

Materiał teoretyczny do ćwiczenia dostępny jest w oddzielnym dokumencie *Farmakokinetyka – jako dyscyplina wiedzy*, jak również w książce: Hermann T., *Farmakokinetyka. Teoria i praktyka*. Wydawnictwa Lekarskie PZWL, Warszawa 2002, s. 13-74

Ćwiczenie 6:

Wyznaczanie stałej szybkości eliminacji i okresu półtrwania furazydyny w modelu zawierającym sztuczną nerkę jako układ eliminujący lek

Działanie farmakologiczne wielu leków zależy od ich stężenia we krwi i tkankach, a ich ilościową ocenę biodostępności wyraża się za pomocą parametrów farmakokinetycznych. Dostępność biologiczna określa jaką część przyjętej dawki dociera do krążenia ogólnego oraz szybkość z jaką poszczególne procesy wchłaniania i dystrybucji leku zachodzą. Nauka zajmująca się badaniem szybkości oceniających procesy absorpcji (wchłaniania), dystrybucji, biotransformacji i wydalania leków z organizmu nazywana jest farmakokinetką. Jej praktycznym zastosowaniem jest badanie przebiegu zmian stężenia (ilości) leku i jego metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i wydalinach z równoczesnym ustalaniem zależności matematycznych opisujących i tłumaczących znalezione dane analityczne. Ustalenie równań matematycznych ma na celu wyznaczenie odpowiednich parametrów farmakokinetycznych, a w konsekwencji umożliwienie skutecznego i bezpiecznego dawkowania leku.

W farmakokinetyce bardzo często organizm przedstawia się jako układ kompartmentów. Za kompartment przyjmuje się taką część ustroju, w której lek pod względem kinetycznym zachowuje się tak samo – tzn. że jego stężenie i zawartość poszczególnych metabolitach jest w danym obszarze (kompartymencie) taka sama. Kompartymenty możemy zatem opisać jako hipotetyczne założenie, które pozwala nam interpretować otrzymane eksperymentalnie dane przedstawiając je w postaci równań kinetycznych, a następnie obliczyć, po ich rozwiązaniu, parametry farmakokinetyczne. Najprostszym modelem farmakokinetycznym jest model jednokompartamentowy. Model ten zakłada, że lek po dożylnym lub doustnym podaniu z chwilą dostania się do krążenia ogólnoustrojowego ulega natychmiastowej dystrybucji. W modelu tym dopuszcza się zarówno jednorazowe, jak i wielokrotne podania leku.

Stężenie leku we krwi zależy od podanej dawki, objętości krwi i szybkości, z jaką ten lek jest metabolizowany. W najprostszym przypadku (model jednokompartamentowy, jedna dawka) szybkość eliminacji tego leku będzie zachodzić z kinetyką pierwszego rzędu (tzn. jej szybkość zależy tylko od stężenia jednego substratu):

$$dx/dt = k \cdot x \quad (1)$$

gdzie: x – jest ilością leku w ustroju w określonym czasie (t), k – stałą szybkości reakcji (eliminacji). Po scałkowaniu tego równania moglibyśmy zapisać:

$$x = x_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

- gdzie e (liczba Eulera, Nepera) – oznacza podstawę logarytmu naturalnego $\approx 2,718281828459$

Ponieważ określenie ilości leku w organizmie jest kłopotliwe, wprowadzono pojęcie objętości dystrybucji (V_d), czyli współczynnika proporcjonalności pomiędzy ilością leku we krwi, a jego stężeniem (C) w osoczu w tym samym czasie:

$$x = V_d \cdot C \quad (3)$$

Z równania tego wynika, że dzieląc ilość leku (x) przez objętość dystrybucji (V_d) uzyskamy stężenie. Zatem równanie (2) przedstawiające zmianę stężenia substancji w czasie możemy też opisać równaniem:

$$C_{(t)} = C_0 e^{-kt} \quad (4)$$

lub po logarytmowaniu jako: $\ln C_{(t)} = \ln C_0 - kt \quad (5)$

gdzie:

- C_0 - początkowe, zależne od dawki stężenie substancji,
- $C_{(t)}$ – stężenie substancji po czasie t
- k - stała szybkości reakcji.

Liczbowa wartość objętości dystrybucji daje wyobrażenie o rozmieszczeniu leku w organizmie. Jeżeli wynosi ona ok. 1 % masy ciała (ok. 3,5 – 7 l) oznacza to, że lek nie przenika do przestrzeni pozanaczyniowej i jego dystrybucja zachodzi w łożysku naczyniowym. Wartość tego parametru w granicach 15-30 % masy ciała (10-20 l) świadczy o przenikaniu do przestrzeni pozanaczyniowej i rozmieszczeniu w płynach pozakomórkowych, natomiast gdy wartość tego parametru przekracza 40-50 l, to możemy zakładać że lek ulega rozmieszczeniu w całym organizmie (całej wodzie organizmu). Wartości, które przekraczają 100 % masy ciała (nawet kilkaset litrów) sugerują, że dochodzi do kumulacji leku w tkankach i łączeniu się z strukturami wewnątrzkomórkowymi.

