

Ćwiczenie 2. Wiązanie leków z białkami

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie stopnia wiązania gliklazydu z białkami osocza, z zastosowaniem metody ultrafiltracji do rozdziału leku wolnego od związanego.

Opracowanie: dr Matylda Resztak, prof. dr hab. Franciszek Główka

Wprowadzenie

W większości przypadków w rutynowym monitorowaniu leku w ustroju oznacza się stężenie całkowite leku w osoczu lub surowicy krwi. Efekt terapeutyczny leku zależy jednak od jego frakcji wolnej, niezwiązanej z białkiem. Przy tym samym stężeniu całkowitym możemy więc obserwować różne działanie w przypadku istotnie różnych stężeń frakcji wolnej (tzn. gdy stężenie całkowite w przypadku A i B będzie to samo, ale w sytuacji A frakcja wolna będzie stanowiła 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 niższym powinowactwie do miejsc wiążących będzie wypierany przez lek o większym powinowactwie. W przypadku wiązania specyficznego, białka są odpowiednio dopasowane do każdego leku.

Farmakologiczne 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 niespecyficznego oddziaływań, jak np. wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych lub sił van der Waalsa. Cząsteczki leku związane z białkami tworzą tzw. depot (magazyn, rezerwuar), 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 parametrów charakteryzujących wiązanie leków z białkami zaliczyć należy: stałą wiązania, liczbę miejsc wiążących, stopień wiązania oraz czynniki determinujące wiązanie,

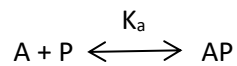
takie jak: stężenie leku, stężenie białka, rodzaj białka biorącego udział w wiązaniu, pH, a także siłę jonową.

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 :



$$K_a = \frac{[AP]}{[A][P]} \quad (2.1)$$

gdzie:

K_a – stała wiązania leku z białkiem w stanie równowagi

$[A]$ – stężenie wolnego leku

$[P]$ – stężenie białka

$[AP]$ – stężenie kompleksu lek-białko

Stężenie leku związanego wyznaczyć można:

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

Wielkością charakteryzującą zdolność tworzenia kompleksu substancji leczniczej z białkiem jest wartość r , która oznacza liczbę moli leku związanego przez jeden 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; 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 wolnej)

[AP] – stężenie leku związanego z białkiem

[A]_{tot} – całkowite stężenie leku (suma leku związanego i leku wolnego)

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 niezwiązanego, czyli aktywnej frakcji leku w osoczu czy surowicy krwi. Problemem analitycznym, jaki 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, które pozwolą na rzetelne oznaczenia.

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. Każda z tych metod posiada 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 posiada 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 (do buforu) 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 wolnego

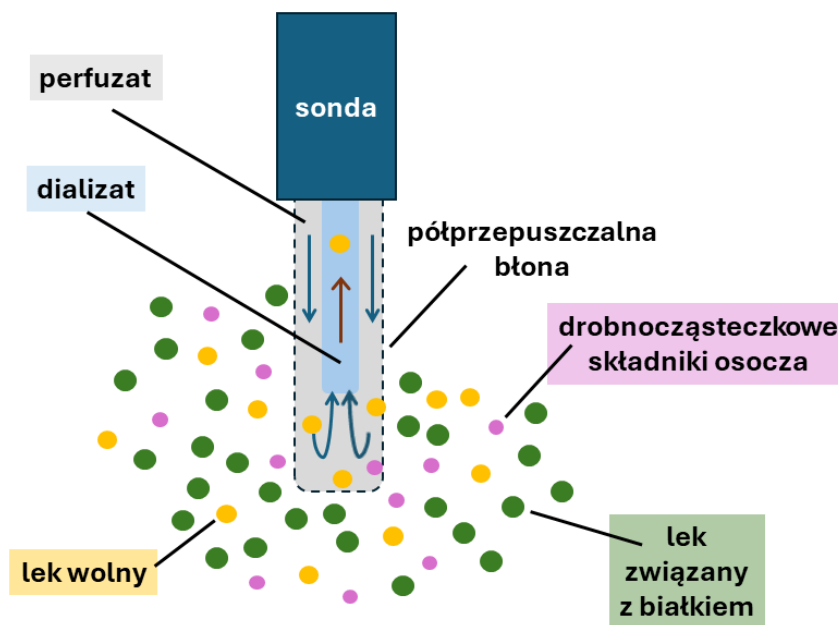
A_{tot} – całkowita ilość leku

C_u – stężenie leku wolnego

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 jej ustalenia jest m.in. temperatura oraz rodzaj stosowanej membrany. Do błędnych wniosków w tej metodzie może prowadzić bezpośrednio 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 stanowi jedną z najczęściej wykorzystywanych metod oznaczania wolnej frakcji leku, ze względu na niski koszt analizy, wysoką powtarzalność wyników oraz małe objętości próbek osocza wykorzystywanych w badaniu.

