wydanie04122015

FARMAKOKINETYKA I BIOFARMACJA

Tomasz Grabowski

www.biokinetica.pl Copyright © Tomasz Grabowski 2000-2015
Wszelkie Prawa Zastrzeżone. All Rights Reserved. ISBN 978-83-925171-0-8

Spis tresci

Historia	6
Farmakokinetyka koncepcje i trendy	7
Metody obliczeniowe w farmakokinetyce	18
Analiza farmakokinetyczna we wczesnej fazie klinicznej	23
Optymalizacja DMPK in silico	53
Strategia planowania badań nad nowymi lekami	63
Specyfika LADME	70
Projektowanie badan farmakokinetycznych	71
Krzywa C-T źródło informacji w klasycznej analizie PK	94
Przygotowanie matrycy biologicznej do analizy PK	104
Przygotowanie matrycy biologicznej do analizy chemicznej	114
Analiza chemiczna matrycy biologicznej w badaniach DMPK	128
Rzędowość procesów farmakokinetycznych	160
Farmakokinetyka procesów nieliniowych	164
Model fluktuacyjny	171
Podstawy teorii kompartmentowej rozmieszczania leków	172
Stałe szybkości w farmakokinetyce	179
Stężenia początkowe, stężenia maksymalne	197
Kwalifikowanie do modelu kompartmentowego	198
Modele fizjologiczne w PK	201
Modelowanie PK/PD	204
Stężenie efektywne czas trwania stężenia efektywnego	217
Transport leków przez błony, dyspozycja leków	226
Białka i systemy transportu	234
Oporność na leki kodowana MDR	236
Wiązanie leków z białkami	239
Pole powierzchni pod krzywą C-T	245
Teoria momentów statystycznych	263
Średni czas przebywania leku w organizmie MRT	265
Średni czas tranzytu leku MTT	275
Dostępność biologiczna BA	279
Dostępność farmaceutyczna	286
Biorównoważność leków BE	293
Objętość dystrybucji	299
Szczególne problemy w zakresie dystrybucji leków	308
Okres półtrwania	367
Czas wymywania leku z organizmu	379
Klirens	382
Efekt pierwszego przejścia, klirens wątrobowy	396
Krążenie wątrobowo jelitowe	406
Wartość dawki leku w farmakokinetyce	417
PK wielokrotnego podania leku	418
PK wlewu	428
Różnice międzygatunkowe w analizie PK	430
Dozymetria i skalowanie allometryczne	432
Diagnostyka kompartmentu centralnego	445
Optymalizacja DMPK	452
Interakcje -rola w farmakokinetyce	458
Farmakokinetyka enancjoselektywna	462

Chronofarmakokinetyka 468
Pozostałości leków w tkankach zwierząt 473
ADI substancji chemicznych w żywności 478
Farmakokinetyka terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych 489
Wytyczne i wymogi w badaniach farmakokinetycznych 495

Nazewnictwo - akronimy 499
Wykaz skrótów 505
Tłumaczenia wybranych terminów na j. niemiecki 510
Wykaz jednostek 511
Ważne organizacje międzynarodowe 512
Piśmiennictwo 513

Skróty klawiaturowe - wersja elektroniczna:

Home	**-** powrót na pierwsza strone
End	**-** przejscie do ostatniej strony
Ctrl + D	**-** informacje o dokumencie
Ctrl + **P**	**-** okno dialogowe kreatora druku
Ctrl + Shift + F	**-** wyszukiwanie wyrazu w tekstach
Ctrl + L	**-** widok pelnoekranowy
Ctrl + +	**-** powiekszenie
Ctrl + -	**-** pomniejszenie
Esc	- wyjscie z widoku pelnoekranowego
Crtl + 1, Ctrl + 2	**-** dopasuj w poziomie / w pionie
Ctrl + **Shift + S**	**-** zapisz kopie
Alt + **F4**	**-** zamknij program i plik
Ctrl + Shift + W	**-** zamknij okno pliku

Keyboard shortcuts - electronic version:

- go to first page
- go to the last page
- document informations
- common print manager
- find word
- full screen
- zoom in
- zoom out
- full screen exit
- actual size , fit width
- save as
- file and program exit
- file window exit

Gdańsk 2015

Wprowadzenie

Zasadniczym i podstawowym celem niniejszej publikacji jest propagowanie wiedzy z zakresu farmakokinetyki. Adresatem książki są pracownicy placówek naukowych oraz przemysłu farmaceutycznego. Książka stanowi zwarte kompendium sygnalizujące wybrane zagadnienia z zakresu farmakokinetyki, biofarmacji i farmakologii klinicznej. Kolejne strony opracowania nie wyczerpują żadnego z omawianych tematów, stąd forma e-book, która pozwala na wprowadzanie uzupełnień i ciągłą aktualizację. Wszelkie sugestie, uwagi i spostrzeżenia na temat prezentowanych materiałów proszę przesyłać na adres autora:

dr hab. Tomasz Grabowski

e-mail: auc@poczta.fm

Serdeczne podziękowania,

... za liczne krytyczne uwagi, wskazówki,
ustne konsultacje, korektę merytoryczną materiału
oraz pomoc w przeredagowaniu książki w roku 2007
kieruję pod adresem

Pana profesora dr. hab. Stanisława Witolda Gumułki
Kierownika Zakładu Farmakodynamiki AM w Warszawie

Historia

Farmakokinetyka jest nauką niezwykle silnie związaną z osiągnięciami innych dziedzin naukowych. Przykładem jest analityka chemiczna która dała początek podstawowym narzędziom analizy w farmakokinetyce. Mówiąc o historii rozwoju farmakokinetyki nie sposób pominąć doniesień o innych odkryciach w naukach pokrewnych które pozwoliły na jej dynamiczny rozwój (Danek A. 1979; Gibaldi M., Perrier D. 1982; Hoffman E. i wsp. 1998).

1863 Cros - toksyczność alkoholi u ssaków zależna jest od ich rozpuszczalności w wodzie
1868 A.C.Brown, T. Fraser - "...aktywność fizjologiczna wynika z budowy chemicznej związku..."
1893 Charles Richet - badania na temat zależności między toksycznością a właściwościami fizjochemicznymi substancji (uretan, eter dietylowy, etanol etc.)
1894 Fischer - koncepcja zamka i klucza w opisie interakcji pomiędzy enzymem a substratem
1900 Meyer, Overton - aktywność biologiczna jest zależna od rozpuszczalności w oleju.
1902 Merkel - poszukiwania metabolitów chininy w moczu psa.
1913 Michaelis , Menten publikacja dotycząca kinetyki procesów enzymatycznych.
1924 Widmark & Tandberg, opublikowali równania ilustrujące model jednokompartmentowy.
1925 Schuller - reakcje koniugacji (np. z kwasem glukuronowym) doprowadzają do spadku lipofilności leków i modyfikują ich eliminację.
1927 Wuth O. - pierwszy opis terapii monitorowane stężeniem leku
1931 Amberson - pierwsze randomizowane badanie kliniczne (gruźlica)
1932 Widmark, alkohol etylowy eliminowany jest z organizmu zgodnie z kinetyką zerowego rzędu
1934 Dominguez, definicja objętości dystrybucji
1937 Torsten, Teorell - pierwsza publikacja z zakresu farmakokinetyki w *International Archives of Pharmacodynamics* pt. "*Kinetics of distribution of substances administered to the body*".
1942 Williams R.T - badania nad metabolizmem i toksycznością TNT
1942 Albert, Bell - wpływ jonizacji leku na aktywność przeciwbakteryjną.
1943 Kelsey, Oldham - badania metabolizmu chininy *in vitro*
1945 Oser, analiza względnej dostępności biologicznej witamin
1945 Boxer & Jelinek, wzory służące do obliczania Cmax i Cmin po wielokrotnym podaniu leku
1948 Cameron - zasada analizy stężenia z zastosowaniem czasu przelotu - TOF (ang.: *Time Of Flight*)
1958 Pierwsze aparaty GC-MS .
1958 Dost F.H. Pierwsza definicja terminu farmakokinetyka w monografii: *Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentrations Ablaufe in der Kriesslaufflussigkeit.*
1960 Garrett, Wiegand, Taylor – podstawy dopasowania danych i symulowania danych farmakokinetycznych z zastosowaniem komputerów analogowych
1961 Wagner Pierwsza definicja terminu *biopharmaceutics* w monografii: *Biopharmaceutics, absorption aspects.*
1964 Hansch, Leo - standaryzacja pomiarów współczynnika rozdziału oktanol woda, podstawy QSAR.
1964 World Medical Association ustanowienie Deklaracji Helsińskiej
1968 Dost F.H. monografia pt.: *Grundlagen der Farmakokinetik.*
1969 Metzler, NONMEM pierwsze wersje programu dostępne na rynku
1970 Hansch, Kubinyi, MacFarland - zależność między rozpuszczalnością i przepuszczalnością a aktywnością leków.
1972 Academy of Pharmaceutical Science, dokument pt.: *Guidelines for biopharmaceutical studies in man*.
1973 Pierwsze wydanie czasopisma *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*
1974 Wagner, opis jednego z pierwszych programów do obliczeń farmakokinetycznych AUTOAN
1976 Wykrycie białka P..-gp
1976 Pierwsze wydanie czasopism *Clinical Pharmacokinetics*, oraz *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*

1977 Badania biorównoważności znajdują odzwierciedlenie w aktach prawnych U.S. FDA.
1977 Baggot D. - pierwszy podręcznik akademicki z zakresu farmakokinetyki weterynaryjnej: "*Principles of drug disposition in domestic animals*".
1980 Yalkowsky - badania krystalograficzne leków. Początki analiz HTS.
1980 Benet L pierwsza definicja immunofarmakokinetyki.
1982 Gibaldi M. Perrier D. - podstawy nowoczesnej analizy matematycznej w klasycznych metodach analizy farmakokinetycznej - "*Pharmacokinetics*".
1984 Stafford, Kelley, Syka, Reinnholds, Todd - konstrukcja pułapki jonowej (ang.: *Ion Trap*) w GC-MS
1986 Mallet, zastosowanie nieparametrycznej metody obliczeniowej NPLM
1988 Fenn - metoda joinizacji przez rozpylanie w polu elektromagnetycznym - ESI (ang.: *Electrospray Ionisation*) stosowana w detekcji MS - MS.
1990 Lindstrom & Bates zastosowanie metody FOCE.
1991 Schumitzky, zastosowanie nieparametrycznej metody obliczeniowej NPEM.
1995 Sformułowanie przez K. Lipińskiego reguły pięciu - "*Rule of Five"*.
1997 Rozwój technik QSAR-4D.
2002 Pierwsze wydanie czasopisma *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*
2016 Pierwsze wydanie czasopisma *International Journal of Pharmacokinetics*

Farmakokinetyka - koncepcje i trendy.

Jednym z podstawowych celów nowoczesnej farmakometrii jest kontrola właściwości leku na każdym etapie jego tworzenia. Począwszy od poszukiwania kandydatów na leki, od projektu, poprzez formulację postaci, zastosowanie u pacjenta aż do zakończenia terapii i kontroli jej skutków. Na kontrolowanie właściwości leku w sposób obiektywny, pozwala złożony opis fizykochemiczny oraz matematyczny zarówno samego leku jak i zmian jakim ulega on na przestrzeni czasu w żywym organizmie (Notari R.E. 1978; Gibaldi M., Perrier D. 1982; Rowland M., Tozer T.N. 1989; Riviere J.E. 1999). Obecnie analiza parametrów farmakokinetycznych i toksykokinetycznych rozwija się w czterech podstawowych środowiskach badawczych: *in silico, in vivo, in vitro, in situ.*

Na opis farmakokinetyczny składa się zbiór wyrażeń matematycznych i/lub statystycznych i/lub fizykochemicznych, charakteryzujących zmiany jakim ulega substancja lub jej pochodne, w zakresie uwzględniającym wszystkie możliwe do zaobserwowania procesy w których uczestniczy na przestrzeni czasu.

Model obliczeniowy w farmakologii jest zwykle złożony i niejednorodny. Obecnie w skład pełnego opisu kinetyki leku w organizmie oraz w ramach badań *in vitro* wchodzą różne techniki farmakometryczne. Wyzwaniem dla specjalistów z zakresu farmakokinetyki nie jest już wykonanie samych obliczeń, lecz interpretacja wielu bardzo różnych możliwych do uzyskania wyników. Obliczając pole powierzchni pod krzywą - AUC oraz pole powierzchni pod krzywą dla pierwszego momentu AUMC trzema metodami, dla wszystkich cząsteczek leku oraz frakcji niezwiązanej z białkami - u, można uzyskać co najmniej 6 wyników, tylko dla jednego parametru - średniego czasu przebywania leku w organizmie - MRT. Parametr ten można także obliczyć w skali komórki, narządu lub całego organizmu.

1)	$AUMC_{(o\text{-}t)} / AUC_{(o\text{-}t)}$	=	$MRT_{b(o\text{-}t)}$
2)	$AUMC_{(o\text{-}t)} / AUC_{(o\text{-}t)u}$	=	$MRT_{b(o\text{-}t)u}$
3)	$AUMC_{(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)} / AUC_{(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)}$	=	$MRT_{b(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)}$
4)	$AUMC_{(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)u} / AUC_{(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)u}$	=	$MRT_{b(o\text{-}t\ +\ pole\ resztkowe)u}$
5)	$AUMC_{(eksponencjały)} / AUC_{(eksponencjały)}$	=	$MRT_{b(eksponencjały)}$
6)	$AUMC_{(eksponencjały)u} / AUC_{(eksponencjały)u}$	=	$MRT_{b(eksponencjały)u}$

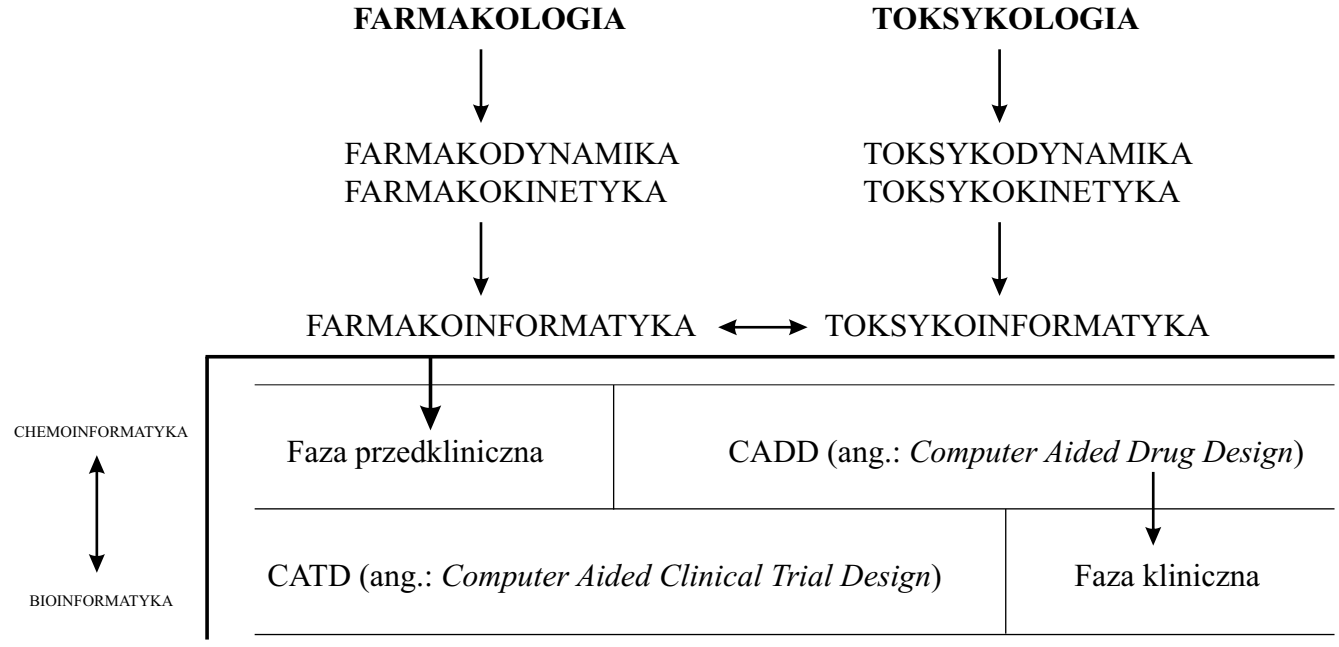
Model obliczeniowy w farmakokinetyce nie jest typowym modelem złożonym jedynie z czysto matematycznych czy statystycznych wyrażeń. Wzbogacony jest dodatkowo wskaźnikami o charakterze chemicznym oraz specyficznymi parametrami fizycznymi leku. Dopiero suma wskaźników o tak różnym rodowodzie może w optymalny sposób charakteryzować zjawiska jakim lek ulega w organizmie. Złożoność opisu wynika w tym wypadku ze specyfiki wielu różnych procesów jakim ulega lek w żywym organizmie. Procesy te opisuje nie tylko farmakokinetyka czy farmakologia lecz cała gama innych dziedzin nauki dysponujących specyficznymi narzędziami analizy matematycznej oraz statystycznej. Narzędzia te w części poświęconej analizom procesów zachodzących w czasie są często "adoptowane" przez farmakometrię. Analiza kompletnego profilu farmakokinetycznego leku *in vivo* obejmuje zwykle kilka typowych kroków. Są to między innymi:

- doświadczenie kliniczne
- analiza chemiczna stężenia leku
- obliczenia parametrów farmakokinetycznych
- wnioskowanie dotyczące losów leku w organizmie

Opis zmian jakim ulegają cząsteczki leku w organizmie jest dopiero punktem wyjścia do wnioskowania na podstawie wytyczonych parametrów. Obecnie zarówno same obliczenia wyjściowych parametrów PK (ang.: *Pharmacokinetics Parameters*) jak i analiza zebranych danych wykonywana jest za pomocą odpowiednich programów komputerowych lub za pomocą sieci neuronowych (Chow H. i wsp. 1997; Engel T.P. 2002).