Znając stężenie początkowe i stężenie po czasie t możemy wyznaczyć szybkość eliminacji, okres półtrwania leku, klirens i inne parametry farmakokinetyczne. Całkowity klirens leku (CL) wyraża objętość krwi (osocza), jaka w jednostce czasu została „oczyszczona” z tego leku wszystkimi możliwymi sposobami jego eliminacji.

Wychodząc z równania (4) można wyznaczyć stężenie leku, po N kolejnych iniekcjach odbywających się z odstępem czasu T wynosi:

$$C_n = C_0 \left(1 + e^{-kT} + e^{-k(2T)} + e^{-k(3T)} + \dots + e^{-k((N-1)T)} \right) \quad (6)$$

W przypadku infuzji odbywającej się ze stałą szybkością Q zmiana stężenia substancji w układzie dana jest wzorem:

$$C(t) = \frac{Q}{k \cdot V} (1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

gdzie: V - jest objętością płynu w układzie.

Po pewnym (długim) czasie stężenie substancji w układzie ustala się na poziomie nazywanym stężeniem asymptotycznym, równym:

$$C_{\infty} = \frac{Q}{k \cdot V} \quad (8)$$

Wykonanie ćwiczenia:

Aparat nazywany popularnie „sztuczną nerką” ma za zadanie zastąpić funkcję wydalniczą uszkodzonych nerek. Jego rola polega ona na oczyszczaniu krwi z substancji toksycznych za pomocą jej dyfuzji przez błonę półprzepuszczalną. Zasadniczą częścią sztucznej nerki jest wkład dializacyjny (dializator), złożony z cieniutkich rurek wykonanych z octanu celulozy. Przepływająca przez nie krew oczyszcza się dzięki przechodzeniu szkodliwych substancji do otaczającego rurki płynu dializacyjnego. Warunkiem skuteczności tej metody „oczyszczania” jest zdolność przechodzenia substancji trujących lub ich metabolitów przez błonę półprzepuszczalną. Zdolność tę mają substancje drobnocząsteczkowe rozpuszczalne w wodzie i nie związane z białkami.

Korzystając z tego modelu będziemy określali szybkość eliminacji leku z badanego układu (w naszym przypadku organizm człowieka zastąpi zlewka w której rozpuścimy badany lek). Szybkość usuwania leku z układu będzie uzależniona od szybkości przepływu leku przez nerkę (szybkość przepływu regulowana jest przez pompę perystaltyczną). W celu określenia stężenia leku w układzie należy dokonać pomiaru absorpcji światła przez roztwór leku. Na podstawie odczytu z krzywej wzorcowej określamy następnie stężenie leku.

1) Sporządzanie krzywej wzorcowej furazydyny

Furazydyna (dawniej nazywana furaginą) jest substancja czynną leków stosowanych w zakażeniu dróg układu moczowego, która wykazuje działanie przeciwbakteryjne. Zwalcza bakterie Gram-dodatnie (gronkowce, takie jak *Staphylococcus epidermidis*, gronkowiec złocisty, a także paciorkowca kałowego) i wiele szczepów Gram-ujemnych (enterobakterie: *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, pałeczka zapalenia płuc, bakteria *E. coli*). Jest to pochodna nitrofuranu, która charakteryzuje się żółtym lub żółto-pomarańczowym zabarwieniem. Jest usuwana głównie przez nerki (~85 %) i w trakcie ćwiczenia będziemy monitorować jej stężenie za pomocą pomiaru absorpcji światła.

Stężenie furazydyny w poszczególnych próbach można odczytać z krzywej wzorcowej. W tym celu należy przygotować serię 5 roztworów wzorcowych. Z roztworu wzorcowego furazydyny (250 mg/l) należy przygotować próby o stężeniu: 25 mg/l; 50 mg/l; 100 mg/l; 150 mg/l.

Następnie należy dokonać pomiaru absorbancji ($\lambda=415$ nm) poszczególnych roztworów (łącznie z roztworem wyjściowym). Na papierze milimetrowym wykonać wykres zależności absorpcji (A) od stężenia furazydyny (C).

2) Sporządzenie roztworu furaginy

Dwie tabletki furaginy roznieść w moździerzu i rozpuścić w 500-600 ml wody. Otrzymany roztwór przesączyć, tak aby usunąć wszelkie nierozpuszczone pozostałości.

