



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ

***IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ
ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ *PER OS* ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΣΕ ΜΥΕΣ ΜΕ
ΤΗ ΜΟΡΦΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΕ ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΠΥΛΟ-β-
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ**



Ειρήνη Χριστοδούλου

Φαρμακοποιός

A.M. 1009-10

Μ.Δ.Ε. «Βιομηχανική Φαρμακευτική»

Αθήνα 2012

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαχαίρας Παναγιώτης, Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας

Βαλσαμή Γεωργία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας και Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αρχοντάκη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών, Τομέας Αναλυτικής Χημείας

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με τη συνεργασία των:

- **Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής-Φαρμακοκινητικής** – Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας - Φαρμακευτικό Τμήμα - Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας** – Χημικό Τμήμα – Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **Τμήμα Πειραματικής Χειρουργικής** – Ινστιτούτο Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (Ι.Ι.Β.Ε.Α.Α.)

ΚΑΤΙ ΣΑΝ ΠΡΟΛΟΓΟΣ...

Τα χρόνια πέρασαν... Φοίτησα στη Φαρμακευτική Σχολή Αθήνας και έγινα Φαρμακοποιός... Και τώρα αποφοιτώ και από το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης της Βιομηχανικής Φαρμακευτικής... Μεγάλωσα...

Θα έλεγε κανείς πως όλα αυτά αποτελούν απλώς τη φυσική εξέλιξη των πραγμάτων...Κάθε κύκλος κλείνει για να ανοίξει ένας καινούριος, και ούτω καθεξής... Δύσκολο βέβαια στις δικές μας εποχές, τις εποχές των φαύλων κύκλων, των πισωγυρισμάτων και της αβεβαιότητας να μιλά κανείς για νέα αρχή, για εξέλιξη, για βελτίωση. Πολλοί το θεωρούν και ανούσιο. Ίσως ανάμεσα σ' αυτούς να είμαι και εγώ... Παρόλα αυτά δε θα ήθελα να προλογίσω το μεταπτυχιακό μου με απαισιόδοξο τόνο επειδή δεν του αξίζει και δεν του αρμόζει και ίσως επειδή κατά βάθος υπάρχει ελπίδα...

Θέλω λοιπόν να ευχαριστήσω την καθηγήτρια-σύμβουλό μου κυρία Γεωργία Βαλσαμή για τη βοήθεια, τη συμπαράσταση, την κατανόηση αλλά και το ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε να εκπονήσω. Την καθηγήτρια του Χημικού Τμήματος κυρία Ελένη Αρχοντάκη για τις πολύτιμες συμβουλές αναλυτικής φύσεως αλλά και για τις ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις και την τροφή για σκέψη που παρείχε σε κάθε συνάντηση. Τον επικεφαλής του Τμήματος Πειραματικής Χειρουργικής του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.) κύριο Νικόλαο Κωστομητσόπουλο για την παροχή της απαραίτητης υποδομής και των πειραματοζώων αλλά και για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διάρκεια της in vivo πειραματικής διαδικασίας. Και μαζί με αυτούς, το Βαγγέλη Μπαλάφα για την καταλυτική του συμβολή στη συλλογή των δειγμάτων και το χειρισμό των πειραματοζώων, το Σταύρο Τζίμα για την εκμάθηση παρασκευής του συμπλόκου, τον Αλέξανδρο Κούρεντα και τη Γεωργία Χαρκοφτάκη για την εκμάθηση του συστήματος HPLC, το Θύμιο Νερούτσο για τα προβλήματα που προέκυπταν με το σύστημα HPLC και ήταν εκεί, τον καθηγητή κύριο Κωνσταντίνο Δεμέτσο και τη Νατάσσα Πίππα για την ευγενική παραχώρηση του λυοφιλοποιητή και βεβαίως τον καθηγητή Παναγιώτη Μαχαίρα που με τιμά με την παρουσία του στην επιτροπή αξιολόγησης της εργασίας και που επέδειξε τη στήριξή του στα χρόνια της φοιτητικής μου πορείας.

Και επειδή κανείς δεν έρχεται μόνος σ' αυτή τη ζωή θέλω οπωσδήποτε να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τον πατέρα μου Παύλο, τη μητέρα μου Ελένη και τον αδερφό μου Χάρη, που μου έδωσαν τα εφόδια να αγαπήσω αυτό που κάνω, που με έμαθαν να εκτιμώ και να εμβαθύνω, να αναζητώ και να σκέφτομαι... Όσο για τους πολύ κοντινούς μου ανθρώπους, ευχαριστώ που τους έχω γύρω μου και ξέρω ότι μπορώ να στηριχτώ σε αυτούς. Δημήτρη, Ντίνα, Ορέστη... να είστε καλά!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ	ΤΙΤΛΟΣ	ΣΕΛΙΔΑ
1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1	ΔΡΟΓΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ	1
1.2	ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗ	3
1.2.1	Χημική κατηγορία-Ιδιότητες	3
1.2.2	Προέλευση-Ιστορική Αναδρομή	4
1.2.3	Μοριακή Δομή-Φυσικοχημικές Ιδιότητες και Χαρακτηριστικά	6
1.2.4	Μηχανισμός Δράσης-Φαρμακολογικές Ιδιότητες	7
1.2.5	Θεραπευτική Χρήση	9
1.2.6	Κυριότερες Φαρμακοτεχνικές Μορφές-Δοσολογία	10
1.2.7	Φαρμακοκινητική	12
1.2.8	Μεταβολισμός	14
1.2.9	Τοξικότητα-Ανεπιθύμητες Ενέργειες	15
1.2.10	Βιοφαρμακευτική Κατάταξη της Σιλιμπινίνης	16
1.2.11	Μέθοδοι Αύξησης της Διαλυτότητας και της Βιοδιαθεσιμότητας της Σιλιμπινίνης	16
1.3	PER OS ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΙ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	19
1.3.1	Φυσιολογία και Οργάνωση του Γαστρεντερικού Συστήματος	20
1.3.2	Παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική απορρόφηση	22

1.3.3	Μηχανισμοί μεταφοράς διαμέσου της εντερικής βλεννογόνου	25
1.4	ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	27
1.4.1	Ο κανόνας των 5	27
1.4.2	Διάλυση και Διαλυτότητα	28
1.5	ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (BIOPHARMACEUTICS CLASSIFICATION SYSTEM-BCS)	30
1.5.1	Εισαγωγή	30
1.5.2	Ταξινόμηση	30
1.5.3	Κατηγοριοποίηση σε τάξεις/κλάσεις	32
1.5.4	Ορισμοί για το BCS	34
1.6	ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΞΗΣΗΣ/ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ	35
1.7	ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ	37
1.7.1	Εισαγωγή	37
1.7.2	Ιστορική Αναδρομή	37
1.7.3	Δομή κυκλοδεξτρινών και φυσικοχημικές ιδιότητες	39
1.7.4	Σύμπλοκα εγκλεισμού κυκλοδεξτρινών	41
1.7.5	Παρασκευή Συμπλόκων Εγκλεισμού	41
1.7.6	2-Υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)	42

1.7.7	Εφαρμογές κυκλοδεξτρινών	43
1.8	ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΪΣΟΔΥΝΑΜΙΑ	46
1.8.1	Εισαγωγή	46
1.8.2	Εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας-Σχετική και Απόλυτη Βιοδιαθεσιμότητα	47
1.8.3	Βιοϊσοδυναμία	48
1.9	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΕ ΖΩΑ	49
1.9.1	Γενικές πληροφορίες	49
1.9.2	Ιστορική Αναδρομή	49
1.9.3	Κανονισμοί	50
1.9.4	Εφαρμογές in vivo πειραματισμών	51
1.9.5	Γενικά συμπεράσματα γύρω από τον in vivo πειραματισμό	52
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	53
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
2.1	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	54
2.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ	54
2.3	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ	55
2.4	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ/ΗΡ-β-CD ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ 1:1	57
2.5	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	58
2.5.1	<i>In vitro</i> πειραματική διαδικασία	58
2.5.2	<i>In vivo</i> πειραματική διαδικασία	59

2.5.3	Επεξεργασία δειγμάτων	60
2.5.4	Καμπύλες αναφοράς σιλιμπινίνης	61
2.5.5	HPLC μέθοδος για την ανάλυση των δειγμάτων	61
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
3.1	ΦΑΣΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	62
3.2	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	62
3.2.1	Καμπύλες αναφοράς για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της σιλιμπινίνης	63
3.2.2	Καμπύλες αναφοράς για τον προσδιορισμό με HPLC της μητρικής (parent) σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος	64
3.2.3	Καμπύλες αναφοράς HPLC για τον προσδιορισμό της ολικής σιλιμπινίνης (μητρικής και μεταβολίτη) στον ορό του αίματος	65
3.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΛΥΟΦΙΛΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΗΡ-β-CD/SLB ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΥΔΩΡ	66
3.4	ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	67
3.5	ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOQ)	68
3.6	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ HPLC	69
3.7	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ -ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	72
3.7.1	Μη-διαμερισματική ανάλυση αραιών δεδομένων (NCA sparse methodology)	74

3.7.2	Υπολογισμός της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της σιλμπινίνης	74
3.7.3	Διαμερισματική ανάλυση των αποτελεσμάτων	76
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	84
	ABSTRACT	86
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	88

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΔΡΟΓΕΣ ΚΑΙ ΦΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ

Τα φυτά έχουν την ικανότητα να συνθέτουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών μορίων που χρησιμοποιούνται για την περαίωση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών αλλά και για την άμυνα εναντίον «εισβολέων», όπως τα έντομα, οι μύκητες και τα φυτοφάγα θηλαστικά. Πολλές από τις φυτοχημικές ενώσεις έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ανθρώπου μακροπρόθεσμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματική αντιμετώπιση ασθενειών. Τουλάχιστον 12.000 τέτοια μόρια έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα, αριθμός που αντιστοιχεί σε λιγότερο από 10% του συνόλου που υπάρχουν στη φύση. Τα φυτικά χημικά μόρια δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω διεργασιών ανάλογων με αυτούς των συνθετικών φαρμάκων, καθιστώντας τα με τον τρόπο αυτό ισοδύναμα με τα συμβατικά φάρμακα τόσο ως προς τη δράση όσο και ως προς την πιθανότητα εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών.

Η χρήση των φυτών ως φαρμάκων χρονολογείται από τα βάθη της ιστορίας. Η Εθνοβοτανική (μελέτη των παραδοσιακών χρήσεων των φυτών από τους ανθρώπους) αναγνωρίστηκε ως ένας αποτελεσματικός τρόπος ανακάλυψης μελλοντικών φαρμάκων. Το 2001, ερευνητές ταυτοποίησαν 122 μόρια που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη θεραπευτική με αυτά που προέρχονταν από την Εθνοβοτανική. Πολλά από τα φαρμακευτικά μόρια που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας έχουν μακρά ιστορία χρήσης ως φυτικά θεραπευτικά μέσα, ανάμεσά τους η ασπιρίνη, η διγίταλίτιδα, η κινίνη και το όπιο.

Όλα τα φυτά παράγουν χημικά μόρια ως μέρος των φυσιολογικών μεταβολικών τους διεργασιών. Οι φυτοχημικές αυτές ουσίες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

A. Τους πρωτογενείς μεταβολίτες όπως τα σάκχαρα και τα λίπη, και

B. Τους δευτερογενείς μεταβολίτες, μόρια που συναντώνται σπανιότερα και σε μικρότερες ποσότητες στα φυτά και συμμετέχουν σε πιο εξειδικευμένες διεργασίες.

Για παράδειγμα, κάποιοι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι τοξίνες χρήσιμες για την απομάκρυνση των ζώων και άλλοι είναι φερομόνες για την προσέλκυση εντόμων κατά την περίοδο της αναπαραγωγής των φυτών.

Ορισμένες από τις βασικές κατηγορίες ενώσεων που παράγουν τα φυτά είναι οι εξής:

- Αλκαλοειδή: Περιέχουν στο μόριό τους ένα δακτύλιο με άζωτο. Τα περισσότερα είναι τοξικά για του υπόλοιπους οργανισμούς. Συνήθως εμφανίζουν φαρμακολογική δράση και χρησιμοποιούνται ως φάρμακα και αναγεννητικές ουσίες. Ορισμένα παραδείγματα είναι η αναλγητική κοκαΐνη, η ψυχεδελική ψιλοκίνη, η αντιυπερτασική ρεζερπίνη, η αντικαρκινική βινκριστίνη κ.α. Χαρακτηριστικό των ενώσεων αυτών είναι η κατά κανόνα πικρή γεύση.
- Πολυφαινόλες: Περιέχουν φαινολικούς δακτυλίους στο μόριό τους και ορισμένα παραδείγματα είναι οι ανθοκυανίνες που προσδίδουν το μωβ χρώμα των σταφυλιών και οι ταννίνες στις οποίες οφείλεται η στυπτική ιδιότητα του τσαγιού.
- Γλυκοσίδες: Πρόκειται για μόρια στα οποία ένα μόριο σακχάρου συνδέεται με ένα μη καρβοξυλικό μόριο. Οι γλυκοσίδες παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στους ζώντες οργανισμούς. Πολλά φυτά αποθηκεύουν οργανικές ενώσεις με τη μορφή ανενεργών γλυκοσιδών. Οι ενώσεις αυτές ενεργοποιούνται μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης, που οδηγεί σε απόσπαση του σακχάρου. Πολλοί γλυκοσίδες χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικά μόρια. Τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους, τοξικές ενώσεις δεσμεύονται από σάκχαρα με σκοπό την απομάκρυνσή τους. Κατά συνέπεια, οι γλυκοσίδες μπορούν να φανούν ιδιαίτερα χρήσιμοι στην αντιμετώπιση δηλητηριάσεων.
- Τερπένια: Αποτελούν μια μεγάλη ομάδα οργανικών μορίων που παράγονται από πληθώρα φυτών, κυρίως κωνοφόρων, με έντονη οσμή. Είναι τα πρωταρχικά συστατικά των απαραίτητων ελαίων φυτών και ανθέων, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στην αρωματοθεραπεία, την αρωματοποιία, ως προσθετικά στις τροφές για βελτίωση οσμής και γεύσης κ.α.
- Φλαβονοειδή: Ομάδα μορίων που επίσης απαντώνται ευρύτατα στα φυτά. Συνήθως έχουν άμεση σχέση με το χρωματισμό των καρπών και των άλλων οργάνων του φυτού. Σε αυτά εντάσσεται και το υπό μελέτη μόριο σιλμπινίνη που αναλύεται περαιτέρω στην επόμενη ενότητα.

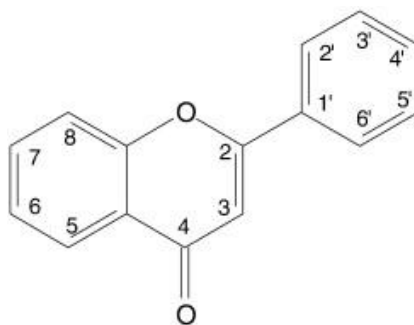
1.2. ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗ

1.2.1. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ-ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η σιλιμπινίνη ή αλλιώς σιλιμπίνη εντάσσεται στην ευρύτερη χημική κατηγορία των флаβονοειδών. Τα флаβονοειδή αποτελούνται από μια ομάδα 6000 και πλέον μορίων που συναντώνται κυρίως σε φυτά με αγγειακό σύστημα και έχουν την ικανότητα να προσδίδουν το κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα στα φύλλα, τα λουλούδια και τους καρπούς των φυτών από τα οποία προέρχονται (Havsteen et al., 2002; Erlund et al., 2004). Συνήθως, εντοπίζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα φρούτα (κυρίως του γένους *Citrus*) και τα λαχανικά. Ροφήματα και αφεψήματα, όπως το κρασί, το τσάι, ο καφές και η μπύρα καθώς και πληθώρα φαρμακευτικών φυτών έχουν εξίσου υψηλή περιεκτικότητα σε флаβονοειδή (Di Carlo et al., 1999; Ghedira et al., 2005).

Είναι γνωστό ότι πολλά ιαματικά σκευάσματα με βάση φαρμακευτικά φυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε флаβονοειδή χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα στην παραδοσιακή ιατρική ανά τον κόσμο. Ο μηχανισμός δράσης τους συνήθως αφορά στην τροποποίηση της ενεργότητας ορισμένων ενζύμων με αποτέλεσμα την ρύθμιση του κυκλοφορικού συστήματος. Σήμερα πλέον οι ιδιότητες που προσδίδονται στα флаβονοειδή είναι η αντιοξειδωτική, η αγγειοπροστατευτική, η αντιπηπτοτοξική, η αντιαλλεργική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιελκωτική και σε σημαντικό βαθμό η αντικαρκινική (Morazzoni et al., 1995; Rambaldi et al., 2005).

Ο γενικός χημικός τύπος των флаβονοειδών περιλαμβάνει το σκελετό της βενζο-γ-πυρόνης και κατηγοριοποιούνται με βάση τους υποκαταστάτες του βενζολικού δακτυλίου που ενώνεται στη θέση 2 της πυρόνης και το βαθμό κορεσμού του σκελετού (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Βασικός σκελετός φλαβονοειδούς

1.2.2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ-ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η σιλιμπινίνη απομονώνεται από τους καρπούς του φυτού *Silybum marianum* Gaertner, οικ. *Asteraceae* (= *Cardus marianus* L., κν.γαϊδουράγκαθο). Πρόκειται για ετήσιο ή διετές φυτό του οποίου το ύψος φτάνει συνήθως ως το 1,5 m. Ετυμολογικά, “*Silybum*” είναι το όνομα που έδωσε ο Διοσκουρίδης για το βρώσιμο μέρος του φυτού, ενώ το δεύτερο συνθετικό “*marianum*” προέρχεται από το θρύλο που θέλει τα λευκά αγγεία που διατρέχουν τα φύλλα του φυτού να πήραν το χρώμα τους από μια σταγόνα από το γάλα της θηλάζουσας Μαρίας της Παρθένου (Παναγίας). Λέγεται ότι στην αναζήτηση ασφαλούς μέρους για να θηλάσει τον Ιησού, καθώς έφευγε από την Αίγυπτο, βρήκε ως καταφύγιο μια «φωλιά» από γαϊδουράγκαθα. Εξαιτίας της παραδοσιακής αυτής πίστης, γεννήθηκε η άποψη ότι το γαϊδουράγκαθο είναι ευεργετικό για τις μητέρες που θηλάζουν (Rambaldi et al., 2005; Abenavoli et al., 2010).

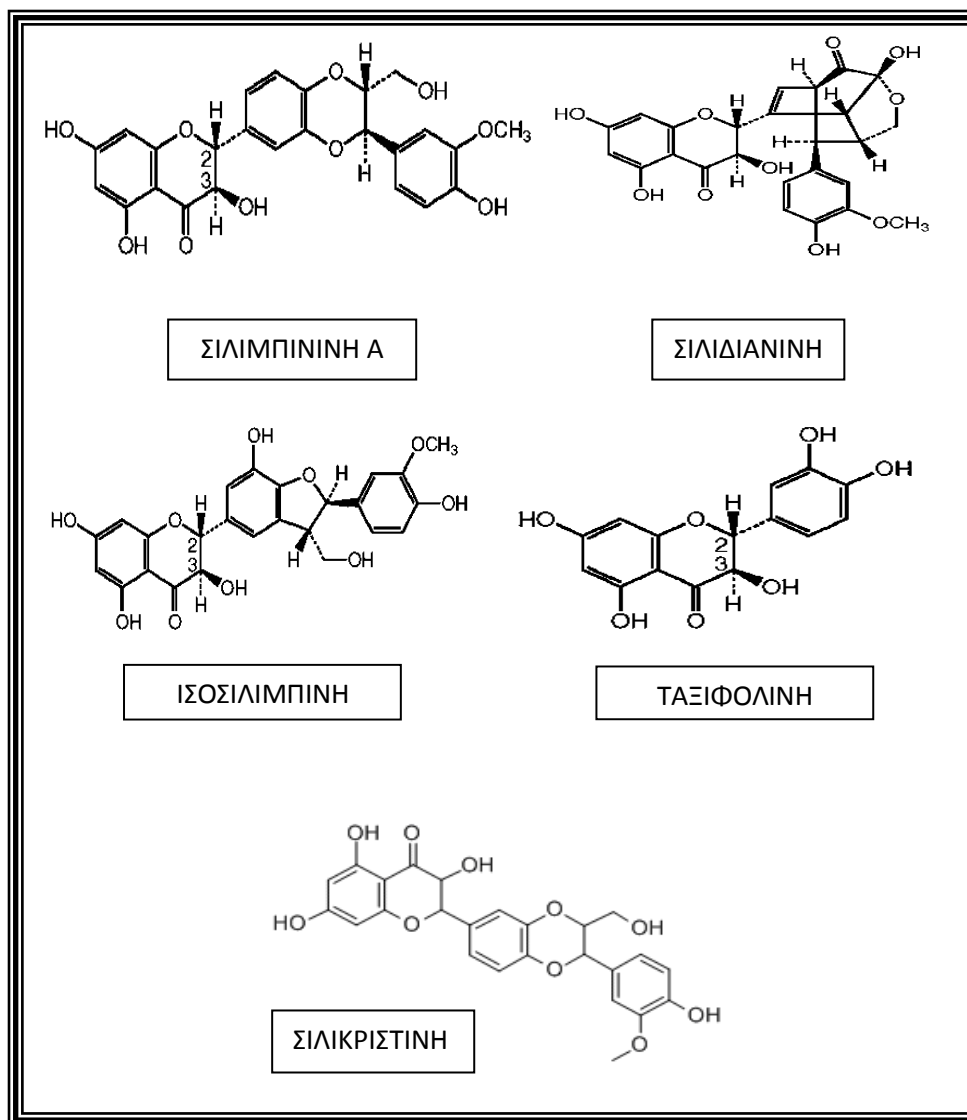
Το φυτό *Silybum marianum* ευδοκίμει στη νότια Ευρώπη και Ρωσία, τη Μικρά Ασία και τη Βόρεια Αφρική αλλά συναντάται επίσης στη Βόρεια και Νότια Αμερική αλλά και στη Βόρεια Αυστραλία. Φυτρώνει σε θερμό, στεγνό έδαφος και ανθίζει κατά την περίοδο Ιουλίου-Αυγούστου. Η σιλιμπινίνη αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του μίγματος φλαβονοειδών με τη γενική ονομασία «σιλυμαρίνη» που απομονώνεται από τον ωοειδή καρπό (αχάινιο) του φυτού μετά την απομάκρυνση του χνουδιού (Abenavoli et al., 2010).

Η σιλυμαρίνη συνίσταται σε 50 % περίπου σιλιμπινίνη (διαστερεοϊσομερή Α και Β), 25 % σιλικριστίνη και 25 % σιλιδιανίνη. Σε ίχνη απαντώνται και τα ταυτοποιημένα φλαβονολιγνάνα ισοσιλιμπίνη, 2,3-διυδρο-σιλιμπίνη, 2,3-διυδρο-

σιλικριστίνη, σιλυχερμίνη, δεσοξυσιλικριστίνη, σιλανδρίνη και σιλιμπινόμη. Η ταξιφολίνη είναι ένα ακόμη 2,3-διυδρο-φλαβονοειδές που ανιχνεύεται στους καρπούς. Οι δομές των κυριότερων περιεχομένων της σιλυμαρίνης φαίνονται στην Εικόνα 3 (Νικολακοπούλου, 2007; Abenavoli et al., 2010).

Η παλαιότερα καταγεγραμμένη χρήση του *Silybum marianum*, φτάνει στην εποχή του Διοσκουρίδη, όταν χρησιμοποιούνταν ως αντίδοτο για την αντιμετώπιση δηγμάτων από ερπετά. Ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος ανέφερε ότι μίγμα του χυμού του φυτού με μέλι ήταν ιδανικό για την έκκριση της χολής. Κατά το Μεσαίωνα το γαϊδουράγκαθο χρησιμοποιείται για πρώτη φορά ως αντίδοτο στις ουσίες που προκαλούν ηπατοτοξικότητα, ενώ αργότερα χρησιμοποιήθηκε από τον Βρετανό βοτανολόγο Culpeper για την ανακούφιση της ηπατικής απόφραξης (Flora et al., 1998; Foster, 1999). Το 1898, οι Felter και Lloyd αναγνώρισαν ότι το βότανο αυτό ήταν κατάλληλο για την υπεραιμία του ήπατος, του σπλήνα και των νεφρών. Οι ιθαγενείς της Αμερικής χρησιμοποίησαν το *Silybum marianum* για τη φροντίδα δοθιήνων και άλλων δερματικών παθήσεων. Ομοιοπαθητικοί πρακτικοί χρησιμοποιούσαν παρασκευάσματα από τους σπόρους του φυτού για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών, μεταξύ των οποίων ο ίκτερος, η χολολιθίαση, η περιτονίτιδα, η αιμορραγία, η βρογχίτιδα, οι κισοί (Blumenthal et al, 1998; Post-White et al., 2007).

Στις μέρες μας, το *Silybum marianum* χορηγείται για την αντιμετώπιση της ηπατικής δυσλειτουργίας. Μάλιστα, η Γερμανική Φαρμακοποιία E προτείνει ως κύρια χρήση τη θεραπεία πεπτικών και ηπατικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων την επαγόμενη από τοξίνες ηπατική καταστροφή και την ηπατική κίρρωση, και ως δευτερεύουσα την υποστηρικτική θεραπεία χρόνιων ηπατικών φλεγμονών (Post-White et al., 2007).



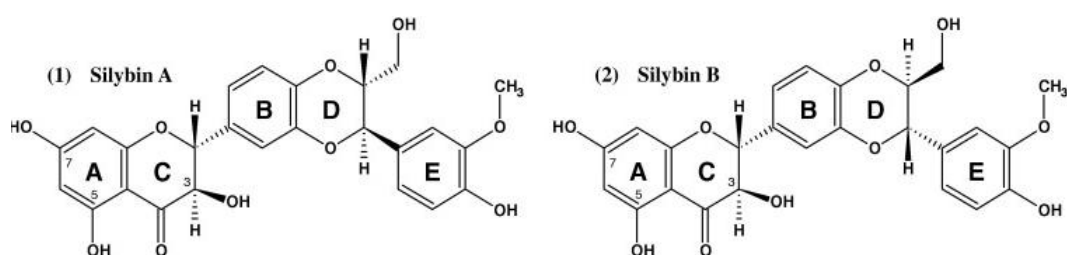
Εικόνα 2: Μοριακή δομή των κυριότερων συστατικών της σιλυμαρίνης

1.2.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ-ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η σιλμπινίνη είναι οργανική ένωση με γενικό μοριακό τύπο $C_{25}H_{22}O_{10}$, μοριακό βάρος (Μ.Β.) 482,44 και συστηματική κατά IUPAC ονομασία 3,5,7-τριυδροξυ-2-(3-(3-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλο)-2-(υδροξυμεθυλο)-2,3 διυδροβενζο[β][1,4] διοξιν-6-υλ) χρωμαν-4-όνη. Πρόκειται για στερεό, λευκού χρώματος, με χαρακτηριστική φωτοευαισθησία και φωτοχημική ενεργότητα (Dixit et al., 2007; Μήτσικας και Τζίμας, 2008). Είναι σχετικά ασταθής ένωση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυλάσσεται συνήθως σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Βασικό

χαρακτηριστικό που παίζει και ιδιαίτερο ρόλο στη μελέτη της ένωσης γενικότερα είναι η χαμηλή διαλυτότητά της στο νερό. Παράλληλα, είναι διαλυτή στη μεθανόλη, την αιθανόλη (0,1 μg/mL), την ακετόνη, το DMSO (10 mg/mL), το DMF και μερικώς στο CHCl₃ (www.liversupport.com/milkthistle; Merck Index, 1997; Sigma Aldrich catalogue, 2012).

Η σιλμπινίνη έχει 16 στερεοϊσομερή εκ των οποίων τα δύο βασικότερα είναι η σιλμπινίνη Α με στερεοχημεία 2R, 3R, 2'S, 3'S και η σιλμπινίνη Β με στερεοχημεία 2R, 3R, 2'R, 3'R (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Διαστερομερή σιλμπινίνης

Το σημείο τήξης της σιλμπινίνης βρίσκεται μεταξύ 158 και 180 °C, και πρόκειται για ουσία ιδιαίτερα ερεθιστική για τα μάτια, το αναπνευστικό σύστημα και το δέρμα, με LD₅₀ μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε μύες 1056 mg/kg σωματικού βάρους (www.liversupport.com/milkthistle).

1.2.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η σιλυμαρίνη, και κατά συνέπεια η σιλμπινίνη, είναι κυρίως γνωστή για τις αντιοξειδωτικές, καθώς και για τις χημειοπροστατευτικές της ιδιότητες επί του ήπατος. Σε εργαστηριακές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η σιλμπινίνη σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο το κύτταρο από την είσοδο τοξικών ουσιών (Hruby et al., 1983; Campos et al, 1989; Letteron et al., 1990; Farghali et al., 2000) αλλά και βοηθώντας στην αποβολή τοξινών προς το εξωκυττάριο περιβάλλον με σκοπό την επιβίωση του κυττάρου (Valenzuela et al., 1987; Campos et al., 1988; Shear et al., 1995). Κατά τη χορήγηση σιλυμαρίνης σε επίμυες που έχουν δηλητηριαστεί με τοξίνες παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα

γλουταθειόνης στο ήπαρ, μείωση του οξειδωτικού στρες και περιορισμός της διακύμανσης των τιμών των ηπατικών ενζύμων. Η σιλμπινίνη αποδείχθηκε επίσης ότι έχει την ικανότητα να επάγει ή να αναστέλλει τη φάση I των πορειών αποτοξίνωσης του οργανισμού (Venkataramanan et al., 2000; Zuber et al., 2002), να επάγει τη φάση II (Zhao et al., 1999) και να επιταχύνει την αναγέννηση των ηπατικών κυττάρων μέσω της επαγωγής της σύνθεσης των πρόδρομων τμημάτων DNA καθώς και να επιτείνει την παραγωγή κυτταρικών ενζύμων (Sonnenbichler et al., 1976; Sonnenbichler et al., 1984; Sonnenbichler et al., 1986; Sonnenbichler and Goble, 1986). Με τον τρόπο αυτό δρα ενάντια των τοξινών τουμανιταριού *Amanita phalloides*, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως το μόνο αντίδοτο ικανό να αναστρέψει τα πιθανώς θανατηφόρα αποτελέσματα μιας τέτοιας δηλητηρίασης.

Παρόλα αυτά διαφαίνεται ότι ο μηχανισμός-κλειδί για την ηπατοπροστασία είναι η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών συμπεριλαμβανομένων και αυτών που οδηγούν σε λιπιδική υπεροξειδωση, η οποία σημαίνει την εκφύλιση των κυτταρικών μεμβρανών και την πρόκληση διαταραχών στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Mouliskoná et al., 2006). Συγκεκριμένα, αναστέλλει την υπεροξειδωση του λινολεϊκού οξέος από τη λιποξυγενάση και μειώνει τη σύνθεση της χοληστερόλης στο ήπαρ. Η διαδικασία αυτή συνδέεται ταυτόχρονα και με αντιφλεγμονώδη δράση της σιλμπινίνης, καθώς η αναστολή του μονοπατιού της 5-λιποξυγενάσης οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης λευκοτριενίων, χωρίς επίδραση στην παρατηρούμενη συγκέντρωση των προσταγλανδινών. Μέσω των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων, η σιλμπινίνη ελαττώνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, αναστέλλει τον παράγοντα κΒ και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων ενώ εξισορροπεί την αλληλουχία των διαδικασιών μεταγραφής που επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η φλεγμονή (αντιφλεγμονώδης δράση) και αυξάνεται η ανθεκτικότητα του ήπατος έναντι του οξειδωτικού στρες (Pradhan et al., 2006).

