οκτανόλη (Camenisch et al., 1997) και το περιστρεφόμενο κύτταρο με πορώδες υλικό PVDF (polyvinylidene fluoride), στο οποίο έχει προστεθεί μίγμα DOPC (dioleoyl phosphatidylcholine) και στεατικού οξέος (Velický et al., 2010). Άλλο παράδειγμα όπου χρησιμοποιείται κύτταρο διάχυσης και τεχνητή λιπιδική μεμβράνη είναι η τεχνική PVPA (phospholipid vesicle-based permeation assay) (Flaten et al., 2006). Σε αυτή την τεχνική τοποθετείται υδατική διασπορά λιποσωμάτων σε πορώδες υλικό εστέρων κυτταρίνης, οπότε μετά από φυγοκεντρήσεις και κύκλους ψύξης-θέρμανσης σχηματίζεται λιπιδική μεμβράνη. Με την τεχνική αυτή η *in vivo* απορρόφηση φαρμάκων υπολογίζεται τόσο καλά όσο και με την τεχνική DS-PAMPA και τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων (Flaten et al., 2006). Επίσης, στην τεχνική PVPA μπορεί να χρησιμοποιηθεί FaSSIF (Fasted state simulating intestinal fluid) στο διαμέρισμα-δότης (Fischer et al., 2012), καθώς και συνδιαλύτες και επιφανειοδραστικά σε ευρεία περιοχή τιμών pH (Flaten et al., 2008). Πάντως, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική που χρησιμοποιεί τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες είναι η τεχνική PAMPA (Kansy et al., 1998).

PAMPA

Η τεχνική PAMPA (parallel artificial membrane permeation assay) είναι σήμερα μια δημοφιλής, υψηλής απόδοσης τεχνική διαλογής (high-throughput screening technique) μορίων ως προς την ικανότητά τους να μεταφέρονται παθητικά μέσω κυτταρικών μεμβρανών. Για την εφαρμογή της χρησιμοποιούνται πλάκες 96 φρεατίων (12 παράλληλες οκτάδες). Μία πλάκα αποτελείται από δύο διαμερίσματα, το κάτω και το πάνω, τα οποία όταν ενωθούν σχηματίζουν τα 96 φρεάτια. Το κάτω διαμέρισμα κάθε φρεατίου είναι το διαμέρισμα-δότης, ενώ το πάνω αποτελεί το διαμέρισμα-δέκτης. Η βάση του πάνω διαμερίσματος αποτελείται από PVDF

πορώδες υλικό (πάχος 125 μm , έκταση επιφάνειας 0,3 cm^2 , διάμετρος πόρων 0,45 μm). Με βάση την αρχική πρόταση για την τεχνική PAMPA, το πορώδες υλικό εμποτίζεται με διάλυμα φωσφατιδυλογολίνης σε n-δωδεκάνιο (10% w/v λεκιθίνη αυγού, Kansy et al., 1998) και στους πόρους του υλικού σχηματίζονται λιπιδικές διπλοστιβάδες μόλις τα λιπίδια έρθουν σε επαφή με το υδατικό μέσο μεταφοράς. Στο Σχήμα A.2 παρουσιάζεται φωτογραφία και το διάγραμμα της εμπορικά διαθέσιμης από την εταιρεία Pion (Pion Inc., MA, USA - www.pion-inc.com) πλάκας φρεατίων PAMPA. Η συσχέτιση των ροών φαρμάκων με το απορροφούμενο κλάσμα σε ανθρώπους ήταν ικανοποιητική για φάρμακα που μεταφέρονται ενδοκυττάρια με παθητική διάχυση, ενώ απέτυχε για υδρόφιλες ουσίες και για ουσίες που μεταφέρονται με μεσολάβηση φορέα (Kansy et al., 1998).



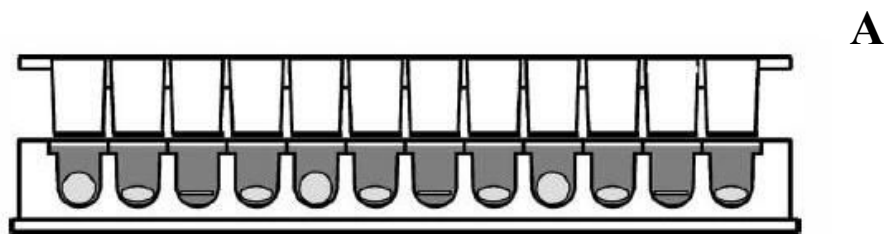
Σχήμα A.2: A) Φωτογραφία μιας πλάκας PAMPA της εταιρείας Pion με 96 φρεάτια. B) Σχηματική αναπαράσταση των φρεατίων PAMPA.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές της αρχικής τεχνικής PAMPA (egg-PAMPA, Kansy et al., 1998), που στόχο είχαν να βελτιώσουν ορισμένα χαρακτηριστικά. Το μοντέλο HDM-PAMPA (hexadecane membrane PAMPA) συνίσταται στη χρήση δεκαεξανίου αντί φωσφολιπιδίου για τον εμποτισμό λεπτού πολυκαρβονικού πορώδους υλικού πάχους 10 μm (Wohnsland and Faller, 2001). Αν και χρησιμεύει στον υπολογισμό συντελεστών μερισμού αλκανίου-νερού, δεν ενδείκνυται για τη μελέτη μεταφοράς λιγότερο λιπόφιλων ουσιών. Μια άλλη παραλλαγή συνίσταται στη χρήση υδρόφιλου πορώδους υλικού, η οποία μείωσε αρκετά τη χρονική διάρκεια των πειραμάτων μεταφοράς (≈ 2 h σε σχέση με ≈ 10 h με υδρόφοβο υλικό). Στην περίπτωση αυτή όμως υπάρχει δυσκολία στην τοποθέτηση του μίγματος λιπιδίων στο υλικό (Zhu et al., 2002). Πολλές προτάσεις έχουν γίνει σχετικά με τη σύσταση του διαλύματος λιπιδίων που εμποτίζει το υλικό, ώστε η τεχνητή λιπιδική μεμβράνη που σχηματίζεται να μοιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο στην κυτταρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Η σύσταση του μίγματος λιπιδίων είναι σημαντικός παράγοντας στη δοκιμασία PAMPA και επηρεάζει την τιμή του συντελεστή διαπερατότητας (Seo et al., 2006). Στο μοντέλο A-PAMPA (anionic PAMPA) το μίγμα αποτελείται από 3 λιπίδια: χοληστερόλη, μια φωσφοχολίνη και μια ανιονική φωσφοσερίνη. Η παρουσία του ανιονικού λιπιδίου διευκολύνει τη μεταφορά ασθενών βάσεων λόγω σχηματισμού ζεύγους ιόντων (Teksin et al., 2006). Άλλη πρόταση είναι το DOPC-PAMPA (dioleoylphosphatidylcholine PAMPA), όπου το λιπίδιο αποτελείται από 2% w/v διελαϊκή φωσφατιδυλοχολίνη σε δωδεκάνιο (Haque et al., 2004). Το διάλυμα που φαίνεται ότι προσομοιώνει καλύτερα τη μεμβράνη της ψηκτροειδούς παρυφής είναι 3% w/v μίγμα λιπιδίων σε 1,7-οκταδιένιο που περιέχει 33% w/w χοληστερόλη, 27% φωσφατιδυλοχολίνη, 27% φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, 7% φωσφατιδυλοσερίνη και 7% φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, παρουσία αρνητικού φορτίου (μοντέλο BM-PAMPA – biomimetic PAMPA) (Sugano et al., 2001).

Η παραλλαγή που συχνότερα χρησιμοποιείται σήμερα και είναι εμπορικά διαθέσιμη από την εταιρεία Pion είναι η DS-PAMPA (double sink PAMPA) (Ruell and Avdeef, 2004). Το μίγμα λιπιδίων που χρησιμοποιείται στην παραλλαγή DS-PAMPA (GIT-0 lipid) είναι 20% w/v εκχύλισμα λεκιθίνης σόγιας σε n-δωδεκάνιο και περιέχει αρνητικό φορτίο. Η μέθοδος ονομάζεται DS-PAMPA, επειδή επιτρέπει τη διατήρηση συνθηκών δεξαμενής κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταφοράς με δύο τρόπους. Ο πρώτος σχετίζεται με την υπόθεση του pH-μερισμού, σύμφωνα με την οποία μόνο

η μη ιονισμένη μορφή του φαρμάκου θα μεταφερθεί στο διαμέρισμα-δέκτης μέσω της μεμβράνης. Στη μέθοδο DS-PAMPA το pH του διαλύματος στο διαμέρισμα-δότης ρυθμίζεται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά ιονισμού του υπό μεταφορά μορίου (συνήθως σε τιμές μεταξύ 5,0 και 7,4), ενώ στο διαμέρισμα-δέκτης έχει την τιμή 7,4. Οι τιμές στο διαμέρισμα-δότης αντιστοιχούν σε τιμές που επικρατούν σε διάφορες περιοχές και συνθήκες χορήγησης στον εντερικό αυλό, ενώ η τιμή στο διαμέρισμα-δέκτης αντιστοιχεί στην τιμή του αίματος. Με τη χρήση των τιμών αυτών διευκολύνεται η μελέτη της μεταφοράς ουσιών με διαφορετικά pKa (ionization-maintained sink). Για παράδειγμα, ασθενή οξέα σε χαμηλό pH στο διαμέρισμα-δότης είναι μη ιονισμένα, ενώ όταν περάσουν στο διαμέρισμα-δέκτης με pH=7,4 ιονίζονται και παγιδεύονται. Ο δεύτερος τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνονται συνθήκες δεξαμενής στο διαμέρισμα-δέκτης είναι με τη χρήση ενός διαλύματος που παγιδεύει τη μεταφερόμενη ουσία λόγω διαλυτοποίησής της σε μικκύλια επιφανειοδραστικού συστατικού (acceptor sink buffer - ASB) που δεν διαπερνούν τη μεμβράνη. Έτσι, διατηρείται μηδενική η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στο διαμέρισμα-δέκτης και συνεχίζεται η παθητική διάχυση (binding-maintained sink). Υπερτερεί έναντι της αλβουμίνης, καθώς είναι πιο σταθερό, συνδέεται μη ειδικά με ουσίες και δεν προκαλεί ανάπτυξη βακτηρίων. Το ASB προστατεύεται από δίπλωμα ευρεσιτεχνίας, έχει pH 7,4 και ωσμωτικότητα 45 mOsm/kg. Το ASB είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για λιπόφιλες ουσίες, αφού μειώνει την κατακράτησή τους στη μεμβράνη. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς η κατακράτηση λιπόφιλων φαρμάκων στη μεμβράνη και στα πλαστικά τοιχώματα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στη μέθοδο PAMPA. Άλλη βελτίωση που έχει η μέθοδος DS-PAMPA είναι η παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα με τη μορφή δίσκου στο διαμέρισμα-δότης (Σχήμα A.3A). Τοποθέτηση της πλάκας φρεατίων στη συσκευή Gut-BoxTM (Σχήμα A.3B) επιτρέπει την ανάδευση των μαγνητών με ταχύτητες τέτοιες που να σχηματίζουν UWL πάχους από 25 ως 300 μm . Η UWL είναι δυνατό να αποτελέσει πρόβλημα, καθώς είναι το περιοριστικό βήμα για πολύ λιπόφιλες ουσίες και αυξάνει κατά πολύ το χρόνο μεταφοράς. Η χρήση μαγνητικών αναδευτήρων σε κάθε φρεάτιο μειώνει σημαντικά τη χρονική διάρκεια του πειράματος όταν επιτυγχάνονται UWL πάχους παρόμοιου με ό,τι πιστεύεται πως επικρατεί in vivo (Avdeef et al., 2004). Η μέθοδος DS-PAMPA συγκρινόμενη με τις μεθόδους HDM-PAMPA και DOPC-PAMPA βρέθηκε καλύτερη, αφού επιτρέπει συγκριτικά γρηγορότερη μεταφορά φαρμάκων (μεγαλύτεροι συντελεστές διαπερατότητας) (Avdeef and Tsinman, 2006).

Επίσης, η μέθοδος DS-PAMPA υπερτερεί έναντι της HDM-PAMPA, αφού με αυτή είναι εφικτή η μέτρηση του συντελεστή διαπερατότητας ουσιών χαμηλής διαπερατότητας. Η μέθοδος HDM-PAMPA όμως εμφανίζει για τις λιπόφιλες ουσίες μικρότερη κατακράτηση στη μεμβράνη έναντι της DS-PAMPA (Avdeef, 2005).



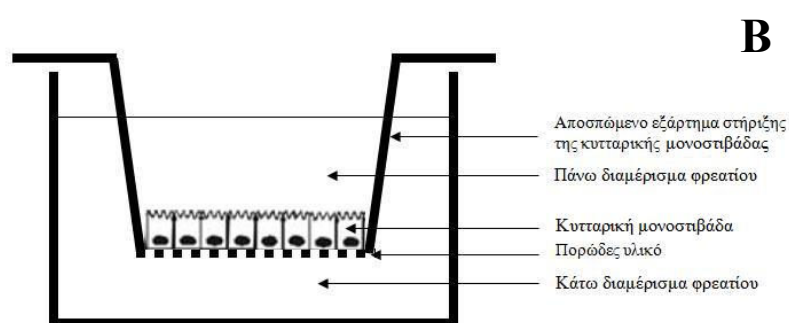
Σχήμα A.3: A) Διάγραμμα μιας πλάκας φρεατίων που χρησιμοποιείται στη μέθοδο DS-PAMPA (με βάση τους Avdeef et al., 2004). Φαίνονται στο διαμέρισμα-δότης του φρεατίου οι διαφορετικές φάσεις περιστροφής των μαγνητικών αναδευτήρων σχήματος δίσκου (περιστρέφονται σε επίπεδο κάθετο στο διάγραμμα). B) Φωτογραφία της συσκευής ανάδευσης Gut-Box™. Το κόκκινο κουμπί ξεκινά την ανάδευση, ενώ το μαύρο ρυθμίζει την ταχύτητα ανάδευσης, ώστε να επιτυγχάνεται το επιθυμητό πάχος μη αναδευόμενης υδάτινης στιβάδας (όρια: 25-300 μm). Αριστερά φαίνεται η πλάκα φρεατίων που έχει τοποθετηθεί για ανάδευση. Τα υγρά σφουγγάρια προκαλούν τον κορεσμό του θαλάμου ανάδευσης με υδρατμούς όταν κλείσει το καπάκι, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται εξάτμιση των διαλυμάτων από τα διαμερίσματα του φρεατίου κατά τη διάρκεια του πειράματος. Δεξιά, η συσκευή όπως φαίνεται όταν λειτουργεί, με κλειστό το καπάκι.

Η μέθοδος DS-PAMPA χρησιμοποιείται ευρέως για τη συγκριτική μέτρηση των φαινόμενων συντελεστών διαπερατότητας νέων ουσιών στα πρώτα στάδια ανακάλυψης (early discovery phase) σε διαδικασίες υψηλής απόδοσης και μπορεί να αυτοματοποιηθεί, ώστε να μελετάται η διαπερατότητα πολλών ουσιών που προκύπτουν από τη Συνδυαστική Χημεία σε σύντομο χρονικό διάστημα (ρομποτική συσκευή Tecan Freedom EVO®). Η εταιρεία Pion προτείνει γενικά για τις ουσίες υψηλής διαπερατότητας μέτρηση στα 30 min, ενώ για ουσίες χαμηλής διαπερατότητας προτείνει μεγαλύτερη διάρκεια πειράματος (4-16 h). Έχει αναπτύξει λογισμικό (PAMPA Explorer™) που συνδέεται με αναγνώστη υπεριώδους για τον άμεσο υπολογισμό συντελεστή διαπερατότητας. Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται από το λογισμικό για τον υπολογισμό αυτό έχουν δημοσιευθεί (Avdeef, 2003). Με τη χρήση προτύπων ουσιών είναι δυνατό να αναγνωριστεί στη συνέχεια με σύγκριση των τιμών των συντελεστών αν η υπό μελέτη ουσία είναι υψηλής ή χαμηλής διαπερατότητας. Γενικώς, η μέθοδος DS-PAMPA είναι σήμερα από τις πιο δημοφιλείς για ταχεία διαλογή ουσιών ως προς τη δυνατότητα ενδοκυττάριας παθητικής διάχυσης μέσω της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων της εντερικής βλεννογόνου. Σε προχωρημένο στάδιο της ανακάλυψης (late discovery phase) ή στο στάδιο της ανάπτυξης λαμβάνονται πιο ακριβείς πληροφορίες με τη χρήση κυτταρικών σειρών ή πειραμάτων ex vivo ή in situ (Kerns et al., 2004). Μειονεκτήματά της είναι ότι δεν χρησιμεύει για ουσίες που μεταφέρονται με μεσολάβηση φορέα ή παρακυττάρια και ότι για λιπόφιλες ουσίες παρατηρείται σημαντική προσρόφηση στο πολυμερές υλικό των τοιχωμάτων των φρεατίων. Για να μειώσει αυτό τον κίνδυνο, η εταιρεία Millipore διαθέτει πλάκες από PTFE (Teflon), όπου οι λιπόφιλες ουσίες δεν προσροφούνται σημαντικά (Millipore Cat. No. MSSA CCEP T0R).

A.2.2.2 Συνεχείς κυτταρικές σειρές

Η χρήση συνεχών κυτταρικών σειρών στη μελέτη της εντερικής διαπερατότητας των φαρμάκων έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα την τελευταία δεκαετία και είναι σήμερα μία από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές. Τα κύτταρα καλλιεργούνται ώστε να εμφανίσουν μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Έτσι, σχηματίζονται σφιχτές συνάψεις, εκφράζονται ένζυμα και φορείς και διακρίνεται η ψηκτροειδής παρυφή. Μόλις φτάσουν στην

κατάλληλη ηλικία, τα κύτταρα τοποθετούνται σε φρεάτια μεταφοράς, όπου αφήνονται να σχηματίσουν απλή στιβάδα. Τα φρεάτια είναι κατασκευασμένα από πολυμερές υλικό και αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, το πάνω (apical) και το κάτω (basolateral). Τα κύτταρα τοποθετούνται και η απλή στιβάδα δημιουργείται στη βάση του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου, που αποτελείται από πορώδες υλικό (Σχήμα A.4). Η υπό μελέτη ουσία διαλύεται σε κατάλληλο υγρό μέσο και τοποθετείται σε ένα διαμέρισμα του φρεατίου (είτε πάνω είτε κάτω). Στο άλλο διαμέρισμα τοποθετείται υδατικό μέσο χωρίς ουσία. Η ακεραιότητα της κυτταρικής μονοστιβάδας ελέγχεται (συνήθως με μέτρηση της διεπιθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης - transepithelial electrical resistance, TEER) πριν και μετά το πείραμα μεταφοράς.



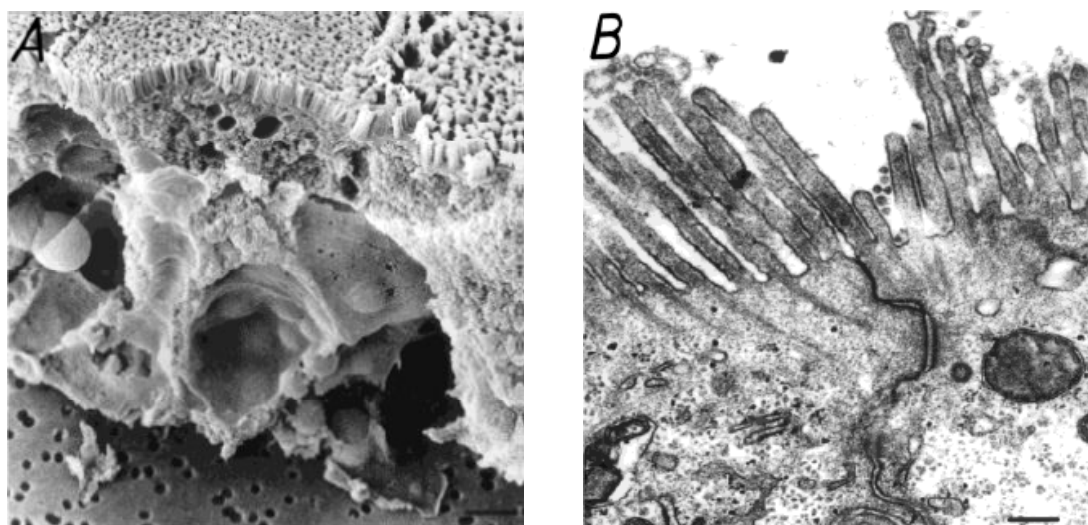
Σχήμα A.4: A) Φωτογραφία μιας εξάδας φρεατίων μεταφοράς της εταιρείας Costar που χρησιμοποιείται σε πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες (πλάκα Transwell®). Το πορώδες υλικό είναι πολυκαρβονικό. B) Διάγραμμα που περιγράφει τα μέρη ενός φρεατίου μεταφοράς.

Συνεχείς κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται σε πειράματα διαπερατότητας φαρμάκων είναι κυρίως η MDCK, η LLC-PK1, η 2/4/A1, και η δημοφιλέστερη όλων, η Caco-2. Η MDCK (Madin-Darby canine kidney) κυτταρική σειρά προέρχεται από επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα σκύλου. Το πλεονέκτημά της είναι ότι απαιτείται μικρός χρόνος καλλιέργειας μέχρι να τοποθετηθούν τα κύτταρα σε φρεάτια (3-5 ημέρες). Το κύριο μειονέκτημα είναι ότι δεν προέρχεται από άνθρωπο και ότι αποτελείται από νεφρικά κύτταρα. Επίσης, εμφανίζει χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και έχει περιορισμένη έκφραση φορέων μεταφοράς (Braun et al., 2000). Πάντως, τα MDCK κύτταρα μπορούν να επιμολυνθούν (transfected) με P-gr και έτσι να αποτελέσουν εργαλεία μελέτης της επίδρασης της P-gr στην εντερική διαπερατότητα φαρμάκων (Tang et al., 2002). Την ίδια ικανότητα επιμόλυνσης με P-gr έχουν και οι LLC-PK1 (Lewis lung carcinoma - porcine kidney 1) κυτταρικές σειρές, που προέρχονται από επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα χοίρου (Tairalensuu et al., 2004). Τα 2/4/A1 κύτταρα είναι επιθηλιακά εντερικά κύτταρα από έμβρυο αρουραίου και χρησιμοποιούνται κυρίως για τη μελέτη της παρακυττάριας μεταφοράς φαρμάκων (Tavelin et al., 2003a). Το πάχος των σφιχτών συνάψεων που σχηματίζουν είναι $0,9 \pm 0,2$ nm, παρόμοιο με αυτό των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Στο σημείο αυτό πλεονεκτούν έναντι των Caco-2, όπου η παρακυττάρια μεταφορά υποεκτιμάται. Από την άλλη όμως, δεν εκφράζουν φορείς όπως Pgp1 και P-gr (Tavelin et al., 2003b).

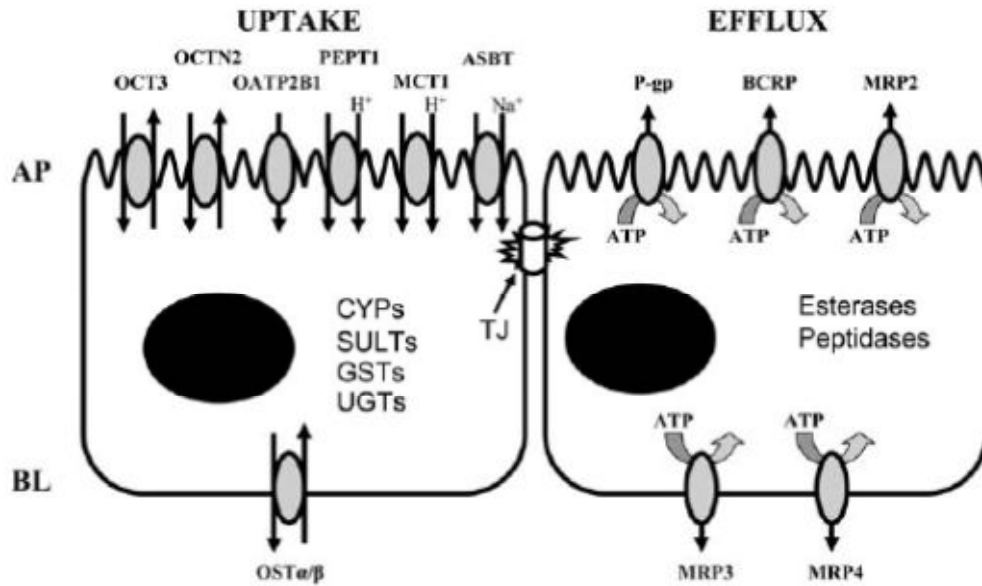
Caco-2 κυτταρικές σειρές

Οι Caco-2 κυτταρικές σειρές προτάθηκαν για χρήση σε πειράματα εντερικής διαπερατότητας φαρμάκων για πρώτη φορά το 1989 (Hidalgo et al., 1989) και σήμερα αποτελούν την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη in vitro τεχνική. Προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου ανθρώπου και διαφοροποιούνται πλήρως μετά από περίπου 20 ημέρες καλλιέργειας. Μεταξύ των κυττάρων σχηματίζονται σφιχτές συνάψεις, διακρίνεται η ψηκτροειδής παρυφή (Σχήμα A.5) και εκφράζονται πεπτιδάσες, εστεράσες, ένζυμα βιομετατροπής Φάσης I (CYP) και ένζυμα βιομετατροπής Φάσης II [όπως οι γλουταθειόνη S-τρανσφεράσες (GSTs), οι σουλφοτρανσφεράσες (SULTs) και οι ουριδινοδιφωσφορογλυκουρονυλοτρανσφεράσες (UGTs)], φορείς για τη μεταφορά πεπτιδίων (Pgp1, HPT1), χολικών αλάτων (ASBT/IBAT), οργανικών ανιόντων (OATPB) και οργανικών κατιόντων (OCTN2), καθώς και φορείς εκροής (BCRP, MRPs και P-gr)

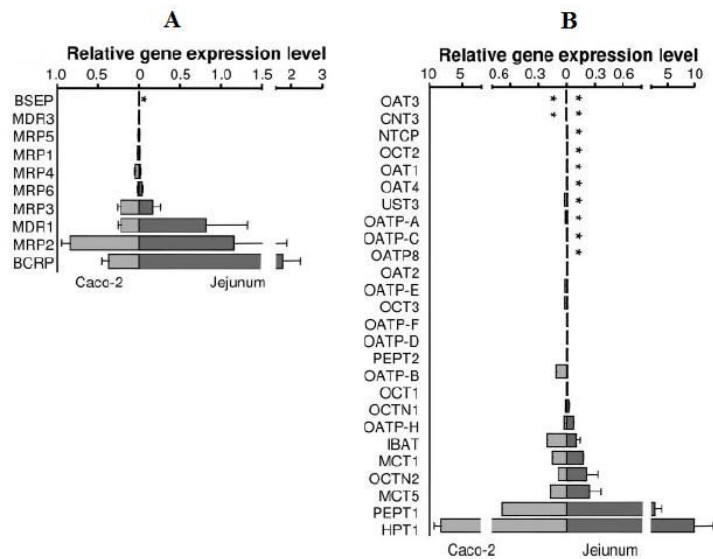
(Σχήμα A.6). Γενικώς, υπάρχει καλή συσχέτιση στην έκφραση φορέων μεταφοράς μεταξύ της ανθρώπινης νήστιδας και Caco-2 κυττάρων (Hilgendorf et al., 2007) (Σχήμα A.7) και οι συντελεστές διαπερατότητας που προκύπτουν με χρήση Caco-2 κυτταρικών σειρών συσχετίζονται ικανοποιητικά με το ποσοστό της δόσης που απορροφάται στους ανθρώπους, δίνοντας σιγμοειδείς απεικονίσεις (Artursson et al., 2001). Η καλύτερη πρόβλεψη προκύπτει στην περίπτωση των φαρμάκων που απορροφώνται με ενδοκυττάρια παθητική μεταφορά (Lennernäs et al., 1996).



Σχήμα A.5: A) Φωτογραφία SEM (scanning electron microscopy) απλής στιβάδας Caco-2/TC7 κυτταρικής σειράς σε εγκάρσια τομή. Φαίνεται η ψηκτροειδής παρυφή στην κορυφή και οι πόροι του πολυκαρβονικού υλικού στήριξης στη βάση. Η μαύρη γραμμή κάτω δεξιά αντιστοιχεί σε μήκος 1,9 mm (Pontier et al., 2001). B) Φωτογραφία TEM (transmission electron microscopy) απλής στιβάδας Caco-2/TC7 κυτταρικής σειράς. Φαίνονται οι μικρολάχνες και η σφιχτή σύναψη μεταξύ δύο κυττάρων. Η μαύρη γραμμή κάτω δεξιά αντιστοιχεί σε μήκος 0,4 mm (Pontier et al., 2001). Η TC7 κυτταρική σειρά είναι υποκλώνος της Caco-2 με διαφορετική έκφραση ενζύμων.



Σχήμα A.6: Τα ένζυμα και οι κυριότεροι φορείς πρόσληψης (uptake) και εκροής (efflux) που εκφράζονται στα Caco-2 κύτταρα (Proctor et al., 2010).



Σχήμα A.7: Έκφραση ABC (A) και SLC (B) φορέων στα Caco-2 κύτταρα και στην ανθρώπινη νήστιδα. Αστερίσκος σημαίνει απουσία έκφρασης (Hilgendorf et al., 2007).

Υπάρχουν όμως και σημαντικά μειονεκτήματα στη χρήση Caco-2 κυτταρικών σειρών. Το κυριότερο είναι η υψηλή διεργαστηριακή μεταβλητότητα που οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και πραγματοποίησης των πειραμάτων (Hayeshi et al., 2008 και Volpe, 2008), όπως για παράδειγμα στην ηλικία των κυττάρων (Walter and Kissel, 1994 και Briske-Anderson et al., 1997), στην

πυκνότητά τους στο πορώδες υλικό, στην ταχύτητα ανακίνησης των φρεατίων κατά τη διάρκεια του πειράματος μεταφοράς (Adson et al., 1995), στη μέθοδο υπολογισμού του συντελεστή διαπερατότητας και στη σύσταση των μέσων καλλιέργειας και μεταφοράς. Για να είναι εφικτή η σύγκριση δεδομένων από διαφορετικά πειραματικά πρωτόκολλα, μελετώνται σε κάθε εργαστήριο παράλληλα και πρότυπες ουσίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά διαπερατότητας (χαμηλής, υψηλής και μηδενικής διαπερατότητας, που μεταφέρονται παθητικά ή με μεσολάβηση φορέα), ως ουσίες αναφοράς (FDA, 2000). Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα είναι η διαφορετική έκφραση συγκεκριμένων ενζύμων σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Ενώ τα κύρια CYP ισοένζυμα στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου είναι τα CYP3A4 και CYP3A5, αυτά είτε δεν εκφράζονται (CYP3A4) είτε εκφράζονται σε χαμηλό ποσοστό (CYP3A5) στα Caco-2 κύτταρα (Engman et al., 2001). Αύξηση της έκφρασης CYP3A4 μπορεί να γίνει με χρήση επαγωγέων (π.χ. 1α,25-διυδροξυ βιταμίνη D3), ενώ η κυτταρική σειρά TC7, που είναι υποκλώνος της Caco-2, εκφράζει σε μεγαλύτερο ποσοστό CYP3A5 (Engman et al., 2001). Επίσης, τα κύτταρα της νήστιδας εκφράζουν περισσότερο το φορέα εκροής BCRP σε σχέση με τον MRP2, αλλά στα Caco-2 κύτταρα ο φορέας BCRP εκφράζεται 1000 φορές λιγότερο (Tairalensuu et al., 2001). Χαμηλή έκφραση σε σχέση με τη νήστιδα έχει ο φορέας PEPT1, ενώ αυξημένη ο φορέας OATP-B (Englund et al., 2006). Το αποτέλεσμα είναι ότι η ικανότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς για ουσίες που μεταφέρονται με μεσολάβηση φορέα δεν είναι πάντα επιτυχής από ποσοτική άποψη.

Άλλο μειονέκτημα στη χρήση Caco-2 κυτταρικών σειρών είναι ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται μέχρι τα κύτταρα να διαφοροποιηθούν πλήρως και να είναι έτοιμα προς χρήση σε πειράματα διαπερατότητας, γεγονός που συνεπάγεται δυσκολία χρήσης τους σε τεχνικές διαλογής υψηλής απόδοσης. Έχουν γίνει προσπάθειες μείωσης του χρόνου μέχρι και στις 3 ημέρες (Chong et al., 1997 και Liang et al., 2000), αλλά μέχρι σήμερα η διάρκεια των 20 ημερών είναι ο κανόνας. Αυξημένο είναι και το κόστος σε σχέση με μεθόδους ταχείας διαλογής. Συγκριτικά με τη μέθοδο PAMPA, το κόστος των πειραμάτων διαπερατότητας με Caco-2 κυτταρικές σειρές υπολογίζεται από 15-20 (Kerns et al., 2004) έως και 50 φορές μεγαλύτερο (Avdeef, 2005). Επίσης, μειονέκτημα είναι η απουσία εκκριτικών κυττάρων που παράγουν βλέννα, σε αντίθεση με τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Οι συγκαλλιέργειες με HT29-MTX και HT29-H κυτταρικές σειρές (κλώνοι των HT29 κυτταρικών σειρών

που παράγουν βλέννα) μπορούν να αντιμετωπίσουν αυτό το πρόβλημα, αν και στις συγκαλλιέργειες αυτές υπάρχει χαμηλότερη έκφραση φορέων (Hilgendorf et al., 2000). Επιπλέον, σε αντίθεση με τα κύτταρα Ussing και τη διαπότιση τμήματος εντέρου αρουραίου, με τις Caco-2 κυτταρικές σειρές δεν είναι δυνατό να μελετηθούν οι διαφορές στη διαπερατότητα μεταξύ διαφορετικών περιοχών του λεπτού εντέρου. Ακόμα, όπως και στη μέθοδο PAMPA, εμπόδιο στη μεταφορά μέσω της μονοστιβάδας Caco-2 κυττάρων μπορεί να αποτελέσει η UWL, ιδίως για πολύ λιπόφιλα φάρμακα. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με ανακίνηση των φρεατίων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων μεταφοράς. Πρόβλημα αποτελεί και η πιθανότητα προσρόφησης λιπόφιλων ουσιών στα πλαστικά μέρη του φρεατίου, οπότε υπολογίζεται λανθασμένη τιμή για το συντελεστή διαπερατότητας. Η προσρόφηση αυτή είναι δυνατό να μειωθεί με τη χρήση αλβουμίνης, ή TPGS (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate) στο διαμέρισμα-δέκτης (Ingels and Augustijns, 2003). Τέλος, οι Caco-2 κυτταρικές σειρές υποεκτιμούν την παρακυττάρια μεταφορά, καθώς το πάχος των σφιχτών συνάψεών τους ($0,37 \pm 0,01$ nm, Tavelin et al., 2003a) είναι μικρότερο από των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου.

Η κυριότερη εφαρμογή των Caco-2 κυτταρικών σειρών είναι στη μελέτη της εντερικής διαπερατότητας μορίων στα τελευταία στάδια ανακάλυψης και στα πρώτα στάδια ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Συχνά ακολουθεί τη μέτρηση της διαπερατότητας με τη μέθοδο PAMPA, συμβάλλοντας στην εκτίμηση των χαρακτηριστικών διαπερατότητας με μεγαλύτερη ακρίβεια (Kerns et al., 2004). Λόγω της πληθώρας φορέων και ενζύμων που εκφράζουν, οι Caco-2 κυτταρικές χρησιμεύουν κυρίως στη μελέτη του μηχανισμού μεταφοράς ενός υπό ανάπτυξη φαρμάκου. Ο μηχανισμός διερευνάται με ταυτόχρονη μεταφορά με φάρμακα που είναι είτε γνωστά υποστρώματα σε ένζυμα και φορείς (π.χ. διγοξίνη για την P-gp, δοξορουβικίνη για την BCRP, μιδαζολάμη για το CYP3A4) είτε γνωστοί αναστολείς (π.χ. βεραπαμίλη για την P-gp, κυκλοσπορίνη για το φορέα εκροής MRP2, προβενεσίδη για το φορέα μεταφοράς OATP-B, κετοκοναζόλη για το ένζυμο CYP3A4) (FDA, 2006). Η μεσολάβηση φορέων κατά τη μεταφορά εντοπίζεται και από τη διαφορά στους συντελεστές διαπερατότητας, όταν γίνει διπλό πείραμα, τοποθετώντας αρχικά το φάρμακο στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου (πρώτο πείραμα) και στη συνέχεια στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου (δεύτερο πείραμα). Επίσης, οι Caco-2 κυτταρικές σειρές αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση αλληλεπιδράσεων στη διαδικασία μεταφοράς μέσω του επιθηλίου. Η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων

αποδεικνύεται με την αλλαγή στο συντελεστή διαπερατότητας ενός φαρμάκου παρουσία άλλου φαρμάκου (π.χ. ιντιναβίρη παρουσία ριτοναβίρης, Profit et al., 1999), με την παρουσία θρεπτικών συστατικών (π.χ. σακιναβίρη παρουσία χυμού grapefruit, Eagling et al., 1999) ή με την παρουσία ουσιών που χρησιμοποιούνται ως έκδοχα (π.χ. επίδραση TPGS και Poloxamer 188 στη διαπερατότητα ταλινολόλης, Bogman et al., 2005). Άλλη εφαρμογή των Caco-2 κυτταρικών σειρών είναι στην αξιολόγηση μεθόδων αύξησης της διαπερατότητας. Με πειράματα μεταφοράς μέσω Caco-2 κυτταρικών σειρών έχει αποδειχτεί η θετική επίδραση εκδόχων (π.χ. Tween 80, Rege et al., 2001) και προφαρμάκων (Annaert et al., 2000) στη διαπερατότητα. Επίσης, με μέτρηση της TEER, με εφαρμογή της δοκιμασίας MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983) ή με μέτρηση της απελευθέρωσης γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH - lactate dehydrogenase) ελέγχεται η κυτταροτοξικότητα ουσιών που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης, συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (π.χ. μικροσωματιδίων διοξειδίου του πυριτίου MCM-41 και SBA-15) (Heikkilä et al., 2010) και εκδόχων (Shah et al., 2004). Οι Caco-2 κυτταρικές σειρές έχουν βρει εφαρμογή σε συστήματα διάλυσης/διαπερατότητας, όπου οι δύο αυτές κρίσιμες για την απορρόφηση διαδικασίες μελετώνται ταυτόχρονα (Ginski and Polli, 1999 και Kataoka et al., 2003). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι μελέτες μεταφοράς μέσω Caco-2 κυτταρικών σειρών είναι αποδεκτές για την κατηγοριοποίηση μιας ένωσης με βάση το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης των φαρμάκων (BCS - biopharmaceutics classification system) (FDA, 2000 και EMA, 2010).

Υγρά μέσα που χρησιμοποιούνται σε πειράματα μεταφοράς με Caco-2 κυτταρικές σειρές

Στα πειράματα μεταφοράς μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων χρησιμοποιούνται συνήθως απλά υδατικά διαλύματα αλάτων με pH 7,4, κυρίως του τύπου Hank's balanced salt solution (HBSS) (Ingels and Augustijns, 2003). Η χρήση όμως τέτοιων διαλυμάτων έχει το μειονέκτημα ότι το pH και η σύσταση αυτών των μέσων δεν αντιστοιχεί στις συνθήκες που επικρατούν στον εντερικό αυλό. Επίσης, η χρήση τους σε πειράματα διαπερατότητας με λιπόφιλες ουσίες είναι προβληματική, καθώς οι ουσίες αυτές έχουν χαμηλή διαλυτότητα στα υδατικά μέσα και επιπρόσθετα υπάρχει αυξημένη πιθανότητα προσρόφησης στα τοιχώματα του φρεατίου. Το

πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς οι σύγχρονες, υψηλής απόδοσης τεχνικές διαλογής φαρμακολογικά δραστικών μορίων και η Συνδυαστική Χημεία οδηγούν στη σύνθεση όλο και περισσότερων λιπόφιλων ουσιών (Lipinski, 2000).

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για βελτίωση της σύστασης του μέσου μεταφοράς, ώστε να προσομοιώνει καλύτερα τις ενδοαυλικές συνθήκες (Ingels and Augustijns, 2003). Σχετικά με το pH, βρέθηκε ότι, όταν αυτό ρυθμίζεται στην τιμή 6 στο διαμέρισμα-δότης, προκύπτει καλύτερη συσχέτιση με το απορροφούμενο κλάσμα σε σχέση με pH=7,4 (Yamashita et al., 2000). Όσο για τη σύσταση, έχουν γίνει δοκιμές με μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των ενδοαυλικών περιεχομένων κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά την περίοδο της πέψης και χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες διάλυσης των φαρμάκων, δηλαδή με FaSSIF (fasted state simulating intestinal fluid) και FeSSIF (fed state simulating intestinal fluid) (Dressman and Reppas, 2000).

Πρώτοι οι Ingels et al. (2002) διερεύνησαν τη δυνατότητα χρήσης των FaSSIF και FeSSIF σε πειράματα διαπερατότητας με Caco-2 κυτταρικές σειρές. Αρχικά, εξέτασαν την τοξικότητά τους πάνω στα κύτταρα με μέτρηση της TEER. Το FaSSIF έγινε καλά ανεκτό για τουλάχιστον 2 h, αφού η TEER μειώθηκε μόνο 10-20% σε αυτό το διάστημα, ενώ αντίθετα το FeSSIF ήταν τοξικό και μηδένισε την TEER σε 15 min. Τη συμβατότητα του FaSSIF και την ακαταλληλότητα του FeSSIF έδειξε και η μελέτη της τοξικότητας με τη μέθοδο MTT. Επίσης, ιστολογική εξέταση έδειξε τη σημαντική αλλαγή στη μορφολογία των κυττάρων όταν χρησιμοποιήθηκε FeSSIF, σε αντίθεση με το FaSSIF, όπου τα κύτταρα έχουν την ίδια εικόνα με αυτή μετά από χρήση HBSS. Για να βρεθεί ποιο συγκεκριμένο συστατικό των υγρών είναι το πιο τοξικό, εφαρμόστηκαν σε κυτταρικές μονοστιβάδες παραλλαγές του FaSSIF με αυξημένη συγκέντρωση λεκιθίνης, με αυξημένη συγκέντρωση ταυροχολικού νατρίου (NaTC), χωρίς λεκιθίνη και χωρίς NaTC. Η απουσία λεκιθίνης και η παρουσία μεγάλης ποσότητας NaTC μηδένιζαν γρήγορα την αντίσταση, ενώ τα FaSSIF με υψηλή συγκέντρωση λεκιθίνης και χωρίς NaTC γίνονταν ανεκτά. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπερατότητας με HBBS και FaSSIF τριών ουσιών, οι οποίες μεταφέρονται με διαφορετικούς τρόπους (με παθητική διάχυση, με τη μεσολάβηση φορέα, με ή χωρίς την ταυτόχρονη δράση φορέα εκροής). Οι τιμές P_{app} (Κεφ. Α.5) που υπολογίστηκαν για τις υδρόφιλες ουσίες θεοφυλλίνη (μεταφέρεται παθητικά) και τη φαινυλαλανίνη (μεταφέρεται με μεσολάβηση φορέα) ήταν παρόμοιες είτε χρησιμοποιούνταν κλασικό HBBS μέσο είτε FaSSIF, ενώ για την

κυκλοσπορίνη A που υπόκειται σε εκροή διαπιστώθηκε με τη χρήση FaSSIF αναστολή του φορέα εκροής P-gr. Δοκιμές με μόνο λεκιθίνη ή μόνο NaTC έδειξαν ότι το χολικό άλας είναι αυτό που προκαλεί την αναστολή του φορέα P-gr.

Αργότερα (2004), οι Ingels et al. πραγματοποίησαν πειράματα μεταφοράς με HBBS και FaSSIF για 19 ουσίες διαφορετικών βαθμών λιποφιλίας και μηχανισμών μεταφοράς. Όταν χρησιμοποιήθηκε FaSSIF, ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας ουσιών που μεταφέρονται παθητικά βρέθηκε ίδιος ή μικρότερος σε σχέση με το HBBS. Σε γενικές γραμμές, ο συντελεστής διαπερατότητας μειώθηκε στις λιπόφιλες ουσίες, ενώ ήταν παρόμοιος για τις υδρόφιλες. Οι μικρότερες τιμές μπορούν να εξηγηθούν με βάση το γεγονός ότι οι λιπόφιλες ουσίες εγκλωβίζονται στα μικτά μικκύλια χολικών αλάτων-λεκιθίνης. Όμως για τη δαναζόλη, επειδή η διαλυτότητά της σε FaSSIF είναι σημαντικά αυξημένη, παρόλο που η τιμή P_{app} ήταν μικρότερη (περίπου 20 φορές), τελικά μεταφέρθηκε μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας στη διάρκεια του πειράματος. Όσον αφορά στην ανάκτηση των ουσιών μετά το τέλος του πειράματος, όταν χρησιμοποιήθηκε HBBS διάλυμα, ήταν υψηλή για υδρόφιλες ουσίες, αλλά μόλις 50% για λιπόφιλες. Το ποσοστό που χανόταν είτε είχε εγκλωβιστεί στα κύτταρα είτε είχε προσροφηθεί στα πλαστικά μέρη του φρεατίου. Η χρήση FaSSIF έδωσε ανακτήσεις κοντά στο 90% για όλες τις ουσίες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι ουσίες εγκλωβίζονται στα μικτά μικκύλια σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα κύτταρα ή στις επιφάνειες.

Σε μια άλλη μελέτη για την ικανότητα του FaSSIF να προσομοιώνει την *in vivo* κατάσταση, οι Brouwers et al. (2006) συνέκριναν το συντελεστή διαπερατότητας της αμπρεναβίρης από εντερικό υγρό και FaSSIF. Η αμπρεναβίρη είναι λιπόφιλη ουσία και υπόκειται κατά τη μεταφορά της σε εκροή από την P-gr. Αρχικά, αναρροφήθηκε εντερικό υγρό από το λεπτό έντερο νηστικών εθελοντών και αραιώθηκε 1:2 με απλό υδατικό μέσο μεταφοράς. Η αραιώση ήταν απαραίτητη, επειδή αναραίωτο εντερικό υγρό καταστρέφει την ακεραιότητα της κυτταρικής μονοστιβάδας. Αφού διαλύθηκε αμπρεναβίρη στο αραιωμένο εντερικό υγρό, πραγματοποιήθηκε πείραμα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυτταρικής μονοστιβάδας. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ως μέσο μεταφοράς FaSSIF, αραιωμένο και αυτό 1:2 με απλό υδατικό μέσο μεταφοράς, ώστε να υπάρχει άμεση σύγκριση. Οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας για το εντερικό υγρό και το FaSSIF βρέθηκαν ίδιοι μεταξύ τους (αν και η σύστασή τους σε χολικά άλατα και φωσφατιδυλοχολίνη δεν ήταν ίδια) και μεγαλύτεροι από το συντελεστή που προέκυψε από πείραμα με απλό

υδατικό μέσο μεταφοράς. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στην αναστολή της P-gr, αν και όπως έδειξαν πειράματα με χρήση ταυτόχρονα με εντερικό υγρό και FaSSIF του αναστολέα της P-gr βεραπαμίλης, η αναστολή δεν ήταν πλήρης. Πάντως, από τη μελέτη αυτή προκύπτει η ικανότητα του FaSSIF να προσομοιώνει το εντερικό υγρό νηστικών εθελοντών σε πειράματα διαπερατότητας.

Τη χρησιμότητα του FaSSIF ως μέσου μεταφοράς μελέτησαν και οι Fossati et al. (2008), με τη διαφορά ότι εκτός από FaSSIF στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου, χρησιμοποίησαν ταυτόχρονα και διάλυμα αλβουμίνης στο κάτω, επειδή αυτή επιδρά θετικά στη διαλυτότητα και την ανάκτηση λιπόφιλων ουσιών. Έγιναν πειράματα μεταφοράς με 10 λιπόφιλες ουσίες με χρήση είτε HBBS είτε FaSSIF στο πάνω διαμέρισμα και αλβουμίνης 1% στο κάτω. Για εννέα από τις δέκα ουσίες η ανάκτηση ήταν πάνω από 50% με FaSSIF και αλβουμίνη, ενώ με χρήση HBBS μόνο για δύο ήταν σημαντική (>20%). Σύγκριση των τιμών P_{app} για αυτές τις δύο ενώσεις έδειξε ότι οι συντελεστές διαπερατότητας ήταν μικρότεροι όταν χρησιμοποιήθηκε FaSSIF και αλβουμίνη 1%. Για να αποδειχθεί περαιτέρω η χρησιμότητα του συνδυασμού αυτού, έγιναν πειράματα με 35 ενώσεις, διαφόρων βαθμών λιποφιλίας και μηχανισμών μεταφοράς. Σε γενικές γραμμές, οι τιμές P_{app} με χρήση FaSSIF και αλβουμίνης βρέθηκαν για τις λιπόφιλες ουσίες μικρότερες από ότι με HBBS και για τις υδρόφιλες παρόμοιες, όπως είχαν βρει και οι Ingels et al., 2004.

Οι Patel et al. (2006) παρασκεύασαν παραλλαγές των FaSSIF και FeSSIF για χρήση σε πειράματα μεταφοράς και έλεγξαν τη συμβατότητά τους με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Έγιναν τρεις βελτιώσεις στη σύσταση των κλασικών προσομοιωμένων εντερικών υγρών: αντικαταστάθηκαν τα απλά ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύματα τύπου HBBS, το pH και η ωσμωτικότητα για το FeSSIF ρυθμίστηκαν σε τιμές που είναι καλύτερα ανεκτές από τα κύτταρα (pH 6 αντί 5 και ωσμωτικότητα 336 mOsm/kg αντί 635 mOsm/kg) και άλλαξε στο νέο FeSSIF ο λόγος χολικών αλάτων : λεκιθίνη από 4:1 σε 2:1. Όταν εφαρμόστηκαν τα τροποποιημένα FaSSIF και FeSSIF μεταφοράς στις κυτταρικές μονοστιβάδες, η μέτρηση της TEER και η απελευθέρωση της LDH έδειξαν ότι τα νέα μέσα μεταφοράς γίνονταν ανεκτά για διάστημα 4 ωρών. Επίσης, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φάνηκε ότι οι μικρολάχνες των κυττάρων και οι σφιχτές συνάψεις διατηρούνταν. Η διατήρηση των σφιχτών συνάψεων αποδείχτηκε και από τη διαπερατότητα της μαννιτόλης, η οποία ήταν ίδια είτε με HBBS μέσο είτε με τα νέα FaSSIF και FeSSIF. Πείραμα μεταφοράς με μετοπρολόλη έδειξε ότι ο P_{app} ήταν μικρότερος με το νέο FaSSIF σε σχέση με HBBS και ακόμα μικρότερος με το

νέο FeSSIF. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στον εγκλωβισμό της ουσίας στα μικτά μικκύλια χολικών αλάτων-λεκιθίνης, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα των Ingels et al. (2004).

Πιο πρόσφατα (2007), οι Lind et al. προχώρησαν στην παρασκευή προσομοιωμένου εντερικού υγρού για πειράματα μεταφοράς χωρίς όμως να βασιστούν στα FaSSIF και FeSSIF. Τα βασικά συστατικά του ήταν NaTC και φωσφατιδυλοχολίνη (PC) ή λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη (lyso-PC) σε λόγο 4:1. Η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη χρησιμοποιήθηκε, καθώς είναι το κύριο φωσφολιπίδιο στο εντερικό υγρό. Επίσης, δοκιμάστηκε και η προσθήκη προϊόντων λιπόλυσης, όπως ελαϊκού οξέος (OA) και μονοελαϊκού γλυκερινεστέρα (GMO), τα οποία είναι επίσης παρόντα στο λεπτό έντερο. Τα συστατικά αυτά δεν ενσωματώθηκαν σε HBSS διάλυμα, αλλά σε θρεπτικό μέσο Leibovitz-15 (L-15), το οποίο δρα υπέρ της ζωτικότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Το pH ρυθμίστηκε στο 6 και η ωσμωτικότητα μεταξύ 324 και 380 mOsm/kg (τιμή ενδιάμεση των πραγματικών που έχουν αναφερθεί για διαπεπτική περίοδο και περίοδο πέψης). Από 24 συνδυασμούς συστατικών που δοκιμάστηκαν οι πιο συμβατοί με τις κυτταρικές μονοστιβάδες ήταν αυτοί που περιείχαν 5 mM NaTC, 1,25 mM lyso-PC σε L-15 με ή χωρίς 0,5 mM OA και 0,25 mM GMO. Η ακεραιότητα και η ζωτικότητα των κυττάρων ελέγχθηκαν με μέτρηση της TEER, της απελευθέρωσης LDH και του κυτταρικού περιεχομένου σε πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα προσομοιωμένα αυτά εντερικά περιεχόμενα δοκιμάστηκαν ως μέσα μεταφοράς σε πειράματα διαπερατότητας και έγινε σύγκριση με τη διαπερατότητα, όταν χρησιμοποιείται απλό διάλυμα L-15. Τα μόρια που εξετάστηκαν ήταν ένα λιπόφιλο (οιστραδιόλη) και ένα που υφίσταται εκροή (ετοποσίδη). Στο πείραμα με την οιστραδιόλη το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου περιείχε L-15 με pH=7,4 και 1% αλβουμίνη, ενώ με τον ετοποσίδη δεν χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη. Η ροή της οιστραδιόλης μειώθηκε κατά 1,5 φορά όταν χρησιμοποιήθηκε το προσομοιωμένο μέσο σε σχέση με το απλό L-15. Η παρουσία OA και GMO δεν άλλαξε την εικόνα ως προς τη διαπερατότητα, παρόλο που αλλάζει ελαφρώς τη μορφή των μικκυλίων. Επίσης, η χρήση του νέου μέσου αύξησε την ανάκτηση της ουσίας, καθώς και τη διαλυτότητά της. Όσο για τον ετοποσίδη, η χρήση του νέου μέσου αύξησε τη μεταφορά από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα 2-3 φορές, αναστέλλοντας την εκροή. Και πάλι, η προσθήκη των προϊόντων λιπόλυσης OA και GMO δεν άλλαξε την εικόνα σημαντικά. Το μειονέκτημα του προσομοιωμένου εντερικού υγρού που αναπτύχθηκε είναι ότι, σε αντίθεση με τα FaSSIF και FeSSIF, δεν αντιστοιχεί στη

διαπεπτική περίοδο και στην περίοδο πέψης, αλλά προσομοιώνει μια ενδιάμεση κατάσταση.

Συνοψίζοντας τις παραπάνω πληροφορίες, φαίνεται ότι το FaSSIF μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει, σε αντίθεση με το FeSSIF που είναι τοξικό για τα κύτταρα. Οι Patel et al. άλλαξαν ελαφρώς τη σύσταση, ώστε το τροποποιημένο FeSSIF να είναι ανεκτό για περισσότερο χρόνο. Με μία παραπλήσια προσέγγιση, οι Lind et al. ανέπτυξαν προσομοιωμένο εντερικό υγρό, χωρίς όμως να βασιστούν στα FaSSIF και FeSSIF. Η αναλυτική σύσταση των FaSSIF, FeSSIF, των τροποποιημένων προσομοιωμένων περιεχομένων των Patel et al. και το προσομοιωμένο εντερικό υγρό των Lind et al. παρουσιάζεται στον Πίνακα Α.1. Σε σχέση με τα απλά υδατικά μέσα μεταφοράς, τα προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα οδηγούν σε μικρότερους συντελεστές διαπερατότητας λιπόφιλων φαρμάκων που μεταφέρονται παθητικά. Επιπρόσθετα, με τη χρήση προσομοιωμένων εντερικών υγρών σε πειράματα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων επιτυγχάνεται καλύτερη ανάκτηση και αυξημένη διαλυτότητα λιπόφιλων ουσιών. Τέλος, τα προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα είναι ιδανικά για χρήση σε συστήματα διάλυσης/διαπερατότητας, όπου μπορεί να μελετηθεί με αυτά η επίδραση της τροφής στην απορρόφηση των φαρμάκων (Buch et al., 2009 και Kataoka et al., 2006).

Πίνακας Α.1: Σύσταση, pH και ωσμωτικότητα των FaSSIF και FeSSIF (Dressman and Reppas, 2000) και των προσομοιωμένων εντερικών υγρών που αναπτύχθηκαν για πειράματα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων από τους Patel et al. (2006) (FaSSIF_{Patel} και FeSSIF_{Patel}) και Lind et al. (2007) (SIF_{Lind})

	FaSSIF	FeSSIF	FaSSIF_{Patel}	FeSSIF_{Patel}	SIF_{Lind}
Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (mM)	22,39	-	0,34	0,34	1,34
Μονόξινο φωσφορικό κάλιο (mM)	-	-	0,44	0,44	0,44
Οξικό οξύ (mM)	-	144	-	-	
Χλωριούχο κάλιο (mM)	-	-	1,67	1,67	1,26
Θεικό μαγνήσιο (mM)	-	-	0,81	0,81	0,81
Χλωριούχο μαγνήσιο (mM)	-	-	-	-	0,99
Χλωριούχο κάλιο (mM)	-	-	5,37	5,37	5,33
Όξινο ανθρακικό νάτριο (mM)	-	-	0,42	0,42	-
Χλωριούχο νάτριο (mM)	103,29	203,89	136,89	136,89	138
Πυρροβικό νάτριο (mM)	-	-	-	-	5,00
Αμινοξέα	-	-	-	-	+
Βιταμίνες	-	-	-	-	+
D-γαλακτόζη (mM)	-	-	-	-	5
D-γλυκόζη (mM)	-	-	5,55	5,55	20
L-γλουταμίνη (mM)	-	-	2	2	-
Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)	0,75	3,75	0,75	7,50	1,25*
Ταυροχολικό νάτριο (mM)	3	15	3	15	5
2-(N-μορφολινο)αιθανοσουλφονικό οξύ (mM)	-	-	μέχρι pH=6,5	μέχρι pH=6	20
Υδροξείδιο του νατρίου (mM)	μέχρι pH=6.5	μέχρι pH=5	-	-	-
pH	6,5	5	6.5	6	6
Ωσμωτικότητα (mOsm/Kg)	270	635	343	336	364-380

* ή λυσοφωσφατιδυλοχολίνη

+ Leibovitz, 1963

A.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στο στάδιο της ανάπτυξης νέων φαρμάκων οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι πλησιέστερα στην *in vivo* κατάσταση και επιτρέπουν την εκτίμηση της διαπερατότητας σε διάφορες περιοχές του εντερικού αυλού. Οι τεχνικές αυτές δεν είναι εφαρμόσιμες στο στάδιο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων, μιας και δεν είναι δυνατό να εφαρμοστούν σε διαδικασίες υψηλής απόδοσης (μέχρι σήμερα, τουλάχιστον).

A.3.1 Τεχνική ανεστραμμένων σάκων

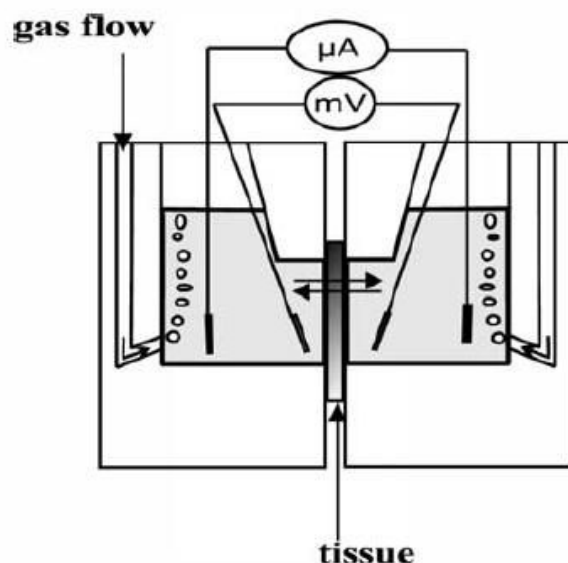
Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '50 (Wilson and Wiseman, 1954) και περιλαμβάνει τη χρήση τμήματος του εντέρου πειραματόζωων, συνήθως αρουραίων. Αφού πλυθεί το εντερικό τμήμα με ρυθμιστικό διάλυμα για να καθαριστεί, δένεται το ένα άκρο του με κλωστή και, με τη βοήθεια υάλινης ράβδου, ωθείται προς το άλλο άκρο μέσω του αυλού, ώστε τελικά το εντερικό τμήμα να αναστραφεί.

Το ανεστραμμένο εντερικό τμήμα (2-3 cm) δένεται και στο άλλο άκρο του με κλωστή και γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα. Ο σάκος, που δημιουργείται, τοποθετείται σε κωνική φιάλη με οξυγονωμένο ρυθμιστικό διάλυμα (95% O₂, 5% CO₂) που περιέχει το εξεταζόμενο φάρμακο. Έτσι, έρχεται σε επαφή με το φάρμακο η βλεννογόνο στιβάδα. Η κωνική φιάλη αναδεύεται σε υδατόλουτρο (37 °C) και σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές αφαιρείται ο σάκος, λαμβάνεται δείγμα από τα περιεχόμενά του και μετράται πόση ουσία έχει απορροφηθεί. Η ακεραιότητα του ιστού κατά τη διάρκεια του πειράματος ελέγχεται μετρώντας τη μεταφορά δείκτη (π.χ. κυανό του τρυπανίου). Με την τεχνική των ανεστραμμένων σάκων μπορεί να γίνει διάκριση της ενδοκυττάριας και της παρακυττάριας μεταφοράς κατά τη μελέτη παθητικής διάχυσης ουσιών (Tomita et al., 1988). Στα υπέρ της είναι η απλότητα, το μικρό κόστος και το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε τμήμα εντέρου. Κύριο μειονέκτημά της είναι ο μικρός χρόνος βιωσιμότητας των εντερικών τμημάτων. Ένα επιπλέον μειονέκτημα εντοπίζεται στο γεγονός ότι η πρόσληψη του φαρμάκου δεν γίνεται μόνο από τη βλεννογόνο στιβάδα, αλλά και από το μυϊκό και το συνδετικό ιστό του εντερικού τμήματος, που επίσης έρχονται σε επαφή με το

διάλυμα του φαρμάκου. Για τους λόγους αυτούς, η χρήση της σήμερα είναι περιορισμένη.

A.3.2 Κύτταρα Ussing

Η μελέτη της διαπερατότητας φαρμάκων με τα κύτταρα Ussing (Ussing chambers) είναι άλλη μια *ex vivo* τεχνική με ρίζες στη δεκαετία του '50. Τα κύτταρα Ussing αναπτύχθηκαν από τους Ussing και Zerahn (Ussing and Zerahn, 1951) για τη μελέτη μεταφοράς ιόντων και υιοθετήθηκαν για μελέτες διαπερατότητας φαρμάκων πολύ αργότερα (Grass and Sweetana, 1988). Το κύτταρο Ussing είναι ένα κύτταρο διάχυσης που αποτελείται από δύο διαμερίσματα, τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους από κομμάτι εντερικού επιθηλίου, το οποίο προηγουμένως έχει αφαιρεθεί προσεκτικά από το υπόλοιπο εντερικό τοίχωμα. Ο ιστός εντερικού επιθηλίου μπορεί να προέρχεται είτε από ζώο είτε από άνθρωπο (Haslam et al., 2011). Το ένα διαμέρισμα έρχεται σε επαφή με την ψηκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ το άλλο με την απέναντι πλευρά. Το μέσο μεταφοράς που χρησιμοποιείται στα πειράματα διαπερατότητας συνήθως είναι ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικών (Krebs-Ringer), παρουσία γλυκόζης, γλουταμικού, φουμαρικού και πυρουβικού οξέος, το οποίο συνεχώς οξυγονώνεται με 95% O₂, 5% CO₂. Η σύσταση αυτή επιβάλλεται, ώστε να διατηρηθεί ζωντανός ο ιστός. Η συνεχής εισροή O₂-CO₂ επίσης δρα στην ανάδευση του διαλύματος και στη μείωση του πάχους της μη αναδευόμενης υδάτινης στιβάδας. Το υπό εξέταση φάρμακο προστίθεται είτε στο διαμέρισμα στην πλευρά της ψηκτροειδούς παρυφής, οπότε μελετάται η πρόσληψή του, είτε στο απέναντι διαμέρισμα, οπότε μελετάται η αντίθετη πορεία. (Σχήμα A.8).



Σχήμα Α.8: Η διάταξη του κυττάρου Ussing (Brouwers et al., 2010).

Η βιωσιμότητα του επιθηλιακού ιστού είναι το βασικό πρόβλημα της τεχνικής. Αν και πειράματα διαπερατότητας μπορούν να διαρκέσουν μέχρι και 3 h, έχει αναφερθεί καταστροφή του ιστού στα 20 min (Plumb et al., 1987). Για το λόγο αυτό, παρακολουθείται η ακεραιότητα του ιστού είτε ελέγχοντας ηλεκτροφυσιολογικές παραμέτρους (διαφορά δυναμικού, TEER) είτε χρησιμοποιώντας ουσίες-δείκτες παρακυττάριας μεταφοράς, όπως μαννιτόλη, ιουλίνη, Na-φλουορεσκεΐνη και PEG-400. Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι αντιπροσωπεύει ικανοποιητικά την *in vivo* κατάσταση στον άνθρωπο, αφού υπάρχει υψηλή συσχέτιση ($r^2=0.95$) μεταξύ συντελεστών διαπερατότητας που μετρήθηκαν στον άνθρωπο και στα κύτταρα Ussing (Lennernäs, 2007). Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαφορών στη διαπερατότητα από διαφορετικά τμήματα του εντερικού αυλού. Ακόμα, μπορούν να μελετηθούν οι διαφορές διαπερατότητας μεταξύ των ειδών, ανάλογα την προέλευση του επιθηλιακού ιστού. Άλλο ερώτημα που απαντάται με τη βοήθεια των κυττάρων Ussing είναι πώς επιδρούν οι φορείς στη διαπερατότητα φαρμάκων. Η σύγκριση μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ιστούς από αρουραίους και ιστούς από μεταλλαγμένους αρουραίους που δεν εκφράζουν συγκεκριμένους μεταφορείς (Mallants et al., 2005). Τέλος, τα κύτταρα Ussing έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατάταξη φαρμάκων ως υψηλής ή χαμηλής διαπερατότητας με βάση το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης των φαρμάκων (Ungell et al., 1998).

