

Ocena stężeń leku wolnego i związanego z białkami osocza z zastosowaniem metody ultrafiltracji

Matylda Resztak, Franciszek Główka

Cel ćwiczenia

Wyznaczenie stopnia wiązania gliklazu z białkami osocza, z zastosowaniem metody ultrafiltracji do rozdzielenia leku wolnego od związanego.

Wymagane zagadnienia

Kinetyka wiązania leku z białkami oraz metody wyznaczania tego wiązania, czynniki wpływające na stopień wiązania leku z białkami wraz z oceną jego wpływu na parametry farmakokinetyczne.

WPROWADZENIE

Efekt terapeutyczny leku zależy od leku wolnego, niezwiązanego z białkiem. Przy tym samym stężeniu całkowitym możemy więc obserwować różne działanie w sytuacji istotnie różnych stężeń frakcji wolnej (tzn. gdy stężenie całkowite w przypadku *A* i *B* będzie to samo, ale w sytuacji *A* frakcja wolna będzie stanowić 50%, a w sytuacji *B* – 90%, to oczywiście silniejszy efekt będziemy obserwować w sytuacji *B*).

Najczęściej wiązanie leku z białkami osocza lub tkanek ma charakter niespecyficzny. Lek wiąże się z dowolnym białkiem, w konsekwencji różne leki mogą być związane w tym samym miejscu w cząsteczce białka. Wówczas lek o mniejszym powinowactwie do miejsc wiążących będzie wypierany przez lek o większym powinowactwie. Gdy dochodzi do wiązania specyficznego, białka są odpowiednio dopasowane do każdego leku.

Farmakodynamiczne działanie leku polega m.in. na wzajemnym oddziaływaniu cząsteczki substancji aktywnej i jej celu molekularnego (np. receptora). Cząsteczka leku związanego z białkiem osocza jest farmakologicznie nieaktywna. Kompleks lek–białko jest zbyt duży, aby przejść przez błony biologiczne i dotrzeć do receptora znajdującego się w tkankach. Tylko lek wolny jest aktywny farmakologicznie. Najważniejsze białka osocza, które wiążą leki, to albumina i kwaśna α_1 -glikoproteina, ale mogą tu mieć znaczenie również lipoproteiny i γ -globuliny. W przypadku pełnej krwi dodatkowym czynnikiem wiążącym lek mogą być również komórki krwi, głównie erytrocyty. Większość leków wiąże się z białkiem odwracalnie przy udziale niespecyficznych oddziaływań, jak wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe lub siły van der Waalsa. Cząsteczki leku związane z białkami tworzą tzw. depot (magazyn, rezerwuár), z którego stopniowo uwalniają się kolejne cząsteczki leku, zastępując te, które uległy już eliminacji. Wiązanie nieodwracalne jest dość rzadkie, a lek wiąże się w takim przypadku z białkiem najczęściej za pomocą specyficznego wiązania kowalencyjnego. Do leków wiążących się kowalencyjnie z albuminami surowicy krwi należą inhibitory kinazy tyrozynowej stosowane w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuc: furmonertinib i osimertinib oraz raka piersi: pyrotinib, neratinib.

Do parametrów charakteryzujących wiązanie leków z białkami zaliczyć należy: stałą wiązania, liczbę miejsc wiążących, stopień wiązania oraz czynniki determinujące wiązanie, takie jak: stężenie leku, stężenie białka, rodzaj białka biorącego udział w wiązaniu, pH środowiska, a także siłę jonową.

Ilościowy opis wiązania leku z białkami

Reakcja wiązania leku z białkiem przebiega zgodnie z prawem działania mas Guldberga-Waagego:



Proces wiązania leku A z białkiem P można opisać ilościowo poprzez stałą wiązania w stanie równowagi K_a :



gdzie: K_a – stała wiązania leku z białkiem w stanie równowagi,

$[A]$ – stężenie niezwiązanego leku,

$[P]$ – stężenie niezwiązanego białka,

$[AP]$ – stężenie kompleksu lek-białko.

Stężenie leku związanego z białkiem wyznaczyć można z równania:

$$[AP] = K_a[A][P] \quad (2.2)$$

Wielkością charakteryzującą zdolność tworzenia kompleksu substancji leczniczej z białkiem jest wartość r , która oznacza *liczbę moli leku związanego przez 1 mol białka*. Przy założeniu, że na cząsteczce białka znajduje się jedno miejsce wiążące lek (czyli lek wiąże się z białkiem w stosunku molowym 1:1), ilość leku przypadającą na cząsteczkę białka można przedstawić jako stosunek stężenia leku związanego $[AP]$ do całkowitego stężenia białka $[P]_{tot}$:

$$r = \frac{[AP]}{[AP] + [P]} = \frac{[AP]}{[P]_{tot}} \quad (2.3)$$

Wyznaczając z równania 2.2 stężenie leku związanego i po podstawieniu do równania 2.3 otrzymuje się zależność:

$$r = \frac{K_a[A][P]}{K_a[A][P] + [P]} = \frac{K_a[A]}{K_a[A] + 1} \quad (2.4)$$

Jeżeli istnieje n identycznych i niezależnych miejsc wiążących na cząsteczce białka, to:

$$r = \frac{n \cdot K_a[A]}{K_a[A] + 1} \quad (2.5)$$

Analizując równanie 2.5, warto przypomnieć sobie model adsorpcji Langmuira z kursu chemii fizycznej i odnieść proces wiązania leku z białkiem do procesu adsorpcji na powierzchni ciała stałego.