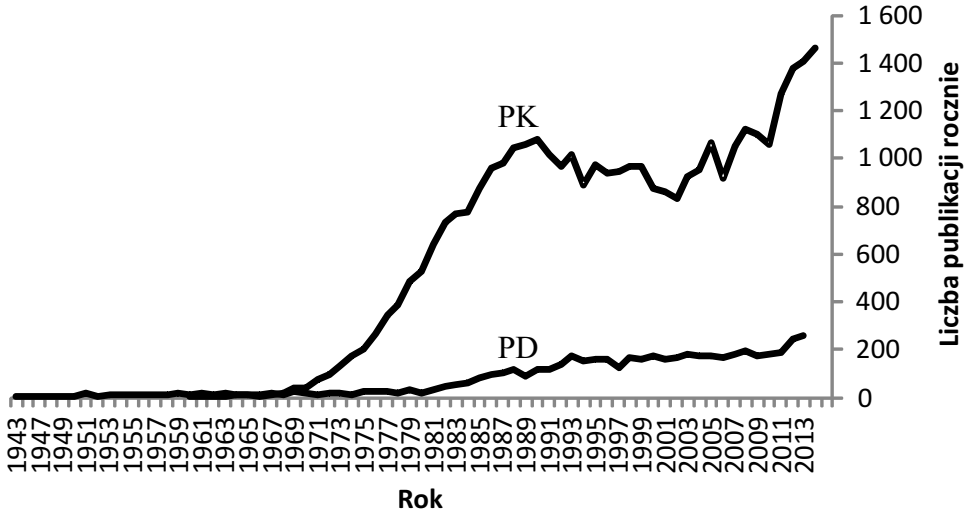
Programy takie umożliwiają skupianie danych w postaci dużych baz danych. Kwalifikowanie substancji (potencjalnych leków) do badań również opiera się na analizie danych zebranych w bazach danych (Clark D.E. 2001). Tradycyjną metodą określania kompletnych profili farmakokinetycznych leków były badania *in vivo*. W chwili obecnej większe znaczenie dla badań farmakokinetycznych we wczesnej fazie przedklinicznej stanowią znacznie tańsze i łatwiejsze do kontrolowania badania *in vitro* oraz metody *in silico*. Ogromne zmiany w technologiach informatycznych stworzyły podstawy dla nowej gałęzi farmakologii - farmakoinformatyki. Techniki obliczeniowe mające u podstaw specyficzne oprogramowanie i bazy danych znajdują stałe zastosowanie w optymalizacji postaci leku w fazie klinicznej i przedklinicznej. Rola specyficznych technik obliczeniowych typu PLOT (ang.: *Preclinical Lead Optimization Technology*) w farmakokinetyce jest obecnie znaczna (Attervill C.K., Wing M.G. 2002; Veselovsky A.V., Ivanov A.S. 2003). Techniki te są systematycznie wzbogacane o liczne metody skalowania nie tylko parametrów PK pomiędzy gatunkami lecz przede wszystkim w odniesieniu do środowiska *in vivo*. Rozwój tego rodzaju obliczeń prowadzi do wykonywania symulacji wartości PK dla warunków *in vivo* na podstawie parametrów uzyskanych w badaniach *in vitro*. Zupełnie nowe podejście do problematyki optymalizacji farmakokinetycznej we wczesnej fazie badań nad nowymi lekami proponują nowoczesne techniki obliczeniowe *in silico* (Lipinski C.A. 2002). W ramach tych technik wyróżnić można zarówno proste narzędzia wstępnej analizy PK typu SAR (ang.: *Structure Activity Relationship*), jak i złożone narzędzia analizy grup farmako i toksykoforowych 4D. Złożona analiza grup funkcyjnych leków obejmuje między innymi techniki badania zależności budowa związku - właściwości QSPR (ang.: *Quantitative Structure-Property Relationship*), zależności budowa związku - aktywność QSAR (ang.: *Quantitative Structure-Activity Relationship*), zależności budowa związku - metabolizm QSMR (ang.: *Quantitative Structure-Metabolism Relationship*), zależności budowa związku - toksyczność QSTR (ang.: *Quantitative Toxicity-Relationship*).

Duży postęp w dziedzinie kwalifikowania substancji do wczesnej fazy badań oraz modelowania wirtualnego PK przyszłych leków zagwarantowały badania Lipińskiego i opisanie tak zwanej reguły pięciu (Lipinski C.A. i wsp 1996; Lipinski C.A. 2000; Opera T.I. 2002).

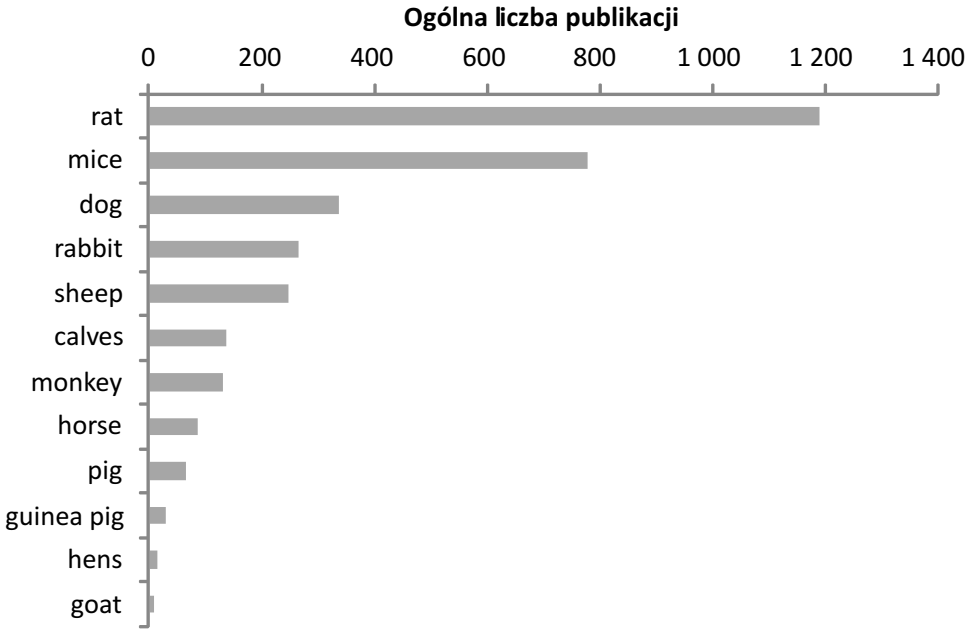


Rys. Miejsce informatyki w metodach farmako i toksykometrycznych.

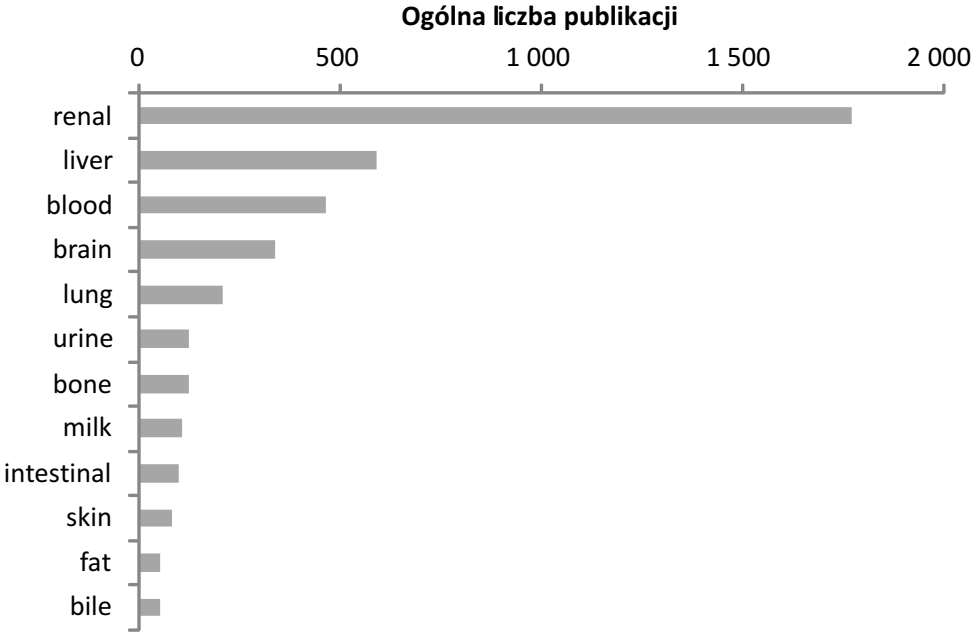
Rozwój metod komputerowego wspomagania projektowania leków - CADD (ang.: *Computer Aided Drug Design*) wyłonił wiele nowoczesnych metod które stosuje się w wirtualnych modelach farmakokinetycznych. Rozwinięciem tego typu analizy jest projektowanie leków związane z celową modyfikacją cząsteczki - SBDD (ang.: *Structure Based Drug Design*). Konsekwencją wyodrębnienia rozwiązań typowych dla farmakoinformatyki jest również stosowanie komputerowego wspomagania projektowania badań klinicznych CATD (ang.: *Computer Aided Clinical Trial Design*), (Schoenwald R.D. 2002). Wspomagane przez najnowocześniejsze narzędzia analityczne i obliczeniowe typu SAR by NMR (ang.: *Structure Activity Relationships by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*), (Kubinyi H. 1998). Techniki szybkiej analizy parametrów fizjochemicznych - HTS (ang.: *High Troughput Screening*) znacznie ułatwiają i przyśpieszają projektowanie nowych leków oraz modyfikację już obecnych na rynku. Farmakokinetyka jako zestaw metod obliczeniowych w dyspozycji przemysłu farmaceutycznego stanowi silną i szeroka dziedzinę. Pozwala na pełną kontrolowaną optymalizację postaci leku. Obecnie dzięki licznie prezentowanym narzędziom programistycznym wykształca się w technikach obliczeniowych PK specyficzna dla tej dziedziny forma komunikacji. Pozwala ona na jednoczesne łączenie wielopłaszczyznowych wyników badań i różnorakich wniosków. Przedstawianie ich w postaci określonych parametrów skutkuje powstawaniem odpowiednich procedur rozwoju projektu leku. Trzy główne gałęzie technik obliczeniowych (*in silico*, *in vitro*, *in vivo*) pozwalają zgromadzić ogromną liczbę wyników badań w odniesieniu do jednej cząsteczki leku i potwierdzać lub wykluczać stawiane tezy. Integralną częścią badań farmakokinetycznych jest rozwój metod analitycznych wśród których największe znaczenie mają metody chromatograficzne oraz NMR. Na uzyskanie największej liczby danych potrzebnych do wytyczenia profilu zmian stężeń leku w organizmie w czasie (C-T) oraz jego metabolitów pozwalają metody HPLC-MS^n. Dowodem na ogromny rozwój farmakometrii jest wciąż rosnąca liczba publikacji dotyczących farmakokinetyki oraz związanych z nią dziedzin.



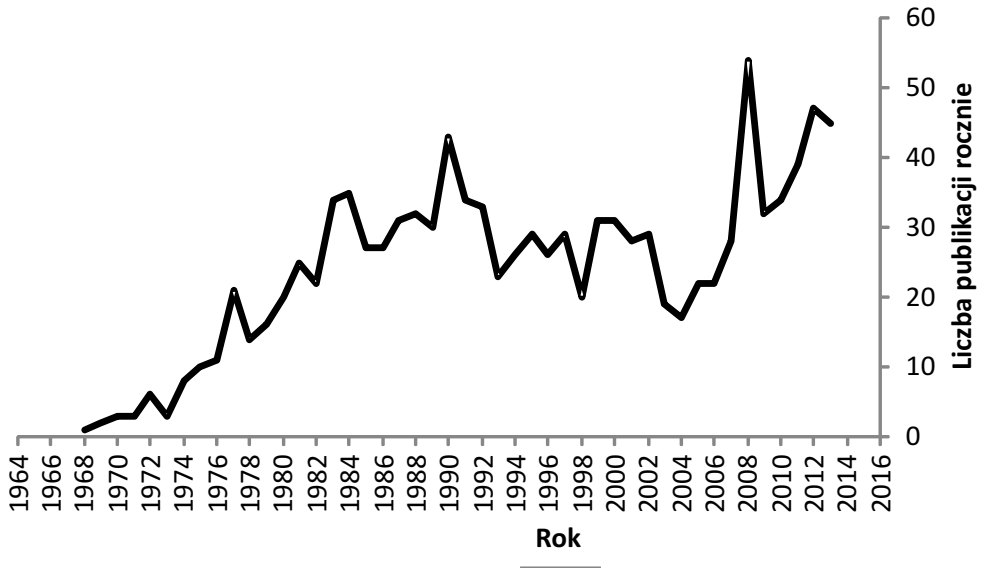
Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe “pharmacokinetics” lub “pharmacodynamics” w tytule publikacji (źródło: NCBI).



Rys. Ogólna liczba publikacji naukowych zawierających słowo kluczowe “pharmacokinetics” AND - (gatunek zwierzęcia na wykresie powyżej) w tytule publikacji do roku 2015 (źródło: NCBI).



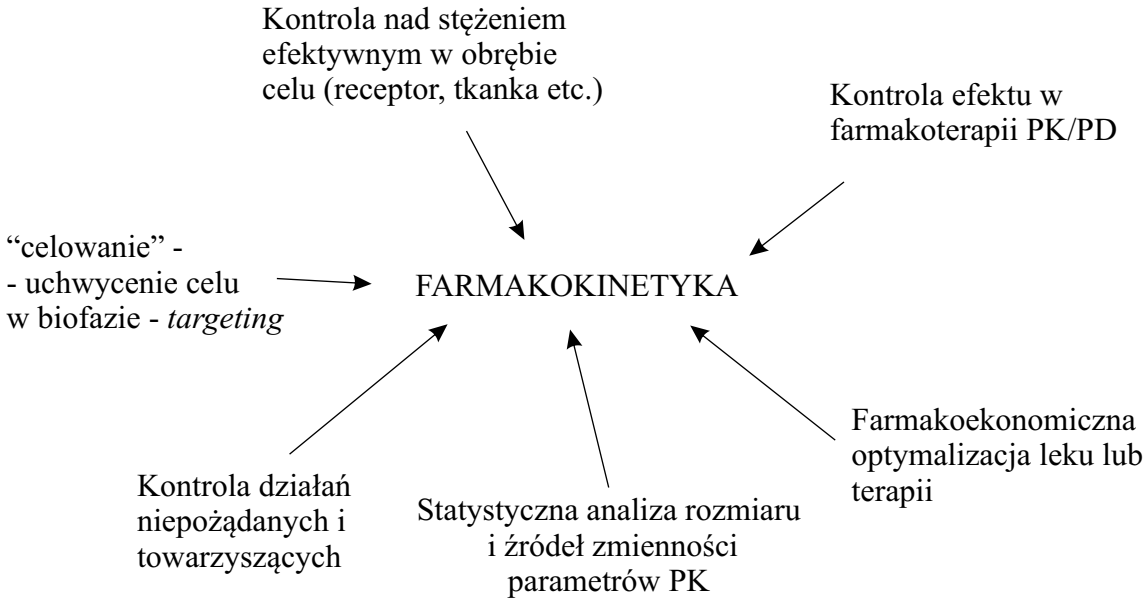
Rys. Ogólna liczba publikacji naukowych zawierających słowo kluczowe “pharmacokinetics” AND - (tkanka, organ, wydzielina etc.) w tytule publikacji do roku 2015 (źródło: NCBI).