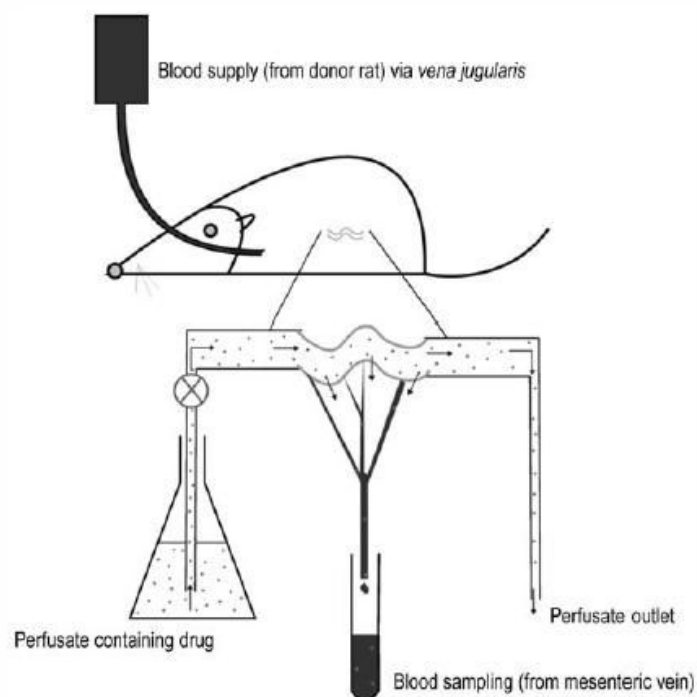
A.3.3 In situ τεχνικές διαπότισης

Η in situ μελέτη διαπερατότητας αναπτύχθηκε στο τέλος της δεκαετίας του '50 (Schanker et al., 1958) και συνίσταται στη διαπότιση τμήματος του εντέρου πειραματόζωου, συνήθως αρουραίου, με διάλυμα του υπό εξέταση φαρμάκου. Ο αρουραίος, που έχει σταματήσει να λαμβάνει τροφή για 12-24 h πριν το πείραμα, αναισθητοποιείται και τοποθετείται σε θερμαινόμενο πάγκο για διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματός του. Γίνεται τομή στην κοιλιακή χώρα και φέρεται στην επιφάνεια το τμήμα του εντέρου που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα. Αφού καθαριστεί με φυσιολογικό ορό το υπό μελέτη τμήμα του εντέρου, προσαρμόζονται στα δύο άκρα του καθετήρες σχήματος L. Υπάρχουν δύο παραλλαγές της τεχνικής, η μέθοδος Doluisio (Doluisio et al., 1969) και η διαπότιση προς μια κατεύθυνση (single-pass perfusion).

Στη μέθοδο Doluisio τοποθετείται μέσω του ενός καθετήρα διάλυμα του φαρμάκου όγκου περίπου 10 ml και αφήνεται εκεί για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Σε τακτά χρονικά διαστήματα αφαιρείται ποσότητα περίπου 0,1 ml προς ανάλυση. Στο διάλυμα του φαρμάκου περιέχεται και μη απορροφούμενη ουσία-δείκτης (π.χ. ινουλίνη, ^{14}C PEG 4000) για τον υπολογισμό της απορρόφησης ή έκκρισης νερού κατά τη διάρκεια της διαπότισης. Από τη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο υγρό διαπότισης υπολογίζεται ο συντελεστής διαπερατότητάς, P_{eff} (Κεφ. Α.5). Σε περίπτωση όμως είτε προσρόφησης του φαρμάκου στον καθετήρα ή στη σύριγγα είτε βιομετατροπής του εντός των επιθηλιακών κυττάρων, η εξαφάνιση του φαρμάκου δεν συμπίπτει με την εμφάνισή του στο αίμα. Για την άρση των προβλημάτων αυτών, εναλλακτικά μπορεί να συλλέγεται αίμα από τη μεσεντέρια ή την πυλαία φλέβα του αρουραίου, οπότε από την εμφάνιση του φαρμάκου στο αίμα υπολογίζεται ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας, P_{app} (Κεφ. Α.5). Το αφαιρούμενο αίμα αντικαθίσταται από νέο που εγχύεται στον αρουραίο.

Στη διαπότιση προς μια κατεύθυνση το διάλυμα του φαρμάκου (μέχρι και 100 ml) δεν τοποθετείται εντός του εντερικού τμήματος, αλλά διέρχεται μια φορά μέσω αυτού (Σχήμα Α.9). Προωθείται από το ένα άκρο του εντερικού τμήματος με αντλία έγχυσης σε σταθερό ρυθμό, ενώ στο άλλο άκρο συλλέγονται δείγματα προς ανάλυση. Από τη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου υπολογίζεται ο συντελεστής διαπερατότητάς P_{eff} . Όπως και με τη μέθοδο Doluisio, εναλλακτικά μπορεί να συλλεχθεί αίμα από τη μεσεντέρια ή την πυλαία φλέβα και να υπολογιστεί ο

φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας P_{app} . Η διαπότιση προς μία κατεύθυνση θεωρείται καλύτερη μέθοδος από την Doluisio, καθώς υπάρχει καλύτερος έλεγχος των υδροδυναμικών συνθηκών και ο λόγος της έκτασης επιφάνειας του εντέρου προς τον όγκο του διαλύματος του φαρμάκου είναι μεγαλύτερος.



Σχήμα A.9: Η διάταξη της διαπότισης προς μία κατεύθυνση με συλλογή αίματος (Brouwers et al., 2010).

Η τεχνική της *in situ* διαπότισης αποτελεί ίσως την πληρέστερη προσομοίωση της *in vivo* κατάστασης, αφού, σε αντίθεση με τις *ex vivo* ή τις *in vitro* τεχνικές, η μεταφορά γίνεται παρουσία βλέννας και σε συνθήκες δεξαμενής. Έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της απορρόφησης φαρμάκων που απορροφώνται τόσο παθητικά, όσο και με τη μεσολάβηση φορέα (Amidon et al., 1988). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα δεδομένα από πειράματα διαπότισης σε αρουραίους συσχετίζονται ικανοποιητικά με *in vivo* δεδομένα από ανθρώπους (Fagerholm et al., 1996). Επίσης, με την τεχνική της διαπότισης και χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένους αρουραίους είναι δυνατή η μελέτη της επίδρασης φορέων μεταφοράς (Mallants et al., 2005). Μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η σχετική δυσκολία εφαρμογής (λόγω της αναισθησίας, της εγχείρησης και τελικής ευθανασίας του αρουραίου), το γεγονός ότι δεν μπορεί να εφαρμοσθεί σε διαδικασίες υψηλής απόδοσης, καθώς και ότι απαιτείται

ανάλυση βιολογικού υγρού στην περίπτωση που συλλέγεται αίμα.

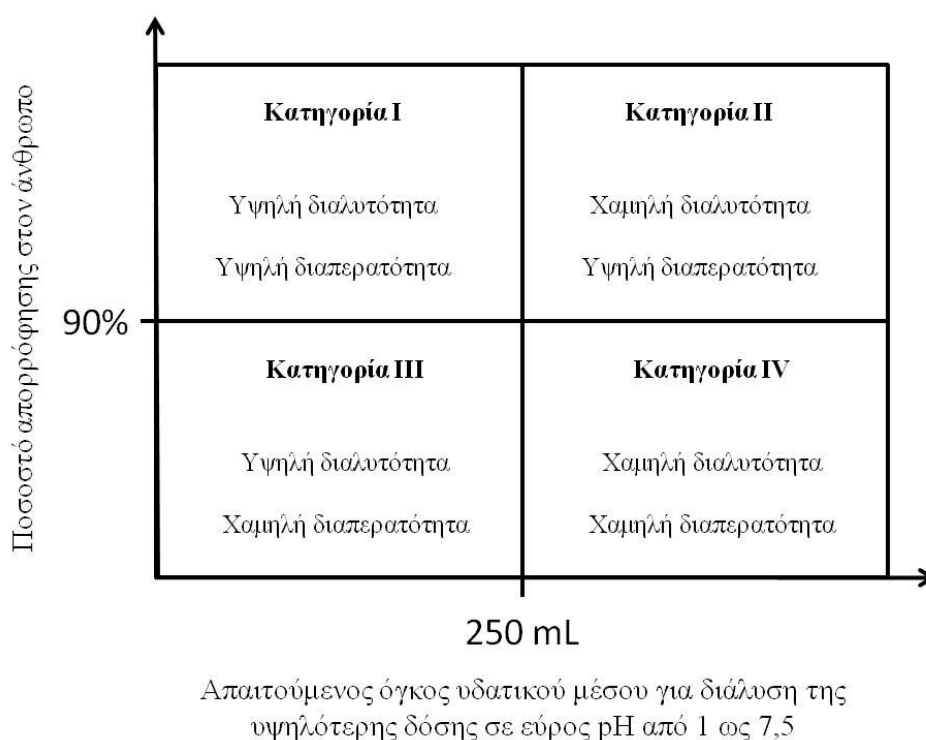
Η τεχνική της *in situ* διαπότισης χρησιμοποιείται και σε μελέτες της διαπερατότητας σε ανθρώπους. Καθώς όμως τα πειράματα σε ανθρώπους έχουν υψηλό κόστος και συνδέονται με ηθικά προβλήματα, η *in situ* διαπότιση εντέρου ανθρώπου είναι μια τεχνική που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ρουτίνα κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, αλλά χρησιμοποιείται ως αναφορά σε σχέση με άλλες εργαστηριακές τεχνικές. Από τις παραλλαγές της τεχνικής που υπάρχουν (ανοιχτή, ημι-ανοικτή διαπότιση, Loc-I-Gut) η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η μέθοδος Loc-I-Gut (Lennernäs, 2000). Σε αυτή χρησιμοποιείται σωλήνας από πολυβινύλιο, ο οποίος ενσωματώνει έξι σωλήνες και φέρει δύο μπαλόνια που απέχουν 10 cm μεταξύ τους. Δύο από τους σωλήνες χρησιμεύουν για να εισάγουν αέρα στα μπαλόνια, ένας περιέχει το προς διαπότιση διάλυμα του φαρμάκου, ένας χρησιμεύει για λήψη δείγματος και οι δύο άλλοι περιέχουν διαλύματα-δείκτες (π.χ. ερυθρό του φαινολίου, PEG 4000). Ο σωλήνας εισάγεται στο έντερο νηστικού ανθρώπου και προωθείται μέχρι τα μπαλόνια να οριοθετήσουν την περιοχή όπου θα γίνει η διαπότιση (συνήθως στη νήστιδα). Τότε, αυτά γεμίζουν με αέρα, αποκλείοντας την περιοχή από τον υπόλοιπο ΓΕ σωλήνα και ακολουθεί η διαπότιση με το διάλυμα του φαρμάκου. Η διαπερατότητα προκύπτει από την εξαφάνιση του φαρμάκου, υπολογίζοντας τον δρόντα συντελεστή διαπερατότητας, P_{eff} (Κεφ. Α.5). Σύγκριση δεδομένων διαπερατότητας που ελήφθησαν με *in situ* διαπότιση εντέρου ανθρώπου και δεδομένων με άλλες τεχνικές (*in situ* διαπότιση εντέρου αρουραίου, κύτταρα Ussing, Caco-2 κυτταρικές σειρές) έδειξε ότι οι τεχνικές αυτές υπολογίζουν με σχετική ακρίβεια τη διαπερατότητα φαρμάκων που μεταφέρονται με παθητική διάχυση, ενώ υπολογίζουν χαμηλότερες τιμές για φάρμακα που μεταφέρονται ενεργητικά (Lennernäs, 1998).

Α.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ Ή ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ

Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται σε προχωρημένο στάδιο της ανάπτυξης ή μετά από τη λήψη άδειας κυκλοφορίας και είναι ποιοτικού χαρακτήρα. Σε συνδυασμό με άλλα δεδομένα είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην απόφαση σχετικά με την αναγκαιότητα πραγματοποίησης μιας *in vivo* μελέτης βιοϊσοδυναμίας [χορήγηση άδειας βιοαπαλλαγής (biowaiver) από τον οργανισμό ελέγχου κυκλοφορίας φαρμακευτικών

προϊόντων μιας χώρας].

Το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης (BCS) αναπτύχθηκε το 1995 μετά από συνεργασία επιστημόνων με την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ως εργαλείο για την απλούστευση διαδικασιών απόδειξης βιοϊσοδυναμίας δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων. Το BCS κατατάσσει τα φάρμακα σε τέσσερις κατηγορίες με βάση τη διαλυτότητα και τη διαπερατότητά τους (Σχήμα Α.10). Υψηλή διαλυτότητα έχουν τα φάρμακα στα οποία η υψηλότερη δόση τους μπορεί να διαλυθεί σε 250 ml υδατικού μέσου στους 37 °C και σε εύρος pH από 1 ως 7,5. Κριτήριο για την υψηλή διαπερατότητα είναι απορρόφηση μεγαλύτερη από 90% βασισμένη σε εξισορρόπηση μάζας ή σε σύγκριση με ενδοφλέβια δόση αναφοράς. Φαίνεται δηλαδή ότι από την απορρόφηση του φαρμάκου προκύπτει ποιοτική εκτίμηση της διαπερατότητας. Για φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία I είναι δυνατή η βιοαπαλλαγή (biowaiver), δηλ. δεν είναι απαραίτητη in vivo μελέτη βιοϊσοδυναμίας για την κυκλοφορία ουσιασώς ομοίου φαρμάκου άμεσης αποδέσμευσης (FDA, 2000).



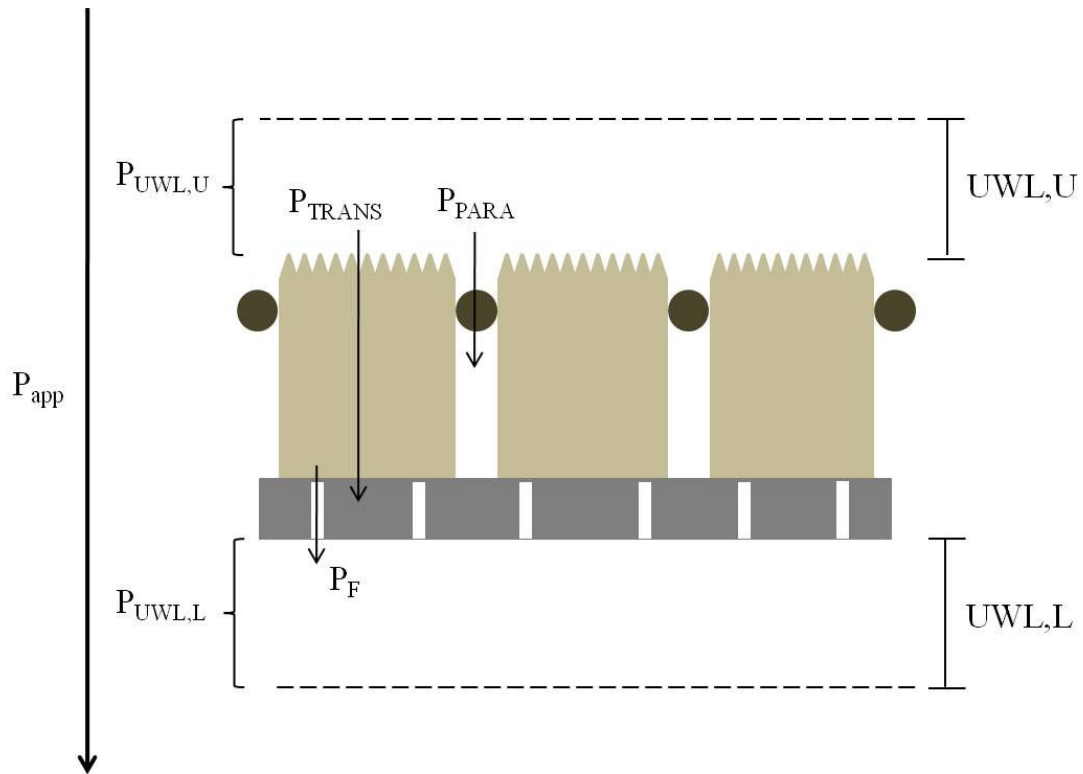
Σχήμα Α.10: Το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης (Amidon et al., 1995)

Σχετικά πρόσφατα εξετάζεται και η πιθανότητα κατάταξης με βάση τη βιομετατροπή σύμφωνα με το σύστημα BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) (Wu and Benet, 2005). Όταν η βιομετατροπή είναι η κύρια οδός απομάκρυνσης του φαρμάκου (μεταβολισμός > 90%), τότε το φάρμακο θεωρείται ότι έχει υψηλή διαπερατότητα. Αντίθετα, όταν υπάρχει απέκκριση από τα νεφρά και τη χολή φαρμάκου που δεν έχει υποστεί βιομετατροπή (δηλαδή χωρίς σημαντικό φαινόμενο πρώτης δόσης), τότε αυτό θεωρείται ότι έχει χαμηλή διαπερατότητα.

A.5 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

A.5.1 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας

Η δυνατότητα ενός μορίου να μεταφέρεται μέσω της εντερικής βλεννογόνου στιβάδας ποσοτικοποιείται με βάση την τιμή ενός συντελεστή, που ονομάζεται συντελεστής διαπερατότητας. Η τιμή του συντελεστή διαπερατότητας είναι ανάλογη της ευκολίας μεταφοράς από μία περιοχή σε μία άλλη. Ονομάζεται είτε φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας (apparent permeability coefficient, P_{app}) είτε δρων συντελεστής διαπερατότητας (effective permeability coefficient, P_{eff}), όπου P_{app} είναι ο συντελεστής διαπερατότητας που υπολογίζεται από την εμφάνιση του φαρμάκου σε μια περιοχή, ενώ P_{eff} είναι αυτός που υπολογίζεται από την εξαφάνιση του φαρμάκου από μια περιοχή. Τόσο ο P_{app} όσο και ο P_{eff} ενσωματώνουν επί μέρους συντελεστές μεταφοράς. Ένα παράδειγμα των συντελεστών μεταφοράς που ενσωματώνονται στον P_{app} που υπολογίζεται από ένα πείραμα μεταφοράς μέσω κυτταρικής μονοστιβάδας φαίνεται στο Σχήμα A.10. Μέσω κυτταρικής μονοστιβάδας ή βλεννογόνου του εντέρου ο P_{app} ενσωματώνει και την πιθανή βιομετατροπή του μορίου στο επιθήλιο (σε αντίθεση με τον P_{eff}).



Σχήμα Α.10: Σχηματική απεικόνιση των συντελεστών διαπερατότητας που ενσωματώνει ο P_{app} που υπολογίζεται μετά από πείραμα διαπερατότητας με κυτταρική μονοστιβάδα, όταν το μόριο δεν βιομετατρέπεται κατά τη διαδικασία μεταφοράς. Ο P_{app} ενσωματώνει το συντελεστή για την ενδοκυττάρια μεταφορά (P_{TRANS}), για την παρακυττάρια μεταφορά (P_{PARA}), για τη μεταφορά μέσω της UWL του πάνω ($P_{UWL,U}$) και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου ($P_{UWL,L}$) και για τη μεταφορά μέσω του πορώδους υλικού στήριξης (P_F). Στην περίπτωση αυτή θα ισχύει ότι:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL,U}} + \frac{1}{P_{TRANS} + P_{PARA}} + \frac{1}{P_F} + \frac{1}{P_{UWL,L}}$$

Ο P_{app} (ή ο P_{eff}) μπορεί να υπολογιστεί με τρεις τρόπους: α) με μέτρηση του ποσού που έχει μεταφερθεί για ορισμένη χρονική στιγμή από την έναρξη του πειράματος, β) με βάση την απεικόνιση συνολικής ποσότητας που μεταφέρθηκε (ή μένει να μεταφερθεί) ως προς το χρόνο σε συνθήκες δεξαμενής (με βάση τα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς) και γ) με προσαρμογή μοντέλου στα δεδομένα μεταφοράς που έχουν συλλεγεί σε διάφορους χρόνους.

Η πρώτη μέθοδος, η μέθοδος ενός σημείου, χρησιμοποιείται κυρίως στη μέθοδο των τεχνητών μεμβρανών PAMPA και βρίσκει εφαρμογή σε αρχικά στάδια ανακάλυψης

νέων φαρμακευτικών ουσιών, όπου μελετώνται ταυτόχρονα εκατοντάδες ενώσεις. Πλεονέκτημά της είναι η ταχύτητα, μιας και η ποσότητα ουσίας που έχει μεταφερθεί μετράται σε μια μόνο χρονική στιγμή, αλλά από την άλλη η μέτρηση αυτή υστερεί σε ακρίβεια και δίνει μόνο ποιοτικές πληροφορίες, αν δηλαδή η ουσία είναι υψηλής ή χαμηλής διαπερατότητας σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Για τον υπολογισμό του P_{app} με βάση τη δεύτερη μέθοδο ακολουθούνται τα εξής βήματα:

Η ροή της ουσίας, J , από το ένα διαμέρισμα στο άλλο μέσω μιας «επιφάνειας» με έκταση A δίνεται από την εξίσωση A.6:

$$J = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A} \quad \text{Εξίσωση A.6}$$

όπου dQ είναι το ποσό που μεταφέρεται στο διαμέρισμα-δέκτης στο χρονικό διάστημα dt .

Με βάση τον πρώτο νόμο του Fick, η ροή είναι ανάλογη της διαφοράς συγκεντρώσεων της ουσίας στα διαμερίσματα δότης και δέκτης (εξίσωση A.7)¹:

$$J = P_{app} \times (C_{donor} - C_{acceptor}) \quad \text{Εξίσωση A.7}$$

Σε συνθήκες δεξαμενής (sink conditions), η συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δέκτης είναι πολύ μικρή ($< 0,15 \times C_{donor}$) σε σχέση με αυτή στο διαμέρισμα-δότης. Τότε, η εξίσωση A.7 παίρνει την εξής μορφή:

$$J = P_{app} \times C_{donor} \quad \text{Εξίσωση A.8}$$

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις A.6 και A.8, προκύπτει η εξίσωση υπολογισμού του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας σε συνθήκες δεξαμενής:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_{donor}} \quad \text{Εξίσωση A.9}$$

Γνωρίζοντας τις τιμές για A και C_{donor} , η μέτρηση της κλίσης dQ/dt στο αρχικό ευθύγραμμο τμήμα διαγράμματος αθροιστικής ποσότητας που μεταφέρεται στο διαμέρισμα-δέκτης ως προς το χρόνο (όπου επικρατούν συνθήκες δεξαμενής) δίνει την τιμή P_{app} . Μέτρηση του P_{app} με τον ίδιο τρόπο, αλλά ακολουθώντας την αντίθετη κατεύθυνση μεταφοράς, παρέχει την πληροφορία για το αν στο μηχανισμό μεταφοράς μεσολαβεί και φορέας (κάτι που ισχύει αν οι δύο τιμές P_{app} που υπολογίζονται δεν

¹ Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ετερογενή συστήματα, όπου ο συντελεστής από τον οποίο εξαρτάται ο ρυθμός αλλάζει με το χρόνο, προτείνεται η χρήση fractal και fractional κινητικών (Dokoumetzidis and Macheras, 2011).

είναι ίσες). Η ύπαρξη φορέα επιβεβαιώνεται με τη χρήση αναστολέων φορέα κατά το πείραμα μεταφοράς.

Η τρίτη μέθοδος, της προσαρμογής μοντέλου στα δεδομένα μεταφοράς, είναι πιο πολύπλοκη και απαιτεί τη χρήση υπολογιστή. Βασίζεται στη θεώρηση ενός διαμερισματικού μοντέλου και μετράται η μεταφορά της ουσίας για ικανό χρονικό διάστημα. Έτσι, δεν διατηρούνται συνθήκες δεξαμενής σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να διερευνηθεί ο μηχανισμός μεταφοράς (π.χ. ύπαρξη φορέων), χωρίς την ανάγκη πρόσθετων πειραμάτων (μεταφορά στην αντίθετη κατεύθυνση ή χρήση αναστολέων φορέων).

A.5.2 Χρησιμότητα του συντελεστή διαπερατότητας

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί σύνθετα μαθηματικά μοντέλα για την εκτίμηση συνολικά της απορρόφησης (και όχι μόνο της διαπερατότητας) (*in silico* μέθοδοι), τα οποία λαμβάνουν υπόψη τη φυσιολογία του γαστρεντερικού αυλού, την ενδοαυλική διάλυση, τη μεταφορά του φαρμάκου μέσω της εντερικής βλεννογόνου, αλλά και δευτερεύουσες πορείες, όπως η βιομετατροπή κατά την πρώτη δίοδο και η εντεροηπατική κυκλοφορία. Μεταξύ των δεδομένων που εισάγονται στα μοντέλα είναι και τιμές συντελεστών διαπερατότητας. Η εφαρμογή των μοντέλων αυτών συνήθως γίνεται με τη βοήθεια εμπορικά διαθέσιμων λογισμικών (Parrott and Lave, 2010).

Μια απλή και οικονομική λύση είναι το λογισμικό STELLA[®] (structural thinking experimental learning laboratory with animation), το οποίο επιτρέπει στο χρήστη να επεμβαίνει στην κατασκευή του μοντέλου (π.χ. Fotaki et al., 2005 και Shono et al., 2009). Η Φαρμακευτική Βιομηχανία χρησιμοποιεί λογισμικά με μεγαλύτερες δυνατότητες, συγκριτικά πιο ακριβά, στα οποία ο χρήστης μπορεί να ακολουθήσει μόνο ότι προβλέπεται από τον προμηθευτή του μοντέλου. Το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο λογισμικό για αποκλειστική εφαρμογή σε θέματα διακίνησης του φαρμάκου στο σώμα ήταν το Intellipharm[®]PKCR (www.intellipharm.com), το οποίο βασίζεται σε ένα μοντέλο πλήρως αναμιγνυόμενης δεξαμενής (mixing tank model) των Dressman και Fleisher (1986), το οποίο καταγράφει αλλαγές στις τιμές των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διάλυση και την απορρόφηση. Ένα από τα πιο δημοφιλή λογισμικά στη συνέχεια ήταν το GastroPlus[™] (<http://www.simulations-plus.com>), που βασίστηκε στο μοντέλο CAT (compartmental absorption and transit –

διαμερισματική απορρόφηση και διάβαση) των Yu et al. (1996). Εξέλιξη του μοντέλου CAT αποτελεί το ACAT (advanced CAT), που επιπροσθέτως λαμβάνει υπόψη την pH-εξαρτώμενη διαλυτότητα και τη διαπερατότητα. Για τη διαπερατότητα χρησιμοποιούνται συνήθως δεδομένα από PAMPA και Caco-2 κυτταρικές σειρές. Προγράμματα με βάση το μοντέλο ACAT, που ενσωματώνουν και μοντέλα απορρόφησης, έχουν αναπτύξει η Cyprotex (www.cyprotex.com), η SimCyp (www.simcyp.com) και η Bayer Technology Services (το PK-Sim[®]) (<http://www.systems-biology.com/products/pk-sim.html>).

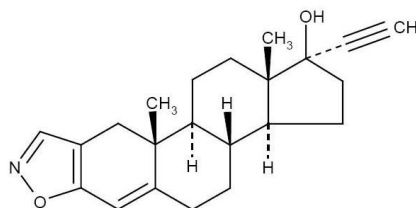
Οι *in silico* μέθοδοι πρόβλεψης της απορρόφησης μπορούν να βρουν εφαρμογή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου. Σε αρκετά πρώιμο στάδιο, μπορούν να αντικαταστήσουν *in vivo* πειράματα σε αρουραίους χρησιμοποιώντας μόνο *in vitro* δεδομένα (Parrott et al., 2005). Αν και προς το παρόν οι προσομοιώσεις εμπεριέχουν σημαντικό ποσοστό λάθους, αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στην ποιοτική διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την απορρόφηση και είναι πιθανό να φανούν πιο χρήσιμες αν βελτιωθεί η αξιοπιστία των δεδομένων που εισάγονται. Επίσης σε πρώιμο στάδιο, οι *in silico* μέθοδοι είναι χρήσιμες στον υπολογισμό της μέγιστης απορροφήσιμης δόσης ενός νέου, υπό ανάπτυξη φαρμακευτικού μορίου. Σε μεταγενέστερο στάδιο, τα λογισμικά βοηθούν στην επιλογή κατάλληλης μορφοποίησης ενός δραστικού συστατικού, για την πρόβλεψη της επίδρασης της τροφής στην απορρόφηση (Jones et al., 2006 και Kesisoglou et al., 2007) και στη μελέτη της σημασίας των φορέων μεταφοράς και των ενζύμων βιομετατροπής στην απορρόφηση (Agoram et al., 2001 και Bolger et al., 2007).

A.6 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μετά τη χορήγηση p.o. μιας απλής Φ/Μ άμεσης αποδέσμευσης στη διαπεπτική περίοδο, το φάρμακο προσεγγίζει την εντερική βλεννογόνο μέσω της μικκυλιακής φάσης των εντερικών περιεχομένων, που περιέχει μικτά μικκύλια χολικών αλάτων, δηλαδή χολικά άλατα, φωσφατιδυλοχολίνη, μονογλυκερίδια, χοληστερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα [μικκυλιακά λιπίδια (ΜιΛ)]. Τα μικτά μικκύλια χολικών αλάτων αυξάνουν τη διαλυτοποίηση των λιπόφιλων φαρμάκων, αλλά, κυρίως λόγω του μεγέθους τους, η διάχυσή τους προς τα επιθηλιακά κύτταρα είναι πιο αργή σε σχέση με τα ελεύθερα μόρια των λιπόφιλων φαρμάκων. Η διαλυτοποίηση των λιπόφιλων φαρμάκων σε μικτά μικκύλια χολικών αλάτων μπορεί να αυξήσει τη μεταφερόμενη

ποσότητα (Westergaard and Dietschy, 1976). Στην περίοδο πέψης, και ανεξάρτητα από της συνθήκες χορήγησης, μετά τη χορήγηση μιας λιπιδικής Φ/Μ υπάρχουν και άλλες λιπιδικές δομές, εκτός από τα μικτά μικκύλια, που μπορούν να μεταφέρουν το φάρμακο. Αυτές είναι λιποσταγονίδια και υδατοδιαλυτά λιπιδικά κυστίδια (μεγάλοι λιπιδικοί σχηματισμοί – ΜΛΣ), ενώ υπάρχουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και απλά λιπίδια (ΑΛ) (Porter et al., 2007). Αν και γενικώς πιστεύεται ότι ακόμα και σε αυτές τις συνθήκες τα λιπόφιλα φάρμακα μεταφέρονται στην εντερική βλεννογόνο κυρίως μέσω της μικκυλιακής φάσης (Porter et al., 2007), δεν υπάρχει επαρκής πληροφορία στη βιβλιογραφία περί τούτου. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι λιπίδια, τα οποία είτε συγχωρηγούνται με την τροφή είτε βρίσκονται στη λιπιδική Φ/Μ, βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της δαναζόλης αυξάνοντας την έκταση της διαλυτοποίησης ενδοαυτικά και επιταχύνοντας ή παρακάμπτοντας τα προβλήματα απορρόφησης που σχετίζονται με τη διάλυση (Charman et al., 1993). Το αν όμως η δαναζόλη πρέπει πρώτα να περάσει στη μικκυλιακή φάση για να μεταφερθεί μέσω της εντερικής βλεννογόνου δεν έχει απαντηθεί.

Ο πρώτος στόχος λοιπόν ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο είναι εφικτή η ροή μέσω του εντερικού επιθηλίου ενός λιπόφιλου μικρομορίου από μεγάλους λιπιδικούς σχηματισμούς (ΜΛΣ) που υπάρχουν στα εντερικά περιεχόμενα (λιποσταγονίδια, κυστίδια) μετά από χορήγηση του μικρομορίου σε λιπιδικό φορέα. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έγιναν πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA και με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες και χρησιμοποιήθηκε ως λιπόφιλη ουσία-μοντέλο η δαναζόλη. Η δαναζόλη είναι ασθενούς δράσης ανδρογόνο που αναστέλλει την έκλυση γοναδοτροπινών (FSH και LH) από την υπόφυση, μειώνοντας έτσι την παραγωγή οιστρογόνων και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ενδομητρίωσης και για την ινοκυστική μαστοπάθεια. Στο Σχήμα Α.11 παρουσιάζεται η δομή της και στον Πίνακα Α.2 τα βιοφαρμακευτικά της χαρακτηριστικά.



Σχήμα Α.11: Χημική δομή της δαναζόλης.

Πίνακας Α.2: Βιοφαρμακευτικά χαρακτηριστικά της δαναζόλης

	MW	clogP	pKa	Μηχανισμός διαπέρασης της μεμβράνης	Διαλυτότητα (µg/ml)		
					Νερό	FaSSIF	FeSSIF
Δαναζόλη	337,5	4,2 ^α	-	παθητική διάχυση	0,4	5,40 ^β	17,55 ^β

^α Bakatselou et al., 1991

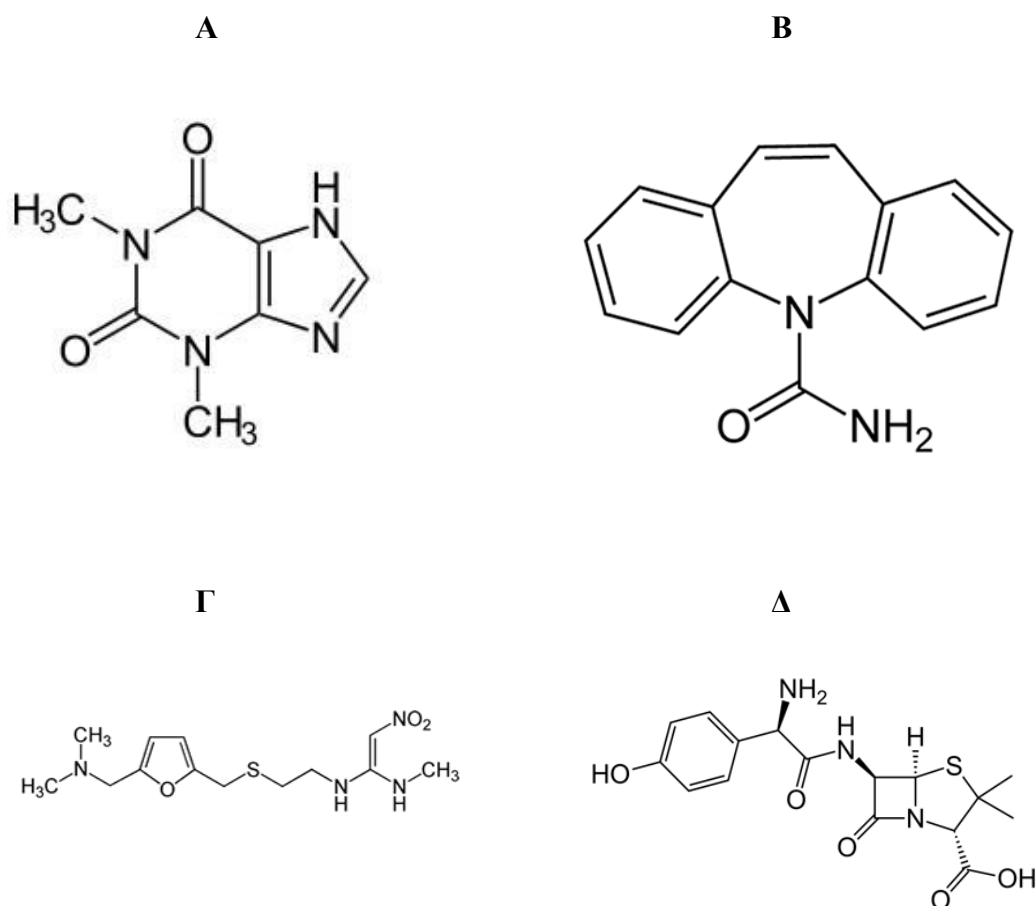
^β Clarysse et al., 2009

Χρησιμοποιήθηκαν εντερικά περιεχόμενα που είχαν προκύψει στα πλαίσια προηγούμενης μεταδιδακτορικής έρευνας (Βερτζώνη, 2006) μετά από κλινική μελέτη σε εθελοντές στους οποίους είχε χορηγηθεί δαναζόλη μαζί με υγρό γεύμα (Παράρτημα 1). Τα περιεχόμενα χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν (εντερικά περιεχόμενα – ΕΠ), οπότε περιείχαν όλες τις λιπιδικές δομές (ΜΛΣ+μικκύλια+ΑΛ), και μετά από υπερφυγοκέντρωση, οπότε περιείχαν σχεδόν αποκλειστικά μικκύλια (Müllertz et al., 2011) (μικκυλιακή φάση - ΜΦ).

Ο δεύτερος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί το πώς επηρεάζεται η τιμή του συντελεστή διαπερατότητας μικρομορίων με ποικίλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και μηχανισμούς μεταφοράς μέσω της εντερικής βλεννογόνου από τις συνθήκες που επικρατούν στη μικκυλιακή φάση των ενδοαυλικών περιεχομένων κατά τη διαπεπτική περίοδο και κατά τη διάρκεια της πέψης. Η διερεύνηση έγινε με βάση *in vitro* δεδομένα διαπερατότητας που συλλέχθηκαν με την τεχνική PAMPA και με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών σειρών. Μέχρι σήμερα έχει διερευνηθεί μόνο η ανάγκη προσομοίωσης των ενδοαυλικών συνθηκών κατά τη διαπεπτική περίοδο, δεδομένου ότι οι ενδοαυλικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της πέψης είναι τοξικές για τις κυτταρικές μονοστιβάδες. Όποιες προσπάθειες έχουν γίνει μέχρι σήμερα σχετικά με τη σημασία της σύστασης της μικκυλιακής φάσης των περιεχομένων στη διάρκεια της πέψης περιελάμβαναν τη χρήση μέσων με σύσταση που δεν είχε επιβεβαιωθεί στη διάρκεια της πέψης (Κεφ. Α.2.2.2). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σημασία της σύστασης μικκυλιακής φάσης των περιεχομένων κατά τη διαπεπτική περίοδο και τη διάρκεια της πέψης. Αναπτύχθηκαν μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων με βάση τα FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 (Jantratid et al., 2008) και τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων που χαρακτηρίστηκε με πρόσφατη μελέτη σε ενήλικες (Βερτζώνη, 2006) (Παράρτημα 1). Τα δεδομένα

συγκρίθηκαν με δεδομένα που προέκυψαν χρησιμοποιώντας απλό υδατικό μέσο μεταφοράς.

Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου μελετήθηκαν 10 μικρομόρια. Τέσσερα ήταν πρότυπα μόρια (υψηλής ή χαμηλής διαπερατότητας) σύμφωνα με σχετικές οδηγίες (FDA, 2000). Τα τέσσερα πρότυπα μικρομόρια ήταν η αμοξικιλίνη (χαμηλής διαπερατότητας – αντιβιοτικό), η ρανιτιδίνη (χαμηλής διαπερατότητας – φάρμακο κατά του έλκους), η καρβαμαζεπίνη (υψηλής διαπερατότητας – αντιεπιληπτικό) και η θεοφυλλίνη (υψηλής διαπερατότητας – φάρμακο κατά του άσθματος και ασθενειών του αναπνευστικού) (Σχήμα A.12 και Πίνακας A.3). Για τα μικρομόρια αυτά έγιναν πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιώντας μόνο απλό υδατικό μέσο μεταφοράς. Τα πειράματα αυτά είχαν στόχο την κατάταξη των υπόλοιπων έξι μικρομορίων ως χαμηλής ή υψηλής διαπερατότητας.



Σχήμα A.12: Χημικές δομές των τεσσάρων προτύπων μορίων: A) θεοφυλλίνη, B) καρβαμαζεπίνη, Γ) ρανιτιδίνη, Δ) αμοξικιλίνη.

Πίνακας Α.3: Βιοφαρμακευτικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων πρότυπων μικρομορίων (στοιχεία από ΕΟΦ, 2007 και SciFinder® - <http://scifinder.cas.org>).

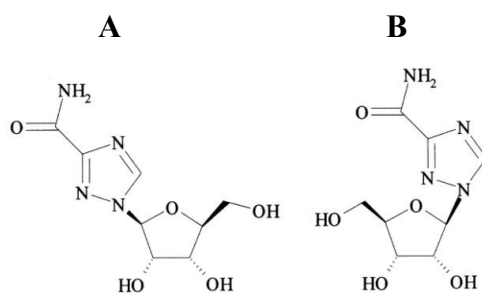
	MW	clogP	pKa	Μηχανισμός διαπέρασης της κυτταρικής μεμβράνης	Διαλυτότητα (µg/ml) στο νερό	Απλή δόση per os (mg)
Αμοξικιλίνη	365,4	0,883	2,44 (όξινο) 7,14 (αλκαλικό)	παθητική διάχυση και πρόσληψη με τη μεσολάβηση του φορέα PEPT1 ^α	180	500-1000
Ρανιτιδίνη	314,4	-0,068	8,35 (αλκαλικό)	παθητική διάχυση, πρόσληψη με μεσολάβηση φορέα και P-gr εκροή ^β	434000	150-300
Καρβαμαζεπίνη	236,3	1,895	13,94 (όξινο) -0,49 (αλκαλικό)	παθητική διάχυση	220	400
Θεοφυλλίνη	180,2	-0,276	8,60 (όξινο) 1,64 (αλκαλικό)	παθητική διάχυση	13000	125-250

^α Lennernäs et al., 2002

^β Bourdet and Thakker, 2006

Τα υπόλοιπα έξι μικρομόρια ήταν η δαναζόλη και πέντε μικρομόρια που ανήκουν στην εταιρεία Roche (σε φάση ανάπτυξης ή εμπορικά διαθέσιμα). Τα πέντε μικρομόρια ήταν η ριμπαβιρίνη (Coregus®), η λεβοβιρίνη (L-ισομερές της ριμπαβιρίνης) και τρία μικρομόρια, τα οποία λόγω εταιρικού απορρήτου αναφέρονται ως μικρομόρια Α, Β και Γ. Η ριμπαβιρίνη είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται σε συνδυαστική θεραπεία με ιντερφερόνη άλφα-2α ή PEG-ιντερφερόνη άλφα-2α κατά της χρόνιας ηπατίτιδας C. Η λεβοβιρίνη εξετάστηκε ως υποψήφιο εναλλακτικό

φάρμακο της ριμπαβιρίνης, μιας και δεν εμφάνιζε την παρενέργεια της αιμολυτικής αναιμίας, αλλά τελικά δεν χρησιμοποιήθηκε, καθώς η κλινική της δράση βρέθηκε κατώτερη της ριμπαβιρίνης (Rockros et al., 2004). Οι χημικές δομές των δύο αυτών μικρομορίων παρουσιάζονται στο Σχήμα A.13, ενώ τα βιοφαρμακευτικά χαρακτηριστικά και των πέντε μικρομορίων στον Πίνακα A.4. Όπως φαίνεται στον Πίνακα A.4, τα προς μελέτη μικρομόρια διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς τη διαλυτότητα όσο και ως προς το μηχανισμό διαπέρασης της κυτταρικής μεμβράνης. Για τα μικρομόρια αυτά έγιναν πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιώντας απλό υδατικό μέσο μεταφοράς και μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των περιεχομένων κατά τη διαπεπτική περίοδο και στην περίοδο πέψης.



Σχήμα A.13: Χημικές δομές της λεβοβιρίνης (A) και ριμπαβιρίνης (B).

Πίνακας Α.4: Βιοφαρμακευτικά χαρακτηριστικά των πέντε προς μελέτη μικρομορίων της εταιρείας Roche

	MW	clogP	pKa	Μηχανισμός διαπέρασης της κυτταρικής μεμβράνης	Διαλυτότητα (µg/ml)		
					Νερό	FaSSIF	FeSSIF
Μικρομόριο Α	727,8	9,0	4.0 & 5.4 (βασικό)	παθητική διάχυση και P-gp εκροή	δεν διαλύεται σε pH=7	2 ^α	190 ^α
Μικρομόριο Β	302,3	2,07	< 1 (βασικό)	παθητική διάχυση	3	6 ^α	17 ^α
Μικρομόριο Γ	554,5	10,4	-	παθητική διάχυση	< 0,9	13 ^α	38 ^α
Λεβοβιρίνη	244,2	-2,26	-	παθητική διάχυση ^β	ευδιάλυτη	μη διαθέσιμο	μη διαθέσιμο
Ριμπαβιρίνη^γ	244,2	-2,26	-	παθητική διάχυση και πρόσληψη με τη μεσολάβηση των φορέων CNT2 (N1), CNT3, ENT1, ENT2 ^δ	ευδιάλυτη	μη διαθέσιμο	μη διαθέσιμο

^α Δεδομένα από Roche

^β Li et al., 2006

^γ Δόση: 800-1200 mg (ΕΟΦ, 2007)

^δ Patil et al., 1998 και Yamamoto et al., 2007

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1 ΜΙΚΡΟΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ

Αμοξικιλίνη καθαρότητας 86,2% (ELPEN, Athens, Greece)

Δαναζόλη καθαρότητας 98,5% κατ' ελάχιστο (Sanofi-Aventis AEBE Hellas, Batch No.F510357)

Θεοφυλλίνη καθαρότητας 99% κατ' ελάχιστο (Sigma)

Καρβαμαζεπίνη καθαρότητας 97% κατ' ελάχιστο (Novartis (Hellas) S.A.C.I., Metamorphosis Attikis, Greece)

Λεβοβιρίνη καθαρότητας 98% κατ' ελάχιστο (Roche, Basel, Switzerland)

Μικρομόριο Α καθαρότητας 97% κατ' ελάχιστο (Roche, Nutley, NJ, USA)

Μικρομόριο Β καθαρότητας 99% κατ' ελάχιστο (Roche, Basel, Switzerland)

Μικρομόριο Γ καθαρότητας 98% κατ' ελάχιστο (Roche, Basel, Switzerland)

Ρανιτιδίνη υδροχλωρική καθαρότητας 98,5% κατ' ελάχιστο (Unipharma, Athens, Greece)

Ριμπαβιρίνη καθαρότητας 99% κατ' ελάχιστο (Roche, Basel, Switzerland)

B.2 ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

B.2.1 Πειράματα με την τεχνική PAMPA

Όργανα

Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (Unitronic OR - pSelecta, Barcelona, Spain)

Αναλυτικός ζυγός (Kern 770 - Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Germany)

Μαγνητική πλάκα ανάδευσης (model RH basic - IKA[®] Works, INC., Wilmington, USA)

Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (Büchi R-200) με θερμαινόμενο λουτρό (Büchi R-490) (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)

Πεχάμετρο Schott (model CG842 - Mainz, Germany)

Συσκευή ανάδευσης Gut-Box[™] (PN:110205– Pion Inc., Billerica, MA, USA)

Συσκευή μέτρησης ωσμωτικότητας (model Semimicro Osmometer Typ Dig. L - KNAUER GmbH, Berlin, Germany)

Συσκευή περιδίνησης (model MS 3 basic - IKA[®] Works, INC., Wilmington, USA)

Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελούμενο από αντλία Spectra System P4000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA), ανιχνευτή υπεριώδους P2000, αυτόματο δειγματολήπτη AS3000 (ThermoQuest Inc., San Jose, USA) και λογισμικό EZChrom Agilent[®] version 3.2 (Agilent Technologies, Inc, Pleasanton, CA, USA)

Φυγόκεντρος (model Universal 32R - Hettich Laborapparate, Tuttlingen, Germany)

Στήλη² χρωματογραφίας Agilent Eclipse XDB-C8 (5 μm, 150×4.6 mm)

² Αν και έχει επικρατήσει η χρήση της λέξης «στήλη», ίσως πιο σωστό θα ήταν να ονομάζεται «στόλος» (σύμφωνα με το Λεξικό της Νέας Ελληνικής Γλώσσας του Γ.Μπαμπινιώτη).

Στήλη χρωματογραφίας BDS Hypersil C18 (5 μm, 150×4,6 mm ID)

Στήλη χρωματογραφίας Fortis C18 (5 μm, 150×3,0 mm)

Στήλη χρωματογραφίας Fortis C18 (5 μm, 250×4,6 mm)

Στήλη χρωματογραφίας Nucleodur C18 Pyramid (5 μm, EC 250/2)

Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας HPLC (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Ελαϊκό νάτριο καθαρότητας 88,9% (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)

Επιφανειοδραστικό ρυθμιστικό διάλυμα για το διαμέρισμα-δέκτης, acceptor sink buffer (ASB) (ωσμωτικότητα 45 ± 2 mOsm/kg) (PN:110139, US patent #7,022,528 – Pion Inc., Billerica, MA, USA)

Ισοπροπανόλη, καθαρότητας HPLC (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

Λεκιθίνη αβγού, καθαρότητας 96,86% σε φωσφατιδυλοχολίνη (Lipoid E PC S, Lipoid GmbH, (Ludwigshafen, Germany)

Λιπιδικό διάλυμα για διαβροχή του PVDF υλικού, GIT-0 Lipid Solution (PN:110669– Pion Inc., Billerica, MA, USA)

Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)

1-Μονοελαϊκός γλυκερινεστέρας, καθαρότητας 100% (RYLO MG 19 Pharma - Danisco, Brabrand, Denmark)

Μυρμηκικό αμμώνιο (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)

Νερό βαθμού αναλυτικής καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Labconco® water pro p.s. System (Kansas City , Missouri, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα για το διαμέρισμα-δότης, Prisma™ HT (System Solution) (PN:110151, US patent #6,569,686 – Pion Inc., Billerica, MA, USA). Πρόκειται για υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7,4 και οσμωτικότητα 43 mOsm/kg.

Ταυροχολικό νάτριο, καθαρότητας 99,5% (Prodotti Chimici e Alimentari S.p.A., Basaluzzo, AL, Italy)

Χλωριούχο νάτριο (Riedel-de Haën GmbH, Seelze, Germany)

Υδροξείδιο του νατρίου στερεό (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany)

Υλικά

Πιπέτα Transferpette®-12, 30-300 µl (Brandtech Scientific Inc., Essex, CT, USA)

Πιπέτες Finnpiquette 5-40 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml (Labsystems)

Ρύγχη για πιπέτες, 5-40 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

Υμένιο παραφίνης “M” (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA)

Φιαλίδια 150 µl για μέτρηση οσμωτικότητας (Knauer, Berlin, Germany)

Πλάκες 96 φρεατίων PAMPA με μαγνητικούς αναδευτήρες (PN:110212, 120551 – Pion Inc., Billerica, MA, USA)

B.2.2 Πειράματα με Caco-2 κυτταρικές σειρές

Όργανα

Αναλυτικός ζυγός (Excellence XS 105 Dual Range - Mettler Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland)

Ανάστροφο μικροσκόπιο (Olympus CKX 41 - Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany)

Αντλία κενού (Vakuskan R - SKAN AG, Allschwill, Switzerland)

Αυτόκαυστο (Varioklav[®] 500 - H & P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Germany)

Επωαστής για καλλιέργεια κυττάρων (Heraus Heracell 150 - Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany)

Επωαστής εντός του οποίου λειτουργούσε ο οριζόντιος αναδευτήρας (TH15 - Edmund Bühler GmbH, Tübingen & Hechingen, Germany)

Κλίβανος αποστείρωσης (Heraeus UT 6 P - Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany)

Στήλη χρωματογραφίας Nucleodur 100-5 C18 ec (CC 125x2 mm - Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland)

Στήλη χρωματογραφίας Nucleodur Sphinx RP (5 μm, CC 125/2 - Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland)

Στήλη χρωματογραφίας Nucleodur C18 Pyramid (5μm, EC 250/2 - Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland)

Στήλη χρωματογραφίας Agilent Eclipse XDB-C8 (150×4.6 mm, 5 μm)

Ομογενοποιητής (Polytron[®] PT3000 - Kinematica AG, Littau, Switzerland)

Οριζόντιος αναδευτήρας (KS15 - Edmund Bühler GmbH, Tübingen & Hechingen, Germany)

Πάγκος νηματικής ροής αέρα (Polaris 48 - SKAN AG, Allschwill, Switzerland)

Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (RE 120, Büchi, Flawil, Switzerland)

Πεχάμετρο (827 pH lab - Metrohm AG, Herisau, Switzerland)

Συσκευή περιδίνησης (IKA[®] Vortex Genius 3 - Scientific Industries INC., USA)

Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης Agilent Technologies 1200 Series αποτελούμενο από αντλία G1312A, ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού G1314B VWD, ανιχνευτή MS G1946C, αυτόματο δειγματολήπτη G1367B, απαερωτή G1379B και λογισμικό σύστημα ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Φυγόκεντρος για σωληνάκια Eppendorf 1,5 ml (5415R - Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Φυγόκεντρος για σωληνάκια Falcon 15 ml (5810R - Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Pipette-boy (Automatic-Sarpette[®] - Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

Thermomixer (Thermomixer comfort 1.5 ml, - Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hechingen, Germany)

Ultrasonic Disintegrator (Branson Sonifier 250 100-132-868, output control: 2 / duty cycle: 30% - Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA)

Ultrasonic Disintegrator - θάλαμος (Sonifier Sound Enclosure, model SSE1 - Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA)

Voltohmeter για μέτρηση της TEER (EVOMX - World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA)

Voltohmeter - θάλαμος (Endohm-24SNAP - World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA)

Αντιδραστήρια

Αιθανόλη 70% (PROL 83801 410 – VWR International, Fontenay sous Bois, France)

Αιθανόλη 96% (PN: 82352-150 – Schweizerhall Chemie AG, Basel, Switzerland)

Ακετονιτρίλιο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

L-Γλουταμίνη, στερεό (PN: G8540-25G - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

L-Γλουταμίνη, υγρό (200 mM, 29,2 mg/ml, PN: 25030-024 - GIBCO® Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)

D-(+)-Γλυκόζη (PN: G021-1KG - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

Ελαϊκό νάτριο καθαρότητας 88,9% (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)

Θρυψίνη-EDTA διάλυμα (0,25% θρυψίνη, 2,65 mM EDTA 4Na) (sterile, PN: 35400-027 - GIBCO® Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)

Λεκιθίνη αβγού, Lipoid E PC S, καθαρότητας 96,86% σε φωσφατιδυλοχολίνη (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)

Λεκιθίνη σόγιας Lipoid S 100 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)

Μεθανόλη, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Μυρμηκικό αμμώνιο (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

1-Μονοελαϊκός γλυκερινεστέρας (RYLO MG 19 Pharma - Danisco, Brabrand, Denmark)

Νερό βαθμού αναλυτικής καθαρότητας HPLC, προερχόμενο από συσκευή Purite Select MP 800/IT (Omnilab, Mettmenstetten, Switzerland)

Οξικό οξύ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

Ταυροχολικό νάτριο, καθαρότητας 99,5% (Prodotti Chimici e Alimentari S.p.A., Basaluzzo, AL, Italy)

Τριφθοροξικό οξύ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

Χλωριούχο νάτριο (PN: 71378 – Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)

Υδροξείδιο του νατρίου, διάλυμα 1 M (PN: 35256 - Riedel-de Haën GmbH, Seelze, Germany)

Υδροξείδιο του νατρίου, στερεό (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

DMEM, υγρό (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (sterile, PN: 31053-028 - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

DMEM βάση, στερεό που δεν περιείχε ερυθρό φαινόλης, πυρουβικό νάτριο, FBS, ή NaHCO_3 (DMEMbase - Dulbecco's Modified Eagle Medium base) (PN: D5030-10X1L - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) (αναλυτικά η σύσταση:

http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/d5030pis.Par.0001.File.tmp/d5030pis.pdf)

DMSO (dimethylsulfoxide) (PN: 41639 - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) με Ca^{2+} , Mg^{2+} (sterile, PN: D8662 - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+} (sterile, PN: D8662 - GIBCO[®] Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)

FBS (foetal bovine serum – εμβρυικός βόειος ορός) (Heat inactivated, South American origin, PN: 10500-064 - GIBCO[®] Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (PN: 54461 - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland)

NEAA (non essential amino acids) (περιέχει L-Αλανίνη, L-Ασπαραγίνη, L-Ασπαραγινικό οξύ, L-Γλουταμικό οξύ, Γλυκίνη, L-Προλίνη, L-Σερίνη) (sterile, PN: 11140-035 - GIBCO[®] Invitrogen Corporation, Auckland, New Zealand)

Υλικά

Αποστειρωμένοι ηθμοί διήθησης (Supor[®]-200, 47 mm, 0,2 μm - Gelman Sciences, Michigan, USA – Pall corporation)

Αποστειρωμένες πιπέτες 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany)

Εργαλείο απόξεσης κυττάρων (BD Falcon™, 18 cm handle, 1.8 cm blades, sterile - BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA)

Καπάκια για φιαλίδια HPLC (PN: 5511030300 - Schmidlin Labor + Service AG, Neuheim, Switzerland)

Κυτταρική σειρά Caco-2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)

Πιπέτες Eppendorf 1-20 μl, 10-100 μl, 50-250 μl, 200-1000 μl, 500-2500 μl (Vaudaux-Eppendorf, Schönenbuch, Switzerland)

Πιπέτες Pasteur (Volac, 230 mm - Poulten & Graf LTD, Barking, England)

Πλάκες φρεατίων Transwell®, με έξι φρεάτια μεταφοράς ανά πλάκα, έκταση επιφάνειας πολυκαρβονικής μεμβράνης 4,71 cm² (Costar 3412, 0,4 μm polycarbonate membrane, 24 mm insert, tissue culture treated, sterile, polystyrene plates - Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

Πολυκαρβονικοί ηθμοί 0,4 μm, 0,2 μm, 0,1 μm (Nuclepore Track-Etch Membrane, Sterico, Wangen, Switzerland)

Ρύγχι για πιπέτες, 2-200 μl, 50-1000 μl, 500-2500 μl (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Σωληνάκια φυγοκέντρησης 1,5 ml (σωληνάκια Eppendorf) (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

Σωλήνες φυγοκέντρησης 15 ml και 50 ml (Cellstar® PP-test tubes, sterile - BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA)

Τρυβλία Petri, 92×17 mm, έκτασης επιφάνειας 56,72 cm² (Nunclon™ Δ Surface Sterile R - Nunc A/S, Roskilde, Denmark)

Φιαλίδια HPLC χωρητικότητας 1 ml (PN: 5511251054 - Schmidlin Labor + Service AG, Neuheim, Switzerland)

B.3 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ PAMPA

Στα πειράματα με την τεχνική PAMPA επιτυγχάνονταν συνθήκες δεξαμενής με την παρουσία του επιφανειοδραστικού στο διαμέρισμα-δέκτης. Δεν έγιναν πειράματα με λεβοβιρίνη, καθώς θεωρήθηκε ότι ως L-ισομερές της ριμπαβιρίνης η συμπεριφορά της σε ένα πείραμα που μελετά μόνο τη μεταφορά με παθητική διάχυση θα είναι ίδια με της ριμπαβιρίνης.

B.3.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε Prisma™ HT

Αρχικά, έγιναν πειράματα με τη δαναζόλη. Για την παρασκευή του διαλύματος δαναζόλης αρχικά διαλύθηκε 1 mg σε 10 ml DMSO και ακολούθησε αραιώση 1:100 με Prisma™ HT. Στη συνέχεια, έγινε περιδίνηση, φυγοκέντρωση (16000×g, 15 min, 25 °C) και παραλαβή της υπερκείμενης φάσης για χρήση στο διαμέρισμα-δότης. Η συγκέντρωση του διαλύματος μετρήθηκε με HPLC (Παράρτημα 3). Στο διαμέρισμα-δότης (κάτω) (Σχήμα A2.B) τοποθετήθηκαν 200 μl διαλύματος δαναζόλης σε Prisma™ HT. Στη συνέχεια, διαβράχθηκε το PVDF υλικό του φρεατίου με 5 μl διαλύματος GIT-0 Lipid (20% λεκιθίνη σόγιας διαλυμένη σε n-δωδεκάνιο) της Pion και συνδέθηκε το πάνω με το κάτω μέρος της πλάκας φρεατίων. Στο διαμέρισμα-δέκτης (πάνω) (Σχήμα A2.B) προστέθηκαν 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (acceptor sink buffer, ASB). Η ωσμωτικότητα του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης ρυθμίστηκε ίση με του διαλύματος δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης, προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα NaCl. Η επιλογή του ASB καθώς και η ρύθμιση της ωσμωτικότητας στο διαμέρισμα-δέκτης βασίστηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα διαπερατότητας της δαναζόλης (Παράρτημα 2). Έπειτα, η πλάκα φρεατίων τοποθετήθηκε στη συσκευή ανάδευσης Gut-Box™ (Σχήμα A.3), ρυθμίστηκε η μη αναδευόμενη υδάτινη στιβάδα στα 40 μm (Lennernäs, 1998 και Levitt et al., 1990) και άρχισε η ανάδευση των κάτω διαμερισμάτων. Τις χρονικές στιγμές 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min μετά την έναρξη του πειράματος αφαιρέθηκαν 200 μl δείγματος από το διαμέρισμα-δέκτης και 200 μl δείγματος από το διαμέρισμα-δότης (διαφορετικού κάθε χρονική στιγμή φρεατίου) για ανάλυση στην HPLC (Παράρτημα 3). Το πείραμα είχε διάρκεια τόση, ώστε να επέλθει plateau στις συγκεντρώσεις στο διαμέρισμα-δέκτης και άρα να ολοκληρωθεί η μεταφορά δαναζόλης. Η απαιτούμενη διάρκεια βρέθηκε με προκαταρκτικό πείραμα. Επίσης, σε κάθε χρονική στιγμή υπολογίστηκε η

κατακράτηση της δαναζόλης στη μεμβράνη και στα τοιχώματα του φρεατίου, όπως αναφέρεται στο Παράρτημα 2.

Τα πειράματα με τα πρότυπα μόρια υψηλής διαπερατότητας (θεοφυλλίνη, καρβαμαζεπίνη), με τα πρότυπα μόρια χαμηλής διαπερατότητας (ρανιτιδίνη, αμοξικιλίνη) και με τα υπόλοιπα τέσσερα μικρομόρια (Α, Β, Γ και ριμπαβιρίνη) έγιναν με παρόμοιο τρόπο. Για την παρασκευή των διαλυμάτων των λιπόφιλων μορίων (μικρομόρια Α, Β και Γ), αρχικά διαλύθηκε κατάλληλη ποσότητα σε 10 ml DMSO. Ακολούθησε αραιώση 1:100 με Prisma™ HT, περιδίνηση, φυγοκέντρηση (14000 rpm, 15 min, 25 °C), παραλαβή της υπερκείμενης φάσης για χρήση στο διαμέρισμα-δότης και μέτρηση της αρχικής συγκέντρωσης με HPLC (Παράρτημα 3). Για τη ριμπαβιρίνη και όλα τα πρότυπα φάρμακα ελήφθη υπόψη η θεραπευτική δόση για τον υπολογισμό των ποσοτήτων που διαλύθηκαν απευθείας σε Prisma™ HT. Θεωρήθηκε ότι η απλή δόση (όχι η ημερήσια) διαλύεται σε 250 ml ΓΕ υγρών. Το μισό της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε ως αρχική συγκέντρωση.

Η παρακολούθηση της μεταφοράς από το διαμέρισμα-δότης στο διαμέρισμα-δέκτης γινόταν κατά προτίμηση μετρώντας στο διαμέρισμα-δέκτης. Σε περίπτωση που αυτό δεν ήταν δυνατό, η μέτρηση γινόταν στο διαμέρισμα-δότης. Η δειγματοληψία από το διαμέρισμα-δότης (κάτω) γινόταν τρυπώντας τη μεμβράνη, αφού πρώτα είχε αφαιρεθεί το περιεχόμενο του διαμερίσματος-δέκτης. Οι χρονικές στιγμές δειγματοληψίας για ανάλυση στην HPLC ήταν διαφορετικές για κάθε ουσία και προέκυψαν μετά από προκαταρκτικά πειράματα. Η διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκε από 5 h για τη δαναζόλη μέχρι 185 h για το μικρομόριο Γ. Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

B.3.2 Πειράματα διαπερατότητας με τη δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)

Για τα πειράματα διαπερατότητας επιλέχθηκαν συγκεκριμένα ζεύγη δειγμάτων ΕΠ - ΜΦ. Κάθε ζεύγος προερχόταν από εντερικά περιεχόμενα που είχαν συλλεχθεί ορισμένη χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση του γεύματος σε συγκεκριμένο εθελοντή. Η επιλογή του ζεύγους βασίστηκε στην ύπαρξη των απαραίτητων όγκων. Επιπρόσθετα, δεν επελέγησαν δείγματα με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις χολικών οξέων, επειδή έχει αναφερθεί ότι δρουν καταστρεπτικά σε Caco-2 κυτταρικές

μονοστιβάδες (Ingels et al., 2002), πιθανότατα λόγω της έλλειψης βλέννας. Αυτός ο παράγοντας ελήφθη υπόψη, καθώς χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα ΕΠ και ΜΦ τόσο για τα πειράματα με την τεχνική PAMPA όσο και με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών σειρών. Τελικά, επελέγησαν για πειράματα διαπερατότητας 18 ζεύγη δειγμάτων ΕΠ – ΜΦ, των οποίων τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1.

Τα πειράματα έγιναν όπως περιγράφηκε στο Κεφ. Β.3.1, με τη διαφορά ότι δεν γινόταν δειγματοληψία στο διαμέρισμα-δότης. Τοποθετήθηκαν 200 μl εντερικού περιεχομένου στο διαμέρισμα-δότης, η συγκέντρωση του οποίου ήταν γνωστή (Παράρτημα 1). Στη συνέχεια, διαβράχθηκε το PVDF υλικό του φρεατίου με 5 μl διαλύματος GIT-0 Lipid και συνδέθηκε το πάνω με το κάτω μέρος της πλάκας φρεατίων. Στο διαμέρισμα-δέκτης τοποθετήθηκαν 200 μl ASB, του οποίου η ωσμωτικότητα είχε ρυθμιστεί με NaCl τόση, όση είχε το εντερικό περιεχόμενο στο διαμέρισμα-δότης. Τα φρεάτια αναδεύτηκαν στο Gut-Box[™] (πάχος UWL: 40 μm) και τις χρονικές στιγμές 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300, 480 και 720 min για τα δείγματα ΕΠ και 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480 min για τα δείγματα ΜΦ αφαιρέθηκαν από το διαμέρισμα-δέκτης 200 μl για ανάλυση στην HPLC (Παράρτημα 3). Η διάρκεια των πειραμάτων καθορίστηκε από προκαταρκτικό πείραμα. Λόγω περιορισμένης διαθεσιμότητας όγκων, τα πειράματα έγιναν μια φορά για κάθε δείγμα ΕΠ και ΜΦ.

Β.3.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων

Για την προσομοίωση της μικκυλιακής φάσης των εντερικών περιεχομένων χρησιμοποιήθηκαν τα FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2. Η σημασία της προσομοίωσης του περιβάλλοντος του εντερικού αυλού στη διαπερατότητα μελετήθηκε σε πέντε μικρομόρια, για τα οποία δεν υπάρχουν σαφή in vitro δεδομένα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA, δηλ. στη δαναζόλη, τα μικρομόρια Α, Β, Γ και τη ριμπαβιρίνη. Η μεθοδολογία ήταν όπως περιγράφηκε στο Κεφ. Β.3.1. Στο διαμέρισμα-δότης (κάτω) τοποθετήθηκαν 200 μl διαλύματος μικρομορίου σε FaSSIF-V2 ή FeSSIF-V2. Για την παρασκευή των διαλυμάτων των λιπόφιλων μικρομορίων (δαναζόλη, μικρομόρια Α, Β και Γ) αρχικά διαλύθηκε κατάλληλη ποσότητα μικρομορίου σε 10 ml DMSO. Η ποσότητα ήταν τόση, ώστε να προκύψει συγκέντρωση μικρότερη της

διαλυτότητας σε FaSSIF και FeSSIF. Ακολούθησε αραιώση 1:1000 με FaSSIF-V2 ή FeSSIF-V2, περιδίνηση, φυγοκέντρηση (14000 rpm, 15 min, 25 °C), παραλαβή της υπερκείμενης φάσης για χρήση στο διαμέρισμα-δότης και μέτρηση της αρχικής συγκέντρωσης με HPLC (Παράρτημα 3).