Jeżeli dostępnych jest więcej niż jeden rodzaj miejsc wiążących, to równanie przyjmuje postać:

$$r = \frac{n_1 \cdot K_{a1} \cdot [A]}{K_{a1}[A] + 1} + \frac{n_2 \cdot K_{a2} \cdot [A]}{K_{a2}[A] + 1} + \dots \quad (2.6)$$

Istnieją różne transformacje liniowe równania 2.5 pozwalające na wyznaczenie stałych n i K_a ; są to np.: odwrócone równanie Klotza, równanie Scatcharda i równanie Rosenthala. W praktyce proces wiązania leku z białkiem charakteryzuje się najczęściej poprzez podanie ułamka (frakcji) leku związanego z białkiem f_b :

$$f_b = \frac{[AP]}{[A]_{tot}} \quad (2.7)$$

gdzie: f_b – ułamek leku związanego z białkiem (może przyjmować wartości od 0 do 1; wartość 1 odpowiadałaby teoretycznej sytuacji, gdy 100% leku występuje we krwi w postaci związanej z białkami, w praktyce zawsze niewielki ułamek leku będzie występował w postaci niezwiązanej),
 $[AP]$ – stężenie leku związanego z białkiem,
 $[A]_{tot}$ – całkowite stężenie leku (suma leku związanego i leku niezwiązanego).

W rutynowym terapeutycznym monitorowaniu leków oznacza się najczęściej stężenie całkowite leku w osoczu czy surowicy, również zakresy terapeutyczne dotyczą najczęściej stężeń całkowitych leku. Jednakże, biorąc pod uwagę powyższe informacje, wiemy już, że bardziej precyzyjnej informacji o możliwym działaniu farmakologicznym podanego leku dostarcza analiza stężenia leku niezwiązane, czyli aktywnej frakcji leku w osoczu czy surowicy krwi. Problemem analitycznym, który należy pokonać, jest rozdzielenie leku wolnego od związanego z białkiem. Poniżej opisano metody wykorzystywane do tego celu wraz z ich najważniejszymi zaletami i wadami. Poza możliwymi problemami z rozdzieleniem leku wolnego i związanego z białkiem łatwo przewidzieć, że stężenie leku wolnego jest niższe niż stężenie całkowite, różnica ta jest tym większa, im silniej lek jest wiązany przez białka osocza. Przy niskich stężeniach leku wolnego do terapeutycznego monitorowania konieczne będzie zastosowanie odpowiednio czułych metod analitycznych.

Metody badania wiązania leku z białkami

Podstawową zasadą większości metod analitycznych ilościowego oznaczania wiązania leków z białkami jest oddzielenie leku wolnego od dużej cząsteczki białka, względnie kompleksu lek–białko. Najczęściej stosowane metody to: dializa równowagowa, mikrodializa, ultrafiltracja, ultrawirowanie. Inne metody to: mikroekstrakcja, wysokosprawna analiza czołowa oraz ekstrakcja w punkcie zmętnienia. Każda z tych metod ma zarówno zalety, jak i wady.

Dializa równowagowa stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych metod oznaczania wolnej frakcji leku. Oznaczenie tą metodą przebiega w komorze dializacyjnej składającej się z dwóch części, które rozdziela półprzepuszczalna błona. W jednej części komory znajduje się badane osocze, w drugiej części – wolny od białek i izotoniczny roztwór buforowy. Zdolność do przenikania przez błonę ma tylko wolna forma leku. Lek związany z białkiem nie będzie więc przechodził przez błonę i pozostanie w części komory, w której umieszczono osocze. Lek wolny będzie przechodził przez półprzepuszczalną membranę do drugiej części komory zawierającej bufor aż do ustalenia się stanu równowagi. Zatem w stanie równowagi całkowite stężenie leku po obu stronach membrany nie będzie jednakowe – będzie ono większe w części komory dializacyjnej, w której znajduje się lek związany z białkiem. Po ustaleniu się stanu równowagi oznacza się stężenie wolnego leku w komorze z buforem. Znając początkowe całkowite stężenie leku, można obliczyć ułamek ilości leku związanego z białkami z następującej zależności:

