ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τσαγκρασούλη Μαρία[1], Πουρσανίδης Παύλος[2], Πιτσάκη Μαρία[2], Παντερή Ειρήνη[1], Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα[1], Γιαγκίνης Κωστας[2]
[1]Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα
[2]Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Λήμνος
e-mail: cgiaginis@aegean.gr

Περίληψη
Εισαγωγή: Τα φλαβονοειδή εντοπίζονται κυρίως στους φυτικούς οργανισμούς, προάγοντας την αναστολή του οξειδωτικού στρες και δρώντας ως αυξητικοί παράγοντες σε αυτούς. Πολλά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντιαθηρωματική, ηπατοπροστατευτική και αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες. Η απορρόφηση των φλαβονοειδών διαμέσου του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου θεωρείται ότι αποτελεί την πλέον κρίσιμη παράμετρο για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης. **Σκοπός:** Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν οι χρωματογραφικοί δείκτες φωσφολιποφιλίας 23 φλαβονοειδών, οι οποίοι αξιοποιήθηκαν περαιτέρω για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας τους. **Υλικά-Μέθοδοι:** Η χημική δομή των φλαβονοειδών σχεδιάστηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ChemDrawn 9.0. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, όπως ο συντελεστής κατανομής $logD_{7.4}$ και ο συντελεστής μερισμού logP στο σύστημα οκτανόλης-νερού, ο αριθμός δεσμών υδρογόνου ως δότης (HBD) και δέκτης (HBA), η ολική πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), κ.α., προσδιορίστηκαν με την χρήση του λογισμικού προγράμματος PharmaAlgorithms 3.0. Οι χρωματογραφικοί δείκτες $logk_w^{IAM}$ προσδιορίστηκαν με την χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane-IAM) και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε pH=7.4. Οι τιμές του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας στην μονοστοιβάδα των κυττάρων αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου Caco-2 (P_{caco}) συλλέχθηκαν από την διεθνή βιβλιογραφία. **Αποτελέσματα:** Ο συντελεστής εντερικής διαπερατότητας P_{caco} παρουσίασε ανάλογη γραμμική σχέση με τους δείκτες $logk_w^{IAM}$ με βάση την εξίσωση: $P_{caco} = 0.38(\pm0.08)\ logK_w^{IAM} - 0.12(\pm0.24)$, n=23; r=0.7150; p=0.00013; SEE=0.30. Η γραμμική σχέση του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας με τους δείκτες $logk_w^{IAM}$ βελτιώθηκε σημαντικά με την εισαγωγή του αριθμού δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD): $P_{caco} = 0.29(\pm0.07)\ logK_w^{IAM} - 0.09(\pm0.03)\ HBD + 0.49(\pm0.30)$, n=23, r=0.8101, p=0.00002; SEE=0.25. Οι αντίστοιχες εξισώσεις, μετά από αντικατάσταση των δεικτών $logK_w^{IAM}$ με τον συντελεστή $logD_{7.4}$ ή logP, παρουσίασαν κατώτερα ποιοτικά στατιστικά χαρακτηριστικά. **Συμπεράσματα:** Η βιομιμητική χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών αποτελεί μια γρήγορη, εύχρηστη και χαμηλού κόστους τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας των φλαβονοειδών. Η φωσφολιποφιλία και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δότη παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εντερική διαπερατότητα των φλαβονοειδών.