Σήμερα, η σιλμπινίνη αρχίζει να γίνεται και ευρύτερα γνωστή για τις αντικαρκινικές-αντινεοπλασματικές της ιδιότητες, που συνδέονται ευθέως με την αντιοξειδωτική της δράση (Muriel et al., 1990). Σε προκλινικές μελέτες παρατηρήθηκε η άμεση αντικαρκινική δράση στον προστάτη, το στήθος και τον τράχηλο της μήτρας (Bhatia et al., 1999; Zi et al., 1999). Με την in vitro μελέτη ενός

συνθετικού αναλόγου της σιλιμπινίνης, παρατηρήθηκε ενίσχυση της αποτελεσματικότητας του cisplatin και της δοξορουβικίνης ενάντια στον καρκίνο των ωοθηκών, του στήθους και του προστάτη καθώς και συνεργιστική δράση με τη βινκριστίνη ενάντια στη λεμφοβλαστική λευχαιμία (Ladas et al., 2006). Το 1997, οι Skottová και Krecman ανέφεραν μετά από μελέτες την πιθανότητα χρήσης του μίγματος φλαβονοειδών της σιλυμαρίνης ως υποχοληστερηναιμικού φαρμάκου (Skottová et al., 1998). Αυτό συνδέθηκε άρρηκτα με το γεγονός ότι ο ποικίλης αιτιολογίας τραυματισμός του ήπατος συνοδεύεται από διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπών που αντικατοπτρίζονται με τη μορφή δευτεροπαθούς δυσλιποπρωτεϊναιμίας. Αποδείχθηκε ότι η θεραπεία με σιλυμαρίνη μείωσε σημαντικά τα ποσοστά ολικής και LDL χοληστερόλης στο πλάσμα σε υπερλιπιδαιμικούς επίμυες (Rui et al., 1991).

1.2.5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

Η κυριότερη και πιο αξιόλογη χρήση της σιλυμαρίνης (και κατά συνέπεια και της σιλιμπινίνης) είναι στη δηλητηρίαση από το μανιτάρι *Amanita phalloides*. Πολλά από τα είδη *Amanita* είναι ιδιαίτερα τοξικά και η βρώση τους μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή ηπατική βλάβη, ακόμα και θάνατο. Το μανιτάρι αυτό περιέχει δύο πολύ ισχυρές ηπατοτοξίνες, τις αμανιτίνη και φαλλοειδίνη. Η σιλιμπινίνη χορηγούμενη σε συνδυασμό με βενζυλο-πενικιλίνη δρα αποτελεσματικά έναντι της δηλητηρίασης με αμανιτίνη (Pradhan et al., 2006; Dixit et al., 2007).

Επίσης, αρκετές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η σιλυμαρίνη είναι αποτελεσματική έναντι τόσο της οξείας όσο και της χρόνιας ηπατίτιδας. Σε οξεία ιογενή ηπατίτιδα, η χορήγηση σιλυμαρίνης σε δόση 140 mg, 3 φορές την ημέρα για 3 εβδομάδες μείωσε το χρόνο εφαρμογής της θεραπείας και ελάττωσε τα επίπεδα μπιλρουμπίνης στον ορό, καθώς και αυτά της AST (aspartate aminotransferase).

Σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα, 420 mg σιλυμαρίνης την ημέρα για 6 μήνες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων στον ορό του αίματος (Magliulo et al., 1978).

Επιπρόσθετα, η χορήγηση σιλυμαρίνης βοηθά στην αποκατάσταση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων σε ασθενείς με αλκοολική ηπατική νόσο καθώς και στη βελτίωση της ιστολογικής μορφής του ήπατος (Fehér et al., 1989).

Σε ασθενείς με ψωρίαση, έχουν παρατηρηθεί δυσανάλογα υψηλά επίπεδα cAMP και λευκοτριενίων. Κατά συνέπεια, η σιλυμαρίνη, βοηθά στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου μέσω αναστολής της cAMP φωσφοδιεστεράσης και της σύνθεσης λευκοτριενίων (Fiebrich et al., 1978; Kock et al., 1985).

Οι πλέον πρόσφατες εφαρμογές της σιλιμπινίνης στη θεραπευτική περιλαμβάνουν την αντιμετώπιση νεοπλασμάτων του ουροποιητικού συστήματος που οφείλονται στην τοξικότητα της N-βουτυλο-N (4-υδροξυβουτυλο) νιτροζαμίνης (Vinh et al., 2002), την αντιμετώπιση της ηπατοτοξικότητας από τετραχλωράνθρακα, φαινυλ-υδραζίνη, tert-βουτυλ-υπεροξείδιο, αιθανόλη, αλλοθάνιο, θειοακεταμίδιο, γαλακτοζαμίνη, παρακεταμόλη, ερυθρομυκίνη, μικροκυστίνη (Schriewer et al., 1973; Siegers et al., 1983; Valenzuela et al., 1985; Valenzuela et al., 1986; Davila et al., 1989; Muriel et al., 1990; Letteron et al., 1990; Mereish, 1991; Muriel et al., 1992; Datta et al., 1999; Thakur, 2002), καθώς και την προστασία και θεραπεία καρκίνου του προστάτη, μαστού, πνεύμονα και ορθού (Tyagi et al., 2002; Dhanalakshmi et al., 2003; Singh et al., 2004; Davis-Searles et al., 2005; Varghese et al., 2005; Hoh et al., 2006; Singh et al., 2006).

Αρχικές μελέτες σε πληθυσμούς που δεν πάσχουν από καρκίνο υποδεικνύουν τη χρήση του Σίλυβου στη θεραπεία του διαβήτη. Κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι η σιλιμπινίνη μπορεί να περιορίσει την ινσουλινοαντίσταση των ιστών σε περίπτωση αλκοολικής ηπατικής κίρρωσης (Lirussi et al., 2002; Greenlee et al., 2007), καθώς και να παρεμποδίσει την νευροπάθεια που οφείλεται σε αυτήν.

1.2.6. ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ-ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ

Τα περισσότερα εμπορικά σκευάσματα περιέχουν συνήθως 70-80% σιλυμαρίνη με κυριότερο συστατικό τη σιλιμπινίνη. Οι ερευνητές που σχεδιάζουν και πραγματοποιούν κλινικές μελέτες συνήθως επιλέγουν τα συγκεκριμένα σκευάσματα σε δοσολογία 140 mg, 3 φορές την ημέρα. Στον **Πίνακα 1**

καταγράφονται οι δόσεις ενηλίκων και παιδιών ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή και τη θεραπευτική εφαρμογή.

Πίνακας 1.1: Επιλέγοντας φαρμακοτεχνική μορφή σιλιμπινίνης/σιλυμαρίνης και δοσολογία ανά περίπτωση (Blumenthal, 2003; Greenlee et al., 2007)			
ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ	ΔΟΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ	ΔΟΣΗ ΠΑΙΔΙΩΝ	ΑΙΤΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΤΗΣ ΕΚΑΣΤΟΤΕ Φ/Μ
Συμπαγής σπόρος σε ψύξη	5 – 10 g δύο ή τρεις φορές την ημέρα	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Αλκοολικοί ασθενείς- Ασθενείς που αποφεύγουν την φαρμακευτική αγωγή
Αφέψημα	3,5 g σπασμένου σπόρου σε 150 mL βραστού νερού για 30 min (2-3 φορές ημερησίως)	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Ανάγκη για υγρή μορφή χορήγησης
Υγρό εκχύλισμα (1:1, 70% αιθανόλη)	3-8 mL 3-5 φορές ημερησίως	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Ανάγκη για υγρή μορφή χορήγησης
Βάμμα (1:2, 1:3, 70% αιθανόλη)	3-10 mL 3-5 φορές ημερησίως	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Ανάγκη για υγρή μορφή χορήγησης
Εκχύλισμα με γλυκερίνη (1:2, 1:3, 75-100% γλυκερίνη)	5-10 mL 3-5 φορές ημερησίως	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Ανάγκη για υγρή μορφή χορήγησης, σε αλκοολικούς ασθενείς
Εκχύλισμα με σταθερή περιεκτικότητα σε σιλυμαρίνη 70-80% (Legalon® capsules)	140 mg 3 φορές την ημέρα	70-140 mg τρεις φορές την ημέρα	Διεξαχθείσες κλινικές μελέτες, χαμηλό κόστος, αλκοολικοί ασθενείς
Εκχύλισμα με 33% σιλυμαρίνη και 66% λεκιθίνη σόγιας (Siliphos®)	120 mg δύο ή τρεις φορές ημερησίως	60-120 mg δύο ή τρεις φορές ημερησίως	Επί ελλιπούς δράσης του Legalon®, σε ασθενείς με κακή απορρόφηση του φαρμάκου
Silibinin hemisuccinate, i.v.	5 mg/kg σωματικού βάρους με έγχυση διάρκειας 2 ωρών, έως 4 φορές την ημέρα	Παρόμοια με των ενηλίκων, προσαρμογή στο σωματικό βάρος	Σε οξεία δηλητηρίαση με <i>Amanita phalloides</i>

Όταν το φυτό *Silybum marianum* χρησιμοποιείται ως υποστηρικτική αγωγή στο ήπαρ ή για αποτοξίνωση, προτιμώνται τα εγχύματα, τα αφεψήματα, τα βάμματα, τα εκχυλίσματα και οι μη συμπιεσμένες κάψουλες (για υγιείς ανθρώπους-χρήση ως συμπληρώματα διατροφής). Σε συγκεκριμένες νόσους, χρησιμοποιούνται σε δισκία και κάψουλες με αυστηρά προσδιορισμένη περιεκτικότητα σε σιλιμπινίνη.

Στην Ευρώπη κυκλοφορούν τα δισκία Siliphos® 80 mg (σύμπλοκο με φωσφατιδυλοχολίνη) (Barzaghi et al., 1999; Flaig et al., 2006), τα επικαλυμμένα δισκία Legalon® 70 mg silymarin (www.intekom.com), τα δισκία Carsil® 35 mg (www.vitamins-supplements.org), Silymarol® 70 mg, Liverman® κ.α. Στην Αμερική, στο εμπόριο απαντώνται τα: Silibinin plus® 60 mg, Silybin phytosome® 120 mg κ.α (www.intekom.com).

Στην Ελλάδα, η σιλιμπινίνη εισάγεται από τον ΙΦΕΤ (Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας και Τεχνολογίας) ως αντίδοτο για τη δηλητήριαση απόμανιτάρια *Amanita phalloides* σε ενέσιμη μορφή 350 mg (www.ifet.gr). Τέλος, σε φαρμακεία και καταστήματα με βιολογικά προϊόντα κυκλοφορεί χυμός από γαϊδουράγκαθο (Mariendistel, Hubner).

1.2.7. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η σιλυμαρίνη είναι αδιάλυτη στο νερό και χορηγείται συνήθως σε ενκαψυλιωμένη μορφή (Arcari et al., 1992). Απορροφάται χορηγούμενη από του στόματος και η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα επιτυγχάνεται σε 6-8 ώρες. Η απορρόφηση κατά την από του στόματος χορήγηση περιορίζεται σε ποσοστό 23-47%, οδηγώντας αναπόφευκτα σε χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα του μορίου μετά από χορήγηση του εκχυλίσματος του φυτού (περιεκτικότητα 70-80% σε σιλυμαρίνη). Η ανακτησιμότητα στη χολή μετά την per os χορήγηση υπολογίζεται στο 2-3 % (Dixit et al., 2007).

Οι περιοριστικοί παράγοντες, κατά συνέπεια, στη χρήση της σιλιμπινίνης είναι η περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα και η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα λόγω της φτωχής εντερικής απορρόφησης.

Η απορρόφηση της σιλιμπινίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα, μετά από per os χορήγηση, είναι φτωχή λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητάς της. Σε εφάπαξ

χορήγηση της σιλιμπινίνης σε δόσεις 102, 153, 203, 254 mg σε υγιή άτομα, το AUC_{inf} βρέθηκε ότι είχε γραμμική συσχέτιση με τη δόση τόσο για την ολική όσο και για την ελεύθερη σιλιμπινίνη. Κατά μέσο όρο μόνο το 10% της ολικής σιλιμπινίνης βρισκόταν στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή (όχι υπό τη μορφή γλυκουρονιδίου). Ο τελικός χρόνος ημιζωής της ολικής σιλιμπινίνης ήταν 6h, της ελεύθερης λιγότερο από 1h και περίπου το 5% της δόσης απεκκρίθηκε με τα ούρα ως ολική σιλιμπινίνη με νεφρική κάθαρση περίπου 30 mg/mL (Weyhenmeyer et al., 1992). Μετά από χορήγηση 240 mg σιλιμπινίνης από το στόμα, το C_{max} κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα μεταξύ 0,18 έως 0,62 $\mu\text{g/mL}$. Μόνο το 3-8 % της δόσης απεκκρίθηκε με τα ούρα 24 h μετά τη χορήγηση (Lorenz et al., 1984). Σε άρρενες, μετά από εφάπαξ δόση σιλιμπινίνης (100-360 mg), το C_{max} στο πλάσμα μετά από 2 h κυμαίνεται μεταξύ 200 και 1400 $\mu\text{g/mL}$ με περίπου το 75% να βρίσκεται στη συζευγμένη μορφή. Στο ήπαρ συμπλέκεται με θειικά και γλυκουρονικά οξέα και με τη μορφή αυτών των μεταβολιτών καταλήγει μέσω του πλάσματος στη χολή όπου ανιχνεύεται σε ποσοστό 80% της αρχικής δόσης που χορηγήθηκε, με τη μέγιστη συγκέντρωση να επιτυγχάνεται εντός 2 έως 9 ωρών. Η ποσότητα που αποβάλλεται αμεταβόλιση με τα ούρα θεωρείται αμετάβλητη (Morazzoni et al., 1993). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν εντεροηπατική κυκλοφορία: εντερική απορρόφηση, σύζευξη στο ήπαρ, έκκριση στη χολή, υδρόλυση στην εντερική χλωρίδα και επαναπορρόφηση από το έντερο (Frachini et al., 2002). Η κατανομή της σιλιμπινίνης στους ιστούς μελετημένη σε *senecio* μύες μετά από *per os* χορήγηση σε δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους, έδειξε μέγιστη συγκέντρωση μετά από 30 min σε ήπαρ, πνεύμονες, στόμαχο και πάγκρεας και μετά από 1 h σε δέρμα και προστάτη. Η βιοδιαθεσιμότητα της σιλιμπινίνης τροποποιείται ανάλογα με τη φαρμακοτεχνική μορφή και το μέσο συμπλοκοποίησης (εστέρες σιλιμπινίνης με δικαρβοξυλικό οξύ, κυκλοδεξτρίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, PEG). Στον **Πίνακα 1.2** παρουσιάζονται συγκριτικά αποτελέσματα 3 διαφορετικών σκευασμάτων σιλιμπινίνης (Kim et al., 2003).

Πίνακας 1.2: Σύγκριση φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών τριών σκευασμάτων συλιμπινίνης			
ΦΚ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	LEGALON CAPSULE	SILYMARIN TABLET	LIVERMAN CAPSULE
C_{max} (μg/mL)	1.33 ± 0.546	1.13 ± 0.516	6.04 ± 1.90
t_{max} (h)	1.83 ± 0.940	2.10 ± 1.07	0.875 ± 0.369
AUC_{inf} (μg/mL x h)	6.00 ± 2.20	4.63 ± 1.96	15.1 ± 3.68
AUC_{0-12h} (μg/mL x h)	5.59 ± 1.85	4.24 ± 1.79	13.9 ± 3.38
Half-life ($t_{1/2}$, h)	3.42 ± 0.698	3.20 ± 0.654	3.91 ± 0.631
K_e (h ⁻¹)	0.220 ± 0.0504	0.226 ± 0.0509	0.182 ± 0.0362

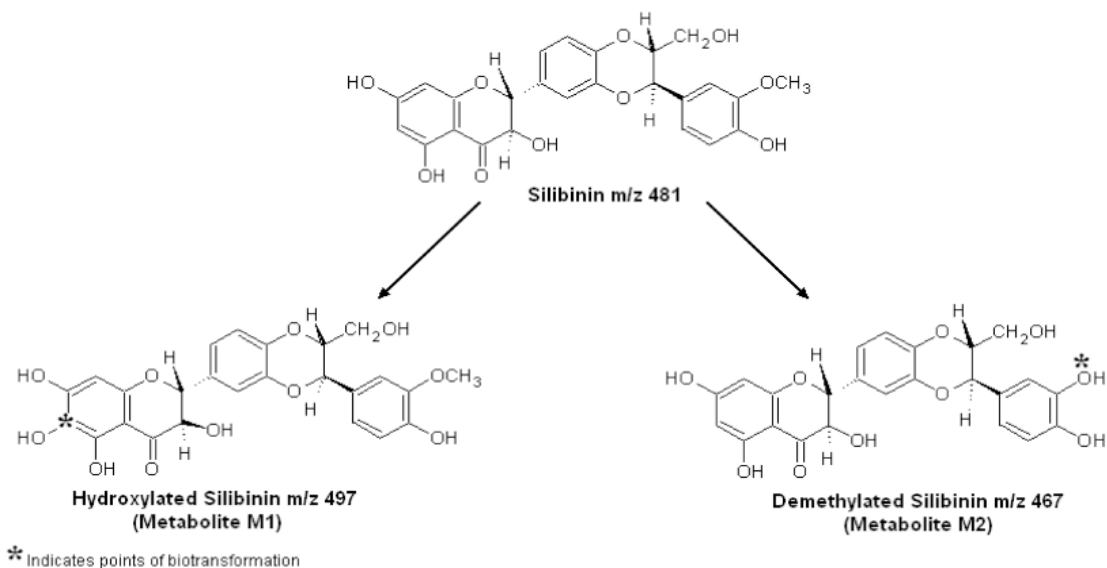
1.2.8. ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

Η συλιμπινίνη πιστεύεται ότι μεταβολίζεται κυρίως προς σύμπλοκα (π.χ. σουλφονικά και γλυκουρονικά) τόσο in vitro όσο και in vivo (Rickling et al., 1995; Kren et al., 2000; Han et al., 2004; D' Andrea et al., 2005; Wen et al., 2007). Μετά από τη μελέτη του Wen και των συνεργατών του, κατά την οποία μελετήθηκε η μεταβολική πορεία των φλαβονοειδών της σιλυμαρίνης ξεχωριστά και μετρήθηκαν τα επίπεδα τόσο της ελεύθερης μορφής τους όσο και της συζευγμένης τα συμπεράσματα που προέκυψαν ήταν ιδιαίτερα χρήσιμα και κατατοπιστικά (Wen et al., 2007). Καταρχήν, η συλιμπινίνη δεσμεύεται και εκκρίνεται μέσω της χολής και του ουρικού οξέος και δείχνει να έχει ένα ελάχιστο μεταβολισμό φάσης I από το ήπαρ (Flora et al., 1998; Frachini et al., 2002). Παρόλα αυτά, υπάρχουν ανεπαρκή στοιχεία για μεταβολισμό φάσης II και ο ρόλος των μεταφορέων in vivo παραμένει άγνωστος (Venkataramanan et al., 2006). Ο μεταβολισμός της σιλυμαρίνης in vivo ενδεχομένως να παίζει ρόλο στις αλληλεπιδράσεις βοτάνου-φαρμάκου, ειδικά όταν αυξάνονται οι χορηγούμενες δόσεις σιλυμαρίνης.

Ο Venisetty και οι συνεργάτες του κατέγραψαν την ενδεικτική μεταβολική πορεία της συλιμπινίνης με τη χρήση μικροοργανισμών. Είναι γεγονός ότι για την ανάπτυξη ενός νέου σκευάματος η γνώση του μεταβολισμού είναι απαραίτητη. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν πηγή ενζύμων τα οποία καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία χημικών αντιδράσεων. Η δραστηριότητα της μονοξυγενάσης του μύκητα

Cunninghamella bainieri είναι παρόμοια με αυτήν της μονοξυγενάσης του ανθρώπινου ήπατος και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την εύρεση του μεταβολικού μονοπατιού (Ferris JP et al., 1973; Venisetty et al., 2011).

Σχηματικά η ενδεικτική βιομετατροπή της σιλιμπινίνης φαίνεται στην Εικόνα 4. Με βάση την ανάλυση θραυσμάτων με LC-MS-MS, βρέθηκαν δύο βασικοί μεταβολίτες της σιλιμπινίνης: το υδροξυλιωμένο και το απομεθυλιωμένο παράγωγο.



Εικόνα 4: Ενδεικτικό μονοπάτι βιομετατροπής της σιλιμπινίνης

1.2.9. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ-ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τον προσδιορισμό της οξείας (άμεσης) τοξικότητας της σιλυμαρίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση τόσο σε μύες, επίμυες, κόνικλους όσο και σε κύνες. Η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀) προσδιορίστηκε σε 400 mg/kg σωματικού βάρους για τους μύες, σε 385 mg/kg για τους επίμυες και σε 140 mg/kg για κόνικλους και κύνες. Οι τιμές αυτές μπορούν να διαφοροποιηθούν ανάλογα με το ρυθμό έγχυσης του φαρμάκου. Σε αργή έγχυση (2-3h) το LD₅₀ ήταν 2 g/kg σε επίμυες και μετά από per os χορήγηση ορίστηκε στα 10 g/kg σωματικού βάρους (Lecomte, 1975). Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η τοξικότητα της σιλιμπινίνης είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

Σε ό,τι αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες, το *Silybum marianum* (Εικόνα 6) θεωρείται γενικά ασφαλές και καλώς ανεκτό με ανεπιθύμητες ενέργειες παρόμοιες με αυτές του placebo (Post-White et al., 2007). Αν και παρατηρούνται σπάνια, οι

παρενέργειες που έχουν καταγραφεί είναι ήπια καθαρτική (υπακτική) δράση και γαστρεντερολογικές διαταραχές (Saller et al., 2001; Post-White et al., 2007). Τα συμπτώματα που παρατηρούνται τόσο με τη χορήγηση σιλιμπινίνης όσο και με τη χορήγηση placebo είναι ναυτία, επιγαστρική δυσφορία, πονοκέφαλος και κνησμός (Rambaldi et al., 2005). Ήπιες αντιδράσεις υπερευαισθησίας παρατηρούνται σε δόσεις υψηλότερες των 1500 mg. Το *Silybum marianum* είναι ασφαλές για συνεχόμενη χορήγηση έως και 41 μήνες (Rainone, 2005).

1.2.10. ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ

Πίνακας 1.3: Βιοφαρμακευτική κατάταξη σιλιμπινίνης με βάση τη μορφή της			
	Διαλυτότητα	Διαπερατότητα	BCS Class
Καθαρή σιλιμπινίνη	1 mg/250 mL	$0,8 \times 10^{-6}$ cm/s	IV
Σιλιμπινίνη ως σιλυμαρίνη	8 mg/250 mL	54×10^{-6} cm/s	II

1.2.11. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ (Post-White et al., 2007)

Το βασικότερο πρόβλημα στη χρήση της σιλιμπινίνης παραμένει η ιδιαίτερως φτωχή βιοδιαθεσιμότητά της. Για το λόγο αυτό απαιτείται η χορήγηση εξαιρετικά υψηλών δόσεων έτσι ώστε να επιτευχθούν θεραπευτικά επίπεδα στο πλάσμα. Πολλές ομάδες ερευνητών προσέγγισαν με διαφορετικό τρόπο το ζήτημα και τελικά κατάφεραν να βελτιώσουν τη βιοδιαθεσιμότητα της σιλιμπινίνης.

Ο Blumenthal και οι συνεργάτες του (Blumenthal et al., 2000) συμπέραναν ότι είναι επιτακτική η ενσωμάτωση της σιλυμαρίνης (και κατ' επέκτασιν της σιλιμπινίνης) σε μια φαρμακοτεχνική μορφή τέτοια ώστε να αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητά της.

Οι φαρμακοτεχνικές μορφές που προέκυψαν από τις προσπάθειες αυτές περιλαμβάνουν τη συμπλοκοποίηση με κυκλοδεξτρίνες (Arcari et al., 1992; Valcavi et al., 1993), ενσωμάτωση σε στερεή διασπορά (Koo et al., 2002; Chen et al., 2005), μετατροπή της σιλιμπινίνης σε άλατα πολυυδροξυ-φαινυλ-χρωμανονών και άλλων

ευδιάλυτων παραγώγων (Madaus et al., 1976; Giorgi et al., 1989) καθώς και η συμπλοκοποίηση με φωσφολιπίδια (Gabetta et al., 1988; Vailati et al., 1993; Škottová et al., 2000).

Για τη βελτίωση του ρυθμού διάλυσης, και του ρυθμού απελευθέρωσης του φαρμάκου ο Woo και οι συνεργάτες του μετέτρεψαν τη σιλυμαρίνη σε αυτογαλακτωποιούμενη μορφή (self-emulsifying-SMEDDS) (Woo et al., 2007). Η ιδανική μορφή αυτού του συστήματος περιλαμβάνει 15% σιλυμαρίνη, 10% glyceryl monooleate (λιπαρή φάση), 37,5% μίγμα polysorbate 20 και HCO-50 1:1 ως επιφανειοδραστικό και 37,5% transcitol ως συνεπιφανειοδραστικό. Το μέσο μέγεθος σταγονιδίων της λιπαρής φάσης του μικρογαλακτώματος υπολογίστηκε σε 67 nm.

Ο Abrol και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη συνεργιστική ηπατοπροστατευτική δράση της σιλιμπινίνης με τα φωσφολιπίδια που ενσωματώνονται σε μικροσφαιρίδια με στόχο το ήπαρ και τη συνέκριναν με το απλό διάλυμα σιλυμαρίνης (Abrol et al., 2005). Μελέτες έδειξαν τέσσερις (4) φορές υψηλότερο ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου που ενσωματώνεται σε φωσφολιπίδια σε σχέση με το διάλυμα.

Ακολούθησε το σύμπλοκο εγκλεισμού της σιλιμπινίνης σε β-κυκλοδεξτρίνη από τον Arcari. Η χορήγηση του συμπλόκου *in vivo* (παρακολούθηση της απέκκρισης μέσω της χολής) αλλά και οι *in vitro* μελέτες έδειξαν εξαιρετικά μεγάλη αύξηση του ρυθμού διάλυσης του συμπλόκου (>98% μέσα σε 5 λεπτά) σε σχέση με την καθαρή σιλιμπινίνη που είναι πρακτικά αδιάλυτη (<5%) (Arcari et al., 1992).

Μια ακόμη μελέτη του Yan-yu παρείχε σημαντικά στοιχεία για τη βιοδιαθεσιμότητα της σιλιμπινίνης μετά από χορήγηση υπό μορφή συμπλόκου με φωσφολιπίδια και N-μεθυλο-γλυκαμίνη σε επίμυες (Yan-yu et al., 2006) αλλά και σε κύνες ράτσας Beagle (Yan-yu et al., 2006). Και οι δύο χορηγήσεις οδήγησαν σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης έως και 5 φορές περισσότερο από το αναμενόμενο.

Ο El-Samaligy και οι συνεργάτες του προετοίμασαν υβριδικά λιποσώματα σιλυμαρίνης με τη μέθοδο της ανάστροφης εξάτμισης (reverse evaporation technique) χρησιμοποιώντας λεκιθίνη, χοληστερόλη, στεαρυλαμίνη και Tween 20 σε

μοριακή αναλογία 9:1:1:0,5 (El-Samaligy et al., 2006). Η μορφή αυτή υπήρξε σταθερή έως και 3 μήνες μετά την παρασκευή της στους 4 °C.

Τέλος, η ερευνητική ομάδα του Wu παρασκεύασε SMEDDS (self-micro-emulsifying drug delivery systems) με βάση τα λιπίδια (Wu et al., 2006). Η αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα που παρατηρήθηκε οφειλόταν στην κυκλοφορία της λέμφου και τη μακρά ανθρακική αλυσίδα του αιθυλο-λινολεϊκού οξέος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συστήματος (Hausse et al., 1994). Παρόλα αυτά, κρίθηκε ως ανεπαρκής φαρμακοτεχνική μορφή με περιορισμένα θετικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 5: Το φυτό *Silybum marianum*

1.3. PER OS ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΑΙ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι ανακαλύψεις και οι καινοτομίες στον τομέα της τεχνολογίας μεταφοράς των φαρμάκων υπήρξαν σημαντικές και καθοριστικές τις τελευταίες δεκαετίες, όμως δεν κατάφεραν να υπερσκελίσουν την *per os* χορήγηση η οποία παραμένει ακόμα και σήμερα η σημαντικότερη οδός χορήγησης των φαρμάκων για πολλούς λόγους, με κύριο τη συμμόρφωση των ασθενών με τη θεραπευτική αγωγή. Οι ουσίες που προορίζονται για από του στόματος χορήγηση είναι απαραίτητο να διαθέτουν συγκεκριμένες βιοφαρμακευτικές ιδιότητες ώστε να επιτυγχάνουν τις επιθυμητές θεραπευτικές συγκεντρώσεις στον προβλεπόμενο στόχο δράσης.

Η *in vivo* διαδικασία απορρόφησης είναι το αποτέλεσμα μιας σύνθετης σειράς γεγονότων που περιγράφονται από το γενικό όρο «πρόσληψη» και εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που αφορούν αφενός στα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, αφετέρου στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του γαστρεντερικού σωλήνα (Macheras and Reppas, 1997; Rang et al., 2007; Richard et al, 2007). Η πρόσληψη ενός φαρμάκου από τον ανθρώπινο οργανισμό περιλαμβάνει τις επιμέρους πορείες που οδηγούν στη μεταφορά των φαρμάκων από το εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα στα αγγεία και στη συνέχεια στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Βασικές προϋποθέσεις για την έλευση του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία είναι η παρουσία αυτού στα γαστρεντερικά υγρά και τις θέσεις πρόσληψης με την επιθυμητή μορφή καθώς και η υπερπήδηση μιας σειράς φραγμών. Οι φραγμοί αυτοί είναι κυρίως φυσικοί αλλά και μεταβολικοί και η αντίστασή τους εξαρτάται από πληθώρα παραμέτρων που σχετίζονται τόσο με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου όσο και με τους φυσιολογικούς παράγοντες του γαστρεντερικού συστήματος (Rang et al., 2007).

Οι φυσικοί φραγμοί που πρέπει να διαπεράσει το φάρμακο για να φτάσει στα αιμοφόρα και λεμφοφόρα αγγεία είναι οι εξής:

- A. Η στατική υδάτινη στιβάδα, η οποία περιλούει τα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και
- B. Η βλεννογόνος στιβάδα.