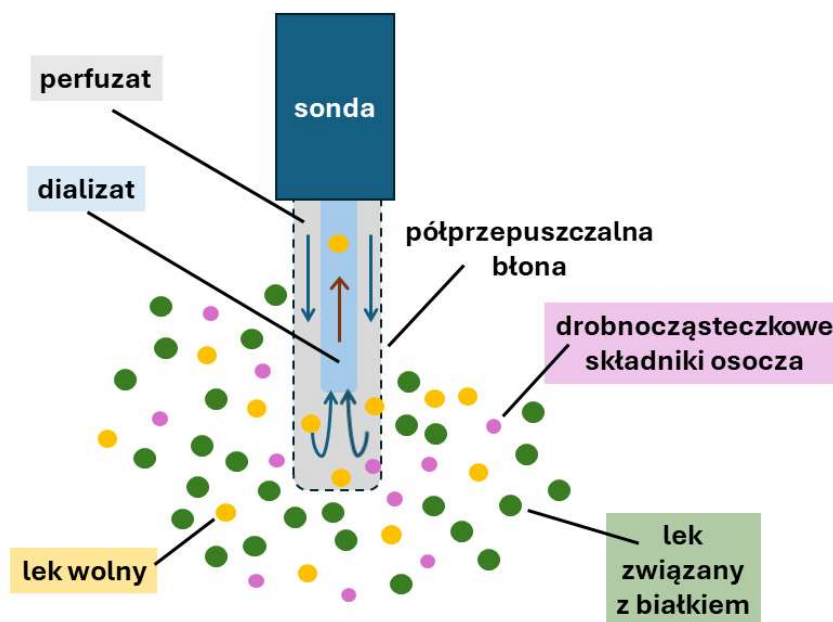
$$f_b = \frac{A_b}{A_{tot}} = \frac{A_{tot} - A_u}{A_{tot}} = \frac{A_{tot} - C_u \cdot V_{tot}}{A_{tot}} \quad (2.8)$$

gdzie: f_b – ułamek leku związanego z białkami,

A_b – ilość leku związanego z białkami,
 A_u – ilość leku niezwiązanego,
 A_{tot} – całkowita ilość leku,
 C_u – stężenie leku niezwiązanego,
 V_{tot} – objętość całkowita osocza i buforu.

Ograniczeniem tej metody jest stosunkowo długi czas ustalania się stanu równowagi stężenia leku wolnego po obu stronach membrany. Czynnikiem wpływającym na szybkość ustalenia równowagi są m.in. temperatura oraz rodzaj stosowanej membrany. Do błędnych wniosków w tej metodzie może prowadzić bezpośrednie porównanie stężeń leku po obu stronach błony. Należy pamiętać, że ruch przez błonę półprzepuszczalną będzie zachodzić w obu kierunkach. W trakcie procesu, wskutek zjawiska osmozy, cząsteczki wody dyfundują przez błonę do komory z osoczem, zwiększając jego objętość, a tym samym zmniejszając stężenie leku i białka po tej stronie błony. Stąd bardzo istotne są warunki izoosmotyczne. Inną przyczyną błędów może być również adsorpcja niektórych leków na komorze dializacyjnej. Należy więc położyć nacisk na rzetelne określenie odzysku w procesie dializy, aby odpowiednio skorygować oznaczenia i prawidłowo wyznaczyć stopień wiązania leku z białkiem. Pomimo tych ograniczeń metoda ta ze względu na niski koszt analizy, wysoką powtarzalność wyników oraz małe objętości próbek osocza wykorzystywanych w badaniu stanowi jedną z częściej wykorzystywanych metod oznaczania wolnej frakcji leku.

Mikrodializa jest szybką i prostą metodą wyznaczania stopnia wiązania leku z białkami. Opiera się na zastosowaniu sondy mikrodializacyjnej wyposażonej w błonę półprzepuszczalną (**rycina 2.1**), którą umieszcza się w badanej próbce, a następnie przepłukuje się ją roztworem Ringera (perfuzatem). W wyniku ciągłego przepływu płynu perfuzyjnego nie dochodzi do osiągnięcia stanu równowagi. Następnie określa się współczynnik odzysku w buforze niezawierającym białek (w dializacie), dzięki czemu możliwe jest obliczenie stężenia leku wolnego oraz stopnia wiązania z białkami osocza.



Rycina 2.1. Schemat pokazujący zasadę rozdzielania leku wolnego i związanego z białkiem metodą mikrodializy (Źródło: opracowanie własne)