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe “pharmacokinetics” AND “rat” w tytule publikacji (źródło: NCBI).

Szczególne znaczenie i w tym wypadku mają możliwości obliczeniowe programów za pomocą których dokonywana jest integracja uzyskanych chromatogramów, przygotowanie krzywych kalibracyjnych itp.. Profesjonalne oprogramowanie pozwala także na tworzenie baz danych do badanych matryc. Aby informacja uzyskana na podstawie metody analitycznej była wiarygodna, optymalizacja metody podlega licznym obostrzeniom. Jednocześnie wymogi takie na całym świecie precyzowane są przez organizacje funkcjonujące w strukturach państwowych (FDA) lub strukturach działających w ramach wspólnot (EMA). Niezwykle ważne w kwestii uregulowań prawnych dotyczących badań farmakokinetycznych są organizacje pozarządowe (ICH) oraz sam przemysł farmaceutyczny.

Obecnie farmakokinetyka jest kluczowym narzędziem optymalizacji postaci leku, zwiększenia efektywności farmakoterapii i zmniejszenia zagrożeń związanych ze stosowaniem leków.



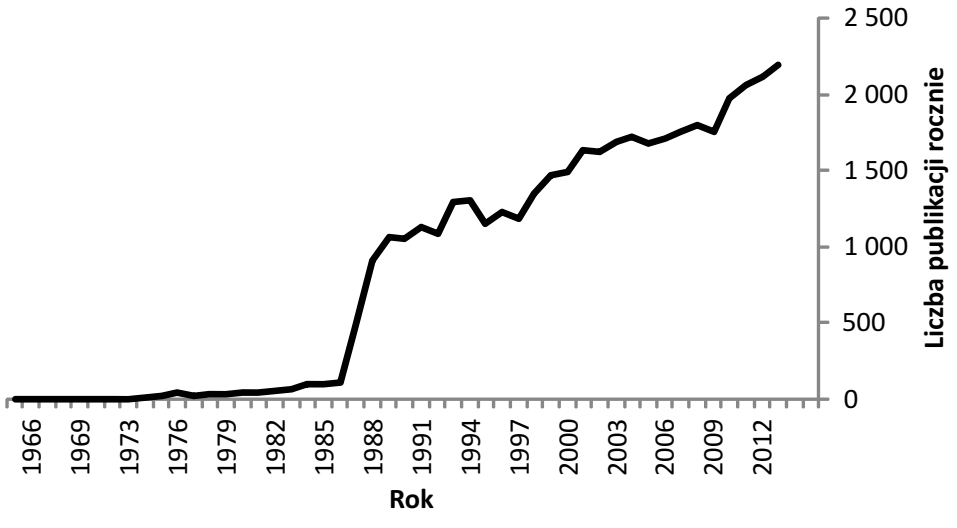
Ryc. Farmakokinetyka wśród innych kierunków w farmakologii i farmakometrii.

Farmakokinetyka jest dziedziną opisującą zjawisko rozmieszczania cząsteczek leku w czasie dzieląc zespół towarzyszących zjawisk na kilka etapów określanych często akronimem LADME (ang.: *Liberation, Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination*). Granice pomiędzy tymi procesami są płynne ponieważ nie znajdują one odniesienia do realnych interwałów czasowych i nie następują jeden po drugim w ściśle określonej kolejności. Wszystkie wymienione w ramach LADME procesy to procesy w mniejszym lub większym stopniu równoczesne. Oznacza to że nakładają się na siebie w różnym stopniu i zakresie. W pewnym sensie interferują ze sobą często wikłając obraz dyspozycji leku. Farmakokinetyka leków jest niejednokrotnie zespołem bardzo zawiłych procesów wielokrotnie przeplatających się ze sobą. Optymalizacja i ocena farmakokinetyki leków *de novo* pozwala na uzupełnienie informacji o farmakokinetyce leków znanych od dawna dzięki zupełnie nowym metodom analizy w chemii analitycznej i analityce e-ADME *in silico*. Taki stan rzeczy powoduje, że farmakokinetyka jest dziedziną niezwykle dynamiczną i pełną zmian. Jest to związane z tym, że wyniki analizy farmakokinetycznej są ściśle zależne od wdrażania coraz nowszych rozwiązań metodycznych w fazie doświadczalnej i technicznych w sferze analizy chemicznej i analizy danych.

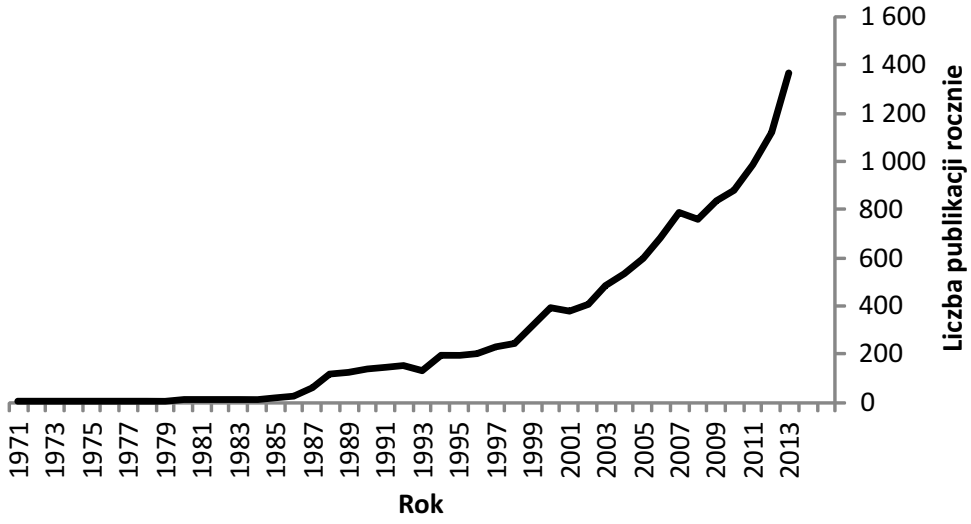
Perspektywy rozwoju analizy farmakokinetycznej leku.

Obecnie wzrost ilości badań z zakresu farmakokinetyki oraz farmakodynamiki można uznać za znaczny. W przypadku badań farmakokinetycznych od roku 1980 notuje się ciągły wzrost ilości publikacji z tego zakresu, indeksowanych w bazach danych (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Jedynie w latach 1989-1997 dało się zauważyć pewne zahamowanie ilości publikowanych prac. Trudno jednak mówić o jakichkolwiek wyraźnych tendencjach spadkowych. Zarówno w przypadku opisów badań przeprowadzanych na zwierzętach jak i na ludziach, liczba zamieszczanych publikacji w czasie ostatnich 20 lat stale wzrastała. Mimo dynamicznego rozwoju technik *in silico* oraz technik *in vitro* tendencje wzrostowe w przypadku klasycznych badań farmakokinetycznych zostały nadal zachowane. Od roku 1980 liczba publikacji z zakresu farmakokinetyki dotycząca badań nad zwierzętami wzrosła około trzykrotnie natomiast analogiczne badania odnoszące się do ludzi charakteryzuje około pięciokrotny wzrost publikacji indeksowanych w skali roku. W przypadku publikacji indeksowanych w bazach danych zawierających słowo kluczowe "pharmacodynamics", dynamika wzrostu liczby opisywanych badań jest zupełnie różna w przypadku badań u zwierząt i ludzi. Podobnie jak w przypadku doniesień z zakresu farmakokinetyki daje się zauważyć wyraźny przestój na początku lat dziewięćdziesiątych. W przypadku badań dotyczących leków przeznaczonych dla człowieka jest to tylko chwilowy spadek ilości publikacji. Wzrost ilości badań relacjonowany w grupie publikacji opisujących badania na zwierzętach był znacznie wolniejszy i wyraźnie zaznacza się dopiero w ostatnich latach.

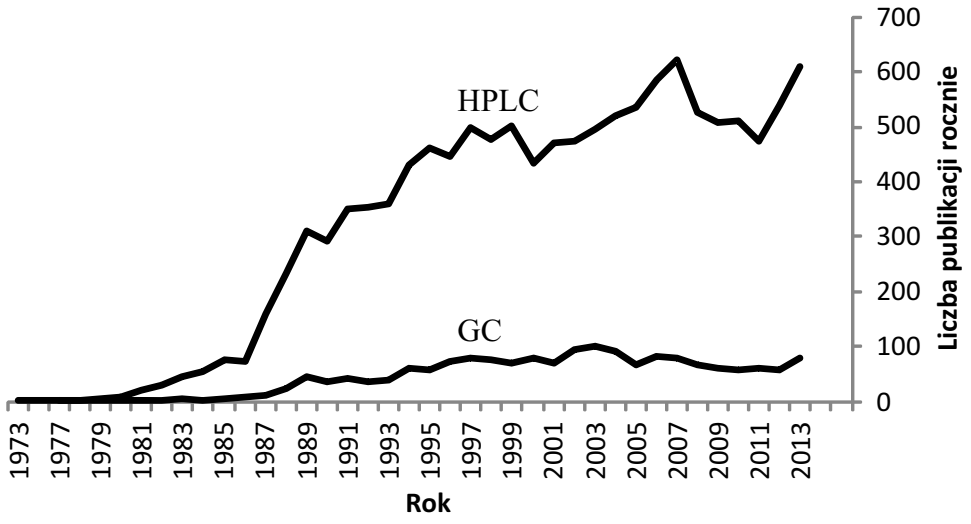
Bardzo wysoki wzrost liczby publikowanych badań w zakresie farmakokinetyki *in vitro* nastąpił na przełomie lat 80-90 tych. Wskazuje to wzrost roli badań *in vitro* w farmakokinetyce i ciągłe doskonalenie warsztatu badawczego PK *in vitro* w ośrodkach rozwojowych na całym świecie. Wzrost liczby badań farmakokinetycznych *in vitro* po 2000 roku nie jest tak dynamiczny jak w latach 1989-1992 jednak liczba publikacji sukcesywnie rośnie.



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe "pharmacokinetics"AND "*in vitro*" (źródło: NCBI).



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe "mass spectrometry"AND"pharmacokinetics" (źródło: NCBI).



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe "HPLC"AND"pharmacokinetics",oraz "GC"AND"pharmacokinetics" (źródło: NCBI).

Analiza danych dotyczących rozwoju badań farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych ilustruje znaczny wzrost dynamiki badań farmakometrycznych. Na tej podstawie można prognozować, dalszy rozwój technik obliczeniowych w farmakokinetyce i biofarmacji.

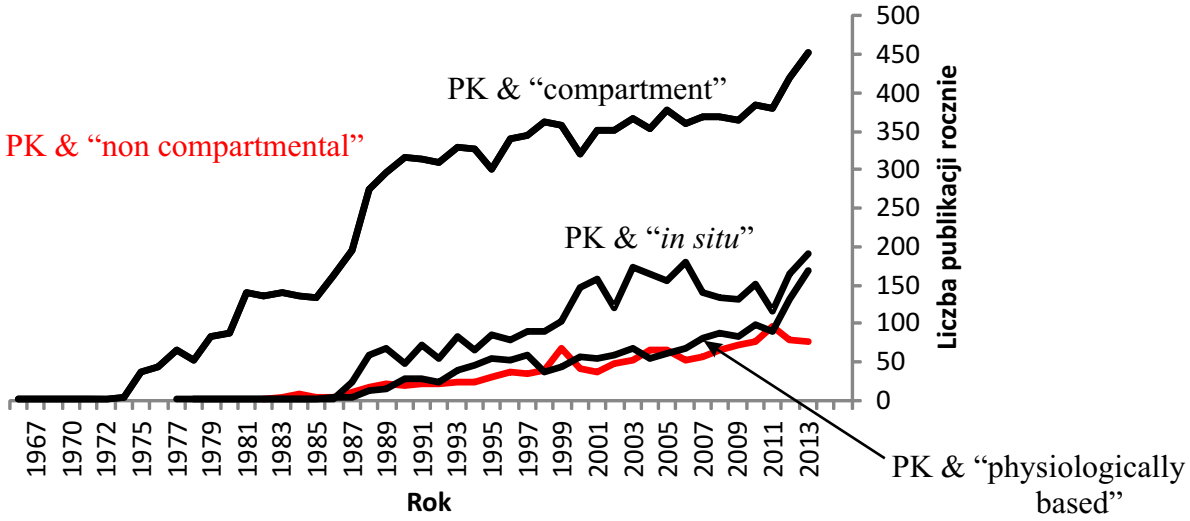
Dość wyraźnie zaznacza się także postęp w analityce chemicznej matryc biologicznych. Postęp ten w przypadku zastosowania detekcji typu MS w badaniach farmakokinetycznych jest znaczny. Trwa nieprzerwanie od początku lat osiemdziesiątych. Wzrost ilustruje ciągle rosnąca liczba publikacji z tego zakresu indeksowanych przez PUBMED.

Od początku lat 90 tych w farmakokinetyce na stałe zagościło modelowanie procesów farmakokinetycznych na podstawie znajomości parametrów fizjochemicznych, elektrostatycznych czy topologicznych cząsteczki. Także tutaj notuje się coraz większą liczbę prezentowanych prac. Ilość publikacji dotyczących zastosowania nowych metod analitycznych czy obliczeniowych w farmakokinetyce nie jest imponująca. Jednak obecny wzrost w stosunku do stanu z końca lat 80 tych jest ogromny. Na przedstawionych wyżej wykresach również zauważalny jest znaczny wzrost liczby publikacji który nastąpił z końcem lat 90 tych.

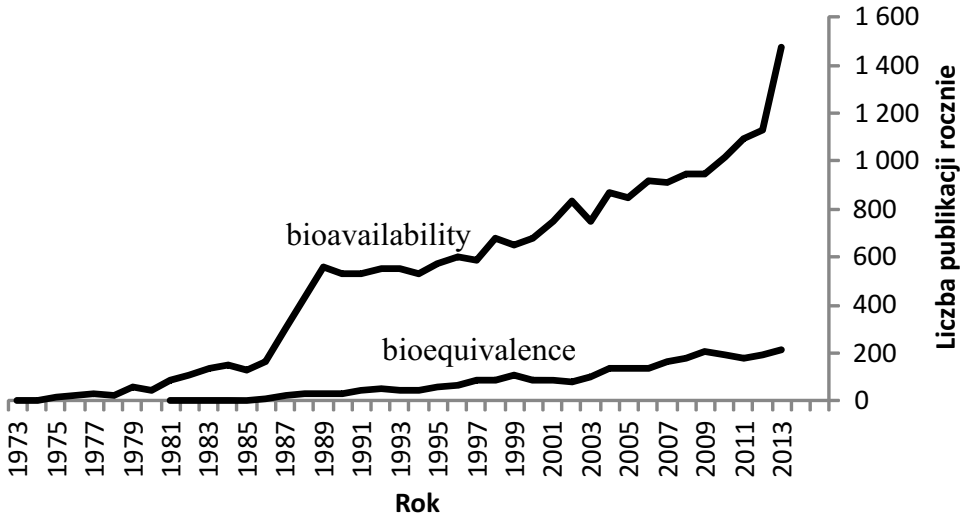
Na przestrzeni ostatnich lat wyraźnie zaznacza się trend wzrostowy liczby publikacji z zakresu farmakokinetyki PBPK lub metod *in situ*. Sukcesywnie spada lub co najmniej zajmuje ostatnie miejsca farmakokinetyka zgodna z modelowaniem kompartmentowym. Coraz więcej zyskują specyficzne, precyzyjne metody modelowania i prowadzenia badań farmakokinetycznych. Coraz większe jeśli nie największe znaczenie w tym zakresie mają ośrodki badawczo rozwojowe związane z przemysłem farmaceutycznym.

Trudny do śledzenia jest wzrost ilości publikacji poprzedzających premiery zupełnie nowych substancji leczniczych. Związane jest to z konkurencyjnością nowych produktów ochroną patentową etc. Jednak w badaniach farmakokinetycznych pewnym odwzorowaniem postępu jaki obecny jest w tym zakresie są badania biodostępności. Tutaj także notuje się znaczny wzrost ilości indeksowanych publikacji. Jednocześnie należy zauważyć że wzrost ten utrzymuje się na znacznym poziomie od lat.