Λέξεις-Κλειδιά: Φλαβονοειδή, Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών, Εντερική διαπερατότητα, Δεσμοί υδρογόνου; Συντελεστής λιποφιλίας

ESTIMATION OF INTESTINAL PERMEABILITY OF FLAVONOID ANALOGUES BY THE USE OF BIOMIMETIC CHROMATOGRAPHY

Tsagkrasouli Maria[1], Poursanidis Pavlos[2], Pitsaki Maria[2], Panderi Irene[1], Tsantili- Kakoulidou Anna[1], Giaginis Constantinos[2]

[1]Department of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zographou, Athens
[2]Department of Food Science and Nutrition, University of the Aegean, Lemnos
e-mail: cgiaginis@aegean.gr

Abstract

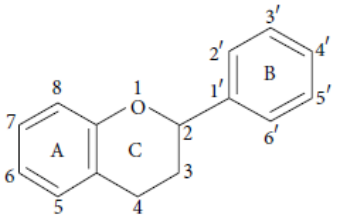
Introduction: Flavonoids are ubiquitously present in plants, promoting inhibition of oxidative stress and acting as growth factors to them. Many flavonoids are shown to have antioxidant, anti-atherosclerotic, hepatoprotective, anti-inflammatory and anti-cancer properties. The absorption of flavonoids through the small intestinal mucosa is considered to critically affect their biological activity. **Purpose:** The aim of the present study was to determine the chromatographic phospholipophilicity of 23 flavonoids, which is further utilized to estimate their intestinal permeability. **Materials-Methods:** The chemical structures of flavonoid compounds were drawn by the use of ChemDrawn 9.0 Cambridge Soft Corporation. The physicochemical properties of flavonoids, such as the distribution coefficient $logD_{7.4}$ and the partition coefficient logP in octanol-water system, the number of hydrogen bonds as donor (HBD) and acceptor (HBA), the total polar surface area (TPSA), etc, were determined using the software PharmaAlgorithms 3.0. $Logk_w^{IAM}$ indices were determined using immobilized artificial membrane (IAM) chromatography column mixture of acetonitrile and PBS buffer at pH = 7.4 as mobile phase. The values of the apparent permeability coefficient in intestinal monolayer of human colon adenocarcinoma Caco-2 cells (P_{caco}) were compiled from literature. **Results:** The intestinal permeability coefficient P_{caco} showed a linear relationship with $logk_w^{IAM}$ indices according to the equation: P_{caco} = 0.38(±0.08) $logK_w^{IAM}$ - 0.12(±0.24), n=23; r=0.7150; p=0.00013; SEE=0.30. The linear relationship between intestinal permeability coefficient and $logk_w^{IAM}$ indices was improved significantly by the introduction of the number of hydrogen bonds as donor (HBD): P_{caco} = 0.29(±0.07) $logK_w^{IAM}$ - 0.09(±0.03) HBD + 0.49(±0.30), n=23, r=0.8101, p=0.00002; SEE=0.25. The corresponding equations, after replacing $logk_w^{IAM}$ indices with $logD_{7.4}$ coefficient or logP, were characterized by lower quality statistics. **Conclusions:** Biomimetic IAM chromatography proved to be a simple, fast and low-cost technique which can reliably be used to estimate the intestinal permeability of flavonoids. The phospholipophilicity and the hydrogen bonding donor ability seem to exert a key role in the intestinal permeability of flavonoids.

Key-words: *flavonoids, Immobilized Artificial Membrane Chromatography, intestinal permeability, hydrogen bonds, lipophilicity*

1. Εισαγωγή

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από μια μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων με χημική δομή παρόμοια του γ-βενζοπυρενίου και εντοπίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά. Συντίθενται μέσου της βιοσυνθετικής οδού του φαίνυλο-προπανικού. Οι δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων και των φλαβονοειδών, παρουσιάζουν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Τα φλαβονοειδή αποτελούν υδροξυλιωμένες φαινολικές ενώσεις οι οποίες συντίθενται από τα φυτά ως απάντηση στη μικροβιακή μόλυνση. Η κατάταξη των φλαβονοειδών εξαρτάται από την χημική δομή τους, τον βαθμό υδροξυλίωσης τους, την παρουσία άλλων υποκαταστατών και παραγόντων σύζευξης και το βαθμό πολυμερισμού τους (Shashank Kumar and Abhay K. Pandey, 2013).

Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από έναν σκελετό 15 ατόμων άνθρακα. Τα άτομα άνθρακα στα φλαβονοειδή μόρια σχηματίζουν δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B), οι οποίοι συνδέονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων, C6-C3-C6, σχηματίζοντας έτσι μια διφαινυλο-προπανική δομή με την κεντρική μονάδα να είναι μία βενζο-γ-πυρόνη (C) (**Σχήμα 1**).



Σχήμα 1: Η βασική χημική δομή των φλαβονοειδών

Ανάλογα με τους υποκαταστάτες του ετεροκυκλικού δακτυλίου, τα φλαβονοειδή ταξινομούνται σε φλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλαβανόνες και ισοφλαβόνες. Οι διάφορες τάξεις των φλαβονοειδών διαφέρουν στο βαθμό οξείδωσης και στο είδος των υποκαταστατών του δακτυλίου C, ενώ τα φλαβονοειδή της ίδιας τάξης διαφοροποιούνται ως προς τους υποκαταστάτες των δακτυλίων A και B. Τα φλαβονοειδή μπορούν επίσης να βρεθούν με την μορφή αγλυκονών, γλυκοζιτών ή μεθυλιωμένων παραγώγων (Shashank Kumar and Abhay K. Pandey, 2013).
Πολλά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα φλαβονοειδή ρυθμίζουν τις φλεγμονώδεις διαδικασίες που σχετίζονται με αθηροσκλήρωση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταβολικές διαταραχές και άλλες χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, αφορούν στην αναστολή της φλεγμονώδης σηματοδότησης, τη μείωση παραγωγής φλεγμονωδών μορίων και την αναστολή της διηθητικής ικανότητας φλεγμονωδών κυττάρων(Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Laia and Chi-Tang Ho, 2010).

Η απορρόφηση των φλαβονοειδών διαμέσου του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου θεωρείται ότι αποτελεί την πλέον κρίσιμη παράμετρο για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης. Πολλά από αυτά παρουσιάζουν πολύ χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και ως εκ τούτου κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμη η διερεύνηση των παραμέτρων εκείνων που επηρεάζουν την εντερική διαπερατότητά τους. Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες που επηρεάζει γενικότερα την διάχυση των φαρμακομορίων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών των εντεροκυττάρων και ως εκ τούτου και την εντερική διαπερατότητά τους είναι και η φωσφολιποφιλία τους. Στα πλαίσια αυτά, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στο να προσδιορίσει χρωματογραφικούς δείκτες φωσφολιποφιλίας φλαβονοειδών αναλόγων και

να διερευνήσει την πιθανή σχέση τους με την εντερική διαπερατότητά τους λαμβάνοντας υπόψη και πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορούν να προσδιοριστούν εύκολα και γρήγορα από εύχρηστα λογισμικά προγράμματα.

2. Υλικά-Μέθοδοι

2.1 Ομάδα εργασίας και φυσικοχημικές ιδιότητες

Ως ομάδα εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 23 φλαβονοειδή ανάλογα. Η χημική δομή των φλαβονοειδών σχεδιάστηκε με το λογισμικό πρόγραμμα ChemDrawn 9.0. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φλαβονοειδών, όπως ο συντελεστής κατανομής $logD_{7.4}$ και ο συντελεστής μερισμού logP στο σύστημα οκτανόλης-νερού, ο αριθμός δεσμών υδρογόνου ως δότης (HBD) και δέκτης (HBA), η ολική πολική επιφάνεια επαφής (TPSA), κ.α., προσδιορίστηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος PharmaAlgorithms 3.0.