Ze względu na krótki czas analizy i proste wykonanie *ultrafiltracja* jest często stosowaną metodą wyznaczania wiązania leku z białkami. W metodzie tej wykorzystuje się specjalne naczynka wyposażone w błonę filtracyjną o ściśle określonej wielkości porów (np. 30 K, tzn. że

przez filtr przejdą cząsteczki o masie poniżej 30 kDa). Najczęściej są to próbówki ze specjalnym wkładem zawierającym błonę filtracyjną, w którym umieszcza się badaną próbkę. W czasie wirowania lek wolny oddzielony zostaje od leku związanego z białkiem i wolnego białka (duże cząsteczki zostają na błonie filtracyjnej, mniejsze przechodzą do próbówki, w której umieszczony jest wkład z filtrem). Obliczenie stopnia wiązania leku z białkami osocza przeprowadza się podobnie jak w przypadku dializy. Stosując tę metodę należy zwrócić uwagę, aby nie odwirować zbyt dużej ilości osocza, powyżej 20% całkowitej objętości wziętej do analizy, może prowadzić to bowiem do zaburzenia równowagi wiązania leku z białkami wskutek zmiany stężenia białek. Ograniczeniem tej metody jest również możliwość adsorpcji niektórych leków na filtrze lub na naczynku. W celu uniknięcia błędu pomiaru należy ocenić zjawisko adsorpcji leku poprzez wyznaczenie wartości wiązań niespecyficznych (*NSB*, *non-specific binding*). Ewentualny efekt adsorpcji próbuje się minimalizować poprzez zastosowanie przed analizą antyadsorbentów nanoszonych na filtr, np. 0,5% Tweenu, lub przez nasycenie błony roztworem z lekiem w stężeniu odpowiadającym stężeniu leku niezwiązanego.

Ultrawirowanie to metoda wykorzystywana w przypadku, gdy obserwowany jest wysoki stopień adsorpcji leku na membranie lub filtrze. Kompleks leku z białkiem o dużej masie cząsteczkowej oddziela się od leku wolnego w procesie ultrawirowania przy przyspieszeniu odśrodkowym rzędu 100 000 g, a pozostały płyn osocza poddaje się analizie celem obliczenia stopnia wiązania leku z białkami. Zaletą tej metody jest brak występowania efektu Donnana oraz fakt, że stężenie leku w układzie jest stałe. Ograniczeniem jest natomiast możliwość wiązania się leku z lipoproteinami, które z powodu małej gęstości mają tendencję do flotacji. Wady tej metody to również wysoki koszt zakupu ultrawirówki oraz długi czas trwania analizy.

Czynniki wpływające na stopień wiązania leku z białkami

Zmiana stężenia białek osocza. Stan fizjologiczny (wiek, płeć, ciąża, stany chorobowe) ma wpływ na wiązanie leków z białkami. Związane jest to głównie ze zmianami stężenia w osoczu albuminy, α_1 -glikoproteiny, wolnych kwasów tłuszczowych i bilirubiny. Stężenie albuminy w osoczu zmniejsza się u chorych z nieprawidłową czynnością wątroby, w wyniku tego stężenie leku wolnego wzrasta (diazepam), choć całkowite stężenie leku może pozostać niezmienione ze względu na zmniejszoną zdolność wątroby do metabolizowania leku wolnego. Również podwyższony poziom bilirubiny, która ma zdolność wypierania leków z połączeń z białkami, może zmniejszać stopień wiązania leku z białkiem.

Wiązanie z białkami osocza wielu leków (fenytoiny, sulfonamidów, kwasu walproinowego, furosemidu, diazepamu) obniża się u pacjentów z niewydolnością nerek. Wiązanie fenytoiny z białkami osocza osiąga wartość ok. 90% ($f_b = 0,9$; wartość prawidłowa), a u pacjentów, u których zdiagnozowano zespół nerczycowy, może zmniejszyć się nawet do 60% ($f_b = 0,6$). Wykazano, że każdemu obniżeniu stężenia albuminy w surowicy o 1 g/l (wartość prawidłowa 37 g/l) towarzyszy zwiększenie stężenia frakcji wolnej leku o 1%. Obniżenie **stężenia** albumin do 27 g/l powoduje zwiększenie wolnej frakcji fenytoiny z 10 do 20% (f_u wzrasta z wartości 0,1 do wartości 0,2). Przedział terapeutyczny fenytoiny całkowitej to 10–20 $\mu\text{g/ml}$ u pacjentów z normalbuminemią (przy wiązaniu z białkiem na poziomie 90% frakcja wolna leku stanowi 10%, a więc zakres terapeutyczny dla leku wolnego to 1–2 $\mu\text{g/ml}$). U osoby z hipoalbuminemią na poziomie 27 g/l, jeśli chcemy utrzymać stężenie leku wolnego na tym samym poziomie 1–2 $\mu\text{g/ml}$, przedział terapeutyczny określany dla całkowitego stężenia musiałby wynosić 5–10 $\mu\text{g/ml}$. W takiej sytuacji do prawidłowego monitorowania terapii konieczne jest oznaczenie stężenia frakcji wolnej leku lub korekta całkowitego stężenia w oparciu o równania populacyjne.

Stężenie kwaśnej α_1 -glikoproteiny zwiększa się w stanach zapalnych, w stresie, w przypadku chorób nowotworowych czy zawału mięśnia sercowego, spada natomiast w schorzeniach nerek i wątroby. Dla leków silnie wiążących się z glikoproteina (lidokaina, propranolol, chinidyna) stężenie całkowite leku w osoczu, przy zwiększonym stężeniu α_1 -glikoproteiny, może osiągnąć

wymagany poziom terapeutyczny, podczas gdy stężenie leku wolnego będzie poniżej tego poziomu. Frakcja wolna lidokainy, wynosząca zwykle od 20 do 40%, zmniejsza się do wartości poniżej 20% u pacjentów po zawale serca, u których obserwowany jest wysokie stężenie kwaśnej α_1 -glikoproteiny, co powoduje zmniejszenie skuteczności działania leku.