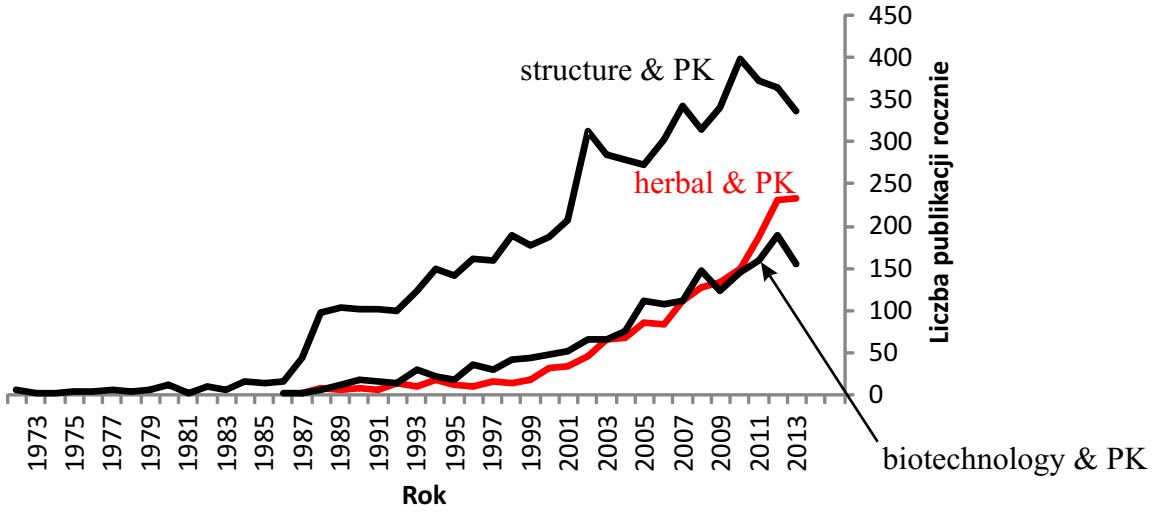
Przełomowym dla farmakokinetyki i dziedzin nauki pokrewnych farmakokinetyce okazał się początek lat dziewięćdziesiątych. Koniec XX stulecia dzięki nowym odkryciom oddaje w ręce badaczy zupełnie nowe narzędzia służące rozwojowi tej dziedziny. Rozwój ten zachodzi obecnie w bardzo wielu środowiskach (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*) i w różnej skali (pojedynczej komórki, organu, organizmu). Największe przyśpieszenie prac z zakresu farmakokinetyki ostatnich lat dał rozwój informatyki oraz analityki.



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe "pharmacokinetics"AND"*in situ*", "pharmacokinetics"AND "physiologicaly based", "pharmacokinetics"AND "compartment", "pharmacokinetics"AND "non compartmental" (źródło: NCBI).



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe
“bioavailability”AND “pharmacokinetics”,
“bioequivalence”AND “pharmacokinetics” (źródło: NCBI).



Rys. Liczba publikacji naukowych (rocznie) zawierających słowo kluczowe
“structure activity relationship”AND “pharmacokinetics”,
“herbal”AND “pharmacokinetics”,
“biotechnology”AND “pharmacokinetics” (źródło: NCBI).

Obecne kierunki rozwoju farmakokinetyki jako samodzielnej nauki obejmują przede wszystkim:

1. Wykorzystywanie i poszukiwanie szybkich selektywnych i specyficznych metod analitycznych służących analizie ilościowej i jakościowej (HPLC; UPLC).

2. Eksplorację możliwości nowych łatwych w projektowaniu środowisk badawczych (*in vitro*; *in silico*).

3. Wzrost wymagań jakościowych dla badań DMPK (GMP/GCP/GLP).

4. Tworzenie złożonych systemów analizy - modele hybrydowe.

5. Automatyzacja badań zarówno po stronie próbkowania jak i analiz chemicznych.

6. Wykorzystywanie oprogramowania dedykowanego do planowania badań i analizy danych.

7. Rozszerzenia liczby danych wykorzystywanych w analizie matematycznej i wnioskowaniu.

8. Obniżanie kosztów badań.

Metody obliczeniowe w farmakokinetyce.

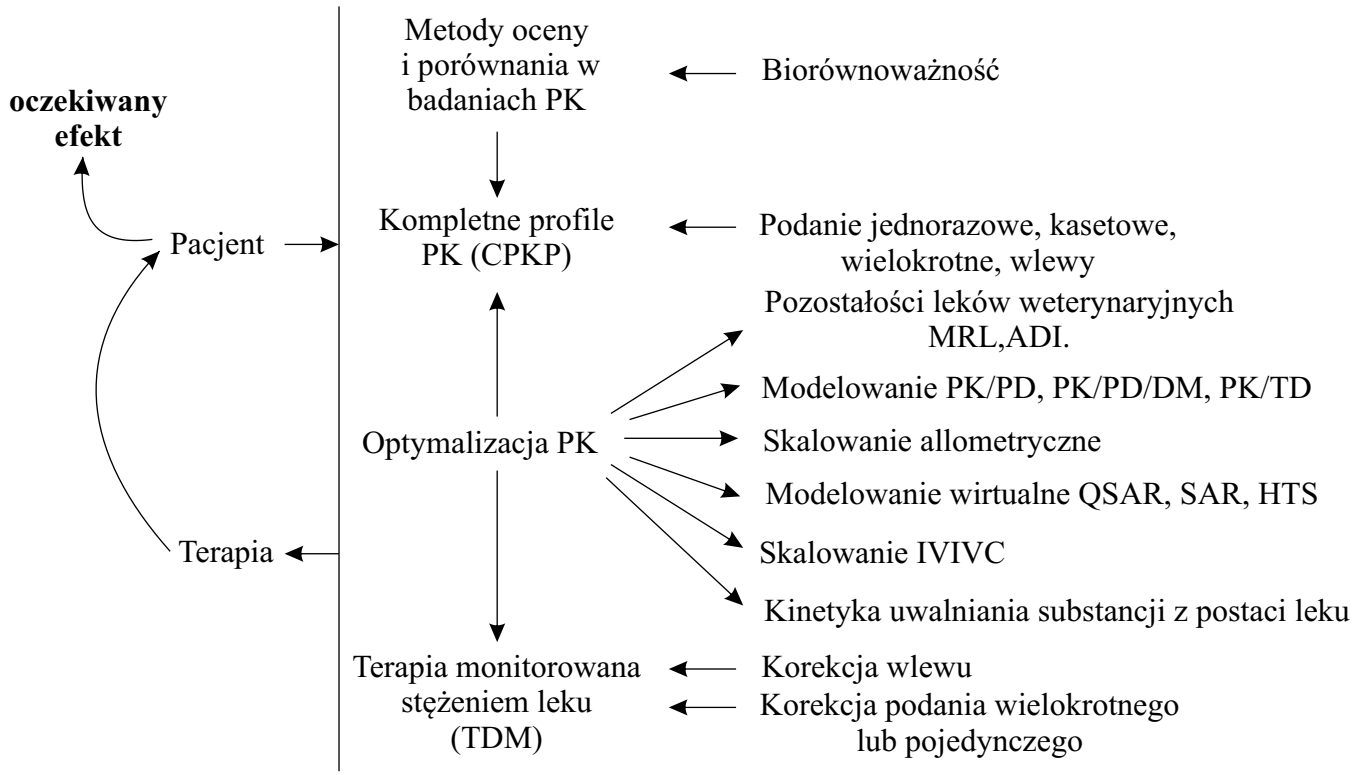
Obecnie w badaniach farmakokinetycznych najczęściej wykorzystuje się kilka podstawowych metod obliczeniowych. Metody te zwykle związane są z określonym podejściem i koncepcją modelu doświadczalnego. Sposoby modelowania badań farmakokinetycznych w trakcie projektowania leków w ostatnich latach wzbogacone zostały o liczne techniki wirtualne. Typowe modele obliczeniowe wykorzystywane w chwili dotyczą trzech podstawowych płaszczyzn metodologicznych *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo*: W ramach tych środowisk stosuje się liczne modele obliczeniowe:

- Modele oparte na teorii kompartmentowej: (fenomenologiczne)
  - jednokompartmentowe
  - wielokompartmentowe
- Modele oparte na teorii momentów statystycznych (SHAM): (statystyczne)
- Modele fizjologiczne (PBPK) (mechanistyczne)
- Modele obliczeniowe e - ADME prowadzone w ramach CADD: (wirtualne)
  - korelacyjne
  - oparte na zasadach (np.. R-of-5)
  - wykorzystujące sieci neuronowe
- Modelowanie mieszane: (hybrydowe)
  a) W obrębie dziedziny
     modele populacyjne
     statystyczne / kompartmentowe
     fizjologiczne / kompartmentowe
     fizjologiczne / statystyczne
     fizjochemiczne / kompartmentowe
     fizjochemiczne / fizjologiczne
  b) Pomiędzy dziedzinami naukowymi
     PK/PD
  c) W ramach różnych środowisk obliczeniowych
     Permeability(in silico) / F(in vivo)

Każdy z wymienionych modeli może być poddany skalowaniu, może ono dotyczyć wykrycia korelacji pomiędzy:

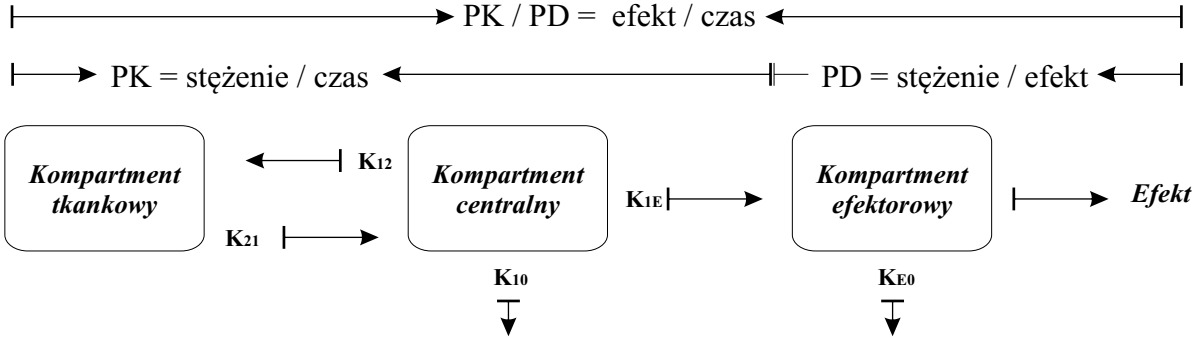
- Warunkami *in vitro in vivo*.
- Pomiędzy gatunkami lub rasami (skalowanie allometryczne)
- W obrębie gatunku (skalowanie między PK a masą ciała, powierzchnią ciała etc.)
- Patologią i fizjologiczną pracą tkanki organu lub organizmu

Parametry farmakokinetyczne w układach doświadczalnych, złożonych z etapów: podanie leku / analiza stężenia lub określenie masy leku w tkance / analiza danych, najczęściej uzyskiwane są w drodze obliczeń zależnych lub niezależnych od modelu matematycznego. W typowych badaniach naukowych przyjęty model zwykle jest bardzo precyzyjnym narzędziem oceny. W ocenie leku modelowanie procesów farmakokinetycznych nie zawsze jest jednak preferowane. Problem ten najlepiej ilustruje zdanie G.E.P. Box'a "Wszystkie modele są złe, ale niektóre z nich są użyteczne "(Motulsky H., Christopoulos A. 2003). Jednym z bardziej znanych jest model oparty na teorii kompartmentowej rozmieszczania leków w organizmie. Zakłada ona istnienie takich przestrzeni w organizmie żywym w których lek występuje w takim samym stężeniu w określonym przedziale czasu. Lek może przemieszczać się pomiędzy tymi kompartmentami - przestrzeniami kinetycznymi z różnymi szybkościami. Obliczenia jakie wykonać można w oparciu o teorię kompartmentową rozmieszczania leków w organizmie pozwalają między innymi poznać stężenie maksymalne leku, pozorną objętość dystrybucji, pole powierzchni pod uzyskaną krzywą stężeń oraz inne parametry farmakokinetyczne. Te z kolei pozwalają określić dawkowanie leku lub wprowadzić korekcję dawkowania (Farrier D.S. 2000). Modele jedno, lub wielokompartmentowe pozwalają na precyzyjną analizę parametrów farmakokinetycznych w oparciu o matematyczną charakterystykę wszystkich fragmentów krzywej zależności stężenie - czas (C-T) leku we krwi.



Rys. Kierunki obliczeń farmakokinetycznych oraz ich powiązania z innymi metodami farmakometrycznymi.

Parametry uzyskane tą drogą mogą zaś opisać przebieg poszczególnych faz kinetycznych jakim lek ulega w ustroju. Jest to więc model w którym w sposób wybiórczy i precyzyjny śledzić można tok przemian farmakokinetycznych zaczynając od absorpcji poprzez dystrybucję, na eliminacji leku kończąc, w skali całego organizmu. Dane do wykonania obliczeń farmakokinetycznych w tak skonstruowanych modelach pobierane są bezpośrednio z krzywej stężeń bądź po uprzedniej ekstrapolacji danych. W tej fazie pochopne, losowe wybieranie danych do obliczeń może przyczynić się do uzyskania wyników nieprawidłowych lub obarczonych dużym błędem. W chwili obecnej programy komputerowe umożliwiające symulacyjny tryb przeprowadzania takich obliczeń (prognozowania wielu kombinacji) pozwalają uniknąć błędów i wnikliwie zbadać każdy przypadek. Modele fizjologiczne stanowią cenne narzędzie pozwalające ukierunkować prowadzone badania farmakokinetyczne w stosunku do wybranych narządów lub tkanek. Jednak często metody PBPK posiłkują się parametrami typowymi dla metod kompartmentowych. Pozwala to uniknąć błędów w trakcie żmudnych i wieloetapowych obliczeń (Farrier D.S. 2000).

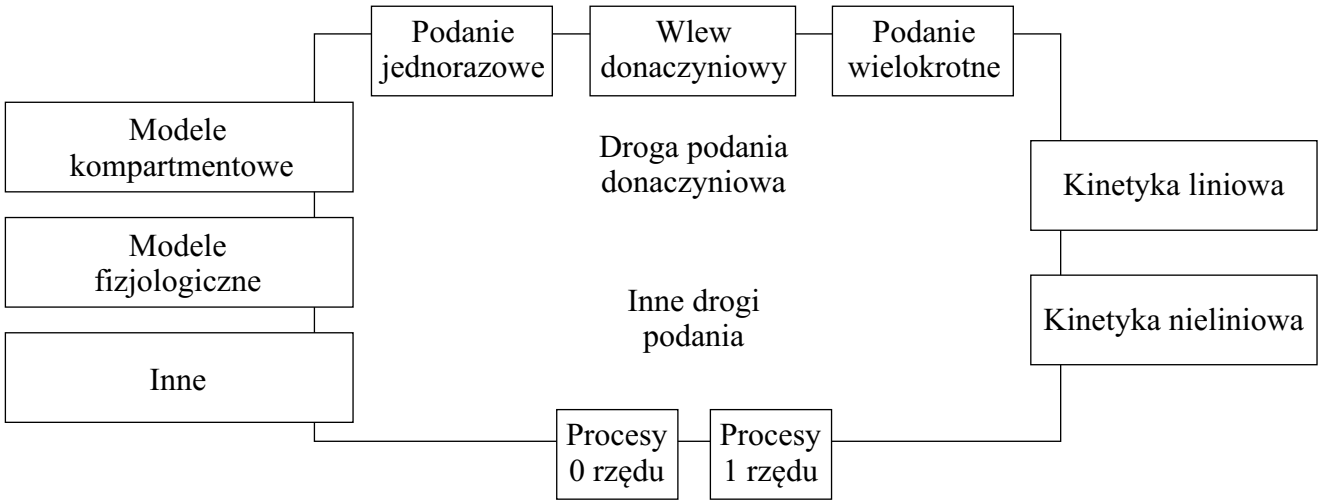


Rys. Obliczenia farmakokinetyczne jako punkt wyjścia do analizy farmakokinetycznej - PK, farmakodynamicznej - PD oraz modelowania PK/PD .