1.3.1. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το πεπτικό σύστημα αποτελείται από τον γαστρεντερικό σωλήνα και από ορισμένα, συνδεδεμένα με αυτόν, αδενικά όργανα τα οποία παράγουν εκκρίματα που ενεργούν στον γαστρεντερικό σωλήνα. Κύριες υποδιαίρεσεις του γαστρεντερικού σωλήνα είναι η στοματική κοιλότητα, ο φάρυγγας, ο οισοφάγος, ο στόμαχος, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το κόλον, το απευθυσμένο και ο πρωκτός. Το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις και ο ειλεός συγκροτούν το λεπτό έντερο. Στα συνδεδεμένα αδενικά όργανα περιλαμβάνονται οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη και το πάγκρεας. Σημαντικότερες φυσιολογικές λειτουργίες του πεπτικού συστήματος είναι η πέψη των τροφών και η απορρόφηση των θρεπτικών μορίων στο κυκλοφορικό σύστημα. Οι δραστηριότητες μέσω των οποίων το γαστρεντερικό σύστημα πραγματοποιεί αυτές τις λειτουργίες υποδιαιρούνται σε: κινητικότητα, έκκριση, πέψη και απορρόφηση. Η κινητικότητα αναφέρεται στις γαστρεντερικές κινήσεις που αναμειγνύουν και κινούν το γαστρεντερικό περιεχόμενο και το προωθούν κατά μήκος του σωλήνα. Συνήθως, γίνεται απόλυτη προώθηση προς την ορθόδρομη κατεύθυνση, δηλαδή με κατεύθυνση τον πρωκτό. Παρόλα αυτά, μπορεί να συμβεί και αντίστροφη προώθηση, όπως ο έμετος. Η έκκριση αναφέρεται στις διεργασίες με τις οποίες οι αδένες που είναι συνδεδεμένοι με τον γαστρεντερικό σωλήνα απελευθερώνουν ύδωρ και ουσίες στον σωλήνα. Η πέψη ορίζεται ως η διεργασία μέσω της οποίας τα προσλαμβανόμενα τεμάχια τροφής και τα μεγάλα μόρια αποδομούνται χημικά, έτσι ώστε να παραχθούν μικρότερα μόρια τα οποία είναι δυνατόν να απορροφηθούν διά μέσου του τοιχώματος του γαστρεντερικού σωλήνα. Η απορρόφηση αναφέρεται στις διεργασίες μέσω των οποίων τα θρεπτικά μόρια απορροφώνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Η δομή του γαστρεντερικού σωλήνα διαφέρει πολύ από περιοχή σε περιοχή αλλά υπάρχουν κοινά χαρακτηριστικά στη γενική οργάνωση του ιστού. Ο γαστρεντερικός σωλήνας παρουσιάζει έναν αριθμό στιβάδων διαφορετικής σύστασης.

Ο βλεννογόνος αποτελείται από το επιθήλιο, το χόριο και τη βλεννογόνο μυική στιβάδα. Το επιθήλιο αποτελείται από μία στιβάδα εξειδικευμένων κυττάρων που επενδύει τον αυλό του γαστρεντερικού σωλήνα. Το χόριο του βλεννογόνου αποτελείται κυρίως από χαλαρό συνδετικό ιστό που περιέχει ίνες κολλαγόνου και

ελαστίνης. Είναι πλούσιο σε αρκετούς τύπους αδένων και περιέχει λεμφοζίδια και τριχοειδή αγγεία. Η βλεννογόνιος μυϊκή στιβάδα είναι η λεπτή ενδότερη στιβάδα του λείου μυϊκού ιστού του εντέρου. Οι συσπάσεις της δημιουργούν πτυχές και προεξοχές στο βλεννογόνο. Ο υποβλεννογόνιος χιτώνας αποτελείται κυρίως από χαλαρό συνδετικό ιστό με ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Σε μερικές περιοχές υπάρχουν υποβλεννογόνιοι αδένες. Τα μεγαλύτερα νεύρα και αιμοφόρα αγγεία του εντερικού τοιχώματος διασχίζουν τον υποβλεννογόνιο χιτώνα (Berne et al., 2011).

Ο έξω μυϊκός χιτώνας αποτελείται συνήθως από δύο σημαντικές στιβάδες λείων μυϊκών κυττάρων: μία εσωτερική κυκλοτερή στιβάδα και μία εξωτερική διαμήκη στιβάδα. Οι συσπάσεις του έξω μυϊκού χιτώνα αναδύουν και κινούν το περιεχόμενο του αυλού και το προωθούν κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα.

Το τοίχωμα του γαστρεντερικού σωλήνα περιέχει πολλούς νευρώνες που αλληλοσυνδέονται σε μεγάλο βαθμό. Ένα πυκνό δίκτυο νευρικών κυττάρων στον υποβλεννογόνιο χιτώνα είναι το υποβλεννογόνιο πλέγμα (πλέγμα Meissner). Το σημαντικό μυεντερικό πλέγμα (πλέγμα Auerbach) εντοπίζεται μεταξύ της κυκλοτερούς και της διαμήκουσ λείας μυϊκής στιβάδας. Το υποβλεννογόνιο και το μυεντερικό πλέγμα, μαζί με τους άλλους νευρώνες του γαστρεντερικού σωλήνα απαρτίζουν τα ενδοτοιχωματικά πλέγματα ή το εντερικό νευρικό σύστημα, το οποίο υποβοηθεί τον συνδυασμό των κινητικών και εκκριτικών δραστηριοτήτων του γαστρεντερικού σωλήνα. Εάν τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά νεύρα του εντέρου αποκοπούν, πολλές κινητικές και εκκριτικές δραστηριότητες συνεχίζονται, διότι αυτές οι διεργασίες ελέγχονται από το εντερικό νευρικό σύστημα. Ο ορογόνος ή πρόσθετος χιτώνας είναι η εξώτερη στιβάδα και αποτελείται κυρίως από συνδετικό ιστό καλυπτόμενο από μια στιβάδα πλακωδών μεσοθηλιακών κυττάρων.

Το λεπτό έντερο αντιστοιχεί στα τρία τέταρτα περίπου του μήκους του γαστρεντερικού σωλήνα. Έχει μήκος 5 περίπου μέτρα και ο χυμός, συνήθως, το διατρέχει σε 2 έως 4 ώρες. Τα πρώτα 5% περίπου του λεπτού εντέρου είναι το δωδεκαδάκτυλο, το οποίο δεν έχει μεσεντέριο και διακρίνεται ιστολογικά από το λοιπό λεπτό έντερο. Το λοιπό λεπτό έντερο υποδιαιρείται στη νήστιδα και στον ειλέο. Πλησιέστερα βρίσκεται η νήστις, η οποία καταλαμβάνει τα 40% περίπου του μήκους του λεπτού εντέρου. Ο ειλέος είναι το απώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου και καταλαμβάνει το υπόλοιπο μήκος. Το λεπτό έντερο, ιδίως το δωδεκαδάκτυλο

και η νήσις, είναι ο χώρος όπου γίνεται κυρίως η πέψη και η απορρόφηση. Οι κινήσεις του λεπτού εντέρου αναμειγνύουν τον χυμό με τα πεπτικά εκκρίματα, φέρνουν τον νέο χυμό σε επαφή με την απορροφητική επιφάνεια των μικρολαχμών και τον προωθούν προς το κόλον. Ο πιο συχνός τύπος κίνησης του λεπτού εντέρου καλείται μεταμερισμός. Ο μεταμερισμός χαρακτηρίζεται από συσπάσεις, κατά συχνά διαστήματα, της κυκλοτερούς μυϊκής στιβάδας. Οι συσπάσεις υποδιαιρούν το λεπτό έντερο σε μικρά παρακείμενα τμήματα. Κατά τον ρυθμικό μεταμερισμό, οι θέσεις των κυκλικών συσπάσεων εναλλάσσονται, έτσι ώστε ένα δεδομένο τμήμα του εντέρου να συσπάται και μετά να χαλαρώνει. Κατά τον μεταμερισμό, ο χυμός αναμειγνύεται με τα πεπτικά εκκρίματα αποτελεσματικά και έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του βλεννογόνου.

Περίσταση είναι η προοδευτική σύσπαση διαδοχικών τμημάτων του κυκλοτερούς λείου μυός. Οι συσπάσεις κινούνται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα σε ορθόδρομη κατεύθυνση. Τα περισταλτικά κύματα αναπτύσσονται στο λεπτό έντερο, αλλά συνήθως αφορούν μόνο ένα μικρό τμήμα του. Όπως και σε άλλα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα, τα βραδέα κύματα των λείων μυϊκών κυττάρων καθορίζουν τον ρυθμό των εντερικών συσπάσεων (Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρία, 1995).

1.3.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την εντερική απορρόφηση των φαρμάκων διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

A. Φυσιολογικοί παράγοντες: Σχετίζονται με τα ανατομικά και φυσιολογικά στοιχεία του γαστρεντερικού συστήματος και περιλαμβάνουν το ρυθμό γαστρικής κένωσης, την κινητικότητα του εντέρου, τη διαπερατότητα των μεμβρανών, το εντερικό pH, ορισμένες παθολογικές καταστάσεις κ.α. Η γαστρεντερική κινητικότητα έχει μεγάλη επίδραση στην απορρόφηση. Εάν ένα φάρμακο περάσει πολύ γρήγορα μέσα από το γαστρεντερικό σωλήνα, όπως σε μια σοβαρή διάρροια, δε θα απορροφηθεί καλά. Αντίστροφα, οτιδήποτε καθυστερεί τη μεταφορά του φαρμάκου από το στόμαχο στο έντερο επιβραδύνει και την ταχύτητα απορρόφησης το φαρμάκου. Πολλές

διαταραχές (π.χ. ημικρανία, διαβητική νευροπάθεια) προκαλούν γαστρική στάση και καθυστερούν την απορρόφηση του φαρμάκου. Η φαρμακευτική θεραπεία μπορεί επίσης να επηρεάσει την κινητικότητα, είτε μειώνοντας είτε αυξάνοντας τη. Η υπερβολικά γρήγορη προώθηση του περιεχομένου του εντέρου μπορεί να παρεμποδίσει την απορρόφηση. Ένα φάρμακο που λαμβάνεται μετά από γεύμα απορροφάται συνήθως πιο αργά επειδή καθυστερεί η μετάβασή του στο λεπτό έντερο. Ακόμα, η συνολική έκταση της επιφάνειας απορρόφησης αποτελεί εξίσου βασικό παράγοντα. Επειδή η επιφάνεια του εντέρου είναι πλούσια σε μικρολάχνες, η έκτασή της είναι περίπου 1000 φορές μεγαλύτερη από την επιφάνεια του στομάχου. Έτσι, η απορρόφηση του φαρμάκου από το έντερο είναι αποτελεσματικότερη.

Τέλος, η αιματική ροή στο έντερο είναι πολύ μεγαλύτερη από τη ροή στο στόμαχο με αποτέλεσμα να ευνοείται η απορρόφηση από το έντερο σε σχέση με αυτήν από το στόμαχο.

B. Φυσικοχημικοί παράγοντες: Με βάση το λιπιδικό χαρακτήρα της κυτταρικής μεμβράνης είναι λογικό να περιμένει κανείς ότι η διαπέραση των φαρμάκων από τη μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου θα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη λιποφιλία. Εκτεταμένη έρευνα στη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών απέδειξε πράγματι ότι υπάρχει μεγάλος συσχετισμός ανάμεσα στη διαπερατότητα και το συντελεστή μερισμού (μέτρο της λιποφιλίας των ουσιών) του φαρμάκου μεταξύ μιας υδατικής και μιας λιπιδικής ή οργανικής φάσης. Εξίσου σημαντικοί παράγοντες είναι η διαλυτότητα στο νερό, το μέγεθος και βάρος του μορίου, το pK_a , η επιφάνεια του μορίου, η υδροφοβικότητα και άλλα. Είναι γενικά παραδεκτό ότι μόνο η μη ιονισμένη μορφή του φαρμάκου διαπερνά τη μεμβράνη και κατά συνέπεια η ευκολία υπερπήδησης του λιπιδικού φράγματος είναι συνάρτηση του pK_a του φαρμάκου, του pH , που επικρατεί στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, και του συντελεστή μερισμού της μη ιονισμένης μορφής του φαρμάκου. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται επίσης η δυνατότητα συσσωμάτωσης ή συμπλοκοποίησης της χορηγούμενης ουσίας καθώς και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.

Γ. Παράγοντες μορφοποίησης – Κατασκευαστικοί παράγοντες: Αφορούν κυρίως στη φαρμακοτεχνική και δοσολογική μορφή που σχετίζονται άμεσα με το ρυθμό και τον

τρόπο αποδέσμευσης του φαρμάκου. Τα θεραπευτικά φάρμακα χορηγούνται σε κατάλληλες μορφές ώστε να επιτυγχάνονται τα επιθυμητά χαρακτηριστικά απορρόφησης. Για παράδειγμα, οι κάψουλες μπορεί να σχεδιαστούν έτσι ώστε να μένουν άθικτες για μερικές ώρες μετά την κατάποση και έτσι να καθυστερείται η απορρόφηση, ή τα δισκία μπορεί να έχουν μια ανθεκτική επίστρωση για τον ίδιο σκοπό. Σε μερικές περιπτώσεις, σε μια κάψουλα περιλαμβάνεται ένα μίγμα σωματιδίων βραδείας και ταχείας απελευθέρωσης για να επιτυγχάνεται ταχεία αλλά και παρατεταμένη απορρόφηση. Πιο εξειδικευμένα συστήματα περιλαμβάνουν σκευάσματα τροποποιημένης απελευθέρωσης. Τέτοια σκευάσματα δεν αυξάνουν μόνο το μεσοδιάστημα μεταξύ δόσεων αλλά μειώνουν επίσης και τις ανεπιθύμητες ενέργειες που οφείλονται στην απότομη αύξηση της συγκέντρωσής του στο αίμα στο ως επακόλουθο της χορήγησης ενός συμβατικού σκευάσματος. Τέλος, στους κατασκευαστικούς παράγοντες περιλαμβάνονται και τα χρησιμοποιούμενα έκδοχα (όπως συνδετικά ή γαλακτωματοποιητές) τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την ευχέρεια διάλυσης του φαρμάκου και συνεπώς να μεταβάλλουν την ταχύτητα απορρόφησης του.

Δ. Βιοχημικοί παράγοντες: Περιλαμβάνουν το μεταβολισμό, τη μεσολάβηση μεταφορών εισροής και ενεργού μεταφοράς. Όταν ένα φάρμακο απορροφάται από το γαστρεντερικό σωλήνα, πρώτα εισέρχεται στην πυλαία κυκλοφορία και στη συνέχεια μπαίνει στη συστηματική κυκλοφορία. Αν το φάρμακο μεταβολίζεται γρήγορα από το ήπαρ, η ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει αμετάβλητη στη συστηματική κυκλοφορία ελαττώνεται. Πολλά φάρμακα υφίστανται σημαντική βιομετατροπή με μια απλή διέλευση από το ήπαρ, μια διαδικασία που καλείται «μεταβολισμός πρώτης διόδου».

Ο εντερικός μεταβολισμός ενός φαρμάκου μπορεί επίσης να συμβαίνει και λόγω της μικροχλωρίδας που υπάρχει στο εσωτερικό του εντέρου καθώς επίσης και από την ύπαρξη ενζύμων στα εντερικά υγρά και την εντερική βλεννογόνο. Ο μεταβολισμός των ξеноβιοτικών από την εντερική μικροχλωρίδα είναι χαμηλός σε σύγκριση με το μεταβολισμό από την εντερική βλεννογόνο και το ήπαρ. Παρόλα αυτά, η μικροχλωρίδα μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό πρώτης διόδου συστατικών που είναι φτωχά ή ατελώς απορροφούμενα από την εντερική

βλεννογόνο, φαινόμενο που παρατηρείται κυρίως στα κατώτερα τμήματα του εντέρου.

Τέλος, μερικά φάρμακα μπορεί να είναι ασταθή στο pH του γαστρικού περιεχομένου (πενικιλίνη G) με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου και άλλα (ινσουλίνη) μπορεί να καταστρέφονται πλήρως στο γαστρεντερικό σωλήνα από διάφορα ένζυμα.

1.3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟΥ

Ο ρυθμός μεταφοράς μέσω του επιθηλίου εξαρτάται από τη συγκέντρωση των συστατικών και, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά διαπέρασής τους, διακρίνονται οι παρακάτω μηχανισμοί προσέλασης των επιθηλιακών κυττάρων της εντερικής μεμβράνης:

A. Ενδοκυττάρια μεταφορά: Η ενδοκυττάρια οδός είναι η συνηθέστερη για τη μεταφορά των φαρμάκων από τα γαστρεντερικά υγρά στην κυκλοφορία του αίματος. Οι περισσότερο λιπόφιλες (μη πολικές) ουσίες μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου κυρίως με παθητική διάχυση ενώ οι πολύ υδρόφιλες (πολικές) ενώσεις μεταφέρονται με πιο εξειδικευμένους μηχανισμούς, όπως με τη μεσολάβηση κάποιου φορέα (carrier-mediated transport), διαμέσου υδάτινων πόρων ή σπανιότερα με ενδοκύτωση (Mayersohm, 1996; Macheras et al., 1997; van der Waterbeemd et al., 2004).

- **Διαπέραση της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική διάχυση:** (Mayersohm, 1996; Macheras and Reppas, 1997; Pade et al., 1997; Deferme et al.; Tukker, 2002; van der Waterbeemd et al., 2004). Η κινητήρια δύναμη για την παθητική απορρόφηση ενός φαρμάκου είναι η διαφορά συγκέντρωσης εκατέρωθεν μιας μεμβράνης που χωρίζει δύο διαμερίσματα του σώματος: το φάρμακο, δηλαδή, μετακινείται από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε μια περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης. Η συντριπτική πλειοψηφία των φαρμάκων αποκτούν πρόσβαση στον οργανισμό μέσω αυτού του μηχανισμού. Τα λιποδιαλυτά φάρμακα μετακινούνται γρήγορα και εύκολα μέσα από τις περισσότερες βιολογικές μεμβράνες, ενώ τα υδατοδιαλυτά φάρμακα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσα από υδατικούς διαύλους.

• Διαπέραση της κυτταρικής μεμβράνης με τη μεσολάβηση φορέα: (Mayersohm, 1996; Macheras and Reppas, 1997; Pade et al., 1997; Deferme et al.; Tukker, 2002; van der Waterbeemd et al., 2004) Η μεταφορά με τη μεσολάβηση φορέα χαρακτηρίζεται από την αμφίδρομη αντίδραση της μεταφερόμενης ουσίας με ένα συστατικό (συνήθως πρωτεϊνικής φύσης, που στην περίπτωση της διαπέρασης βρίσκεται πάνω στη μεμβράνη), που δρα ως φορέας (carrier). Στην περίπτωση αυτή, η μεμβράνη παύει να αποτελεί ένα απλό φράγμα στη διάχυση των μορίων του φαρμάκου και συμμετέχει ενεργά στην όλη διαδικασία. Βασικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου μηχανισμού μεταφοράς, που δεν παρατηρούνται στην παθητική διάχυση, είναι:

α. ο βαθμός ειδίκευσης: κάθε φορέας είναι σε θέση να μεσολαβήσει στη μεταφορά μιας ουσίας ή το πολύ μιας ομάδας ουσιών με παραπλήσια δομή και πάντα προς μία μόνο κατεύθυνση

β. το φαινόμενο του κορεσμού: όταν ο συνολικός αριθμός των μεταφερόμενων μορίων υπερβεί τον αριθμό των διαθέσιμων από τον φορέα θέσεων, τότε η μεταφορά αποκτά μηδενοταξικό χαρακτήρα (σταθερός και μέγιστος δυνατός ρυθμός μεταφοράς)

γ. η κατανάλωση ενέργειας: γίνεται μέσω της υδρόλυσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη μεταφορά ενός φαρμάκου από περιοχές χαμηλής σε περιοχές υψηλής συγκέντρωσης.

Ανάλογα με τη δυνατότητα μεταφοράς προς την περιοχή της υψηλής συγκέντρωσης διακρίνονται δύο τύποι μεταφοράς με τη μεσολάβηση φορέα:

- Διευκολυνόμενη διάχυση: Στην περίπτωση αυτή η μεταφορά γίνεται μόνο προς την περιοχή της χαμηλότερης συγκέντρωσης. Πρόκειται, δηλαδή, για ένα είδος παθητικής μεταφοράς, που όμως παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά της ειδίκευσης και του κορεσμού

- Ενεργός μεταφορά: Διαφέρει από την παθητική διευκολυνόμενη διάχυση στο ότι το φάρμακο μεταφέρεται και προς την περιοχή της υψηλής συγκέντρωσης. Όπως αναφέρθηκε, κατά τη διαδικασία αυτή απαιτείται ενέργεια που παρέχεται από την υδρόλυση του ATP προς ADP και παρατηρείται και εδώ το φαινόμενο του κορεσμού.

B. Παρακυττάρια μεταφορά: (Macheras and Reppas, 1997; Deferme et al.; Tukker, 2002; van der Waterbeemd, 2004). Παρά το γεγονός ότι στις πλάγιες πλευρές της μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων του γαστρεντερικού σωλήνα δημιουργούνται σφιχτές συνάψεις, τα σημεία αυτά είναι διαπερατά από νερό, ηλεκτρολύτες και άλλα (ιονισμένα ή μη) μόρια πολύ μικρού μεγέθους. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι μόνο μικρά, υδροφιλικά και πολικά φαρμακευτικά μόρια είναι ικανά να διασχίσουν την επιθηλιακή μονοστιβάδα μέσω του παρακυττάρου χώρου. Έχει αποδειχθεί ότι η παρακυττάρια πρόσληψη φαρμάκων είναι ανάλογη της μεταφοράς νερού από το γαστρεντερικό σωλήνα προς το αίμα. Η παρακυττάρια διαδρομή γενικά συντελεί στη χαμηλή από του στόματος απορρόφηση λόγω της περιορισμένης έκτασης της επιφάνειας.

Πέρα από τους κύριους τρόπους μεταφοράς και πρόσληψης φαρμάκων, έχει μελετηθεί και ακόμα ένας μηχανισμός που συναντάται σπανιότερα και ονομάζεται *efflux-mediated* μεταφορά (Deferme et al.; Tukker, 2002; van der Waterbeemd, 2004):

- **Efflux-mediated transport:** Σε αυτήν την περίπτωση, φάρμακα που εισήλθαν στα εντεροκύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, αποβάλλονται ενεργά έξω από αυτά πίσω στον εντερικό αυλό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μεταφοράς, απαιτείται μια πηγή ενέργειας όπως το ATP, η μεταφορά ηλεκτρονίων ή η ηλεκτροχημική διαφορά ενός άλλου ιόντος για τη μετακίνηση ιόντων ή μορίων αντίθετα προς την ηλεκτροχημική δυναμική ισορροπία.

1.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΤΗΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

1.4.1. Ο ΚΑΝΟΝΑΣ ΤΩΝ 5

Από την ανάλυση των παραμέτρων κλειδιών των ενώσεων του World Drug Index (WDI) προέκυψε ο πολύ γνωστός κανόνας των 5 (rule of 5) (Lipinski et al., 1997; Lipinski, 2000) με βάση τον οποίο οι ουσίες οι οποίες αναμένεται να παρουσιάζουν χαμηλή απορρόφηση είναι αυτές που εμφανίζουν:

- Μοριακό βάρος >500
- Υπολογιζόμενο συντελεστή μερισμού οκτανόλη/νερό (ClogP) >5
- Αριθμό ομάδων που είναι δότες δεσμών-H (H-bond donors) >5
- Αριθμό ομάδων που είναι δέκτες δεσμών-H (H-bond acceptors) >10

Ο κανόνας αυτός θεωρείται μια ποιοτική και όχι ποσοτική πρόβλεψη της ικανότητας απορρόφησης/διαπέρασης.

1.4.2. ΔΙΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ

Κάθε κυτταρική μεμβράνη μπορεί να θεωρηθεί ως ένας συνδυασμός φυσικοχημικού και βιολογικού φραγμού για τη μεταφορά των φαρμάκων. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ύπαρξη μηχανισμού ενεργού μεταφοράς υπερπηδά το πρόβλημα των φτωχών φυσικοχημικών ιδιοτήτων του φαρμάκου. Εντούτοις, για να μπορέσει να ξεκινήσει η διαδικασία της απορρόφησης οι βασικές ιδιότητες του φαρμάκου που πρέπει να θεωρηθούν είναι η διαλυτότητα που αφορά στη φαρμακευτική ουσία και η διάλυση που αφορά στο χορηγούμενο σκεύασμα. Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις περιοριζόμενης από τη διαλυτότητα απορρόφησης με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός της διαλυτότητας των φαρμακευτικών ουσιών να θεωρείται πλέον απαραίτητο βήμα από τα αρχικά ακόμη στάδια της έρευνας για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών μορίων αλλά και στη φάση της ανάπτυξης νέων φαρμακοτεχνικών μορφών. Μόνο ουσίες που βρίσκονται σε μορφή διαλύματος είναι δυνατό να μεταφερθούν μέσα από τη γαστρεντερική μεμβράνη και άρα η

διαλυτότητα μπορεί να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στη διαδικασία της απορρόφησης γεγονός που οδήγησε στην εφαρμογή της διαδικασίας ελέγχου διαλυτότητας στα πρώτα στάδια σχεδιασμού φαρμάκων. Ο ισχυρά λιπόφιλος χαρακτήρας είναι σε πολλές περιπτώσεις η αιτία της χαμηλής διαλυτότητας και της προβληματικής απορρόφησης μετά από χορήγηση από το στόμα.

Η πρόβλεψη της διαλυτότητας που πρέπει να έχει μια φαρμακευτική ουσία ώστε να απορροφάται πλήρως από το γαστρεντερικό επιθήλιο μετά από χορήγηση από το στόμα εξαρτάται από τη διαπερατότητα της ουσίας και τη χορηγούμενη δόση, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4: Επιθυμητή διαλυτότητα σε σχέση με τη χορηγούμενη δόση για τρία επίπεδα διαπερατότητας (van der Waterbeemd et al., 2005)			
Δόση (mg/kg)	Διαλυτότητα μg/MI		
	Υψηλή διαπερατότητα	Μέτρια διαπερατότητα	Χαμηλή διαπερατότητα
0.1	1	5	21
1	10	52	207
10	100	520	2100

Επιπλέον η έννοια της μέγιστης απορροφήσιμης δόσης (Maximum absorbable dose, MAD) (Johnson and Swindell, 1996; Curatolo, 1998) συσχετίζει την απορρόφηση των φαρμάκων με τη διαλυτότητα μέσω της ακόλουθης εξίσωσης:

$$MAD = S \times k_a \times MIWV \times MITT \quad (1)$$

Όπου:

S = διαλυτότητα

k_a = σταθερά ρυθμού απορρόφησης

MIWV = μέσος όγκος περιεχομένου του λεπτού εντέρου (250 mL)

MITT = μέσος χρόνος διάβασης του λεπτού εντέρου (270 min)

1.5. ΣΥΣΤΗΜΑ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (BIOPHARMACEUTICS CLASSIFICATION SYSTEM-BCS)

1.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης φαρμάκων (BCS) είναι το αποτέλεσμα διαρκούς προσπάθειας της μαθηματικής ανάλυσης για το συνδυασμό της κινητικής και δυναμικής πορείας του φαρμάκου στο γαστρεντερικό σύστημα. Η παρουσίασή του το 1995 οδήγησε στην αποδοχή του από τις κανονιστικές αρχές και την έκδοση οδηγιών για τη χρήση και εφαρμογή του ως εργαλείου για την αντικατάσταση ορισμένων μελετών βιοϊσοδυναμίας με ακριβή πειράματα διάλυσης και διαλυτότητας *in vitro* (FDA Guidance, 2000). Το βήμα αυτό μειώνει σαφώς το χρονοδιάγραμμα σχεδιασμού και ανάπτυξης ενός νέου φαρμακευτικού σκευάσματος ενώ περιορίζει σημαντικά την άσκοπη έκθεση υγιών εθελοντών σε ένα υπό μελέτη φάρμακο.

Οι στόχοι του BCS σε συνδυασμό με την αντίστοιχη οδηγία του FDA είναι οι εξής:

1. Να αποτελέσει ένα απλό και εύκολο εργαλείο κατηγοριοποίησης των φαρμακευτικών ουσιών με βάση τα χαρακτηριστικά διάλυσης/διαλυτότητας και διαπερατότητας του φαρμάκου, για τη διευκόλυνση της διαδικασίας ανάπτυξης νέων φαρμάκων.
2. Να επιτρέψει την αντικατάσταση των *in vivo* μελετών βιοϊσοδυναμίας από *in vitro* πειράματα διάλυσης και διαλυτότητας σε σαφώς καθορισμένες συνθήκες, για τα φάρμακα της κατηγορίας I, τα οποία μορφοποιούνται σε φαρμακοτεχνικές μορφές άμεσης αποδέσμευσης (immediate release-IR).

1.5.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το BCS είναι το επιστημονικό πλαίσιο κατάταξης μιας φαρμακευτικής ουσίας με βάση την υδατοδιαλυτότητά της και την εντερική διαπερατότητα (Amidon et al., 1995; Reddy and Karunakar, 2011). Επιτρέπει με αυτόν τον τρόπο την πρόβλεψη της *in vivo* φαρμακοκινητικής ενός *per os* χορηγούμενου σκευάσματος άμεσης αποδέσμευσης ταξινομώντας τα φάρμακα σε 4 τάξεις/κλάσεις ανάλογα με την

διαλυτότητα που συνδέεται με τη δόση και την εντερική διαπερατότητα σε συνδυασμό με τη φαρμακοτεχνική μορφή (Hussain et al., 1999; Gothoskar, 2005).

Το ενδιαφέρον που παρουσιάζει το σύστημα ταξινόμησης αφορά κυρίως στην εφαρμογή του στην πρώιμη ανάπτυξη ενός φαρμακομορίου αλλά και στο χειρισμό του προϊόντος κατά τον κύκλο ζωής του. Στην πρώιμη φάση ανάπτυξης ενός φαρμακομορίου, το να γνωρίζει κανείς σε ποια κλάση εντάσσεται ένα μόριο είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι καθορίζει τη συνέχιση ή μη του σχεδιασμού και της προώθησής του. Για το λόγο αυτό, μια εταιρεία που παράγει *per os* χορηγούμενες φαρμακοτεχνικές μορφές θα επιθυμεί τον περιορισμό της ανάπτυξης μορίων με υψηλή διαπερατότητα. Η κατάταξη των μορίων σε κλάσεις σχετίζεται με ένα μοντέλο διάλυσης και απορρόφησης, που εντοπίζει και καταγράφει τις παραμέτρους-κλειδιά υπό μορφή αδιάστατων αριθμών (Varma et al., 2004; Gothoskar, 2005; Reddy and Karunakar, 2011) που δεν είναι άλλοι από τους εξής:

- Αριθμός απορρόφησης (Absorption Number- A_n): Ορίζεται ως το πηλίκο του μέσου χρόνου παραμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα δια τον μέσο χρόνο απορρόφησης. Υποδεικνύει τον αδιάστατο λόγο δόση/διαλυτότητα για τη μελετώμενη φαρμακοτεχνική μορφή ή το υπό μελέτη μόριο. Το πηλίκο αυτό δείχνει αν η ποσότητα του γαστρεντερικού υγρού επαρκεί για να διαλύσει το σύνολο της χορηγούμενης δόσης. Ισχύει η σχέση:

$$A_n = P_{\text{eff}} \times t_{\text{res}} / R \quad (2)$$

Όπου P_{eff} η δρώσα διαπερατότητα

t_{res} ο μέσος χρόνος παραμονής (≈ 180 min)

R η ακτίνα του εντερικού αυλού

- Αριθμός διάλυσης (Dissolution Number- D_n): Ορίζεται ως το πηλίκο του μέσου χρόνου παραμονής στο γαστρεντερικό σωλήνα δια το μέσο χρόνο διάλυσης του μορίου και δίνεται από τη σχέση:

$$D_n = t_{\text{res}} / t_{\text{Diss}} \quad (3)$$

Όπου t_{diss} ο μέσος χρόνος διάλυσης του μορίου

- Αριθμός δόσης (Dose Number- D_0): Δίνεται από τη σχέση:

$$D_0 = M_0 / C_s V_0 \quad (4)$$

Όπου M_0 η χορηγούμενη δόση

V_0 ο αρχικός όγκος στο γαστρεντερικό (≈ 250 mL)

1.5.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΤΑΞΕΙΣ/ΚΛΑΣΕΙΣ

- **Κλάση I**

Τα φάρμακα που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλό αριθμό απορρόφησης και διάλυσης. Το περιοριστικό βήμα είναι η διάλυση του φαρμάκου, και στην περίπτωση που αυτή είναι εξαιρετικά ταχεία τότε ο ρυθμός γαστρικής κένωσης γίνεται ο καθοριστικός παράγοντας. Τα μόρια αυτά απορροφώνται πολύ ικανοποιητικά και ο ρυθμός απορρόφησής τους είναι συνήθως υψηλότερος από το ρυθμό απέκκρισης (Devane, 1998; Gothoskar, 2005). Ορισμένα παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι η μετοπρολόλη, η διλτιαζέμη, η βεραπαμίλη και η προπρανολόλη.