Współzawodnictwo o miejsca wiążące na białku. W praktyce terapeutycznej bardzo często wymagane jest stosowanie kilku leków równocześnie. Ponieważ leki mają różne powinowactwo do cząsteczki białka, zdarza się, że lek posiadający większe powinowactwo do tego samego miejsca wiązania wyprze inny z jego kompleksu z białkiem. Zazwyczaj jednak zmiana stopnia wiązania leku z białkiem rzadko przyczynia się do trwałej zmiany stężenia leku niezwiązanego, ponieważ jednocześnie dochodzi do zmiany jego klirensu. W przypadku leków o farmakokinetyce liniowej zmiana stopnia wiązania z białkami osocza wywołuje zmianę stężenia leku wolnego i wpływa na efekt terapeutyczny, jeśli lek ma wysoki współczynnik ekstrakcji wątrobowej i jest podawany parenteralnie. Zmiana wiązania leku z białkami ma większe znaczenie w przypadku leków o nieliniowej dystrybucji lub eliminacji. Przykładem klinicznym, w którym wypieranie leków ze swoich miejsc wiążących skutkuje wzrostem stężenia wolnej frakcji leku, a tym samym zwiększeniem efektu terapeutycznego jest interakcja fenytoiny i kwasu walproinowego. Jeśli nie doszło do wysycenia procesu eliminacji, fenytoina uwolniona z połączeń z białkiem będzie ulegać szybszej eliminacji wskutek zwiększonego klirensu, co z kolei prowadzi do obniżenia jej całkowitego stężenia w stanie stacjonarnym (stężenie leku wolnego nie powinno zmienić się znacząco). Jednakże w przypadku fenytoiny sytuację komplikuje fakt, że nawet przy terapeutycznych stężeniach leku w osoczu jej metabolizm najczęściej ulega wysyceniu (fenytoina charakteryzuje się farmakokinetyką nieliniową). Wtedy, pomimo wzrostu frakcji wolnej leku, nie będzie wzrastać kompensacyjnie klirens fenytoiny, gdyż proces eliminacji osiągnął maksymalną szybkość. W takim przypadku całkowite stężenie leku nie zmieni się znacząco, wzrośnie natomiast stężenie leku wolnego, a w konsekwencji nasili się działanie leku. Interesującym przypadkiem jest interakcja fenpropionu z fenylbutazonem. Liczne badania wykazały, że obserwowane krwawienie związane ze wzrostem działania pochodnej kumaryny powodowane jest nie tylko jej wypieraniem z kompleksu z białkami osocza, ale dodatkowo hamowaniem przez fenylbutazon metabolizmu fenpropionu. Obniżony w ten sposób klirens wewnętrzny fenpropionu prowadzi do wzrostu stężenia frakcji wolnej i w konsekwencji do wystąpienia objawów toksycznych.

Także substancje endogenne, jak np. bilirubina, mogą zostać wyparte przez leki z ich miejsc wiążących na białku. Przykładem są sulfonamidy wypierające bilirubinę z postaci związanej z białkiem do postaci wolnej. Podanie ich noworodkom może doprowadzić do wystąpienia żółtaczki, w skrajnym przypadku do żółtaczki jąder podkorowych mózgu.

Interakcje polegające na wypieraniu z połączeń z białkiem jednego leku przez drugi mogą mieć istotne znaczenie kliniczne głównie w przypadku leków, które wiążą się z białkami w ponad 95% i charakteryzują się wąskim indeksem terapeutycznym. Na przykład gdy lek wiąże się w 95% z białkiem, nawet niewielkie (o 5%) zastąpienie leku w jego wiązaniu z białkiem przez inny lek powoduje znaczący wzrost stężenia leku wolnego (początkowo 5% leku wolnego vs $5\% + 5\% = 10\%$ frakcji wolnej po zmianie, a więc wzrost o 100%!). W przypadku leków średnio wiążących się z białkami osocza (50%) obserwowane w wyniku podania innego konkurującego leku wyparcie 10% puli leku związanego z białkiem nie będzie miało tak znaczącego wpływu na efekt terapeutyczny (początkowo 50% leku wolnego vs $50\% + 10\% = 60\%$ frakcji wolnej po zmianie, a więc wzrost o 20%).