Mikrodializa – jest szybką i prostą metodą wyznaczania stopnia wiązania leku z białkami. Opiera się na zastosowaniu sondy mikrodializacyjnej wyposażonej w błonę półprzepuszczalną (Ryc. 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 nie zawierającym białek (w dializacie), dzięki czemu możliwe jest obliczenie stężenia leku wolnego oraz stopnia wiązania z białkami osocza.



Ryc. 2.1 Schemat pokazujący zasadę rozdzielania leku wolnego i związanego z białkiem metodą mikrodializy.

Ultrafiltracja – często stosowana metoda wyznaczania wiązania leku z białkami ze względu na krótki czas analizy i proste wykonanie. W metodzie tej wykorzystuje się specjalne naczynka wyposażone w błonę filtracyjną o ściśle określonej wielkości porów (np. 30K – tzn, że przez filtr przejdą cząsteczki o masie poniżej 30 kDa). Najczęściej są to próbki 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 próbki, 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 błędów 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 – metodę tę wykorzystuje się w przypadku, gdy obserwowany jest wysoki stopień adsorpcji leku na membranie lub filtrze. Kompleks leku z białkiem o dużo większej masie cząsteczkowej oddziela się od leku wolnego w procesie ultrawirowania przy przyspieszeniu odśrodkowym rzędu 100000 g, a pozostałą wodę 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 w wyniku małej gęstości mają tendencję do flotacji. Wadą tej metody jest również jej 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 poziomu 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, w pierwszych z przytoczonych sytuacji 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 wysoki poziom α_1 -kwaśnej 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 posiadają 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 powinno nie 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 fenprokumonu. Obniżony w ten sposób klirens wewnętrzny fenprokumonu 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. Np. 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 posiada 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 spełnia rolę magazynu, podczas gdy forma wolna posiada 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 wolnego we krwi

$f_{u(T)}$ – ułamek leku wolnego 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 (zagadnienie omówiono w materiałach do ćw. 1).

Klirens. Wiązanie leków z białkami ma często wpływ na klirens, metabolizowane mogą być bowiem tylko wolne cząsteczki leku (zagadnienie omówione również w materiałach do ćw. 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 jego wartość 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 jego frakcji wolnej, 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 wolnego 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 kłębkowej leku będzie równy:

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

gdzie:

Cl_{rf} – klirens odpowiadający filtracji kłębkowej

Cl_{kr} – klirens kreatyniny

f_u – ułamek leku wolnego we krwi.

Biologiczny okres półtrwania. Wpływ stopnia wiązania na czas $t_{0,5}$ zależy od wartości takich parametrów jak klirens i objętość dystrybucji. 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 jest większym błędem niż pomiar stężenia całkowitego leku. Istnieją jednak przypadki, gdy monitorowanie leku wolnego jest wskazane:

- 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.
- 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 II 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 się doustnie w formie tabletek klasycznych w dawkach 80 mg, tabletek o zmodyfikowanym uwalnianiu 30 mg i 60 mg oraz tabletek o przedłużonym uwalnianiu 30 mg 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 mg 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 wchłania się szybko i całkowicie z przewodu pokarmowego. Posiłek nie ma wpływu na szybkość ani na stopień wchłaniania. Stężenie gliklazydu w osoczu osiąga wartość maksymalną w 4-6 h po podaniu leku. Stężenie terapeutyczne utrzymywane jest przez sześć do dwunastu godzin po podaniu preparatu o przedłużonym uwalnianiu. Natomiast jednorazowa dawka dobowa preparatu o zmodyfikowanym uwalnianiu umożliwia utrzymanie terapeutycznego stężenia gliklazydu w osoczu przez ponad 24 godziny. Zmienność u poszczególnych osobników jest niska.

Dystrybucja

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

Metabolizm

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

Eliminacja

Biologiczny okres półtrwania gliklazydu wynosi od 12 do 20 godzin.

Piśmiennictwo:

1. Hermann T.W. *Farmakokinetyka. Teoria i praktyka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.

2. Derendorf H., Schäfer H.G., Staab A. (aut). Wyska E. (red). *Farmakokinetyka. Podstawy i znaczenie praktyczne*. MedPharm Polska, Wrocław 2013.
3. Skibińska Ł., Hermann T.W. *Ćwiczenia z farmakokinetyki*. Wydawnictwa Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2003.
4. Charakterystyka produktu leczniczego - gliklazyd