Για τη ριμπαβιρίνη και τα πρότυπα μικρομόρια (όλα υδρόφιλα) ελήφθη υπόψη η θεραπευτική δόση για τον υπολογισμό των επιθυμητών ποσοτήτων που διαλύθηκαν απευθείας σε FaSSIF-V2 ή FeSSIF-V2. Θεωρήθηκε ότι η απλή δόση (όχι η ημερήσια) διαλύεται σε 250 ml ΓΕ υγρών στη διαπεπτική περίοδο (που προσομοιώνεται με το FaSSIF-V2) και σε 800 ml στην περίοδο πέψης (που προσομοιώνεται με το FeSSIF-V2). Το μισό της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε με αυτό τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε ως επιθυμητή συγκέντρωση για τα διαλύματα FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 στο διαμέρισμα-δότης. Στη συνέχεια, διαβράχθηκε το PVDF υλικό του φρεατίου με 5 μl διαλύματος GIT-0 Lipid, συνδέθηκε το πάνω με το κάτω μέρος της πλάκας φρεατίων και στο διαμέρισμα-δέκτης τοποθετήθηκαν 200 μl ASB, του οποίου η ωσμωτικότητα είχε ρυθμιστεί με NaCl τόση, όση είχε το διάλυμα στο διαμέρισμα-δότης. Τα φρεάτια αναδεύτηκαν στο Gut-Box™ (πάχος UWL: 40 μm). Η παρακολούθηση της μεταφοράς από το διαμέρισμα-δότης στο διαμέρισμα-δέκτης γινόταν κατά προτίμηση μετρώντας στο διαμέρισμα-δέκτης. Σε περίπτωση που αυτό δεν ήταν δυνατό, η μέτρηση γινόταν στο διαμέρισμα-δότης. Ειδικά για την περίπτωση της δαναζόλης σε FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 υπολογίστηκε η κατακράτησή της στη μεμβράνη και στα τοιχώματα του φρεατίου για κάθε χρονική στιγμή, όπως αναφέρεται στο Παράρτημα 2.

Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

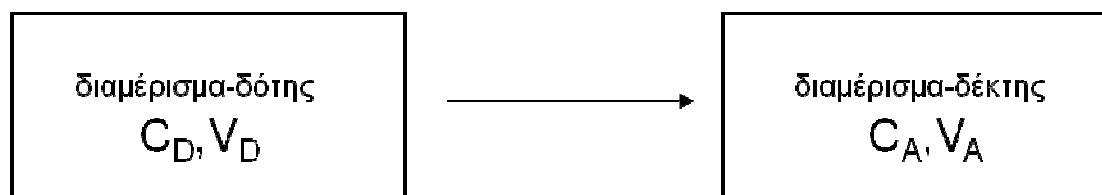
B.3.4 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας

Σύμφωνα με την καθιερωμένη διαδικασία που προτείνεται από την εταιρεία Pion, στο τέλος του πειράματος διαπερατότητας η πλάκα φρεατίων μεταφέρεται σε αναγνώστη πλακών υπεριώδους-ορατού (εάν η ανάλυση είναι εφικτή με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού) και υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας στο διαμέρισμα-δότης ή/και στο διαμέρισμα-δέκτης. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με το λογισμικό PAMPA Explorer™ της Pion και υπολογίζεται ο συντελεστής διαπερατότητας με βάση την τιμή της συγκέντρωσης τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή (single-point estimation). Οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται από το

λογισμικό για τον υπολογισμό αυτό έχουν δημοσιευθεί (Avdeef, 2003). Στην περίπτωση όμως πειραμάτων όπου οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές ή πειραμάτων με μέσα που προσομοιώνουν τη σύσταση των περιεχομένων του εντερικού αυλού, η τεχνική αυτή περιπλέκεται, καθώς, λόγω σύστασης, δεν είναι δυνατή η χρήση αναγνώστη πλακών υπεριώδους. Επιπλέον, η χρήση του λογισμικού PAMPA Explorer™ αυξάνει σημαντικά το κόστος. Λόγω προβλημάτων που εντοπίστηκαν κατά την εφαρμογή ενός πολυδιαμερισματικού μοντέλου, αλλά και κατά την εφαρμογή της μεθόδου που προτείνεται από την εταιρεία Pion (Παράρτημα 2) στην παρούσα εργασία ο υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας έγινε με δύο τρόπους: α) Με προσαρμογή απλού διαμερισματικού μοντέλου σε όλα τα πρωτογενή δεδομένα, και β) χρησιμοποιώντας το γραμμικό μοντέλο και πρωτογενή δεδομένα στα αρχικά στάδια της μεταφοράς.

B.3.4.1 Προσαρμογή απλού διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα

Με βάση το απλό διαμερισματικό μοντέλο υπάρχουν δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα-δότης και το διαμέρισμα-δέκτης (Σχήμα B.1), και πρωτογενή δεδομένα είναι δυνατό να συλλέγονται από το διαμέρισμα-δέκτης ή/και το διαμέρισμα-δότης.



Σχήμα B.1: Σχηματική αναπαράσταση του απλού διαμερισματικού μοντέλου που προσαρμόστηκε στα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς με τη διάταξη PAMPA. C_D είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δότης, C_A η συγκέντρωση του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δέκτης, και $V_D=V_A=200$ μl είναι ο όγκος των περιεχομένων του κάθε διαμερίσματος.

Δειγματοληψίες από το διαμέρισμα-δέκτης

Όταν οι μετρήσεις γίνονται στο διαμέρισμα-δέκτης οι απώλειες στη μεμβράνη (λόγω κατακράτησης) ή/και στα τοιχώματα (λόγω προσρόφησης) θεωρούνται σταθερές και ότι ολοκληρώνονται γρήγορα μετά την έναρξη του πειράματος³.

Λόγω της παρουσίας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης, η μεταφορά θεωρείται ότι συμβαίνει μη αντιστρεπτά, και ο ρυθμός μεταβολής της ποσότητας στο διαμέρισμα-

δέκτης, $\frac{dM_A}{dt}$, δίνεται από την παρακάτω σχέση (Μαχαίρας και Ρέππας, 1997):

$$\frac{dM_A}{dt} = P_{app}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_A} \times M_D \quad \text{Εξίσωση B.1}$$

όπου A είναι η έκταση επιφάνειας της μεμβράνης, $V_A=200$ μl είναι ο όγκος στο διαμέρισμα-δέκτης, M_A η ποσότητα του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δέκτης και M_D η ποσότητα του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δότης.

Από την ισορροπία μάζας ισχύει:

$$M_D = M_{D(0)} - M_A - Q \quad \text{Εξίσωση B.2}$$

όπου $M_{D(0)}$ είναι η αρχική ποσότητα του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δότης, Q είναι η ποσότητα που κατακρατείται στη μεμβράνη ή/και προσροφάται στα τοιχώματα και $V_D=200$ μl είναι ο όγκος του διαμερίσματος-δότης.

Από τις εξισώσεις B.1 και B.2 προκύπτει:

$$\frac{dM_A}{(M_{D(0)} - Q) - M_A} = P_{app}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_A} \times dt \quad \text{Εξίσωση B.3}$$

Ολοκληρώνεται η εξίσωση B.3:

$$\int_0^{M_A} \frac{1}{(M_{D(0)} - Q) - M_A} \times dM_A = P_{app}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_A} \times \int_0^t dt \quad \text{Εξίσωση B.4}$$

³ Στην ουσία γίνεται πολύ γρήγορη πρόσληψη του φαρμάκου στη μεμβράνη και μετά μεταφορά προς το διαμέρισμα-δέκτης, χωρίς να γίνεται μεταφορά προς το διαμέρισμα-δότης. Το «σύστημα» μεμβράνη - διαμέρισμα-δότης λειτουργεί ως ένα διαμέρισμα, όπου ένα μέρος της ουσίας «χάνεται» (κατακρατείται) στη μεμβράνη ή/και στα τοιχώματα και δεν μετράται.

και προκύπτει⁴:

$$M_A = (M_{D(0)} - Q) \times (1 - e^{-\frac{P \times A}{V_A} \times t})$$

Εφόσον $M_A = C_A \times V_A$ και $V_D = V_A$, τελικά ισχύει:

$$C_A = \frac{M_{D(0)} - Q}{V_D} \times (1 - e^{-\frac{P \times A}{V_D} \times t}) \quad \text{Εξίσωση B.5}$$

Η εξίσωση B.5 προσαρμόσθηκε στα πρωτογενή δεδομένα με τη βοήθεια του λογισμικού SigmaPlot11.

Δειγματοληψίες από το διαμέρισμα-δότης

Παρακολούθηση της διαπερατότητας με βάση πρωτογενή δεδομένα που έχουν συλλεχθεί στο διαμέρισμα-δότης γίνεται όταν είναι αδύνατη η συλλογή δεδομένων στο διαμέρισμα-δέκτης. Στην περίπτωση αυτή θεωρείται ότι γίνεται μη αντιστρεπτή μείωση της συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δότης και ο ρυθμός μεταβολής της ποσότητας στο διαμέρισμα-δότης, $\frac{dM_D}{dt}$, δίνεται από την παρακάτω σχέση

(Μαχαίρας και Ρέππας, 1997):

$$\frac{dM_D}{dt} = -P_{eff}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_D} \times M_D \quad \text{Εξίσωση B.6}$$

Ολοκληρώνεται η εξίσωση B.6:

$$\int_{M_{D(0)} - Q}^{M_D} \frac{1}{M_D} \times dM_D = -P_{eff}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_D} \times \int_0^t dt$$

και προκύπτει:

⁴ Το σύμβολο P αντιστοιχεί στο P_{app}^{PAMPA} , αλλά γράφτηκε έτσι για καλύτερο οπτικό αποτέλεσμα. Για το συγκεκριμένο μοντέλο ο συντελεστής αυτός είναι P_{app} και ταυτίζεται με τον P_{eff} (Κεφ. Α.5).

$$\ln M_D = \ln(M_{D(0)} - Q) - P_{eff}^{PAMPA} \times \frac{A}{V_D} \times t$$

που μπορεί να γραφτεί και ως:

$$M_D = (M_{D(0)} - Q) \times e^{-\frac{P \times A}{V_D} \times t} \quad \text{Εξίσωση B.7}$$

Εφόσον $M_D = C_D \times V_D$, τελικά ισχύει:

$$C_D = \frac{M_{D(0)} - Q}{V_D} \times e^{-\frac{P \times A}{V_D} \times t} \quad \text{Εξίσωση B.8}$$

Η εξίσωση B.8 προσαρμόστηκε στα πρωτογενή δεδομένα με τη βοήθεια του λογισμικού SigmaPlot 11.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η εξίσωση B.8 είναι ταυτόσημη με την εξίσωση Π2.5, αν η εξίσωση B.8 λυθεί ως προς P, δηλ. $P = -\frac{V_D}{A \times t} \times \ln\left(\frac{M_D}{M_{D(0)} - Q}\right)$ και εφόσον $C_{D(t)} \times V_D = M_D$, $C_{D(0)} \times V_D = M_{D(0)}$, $R \times C_{D(0)} \times V_D = Q$ και $\tau_{lag} = 0$.

B.3.4.2 Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου σε πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν στα αρχικά στάδια της μεταφοράς

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση A.9 (Κεφ. A.5.1), θέτοντας $C_{donor} = C_0$ και $A = 0,3 \text{ cm}^2$. Η εξίσωση αυτή προσαρμόστηκε (SigmaPlot11) στα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν στα αρχικά στάδια μεταφοράς (n=3 σε όλες τις περιπτώσεις). Ανάλογη εξίσωση με την A.9 (Κεφ. A.5.1) χρησιμοποιήθηκε όταν η δειγματοληψία γινόταν στο διαμέρισμα-δότης για τον υπολογισμό του P_{eff}^{PAMPA} , ο οποίος στην περίπτωση της παθητικής μεταφοράς ταυτίζεται με τον P_{app}^{PAMPA} (Κεφ. A.5).

B.4 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ CACO-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΩΝ

B.4.1 Καλλιέργεια κυττάρων – σχηματισμός κυτταρικών μονοστιβάδων στα φρεάτια

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν μέσα σε τρυβλία Petri και επωάζονταν στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα που περιείχε 8% CO₂. Το θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια αποτελούνταν από DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, που δεν περιείχε ορό βόειου εμβρύου (foetal bovine serum, FBS) ή πυρουβικό νάτριο. Στο μέσο αυτό προσετίθετο 0,9% v/v L-γλουταμίνη, 1% v/v διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων (MEM NEAA 100x) και 10% v/v FBS. Το θρεπτικό υλικό άλλαζε κάθε τέσσερις ημέρες και τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο, όταν έφταναν να καλύπτουν το 90% της επιφάνειας της βάσης του τρυβλίου. Αυτή η διαδικασία μεταφοράς ονομάζεται πέρασμα (passage) και γίνεται για να φτάσουν τα κύτταρα στην κατάλληλη φάση ανάπτυξης (ηλικία) για πειράματα διαπερατότητας (π.χ. σε φάση κατά την οποία έχουν εκφραστεί πλήρως οι πιθανοί φορείς για τη μεταφορά της ουσίας). Η διαδικασία κάθε περάσματος είχε ως εξής: αφού τα τρυβλία Petri που περιείχαν κύτταρα σε θρεπτικό υλικό φέρονταν από τον επωαστή σε πάγκο νηματικής ροής αέρα (laminar air-flow), αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό με τη χρήση αντλίας κενού. Προσθέτονταν 6 ml φυσιολογικού ορού DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) που περιείχε Ca²⁺ και Mg²⁺, ώστε να ξεπλυθούν τα τρυβλία, εν συνεχεία αφαιρούνταν, και προσετίθετο 1 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Τα τρυβλία επωάζονταν για 3 min και μετά, στον πάγκο, προσετίθεντο 6 ml θρεπτικού υλικού. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφερόταν σε πλαστικά σωληνάκια των 15 ml τα οποία φυγοκεντρούνταν για 6 min στις 980 rpm. Αφαιρούνταν στον πάγκο το υπερκείμενο υγρό και προσετίθετο θρεπτικό υλικό στο ίζημα, ώστε να επαναιωρηθεί. Στα πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί για 60-65 περάσματα. Για τα περάσματα μέχρι το 60^ο προσθέτονταν 10 ml, ενώ για τα περάσματα 60-65 προσθέτονταν 6 ml. Η χρήση μικρότερου όγκου για τα περάσματα 60-65 γινόταν για να γεμίζει γρηγορότερα η βάση του τρυβλίου και να υπάρχει νέο πέρασμα, άρα και νέες πλάκες για πείραμα, δύο φορές την εβδομάδα. Μετά από ανακίνηση, ώστε να διαλυθεί μέσα στο σωληνάκι πλήρως το ίζημα των κυττάρων,

τοποθετείτο 1 ml σε κάθε νέο τρυβλίο μαζί με 10 ml θρεπτικού υλικού και τα νέα τρυβλία μεταφέρονταν στον επωαστή.

Για τα πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιήθηκαν φρεάτια μεταφοράς (wells) που ήταν κατασκευασμένα από πολυστυρένιο σε εξάδες (Transwell[®]) (Σχήμα A4.A). Η βάση του αποσπώμενου εξαρτήματος στήριξης είναι πολυκαρβονικό υλικό (μέγεθος πόρων 0,4 μm), επί του οποίου τοποθετείται η κυτταρική σειρά (Σχήμα A4.B). Τα κύτταρα τοποθετούνταν στο πολυκαρβονικό υλικό με πυκνότητα 114.000 κύτταρα/cm² και επωάζονταν (37°C, 8% CO₂) για 19 ως 21 ημέρες, οπότε είχε σχηματιστεί πλήρως η κυτταρική μονοστιβάδα και τα φρεάτια ήταν έτοιμα για χρήση σε πειράματα διαπερατότητας. Μέχρι τότε, το θρεπτικό υλικό άλλαζε στο πάνω και στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου μεταφοράς κάθε δύο ημέρες. Κάθε φορά ετοιμάζονταν δύο εξάδες φρεατίων.

B.4.2 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε απλό υδατικό μέσο μεταφοράς (MM)

Το απλό μέσο μεταφοράς (MM) παρασκευαζόταν ως εξής: Ποσότητα DMEM βάσης προστίθετο σε απεσταγμένο νερό, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 8,3 g/l. Στη συνέχεια προστίθεντο γλυκόζη (4,5 g/l), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) ως ρυθμιστικό διάλυμα (4,76 g/l), NaCl (1,987 g/l) και L-γλουταμίνη (0,867 g/l). Το pH ρυθμιζόταν στο 7,4 και το τελικό μέσο διηθούνταν υπό άσηπτες συνθήκες.

B.4.2.1 Πειράματα με δαναζόλη

Τα πειράματα αυτά έγιναν για να διευκρινισθεί:

- α) ο χρόνος για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου που είναι σε επαφή με την πάνω (ενδοαυλική) πλευρά (apical side) της κυτταρικής μονοστιβάδας και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου που είναι σε επαφή με την κάτω πλευρά (basolateral side) της κυτταρικής μονοστιβάδας
- β) η πιθανή ύπαρξη φορέα για τη μεταφορά της δαναζόλης μέσω της κυτταρικής μονοστιβάδας, και
- γ) η πιθανή βιομετατροπή της δαναζόλης κατά τη διέλευσή της από την κυτταρική μονοστιβάδα.

Αρχικά, παρασκευαζόταν διάλυμα της δαναζόλης σε MM με ονομαστική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$, διαλύοντας 1 mg δαναζόλης σε DMSO και αραιώνοντας στη συνέχεια 100 μl από το διάλυμα αυτό με 9,9 ml MM. Φυγοκεντρώνταν το τελικό διάλυμα στις 16000 $\times\text{g}$ για 15 min και λαμβανόταν το υπερκείμενο υγρό, το οποίο και εφαρμόζονταν στα κύτταρα. Η συγκέντρωσή του μετρούνταν στην αρχή και κατά τη διάρκεια του πειράματος, εξασφαλίζοντας ότι δεν υπάρχει καθίζηση.

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, μετριόταν η TEER της κυτταρικής μονοστιβάδας για να επιβεβαιωθεί ότι οι μονοστιβάδες που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν είχαν αντίσταση μεταξύ των επιθυμητών τιμών 500 και 650 Ωcm^2 . Η μέτρηση επαναλαμβανόταν στο τέλος του πειράματος για να επαληθευθεί ότι η ακεραιότητα της μονοστιβάδας είχε διατηρηθεί καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Η πρώτη μέτρηση της TEER έγινε ως εξής: αφού μεταφέρθηκαν τα φρεάτια από τον επωαστή στον πάγκο νηματικής ροής αέρα, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και ξεπλύθηκαν τα φρεάτια μεταφοράς με DPBS που περιείχε Ca^{2+} και Mg^{2+} . Αφαιρέθηκε το DPBS και προστέθηκε 1,6 ml MM στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου και 2,8 ml MM στο κάτω. Επωάστηκαν τα φρεάτια για τουλάχιστον 1 h στους 37°C και στη συνέχεια μετρήθηκε η αρχική TEER.

Μετά τη μέτρηση της αντίστασης, αφαιρέθηκε το MM και από τα δύο διαμερίσματα του φρεατίου και ξεκίνησε το πείραμα διαπερατότητας. Τα πειράματα με δαναζόλη σε MM πραγματοποιήθηκαν και στις δύο κατευθύνσεις (πάνω προς κάτω και κάτω προς πάνω διαμέρισμα του φρεατίου). Σε τρία φρεάτια μεταφοράς (n=3) προστέθηκαν 1,6 ml διαλύματος δαναζόλης σε MM στο πάνω διαμέρισμα και 2,8 ml MM στο κάτω διαμέρισμα. Για τη μελέτη της μεταφοράς προς την αντίθετη κατεύθυνση τοποθετήθηκαν στα άλλα τρία φρεάτια της εξάδας 2,8 ml διαλύματος δαναζόλης σε MM στο κάτω και 1,6 ml MM στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Τα φρεάτια ανακινούνται σε οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα για 180 min (75 rpm, 37 °C). Σε 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, και 180 min μετά την έναρξη της ανακίνησης ελήφθησαν δείγματα (εντός του πάγκου νηματικής ροής) των 100 μl και από τα δύο διαμερίσματα του φρεατίου για ανάλυση στην HPLC (Παράρτημα 3). Ο όγκος του δείγματος που αφαιρούνταν δεν αντικαθιστούνταν. Στο τέλος του πειράματος προστέθηκε 1 ml MM στο πάνω διαμέρισμα (όσο είχε αφαιρεθεί κατά τη διάρκεια του πειράματος) και μετρήθηκε η τελική TEER της μονοστιβάδας.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων που ελήφθησαν από το διαμέρισμα-δέκτης καταγράφηκε το φάσμα μαζών (MS, λειτουργία scan) από m/z 100 μέχρι m/z 800 στο έκλουσμα της HPLC για την ανίχνευση μεταβολιτών της δαναζόλης (de Oca Porto et al., 2006 και Van Eenoo et al., 2006).

Μετά το τέλος του πειράματος διαπερατότητας και τη μέτρηση της τελικής TEER, έγινε λύση των κυττάρων, ώστε να μετρηθεί η δεσμευμένη εντός των κυττάρων ποσότητα δαναζόλης. Η λύση ήταν μια διαδικασία συνεχόμενων κύκλων ψύξης-απόψυξης, οι οποίοι κατέστρεψαν τα κύτταρα και οδήγησαν στην απελευθέρωση της δαναζόλης. Αρχικά, αφαιρέθηκαν τα περιεχόμενα όλων των φρεατίων και πλύθηκαν τα κύτταρα με DPBS, που δεν περιείχε Ca^{2+} ή Mg^{2+} (3,5 ml στο πάνω διαμέρισμα, 4 ml στο κάτω διαμέρισμα). Έπειτα, μεταφέρθηκαν τα αποσπώμενα εξαρτήματα των φρεατίων σε τρυβλία Petri, προστέθηκαν 0,3 ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA, και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 15 min. Προστέθηκε 1 ml θρεπτικού υλικού στα πάνω διαμερίσματα των φρεατίων και καταστράφηκε η κυτταρική μονοστιβάδα ξύνοντας με εργαλείο απόξεσης τα κύτταρα, ώστε να αποκολληθούν από το πολυκαρβονικό υλικό. Συλλέχθηκε το εναιώρημα των κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 ml, ο οποίος φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 1000 rpm. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε η υπερκείμενη φάση, επαναιωρήθηκε το σφαιρίδιο που είχε καθιζήσει σε 750 μL απιονισμένου νερού 37 °C και μεταφέρθηκε το εναιώρημα σε σωληνάκι Eppendorf του 1,5 ml. Ακολούθησε περιδίνηση και ψύξη στον υπερκαταψύκτη στους -80 °C για τουλάχιστον 15 min. Μετά, θερμάνθηκαν τα σωληνάκια υπό ανάδευση (στο thermomixer) στους 37 °C στις 1400 rpm μέχρι να λειώσει ο πάγος, προστέθηκαν 750 μl ακετονιτρίλιο, και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4 °C για 20 min. Ξαναθερμάνθηκαν τα σωληνάκια υπό ανάδευση για 10 min στους 37 °C στις 1400 rpm, ακολούθησε φυγοκέντηση και η υπερκείμενη φάση ακετονιτριλίου-νερού μεταφέρθηκε σε άλλο σωληνάκι Eppendorf του 1,5 ml, το οποίο φυλάχθηκε στους 4 °C. Στο σφαιρίδιο που έμεινε προστέθηκαν 750 μl ακετονιτριλίου και το εναιώρημα υποβλήθηκε σε υπέρηχους. Ακολούθησε θέρμανση στο thermomixer στους 37 °C στις 1400 rpm για 5 min, φυγοκεντρήθηκε το εναιώρημα στις 16000×g και η υπερκείμενη φάση (ακετονιτρίλιο) μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάκι Eppendorf του 1,5 ml. Το σφαιρίδιο που είχε παραμείνει μετά τη φυγοκέντρηση χειρίστηκε εκ νέου όπως πριν (υπέρηχοι, θέρμανση, φυγοκέντρηση, εξάτμιση υπερκείμενου υγρού). Η επανάληψη της διαδικασίας αυτής είχε σκοπό να απελευθερώσει όση δαναζόλη είχε μείνει εντός των κυττάρων μετά την πρώτη φορά.

Οι υπερκείμενες φάσεις από τις δύο φυγοκεντρήσεις ενώθηκαν στο ίδιο σωληνάκι, εξατμίστηκαν πλήρως με ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια προστέθηκε στο σωληνάκι το μίγμα ακετονιτριλίου-νερού που είχε φυλαχθεί στους 4 °C. Το σωληνάκι θερμάνθηκε στο thermomixer για 3 min στους 37 °C στις 1400 rpm, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 25 min και τελικά αφαιρέθηκε από την υπερκείμενη φάση δείγμα 100 μl προς ανάλυση.

Παράλληλα, έγινε και λευκό πείραμα, με σκοπό να ελεγχθεί αν, ακολουθώντας τη διαδικασία λύσης των κυττάρων, λαμβάνεται στο τέλος όλη η ποσότητα εγκλωβισμένης δαναζόλης. Για το λευκό πείραμα ελήφθησαν φρεάτια που δεν είχαν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα διαπερατότητας και ακολουθήθηκε η διαδικασία μέχρι το σημείο που επαναιωρήθηκε πρώτη φορά το σφαιρίδιο. Στο σημείο αυτό προστέθηκε γνωστή ποσότητα δαναζόλης διαλυμένη σε DMSO (1 μg/ml) στα σφαιρίδια και η διαδικασία λύσης συνεχίστηκε κατά τα γνωστά. Τελικά αποδείχτηκε ότι η διαδικασία λύσης των κυττάρων ήταν αξιόπιστη, αφού παραλήφθηκε το 100% της δαναζόλης που είχε προστεθεί.

Μετά τη λύση των κυττάρων και την παραλαβή της εγκλωβισμένης δαναζόλης, παρελήφθη και η δαναζόλη που είχε προσροφηθεί στα τοιχώματα των φρεατίων μεταφοράς. Για το σκοπό αυτό, προστέθηκαν 1,6 ml ακετονιτριλίου στο πάνω και 2,8 ml ακετονιτριλίου στο κάτω διαμέρισμα και τα φρεάτια σκεπάστηκαν με ελαστικό υμένιο παραφίνης, ώστε να εμποδιστεί πιθανή εξάτμιση. Τα φρεάτια ανακινήθηκαν στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα για 45 min (75 rpm, 37 °C) και στο τέλος ελήφθησαν 500 μl και από τα δύο διαμερίσματα κάθε φρεατίου, προστέθηκαν 500 μl νερού και το δείγμα αναλύθηκε ως προς δαναζόλη.

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα παραλαβής της προσροφημένης δαναζόλης από τα τοιχώματα των φρεατίων μεταφοράς έγινε λευκό πείραμα. Επαναλήφθηκε το πείραμα διαπερατότητας δαναζόλης από MM, με τη διαφορά ότι πραγματοποιήθηκε σε φρεάτιο χωρίς κυτταρική μονοστιβάδα. Στο τέλος υπολογίστηκε η συνολική ποσότητα δαναζόλης στα τοιχώματα, στα δείγματα που είχαν αφαιρεθεί και όση είχε απομείνει στο MM στα δύο διαμερίσματα του φρεατίου. Η ανάκτηση προέκυψε ότι ήταν $91,31 \pm 9,13\%$ και η διαδικασία παραλαβής της δαναζόλης από τα τοιχώματα θεωρήθηκε αξιόπιστη.

B.4.2.2 Πειράματα με τα υπόλοιπα μικρομόρια

Επειδή τα μικρομόρια A, B και Γ είναι ουσίες χαμηλής διαλυτότητας στο νερό, η παρασκευή των διαλυμάτων τους σε MM έγινε σε τρία βήματα. Πρώτα, τα μικρομόρια διαλύθηκαν σε DMSO και στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος αυτού σε MM, ώστε να επιτευχθεί ονομαστική συγκέντρωση περίπου όση η διαλυτότητα των μικρομορίων σε νερό. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρωση στις 16000×g για 20 min και το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διαπερατότητας. Όλα τα διαλύματα σε MM που τοποθετήθηκαν στο διαμέρισμα-δότης μετρήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν σταθερή συγκέντρωση για τουλάχιστον 3 h στους 37 °C.

Η ριμπαβιρίνη και η λεβοβιρίνη (ευδιάλυτες στο νερό) διαλύθηκαν απευθείας σε MM, όπως έγινε και για τα υδρόφιλα πρότυπα φάρμακα αμοξικιλίνη και ρανιτιδίνη (και τα δύο χαμηλής διαπερατότητας). Για τα πρότυπα μόρια καρβαμαζεπίνη και προπρανολόλη (και τα δύο υψηλής διαπερατότητας) οι συντελεστές διαπερατότητας είχαν ήδη μετρηθεί στο ίδιο εργαστήριο με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία (Schneider, 2008). Ο υπολογισμός των επιθυμητών ποσοτήτων που διαλύθηκαν έγινε λαμβάνοντας υπόψη τη θεραπευτική δόση, με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στα αντίστοιχα πειράματα με την τεχνική PAMPA (κεφ. B.3.3).

Τα πειράματα διαπερατότητας με μικρομόρια σε MM πραγματοποιήθηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις (πάνω προς κάτω διαμέρισμα και κάτω προς πάνω διαμέρισμα) του φρεατίου. Τοποθετήθηκαν σε τρία φρεάτια 1,6 ml διαλύματος του μικρομορίου σε MM στο πάνω διαμέρισμα και 2,8 ml MM στο κάτω. Για το πείραμα προς την αντίθετη κατεύθυνση, τοποθετήθηκαν στα άλλα τρία φρεάτια της εξάδας 2,8 ml διαλύματος του μικρομορίου σε MM στο κάτω διαμέρισμα και 1,6 ml MM στο πάνω. Οι πλάκες φρεατίων ανακινούνταν στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα (50 rpm, 37 °C) και εντός του πάγκου νηματικής ροής λαμβάνονταν δείγματα των 100 μl για ανάλυση και από τα δύο διαμερίσματα τις χρονικές στιγμές 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 και 300 min. Οι χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των δειγμάτων στην HPLC παρουσιάζονται στο Παράρτημα 3. Ο αφαιρούμενος όγκος δεν αντικαθίστατο. Στο τέλος του πειράματος (300 min) προστέθηκε 1 ml MM στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου και επιβεβαιώθηκε η διατήρηση της αρχικής TEER.

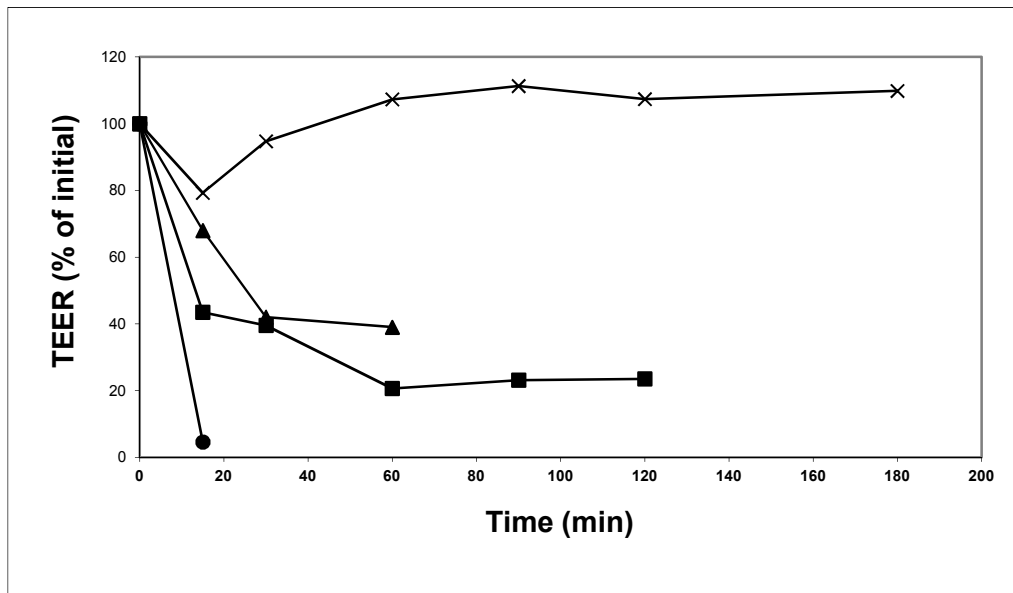
Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν.

B.4.3 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)

B.4.3.1 Αντοχή κυττάρων στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ

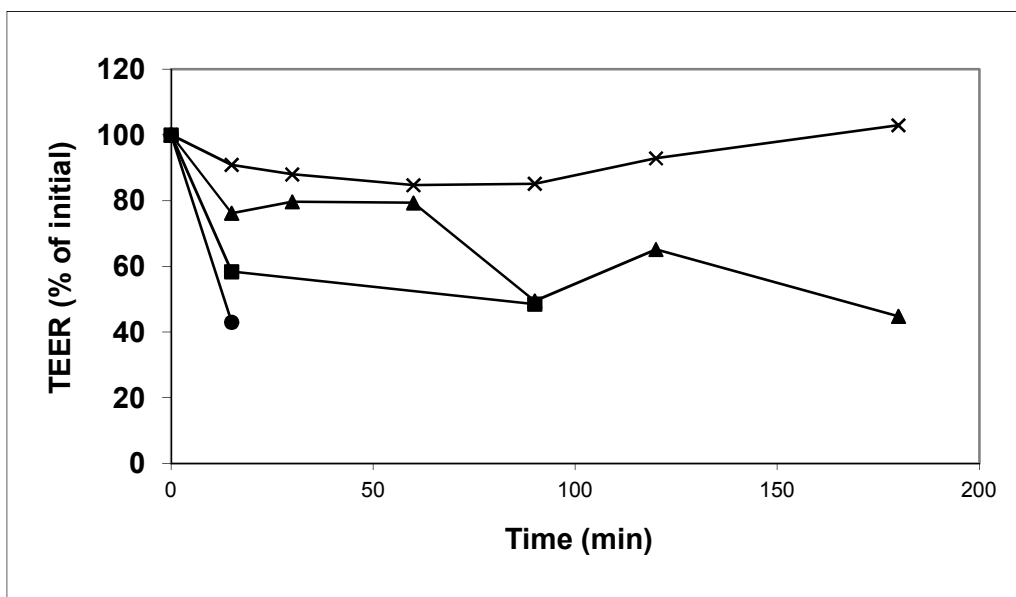
Πριν ξεκινήσουν τα πειράματα διαπερατότητας με τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ, έπρεπε να ελεγχθεί αν τα δείγματα αυτά ήταν τοξικά για τα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη και τα χολικά άλατα δρουν τοξικά πάνω στα κύτταρα (Hovgaard et al., 1995 και Ingels et al., 2002, αντίστοιχα). Για το σκοπό αυτό μετρήθηκε η TEER μετά από εφαρμογή δειγμάτων χωρίς αραιώση και μετά από εφαρμογή δειγμάτων αραιωμένων με MM. Η αραιώση με MM έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν σε πειράματα διαπερατότητας με εντερικά υγρά που έχουν αναρροφηθεί στη διαπεπτική περίοδο (Brouwers et al., 2006).

Αρχικά, προστέθηκαν 2,4 ml MM στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου και 0,8 ml δείγματος ΜΦ χωρίς αραιώση στο πάνω διαμέρισμα. Είχε βρεθεί με δοκιμές ότι ο ελάχιστος όγκος υγρού που μπορεί να εφαρμοστεί στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου, ώστε να μην μένει η κυτταρική μονοστιβάδα χωρίς υγρό κατά την ανάδευση, είναι 0,8 ml. Ανακινήθηκε η πλάκα στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα (50 rpm, 37 °C, 15 min), προστέθηκε 0,8 ml MM στο πάνω διαμέρισμα (απαιτείται όγκος στο πάνω διαμέρισμα 1,6 ml τουλάχιστον για να γίνει η μέτρηση με το όργανο) και μετρήθηκε η TEER της κυτταρικής μονοστιβάδας. Η ακεραιότητα δεν είχε διατηρηθεί. Επαναλήφθηκε η διαδικασία με το ίδιο δείγμα ΜΦ σε αυξανόμενες αραιώσεις, μέχρι να βρεθεί ότι η TEER διατηρούνταν για 30, 60, 90, 120 και 180 min πάνω από το 75% της αρχικής τιμής. Αφού έγιναν δοκιμές με αραιώσεις 1:2, 1:4, και 1:8, βρέθηκε ότι την ακεραιότητά της για 180 min η κυτταρική μονοστιβάδα τη διατηρεί όταν εφαρμοστούν δείγματα ΜΦ αραιωμένα 1:8. Στο Σχήμα B.1 φαίνεται η TEER σε συνάρτηση με το χρόνο για τις διάφορες αραιώσεις.



Σχήμα Β.1: Επίδραση της αραιώσης με ΜΜ δείγματος ΜΦ (#8-120 min, Παράρτημα 1) στην τιμή της TEER Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων. Σύμβολα: × αραιώση 1:8, ▲ αραιώση 1:4, ■ αραιώση 1:2, ● χωρίς αραιώση.

Στη συνέχεια, επαναλήφθηκε η διαδικασία με διάφορα δείγματα ΕΠ που είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς αραιώση είτε αραιώθηκαν 1:2, 1:8 και 1:16. Η αραιώση που επέτρεψε στην κυτταρική μονοστιβάδα να διατηρήσει την ακεραιότητά της ήταν η 1:16. Στο Σχήμα Β.2 φαίνεται η σχέση της TEER με το χρόνο για τις διάφορες αραιώσεις.



Σχήμα Β.2: Επίδραση της αραιώσης με ΜΜ των δειγμάτων ΕΠ στην τιμή της TEER Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων. Σύμβολα: × αραιώση 1:16 του δείγματος #5-120 min, ▲ αραιώση 1:8 του δείγματος #2-60 min, ■ αραιώση 1:2 του δείγματος #1-90 min, ● χωρίς αραιώση (δείγμα #1-90 min).

Το συμπέρασμα αυτών των πειραμάτων ήταν ότι τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ έπρεπε να αραιωθούν προτού χρησιμοποιηθούν σε πειράματα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυττάρων. Αποφασίστηκε και στα δείγματα ΜΦ η αραιώση να είναι 1:16, ώστε όλα τα δείγματα να έχουν αραιωθεί το ίδιο.

Β.4.3.2 Σύσταση των περιεχομένων στο διαμέρισμα-δέκτης όταν στο διαμέρισμα-δότης έχει τοποθετηθεί δείγμα ΕΠ ή ΜΦ

Για τα πειράματα με δαναζόλη σε ΕΠ ή ΜΦ τοποθετούνταν στο διαμέρισμα-δέκτης του φρεατίου διασπορά λιποσωμάτων. Αυτό έγινε με στόχο η δαναζόλη να έχει την ίδια διαλυτότητα στα δύο διαμερίσματα του φρεατίου και επομένως στην κατάσταση ισορροπίας οι συγκεντρώσεις της δαναζόλης στο πάνω και στο κάτω διαμέρισμα να είναι περίπου ίδιες.

Για τον υπολογισμό των επιθυμητών συγκεντρώσεων λιποσωμάτων στο διαμέρισμα-δέκτης όταν στο διαμέρισμα-δότης υπήρχαν δείγματα ΜΦ, χρειαζόταν αρχικά να βρεθεί πόση δαναζόλη μπορεί να δεσμευτεί στα λιποσώματα, δηλ. ο λόγος μάζας προστιθέμενου φαρμάκου προς μάζα λιποσωμάτων (Karitza et al., 2007). Ο λόγος

αυτός υπολογίστηκε μετρώντας την κινητική διαλυτότητα της δαναζόλης στη διασπορά λιποσωμάτων. Ρίχνοντας σταγόνες των 10 μl διαλύματος δαναζόλης σε DMSO (1 mg/ml) σε 1 ml διασποράς λιποσωμάτων γνωστής συγκέντρωσης, η κινητική διαλυτότητα ήταν το σημείο κατά το οποίο εμφανίστηκε πρώτη φορά θόλωμα. Έτσι, σε διασπορά λιποσωμάτων 0,5 mg/ml, άρα σε 500 μg λιποσωμάτων, έπεσαν μέχρι και επτά σταγόνες (70 μg) δαναζόλης χωρίς να εμφανιστεί θόλωμα, ενώ σε διασπορά 0,35 mg/ml θόλωμα παρατηρήθηκε στην έκτη σταγόνα, άρα είχαν δεσμευτεί επιτυχώς περίπου 50 μg δαναζόλης από 350 μg λιποσωμάτων. Από τις δύο δοκιμές αυτές προκύπτει ότι ο λόγος μαζών δαναζόλης : λιποσώματα είναι 1:7. Για τον υπολογισμό της επιθυμητής συγκέντρωσης λιποσωμάτων χρησιμοποιούνταν κάθε φορά η εξίσωση B.9:

$$C_{lip} = C_{S,danazol} \times \frac{1}{16} \times 7 \quad \text{Εξίσωση B.9}$$

όπου C_{lip} είναι η συγκέντρωση λιποσωμάτων και $C_{S,danazol}$ η διαλυτότητα δαναζόλης στη μικκυλιακή φάση. Η διαλυτότητα δαναζόλης σε δείγματα μικκυλιακής φάσης, $C_{S,danazol}$, ήταν γνωστή, καθώς είχε μετρηθεί στα πλαίσια της μεταδιδακτορικής έρευνας που χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «ΕΠΕΑΕΚ II - Πυθαγόρας» (Βερτζώνη, 2006) (Παράρτημα 1).

Για τον υπολογισμό των επιθυμητών συγκεντρώσεων λιποσωμάτων στο διαμέρισμα-δέκτης όταν στο διαμέρισμα-δότης υπήρχαν δείγματα ΕΠ δεν ήταν δυνατός ο ίδιος τρόπος υπολογισμού, εφόσον δεν υπήρχαν τιμές διαλυτότητας της δαναζόλης. Η επιθυμητή συγκέντρωση υπολογίστηκε προσεγγιστικά για μία μέση κατάσταση και χρησιμοποιήθηκε η ίδια για όλα τα πειράματα με ΕΠ. Αρχικά, υπολογίστηκε ο μέσος σχετικός όγκος ελαιώδους φάσης των 18 δειγμάτων (Παράρτημα 1) και βρέθηκε 3,3%. Θεωρώντας πυκνότητα 1 g/ml, προέκυψε μια μέση συγκέντρωση ελαιώδους φάσης 33 mg/ml. Αυτή η συγκέντρωση, διαιρεμένη με την αραιώση, δηλ. $33/16=2,0625$ mg/ml ήταν η συγκέντρωση λιποσωμάτων που χρησιμοποιήθηκε στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

Η διασπορά λιποσωμάτων παρασκευάστηκε με Lipoid S 100 (λεκιθίνη σόγιας). Προστέθηκε 1,55 g Lipoid S 100 σε 50 ml MM και το μίγμα ομογενοποιήθηκε για 5 min στις 15000 rpm. Στη συνέχεια, εξωθήθηκε (extruded) η γαλακτώδης σε εμφάνιση διασπορά μέσω πολυκαρβονικών φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,4 μm (3 διηθήσεις), 0,2 μm (5 διηθήσεις), and 0,1 μm (20 διηθήσεις) με εφαρμογή αζώτου πίεσης 8-10

bar. Στη συνέχεια, η επιθυμητή συγκέντρωση λιποσωμάτων επιτυγχανόταν με κατάλληλη αραιώση με MM.

B.4.3.3 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)

Πριν την έναρξη των πειραμάτων διαπερατότητας, μετρήθηκε η TEER της κυτταρικής μονοστιβάδας, ακριβώς όπως έγινε και στα πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη διαλυμένη σε MM.

Τα πειράματα με δαναζόλη σε δείγματα ΕΠ και ΜΦ πραγματοποιήθηκαν μόνο κατά την κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου, επειδή οι διαθέσιμοι όγκοι δειγμάτων ήταν περιορισμένοι. Έτσι, τοποθετήθηκαν 0,8 ml αραιωμένου (1:16) δείγματος (δηλ. 50 μl δείγματος και 750 μl MM) στο πάνω διαμέρισμα και 2,4 ml διασποράς λιποσωμάτων στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου μεταφοράς. Η συγκέντρωση του αραιωμένου δείγματος είχε μετρηθεί στην HPLC (Παράρτημα 3) πριν την έναρξη του πειράματος. Τα πειράματα διήρκεσαν 180 min και έγιναν εις τριπλούν. Τα φρεάτια ανακινούνταν στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα (75 rpm, 37 °C) και στα 10, 20, 30, 45, 60, 90, και 120 min ελήφθησαν 100 μl δείγματος μόνο από το κάτω διαμέρισμα, χωρίς να αντικατασταθεί ο αφαιρούμενος όγκος. Στα 180 min ελήφθησαν 100 μl τόσο από το κάτω, όσο και από το πάνω διαμέρισμα. Αφού τελείωσε το πείραμα, προστέθηκαν 0,9 ml MM στο πάνω διαμέρισμα (ώστε να υπάρχουν συνολικά 1,6 ml που απαιτούνται για να μετρηθεί TEER) και μετρήθηκε η τελική TEER. Στη συνέχεια, έγινε λύση των κυττάρων και παραλαβή από τα πλαστικά τοιχώματα των φρεατίων, ώστε να μετρήσουμε τη δεσμευμένη εντός των κυττάρων και την προσροφημένη στα τοιχώματα ποσότητα δαναζόλης. Η διαδικασία ήταν ακριβώς η ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε μετά τα πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης σε MM (κεφ. B.3.2).

Για το δείγμα ΕΠ #2-90 min και για το δείγμα ΜΦ #2-210 min έγιναν ακριβώς ίδια πειράματα διαπερατότητας, με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις. Αυτό έγινε για να ελεγχθεί αν υπάρχει σχέση μεταξύ διαφορετικών αραιώσεων και των υπολογιζόμενων συντελεστών διαπερατότητας. Συγκεκριμένα, για το δείγμα ΕΠ #2-90 min έγιναν πειράματα μετά από αραιώση 1:4, 1:8, 1:12, 1:16, 1:24, 1:32 και 1:48. Για το δείγμα ΜΦ #2-210 min έγιναν πειράματα μετά από αραιώση 1:4, 1:8, 1:12 και 1:20. Στα συγκεκριμένα δείγματα, οι αραιώσεις που ήταν

μικρότερες από αυτές που βρέθηκαν να γίνονται ανεκτές από τα κύτταρα (1:16 και 1:8 για το δείγμα ΕΠ και ΜΦ, αντίστοιχα – κεφ. Β.3.3.1) δεν μείωσαν δραματικά την TEER. Αυτό σημαίνει ότι η κατάλληλη αραίωση εξαρτάται από τη σύσταση του κάθε δείγματος και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του. Χρησιμοποιώντας όμως για όλα τα δείγματα μια μεγάλη αραίωση, όπως είναι η 1:16, αφενός εξασφαλίστηκε η αντοχή των κυττάρων και αφετέρου η επίδραση της αραίωσης ήταν η ίδια για όλα τα δείγματα.

B.4.4 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων

B.4.4.1 Ανάπτυξη μέσων κατάλληλων για χρήση σε πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες

Ο σχεδιασμός βασίστηκε στα FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 (Jantravid et al., 2008), τα οποία χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες διάλυσης.

Αρχικά, παρασκευάστηκε FaSSIF-V2 για να ελεγχθεί η συμβατότητά του με τις κυτταρικές μονοστιβάδες. Αφού μετρήθηκε η αρχική TEER των κυτταρικών μονοστιβάδων, τοποθετήθηκαν 0,8 ml FaSSIF-V2 στο πάνω διαμέρισμα τριών φρεατίων και 2,4 ml MM στο κάτω. Ανακινήθηκε η πλάκα στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα (75 rpm, 37 °C) για 180 min, προστέθηκαν 0,8 ml MM στην πάνω πλευρά και η τελική TEER μετρήθηκε 34,0±2,9% της αρχικής. Αύξηση της συγκέντρωσης της λεκιθίνης και μείωση των χολικών αλάτων, ώστε το μέσο να είναι λιγότερο τοξικό για τα κύτταρα (Ingels et al., 2002), δεν βελτίωσε την εικόνα. Λόγος NaTC : PC 4:1, αντί για 15:1 του FaSSIF-V2, είχε ως αποτέλεσμα μείωση στο 45,5±4,3% της αρχικής TEER. Θεωρήθηκε ότι υπεύθυνη για τη μείωση της TEER ήταν η απουσία θρεπτικών για τα κύτταρα συστατικών στο διάλυμα. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε FaSSIF-V2 με MM αντί με νερό. Στην περίπτωση αυτή όμως δεν προστέθηκε NaCl ούτε στο FaSSIF-V2 (η DMEM βάση το εμπεριέχει, και αν προσετίθετο, θα αυξανόταν η ωσμωτικότητα, που είναι παράγοντας επιβαρυντικός για τα κύτταρα) ούτε στο MM (το FaSSIF-V2 έχει μικρότερη ωσμωτικότητα (180±10 mOsm/kg) από την ωσμωτικότητα του MM με NaCl). Επίσης, δεν χρειαζόταν να προστεθεί ούτε HEPES, επειδή ήδη το μηλεϊνικό οξύ και το NaOH του FaSSIF-V2 έπαιζαν το ρόλο

ρυθμιστικού διαλύματος. Το αποτέλεσμα μετά από 180 min εφαρμογής του νέου μέσου ήταν να διατηρηθεί η αρχική TEER σε επιθυμητές τιμές, δηλ. στο $93,1 \pm 1,1\%$. Το νέο μέσο, που διαφέρει από το FaSSIF-V2 στο ότι περιέχει επιπρόσθετα DMEM βάση, D-γλυκόζη και L-γλουταμίνη, αποδείχτηκε συμβατό με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες και ονομάζεται FaSSIF_{Caco} (Πίνακας Β.2).

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε το εντερικό υγρό που προσομοιώνει τη μικκυλιακή φάση στη διάρκεια της πέψης. Αρχικά, παρασκευάστηκε FeSSIF-V2 με MM που δεν περιείχε NaCl και HEPES και ελέγχθηκε η συμβατότητά του με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Στα 180 min η αρχική TEER είχε πέσει στο 0. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν μέσα με μειωμένο λόγο PC : [NaTC + 1-μονοελαϊκός γλυκερινεστέρας (GMO)] σε σχέση με τον 1:7,5 του FeSSIF-V2, αλλά με ίδια ολική συγκέντρωση λιπιδίων, αφού φαίνεται ότι η ολική και όχι οι επιμέρους συγκεντρώσεις επηρεάζουν τη διαπερατότητα (Buyukozturk et al., 2010). Η συγκέντρωση του ελαϊκού νατρίου διατηρήθηκε η ίδια με το FeSSIF-V2, καθώς αύξησή της θα επηρέαζε τη σταθερότητα του μέσου (Jantratid et al., 2008). Δοκιμάστηκαν λόγοι PC : [NaTC + GMO] 1:4, 1:2 και 1:1,5. Το καλύτερα ανεκτό από τα κύτταρα μέσο ήταν αυτό που περιείχε PC : [NaTC + GMO] 1:1,5. Στον Πίνακα Β.1 παρουσιάζεται η επίδραση των διαφορετικών συστάσεων στην αρχική TEER των κυτταρικών μονοστιβάδων.

Πίνακας Β.1: Επίδραση της σύστασης διαφόρων μέσων, που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων στη διάρκεια της πέψης, στην αρχική TEER των κυτταρικών μονοστιβάδων

Λόγος PC : [NaTC + GMO] στο προσομοιωμένο εντερικό υγρό	Τελική TEER ως ποσοστό % επί της αρχικής
1:4	18,9±0,5
1:2	65,4±4,3
1:1,5	100,5±12,3

Το μέσο που μετά τις δοκιμές με διαφορετικούς λόγους συστατικών βρέθηκε να είναι το καλύτερα ανεκτό από τις κυτταρικές μονοστιβάδες ονομάζεται FeSSIF_{Caco}

(Πίνακας Β.2). Η ρυθμιστική χωρητικότητα των FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} (Πίνακας Β.2) μετρήθηκε με προσθήκη στάγδην μέσω προχοΐδας διαλυμάτων HCl 0,1 M και NaOH 0,1 M σε 2 ml FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} μέχρι να αλλάξει κατά μία μονάδα το pH τους (καταγραφόταν συνεχώς με πεχάμετρο).

Πίνακας Β.2: Σύσταση των FaSSIF-V2, FaSSIF_{Caco}, FeSSIF-V2, FeSSIF_{Caco}

	FaSSIF-V2	FaSSIF _{Caco}	FeSSIF-V2	FeSSIF _{Caco}
Μηλεϊνικό οξύ (mM)	19,12	19,12	55,02	55,02
Χλωριούχο νάτριο (mM)	68,62	109,5 *	125,5	109,5 *
Αμινοξέα	-	*	-	*
Βιταμίνες	-	*	-	*
D-γλυκόζη (mM)	-	25	-	25
L-γλουταμίνη(mM)	-	6	-	6
Φωσφατιδυλοχολίνη (mM)	0,2	0,2	2	6,8
Ταυροχολικό νάτριο (mM)	3	3	10	6,8
1-Μονοελαϊκός γλυκερινεστέρας (mM)	-	-	5	3,4
Ελαϊκό νάτριο (mM)	-	-	0,8	0,8
Υδροξείδιο του νατρίου (mM)	34,8	34,8	81,65	81,65
pH	6,5	6,5	5,8	5,8
Ωσμωτικότητα (mOsm/kg)	180 ±10	330 ± 10	390 ± 10	390 ± 10
Ρυθμιστική χωρητικότητα [(mmol/l)/ΔpH]	10	10	25	23,8

* περιέχεται στη βάση DMEM. Χρησιμοποιήθηκαν 8,3 g/l βάσης DMEM, η οποία περιέχει ανόργανα άλατα, αμινοξέα και βιταμίνες.

Από τον Πίνακα Β.2 φαίνεται ότι το FaSSIF_{Caco} έχει αυξημένη ωσμωτικότητα σε σχέση με το FaSSIF-V2, κάτι που οφείλεται στα ανόργανα άλατα που περιέχει η βάση DMEM.

Σύγκριση της σύστασης της μικκυλιακής φάσης των εντερικών περιεχομένων (Παράρτημα 1, Πίνακας Π1.2) που αναρροφήθηκαν από εθελοντές με τη σύσταση του FeSSIF_{Caco} (Πίνακας Β.4) δείχνει ότι η ολική συγκέντρωση λιπιδίων στο FeSSIF_{Caco} (PC, GMO και ελαιϊκό νάτριο: 11 mM) είναι κοντά σε αυτή που μετρήθηκε στη μικκυλιακή φάση των δωδεκαδακτυλικών περιεχομένων (PC, lyso-PC, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, διγλυκερίδια - μέση τιμή: 12,28 mM, διάμεσος: 8,01 mM). Επίσης, η συγκέντρωση των χολικών αλάτων στο FeSSIF_{Caco} (6,8 mM) είναι κοντά στην αντίστοιχη συγκέντρωση στη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων (μέση τιμή: 7,17 mM, διάμεσος: 3,74 mM, Πίνακας Π1.2). Βέβαια, η συγκέντρωση GMO είναι λίγο υψηλή σε σχέση με τη μέση συγκέντρωση μονογλυκεριδίων στα δωδεκαδακτυλικά περιεχόμενα (3,4 mM, έναντι 1 mM, αντίστοιχα) και η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων πιο χαμηλή (0,8 mM έναντι 9 mM στα δωδεκαδακτυλικά περιεχόμενα). Πάντως, ενσωμάτωση των εν λόγω συστατικών στο FeSSIF-V2 σε συγκεντρώσεις κοντά στις φυσιολογικές τιμές επηρεάζει τη σταθερότητά του (Jantratid et al. 2008).

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι στο FeSSIF_{Patel} (το μόνο εντερικό υγρό προσομοίωσης της κατάστασης πέψης που έχει προταθεί ως σήμερα για χρήση σε πειράματα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων) η συγκέντρωση τόσο των λιπιδίων όσο και των χολικών αλάτων (Πίνακας Α.1) απέχει αρκετά από τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στη μικκυλιακή φάση των δωδεκαδακτυλικών περιεχομένων στη διάρκεια της πέψης (Παράρτημα 1).

Τα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμασίες MTT και LDH, οπότε και αποδείχτηκε ότι δεν δρουν τοξικά στις Caco-2 μονοστιβάδες (Imanidis et al., unpublished data).

B.4.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων για το διαμέρισμα-δότης

Η παρασκευή των διαλυμάτων δαναζόλης και μικρομορίων Α, Β, Γ σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} έγινε σε δύο βήματα. Αρχικά, τα μικρομόρια διαλύθηκαν σε DMSO και μετά προστέθηκε υπό ανάδευση κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος αυτού σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}, ώστε να επιτευχθεί ονομαστική συγκέντρωση λίγο μικρότερη από τη διαλυτότητά τους σε FaSSIF και FeSSIF (Πίνακας Α.4). Μέτρηση της συγκέντρωσης καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος εξασφάλιζε ότι δεν συνέβαινε καθίζηση. Η ριμπαβιρίνη και η λεβοβιρίνη (ευδιάλυτες στο νερό)

διαλύθηκαν απευθείας σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$. Ο υπολογισμός των επιθυμητών ποσοτήτων που διαλύθηκαν έγινε λαμβάνοντας υπόψη τη θεραπευτική δόση, με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στα αντίστοιχα πειράματα με την τεχνική PAMPA (κεφ. B.3.3).

B.4.4.3 Παρασκευή διαλυμάτων για το διαμέρισμα-δέκτης

Όταν στο διαμέρισμα-δότης τοποθετήθηκε διάλυμα σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$, στο διαμέρισμα-δέκτης χρησιμοποιήθηκε είτε διασπορά λιποσωμάτων σε MM, για την περίπτωση των ελάχιστα διαλυτών στο νερό ουσιών, είτε MM για τις υδρόφιλες ριμπαβιρίνη και λεβοβιρίνη. Ο υπολογισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης λιποσωμάτων έγινε με τον ίδιο τρόπο που είχε γίνει στα δείγματα ΜΦ (κεφ. B.3.3.2), λαμβάνοντας υπόψη τη διαλυτότητα σε $FaSSIF$ και $FeSSIF$ (Πίνακας Α.4). Ο λόγος μάζας προστιθέμενου φαρμάκου προς μάζα λιποσωμάτων για τα μικρομόρια Α, Β και Γ βρέθηκε 1:3.6, 1:23 και 1:132, αντίστοιχα. Ιδανικά, η διαλυτότητα στα δύο διαμερίσματα θα έπρεπε να είναι ίδια. Πρακτικά όμως αυτό δεν συμβαίνει, καθώς η σύσταση του διαλύματος στο διαμέρισμα-δέκτης αλλάζει κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς μεταφέρονται λιπίδια από το διαμέρισμα-δότης. Παρέκκλιση από την ιδανική κατάσταση διορθώθηκε με κατάλληλο χειρισμό κατά τον υπολογισμό του συντελεστή διαπερατότητας (εισαγωγή στις διαφορικές εξισώσεις του παράγοντα διόρθωσης u , Παράρτημα 4). Η παρασκευή της διασποράς λιποσωμάτων έγινε όπως ακριβώς και στην περίπτωση των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ (κεφ. B.4.3.2), με μόνη διαφορά ότι στο τέλος ρυθμιζόταν η ωσμωτικότητα της διασποράς λιποσωμάτων με NaCl, ώστε να είναι ίδια με αυτή του διαλύματος στο διαμέρισμα-δότης.

B.4.4.4 Πειράματα διαπερατότητας χρησιμοποιώντας $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος επιβεβαιώθηκε ότι οι προς χρήση κυτταρικές μονοστιβάδες είχαν τιμή TEER μεταξύ 500 and 650 $\Omega \times \text{cm}^2$. Αυτό έγινε όπως στα πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε MM (κεφ. B.3.2). Η TEER μετρήθηκε και στο τέλος των πειραμάτων, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η ακεραιότητα των κυτταρικών μονοστιβάδων είχε διατηρηθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τα πειράματα διαπερατότητας με μικρομόρια σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$ πραγματοποιήθηκαν μόνο στην κατεύθυνση από το πάνω προς το κάτω διαμέρισμα.

Τοποθετήθηκαν 0,8 ml διαλύματος του μικρομορίου σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} στο πάνω διαμέρισμα και 2,4 ml διασποράς λιποσωμάτων στο κάτω διαμέρισμα. Οι πλάκες φρεατίων ανακινούνταν στον οριζόντιο αναδευτήρα εντός επωαστή σε κορεσμένη με υδρατμούς ατμόσφαιρα (50 rpm, 37 °C) και εντός του πάγκου νηματικής ροής λαμβάνονταν δείγματα των 100 μl για ανάλυση μόνο από το κάτω διαμέρισμα (διαμέρισμα-δέκτης) τις χρονικές στιγμές 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 και 300 min. Ο αφαιρούμενος όγκος δεν αντικαθίστατο. Στο τέλος του πειράματος (180 min για τη δαναζόλη, 300 min για τα υπόλοιπα μικρομόρια) ελήφθη δείγμα 100 μl και από το πάνω διαμέρισμα. Ύστερα, προστέθηκαν 0,9 ml TM στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου και μετρήθηκε η τελική TEER.

Ειδικά για τη δαναζόλη, έγινε και πείραμα διαπερατότητας με αραιωμένα 1:16 FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}. Αυτό έγινε με σκοπό να γίνει σύγκριση με τα πειράματα με αραιωμένα δείγματα ΕΠ και ΜΦ.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Μετά το πέρας των πειραμάτων διαπερατότητας ακολούθησε λύση των κυττάρων για παραλαβή της δεσμευμένης ποσότητας μικρομορίου, καθώς και παραλαβή της προσροφημένης στα πλαστικά τοιχώματα ποσότητας. Οι διαδικασίες ήταν οι ίδιες όπως και στην περίπτωση της δαναζόλης σε MM (κεφ. B.4.2.1).

B.4.5 Υπολογισμός του συντελεστή διαπερατότητας

Ο παραδοσιακός τρόπος υπολογισμού του συντελεστή διαπερατότητας στα *in vitro* πειράματα μεταφοράς μέσω κυτταρικών μονοστιβάδων είναι με βάση το γραμμικό μοντέλο, χρησιμοποιώντας δεδομένα που έχουν προκύψει όσο επικρατούν συνθήκες δεξαμενής (Εξίσωση A.9, Κεφ. A.5.1, θέτοντας $C_{\text{donor}}=C_0$ και $A=4,71 \text{ cm}^2$). Ένα σημαντικό πρόβλημα αυτής της μεθοδολογίας είναι η δυσκολία εφαρμογής σε περιπτώσεις δυσδιάλυτων μορίων (λόγω του πολύ περιορισμένου χρόνου διατήρησης συνθηκών δεξαμενής). Επίσης, με τη μεθοδολογία αυτή δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση διαφόρων παραγόντων που ίσως επηρεάζουν την τιμή του συντελεστή διαπερατότητας. Στην παρούσα εργασία οι συντελεστές διαπερατότητας υπολογίστηκαν μετά από προσαρμογή πολυδιαμερισματικού μοντέλου χρησιμοποιώντας το λογισμικό EASY-FIT^{ModelDesign} (http://www.ai7.uni-bayreuth.de/easy_fit.htm, Dr. K. Schittkowski, University of Bayreuth, Germany). Τα

αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν μετά από εφαρμογή του γραμμικού μοντέλου (Εξίσωση A.9, Κεφ. A.5.1).

Το πολυδιαμερισματικό μοντέλο βασίστηκε σε αυτό των Kapitza et al. (2007). Θεωρήθηκε αρχικά ότι υπάρχουν τρία διαμερίσματα, σε καθένα από τα οποία η συγκέντρωση της ουσίας μεταβάλλεται με το χρόνο. Αυτά είναι το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου, το κύτταρο και το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου, τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους με την ψηκτροειδή παρυφή και με τη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων στην κάτω πλευρά, αντίστοιχα. Η μεταβολή της συγκέντρωσης του μικρομορίου με το χρόνο σε κάθε διαμέρισμα περιγράφηκε με μία διαφορική εξίσωση, η οποία λάμβανε υπόψη της τη μεταφορά του μικρομορίου μέσω της ψηκτροειδούς παρυφής και της κάτω μεμβράνης με παθητική διάχυση και τυχόν μεταφορά με τη μεσολάβηση φορέα. Οι διαφορικές εξισώσεις περιελάμβαναν μεταβλητές που αντιστοιχούσαν σε πειραματικά μετρήσιμες ποσότητες και παραμέτρους που χαρακτήριζαν τη διαδικασία μεταφοράς. Επειδή τα περισσότερα μικρομόρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν λιπόφιλα, ελήφθη υπόψη και το γεγονός ότι σημαντική ποσότητα προσροφούνταν κατά τη διάρκεια του πειράματος στα τοιχώματα των φρεατίων. Για το λόγο αυτό, τα τοιχώματα του πάνω και του κάτω διαμερίσματος θεωρήθηκαν ως δύο επιπλέον διαμερίσματα. Η προσροφημένη στα τοιχώματα ποσότητα ουσίας συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση στο διάλυμα με τη βοήθεια σταθερών σύνδεσης. Επίσης, θεωρήθηκε ότι η συνολική ποσότητα της ουσίας στα πέντε διαμερίσματα διατηρούνταν σταθερή. Το μοντέλο αυτό δεν απαιτεί συνθήκες δεξαμενής ή σταθερές συγκεντρώσεις στο διαμέρισμα-δότης και λαμβάνει υπόψη του τη συσσώρευση φαρμάκου στα κύτταρα, τους άνιςους όγκους των περιεχομένων στα δύο διαμερίσματα του φρεατίου και την αλλαγή των όγκων στο πάνω και στο κάτω διαμέρισμα των φρεατίων λόγω των δειγματοληψιών. Πιθανή ασυμμετρία στις διαλυτότητες της ουσίας στο πάνω και στο κάτω διαμέρισμα στα πειράματα με δείγματα ΕΠ και ΜΦ διορθώθηκε με την εισαγωγή ενός παράγοντα διόρθωσης στο μοντέλο (του u , βλ. Παράρτημα 4). Η ασυμμετρία αυτή οφειλόταν στα πειραματικά σφάλματα κατά την παρασκευή της διασποράς λιποσωμάτων για τα δείγματα ΜΦ και στον (αναπόφευκτα) προσεγγιστικό τρόπο υπολογισμού της συγκέντρωσης λιποσωμάτων για τα δείγματα ΕΠ. Το σύστημα διαφορικών εξισώσεων επιλύθηκε αριθμητικά και προσαρμόστηκε ταυτόχρονα για όλα τα πειραματικά δεδομένα με τη βοήθεια αλγορίθμου του λογισμικού για τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Από τη μη γραμμική προσαρμογή υπολογίστηκαν τιμές για

όλες τις παραμέτρους. Για χρόνο $t=0$ οι μεταβλητές είτε καθορίστηκαν ως 0 (π.χ. συγκέντρωση μικρομορίου στο διαμέρισμα-δέκτης) είτε υπολογίστηκαν με βάση το αποτέλεσμα της προσαρμογής του μοντέλου (π.χ. αρχική συγκέντρωση μικρομορίου στο διαμέρισμα-δότης). Την επιτυχία της προσαρμογής αντιπροσωπεύει το στατιστικό μέγεθος GOF (goodness of fit), για το οποίο ισχύει:

$GOF=1 - \frac{\text{άθροισμα των τετραγώνων}}{\text{άθροισμα των τετραγώνων των διαφορών των πειραματικών από τις εκτιμηθείσες τιμές}}$.

Για τα πειράματα με δαναζόλη, μικρομόριο A και ριμπαβιρίνη σε MM υπολογίστηκαν δύο φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας για μεταφορά με διάχυση, ένας για τη μεταφορά μέσω της πάνω μεμβράνης (ψηκτροειδούς παρυφής), P_a , και ένας για τη μεταφορά μέσω της κάτω μεμβράνης, $(P_b)^5$. Αντίθετα, για τα πειράματα με τα μικρομόρια B, Γ και λεβοβιρίνη χρησιμοποιήθηκε μόνο ένας συντελεστής, ο P_{hm} , ο οποίος ήταν ο αρμονικός μέσος των P_a και P_b . Αυτό συνέβη, επειδή η χρήση δύο διαφορετικών συντελεστών P_a και P_b οδηγούσε σε υψηλή συσχέτιση των υπολογιζόμενων παραμέτρων. Στα υπόλοιπα πειράματα με δείγματα ΕΠ, ΜΦ και προσομοιωμένες μικκυλιακές φάσεις υπολογίστηκε μόνο ο P_{hm} . Επίσης, για να είναι εφικτή η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών συντελεστών διαπερατότητας, στην περίπτωση που υπήρχε P_a και P_b , υπολογίστηκε ο P_{hm} ως ο αρμονικός μέσος των P_a και P_b . Αναλυτικά, τα συστήματα διαφορικών εξισώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των συντελεστών διαπερατότητας παρουσιάζονται στο Παράρτημα 4.