Wysycenie miejsc wiążących w cząsteczce białka. Cząsteczka białka ma ograniczoną liczbę miejsc wiążących w stosunku do danego leku. Dla większości leków stężenie białka jest dużo większe niż stężenie leku, dlatego wysycenie miejsc wiążących nie jest możliwe. Jednak w przypadku pewnej grupy leków występujących w osoczu w stężeniu terapeutycznym, których wiązanie z białkiem zależy od stężenia, może dojść do takiej sytuacji. Dzieje się tak np.

w przypadku kwasu walproinowego, gdy przy wzroście stężenia całkowitego może dojść do wysycenia przez lek miejsc wiążących, a co za tym idzie – do nawet 10-krotnego wzrostu ułamka leku wolnego (f_u). Należy jednak zaznaczyć, że stężenie leku wolnego (C_u) wzrośnie tylko chwilowo, a następnie wróci do początkowego poziomu dzięki zwiększeniu klirensu.

Wpływ wiązania leku z białkami na parametry farmakokinetyczne

Część leku, która związana jest z białkiem, jest farmakologicznie nieaktywna i pełni funkcję magazynu, podczas gdy forma wolna ma zdolność przenikania do tkanek i wywiera działanie farmakologiczne. Zmiana stopnia wiązania leku z białkami wpływa na jego objętość dystrybucji, klirens i biologiczny okres półtrwania.

Objętość dystrybucji. Wiązanie leku z białkami to jeden z czynników wpływających na rozmieszczenie leku w organizmie, a więc na wartość jego objętości dystrybucji. Zależność między wiązaniem leku z białkami a objętością dystrybucji przedstawia następujący wzór:

$$V_d = V_B + \frac{f_u}{f_{u(T)}} V_T \quad (2.9)$$

gdzie: V_d – objętość dystrybucji (pozorna),

V_B – objętość krwi,

f_u – ułamek leku niezwiązanego we krwi,

$f_{u(T)}$ – ułamek leku niezwiązanego w tkankach,

V_T – różnica między całkowitą objętością płynów ustrojowych a objętością krwi.

Dla substancji słabo wiążących się z białkami osocza i tkanek objętość dystrybucji odpowiada fizjologicznej objętości płynów, w których lek jest rozmieszczony. Przykładem mogą być antybiotyki aminoglikozydowe, które nie przenikają do wnętrza komórek i rozmieszczone są głównie w wodzie zewnątrzkomórkowej. Ich objętość dystrybucji wynosi ok. 0,25 l/kg. W przypadku leku dobrze wiążącego się z białkami osocza i tkanek na wartość objętości dystrybucji wpływa iloraz frakcji niezwiązanych leku f_u i $f_{u(T)}$. Niewielka wartość objętości dystrybucji ibuprofenu 0,15 l/kg związana jest z faktem, iż lek w 99% wiąże się z białkami osocza, w którym osiąga wysokie stężenie. Z kolei diazepam wykazujący właściwości lipofilne w dużym stopniu (ok. 99%) wiąże się z białkami tkanek i jego objętość dystrybucji wynosi ok. 1,1 l/kg. Objętość dystrybucji digoksyny jest duża i wynosi ok. 7,3 l/kg, ponieważ lek w niewielkim stopniu wiąże się z białkami osocza, ale ma duże powinowactwo do tkanek.

Klirens. Wiązanie leków z białkami ma często wpływ na klirens, metabolizowane mogą być bowiem tylko wolne cząsteczki leku (zagadnienie omówione również w materiałach do ćwiczenia 1). Główne narządy odpowiedzialne za eliminację leku to wątroba i nerki, dlatego duże znaczenie ma klirens wątrobowy oraz klirens nerkowy leku. W przypadku leków o dużym współczynniku ekstrakcji wątrobowej ($ER > 0,7$, np. propranolol) wątroba zdolna jest całkowicie zmetabolizować lek wpływający do niej wraz z krwią. Wiązanie leku z białkami nie ma w tym przypadku wpływu na klirens wątrobowy leku, a wartość klirensu zależy głównie od przepływu krwi przez ten narząd. Dla leków o małym współczynniku ekstrakcji ($ER < 0,3$, np. warfaryna, kwas walproinowy) szybkość eliminacji zależy od stężenia leku wolnego i klirens wątrobowy zmienia się proporcjonalnie wraz ze zmianą stężenia frakcji wolnej leku, co wynika z następującej zależności:

$$Cl_H \approx Cl_{int} \cdot f_u \quad (2.10)$$

gdzie: Cl_H – klirens wątrobowy,

Cl_{int} – klirens wewnętrzny,

f_u – ułamek leku niezwiązanego we krwi.

Wiązanie leku z białkami osocza wpływa również na klirens nerkowy. Duże cząsteczki białka nie przechodzą przez filtr nerkowy (nie ulegają filtracji kłębuszkowej) i pozostają we krwi. Tylko

lek wolny ulega filtracji w kłębuszkach nerkowych zdrowej nerki, a szybkość filtracji zależy wprost proporcjonalnie od ułamka leku wolnego.

Klirens odpowiadający filtracji kłębuszkowej leku będzie równy:

$$Cl_{GF} = GFR_{kr} \cdot f_u \quad (2.11)$$

gdzie: Cl_{GF} – klirens nerkowy wynikający z filtracji kłębuszkowej,

GFR_{kr} – szybkość przesączania kłębuszkowego,

f_u – ułamek leku niezwiązanego we krwi.