Obliczenia wykonane niezależnie od modelu kompartmentowego - NCA (ang.: *Non Compartmental Analysis*) pozwalają na uzyskanie precyzyjnych wyników jednak nie zawsze tak wnikliwie charakteryzują badaną substancję jak klasyczne obliczenia modelowe. Przykładem tego rodzaju modelowania są metody oparte na teorii momentów statystycznych (ang.: *Statistical Moments Theory*). Obliczenia prowadzone jednocześnie przy użyciu modelu kompartmentowego oraz innych rodzajów modelowania pozwalają na przeprowadzenie wstępnej analizy danych, dopasowania modelu oraz analizy precyzji i dokładności wyników prowadzonych obliczeń.

Modele populacyjne służą najczęściej znalezieniu wspólnego mianownika pomiędzy wynikami badań na wąskiej grupie a populacją docelową dla leku. Można je przyrównać do metody skalowania danych posługującej się metodami klasycznej statystyki. Zupełnie inne zastosowanie mają modle wirtualne które korzystają z efektów poprzednich metod w celu opisywania ewentualnych korelacji pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi a fizykochemicznymi cechami leku.

Farmakokinetyka nie jest dziedziną która odpowiada na wszystkie pytania dotyczące charakteru efektu terapeutycznego po podaniu leku. Dziedziną która w znacznym stopniu dopełnia i uzupełnia obliczenia farmakokinetyczne o kolejne zależności i wnioski jest farmakodynamika. Powiązaniem farmakokinetyki (PK) i farmakodynamiki (PD) jest złożony sposób modelowania właściwości leków typu PK/PD. Analiza PK / PD towarzyszy wszystkim etapom badań nad lekiem od wczesnej fazy badań przedklinicznych do badań postmarketingowych fazy czwartej (Meibohm B., Derendorf H. 2002).Wzajemne porównywanie uzyskanych wyników w modelach mieszanych pozwala unikać błędów a jednocześnie wychwytywać procesy kinetyczne wyrażone niewielkimi wartościami arytmetycznymi w badanym ciągu danych stężenie / czas. Wszystkie obliczenia farmakokinetyczne niezależnie od przyjętego modelu obliczeniowego zmierzają do powiązania wartości stężeń leku w przestrzeniach organizmu z efektem terapeutycznym.



Rys. Czynniki decydujące o przebiegu analizy DMPK.

Klasyczne obliczenia farmakokinetyczne zwykle poprzedza analiza stężenia leku we krwi rzadziej w badanej tkance lub wydzielinie. W układach *in vitro* zastosowania te poszerzone są o prace nad oceną postaci leku w ujęciu farmaceutycznym. Obliczenia te często znajdują zastosowanie w wielu kierunkach działań z zakresu biofarmacji, terapii, w medycynie i weterynarii. Stanowią cześć działań dotyczących skuteczności, bezpieczeństwa stosowania leków u zwierząt czy badania pozostałości leków w tkankach zwierząt przeznaczonych do spożycia przez człowieka. Wreszcie, kładą podwaliny pod nowoczesną toksykokinetykę ksenobiotyków. Typowe modele obliczeniowe oparte o klasyczną analizę stężenia leku rozmieszczonego w kompartmentach zależne są od wielu jednoczesnych i często nakładających się na siebie procesów, drogi podania oraz wielu innych czynników.

Łatwo zauważyć że samo sklasyfikowanie obliczeń wykonywanych przy wstępnej ocenie rzędowości liniowości oraz sposobu rozmieszczenia leku może znacznie komplikować przebieg symulacji bądź właściwych obliczeń farmakokinetycznych. Stosowane obecnie modele obliczeniowe stają się coraz bardziej niejednorodne, wykorzystując różne metody matematyczne w celu doprowadzenia do konkretnych wniosków. Obecnie obliczenia farmakokinetyczne w fazie badań przedklinicznych w przemyśle farmaceutycznym to wielotorowe wieloetapowe projektowanie leku wykorzystujące wszelkie dostępne narzędzia obliczeniowe. Podstawowe obliczenia parametrów farmakokinetycznych dotyczą zwykle kilku zasadniczych parametrów. Mają na celu określenie pola powierzchni pod uzyskanymi krzywymi (AUC) zależności stężenie - czas. Dokładną wartość pola opisuje równanie uwzględniające również pole resztkowe:

$$\mathbf{AUC_{(o\text{-}inf)} = AUC_{(o\text{-}t)} + AUC_{(t\text{-}inf)}}$$

Inną typową wartością dla analizy PK jest objętość organizmu jaką zajmują cząsteczki leku - objętość dystrybucji. Obliczenia objętości dystrybucji obejmują wybrane lub wszystkie przestrzenie organizmu:

$$\mathbf{Vd = Vd_{(ECF)} + Vd_{(ICF)}}$$

Lek w organizmie ulega ekstrakcji na różnych etapach dystrybucji. Organem który prezentuje w stosunku do większości leków duży współczynnik ekstrakcji jest wątroba. Podobnie współczynnik ekstrakcji obliczyć można dla nerek, płuc lub innych organów. Opisuje on wartość eliminacji jaką wnosi w kinetykę leku badany narząd lub tkanka. Im większy jest współczynnik ekstrakcji -ER, tym mniejsza jest dostępność biologiczna leku - F.

$$\mathbf{F = 1 - ER}$$

Współczynnik ekstrakcji jest parametrem który wraz z szybkością przepływu krwi przez tkankę określa jej klirens. Opisuje zdolność do oczyszczania z leku kompartmentu centralnego (Cl) przez organ, przy określonym przepływie krwi (Q).

$$\mathbf{Cl = Q \times ER}$$

Klirens jest parametrem farmakokinetycznym charakteryzującym wiele organów i tkanek, stąd jego całkowita wartość jest sumą wielu składowych:

$$\mathbf{Cl_{(tot)} = Cl_{(h)} + Cl_{(r)} + Cl_{(l)} \ldots etc.}$$

Wiedząc z jaką szybkością organizm jest oczyszczany z cząsteczek leku można obliczyć czas przebywania leku w organizmie i jego okres półtrwania. Kolejnym etapom obliczeń i badania poszczególnych parametrów farmakokinetycznych służą odpowiednie modele. Ich uzupełnieniem są liczne metody skalowania oraz wiele dodatkowych metod farmakometrycznych. Każdy parametr farmakokinetyczny można normalizować wobec innych parametrów - cech których duża zmienność wpływa na analizę badanego parametru.

$$\mathbf{xNy = y / x}$$

x - parametr o dużej zmienności
Ny - parametr normalizowany

Przykład pole powierzchni pod krzywą normalizowane wartością klirensu:

$$\mathbf{ClNAUC = AUC / Cl}$$

Transformacja Laplace'a.

Obliczenia farmakokinetyczne zwykle cechuje złożony opis matematyczny relacjonowanych procesów. Typowym narzędziem matematycznym jakie wykorzystywane jest od wielu lat do klasycznych obliczeń farmakokinetycznych są równania różniczkowe, układy równań różniczkowych oraz zwykłych równań. Tradycyjny zapis tych równań jest bardzo złożony a przekształcenia do prostszych form bardzo trudne. W celu ułatwienia i przyspieszenia obliczeń stosowano więc przekształcenie Laplace'a proponowanych równań. Przekształconą funkcję - f(t) oznacza się w takich wypadkach tzw. transformatą lub obrazem Laplace'owskim - f(s) (Krysicki W., Włodarski L. 1991).
Taka metoda pozwalała w praktyczny sposób rozwiązywać wiele złożonych równań. Jednak aby cały proces uprościć stosowano tablice w których znajdowały się gotowe wyrażenia typowe dla przekształcanych równań oraz ich transformaty (Gibaldi M., Perrier D. 1982). Założenia przekształcenia Laplace'a pozwalają na generowanie oryginału - funkcji lub równania poddanego transformacji także z obrazu jaki powstał po przekształceniu. Obecnie rola tego narzędzia obliczeniowego w praktyce obliczeń farmakokinetycznych jest marginalna z uwagi na powszechne stosowanie specjalistycznych rozwiązań informatycznych.

Poniżej przedstawiono wybrane oryginalne wyrażenia funkcji oraz równań oraz ich transformaty po przekształceniu Laplace'a.

$f(t)$	1	$f(t)$	$A \times e^{-a \times t}$
$f(s)$	$1 / s$	$f(s)$	$A / (s + a)$
$f(t)$	t	$f(t)$	$A \times t \times e^{-a \times t}$
$f(s)$	$1 / s^2$	$f(s)$	$A / (s + a)^2$
$f(t)$	t^m	$f(t)$	$(A / a) \times (1 - e^{-a \times t})$
$f(s)$	$m! / s^{m+1}$	$f(s)$	$A / [s \times (s + a)^2]$
$f(t)$	$t \times e^{a \times t}$	$f(t)$	$(A / a) \times t - (A / a^2) \times (1 - e^{-a \times t})$
$f(s)$	$1 / (s - a)^2$	$f(s)$	$A / [s^2 \times (s + a)]$
$f(t)$	$t^n \times e^{a \times t}$	$f(t)$	$[A / (b - a)] \times (e^{-a \times t} - e^{-b \times t})$
$f(s)$	$n! / (s - a)^{n+1}$	$f(s)$	$A / [(s + a) \times (s + b)]$
$f(t)$	$t^n / n!$	$f(t)$	$A / \{[1 / (a \times b)] + [e^{-a \times t} / a \times (a - b)] - [e^{-b \times t} / b \times (a - b)]\}$
$f(s)$	$1 / s^{n+1}$	$f(s)$	$A / [s \times (s + a) \times (s + b)]$
$f(t)$	A	$f(t)$	$e^{-a \times t} \times [A + (B - A \times a) \times t]$
$f(s)$	A / s	$f(s)$	$(A \times s) + B / (s + a)^2$

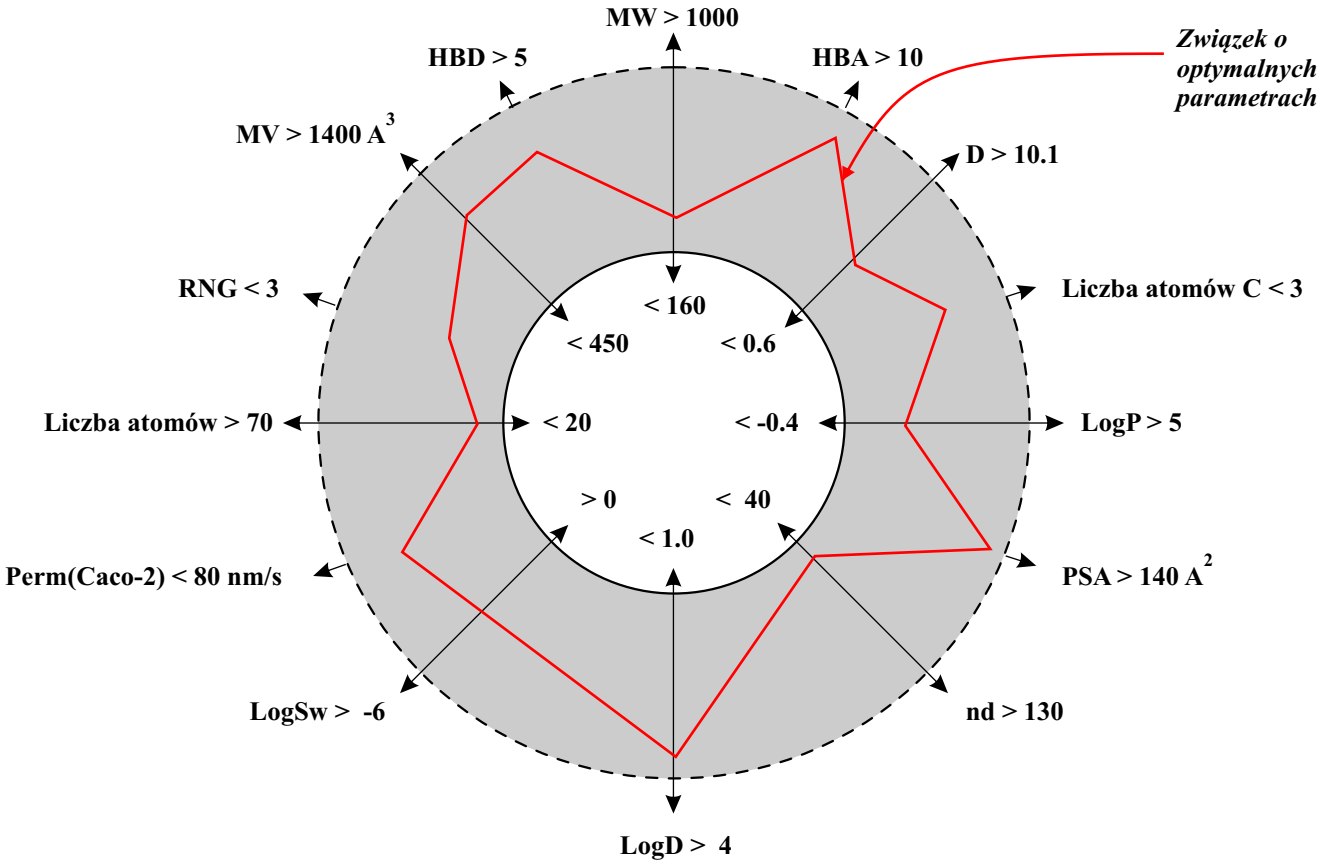
Badania farmakokinetyczne wczesnej fazy, reguła pięciu (ang.: *Role of 5*).

W chwili obecnej duże znaczenie w tzw. wczesnej fazie badań nad nowymi lekami mają metody obliczeniowe pozwalające symulować właściwości PK przyszłego leku. Metody te opracowywane są na podstawie baz danych właściwości fizjochemicznych substancji już znanych. Pozwalają one na tworzenie teoretycznych (wirtualnych) modeli cząsteczek i symulacji ich charakterystyki farmakokinetycznej (ang.: *Virtual Screening*), (Opera T.I. 2002). Wstępne zakwalifikowanie substancji do grupy "podobnych do leków" (ang.: *Drug-like*; *Drugability*; *Druglikeness*) daje szanse powodzenia dla przyszłych badań nad kandydatami na nowe leki (Clark D.E. 2001; Lipinski C.A. 2001; Egan W.J, Lauri G. 2002;Veber D.F. i wsp. 2002; Viswanadhan V.N. i wsp. 2002). Podstawowe założenia które powinien spełniać nowy lek to:

MW:	> 100 (160) lecz nie więcej niż 1000 (480)
Liczba atomów węgla:	> 3
Liczba wszystkich atomów:	> 20 lecz nie więcej niż 70
Niewielka liczba atomów:	azotu, tlenu, siarki, brak atomów metali
Liczba wiązań i pierścieni:	RNG większe równe 3, RGB większe równe 18, RTB większe równe 6
Suma grup OH i NH (HBD):	< 5
Suma atomów O i N(HBA):	< 10
HBD + HBA	< 12
LogP(o/w):	mniejszy równy - 0.4 (0) lecz nie większy, równy + 5.0
LogD:	dla leków podawanych *per os* 0 - 4 dla pozostałych -0.4 - 5.6
LogP(o/g):	pomiędzy 6.0 a 20.0
LogP(hex/g):	pomiędzy 4.0 a 1 4.4
LogP(w/g):	pomiędzy 4.0 a 22.0
LogBB:	pomiędzy - 1.5 a + 1.2
Perm(Caco-2):	< 20 - 34 nm/s mała, > 80 nm/s duża przepuszczalność
MiLogP (Moriguchi LogP):	> -2 (0) < + 4.6 (+ 6)
Sw:	> 10 mM; lub > 20 mg/ml; LogSw w zakresie - 6 do 0
nd:	Pomiędzy 40 oraz 130
PSA:	< (120) 140 A^2 PSAd < 63 A^2
SASA(total):	pomiędzy 300 a 750
SASA(hydrophobic):	pomiędzy 0.0 a 460
MV:	pomiędzy 450 a 1400 A^3
D:	pomiędzy 0.6 a 10.1

MW - masa cząsteczkowa (ang.: *Molecular Weight*)
LogD - współczynnik rozdziału oktanol / woda dla elektrolitów (ang.: *Effective Partition Coefficient*)
LogP(o/w) - współczynnik rozdziału oktanol / woda (ang.: *Partition Coefficient Octanol / Water*)
LogP(o/g) - współczynnik rozdziału oktanol / powietrza (ang.: *Partition Coefficient Octanol /Gas*)
LogP(hex/g) - współczynnik rozdziału heksadekan / powietrze (ang.: *Partition Coefficient Hexadecan / Water*)
LogP(w/g) - współczynnik rozdziału woda / powietrze (ang.: *Partition Coefficient Water / Gas*)
LogBB - współczynnik rozdziału krew /mózg (ang.: *Partition Coefficient Blood / Brain*)
Perm(Caco-2) - Przepuszczalność błon komórkowych Caco-2 (ang.: *Caco -2 Permeability*)
Sw - rozpuszczalność w wodzie (ang.: *Water Solubility*)
nd - współczynnik refrakcji (ang.: *Molar Refractivity*)
PSA - polarna powierzchnia cząsteczki (ang.: *Polar Surface Area*)
SASA - całkowita powierzchnia cząsteczki dostępna dla procesów rozpuszczania (ang.: *Solvent Accesible Surface Area*)
SASA(hydrophobic) - hydrofobowa powierzchnia cząsteczki (ang.: *Hydrofobic Surface Area*)
SASA(hydrophilic) - hydrofilowa powierzchnia cząsteczki (ang.: *Hydrofilic Surface Area*)
MV - objętość cząsteczki (ang.: *Molar Volume*)
D - moment dipolowy (ang.: *Dipole Moment*)

Rys. Właściwości związków chemicznych posiadających cechy leków. Wymieniono przedziały wartości typowe dla większości (90 - 95 %) znanych obecnie leków.