B.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τόσο στα πειράματα με την τεχνική PAMPA όσο και στα πειράματα μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων οι συγκρίσεις μεταξύ ζευγών των συντελεστών διαπερατότητας και των ροών δαναζόλης έγιναν στο λογισμικό SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) με paired t-test ή Wilcoxon test (ανάλογα με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας κανονικότητας). Οι συγκρίσεις των συντελεστών διαπερατότητας μεταξύ των διαφορετικών μέσων για το ίδιο μικρομόριο έγιναν στο λογισμικό SigmaStat 3.5 με unpaired t ή Mann-Whitney test. Συγκρίσεις συντελεστών

⁵ Οι συντελεστές αυτοί είναι φαινόμενοι, εφόσον ενσωματώνουν και τη διαπερατότητα μέσω της UWL.

διαπερατότητας και ροών δαναζόλης των ΕΠ και ΜΦ σε σχέση με την τιμή από Prisma™ HT και MM έγιναν στο λογισμικό Origin Pro8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) με one-way ANOVA. Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο σημαντικότητας ετέθη 0,05.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΡΑΜΡΑ

Γ.1.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε Prisma™ HT

Προσαρμογή του διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα από πειράματα με Prisma™ HT ήταν εφικτή για τη θεοφυλλίνη, την καρβαμαζεπίνη, τη ρανιτιδίνη, τη δαναζόλη και το μικρομόριο Β. Αναλυτικά, οι απεικονίσεις των πρωτογενών δεδομένων και οι καλύτερα προσαρμοσμένες καμπύλες παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5. Για την αμοξικιλίνη και τη ριμπαβιρίνη δεν υπήρχε μεταβολή της συγκέντρωσης σε κανένα διαμέρισμα κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ για τα μικρομόρια Α και Γ η διαλυτότητα σε Prisma™ HT είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ανάλυσης. Για τη θεοφυλλίνη, την καρβαμαζεπίνη, τη δαναζόλη και το μικρομόριο Β ο συντελεστής διαπερατότητας υπολογίστηκε μετρώντας στο διαμέρισμα-δέκτης, ενώ για τη ρανιτιδίνη (μόριο χαμηλής διαπερατότητας) μετρώντας στο διαμέρισμα-δότης, μιας και μέτρηση στο διαμέρισμα-δέκτης στις 24 h δεν έδειξε παρουσία φαρμάκου. Στον Πίνακα Γ.1 παρουσιάζονται οι τιμές των εκτιμηθεισών παραμέτρων και οι τιμές συγκέντρωσης που μετρήθηκαν κατά την έναρξη του πειράματος στο διαμέρισμα-δότης.

Πίνακας Γ.1: Οι τιμές του συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} (ή P_{eff}^{PAMPA} για την περίπτωση της ρανιτιδίνης) (\pm SD) και της μέγιστης συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης (ή ελάχιστης συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δότης για την περίπτωση της ρανιτιδίνης) (\pm SD) που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς των μικρομορίων από Prisma™ HT, καθώς και οι τιμές συγκέντρωσης που είχαν μετρηθεί πριν την έναρξη των πειραμάτων στο διαμέρισμα-δότης.

	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)	$\frac{(M_{D(0)} - Q)^{estim}}{V_D}$ (μg/ml)	$\frac{M_{D(0)}^{meas}}{V_D}$ (μg/ml)
Θεοφυλλίνη	0,0200 \pm 0,0019	36,1 \pm 2,1	72,7
Καρβαμαζεπίνη	0,593 \pm 0,038	101,8 \pm 2,7	105,2
Ρανιτιδίνη	0,0081 \pm 0,0025	293,6 \pm 4,2	320,7
Δαναζόλη	2,11 \pm 0,16	0,553 \pm 0,011	0,436
Μικρομόριο Β	1,191 \pm 0,037	1,680 \pm 0,016	2,238

Από τον Πίνακα Γ.1 προκύπτει ότι η δαναζόλη και το μικρομόριο Β είναι μόρια υψηλής διαπερατότητας, καθώς οι τιμές P_{app}^{PAMPA} είναι μεγαλύτερες από τις τιμές που υπολογίστηκαν για τα πρότυπα μόρια υψηλής διαπερατότητας (θεοφυλλίνη και καρβαμαζεπίνη).

Με βάση το γραμμικό μοντέλο υπολογίστηκε ο P_{app}^{PAMPA} για τη θεοφυλλίνη ($7,87 \times 10^{-7}$ cm/s), την καρβαμαζεπίνη ($0,57 \times 10^{-4}$ cm/s), τη δαναζόλη ($1,27 \times 10^{-4}$ cm/s) και το μικρομόριο Β ($0,544 \times 10^{-4}$ cm/s). Τα r^2 των ευθειών από τις οποίες προέκυψαν οι κλίσεις dQ/dt (Εξίσωση A.9, Κεφ. A.5.1) κυμάνθηκαν μεταξύ 0,918 και 0,976. Επομένως, και με το γραμμικό μοντέλο προκύπτει ότι η δαναζόλη και το μικρομόριο Β είναι μόρια υψηλής διαπερατότητας.

Στον Πίνακα Γ.2 παρουσιάζονται οι τιμές του συντελεστή διαπερατότητας (P_{app}^{PAMPA} ή P_{eff}^{PAMPA}) σε απλό υδατικό μέσο μεταφοράς που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για τα τέσσερα πρότυπα μόρια.

Πίνακας Γ.2: Τιμές P^{PAMPA} ($\times 10^4$ cm/s) από απλό υδατικό μέσο που υπολογίστηκαν στην παρούσα μελέτη (DS-PAMPA) και δημοσιευμένες τιμές από τη βιβλιογραφία για τα τέσσερα πρότυπα μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

	Παρούσα μελέτη ^α	Βιβλιογραφία ^β
Θεοφυλλίνη	0,0200	0,0858 (A-PAMPA, Teksin et al., 2010 ^γ)
		0,00043 (Egg-PAMPA, Kerns et al., 2004)
		0,048 (παραλλαγή Egg-PAMPA, Zhu et al., 2002)
		0,0278 (BM-PAMPA, Sugano et al., 2002)
		0,0353 (Tri-Layer Membrane, Chen et al., 2008)
Καρβαμαζεπίνη	0,593	0,274 (A-PAMPA, Teksin et al., 2010 ^γ)
		0,081 (Egg-PAMPA, Kerns et al., 2004)
		0,12 (παραλλαγή Egg-PAMPA, Zhu et al., 2002)
		1,48 (DS-PAMPA, Avdeef et al., 2007)
		0,166 (παραλλαγή DS-PAMPA, Balimane et al., 2005)
		0,0944 (Tri-Layer Membrane, Chen et al., 2008)
Αμοξικιλίνη	-	0,0074 (DS-PAMPA, Avdeef et al., 2007)
		0,0004 (DOPC-PAMPA, Liu et al., 2003)
		0,0022 (Egg-PAMPA, Kerns et al., 2004)
Ρανιτιδίνη	0,0081	0,00672 (A-PAMPA, Teksin et al., 2010 ^γ)
		0,00034 (Egg-PAMPA, Kerns et al., 2004)
		0,005 (παραλλαγή Egg-PAMPA, Zhu et al., 2002)
		0,0219 (BM-PAMPA, Sugano et al., 2001)
		0,0163 (BM-PAMPA, Sugano et al., 2002)
		0,00794 (DS-PAMPA, Avdeef et al., 2005)
		0,0166 (DS-PAMPA, Avdeef et al., 2007)
		0,019 (παραλλαγή DS-PAMPA, Balimane et al., 2005)
0,0045 (Tri-Layer Membrane, Chen et al., 2008)		

^α: Οι τιμές έχουν προκύψει με βάση το απλό διαμερισματικό μοντέλο

^β: Σε παρένθεση ο τύπος της τεχνικής PAMPA που χρησιμοποιήθηκε και η βιβλιογραφική παραπομπή

^γ: Η μόνη μελέτη όπου ο συντελεστής διαπερατότητας υπολογίστηκε με μη γραμμική προσαρμογή μοντέλου. Σε όλες τις υπόλοιπες μελέτες ακολουθήθηκε η μέθοδος του τελικού σημείου

Από τον Πίνακα Γ.2 φαίνεται ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές στον υπολογιζόμενο συντελεστή διαπερατότητας ανάλογα με την τεχνική PAMPA που χρησιμοποιείται (Κεφ. Α.2.2.1). Αν και η ιεράρχηση των τιμών P^{PAMPA} για τα τέσσερα πρότυπα μόρια φαίνεται να είναι ίδια στην παρούσα και στις προηγούμενες μελέτες, η μεταβλητότητα στις υπολογιζόμενες τιμές είναι πολύ υψηλή. Πάντως, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η υπολογιζόμενη τιμή P^{PAMPA} από την παρούσα μελέτη για τη ρανιτιδίνη είναι πολύ κοντά στις τιμές της βιβλιογραφίας που προέκυψαν με χρήση της τεχνικής DS-PAMPA, ενώ είναι 2,5 φορές μικρότερη για την καρβαμαζεπίνη. Διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ πειραμάτων σε διαφορετικές ημέρες (interplate variability) έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Avdeef, 2003).

Γ.1.2 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)

Από τα 36 δείγματα ΕΠ και ΜΦ (18 ζεύγη) ήταν εφικτό να υπολογιστεί φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας για 14 δείγματα ΕΠ και για 13 δείγματα ΜΦ, λόγω υψηλής μεταβλητότητας των δεδομένων. Αναλυτικά οι απεικονίσεις των πρωτογενών δεδομένων και οι καλύτερα προσαρμοσμένες καμπύλες παρουσιάζονται στο Παράρτημα 5.

Στον Πίνακα Γ.3 παρουσιάζονται οι παράμετροι που υπολογίστηκαν από την προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα πειραμάτων με δείγματα ΕΠ, ενώ στον Πίνακα Γ.4 παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές για τα πειράματα με δείγματα ΜΦ.

Πίνακας Γ.3: Οι τιμές του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} (\pm SD) και της μέγιστης συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης (\pm SD) που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου (Εξίσωση Β.5) στα πρωτογενή δεδομένα με δαναζόλη σε ΕΠ, καθώς και οι τιμές συγκέντρωσης δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης, που είχαν μετρηθεί πριν την έναρξη των πειραμάτων.

Εθελοντής-χρόνος (min) ^a	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)	$\frac{(M_{D(0)} - Q)^{estim}}{V_D}$ (μ g/ml)	$\frac{M_{D(0)}^{meas}}{V_D}$ (μ g/ml)
#1-120	2,01 \pm 0,28	11,75 \pm 0,49	182,15
#2-90	1,38 \pm 0,37	5,26 \pm 0,43	69,44
#2-180	0,97 \pm 0,46	7,9 \pm 1,4	23,4
#2-210	1,12 \pm 0,28	21,0 \pm 1,8	46,1
#3-150	0,87 \pm 0,15	15,7 \pm 1,2	93,6
#4-60	2,62 \pm 0,40	8,08 \pm 0,34	28,87
#4-120	1,13 \pm 0,14	28,4 \pm 1,2	139,8
#4-150	0,512 \pm 0,092	11,02 \pm 0,99	31,89
#5-210	0,469 \pm 0,063	37,7 \pm 2,6	35,0
#5-240	0,472 \pm 0,062	30,8 \pm 2,1	76,1
#6-90	2,07 \pm 0,50	21,1 \pm 1,1	100,6
#6-180	1,17 \pm 0,21	18,33 \pm 0,97	48,2
#7-180	0,559 \pm 0,032	36,8 \pm 1,0	91,2
#7-210	1,11 \pm 0,11	18,04 \pm 0,56	40,78

^a Χρόνος αναρρόφησης δείγματος ΕΠ μετά τη χορήγηση του γεύματος στον εθελοντή

Πίνακας Γ.4: Οι τιμές του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} (\pm SD) και της μέγιστης συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης (\pm SD) που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου (Εξίσωση Β.5) στα πρωτογενή δεδομένα με δαναζόλη σε ΜΦ, καθώς και οι τιμές συγκέντρωσης δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης, που είχαν μετρηθεί πριν την έναρξη των πειραμάτων.

Εθελοντής-χρόνος (min)	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)	$\frac{(M_{D(0)} - Q)^{estim}}{V_D}$ (μ g/ml)	$\frac{M_{D(0)}^{meas}}{V_D}$ (μ g/ml)
#1-120	1,05 \pm 0,24	0,234 \pm 0,018	0,42
#2-180	1,16 \pm 0,18	7,27 \pm 0,39	8,29
#2-210	1,55 \pm 0,22	10,74 \pm 0,41	13,37
#4-60	0,60 \pm 0,16	20,7 \pm 2,4	24,0
#4-120	1,46 \pm 0,38	15,2 \pm 1,1	21,0
#4-150	1,87 \pm 0,17	3,700 \pm 0,083	4,65
#5-180	1,24 \pm 0,10	1,051 \pm 0,027	4,69
#5-240	1,76 \pm 0,24	3,28 \pm 0,13	4,46
#6-90	1,60 \pm 0,15	14,85 \pm 0,45	14,64
#6-180	1,17 \pm 0,24	5,43 \pm 0,41	5,7
#7-180	1,04 \pm 0,16	4,07 \pm 0,20	9,09
#7-210	1,96 \pm 0,79	3,71 \pm 0,45	3,31
#7-240	1,74 \pm 0,28	0,261 \pm 0,017	0,25

Όπως φαίνεται από τους Πίνακες Γ.3 και Γ.4, οι τιμές συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης που προκύπτουν από την προσαρμογή είναι πιο κοντά στις μετρημένες τιμές στο διαμέρισμα-δότης για τα δείγματα ΜΦ από ότι για τα δείγματα ΕΠ (μέσες τιμές λόγων 78,14 \pm 25,20% και 34,63 \pm 24,67%, αντίστοιχα). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ASB δεν μπορεί να προσροφήσει όλη τη δαναζόλη και αυτή παραμένει ενσωματωμένη στις λιπιδικές δομές των εντερικών περιεχομένων στο διαμέρισμα-δότης. Επειδή δε τα δείγματα ΕΠ έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων, κατακρατούν περισσότερο τη δαναζόλη.

Οι μέσες τιμές των P_{app}^{PAMPA} των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ είναι $(1,18 \pm 0,66) \times 10^{-4}$ cm/s και $(1,38 \pm 0,38) \times 10^{-4}$ cm/s και, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας μόνο ζεύγη τιμών που είχαν προέλθει από το ίδιο αναρροφηθέν δείγμα (ΕΠ και ΜΦ) ($n=11$), η διαφορά στις τιμές P_{app}^{PAMPA} μεταξύ ΕΠ και ΜΦ δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,341$). Πάντως, η δύναμη του t-test ήταν 0,050, κάτω από την επιθυμητή τιμή 0,800. Αυτό σημαίνει ότι ενδεχομένως να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά, αλλά δεν μπορεί να εντοπιστεί λόγω μικρού δείγματος και της υψηλής μεταβλητότητας (interplate variability, Avdeef, 2003).

Η σύγκριση του P_{app}^{PAMPA} της δαναζόλης από Prisma™ HT [Πίνακας Γ.1, $(2,11 \pm 0,16) \times 10^{-4}$ cm/s] με το P_{app}^{PAMPA} της δαναζόλης από ΜΦ [$(1,38 \pm 0,38) \times 10^{-4}$ cm/s] δείχνει ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,001$).

Στον Πίνακα Γ.5 παρουσιάζονται οι ροές μεταφοράς της δαναζόλης από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα των Πινάκων Γ.3 και Γ.4, την εξίσωση Α.8 (Κεφ. Α.5.1) και θέτοντας $C_{donor} = \frac{(M_{D(0)} - Q)^{estim}}{V_D}$.

Πίνακας Γ.5: Ροές μεταφοράς δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ με βάση την τεχνική PAMPA, χρησιμοποιώντας το απλό διαμερισματικό μοντέλο για τον υπολογισμό του P_{app}^{PAMPA} .

Εθελοντής-χρόνος (min)	Ροή δαναζόλης $\times 10^4$ ($\mu\text{g/s/cm}^2$)	
	Δείγματα ΕΠ	Δείγματα ΜΦ
#1-120	23,6	0,246
#2-90	7,26	Δεν εκτιμήθηκε
#2-180	7,66	8,43
#2-210	23,5	16,7
#3-150	13,7	Δεν εκτιμήθηκε
#4-60	21,2	12,4
#4-120	32,1	22,2
#4-150	5,64	6,92
#5-180	Δεν εκτιμήθηκε	1,30
#5-210	17,7	Δεν εκτιμήθηκε
#5-240	14,5	5,77
#6-90	43,7	23,8
#6-180	21,5	6,35
#7-180	20,6	4,23
#7-210	20,0	7,27
#7-240	Δεν εκτιμήθηκε	0,454

Οι μέσες τιμές ροής μεταφοράς από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ είναι $(19,5 \pm 10,1) \times 10^{-4}$ και $(8,92 \pm 7,74) \times 10^{-4}$ ($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2$), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας μόνο ζεύγη τιμών που είχαν προέλθει από το ίδιο αναρροφηθέν δείγμα (ΕΠ και ΜΦ) η διαφορά στις τιμές ροής μεταφοράς μεταξύ ΕΠ και ΜΦ ($n=11$) ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,001$). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι αν και δεν εντοπίστηκε διαφορά μεταξύ των φαινομένων συντελεστών διαπερατότητας στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ, η ροή δαναζόλης από τα δείγματα ΕΠ είναι μεγαλύτερη, κάτι που οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση δαναζόλης που περιέχεται στα δείγματα ΕΠ.

Οι τιμές P_{app}^{PAMPA} που υπολογίστηκαν με βάση το γραμμικό μοντέλο παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.6.

Πίνακας Γ.6: Τιμές P_{app}^{PAMPA} σε δείγματα ΕΠ και ΜΦ υπολογισμένες με βάση το γραμμικό μοντέλο και πρωτογενή δεδομένα από τα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς (Εξίσωση Α.9) ^α

Εθελοντής-χρόνος (min)	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ για τα δείγματα ΕΠ (cm/s)	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ για τα δείγματα ΜΦ (cm/s)
#1-120	0,0348	Δεν εκτιμήθηκε
#2-90	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε
#2-180	0,436	0,724
#2-210	0,382	0,719
#3-150	0,107	Δεν εκτιμήθηκε
#4-60	0,369	0,543
#4-120	0,116	0,681
#4-150	0,176	3,05
#5-180	Δεν εκτιμήθηκε	0,190
#5-210	0,332	Δεν εκτιμήθηκε
#5-240	0,180	1,27
#6-90	0,169	0,767
#6-180	0,211	0,587
#7-180	0,184	0,354
#7-210	0,207	Δεν εκτιμήθηκε
#7-240	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε

^α Τα r^2 των ευθειών από τις οποίες προέκυψαν οι κλίσεις dQ/dt κυμάνθηκαν μεταξύ 0,903 και 0,999.

Οι μέσες τιμές των P_{app}^{PAMPA} στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ είναι $(0,22\pm 0,12)\times 10^{-4}$ cm/s και $(0,89\pm 0,81)\times 10^{-4}$ cm/s και, αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας μόνο ζεύγη τιμών που είχαν προέλθει από το ίδιο αναρροφηθέν δείγμα (ΕΠ και ΜΦ) η διαφορά στις τιμές P_{app}^{PAMPA} μεταξύ ΕΠ και ΜΦ (n=9) ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,004$). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μέθοδο προσαρμογής του απλού διαμερισματικού μοντέλου, όπου βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τις τιμές P_{app}^{PAMPA} μεταξύ ΕΠ και ΜΦ. Το γεγονός αυτό ίσως σχετίζεται με την αυξημένη μεταβλητότητα στα δεδομένα που παρατηρείται σε μεγάλους χρόνους (Παράρτημα 5) και, επομένως, με τη χαμηλή αξιοπιστία του προσαρμοσμένου απλού διαμερισματικού μοντέλου.

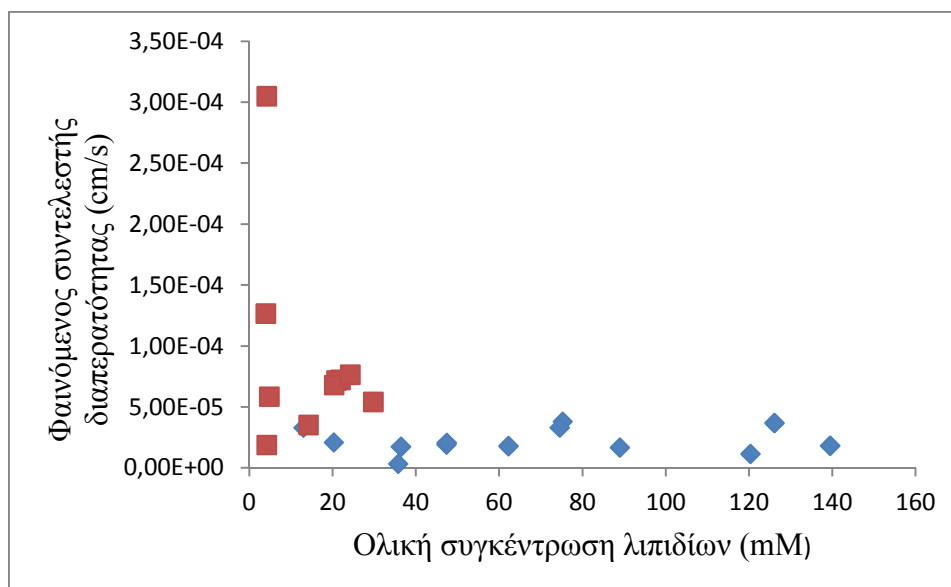
Όσον αφορά στις ροές μεταφοράς της δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ (Πίνακας Γ.7), αυτές υπολογίστηκαν από τα δεδομένα του Πίνακα Γ.6, την εξίσωση Α.8 (Κεφ. Α.5.1) και θέτοντας $C_{donor}=C_0$.

Πίνακας Γ.7: Ροές μεταφοράς δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ με βάση την τεχνική PAMPA, χρησιμοποιώντας το γραμμικό μοντέλο για τον υπολογισμό του P_{app}^{PAMPA} .

Εθελοντής-χρόνος (min)	Ροή δαναζόλης $\times 10^4$ ($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2$)	
	Δείγματα ΕΠ	Δείγματα ΜΦ
#1-120	6,34	Δεν εκτιμήθηκε
#2-90	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε
#2-180	10,20	6,00
#2-210	17,60	9,61
#3-150	10,0	Δεν εκτιμήθηκε
#4-60	10,70	13,00
#4-120	16,20	14,30
#4-150	5,61	14,20
#5-180	Δεν εκτιμήθηκε	0,89
#5-210	11,60	Δεν εκτιμήθηκε
#5-240	13,70	5,66
#6-90	17,00	11,20
#6-180	10,20	3,35
#7-180	16,80	3,22
#7-210	8,44	Δεν εκτιμήθηκε
#7-240	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε

Οι μέσες τιμές για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ προέκυψαν $(1,19 \pm 0,41) \times 10^{-3}$ και $(0,82 \pm 0,50) \times 10^{-3}$ ($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2$), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας μόνο ζεύγη τιμών που είχαν προέλθει από το ίδιο αναρροφηθέν δείγμα (ΕΠ και ΜΦ) η διαφορά στις τιμές ροής μεταφοράς μεταξύ ΕΠ και ΜΦ ($n=9$) δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,092$).

Τέλος, για να διερευνηθεί το πώς επηρεάζουν οι λιπιδικές δομές (σταγονίδια, λιπίδια, μικκύλια) το συντελεστή διαπερατότητας, έγινε απεικόνιση P_{app}^{PAMPA} σε σχέση με τη συγκέντρωση λιπιδίων χρησιμοποιώντας τα δεδομένα κάθε ΕΠ και ΜΦ δείγματος. Η απεικόνιση έδειξε συσχέτιση όταν χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του P_{app}^{PAMPA} το γραμμικό μοντέλο (Σχήμα Γ.1), ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση όταν χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των P_{app}^{PAMPA} το απλό διαμερισματικό μοντέλο.



Σχήμα Γ.1: Απεικόνιση σε συνάρτηση με την ολική συγκέντρωση λιπιδίων του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} . Τα κόκκινα τετράγωνα είναι δείγματα ΜΦ, ενώ οι μπλε ρόμβοι δείγματα ΕΠ.

Γ.1.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων

Προσαρμογή του διαμερισματικού μοντέλου στα πρωτογενή δεδομένα από πειράματα με FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 ήταν εφικτή για τρία από τα πέντε υπό έλεγχο μικρομόρια (δαναζόλη, μικρομόρια A και B). Στον Πίνακα Γ.8 παρουσιάζονται οι εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων και οι τιμές συγκέντρωσης που μετρήθηκαν κατά την έναρξη του πειράματος στο διαμέρισμα-δότης.

Πίνακας Γ.8: Οι τιμές του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} (\pm SD) και της μέγιστης συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης (\pm SD) που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου (Εξίσωση B.5) στα πρωτογενή δεδομένα, όταν στο διαμέρισμα-δότης το μικρομόριο ήταν διαλυμένο σε FaSSIF-V2 ή FeSSIF-V2, καθώς και οι συγκεντρώσεις των μικρομορίων στο διαμέρισμα-δέκτης, που είχαν μετρηθεί πριν την έναρξη των πειραμάτων.

	Διάλυμα στο διαμέρισμα-δότης	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)	$\frac{(M_{D(0)} - Q)^{estim}}{V_D}$ (μ g/ml)	$\frac{M_{D(0)}^{meas}}{V_D}$ (μ g/ml)
Δαναζόλη	FaSSIF-V2	1,30 \pm 0,12	3,48 \pm 0,12	3,71
	FeSSIF-V2	0,93 \pm 0,17	22,2 \pm 1,9	22
Μικρομόριο A	FaSSIF-V2	0,183 \pm 0,024	0,700 \pm 0,042	0,847
	FeSSIF-V2	0,300 \pm 0,034	0,861 \pm 0,035	Δεν μετρήθηκε
Μικρομόριο B	FaSSIF-V2	0,825 \pm 0,062	4,50 \pm 0,13	4,97
	FeSSIF-V2	0,626 \pm 0,058	10,29 \pm 0,46	14,13

Για τη δαναζόλη και το μικρομόριο B παρατηρείται ότι ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} [(2,11 \pm 0,16) $\times 10^{-4}$ cm/s και (1,191 \pm 0,037) $\times 10^{-4}$ cm/s, αντίστοιχα, Πίνακας Γ.1] είναι μικρότερος σε πείραμα με FaSSIF-V2 σε σχέση με PrismaTM HT και ακόμα μικρότερος με FeSSIF-V2. Οι τιμές από τα τρία μέσα διαφέρουν σημαντικά τόσο για το μικρομόριο B ($p < 0,001$) όσο και για τη δαναζόλη ($p = 0,004$). Η ελαφρά μείωση του συντελεστή διαπερατότητας με τη χρήση

προσομοιωμένων εντερικών περιεχομένων (FaSSIF και FeSSIF) έχει αναφερθεί στο παρελθόν (Lu et al., 2007). Για το μικρομόριο A υπολογίζεται μεγαλύτερος συντελεστής διαπερατότητας με FeSSIF-V2 σε σχέση με FaSSIF-V2, αλλά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τιμών ($p=0,595$).

Στον Πίνακα Γ.9 παρουσιάζονται οι εκτιμηθείσες τιμές P_{app}^{PAMPA} με βάση το γραμμικό μοντέλο και πρωτογενή δεδομένα από τα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς.

Πίνακας Γ.9: Τιμές του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} σε FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 για τα πέντε υπό έλεγχο μικρομόρια με βάση το γραμμικό μοντέλο και πρωτογενή δεδομένα στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς (Εξίσωση A.9) ^a

	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)	
	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
Δαναζόλη	0,979	0,918
Μικρομόριο A	0,114	Δεν εκτιμήθηκε
Μικρομόριο B	0,796	0,417
Μικρομόριο Γ	0,000325	0,00117
Ριμπαβιρίνη	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε

^a Τα r^2 των ευθειών από τις οποίες προέκυψαν οι κλίσεις dQ/dt κυμάνθηκαν μεταξύ 0,635 και 0,976.

Με βάση τον Πίνακα Γ.9 και το Κεφ. Γ.1.1, η μείωση του P_{app}^{PAMPA} κατά την κατεύθυνση Prisma™ HT > FaSSIF > FeSSIF παραμένει για τη δαναζόλη ($1,24 \times 10^{-4} > 0,979 \times 10^{-4} > 0,918 \times 10^{-4}$ cm/s), αν και δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,214$). Αντίθετα, δεν παραμένει για το μικρομόριο B ($0,544 \times 10^{-4} < 0,796 \times 10^{-4} > 0,417 \times 10^{-4}$ cm/s), όπου οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($p=0,01$). Από την άλλη, εκτιμήθηκε το P_{app}^{PAMPA} για το μικρομόριο Γ (Πίνακας Γ.9), κάτι που δεν ήταν εφικτό με τη μέθοδο της προσαρμογής του απλού διαμερισματικού μοντέλου.

Τέλος, τα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας με τα μικρομόρια σε Prisma™ HT, FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 επιβεβαίωσαν τα όσα περιγράφονται στο Παράρτημα 2 σχετικά με τα προβλήματα υπολογισμού του συντελεστή διαπερατότητας με τη μέθοδο του σημείου (Avdeef, 2003). Στον Πίνακα Γ.10 παρουσιάζονται οι τιμές P_{app}^{PAMPA} που υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ενός σημείου για τη δαναζόλη και το μικρομόριο B.

Πίνακας Γ.10: Φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} (cm/s) σε Prisma™ HT, FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 για τη δαναζόλη και το μικρομόριο B που εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο ενός σημείου (Παράρτημα 2)

	$P_{app}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)		
	Prisma™ HT	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
Δαναζόλη (40 min)	10,1	4,80	2,29
Δαναζόλη (300 min)	Μη διαθέσιμο	1,81	1,08
Μικρομόριο B (420 min)	0,612	0,722	0,452

Για τη δαναζόλη προκύπτει ότι δεν αλλάζει η τάση μείωσης του P_{app}^{PAMPA} κατά την κατεύθυνση Prisma™ HT > FaSSIF > FeSSIF, αλλά ο υπολογιζόμενος συντελεστής διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} διαφέρει με τη χρονική στιγμή της μέτρησης. Αυτό οφείλεται στη μεταβολή του R με το χρόνο (παράρτημα 2). Για το μικρομόριο B φαίνεται ότι με τη μέθοδο ενός σημείου δεν παρατηρείται η τάση που προκύπτει με βάση τα δεδομένα μετά από προσαρμογή του απλού διαμερισματικού μοντέλου.

Γ.2 IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ CACO-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΩΝ

Τα πρωτογενή δεδομένα και οι καλύτερα προσαρμοσμένες καμπύλες παρουσιάζονται στο Παράρτημα 6.

Γ.2.1 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε MM

Γ.2.1.1 Δαναζόλη σε MM

Με βάση τα πρωτογενή δεδομένα (Παράρτημα 6) υπολογίστηκε η συνολική ποσότητα δαναζόλης στα κύτταρα, στα τοιχώματα, στα δείγματα που είχαν αφαιρεθεί και όση είχε απομείνει στο MM στα δύο διαμερίσματα του φρεατίου. Έτσι, προέκυψε ότι η ανάκτηση ήταν $76,73 \pm 3,53\%$. Κατά το μεγαλύτερο ποσοστό η δαναζόλη δεσμευόταν στα κύτταρα ($35,96 \pm 3,87\%$), αλλά σημαντικό ποσοστό προσροφούνταν και στα τοιχώματα ($16,43 \pm 4,60\%$).

Οι τιμές των παραμέτρων που υπολογίσθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα Γ.11.

Πίνακας Γ.11: Εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων για τη μεταφορά της δαναζόλης από MM μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων ^a

$P_a \times 10^4$ (cm/s)	$P_b \times 10^4$ (cm/s)	$K \times 10^3$	C_{Aab0} (μg/ml) ^γ	C_{Bba0} (μg/ml) ^δ	v_k	k_{off} (1/s)	k_{on} [1/(s×μg/ml)]	W_{tot} (μg)
$6,43 \pm 0,58^b$	$2,01 \pm 0,13^b$	1,26	0,310	0,301	0	0	0,352	0,0268

^a Οι επεξηγήσεις όλων των συμβόλων δίνονται στο Παράρτημα 4.

^b Μέσοι±SD, n=3

^γ Η συγκέντρωση στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου στο χρόνο 0, όταν το πείραμα γίνεται κατά την κατεύθυνση πάνω προς κάτω.

^δ Η συγκέντρωση στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου στο χρόνο 0, όταν το πείραμα γίνεται κατά την κατεύθυνση κάτω προς πάνω.

Το πείραμα αυτό έδειξε καταρχάς ότι στα 180 min έχει επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων στα δύο διαμερίσματα του φρεατίου (Παράρτημα 6). Για το λόγο αυτό τα πειράματα για την αντοχή των κυττάρων στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ, καθώς και τα πειράματα διαπερατότητας με δείγματα ΕΠ και ΜΦ διήρκεσαν 180 min. Επίσης, βρέθηκε ότι δεν μεσολαβεί φορέας στη μεταφορά της δαναζόλης ($v_k=0$). Όσον αφορά στον πιθανό μεταβολισμό της δαναζόλης κατά τη διέλευσή της από την κυτταρική μονοστιβάδα, δεν εντοπίστηκε σχηματισμός μεταβολιτών.

Εκτός από το v_k , τιμή 0 υπολογίστηκε και για τη σταθερά k_{off} . Οι όροι v_k και k_{off} τέθηκαν στη συνέχεια σταθεροί και ίσοι με 0 σε όλα τα πειράματα διαπερατότητας μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων με δαναζόλη και μικρομόρια που μεταφέρονται με παθητική διάχυση. Αν δεν ορίζονταν οι όροι σταθεροί και η τιμή τους αφηνόταν να υπολογιστεί από τη μη γραμμική προσαρμογή, οι προς επίλυση παράμετροι ήταν τόσο πολλές, ώστε οι εκτιμηθείσες παράμετροι συσχετιζόνταν.

Η διαφορά μεταξύ των συντελεστών διαπερατότητας P_a και P_b μπορεί να εξηγηθεί με την παρουσία μικρολαχνών στην ενδοαυλική μεμβράνη ή/και σε διαφοροποιήσεις των δύο διαμερισμάτων (π.χ. όγκοι, υδροδυναμικές συνθήκες, υλικό στήριξης της μονοστιβάδας). Ανάλογες διαφορές μεταξύ P_a και P_b έχουν παρατηρηθεί και με άλλες ενώσεις στο παρελθόν (Imanidis et al., unpublished data).

Από τις τιμές P_a και P_b υπολογίστηκε ο P_{hm} (Παράρτημα 4) και βρέθηκε $(3,06 \pm 0,34) \times 10^4$ cm/s.

Γ.2.1.2 Υπόλοιπα μικρομόρια σε MM

Για τα υπόλοιπα μικρομόρια, ανάκτηση ήταν δυνατό να υπολογιστεί μόνο στα πειράματα με λεβοβιρίνη και ριμπαβιρίνη. Η ανάκτηση βρέθηκε $101,86 \pm 1,95\%$ και $100,78 \pm 2,19\%$, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα Γ.12 παρουσιάζονται οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} (Παράρτημα 4) για τα τέσσερα πρότυπα μόρια που υπολογίστηκαν με μη γραμμική προσαρμογή του κινητικού μοντέλου στα δεδομένα από πειράματα διαπερατότητας με MM. Τα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς και οι καλύτερα προσαρμοσμένες καμπύλες για την αμοξικιλίνη και τη ρανιτιδίνη παρουσιάζονται στο Παράρτημα 6.

Πίνακας Γ.12: Φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} και τυπικά σφάλματα του υπολογισμού (standard errors of estimate) (όπου ήταν διαθέσιμα) για τις τέσσερις πρότυπες ουσίες σε MM

	Υψηλή/Χαμηλή Διαπερατότητα ^a	$P_{hm} \times 10^4$ (cm/s)
Αμοξικιλίνη	Χαμηλή	0,0124 ± 0,0019
Ρανιτιδίνη	Χαμηλή	< 0,00011 ^β
Καρβαμαζεπίνη	Υψηλή	3,18 ^γ
Προπρανολόλη	Υψηλή	3,22 ^γ

^a FDA, 2000

^β Ενδεικτική τιμή. Οι συγκεντρώσεις στο διαμέρισμα-δέκτης ήταν πολύ κοντά στο όριο ανίχνευσης για να επιτρέψουν αξιόπιστο υπολογισμό του P_{hm} .

^γ Schneider, 2008

Στον Πίνακα Γ.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσαρμογής του μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας των πέντε υπολοίπων μικρομορίων σε MM. Τα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς και οι καλύτερα προσαρμοσμένες καμπύλες παρουσιάζονται στο Παράρτημα 6.

Πίνακας Γ.13: Αποτελέσματα της προσαρμογής του κινητικού μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας με τα πέντε υπό έλεγχο μικρομόρια σε MM

	$(P_a \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	$(P_b \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	$(P_{hm} \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	K	v_k [1/(cm ² ×s)]	C_{0ab}^a (μg/ml)	C_{0ba}^b (μg/ml)	k_{on} [1/(s×μg/ml)]	W_{tot} (μg)
Μικρομόριο Α	6,74 ± 1,03	3,13 ± 0,38	4,27 ± 0,83 ^γ	6,26×10 ⁻⁵	5,17×10 ⁻⁵	0,0478	0,0349	18,1	6,36×10 ⁻³
Μικρομόριο Β	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε	2,50 ± 0,26	0,493	0	2,37	2,26	251	3,71×10 ⁻³
Μικρομόριο Γ ^δ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Λεβοβιρίνη	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε	0,0128 ± 0,00066	45,1	0	1,51×10 ²	1,52×10 ²	0	0
Ριμπαβιρίνη	0,0189 ± 0,0031	0,0402 ± 0,0080	0,0257 ± 0,0066	1,91	7,40×10 ⁻⁷	1,01×10 ³	0,981×10 ³	0	0

^α Συγκέντρωση της ουσίας σε χρόνο t=0 όταν η κατεύθυνση του πειράματος διαπερατότητας είναι από το πάνω προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

^β Συγκέντρωση της ουσίας σε χρόνο t=0 όταν η κατεύθυνση του πειράματος διαπερατότητας είναι από το κάτω προς το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου.

^γ Η τυπική απόκλιση του P_{hm} υπολογίζεται από τη μετάδοση των τυπικών αποκλίσεων του P_a και του P_b (error propagation).

^δ Οι συγκεντρώσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Με βάση τους Πίνακες Γ.11, Γ.12 και Γ.13 προκύπτει ότι η δαναζόλη, το μικρομόριο Α και το μικρομόριο Β είναι μόρια υψηλής διαπερατότητας, ενώ η λεβοβιρίνη και η ριμπαβιρίνη είναι μόρια χαμηλής διαπερατότητας. Το μικρομόριο Γ δεν μπορεί να καταταχθεί, επειδή δεν υπολογίστηκε τιμή φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας σε ΜΜ. Η διαφορά των τιμών στους συντελεστές διαπερατότητας μεταξύ των δύο κατηγοριών διαπερατότητας είναι μεγαλύτερη από δύο τάξεις μεγέθους. Ο P_{hm} των μικρομορίων υψηλής διαπερατότητας βρίσκεται σε ένα εύρος τιμών χαρακτηριστικό της διαπέρασης που ελέγχεται από την UWL (Ho et al., 2000).

Γ.2.2 Πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και μικκυλιακή φάση εντερικών περιεχομένων (ΜΦ)

Γ.2.2.1 Σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταφοράς μετά από διάφορες αραιώσεις των αναρροφηθέντων δειγμάτων

Στον Πίνακα Γ.14 παρουσιάζονται οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} που υπολογίστηκαν μετά από πειράματα διαπερατότητας με ένα δείγμα ΕΠ και με ένα δείγμα ΜΦ που είχαν υποστεί διαφορετικές αραιώσεις από ότι τα υπόλοιπα δείγματα.

Πίνακας Γ.14: Φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} [$\times 10^4$ (cm/s)] για το δείγμα ΕΠ #2-90 min και το δείγμα ΜΦ #2-210 min

Αραιώση	Δείγμα ΕΠ #2-90 min	Δείγμα ΜΦ #2-210 min
1:4	0,187	1,07
1:8	0,486	2,20
1:12	0,628	3,33
1:16	0,532	Δεν υπήρχαν δεδομένα
1:20	Δεν υπήρχαν δεδομένα	3,20
1:24	1,37	Δεν υπήρχαν δεδομένα
1:32	1,95	Δεν υπήρχαν δεδομένα
1:48	2,24	Δεν υπήρχαν δεδομένα

Από τον Πίνακα Γ.14 προκύπτει ότι υπάρχουν δείγματα για τα οποία ακόμα και αραιώση 1:4 γίνεται ανεκτή από τα κύτταρα. Επίσης, φαίνεται ότι αύξηση της αραιώσης προκαλεί αύξηση του συντελεστή διαπερατότητας.

Γ.2.2.2 Σύγκριση των χαρακτηριστικών μεταφοράς χρησιμοποιώντας δείγματα αραιωμένα 1:16 με MM

Η ανάκτηση της δαναζόλης στα δείγματα ΕΠ ήταν καλύτερη από ότι στα δείγματα ΜΦ. Στα δείγματα ΕΠ ήταν $119,69 \pm 27,85\%$, ενώ στα δείγματα ΜΦ ήταν $66,90 \pm 6,32\%$. Αναλυτικά, οι ανακτήσεις για κάθε δείγμα παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.15. Η διαφορά αυτή οφείλεται αφενός στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ΕΠ ήταν τόσο μεγάλες που το ποσοστό δαναζόλης που χανόταν ήταν πολύ μικρό και αφετέρου στο μεγαλύτερο ποσοστό λιπιδίων που αυτά περιείχαν. Τα λιπίδια δρούσαν ανταγωνιστικά προς την προσρόφιση στα πλαστικά μέρη του φρεατίου και τον εγκλωβισμό στα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάκτηση στα δείγματα ΜΦ ήταν συγκρίσιμη με την ανάκτηση στα πειράματα με δαναζόλη διαλυμένη σε TM (Κεφ. Γ.2.1.1).

Πίνακας Γ.15: Ανάκτηση δαναζόλης % (Μέσοι±SD, n=3) μετά τα πειράματα με δείγματα ΕΠ και ΜΦ

Εθελοντής – χρόνος (min)	Ανάκτηση δειγμάτων ΕΠ %	Ανάκτηση δειγμάτων ΜΦ %
#1-120	Αδύνατη εκτίμηση	Αδύνατη εκτίμηση
#2-90	98,85±5,01	66,97±5,39
#2-180	146,59	67,94±4,18
#2-210	111,62±6,63	70,19±3,91
#3-150	Αδύνατη εκτίμηση	76,50±12,25
#4-60	89,09±2,81	71,12±6,30
#4-120	98,15±3,07	72,76±3,46
#4-150	97,74±3,07	66,70±1,06
#5-180	Αδύνατη εκτίμηση	67,04±5,64
#5-210	99,66±0,04	Αδύνατη εκτίμηση
#5-240	Αδύνατη εκτίμηση	71,98±4,06
#6-90	119,98±3,53	59,97±1,80
#6-180	Αδύνατη εκτίμηση	58,72±0,72
#7-180	124,44±7,90	67,41±4,91
#7-210	Αδύνατη εκτίμηση	60,72±3,90
#7-240	Αδύνατη εκτίμηση	Αδύνατη εκτίμηση

Στον Πίνακα Γ.16 παρουσιάζονται οι τιμές για την αρχική συγκέντρωση δαναζόλης στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου (διαμέρισμα-δότης) όπως υπολογίστηκαν από τη μη γραμμική προσαρμογή του πολυδιαμερισματικού μοντέλου στα δεδομένα σε σχέση με τις τιμές που είχαν μετρηθεί στην HPLC πριν την έναρξη του πειράματος.

Πίνακας Γ.16: Αρχική συγκέντρωση δαναζόλης στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου όπως υπολογίστηκε από τη μη γραμμική προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα (C_{donor}^{estim}) σε σχέση με τις τιμές που είχαν μετρηθεί στην HPLC πριν την έναρξη του πειράματος (C_{donor}^{meas})

Είδος δείγματος	Εθελοντής- χρόνος (min)	C (μg/ml)		$C_{donor}^{estim}/C_{donor}^{meas} \times 100\%$
		C_{donor}^{estim}	C_{donor}^{meas}	
ΕΠ	#1-120	2,59	1,70	153
	#2-90	3,73	3,92	95,3
	#2-180	0,900	0,998	90,2
	#2-210	2,81	2,66	106
	#4-60	5,69	7,13	79,8
	#4-120	4,29	4,78	89,8
	#4-150	1,51	1,56	96,6
	#5-180	2,12	1,65	129
	#5-210	1,76	2,66	66,4
	#6-90	4,48	3,56	126
	#6-180	0,872	0,501	174
	#7-180	4,75	3,80	125
#7-240	1,13	0,722	157	
ΜΦ	#2-90	0,168	0,270	62,2
	#2-180	0,255	0,400	63,8
	#2-210	0,441	0,654	67,4
	#3-150	0,0571	0,0740	77,2
	#4-60	0,354	0,531	66,7
	#4-120	1,26	1,79	70,4
	#4-150	0,144	0,224	64,3
	#5-180	0,0564	0,0850	66,4
	#5-240	0,126	0,189	66,7
	#6-90	0,461	0,781	59,0
	#6-180	0,184	0,280	65,7
	#7-180	0,341	0,530	64,3
#7-210	0,443	0,772	57,4	

Για τα δείγματα ΕΠ η μέση τιμή του λόγου $C_{donor}^{estim}/C_{donor}^{meas}$ είναι ικανοποιητική [114,3(±32,5)%]. Για τα δείγματα ΜΦ η μέση τιμή του λόγου είναι 65,5(±4,93)%. Στην περίπτωση αυτή φαίνεται ότι η προσαρμογή υποεκτιμά τις πραγματικές τιμές κατά περίπου 33%. Η υποεκτίμηση αυτή οφείλεται στις χαμηλές συγκεντρώσεις των

δειγμάτων ΜΦ, καθώς και στη χαμηλή ανάκτηση της δαναζόλης στα πειράματα με δείγματα ΜΦ.

Από τα 36 δείγματα (18 ζεύγη) ΕΠ και ΜΦ ήταν εφικτό να γίνει προσαρμογή του πολυδιαμερισματικού μοντέλου στα δεδομένα για 28 δείγματα, δηλ. 15 δείγματα ΕΠ και 13 δείγματα ΜΦ. Για τα δείγματα αυτά υπήρχε αρκετός διαθέσιμος όγκος και οι συγκεντρώσεις τους κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν μεγαλύτερες του ορίου ανίχνευσης της HPLC. Αναλυτικά, οι εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων για τη μεταφορά της δαναζόλης από δείγματα ΕΠ παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.17 και από δείγματα ΜΦ στον Πίνακα Γ.18.

Πίνακας Γ.17: Εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων για τη μεταφορά της δαναζόλης από δείγματα ΕΠ μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Εθελοντής- χρόνος (min)	$(P_{hm} \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	$K \times 10^3$	C_{Aab0} ($\mu\text{g/ml}$)	u	k_{on} ($s \times \mu\text{g/ml}$) ⁻¹	$W_{tot} \times 10^3$ (μg)
#1-120	1,04±0,10	5,91	2,59	0	0,000955	100
#2-90	0,589±0,082	9,14	3,73	0	0,000895	96,4
#2-180	3,93±1,68	1,17	0,900	0	0,000144	303
#2-210	0,981±0,039	4,54	2,81	0,0469	0,120	6,46
#4-60	0,396±0,015	13,0	5,69	0,145	0,0678	4,30
#4-120	0,539±0,014	13,0	4,29	0,141	0,0867	11,7
#4-150	1,55±0,11	3,77	1,51	0,0305	0,355	6,25
#5-180	1,20±0,31	5,15	2,12	0	1,386	7,76
#5-210	1,48±0,12	4,47	1,76	0,0317	0,360	19,5
#5-240	0,744±0,055	8,12	3,97	0	0,248	29,1
#6-90	0,382±0,072	19,9	4,48	0,209	0,0669	15,7
#6-180	2,16±0,18	2,48	0,872	0	0	28,3
#7-180	0,563±0,039	9,13	4,75	0,00146	0,160	26,8
#7-210	0,928±0,12	6,35	2,09	0	0,00028	106
#7-240	2,81±0,51	1,44	1,13	0	0,0957	0

Πίνακας Γ.18: Εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων για τη μεταφορά της δαναζόλης από δείγματα ΜΦ μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Εθελοντής- χρόνος (min)	$(P_{hm} \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	$K \times 10^3$	C_{Aab0} ($\mu\text{g/ml}$)	u	k_{on} ($\text{s} \times \mu\text{g/ml}$) ⁻¹	$W_{tot} \times 10^3$ (μg)
#2-90	3,00±1,16	1,10	0,168	0,838	0,034	36,6
#2-180	1,51±0,63	1,53	0,255	0,92	0,209	13,6
#2-210	2,54±0,58	1,31	0,441	1,03	1,839	7,00
#3-150	3,16±2,47	1,29	0,0571	1,24	0,994	0,868
#4-60	3,04±2,57	2,36	0,354	1,19	2,923	7,534
#4-120	1,20±0,43	3,87	1,26	2,72	0,614	13,52
#4-150	2,04±0,31	1,94	0,144	1,44	0,938	2,15
#5-180	3,46±7,84	1,80	0,0564	1,04	4,99	0,87
#5-240	2,42±0,42	2,17	0,126	1,12	0,944	4,36
#6-90	1,72±0,45	1,76	0,461	1,15	1,346	2,25
#6-180	2,04±0,43	1,02	0,184	1,05	0,990	0,00365
#7-180	2,75±0,34	2,08	0,341	1,21	7,847	6,51
#7-210	1,89±0,80	1,67	0,443	1,58	6,763	1,26

Οι μέσες τιμές K (Παράρτημα 4) για τα δείγματα ΕΠ ήταν $(7,17 \pm 5,07) \times 10^{-3}$, ενώ για τα δείγματα ΜΦ ήταν $(1,84 \pm 0,74) \times 10^{-3}$. Οι τιμές είναι πολύ μικρότερες από 1, κάτι που δείχνει ότι η λιπόφιλη δαναζόλη είχε υψηλότερη συγγένεια με το εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, το K είναι σημαντικά μεγαλύτερο για τα δείγματα ΕΠ ($p < 0,001$), γεγονός που δικαιολογείται από την παρουσία σε αυτά περισσότερων λιπιδίων σε σχέση με τα δείγματα ΜΦ. Σημαντική αρνητική συσχέτιση Spearman rank βρέθηκε για τα δείγματα ΕΠ ($r = -0,985$, $p < 0,001$, $n = 15$), αλλά όχι για τα δείγματα ΜΦ ($p = 0,669$). Ο συντελεστής μερισμού της δαναζόλης μεταξύ του πάνω και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου (u) ήταν $< 0,2$ για τα δείγματα ΕΠ και 0,8-2,7 για τα δείγματα ΜΦ. Οι τιμές αυτές οφείλονται στον τρόπο παρασκευής της διασποράς λιποσωμάτων για το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου (διαμέρισμα-δέκτης).

Τα ζεύγη για τα οποία υπολογίστηκαν οι παράμετροι τόσο για το δείγμα ΕΠ όσο και για το αντίστοιχο δείγμα ΜΦ ήταν 12. Στον Πίνακα Γ.19 γίνεται σύγκριση των

συντελεστών διαπερατότητας P_{hm} για τα δείγματα από τον ίδιο εθελοντή και τον ίδιο χρόνο (παρατηρήσεις κατά ζεύγη).

Πίνακας Γ.19: Σύγκριση φαινόμενων συντελεστών διαπερατότητας P_{hm} δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ που υπολογίστηκαν με το πολυδιαμερισματικό μοντέλο

Εθελοντής – χρόνος (min)	P_{hm} δειγμάτων ΕΠ $\times 10^4$ (cm/s)	P_{hm} δειγμάτων ΜΦ $\times 10^4$ (cm/s)
#1-120	1,04	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#2-90	0,589	3,00
#2-180	3,93	1,51
#2-210	0,981	2,54
#3-150	Δεν υπήρχαν δεδομένα	3,16
#4-60	0,396	3,04
#4-120	0,539	1,20
#4-150	1,55	2,04
#5-180	1,20	3,46
#5-210	1,48	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#5-240	0,744	2,42
#6-90	0,382	1,72
#6-180	2,16	2,04
#7-180	0,563	2,75
#7-210	0,928	1,89
#7-240	2,81	Δεν υπήρχαν δεδομένα

Οι μέσες τιμές των P_{hm} των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ είναι $(1,29 \pm 1,00) \times 10^{-4}$ και $(2,37 \pm 0,70) \times 10^{-4}$ cm/s, αντίστοιχα. Για τα 12 ζεύγη από τον ίδιο εθελοντή και τον ίδιο χρόνο, παρά τη σημαντική αραίωση των δειγμάτων, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στους συντελεστές διαπερατότητας μεταξύ των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ ($p=0,017$). Η σύγκριση των τιμών P_{hm} των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ με την τιμή από πείραμα με δαναζόλη διαλυμένη σε ΜΜ ($3,06 \times 10^{-4}$ cm/s) δείχνει ότι

υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο για τα δείγματα ΕΠ ($p < 0,001$) όσο και για τα δείγματα ΜΦ ($p = 0,0037$), παρά τη μεγάλη αραιώση των δειγμάτων ΜΦ.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι, εάν ο χειρισμός των δεδομένων δεν γινόταν με τη χρήση μοντέλου, το παραπάνω συμπέρασμα δεν θα ήταν δυνατό να εξαχθεί. Οι συντελεστές διαπερατότητας με βάση την απεικόνιση αθροιστικής ποσότητας που μεταφέρθηκε ως προς το χρόνο σε συνθήκες δεξαμενής (δηλ. με βάση τα δεδομένα στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς) και το γραμμικό μοντέλο παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.20.

Πίνακας Γ.20: Σύγκριση συντελεστών διαπερατότητας P_{app}^{Caco} δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ με βάση το γραμμικό μοντέλο και πρωτογενή δεδομένα από τα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς (Εξίσωση Α.9) ^α

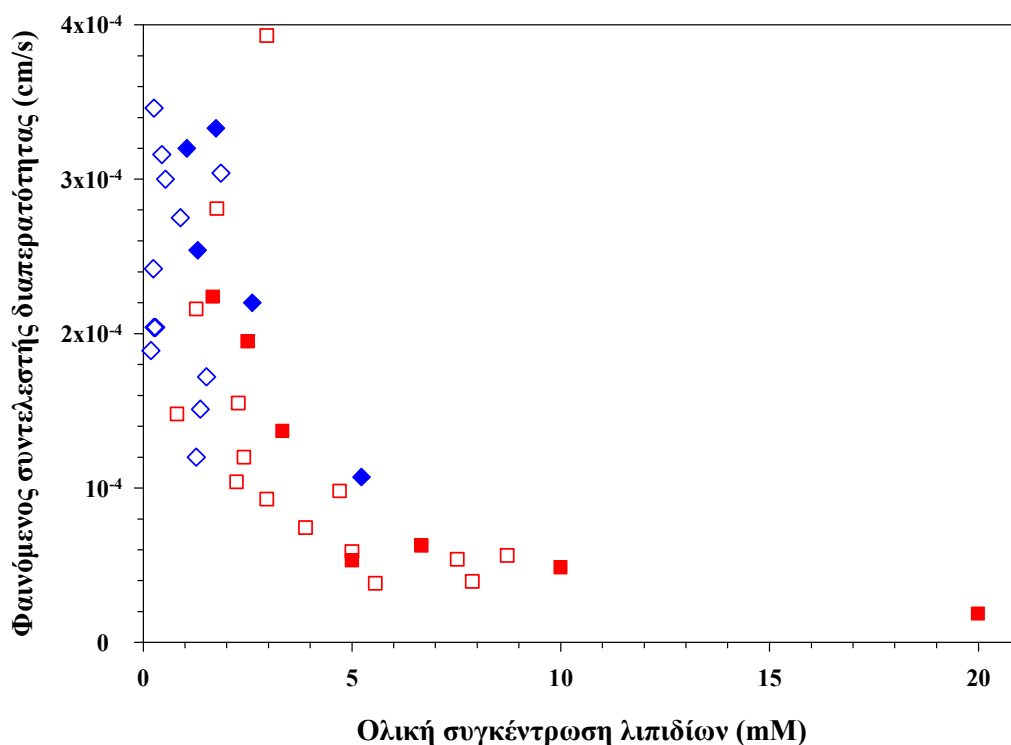
Εθελοντής-χρόνος (min)	P_{app}^{Caco} δειγμάτων ΕΠ $\times 10^4$ (cm/s)	P_{app}^{Caco} δειγμάτων ΜΦ $\times 10^4$ (cm/s)
#1-120	0,0125	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#2-90	Δεν υπήρχαν δεδομένα	0,00235
#2-180	0,0106	0,00217
#2-210	0,00804	0,00321
#3-150	Δεν υπήρχαν δεδομένα	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#4-60	0,00435	0,00278
#4-120	0,00623	0,00296
#4-150	0,0103	0,00208
#5-180	0,0104	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#5-210	0,00973	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#5-240	0,0391	0,00292
#6-90	0,00689	0,00226
#6-180	0,1623	0,0223
#7-180	0,007685	0,0042
#7-210	Δεν υπήρχαν δεδομένα	0,00172
#7-240	22,5	Δεν υπήρχαν δεδομένα

^α τα r^2 των ευθειών από τις οποίες προέκυψαν οι κλίσεις dQ/dt κυμάνθηκαν μεταξύ 0,824 και 0,997

Σύγκριση των τιμών των συντελεστών διαπερατότητας των Πινάκων Γ.19 και Γ.20 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χωρίς τη χρήση μοντέλου οι τιμές είναι πολύ μικρότερες. Κάτι τέτοιο παρατηρήθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PAMPA (Κεφ. Γ.1.2). Επίσης, οι τιμές εκτιμώνται ότι είναι μεγαλύτερες για τη μεταφορά από τα εντερικά περιεχόμενα απ' ό,τι από τη μικκυλιακή φάση. Το τελευταίο είναι θεωρητικά αδύνατο να συμβεί για ένα μόριο που ο συντελεστής διαπερατότητας είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής μεταξύ του διαμερίσματος-δότη και της κυτταρικής μονοστιβάδας. Επομένως η αξιοπιστία της εκτίμησης με βάση τα αρχικά στάδια της διαδικασίας τίθεται υπό αμφισβήτηση.

Γ.2.2.3 Σχέση μεταξύ φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και συγκέντρωσης λιπιδίων

Για να ερευνηθεί το πώς οι λιπιδικές δομές (σταγονίδια, κυστίδια, μικκύλια) επιδρούν στο φαινόμενο συντελεστή διαπερατότητας, έγινε συσχέτιση των τιμών P_{hm} και της ολικής συγκέντρωσης λιπιδίων. Στο Σχήμα Γ.2 παρουσιάζεται η απεικόνιση της ολικής συγκέντρωσης λιπιδίων (PC, lyso-PC, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, διγλυκερίδια) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή P_{hm} για τα δείγματα ΕΠ (n=15), ΜΦ (n=13), του δείγματος ΕΠ 2-90 min που αραιώθηκε σε διαφορετικές από 1:16 αραιώσεις (n=7) και του δείγματος ΜΦ #2-210 min που αραιώθηκε σε διαφορετικές από 1:16 αραιώσεις (n=4).



Σχήμα Γ.2: Απεικόνιση σε συνάρτηση με την ολική συγκέντρωση λιπιδίων του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας P_{hm} ($n=39$). Τα κόκκινα τετράγωνα αντιστοιχούν σε δείγματα ΕΠ, ενώ οι μπλε ρόμβοι σε δείγματα ΜΦ. Τα άδεια σύμβολα αντιστοιχούν σε αραιώσεις 1:16. Τα γεμάτα κόκκινα τετράγωνα αντιστοιχούν σε αραιώσεις 1:4 ως 1:48 του δείγματος ΕΠ #2-90 min, ενώ οι γεμάτοι μπλε ρόμβοι σε αραιώσεις 1:4 ως 1:20 του δείγματος ΜΦ #2-210 min.

Από το Σχήμα Γ.2 φαίνεται ότι ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση λιπιδίων. Συσχετίσεις Spearman rank δείχνουν ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ του P_{hm} και της ολικής συγκέντρωσης λιπιδίων για τα δείγματα ΕΠ ($r=-0,843$, $p<0,001$, $n=15$) και για το δείγμα ΕΠ #2-90 min που αραιώθηκε σε διαφορετικές από 1:16 αραιώσεις ($r=-0,964$, $p<0,001$, $n=7$). Για τα δείγματα ΜΦ δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=0,616$), όπως δεν βρέθηκε και για το δείγμα ΜΦ #2-210 min που αραιώθηκε σε διαφορετικές από 1:16 αραιώσεις ($p=0,333$).

Το Σχήμα Γ.2 και οι Spearman rank συσχετίσεις επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο που παίζει η συγκέντρωση λιπιδίων στο φαινόμενο συντελεστή διαπερατότητας της

δαναζόλης. Επίσης, επιβεβαιώνουν τη θεωρία ότι ο συντελεστής διαπερατότητας στα δείγματα ΕΠ είναι μικρότερος από ότι στα δείγματα ΜΦ, επειδή τα πρώτα περιέχουν περισσότερα λιπίδια, τα οποία μειώνουν το ελεύθερο κλάσμα δαναζόλης ακόμα περισσότερο. Από το Σχήμα Γ.2 φαίνεται επιπλέον ότι η σχέση μεταξύ φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και συγκέντρωσης λιπιδίων ήταν παρόμοια για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ, ανεξάρτητα από την προέλευση των λιπιδίων (διαφορετικοί εθελοντές) και την τιμή της συγκέντρωσης. Προκύπτει δηλαδή το συμπέρασμα ότι τα ΜιΛ και οι ΜΛΣ επηρεάζουν κατά τον ίδιο τρόπο το συντελεστή διαπερατότητας και ότι η σύσταση και η δομή των λιπιδίων δεν παίζουν σημαντικό ρόλο. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Buyukozturk et al. (2010) με διαφορετικό πείραμα. Θεωρήθηκε ότι αν και η αραίωση μπορεί να επηρεάσει τη δομή των λιπιδικών σχηματισμών, αυτοί σε γενικές γραμμές διατηρούν την οργάνωσή τους, με την προϋπόθεση να μην πέσει η ολική συγκέντρωση λιπιδίων κάτω από την CMC (critical micellar concentration).

Η συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και της ολικής συγκέντρωσης λιπιδίων είναι καλύτερη για τα δείγματα ΕΠ σε σχέση με τα δείγματα ΜΦ. Αυτό πιθανό να έχει σχέση με μια αλλαγή στη μικκυλιακή δομή που προκαλεί η αραίωση για τα περισσότερα δείγματα ΜΦ και έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διασπορά τιμών για συγκεντρώσεις μικρότερες από περίπου 1 mM. Ανάλογα με τη λιπιδική σύσταση της μικκυλιακής φάσης, πιθανό να μη σχηματίζονται μικκύλια κάτω από αυτή τη συγκέντρωση. Η μικρότερη ολική συγκέντρωση λιπιδίων που απαιτείται για το σχηματισμό μικτών μικκυλίων φωσφατιδυλοχολίνης-χολικών αλάτων είναι μεταξύ 0,25 και 1 mM, ανάλογα με το λόγο φωσφατιδυλοχολίνης-χολικών αλάτων, το είδος του χολικού άλατος και την παρουσία άλλων λιπιδίων (π.χ. μονογλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων) και φαρμάκου στο σύστημα (Naylor et al., 1993 και de Castro et al., 2001). Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι μεγάλη αραίωση μικτών μικκυλίων φωσφατιδυλοχολίνης-χολικών αλάτων οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων φωσφατιδυλοχολίνης (Schurtenberger et al., 1985). Καθώς το περιεχόμενο της μικκυλιακής φάσης σε φωσφατιδυλοχολίνη είναι μικρό και με υψηλή μεταβλητότητα (Πίνακας Π1.2), πιθανό να μη σχηματίζονται πάντα κυστίδια φωσφατιδυλοχολίνης από την αραίωση των δειγμάτων. Αυτές οι εικασίες πιθανό να είναι υπεύθυνες για τη διασπορά των δεδομένων σε χαμηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων, δεδομένου ότι τα ΑΛ δεν επηρεάζουν τη διαπερατότητα όπως οι υπόλοιπες λιπιδικές δομές. Πάντως, οι μεγαλύτερες τιμές P_{hm} για τα δείγματα ΜΦ βρίσκονται σε

συμφωνία με την τιμή P_{hm} για πείραμα με δαναζόλη σε MM (αναλογιζόμενοι και το πειραματικό λάθος). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι σε φυσιολογικές συνθήκες τα χολικά άλατα στο δωδεκαδάκτυλο βρίσκονται πάντα με τη μορφή μικτών μικκυλίων. Η μείωση του συντελεστή διαπερατότητας όσο αυξάνει η συγκέντρωση λιπιδίων δεν ακολουθεί γραμμική σχέση. Τα σημεία του Σχήματος Γ.2 δείχνουν ότι ο P_{hm} πιθανό να φτάσει σε μια τιμή plateau για μεγάλες συγκεντρώσεις λιπιδίων. Δεν είναι δυνατό με βάση αυτά τα δεδομένα να προκύψει συμπέρασμα για το αν η τιμή αυτή θα είναι 0 ή $\neq 0$, ούτε να προκύψει μη εμπειρική εξίσωση που να περιγράφει τη συσχέτιση P_{hm} και συγκέντρωσης λιπιδίων. Για το λόγο αυτό δεν μπορούν να υπολογιστούν και τιμές για τα αναραίωτα δείγματα ΕΠ και ΜΦ. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να προκύψει το λογικό συμπέρασμα ότι οι τιμές P_{hm} για τα αναραίωτα δείγματα θα είναι μικρότερες από ότι για τα αραιωμένα δείγματα και ότι οι τιμές για τα αναραίωτα δείγματα ΕΠ θα είναι μικρότερες από ότι για τα αναραίωτα δείγματα ΜΦ.

Γ.2.2.4 Ροή δαναζόλης από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ

Στον Πίνακα Γ.21 παρουσιάζονται οι τιμές ροής δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ που υπολογίστηκαν από τα δεδομένα των Πινάκων Γ.17 και Γ.18, την εξίσωση Α.8 (Κεφ. Α.5.1) και θέτοντας $C_{donor} = C_{Aab0}$.