- **Κλάση II**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν φαρμακομόρια με μεγάλο αριθμό απορρόφησης αλλά χαμηλό αριθμό διάλυσης. Ως αποτέλεσμα, το περιοριστικό βήμα για την *in vivo* απορρόφηση είναι η διάλυση, εκτός αν ο αριθμός της δόσης είναι εξαιρετικά υψηλός. Η απορρόφηση φαρμάκων της κλάσης II είναι συνήθως πιο αργή από αυτών της κλάσης I. *In vitro-in vivo* συσχετισμοί (IVIVC) είναι συνήθως αποδεκτοί για φάρμακα της κλάσης II. Η βιοδιαθεσιμότητα αυτών των μορίων περιορίζεται από το ρυθμό διάλυσής τους. Κατά συνέπεια, ο συσχετισμός μεταξύ της *in vivo* βιοδιαθεσιμότητας και της *in vitro* διάλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί (Devane, 1998; Lipka and Amidon, 1999; Gothoskar, 2005). Ορισμένα παραδείγματα φαρμάκων που ανήκουν στην κατηγορία αυτή είναι η φαινυτοΐνη, το μεφαιναμικό οξύ, η δαναζόλη, η γλιβενκλαμίδα, η νιφεδιπίνη, η κετοπροφαίνη, η ναπροξένη, η καρβαμαζεπίνη και η κετοκοναζόλη.

- **Κλάση III**

Στην κατηγορία αυτή το περιοριστικό βήμα για την απορρόφηση του φαρμάκου αποτελεί η διαπέραση των μεμβρανών, όμως το φάρμακο διαλύεται ταχύτατα. Τα μόρια αυτά εμφανίζουν μεγάλη μεταβλητότητα ως προς το ρυθμό και την έκταση της απορρόφησης. Από τη στιγμή που η διάλυση πραγματοποιείται ιδιαίτερα γρήγορα, η μεταβλητότητα αυτή οφείλεται περισσότερο στη φυσιολογία και τη διαπερατότητα της μεμβράνης παρά στους παράγοντες που σχετίζονται με τη δοσολογική μορφή. Εάν η φαρμακοτεχνική μορφή δε μεταβάλλει τη διαπερατότητα ή τη διάρκεια της γαστρεντερικής απορρόφησης, τότε πληρούνται κριτήρια κλάσης I (Devane, 1998; Lipka and Amidon, 1999; Gothoskar, 2005). Παραδείγματα τέτοιων μορίων είναι η σιμετιδίνη, η ρανιτιδίνη, η ακυκλοβίρη, η νεομυκίνη Β, η ατενολόλη και η καπτοπρίλη.

- **Κλάση IV**

Τα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι συνήθως ακατάλληλα για αποτελεσματική χορήγηση από το στόμα καθώς παρουσιάζουν πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Κατά κανόνα, δεν απορροφώνται καλά από τον εντερικό βλεννογόνο και παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα. Παρόλα αυτά συναντώνται ορισμένα μόρια αυτής της κατηγορίας που έχουν μορφοποιηθεί σε *per os* χορηγούμενα σκευάσματα όπως η υδροχλωροθειαζίδη, η ταξόλη και η φουροσεμίδη.

1.5.4. ΟΡΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟ BCS

Για καλύτερη κατανόηση των ορισμών διαλυτότητα, διαπερατότητα και διάλυση σε ό,τι αφορά στο βιοφαρμακευτικό σύστημα ταξινόμησης φαρμάκων δίνονται οι εξής επεξηγήσεις (Rinaki, 2003; Lindenberg et al., 2004; Polli et al., 2004):

1. Διαλυτότητα: Ένα μόριο θεωρείται ιδιαίτερα διαλυτό όταν η μέγιστη δυνατή δόση διαλύεται σε 250 mL νερού (ή και λιγότερου) σε ένα εύρος pH από 1

έως 7.5 στους 37° C (USA Pharmacopeia, 1994; Lindenberg et al., 2004; Polli et al., 2004; Gohel, 2005).

2. Διαπερατότητα: Μια φαρμακευτική ουσία θεωρείται ότι παρουσιάζει υψηλή διαπερατότητα όταν η έκταση της απορρόφησης στον άνθρωπο ξεπερνά το 90 % της χορηγούμενης δόσης, με βάση το μέσο βάρος ή σε σύγκριση με την ενδοφλέβια χορηγούμενη δόση (USA Pharmacopeia, 1994; Gohel, 2005).
3. Διάλυση: Ένα φαρμακομόριο θεωρείται ταχέως διαλυόμενο όταν 85% και πλέον της δόσης (ποσότητας) διαλύεται σε 30 min με τη χρήση συσκευής διάλυσης USP Apparatus 1 ή 2 σε 900 mL ή και λιγότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (USA Pharmacopeia, 1994; Gohel, 2005)

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.5) παρουσιάζονται συνοπτικά οι τάξεις φαρμακομορίων του Συστήματος Βιοφαρμακευτικής ταξινόμησης και τα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 1.5: Σύστημα Βιοφαρμακευτικής Ταξινόμησης Φαρμάκων (BCS)		
Κλάση	Διαλυτότητα	Διαπερατότητα
I	Υψηλή	Υψηλή
II	Χαμηλή	Υψηλή
III	Υψηλή	Χαμηλή
IV	Χαμηλή	Χαμηλή

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΥΞΗΣΗΣ/ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ

Τα από του στόματος χορηγούμενα φάρμακα απορροφώνται πλήρως μόνο όταν επιδεικνύουν ελάχιστη διαλυτότητα στα γαστρικά υγρά, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Η ύπαρξη δραστικών ουσιών με χαμηλή υδατοδιαλυτότητα που προκαλούν φαινόμενα τοξικότητας και ερεθισμού στο γαστρεντερικό βλεννογόνο ενώ εμφανίζουν και σαφώς ελαττωμένη δράση οδήγησε αναπόφευκτα στην ανάπτυξη μεθόδων βελτίωσης της διαλυτότητάς τους. Η επίτευξη αυτού του σκοπού μπορεί να γίνει με έναν από τους εξής τρόπους:

- Μείωση του μεγέθους των σωματιδίων: Με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της δραστικής ουσίας, ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο αυξάνει. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αλληλεπίδραση με το διαλύτη, γεγονός που συμβάλλει καταλυτικά στην αύξηση της διαλυτότητας (Persky and Hughes; Kumar et al., 2011). Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων επιτυγχάνεται συνήθως με την εφαρμογή μεθόδων μηχανικής καταπόνησης (spray drying, λειοτρίβηση κ.α.), αλλά και άλλως όπως ο μικρονισμός (μείωση του μεγέθους των κόκκων στο ελάχιστο δυνατό).
- Στερεή διασπορά: Οι στερεές διασπορές αντιπροσωπεύουν μια χρήσιμη τεχνική στην φαρμακευτική βιομηχανία για την αύξηση της διαλυτότητας, της απορρόφησης και της αποτελεσματικότητας των δραστικών ουσιών. Ο όρος «στερεή διασπορά» αναφέρεται σε μια ομάδα στερεών προϊόντων που αποτελείται από τουλάχιστον δύο τμήματα: υδρόφιλο και υδρόφοβο. Υδρόφιλοι φορείς είναι οι πολυαιθυλενογλυκόλες, η πολυβινυλοπιρολιδόνη κ.α., ενώ ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται και επιφανειοδραστικά όπως το Tween 80 και το Sodium Lauryl Sulphate.
- Νανογαλακτώματα: Πρόκειται για ικανή μέθοδο μορφοποίησης για τα υδρόφοβα φάρμακα. Η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται σε ελάχιστα διαλυτά φάρμακα τόσο στο νερό όσο και σε ελαιώδεις φορείς. Τα νανογαλακτώματα είναι και αυτά διφασικά συστήματα που συνίστανται από νανοσωματίδια του φαρμάκου τα οποία σταθεροποιούνται με επιφανειοδραστικά. Προορίζονται

τόσο για *per os* όσο και για τοπική, εισπνεόμενη ή παρεντερική χορήγηση. Το μέσο μέγεθος των σωματιδίων είναι συνήθως 200-600 nm (Muller et al., 2000; Kumar et al., 2011).

- Μέθοδος υπερκρίσιμου υγρού: Τα υπερκρίσιμα υγρά είναι ουσίες των οποίων όταν η θερμοκρασία και η πίεση είναι υψηλότερες από την κρίσιμη θερμοκρασία (T_c) και την κρίσιμη πίεση (P_c) εμφανίζουν ιδιότητες τόσο υγρού όσο και αέριου. Κοντά στις τιμές της T_c και της P_c , τα υπερκρίσιμα υγρά είναι ιδιαίτερα συμπιέσιμα, με αποτέλεσμα να επιτρέπονται οι αλλαγές στην πίεση που συμβάλλουν στη μεταβολή της πυκνότητας που καθορίζει την ικανότητα διάλυσης σε ένα μέσο (Philips and Stella, 1993; Subramaniam et al., 1997; Kumar et al., 2011). Όταν τα σωματίδια του φαρμάκου διασπαρούν μέσα σε υπερκρίσιμο υγρό, επανακρυσταλλώνουν αποκτώντας σημαντικά μειωμένο μέγεθος και εξασφαλίζοντας υψηλότερη διαλυτότητα.

- Κρυογονικές μέθοδοι: Αναπτύχθηκαν για να βελτιώσουν το ρυθμό διάλυσης των φαρμάκων με τη δημιουργία άμορφων νανοσωματιδίων με υψηλό βαθμό πορώδους σε χαμηλές συνθήκες θερμοκρασίας. Μετά τη διαδικασία αυτή, η ξηρά κόνις μπορεί να ανακτηθεί με διάφορες μεθόδους όπως η λυοφιλοποίηση υπό κενό ή υπό την ατμοσφαιρική πίεση (Mumenthaler and Leuenberger, 1991; Leuenberger, 2002; Williams et al., 2003; Kumar et al., 2011).

- Μέθοδοι εγκλεισμού σε σύμπλοκα: Ανάμεσα στις μεθόδους βελτίωσης της διαλυτότητας, η μέθοδος εγκλεισμού σε σύμπλοκα έχει χρησιμοποιηθεί πιο συγκεκριμένα για να βελτιώσει την υδατοδιαλυτότητα, το ρυθμό διάλυσης και τη βιοδιαθεσιμότητα ελάχιστα υδατοδιαλυτών μορίων. Τα σύμπλοκα εγκλεισμού σχηματίζονται με την ενσωμάτωση ενός μη πολικού μορίου ή του μη πολικού τμήματος ενός μορίου («φιλοξενούμενο» μόριο – guest) μέσα στην κοιλότητα ενός άλλου μορίου ή μιας ομάδας μορίων (host). Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα, που θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα, είναι οι κυκλοδεξτρίνες οι οποίες αποτελούν προϊόντα της ενζυμικής αποικοδόμησης του αμύλου (Uekama et al., 1998; Kumar et al., 2011).

1.7. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

1.7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κυκλοδεξτρίνες, τόσο οι α- όσο οι β- και οι γ και τα αντίστοιχα παράγωγά τους, είναι γνωστές για την ικανότητά τους να εγκλείουν άπολα μόρια ή τμήματα μορίων μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητά τους. Τα σύμπλοκα που προκύπτουν διαθέτουν νέα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα αρχικά επιμέρους τμήματα (μόρια) που τα αποτελούν. Οι ιδιότητες που μεταβάλλονται αποσκοπούν κυρίως στην αύξηση της σταθερότητας του μορίου, στη βελτίωση της υδατοδιαλυτότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και στην εξάλειψη των σχετιζόμενων με τα επιμέρους μόρια του συμπλόκου ανεπιθύμητων ενεργειών (Duchêne et al., 1999). Παρόλα αυτά, οι κυκλοδεξτρίνες δεν είναι συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με δυνατότητα στόχευσης του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία ή τη γαστρεντερική οδό, γεγονός το οποίο προκαλεί ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον.

1.7.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Ο Καθηγητής József Szejtli (1933-2004) χώρισε στη χημική και βιομηχανική ανάπτυξη/πρόοδο των κυκλοδεξτρινών σε 3 στάδια:

- A. Την περίοδο της ανακάλυψης
- B. Την περίοδο της εξερεύνησης
- Γ. Την περίοδο της χρήσης και εφαρμογής

Κατά την πρώτη φάση, η καταγραφή κυκλοδεξτρινών έγινε κατά την απομόνωση 3 g κρυσταλλικής ουσίας από βακτηριακή πέψη αμύλου (Viliers, 1891). Η ουσία αυτή ήταν ανθεκτική έναντι της υδρόλυσης με οξύ και εμφάνιζε σταθερές ιδιότητες. Ο μοριακός τύπος που καταγράφηκε ήταν ο $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ ("cellulosine"). Ακολούθησε ο Schardinger ο οποίος περιέγραψε δύο κρυσταλλικά μόρια Α και Β τα οποία ονόμασε κρυσταλλικές δεξτρίνες και τα διέκρινε σε α- και β- δεξτρίνη. Τα μόρια αυτά ονομάζονται πλέον α- και β- κυκλοδεξτρίνες (Schardinger, 1903). Το

1935 ανακαλύφθηκε η γ-κυκλοδεξτρίνη από τους Freudenberg και Cramer. Κατά την περίοδο της ανακάλυψης έγινε γνωστό ότι πρόκειται για ολιγοσακχαρίτες αλλά το μοριακό βάρος τους, η ακριβής χημική δομή καθώς και το μεγαλύτερο μέρος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους παρέμεναν άγνωστες (Loftsson and Duchêne, 2006).

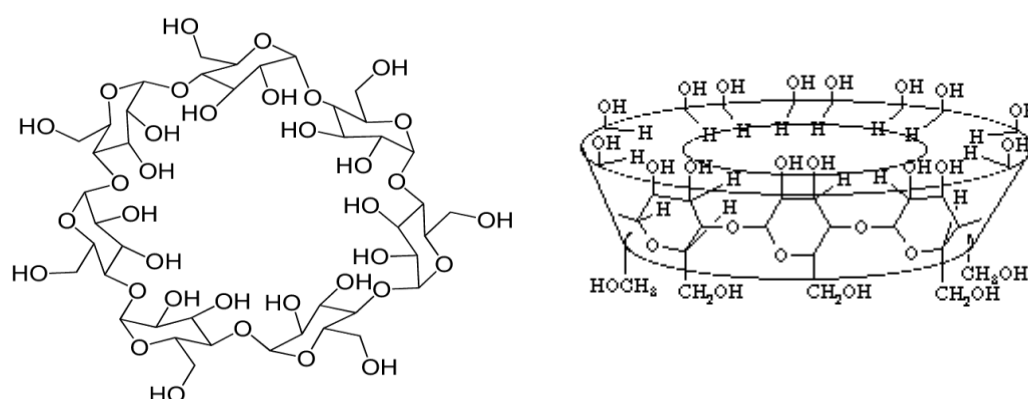
Η δεύτερη φάση («εξερεύνηση») οδήγησε σε πολλά συμπεράσματα γύρω από τις κυκλοδεξτρίνες. Το 1938, ο Freudenberg απέδειξε ότι οι κυκλοδεξτρίνες έχουν δομή δακτυλίου με α (1→4) γλυκοσιδικούς δεσμούς και διαθέτουν κοιλότητα στο κέντρο (Freudenberg and Meyer Delius, 1938), ενώ τα επόμενα χρόνια προσδιορίστηκε με ακρίβεια και το μοριακό τους βάρος (Freudenberg and Cramer, 1948). Είχε πλέον γίνει γνωστό ότι οι κυκλοδεξτρίνες διέθεταν τόσο σταθεροποιητική όσο και αποσταθεροποιητική δράση σε μόρια και για το λόγο αυτό μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενζυμικά μοντέλα αλλά και να καταστήσουν υδατοδιαλυτά ορισμένα λιπόφιλα, αδιάλυτα στο νερό μόρια.

Τέλος, το στάδιο της εφαρμογής των κυκλοδεξτρινών στη σύγχρονη φαρμακευτική τεχνολογία βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη. Αναπτύχθηκαν πολλές μέθοδοι παρασκευής, απομόνωσης και σύνθεσης μεγαλύτερων κυκλοδεξτρινών. Οι βιομηχανικές εφαρμογές των κυκλοδεξτρινών ξεκίνησαν από το χώρο των τροφίμων και των καλλυντικών (Vaution et al., 1987). Στη βιομηχανία των τροφίμων, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιήθηκαν ως σταθεροποιητές χημικώς ασταθών μορίων, ως επιμηκυντές της διάρκειας ζωής του προϊόντος και της αποτελεσματικής του δράσης, ενώ είχαν τη δυνατότητα να περιορίζουν τον ερεθισμό που προκαλούσαν τα καλλυντικά και να μειώνουν τις δυσάρεστες οσμές.

Το 1976, κυκλοφόρησε το πρώτο σε παγκόσμιο επίπεδο φαρμακευτικό σκεύασμα που συνδύαζε προσταγλαδίνη E₂ με β-κυκλοδεξτρίνη (Prostarmon ETM, υπογλώσσια δισκία). 12 χρόνια αργότερα παρουσιάστηκαν δισκία πιροξικάμης με β-κυκλοδεξτρίνη στην Ιταλία, ενώ το 1997 εγκρίθηκε στις ΗΠΑ η κυκλοφορία σκευάσματος ιτρακοναζόλης με 2-υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη. Πλέον, κυκλοφορούν 30-40 διαφορετικά σκευάσματα υπό μορφήν συμπλόκου με κυκλοδεξτρίνη.

1.7.3. ΔΟΜΗ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από μονάδες α-D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένες μεταξύ τους με α-(1→4)-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Χαρακτηριστικό του μορίου της κυκλοδεξτρίνης είναι η ύπαρξη υδρόφοβης κοιλότητας στο μέσον και υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας. Εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερης περιστροφής γύρω από τους δεσμούς που συνδέουν τις γλυκοπυρανοζικές μονάδες, οι κυκλοδεξτρίνες δεν είναι τέλεια κυλινδρικά μόρια αλλά έχουν την μορφή κώλου κώνου (Εικόνα 6). Οι συνηθέστερες μορφές κυκλοδεξτρινών είναι η α-κυκλοδεξτρίνη, η β-κυκλοδεξτρίνη και η γ-κυκλοδεξτρίνη που αποτελούνται από 6, 7 και 8 γλυκοπυρανοζικές μονάδες αντίστοιχα ενώ απαντάται και η δ-κυκλοδεξτρίνη με 9 μονάδες.



Εικόνα 6: Χημική και μοριακή δομή κυκλοδεξτρίνης

Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των κυκλοδεξτρινών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.6**. Τα σημεία τήξεως βρίσκονται μεταξύ 240 και 265 °C (Loftsson and Brewster, 1996).

Πίνακας 1.6: Βασικές ιδιότητες των κυριότερων κυκλοδεξτρινών				
	α-κυκλοδεξτρίνη	β-κυκλοδεξτρίνη	γ-κυκλοδεξτρίνη	δ-κυκλοδεξτρίνη
Αριθμός γλυκοπυρανοζικών μονάδων	6	7	8	9
Διάμετρος κεντρικής κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3	10.3-11.2
Μοριακό βάρος	972	1135	1297	1459
Υδατοδιαλυτότητα στους 25 °C (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2	8,19

Οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες είναι στερεές κρυσταλλικές ουσίες που μπορούν να δεσμεύσουν 6-13% νερό ανάλογα με το μέγεθος του δακτυλίου τους. Τα μόρια του νερού είτε εγκλείονται μέσα στην κοιλότητα, είτε διατάσσονται έξω από αυτήν αποτελώντας μέρος της κρυσταλλικής δομής των κυκλοδεξτρινών (Μήτσικας και Τζίμας, 2008).

Η διαλυτότητα στο νερό των φυσικών κυκλοδεξτρινών και ειδικά της β-κυκλοδεξτρίνης είναι μικρή, που σημαίνει ότι τα σύμπλοκα λιπόφιλων μορίων με αυτές έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και καθιζάνουν. Η υποκατάσταση, όμως, οποιουδήποτε ατόμου υδρογόνου από τις υδροξυλομάδες των ατόμων άνθρακα ακόμα και με λιπόφιλες μεθοξυ-ομάδες οδηγεί σε δραματική αύξηση της διαλυτότητάς τους στο νερό (Loftsson and Brewster, 1996).

Παράγωγα κυκλοδεξτρινών με φαρμακευτικό ενδιαφέρον είναι τα υδροξυπροπυλο-παράγωγα της β- και γ-κυκλοδεξτρίνης, η τυχαίως μεθυλιωμένη β-κυκλοδεξτρίνη, η σουλφυβουτυλαιθερο-β-κυκλοδεξτρίνη και οι λεγόμενες διακλαδισμένες κυκλοδεξτρίνες (π.χ. γλυκοσυλ-β-κυκλοδεξτρίνη) (Loftsson et al., 2004).

1.7.4. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

Η κεντρική κοιλότητα του μορίου της κυκλοδεξτρίνης σχηματίζεται από άνθρακα και συνδεδεμένα με αιθερικούς δεσμούς οξυγόνα, με αποτέλεσμα να είναι λιπόφιλη. Συνεπώς, παρέχει λιπόφιλο μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο μόρια κατάλληλου μεγέθους μπορούν να εισέλθουν και να ενσωματωθούν. Τα ελεύθερα μόρια του φαρμάκου βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία με τα μόρια που είναι συμπλοκοποιημένα με την κυκλοδεξτρίνη κατά τη διάρκεια παρασκευής του συμπλόκου. Η ισορροπία μπορεί να περιγραφεί με τη Σχέση 5:



όπου $K_{1:1}$ η τιμή της σταθεράς σύνδεσης (σχηματισμού) του συμπλόκου (συνήθως πρόκειται για 1:1 συμπλοκοποίηση) (Stella et al., 1997; Rao and Stella, 2003).

1.7.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Κατά την παρασκευή συμπλόκων εγκλεισμού των κυκλοδεξτρινών ιδιαίτερο ρόλο παίζουν η μορφή των κυκλοδεξτρινών και των εγκλειόμενων μορίων, η θερμοκρασία, η χρήση διαλυτών, η επίδραση του νερού και η χρήση υδατοδιαλυτών πολυμερών, η ρύθμιση του pH κ.α. (Del Valle, 2004).

Η εργαστηριακή παρασκευή είναι γενικά απλή και περιλαμβάνει ανάδευση ή ανακίνηση υδατικού διαλύματος της κυκλοδεξτρίνης με το φιλοξενούμενο μόριο σε περίσσεια για χρονικό διάστημα έως και μία εβδομάδα σε σταθερή θερμοκρασία (Loftsson et al., 2004).

Η απομάκρυνση του νερού γίνεται είτε με συμπύκνωση είτε με λυοφιλοποίηση μετά το τέλος της διαδικασίας εγκλεισμού.

1.7.6. 2-ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΠΥΛΟ-Β-ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗ (HP-β-CD)

Η 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη είναι υδροξυ-αλκυλο παράγωγο της β-κυκλοδεξτρίνης με μοριακό βάρος περίπου ίσο με 1400 Da. Βασικό πλεονέκτημά της είναι ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη διαλυτότητα και χαμηλότερη τοξικότητα από τις υπόλοιπες κυκλοδεξτρίνες όταν χορηγείται από το στόμα και παρεντερικά σε ανθρώπους και ζώα. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στη φαρμακευτική βιομηχανία. Η τοξικότητά της έχει μελετηθεί ευρύτατα τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο.

Σε ό,τι αφορά στον άνθρωπο, πλήθος κλινικών μελετών έδειξαν ότι είναι καλώς ανεκτή στην πλειοψηφία των ασθενών που έλαβαν HP-β-CD από το στόμα σε δόσεις 4-8 g για τουλάχιστον 2 εβδομάδες (Irie et al., 1997). Υψηλότερες από του στόματος δόσεις της τάξης των 16-24 g, όταν χορηγήθηκαν σε εθελοντές, είχαν σαν αποτέλεσμα την συχνή εμφάνιση διάρροιας και μαλακών κοπράνων. Κατά συνέπεια η μη τοξική δόση ορίζεται σε <16 g /ημέρα με μέγιστη διάρκεια χορήγησης τις 2 εβδομάδες.

Σε μελέτες γύρω από την ενδοφλέβια χορήγηση (Szathmary et al., 1990), εφάπαξ δόσεις 3 g, φάνηκαν να μην έχουν μετρήσιμη επίδραση στη νεφρική λειτουργία και ήταν γενικώς καλώς ανεκτές από τους ασθενείς.

Με βάση μελέτες σε μύες, επίμυες και κύνες, αποδείχθηκε ότι η HP-β-CD χορηγούμενη per os, είναι καλώς ανεκτή και παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα. Σε μικρής διάρκειας μελέτες (7 ημερών) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές βιοχημικές αλλαγές, ενώ σε μεγαλύτερης διάρκειας (30-90 ημερών) με δόσεις 450 mg/kg σωματικού βάρους μέχρι 5000 mg/kg σωματικού βάρους την ημέρα, παρατηρήθηκαν μικρές αιματολογικές αλλαγές και αύξηση επιπέδων των ηπατικών ενζύμων, ενώ δεν υπήρξαν ιστοπαθολογικές μεταβολές. Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση παρόμοιων δόσεων, καταγράφηκαν αναστρέψιμες ιστοπαθολογικές αλλαγές στους πνεύμονες, το ήπαρ και τους νεφρούς.

Η φαρμακοκινητική και ο μεταβολισμός της HP-β-CD μελετήθηκε σε υγιείς εθελοντές έπειτα από εφάπαξ ενδοφλέβιες και από του στόματος χορηγήσεις της. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 και 3.0 g 2-HP-β-CD, τα επίπεδα της αμετάβλητης HP-β-CD στο πλάσμα ελαττώθηκαν ταχύτατα,

ακολουθώντας διφασική μείωση. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Οι φαρμακοκινητικές παράμετροι, όπως ο χρόνος ημιζωής, η κάθαρση και ο όγκος κατανομής φάνηκε να είναι ανεξάρτητες της δόσης και τα επίπεδα στα ούρα έδειξαν ότι η απέκκριση γίνεται σχεδόν αποκλειστικά από τους νεφρούς, απουσία σωληναριακής επαναπορρόφησης. Το υπόλοιπο φάρμακο φαίνεται να υποβάλλεται σε μεταβολική κάθαρση. Μία ώρα μετά την από του στόματος χορήγηση, η HP-β-CD δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα και τα ούρα, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν απορροφάται σχεδόν καθόλου από το γαστρεντερικό επιθήλιο (<0,5 %) και ότι η *per os* βιοδιαθεσιμότητα είναι πολύ χαμηλή. Γενικώς, η απορρόφηση από το γαστρεντερικό σύστημα δεν ξεπερνάει το 1-2 % της *per os* δόσης και ο μεταβολισμός γίνεται με τη βοήθεια των βακτηρίων της φυσιολογικής μικροχλωρίδας στο τυφλό έντερο και το κόλον (Kurkon and Loftsson, 2012).

Η βιοδιαθεσιμότητα της HP-β-CD είναι επίσης χαμηλή στα ζώα (μύες, κύνες), κατά την *per os* χορήγηση. Η ανάλυση κατανομής έδειξε ότι όργανα-στόχοι είναι οι νεφροί και το ήπαρ, ενώ κατά την ενδοφλέβια χορήγηση τα κύρια όργανα είναι οι πνεύμονες και οι νεφροί. Η απέκκριση σε μύες και κύνες γίνεται μέσω των κοπράνων, μετά από *per os* χορήγηση και μέσω των ούρων μετά από ενδοφλέβια χορήγηση.

1.7.7. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΩΝ

Οι κυκλοδεξτρίνες βρίσκουν εφαρμογή τόσο στη βελτίωση της διαλυτότητας δυσδιάλυτων ουσιών όσο και της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Όμως, η χρήση τους παρατηρείται και στις εξής περιπτώσεις:

- α. Βελτίωση της σταθερότητας ευαίσθητων ουσιών σε υψηλές θερμοκρασίες, στο φως, την οξείδωση ή την αποσύνθεση από μικροοργανισμούς.
- β. Μετατροπή υγρών και ελαίων σε κόνεις.
- γ. Σταθεροποίηση και μείωση της εξάτμισης αρωματικών ουσιών.
- δ. Μείωση δυσάρεστων οσμών και γεύσεων.
- ε. Προστασία ουσιών σε μίγματα από ασυμβατότητες.
- στ. Σταθεροποίηση ιδιαίτερα πτητικών ουσιών.
- ζ. Καταλυτική δράση επί των εγκλειόμενων μορίων.

Αυτά τα χαρακτηριστικά των κυκλοδεξτρινών αλλά και των παραγώγων τους τις καθιστούν κατάλληλα μόρια για εφαρμογή σε πολλούς τομείς, και κυρίως αυτούς της αναλυτικής χημείας, της αγροτικής παραγωγής, της φαρμακευτικής και των τροφίμων (Singh et al., 2002; Del Valle, 2004).

Η προετοιμασία και παρασκευή καλλυντικών σκευασμάτων είναι ακόμη ένας τομέας με ευρύτατη χρήση των κυκλοδεξτρινών, ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά στην συμπίεση πτητικών ουσιών στα αρώματα, στα αποσμητικά χώρου και στα απολυμαντικά με ελεγχόμενη αποδέσμευση της αρωματικής ουσίας από σύμπλοκα. Τα βασικά πλεονεκτήματα των κυκλοδεξτρινών σε αυτήν την περίπτωση είναι η σταθεροποίηση, ο έλεγχος της οσμής και η δυνατότητα μετατροπής υγρής μορφής σε στερεή. Συναντώνται σε οδοντόπαστες, κρέμες, υγρά και υπό μορφήν κόνεως μαλακτικά ρούχων, χαρτοπετσέτες και χαρτομάντηλα (Del Valle, 2004).

Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται επίσης στη βιομηχανία των τροφίμων σε αρκετά μεγάλο βαθμό κυρίως για την προστασία και ανάδειξη της γεύσης και της οσμής. Σχηματίζουν σύμπλοκα με μεγάλη ποικιλία μορίων που περιλαμβάνουν λίπη, χρωστικές και γεύσεις. Οι περισσότερες φυσικές και τεχνητές γεύσεις είναι πτητικά έλαια ή υδατικά υγρά και η συμπλοκοποίησή τους με κυκλοδεξτρίνες εξασφαλίζει μια καλή εναλλακτική στην τεχνολογία ενκαψυλίωσης που χρησιμοποιείται για την προστασία της γεύσης. Οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται επίσης ως πρόσθετα βοηθήματα, όπως για παράδειγμα, στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από το γάλα, το βούτυρο και τα αυγά. Οι κυκλοδεξτρίνες δρουν ως μοριακοί ενκαψυλιωτές που προστατεύουν τη γεύση των τροφών μέσα από τις διαδικασίες καταπόνησης στις οποίες μπορεί να υποβληθεί (ψύξη, μικροκύματα) (Muñoz-Botella et al., 1995; Del Valle, 2004).

Στη φαρμακευτική βιομηχανία, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται για την ικανότητά τους να βελτιώνουν την απορρόφηση του φαρμάκου διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών. Οι κυκλοδεξτρίνες δρουν ως φορείς των φαρμακομορίων όταν αυτά είναι ιδιαίτερα υδρόφοβα, μεταφέροντάς τα στην επιφάνεια των βιολογικών μεμβρανών, π.χ. στο δέρμα ή τους βλεννογόνους, και απελευθερώνοντάς τα εκεί. Η λιπόφιλη μεμβράνη έχει μικρή συγγένεια για την υδρόφιλη επιφάνεια του μορίου της κυκλοδεξτρίνης, με αποτέλεσμα η ίδια η κυκλοδεξτρίνη να μην απορροφάται. Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στο σχεδιασμό

υδατικών δερματικών φαρμακοτεχνικών μορφών (Uekama et al., 1992), στοματικών διαλυμάτων (Kristmundsdóttir et al., 1996), ρινικών σκευασμάτων (Kublik et al., 1996) και άλλων οφθαλμικών συστημάτων (van Dorne et al., 1993; Jarho et al., 1996; Loftsson et al., 1997). Η πλειοψηφία των φαρμακευτικών μορίων δεν έχουν την επαρκή υδατοδιαλυτότητα και τα παραδοσιακά συστήματα μεταφοράς φαρμακομορίων σε αυτήν την περίπτωση συνδυάζουν οργανικούς διαλύτες, επιφανειοδραστικές ουσίες, ακραίες συνθήκες pH, γεγονός που αναπόφευκτα οδηγεί σε αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι κυκλοδεξτρίνες δεν είναι ερεθιστικές και προσφέρουν εξαιρετικά πλεονεκτήματα, όπως η σταθεροποίηση των δραστικών μορίων, η μείωση της πτητικότητας και η κάλυψη δυσάρεστων οσμών και γεύσης. Συνήθως, η ικανότητα των κυκλοδεξτρινών να αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα μιας ουσίας συμβάλλει στη μείωση της χορηγούμενης δόσης και επίτευξη του αυτού θεραπευτικού αποτελέσματος. Επίσης, έχει προταθεί και επιτευχθεί εγκλεισμός ερεθιστικών για το γαστρεντερικό βλεννογόνο ουσιών σε κυκλοδεξτρίνες έτσι ώστε να αποφευχθεί ο τραυματισμός κατά την από του στόματος χορήγηση (Del Valle, 2004).

1.8. ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ-ΒΙΟΪΣΟΔΥΝΑΜΙΑ

1.8.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η Φαρμακοκινητική εξελίχθηκε σε αναπόσπαστο κομμάτι της ανάπτυξης ενός φαρμακομορίου, και ειδικότερα στην προσπάθεια ανακάλυψης των κινητικών-δυναμικών χαρακτηριστικών της ουσίας. Ο όρος της φαρμακοκινητικής συμπεριλαμβάνει το χρόνο παραμονής ενός φαρμάκου στο σώμα και την τύχη του μέσα σε αυτό μετά τη χορήγησή του. Ο ορισμός περιλαμβάνει την απορρόφηση, την κατανομή και το μεταβολισμό (βιομετατροπή) καθώς και την απέκκριση. Η σύνδεση της φαρμακοκινητικής με τη φαρμακοδυναμική (απόκριση) προσφέρει τη γνώση γύρω από τον τρόπο με τον οποίο το φάρμακο επηρεάζει το σώμα αλλά και πώς το σώμα επηρεάζει το φάρμακο.

Ο πιο κατανοητός τρόπος για τον υπολογισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων ενός φαρμάκου είναι μέσω της μελέτης της ενδοφλέβιας χορήγησής του. Αυτή η οδός χορήγησης επιτρέπει τη συσχέτιση της δόσης με την κατανομή, την κάθαρση και τις διεργασίες του σώματος που σχετίζονται με την απέκκριση και το μεταβολισμό (νεφροί, ήπαρ). Η χορήγηση του φαρμάκου από άλλες οδούς, κυρίως την από του στόματος, εισάγει αβεβαιότητα που αντανακλά το άγνωστο μέρος/ποσοστό του φαρμάκου που απορροφάται. Συνεπώς, οι άλλες οδοί χορήγησης δεν μπορούν με ακρίβεια να αποδώσουν την κατανομή και την κάθαρση.

Η πιο σημαντική ιδιότητα οποιασδήποτε μη-ενδοφλέβιας μορφής χορήγησης, που στοχεύει στη θεραπεία μιας συστηματικής νόσου, είναι η ικανότητα να παρέχει τη δραστική ουσία στην αιματική κυκλοφορία σε ποσότητα τέτοια ώστε να προκαλεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η ιδιότητα αυτή αποκαλείται φυσιολογική διαθεσιμότητα, βιολογική διαθεσιμότητα ή βιοδιαθεσιμότητα. Η έννοια της βιοδιαθεσιμότητας εμπεριέχει δύο απαραίτητα στοιχεία, την ταχύτητα με την οποία το φάρμακο εισέρχεται στη γενική κυκλοφορία (ρυθμός απορρόφησης) και το ποσοστό του φαρμάκου που φτάνει σε αυτήν αλλά και στους ιστούς (έκταση της απορρόφησης). Δεδομένου ότι το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι συνάρτηση της

συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα του ασθενούς, τα δύο αυτά στοιχεία είναι κατά κανόνα απαραίτητα στην ανίχνευση της σχέσης δόσης-απόκρισης.

1.8.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ - ΣΧΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΤΗ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας σκευασμάτων μπορεί να έχει είτε συγκριτικό είτε απόλυτο χαρακτήρα. Στην πρώτη περίπτωση συγκρίνεται η βιοδιαθεσιμότητα δύο ή περισσότερων φαρμακοτεχνικών μορφών που δε χορηγούνται ενδοφλέβια, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η μελέτη περιλαμβάνει οπωσδήποτε ένα ενδοφλέβια χορηγούμενο σκεύασμα παράλληλα με τις υπό εξέταση μη ενδοφλέβια χορηγούμενες φαρμακοτεχνικές μορφές. Από τη μελέτη της συγκριτικής βιοδιαθεσιμότητας προκύπτουν συμπεράσματα με σχετικό χαρακτήρα για τις φαρμακοτεχνικές μορφές χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα ακριβούς προσδιορισμού της ποσότητας του φαρμάκου που φτάνει στη γενική κυκλοφορία. Στις μελέτες απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια η ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στη γενική κυκλοφορία από το υπό εξέταση σκεύασμα. Αυτό είναι εφικτό διότι το σκεύασμα αναφοράς χορηγείται ενδοφλέβια διασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό την ολοκληρωτική διάθεση του φαρμάκου στη γενική κυκλοφορία.

Ο προσδιορισμός της συγκριτικής και της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας στηρίζεται στον υπολογισμό του συντελεστή βιοδιαθεσιμότητας, F , με βάση το λόγο των εμβαδών (AUC_s) των δύο χορηγήσεων:

$$F = \frac{(AUC)_{test}}{(AUC)_{ref}} \quad (6)$$

Όπου $(AUC)_{test}$ και $(AUC)_{ref}$ τα εμβαδά των επιφανειών κάτω από την καμπύλη για το υπό έλεγχο και το σκεύασμα αναφοράς αντίστοιχα.

Η πιο πάνω σχέση ισχύει με την προϋπόθεση ότι η χορηγούμενη δόση και στις δύο περιπτώσεις είναι η ίδια. Διαφορετικά, η σχέση τροποποιείται ως εξής:

$$F = \frac{(AUC)_{p.o.} \times (Dose)_{i.v.}}{(AUC)_{i.v.} \times (Dose)_{p.o.}} \quad (7)$$

Για τον υπολογισμό της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας η διαφορά στις σχέσεις είναι ότι ως σκεύασμα αναφοράς χρησιμοποιείται η ενδοφλέβια χορηγούμενη φαρμακοτεχνική μορφή.

1.8.3. ΒΙΟΪΣΟΔΥΝΑΜΙΑ

Η έννοια της συγκριτικής βιοδιαθεσιμότητας κάτω από συνθήκες που επιβάλλουν οι υγειονομικές αρχές είναι στην ουσία η έννοια της βιοϊσοδυναμίας. Ως βιοϊσοδύναμα χαρακτηρίζονται εκείνα τα σκευάσματα τα οποία κατά τη μελέτη της συγκριτικής βιοδιαθεσιμότητας παρουσιάζουν στατιστικά ισοδύναμα μεγέθη στις παραμέτρους AUC και C_{max} . Ως ένας γενικός κανόνας αποδοχής της βιοϊσοδυναμίας δύο μορφών ενός και του αυτού φαρμάκου θεωρείται ότι τα δύο σκευάσματα δείχνουν διαφορά μικρότερη του 20% στις μέσες τιμές των δύο αυτών παραμέτρων. Οι μέσες τιμές υπολογίζονται από τις επιμέρους τιμές των μεγεθών, που προκύπτουν για κάθε έναν εθελοντή. Αυστηρότερα, όταν το 90% διάστημα εμπιστοσύνης του λόγου των γεωμετρικών μέσων των τιμών των παραμέτρων AUC και C_{max} βρίσκεται στο διάστημα 0,80-1,25. Όταν δεν ικανοποιείται αυτή η συνθήκη, τα σκευάσματα χαρακτηρίζονται ως βιοανισοδύναμα.

1.9. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΙ ΣΕ ΖΩΑ

1.9.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ο πειραματισμός σε ζώα, ή ευρέως αποκαλούμενος *in vivo* πειραματισμός, είναι η χρήση μη-ανθρώπινων όντων σε πειράματα. Εκτιμάται παγκοσμίως ότι ο αριθμός των σπονδυλωτών ζώων ποικίλλει από δεκάδες εκατομμύρια έως και περισσότερα από 100 εκατομμύρια ετησίως. Μύες, επίμυες, πτηνά, ιχθύες, βάτραχοι κ.α. περιλαμβάνονται στη λίστα των χρησιμοποιούμενων πειραματοζώων (Cohn, 2010).

Η πλειοψηφία των πειραματοζώων θανατώνονται μετά το πέρας των πειραμάτων με ευθανασία (Carbone, 2004). Οι πηγές προέλευσης ποικίλλουν από εκτροφές με σκοπό την ανατροφή πειραματοζώων με συγκεκριμένες προδιαγραφές έως και την αιχμαλώτιση από την άγρια φύση (Institute for Laboratory Animal Research, 1988).

Η έρευνα διεξάγεται συνήθως σε Πανεπιστήμια, φαρμακευτικές εταιρίες, ερευνητικά κέντρα και εμπορικές εγκαταστάσεις που παρέχουν υπηρεσίες πειραματισμού σε ζώα στη βιομηχανία (UK Parliament, 2012). Τις περισσότερες φορές, η έρευνα αφορά στη γενετική, τη μελέτη της συμπεριφοράς, τη βιοϊατρική, τον έλεγχο φαρμάκων και δοκιμασίες τοξικότητας (κυρίως σε σχέση με τη χρήση καλλυντικών).

1.9.2. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι παλαιότερες αναφορές γύρω από τον πειραματισμό στα ζώα βρίσκονται στις γραφές των Αρχαίων Ελλήνων κατά τον 2^ο και 4^ο π.Χ. αιώνα. Ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) και ο Ερασίστρατος (304-258 π.Χ.) ήταν ανάμεσα σε αυτούς που επεχείρησαν πειράματα σε ζωντανά ζώα (Cohen and Loew, 1984). Ο Γαληνός, φυσιοδίφης από τη Ρώμη (2^{ος} μ.Χ. αιώνας), ανέτεμνε χοίρους και αίγες και έγινε γνωστός ως ο πατέρας της ζωτομίας (History of nonhuman animal research, 2012).

Τα ζώα έχουν χρησιμοποιηθεί επανειλημμένα κατά την ανάπτυξη της βιοϊατρικής έρευνας. Το 1880, ο Louis Pasteur, παρουσίασε τη γονιδιακή θεωρία γύρω από τα φάρμακα στηρίζοντάς την σε ένα πείραμα κατά το οποίο ενσωμάτωσε άνθρακα στο γενετικό υλικό προβάτων (Mock and Fouet, 2001). Η ινσουλίνη απομονώθηκε για

πρώτη φορά το 1922 από κύνες, φέρνοντας την επανάσταση στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη (Gorden, 1997). Στις 3 Νοεμβρίου 1957, η Λάικα, σκύλος από τη Σοβιετική Ένωση, ήταν ο πρώτος ζων οργανισμός που τέθηκε σε τροχιά γύρω από τη Γη. Τη δεκαετία του 1970, αναπτύχθηκαν αντιβιοτικά και εμβόλια κατά της λέπρας χάρη στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε armadillos (Walgate, 1981). Ακολούθησαν τα πειράματα γενετικής που οδήγησαν στη γέννηση της Dolly το 1996, του πρώτου θηλαστικού που κλωνοποιήθηκε από ένα και μόνο ενήλικο κύτταρο (Wilmut et al., 1997).

Τα τεστ τοξικότητας έγιναν δημοφιλή κατά τον 20^ο αιώνα, καθώς κατά τον 19^ο αιώνα η νομοθεσία γύρω από τα φάρμακα και τα καλλυντικά ήταν λιγότερο αυστηρή. Η ανάγκη προέκυψε μετά το σκάνδαλο με το «Ελιξήριο του σουλφανιλαμιδίου» το 1937, όταν απεβίωσαν περισσότερα από 100 άτομα κατά τη χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η νομοθεσία όρισε τότε ως απαραίτητη τη διενέργεια ελέγχων ασφάλειας των φαρμάκων με τη χρήση πειραματοζώων, πριν την ευρεία κυκλοφορία τους στο εμπόριο. Οι τελικοί αυστηροί έλεγχοι καθορίστηκαν μετά την τραγωδία της θαλιδομίδης, τη δεκαετία του 1960.

1.9.3. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

Οι κανονισμοί που διέπουν τη χρήση πειραματόζων διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος. Γενικώς, οποιαδήποτε πειραματική διεργασία μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα πειραματόζωο, εάν αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί και να τεκμηριωθεί επιστημονικά ως απαραίτητη. Συνήθως, κάθε ίδρυμα με πειραματόζωα, έχει ως επικεφαλής έναν κτηνίατρο-σύμβουλο, ο οποίος καθοδηγεί τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επίσης, πρέπει να διασφαλίζεται ότι έχουν ληφθεί πρωτίστως υπόψιν οι εναλλακτικές της αποφυγής πειραματισμού σε ζώα, και ότι εξασφαλίζεται αναλγησία (με εξαίρεση την παρεμβολή της στα πειραματικά αποτελέσματα) (Carbone, 2004).

Υπάρχει γενική αποδοχή ότι η ζωή των πειραματόζων είναι σημαντική και ότι οι επιστήμονες οφείλουν να χρησιμοποιούν τον ελάχιστο δυνατό αριθμό (Flecknell, 2002). Παρόλα αυτά, οι αρχές θεωρούν τον πόνο ως το πιο σημαντικό ζήτημα και για το λόγο αυτό ορίζουν την ευθανασία ως το μέσο ελάττωσης του πόνου (Animal

Procedures Committee, 2003). Τα πειραματόζωα θυσιάζονται συνήθως στο τέλος των πειραματικών διεργασιών είτε για τη συλλογή δειγμάτων είτε και για τοξικολογική εξέταση. Η κυριότερη μέθοδος ευθανασίας είναι η ταχεία αναισθησία και θανάτωση χωρίς την πρόκληση πόνου (Guide for the care and use of laboratory animals, 1996). Τα ζώα συνήθως εισπνέουν κάποιο αναισθητικό αέριο (π.χ. ισοφλουράνιο) και η θανάτωση γίνεται είτε με αποκεφαλισμό (decapitation- για τρωκτικά) είτε με αυχενική εξάρθρωση (cervical dislocation-για μύες, πτηνά κ.α.) είτε με τεμαχισμό (πτηνά μίας ημέρας) είτε με εγκεφαλική έκθεση σε υψηλής συχνότητας ακτινοβολία.

1.9.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Η βασική έρευνα κατευθύνεται στον τρόπο συμπεριφοράς κάθε οργανισμού, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του. στην περίπτωση αυτή απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραματόζωων καθώς και αυξημένη ποικιλία. Φρουτόμυγες, νηματοειδείς έλμινθες, μύες και επίμυες αποτελούν τον κύριο όγκο των χρησιμοποιούμενων πειραματόζωων. Συνήθως, η καθαρή έρευνα ασχολείται με την εμβρυογένεση, τη στόχευση γονιδίων (Sung et al., 2004; Venken and Bellen, 2005), τη συμπεριφορά και την προσαρμοστικότητα των ζώων (Prasad and Reed, 1999; Schafer, 2006), αλλά και την εξέλιξη των ειδών (Festing, 2008).

Η εφαρμοσμένη έρευνα στοχεύει στην επίλυση σοβαρών και πρακτικών προβλημάτων και εφαρμόζεται κυρίως στη φαρμακευτική βιομηχανία και την πανεπιστημιακή κοινότητα. Αφορά κυρίως στην ανάπτυξη ζωικών μοντέλων για νόσους και το πρώιμο στάδιο της ανακάλυψης και του σχεδιασμού νέων φαρμάκων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα περιλαμβάνουν τη γενετική τροποποίηση ζώων για τη μελέτη ασθενειών (Ramaswamy et al., 2007), τη χρήση νοσούντων οργανισμών για την εφαρμογή και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας θεραπευτικών προσεγγίσεων (Vail and MacEwen, 2000; Dunham, 2006), τον έλεγχο τοξικότητας καλλυντικών και φαρμάκων, τη μελέτη των φαρμάκων κατά τις διαφορετικές οδούς χορήγησης, τη διεξαγωγή μελετών αποτελεσματικότητας (φαρμακοδυναμική) φαρμάκων κ.α.

1.9.5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΟΝ IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟ

Τα ηθικά διλήμματα που προκύπτουν γύρω από την εφαρμογή πειραμάτων σε ζώα βρίσκονται υπό διερεύνηση και έχουν κατατεθεί πολλές απόψεις γύρω από το συγκεκριμένο ζήτημα. Αυτές έχουν να κάνουν κυρίως με το ποιες διαδικασίες είναι χρήσιμες και για ποιο σκοπό μπορούν να εφαρμοστούν σε *in vivo* πειραματισμό. Παγκοσμίως, είναι πλέον αποδεκτή η χρήση πειραματόζωων για επιστημονικούς και ιατρικούς σκοπούς, αρκεί να εξασφαλίζεται ότι τα πειραματόζωα δεν υποφέρουν και ότι χρησιμοποιείται ο ελάχιστος δυνατός αριθμός (1985 Amendment to Animal Welfare Act).

Κατά γενική αποδοχή έχει επικρατήσει ο κανονισμός των «3 R» (Flecknell, 2002) ο οποίος περιλαμβάνει τα εξής:

- 1. Replacement:** Αναφέρεται στην προτίμηση χρήσης άλλων μεθόδων και όχι της *in vivo* όπου αυτό είναι εφικτό (για την επίτευξη του ίδιου επιστημονικού σκοπού).
- 2. Reduction:** Η χρήση του όσο το δυνατόν μικρότερου αριθμού πειραματόζωων και η εξασφάλιση από αυτόν της μέγιστης πληροφορίας.
- 3. Refinement:** Αφορά στον περιορισμό του πόνου που υποφέρουν τα πειραματόζωα και την εξασφάλιση της ευζωίας τους στο μέτρο του δυνατού κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, 2012).

Βασιζόμενοι στα παραπάνω, οι επιστήμονες ανά τον κόσμο χρησιμοποιούν τις *in vivo* μεθόδους για την εξέλιξη της επιστημονικής γνώσης και την ανακάλυψη νέων δεδομένων που θα συμβάλλουν καταλυτικά στη θεραπεία ασθενειών, στην εξεύρεση λύσεων στα προβλήματα της σύγχρονης κοινωνίας κ.λπ.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η σιλιμπινίνη ως ιδιαίτερα δυσδιάλυτη ουσία παρουσιάζει εξαιρετικά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα χορηγούμενη από το στόμα. Κατά συνέπεια, η από του στόματος χορηγούμενη δόση είναι πολύ υψηλή και τα επίπεδα που επιτυγχάνονται στο αίμα δυσανάλογα χαμηλά σε σχέση με αυτήν.

Πρόσφατα, παρασκευάστηκε από την ερευνητική μας ομάδα και αξιολογήθηκε *in vitro*, λυόφιλο προϊόν του συμπλόκου της σιλιμπινίνης με τη 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD-SLB), το οποίο έχει τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερη διαλυτότητα κορεσμού από τη σιλιμπινίνη σε υδατικά μέσα με pH 1-7.4 (Μήτσικα Γ.-Τζίμα Σ., Πτυχιακή Εργασία, 2008).

Σε συνέχεια της μελέτης αυτής, στην παρούσα εργασία το λυόφιλο προϊόν HP-β-CD-SLB χορηγήθηκε ενδοφλέβια και από του στόματος σε μύες του είδους Black-6/C57bl/6J (Εικόνα 7) και πραγματοποιήθηκε φαρμακοκινητική μελέτη με στόχο την εύρεση της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης.

Παράλληλα με τα δείγματα αίματος, συλλέχθηκαν και δείγματα ιστών στα ίδια χρονικά σημεία με στόχο την κατανόηση και περιγραφή της κινητικής της σιλιμπινίνης σε αυτούς και τη διερεύνηση της εφαρμογής της στη θεραπευτική, μελέτη που βρίσκεται σε εξέλιξη και δεν περιγράφεται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 7: Μύες του γένους Black-6/C57bl/6J

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)
Αυτόματος δειγματολήπτης SHIMADZU SIL-HTC
Αντλία ULFC SHIMADZU LC-20AD prominence
Ανιχνευτής UV-Vis GBC LC 1210
- Στήλη BDS C18 Hypersil, 250 x 4.6 mm, Thermo Scientific
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους Pharmaspec UV-1700 (UV-Vis Spectrophotometer)-SHIMADZU
- Κυψελίδες από χαλαζία, 9-Q-10mm Semi Micro Rectangular Quartz cell with 10mm P/L 2 off Lightpath Optical (UK) LTD
- Θερμοστατούμενο λουτρό υπερήχων Elma S-100H Elmasonic
- Θερμοστατούμενο ανακινούμενο υδατόλουτρο με σκέπαστρο για την επώαση των δειγμάτων P SELECTA Unitronic OR
- Φυγόκεντρος SIGMA 202 MK
- Πεχάμετρο SCHOTT Lab 360
- Θερμοστατούμενη μαγνητική πλάκα IKA RH basic 2
- Αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός KERN AEJ (max 220 g, min 0,01 g)
- Συσκευή διήθησης AFORA 5810/3, 5810/4
- Λυοφιλοποιητής Cryodos TELESTAR Model CRYODOS – 50 2002
- Vortex IKA MS 3 Basic

2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΥΛΙΚΑ

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια και υλικά:

- Σιλμπινίνη (SIGMA ALDRICH Cas No: 2288-70-6)
- Ναρινγενίνη

- 2-Υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD) MB=1500 g/mol SIGMA ALDRICH
- Δισόξινο φωσφορικό νάτριο (ένυδρο), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, MB=156,02 g/mol, MERCK Darmstadt Germany
- Υδροξείδιο του νατρίου, NaOH, MB=40,00 g/mol, MERCK Darmstadt Germany
- Μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC, FISCHER SCIENTIFIC, Cas No: 67-56-1
- Ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας HPLC, FISCHER SCIENTIFIC, Cas No: 75-05-8
- Απιονισμένο νερό
- Νερό HPLC-grade FISCHER SCIENTIFIC, MB=18,02 g/mol
- Φίλτρα διήθησης διαλυμάτων HPLC Uptidisc membranes nylon 47 mm 0,45 UM, 50 U, INTERCHROM N11 850
- Πυκνή αμμωνία, NH_3 25 %, MB=17,03 g/mol, PANREAC
- Ένζυμο β-γλυκουρονιδάση (β-glucuronidase), 196000 units/g solid from *Helix pomatia* Type H-1, SIGMA ALDRICH
- Οξικό νάτριο (CH_3COONa), MB=82,03 g/mol, MERCK, Darmstadt Germany
- Πυκνό οξικό οξύ (CH_3COOH -glacial acetic acid 100%), MB=60,05 g/mol, MERCK Darmstadt Germany
- Water for injection, αμπούλες των 5 mL, DEMO S.A.

2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Διάλυμα καυστικού νατρίου 0,1 M

Ζυγίζονται 4 g στερεού NaOH και διαλύονται σε νερό σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στον εξώθερμο χαρακτήρα της διαδικασίας της διάλυσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1 M pH 5,45

Για την παρασκευή 1 L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0,1 M διαλύονται 15,6 g NaH_2PO_4 σε περίπου 800 mL νερού βαθμού καθαρότητας HPLC, με τη βοήθεια του λουτρού υπερήχων, σε ποτήρι ζέσεως χωρητικότητας 1000 mL.

Το pH ρυθμίζεται με τη στάγδην προσθήκη διαλύματος NaOH 0,1 M στο 5,45 υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και αραιώνεται με νερό έως τη χαραγή.

Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5,0

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος οξικών ζυγίζονται 9,45 g οξικού νατρίου (CH_3COONa), προστίθενται σε αυτά 1,725 mL πυκνού οξικού οξέος (CH_3COOH) και το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τα 500 mL με απιονισμένο νερό.

Διάλυμα παρακαταθήκης σιλιμπινίνης

Ζυγίζονται 60 mg καθαρής σιλιμπινίνης και διαλύονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με μεθανόλη βαθμού καθαρότητας HPLC. Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος παρακαταθήκης είναι 600 $\mu\text{g/mL}$.

Διάλυμα παρακαταθήκης εσωτερικού προτύπου ναρινγενίνης

Ζυγίζονται 10 mg ναρινγενίνης και διαλύονται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL με ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας HPLC. Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονται στην κατάψυξη μέσα σε ερμητικά κλειστά υάλινα φιαλίδια καλυμμένα με αλουμινόχαρτο και parafilm.

Διάλυμα αμμωνίας 5 M

Μεταφέρονται με σιφώνιο 4 mL π. NH_3 σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και πραγματοποιείται αραιώση με απιονισμένο νερό ως τη χαραγή.

Παρασκευή κινητής φάσης HPLC και υγρού έκπλυσης

Πρόκειται για διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-ακετονιτρίλιου σε αναλογία 50:50 v/v. Η παρασκευή γίνεται με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου και με ιδιαίτερη φροντίδα ως προς την ακρίβεια της αναλογίας. Ακολουθεί απαέρωση σε λουτρό υπερήχων για ένα τέταρτο της ώρας και διήθηση με τη συσκευή Millipore για εξασφάλιση της μεγαλύτερης δυνατής καθαρότητας. Το υγρό έκπλυσης παρασκευάζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με μόνη διαφορά την αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος από νερό βαθμού καθαρότητας HPLC.

Παρασκευή διαλύματος ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης 3000 units/mL

Ζυγίζονται 3,2 mg ενζύμου και διαλύονται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών. Το διάλυμα του ενζύμου παρασκευάζεται και χρησιμοποιείται αυθημερόν.

2.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ/HP-β-CD ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΟΓΙΑΣ 1:1

Για την παρασκευή του συμπλόκου (όπως περιγράφεται στην πτυχιακή εργασία των Μήτσικα-Τζίμα, 2008) ζυγίζονται 186 mg 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως μαζί με 25-27 mL απιονισμένου νερού. Υπό συνεχή ανάδευση προστίθενται 30 mg σιλιμπινίνης μέσα στο ποτήρι ζέσεως και παρατηρείται ο σχηματισμός θολού εναιωρήματος. Το ηλεκτρόδιο του πεχαμέτρου τοποθετείται στο ποτήρι ζέσεως και το pH μετράται αρχικά γύρω στο 4,5-4,6. Προστίθεται στάγδην διάλυμα αμμωνίας 5 M και το pH ανεβαίνει περίπου στο 10,5.

Το ποτήρι ζέσεως καλύπτεται με αλουμινοχαρτο λόγω του φωτοευαίσθητου χαρακτήρα της σιλιμπινίνης και αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα, ενώ πραγματοποιείται συνεχής καταγραφή της τιμής του pH του διαλύματος. Σε περίπτωση μείωσης της τιμής του pH κατά τη διάρκεια της αντίδρασης εγκλεισμού προστίθενται ακόμη μερικές σταγόνες διαλύματος αμμωνίας. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει είναι διαυγές υποκίτρινο και αραιώνεται ως τα 30 mL. Το διάλυμα κατανέμεται σε υάλινα φιαλίδια έτσι ώστε να περιέχονται 2,5 mL υγρού σε κάθε φιαλίδιο. Ακολουθεί λυοφιλοποίηση για 48 περίπου ώρες υπό υψηλό κενό έτσι ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία και να ληφθεί σε στερεή μορφή το φάρμακο. Το προϊόν που προκύπτει είναι σομόν χρώματος στερεό με υφή βάμβακος.

2.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

2.5.1. IN VITRO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Βασική προτεραιότητα για την έναρξη της χορήγησης του συμπλόκου *in vivo* ήταν η μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου όταν αυτό βρίσκεται διαλυμένο στο μέσο χορήγησης. Αρχικά, επιλέχθηκε το μέσο διάλυσης του φαρμάκου μεταξύ των: φυσιολογικού ορού (Sodium chloride) 0,9 %, δεξτρόζης 35 % και αποστειρωμένου ενέσιμου ύδατος (Water for Injection).

Πραγματοποιήθηκε διάλυση των 2,5 mg του συμπλόκου που περιέχονταν σε κάθε φιαλίδιο με 1 mL από τα παραπάνω μέσα διάλυσης. Με τη χρήση φυσιολογικού ορού παρατηρήθηκε άμεσος σχηματισμός εναιωρήματος και όχι διαλύματος, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό του ως μέσου χορήγησης, καθώς η ύπαρξη ιζήματος απέκλειε την ενδοφλέβια χορήγηση.

Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε τόσο δεξτρόζη όσο και ενέσιμο ύδωρ. Και στα δύο μέσα, η διαλυτότητα υπήρξε εξίσου καλή ενώ ο έλεγχος του pH έδειξε τιμή γύρω στο 6,0. Προτιμήθηκε μεταξύ των δύο μέσων, το αποστειρωμένο ύδωρ καθώς δεν παρουσιάζει ουσιαστική διαφορά με το νερό και δε θα δημιουργούσε δυσχέρειες κατά την *per os* χορήγηση στους μύες.