2.2 Προσδιορισμός χρωματογραφικών δεικτών με τη χρήση ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM: Immobilized Artificial Membranes)

Οι χρωματογραφικοί δείκτες $logk_w^{IAM}$ προσδιορίστηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane-IAM) και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σταθερής ιονικής ισχύος (PBS) pH 7,4. Αναλυτικότερα, ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η στήλη IAM.PC.DD2 3cm x 4,6mm της εταιρίας Regis Technology. Οι στατικές φάσεις αυτού του τύπου περιέχουν ενσωματωμένα φωσφολιπίδια (κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη) ακινητοποιημένα σε πήγμα διοξειδίου του πυριτίου ώστε να προσομοιάζουν το λιπιδικό περιβάλλον των κυτταρικών μεμβρανών (Yoshinori et al, 2008). Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1, 1,5, 2 ή 3ml/min ανάλογα με το χρόνο έκλουσης των φλαβονοειδών. Οι μετρήσεις των χρόνων συγκράτησης επαναλήφθηκαν 3 φορές για κάθε δείγμα και μετατράπηκαν στον λογάριθμο του παράγοντα χωρητικότητας σύμφωνα με την εξίσωση: $logk = log[(t_r - t_o)/t_o]$
Ως νεκρός χρόνος χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος έκλουσης της μεθανόλης. Οι δείκτες $logk_w$ που αναφέρονται σε κινητή φάση αποτελούμενη από 100% ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση: $logk = -S\varphi + logk_w$

Όπου φ είναι το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή. Ακολούθησε συλλογή από τη διεθνή βιβλιογραφία των τιμών του φαινόμενου συντελεστή διαπερατότητας στην μονοστοιβάδα των κυττάρων αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου Caco-2 (P_{caco}).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε γραμμική και πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης. Η στατιστική ανάλυση έγινε με την χρήση του λογισμικού Statistica Axa 2.0.

3. Αποτελέσματα

Ο συντελεστής εντερικής διαπερατότητας P_{caco} παρουσίασε ανάλογη γραμμική σχέση με τους δείκτες $logk_w^{IAM}$ με βάση την εξίσωση:
$P_{caco} = 0.38(\pm0.08)\ logK_w^{IAM} - 0.12(\pm0.24)$, n=23; r=0.7150; p=0.00013; SEE=0.30.
Η γραμμική σχέση του συντελεστή εντερικής διαπερατότητας με τους δείκτες $logk_w^{IAM}$ βελτιώθηκε σημαντικά με την εισαγωγή του αριθμού δεσμών υδρογόνου ως δότη (HBD):
$P_{caco} = 0.29(\pm0.07)\ logK_w^{IAM} - 0.09(\pm0.03)\ HBD + 0.49(\pm0.30)$, n=23, r=0.8101, p=0.00002; SEE=0.25.
Οι αντίστοιχες εξισώσεις, μετά από αντικατάσταση των δεικτών $logK_w^{IAM}$ με τον συντελεστή $logD_{7.4}$ ή logP, παρουσίασαν κατώτερα ποιοτικά στατιστικά χαρακτηριστικά.

4. Συμπεράσματα

Η βιομιμητική χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών αποτελεί μια γρήγορη, εύχρηστη και χαμηλού κόστους τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την εκτίμηση της εντερικής διαπερατότητας των φλαβονοειδών. Η φωσφολιποφιλία και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δότη φαίνεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εντερική διαπερατότητα των φλαβονοειδών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμβάλλουν περαιτέρω στην κατανόηση των μηχανισμών απορρόφησης τους των φλαβονοειδών διαμέσου του εντερικού βλεννογόνου στην κυκλοφορία του αίματος.

5. Βιβλιογραφία

Min-Hsiung Pan, Ching-Shu Laia, Chi-Tang Ho "*Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids*", The Royal Society of Chemistry, Food Funct., 1, 15–31, 2010

Shashank Kumar, Abhay K. Pandey, "*Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*", The ScientificWorld Journal, 1-15, 2013

Yoshinori Uekusa, Yuko Takeshita, Takeshi Ishii and Tsutomu Nakayama, "*Partition Coefficients of Polyphenols for Phosphatidylocholine Investigated by HPLC with an Immobilized Artificial Membrane Column*", Biosci.Biotechnol.Biochem.72(12), 3289-3292, 2008