Πίνακας Γ.21: Ροή δαναζόλης [($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2 \times 10^4$)] από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ

Εθελοντής-χρόνος (min)	Δείγματα ΕΠ	Δείγματα ΜΦ
#1-120	2,69	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#2-90	2,20	0,504
#2-180	3,54	0,385
#2-210	2,76	1,12
#3-150	Δεν υπήρχαν δεδομένα	0,180
#4-60	2,25	1,08
#4-120	2,31	1,51
#4-150	2,34	0,294
#5-180	2,54	0,195
#5-210	2,60	Δεν υπήρχαν δεδομένα
#5-240	2,95	0,305
#6-90	1,71	0,793
#6-180	1,88	0,375
#7-180	2,67	0,938
#7-210	1,94	0,837
#7-240	3,18	Δεν υπήρχαν δεδομένα

Η ροή (ρυθμός μεταφοράς ανά μονάδα έκτασης επιφάνειας) της δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ ήταν $(2,51 \pm 0,49) \times 10^{-4}$ και $(0,66 \pm 0,42) \times 10^{-4}$ ($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2$), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας ζεύγη δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ από τον ίδιο εθελοντή και χρόνο και στα οποία η ολική συγκέντρωση λιπιδίων ήταν ≥ 1 mM, οι τιμές των ροών από τα δείγματα ΕΠ ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις τιμές των ροών από τα δείγματα ΜΦ ($p=0,027$, $n=5$). Επομένως, οι μικρότερες τιμές P_{hm} για τα δείγματα ΕΠ δεν επηρεάζουν αρνητικά τη ροή της δαναζόλης, καθώς αυτές αντισταθμίζονται από την αυξημένη συγκέντρωση δαναζόλης σε αυτά. Από το χαρακτηρισμό των δειγμάτων είχε βρεθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δαναζόλης βρίσκεται στην ενδιάμεση φάση μετά την υπερφυγοκέντρωση.

Χρησιμοποιώντας συγκέντρωση κοντά στη διαλυτότητα, η μέγιστη τιμή ροής της δαναζόλης σε MM ήταν $1,22 \times 10^{-4}$ ($\mu\text{g/s}/\text{cm}^2$), δηλ. σημαντικά διαφορετική από τις τιμές ροής για τα δείγματα ΕΠ ($p < 0,001$) και για τα δείγματα ΜΦ ($p < 0,001$).

Γ.2.3 Πειράματα διαπερατότητας με το μικρομόριο σε μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων

Στον Πίνακα Γ.22 παρουσιάζεται η ανάκτηση των ουσιών μετά το τέλος των πειραμάτων με μέσα που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων, καθώς και με MM για σύγκριση. Προκύπτει ότι για τα υδρόφιλα μικρομόρια η ανάκτηση δεν επηρεάζεται από τη χρήση προσομοιωμένων εντερικών περιεχομένων (Κεφ. Γ.2.1.2), ενώ για τη δαναζόλη η χρήση $\text{FeSSIF}_{\text{Caco}}$ αυξάνει την ανάκτηση σε σχέση με MM (Κεφ. Γ.2.1.1), κάτι που δεν επιτυγχάνεται με το $\text{FaSSIF}_{\text{Caco}}$.

Πίνακας Γ.22: Ανάκτηση ουσιών % (\pm SD) μετά τα πειράματα με προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα

	Ανάκτηση %	
	$\text{FaSSIF}_{\text{Caco}}$	$\text{FeSSIF}_{\text{Caco}}$
Δαναζόλη	74,86 \pm 4,32	90,26 \pm 8,40
Μικρομόριο Α	64,25 \pm 1,43	95,54 \pm 1,46
Μικρομόριο Β	Δεν εκτιμήθηκε	Δεν εκτιμήθηκε
Μικρομόριο Γ	101,02 \pm 31,4	Δεν εκτιμήθηκε
Λεβοβιρίνη	110,79 \pm 1,76	98,59 \pm 1,64
Ριμπαβιρίνη	106,40 \pm 2,08	92,79 \pm 0,81

Στον Πίνακα Γ.23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσαρμογής του μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας των έξι υπό έλεγχο μικρομορίων σε $\text{FaSSIF}_{\text{Caco}}$ και $\text{FeSSIF}_{\text{Caco}}$.

Πίνακας Γ.23: Αποτελέσματα της προσαρμογής του κινητικού μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας με τα έξι μικρομόρια σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}

	Διάλυμα στο διαμέρισμα-δότης	$(P_{hm} \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)	K	u	v_k^a [1/(cm ² ×s)]	C_{0ab}^b (μg/ml)	k_{on} [1/(sec×μg/ml)]	W_{tot} (μg)
Δαναζόλη	FaSSIF _{Caco}	1,50 ± 0,73	0,00686	1,40	0	2,66	0,318	0,0809
	FeSSIF _{Caco}	0,115 ± 0,0063	0,207	15,4	0	21,5	0,165	0,104
Μικρομόριο Α	FaSSIF _{Caco}	0,266 ± 0,015	0,00213	2,88	$5,17 \times 10^{-5}$	0,0741	14,81	$7,31 \times 10^{-4}$
	FeSSIF _{Caco}	0,0287 ± 0,00090	0,118	7,50	$5,17 \times 10^{-5}$	10,7	$5,085 \times 10^{-5}$	0,219
Μικρομόριο Β	FaSSIF _{Caco}	1,20 ± 0,23	2,46	1,05	0	7,51	1,66	$1,15 \times 10^{-3}$
	FeSSIF _{Caco}	0,427 ± 0,071	7,99	4,15	0	16,8	0,495	$9,29 \times 10^{-4}$
Μικρομόριο Γ	FaSSIF _{Caco}	0,0407 ± 0,019	0,161	166	0	3,15	0,233	$6,22 \times 10^{-3}$
	FeSSIF _{Caco} ^γ	0,0135 ± 0,0017	0,294	467	0	6,60	0,0684	0,174
Λεβοβιρίνη	FaSSIF _{Caco}	0,0124 ± 0,0023	314	34,2	0	$1,04 \times 10^3$	0	0
	FeSSIF _{Caco}	0,0187 ± 0,0040	198	0	0	307	0	0
Ριμπαβιρίνη	FaSSIF _{Caco}	0,00693 ± 0,0016	52,0	124	$7,40 \times 10^{-7}$	$1,06 \times 10^3$	0	0
	FeSSIF _{Caco}	0,0187 ± 0,0058	88,6	42,0	$7,40 \times 10^{-7}$	278	0	0

^a Η παράμετρος v_k υπολογίστηκε από το πείραμα με MM, ενώ στα πειράματα με FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} ορίστηκε σταθερή και ίση με την τιμή που προέκυψε από το πείραμα με MM.

^b Συγκέντρωση της ουσίας σε χρόνο t=0 όταν η κατεύθυνση του πειράματος διαπερατότητας είναι από το πάνω προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

^γ Οι παράμετροι υπολογίστηκαν με δεδομένα από ένα μόνο φρεάτιο.

Στον Πίνακα Γ.24 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά μόνο οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} για τα έξι υπό έλεγχο μικρομόρια σε MM, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}.

Πίνακας Γ.24: Φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_{hm} με το πολυδιαμερισματικό μοντέλο και τυπικά σφάλματα της εκτίμησης για τα έξι μικρομόρια σε MM, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}, καθώς και η πυκνότητα σφάλματος (p value) που υπολογίζεται από one-way ANOVA

	$(P_{hm} \pm SD) \times 10^4$ (cm/s)			Πυκνότητα σφάλματος
	MM	FaSSIF _{Caco}	FeSSIF _{Caco}	
Δαναζόλη	3,06 ± 0,34	1,50 ± 0,73	0,1146 ± 0,0063	0,012
Μικρομόριο Α	4,27 ± 0,83	0,266 ± 0,015	0,02870 ± 0,00090	0,001
Μικρομόριο Β	2,50 ± 0,26	1,20 ± 0,23	0,427 ± 0,071	0,001
Μικρομόριο Γ	- ^α	0,041 ± 0,019	0,0135 ± 0,0017 ^β	0,223
Λεβοβιρίνη	0,01275 ± 0,00066	0,0124 ± 0,0023	0,0187 ± 0,0040	0,255
Ριμπαβιρίνη	0,0257 ± 0,0066	0,0069 ± 0,0016	0,0187 ± 0,0058	0,104

^α Οι συγκεντρώσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

^β Με βάση δεδομένα από ένα μόνο φρεάτιο (n=1).

Από τον Πίνακα Γ.24 φαίνεται ότι για τα λιπόφιλα μικρομόρια (δαναζόλη, Α, Β, Γ) ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με παθητική διάχυση είναι μεγαλύτερος στο MM, μειώνεται στο FaSSIF_{Caco} και μειώνεται περαιτέρω στο FeSSIF_{Caco}. Αντίθετα, για τις υδρόφιλες ουσίες (λεβοβιρίνη, ριμπαβιρίνη) παραμένει παρόμοιος σε όλα τα μέσα. Το εύρημα αυτό έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα πειράματα με προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα σε Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες (Ingels et al., 2004 και Fossati et al., 2008). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη θεωρία που αναφέρθηκε στα πειράματα με τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ (κεφ. Γ.2.2.2) σχετικά με το ελεύθερο κλάσμα της δαναζόλης. Και εδώ, η παρουσία μικτών μικκυλίων PC-NaTC και PC-NaTC-GMO στο FaSSIF_{Caco} and FeSSIF_{Caco}, αντίστοιχα, δεσμεύει τις λιπόφιλες ουσίες, μειώνει το ελεύθερο κλάσμα τους και άρα μειώνει τον φαινόμενο συντελεστή διαπερατότητας. Η μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων στο FeSSIF_{Caco} σε σχέση με το FaSSIF_{Caco} σημαίνει ότι σχηματίζονται περισσότερα μικτά μικκύλια, γι' αυτό και ο P_{hm} στο FeSSIF_{Caco} είναι μικρότερος. Ο

μειωμένος συντελεστής διαπερατότητας οφείλεται στην κατανομή της δαναζόλης μεταξύ μικκυλίων και υδατικού διαλύματος και ίσως στην απευθείας μεταφορά από τα μικκύλια στη μεμβράνη. Για τις υδρόφιλες ουσίες δεν παρατηρείται διαφορά, καθώς αυτές δεν δεσμεύονται από μικτά μικκύλια. Επίσης, σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} τα δύο λιπόφιλα μικρομόρια Α και Γ έχουν χαμηλότερους φαινόμενους συντελεστές διαπερατότητας από τη δαναζόλη και το μικρομόριο Β. Η διαφορά αυτή φαίνεται να έχει σχέση με τη μεγαλύτερη λιποφιλία των μικρομορίων Α και Γ σε σχέση με τις άλλες δύο ουσίες (clogP, Πίνακας Α.3), και άρα τη μεγαλύτερη τάση δέσμευσής τους στα μικτά μικκύλια.

Ενδιαφέρον είναι ότι αν εφαρμοστεί γραμμικό μοντέλο στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς για τον υπολογισμό του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας, δεν προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο συντελεστής διαπερατότητας για τα λιπόφιλα μικρομόρια είναι μεγαλύτερος σε MM, μικρότερος σε FaSSIF_{Caco} και ακόμα μικρότερος FeSSIF_{Caco}. Στον Πίνακα Γ.25 παρουσιάζονται οι τιμές P_{app}^{Caco} υπολογισμένες με εφαρμογή γραμμικού μοντέλου στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς (Εξίσωση Α.9, θέτοντας $C_{donor}=C_0$).

Πίνακας Γ.25: Συντελεστές διαπερατότητας P_{app}^{Caco} για τα έξι υπό έλεγχο μικρομόρια υπολογισμένοι με τη χρήση γραμμικού μοντέλου^α, καθώς και η πυκνότητα σφάλματος (*p* value) που υπολογίζεται από one-way ANOVA

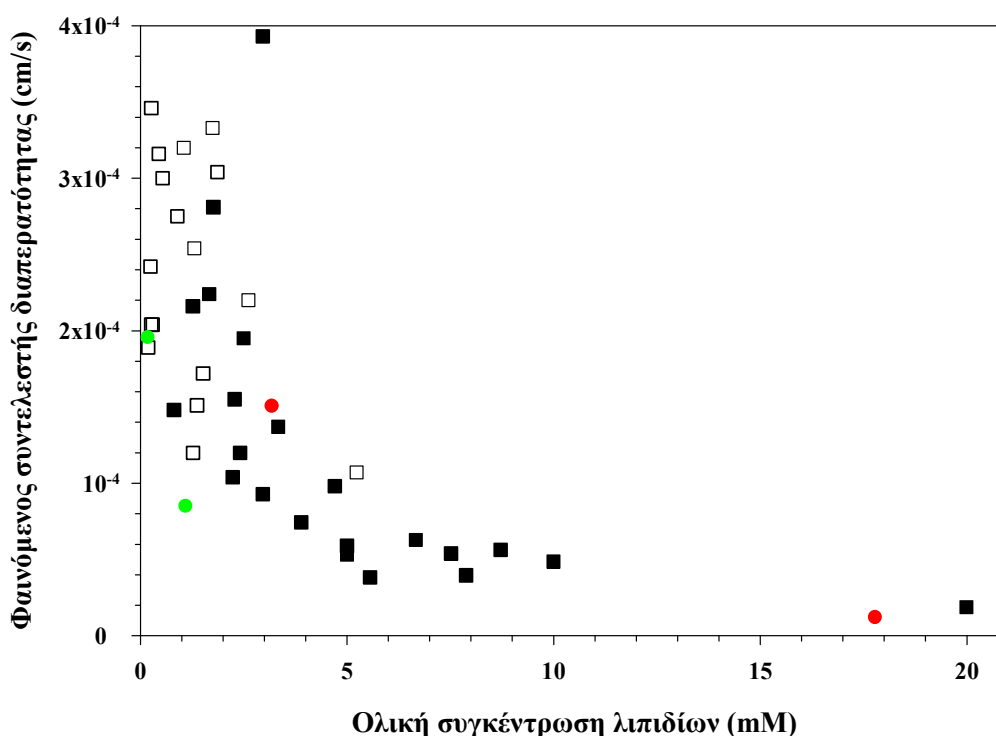
	$P_{app}^{Caco} \times 10^4$ (cm/s)			Πυκνότητα σφάλματος
	MM	FaSSIF _{Caco}	FeSSIF _{Caco}	
Δαναζόλη	0,0650 ± 0,0083	0,0863 ± 0,0091	0,0237 ± 0,0019	0,011
Μικρομόριο Α	Δεν εκτιμήθηκε	0,00198 ± 0,00044	0,00449 ± 0,00092	0,070
Μικρομόριο Β	0,554 ± 0,086	0,515 ± 0,022	0,1916 ± 0,0054	0,005
Μικρομόριο Γ	Δεν εκτιμήθηκε	0,0029 ± 0,0012	Δεν εκτιμήθηκε	-
Λεβοβιρίνη	0,00585 ± 0,00089	0,00762 ± 0,00097	0,00438 ± 0,00068	0,094
Ριμπαβιρίνη	Δεν εκτιμήθηκε	0,00834 ± 0,00084	Δεν εκτιμήθηκε	-

^α Τα r^2 των ευθειών από τις οποίες προέκυψαν οι κλίσεις dQ/dt κυμάνθηκαν μεταξύ 0,472 και 0,991.

Οι απόλυτες τιμές διαφέρουν ως προς το πολυδιαμερισματικό μοντέλο, επειδή με το γραμμικό μοντέλο δεν υπολογίζεται συντελεστής διαπερατότητας μέσω της μεμβράνης, αλλά μέσω του εντερικού επιθηλίου. Από τους Πίνακες Γ.24 και Γ.25 φαίνεται ότι η εκτίμηση του φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας με το πολυδιαμερισματικό μοντέλο είναι περισσότερο ισχυρή στην ανίχνευση πιθανών διαφορών μεταξύ MM, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}.

Γ.2.3.1 Σχέση μεταξύ φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας και συγκέντρωσης λιπιδίων στα πειράματα με FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}

Αφού υπολογίστηκαν τιμές P_{hm} για τη δαναζόλη σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}, υπολογίστηκαν και οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητάς της σε αραιωμένα 1:16 FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}. Αυτοί βρέθηκαν $1,95 \times 10^{-4}$ cm/s και $0,84 \times 10^{-4}$ cm/s, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν και από τα πειράματα με προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα επιβεβαιώνεται η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης λιπιδίων και φαινομένου συντελεστή διαπερατότητας. Στο Σχήμα Γ.2 προστέθηκαν οι τιμές P_{hm} της δαναζόλης και η συγκέντρωση λιπιδίων στα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} και στα αραιωμένα 1:16 FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}, οπότε προέκυψε το Σχήμα Γ.3.



Σχήμα Γ.3: Απεικόνιση ολικής συγκέντρωσης λιπιδίων σε συνάρτηση με το φαινόμενο συντελεστή διαπερατότητας (n=43). Τα μαύρα τετράγωνα αντιστοιχούν σε δείγματα ΕΠ, τα λευκά τετράγωνα σε δείγματα ΜΦ, οι κόκκινοι κύκλοι στα πειράματα με δαναζόλη σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} και οι πράσινοι κύκλοι στα πειράματα με δαναζόλη σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} αραιωμένα 1:16 με MM.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα Γ.3, τα σημεία για τα πειράματα με δαναζόλη σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} ακολουθούν τη γενική τάση που είχε σχηματιστεί στο Σχήμα Γ.2. Αυτό σημαίνει ότι τα προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} παίζουν τον ίδιο ρόλο στη διαπερατότητα της δαναζόλης με τα ανθρώπινα εντερικά περιεχόμενα. Η διασπορά για τα αραιωμένα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} μπορεί να δικαιολογηθεί, καθώς η συγκέντρωση λιπιδίων είναι < 1 mM, οπότε ισχύουν όσα είχαν αναφερθεί για τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις, κάτω από την CMC των μικτών μικκυλίων (κεφ. Γ.2.2.3). Το Σχήμα Γ.3 αποτελεί μια ακόμα επιβεβαίωση, πέρα από τις ομοιότητες στη σύσταση με τα δωδεκαδακτυλικά περιεχόμενα, του ότι τα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} προσομοιώνουν ικανοποιητικά την νίνο κατάσταση.

Δ. ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο δίνουν απαντήσεις στα δύο ερωτήματα που είχε σκοπό να διερευνήσει η παρούσα μελέτη.

Το πρώτο ερώτημα ήταν πώς επηρεάζεται η διαπερατότητα λιπόφιλων φαρμάκων από τις διαφορετικές λιπιδικές δομές που υπάρχουν στα εντερικά περιεχόμενα κατά την περίοδο πέψης. Αρχικά, έγιναν πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης με την τεχνική PAMPA με δείγματα ΕΠ και ΜΦ. Οι συντελεστές διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ υπολογίστηκαν τόσο με τη μέθοδο του απλού διαμερισματικού μοντέλου όσο και με το γραμμικό μοντέλο (Κεφ. Γ.1.2). Η μέθοδος του γραμμικού μοντέλου υπερτερεί έναντι του απλού διαμερισματικού μοντέλου, καθώς τα πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιούνται με το γραμμικό μοντέλο παρουσιάζουν μικρότερη μεταβλητότητα. Επίσης, η διάρκεια των πειραμάτων είναι σημαντικά μικρότερη. Η μεγάλη διάρκεια του πειράματος με το απλό διαμερισματικό μοντέλο έχει ως αποτέλεσμα την αστάθεια του βιολογικού δείγματος. Επιπλέον, η εξίσωση που περιγράφει το απλό διαμερισματικό μοντέλο προϋποθέτει ότι όλη η ποσότητα ουσίας θα έχει περάσει στο διαμέρισμα-δέκτης στο τέλος του πειράματος. Αυτό βρέθηκε πειραματικά να μην ισχύει, επομένως η εξίσωση του μοντέλου δεν μπορούσε να περιγράψει ακριβώς τη διαδικασία. Για τους λόγους αυτούς το γραμμικό μοντέλο προτιμάται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τον υπολογισμό συντελεστή διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA, όταν χρησιμοποιούνται εντερικά περιεχόμενα. Με βάση το γραμμικό μοντέλο βρέθηκε ότι οι συντελεστές διαπερατότητας P_{app}^{PAMPA} για τα δείγματα ΕΠ ήταν στατιστικά μικρότεροι από τους αντίστοιχους για δείγματα ΜΦ από τον ίδιο εθελοντή και για τον ίδιο χρόνο.

Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων με αραιωμένα δείγματα ΕΠ και ΜΦ (λόγω κυτταροτοξικότητας των μη αραιωμένων δειγμάτων). Οι φαινόμενοι συντελεστές διαπερατότητας δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ υπολογίστηκαν τόσο με τη χρήση πολυδιαμερισματικού μοντέλου όσο και με τη μέθοδο του γραμμικού μοντέλου. Η μέθοδος του πολυδιαμερισματικού μοντέλου θεωρήθηκε ότι δίνει ακριβέστερα αποτελέσματα,

καθώς λαμβάνει υπόψη της περισσότερα πειραματικά δεδομένα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η αξιοπιστία της εκτίμησης με βάση τα αρχικά στάδια της διαδικασίας μεταφοράς τίθεται υπό αμφισβήτηση, ενώ η εκτίμηση με το πολυδιαμερισματικό μοντέλο φαίνεται να είναι περισσότερο ισχυρή στην ανίχνευση πιθανών διαφορών. Με βάση λοιπόν το πολυδιαμερισματικό μοντέλο, οι συντελεστές διαπερατότητας για τα δείγματα ΕΠ ήταν στατιστικά μικρότεροι από τους αντίστοιχους για δείγματα ΜΦ από τον ίδιο εθελοντή και για τον ίδιο χρόνο. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα που συλλέχθηκαν με την τεχνική PAMPA και επιβεβαιώνουν ότι οι αραιώσεις που κατ' ανάγκη έγιναν πριν τα πειράματα με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες δεν επηρέασαν το μηχανισμό μεταφοράς.

Έπειτα, μελετήθηκε η ροή της δαναζόλης από τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ και βρέθηκε ότι ήταν είτε παρόμοια (για τα πειράματα με αναραίωτα δείγματα με την τεχνική PAMPA) είτε σημαντικά μεγαλύτερη για τα δείγματα ΕΠ (με αραιωμένα δείγματα μέσω Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων). Η αυξημένη συγκέντρωση δαναζόλης στα (αραιωμένα) δείγματα ΕΠ αντισταθμίζει δηλαδή το μειωμένο συντελεστή διαπερατότητας σε σχέση με τα (αραιωμένα) δείγματα ΜΦ. Η παρόμοια ή και μεγαλύτερη ροή δαναζόλης για τα δείγματα ΕΠ σημαίνει ότι οι ΜΛΣ που βρίσκονται σε αυτά είναι εξίσου ή ακόμα και πιο σημαντικοί για τη μεταφορά της λιπόφιλης δαναζόλης από ότι τα μικτά μικκύλια., όταν ένα λιπόφιλο μόριο χορηγείται διαλυμένο σε λιπιδικό φορέα. Το συμπέρασμα αυτό είναι διαφορετικό από την άποψη που επικρατεί σήμερα, η οποία θεωρεί πιο σημαντικά τα μικτά μικκύλια σε όλες τις περιπτώσεις. Με βάση αυτό, προκύπτει ότι η χορήγηση λιπόφιλων φαρμάκων σε λιπιδικές Φ/Μ, εκτός από το πλεονέκτημα της αύξησης της διαλυτότητας, μπορεί να αυξήσει και τη μεταφορά του φαρμάκου μέσω του εντερικού επιθηλίου. Το συμπέρασμα αυτό δεν θα ήταν σωστό να γενικευτεί για όλες τις λιπόφιλες ουσίες, καθώς πιθανό να εξαρτάται από την ουσία, τη συγγένειά της με τα λιπίδια, τη δόση, την πέψη των λιπιδίων κλπ. Για παράδειγμα, στην παρούσα μελέτη η διασπορά της δαναζόλης στην ελαιώδη φάση είχε ολοκληρωθεί πριν τη χορήγηση στους εθελοντές. Η συγκέντρωση δαναζόλης στο ελαιόλαδο του γεύματος που χορηγήθηκε (2160 μg/ml ή 2.4 mg/g), η διαλυτότητά της στα τριγλυκερίδια με μακρά αλυσίδα [π.χ. 3.9 mg/g σε έλαιο σόγιας (Kaukonen et al., 2004)] και η υψηλή διαπερατότητά της αποκλείουν την πιθανότητα καθίζησης στον εντερικό αυλό. Δεν είναι σίγουρο ότι το συμπέρασμα για τη σπουδαιότητα των ΜΛΣ στη διαπερατότητα δαναζόλης θα ισχύει και για λιπόφιλες ουσίες που καθιζάνουν. Σε κάθε περίπτωση πάντως, είναι χρήσιμο

όσον αφορά χορήγηση λιπιδικών Φ/Μ τύπου II και III (Routon, 2006) που περιέχουν τριγλυκερίδια με μακρά αλυσίδα και φάρμακο σε τέτοιες συγκεντρώσεις που να αποκλείεται καθίζηση. Εδώ να σημειωθεί ότι το γεγονός ότι οι ΜΛΣ βρέθηκαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά της δαναζόλης δεν σημαίνει και ότι αυτοί ενώνονται απευθείας με τη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων, καθώς υπάρχει η πιθανότητα να μεταφέρεται μόνο η ελεύθερη δαναζόλη. Ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς δεν ήταν δυνατό να διευκρινιστεί από την παρούσα μελέτη.

Το δεύτερο ερώτημα που είχε σκοπό να απαντήσει η παρούσα μελέτη ήταν πώς επηρεάζεται η *in vitro* διαπερατότητα μικρομορίων σε συνθήκες που προσομοιώνουν τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν με την τεχνική PAMPA δεν είναι σαφής η επίδραση της μικκυλιακής φάσης στην τιμή του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας. Είναι ενδιαφέρον ότι η τιμή του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας που υπολογίζεται για τη δαναζόλη από δείγματα ΜΦ είναι παρόμοια με την υπολογιζόμενη από FeSSIF-V2. Αυτό δείχνει ότι το FeSSIF-V2 προσομοιώνει επαρκώς τη μικκυλιακή φάση των εντερικών περιεχομένων κατά την περίοδο πέψης. Ο υπολογισμός των συντελεστών διαπερατότητας προτιμάται να γίνεται με τη χρήση απλού διαμερισματικού μοντέλου, καθώς με τα προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα δεν συναντώνται τα προβλήματα που υπάρχουν με τα δείγματα ΕΠ και ΜΦ.

Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν δύο νέες προσομοιωμένες μικκυλιακές φάσεις των εντερικών περιεχομένων, τα FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}, που είναι κατάλληλες για χρήση ως μέσα μεταφοράς σε πειράματα με Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Η σύστασή τους προσομοιώνει ικανοποιητικά την *in vivo* κατάσταση, καθώς η συγκέντρωσή λιπιδίων και χολικών αλάτων ήταν παρόμοια με των εντερικών περιεχομένων. Ενδεχομένως να χρειάζεται μια μικρή βελτίωση της σύστασης, ώστε να είναι παρόμοιες με τα αναρροφηθέντα εντερικά περιεχόμενα και οι συγκεντρώσεις μονογλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων, αλλά κάτι τέτοιο ίσως δημιουργήσει προβλήματα στη σταθερότητα των μέσων αυτών (Jantratid et al., 2008). Η ικανοποιητική προσομοίωση της *in vivo* κατάστασης προκύπτει και από το γεγονός ότι η επίδραση των λιπιδίων των προσομοιωμένων εντερικών υγρών στο συντελεστή διαπερατότητας είναι παρόμοια με την επίδραση των αραιωμένων ΕΠ και ΜΦ (Σχήμα Γ.2). Με βάση δεδομένα που προέκυψαν με χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων φαίνεται ότι για τα λιπόφιλα μικρομόρια (δαναζόλη, Α, Β, Γ) ο

φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με παθητική διάχυση είναι μεγαλύτερος στο MM, μειώνεται στο FaSSIF_{Caco} και μειώνεται περαιτέρω στο FeSSIF_{Caco}. Αντίθετα, για τις υδρόφιλες ουσίες (λεβοβιρίνη, ριμπαβιρίνη) παραμένει παρόμοιος σε όλα τα μέσα. Οι υδρόφιλες ουσίες δεν δεσμεύονται από τα μικτά μικκύλια, επομένως δεν επηρεάζεται η διαπερατότητά τους. Με βάση την παρούσα μελέτη, προτείνεται η χρήση προσομοιωμένων εντερικών περιεχομένων στα πειράματα διαπερατότητας, καθώς τα αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με χρήση απλών μέσων μεταφοράς όταν το μόριο έχει αυξημένη λιποφιλία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 – Περίληψη της κλινικής μελέτης¹ από την οποία προέκυψαν τα εντερικά περιεχόμενα που χρησιμοποιήθηκαν στα in vitro πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA και με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Π1.1 Εθελοντές - Άδειες

Οκτώ νηστικοί, υγιείς ενήλικοι εθελοντές (επτά άντρες και μία γυναίκα) έλαβαν μέρος στη μελέτη. Οι εθελοντές είχαν ηλικία μεταξύ 22 και 34 ετών και το σωματικό τους βάρος δεν παρέκκλινε περισσότερο από 15% από το ιδανικό σωματικό βάρος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γαστρεντερολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου του Ελληνικού Ερυθρού Σταυρού στην Αθήνα, αφού ελήφθησαν οι απαραίτητες εγκρίσεις από την Επιστημονική Επιτροπή του νοσοκομείου, καθώς και από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΚΔ-IS-98-01-05).

Π1.2 Σύσταση του χορηγηθέντος γεύματος

Το υγρό γεύμα που χορηγήθηκε στους εθελοντές ήταν υψηλού λιπιδικού περιεχομένου (750 kcal, αποτελούμενο από 13% υδατάνθρακες, 73% λίπη και 14% πρωτεΐνες). Η σύστασή του βασίστηκε στο γεύμα των Hernell et al. (1990) και το θερμιδικό του περιεχόμενο ρυθμίστηκε έτσι, ώστε να είναι κοντά στην απαίτηση των κανονιστικών αρχών για χρήση γευμάτων υψηλού λιπιδικού περιεχομένου σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας (FDA 2002, EMA 2010). Το χορηγηθέν υγρό γεύμα περιείχε 150 mg δαναζόλης διαλυμένης σε 62,5 g ελαιόλαδο, 1,25 αβγά, 25 g γλυκόζη, 2,7 g NaCl και άρωμα βανίλιας, συμπληρώνοντας στο τέλος με νερό μέχρι συνολικού όγκου 500 ml (% ελαιώδους φάσης στο γεύμα: 12,5% w/v). Το pH του γεύματος ήταν 7,0 και η οσμωτικότητα του 506 mOsm/kg. Πριν τη χορήγηση, έγινε περιδίνηση του γεύματος για 10 s, με σκοπό να σχηματιστεί γαλάκτωμα (Armand et al., 1994).

¹ Τα περιεχόμενα του Παραρτήματος αυτού απαρτίζουν τη μεταδιδακτορική έρευνα που χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «ΕΠΕΑΕΚ II - Πυθαγόρας» (Βερτζώνη 2006).

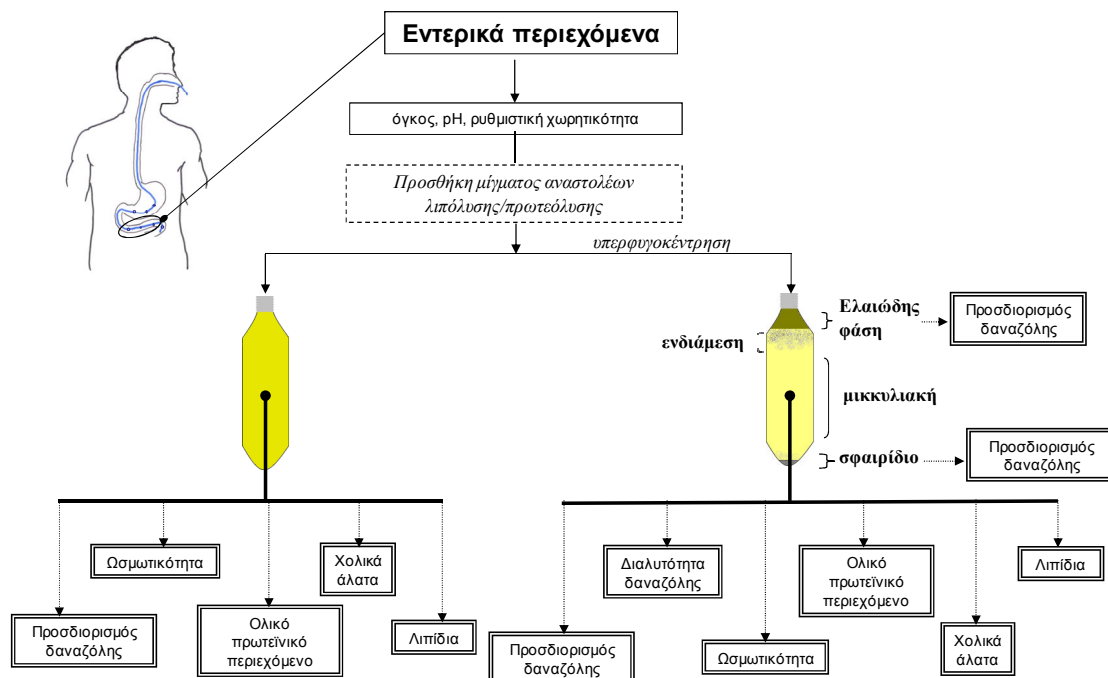
Π1.3 Πρωτόκολλο

Η πρόσληψη τροφής σταμάτησε για τουλάχιστον 12 h πριν την πραγματοποίηση του πειράματος και η πρόσληψη νερού απαγορεύτηκε το πρωί της ίδιας ημέρας. Την ημέρα του πειράματος κάθε εθελοντής έφτασε στην κλινική στις 8 π.μ. και, αν ήταν γυναίκα, εξετάστηκε για το αν ήταν έγκυος. Στον κάθε εθελοντή εισήχθη από τη μύτη στείρος διπλότοιχος ρινο-γαστρο-δωδεκαδακτυλικός ελαστικός σωλήνας που περιείχε σύρμα-οδηγό. Η τοποθέτηση έγινε υπό ακτινοσκόπηση. Η πρόσβαση στο πυλωρικό άντρο του στομάχου ήταν δυνατή μέσω σειράς οπών του ενός τοιχώματος (55-65 cm από το τέλος του σωλήνα). Μια επιπλέον σειρά οπών (13,5-23,5 cm από το τέλος του σωλήνα) χρησιμοποιήθηκε για την αναρρόφηση δειγμάτων από το δωδεκαδάκτυλο μέσω του δεύτερου τοιχώματος. Αφού αφαιρέθηκε το σύρμα-οδηγός χορηγήθηκε το γεύμα στο άντρο του στομάχου χρησιμοποιώντας πλαστικές σύριγγες των 60 ml. Δείγματα (≈ 15 ml) των δωδεκαδακτυλικών περιεχομένων αναρροφήθηκαν από μια περιοχή κοντά στο τέλος του δωδεκαδακτύλου (στο σύνδεσμο του Treitz) κάθε 30 min μέχρι τις 4 h από τη χορήγηση του γεύματος. Στο τέλος του πειράματος και προτού απομακρυνθεί ο σωλήνας από τον εθελοντή, η τελική θέση του σωλήνα επιβεβαιώθηκε ακτινοσκοπικά.

Π1.4 Χειρισμός αναρροφηθέντων δειγμάτων

Αμέσως μετά την αναρρόφηση κάθε δείγματος μετρήθηκε το pH, ο όγκος και η ρυθμιστική χωρητικότητα. Στη συνέχεια, αφού προστέθηκε ένα μίγμα αναστολέων λιπόλυσης και πρωτεόλυσης [2% (v:v)] που περιείχε 50 mM diisopropylfluorophosphate, 50 mM diethyl(p-nitrophenyl)phosphate, 50 mM ακετοφαινόνης, και 250 mM φαινυλβορονικού οξέος (Hernell et al., 1990), το δείγμα χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το πρώτο χωρίστηκε σε τέσσερα επιπλέον μέρη που φυλάχθηκαν στους -70 °C μέχρι τον προσδιορισμό δαναζόλης, ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, χολικών αλάτων και λιπιδίων. Το δεύτερο μέρος υπερφυγοκεντρήθηκε ($410000 \times g$, 37 °C, 2 h), με αποτέλεσμα να σχηματιστούν τέσσερις φάσεις από πάνω προς τα κάτω: η ελαιώδης, η ενδιάμεση, η μικκυλιακή, και το σφαιρίδιο. Μετά το διαχωρισμό τους, η μικκυλιακή φάση χωρίστηκε σε έξι μέρη, τα οποία φυλάχθηκαν στους -70 °C μέχρι τη μέτρηση της διαλυτότητας δαναζόλης και τον προσδιορισμό δαναζόλης, ολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, χολικών αλάτων, λιπιδίων και

ωσμωτικότητας. Ο χειρισμός των αναρροφηθέντων δειγμάτων παρουσιάζεται στο Σχήμα Π1.1.



Σχήμα Π1.1: Χειρισμός αναρροφηθέντων δειγμάτων

Π1.5 Αναλυτικές μέθοδοι

Η δαναζόλη μετρήθηκε με HPLC. Τα χολικά άλατα, δηλαδή ταυροχολικό, γλυκοχολικό, ταυροχηνοδοεοξυχολικό, γλυκοχηνοδοεοξυχολικό και γλυκοδεοξυχολικό, ποσοτικοποιήθηκαν στα εντερικά περιεχόμενα (ΕΠ) και στη μικκυλιακή τους φάση (ΜΦ) με βαθμιδωτή HPLC, χρησιμοποιώντας ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος (Corona CAD) (Vertzoni et al., 2008). Τα λιπίδια, δηλαδή τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, χοληστερόλη και μονοελαϊκός εστέρας χοληστερόλης στα δείγματα ΕΠ και ΜΦ (που προέκυψαν μετά την υπερφυγοκέντρηση) μετρήθηκαν επίσης με βαθμιδωτή HPLC χρησιμοποιώντας ανιχνευτή φορτισμένου αερολύματος (Diakidou et al., 2009). Ο τριελαϊκός γλυκερινεστέρας χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των τριγλυκερίδιων, ο 1,2 διελαϊκός- γ -γλυκερινεστέρας και η

διπαλμιτίνη για την ποσοτικοποίηση των διγλυκεριδίων και ο 1-μονοελαϊκός-gac-γλυκερινεστέρας για την ποσοτικοποίηση των μονογλυκεριδίων. Το ελαϊκό, το λινολεϊκό και το στεατικό οξύ χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η ελαϊκή χοληστερόλη χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των εστέρων της χοληστερόλης. Η ωσμωτικότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο της ταπείνωσης του σημείου πήξης και το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο με τη χρήση του BCA™ Protein Assay Kit.

Π1.6 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εντερικών περιεχομένων

Στον Πίνακα Π1.1 παρουσιάζονται ανά χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση του γεύματος τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων ΕΠ και ΜΦ, ενώ στον Πίνακα Π1.2 η σύστασή τους ανά χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση του γεύματος.

Στους Πίνακες Π1.3 και Π1.4 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΕΠ και των αντίστοιχων ΜΦ που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας Π1.1: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά [άνω τιμές: μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, κάτω τιμές: διάμεσος (εύρος), n=4-8] των δειγμάτων που αναρροφήθηκαν από το σύνδεσμο του Treitz σε διάφορες χρονικές στιγμές (min) μετά τη χορήγηση στο στόμαχο νηστικών υγιών εθελοντών 150 mg δαναζόλης διαλυμένων στο ελαιόλαδο ενός ετερογενούς υγρού γεύματος υψηλού λιπιδικού περιεχομένου

	30	60	90	120	150	180	210
pH	6,23±0,52 6,25 (5,24-6,84)	6,36±0,63 6,54 (5,15-6,84)	6,27±0,58 6,36 (5,15-6,87)	5,25±1,63 5,46 (2,39-6,83)	5,6±1,9 6,32 (2,49-7,21)	5,8±1,3 6,21 (2,85-6,93)	5,8±1,3 6,36 (4,02-7,01)
Ρυθμιστική χωρητικότητα [(mmol/l)/ΔpH]	28±19 21,2 (7,5-55)	22±18 15 (10-50)	15,0±6,4 12,5 (10-25)	18±13 15 (5-35)	14,6±7,0 11,8 (10-25)	12±11 7,5 (5-32,5)	13,1±6,6 12,5 (7,5-20)
Ωσμωτικότητα (mOsm/kg)	291±85 283 (198-399)	360±96 351 (278-516)	353±62 356 (262-456)	274±48 275 (227-344)	287±135 248 (142-530)	215±75 216 (100-310)	231±230 144 (86-693)

Πίνακας Π1.2: Μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (n=4-8) των συγκεντρώσεων των συστατικών των δειγμάτων που αναρροφήθηκαν από το σύνδεσμο του Treitz (άνω τιμές) και των αντίστοιχων μικκυλιακών τους φάσεων (κάτω τιμές) σε διάφορες χρονικές στιγμές (min) μετά τη χορήγηση στο στόμαχο νηστικών υγιών εθελοντών 150 mg δαναζόλης διαλυμένων στο ελαιόλαδο ενός ετερογενούς υγρού γεύματος υψηλού λιπιδικού περιεχομένου

	30	60	90	120	150	180	210
<i>Μη λιπιδικά συστατικά</i>							
Δαναζόλη ($\mu\text{g/ml}$)	202 \pm 229 21,6 \pm 8,1	244 \pm 218 14 \pm 12	190 \pm 174 9,2 \pm 6,8	92 \pm 64 11,7 \pm 9,9	44 \pm 28 5,9 \pm 7,4	50 \pm 27 6,2 \pm 3,6	25 \pm 16 5,1 \pm 5,5
Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/ml)	6,1 \pm 3,3 3,8 \pm 1,8	5,5 \pm 1,4 3,0 \pm 1,5	5,0 \pm 2,6 2,2 \pm 1,5	4,3 \pm 1,1 1,78 \pm 0,64	3,96 \pm 0,86 1,6 \pm 1,0	2,9 \pm 1,1 1,54 \pm 0,84	2,40 \pm 0,73 1,01 \pm 0,55
<i>Λιπιδικά συστατικά</i>							
Τριγλυκερίδια (mM)	4,7 \pm 5,2 < 0,004	8,0 \pm 6,0 < 0,004	5,8 \pm 3,2 < 0,004	4,9 \pm 3,8 < 0,004	2,31 \pm 0,64 < 0,004	1,5 \pm 1,0 < 0,004	2,0 \pm 1,9 < 0,004
Διγλυκερίδια (mM)	6,5 \pm 6,3 0,35 \pm 0,25	9,7 \pm 8,8 0,41 \pm 0,27	6,2 \pm 3,6 0,18 \pm 0,25	4,8 \pm 4,4 0,04 \pm 0,03	2,9 \pm 2,6 0,04 \pm 0,03	2,6 \pm 3,1 0,05 \pm 0,07	1,8 \pm 1,8 0,04 \pm 0,06
Μονογλυκερίδια (mM)	8,1 \pm 5,7 2,9 \pm 2,3	9,2 \pm 7,4 2,0 \pm 1,8	6,9 \pm 5,2 0,95 \pm 0,87	5,21 \pm 4,28 0,63 \pm 0,84	3,2 \pm 3,7 0,63 \pm 0,84	4,5 \pm 4,2 0,52 \pm 0,53	1,6 \pm 1,0 0,37 \pm 0,44
Ελεύθερα λιπαρά οξέα (mM)	52 \pm 43 18,6 \pm 9,6	54 \pm 44 19 \pm 15	51 \pm 22 8,7 \pm 10,8	46 \pm 31 7,7 \pm 9,0	25 \pm 17 5,7 \pm 7,1	37 \pm 38 5,2 \pm 5,4	24 \pm 19 5,2 \pm 6,2
Φωσφατιδυλο- χολίνη (mM)	2,6 \pm 2,6 0,28 \pm 0,22	4,3 \pm 2,4 0,14 \pm 0,12	2,7 \pm 1,6 0,20 \pm 0,32	1,6 \pm 1,6 0,07 \pm 0,08	0,67 \pm 0,68 0,03 \pm 0,03	0,87 \pm 1,27 0,01 \pm 0,03	0,32 \pm 0,22 0,02 \pm 0,03
Λυσο- φωσφατιδυλο- χολίνη (mM)	3,4 \pm 2,0 2,26 \pm 0,67	2,8 \pm 2,1 1,6 \pm 1,2	2,1 \pm 1,2 1,4 \pm 1,4	2,2 \pm 1,5 1,4 \pm 1,3	2,1 \pm 1,7 1,3 \pm 1,5	1,9 \pm 1,5 1,2 \pm 1,4	2,0 \pm 1,6 0,90 \pm 1,07
Χοληστερόλη (mM)	1,50 \pm 0,97 1,25 \pm 0,94	1,10 \pm 0,42 0,46 \pm 0,32	1,4 \pm 1,6 0,28 \pm 0,30	1,0 \pm 1,4 0,19 \pm 0,20	0,51 \pm 0,29 0,17 \pm 0,20	0,47 \pm 0,37 0,19 \pm 0,27	0,63 \pm 0,63 0,17 \pm 0,19
<i>Χολικά άλατα</i>							
Χολικά άλατα (mM)	14 \pm 14 10 \pm 12	10 \pm 11 7 \pm 10	10,8 \pm 4,9 5,0 \pm 3,8	7,7 \pm 4,4 6,2 \pm 5,9	10,6 \pm 8,3 5,6 \pm 5,8	7,3 \pm 5,4 5,9 \pm 4,9	8,2 \pm 6,4 6,3 \pm 6,2

Πίνακας Π1.3: Χαρακτηριστικά των δειγμάτων ΕΠ που αναρροφήθηκαν από υγιείς ενήλικες μετά τη χορήγηση τριγλυκεριδικού διαλύματος δαναζόλης κατά τη διάρκεια της πέψης και χρησιμοποιήθηκαν στα in vitro πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA και με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Αριθμός εθελοντή	Χρόνος από τη χορήγηση δαναζόλης/γεύματος (min)	pH	Συγκέντρωση δαναζόλης (μg/ml)	% ποσοστό της ελαιώδους φάσης στο δείγμα (v/v)	Ωσμωτικότητα (mOsm/kg)	Ολική συγκέντρωση χολικών οξέων (mM)	Ολική συγκέντρωση λιπιδίων (mM)	Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/ml)
1	120	2,39	182,15	1,89	Δεν εκτιμήθηκε	11,02	37,75	4,90
2	90	6,51	69,44	6,39	353	12,54	79,95	3,08
	180	6,93	23,45	1,83	214	12,32	47,36	2,43
	210	6,71	46,12	1,79	86	13,68	75,24	2,75
3	150	6,00	93,64	5,43	142	10,79	74,55	4,85
	210	4,27	4,51	0,45	113	3,50	10,53	1,95
4	60	6,71	228,87	7,17	351	7,66	126,08	5,50
	120	6,83	139,81	11,66	291	5,62	120,32	5,41
	150	6,28	31,89	2,71	214	4,30	33,83	3,93
	240	5,95	5,43	0	143	1,00	5,81	1,38
5	180	5,77	69,70	2,69	234	3,14	38,57	2,80
	210	4,02	34,98	2,42	Δεν εκτιμήθηκε	2,46	12,99	1,93
	240	6,36	76,11	3,65	177	3,29	62,21	1,76
6	90	6,36	100,61	3,59	262	12,1	88,98	3,20
	180	6,21	48,20	2,69	Δεν εκτιμήθηκε	2,80	20,29	1,64
7	180	6,62	91,24	3,59	216	5,62	139,46	4,53
	210	6,62	40,78	2,69	117	2,69	47,41	3,68
	240	6,51	20,85	1,79	186	0,88	28,26	1,57

Πίνακας Π1.4: Χαρακτηριστικά των δειγμάτων ΜΦ που προέκυψαν από υπερφυγοκέντρωση των δειγμάτων ΕΠ που παρουσιάζονται στον Πίνακα Π1.3

Αριθμός εθελοντή	Χρόνος από τη χορήγηση δαναζόλης/γέδατος (min)	Συγκέντρωση δαναζόλης (μg/ml)	Διαλυτότητα δαναζόλης (μg/ml)	Ωσμωτικότητα (mOsm/kg)	Ολική συγκέντρωση χολικών οξέων (mM)	Ολική συγκέντρωση λιπιδίων (mM)	Ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο (mg/ml)
1	120	0,42	1,03	17	0,69	0,69	0,90
2	150	4,26	15,38	233	6,17	8,54	1,13
	180	8,29	43,58	219	12,22	21,93	1,46
	210	13,37	52,30	191	9,5	20,92	1,59
3	150	1,55	5,11	Δεν εκτιμήθηκε	3,17	7,15	0,72
	210	0,08	3,57	208	1,52	1,52	0,29
4	60	15,14	45,53	43	3,28	29,81	2,09
	120	20,96	54,34	Δεν εκτιμήθηκε	3,42	20,37	2,43
	150	1,31	1,71	293	1,39	4,19	1,30
	240	0,50	0,88	Δεν εκτιμήθηκε	0,71	0,71	0,47
5	180	4,69	14,36	263	2,75	4,18	1,56
	210	0,69	2,88	249	1,19	1,19	0,48
	240	2,42	7,05	238	2,08	3,96	0,72
6	90	14,64	60,25	246	11,14	24,26	1,73
	180	2,64	9,76	384	3,16	4,81	0,71
7	180	9,09	37,38	251	3,06	14,24	2,91
	210	1,50	5,92	202	1,36	2,98	1,64
	240	0,25	2,34	21	0,53	0,53	0,81

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 - Εύρεση της κατάλληλης σύστασης των περιεχομένων στο διαμέρισμα-δέκτης των φρεατίων PAMPA και του καταλληλότερου χειρισμού των πρωτογενών πειραματικών δεδομένων

Αρχικά, μελετήθηκε η μεταφορά δαναζόλης από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) που δεν περιείχε Ca^{2+} και Mg^{2+} (pH=7,2) (διαμέρισμα-δότης) σε διασπορά λιποσωμάτων (διαμέρισμα-δέκτης), με στόχο να εφαρμοστούν στο διαμέρισμα-δέκτης συνθήκες παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με τις Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες. Μετρήθηκε η συγκέντρωση δαναζόλης στα περιεχόμενα και των δύο διαμερισμάτων και μετά αφαιρέθηκε η μεμβράνη από το φρεάτιο για κάθε χρονική στιγμή, τοποθετήθηκε σε σωληνάκι Eppendorf που περιείχε 200 μl ισοπροπανόλης και αφέθηκε για 60 min σε λουτρό υπερήχων. Ελήφθησαν 100 μl δείγματος και αφού αραιώθηκαν με 400 μl κινητής φάσης, μετρήθηκε το περιεχόμενο σε δαναζόλη με HPLC (Παράρτημα 3). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl ισοπροπανόλης στο διαμέρισμα-δότης του φρεατίου και αναδεύτηκαν για 45 min στη συσκευή Gut-Box™ με τις ίδιες συνθήκες όπως κατά τη διάρκεια του πειράματος διαπερατότητας (40 μm). Ελήφθησαν 100 μl δείγματος και αφού αραιώθηκαν με 400 μl κινητής φάσης, μετρήθηκε το περιεχόμενο σε δαναζόλη με HPLC. Η χρήση της ισοπροπανόλης είχε σκοπό να παραληφθεί η κατακρατημένη ποσότητα δαναζόλης από τη μεμβράνη και τα πλαστικά τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης. Για πρακτικούς λόγους¹ δεν ήταν δυνατή η χρήση ισοπροπανόλης στο διαμέρισμα-δέκτης. Η ανάκτηση της ουσίας από τα περιεχόμενα των δύο διαμερισμάτων, τη μεμβράνη και τα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης δεν ήταν ικανοποιητική (Πίνακας Π2.1).

¹ Αν προσθέτονταν 400 μl ισοπροπανόλης στο φρεάτιο από το οποίο είχε αφαιρεθεί η μεμβράνη, ώστε να ανακτηθεί η ουσία και από τα δύο διαμερίσματα, υπήρχε διαρροή της ισοπροπανόλης του διαμερίσματος-δέκτης στο σημείο επαφής των δύο διαμερισμάτων. Η διαρροή αυτή οφειλόταν στην αφαίρεση της μεμβράνης που δημιουργούσε κενό στο σημείο επαφής.

Πίνακας Π2.1: Ανάκτηση δαναζόλης από τα περιεχόμενα των δύο διαμερισμάτων, τη μεμβράνη και τα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης, μετά από πείραμα διαπερατότητας δαναζόλης από ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (D-PBS) σε διασπορά λιποσωμάτων (διαμέρισμα-δέκτης).

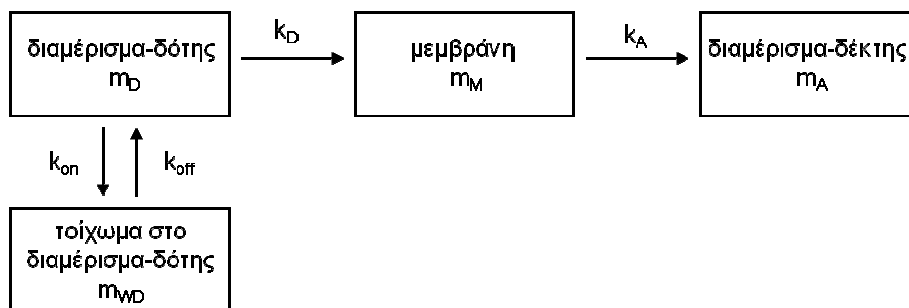
t (min)	ανάκτηση (%)
60	12,66
120	19,59
180	22,34
240	24,00
300	25,86

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η μεταφορά δαναζόλης από FeSSIF-V2 (διαμέρισμα-δότης) σε acceptor sink buffer (ASB) της Pion (διαμέρισμα-δέκτης). Η ανάκτηση της δαναζόλης από τα δύο διαμερίσματα, τη μεμβράνη και τα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης παρουσιάζεται στον Πίνακα Π2.2.

Πίνακας Π2.2: Ανάκτηση δαναζόλης από τα περιεχόμενα των δύο διαμερισμάτων, τη μεμβράνη και τα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης, μετά από πείραμα διαπερατότητας δαναζόλης από FeSSIF-V2 (διαμέρισμα-δότης) σε ASB (διαμέρισμα-δέκτης).

t (min)	ανάκτηση (%)
20	72,93
40	77,74
60	64,51
120	82,75
180	99,98
240	122,78
300	97,85

Στα δεδομένα που προέκυψαν από το πείραμα αυτό προσαρμόστηκαν διαφορικές εξισώσεις με βάση το πολυδιαμερισματικό μοντέλο που παρουσιάζεται στο Σχήμα Π2.1. Το μοντέλο αυτό λαμβάνει υπόψη τη μείωση της συγκέντρωσης της ουσίας στο διαμέρισμα-δότης, την αύξηση της συγκέντρωσης στο διαμέρισμα-δέκτης, και τη διακύμανση της ποσότητας της ουσίας στη λιπιδική μεμβράνη και στα τοιχώματα. Δεν ελήφθη υπόψη η προσρόφηση ουσίας στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δέκτης. Όμως, όπως φαίνεται από την ανάκτηση στον Πίνακα Π2.2, λόγω της ιδιαίτερης σύστασης των περιεχομένων στο διαμέρισμα-δέκτης, αυτή η προσρόφηση είναι μικρή και δεν επηρεάζει τους υπολογισμούς.



Σχήμα Π2.1: Σχηματική αναπαράσταση του πολυδιαμερισματικού μοντέλου που δοκιμάστηκε για τα δεδομένα μεταφοράς της δαναζόλης από FeSSIF-V2 σε ASB στα πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA.

Οι διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν τις διαδικασίες μεταφοράς της δαναζόλης σε ένα πείραμα με την τεχνική PAMPA με βάση το μοντέλο του Σχήματος Π2.1 είναι οι εξής:

$$\frac{dm_D}{dt} = -(k_D \times m_D) - [k_{on} \times m_D \times (W_{tot} - m_{WD})] + (k_{off} \times m_{WD}) \quad \text{Εξίσωση Π2.1}$$

$$\frac{dm_M}{dt} = (k_D \times m_D) - (k_A \times m_M) \quad \text{Εξίσωση Π2.2}$$

$$\frac{dm_A}{dt} = k_A \times m_M \quad \text{Εξίσωση Π2.3}$$

$$\frac{dm_{WD}}{dt} = [k_{on} \times m_D \times (W_{tot} - m_{WD})] - (k_{off} \times m_{WD}) \quad \text{Εξίσωση Π2.4}$$

όπου:

k_D είναι η πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού μεταφοράς από το διαμερίσμα-δότης στη μεμβράνη (1/s). Ισούται με $P_D \times 60 \times A / V_D$, όπου P_D ο συντελεστής διαπερατότητας από το διαμερίσμα-δότης στη μεμβράνη (cm/s), A η έκταση της επιφάνειας της μεμβράνης (cm^2) και V_D ο όγκος του διαμερίσματος-δότης (ml)

k_{on} είναι η δευτεροταξική σταθερά προσρόφησης (σύνδεσης) της ουσίας στην επιφάνεια του διαμερίσματος-δότης του φρεατίου [$1/(s \times \mu\text{g/ml})$]

k_{off} είναι η πρωτοταξική σταθερά απομάκρυνσης της ουσίας από την επιφάνεια του διαμερίσματος-δότης του φρεατίου (1/s)

k_A είναι η πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού μεταφοράς από τη μεμβράνη στο διαμερίσμα-δέκτης (1/s). Ισούται με $P_A \times 60 \times A / V_A$, όπου P_A ο συντελεστής διαπερατότητας από τη μεμβράνη στο διαμερίσμα-δέκτης (cm/s), A η έκταση της επιφάνειας της μεμβράνης (cm^2) και V_A ο όγκος του διαμερίσματος-δέκτης (ml)

M_D είναι η ποσότητα της ουσίας στο διαμερίσμα-δότης (μg)

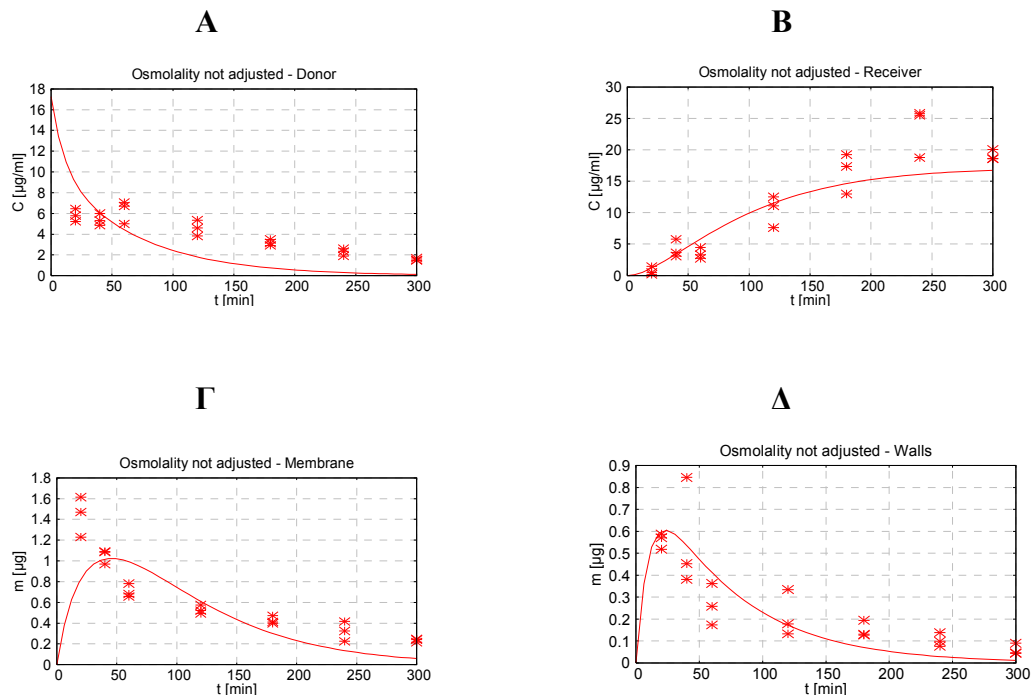
M_M είναι η ποσότητα της ουσίας στη μεμβράνη (μg)

M_A είναι η ποσότητα της ουσίας στο διαμερίσμα-δέκτης (μg)

M_{WD} είναι η ποσότητα της ουσίας που έχει προσροφηθεί στην επιφάνεια του διαμερίσματος-δότης του φρεατίου (μg)

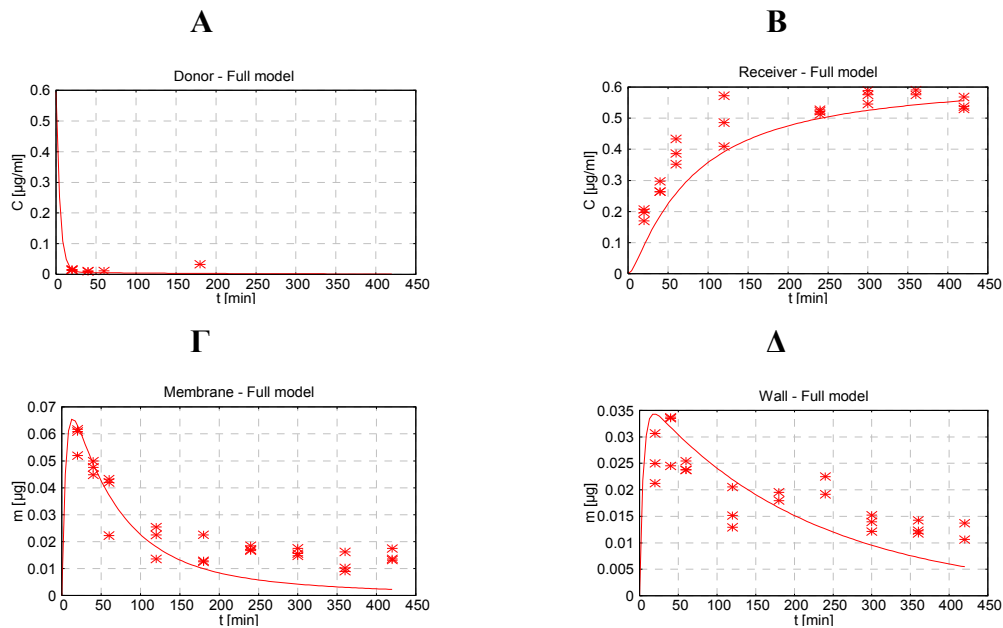
W_{tot} είναι ο συνολικός αριθμός διαθέσιμων θέσεων σύνδεσης της επιφάνειας του διαμερίσματος-δότης του φρεατίου ή η συνολική χωρητικότητα σύνδεσης (μg)

Στο Σχήμα Π2.2 φαίνεται ότι η προσαρμογή του μοντέλου δεν ήταν καλή. Θεωρήθηκε ότι αυτό ίσως να οφείλεται (τουλάχιστον μερικώς) στις διαφορές οσμωτικότητας μεταξύ των περιεχομένων των διαμερισμάτων και γι' αυτό αποφασίστηκε η ρύθμιση της οσμωτικότητας του ASB με NaCl.

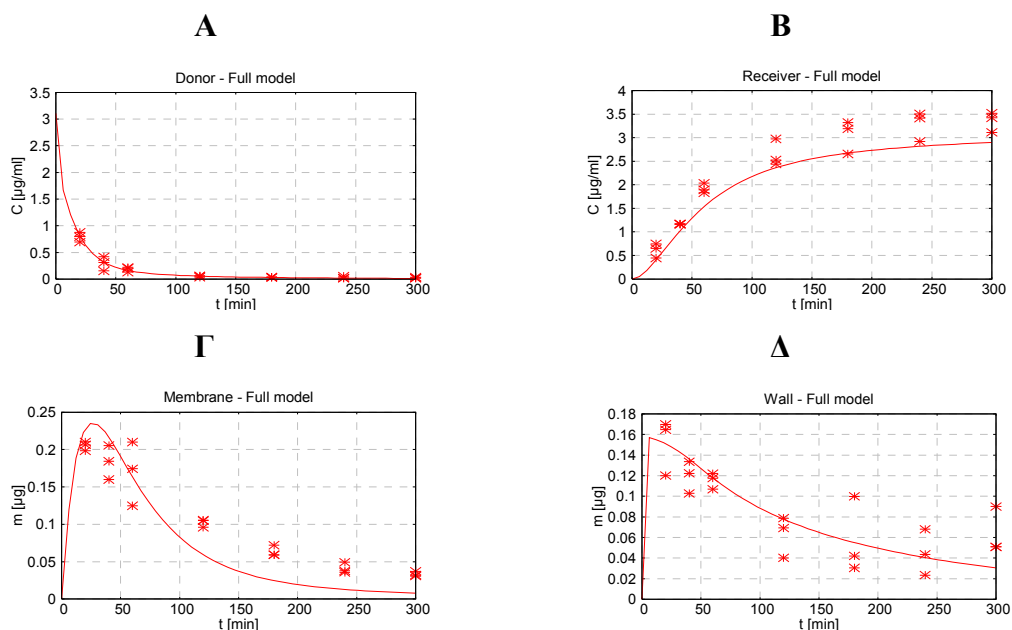


Σχήμα Π2.2: Μεταφορά δαναζόλης από FeSSIF-V2, χωρίς ρύθμιση της οσμωτικότητας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης. Α) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης. Β) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δέκτης. Γ) Ποσότητα δαναζόλης στη μεμβράνη. Δ) Ποσότητα δαναζόλης στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης.

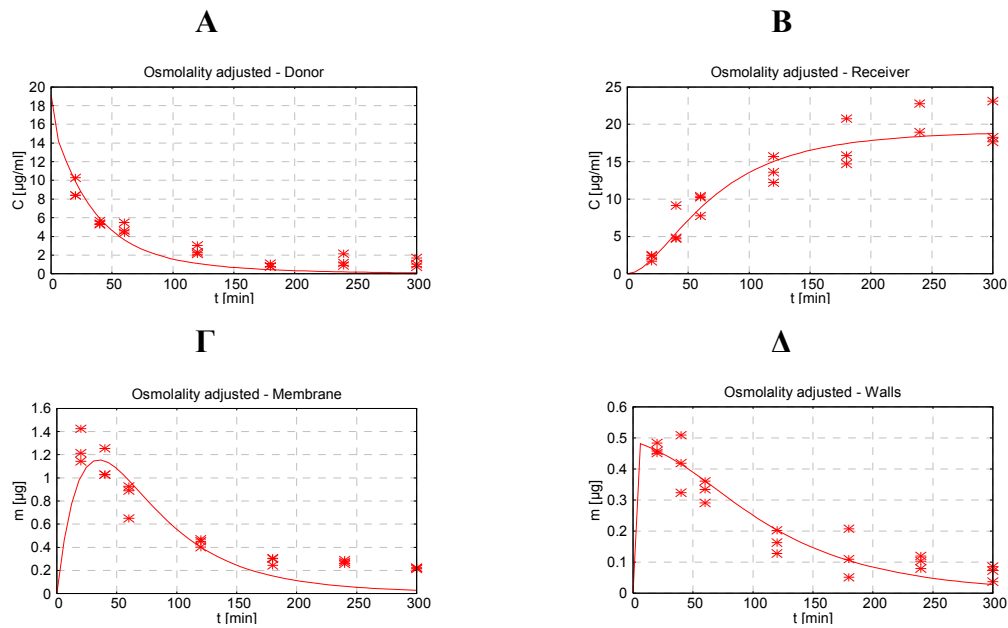
Στα Σχήματα Π2.3, Π2.4, Π2.5 παρουσιάζονται τα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς της δαναζόλης από Prisma™ HT, από FaSSIF-V2 και από FeSSIF-V2, αφού είχε γίνει ρύθμιση της οσμωτικότητας στο διαμέρισμα-δέκτης, καθώς και οι καλύτερα προσαρμοσμένες γραμμές με βάση το πολυδιαμερισματικό μοντέλο που παρουσιάζεται στο Σχήμα Π2.1.