Rys. Tarcza trafności wyboru (ang.: *Disk of Rightness Choice* - DRC) substancji chemicznej do wczesnej fazy badań PK metodami SAR (Grabowski T. 2003). 90 - 95 % znanych obecnie leków lokuje wartości wskazanych wyżej parametrów w części wykresu wyróżnionej szarym kolorem.

Obecnie w celu określenia e-ADME wykonuje się obliczenia wielu deskryptorów cząsteczki leku. Są to zarówno parametry dotyczące budowy - konstytucjonalne, geometrii, parametry topologiczne, elektrostatyczne, termodynamiczne jak i fizykochemiczne (Hanqing W. 1999). Najczęściej w wymiarze badań e-PK opisywane jako parametry fizjochemiczne. Podstawą dla tego rodzaju rozważań są wybrane cechy wspólne dla większości znanych obecnie leków zdefiniowane przez Lipińskiego jako reguła pięciu (ang.: *Role-of-5*). W regule tej wszystkie wartości numeryczne posiadają wspólny mianownik równy pięć (Lipinski C.A. i wsp 1997; Lipinski C.A. 2000). Według tej reguły podstawowe cechy fizjochemiczne charakteryzujące każdy lek i substancje lekopodobne to:

- Poniżej 5 miejsc dawców protonu (HBD) wyrażonych zwykle jako suma grup OH i NH.
- Poniżej 10 miejsc wiązania wodoru (HBA) wyrażonych zwykle jako suma grup O i N.
- LogP o wartości poniżej 5.
- Masa cząsteczkowa związku (MW) mniejsza od 500 Da.

Reguły te uzupełniają definicje leku Vebera według których klasyfikowanie związku jako leko - podobnego jest możliwe gdy:

- MW jest mniejsza od 770
- HBA + HBD jest mniejsza od 12
- liczba wiązań ulegających rotacji < 10
- tPSA < 140 A

Prawidłowości zasad przedstawionych w postaci tarczy trafności wyboru związku do badań dowiodło wiele ośrodków naukowych (Zmuidinavicius D. i wsp. 2002). Wykryte zostały na podstawie analizy tysięcy związków chemicznych stosowanych na całym świecie jako leki opisanych między innymi w *World Drug Index*. Są wspólne zarówno dla metod rozwoju badań nad lekami w weterynarii jak i w medycynie człowieka. Założenia tego rodzaju metod obliczeniowych tworzą ramy w których powinien znaleźć się każdy nowy związek stanowiący propozycję nowego leku. Taki sposób kwalifikowania nowych substancji chemicznych do grona leków pozwala w znacznym stopniu zoptymalizować czas trwania badań w fazie przedklinicznej (Kramer S.D., Wunderli-Allespach H. 2001; Engels M.F.M. i wsp. 2002; Kariv I. i wsp. 2002). Zmniejsza również ryzyko błędnego wyboru związku do żmudnej i kosztownej drogi kolejnych faz badań farmakologicznych, farmakokinetycznych etc.. Pozwala podejmować decyzję o nowych kierunkach badań nad NCE (ang.: *New Chemical Entities*) opierając się na podstawach naukowych, dysponując dla proponowanej tezy dowodem matematycznym. Metody VS (ang.: *Virtual Screening*) pozwalają na przedstawienie we wczesnej fazie badań przewidywań dotyczących charakteru LADME nowego leku. W przypadku badań na większych grupach substancji - kandydatów na nowe leki opisane wyżej zasady zaimplementowane w postaci algorytmów w programach komputerowych generują tak zwany alert obliczeniowy. Stanowi to więc pierwszy krok i pierwszy etap selekcji decydujący o wyborze kierunku badań nad lekiem. Niespełnienie któregokolwiek z wymienionych założeń wiąże się z wykryciem cech negatywnych związku. Cechy te nie są oczekiwane z punktu widzenia optymalnej charakterystyki farmakokinetycznej przyszłego leku. Są to cechy o znaczeniu podstawowym decydujące w sposób fundamentalny o skuteczności leku. Na podstawie tego typu analizy cząsteczki leku z dużym prawdopodobieństwem określić można charakter LADME substancji (Didziapetris R. i wsp. 2003). Obecnie analiza właściwości cząsteczki oraz właściwości parametrów farmakokinetycznych przeprowadzana jest najczęściej za pomocą programów komputerowych na drodze:

- analizy korelacji
- spełnienia zasad (np.: R-of-5)

Poza określonymi regułami jakie powinny spełniać cząsteczki leku istnieje grupa związków lub cech związków chemicznych które nie zawsze lecz najczęściej dyskwalifikują związek chemiczny jako lek. Tymi niepożądanymi właściwościami są:

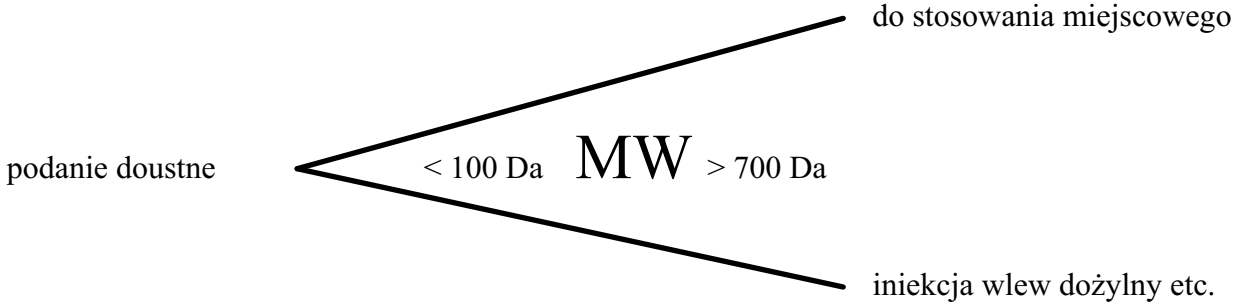
- całkowity brak atomów azotu lub tlenu
- więcej niż 8 pierścieni w cząsteczce
- więcej niż jedna grupa $ArNH_2$
- więcej niż trzy grupy NO_2
- powyżej 6 atomów F, 2 atomów Br, 3 atomów Cl, więcej niż 1 atom I
- suma atomów (I + Br + Cl) > 3
- obecność grup O-O, S-O, N=O, N=N, acykliczne N-N oraz N-O
- obecność O^+, I^+
- obecność $R_2N^+=C-(C=C)_n-NR_2$
- obecność grup SCN
- tiole, tiosiarczki, pochodne tiomocznika
- izotiocyjaniany, halidy sulfonylowe, halidy acylowe, halidy, epoksydy
- grupa aldehydowa
- bardzo długie łańcuchy alifatyczne
- winylo ketony, ketony alifatyczne

Masa cząsteczkowa - MW (ang.: *Molecular Weight*).

Masa cząsteczkowa jest jednym z podstawowych parametrów topologicznych decydujących o farmakokinetyce leku. Zgodnie z regułą pięciu Lipińskiego większość substancji chemicznych zaliczanych do leków lub będących lekami ma masę cząsteczkową nie większą niż 500. Nieliczne mają masę cząsteczkową powyżej 600 lub poniżej 200. Masa cząsteczkowa substancji jest równa przybliżonej wartości współczynnika dyfuzji - D (ang.: *Diffusion Coefficient*), (Jain R.K. 1999):

$$\mathbf{D = MW^{-n}}$$

W praktyce projektowania leków substancje o małej masie cząsteczkowej zwykle uznawane są z a potencjalne leki podawane doustnie. W przypadku substancji o dużej masie cząsteczkowej zakłada się zastosowanie leku powierzchniowo (ang.: *Topical*) lub w postaci iniekcji.

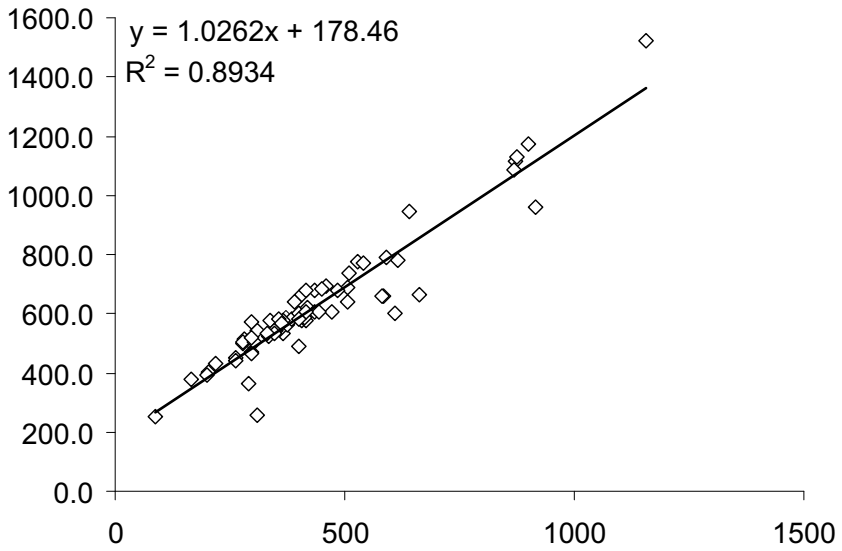


Ryc. Zależność między masą cząsteczkową a wnioskowaniem o formulacji leku.

Masa cząsteczkowa jest związana z wartością objętości badanej molekuły. Cechą dodatkową opisującą zależność między obydwoma cechami jest gęstość - D (ang.: *Density*).

$$\mathbf{MV = MW / D}$$

Objętość cząsteczki - MV oraz moment dipolowy - D (ang.: *Dipole Moment*) pozwalają obliczyć dipolowy współczynnik rozpuszczalności - DSI (ang.: *Dipole Solvation Index*):



$$DSI = D^2 / MV$$

Moment dipolowy w obliczeniach typu SAR relacjonuje skupienie w obrębie cząsteczki centrum masy oraz centrum regionu hydrofilnego. Im bardziej oba centra zbliżone są do siebie tym hydrofilne regiony cząsteczki bardziej są rozproszone. Duży moment dipolowy świadczy o dużej wartości wektora poprowadzonego od centrum masy cząsteczki do regionu hydrofilnego (Crivori P. i wsp. 2000). Duże znaczenie dla analizy wchłaniania potencjalnych kandydatów na leki ma obliczanie momentu amfifilowego. Parametr ten określa odległość regionu hydrofilnego do hydrofobowego. W analizie parametrów cząsteczek leków często oblicza się także takie współczynniki jak refrakcję molową -MR (ang.: *Molar Refractivity*), oraz parachor - PA (ang.: *Parachor*). Dla większości znanych leków wartość refrakcji molowej waha się w granicach 40 - 130 (Ghose A.K. i wsp. 1999).

$$MR = [(n^2 - 1) / (n^2 + 2)] \times (MW / D)$$

n - współczynnik refrakcji
D - gestość

$$PA = \gamma^{1/4} \times (MW / D)$$

γ - napięcie powierzchniowe

Zwykle masa cząsteczkowa skorelowana jest w dużym stopniu z wchłanianiemz przewodu pokarmowego czy przez bariery specjalizowane lub skórę. W większości przypadków wchłaniania i transportu leków przez błony biologiczne można określić pewne granice transportu związane z masą cząsteczkową:

MW < 200	- umożliwia transport śródkomórkowy
MW < 450	- sprzyja pokonywaniu bariery krew mózg
MW 200 do 500	- nie powoduje ograniczeń w dyfuzji przez błony
MW > 600	- przyczynia się do ograniczenia dyfuzji przez błony
MW > 1000	- wyklucza transport bierny

Szczególnie wyraźne potwierdzenie tych zasad opisać można w przypadku wchłaniania z jelit. Eliminacja jako proces wymagający również transportu przez błony biologiczne także może być zależna od masy cząsteczkowej. Przykładem jest eliminacja wraz z żółcią która najczęściej dotyczy związków o masie cząsteczkowej powyżej 300 (Testa B. i wsp. 2001). Dodatkowymi parametrami jakie tworzą charakterystykę badanej molekuły są współczynnik sfałdowania - R (ang.: *Rugosity*) oraz kulistość cząsteczki - G (ang.: *Globularity; Flexibility*). Aby obliczyć obydwa parametry należy obliczyć pole dostępnej dla rozpuszczalnika powierzchni cząsteczki - SASA (ang.: *Solvent Accesible Surface Area*).

$$R = MV / SASA$$

W celu obliczenia kulistości cząsteczki - G, dla znanej objętości molekuły - MV, należy obliczyć teoretyczną powierzchnię kuli o objętości badanej cząsteczki - S(eq). W przypadku tym:

$$MV = (4 \times \pi \times r^3) / 3 \qquad r = \sqrt[3]{3 \times MV / 4 \times \pi}$$

$$S_{(eq)} = 4 \times \pi \times r^2 \qquad G = SASA / S_{(eq)}$$

Parametrem który opisuje kształt badanego związku jest współczynnik krytycznego upakowania molekuły CP (ang.: *Critical Packing*). Współczynnik ten obliczyć można korzystając z formuły:

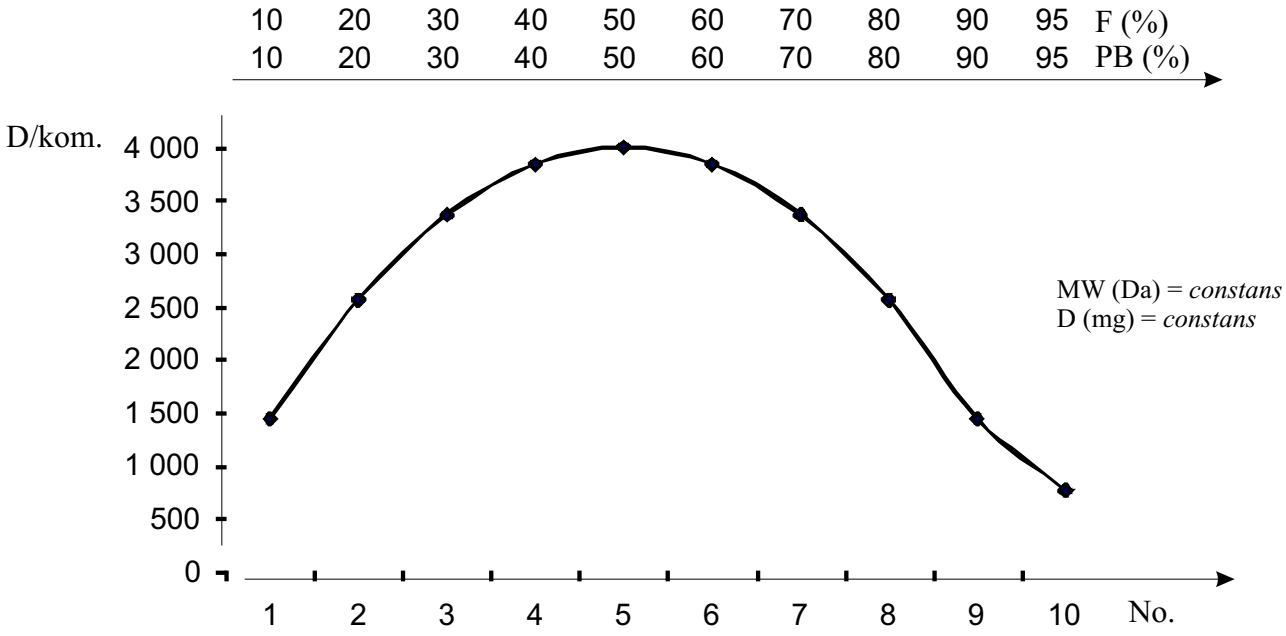
$$CP = V_{(hydrophobic)} / [S_{(hydrophilic)} \times L_{(hydrophobic)}]$$