Uwaga: ewentualne zawiesiny w roztworze mogą przyczynić się do uszkodzenia dializatora !

3a) Określanie szybkości eliminacji furaginy z badanego układu:

Do zlewki wlewamy 250 ml przesączonego roztworu furaginy i umieszczamy w niej przewody prowadzące do/z sztucznej nerki. Ustawić ją na mieszkadle magnetycznym – roztwór powinien być mieszany podczas wykonywania ćwiczenia. Włączyć przepływ wody (okręcić kurek wody), tak aby wewnętrzne rurki dializatora były stale omywane wodą. Efektywność procesu oczyszczania zależy od gradientu stężeń – w przypadku braku przepływu wody dojdzie do zwiększenia stężenia leku na zewnątrz rurek dializacyjnych i zahamowania oczyszczania płynu przepływającego przez dializator. *UWAGA: Szybkość przepływu wody nie powinna być zbyt intensywna, aby nie uszkodzić dializatora (skonsultować z osobą prowadzącą ćwiczenia).*

Z badanego układu (zlewki zawierającej lek) pobieramy niewielką próbkę (1-3 ml; kuwetę napełniamy do $\frac{3}{4}$ wysokości) i mierzymy absorbancję przy 415 nm (jako odnośnik stosujemy wodę). Następnie przelewamy zawartość kuwety z powrotem do naczynia i uruchamiamy pompę perystaltyczną. Szybkość przepływu płynu podawanego dializie określa prowadzący ćwiczenia (domyślnie 80 ml/min). Po uruchomieniu pompy wewnątrz dializatora będzie zachodziła eliminacja furazydyny. Oczyszczony roztwór jest kierowany z powrotem do zlewki. W wyniku zmniejszenia stężenia leku spada absorbancja roztworu. Celem obserwacji zmian stężenia w czasie, co 3 minuty pobieramy próbkę i dokonujemy pomiaru absorbancji. Wyniki odnotować w zeszycie w formie tabeli 1 przedstawionej poniżej. Pomiary prowadzimy do czasu, aż absorbancja nie będzie ulegać zmianie (nie będzie się zmniejszać) – nie dłużej niż 30 minut.

Stężenie furazydyny odczytujemy na podstawie krzywej wzorcowej (sprawdzamy jakiej wartości absorbancji odpowiada stężenie furaginy i wynik zapisujemy w tabelce).

Stałą szybkości (k) wyliczamy zgodnie z kinetyką reakcji I-go rzędu:

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{a}{(a-x)} \quad (9)$$

gdzie: a - stężenie początkowe substratu (wartość wyjściowa, t=0),

(a - x) – stężenie substratu, który nie wszedł jeszcze w reakcję (stężenie próby w czasie t)

t – czas, po którym dokonano pomiaru

Tabela 1.

Nr pomiaru	Czas (t) [min]	Absorbancja (A)	stężenie (C)	Stała szybkości [k] [min ⁻¹]
1	0			-*
2	3			
....				
....				
....				
....				
11	30			

Na podstawie wyliczonych wartości stałej eliminacji (k) ustalić wartość średnią (k_{sr}). Wyliczyć okres półtrwania furazydyny w warunkach przeprowadzonego eksperymentu:

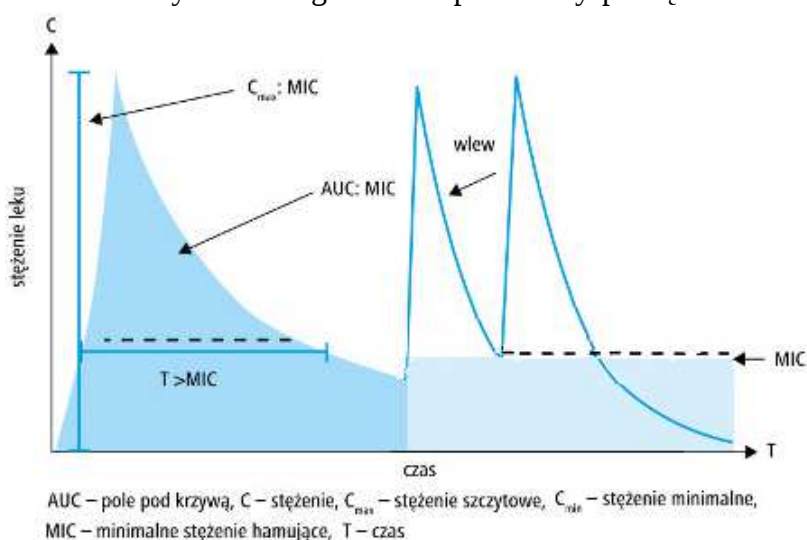
$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0,693}{k}$$

3b) Określanie szybkości eliminacji przy wielokrotnym podaniu (wlewie) oznaczanego leku.