Σχήμα Π2.3: Μεταφορά δαναζόλης από Prisma™ HT με ρύθμιση της ωσμωτικότητας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης. Α) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης. Β) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δέκτης. Γ) Ποσότητα δαναζόλης στη μεμβράνη. Δ) Ποσότητα δαναζόλης στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης.



Σχήμα Π2.4: Μεταφορά δαναζόλης από FaSSiF-V2 με ρύθμιση της ωσμωτικότητας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης. Α) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης. Β) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δέκτης. Γ) Ποσότητα δαναζόλης στη μεμβράνη. Δ) Ποσότητα δαναζόλης στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης.



Σχήμα Π2.5: Μεταφορά δαναζόλης από FeSSiF-V2 με ρύθμιση της ωσμωτικότητας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης. Α) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δότης. Β) Συγκέντρωση δαναζόλης στο διαμέρισμα-δέκτης. Γ) Ποσότητα δαναζόλης στη μεμβράνη. Δ) Ποσότητα δαναζόλης στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότης.

Στον Πίνακα Π2.3 παρουσιάζονται οι τιμές P_D , P_A και η συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δότης σε χρόνο 0, $C_{D(0)}^{estim}$, που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του πολυδιαμερισματικού μοντέλου (Σχήμα Π2.1) στα πρωτογενή δεδομένα, καθώς και η συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δότης που μετρήθηκε κατά την έναρξη του πειράματος, $C_{D(0)}^{meas}$.

Πίνακας Π2.3: Οι τιμές P_D , P_A και $C_{D(0)}^{estim}$ που υπολογίστηκαν μετά από την προσαρμογή του πολυδιαμερισματικού μοντέλου (Σχήμα Π2.1) στα πρωτογενή δεδομένα μεταφοράς δαναζόλης μετά από ρύθμιση της ωσμωτικότητας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης, καθώς και οι μετρηθείσες τιμές $C_{D(0)}^{meas}$ στα πειράματα διαπερατότητας με δαναζόλη σε διάφορα διαλύματα στο διαμέρισμα-δότης του φρεατίου PAMPA

Διάλυμα στο διαμέρισμα-δότης	$P_D \times 10^4$ (cm/s)	$P_A \times 10^4$ (cm/s)	$C_{D(0)}^{estim}$ (μg/ml)	$C_{D(0)}^{meas}$ (μg/ml)
Prisma™ HT	15,4 ± 5,8	1,88 ± 0,31	0,595 ± 0,039	0,436
FaSSIF-V2	6,03	2,99	3,11	3,713
FeSSIF-V2	3,0	3,47	19,2	22,632

Από τα Σχήματα Π2.3-Π2.5 φαίνεται ότι η προσαρμογή και πάλι δεν είναι απόλυτα ικανοποιητική. Επίσης, οι τιμές P_D και P_A (Πίνακας Π4.3) διαφέρουν σημαντικά και επιπρόσθετα με βάση τις τιμές P_D , οι συντελεστές μειώνονται κατά τη φορά Prisma™ HT - FaSSIF-V2 - FeSSIF-V2, ενώ με βάση τις τιμές P_A , αυξάνονται κατά την ίδια φορά.

Στη συνέχεια, έγινε δοκιμή της μεθόδου ενός σημείου (Avdeef, 2003). Συγκεκριμένα, προτείνεται η παρακάτω εξίσωση στην περίπτωση που επικρατούν συνθήκες δεξαμενής στο διαμέρισμα-δέκτης και το pH μεταξύ των διαμερισμάτων-δότης και δέκτης είναι ίδιο (ή διαφορετικό, αλλά το μόριο δεν ιονίζεται, όπως στην περίπτωση της δαναζόλης):

$$P_{eff}^{PAMPA} = -\frac{2.303 \times V_D}{A \times (t - \tau_{lag})} \times \log_{10} \left[\frac{1}{1-R} \times \frac{C_{D(t)}}{C_{D(0)}} \right] \quad \text{Εξίσωση Π2.5}$$

όπου:

A είναι η έκταση της επιφάνειας της μεμβράνης (cm²)

C_D είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διαμέρισμα-δότης (μg/ml). Ο δείκτης δηλώνει τη χρονική στιγμή.

P_{eff}^{PAMPA} είναι ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας (cm/s)

R είναι το κατακρατούμενο κλάσμα της ουσίας από τη μεμβράνη. Υπολογίζεται από

$$\text{τη σχέση: } R = 1 - \frac{C_{D(\infty)}}{C_{D(0)}} - \left(\frac{V_A}{V_D} \times \frac{C_{A(\infty)}}{C_{D(0)}} \right) \quad \text{Εξίσωση Π2.6}$$

όπου V_A ο όγκος του διαμερίσματος δέκτης (ml), $C_{A(\infty)}$ και $C_{D(\infty)}$ η συγκέντρωση της ουσίας στο άπειρο στο διαμέρισμα-δέκτης και δότης, αντίστοιχα (μg/ml).

V_D είναι ο όγκος του διαμερίσματος-δότης (ml)

τ_{lag} είναι ο χρόνος στον οποίο η ουσία πρωτοεμφανίζεται στο διαμέρισμα-δέκτης (s).

Υπολογίζεται από το δεύτερο νόμο του Fick ως $\tau_{lag} = h^2 / (\pi^2 D_m)$, όπου h το πάχος της μεμβράνης (cm) και D_m η ικανότητα διάχυσης της ουσίας μέσα στη μεμβράνη (cm²/s)

Ο ίδιος υπολογισμός μπορεί να γίνει και με βάση τα δεδομένα από το διαμέρισμα-δέκτης. Τότε, η εξίσωση Π4.5 θα γραφτεί ως:

$$P_{app}^{PAMPA} = - \frac{2.303 \times V_D}{A \times (t - \tau_{lag})} \times \log_{10} \left[1 - \left(\frac{1}{1-R} \times \frac{C_{A(t)}}{C_{D(0)}} \right) \right] \quad \text{Εξίσωση Π2.7}$$

Στο τέλος του πειράματος ($t=420$ min για το μέσο μεταφοράς, $t=300$ min για FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2) θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία (plateau στα Σχήματα Π2.3-Π2.5) και ότι τότε οι συγκεντρώσεις στα δύο διαμερίσματα αντιστοιχούν στις τιμές $C_{A(\infty)}$ και $C_{D(\infty)}$. Από τις τιμές αυτές υπολογίστηκε το R με βάση την εξίσωση Π2.6. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε και ο συντελεστής διαπερατότητας P_{eff}^{PAMPA} από την εξίσωση Π2.5, χρησιμοποιώντας ως τιμή $C_{D(t)}$ τη συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δότης για 300 (ή 420 για το ρυθμιστικό διάλυμα) min. Οι τιμές P_{eff}^{PAMPA} για το Prisma™ HT, το FaSSIF-V2 και το FeSSIF-V2 φαίνονται στον Πίνακα Π2.4.

Πίνακας Π2.4: Τιμές συντελεστή διαπερατότητας (cm/s) για πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης από μέσο μεταφοράς, FaSSIF-V2, και FeSSIF-V2, υπολογισμένες με τη μέθοδο του σημείου που προτείνεται από την εταιρεία Pion ^a

Διάλυμα στο διαμέρισμα-δότης	$P_{eff}^{PAMPA} \times 10^4$ (cm/s)
Prisma™ HT	- ^β
FaSSIF-V2	1,83 ± 0,17
FeSSIF-V2	1,097 ± 0,096

^a Οι τιμές P_{app}^{PAMPA} που υπολογίζονται από την εξίσωση Π2.7 είναι ίδιες.

^β Δεν υπολογίστηκε, επειδή στο διαμέρισμα-δότης δεν ανιχνευόταν δαναζόλη 60 min από την έναρξη του πειράματος.

Το πρόβλημα με τη μέθοδο ενός σημείου είναι ότι χρησιμοποιείται ως σταθερά μια τιμή R που υπολογίζεται από το συγκεκριμένο χρονικό σημείο. Η τιμή αυτή όμως, όπως φάνηκε από τα Σχήματα Π2.3-Π2.5 (Απεικονίσεις Γ), δεν είναι σταθερή κατά τη διάρκεια κάθε πειράματος. Στον Πίνακα Π2.5 παρουσιάζεται η διακύμανση της ποσότητας δαναζόλης στη μεμβράνη και στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότη για τα δεδομένα των πειραμάτων που παρουσιάστηκαν στο Σχήματα Π2.3-Π2.5.

Πίνακας Π2.5: Ποσότητα δαναζόλης (ng) στη μεμβράνη και στα τοιχώματα του διαμερίσματος-δότη κατά τη διάρκεια πειραμάτων διαπερατότητας από Prisma™ HT, FaSSIF-V2, και FeSSIF-V2

χρόνος (min)	Ποσότητα δαναζόλης (ng)					
	Prisma™ HT		FaSSIF-V2		FeSSIF-V2	
	μεμβράνη	τοιχώμα στο διαμέρισμα- δότης	μεμβράνη	τοιχώμα στο διαμέρισμα- δότης	μεμβράνη	τοιχώμα στο διαμέρισμα- δότης
20	58	26	205	151	1260	464
40	47	31	183	120	1104	417
60	36	24	170	116	822	328
120	20	16	102	63	441	165
180	16	19	63	57	283	123
240	17	21	41	45	273	101
300	16	14	33	64	219	65

Συμπερασματικά, η μέθοδος ενός σημείου χρησιμοποιώντας την εξίσωση Π2.5 (ή Π2.7) δεν είναι η καλύτερη δυνατή για τον υπολογισμό του συντελεστή διαπερατότητας, γιατί η τιμή R που προκύπτει για το συγκεκριμένο χρονικό σημείο και η τιμή P^{PAMPA} που υπολογίζεται στη συνέχεια ισχύουν μόνο για τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Με βάση τα παραπάνω, αποφασίστηκε οι πιθανές διακυμάνσεις του φαρμάκου στη μεμβράνη ή/και στα τοιχώματα να μη λαμβάνονται υπόψη και η απομάκρυνση των φαρμάκων από το διαμέρισμα-δότης ή η εμφάνιση του φαρμάκου στο διαμέρισμα-δέκτης να θεωρούνται ως απλή πρωτοταξική διαδικασία, η οποία λόγω της παρουσίας του ASB στο διαμέρισμα-δέκτης είναι μη αντιστρεπτή.

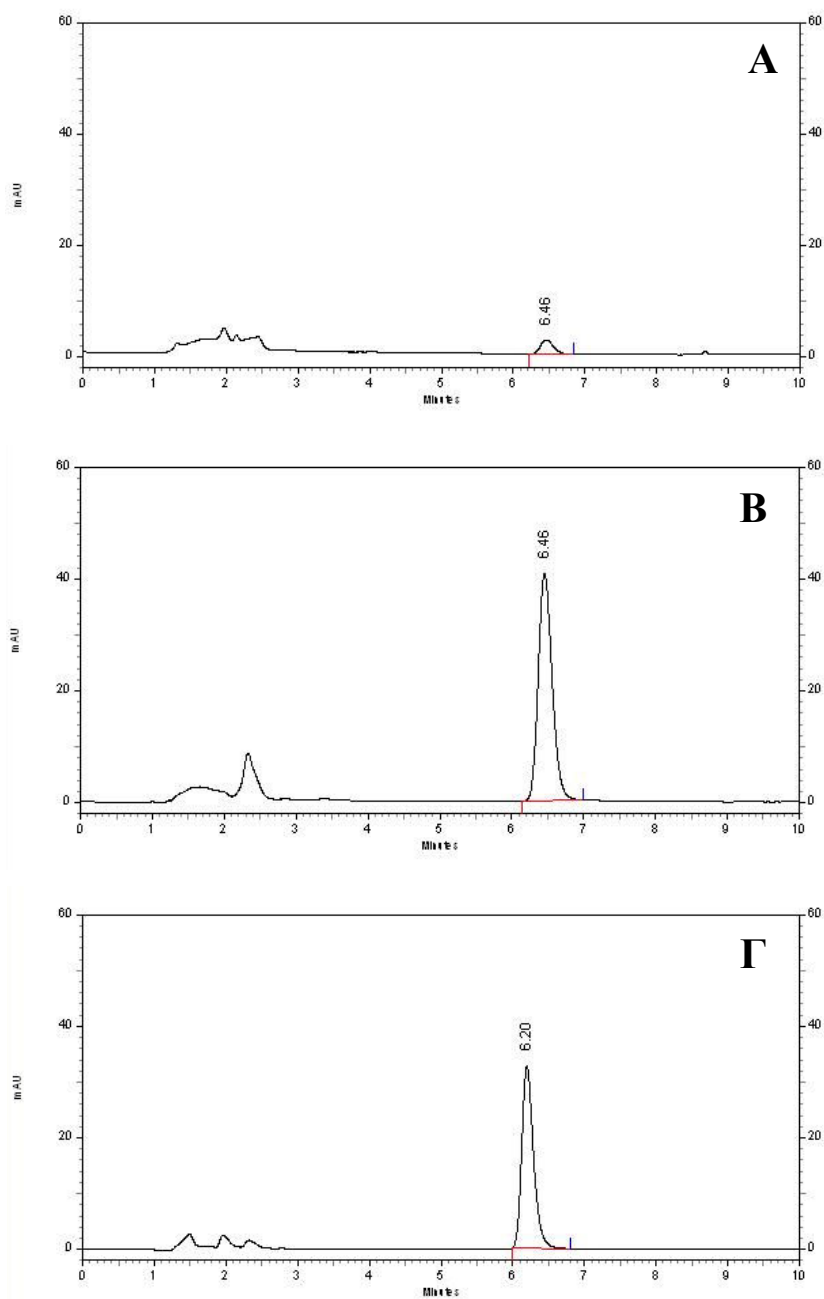
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3 - Χρωματογραφικές συνθήκες για την ποσοτικοποίηση των μικρομορίων που μελετήθηκαν

Π3.1 Πειράματα διαπερατότητας με τη μέθοδο PAMPA

Η ανάλυση σε όλες τις περιπτώσεις έγινε με HPLC-UV. Στους Πίνακες Π3.1-9 παρουσιάζονται οι χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της δαναζόλης, των μικρομορίων της Roche (A, B, Γ, ριμπαβιρίνη) και των τεσσάρων προτύπων μορίων (αμοξικιλίνη, ρανιτιδίνη, θεοφυλλίνη, καρβαμαζεπίνη), ενώ στα Σχήματα Π3.1-9 παρουσιάζονται ενδεικτικά χρωματογραφήματα. Στον Πίνακα Π3.10 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των πειραματικών δεδομένων.

Πίνακας Π3.1: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της δαναζόλης

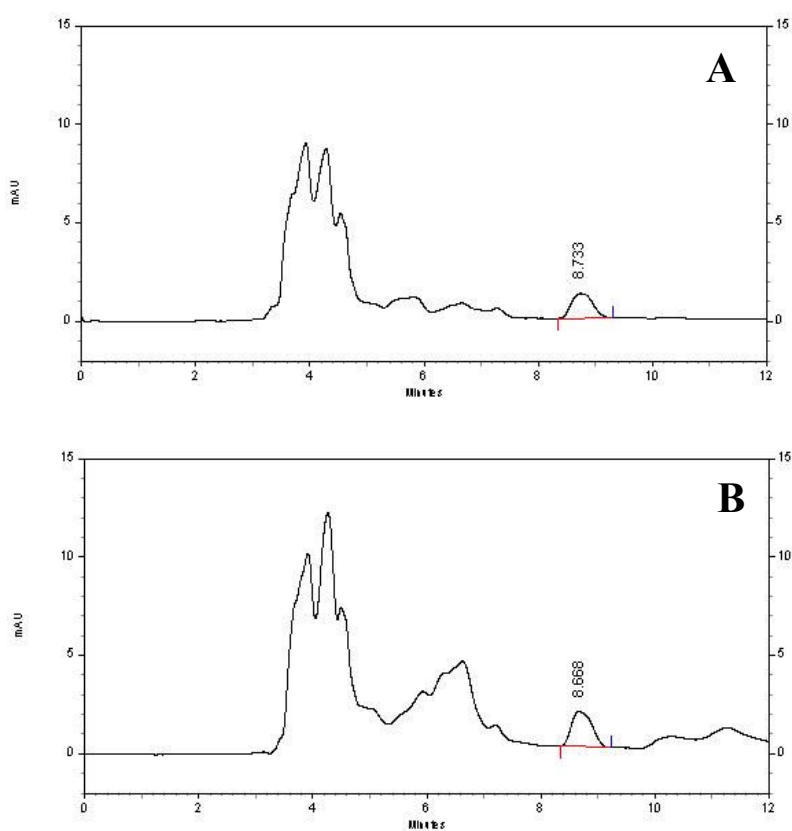
Στήλη	Fortis C18 (5 μ m, 150 \times 3,0 mm)
Κινητή φάση	ακετονιτρίλιο : νερό 70:30 v:v
Ροή (ml/min)	0,5
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	286
Χρόνος ανάσχεσης (min)	\approx 6,5



Σχήμα Π3.1: Χρωματογράφημα δείγματος δαναζόλης σε Prisma™ HT (A), σε FaSSIF-V2 (B) και σε FeSSIF-V2 μετά από αραίωση 1:10 με κινητή φάση (Γ).

Πίνακας Π3.2: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου A

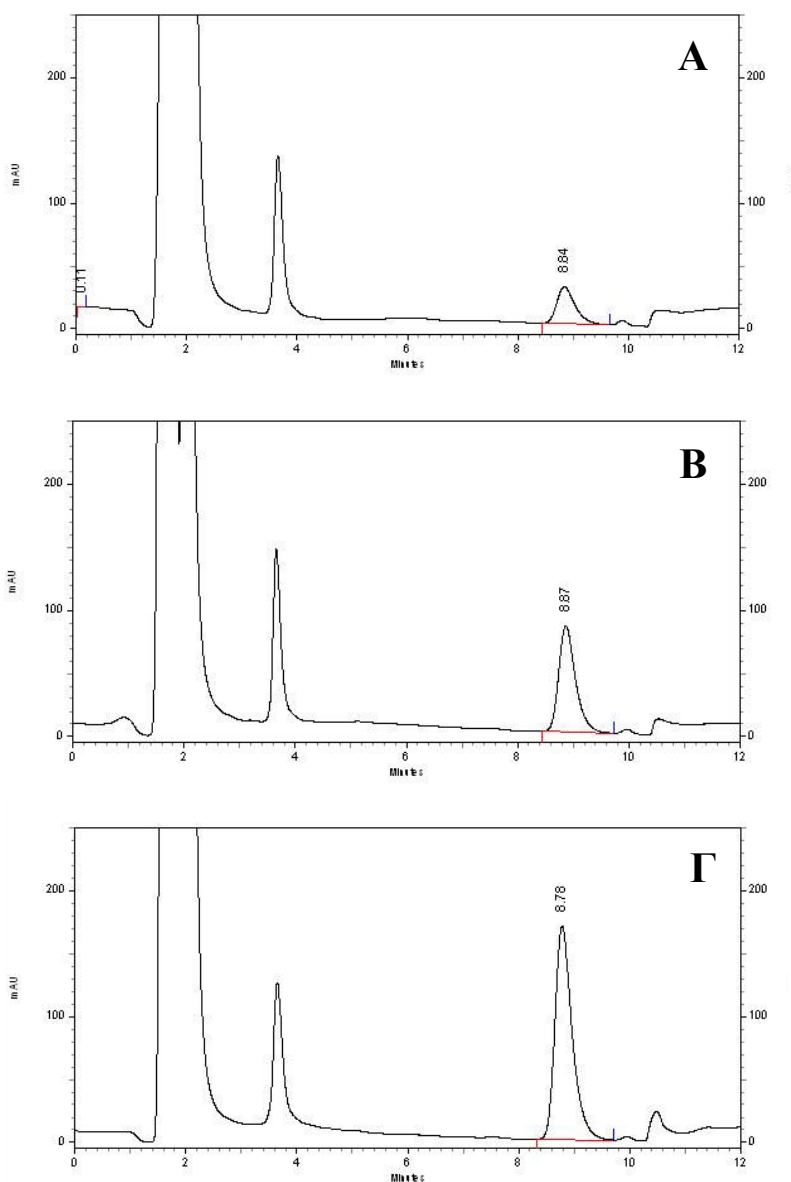
Στήλη	Agilent Eclipse XDB-C8 (5 μ m, 150 \times 4.6 mm)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=7.9) : ακετονιτρίλιο 63:37 v:v
Ροή (ml/min)	0,4
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	250
Χρόνος ανάσχεσης (min)	\approx 8,7



Σχήμα Π3.2: Χρωματογράφημα δείγματος μικρομορίου A σε FaSSIF-V2 (A) και σε FeSSIF-V2 (B).

Πίνακας Π3.3: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου B

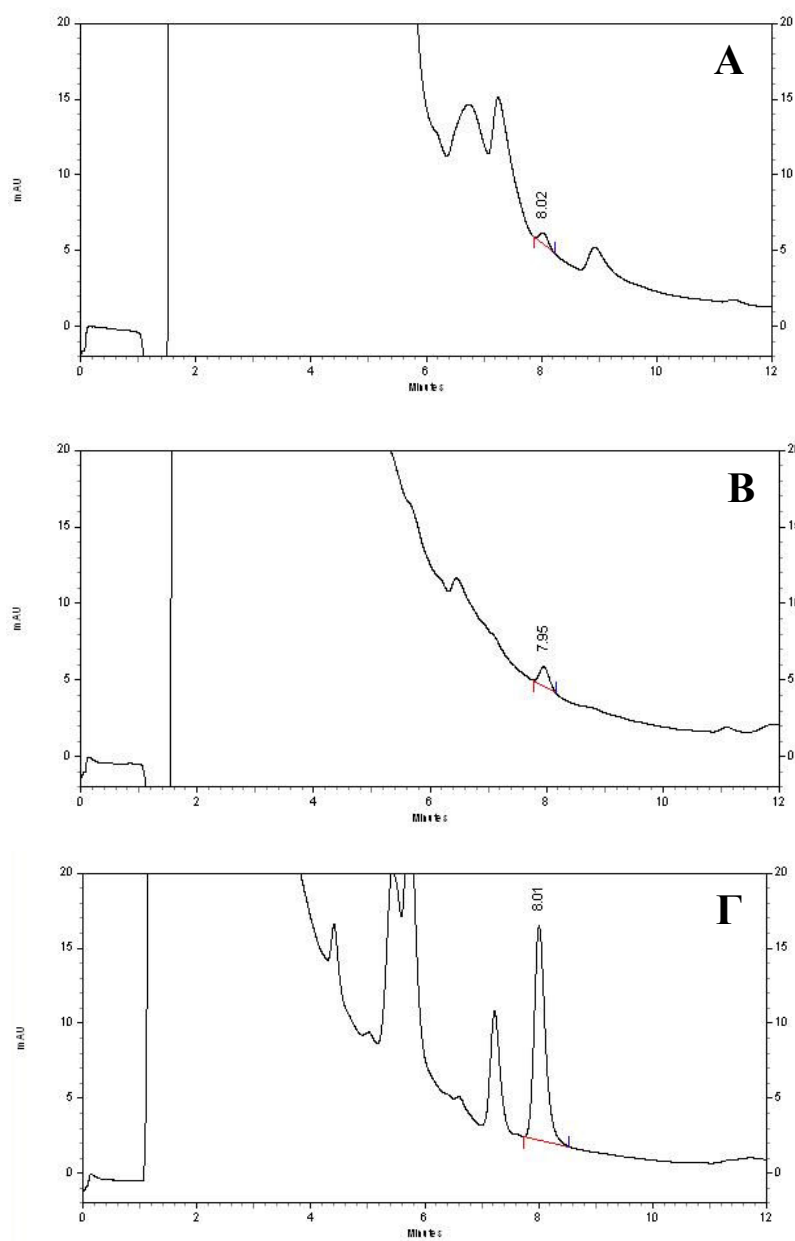
Στήλη	Fortis C18 (5 μm, 150×3,0 mm)
Κινητή φάση	μεθανόλη : νερό 60:40 v:v
Ροή (ml/min)	0,5
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	210
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 8,8



Σχήμα Π3.3: Χρωματογράφημα δείγματος μικρομορίου B σε Prisma™ HT (A), σε FaSSIF-V2 (B) και σε FeSSIF-V2 (Γ).

Πίνακας Π3.4: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου Γ

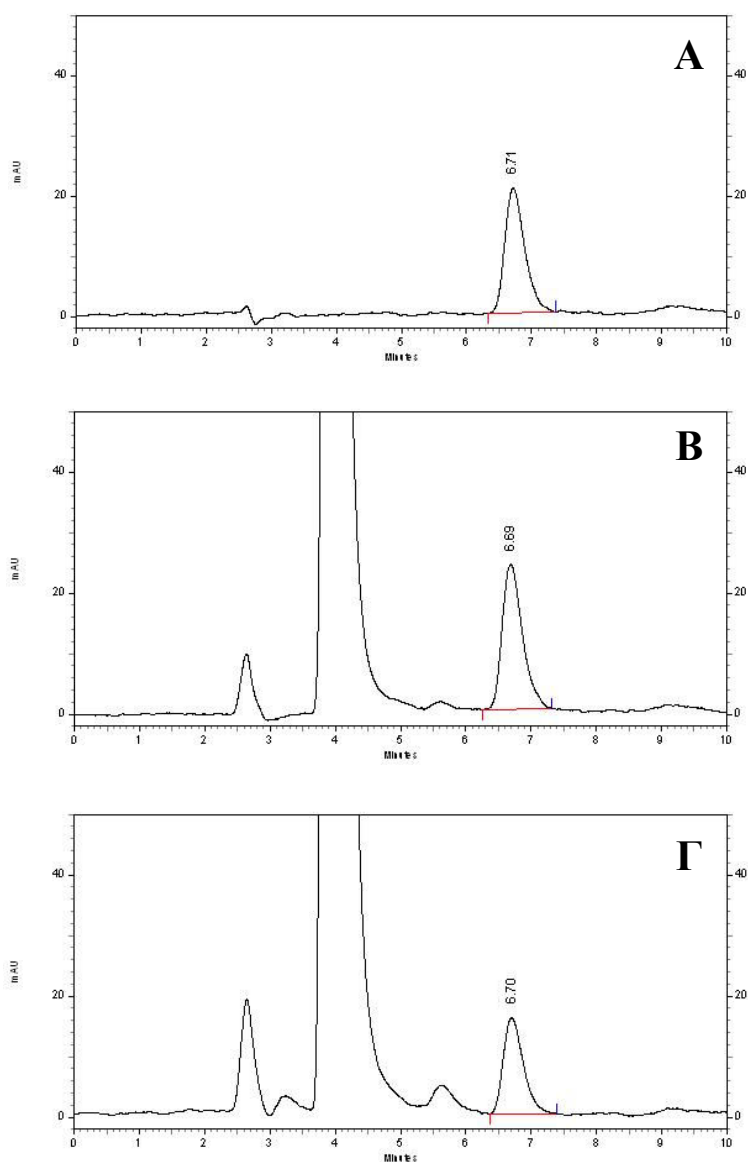
Στήλη	Fortis C18 (5 μm, 150×3,0 mm)
Κινητή φάση	ακετονιτρίλιο : νερό 95:5 v:v
Ροή (ml/min)	0,5
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	220
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 8



Σχήμα Π3.4: Χρωματογράφημα δείγματος μικρομορίου Γ σε Prisma™ HT (A), σε FaSSIF-V2 (B) και σε FeSSIF-V2 μετά από αραιώση 1:3 με κινητή φάση (Γ).

Πίνακας Π3.5: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της ριπαβιρίνης

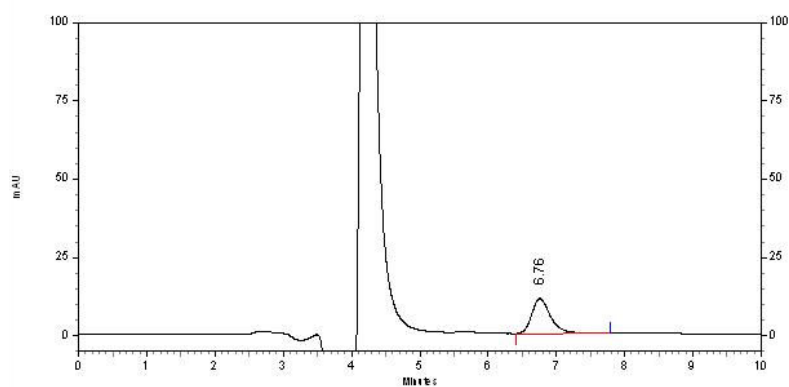
Στήλη	Nucleodur C18 Pyramid (5 μ m, EC 250/2)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (20 mM) : μεθανόλη 99:1 v:v
Ροή (ml/min)	0,2
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	208
Χρόνος ανάσχεσης (min)	\approx 6,7



Σχήμα Π3.5: Χρωματογράφημα δείγματος ριπαβιρίνης από το διαμέρισμα-δότης σε PrismaTM HT μετά από αραίωση 1:2000 με κινητή φάση (Α), σε FaSSIF-V2 μετά από αραίωση 1:500 με κινητή φάση (Β) και σε FeSSIF-V2 μετά από αραίωση 1:500 με κινητή φάση (Γ).

Πίνακας Π3.6: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της αμοξικιλίνης

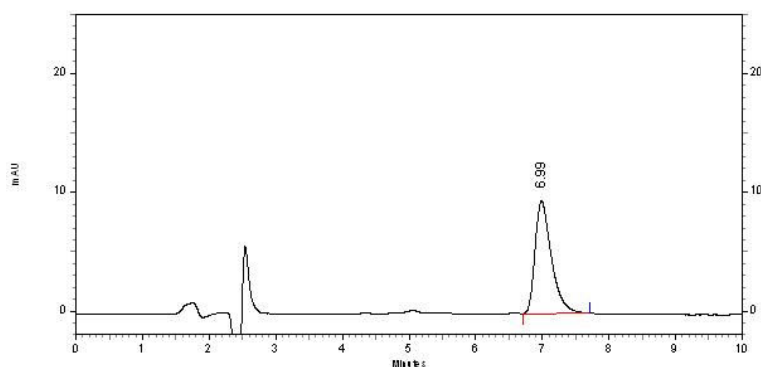
Στήλη	Nucleodur C18 Pyramid (5 μm, EC 250/2)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=3.5) : ακετονιτρίλιο 95:5 v:v
Ροή (ml/min)	0,2
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	230
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 6,7



Σχήμα Π3.6: Χρωματογράφημα δείγματος αμοξικιλίνης από το διαμέρισμα-δότης σε Prisma™ HT μετά από αραιώση 1:200 με κινητή φάση.

Πίνακας Π3.7: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της ρανιτιδίνης

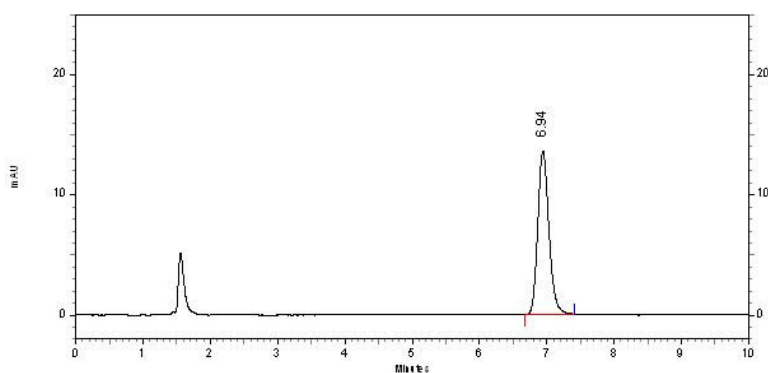
Στήλη	Fortis C18 (5 μm, 150×3,0 mm)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=4.7) : ακετονιτρίλιο 90:10 v:v
Ροή (ml/min)	0,5
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	230
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 7



Σχήμα Π3.7: Χρωματογράφημα δείγματος ρανιτιδίνης από το διαμέρισμα-δότης σε Prisma™ HT μετά από αραίωση 1:500 με κινητή φάση.

Πίνακας Π3.8: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της θεοφυλλίνης

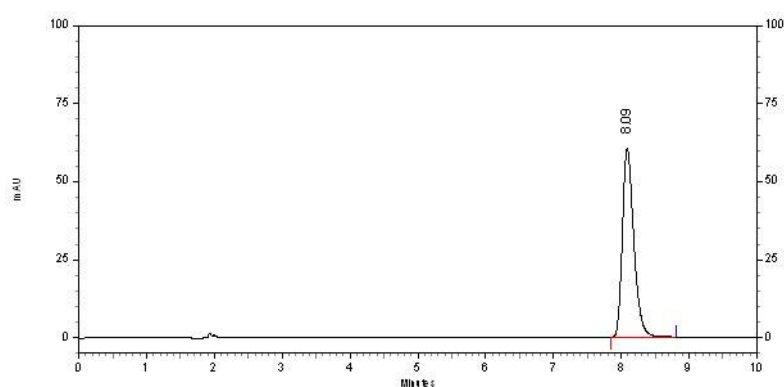
Στήλη	BDS Hypersil C18 (5 μm, 150×4,6 mm ID)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM) : μεθανόλη : νερό 90:5:5 v:v:v
Ροή (ml/min)	1
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	273
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 7



Σχήμα Π3.8: Χρωματογράφημα δείγματος θεοφυλλίνης σε Prisma™ HT μετά από αραίωση 1:20 με κινητή φάση.

Πίνακας Π3.9: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της καρβαμαζεπίνης

Στήλη	Fortis C18 (5 μm, 250×4,6 mm)
Κινητή φάση	ακετονιτρίλιο : νερό 45:55 v:v
Ροή (ml/min)	0,5
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	285
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 8



Σχήμα Π3.9: Χρωματογράφημα δείγματος καρβαμαζεπίνης σε Prisma™ HT μετά από αραίωση 1:20 με κινητή φάση.

Πίνακας Π3.10: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μορίων

	Κλίση ± SE	Τομή ± SE	R ²	Εύρος συγκεντρώσεων (µg/ml)	LOD ^a (µg/ml)	LOQ ^a (µg/ml)
Δαναζόλη	2,103 ± 0,014×10 ⁵	0,4 ± 3,9×10 ²	0,9998	0,01-0,6	0,0118	0,0359
	2,208 ± 0,023×10 ⁵	-1,49 ± 0,65×10 ³	0,9995	0,01-0,6	0,0186	0,0564
	2,186 ± 0,027×10 ⁵	6 ± 44×10 ²	0,998	0,01-4	0,180	0,545
Μικρομόριο Α	5,4904 ± 0,0037×10 ⁴	-5,5 ± 2,4×10 ²	0,9997	0,02-1,5	0,0299	0,090
Μικρομόριο Β	3,889 ± 0,012×10 ⁵	-8,6 ± 4,4×10 ³	0,99990	0,01-10	0,111	0,337
	3,634 ± 0,031×10 ⁵	-6,7 ± 8,6×10 ³	0,9993	0,01-7,5	0,224	0,680
Μικρομόριο Γ	3,795 ± 0,027×10 ⁵	-4,8 ± 4,3×10 ³	0,9995	0,01-4	0,101	0,307
	3,5207 ± 0,0071×10 ⁵	-2,7± 1,5×10 ³	0,99996	0,01-5	0,0387	0,117
	3,545 ± 0,010×10 ⁵	-0,7± 2,2×10 ³	0,99990	0,01-5	0,0566	0,171
Ριπαβιρίνη	7,562 ± 0,062×10 ⁵	-0,3 ± 5,5×10 ³	0,9996	0,05-2	0,046	0,140
Αμοξικιλίνη	4,116 ± 0,017×10 ⁵	-2,43 ± 0,83×10 ³	0,99990	0,01-1	0,0140	0,0424
	4,117 ± 0,023×10 ⁵	-0,3 ± 1,2×10 ³	0,9998	0,01-1	0,0194	0,0588
Ρανιτιδίνη	2,863 ± 0,012×10 ⁵	-1,18 ± 0,61×10 ³	0,99990	0,01-1	0,0148	0,0448
	2,878 ± 0,015×10 ⁵	-1,18 ± 0,80×10 ³	0,9998	0,01-1	0,0172	0,0521
Θεοφυλλίνη	1,9084 ± 0,0039×10 ⁵	-2,4 ± 1,0×10 ³	0,99995	0,02-6	0,0484	0,147
	1,9096 ± 0,0066×10 ⁵	-0,8 ± 1,4×10 ³	0,99990	0,02-5	0,0641	0,194
	1,8703 ± 0,0042×10 ⁵	-0,24 ± 0,91×10 ³	0,99995	0,02-5	0,0419	0,127
Καρβαμαζεπίνη	1,6602 ± 0,0053×10 ⁵	-3,4 ± 2,2×10 ³	0,99990	0,02-10	0,124	0,376
	1,6923 ± 0,0033×10 ⁵	-1,3 ± 1,4×10 ³	0,99996	0,02-10	0,0763	0,231

^a Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκαν με βάση τις σχέσεις $LOD = \frac{3.3s_{y/x}}{b}$ και $LOQ = \frac{10s_{y/x}}{b}$, όπου b η κλίση και $s_{y/x}$ η τυπική απόκλιση των υπολοίπων της ευθείας παλινδρόμησης.

Π3.2 Πειράματα διαπερατότητας σε Caco-2 κυτταρικές μονοστιβάδες

Η ανάλυση των ουσιών έγινε με HPLC-UV ή HPLC-MS. Το MS χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση των ουσιών ήταν χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης του UV. Στους Πίνακες Π3.11-17 παρουσιάζονται οι χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της δαναζόλης, των πέντε μικρομορίων της Roche (A, B, Γ, ριμπαβιρίνη, λεβοβιρίνη) και των δύο προτύπων μορίων (αμοξικιλίνη, ρανιτιδίνη), ενώ στον Πίνακα Π3.18 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μορίων.

Πίνακας Π3.11: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της δαναζόλης

Στήλη	Nucleodur 100-5 C18 ec (CC 125x2 mm)
Κινητή φάση	ακετονιτρίλιο : νερό : οξικό οξύ 55:45:0,5 v:v:v
Ροή (ml/min)	0,25
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	286
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 7,5
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	338
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000
Θραυσματοποιητής (V)	100
Πίεση εκνεφωτή (psig)	30

Πίνακας Π3.12: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου A

Στήλη	Agilent Eclipse XDB-C8 (5 μm, 150×4,6 mm)		
Κινητή φάση	% A	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=7.9) : ακετονιτρίλιο 63:37 v:v	30
	% B	ακετονιτρίλιο	70
Ροή (ml/min)	0,4		
Όγκος ένεσης (μl)	50		
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	250		
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 9,5		
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	727, 728, 729, 730, 731		
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	12		
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350		
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000		
Θραυσματοποιητής (V)	100		
Πίεση εκνεφωτή (psig)	30		

Πίνακας Π3.13: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου Β

Στήλη	Nucleodur Sphinx RP (5 μm, CC 125/2)
Κινητή φάση	μεθανόλη : νερό : οξικό οξύ 60:40:1 v:v:v
Ροή (ml/min)	0,25
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	210
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 4
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	303, 325, 627
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000
Θραυσματοποιητής (V)	70
Πίεση εκνεφωτή (psig)	20

Πίνακας Π3.14: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση του μικρομορίου Γ

Στήλη	Nucleodur 100-5 C18 ec (CC 125/2)
Κινητή φάση	ακετονιτρίλιο : νερό : τριφθοροξικό οξύ 85:15:0.05 v:v:v
Ροή (ml/min)	0,25
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	220
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 8
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	554, 555, 556, 557, 558
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000
Θραυσματοποιητής (V)	70
Πίεση εκνεφωτή (psig)	20

Πίνακας Π3.15: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της λεβοβιρίνης και της ριμπαβιρίνης

Στήλη	Nucleodur C18 Pyramid (5 μm, EC 250/2)		
Κινητή φάση	A: μυρμηκικό αμμώνιο (20 mM) B: μεθανόλη		
	Time (min)	%A	%B
	0	99	1
	2	99	1
	3	40	60
	6,5	40	60
	7	99	1
Ροή (ml/min)	0,2		
Όγκος ένεσης (μl)	50		
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	208		
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 6,5		
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	245, 267, 283, 511		
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10		
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350		
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000		
Θραυσματοποιητής (V)	70		
Πίεση εκνεφωτή (psig)	20		

Πίνακας Π3.16: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της αμοξικιλίνης

Στήλη	Nucleodur C18 Pyramid (5 μm, EC 250/2)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=3.5) : ακετονιτρίλιο 95:5 v:v
Ροή (ml/min)	0,2
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	230
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 6,7
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	366, 388, 404
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000
Θραυσματοποιητής (V)	70
Πίεση εκνεφωτή (psig)	20

Πίνακας Π3.17: Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της ρανιτιδίνης

Στήλη	Nucleodur 100-5 C18 ec (CC 125×2 mm)
Κινητή φάση	μυρμηκικό αμμώνιο (10 mM, pH=4.7) : ακετονιτρίλιο 95:5 v:v
Ροή (ml/min)	0,25
Όγκος ένεσης (μl)	50
Μήκος κύματος ανιχνευτή (nm)	230
Χρόνος ανάσχεσης (min)	≈ 7
Λόγος μάζας προς φορτίο του παρακολουθούμενου επιλεγμένου ιόντος	315
Ταχύτητα ροής ξηραντικού αερίου (L/min)	10
Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου (°C)	350
Δυναμικό τριχοειδούς (V)	4000
Θραυσματοποιητής (V)	70
Πίεση εκνεφωτή (psig)	20

Πίνακας Π3.18: Χαρακτηριστικά των καμπυλών αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μορίων

	Κλίση ± SE	Τομή ± SE	R²	Εύρος συγκεντρώσεων (µg/ml)	LOD^β (µg/ml)	LOQ^β (µg/ml)
Δαναζόλη	296,0 ± 2,3	-2,0 ± 1,9	0,9996	0,025-2	0,0466	0,141
	307,3 ± 4,8	-6,0 ± 4,0	0,998	0,025-2	0,0927	0,281
Μικρομόριο Α	1881,9 ± 9,0	-11,8 ± 7,5	0,9998	0,025-2	0,0284	0,0861
	1873,3 ± 9,9	-9,7 ± 8,3	0,9998	0,025-2	0,0315	0,0956
Μικρομόριο Β	240,6 ± 6,6	-14,2 ± 7,8	0,997	0,2-2,5	0,167	0,506
	285,9 ± 4,5	-12,2 ± 5,0	0,9990	0,2-2,5	0,104	0,315
Μικρομόριο Γ^α	2,23 ± 0,017×10 ⁷	7,4 ± 2,0×10 ³	0,9996	0,0005-0,03	0,000670	0,00202
	1,879 ± 0,044×10 ⁷	1,14 ± 0,44×10 ⁴	0,9951	0,001-0,05	0,00207	0,00629
Λεβοβιρίνη	561,20 ± 2,7	1 ± 11	0,9998	0,05-10	0,171	0,518
	557,9 ± 3,6	7 ± 16	0,9997	0,01-10	0,222	0,674
Ριμπαβιρίνη	734 ± 10	-50 ± 67	0,998	0,05-15	0,833	2,52
	736 ± 11	-51 ± 73	0,998	0,05-15	0,896	2,71
Αμοξικιλίνη^α	5,89 ± 0,20×10 ⁵	1,77 ± 0,11×10 ⁴	0,99993	0,025-1	0,0109	0,0331
	5,21 ± 0,33×10 ⁵	1,53 ± 0,18×10 ⁴	0,9998	0,025-1	0,0207	0,0628
Ρανιτιδίνη	492,6 ± 6,2	-33 ± 11	0,9990	0,025-5	0,193	0,586
	491,2 ± 5,2	-23,4 ± 9,4	0,9991	0,025-5	0,163	0,493

^α Ανάλυση με HPLC-MS

^β Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκαν με βάση τις σχέσεις $LOD = \frac{3.3s_{y/x}}{b}$ και $LOQ = \frac{10s_{y/x}}{b}$, όπου b η κλίση και $s_{y/x}$ η τυπική απόκλιση των υπολοίπων της ευθείας παλινδρόμησης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4 - Διαφορικές εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή μοντέλου στα δεδομένα από τα πειράματα διαπερατότητας με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Π4.1 Επεξήγηση συμβόλων

Τα σύμβολα που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια είναι τα εξής:

a, b και **c** ως δείκτες αντιστοιχούν στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου (apical), στο κάτω διαμέρισμα (basolateral) και στα κύτταρα (cells), αντίστοιχα.

C είναι συγκέντρωση ουσίας (μg/ml). Ο δείκτης δηλώνει πού αναφέρεται π.χ. C_a είναι η συγκέντρωση στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου.

D είναι ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας στην πάνω (apical) μεμβράνη, που θεωρείται ίδιος και στην κάτω (basal) μεμβράνη.

h είναι το πάχος της πάνω μεμβράνης, που θεωρείται ίδιο και για την κάτω μεμβράνη.

K είναι συντελεστής μερισμού της ουσίας. Ο δείκτης δηλώνει μεταξύ ποιων σημείων ορίζεται ο συντελεστής π.χ. $K_{a/c}$ είναι ο συντελεστής μερισμού της ουσίας μεταξύ του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου και των κυττάρων, $K_{m/a}$ είναι ο συντελεστής μερισμού μεταξύ της πάνω μεμβράνης και του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου κλπ.

k_{on} είναι η δευτεροταξική σταθερά του ρυθμού της προσρόφησης της ουσίας στην επιφάνεια του πλαστικού τοιχώματος του φρεατίου [$1/(s \times \mu g/ml)$].

k_{off} είναι η πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης (desorption) της ουσίας από την επιφάνεια του πλαστικού τοιχώματος του φρεατίου [$1/s$].

M είναι ποσότητα ουσίας (μg). Ο δείκτης δηλώνει πού αναφέρεται π.χ. M_a είναι η συγκέντρωση στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου.

P_a είναι ο συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με διάχυση μέσω της πάνω κυτταρικής μεμβράνης (είτε το πείραμα γίνεται από το πάνω προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου είτε αντίστροφα) (cm/s).

P_b είναι ο συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με διάχυση μέσω της κάτω κυτταρικής μεμβράνης (είτε το πείραμα γίνεται από το πάνω προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου είτε αντίστροφα) (cm/s).

P_{hm} είναι ο αρμονικός μέσος των P_a και P_b (cm/s) (Εξίσωση Π4.34).

A είναι η έκταση της επιφάνειας της πολυκαρβονικής μεμβράνης ($4,71 \text{ cm}^2$).

u είναι ο συντελεστής μερισμού της ουσίας μεταξύ του πάνω και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου ($K_{a/b}$) (παράγοντας διόρθωσης).

V_a είναι ο όγκος του διαλύματος στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Είναι σταθερός με το χρόνο (0.8 ml) στα πειράματα διαπερατότητας με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα. Αλλάζει όμως με το χρόνο για πειράματα διαπερατότητας σε MM [$V_a=1,662-(0,0123 \times t)+(7,8074e^{-5} \times t^2)-(2,0069e^{-7} \times t^3)$ για τη δαναζόλη, $V_a=1,641-(0,0105 \times t)+(5,0534e^{-5} \times t^2)-(9,0573e^{-8} \times t^3)$ για τα υπόλοιπα μικρομόρια]¹.

V_b είναι ο όγκος του διαλύματος στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Για τα πειράματα σε MM είναι $V_b=2,862-(0,0123 \times t)+(7,8074e^{-5} \times t^2)-(2,0069e^{-7} \times t^3)$ για τη δαναζόλη και $V_b=2,841-(0,0105 \times t)+(5,0534e^{-5} \times t^2)-(9,0573e^{-8} \times t^3)$ για τα υπόλοιπα μικρομόρια¹. Για τα πειράματα με εντερικά περιεχόμενα είναι $V_b=2,462-(0,0123 \times t)+(7,8074e^{-5} \times t^2)-(2,0069e^{-7} \times t^3)$ ¹. Για τα πειράματα με προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα είναι $V_b=2,462-(0,0123 \times t)+(7,8074e^{-5} \times t^2)-(2,0069e^{-7} \times t^3)$ για τη δαναζόλη και $V_b=2,441-(0,0105 \times t)+(5,0534e^{-5} \times t^2)-(9,0573e^{-8} \times t^3)$ για τα υπόλοιπα μικρομόρια¹.

V_c είναι ο όγκος της κυτταρικής μονοστιβάδας ($0,0094 \text{ ml}$).

v_k είναι η πρωτοταξική σταθερά του ρυθμού μεταφοράς με τη μεσολάβηση φορέα ανά μονάδα έκτασης επιφάνειας [$1/(s \times \text{cm}^2)$].

W_a και W_b είναι η ποσότητα ουσίας που είναι δεσμευμένη στα τοιχώματα του πάνω και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου, αντίστοιχα (μg).

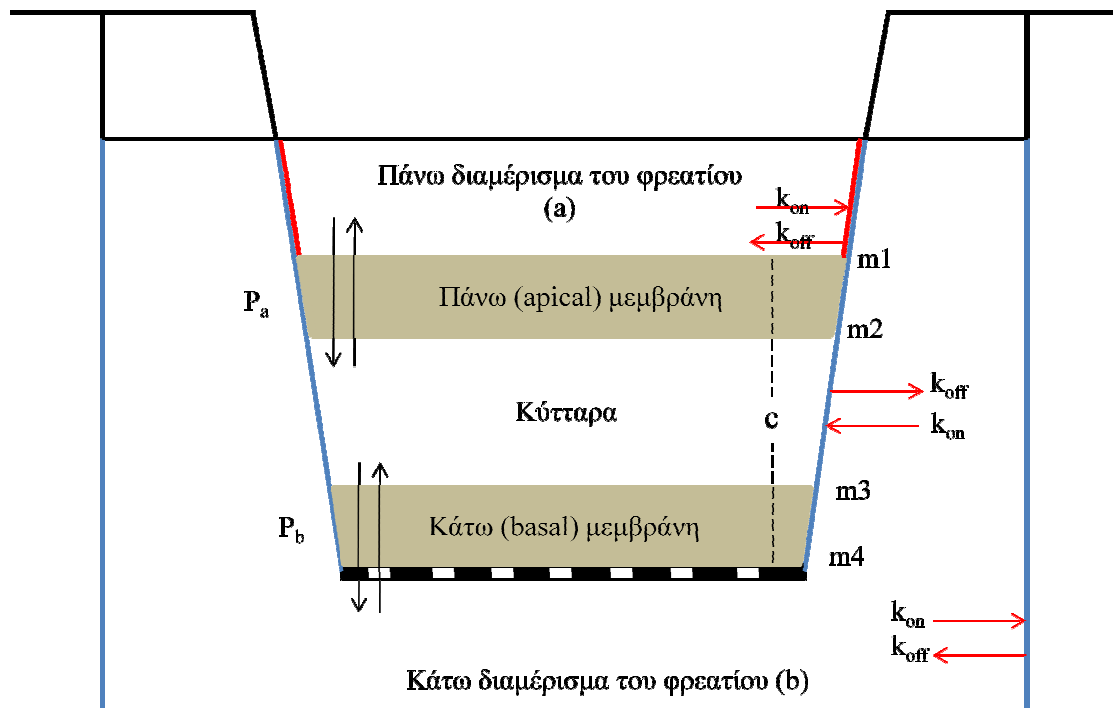
W_{tot} είναι ο συνολικός αριθμός διαθέσιμων θέσεων σύνδεσης στο τοίχωμα του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου (μg). Ο συνολικός αριθμός διαθέσιμων θέσεων σύνδεσης του τοιχώματος στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου είναι $5 \times W_{\text{tot}}$, μιας και ο λόγος της έκτασης των επιφανειών των δύο τοιχωμάτων μετρήθηκε και βρέθηκε 5.

¹ Οι εξισώσεις προέκυψαν με τη χρήση του λογισμικού EASY-FIT^{ModelDesign} και την προσαρμογή πολυωνύμου της μορφής $V_a=a+bt+ct^2+dt^3$.

Π4.2 Γενική μορφή διαφορικών εξισώσεων

Α. Πειράματα με MM

Τα πειράματα με MM έγιναν προς τις δύο κατευθύνσεις: α) πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου και β) κάτω προς πάνω διαμέρισμα του φρεατίου (βλ. Σχήμα Π4.1).



Σχήμα Π4.1: Σχηματική αναπαράσταση φρεατίου σε εγκάρσια τομή. Φαίνονται τα πέντε διαμερίσματα του μοντέλου: το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου (a), το κάτω διαμέρισμα (b), το κύτταρο (c), τα τοιχώματα του πάνω διαμερίσματος (κόκκινο χρώμα) και τα τοιχώματα του κάτω διαμερίσματος (μπλε χρώμα). Με μαύρα βέλη απεικονίζονται οι υπολογιζόμενοι συντελεστές διαπερατότητας P_a και P_b , ενώ με κόκκινα βέλη η προσρόφηση και η απομάκρυνση από τα τοιχώματα (χαρακτηρίζονται από τις σταθερές k_{on} και k_{off} , αντίστοιχα). Με m1 συμβολίζεται η πλευρά της πάνω μεμβράνης προς το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου, m2 είναι η πλευρά της πάνω μεμβράνης προς το κύτταρο, m3 η πλευρά της κάτω μεμβράνης προς το κύτταρο και m4 η πλευρά της κάτω μεμβράνης προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

Έστω ότι μια ουσία μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής μονοστιβάδας κατά την κατεύθυνση από το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου στο κάτω.

Αρχικά, προέκυψε η διαφορική εξίσωση που περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Αναλυτικά, περιγράφεται στη συνέχεια.

Με βάση το νόμο του Fick, η ροή της ουσίας από το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου στο κύτταρο μέσω της πάνω μεμβράνης, περιγράφεται από την εξίσωση Π4.1:

$$J = -D \times \frac{dC_a}{dx} = -\frac{D_a}{h_a} (C_{m2} - C_{m1}) = \frac{D_a}{h_a} (C_{m1} - C_{m2}) \quad \text{Εξίσωση Π4.1}$$

Ο συντελεστής μερισμού μεταξύ της πάνω μεμβράνης και του πάνω διαμερίσματος του φρεατίου, $K_{m/a}$, ορίζεται ως:

$$K_{m/a} = \frac{C_{m1}}{C_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.2}$$

Ο συντελεστής μερισμού μεταξύ της πάνω μεμβράνης και του κυττάρου, $K_{m/c}$, ορίζεται ως:

$$K_{m/c} = \frac{C_{m2}}{C_c} \quad \text{Εξίσωση Π4.3}$$

Με βάση τις εξισώσεις Π4.2 και Π4.3, η εξίσωση Π4.1 γράφεται ως εξής:

$$J = \frac{D_a}{h_a} (K_{m/a} C_a - K_{m/c} C_c) = \frac{D_a K_{m/a}}{h_a} (C_a - \frac{K_{m/c}}{K_{m/a}} C_c) \quad \text{Εξίσωση Π4.4}$$

Ορίζεται ως P_a ο συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με διάχυση μέσω της πάνω κυτταρικής μεμβράνης. Ο P_a ισούται με:

$$P_a = \frac{D_a K_{m/a}}{h_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.5}$$

Επειδή το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου και το κύτταρο έχουν διαφορετική σύσταση, οι συντελεστές μερισμού $K_{m/c}$ και $K_{m/a}$ είναι διαφορετικοί μεταξύ τους. Η πάνω μεμβράνη είναι κοινή για τους δύο συντελεστές, οπότε προκύπτει από αυτούς ο συντελεστής μερισμού μεταξύ πάνω διαμερίσματος φρεατίου και κυττάρων, $K_{a/c}$, ως εξής:

$$K_{a/c} = \frac{K_{m/c}}{K_{m/a}} \quad \text{Εξίσωση Π4.6}$$

Τότε η εξίσωση Π4.4 γίνεται με τη βοήθεια των Π4.5 και Π4.6:

$$J = P_a(C_a - K_{a/c}C_c) \quad \text{Εξίσωση Π4.7}$$

Η ροή της ουσίας, J , από το πάνω διαμέρισμα του φρεατίου στα κύτταρα μέσω της πάνω μεμβράνης με έκταση A δίνεται από την εξίσωση Π4.7:

$$J = -\frac{dM_a}{dt} \frac{1}{A} = -\frac{dC_a}{dt} \frac{V_a}{A} \quad \text{Εξίσωση Π4.8}$$

Οι εξισώσεις Π4.7 και Π4.8 δίνουν την παρακάτω διαφορική εξίσωση:

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)S}{V_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.9}$$

Η εξίσωση αυτή δείχνει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου λόγω μεταφοράς της με παθητική διάχυση στα κύτταρα.

Στην περίπτωση που υπάρχει φορέας στην πάνω μεμβράνη (πρόσληψης ή εκροής), στη διαφορική εξίσωση θα εισαχθεί και όρος που θα αντικατοπτρίζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας λόγω δράσης του φορέα. Έτσι, χρησιμοποιείται η κινητική παράμετρος v_k και η εξίσωση Π4.9 γράφεται ως εξής:

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.10}$$

Το πρόσημο πριν την παράμετρο v_k είναι συν (+) στην περίπτωση εκροής και πλην (-) στην περίπτωση πρόσληψης.

Η προσροφημένη στα τοιχώματα ποσότητα ουσίας συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση στο διάλυμα με τη βοήθεια των σταθερών σύνδεσης k_{on} και k_{off} και η εξίσωση Π4.10 γράφεται:

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} - \frac{k_{on}C_a(W_{tot} - W_a)}{V_a} + \frac{k_{off}W_a}{V_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.11}$$

Αυτή είναι η γενική μορφή της διαφορικής εξίσωσης που περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στη συνέχεια, προέκυψε με αντίστοιχο σκεπτικό η διαφορική εξίσωση που περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

Από το νόμο του Fick ισχύει ότι η ροή της ουσίας από τα κύτταρα μέσω της κάτω μεμβράνης προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου περιγράφεται από την εξίσωση Π4.12:

$$J = -D \times \frac{dC_b}{dx} = -\frac{D_b}{h_b}(C_{m4} - C_{m3}) = \frac{D_b}{h_b}(C_{m3} - C_{m4}) \quad \text{Εξίσωση Π4.12}$$

Ο συντελεστής μερισμού μεταξύ της κάτω μεμβράνης και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου, $K_{m/b}$, ορίζεται ως:

$$K_{m/b} = \frac{C_{m4}}{C_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.13}$$

Ο συντελεστής μερισμού μεταξύ των κυττάρων και της κάτω μεμβράνης, $K_{m/c}$, ορίζεται ως:

$$K_{m/c} = \frac{C_{m3}}{C_c} \quad \text{Εξίσωση Π4.14}$$

Με βάση τις εξισώσεις Π4.13 και Π4.14, η εξίσωση Π4.12 γράφεται ως εξής:

$$J = \frac{D_b}{h_b} (K_{m/c} C_c - K_{m/b} C_b) = \frac{D_b K_{m/b}}{h_b} \left(\frac{K_{m/c}}{K_{m/b}} C_c - C_b \right) \quad \text{Εξίσωση Π4.15}$$

Ορίζεται ως P_b ο συντελεστής διαπερατότητας για μεταφορά με διάχυση μέσω της κάτω κυτταρικής μεμβράνης. Ο P_b ισούται με:

$$P_b = \frac{D_b K_{m/b}}{h_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.16}$$

Επειδή το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου και τα κύτταρα έχουν διαφορετική σύσταση, οι συντελεστές μερισμού $K_{m/c}$ και $K_{m/b}$ είναι διαφορετικοί μεταξύ τους. Η κάτω μεμβράνη είναι κοινή για τους δύο συντελεστές, οπότε προκύπτει από αυτούς ο συντελεστής μερισμού μεταξύ πάνω διαμερίσματος φρεατίου και κυττάρων, $K_{b/c}$, ως εξής:

$$K_{b/c} = \frac{K_{m/c}}{K_{m/b}} \quad \text{Εξίσωση Π4.17}$$

Τότε η εξίσωση Π4.15 γράφεται με τη βοήθεια των Π4.16 και Π4.17:

$$J = P_b (K_{b/c} C_c - C_b) \quad \text{Εξίσωση Π4.18}$$

Η ροή της ουσίας, J , από τα κύτταρα προς το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου μέσω της κάτω μεμβράνης με έκταση επιφάνειας A δίνεται από την εξίσωση Π4.21:

$$J = \frac{dM_b}{dt} \frac{1}{A} = - \frac{dC_b}{dt} \frac{V_b}{A} \quad \text{Εξίσωση Π4.19}$$

Επίσης, καθώς το διάλυμα στο πάνω και το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου είναι το ίδιο (MM), οι συντελεστές $K_{a/c}$ και $K_{b/c}$ είναι ίδιοι. Γι' αυτό, θα ισχύει:

$$K_{a/c} = K_{b/c} \quad \text{Εξίσωση Π4.20}$$

Οι εξισώσεις Π4.18, Π4.19 και Π4.20 δίνουν τη διαφορική εξίσωση Π4.21:

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b(K_{a/c}C_c - C_b)A}{V_b}$$

Εξίσωση Π4.21

Η εξίσωση αυτή δείχνει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ουσίας στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου λόγω μεταφοράς της με παθητική διάχυση από τα κύτταρα.

Η προσροφημένη στα τοιχώματα ποσότητα ουσίας συσχετίστηκε με τη συγκέντρωση στο διάλυμα με τη βοήθεια των σταθερών σύνδεσης k_{on} και k_{off} . Τότε, η εξίσωση Π4.21 παίρνει την εξής μορφή:

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b(K_{a/c}C_c - C_b)A}{V_b} - \frac{k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off}W_b}{V_b}$$

Εξίσωση Π4.22

Δεν υπάρχουν για τις υπό μελέτη ουσίες φορείς στην κάτω μεμβράνη, γι' αυτό δεν εισήχθη όρος για την ενεργή μεταφορά στη διαφορική εξίσωση.

Έπειτα, γράφτηκαν οι διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν τη μεταβολή της ποσότητας της ουσίας στα τοιχώματα του πάνω και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου, τα οποία θεωρήθηκαν ως δύο επιπλέον διαμερίσματα. Αυτές ήταν:

$$\frac{dW_a}{dt} = k_{on}C_a(W_{tot} - W_a) - k_{off}W_a$$

Εξίσωση Π4.23

$$\frac{dW_b}{dt} = k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b) - k_{off}W_b$$

Εξίσωση Π4.24

Η διαφορική εξίσωση για το πέμπτο και τελευταίο διαμέρισμα, τα κύτταρα, προέκυψε από τις Π4.13, Π4.24, Π4.25 και Π4.26, θεωρώντας ότι η συνολική ποσότητα της ουσίας στη διάρκεια του πειράματος παραμένει σταθερή. Έτσι, αυτή ήταν:

$$\frac{dC_c}{dt} = \frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} - \frac{P_b(K_{a/c}C_c - C_b)A}{V_c}$$

Εξίσωση Π4.25

Συγκεντρωμένες οι Π4.11, Π4.22, Π4.23, Π4.24 και Π4.25 δίνουν την ομάδα εξισώσεων A, η οποία προσαρμόστηκε ταυτόχρονα στα δεδομένα από πειράματα με MM κατά την κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

Ομάδα εξισώσεων Α – Πειράματα με MM – Κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα φρεατίου

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} - \frac{k_{on}C_a(W_{tot} - W_a)}{V_a} + \frac{k_{off}W_a}{V_a} \quad (\text{Εξίσωση Π4.11})$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b(K_{a/c}C_c - C_b)A}{V_b} - \frac{k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off}W_b}{V_b} \quad (\text{Εξίσωση Π4.22})$$

$$\frac{dC_c}{dt} = \frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} - \frac{P_b(K_{a/c}C_c - C_b)A}{V_c} \quad (\text{Εξίσωση Π4.25})$$

$$\frac{dW_a}{dt} = k_{on}C_a(W_{tot} - W_a) - k_{off}W_a \quad (\text{Εξίσωση Π4.23})$$

$$\frac{dW_b}{dt} = k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b) - k_{off}W_b \quad (\text{Εξίσωση Π4.24})$$

Ομάδα εξισώσεων Β – Πειράματα με MM – Κατεύθυνση κάτω προς πάνω διαμέρισμα φρεατίου

Προέκυψαν όπως περιγράφηκε για την ομάδα εξισώσεων Α και ήταν οι παρακάτω:

$$\frac{dC_a}{dt} = \frac{P_a(K_{a/c}C_c - C_a)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} - \frac{k_{on}C_a(W_{tot} - W_a)}{V_a} + \frac{k_{off}W_a}{V_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.26}$$

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{P_b(C_b - K_{a/c}C_c)A}{V_b} - \frac{k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off}W_b}{V_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.27}$$

$$\frac{dC_c}{dt} = -\frac{P_a(K_{a/c}C_c - C_a)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} + \frac{P_b(C_b - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \quad \text{Εξίσωση Π4.28}$$

$$\frac{dW_a}{dt} = k_{on}C_a(W_{tot} - W_a) - k_{off}W_a \quad (\text{Εξίσωση Π4.23})$$

$$\frac{dW_b}{dt} = k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b) - k_{off}W_b \quad (\text{Εξίσωση Π4.24})$$

Β. Πειράματα με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα

Τα πειράματα με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα έγιναν μόνο κατά την κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

Στην περίπτωση των πειραμάτων με MM, όπου και στο πάνω και στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου υπάρχει MM, οι συντελεστές $K_{a/c}$ και $K_{b/c}$ είναι ίδιοι, όπως και οι συντελεστές $K_{m/a}$ και $K_{m/b}$. Στην περίπτωση όμως των πειραμάτων με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα τα διαλύματα στα δύο διαμερίσματα είναι διαφορετικά, άρα δεν θα ισχύει η εξίσωση Π4.20. Τότε για το πάνω διαμέρισμα θα ισχύουν η Π4.9 και η Π4.11, ενώ για το κάτω η εξής, εφόσον δεν ισχύει η Π4.20:

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b(K_{b/c}C_c - C_b)A}{V_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.29}$$

Ορίζεται ότι:

$$u = \frac{K_{a/c}}{K_{b/c}} = \frac{K_{m/b}}{K_{m/a}} = K_{a/b} \quad \text{Εξίσωση Π4.30}$$

Τότε, η εξίσωση Π4.29 γράφεται με τη βοήθεια της Π4.30 ως εξής:

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b \left(\frac{K_{a/c}}{K_{a/b}} C_c - C_b \right) A}{V_b} = \frac{P_b (K_{a/c} C_c - K_{a/b} C_b) A}{V_b} = \frac{P_b (K_{a/c} C_c - u C_b) A}{V_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.31}$$

Η τελική μορφή της διαφορικής εξίσωσης για το κάτω διαμέρισμα προκύπτει με την ενσωμάτωση των όρων για την προσρόφηση στα τοιχώματα:

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b (K_{a/c} C_c - u C_b) A}{V_b} - \frac{k_{on} C_b (5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off} W_b}{V_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.32}$$

Οι εξισώσεις για τα τοιχώματα του πάνω και του κάτω διαμερίσματος του φρεατίου ήταν οι ίδιες όπως και στην περίπτωση των πειραμάτων με MM, δηλ. οι διαφορικές εξισώσεις Π4.23 και Π4.24.