V(hydrophobic) - objętość hydrofobowej części związku
S(hydrophilic) - powierzchnia hydrofilnej części związku
L(hydrophobic) - długość hydrofobowej części związku

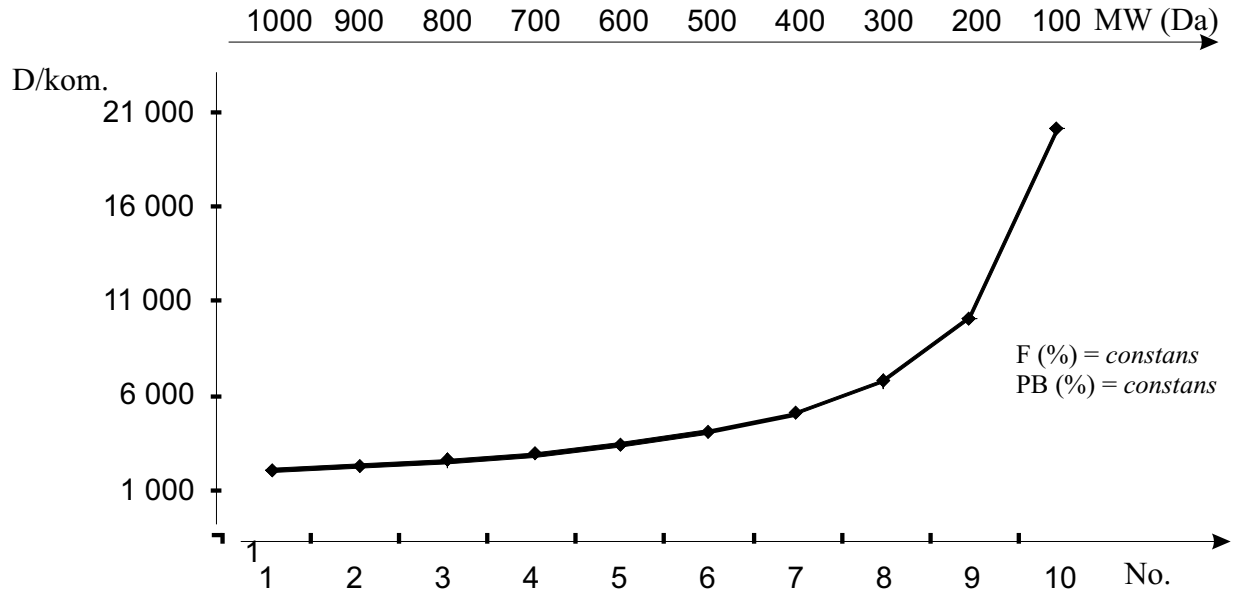
Masa cząsteczkowa oraz znajomość masy molowej leku pozwala obliczyć ile cząsteczek leku obecnych jest w organizmie po podaniu określonej dawki leku. Na tego typu obliczenia pozwala stała Avogadro - wartość która informuje o liczbie cząsteczek substancji w jednym molu. Wartość ta dla mola każdej substancji wynosi 6,02 x 10^{23} cząsteczek. Znając liczbę komórek w organizmie człowieka szacowaną obecnie na około 750 trylionów komórek można określić teoretyczną liczbę cząsteczek leku przypadających na jedną komórkę. Jest to wartość pozorna która jedynie w dużym przybliżeniu informuje o fizykochemicznej stronie drogi cząsteczek leku w organizmie. Biorąc jednak pod uwagę wartość dostępności biologicznej leku oraz jego procent wiązania z białkami osocza można określi pewne trendy które cechować będą różne substancje w zależności od MW, dostępności biologicznej - F oraz wiązania z białkami PB (ang.: *Protein Binding*) oraz zastosowanej dawki.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D/kom	*1 445*	*2 569*	*3 372*	*3 854*	*4 015*	*3 854*	*3 372*	*2 569*	*1 445*	*763*
F (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95
MW (Da)	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
Dawka (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PB (%)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95

Tabela przedstawia symulację zależność między MW, F, PB (frakcja wolna) oraz dawką leku a liczbą cząsteczek leku przypadających na jedną komórkę organizmu ludzkiego D/kom. Analizowana sytuacja zakłada porównanie 10 cząsteczek o tej samej masie cząsteczkowej podanych w tej samej dawce. Każda z substancji różni się od poprzedniej wzrastającymi wartościami dostępności biologicznej oraz procentu wiązania z białkami krwi.



Ryc. Związek między masą cząsteczkową, dostępnością biologiczną, wiązaniem z białkami krwi a pozorną liczbą cząsteczek leku przypadającą na jedną komórkę organizmu człowieka (zmienne F i PB).



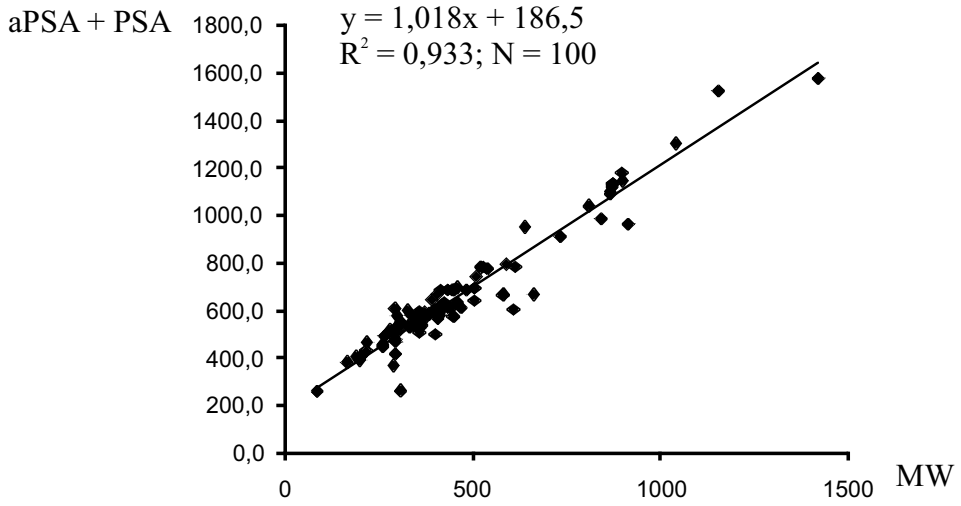
Ryc. Związek między masą cząsteczkową, dostępnością biologiczną i wiązaniem z białkami krwi a pozorną liczbą cząsteczek leku przypadającą na jedną komórkę organizmu człowieka (zmienna - MW).

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D/kom	*2007*	*2 230*	*2 509*	*2 868*	*3 346*	*4 015*	*5 018*	*6 691*	*10 037*	*20 074*
F (%)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
MW (Da)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100
D (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PB (%)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabela przedstawia symulację zależność między MW, F, PB (frakcja wolna) oraz dawką leku a liczbą cząsteczek leku przypadających na jedną komórkę organizmu ludzkiego D/kom. Analizowana sytuacja zakłada porównanie 10 cząsteczek o różnej masie cząsteczkowej podanych w tej samej dawce. Każda z substancji ma tą samą wartość dostępności biologicznej oraz wiązania z białkami krwi. Na przykładzie dużych i zróżnicowanych grup leków można wykazać liniową zależność pomiędzy masą cząsteczkową a wartością PSA i aPSA. Taką zależność wykazano dla grupy stu różnych leków weterynaryjnych (badania niepublikowane):

MW = 1,018 x (aPSA + PSA) + 186,5

Zależność ta do pewnego stopnia tłumaczy niską selektywność wartości MW jako filtra wskazującego na ewentualną możliwość transportu biernego cząsteczki. Selektywność PSA w tym zakresie jest znacznie wyższa, jednak suma pól jest pochodną masy cząsteczkowej związku. Zależność tą odzwierciedla reguła pięciu oraz inne reguły oparte na parametrach topologicznych budowy cząsteczki.



Rys. Zależnośc między masą cząsteczkową a wzrostem wartości sumy pól cząsteczki.

Donory i akceptory protonu (ang.: *HBA*, *HBD*).

Cechą wszystkich znanych leków jest posiadanie mniejszej lub większej liczby akceptorów protonu - HBA lub donorów protonu HBD. Liczba HBA i HBD w znacznym stopniu wpływa na wielkość pola polarnego powierzchni cząsteczki - PSA. Decyduje więc między innymi o dostępności biologicznej leku po podaniu *per os*. Ze spadkiem liczby HBA spada powinowactwo leku do P-gp. Większa liczba HBA decyduje zwykle o większej hydrofilności (możliwości przyłączenia większej liczby cząsteczek wody). Możliwości cząsteczki jako donora protonu można zbadać przez określenie współczynnika rozdziału woda / hydrokarbon, glikol etylenowy/ hydrokarbon lub oktanol/ hydrokarbon (pomiędzy silnymi akceptorem protonu a faza która nie jest akceptorem protonu) (Lipinski C.A. i wsp. 1997). W analizie SAR wartości tych parametrów odnosi się między innymi do LogP tworząc dalsze pochodne służące poszukiwaniu korelacji. Liczba HBD i HBA charakter zlokalizowanych w ich obrębie ładunków, ich dystans i polaryzacja decydują między innymi o LogD leku. Dokładne obliczenia umożliwiają określenie rozmieszczenia ładunków w obrębie regionów HBA i HBD co pozwala między innymi określić kwasowość i zasadowość tych regionów oraz całej cząsteczki.

Energia orbitali E(HOMO),E(LUMO).

E(HOMO),E(LUMO) to parametry orbitali atomowych ilustrujące reaktywność elektrofilową związku. HOMO energy (ang.: Energy Of The Highest Occupied Molecular Orbital) i LUMO energy (ang.: Energy Of The Lowest Unoccupied Molecular Orbital) są to współczynniki chemii kwantowej.

$$E_{gap} = E_{(LUMO)} - E_{(HOMO)}$$

	E(HOMO)	E(LUMO)
meprobamat	-10,722	1,219
mechloretamina	-9,710	0,813
metamfetamina	-9,267	0,454

streptomycyna	-9,611	0,226
imipramina	-7,771	0,159
kofeina	-9,270	-0,169
LSD	-7,776	-0,174
chloropromazyna	-7,499	-0,296
penicylina G	-9,338	-0,418
chinina	-8,522	-0,470
deksametazon	-10,102	-0,564
kwas acetylosalicylowy	-9,619	-0,654
tetracyklina	-9,224	-0,876
diazepam	-8,946	-0,929
czterochlorek węgla	-12,343	-0,956
dietylostilbestrol	-7,180	-0,977
warfaryna	-8,978	-1,011
metotrexat	-8,933	-1,103
busulfan	-11,996	-2,299
acetazolamid	-10,518	-2,351
disulfiram	-8,292	-2,670
chlorek tubokuraryny	-9,837	-3,575

Rys. Przykładowe wartości energii orbitali HOMO, LUMO.

Wartości te łączy się z niektórymi parametrami toksykodynamicznymi i toksykokinetycznymi oraz ekotoksycznością np. wartością BCF (ang.: *Bioconcentration Factor*). Wartości energii odnoszą się do zdolności udziału roztworu w interakcjach na poziomie donor akceptor. Na podstawie obu wartości wyznacza się różnicę -E_{gap} pomiędzy energiami granicznych orbitali. Różnica ta jest miarą stabilności związku. Im większa jest ta różnica tym związek jest bardziej stabilny. E(HOMO) jest miarą nukleofilowości i potencjału jonizacji. Cząsteczki o wyższej wartości E(HOMO) oddają łatwiej elektron niż cząsteczki o niższej energii.

Liczba pierścieni i charakter wiązań liczba atomów.

Aby odróżnić substancje o właściwościach typowych dla leków od substancji nie posiadających takich właściwości, analizie poddaje się zależność która bierze pod uwagę liczbę pierścieni w związku RNG (ang.: *Ring*), liczbę wiązań ulegających rotacji RTB (dla większości leków < 13) oraz liczbę wiązań nie ulegających rotacji (RGB) (Opera T.I. i wsp. 2001).

$$\mathbf{RTB = Nnt + \Sigma(n - 4 - RGB - ShB)}$$

Nnt - liczba nie końcowych wolnych wiązań ulegających rotacji
n liczba pojedynczych wiązań w pierścieniach niearomatycznych
RGB - liczba wiązań w pierścieniu nie ulegających rotacji (ang.: *Rigid Bonds*)
ShB - liczba wiązań wspólnych z innym pierścieniem (ang.: S*hared Bonds*)

Leki posiadające mniejszą liczbę wiązań ulegających rotacji zwykle łatwiej pokonują bariery błonowe. Leki posiadające dużą liczbę takich wiązań są zbyt "elastyczne". Wykazano także że znakomita większość związków chemicznych - leków ma więcej niż 3 atomy węgla. Ilość wszystkich atomów waha się przeważnie między 20 a 70 i ograniczona jest dodatkowo masą cząsteczkową. Opisanie reguły pięciu pozwoliło również na interpretację współczynnika spójności dla ciał stałych CI (ang.: *Cohesive Index*).

$$\mathbf{CI = HBA \times HBD^{0.5} / SASA}$$

Oblicza się również potencjał ładunku dla HBA i HBD a także ich wzajemny stosunek HBA/HBD.

Elektroujemność.

Elektroujemność wyraża zdolność cząsteczki lub atomu do tworzenia pary elektronów. Wartość różnicy w elektroujemności dwóch atomów wyraża polarność wiązania pomiędzy nimi.

- mała różnica w elektroujemności oznacza że wiązanie nie jest polarne
- duża różnica charakteryzuje wiązania polarne
- jeżeli różnica jest bardzo duża to wiązanie ma charakter jonowy

Elektroujemność w badaniach topologii leku wyrażana jest często jako współczynnik Balabana (ang.: *Balaban Index*) obliczany w wielu różnych wersjach, którego wartość dla 90 % znanych obecnie leków nie przekracza wartości 2.8. Współczynnik Balabana często określany jest mianem względnej elektroujemności.

	rymantadyna	somantadyna	amantadyna	memantyna
Balaban index JY	1.913	1.929	1.942	2.033
Balaban index JX	1.904	1.922	1.930	2.023

Ryc. Współczynnik Balabana rymantadyny i struktur o budowie homologicznej.

Powierzchnia polarna cząsteczki - PSA (ang.: *Polar Surface Area*).

Wartość pola powierzchni polarnej cząsteczki w badaniach SAR jest jednym z ważniejszych stosowanych obecnie wskaźników określającym dostępność biologiczną leku (Bartzatt R. i wsp. 2003). Obecnie parametr ten obliczany jest także w układach dynamicznych jako dynamiczne polarne pole powierzchni - PSAd (ang.: *Dynamic Polar Surface Area*). Na podstawie analiz korelacji PSA z parametrami farmakokinetycznymi World Drug Index stwierdzono że wartość PSA powyżej 140 A^2 może znacznie ograniczać wchłanianie leku. Cząsteczki o PSA powyżej 300 - 400 A^2 praktycznie nie są wchłaniane w drodze transportu biernego. Wartość PSA poniżej 60 zwykle gwarantuje dostępność biologiczną leku na bardzo wysokim poziomie (Stenberg P. 2001). Dla wartości topologicznej tPSA (ang.: *Topological Polar Surface Area*) wykazano znaczną korelację z masą cząsteczkową i stopniem wchłaniania z przewodu pokarmowego człowieka. Wykazano także zależność miedzy tPSA a liczbą HBD i HBA.

$$\mathbf{tPSA = - 0.85 + 8.6 \times HBD + 12.4 \times HBA}$$

Dla niektórych grup analizowanych związków formułę tą uprosić można do:

$$\mathbf{tPSA = (HBD + HBA) \times 10} \ [+/-] \ 1$$

	MiLogP	tPSA	HBA	HBD	Z = HBA+HBD	tPSA / Z
hydrohinon	1,361	40,45	2	2	4	10,11
dopamina	0,639	66,48	3	4	7	9,50
kwercetyna	1,981	131,35	7	5	12	10,95
acetaminofen	1,355	49,32	3	2	5	9,86
hesperydyna	-0,463	234,3	15	8	23	10,19
kaptopril	-0,124	57,6	4	1	5	11,52
eugenol	2,789	29,46	2	1	3	9,82
kapsaicyna	4,121	58,56	4	2	6	9,76
guanina	-0,9	100,46	6	4	10	10,05
tryptofan	0,417	80,36	4	6	10	8,04
skopoletyna	1,59	59,67	4	1	5	11,93
tyramina	1,022	46,25	2	3	5	9,25
klenbuterol	3,29	58,27	3	4	7	8,32
acyklowir	-1,203	119,06	8	4	12	9,92
diklofenak	4,53	49,32	3	2	5	9,86
					M	9,94
					SD	1,02

Ryc. Zależność między HBD, HBA oraz tPSA na przykładzie wybranych związków.