Biologiczny okres półtrwania. Wpływ stopnia wiązania na $t_{0,5}$ zależy od wartości takich parametrów jak klirens i objętość dystrybucji:

$$t_{0,5} = \frac{0,693 \cdot V_d}{Cl} \quad (2.12)$$

W przypadku niewydolności nerek całkowity klirens fenytoiny może wzrastać (jeśli proces eliminacji nie uległ wysyceniu) w związku ze zmniejszeniem się jej stopnia wiązania z białkami, co może wpływać na skrócenie jej biologicznego okresu półtrwania. Z kolei klirens wątrobowy propranololu zależy głównie od przepływu krwi przez wątrobę, a mniejsze znaczenie ma wiązanie leku z białkami. Zmiana objętości dystrybucji przy stałym klirensie leku powoduje zmianę biologicznego okresu półtrwania. W przypadku zmniejszenia stopnia wiązania propranololu z białkami jego $t_{0,5}$ się wydłuża ze względu na wzrost objętości dystrybucji leku.

Podsumowując, zmiana stopnia wiązania leku z białkami relatywnie rzadko wpływa na stężenie leku niezwiązanego, gdyż jednocześnie zmienia się jego klirens. Co za tym idzie – nie wpływa ona również na efekt kliniczny czy występowanie działań niepożądanych. Rutynowe monitorowanie leku wolnego jest trudne z analitycznego punktu widzenia i obciążone większym błędem niż pomiar stężenia całkowitego leku. Istnieją jednak sytuacje, gdy monitorowanie leku wolnego jest wskazane:

- a) w przypadku braku odpowiedzi klinicznej po podaniu dawki leku charakteryzującego się wysokim stopniem wiązania z białkami osocza, jak również kiedy silny efekt farmakologiczny obserwowany jest po podaniu małej dawki takiego leku;
- b) w przypadku politerapii, kiedy stosowane są leki o wysokim stopniu wiązania się z białkami osocza i konkurują o te same miejsca wiążące w cząsteczce białka.

Gliklazyd – farmakokinetyka

Wskazania

Gliklazyd jest doustnym lekiem przeciwcukrzycowym należącym do drugiej generacji pochodnych sulfonilomocznika, stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2. Obniża stężenie glukozy we krwi, blokując selektywnie kanały potasowe zależne od ATP w komórkach β trzustki. Oprócz działania hipoglikemizującego wyróżnia się także szeregiem korzystnych efektów pozatrzustkowych, dzięki którym terapia gliklazydem znacznie opóźnia powstawanie powikłań cukrzycowych, przyczyniających się do znacznej śmiertelności w tej grupie chorych.

Postacie leku

Gliklazyd stosowany jest doustnie w formie tabletek klasycznych w dawkach 80 mg, tabletek o zmodyfikowanym uwalnianiu 30 i 60 mg oraz tabletek o przedłużonym uwalnianiu 30 i 90 mg.

Dawkowanie

Gliklazyd należy przyjmować podczas posiłku, najlepiej rano przy śniadaniu, w przypadku dawkowania raz na dobę. Dawki dobowe dla dorosłych wahają się od 30 do 320 mg, w zależności od rodzaju preparatu. Dobowa dawka preparatu o zmodyfikowanym uwalnianiu może wynosić od 1 do 4 tabletek na dobę (od 30 do 120 mg), przyjmowanych jednorazowo, w porze śniadania. Dawkowanie gliklazydu zwiększa się stopniowo, przy czym odstępy czasowe między zmianami dawek mogą wynosić od kilku dni do kilku tygodni, w zależności od postaci leku.

Wchłanianie

Gliklazyd z preparatu o natychmiastowym uwalnianiu wchłania się szybko i całkowicie z przewodu pokarmowego. Posiłek nie ma wpływu na szybkość ani na stopień wchłaniania. Po podaniu preparatu o przedłużonym uwalnianiu stężenie gliklazydu w osoczu osiąga wartość maksymalną w 4–6 h po podaniu leku, a stężenie terapeutyczne utrzymywane jest przez 6 do 12 h. Natomiast jednorazowa dawka dobową preparatu o zmodyfikowanym uwalnianiu umożliwia utrzymanie terapeutycznego stężenia gliklazydu w osoczu przez ponad 24 h. Zmienność u poszczególnych osobników jest niska.

Dystrybucja

Z białkami osocza gliklazyd wiąże się w ok. 95%. Objętość dystrybucji wynosi ok. 30 l.

Metabolizm

Gliklazyd jest intensywnie metabolizowany w wątrobie, a powstałe metabolity są wydalane z moczem (mniej niż 1% dawki jest wydalone w postaci niezmienionej). W osoczu nie wykryto obecności aktywnych farmakologicznie metabolitów.

Eliminacja

Biologiczny okres półtrwania gliklazydu wynosi od 12 do 20 h.