Για το κυτταρικό διαμέρισμα η διαφορική εξίσωση προέκυψε από τις Π4.11, Π4.32, Π.4.23 και Π.4.24, θεωρώντας ότι η συνολική ποσότητα της ουσίας παραμένει σταθερή στη διάρκεια του πειράματος.

$$\frac{dC_c}{dt} = \frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} - \frac{P_b(K_{a/c}C_c - uC_b)A}{V_c}$$

Εξίσωση Π4.33

Ομάδα εξισώσεων Γ – Πειράματα με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα - Κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου (Γενική περίπτωση)

Συγκεντρωμένες οι Π4.11, Π4.23, Π4.24, Π4.32 και Π4.33 δίνουν την ομάδα εξισώσεων Γ, η οποία προσαρμόστηκε ταυτόχρονα στα δεδομένα από πειράματα με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα κατά την κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} - \frac{k_{on}C_a(W_{tot} - W_a)}{V_a} + \frac{k_{off}W_a}{V_a} \quad (\text{Εξίσωση Π4.11})$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_b(K_{a/c}C_c - uC_b)A}{V_b} - \frac{k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off}W_b}{V_b} \quad (\text{Εξίσωση Π4.32})$$

$$\frac{dC_c}{dt} = \frac{P_a(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} - \frac{P_b(K_{a/c}C_c - uC_b)A}{V_c} \quad (\text{Εξίσωση Π4.33})$$

$$\frac{dW_a}{dt} = k_{on}C_a(W_{tot} - W_a) - k_{off}W_a \quad (\text{Εξίσωση Π4.23})$$

$$\frac{dW_b}{dt} = k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b) - k_{off}W_b \quad (\text{Εξίσωση Π4.24})$$

Επειδή υπάρχουν τέσσερις συντελεστές (P_a , P_b , $K_{a/c}$ και u) που υπολογίζονται, ορισμένες φορές εμφανίζεται υψηλή συσχέτιση των εκτιμώμενων τιμών κατά την προσαρμογή του μοντέλου. Για το λόγο αυτό εισάγεται ο P_{hm} , ο οποίος είναι ο αρμονικός μέσος των P_a , P_b και θεωρητικά αντανακλά το συντελεστή διαπερατότητας μέσω των δύο μεμβρανών, ώστε να υπάρξει το ίδιο συνολικό αποτέλεσμα για τη μεταφορά από το διαμέρισμα-δότης στο διαμέρισμα-δέκτης. Θεωρούμε ότι $P_{hm} = P_a = P_b$ και

$$P_{hm} = \frac{2}{\frac{1}{P_a} + \frac{1}{P_b}}$$

Εξίσωση Π4.34

Έτσι, προκύπτουν οι παρακάτω εξισώσεις:

Ομάδα εξισώσεων Δ – Πειράματα με εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα – Κατεύθυνση πάνω προς κάτω διαμέρισμα φρεατίου (Ειδική περίπτωση)²

$$\frac{dC_a}{dt} = -\frac{P_{hm}(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_a} \pm \frac{v_k M_c A}{V_a} - \frac{k_{on}C_a(W_{tot} - W_a)}{V_a} + \frac{k_{off}W_a}{V_a} \quad \text{Εξίσωση Π4.35}$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{P_{hm}(K_{a/c}C_c - uC_b)A}{V_b} - \frac{k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b)}{V_b} + \frac{k_{off}W_b}{V_b} \quad \text{Εξίσωση Π4.36}$$

$$\frac{dC_c}{dt} = \frac{P_{hm}(C_a - K_{a/c}C_c)A}{V_c} \pm \frac{v_k M_c A}{V_c} - \frac{P_{hm}(K_{a/c}C_c - uC_b)A}{V_c} \quad \text{Εξίσωση Π4.37}$$

$$\frac{dW_a}{dt} = k_{on}C_a(W_{tot} - W_a) - k_{off}W_a \quad \text{(Εξίσωση Π4.23)}$$

$$\frac{dW_b}{dt} = k_{on}C_b(5W_{tot} - W_b) - k_{off}W_b \quad \text{(Εξίσωση Π4.24)}$$

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω εξισώσεις, αντί για τέσσερις συντελεστές εκτιμώνται μόνο τρεις (P_a , $K_{a/c}$ και u) και για το λόγο μειώνεται σημαντικά η συσχέτιση μεταξύ των εκτιμώμενων παραμέτρων.

Π4.3 Οι διαφορικές εξισώσεις για κάθε υπό μελέτη ουσία

Οι γενικές μορφές εξισώσεων που παρουσιάστηκαν στο Κεφ. Π4.2 ανάλογα με το μόριο διαμορφώθηκαν με βάση το αν υπολογίζεται P_a και P_b ή μόνο P_{hm} , αν υπάρχει πρόσληψη με μεσολάβηση φορέα ή αν υπάρχει εκροή και αν η διαλυτότητα του μορίου στα διαλύματα στο πάνω και το κάτω διαμέρισμα του φρεατίου είναι παρόμοια.

Π4.3.1 Δαναζόλη σε MM

Για τα πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης χρησιμοποιώντας MM θεωρήθηκε ότι πιθανόν να συμβαίνει και ενεργή μεταφορά, γι' αυτό και θεωρήθηκε $v_k \neq 0$. Η υπόθεση θα ίσχυε αν μετά την προσαρμογή προέκυπτε αποτέλεσμα για την v_k . Αν αυτή ήταν 0, θα σήμαινε ότι δεν συμβαίνει ενεργή μεταφορά κατά τη μεταφορά δαναζόλης, οπότε δεν υπήρχε η ανάγκη για ενσωμάτωση του v_k στις εξισώσεις για τα υπόλοιπα

² Όπως αναφέρεται και στο Κεφ. Π4.3, οι εξισώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν και σε πειράματα με μικρομόριο B και λεβοβιρίνη σε MM, λόγω υψηλής συσχέτισης των εκτιμώμενων τιμών που προκαλούσε η χρήση P_a και P_b .

πειράματα διαπερατότητας δαναζόλης (χρησιμοποιώντας ΕΠ, ΜΦ, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}). Χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες εξισώσεων Α και Β, υπολογίζοντας P_a , P_b και v_k .

Π4.3.2 Δαναζόλη σε ΕΠ, ΜΦ, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}

Από το πείραμα διαπερατότητας με δαναζόλη σε MM, προέκυψε $v_k=0$, οπότε ο μηχανισμός μεταφοράς θεωρήθηκε ότι είναι μόνο παθητική διάχυση. Έτσι, στα πειράματα με ΕΠ, ΜΦ, FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco} χρησιμοποιήθηκε η ομάδα εξισώσεων Δ, θέτοντας $v_k=0$.

Π4.3.3 Μικρομόριο Α σε MM

Για τη μεταφορά της ουσίας θεωρήθηκε ότι συνδυάζεται παθητική διάχυση με P-gr εκροή (δεδομένα από τη Roche). Επομένως, για την προσαρμογή χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες εξισώσεων Α και Β, θέτοντας θετικό πρόσημο στο v_k .

Π4.3.4 Μικρομόριο Α σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}

Με βάση τα στοιχεία από τη Roche και το πείραμα σε MM, ο μηχανισμός μεταφοράς θεωρήθηκε ότι είναι συνδυασμός παθητικής διάχυσης και P-gr εκροής. Επομένως, αν και υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα χολικά άλατα απενεργοποιούν την P-gr (Ingels et al., 2002), για την προσαρμογή χρησιμοποιήθηκε η ομάδα εξισώσεων Γ, θέτοντας θετικό πρόσημο στο v_k .

Π4.3.5 Μικρομόριο Β σε MM

Ο μηχανισμός μεταφοράς θεωρήθηκε ότι είναι παθητική διάχυση (δεδομένα από τη Roche), άρα $v_k=0$. Επειδή ο υπολογισμός P_a και P_b οδηγούσε σε υψηλή συσχέτιση των εκτιμώμενων τιμών, χρησιμοποιήθηκαν οι ομάδες εξισώσεων Α και Β με $v_k=0$ και P_{hm} αντί P_a και P_b .

Π4.3.6 Μικρομόριο Β σε FaSSIF_{Caco} και FeSSIF_{Caco}

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις της ομάδας Δ, θέτοντας $v_k=0$.

Π4.3.7 Μικρομόριο Γ σε MM

Δεν έγινε μη γραμμική προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα, καθώς οι συγκεντρώσεις της ουσίας ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Π4.3.8 Μικρομόριο Γ σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$

Ο μηχανισμός μεταφοράς θεωρήθηκε ότι είναι παθητική διάχυση (δεδομένα από τη Roche). Επομένως, χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή οι εξισώσεις της ομάδας Δ, θέτοντας $v_k=0$.

Π4.3.9 Λεβοβιρίνη σε MM

Ο μηχανισμός μεταφοράς θεωρήθηκε ότι είναι παθητική διάχυση (Li et al., 2006), οπότε στις εξισώσεις των ομάδων A και B τέθηκε $v_k=0$. Χρήση των P_a και P_b οδήγησε σε υψηλή συσχέτιση των εκτιμώμενων τιμών, οπότε χρησιμοποιήθηκε ο P_{hm} , όπως στην περίπτωση του μικρομορίου B.

Π4.3.10 Λεβοβιρίνη σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις της ομάδας Δ, θέτοντας $v_k=0$.

Π4.3.11 Ριμπαβιρίνη σε MM

Η πρόσληψη της ριμπαβιρίνης γίνεται με τη μεσολάβηση των φορέων νουκλεοτιδίων CNT2 (ονομάζεται και N1), CNT3, ENT1 και ENT2 (Patil et al., 1998 και Yamamoto et al., 2007). Οι CNT2 και CNT3 εντοπίζονται στην ενδοαυλική μεμβράνη, ενώ οι ENT1 και ENT2 βρίσκονται στην κάτω μεμβράνη. Από τους φορείς αυτούς εκφράζονται στις Caco-2 κυτταρικές σειρές οι CNT1, ENT1 και ENT2 (Takaai et al., 2008), ενώ δεν εκφράζεται ο CNT3 (Hilgendorf et al., 2007). Επειδή το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή δεν μπορεί να προσδιορίσει πάνω από ένα φορέα, επιλέχθηκε ως αντιπροσωπευτικός της ενεργής μεταφοράς ο CNT2 (N1), επειδή με αυτόν εμφανίζει η ριμπαβιρίνη μεγαλύτερη συγγένεια (Yamamoto et al., 2007).

Έτσι, αφού εκτός από παθητική διάχυση γίνεται και πρόσληψη με τη μεσολάβηση φορέα, χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις των ομάδων A και B, θέτοντας $v_k \neq 0$ με πρόσημο αρνητικό.

Π4.3.12 Ριμπαβιρίνη σε $FaSSIF_{Caco}$ και $FeSSIF_{Caco}$

Με βάση και το πείραμα σε MM, εκτός από παθητική διάχυση, θεωρείται ότι γίνεται και πρόσληψη της ουσίας με τη μεσολάβηση του CNT2 (N1) φορέα νουκλεοτιδίων, οπότε χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις της ομάδας Δ, θέτοντας $v_k \neq 0$ με πρόσημο αρνητικό.

Π4.3.13 Αμοξικιλίνη σε MM

Με βάση τους Lennernäs et al. (2002), εκτός από παθητική διάχυση, θεωρείται ότι γίνεται και πρόσληψη της αμοξικιλίνης με τη μεσολάβηση του φορέα PepT1. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις των ομάδων A και B, θέτοντας $v_k \neq 0$ με πρόσημο αρνητικό.

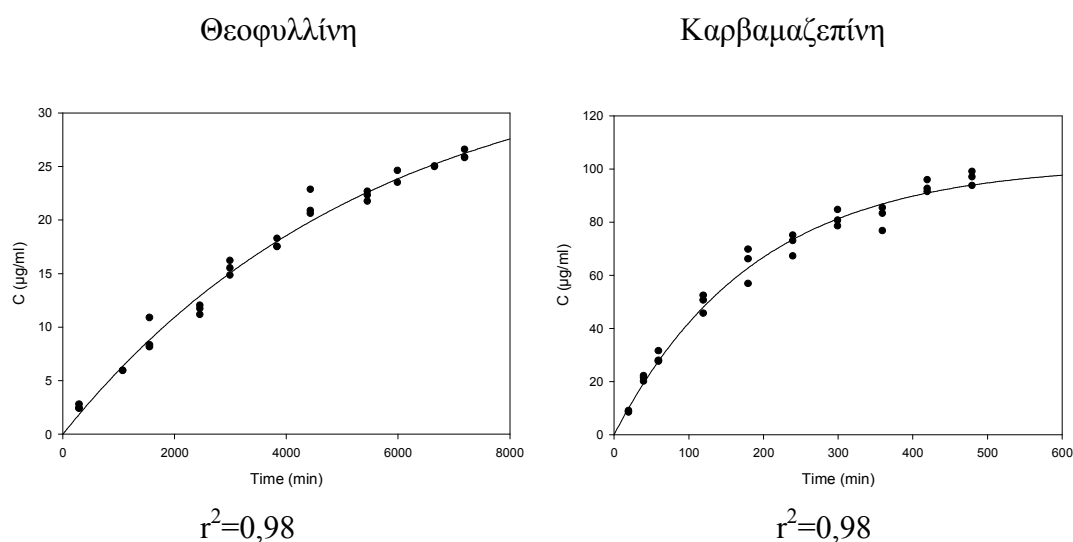
Π4.3.14 Ρανιτιδίνη σε MM

Με βάση τους Bourdet and Thakker (2006), εκτός από παθητική διάχυση, θεωρείται ότι γίνεται πρόσληψη της ρανιτιδίνης με μεσολάβηση φορέα και εκροή με τη μεσολάβηση της P-gr. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις των ομάδων A και B, θέτοντας $v_k \neq 0$ με πρόσημο θετικό. Με v_k περιγράφεται η συνολική ενεργή μεταφορά.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5 – Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων μεταφοράς και των καλύτερα προσαρμοσμένων καμπυλών με την τεχνική PAMPA

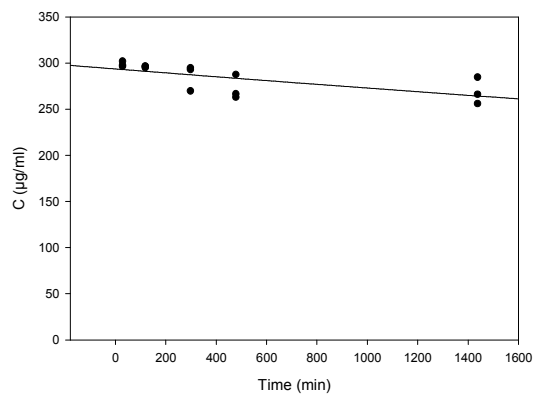
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δέκτης σε συνάρτηση με το χρόνο από την έναρξη του πειράματος, εκτός εάν αναφέρεται διαφορετικά.

Π5.1 Μικρομόρια σε Prisma™ HT (n=3)



Επειδή δεν ήταν δυνατή η μέτρηση στο διαμέρισμα-δέκτης, τα δεδομένα της ρανιτιδίνης παρουσιάζονται ως συγκέντρωση στο διαμέρισμα-δότης σε συνάρτηση με το χρόνο από την έναρξη του πειράματος.

Ρανιτιδίνη



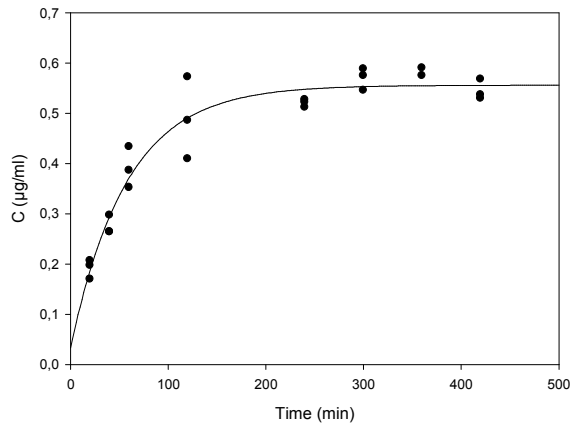
$$r^2=0,4 \ (p=0,006)$$

Πειράματα με αμοξικιλίνη δεν ήταν δυνατά, επειδή δεν παρατηρήθηκε καμιά μεταβολή της συγκέντρωσης ούτε στο διαμέρισμα-δέκτης ούτε στο διαμέρισμα-δότης (Πίνακας Π5.1) ($n=3$, $t \leq 24$ h).

Πίνακας Π5.1: Μέση συγκέντρωση (\pm SD) αμοξικιλίνης στο διαμέρισμα-δότης

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση αμοξικιλίνης ($\mu\text{g/ml}$)
0,5	$99,7 \pm 1,2$
2	$104,3 \pm 1,7$
4	$100,0 \pm 1,3$
6	$100,6 \pm 1,4$
8	$100,4 \pm 1,4$
24	$101,3 \pm 4,9$

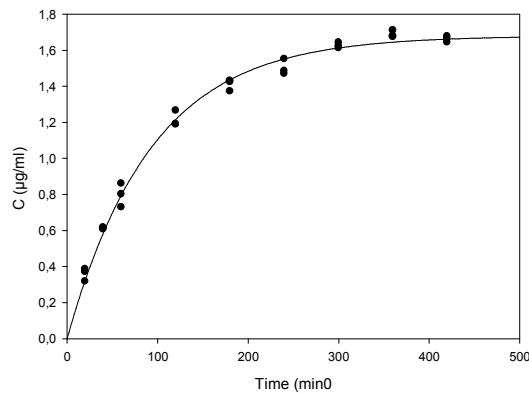
Δαναζόλη



$$r^2=0,94$$

Πειράματα με το μικρομόριο A δεν ήταν εφικτά, καθώς η διαλυτότητά του σε Prisma™ HT είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ανάλυσης.

Μικρομόριο B



$$r^2=0,990$$

Πειράματα με το μικρομόριο Γ δεν ήταν εφικτά, καθώς η διαλυτότητά του σε Prisma™ HT είναι μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ανάλυσης.

Για τη ριμπαβιρίνη, μέτρηση στο διαμέρισμα-δέκτης αλλά και στο διαμέρισμα-δότης (Πίνακας Π5.2) έδειξε μηδενική μεταφορά.

Πίνακας Π5.2: Συγκέντρωση ριμπαβιρίνης (μg/ml) (\pm SD) στο διαμέρισμα-δότης στα πειράματα διαπερατότητας με Prisma™ HT

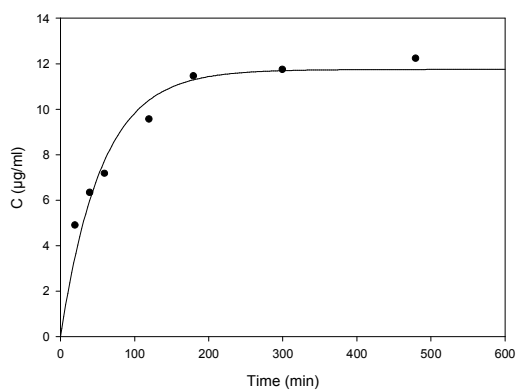
Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ριμπαβιρίνης (μg/ml)
0,33	902,5 \pm 2,6
0,66	904 \pm 13
1	926 \pm 44
2	946 \pm 30
4	914,8 \pm 3,9
6	937 \pm 24
8	894 \pm 32
24	887 \pm 30

Π5.2 Δαναζόλη σε ΕΠ και ΜΦ

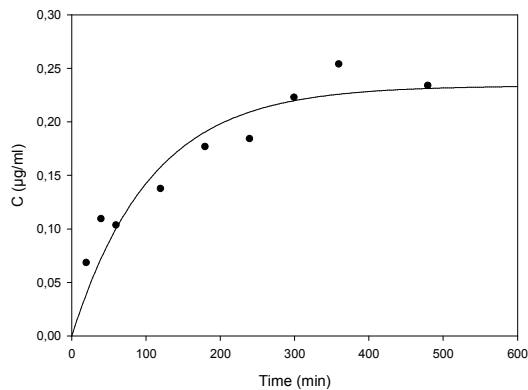
Εθελοντής #1 – 120 min

ΕΠ

ΜΦ



$r^2=0,94$



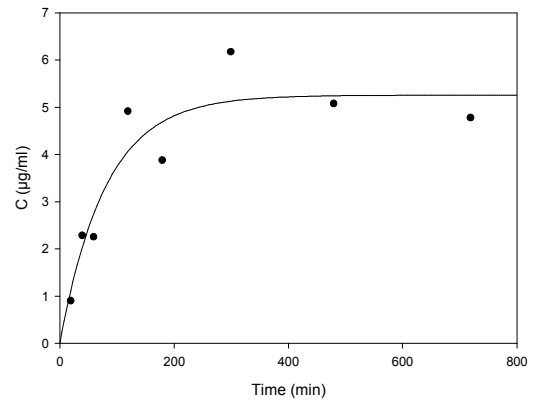
$r^2=0,90$

Εθελοντής #2 – 90 min

ΕΠ

Τα δεδομένα δεν επέτρεψαν
προσαρμογή του μοντέλου λόγω
υψηλής μεταβλητότητας

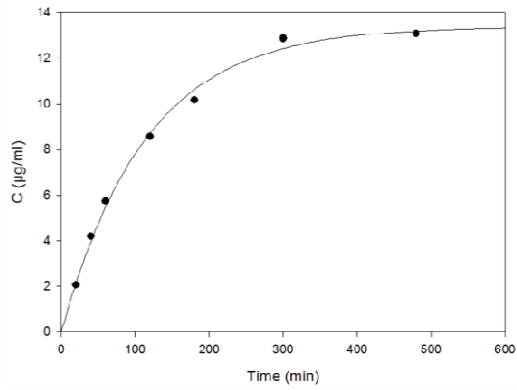
ΜΦ



$$r^2=0,90$$

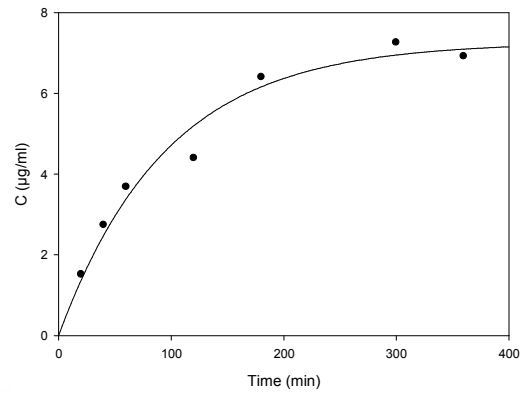
Εθελοντής #2 – 180 min

ΕΠ



$$r^2=0,995$$

ΜΦ

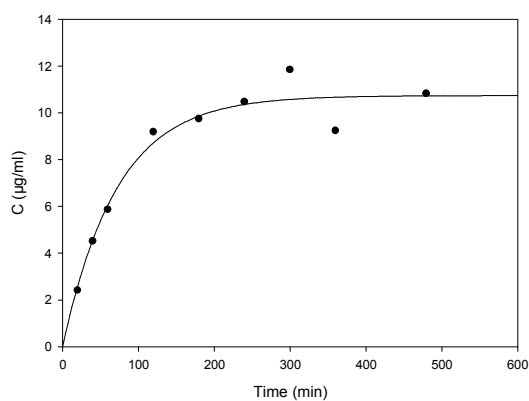
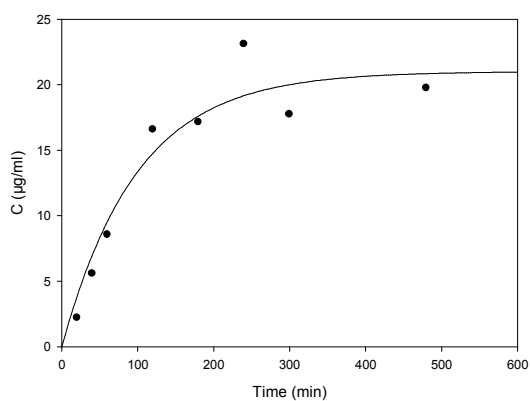


$$r^2=0,97$$

Εθελοντής #2 – 210 min

ΕΠ

ΜΦ



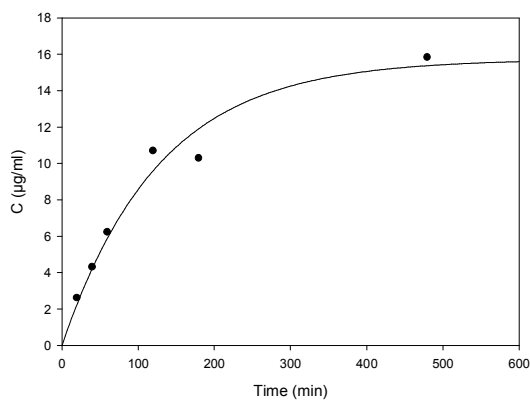
$r^2=0,92$

$r^2=0,95$

Εθελοντής #3 – 150 min

ΕΠ

ΜΦ



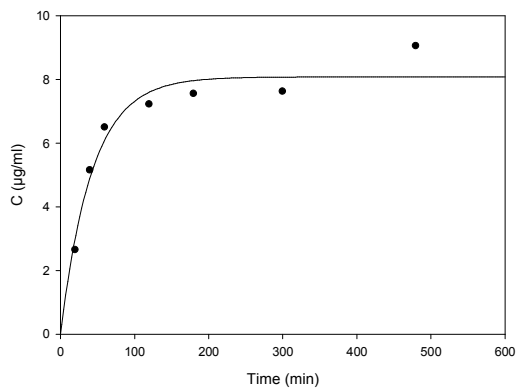
$r^2=0,96$

Τα δεδομένα δεν επέτρεψαν
προσαρμογή του μοντέλου λόγω
υψηλής μεταβλητότητας

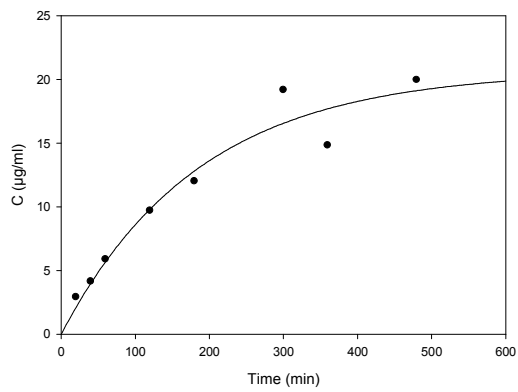
Εθελοντής #4 – 60 min

ΕΠ

ΜΦ



$r^2=0,93$

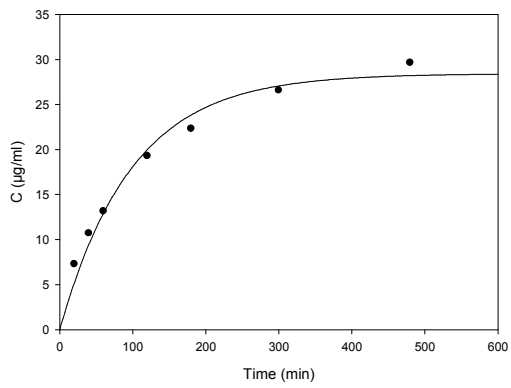


$r^2=0,94$

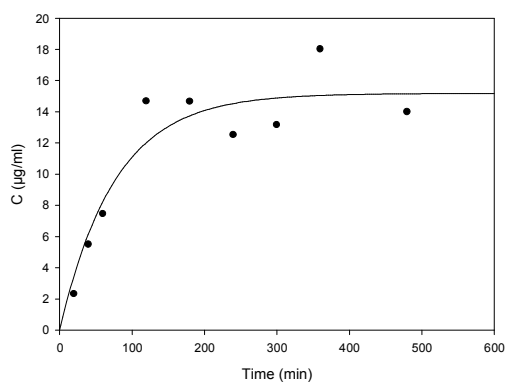
Εθελοντής #4 – 120 min

ΕΠ

ΜΦ



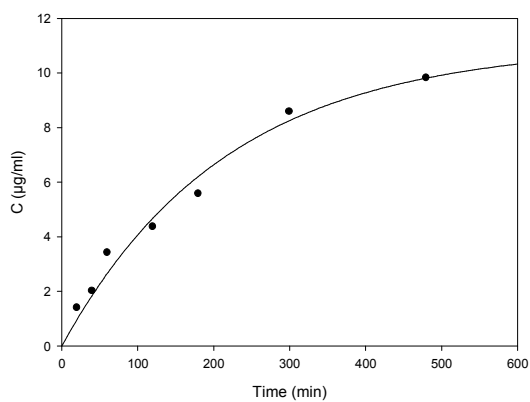
$r^2=0,97$



$r^2=0,90$

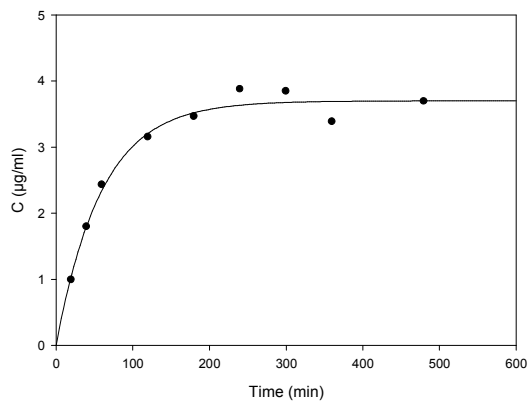
Εθελοντής #4 – 150 min

ΕΠ



$$r^2=0,98$$

ΜΦ



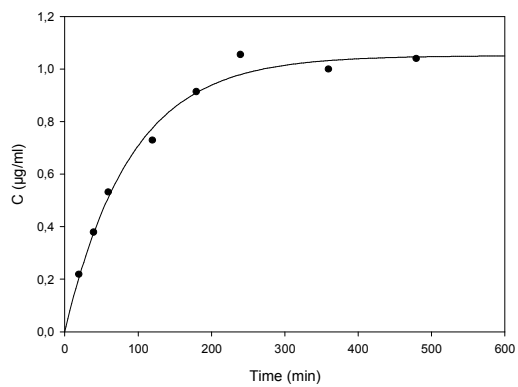
$$r^2=0,98$$

Εθελοντής #5 – 180 min

ΕΠ

Τα δεδομένα δεν επέτρεψαν
προσαρμογή του μοντέλου λόγω
υψηλής μεταβλητότητας

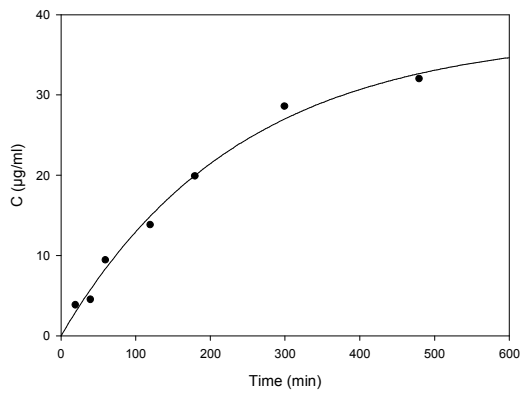
ΜΦ



$$r^2=0,990$$

Εθελοντής #5 – 210 min

ΕΠ



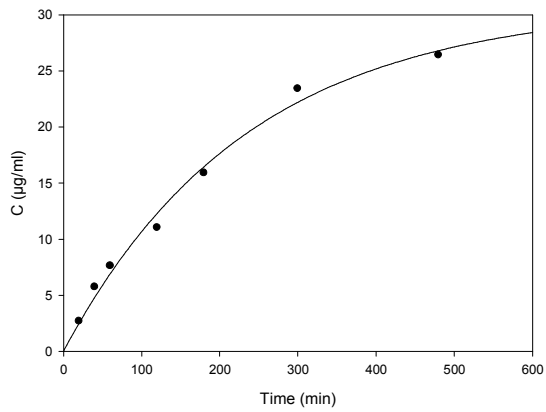
$$r^2=0,990$$

ΜΦ

Τα δεδομένα δεν επέτρεψαν
προσαρμογή του μοντέλου λόγω
υψηλής μεταβλητότητας

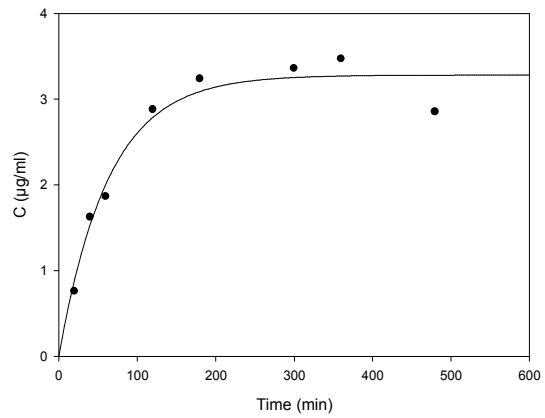
Εθελοντής #5 – 240 min

ΕΠ



$$r^2=0,990$$

ΜΦ

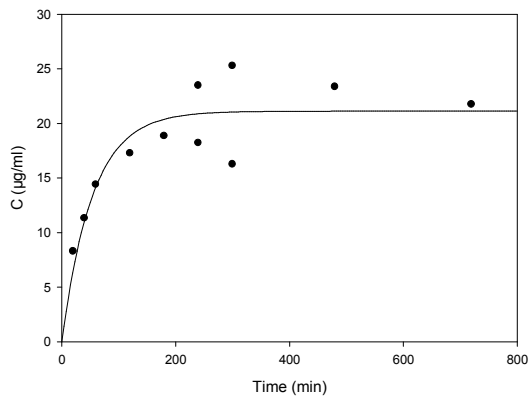


$$r^2=0,95$$

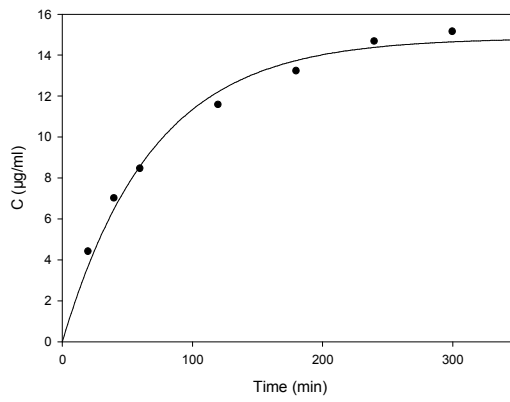
Εθελοντής #6 – 90 min

ΕΠ

ΜΦ



$$r^2=0,76$$

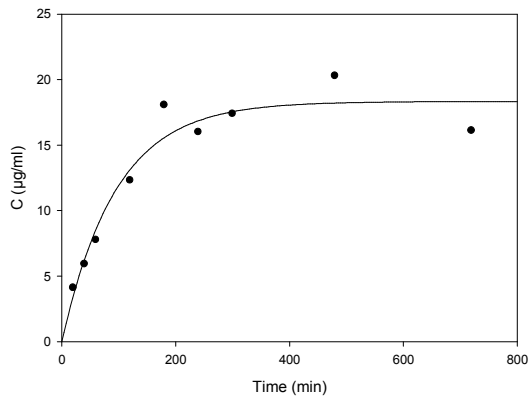


$$r^2=0,98$$

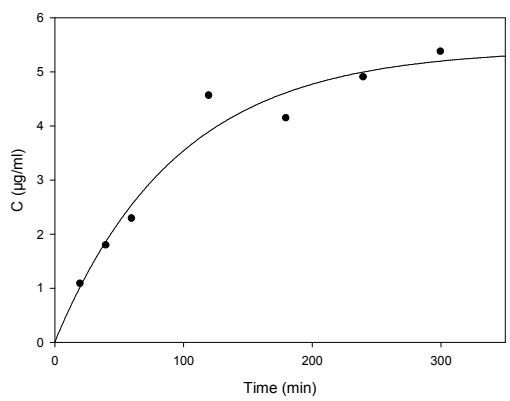
Εθελοντής #6 – 180 min

ΕΠ

ΜΦ



$$r^2=0,93$$

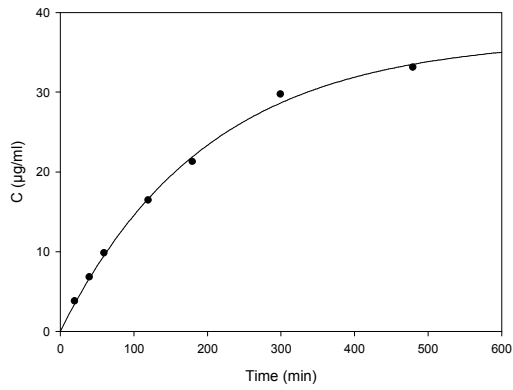


$$r^2=0,95$$

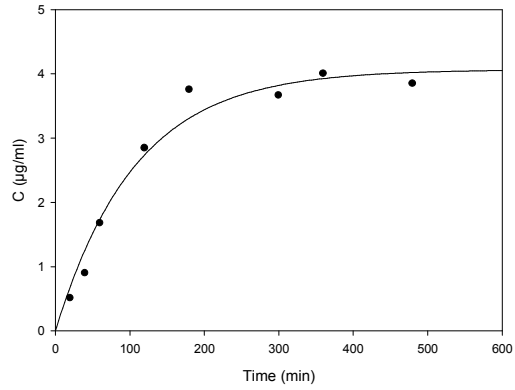
Εθελοντής #7 – 180 min

ΕΠ

ΜΦ



$r^2=0,998$

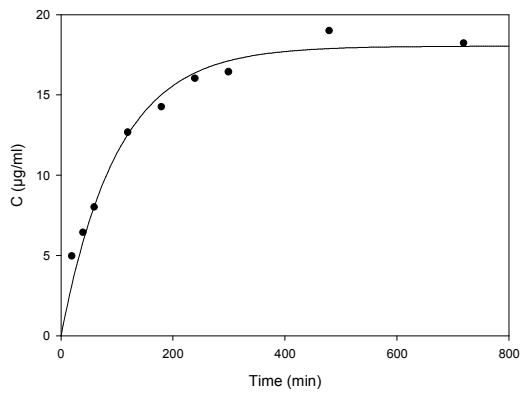


$r^2=0,97$

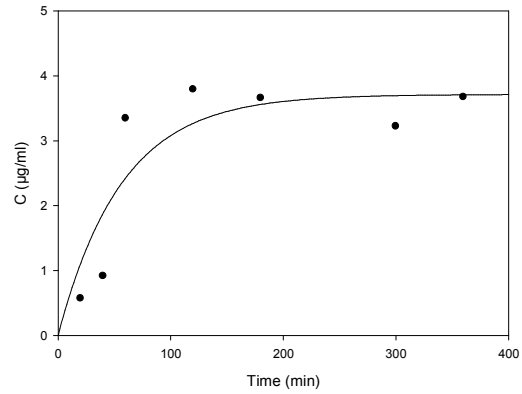
Εθελοντής #7 – 210 min

ΕΠ

ΜΦ



$r^2=0,97$



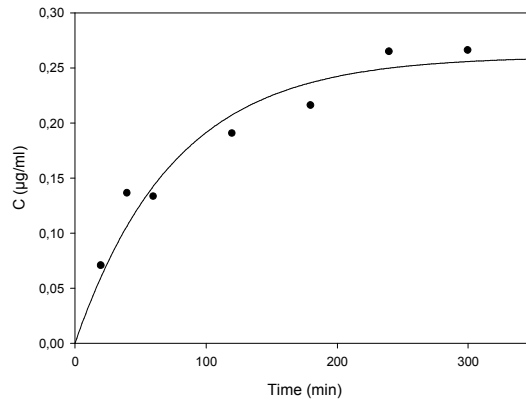
$r^2=0,78$

Εθελοντής #7 – 240 min

ΕΠ

Τα δεδομένα δεν επέτρεψαν
προσαρμογή του μοντέλου λόγω
υψηλής μεταβλητότητας

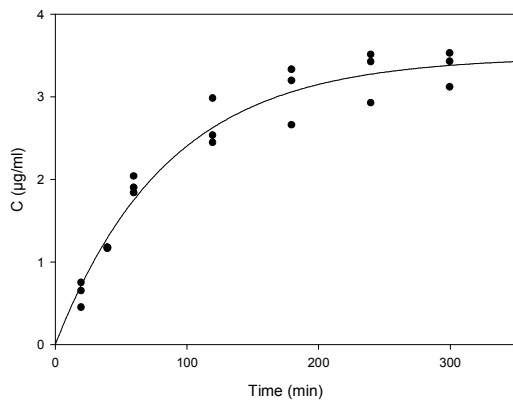
ΜΦ



$r^2=0,94$

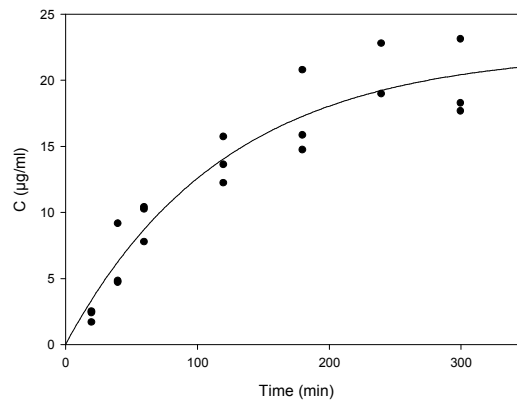
Π5.3 Μικρομόρια σε προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα

Δαναζόλη - FaSSIF-V2



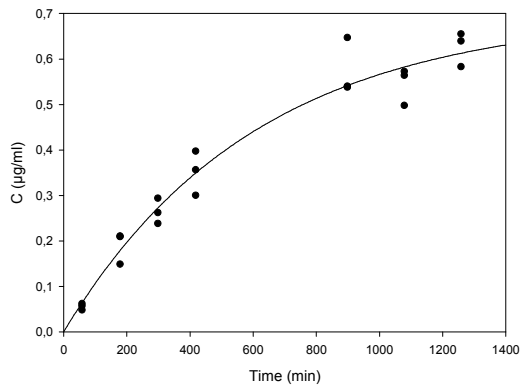
$r^2=0,96$

Δαναζόλη - FeSSIF-V2



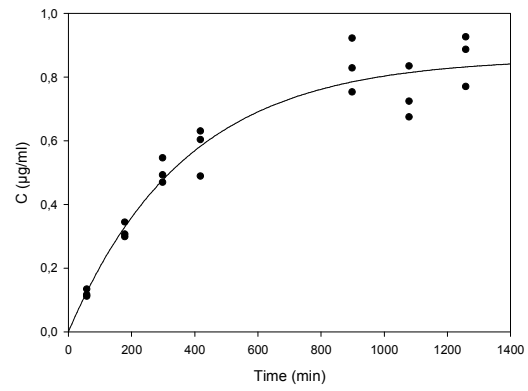
$r^2=0,91$

Μικρομόριο Α - FaSSIF-V2



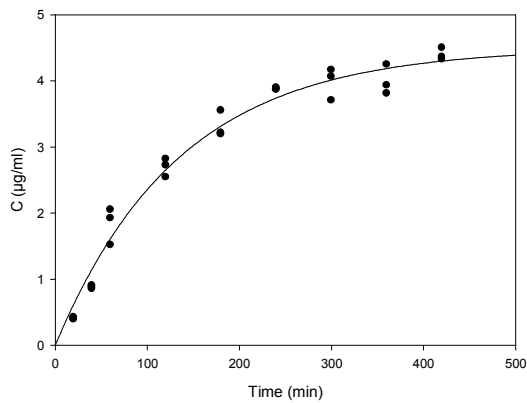
$$r^2=0,96$$

Μικρομόριο Α - FeSSIF-V2



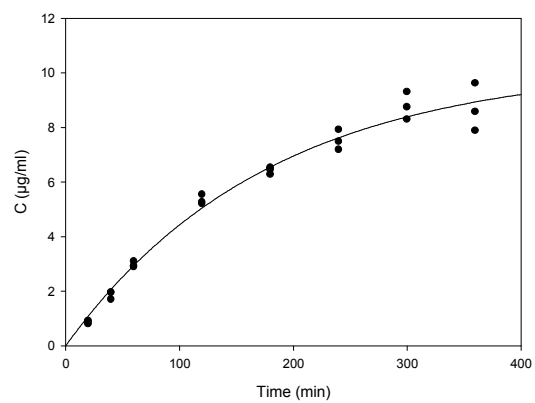
$$r^2=0,94$$

Μικρομόριο Β - FaSSIF-V2



$$r^2=0,98$$

Μικρομόριο Β - FeSSIF-V2



$$r^2=0,98$$

Για το μικρομόριο Γ δεν ήταν εφικτό να προσαρμοστεί το μοντέλο στα δεδομένα συγκέντρωσης, καθώς υπήρχε μεγάλη μεταβλητότητα.

Όπως και στα πειράματα με Prisma™ HT (Πίνακας Π5.2) για τη ριμπαβιρίνη, μέτρηση στο διαμέρισμα-δέκτης αλλά και στο διαμέρισμα-δότης στις 24 h (Πίνακας Π5.3) έδειξε μηδενική μεταφορά.

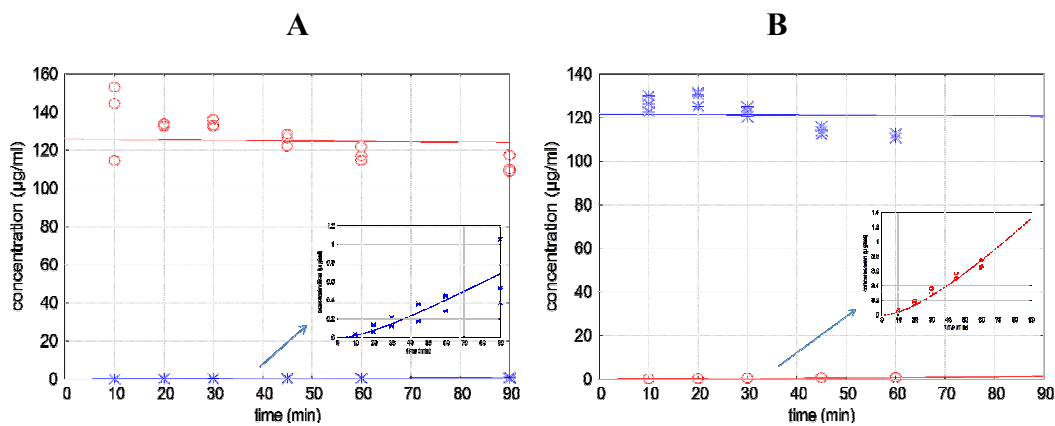
Πίνακας Π5.3: Συγκέντρωση ριμπαβιρίνης (μg/ml) (\pm SD) στο διαμέρισμα-δότης στα πειράματα διαπερατότητας με FaSSIF-V2 και FeSSIF-V2 (n=3)

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση ριμπαβιρίνης (μg/ml)	
	FaSSIF-V2	FeSSIF-V2
0,33	289,0 \pm 7,8	300,3 \pm 7,9
0,66	288,1 \pm 7,5	306,7 \pm 5,6
1	286,0 \pm 2,3	297,3244 \pm 6,6
2	287,1 \pm 9,2	293,0 \pm 4,5
4	289 \pm 12	296 \pm 17
6	291,0 \pm 8,4	292 \pm 14
8	284,2 \pm 2,7	297,7 \pm 6,1
24	266,0 \pm 4,4	280 \pm 16

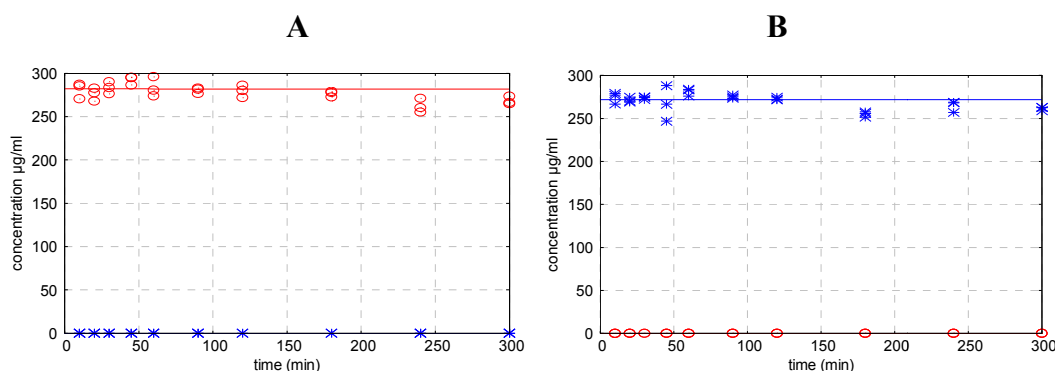
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6 – Αναλυτική παρουσίαση των πρωτογενών δεδομένων μεταφοράς και των καλύτερα προσαρμοσμένων καμπυλών με τη χρήση Caco-2 κυτταρικών μονοστιβάδων

Π6.1 Μικρομόρια σε MM και προσομοιωμένες μικκυλιακές φάσεις

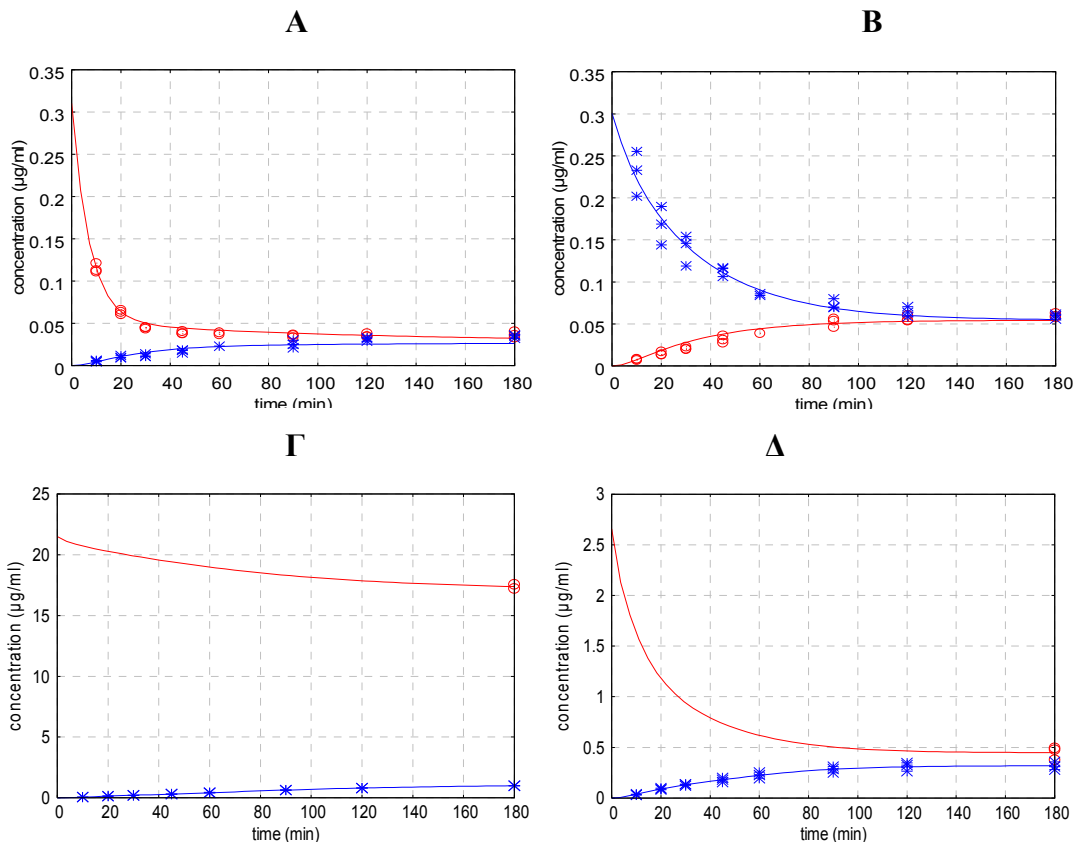
Οι κόκκινοι κύκλοι και η κόκκινη προσαρμοσμένη γραμμή αντιστοιχούν στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου, ενώ οι μπλε αστερίσκοι και η μπλε γραμμή στο κάτω.



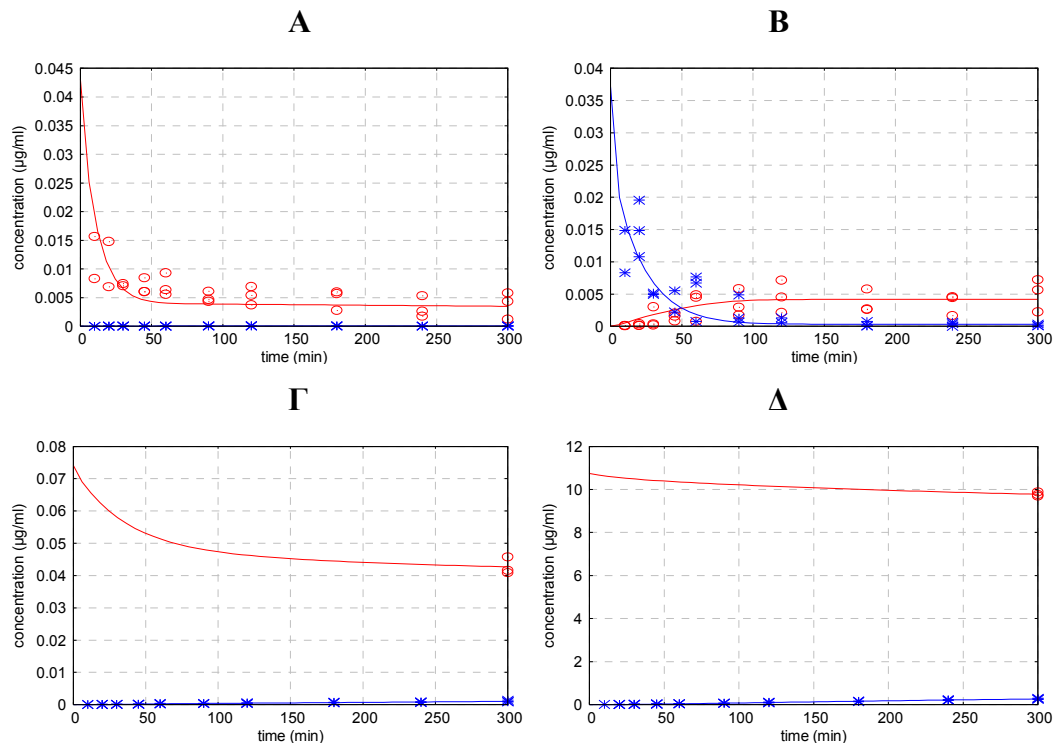
Σχήμα Π6.1: A) Μεταφορά αμοξικιλίνης διαλυμένης σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. B) Μεταφορά αμοξικιλίνης διαλυμένης σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου.



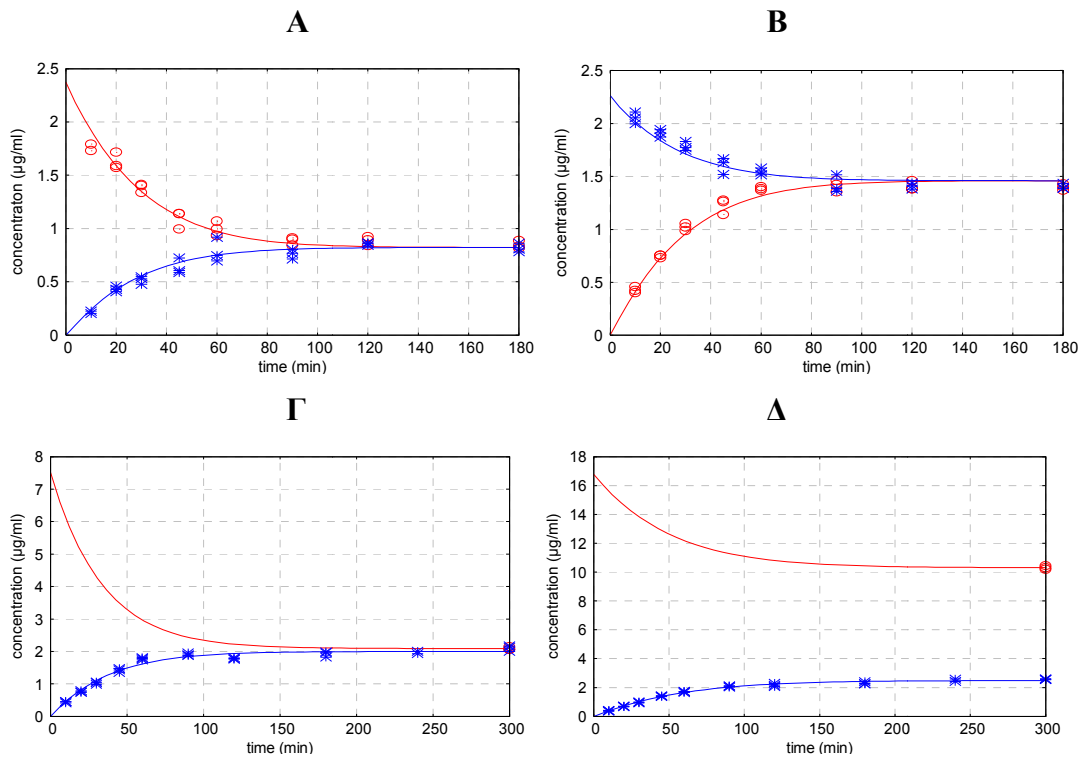
Σχήμα Π6.2: A) Μεταφορά ρανιτιδίνης διαλυμένης σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. B) Μεταφορά ρανιτιδίνης διαλυμένης σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου.



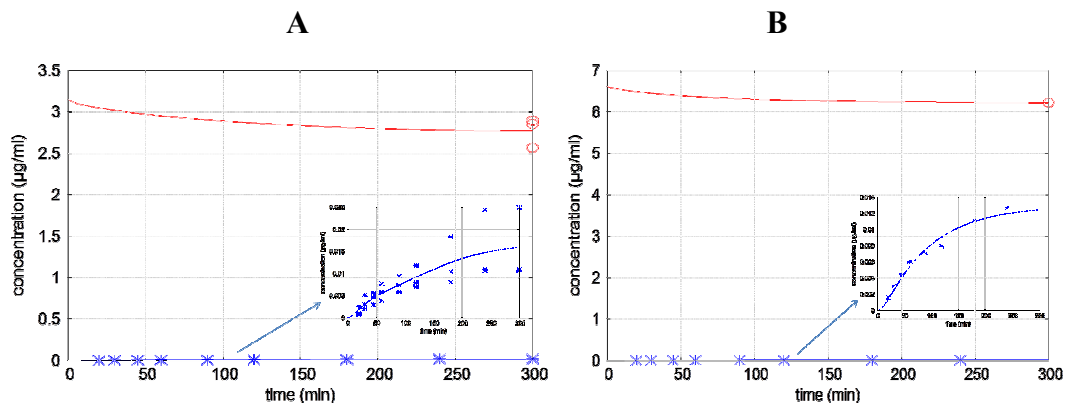
Σχήμα Π6.3: Α) Μεταφορά δαναζόλης διαλυμένης σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Β) Μεταφορά δαναζόλης διαλυμένης σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Κατά την έναρξη κάθε πειράματος στο διαμέρισμα-δότης υπήρχε δαναζόλη διαλυμένη σε MM και στο διαμέρισμα-δέκτης MM. Γ) Μεταφορά δαναζόλης διαλυμένης σε FaSSIF_{Caco}. Δ) Μεταφορά δαναζόλης διαλυμένης σε FeSSIF_{Caco}. Και στις δύο περιπτώσεις (Γ και Δ) η μεταφορά μελετήθηκε από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου.



Σχήμα Π6.4: Α) Μεταφορά μικρομορίου Α σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Β) Μεταφορά μικρομορίου Α σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Γ) Μεταφορά μικρομορίου Α σε FaSSIF_{Caco}. Δ) Μεταφορά μικρομορίου Α σε FeSSIF_{Caco}.

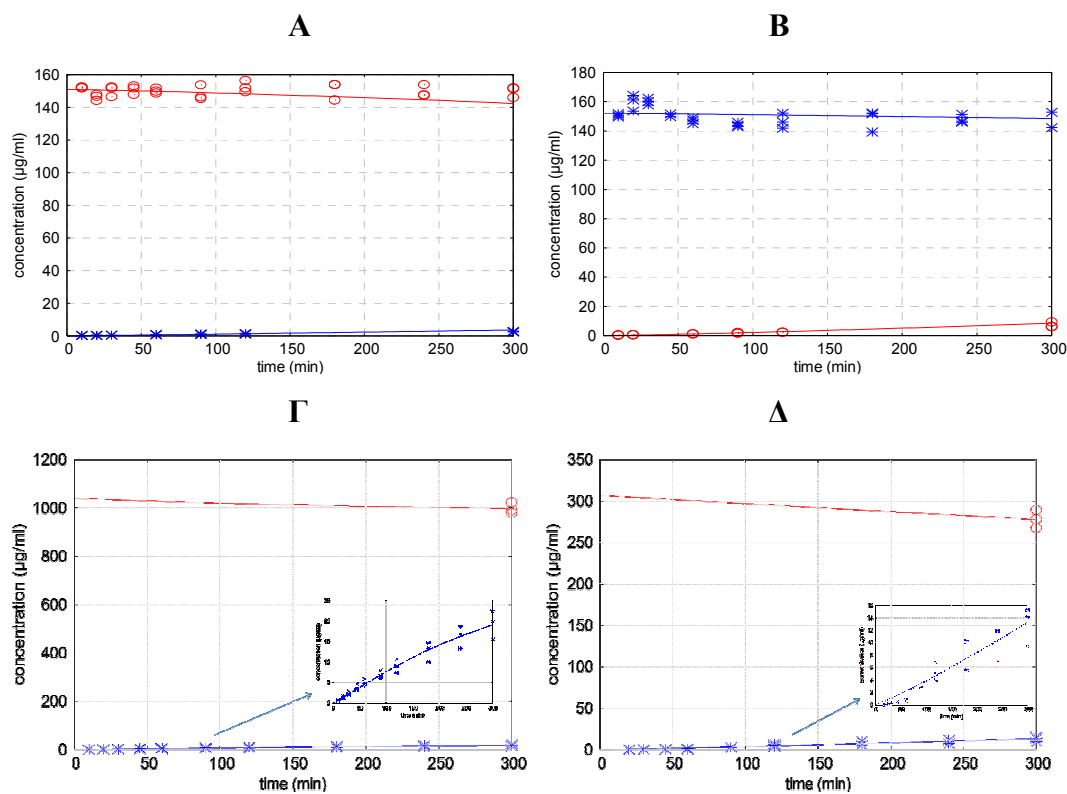


Σχήμα Π6.5: Α) Μεταφορά μικρομορίου Β σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Β) Μεταφορά μικρομορίου Β σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Γ) Μεταφορά μικρομορίου Β σε FaSSIF_{Caco}. Δ) Μεταφορά μικρομορίου Β σε FeSSIF_{Caco}.

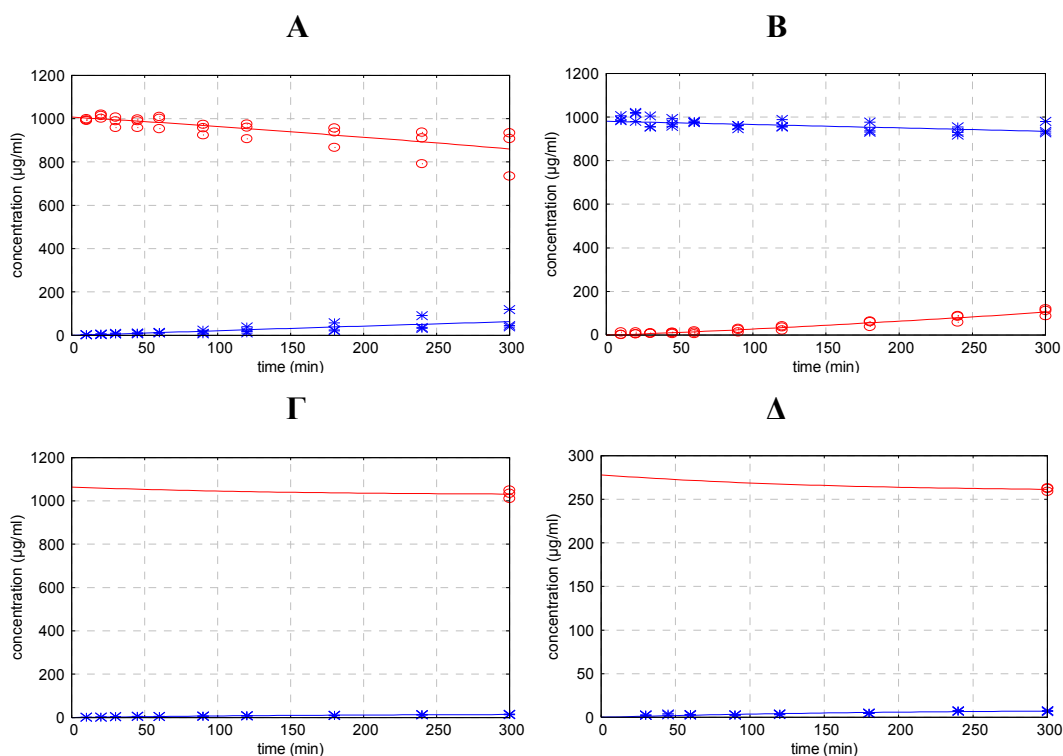


Σχήμα Π6.6: Α) Μεταφορά μικρομορίου Γ σε FaSSIF_{Caco}. Β) Μεταφορά μικρομορίου Γ σε FeSSIF_{Caco}.

Οι συγκεντρώσεις σε πείραμα με μικρομόριο Γ σε MM ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Υψηλή μεταβλητότητα στη μέτρηση του μικρομορίου Γ παρατηρήθηκε και στα πειράματα διαπερατότητας με την τεχνική PAMPA (Π5.3).



Σχήμα Π6.7: Α) Μεταφορά λεβοβιρίνης σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Β) Μεταφορά λεβοβιρίνης σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Γ) Μεταφορά λεβοβιρίνης σε FaSSIF_{Caco}. Δ) Μεταφορά λεβοβιρίνης σε FeSSIF_{Caco}.



Σχήμα Π6.8: Α) Μεταφορά ριμπαβιρίνης σε MM από το πάνω στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου. Β) Μεταφορά ριμπαβιρίνης σε MM από το κάτω στο πάνω διαμέρισμα του φρεατίου. Γ) Μεταφορά ριμπαβιρίνης σε FaSSIF_{Caco}. Δ) Μεταφορά ριμπαβιρίνης σε FeSSIF_{Caco}.

Π6.2 Δαναζόλη σε ΕΠ και ΜΦ

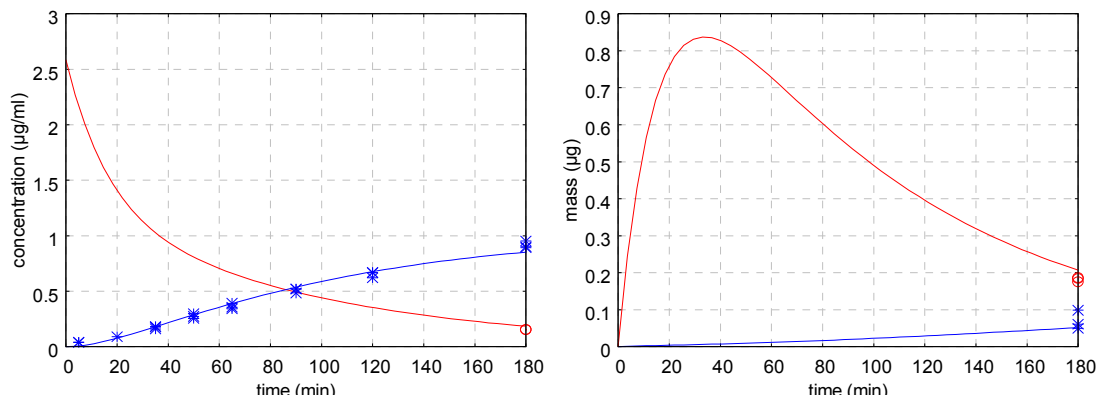
Τα παρακάτω διαγράμματα έχουν προκύψει χρησιμοποιώντας δείγματα ΕΠ και ΜΦ αραιωμένα 1:16 με MM. Για κάθε ζεύγος Σχημάτων που ακολουθεί, το αριστερό Σχήμα απεικονίζει τη συγκέντρωση δαναζόλης στο πάνω (κόκκινοι κύκλοι και κόκκινη προσαρμοσμένη γραμμή) και στο κάτω διαμέρισμα του φρεατίου (μπλε αστερίσκοι και μπλε προσαρμοσμένη γραμμή), ενώ το δεξιό Σχήμα απεικονίζει την ποσότητα δαναζόλης στα κύτταρα (κόκκινοι κύκλοι και κόκκινη προσαρμοσμένη γραμμή) και στα τοιχώματα του φρεατίου (μπλε αστερίσκοι και μπλε προσαρμοσμένη γραμμή). Οι τιμές GOF αντιστοιχούν στις μπλε προσαρμοσμένες γραμμές του αριστερού Σχήματος.