Παράλληλα, τα διαλύματα μελετήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους σε σχέση με το χρόνο. Για το λόγο αυτό, 3 φιαλίδια με 2,5 mg σιλμπινίνης στο καθένα (συνολικά 16,5 mg συμπλόκου) ανασυστάθηκαν καθένα από αυτά με 5 mL ενέσιμου ύδατος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) σε μήκος κύματος $\lambda=326$ nm σε χρόνους $t=0, 30$ min, 1h, 2h, 3h και 24h. Δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς με διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων σιλμπινίνης εύρους 4.5-30 $\mu\text{g/mL}$ σε MeOH-Water for Injection 50:50 v/v (Το διάλυμα παρακαταθήκης της σιλμπινίνης σε μεθανόλη δημιουργούσε παρεμπόδιση στο υπεριώδες και η αραιώση με ίσο όγκο ενέσιμου ύδατος εξισορροπούσε την παρεμπόδιση αυτή) για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης σιλμπινίνης σε κάθε φιαλίδιο σε σχέση με το χρόνο. Η επεξεργασία των άγνωστων δειγμάτων υπήρξε η ίδια με αυτή των διαλυμάτων για την καμπύλη αναφοράς.

2.5.2. IN VIVO ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την από του στόματος χορήγηση του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε ανασύσταση του λυόφιλου προϊόντος με 1 mL ενέσιμου ύδατος (Water for Injection) και χορηγήθηκε 0,5 mL ανά μύ, δόση αντίστοιχη με 50 mg/kg σωματικού βάρους.

Οι αρσενικοί μύες (Black 6-C57bl/6J) ζυγίστηκαν (μέσο βάρος περίπου 25 g) και χωρίστηκαν σε ομάδες των πέντε, καθεμιά από τις οποίες αντιπροσώπευε και ένα χρονικό σημείο. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν για τα χρονικά σημεία: 1, 5, 10, 15 και 30 λεπτά καθώς και για τις 1, 2 και 6 ώρες. Η χορήγηση έγινε με την τεχνική του gavage (Εικόνα 8) και προηγούνταν αναισθητοποίηση του πειραματόζωου για την πραγματοποίηση της αιμοληψίας απευθείας από την καρδιά. Τα δείγματα αίματος φυλάσσονταν σε μη ηπαρηνισμένα erpendorfs (βρέθηκε ότι η ηπαρίνη παρεμπόδιζε τη μέτρηση του φαρμάκου κατά την ανάλυση των δειγμάτων και προτιμήθηκε η αποφυγή της χρήσης της) και φυγοκεντρούνταν αμέσως για την απομόνωση του ορού.



Εικόνα 8: Per os χορήγηση με την τεχνική του gavage

Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση, η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρέμεινε η ίδια με τη διαφορά ότι οι κλωβοί των μυών τοποθετούνταν επάνω σε ειδικές θερμοφόρες πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας με σκοπό τη διαστολή των αγγείων της ουράς. Με αυτόν τον τρόπο, τα αγγεία γίνονταν εμφανή και γινόταν δυνατή η ενδοφλέβια χορήγηση. Επίσης, η δόση περιορίστηκε στα 20 mg/kg σωματικού βάρους, που εξασφαλιζόταν με απευθείας έγχυση 0,2 mL του ανασυσταμένου λυόφιλου προϊόντος.

Για λόγους δεοντολογίας, οι μύες θυσιάζονταν αμέσως μετά τη δειγματοληψία και καθώς παρέμεναν σε αναισθησία με αυχενική εξάρθρωση.

2.5.3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ο ορός του αίματος φυλάσσονταν σε βαθιά κατάψυξη (-20 °C στον υπερκαταψύκτη). Για τον προσδιορισμό της μητρικής (αμεταβόλισης-parent) σιλιμπινίνης, 25 μL ορού μεταφέρονταν σε errendorf μαζί με 5 μL μεθανόλης βαθμού καθαρότητας HPLC και 50 μL εσωτερικού προτύπου ναρινγενίνης (c=100 μg/mL σε ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας HPLC για την καταβύθιση των πρωτεϊνών του ορού του αίματος). Ακολουθούσε καλή ανάδευση με το Vortex και φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 12 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγονταν με πιπέτα και τοποθετούνταν σε ειδικά φιαλίδια προς ένεση στο σύστημα HPLC.

Για τον προσδιορισμό της ολικής σιλιμπινίνης (parent και μεταβολίτη), 15 μL ορού αίματος και 45 μL ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης (3000 units/mL) τοποθετούνταν σε errendorf, ακολουθούσε ανάδευση με Vortex και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (μετατροπή του γλυκουρονιδίου της σιλιμπινίνης σε σιλιμπινίνη). Από το μίγμα αυτό, λαμβάνονταν με πιπέτα 30 μL και μεταφέρονταν σε νέο errendorf μαζί με 60 μL εσωτερικού προτύπου και 5 μL μεθανόλης βαθμού καθαρότητας HPLC, φυγοκεντρούνταν για 12 λεπτά στις 10.000 rpm και το υπερκείμενο υγρό ενίονταν στο σύστημα HPLC προς ανάλυση και υπολογισμό των επιπέδων της σιλιμπινίνης στο αίμα.

2.5.4. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της σιλιμπινίνης στα δείγματα αίματος των μυών, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς σε ανθρώπινο πλάσμα (βρέθηκε ότι ανάμεσα σε ανθρώπινο blank πλάσμα και σε ορό αίματος μύος δεν υπάρχουν σημαντικές χρωματογραφικές διαφοροποιήσεις, και για την αποφυγή θανάτωσης επιπλέον πειραματόζων προτιμήθηκε η χρήση ανθρώπινου πλάσματος).

Ο τρόπος κατασκευής των καμπυλών αναφοράς περιλαμβάνει τα ίδια βήματα με την επεξεργασία των δειγμάτων (τόσο για την ολική όσο και για την ελεύθερη σιλιμπινίνη) με τη διαφορά ότι τα 5 μL μεθανόλης αντικαθίστανται με διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων σιλιμπινίνης σε μεθανόλη (διαλύματα εργασίας).

Για τη μέτρηση της σιλιμπινίνης κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς εύρους συγκεντρώσεων 45-10.000 ng/mL (τελική συγκέντρωση στο ενιόμενο δείγμα) με τη χρήση διαλυμάτων εργασίας με συγκεντρώσεις 0,72-160 $\mu\text{g/mL}$ για τη μητρική σιλιμπινίνη και 0,855-190 $\mu\text{g/mL}$ για την ολική (μητρική και μεταβολίτης).

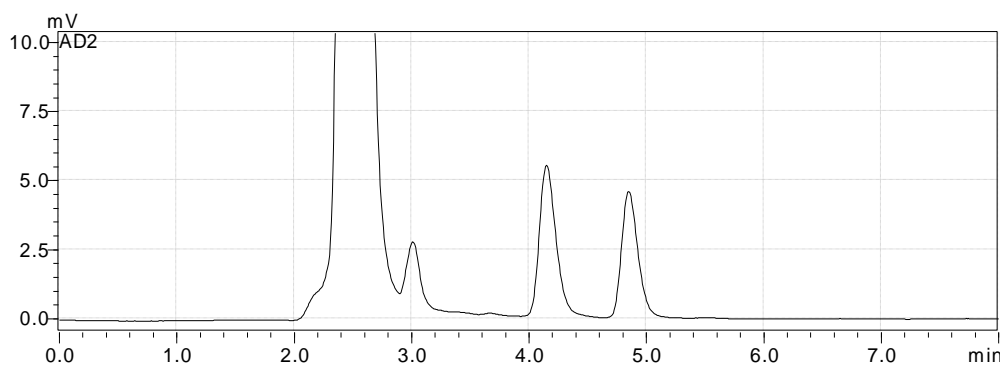
2.5.5. HPLC ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Κατά την έναρξη του πειράματος, πραγματοποιούνταν αρχικό conditioning της στήλης με ACN-HPLC water 50/50 για περίπου ένα τέταρτο της ώρας και ακολουθούσε αλλαγή με την κινητή φάση ACN-Buffer 50/50. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ο χρόνος ανάλυσης του δείγματος στα 7 min. Ανάμεσα στη μέτρηση δύο δειγμάτων πραγματοποιούνταν ένεση ACN στο σύστημα για την αποφυγή του φαινομένου carry-over. Η ανίχνευση της σιλιμπινίνης πραγματοποιούνταν σε μήκος κύματος $\lambda=288$ nm του υπεριώδους και το δείγμα που ενιόνταν είχε όγκο 20 μL . Υπολογίστηκαν τόσο το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD-Limit of Detection) όσο και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ-Limit of quantification).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΦΑΣΜΑΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Με βάση τη βιβλιογραφία η μέτρηση της σιλιμπινίνης γινόταν στα 288 nm, βέλτιστο μήκος κύματος για την ακριβέστερη ανίχνευση της ουσίας. Η κορυφή που παρατηρούνταν ήταν λεπτή και συμμετρική, όπως άλλωστε απαιτείται για τον καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ πολλών ανιχνευόμενων ουσιών, ειδικά στη συγκεκριμένη περίπτωση στην οποία η κορυφή του εσωτερικού προτύπου βρίσκεται πολύ κοντά με την κορυφή της σιλιμπινίνης. Οι χρόνοι έκλυσης των δύο ουσιών ήταν $t_{R,SLB}=4,1$ min και $t_{R,IS}=4,6$ min περίπου για τη σιλιμπινίνη και τη ναρινγενίνη αντίστοιχα ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες περιβάλλοντος. Οι χρόνοι αυτοί επέτρεπαν την ταχεία ανάλυση του δείγματος αλλά και την έλλειψη παρεμπόδισης από τα ενδογενή συστατικά του πλάσματος που εκλούονταν σε χρόνο περίπου 2,5 min.



Σχήμα 3.1: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα της HPLC ανάλυσης. Οι πρώτες κορυφές αντιστοιχούν στα ενδογενή συστατικά του πλάσματος. Στα 4,1 min παρατηρείται η κορυφή της σιλιμπινίνης και στα 4,6 min η κορυφή του εσωτερικού προτύπου ναρινγενίνης.

3.2. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

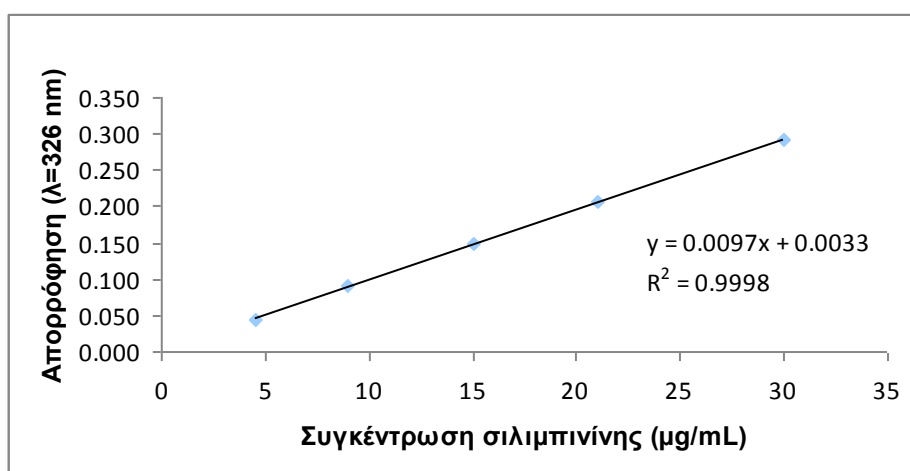
Για την *in vitro* πειραματική διαδικασία κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού με τον τρόπο που παρουσιάστηκε στην

παράγραφο 2.5.1. Κατασκευάστηκαν επίσης καμπύλες αναφοράς τόσο για τον υπολογισμό της parent όσο και της parent σιλιμπινίνης μαζί με το μεταβολίτη με τη χρήση ανθρώπινου πλάσματος στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Ο τρόπος παρασκευής περιγράφηκε στην ενότητα 2.5.4. της παρούσας.

3.2.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΟ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ

Στον πίνακα παρατίθενται οι παράμετροι των καμπυλών αναφοράς των διαλυμάτων σιλιμπινίνης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη σταθερότητας του συμπλόκου σε σχέση με το χρόνο. Παρατηρήθηκε καλή γραμμικότητα.

Πίνακας 3.1: Παράμετροι καμπυλών αναφοράς για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της σιλιμπινίνης			
α/α	Κλίση (b±s)	Τεταγμένη (a±s)	R ²
1	0,00986 ± 0,00015	-0,0029 ± 0,0027	0,9993 (5)
2	0,00969 ± 0,00016	0,0015 ± 0,0029	0,9992 (5)
3	0,009665 ± 0,000085	0,0033 ± 0,0016	0,9998 (5)

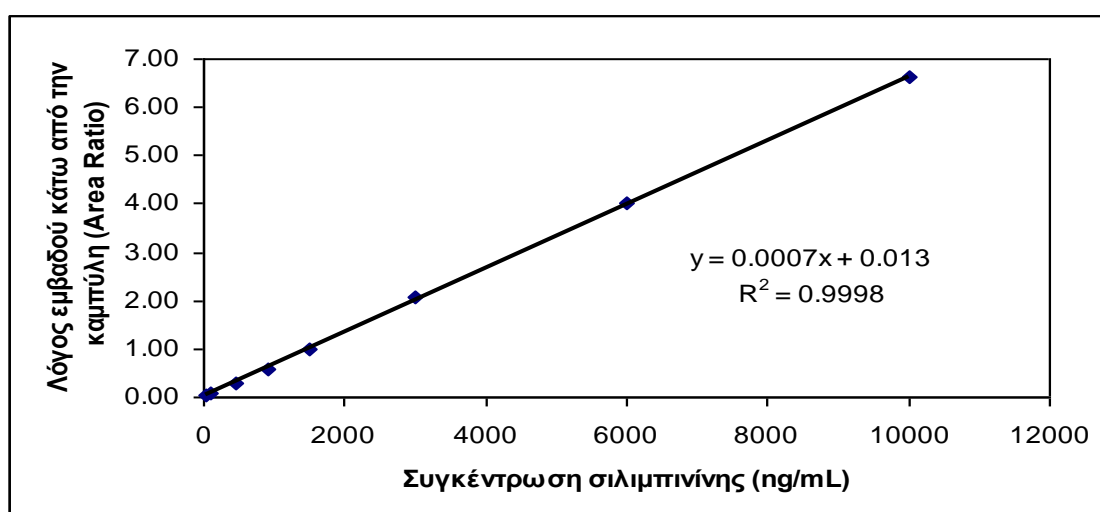


Σχήμα 3.2: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της σιλιμπινίνης

3.2.2. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΜΕ HPLC ΤΗΣ ΜΗΤΡΙΚΗΣ (PARENT) ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Στον πίνακα παρατίθενται οι αναλυτικές παράμετροι των καμπυλών αναφοράς από το μέσο όρο τριών μετρήσεων για το κάθε σημείο. Μετρήθηκε η επιφάνεια κάτω από την κορυφή της σιλιμπινίνης και η επιφάνεια κάτω από την κορυφή του εσωτερικού προτύπου και υπολογίστηκαν οι αντίστοιχοι λόγοι (Area SLB/Area IS ratio). Η περιοχή συγκεντρώσεων γραμμικής απόκρισης της σιλιμπινίνης ήταν 45-10.000 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς παρουσίασαν καλή γραμμικότητα και επαναληψιμότητα.

Πίνακας 3.2: Παράμετροι καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό της μητρικής σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος με HPLC			
α/α	Κλίση (b±s)	Τεταγμένη (a±s)	R²
1	0,0006634 ± 0,0000042	0,013 ± 0,018	0,9998 (8)
2	0,0005937 ± 0,0000092	-0,013 ± 0,013	0,9990 (8)
3	0,000676 ± 0,000016	0,033 ± 0,013	0,9994 (8)

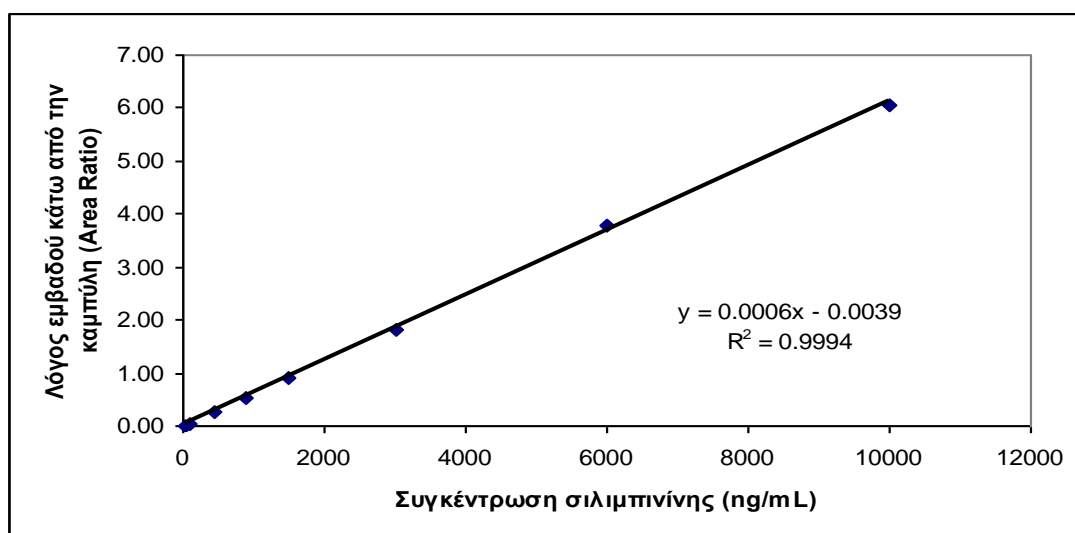


Σχήμα 3.3: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της μητρικής σιλιμπινίνης με HPLC

3.2.3. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΗPLC ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΟΛΙΚΗΣ (PARENT ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ) ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Για την ολική σιλιμπινίνη (parent και μεταβολίτης), η διαδικασία κατασκευής των καμπυλών αναφοράς ήταν η ίδια. Η περιοχή συγκεντρώσεων γραμμικής απόκρισης της σιλιμπινίνης ήταν 45-10.000 ng/mL. Οι καμπύλες αναφοράς παρουσίασαν καλή γραμμικότητα και επαναληψιμότητα. Στον πίνακα παρατίθενται οι αναλυτικές παράμετροι τριών καμπυλών αναφοράς.

Πίνακας 3.3: Παράμετροι καμπυλών αναφοράς για τον προσδιορισμό της ολικής σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος με HPLC			
α/α	Κλίση (b±s)	Τεταγμένη (a±s)	R²
1	0,0006135 ± 0,0000059	-0,004 ± 0,026	0,9994 (8)
2	0,0006111 ± 0,0000063	-0,003 ± 0,027	0,9994 (8)
3	0,0007181 ± 0,0000082	-0,0034 ± 0,0012	0,9995 (8)

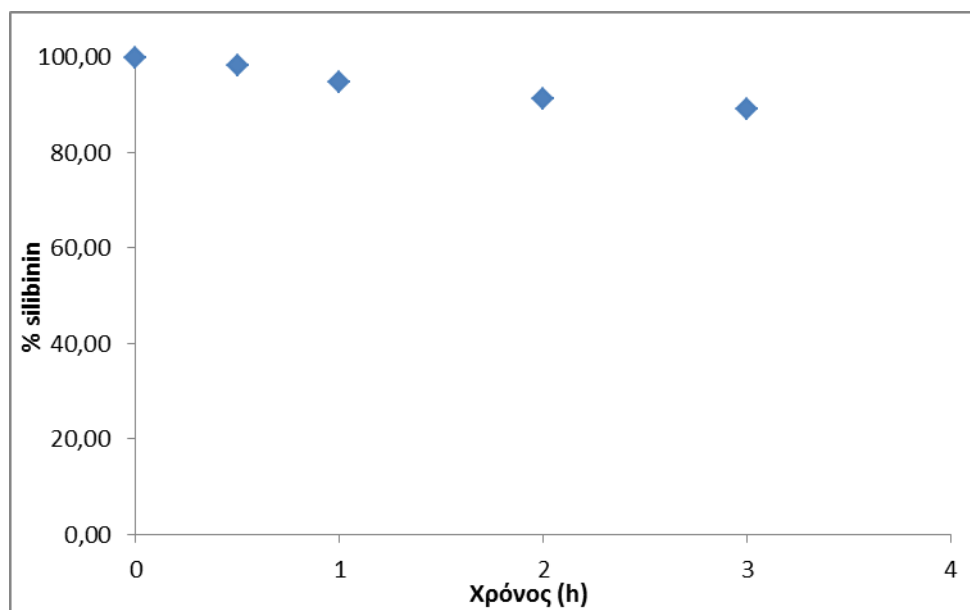


Σχήμα 3.4: Ενδεικτική καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της ολικής σιλιμπινίνης με HPLC

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΛΥΟΦΙΛΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΗΡ-β-CD/SLB ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΝΕΣΙΜΟ ΥΔΩΡ

Τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας του λυόφιλου συμπλόκου της σιλιμπινίνης με την ΗΡ-β-CD δίνονται στον Πίνακα 3.4. Παρατηρείται σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης της σιλιμπινίνης στο διήθημα σε χρονικό διάστημα 24 ωρών. Παραταύτα, δεδομένου ότι η συγκέντρωση είναι σταθερή (διαφορά <98%) στο διάστημα της μισής ώρας που είναι το μέγιστο που μεσολαβεί από τη στιγμή της ανασύστασης μέχρι τη χορήγηση του προϊόντος στους μύες κατά τα in vivo πειράματα, το ενέσιμο ύδωρ επιλέχθηκε ως διαλύτης ανασύστασης.

Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας του λυόφιλου συμπλόκου ΗΡ-β-CD/SLB μετά από ανασύσταση με ενέσιμο ύδωρ		
Χρόνος (h)	Μέση συγκέντρωση σιλιμπινίνης στα 3 φιαλίδια (μg/mL) ± SD	% Εναπομείνασα σιλιμπινίνη (± SD)
0	747 ± 11	100
0.5	733 ± 10	98,17 ± 0,31
1	707 ± 25	94,7 ± 3,2
2	682 ± 30	91,3 ± 4,3
3	667 ± 26	89,2 ± 4,1
24	600 ± 32	80,4 ± 5,4



Σχήμα 3.5: Διάγραμμα απεικόνισης του ποσοστού της εναπομείνουσας σιλιμπινίνης σε σχέση με το χρόνο για τις 3 πρώτες ώρες

3.4. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο υπολογισμός της ανάκτησης του φαρμάκου στον ορό του αίματος, δηλαδή η συσχέτιση της υδατικής συγκέντρωσης του φαρμάκου με αυτήν στον ορό αποτελεί βασική προϋπόθεση για την περαιτέρω διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας και των μετρήσεων των επιπέδων του φαρμάκου στους μύες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Κατασκευάστηκαν καμπίλες αναφοράς τόσο σε νερό όσο και σε ανθρώπινο πλάσμα ενίοντας γνωστές συγκεντρώσεις από τα διαλύματα εργασίας της σιλιμπινίνης. Ο τρόπος κατασκευής των καμπυλών αναφοράς περιγράφηκε νωρίτερα. Η μελέτη ανάκτησης του φαρμάκου (recovery) πραγματοποιήθηκε για τη μητρική και την ολική σιλιμπινίνη αντίστοιχα αλλά και για το εσωτερικό πρότυπο ναρινγενίνη. Στους παρακάτω Πίνακες 3.6 και 3.7 φαίνονται τα αποτελέσματα.

Πίνακας 3.6: Μελέτη ανάκτησης της μητρικής σιλμπινίνης και του εσωτερικού προτύπου ναρινγενίνης		
Συγκεντρώσεις καμπύλης αναφοράς (ng/mL)	Ανάκτηση parent SLB (%) ± SD	Ανάκτηση Ναρινγενίνης (%) ± SD
45	96 ± 10	106,7 ± 2,7
90	105,7 ± 8,7	108,5 ± 5,7
450	113,0 ± 6,6	104,2 ± 1,6
900	119,1 ± 6,4	105 ± 7
1500	108,9 ± 7,2	104,7 ± 1,2
3000	114,9 ± 8,7	104,6 ± 7,9
6000	105 ± 10	100,3 ± 5,1
10000	106,2 ± 8,3	102,4 ± 4,8

Πίνακας 3.7: Μελέτη ανάκτησης της ολικής σιλμπινίνης (parent και μεταβολίτη) και του εσωτερικού προτύπου ναρινγενίνης		
Συγκεντρώσεις καμπύλης αναφοράς (ng/mL)	Ανάκτηση ολικής SLB (%) ± SD	Ανάκτηση Ναρινγενίνης (%) ± SD
45	102 ± 12	100,0 ± 3,0
90	95 ± 10	102,9 ± 5,2
450	108,7 ± 4,9	104,3 ± 2,6
900	103 ± 13	102,10 ± 0,81
1500	102 ± 15	100,5 ± 7,1
3000	111,4 ± 3,2	98,0 ± 6,0
6000	113,1 ± 4,1	100,0 ± 2,7
10000	106,7 ± 7,1	92,6 ± 3,9

3.5. ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOQ)

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η εξής μέθοδος: Εκτυπώθηκαν στην ίδια κλίμακα μεγέθυνσης το χρωματογράφημα της μικρότερης συγκέντρωσης της καμπύλης αναφοράς (45 ng/mL) και το χρωματογράφημα του blank ορού αίματος. Στη συνέχεια μετρήθηκε το ύψος της κορυφής που αντιστοιχεί στα 45 ng/mL καθώς και το ύψος του θορύβου στο σημείο αυτό στο blank. Ο υπολογισμός έγινε με την αφαίρεση από το ύψος της κορυφής της σιλιμπινίνης του μισού του ύψους της κορυφής του θορύβου και διαίρεση με το ύψος της κορυφής του θορύβου σε εκατοστά (cm).

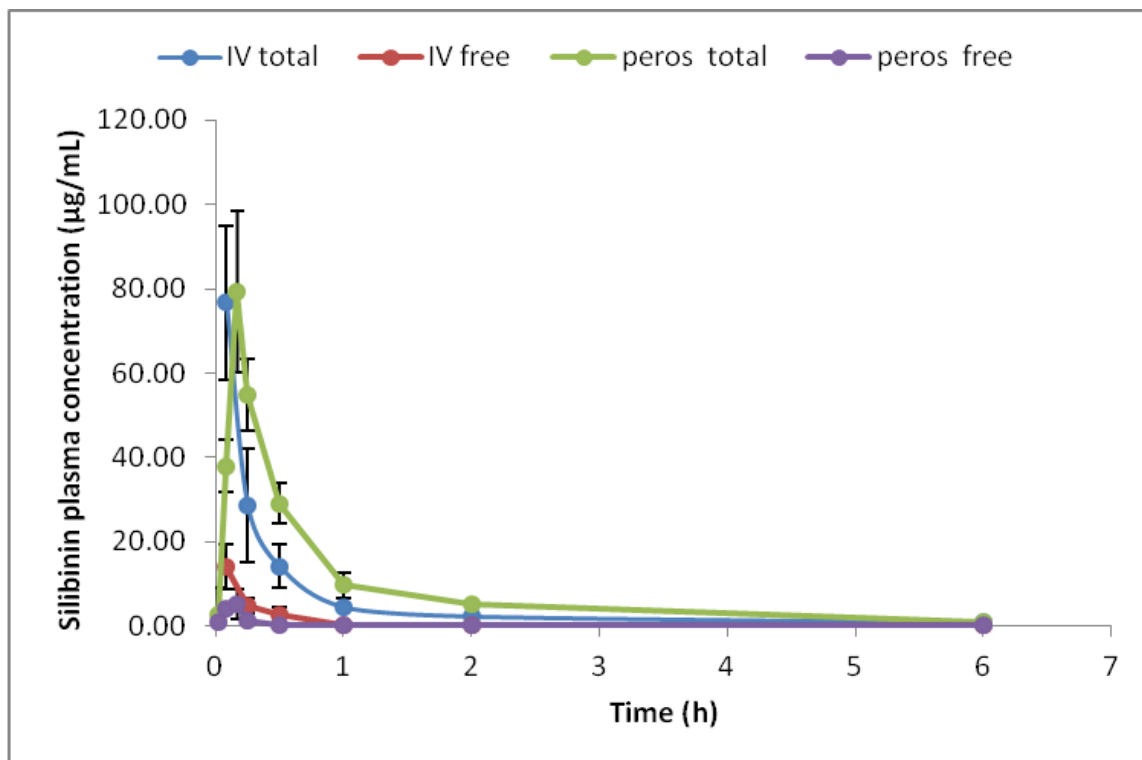
Βρέθηκε ότι το όριο ποσοτικοποίησης είναι τα 72,9 ng/mL, ενώ το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι χαμηλότερο και υπολογίστηκε στα 24,07 ng/mL.

3.6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ HPLC

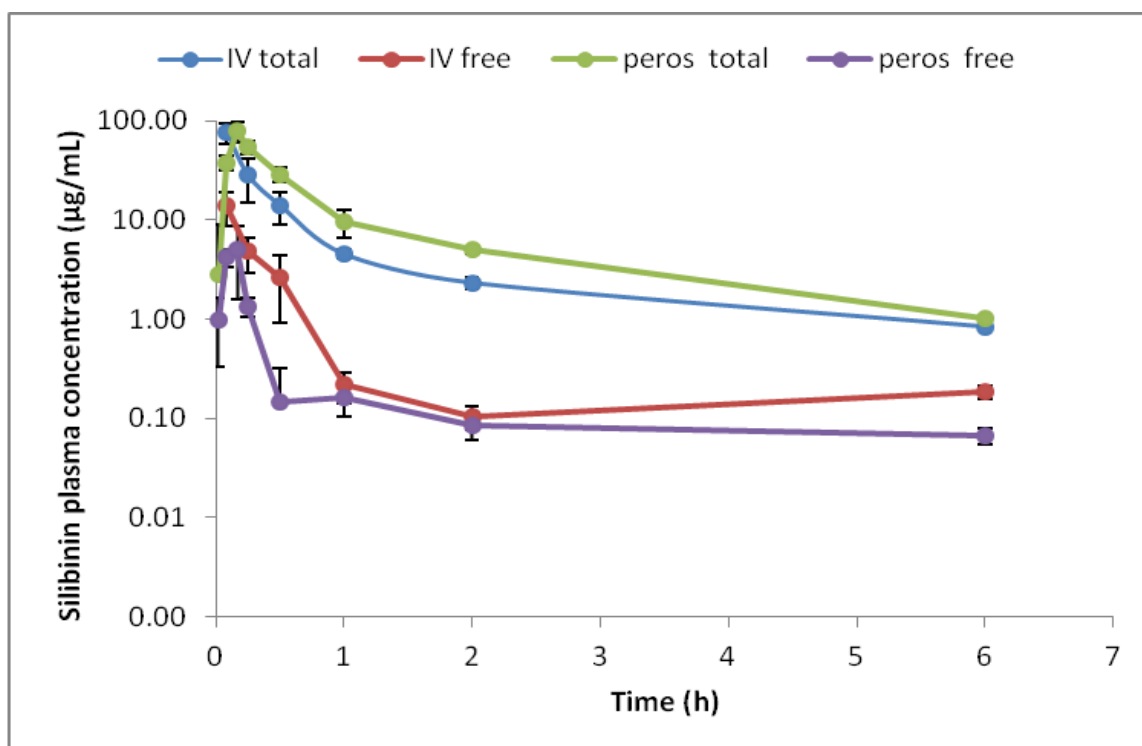
Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις της μητρικής (αμεταβόλιστης) και ολικής (μητρική και μεταβολίτης) SLB στον ορό του αίματος των μυών μετά από *peros* και *i.v.* χορήγηση του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB, παρατίθενται στη συνέχεια υπό μορφή πινάκων (Πίνακες 3.8 & 3.9) και με μορφή απεικονίσεων συγκέντρωσης – χρόνου (Σχήματα 3.6 & 3.7).