W drugiej części ćwiczenia nasza badana substancja jest dostarczona do układu (wielokrotna iniekcja). Do roztworu, który pozostał w zlewce wprowadzamy ok. 100-150 ml przesączonego roztworu furaginy (przygotowanego na początku ćwiczenia). Zlewkę z furaginą ustawiamy na mieszadle magnetycznym (w trakcie wykonywania ćwiczenia roztwór musi być mieszany). Mierzmy absorbancję uzyskanego roztworu, a następnie uruchamiamy pompę perystaltyczną (prędkość przepływu ustawiamy na 80 ml/min). Co 3 minuty z badanego układu pobieramy próbę i mierzymy jej absorbancję.

Po 5 minutach od uruchomienia pompy do układu dodajemy 50 ml roztworu furaginy. Dodatek (iniekcję) leku powtarzamy co 5 minut (kolejne w 10 i 15 minucie). Notujemy wartości absorbancji na podstawie których sporządzamy wykres zmian absorbancji (stężenia furaginy) w czasie (t): $A = f(t)$.

Finalnie powinniśmy uzyskać zapis podobny jak na rycinie obok.



Ryc. Krzywa przebiegu stężenia względem czasu w przerywanym wlewie leku

* Nie wyliczamy stałej w czasie 0. Nie możemy dzielić przez 0!!! Do obliczeń stałej szybkości wymagane jest stężenie początkowe (a), które ustalamy na podstawie pomiaru przed rozpoczęciem dializy.

Przy pierwszej iniekcji zmiana stężenia leku w czasie jest podana równaniem:

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (10)$$

gdzie c_0 zależy liniowo od dawki lekarstwa. Jeśli kolejne iniekcje odbywają się z takim samym odstępem czasu T , i podstawiając dane do wzoru (6), możemy wyliczyć stężenie lekarstwa tuż po jego 3-cim podaniu, które opisane będzie równaniem:

$$C_n = C_0 (1 + e^{-kt} + e^{-2kt}) \quad (11)$$

gdzie kolejne wyrazy w nawiasie są efektem iniekcji wcześniejszych, niż trzecia iniekcja. Sumując szereg geometryczny kolejnych iniekcji otrzymamy warunek w granicy dużej ilości iniekcji:

$$C_\infty = \frac{C_0}{1 - e^{-kt}} < C_{\max} \quad (12)$$

Natomiast stężenie lekarstwa tuż przed N -tą kolejną iniekcją jest opisane równaniem:

$$C_n = C_0 (e^{-kt} + e^{-2kt} + \dots + e^{-Nkt}) \quad (9)$$

co po zsumowaniu daje warunek:

$$C_N = C_0 e^{-kt} \frac{1 - e^{-Nkt}}{1 - e^{-kt}} > C_{\min} \quad (10)$$

Przy zadanym minimalnym $c_{\min}$ (tj. dającym skutek terapeutyczny) i maksymalnym $c_{\max}$ tolerowanym przez organizm poziomem leku należy tak dobrać wielkość pojedynczej dawki i odstęp pomiędzy iniekcjami, aby stężenie leku w organizmie nie przekraczało poziomu maksymalnego i osiągnęło poziom terapeutyczny po N podaniach.

$$c_{\min} = 7,5 \text{ mg/l},$$

$$c_{\max} = 175 \text{ mg/l},$$

$N = 3$ oraz k (wyliczone w części 3a), proszę wyznaczyć C_N i sprawdzić czy zawiera się one w wyznaczonym przedziale.

$e \approx 2,718281828459$ (wartość e można podstawić w kalkulatorach, jako odwrotność $\ln$)

4) Zadanie dodatkowe: Wyznaczanie parametrów farmakokinetycznych przy użyciu komputera

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z kinetyką rozkładu leku w modelu jednokompartментowym. Uruchomić program Excel i wczytać plik „PK – farmakokinetyka leku.xls” (*domyślna lokalizacja pliku: pulpit*).

W poszczególnych zakładkach istnieje możliwość obserwowania zmian parametrów farmakokinetycznych w zależności od warunków zdefiniowanych przez użytkownika – wartości, które możemy modyfikować znajdują się na **żółtych** polach (np. objętość dystrybucji – V ; podana dawka – D , klirens – CL , okres półtrwania – $t_{1/2}$). Przeanalizować zmiany jakie można zaobserwować w wybranych przez prowadzącego modelach – np. dla trzech różnych leków (A, B, C) dobrać dawki, stałe eliminacji i ustalić czy stężenie leków zawiera się w zakresie terapeutycznym (tj. pomiędzy minimalnym, a maksymalnie tolerowanym). Szczegóły ustalić z prowadzącym ćwiczenia.