Οι προσαρμοσμένες γραμμές στο πάνω και κάτω διαμέρισμα για τα περισσότερα δείγματα ΕΠ διασταυρώνονται ($u \neq 1$), κάτι που δεν πρέπει να συμβαίνει όταν ο μηχανισμός μεταφοράς είναι μόνο παθητική διάχυση. Η διασταύρωση συμβαίνει,

επειδή στο διαμέρισμα-δότης έχει τοποθετηθεί διασπορά λιποσωμάτων μεγαλύτερης συγκέντρωσης από ότι έπρεπε, απόρροια του προσεγγιστικού τρόπου παρασκευής της διασποράς για τα δείγματα ΕΠ (Κεφ. Β.4.3.2). Στα δείγματα ΜΦ, όπου η παρασκευή της διασποράς έγινε γνωρίζοντας τη διαλυτότητα της δαναζόλης, στην κατάσταση ισορροπίας οι προσαρμοσμένες γραμμές συμπίπτουν ($u \approx 1$).

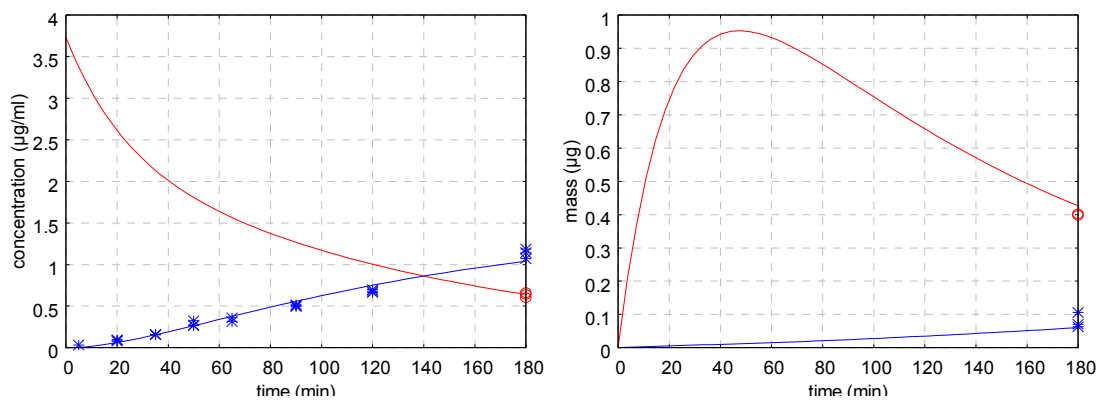
Π.6.2.1 Δαναζόλη σε ΕΠ

Εθελοντής #1 – 120 min



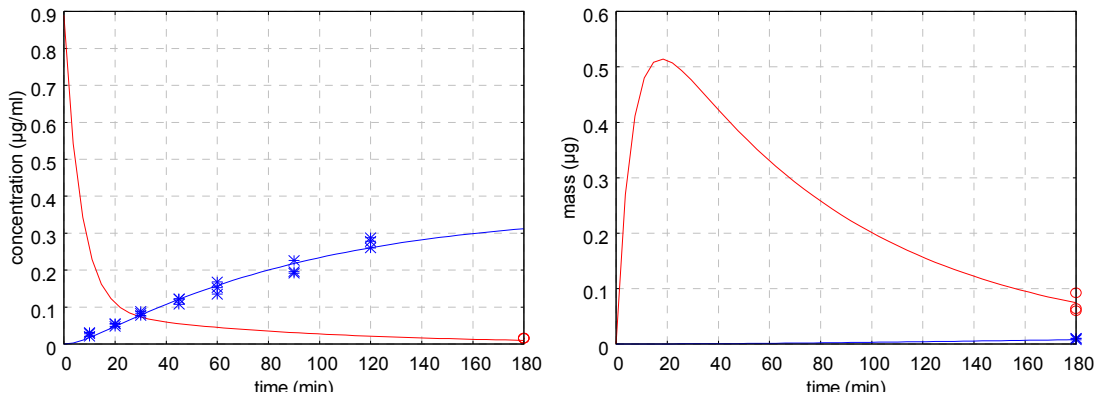
GOF=0,9990

Εθελοντής #2 – 90 min



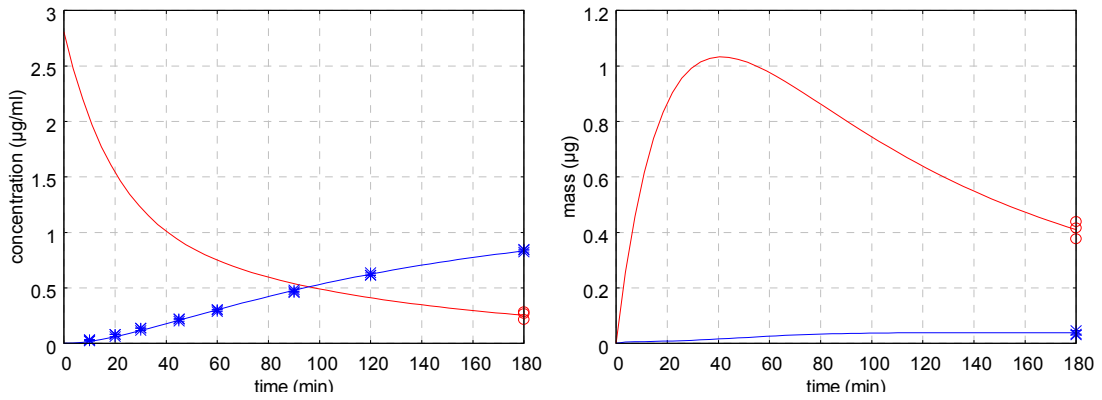
GOF=0,998

Εθελοντής #2 – 180 min



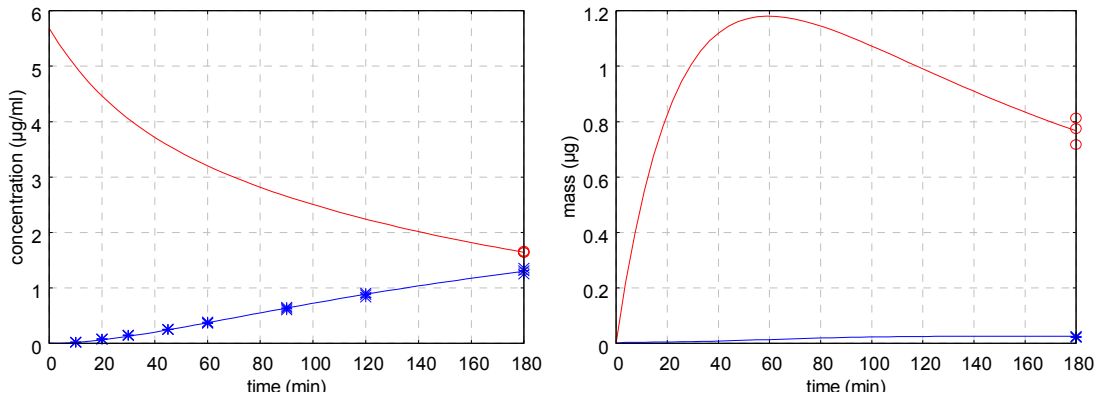
GOF=0,998

Εθελοντής #2 – 210 min



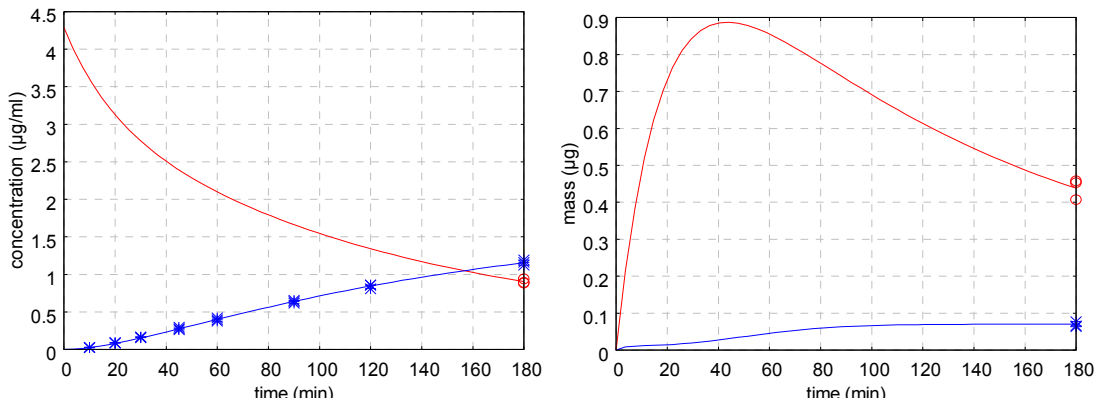
GOF=0,9998

Εθελοντής #4 – 60 min



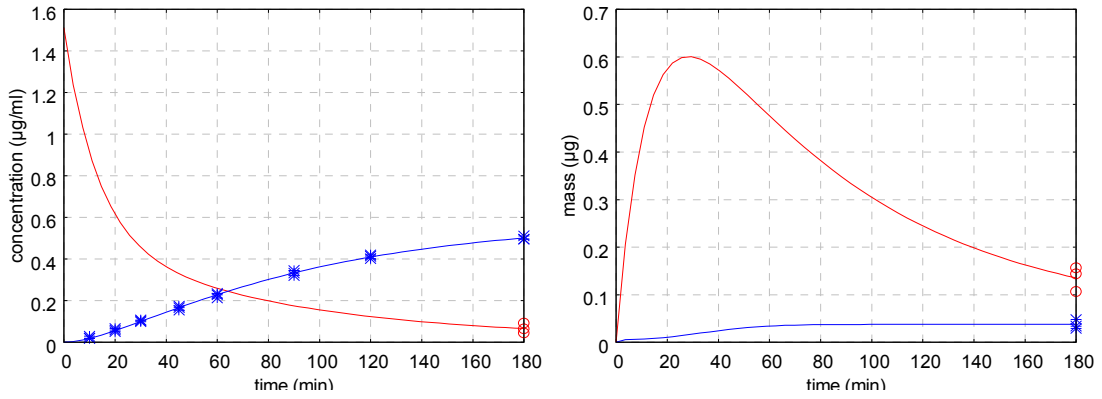
GOF=0,9997

Εθελοντής #4 – 120 min



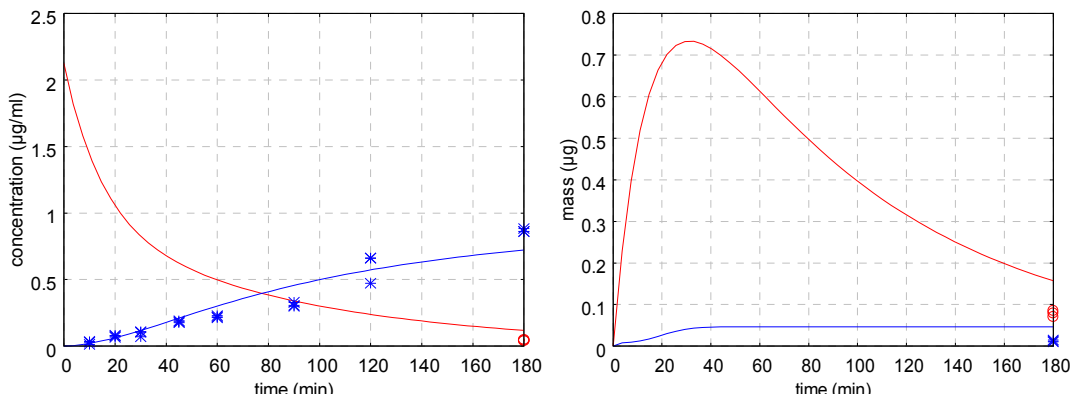
GOF=0,9998

Εθελοντής #4 – 150 min

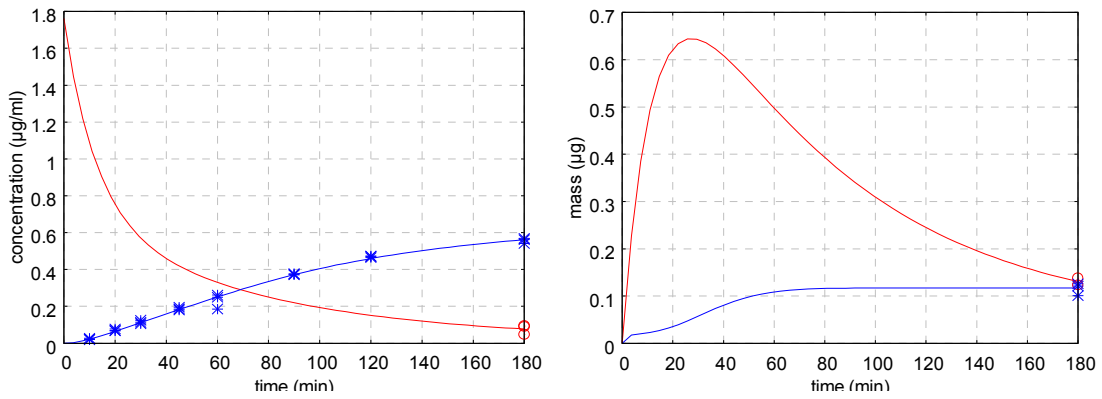


GOF=0,9990

Εθελοντής #5 – 180 min

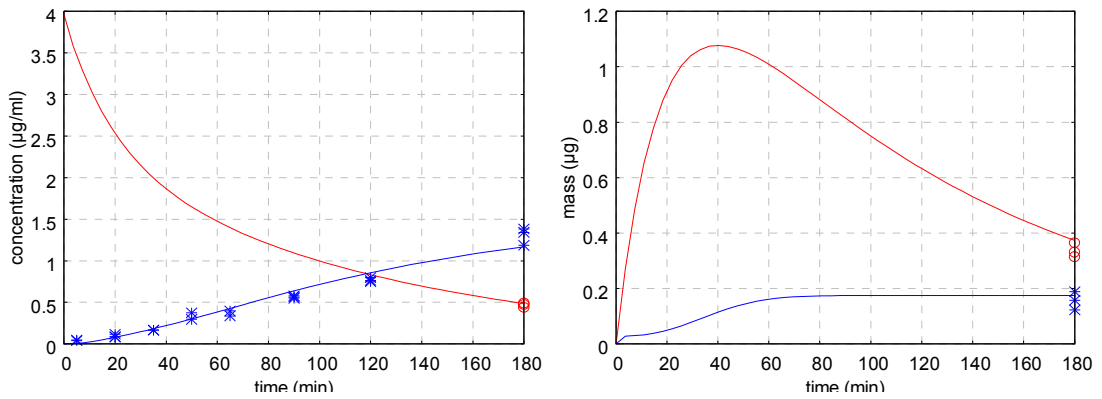


Εθελοντής #5 – 210 min



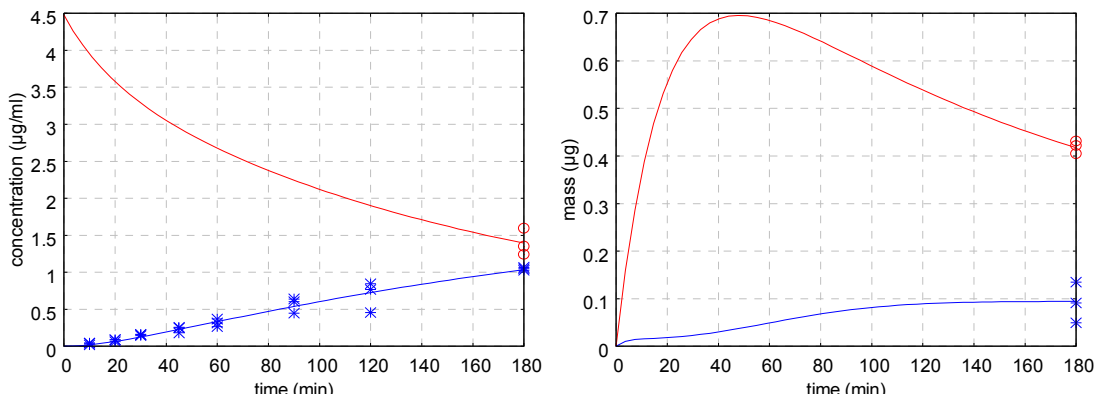
GOF=0,9996

Εθελοντής #5 – 240 min



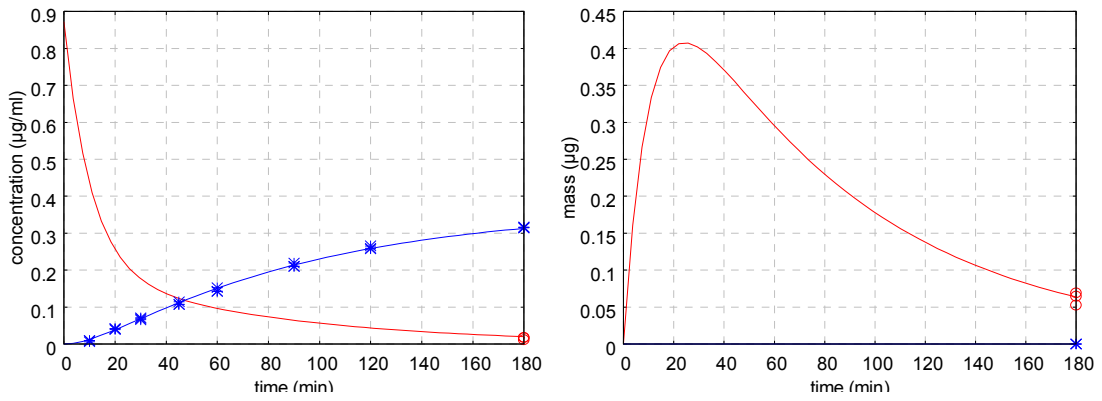
GOF=0,996

Εθελοντής #6 – 90 min



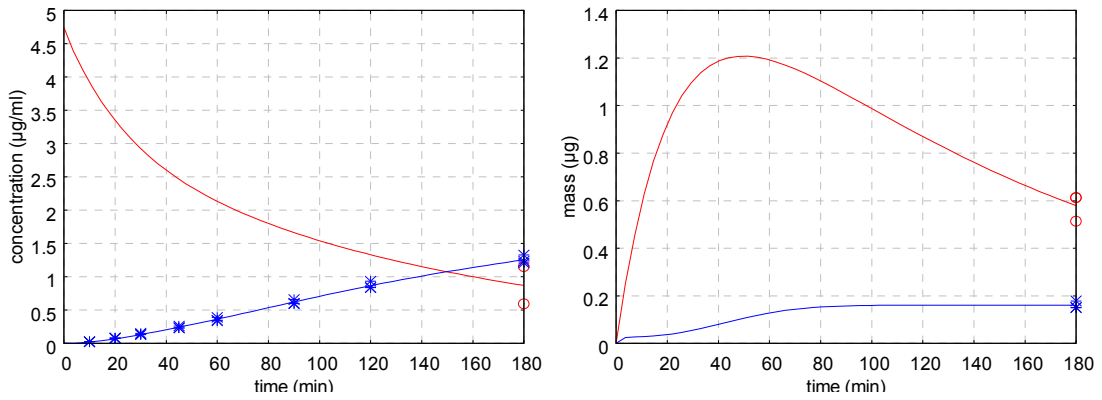
GOF=0,996

Εθελοντής #6 – 180 min



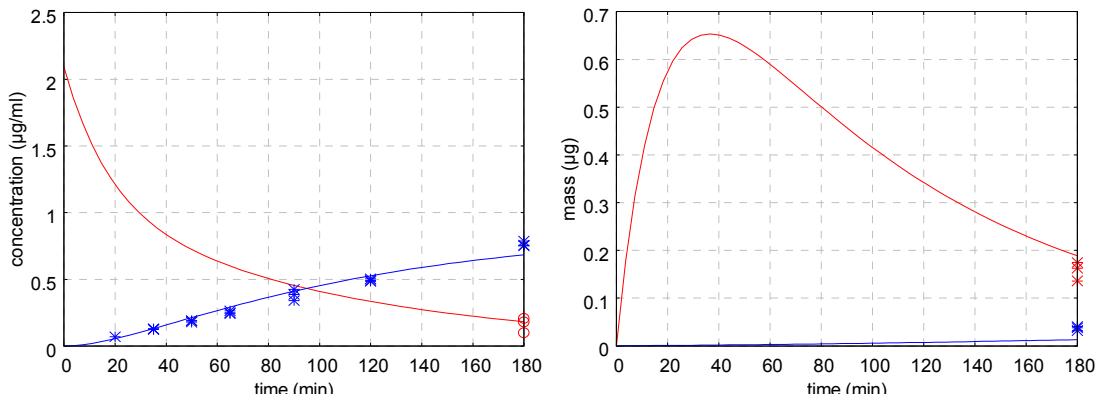
GOF=0,99991

Εθελοντής #7 – 180 min



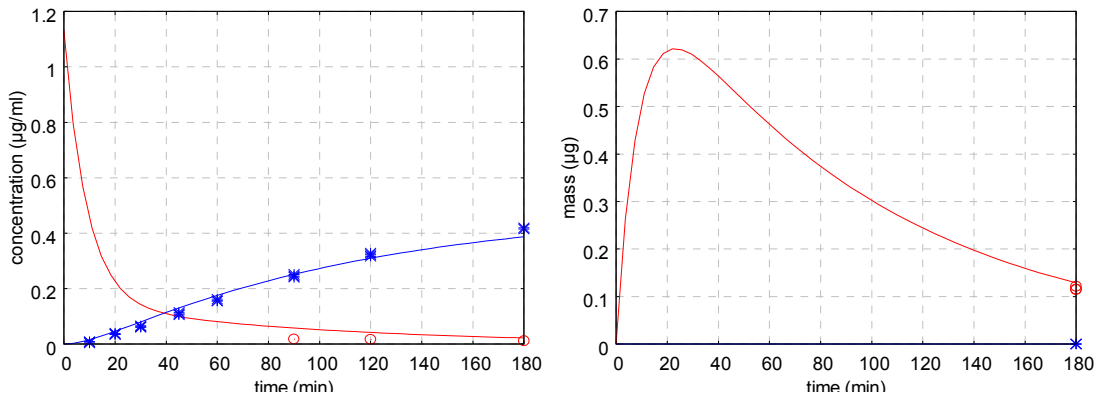
GOF=0,9996

Εθελοντής #7 – 210 min



GOF=0,9997

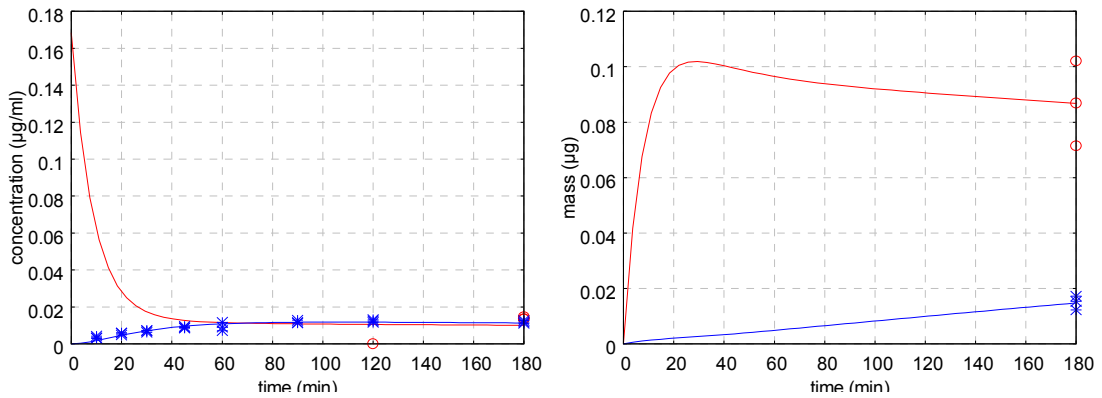
Εθελοντής #7 – 240 min



GOF=0,9990

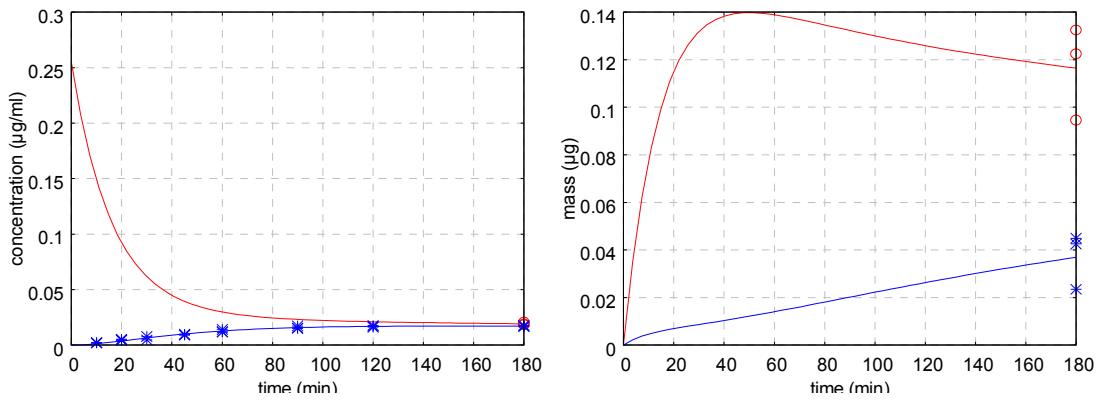
Π6.2.2 Δαναζόλη σε ΜΦ

Εθελοντής #2 – 90 min



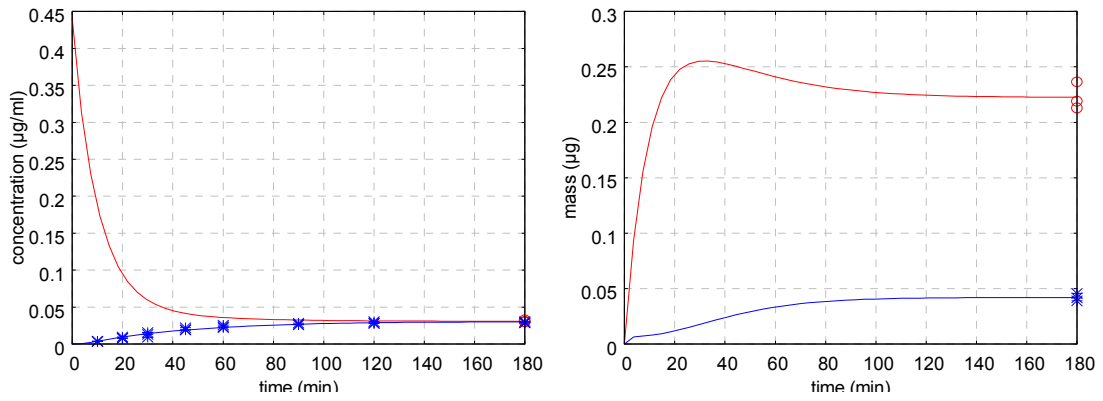
GOF=0,998

Εθελοντής #2 – 180 min



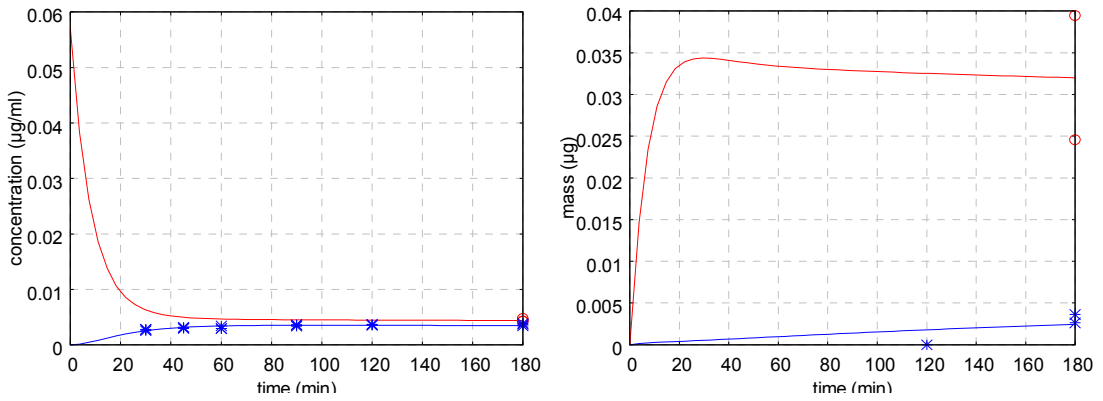
GOF=0,9991

Εθελοντής #2 – 210 min



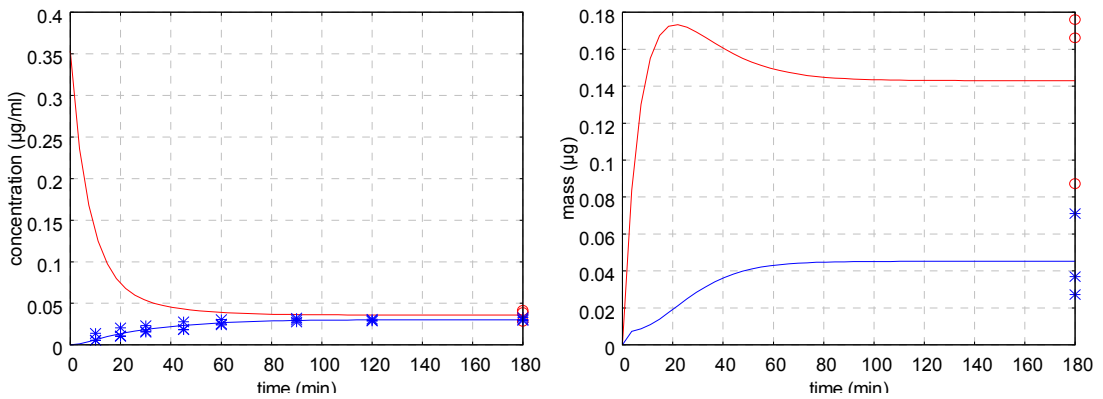
GOF=0,9993

Εθελοντής #3 – 150 min



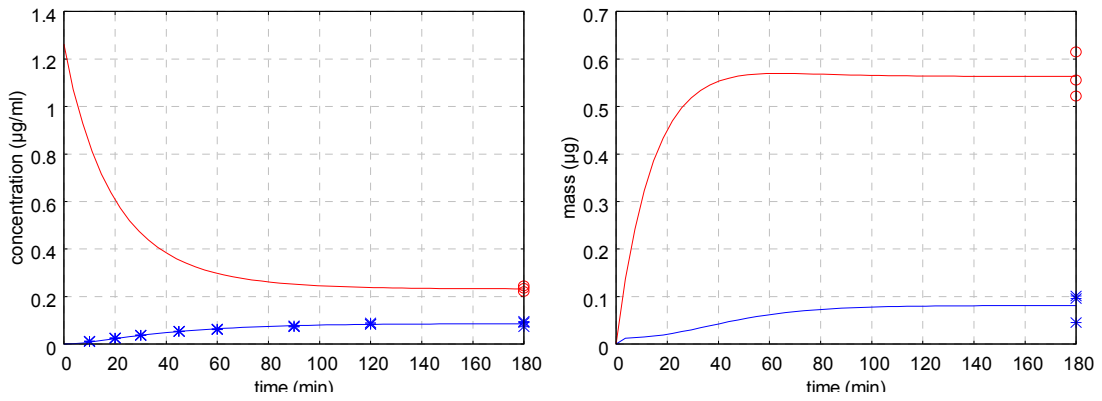
GOF=0,9990

Εθελοντής #4 – 60 min



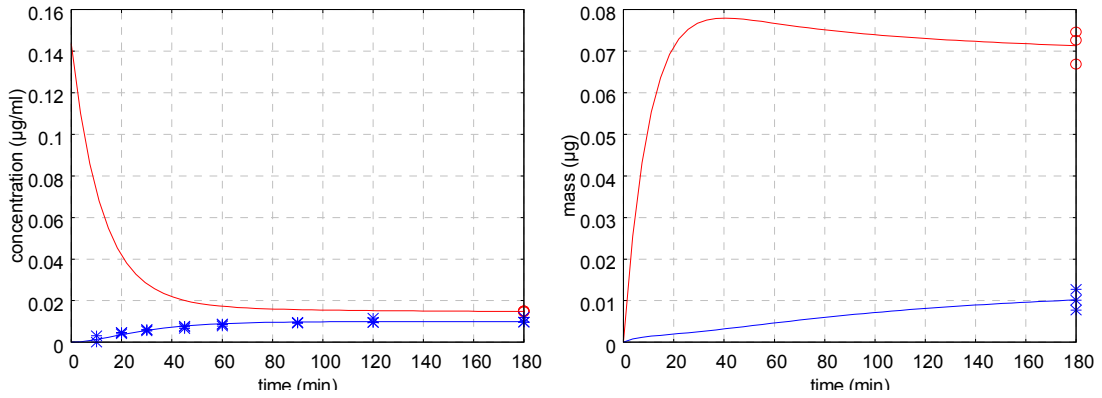
GOF=0,998

Εθελοντής #4 – 120 min



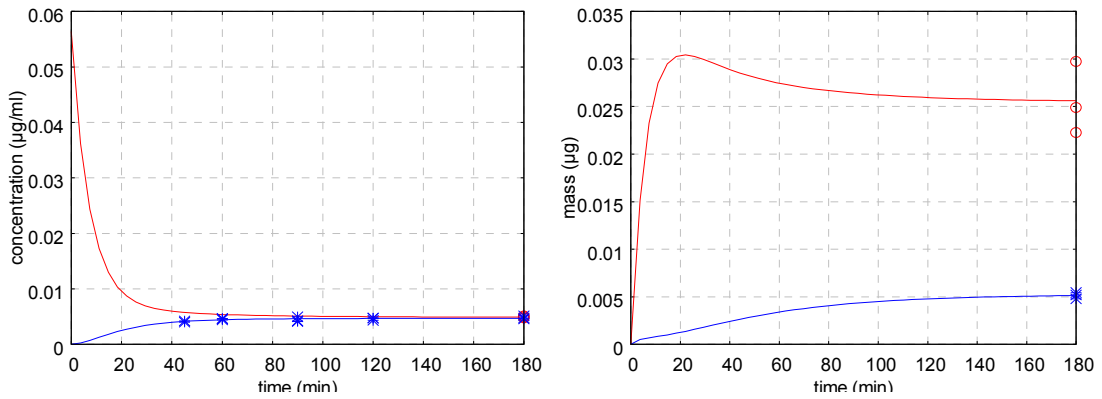
GOF=0,9993

Εθελοντής #4 – 150 min



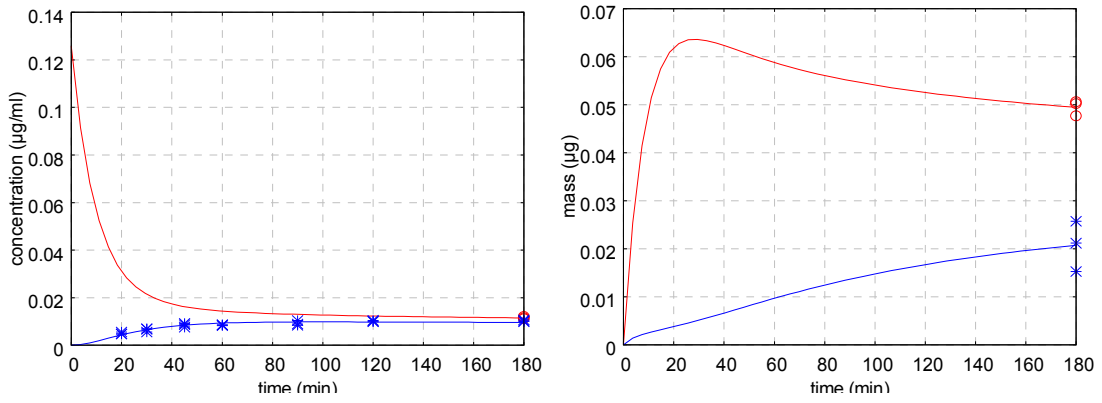
GOF=0,998

Εθελοντής #5 – 180 min



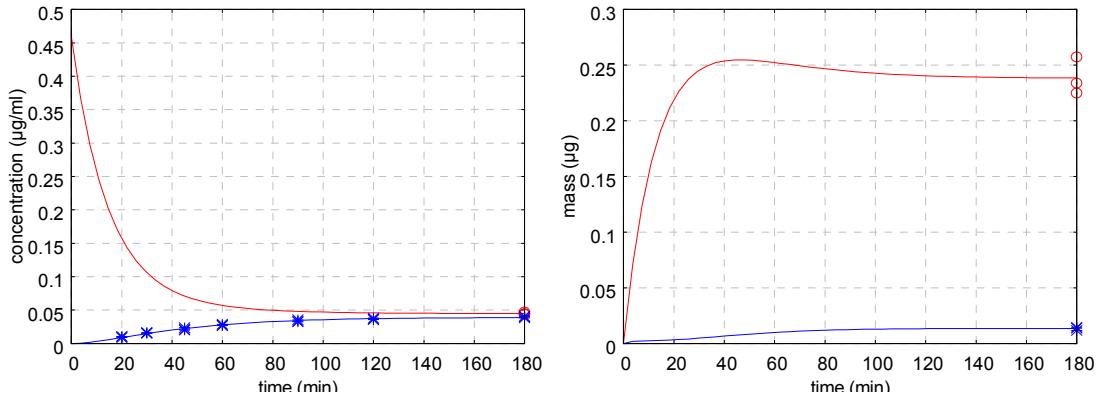
GOF=0,998

Εθελοντής #5 – 240 min



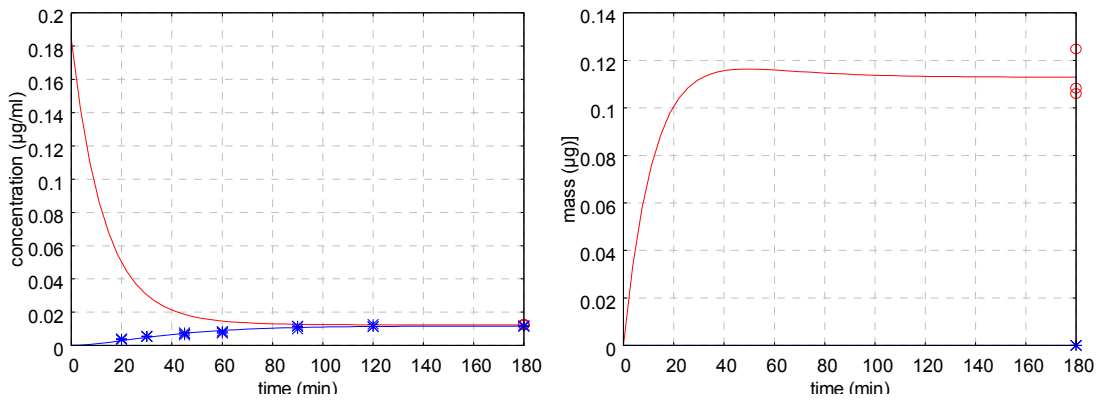
GOF=0,9990

Εθελοντής #6 – 90 min



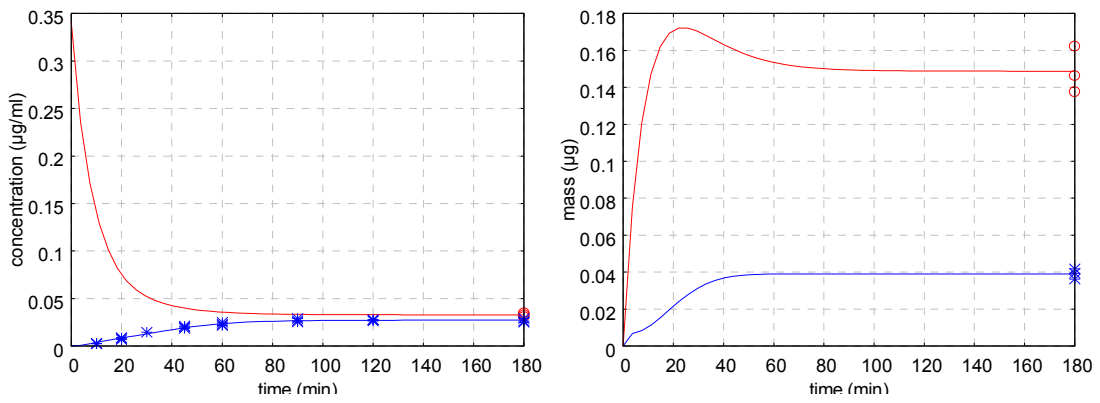
GOF=0,9996

Εθελοντής #6 – 180 min



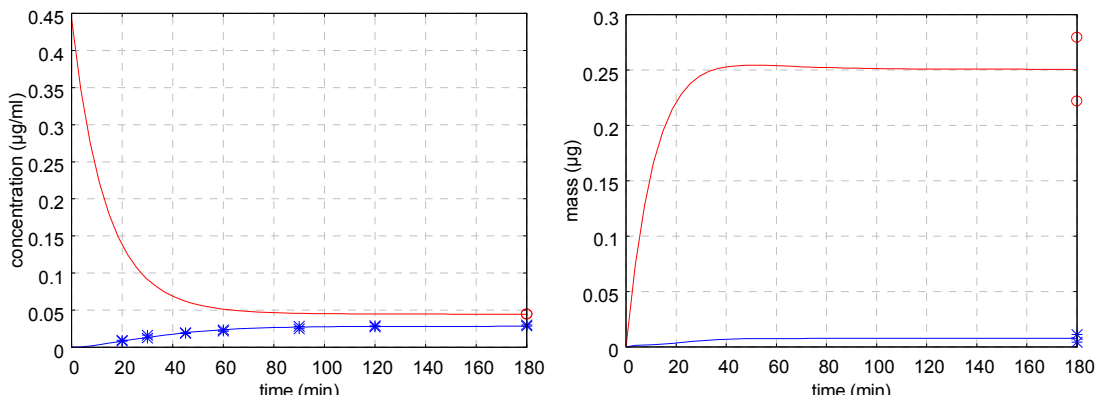
GOF=0,9990

Εθελοντής #7 – 180 min



GOF=0,9993

Εθελοντής #7 – 210 min



GOF=0,998

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βερτζώνη Μ. Διερεύνηση του μηχανισμού μεταφοράς φαρμάκων από λιπιδικούς φορείς στην κυκλοφορία του αίματος μετά από per os χορήγηση στον άνθρωπο. Χρηματοδότηση: Πυθαγόρας ΙΙ-Ενίσχυση Ερευνητικών Ομάδων στα Πανεπιστήμια, 01/03/05-31/12/06 (ΕΚΠΑ, Κ.Α. 70/3/7967).

ΕΟΦ (Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων), Εθνικό Συνταγολόγιο, 2007.

Μαχαίρας Π. και Ρέππας Χ. Βιοφαρμακευτική. 1997, Εκδόσεις Γκέλμπεσης, Αθήνα.

Adson A, Burton PS, Raub TJ, Barsuhn CL, Audus KL, Ho NF. Passive diffusion of weak organic electrolytes across Caco-2 cell monolayers: uncoupling the contributions of hydrodynamic, transcellular, and paracellular barriers. *J Pharm Sci*; 84:1197-204 (1995).

Agoram B, Woltosz WS, Bolger MB. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. *Adv Drug Deliv Rev*; 50:S41–S67 (2001).

Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*; 12:413-420 (1995).

Amidon GL, Sinko PJ, Fleisher D. Estimating Human Oral Fraction Dose Absorbed—A Correlation Using Rat Intestinal-Membrane Permeability for Passive and Carrier-Mediated Compounds. *Pharm Res*; 5:651–654 (1988).

Annaert P, Tukker JJ, van Gelder J, Naesens L, de Clercq E, van Den Mooter G, Kinget R, Augustijns P. In vitro, ex vivo, and in situ intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil. *J Pharm Sci*; 89:1054-62 (2000).

- Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Peyrot J., Salducci J., Lafont H, Lairon D. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *Am J Phys*; 266:G372-G381 (1994).
- Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*; 46:27-43 (2001).
- Avdeef A., Absorption and drug development - solubility, permeability, and charge state, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA (2003).
- Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*; 1:325-42 (2005).
- Avdeef A, Bendels S, Di L, Faller B, Kansy M, Sugano K, Yamauchi Y. PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. *J Pharm Sci*; 96:2893-909 (2007).
- Avdeef A, Nielsen PE, Tsinman O. PAMPA--a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur J Pharm Sci*; 22:365-74 (2004).
- Avdeef A, Tsinman O. PAMPA--a drug absorption in vitro model 13. Chemical selectivity due to membrane hydrogen bonding: in combo comparisons of HDM-, DOPC-, and DS-PAMPA models. *Eur J Pharm Sci*; 28:43-50 (2006).
- Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*; 46:101-10 (1998).
- Bakatselou V, Oppenheim RC, Dressman JB. Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids. *Pharm Res*; 8:1461-9 (1991).
- Balimane PV, Pace E, Chong S, Zhu M, Jemal M, Pelt CK. A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for PAMPA sample analysis. *J Pharm Biomed Anal*; 39:8-16 (2005).

- Benet LZ, Wu CY, Hebert MF and Wacher VJ. Intestinal Drug Metabolism and Anti-Transport Processes: A Potential Paradigm Shift in Oral Drug Delivery. *J Control Release*; 39:139–143 (1996).
- Bogman K, Zysset Y, Degen L, Hopfgartner G, Gutmann H, Alsenz J, Drewe J. P-glycoprotein and surfactants: effect on intestinal talinolol absorption. *Clin Pharmacol Ther*; 77:24-32 (2005).
- Bolger MB, Lukacova V, Lloyd R. GastroPlus PBPK Simulation of Simvastatin: Uptake transport by hepatic serosal OATP, biliary efflux transport by apical Pgp, and metabolism by CYP3A4 in gut and liver. Poster at BioMed-Transporters-2007-Bern (2007)
- Bourdet DL, Thakker DR. Saturable absorptive transport of the hydrophilic organic cation ranitidine in Caco-2 cells: role of pH-dependent organic cation uptake system and P-glycoprotein. *Pharm Res*; 23:1165-77 (2006).
- Braun A, Hämmerle S, Suda K, Rothen-Rutishauser B, Günthert M, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci*; 11 Suppl 2:S51-60 (2000).
- Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med*; 214:248-57 (1997).
- Brouwers J, Deferme S, Annaert P, Augustijns P. Permeability Measurement. In: Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment. Dressman JB, Reppas C (Editors). 2nd edition; Drugs and the Pharmaceutical Sciences - Volume 193; Informa Healthcare USA, Inc.; New York; 2010.
- Brouwers J, Tack J, Lammert F, Augustijns P. Intraluminal drug and formulation behavior and integration in in vitro permeability estimation: a case study with amprenavir. *J Pharm Sci*; 95:372-83 (2006).

- Buch P, Langguth P, Kataoka M, Yamashita S. IVIVC in oral absorption for fenofibrate immediate release tablets using a dissolution/permeation system. *J Pharm Sci*; 98:2001-9 (2009).
- Buyukozturk F, Benneyan JC, Carrier RL. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J Control Release*; 142:22-30 (2010).
- Camenisch G, Folkers G, van de Waterbeemd, H. Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes, *Int J Pharm*; 147:61-70 (1997).
- Castillo-Garit JA, Marrero-Ponce Y, Torrens F, García-Domenech R. Estimation of ADME properties in drug discovery: predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices. *J Pharm Sci*; 97:1946-76 (2008).
- de Castro B, Gameiro P, Guimarães C, Lima JL, Reis S. Partition coefficients of beta-blockers in bile salt/lecithin micelles as a tool to assess the role of mixed micelles in gastrointestinal absorption. *Biophys Chem*; 90:31-43 (2001).
- Charman WN, Rogge MC, Boddy AW, Barr WH, Berger BM. Absorption of danazol after administration to different sites of the gastrointestinal tract and the relationship to single- and double-peak phenomena in the plasma profiles. *J Clin Pharmacol*; 33:381-6 (1993).
- Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL, Balimane PV. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res*; 25:1511-20 (2008).
- Chong S, Dando SA, Morrison RA. Evaluation of Biocoat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm Res*; 14:1835-7 (1997).

- Chiou WL. Effect of 'unstirred' water layer in the intestine on the rate and extent of absorption after oral administration. *Biopharm Drug Dispos*; 15:709-17 (1994).
- Clarysse S, Psachoulas D, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Duchateau G, Reppas C, Augustijns P. Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs. *Pharm Res*; 26:1456-66 (2009).
- Cummins CL, Jacobsen W, Benet LZ. Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther*; 300:1036-45 (2002).
- Diakidou A, Vertzoni M, Goumas K, Söderlind E, Abrahamsson B, Dressman JB, Reppas C. Characterization of the contents of ascending colon to which drugs are exposed after oral administration to healthy adults. *Pharm Res*; 26:2141-2151 (2009).
- Dokoumetzidis A, Macheras P. The changing face of the rate concept in biopharmaceutical sciences: from classical to fractal and finally to fractional. *Pharm Res*; 28:1229-32 (2011) .
- Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, et al. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci*; 58:1196–1200 (1969).
- Dressman JB, Fleisher D. Mixing tank model for predicting dissolution rate control of oral absorption. *J Pharm Sci*; 75:109–116 (1986).
- Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci*; 11 Suppl 2:S73-80 (2000).
- Eagling VA, Profit L, Back DJ. Inhibition of the CYP3A4-mediated metabolism and P-glycoprotein-mediated transport of the HIV-1 protease inhibitor saquinavir by grapefruit juice components. *Br J Clin Pharmacol*; 48:543-52 (1999).
- EMA (European Medicines Agency), Committee for Medicinal Products for Human

Use (CHMP). Guideline on the investigation of bioequivalence. January 2010.

Available at:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (accessed 30-08-11).

Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, Kindmark A, Artursson P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci*; 29:269-77 (2006).

Engman HA, Lennernäs H, Taipalensuu J, Otter C, Leidvik B, Artursson P. CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies. *J Pharm Sci*; 90:1736-51 (2001).

Fagerholm U, Johansson M and Lennernäs H. Comparison Between Permeability Coefficients in Rat and Human Jejunum. *Pharm Res*; 13:1336–1342 (1996).

FDA (Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. September 2006. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072101.pdf> (accessed 30-08-11).

FDA (Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies. December 2002. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070241.pdf> (accessed 30-08-11).

FDA (Food and Drug Administration), Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on Biopharmaceutics Classification System. August 2000. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation>

/Guidances/ucm070246.pdf (accessed 30-08-11).

Fischer SM, Buckley ST, Kirchmeyer W, Fricker G, Brandl M. Application of simulated intestinal fluid on the phospholipid vesicle-based drug permeation assay. *Int J Pharm*; 422:52-8 (2012).

Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci*; 27:80-90 (2006).

Flaten GE, Luthman K, Vasskog T, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 4. The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability. *Eur J Pharm Sci*; 34:173-80 (2008).

Fossati L, Dechaume R, Hardillier E, Chevillon D, Prevost C, Bolze S, Maubon N. Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *Int J Pharm*; 360:148-55 (2008).

Fotaki N, Symillides M, Reppas C. Canine versus in vitro data for predicting input profiles of L-sulpiride after oral administration. *Eur J Pharm Sci*; 26:324-33 (2005).

Fujikawa M, Ano R, Nakao K, Shimizu R, Akamatsu M. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorg Med Chem*; 13:4721-32 (2005).

Ginski MJ, Taneja R, Polli JE. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS PharmSci*; 1:E3 (1999).

Gozalbes R, Jacewicz M, Annand R, Tsaioun K, Pineda-Lucena A. QSAR-based permeability model for drug-like compounds. *Bioorg Med Chem*; 19:2615-24 (2011).

- Grass GM, Sweetana SA. In vitro measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell. *Pharm Res*; 5:372–376 (1988).
- Haslam IS, O'Reilly DA, Sherlock DJ, Kauser A, Womack C, Coleman T. Pancreatoduodenectomy as a source of human small intestine for Ussing chamber investigations and comparative studies with rat tissue. *Biopharm Drug Dispos*; 32:210-21 (2011).
- Hayeshi R, Hilgendorf C, Artursson P, Augustijns P, Brodin B, Dehertogh P, Fisher K, Fossati L, Hovenkamp E, Korjamo T, Masungi C, Maubon N, Mols R, Müllertz A, Mönkkönen J, O'Driscoll C, Oppers-Tiemissen HM, Ragnarsson EG, Rooseboom M, Ungell AL. Comparison of drug transporter gene expression and functionality in Caco-2 cells from 10 different laboratories. *Eur J Pharm Sci*; 35:383-96 (2008).
- Heikkilä T, Santos HA, Kumar N, Murzin DY, Salonen J, Laaksonen T, Peltonen L, Hirvonen J, Lehto VP. Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. *Eur J Pharm Biopharm*; 74:483-94 (2010).
- Hernell O, Staggers J.E and Carey M.C. Physical-chemical behaviour of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry*; 29:2041-2056 (1990).
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*; 96:736-49 (1989).
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos*; 35:1333-40 (2007).

- Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci*; 89:63-75 (2000).
- Ho NFH, Raub TJ, Burton PS, Barsuhn CL, Adson A, Audus KL, Borchardt RT. Quantitative approach to delineate passive transport mechanisms in cell culture monolayers. In: Transport processes in pharmaceutical systems, Amidon GL, Lee PI, Topp EM (Editors), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 2000.
- Hovgaard L, Brøndsted H, Mørck Nielsen H. Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. II. Absorption enhancer effects of lysophosphatidylcholines. *Int J Pharm*; 114:141-49 (1995).
- Huque FT, Box K, Platts JA, Comer J. Permeability through DOPC/dodecane membranes: measurement and LFER modelling. *Eur J Pharm Sci*; 23:223-32 (2004).
- Ingels FM, Augustijns PF. Biological, pharmaceutical, and analytical considerations with respect to the transport media used in the absorption screening system, Caco-2. *J Pharm Sci*; 92:1545-58 (2003).
- Ingels F, Beck B, Oth M, Augustijns P. Effect of simulated intestinal fluid on drug permeability estimation across Caco-2 monolayers. *Int J Pharm*; 274:221-32 (2004).
- Ingels F, Deferme S, Destexhe E, Oth M, Van den Mooter G, Augustijns P. Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *Int J Pharm*; 232:183-92 (2002).
- International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L.

- Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*; 9:215-36 (2010).
- Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharm Res*; 25:1663-76 (2008).
- Jones H, Parrott N, Ohlenbusch G, et al. Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling. *Clin Pharm*; 45:1213–1226 (2006).
- Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*; 41:1007-10 (1998).
- Kapitza SB, Michel BR, van Hoogevest P, Leigh ML, Imanidis G. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. *Eur J Pharm Biopharm*; 66:146-58 (2007).
- Kataoka M, Masaoka Y, Sakuma S, Yamashita S. Effect of food intake on the oral absorption of poorly water-soluble drugs: in vitro assessment of drug dissolution and permeation assay system. *J Pharm Sci*; 95:2051-61 (2006).
- Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S. In vitro system to evaluate oral absorption of poorly water-soluble drugs: simultaneous analysis on dissolution and permeation of drugs. *Pharm Res*; 20:1674-80 (2003).
- Kaukonen AM, Boyd BJ, Porter CJ, Charman WN. Drug solubilization behavior during in vitro digestion of simple triglyceride lipid solution formulations. *Pharm Res*; 21:245-53 (2004).
- Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, Jupp P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci*; 93:1440-53 (2004).

Kesisoglou F, Wu Y, Chin A. Prediction of Micronized Aprepitant Food Effect Through Absorption Modeling. AAPS Annual Meeting and Exposition, 2007

Lassoued MA, Khemiss F, Sfar S. Comparative study of two in vitro methods for assessing drug absorption: Sartorius SM 16750 apparatus versus Everted Gut Sac. *J Pharm Pharm Sci*; 14:117-27 (2011).

Leibovitz A, The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am J Hyg*; 78:173-80 (1963).

Lennernäs H. Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*; 59:1103–1120 (2007).

Lennernäs H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*; 87:403–410 (1998).

Lennernäs H. Human perfusion studies. In: Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment. Dressman JB, Lennernäs H (Editors.); Dekker Inc.; New York; 2000

Lennernäs H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J Pharm Pharmacol*; 57:273-85 (2005).

Lennernäs H, Knutson L, Knutson T, Hussain A, Lesko L, Salmonson T, Amidon GL. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci*; 15:271-7 (2002).

Lennernäs H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo, *Int J Pharm*; 127:103–107 (1996).

Levitt MD, Furne JK, Strocchi A, Anderson BW, Levitt DG. Physiological

- measurements of luminal stirring in the dog and human small bowel. *J Clin Invest*; 86:1540-7 (1990).
- Li F, Hong L, Mau CI, Chan R, Hendricks T, Dvorak C, Yee C, Harris J, Alfredson T. Transport of levovirin prodrugs in the human intestinal Caco-2 cell line. *J Pharm Sci*; 95:1318-25 (2006).
- Liang E, Chessic K, Yazdanian M. Evaluation of an accelerated Caco-2 cell permeability model. *J Pharm Sci*; 89:336-45 (2000).
- Lind ML, Jacobsen J, Holm R, Müllertz A. Development of simulated intestinal fluids containing nutrients as transport media in the Caco-2 cell culture model: assessment of cell viability, monolayer integrity and transport of a poorly aqueous soluble drug and a substrate of efflux mechanisms. *Eur J Pharm Sci*; 32:261-70 (2007).
- Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*; 44:235-49 (2000).
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv Drug Deliv Rev*; 23:3–25 (1997).
- Linnankoski J, Ranta VP, Yliperttula M, Urtti A. Passive oral drug absorption can be predicted more reliably by experimental than computational models--fact or myth. *Eur J Pharm Sci*; 34:129-39 (2008).
- Liu H, Sabus C, Carter GT, Du C, Avdeef A, Tischler M. In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection. *Pharm Res*; 20:1820-6 (2003).
- Lu YF, Richard A, Tatsuta N, Zhang TT. Effect of Fasted and Fed State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF and FeSSIF) on Drug Permeability Estimation in PAMPA

- and Caco-2 Assays. AAPS Annual Meeting, San Diego (2007).
- Mallants R, Van Oosterwyck K, Van Vaeck L, et al. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) affects hepatobiliary elimination but not the intestinal disposition of tenofovir disoproxil fumarate and its metabolites. *Xenobiotica*; 35:1055–1066 (2005).
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65:55-63 (1983).
- Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Westcott WC. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*; 194:979–980 (1962).
- Müllertz A, Fatouros DG, Smith JR, Vertzoni M, Reppas C. Insights into intermediate phases of human intestinal fluids visualised by atomic force microscopy and cryo - transmission electron microscopy ex vivo. *Mol Pharmaceutics*; 9:237-47 (2011).
- Naylor LJ, Bakatselou V, Dressman JB. Comparison of the mechanism of dissolution of hydrocortisone in simple and mixed micelle systems. *Pharm Res*; 10:865-70 (1993).
- Norinder U, Osterberg T, Artursson P. Theoretical calculation and prediction of Caco-2 cell permeability using MolSurf parametrization and PLS statistics. *Pharm Res*; 14:1786-91 (1997).
- de Oca Porto RM, Fernández AR, Brito DM, Vidal TC, Diaz AL. Gas chromatography/mass spectrometry characterization of urinary metabolites of danazol after oral administration in human. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; 830:178-83 (2006).
- Parrott N, Lave T. Computer Models for Predicting Drug Absorption. In: Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment. Dressman JB, Reppas C (Editors). 2nd edition; Drugs and the Pharmaceutical Sciences - Volume 193; Informa Healthcare

- USA, Inc.; New York; 2010.
- Parrott N, Paquereau N, Coassolo P, et al. An evaluation of the utility of physiologically based models of pharmacokinetics in early drug discovery. *J Pharm Sci*; 94:2327–2343 (2005).
- Patel N, Forbes B, Eskola S, Murray J. Use of simulated intestinal fluids with Caco-2 cells and rat ileum. *Drug Dev Ind Pharm*; 32:151-61 (2006).
- Patil SD, Ngo LY, Glue P, Unadkat JD. Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na⁺-nucleoside purine (N1) transporter. *Pharm Res*; 15:950-2 (1998).
- Plumb JA, Burston D, Baker TG, et al. A comparison of the structural integrity of several commonly used preparations of rat small intestine in vitro. *Clin Sci (Lond)*; 73:53–59 (1987).
- Pockros PJ, Pessoa MG, Diago M, Martinelli ALC, Berg T, Germanidis G, Lai MY, Gomez H, Goeser T, Roberts S, Sheen IS, Hinrichsen H, Lee SS, Reindollar R, Sola R, Wilson KA, Jorga K, Graham P, Jackson H. Combination of levovirin (LVV) and peginterferon alfa-2a (40 kD) (Pegasys[®]) fails to generate a virological response comparable to ribavirin (RBV, Copegus[®]) and peginterferon alfa-2a (40 kD) in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*; 40 Supplement 1:391A (2004).
- Pontier C, Pachot J, Botham R, Lenfant B, Arnaud P. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: role of the mucus layer. *J Pharm Sci*; 90:1608-19 (2001).
- Porter CJ, Trevaskis NL, Charman WN. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nat Rev Drug Discov*; 6:231-48 (2007).
- Pouton, CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration:

- physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci*; 29:278-87 (2006).
- Proctor W, Ming X, Thakker D. In Vitro Techniques to Study Drug–Drug Interactions Involving Transport: Caco-2 Model for Study of P-Glycoprotein and Other Transporters. In: Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions. Progress and Future Challenges. Pang S, Rodrigues D, Peter, Raimund M. (Editors) Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2010.
- Profit L, Eagling VA, Back DJ. Modulation of P-glycoprotein function in human lymphocytes and Caco-2 cell monolayers by HIV-1 protease inhibitors. *AIDS*; 13:1623-7 (1999).
- Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *J Pharm Sci*; 90:1776-86 (2001).
- Ruell J and Avdeef A. Absorption Screening Using the PAMPA Approach. In: Optimization in Drug Discovery – In Vitro Methods. Yan Z, Caldwell G, (Editors); Humana Press Inc.; New Jersey; 2004
- Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CA. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther*; 123:81–88 (1958).
- Schneider M. Investigation of the transport of lipophilic drugs in structurally diverse lipid formulations through Caco-2 cell monolayer using mathematical modeling. Ph.D. thesis. University of Basel, 2008.
- Schurtenberger P, Mazer NA, Känzig W. Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin. *J Phys Chem*; 89:1042-49 (1985).
- Seo PR, Teksin ZS, Kao JP, Polli JE. Lipid composition effect on permeability across PAMPA. *Eur J Pharm Sci*; 29:259-68 (2006).
- Shah RB, Palamakula A, Khan MA. Cytotoxicity evaluation of enzyme inhibitors and

- absorption enhancers in Caco-2 cells for oral delivery of salmon calcitonin. *J Pharm Sci*; 93:1070-82 (2004).
- Shono Y, Jantratid E, Janssen N, Kesisoglou F, Mao Y, Vertzoni M, Reppas C, Dressman JB. Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Eur J Pharm Biopharm*; 73:107-14 (2009).
- Stella V. Prodrug Approaches to Enhancing the Oral Delivery of Poorly Permeable Drugs. In: Prodrugs: Challenges and rewards, Part 1, Stella V, Borchardt R, Hageman M, Oliyai R, Maag H, Tilley J (Editors), Biotechnology: Pharmaceutical Aspects, Volume V, Springer Science+Business Media, LLC, New York, 2007.
- Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H. High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in parallel artificial membrane permeation assay. *J Biomol Screen*; 6:189-96 (2001).
- Sugano K, Takata N, Machida M, Saitoh K, Terada K. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *Int J Pharm*; 241:241-51 (2002).
- Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, Ecker GF, Faller B, Fischer H, Gerebtzoff G, Lennernaes H, Senner F. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*; 9:597-614 (2010).
- Taipalensuu J, Tavelin S, Lazorova L, Svensson AC, Artursson P. Exploring the quantitative relationship between the level of MDR1 transcript, protein and function using digoxin as a marker of MDR1-dependent drug efflux activity. *Eur J Pharm Sci*; 21(1):69-75 (2004).
- Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal

- human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*; 299:164-70 (2001).
- Takaai M, Morishita H, Ishida K, Taguchi M, Hashimoto Y. Contribution of Na⁺-independent nucleoside transport to ribavirin uptake in the rat intestine and human epithelial LS180 cells. *Eur J Pharmacol*; 601:61-5 (2008).
- Tang F, Horie K, Borchardt RT. Are MDCK cells transfected with the human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa? *Pharm Res*; 19:765-72 (2002).
- Tavelin S, Taipalensuu J, Söderberg L, Morrison R, Chong S, Artursson P. Prediction of the oral absorption of low-permeability drugs using small intestine-like 2/4/A1 cell monolayers. *Pharm Res*; 20:397-405 (2003).
- Tavelin S, Taipalensuu J, Hallböök F, Vellonen KS, Moore V, Artursson P. An improved cell culture model based on 2/4/A1 cell monolayers for studies of intestinal drug transport: characterization of transport routes. *Pharm Res*; 20:373-81 (2003).
- Teksin ZS, Hom K, Balakrishnan A, Polli JE. Ion pair-mediated transport of metoprolol across a three lipid-component PAMPA system. *J Control Release*; 116:50-7 (2006).
- Teksin ZS, Seo PR, Polli JE. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *AAPS J*; 12:238-41 (2010).
- Thompson M, Lennox RB, McClelland RA. Structure and electrochemical properties of microfiltration filter-lipid membrane systems. *Anal Chem*; 54:76-81 (1982).
- Tomita M, Shiga M, Hayashi M, et al. Enhancement of colonic drug absorption by the paracellular permeation route. *Pharm Res*; 5:341-346 (1988).
- Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S, et al. Membrane transport of drugs in different

- regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci*; 87:360–366 (1998).
- Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*; 23:110–127 (1951).
- Van Eenoo P, Delbeke FT. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control--new steroids and new insights. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 101:161-78 (2006).
- Velický M, Bradley DF, Tam KY, Dryfe RA. In situ artificial membrane permeation assay under hydrodynamic control: permeability-pH profiles of warfarin and verapamil. *Pharm Res*; 27:1644-58 (2010).
- Vertzoni M, Archontaki H, Reppas C. Determination of intraluminal individual bile acids by HPLC with charged aerosol detection. *J Lipid Res*; 49:2690-2695 (2008).
- Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci*; 97:712-25 (2008).
- Walter A, Gutknecht J. Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol*; 77:255-64 (1984).
- Walter E and Kissel T. Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): Evidence for an active transport component? *Pharm Res*; 11:1575–1580 (1994).
- Westergaard H, Dietschy JM. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J Clin Invest*; 58:97-108 (1976).
- Wilson T, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*; 123:116–125 (1954).

- Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H, Karlén A. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem*; 41:4939-49 (1998).
- Wohnsland F, Faller B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. *J Med Chem*; 44:923-30 (2001).
- Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*; 22:11-23 (2005).
- Yamamoto T, Kuniki K, Takekuma Y, Hirano T, Iseki K, Sugawara M. Ribavirin uptake by cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells and *Xenopus laevis* oocytes expressing recombinant plasma membrane human nucleoside transporters. *Eur J Pharmacol*; 557:1-8 (2007).
- Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci*; 10:195-204 (2000).
- Yu LX, Lipka E, Crison JR, et al. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev*; 19:359-376 (1996).
- Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur J Med Chem*; 37:399-407 (2002).