Piśmiennictwo

1. Derendorf H, Schäfer HG, Staab A. Farmakokinetika. Podstawy i znaczenie praktyczne. Wyska E (red. wyd. pol.). Medpharm Polska, Wrocław 2013.
2. Gliklazyd. Charakterystyka produktu leczniczego.
3. Hermann TW. Farmakokinetika. Teoria i praktyka. PZWL, Warszawa 2002.
4. Skibińska Ł, Hermann TW. Ćwiczenia z farmakokinetiki. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2003.

CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

Aparatura i materiały

Zestaw HPLC Agilent Technologies 1220, faza stacjonarna: kolumna Eclipse Plus C₁₈ (4,6 × 100 mm; 3,5 μm), faza ruchoma: mieszanina 0,04 M buforu KH₂PO₄ o pH 3,8 i acetonitrylu (51 : 49; v/v), probówki do ultrafiltracji AMICON ULTRA 500 μl; 10 kDa, probówki Easy CAP; 1,5 ml, wytrząsarka typu Minishaker MS1, wirówka EBA 12R, roztwory wzorcowe gliklazydu 1–50 μg/ml, 0,9% roztwór NaCl, zestaw pipet automatycznych.

Wykonanie

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stopnia wiązania gliklazydu z białkami osocza.

Próbkę osocza pobrano od pacjenta diabetologicznego ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 2, przyjmującego doustnie Diaprel MR w dawce 90 mg na dobę. Próbkę zebrano w 2 h od podania leku i oznaczono stężenie całkowite gliklazydu (5 μg/ml).

1. Ustawienie parametrów analizy HPLC

Przed przystąpieniem do analizy ustawić w aparacie HPLC następujące parametry:

- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min.
- Ustawienie pracy detektora UV: 226 nm.
- Objętość nastrzyku: 50 μl.
- Temperatura kolumny: temperatura pokojowa.

2. Przygotowanie próbek do wyznaczenia stężenia leku wolnego metodą ultrafiltracji

- Do dwóch probówek ultrafiltracyjnych pobrać po 0,5 ml osocza pacjenta leczonego gliklazydem.
- Próbkę osocza umieścić w górnej części naczynka Millipora, szczelnie zamknąć.
- W celu oddzielenia leku wolnego od związanego probówki ultrafiltracyjne umieścić w wirówce, wirować zgodnie z następującymi warunkami: temperatura wirowania: 25°C, czas wirowania: 15 min, szybkość wirowania: 9000 g.
- Z każdej probówki pobrać 50 μl uzyskanego filtratu i nastrzyknąć na kolumnę chromatograficzną w celu wyznaczenia stężenia leku wolnego.

3. Przygotowanie próbek do krzywej wzorcowej

Do probówek Easy CAP o pojemności 1,5 ml pobrać za pomocą pipet automatycznych odpowiednie objętości roztworów wzorcowych gliklazydu i roztworu 0,9% NaCl wg podanego poniżej schematu:

	1	2	3	4	5	6
Objętość roztworu wzorcowego gliklazydu	50 μl (1 μg/ml)	50 μl (2,5 μg/ml)	50 μl (5 μg/ml)	50 μl (10 μg/ml)	50 μl (20 μg/ml)	50 μl (50 μg/ml)
Objętość roztworu 0,9% NaCl	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl	450 μl

Probówki starannie zamknąć, mieszać przez 30 s przy użyciu wytrząsarki.

4. Analiza HPLC

- Przygotowane próbki nastrzykiwać kolejno w objętości 50 μl na kolumnę chromatograficzną.
- Po każdym nastrzyku starannie przepłukać strzykawkę roztworem metanolu.
- Analizę chromatograficzną prowadzić każdorazowo 5 min.
- Po zakończeniu analizy odczytać pole powierzchni uzyskanego piku.

5. Obliczenia

Wyznaczenie równania krzywej wzorcowej

Obliczyć stężenie gliklazu w próbkach przygotowanych do wyznaczenia krzywej wzorcowej.

Za pomocą programu Microsoft Excel wykreślić krzywą wzorcową jako zależność pola powierzchni piku gliklazu od stężenia leku w próbce. Następnie wyznaczyć parametry równania opisującego tę zależność, sprawdzając istotność wyrazu wolnego.

Obliczenie stężenia leku wolnego oraz stopnia wiązania leku z białkami osocza

Na podstawie równania krzywej wzorcowej obliczyć stężenie leku wolnego w próbkach poddanych ultrafiltracji. Uzyskaną wartość z dwóch badanych próbek uśrednić, podając równocześnie odchylenie standardowe.

Znając całkowite stężenie leku oznaczone u pacjenta ($5 \mu\text{g/ml}$) oraz stężenie leku wolnego wyznaczone za pomocą metody ultrafiltracji, obliczyć z różnicy stężenie leku związanego z białkiem, a następnie wyznaczyć ułamek oraz stopień leku związanego z białkami osocza.