Πίνακας 3.8: Μετρούμενες συγκεντρώσεις μητρικής και ολικής SLB στον ορό αίματος μετά από <i>per os</i> χορήγηση		
Time Point (min)	SLB Serum Concentration Parent (μg/mL) ± SD	SLB Serum Concentration Total (parent+metabolized) (μg/mL) ± SD
1	0,98 ± 0,65	2,8 ± 1,5
5	4,23 ± 0,82	28,1 ± 6,3
10	5,1 ± 3,5	63 ± 23
15	1,34 ± 0,29	46,3 ± 1,7
30	0,30 ± 0,18	21,4 ± 8,5
60	0,151 ± 0,016	9,7 ± 4,8
120	0,092 ± 0,024	5,0 ± 3,0
360	0,072 ± 0,012	1,01 ± 0,47

Πίνακας 3.9: Μετρούμενες συγκεντρώσεις μητρικής και ολικής SLB στον ορό αίματος μετά από <i>i.v.</i> χορήγηση		
Time Point (min)	SLB Serum Concentration Parent (μg/mL) ± SD	SLB Serum Concentration Total (parent+metabolized) (μg/mL) ± SD
5	14,0 ± 5,2	77 ± 18
15	4,8 ± 1,8	28 ± 13
30	2,6 ± 1,7	14,1 ± 5,1
60	0,223 ± 0,074	4,55 ± 0,42
120	0,102 ± 0,027	2,33 ± 0,31
360	0,182 ± 0,026	0,841 ± 0,043



Σχήμα 3.6: Απεικόνιση των μεταβολών της συγκέντρωσης της σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος συναρτήσει του χρόνου



Σχήμα 3.7: Απεικόνιση των μεταβολών της συγκέντρωσης της σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος συναρτήσει του χρόνου με τη χρήση λογαριθμικής κλίμακας

3.7. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των *in vivo* πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Phoenix®1.3.

Αρχικά έγινε μη-διαμερισματική ανάλυση (non-compartmental analysis, NCA) των δεδομένων συγκέντρωσης στον ορό – χρόνου, τόσο για τα δεδομένα της *i.v.* χορήγησης όσο και για τα δεδομένα της *per os* χορήγησης. Η NCA βοήθησε στον υπολογισμό των παραμέτρων AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , και την εκτίμηση της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της SLB μετά από την *per os* χορήγηση με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου με την ΗΡ-β-CD. Επιλέχθηκε η μεθοδολογία μη-διαμερισματικής ανάλυσης αραιών δεδομένων (NCA sparse methodology) δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε ικανός αριθμός πειραματοζώων (40 για την *per os* και 30 για την *i.v.* χορήγηση) είχαμε μόνο ένα χρονικό σημείο δειγματοληψίας σε κάθε ζώο. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο (NCA) αρχικά υπολογίζεται η μέση καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου με υπολογισμό της μέσης συγκέντρωσης στο πλάσμα σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας και το τυπικό σφάλμα (SE) των δεδομένων συγκέντρωσης σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οι θεωρητικοί και όχι οι πραγματικοί χρόνοι δειγματοληψίας. Χρησιμοποιώντας τη μέση καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου υπολογίζονται οι βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι της μη-διαμερισματικής ανάλυσης AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} . Επιπλέον υπολογίζεται το SE των παραμέτρων AUC_{0-t} και C_{max} , χρησιμοποιώντας την υπάρχουσα πληροφορία για κάθε ζώο. Πιο συγκεκριμένα, το $SE(C_{max})$ υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση της συγκέντρωσης σε χρόνο T_{max} . Ο υπολογισμός του $SE(AUC_{0-t})$ γίνεται με βάση την εξίσωση 8:

$$SE(AUC) = \sqrt{Var(AUC)} \quad (8)$$

Δεδομένου ότι η παράμετρος AUC υπολογίζεται με τον κανόνα των τραπεζίων ως γραμμικός συνδυασμός των μέσων τιμών συγκέντρωσης, η μεταβλητότητά της ($Var(AUC)$) θα δίνεται από την εξίσωση 9:

$$Var(AUC) = \sum_{i=0}^m \frac{w_i^2 s_i^2}{r_i} + 2 \sum_{i < j} \frac{w_i w_j r_{ij} s_{ij}}{r_i r_j} \quad (9)$$

όπου: r_{ij} ο αριθμός ζώων με δύο χρονικά σημεία δειγματοληψίας i και j
 r_i ο αριθμός των ζώων με ένα χρονικό σημείο δειγματοληψίας, i
 s_i^2 η διακύμανση της συγκέντρωσης τη χρονική στιγμή i
 s_{ij} η συνδιακύμανση μεταξύ των συγκεντρώσεων C_{ik} και C_{jk} για όλα τα ζώα, k ,
στα οποία υπάρχουν δείγματα σε χρόνο i και j

Η μεθοδολογία μη-διαμερισματικής ανάλυσης αραιών δεδομένων εφαρμόστηκε για τα δεδομένα συγκέντρωσης-χρόνου τόσο της μητρικής (αμεταβόλισης, parent SLB) όσο και της ολικής (parent και μεταβολίτης) σιλιμπινίνης.

Στη συνέχεια έγινε φαρμακοκινητική μοντελοποίηση των δεδομένων συγκέντρωσης στον ορό-χρόνου, για την περιγραφή της κινητικής της σιλιμπινίνης μετά από ενδοφλέβια στιγμιαία χορήγηση και *per os* χορήγηση καθώς και για τον υπολογισμό βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων (ολική κάθαρση Cl , όγκος κατανομής Vd , σταθερά ρυθμού απορόφησης, ka).

Για την προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *naïve pooled* η οποία είναι η ενδεδειγμένη για προ-κλινικές *in vivo* μελέτες όπου είναι συνήθως διαθέσιμο μόνο ένα ή δύο δείγματα αίματος από κάθε ζώο. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή, όταν εφαρμόζεται σε πληθυσμιακά δεδομένα, αντιμετωπίζει όλες τις παρατηρήσεις σαν να προέρχονται από ένα άτομο, δηλαδή αγνοεί την υπάρχουσα διατομική μεταβλητότητα και υπολογίζει μόνο τις τιμές των παραμέτρων, και το τυπικό σφάλμα της εκτίμησης, λαμβάνοντας όμως υπόψη τις διατομικές διαφορές στη δόση και στις τιμές των συμμεταβλητών, αν υπάρχουν.

Η διαμερισματική ΦΚ ανάλυση έγινε τόσο για τη μητρική ουσία σιλιμπινίνη (SLB) όσο και για τον μεταβολίτη της SLB.

3.7.1. ΜΗ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΡΑΙΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ (NCA sparse methodology)

Τα αποτελέσματα της μη-διαμερισματικής ανάλυσης των δεδομένων συγκέντρωσης-χρόνου τόσο για την ολική (μητρική και μεταβολίτης) όσο και για τη μητρική SLB, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10: Μη διαμερισματική ανάλυση αραιών δεδομένων				
Φαρμακοκινητικές Παράμετροι	i.v. χορήγηση		p.o. χορήγηση	
	Total SLB (%RSE)	Parent SLB (%RSE)	Total SLB (%RSE)	Parent SLB (%RSE)
AUC_{0-t} (h×μg)/mL	39,8 (3,41)	4,96 (8,67)	45,3 (5,19)	1,23 (11,4)
C_{max} (μg/mL)	84,1 (5,43)	14,0 (16,8)	79,2 (4,53)	5,08 (30,9)
T_{max} (h)	0,83	0,83	0,167	0,167
t_{1/2} (h)	2,2	0,27	1,46	1,73
CL [mL/(g×h)]	0,563	5,0	1,002	32,28

AUC: επιφάνεια κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου, C_{max}:μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα , T_{max}:χρόνος επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης, t_{1/2}: χρόνος ημιζωής απομάκρυνσης, CL: ολική κάθαρση

Ο υπολογισμός της παραμέτρου AUC έγινε με τη μέθοδο των τραπεζίων ενώ οι παράμετροι C_{max} και T_{max} προκύπτουν απευθείας από τα πειραματικά δεδομένα. Για τον υπολογισμό της παραμέτρου t_{1/2} έγινε γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης στα τρία τελευταία σημεία της απεικόνισης συγκέντρωσης-χρόνου, υπολογίστηκε η σταθερά του ρυθμού απομάκρυνσης k_{el} από την κλίση της ευθείας και ο χρόνος ημιζωής από τη σχέση k_{el}=0.693/t_{1/2}. Η παράμετρος CL υπολογίζεται από τη σχέση CL=Dose/AUC.

3.7.2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΣΙΛΙΜΠΙΝΙΝΗΣ

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.11) παρατίθενται τα δεδομένα της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης όταν αυτή χορηγείται με τη μορφή του συμπλόκου με την υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη σε αντιδιαστολή με την απόλυτη βιοδιαθεσιμότητά της κατά τη χορήγησή της υπό μορφήν καθαρής ουσίας (Wu et al., 2006).

Πίνακας 3.11: Απόλυτη % βιοδιαθεσιμότητα ολικής και μητρικής SLB μετά από χορήγηση του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD- SLB και της καθαρής ουσίας			
Λυόφιλο σύμπλοκο με HP-β-CD		Καθαρή σιλιμπινίνη	
Total SLB	Parent SLB	Total SLB	Parent SLB
45,5	9,92	4,04	0,95

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι το λυόφιλο σύμπλοκο της σιλιμπινίνης με υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη παρουσιάζει περίπου 10 φορές μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα σε σχέση με την καθαρή σιλιμπινίνη. Παρατηρείται επίσης ότι η μητρική SLB (αμεταβόλιση) έχει σημαντικά μικρότερη βιοδιαθεσιμότητα σε σχέση με την ολική (μητρική και μεταβολίτης) τόσο μετά από χορήγηση με τη μορφή του λυόφιλου προϊόντος όσο και ως καθαρή ουσία (διάλυμα σε αιθανόλη και PEG200 1:1 v/v, Wu et al., 2007). Είναι πιθανόν η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα να οφείλεται στο έντονο φαινόμενο πρώτης διόδου που υφίσταται η ουσία κατά την από του στόματος χορήγηση.

Η αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα της σιλιμπινίνης όταν χορηγείται με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου δίνει ελπιδοφόρα μηνύματα για περαιτέρω έρευνα γύρω από την ουσία αυτή σε συνδυασμό με τη συγκεκριμένη φαρμακοτεχνική μορφή, δεδομένου ότι αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά τα προβλήματα διαλυτότητας και απορρόφησης παρέχοντας τη δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής της σιλιμπινίνης στην θεραπευτική .

3.7.3. ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα από τη διαμερισματική φαρμακοκινητική ανάλυση των δεδομένων συγκέντρωσης στον ορό – χρόνου της μητρικής SLB και του μεταβολίτη, μετά από i.v. και *per os* χορήγηση του λυόφιλου προϊόντος HP-β-CD-SLB, δίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.12).

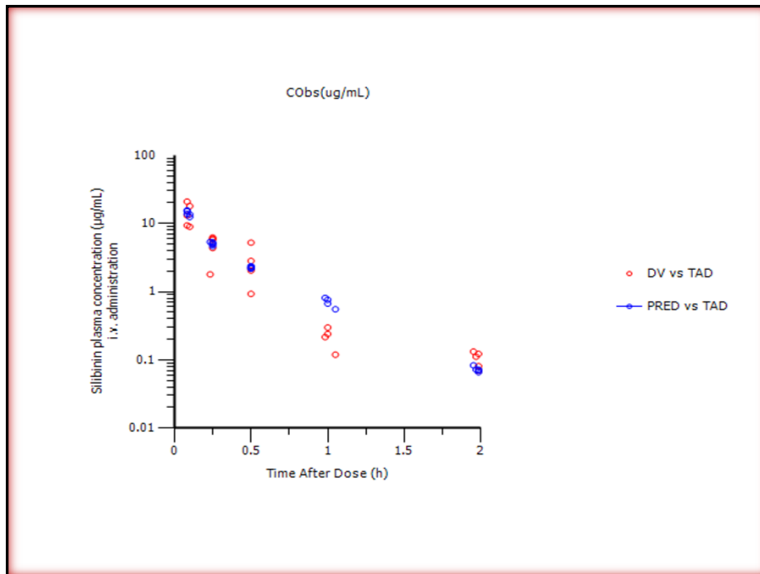
Πίνακας 3.12: Τιμές ΦΚ παραμέτρων (\pm %RSE) όπως υπολογίζονται με βάση το δι-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής				
Φαρμακοκινητικές Παράμετροι	i.v. χορήγηση		p.o. χορήγηση	
	parent SLB (%RSE)	SLB metabolite (%RSE)	parent SLB (%RSE)	SLB metabolite (%RSE)
CL [mL/(g×h)]	4,91 (22,5)	0,76 (4,33)	26,2 (13,7)	1,15 (9,56)
V₁ (mL/g)	0,66 (81,5)	0,31 (9,26)	4,33 (26,1)	0,32 (82,7)
Q [mL/(g×h)]	4,29 (44,1)	0,37 (11,1)	25,2 (20,1)	0,61 (21,8)
V₂ (mL/g)	0,77 (62,0)	0,86 (12,8)	88,6 (35,9)	1,98 (52,2)
K_a (h⁻¹)	-	-	12,0 (23,4)	3,31 (66,8)

Το % υπολειπόμενο σφάλμα κυμαίνεται μεταξύ 16 (μητρική SLB, i.v. χορήγηση) και 58 (μητρική SLB, *per os* χορήγηση)
CL: ολική κάθαρση, **V₁, V₂:** όγκοι κατανομής κεντρικού και περιφερικού διαμερίσματος, **Q:** δια-διαμερισματική κάθαρση, **K_a:** πρωτοταξική σταθερά ρυθμού απορρόφησης

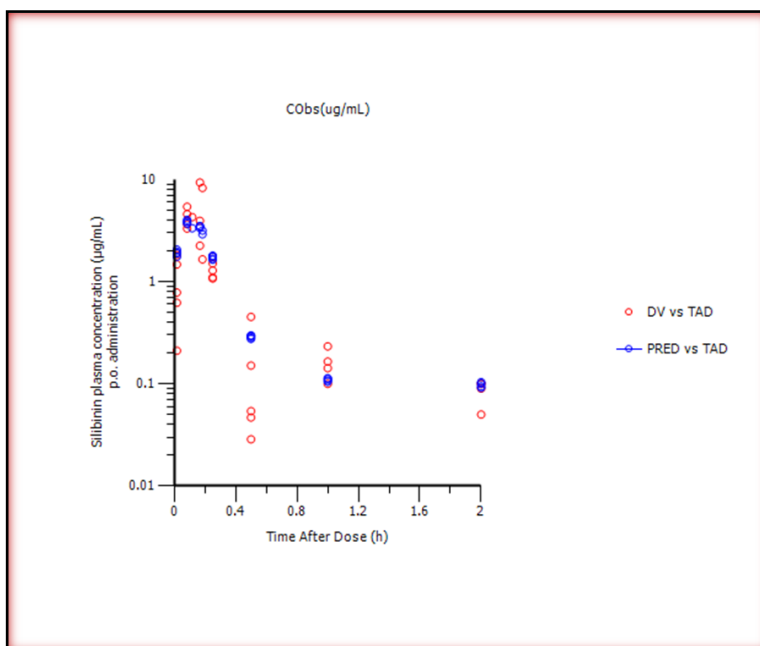
Το δι-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής με πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης περιγράφει ικανοποιητικά την κινητική τόσο της μητρικής SLB όσο και του μεταβολίτη της SLB μετά από ενδοφλέβια χορήγηση του λυόφιλου συμπλόκου με την HP-b-CD. Για την *per os* χορήγηση θεωρήθηκε επίσης πρωτοταξική κινητική εισόδου της SLB στη γενική κυκλοφορία του αίματος.

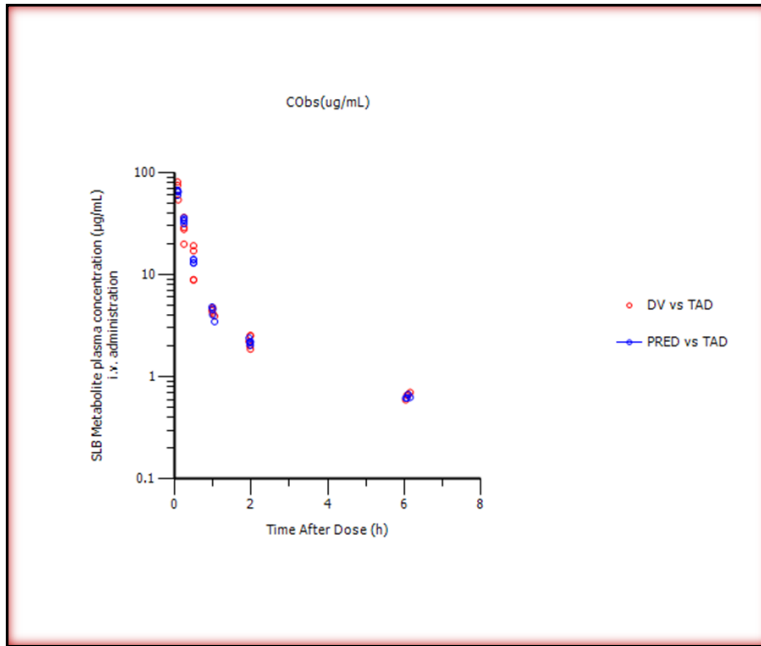
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι απεικονίσεις συγκέντρωσης στον ορό-χρόνου τόσο για τις μετρούμενες όσο και για τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές

συγκέντρωσης για την μητρική SLB και τον μεταβολίτη της SLB (Σχήματα 3.8 & 3.9) μετά από ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB. Επίσης παρουσιάζονται οι απεικονίσεις των μετρούμενων συγκεντρώσεων της μητρικής SLB και του μεταβολίτη ως προς τις προβλεπόμενες από το μοντέλο αντίστοιχες τιμές συγκέντρωσης (Σχήματα 3.10-3.11)

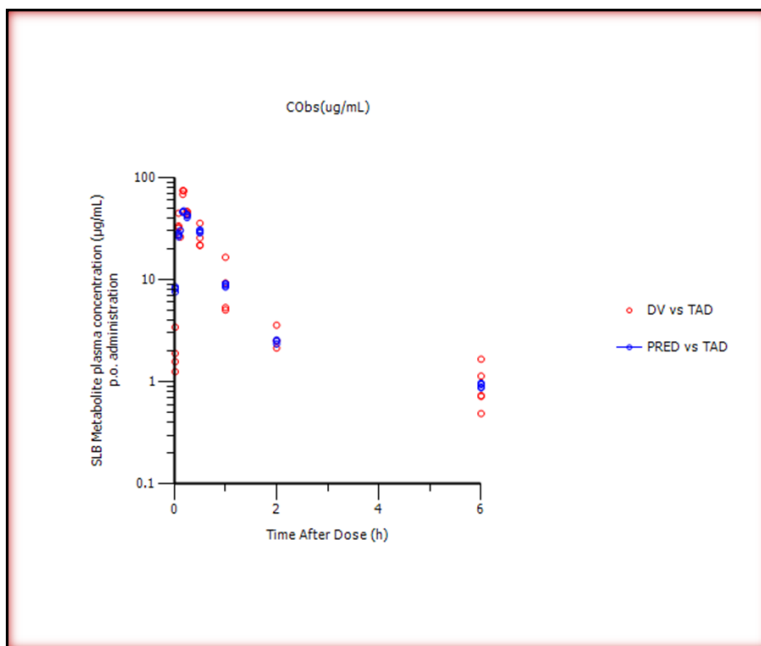


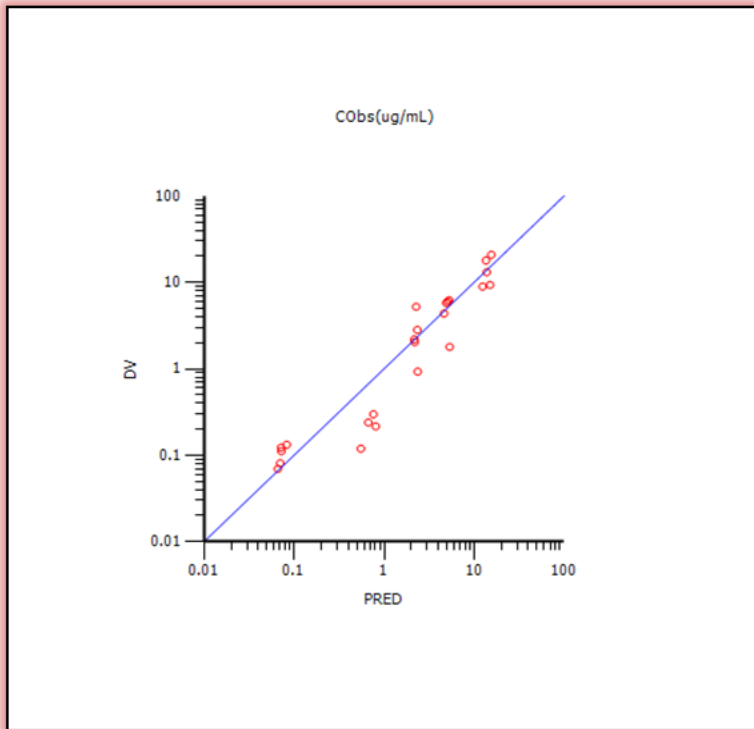
Σχήμα 3.8: Μετρούμενη (ο) και προβλεπόμενη (ο) συγκέντρωση της **parent** σιλιμπινίνης (αμεταβόλιστης) στον ορό του αίματος (λογαριθμική κλίμακα) σε σχέση με το χρόνο, μετά από ενδοφλέβια (επάνω απεικόνιση) και από του στόματος (κάτω απεικόνιση) χορήγηση σε αρσενικούς μύες του γένους C57bl/6J



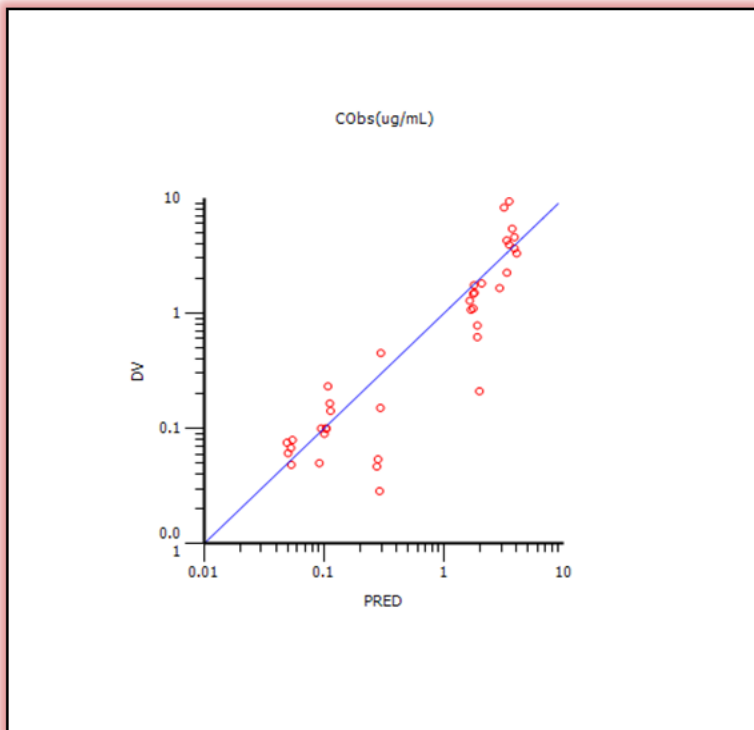


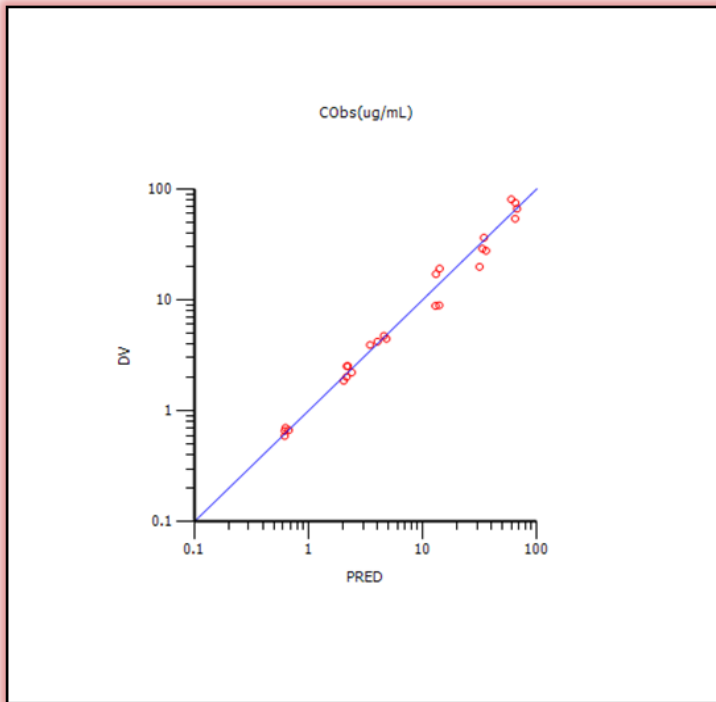
Σχήμα 3.9: Μετρούμενη (○) και προβλεπόμενη (●) συγκέντρωση του **μεταβολίτη** της σιλιμπινίνης στον ορό του αίματος (λογαριθμική κλίμακα) σε σχέση με το χρόνο μετά από ενδοφλέβια (επάνω απεικόνιση) και από του στόματος (κάτω απεικόνιση) χορήγηση σε αρσενικούς μύες του γένους C57bl/6J



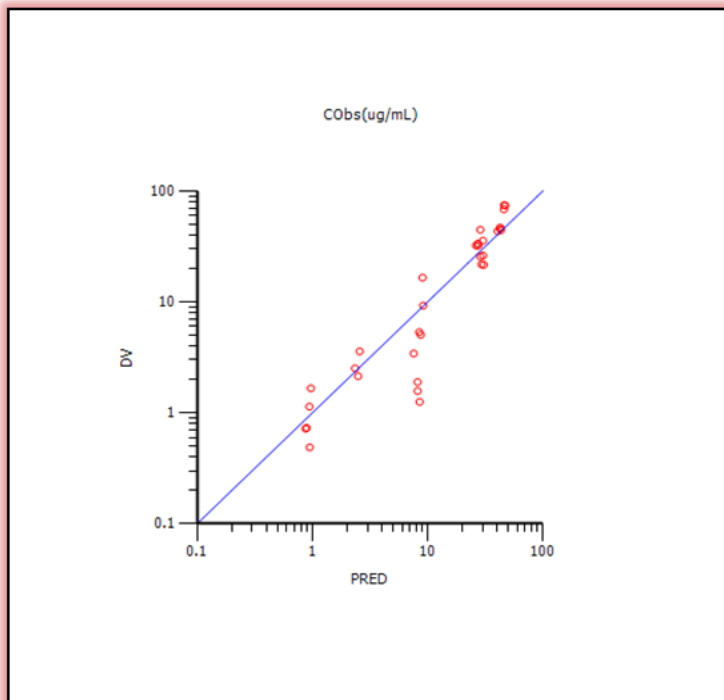


Σχήμα 3.10: Απεικόνιση μετρούμενων τιμών συγκέντρωσης μητρικής σιλιμπινίνης (DV) ως προς τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές (PRED) μετά από ενδοφλέβια (επάνω απεικόνιση) και από του στόματος (κάτω απεικόνιση) χορήγηση σε αρσενικούς μύες του γένους C57bl/6J (λογαριθμική κλίμακα)





Σχήμα 3.11: Απεικόνιση μετρούμενων τιμών συγκέντρωσης του μεταβολίτη της σιλιμπινίνης (DV) ως προς τις προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές (PRED) μετά από ενδοφλέβια (επάνω απεικόνιση) και από του στόματος (κάτω απεικόνιση) χορήγηση σε αρσενικούς μύες του γένους C57bl/6J (λογαριθμική κλίμακα)



Η καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα αντανακλάται στις ικανοποιητικές τιμές %RSE και υπολοιπόμενου σφάλματος (Πίνακας 3.12) ενώ οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές συγκέντρωσης SLB είναι σχεδόν ίδιες με τις μετρούμενες (Σχήματα 3.8-3.11).

Από τις τιμές των ΦΚ παραμέτρων (Πίνακας 3.12) και τις απεικονίσεις συγκέντρωσης-χρόνου (Σχήματα 3.8-3.9) προκύπτει ότι η σιλμπινίνη όταν χορηγείται *per os* με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου με HP-β-CD απορροφάται ικανοποιητικά και γρήγορα από το ΓΕ σωλήνα. Η απομάκρυνση του μητρικού μορίου είναι πολύ πιο γρήγορη σε σχέση με το μεταβολίτη ενώ η τιμή της κάθαρσης του μεταβολίτη είναι λιγότερο από τη μισή αυτής της κάθαρσης της μητρικής SLB.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης μετά την από του στόματος χορήγηση με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB σε μύες, καθώς και η φαρμακοκινητική μοντελοποίηση τόσο μετά από ενδοφλέβια όσο και μετά την από του στόματος χορήγηση.
- Η απορρόφηση της σιλιμπινίνης από το ΓΕ αυλό μετά από την από του στόματος χορήγηση με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB σε μύες βρέθηκε να είναι αρκετά εκτεταμένη και ταχεία.
- Η απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα της SLB μετά την από του στόματος χορήγηση του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB σε μύες, βρέθηκε να ίση με 50% για την ολική (μητρική και μεταβολίτης) και με 10% για τη μητρική SLB, τιμές 10 φορές υψηλότερες από τις αντίστοιχες μετά την από του στόματος χορήγηση της καθαρής SLB.
- Η φαρμακοκινητική τόσο της μητρικής SLB όσο και του μεταβολίτη της SLB μετά από ενδοφλέβια και από του στόματος χορήγηση με τη μορφή του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB σε μύες, περιγράφεται από δι-διαμερισματικό μοντέλο κατανομής με πρωτοταξική κινητική απομάκρυνσης και πρωτοταξική κινητική εισόδου στη γενική κυκλοφορία μετά από την *per os* χορήγηση. Η απομάκρυνση της μητρικής ουσίας βρέθηκε να είναι πιο γρήγορη από αυτή του μεταβολίτη με την τιμή της κάθαρσης του μεταβολίτη να υπολογίζεται λιγότερο από τη μισή της τιμής της κάθαρσης της μητρικής SLB.
- Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και δίνουν τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης της δυνατότητας μορφοποίησης του λυόφιλου συμπλόκου HP-β-CD-SLB, με στόχο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μετά την από του στόματος χορήγηση και την ευρύτερη εφαρμογή της SLB στη θεραπευτική.
- Σε συνέχεια της παρούσας μελέτης, τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με εκείνα από την *in vitro* αξιολόγηση του λυόφιλου συμπλόκου

HP-β-CD-SLB που έχει ήδη πραγματοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα, με στόχο την εγκαθίδρυση in vitro-in vivo συσχέτισης για την από του στόματος απορρόφηση της σιλιμπινίνης.

- Τέλος, τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συγκέντρωσης της SLB και του μεταβολίτη της στους ιστούς που έχουν συλλεχθεί θα δώσουν πληροφορίες για την κατανομή/κινητική του φαρμάκου σε κάθε έναν από αυτούς και πιθανόν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ενός φυσιολογικού φαρμακοκινητικού μοντέλου για την SLB.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φλαβονοειδές σιλιμπινίνη αποτελεί το κυριότερο συστατικό του μίγματος σιλυμαρίνη που απομονώνεται από το φυτό *Silybum marianum* (γαϊδουράγκαθο) οικ. *Asteraceae*. Είναι γνωστό για τις αντιηπατοτοξικές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και μέχρι σήμερα απαντάται κυρίως σε συμπληρώματα διατροφής, ενώ έχουν γίνει μελέτες για πιθανή αντικαρκινική δράση.

Η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα της σιλιμπινίνης την καθιστά δύσκολα απορροφήσιμη από το εντερικό επιθήλιο. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της απορρόφησης και η περιγραφή της κινητικής της σιλιμπινίνης μετά από την *per os* και ενδοφλέβια χορήγηση υπό μορφήν συμπλόκου εγκλεισμού με β-υδροξυ-προπυλο κυκλοδεξτρίνη σε μύες.

Οι μύες ομαδοποιούνται ανά πέντε και το σύμπλοκο (λυόφιλο προϊόν, του οποίου η ανασύσταση γίνεται με ενέσιμο ύδωρ - water for injection) χορηγείται *per os* και ενδοφλέβια. Η μέση χορηγούμενη δόση καθορίζεται στα 50 mg/kg βάρους του ζώου για το *per os* πείραμα και σε 20 mg/kg για το ενδοφλέβιο. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (1, 5, 10, 15 και 30 λεπτά καθώς και στις 1, 2 και 6 ώρες) γίνεται αφαίμαξη μετά από αναισθητοποίηση με ισοφλουράνιο και ακολουθεί θανάτωση του ζώου. Το αίμα φυγοκεντρείται και απομονώνεται ο ορός. Στη συνέχεια, αναλύεται με υγροχρωματογραφική μέθοδο υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) για τον προσδιορισμό των επιπέδων του φαρμάκου. Υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις τόσο του μητρικού (parent-αμεταβόλιστου) φαρμάκου όσο και του ολικού (parent και μεταβολίτη) μετά από επώαση με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση.

Οι μετρήσεις του φαρμάκου στο αίμα χρησιμοποιούνται για φαρμακοκινητική μοντελοποίηση της απορρόφησης κατανομής και απομάκρυνσης του *per os* και του ενδοφλέβια χορηγούμενου συμπλόκου καθώς και για τον υπολογισμό βασικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία τόσο με τη χρήση μη διαμερισματικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων όσο και με την εφαρμογή δι-διαμερισματικού μοντέλου κατανομής του φαρμάκου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ταχεία και εκτεταμένη απορρόφηση της σιλιμπινίνης μετά την *per os* χορήγηση του συμπλόκου ενώ η από του στόματος απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα του συμπλόκου υπολογίστηκε στο 50% για την ολική (parent και μεταβολίτη) σιλιμπινίνη και 10% για την parent (αμεταβόλιση) σιλιμπινίνη, τιμές 10 φορές μεγαλύτερες από αυτές της καθαρής σιλιμπινίνης.

Γενικά, το λυόφιλο σύμπλοκο της σιλιμπινίνης με υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη δίνει το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα στο κομμάτι της βελτίωσης και αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας της σιλιμπινίνης και ανοίγει το δρόμο για αναζήτηση νέων θεραπευτικών χρήσεων. Καθίσταται επίσης δυνατή η επεξεργασία των αποτελεσμάτων για τον καθορισμό *in vitro-in vivo* συσχετίσεων (IVIVC).

ABSTRACT

Silibinin is the main active component of *Silybum marianum*, *Asteraceae*, and belongs to the large family of flavonoids. It is well known for its hepatoprotective and antioxidant properties and is usually used in food supplements. Nowadays, antitumour effects of silibinin are being studied. The aim of the study was to determine pharmacokinetics of the practically water insoluble flavonoid silibinin after *per os* and intravenous administration as a water soluble lyophilized complex with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- β -CD) to mice, and calculate its absolute bioavailability.

60 C57bl/6J male mice, at the age of 12 weeks, were divided into groups of five mice per group. The recently developed (unpublished data) lyophilized HP- β -CD-silibinin product was administered orally and intravenously after reconstitution with water for injection, to each group for selected time points (1, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 360min). Administered doses were 50mg/kg body weight for *per os* (gavage technique-0,5 mL volume administered) and 20mg/kg body weight for intravenous administration (0,2 mL volume administered through the mouse tail artery). Blood samples were centrifuged and serum was properly treated and analyzed with HPLC method for both parent (non-metabolized) and total (metabolized plus non-metabolized) silibinin. HPLC analysis used naringenin as internal standard. Total silibinin was calculated after sample incubation with the enzyme β -glucuronidase for 1 h at 37°C. Silibinin concentrations were measured using the proper calibration curves in human plasma (calibration curves in human and mouse plasma were equivalent).

The results after both *per os* and intravenous administration of the silibinin complex showed that silibinin is rapidly and extensively absorbed from GI after *per os* administration of the lyophilized silibinin-HP- β -CD product. AUC values were calculated using the mean plasma concentration values for each time point for both IV and *per os* data and non-compartmental PK analysis. These values were used to calculate absolute bioavailability (BA) of both parent and total silibinin after oral

administration as silibinin-HP- β -CD complex and found equal to 10% and 50%, respectively.

In conclusion, extensive PK analysis is in process to evaluate rate of absorption while dissolution data will be also used to investigate the possibility of establishing IVIVC.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1985 Amendment to Animal Welfare Act. *Nal usda gov* Retrieved 13/07/2012
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: Past, present, future. *Phytother Res* 24 (10): 1423-32, 2010
- Abrol S, Trehan A, Katare OP. Comparative study of different silymarin formulations: Formulation, characterization and *in vitro/in vivo* evaluation. *Curr Drug Deliv* 2: 45-51, 2005
- 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 (3):413–419, 1995.
- Animal Procedures Committee: review of cost-benefit assessment in the use of animals in research. *The Animal Procedures Committee* p46-7, 2003
- Arcari M, Brambilla A, Brandt A, Caponi R, Corsi G, Di Rella M, Solinas F, Wachter WP. A new inclusion complex of silibinin and beta-cyclodextrins: *in vitro* dissolution kinetics and *in vivo* absorption in comparison with traditional formulations. *Boll Chim Farm* 131 (5): 205-9, 1992.
- Barzaghi N, Crema F, Gatti G, Pifferi G, Perucca E. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 15 (4):333-8, 1999.
- Berne RM, Levy MN. Αρχές Φυσιολογίας. Απόδοση στα ελληνικά: Φεβρωνία Αγγελάτου, Γεωργία Βουκελάτου, Παναγιώτης Γιομπρές, Αδαμαντία Μητσάκου, Ηλίας Κούβελας, Γιώργος Κωστόπουλος. *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, Κεφάλαια 32 και 34 Μέρος VI Πεπτικό Σύστημα, Ηράκλειο 2011
- Bhatia N, Zhao J, Wolf DM et al. Inhibition of human carcinoma cell growth and DNA synthesis by silibinin an active constituent of milk thistle: comparison with silymarin. *Cancer Lett* 147:77-84, 1999
- Blumenthal M, Buse WR. Milk thistle is associated with reduction in liver function. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. *Austin, Tex: American Botanical Council*, 1998.

- Blumenthal M. The ABC Clinical Guide to Herbs. *Austin Tex: American Botanical Council*, 2003.
- Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. Acetaminophen hepatotoxicity in rats is attenuated by silybin dihemisuccinate. *Prog Clin Biol Res* 280:375-378, 1988
- Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med* 55 (5):417-9, 1989
- Carbone L. What animals want. *Oxford University Press* p.26, 2004
- Chen W, Xia H, Wu W. Optimized preparation of silymarin dripping pills by a central composite design response surface method. *Chin Trad Herb Drug* 36:679-683, 2005
- Cohen BJ, Loew FM. Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives in laboratory Animal Medicine. *Academic Press Inc Orlando*, 1984
- Cohn M. Alternatives to animal testing gaining ground. *The Baltimore Sun* 26 Aug 2010
- Curatolo W. Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *Pharm Sci Technol Today* 1:387-393, 1998
- D'Andrea V, Perez LM, and Pozzi EJS. Inhibition of rat liver UDP-glucuronosyltransferase by silymarin and the metabolite silibinin-glucuronide. *Life Sci* 77:683– 692, 2004
- Datta S, Sinha S Bhattacharrya P. Hepatoprotective activity of herbal protein Cl1, purified from *Cajanus indicus* against beta-galactosamine HCl toxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytother Res* 13 (6):508-512, 1999.
- Davila JC, Lenherr A, Acosta D. Protective effects of flavonoids on drug-induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicology* 57 (3):267-86, 1989.
- Davis-Searles PR, Nakanishi Y, Kim NC, Graf TN, Oberlies NH, Wani MC, Wall ME, Agarwal R, Kroll DJ. Milk thistle and prostate cancer: Differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative and points in human prostate carcinoma cells.
- Deferme S, Annaert P, Augustijns P. In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. 8: 182-215

- Del Valle Martin EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* 39:1033–1046, 2004
- Devane J. Oral drug delivery technology: Addressing the solubility/permeability paradigm. *Pharm Technol* (22):68–74, 1998
- Dhanalakshmi S, Agarwal P, Glode LM, Agarwal R. Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin-and carboplatin induced growth inhibition and apoptotic death. *Int J Cancer* 106 (5):699-705, 2003.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65 (4):337-353, 1999
- Dixit N, Baboota S, Kohli K, Ahmad S, Ali J. Silymarin: A review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian J Pharmacol* 39 (4):172-9, 2007
- Duchêne D, Wouessidjewe D, Ponchel G. Cyclodextrins and carrier systems. *Journal of Controlled Release* 62:263–268, 1999
- Dunham SP. Lessons from the cat: development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary immunology and immunopathology* 112 (1–2):67–77, 2006
- El-Samaligy MS, Afifi NN, Mahmoud EA. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and *in vivo* performance. *Int J Pharm* 319: 121-9, 2006
- Erlund I, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin, Dietary sources, bioactivity, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res* 24:851-74, 2004
- Farghali H, Kameniková L, Hynie S, Kmonicková E. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury. *Pharmacol Res* 41 (2):231-7, 2000
- FDA 2000. Guidance for Industry “Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System”, August 2000.
- Fehér J, Deák G, Müzes G, Láng I, Niederland V, Nékám K, Kárteszi M. Liver protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases. *Orv Hetil* 130 (51):2723-7, 1989

- Ferris JP, Fasco MJ, Stylianopoulou FL, Jerina DM, Daly JW, Jeffrey AM. Monooxygenase activity in *Cunninghamella bainieri*: Evidence for a fungal system similar to liver microsomes. *Arc Biochem Biophys* 156 (1):97-103, 1973
- Festing M. Inbred Strains of Mice and their Characteristics. *The Jackson Laboratory* Retrieved January 30, 2008
- Fiebrich F, Koch H. Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experientia* 35 (12):1548-60, 1979
- Flaig TW, Gustafson DL, Lih-Jen Su, Zirrolli JA, Crighton F, Harrison GS, Pierson AS, Agarwal R, Glodé LM. A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. *Invest New Drugs* 25 (2):139-46, 2006.
- Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* 19 (2):73–8, 2002
- Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 93 (2):139-43, 1998
- Foster S. Milk thistle: *Silybum marianum* (Botanical Series). *Rev Ed Austin, Tex: American Botanical Council*, 1999
- Frachini F, Demartini G, Esposito D. Pharmacology of silimarin. *Clin Drug Invest* 22 (1): 51-65, 2002.
- Freudenberg K, Cramer F. Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α , β und γ . *Z Naturforsch* 3b, 464, 1948
- Gabetta B, Bombardelli E, Pifferi G. Complexes of flavonolignans with phospholipids, preparation thereof and associated pharmaceutical compositions. *US patent 4764508*, 1988
- Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* Numéro 4: 162-169, 2005
- Giorgi R, Conti M, Pifferi G. Soluble derivative of silybin a method of preparing them and pharmaceutical composition containing them. *US patent 4886791*, 1989
- Gohel MC. An audit of recent inputs on biopharmaceutical classification system. *Pharm Rev [Online] Dissolution Technologies*, 2005
- Gorden P. Non-insulin dependent diabetes—the past, present and future. *Ann Acad Med Singap* 26 (3):326–30, 1997

- Gothoskar AV. Biopharmaceutical classification of drugs. *Pharm Rev* [Online] <http://www.pharmainfo.net/reviews/biopharmaceutical-classification-drugs>, 2005
- Greenlee H, Abascal K, Yarnell E, Ladas E. Clinical applications of Silybum marianum in oncology. *Integr Cancer Ther* 6 (2):158-65, 2007.
- Guide for the care and use of laboratory animals. Euthanasia section on pg 65, Edition 1996
- Han YH, Lou HX, Ren DM, Sun LR, Ma B, Ji M. Stereoselective metabolism of silybin diastereoisomers in the glucuronidation process. *J Pharm Biomed Anal* 10; 34 (5):1071-8, 2004
- Hauss DJ, Mehta SC, Radebaugh GW. Targeting lymphatic transport and modified systemic distribution of CI_976, a lipophilic lipid-regulator drug, via a formulative approach. *Int J Pharm* 108: 85-93, 1994
- Havsteen BH, The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap* 96: 67-202, 2002
- History of non human animal research. *Laboratory Primate Advocacy Group*. Retrieved 13/07/2012
- Hoh C, Boocock D, Marczylo T, Singh R, Berry DP, Dennison AR, Hemingway D, Miller A, West K, Euden S, Garcea G, Farmer PB, Steward WP, Gescher AJ. Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clin Cancer Res* 12 (9): 2944-50, 2006.
- Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, Thaler H. Chemotherapy of Amanita phalloides poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol* 2 (2): 183-95, 1983
- Hussain AS, Lesko LJ, Lo KY, Shah VP, Volpe D, Williams RL. The Biopharmaceutics Classification System: Highlights of the FDA's Draft Guidance. *Dissolution Technol*, 6 (2):5-9, 1999
- Institute for Laboratory Animal Research. Institute for Laboratory Animal Research Animals in Biomedical and Behavioral Research. *The National Academies Press*, 1988
- Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 86:147-62, 1997

- Jarho P, Urtti A, Pate DW, Suhonen P, Järvinen T. Increase in aqueous solubility. *Int J Pharm* 137:209–17, 1996
- Johnson K, Swindell A. A guidance in the setting of drug particle size specifications to minimize variability in absorption. *Pharm Res* 13:1795-1798, 1996.
- Kim YC, Kim EJ, Lee ED, Kim JH, Jang SW, Kim YG, Kwon JW, Kim WB, Lee MG. Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 12:593-6, 2003
- Kock HP, Bachner. Silymarin: Potent inhibitor of cyclic AMP phosphodiesterase. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 7 (8): 409-413, 1985
- Koo CH. Compositions and preparations of silymarin complex with improved bioavailability. *WO 02/069962*, 2002
- Kren V, Ulrichová J, Kosina P, Stevenson D, Sedmera P, Prikrylová V, Halada P, Simánek V. Chemoenzymatic preparation of silybin beta-glucuronides and their biological evaluation. *Drug Metab Dispos* 28 (12):1513-7, 2000
- Kristmundsdóttir T, Loftsson T, Holbrook WP. Formulation and clinical evaluation of a hydrocortisone solution for treatment of oral disease. *Int J Pharm* 139:63–8, 1996
- Kublik H, Bock TK, Schreier H, Müller BW. Nasal absorption of 17b-estradiol from different cyclodextrin inclusion formulations in sheep. *Eur J Pharm Biopharm* 42:320–4, 1996
- Kumar A, Sahoo SK, Padhee K, Singh Kochar PP, Satapathy A, Pathak N. Review on solubility enhancement techniques for hydrophobic drugs. *Pharmacie Globale* 2 (3):1-7, 2011
- Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharm* [Epub ahead of print], Jul 5 2012
- Ladas EJ, Cheng B, Hughes D, et al. Milk thistle is associated with reductions in liver function tests in children undergoing therapy for acute lymphoblastic leukemia. Abstract presented at: *American Society of Hematology*; December 10, 2006 Orlando, Fla
- Lecomte J. Pharmacologic properties of silybin and silymarin. *Rev Med Liege* 30: 110-4, 1975
- Lettéron P, Labbe G, Degott C, Berson A, Fromenty B, Delaforge M, Larrey D, Pessayre D. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon

- tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochem Pharmacol* 39 (12): 2027-34, 1990
- Leuenberger H. Spray freeze drying: The process of choice for low water soluble drugs. *J Nanoparticle Res* 4:111-119, 2002
- Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm* (58): 265–278, 2004
- Lipinski C, Lombardo F, Dominy W, Feeney J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del Rev* 23:3-25, 1997.
- Lipinski C. Drug like properties and causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44:235-249, 2000.
- Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: Optimizing oral drug delivery systems. *J Controlled Release* (62):41–49, 1999
- Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, Crepaldi G. Silybin-beta cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an antioxidant agent. *Diabetes Nutr Metab* 15 (4):222-31, 2002.
- Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J Pharm Sci* 85 (10):1017-1025, 1996
- Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 329:1–11, available online: 2006
- Loftsson T, Másson M. The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs. *J Drug Deliv Sci Technol* 14:35–43, 2004
- Loftsson T, Stefánsson E. Effect of cyclodextrins on topical drugdelivery to the eye. *Drug Devel Ind Pharm* 23:473–81, 1997
- Lorenz D, Lücker PW, Mennicke WH, Wetzelsberger N. Pharmacokinetic studies with silymarin in human serum and bile. Methods and Experimental Findings in Clinical Pharmacology 6 (10): 655-61, 1984.

- Macheras P, Reppas Ch. Βιοφαρμακευτική. Β' Έκδοση, Αθήνα, 1997
- Madaus R, Halbach G, Trost W. Salt of silymarin group with aminopolyhydroxy alcohols. *US patent 3994925*, 1976
- Magliulo E, Gagliardi B, Fiori GP. Results of a double blind study on the effect of silymarin in the treatment of acute viral hepatitis, carried out at two medical centres. *Med Klin* 73 (28-29):1060-5, 1978
- Mayersohm M. Principles of drug absorption. In: Bernker GS, Rhodes CT Modern Pharmaceutics, 3rd edition Marcel Dekker, H.Y. pp. 21-74, 1996.
- Mereish KA. Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: biochemistry, histopathology and lethality. *Pharm Res* 8 (2):273-7, 1991.
- Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55:647–71, 2001
- Morazzoni P, Bombardelli E. Silybum marianum (Carduus marianus). *Fitoterapia* 66 (1):3-42, 1995
- Morazzoni P, Magistretti MJ, Giachetti C, Zanolo G. Comparative bioavailability of silipide, a new flavanolignan complex, in rats. *Euro J Drug Metab Pharmacokinet* 17:39–44, 1992
- Morazzoni P, Montalbeti A, Malandrino S, Pifferi G. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 18 (3):289-97, 1993.
- Moulisková V, Srbová M, Jedlicková O, Sebestian J, Jegorov A. Silybin reduces lipid peroxidation of rat hepatocyte membrane caused by cyclosporine A. *Biochemistry (Mosc)* 71 (10):1110-4, 2006
- Muller RH, Jacobs C, Kayer O. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. In: F Nielloud, Kumar A et al. / *Pharmacie Globale (IJCP)* 2011, 3(3):6, 2000
- Mumenthaler M, Leuenberger H. Atmospheric spray-freeze, drying: A suitable alternative in freeze-drying technology. *Int J Pharm* 72:97–110, 1991
- Muñoz-Botella S, del Castillo B, Martýn MA. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharm* 36:187–98, 1995
- Muriel P, Garcapiña T, Perez-Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J Appl Toxicol* 12 (6):439-42, 1992

- Muriel P, Mourelle M. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage. *J Appl Toxicol* 10 (4):275-9, 1990
- National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. What are the 3Rs? <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=7>, retrieved 14/07/2012
- Pade V, Stavohansky S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model, 1997
- Persky AM, Hughes JA. Solutions and Solubility. <http://www.cop.ufl.edu/safezone/prokai/pa5100/pha5110.htm>
- Phillips EM, Stella VJ. Rapid expansion from supercritical solutions: application to pharmaceutical processes. *Int J Pharm* 94:1-10, 1993
- Polli JE, Yu LX, Cook JA, Amidon GL, Borchardt RT, Burnside BA, Burton PS, Chen ML, Conner DP, Faustino PJ, Hawin A., Hussain AS, Joshi HN, Kwei G, Lee VHL, Lesko LJ, Lipper RA, Loper AE, Nerurkar SG, Polli JW, Sanvordeker DR, Taneja, R, Uppoor RS, Vattikonda CS, Wilding I, Zhang G. Summary workshop report: Biopharmaceutics classification system-implementation challenges and extension opportunities. *J Pharm Sci* 93 (6): 1375–1381, 2004
- Post-White J, Ladas EJ, Kelly KM. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther* 6 (2):104-9, 2007
- Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 124:491-504, 2006
- Prasad B, Reed R. Chemosensation: molecular mechanisms in worms and mammals. *Trends in Genetics* 15:150–3, 1999
- Rainone F. Milk thistle. *Am Fam Physician* 72:1285-1288, 2005
- Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. Animal models of Huntington's disease. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 48 (4):356–73, 2007
- Rambaldi A, Jacobs BP, Gluud C. Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C liver diseases. *Cochrane database Syst Rev* (4): CD003620, 2007
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Φαρμακολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 5η έκδοση, 2007.

- Rao VM, Stella VJ. When can cyclodextrins be considered for solubilization purposes? *J Pharm Sci* 92 (5):927-932, 2003
- Reddy Kumar Basanta B, Karunakar A. Biopharmaceutics Classification System: A regulatory approach. *Dissol Tech* 31-37, 2011
- Richard ML, Plaine A. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* (Epub:2006) 6 (2):119-33, 2007.
- Rickling B, Hans B, Kramarczyk R, Krumbiegel G, Weyhenmeyer R. Two high-performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silibinin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed-phase chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 670: 267-277, 1995
- Rinaki E, Valsami G, Macheras P. Quantitative biopharmaceutics classification system: The central role of dose/solubility ratio. *Pharm Res* 20 (12),1917-1925, 2003
- Rui YC. Advances in pharmacological studies of silymarin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86 Suppl 2: 79-85, 1991
- Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 61:2035-2063, 2001
- Schafer WR. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction. *WormBook: the online review of C. elegans biology*: 1-42, 2006
- Schardinger FZ. *Unters Nahf Genussm* 6:865-880, 1903
- Schriewer H, Weinhold F. The influence of silybin from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. on in vitro phosphatidyl choline biosynthesis in rat livers. *Arzneimittelforschung* 29 (5):791-2, 1979.
- Shear NH, Malkiewicz IM, Klein D, Koren G, Randor S, Neuman MG. Acetaminophen-induced toxicity to human epidermoid cell line A431 and hepatoblastoma cell line Hep G2, in vitro, is diminished by silymarin. *Skin Pharmacol* 8 (6):279-91, 1995
- Siegers CP, Frühling A, Younes M. Influence of dithiocarb, (+)-catechin and silybine on halothane hepatotoxicity. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenh) 53 (2):125-9, 1983

- Singh M, Sharma R, Banerjee UC. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20:341–59, 2002
- Singh RP, Agarwal R. Prostate cancer chemoprevention by silibinin: bench to bedside. *Mol Carcinoq* 45 (6):436-42, 2006
- Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, Agarwal R. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 98 (12): 846-55, 2006.
- Skottová N, Krecman V, Vaná P, Chmelac Z, Ulrichová J, Simánek V. Effect of silymarin and silibinin-phosphatidylcholine complex on plasma and lipoprotein cholesterol and oxidation of LDL in rats fed on high cholesterol diet supplemented with currant oil. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 144-55, 2000
- Skottová N, Krecman V. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol Res* 47 (1):1-7, 1998
- Sonnenbichler J, Goldberg M, Hane L, et al. Stimulatory effect of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malignant cell lines. *Biochem Pharmacol* 35: 538-41, 1986
- Sonnenbichler J, Mattersberger J, Rosen H. Stimulation of RNA synthesis in rat liver and isolated hepatocytes by silybin, an antihepatotoxic agent from *Silybum marianum* L. Gaertn. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357:1171-80, 1976
- Sonnenbichler J, Zetl I. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Prog Clin Biol Res* 213:319-31, 1986
- Sonnenbichler J, Zetl I. Mechanism of action of silibinin, V: effect of silibinin on the synthesis of ribosomal RNA, mRNA and tRNA in rat liver in vivo. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365:555-66, 1984
- Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res* 14:556–5567, 1997
- Subramaniam B, Rajewski RA, Snavely K. Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide. *J Pharm Sci* 86:885-890, 1997
- Sung YH, Song J, Lee HW. Functional genomics approach using mice. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37 (1):122–32, 2004

- Szathmary SC, Seiler KU, Luhmann I, Huss HJ. Pharmacokinetic behavior and absolute bioavailability of hydroxypropyl- β -cyclodextrin after increasing doses in volunteers. In: Duchêne D. (Ed.), Mins. 5th International Symposium on Cyclodextrins. *Editions de Santé*, Paris, 1990
- Thakur SK. Silymarin-A hepatoprotective agent. *Gastroenterol Today* 6: 78-82, 2002
- The Merck Index: 1997-Monograph Number: 8680
- The Sigma Aldrich Catalogue. Specification Sheet_Silibininum
- Tukker JJ. Characterization of transport over epithelial barriers. In: Lehr CM (Ed) Cell Culture Models of Biological Barriers In Vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery, Taylor and Francis pp. 52-61, 2002.
- Tyagi A, Bhatia N, Condom MS, Bosland MC, Agarwal C, Agarwal R. Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *Prostate* 53 (3):211-7, 2002.
- Uekama K, Adachi H, Irie T, Yano T, Saita M. Improved transdermal delivery of prostaglandin E1 through hairless mouse skin: combined use of carboxymethyl-ethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancers. *J Pharm Pharmacol* 44:119–21, 1992
- Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev* 98:2045-2076, 1998
- UK Parliament. Select Committee on Animals in Scientific Procedures Report. Retrieved 13/07/2012
- United States Pharmacopeia and National Formulary USP 23–NF 18; The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 1994
- Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer investigation* 18 (8):781–92, 2000
- Vailati A, Aristia L, Sozze E, Milani F, Inglese V, Galenda P. Randomized open study of dose-effect relationship of a short course of IdB 1016 in patients with viral or alcoholic hepatitis. *Fitoterapia* 44:219-8, 1993
- Valcavi U, Monterosso V, Caponi R, Bosone E, Wachter W, Szejtli J. Inclusion complexes with silybinin, their preparation and pharmaceutical compositions containing them. *US patent 5198430*, 1993

- Valenzuela A, Barría T, Guerra R. Inhibitory effect of the flavonoid silymarin on the erythrocyte hemolysis induced by phenylhydrazine. *Biochem Biophys Res Commun* 126 (2):712-8, 1985.
- Valenzuela A, Guerra R, Garrido A. Silybin dihemisuccinate protects rat erythrocytes against phenylhydrazine-induced lipid peroxidation and hemolysis. *Planta Med* 53 (5):402-5, 1987
- Valenzuela A, Guerra R. Differential effect of silybin on the Fe²⁺-ADP and t-butyl hydroperoxide-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 42 (2): 139-41, 1986
- Van de Waterbeemd H. Which in vitro screens guide the prediction of oral absorption and volume of distribution? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96 (3):162-6, 2005
- Van der Waterbeemd H, Lennernäs H, Artursson P. Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. In: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry* Vol 18, Wiley-VCH, 2004.
- Van Dorne H. Interaction between cyclodextrins and ophthalmic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 39:133–9, 1993
- Varghese I, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 11 (23):8441-8, 2005.
- Varma MV, Khandavilli S, Ashokraj Y, Dhanikula A, Sood A, Thomas NS, Pillai O, Sharma P, Gandhi R, Agarwal S, Nair V, Panchagnula R. Biopharmaceutic classification system: A scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research. *Curr Drug Metab* (5):375–388, 2004
- Vaution C, Hutin M, Glomot F, Duchêne D. The use of cyclodextrins in various industries. In: Duchêne D. (Ed), *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*. Editions de Santé, Paris, pp. 299–350, 1987
- Venisetty R.K, Keshetty S and Ciddi V. Biotransformation of silibinin (silybin) using fungal organisms. *Ind J Pharm Edu Res* 45 (4):384-391, 2011
- Venkataramanan R, Ramachandran V, Komoroski BJ, Zhang S, Schiff PL, Strom SC. Milk thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* 28 (11):1270-3, 2000

- Venken KJ, Bellen HJ. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews. Genetics* 6 (3):167–78, 2005
- Villiers AC. *R Hebd Seances Acad Sci* 112:536-538, 1891
- Vinh PQ, Sugie S, Tanaka T, Hara A, Yamada Y, Katayama M et al. Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn J Cancer Res* 93: 42-9, 2002
- Walgate R. Armadillos fight leprosy. *Nature* 291 (5816):527, 1981
- Wen Z, Dumas TE, Schrieber SJ, Hawke RL, Fried MW, Smith PC. Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metab Dispos* 36(1):65-72. Epub 2007, 2008
- Weyhenmeyer R, Mascher H, Birkmayer J. Study on the dose linearity of pharmacokinetics on silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *Int J Pharmacol Ther Toxicol* 30 (4):134-8, 1992.
- Williams RQ et al. Process for Production of Nanoparticles and Microparticles by Spray Freezing into Liquid. *US Patent, 20030041602*, 2003
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385 (6619):810–3, 1997
- Woo JS, Kim TS, Park JH, Chi SC. Formulation and pharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Arch Pharm Res* 30:82-9, 2007
- Wu W, Wang Y, Que L. Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm* 63:288-94, 2006
- www.ifet.gr
- www.intekom.com
- www.liversupport.com/milkthistle
- www.vitamins-supplements.org
- Yanyu X, Yunmei S, Zhipeng C, Qineng P. Preparation of silymarin proliposome: A new way to increase oral bioavailability of silymarin in beagle dogs. *Int J Pharm* 319:162-8, 2006

- Yanyu X, Yunmei S, Zhipeng C, Qineng P. The preparation of silybin–phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats. *Int J Pharm* (307):77-82, 2006
- Zhao J, Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis* 20 (11):2101-8, 1999
- Zi X, Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:7490-95, 1999
- Zuber R, Modrianský M, Dvorák Z, Rohovský P, Ulrichová J, Simánek V, Anzenbacher P. Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytother Res* 16 (7):632-8, 2002
- Ελληνική Γαστρεντερολογική Εταιρεία. Στόμαχος-Γαστρεντερολογία. Εκδόσεις Θ. Καναγκίνης-Δ. Καραμανώλης, Αθήνα, 1-326, 1995
- Μήτσικας Γεώργιος, Τζίμας Σταύρος. Παρασκευή και μελέτη στερεών συμπλόκων εγκλεισμού της σιλμπινίνης με υδροξυ-προπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, 2008
- Νικολακοπούλου Η. Επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και της πολυαιθυλενογλυκόλης στη διαλυτότητα της σιλμπινίνης παρουσία ΗΡ-β-CD. ΜΔΕ ΕΚΠΑ, 2007