PSA jest parametrem zwykle kojarzonym w analizie SAR również z współczynnikami takimi jak elektroujemność, moment dipolowy czy współczynnik rozdziału oktanol:woda. Jest parametrem który opisuje powierzchnię pola polarnego jednak nie opisuje jego kształtu i rozmieszczenia. PSA powyżej 140 angsztremów zwykle związane jest ze słabą dostępnością biologiczną leku po podaniu doustnym. Zwykle przy dużej wartości PSA dostępność biologiczna ma wartość poniżej 10 %. Zasady te nie obowiązują w przypadku każdej drogi podania leku (wziewna, donaczyniowa). W fazie przedklinicznej wartość PSA wiąże się z innymi parametrami fizjochemicznymi leku o decydującym wpływie na jego dyspozycję w danym układzie doświadczalnym. Niezależnie od ewentualnych ułatwień w fazie wchłaniania leki o dużej wartości PSA zwykle słabo pokonują bariery biologiczne w trakcie dyspozycji w organizmie. Niska wartość tPSA lub PSA zwykle wiąże się z szybkim transferem przez błony biologiczne lub ściany komórkowe mikroorganizmów. Prawdopodobnie również ta cecha zadecydowała o sukcesie terapeutycznym bardzo prostych pod względem budowy związków chemicznych takich jak sole srebra, mentol czy triklozan.

	tPSA
chlorek srebra	0
fiolet gencjany 6	
akrydyna	13
mentol	20
triklozan	29
chlorchinaldol	33
pirokatechol	40
azotan srebra	49
akryflawina	52
nitromersol	55
ornidazol	83
mafenid	86
kwas pipemidowy	100
chlorheksydyna	167
spiramycyna	195
teikoplanina	645

Rys. Zestawienie wartości tPSA wybranych związków o działaniu antyseptycznym lub przeciwbakteryjnym.

Polarne pole powierzchni leku jest parametrem eksponującym możliwości leku *in vivo* w powiązaniu z budową chemiczną leku. Często nawet niewielkie zmiany w strukturze leków homologicznych dotyczących wybranych grup funkcyjnych znacznie różnicują je pod względem PSA. Jednym z parametrów często poddawanych analizie regresji jest procent PSA w stosunku do SASA (ang.: *Solvent Accesible Surface Area*). Jest to tzw. fraktalne pole polarne cząsteczki - fPSA (ang.: *Fractal Polar Surface Area*). Wyraża ono procentowy udział polarnego pola powierzchni cząsteczki, do całkowitego pola powierzchni związku jakie dostępne jest dla cząsteczek rozpuszczalnika.

$$\mathbf{fPSA = (PSA \times 100) / SASA}$$

Polarność leków opisuje również parametr jakim jest moment dipolowy. Parametr ten dla substancji dysponujących dwoma odmiennymi ładunkami ilustruje ich wartość i odległość.

$$\mathbf{D = e \times d}$$

D - moment dipolowy
e - wartość ładunku
d - odległość ładunków

Moment dipolowy leku jest tym większy im bardziej odległe są ładunki cząsteczki. Jeśli jednak jest ich wiele mimo większej liczby polarnych wiązań sama cząsteczka może mieć niewielki moment dipolowy. Może o tym decydować wzajemne znoszenie się ładunków (Morrison T.R., Boyd R.N. 1985). Analiza powierzchni związków chemicznych, w powiązaniu z rozmieszczeniem ładunków tworzących środowisko kontaktu z określonym typem rozpuszczalnika, stanowi podstawy nowoczesnego opisu SAR. Parametrem zwykle opisywanym w przypadku pól cząsteczek leków jest NPSA (ang.: *Non Polar Surface Area*).

$$\mathbf{NPSA = SASA - PSA}$$

i odpowiednio w układach dynamicznych, dynamiczne niepolarne pole powierzchni cząsteczki NPSAd:

$$\mathbf{NPSA_d = SASA_d - PSA_d}$$

W analizie doświadczalnej i porównawczych badaniach leków PSA może być podobnie jak klirens czy wartość dawki parametrem normalizacji na przykład dla AUC.

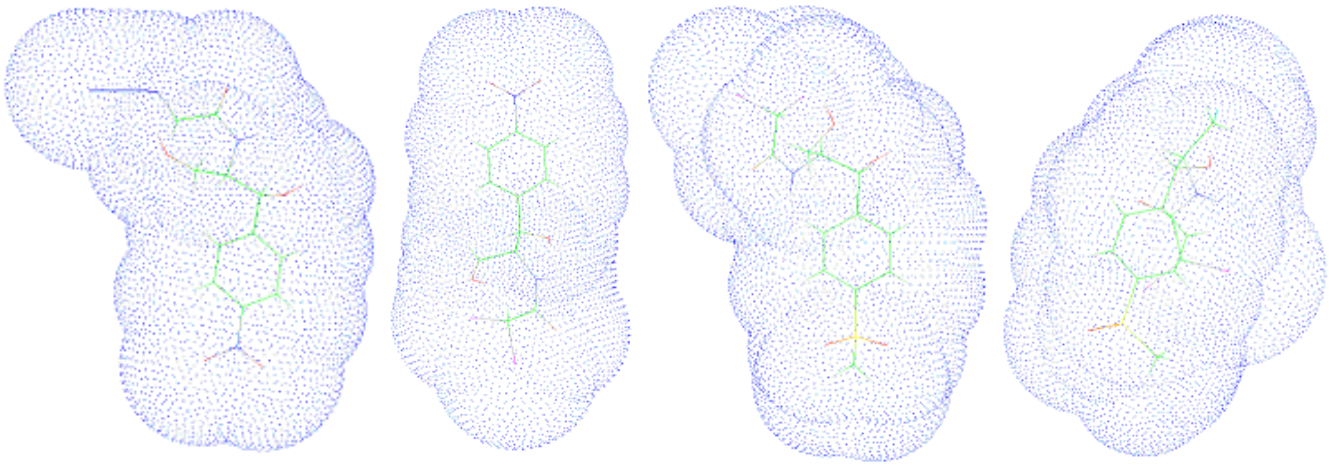
$_{PSA}AUC = AUC \times (PSA / 100)$ **$_{D;PSA}AUC = (AUC \times (PSA / 100)) / D$**

PSAAUC - pole powierzchni pod krzywą normalizowane wartością PSA
D;PSAAUC - pole powierzchni pod krzywą normalizowane wartością PSA i wartością dawki

W obliczeniach tego typu można także zastosować wartość stosunku aPSA / PSA

$_{aPSA;PSA}AUC = AUC / (aPSA / PSA)$ **$_{D;aPSA;PSA}AUC = [AUC / (aPSA /PSA)] / D$**

aPSA;PSAAUC - pole powierzchni pod krzywą normalizowane wartością stosunku aPSA/PSA
D;aPSA;PSAAUC - pole powierzchni pod krzywą normalizowane wartością dawki i stosunku aPSA/PSA
aPSA - niepolarne pole powierzchni cząsteczki



Ryc. Rozmieszczenie pól ładunków dookoła cząsteczek od lewej: azydamfenikolu, chloramfenikolu, tiamfenikolu i floramfenikolu.

	MLogP*	Polaryzacja	PSA	aPSA	aPSA/PSA
florfenikol	0.36	31.30	155.50	441.50	2.84
EINECS 299-130-0	2.00	30.90	173.90	357.20	2.05
WIN 5094-3	1.84	30.63	161.90	327.40	2.02
.....*	-2.03	30.45	184.20	364.40	1.98
tiamfenikol	-0.04	31.96	165.70	313.00	1.89
nitrozochloramfenikol	1.08	26.71	173.90	320.30	1.84
bromamfenikol	0.55	26.43	197.10	291.90	1.48
BU 2000	0.42	25.15	197.40	290.30	1.47
ZINC00495100	0.44	25.28	198.50	285.10	1.44
NSC 63859	-0,02	23.32	205.20	253.40	1.23
NSC 89249	0.28	20.82	197.70	238.80	1.21
amfenikol	-0.03	23.32	204.60	244.60	1.20
CAS 3123-13-5	-0.18	22.66	206.40	241.50	1.17
chloramfenikol	1.09	27.24	217.50	244.80	1.13
3-octan chloramfenikolu	1.25	30.91	253.40	277.90	1.10
Sch 25393	-0.36	27.39	260.50	254.20	0.98
aldehyd chloramfenikolu	-1.36	23.32	249.80	212.80	0.85
CAS 69-49-60-6	0.15	20.82	235.50	182.10	0.77
monoiodoamfenikol	0.94	28.72	285.00	215.70	0.76
azydamfenikol	0.72	25.84	301.10	190.10	0.63

.....* - [1,3- dihydroksy-1-(4- nitrofenylo)-propan-2-yl] karbamoilometylo - trimetylo - amonowy
MlogP*- średnia arytmetyczna MiLogP, CLogP , LogKOW

Ryc. Tabela wartości aPSA i PSA w grupie antybiotyków - amfenikoli oraz pochodnych i struktur homologicznych.

Obecnie znanych jest wiele substancji o bardzo wysokich wartościach stosunku aPSA do PSA przy jednocześnie bardzo niskiej wartości PSA (< 140 A) i na odwrót.

	PSA	aPSA	aPSA/PSA
ubichinon	42.8	1002.4	23.4
tokoferol	40.70	771.80	18.9
retinol	60.70	535.00	8.81
chinina	63.90	480.20	7.51
metylocytyzyna	45.10	333.00	7.38
galantamina	58.30	418.40	7.18
	< 140		> 7
spiramycyna	174.60	894.00	5.12
rapamycyna	216.30	1013.10	4.68
digitoksyna	308.70	726.30	2.35
nystatyna	454.80	913.70	2.01
lanatozyd C	388.60	781.50	2.01
busulfan	197.70	250.10	1.27
	> 140		< 7

Znanych jest wiele substancji o znacznej toksyczności i pole polarne powierzchni cząsteczki równe zero, większość z nich to substancje lipofilne:

1,2 - dibromo - 3 - chloropropanon	butylotoluen
benzen	heksachlorobenzen
dwusiarczek węgla	czterochlorek węgla
chloroform	chloropren
dichlorometan	dwubromoetylen
heksachlorobutadien	halotan
heptachlor	chlorek metylenu
Mirex	styren
trichloroetylen	chlorek winylu
toluen	trichlorotoluen

Obecnie oblicza się również różnego typu frakcje polarnego pola powierzchni. Dokładne obliczenia precyzują także procentowy udział ładunku ujemnego i dodatniego dla tego parametru

$$PSA = |+PSA| + |-PSA|$$

Analiza udziału procentowego poszczególnych frakcji oraz analiza innych parametrów fizjochemicznych takich jak polaryzacja cząsteczki, moment dipolowy, ładunek cząsteczki etc. pozwala miedzy innymi kontrolować NCE ze względu na powinowactwo do systemów nośnikowych, białek, receptorów czy szerzej interakcji w obrębie błon specjalizowanych.

	ketokonazol	itraconazol	terkonazol	NCI60-651919	flukonazol
	posakonazol	saperkonazol	OH itrakonazol	OH saperkonazol	NCI60-658472
LogKOWIN	4,77	4,45	5,28	6,16	6,16	5,06	3,90	1,14	2,15	0,25
CLogP	4,11	3,63	4,85	5,99	5,99	4,81	5,29	0,70	1,51	-0,44
MiLogP	4,16	3,56	4,20	5,42	5,42	4,11	4,03	1,56	2,06	0,34
ALogP	4,71	4,30	4,74	5,49	5,49	4,59	4,23	1,38	2,03	0,57
XLogP	5,48	3,96	5,55	6,47	6,47	4,53	5,95	1,30	2,05	0,38
Średnia LogP	4,65	3,98	4,92	5,91	5,91	4,62	4,68	1,22	1,96	0,22
MW	700,8	531,4	672,7	705,6	721,6	533,5	674,7	339,2	381,2	306,3
HBA	8,0	6,0	8,0	8,0	9,0	6,0	8,0	7,0	8,0	7,0
HBD	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0	1,0
MR	190,4	138,1	180,9	190,1	191,6	142,9	183,5	85,8	95,0	76,6
NRB	9,0	9,0	9,0	8,0	10,0	7,0	6,0	7,0	7,0	5,0
NAR	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
NR	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	5,0	5,0	3,0	3,0	3,0
Całkowity ładunek	12,8	9,2	12,5	12,4	13,1	10,5	13,3	6,9	7,2	7,0
+PSA	103,8	69,9	94,6	94,6	104,9	61,3	98,2	66,6	71,0	66,6
-PSA	27,9	26,8	22,6	22,6	30,4	42,7	30,4	19,1	27,4	19,1
PSA	131,7	96,7	117,2	117,2	135,3	104,0	128,6	85,7	98,4	85,7
tPSA	115,70	69,06	104,70	104,70	124,93	66,08	103,95	81,65	87,72	81,65
Balaban Index	0,87	1,16	0,87	0,87	0,87	1,16	0,87	1,90	2,01	1,90
Wiener index	13566	4692	12096	12096	12828	4692	12096	1000	1348	1000
Ramification index	18,00	12,00	17,00	17,00	18,00	12,00	17,00	7,00	8,00	7,00
Polaryzacja Miller	73,39	54,42	69,72	73,76	74,40	55,91	70,40	33,15	36,91	29,12
Polarność	0,96	1,08	0,97	0,97	0,97	1,53	1,10	0,96	0,96	0,96
Przepuszczalność caco-2	55,75	55,12	54,32	52,14	51,77	50,77	40,75	32,65	25,71	23,38
Przepuszczalność MDCK	0,06	0,55	0,09	0,05	0,10	32,01	0,03	1,11	30,60	40,78
HIA	97,87	97,68	97,08	97,07	97,91	94,53	97,29	99,37	96,69	99,32
Skin Perm	0,0007	0,0005	0,0017	0,0008	0,0029	0,0004	0,0015	0,0001	0,0001	0,0001
BBB	0,99	0,52	0,29	1,84	0,54	4,76	0,54	0,51	0,04	0,48
Wiązanie z białkami	93,82	95,72	93,68	90,75	95,31	87,15	93,69	83,59	80,66	84,49

Ryc. Analiza podstawowych parametrów fizjochemicznych triazoli oraz wybranych pochodnych o homologicznej strukturze.

Pole polarne cząsteczki leku w powiązaniu z innymi parametrami jest więc wyznacznikiem możliwości dystrybucji leku w całym organizmie, nie tylko możliwości wchłaniania z przewodu pokarmowego. Przykładem związków o znacznej toksyczności wysokiej wartości LogP (wyrażanego również jako LogKOWIN) oraz niskiej wartości tPSA są niektóre toksyny grzybicze:

	LogKOWIN	tPSA
ochratoksyna C	5.19	101.9
ochratoksyna A	4.74	112.9
ochratoksyna B	3.77	112.9
T-2 trichotecen	2.27	120.9

W grupie mykotoksyn są także związki o niekorzystnych z punktu widzenia wchłaniania drogą pokarmową wartościach obu wymienionych parametrów:

	LogKOWIN	tPSA
fumonizyna A2	3.91	271.3
fumonizyna A1	2.37	291.5
fumonizyna B4	1.90	248.0
fumonizyna B2	0.77	268.3
fumonizyna B3	0.77	268.2
fumonizyna B1	-0.77	288.5

Wyjątkowo dużą wartość polarnego pola powierzchni mają amatoksyny (amanityny) co pozornie dyskwalifikowałoby je w procesach wchłaniania z przewodu pokarmowego (GIT). Szczególnie w związku z dużą hydrofilnością tych związków. Jednak doskonałe wchłanianie z GIT zapewnia im aktywny transport poprzez system transportujący kwasy żółciowe obecny w jelicie oraz wątrobie.

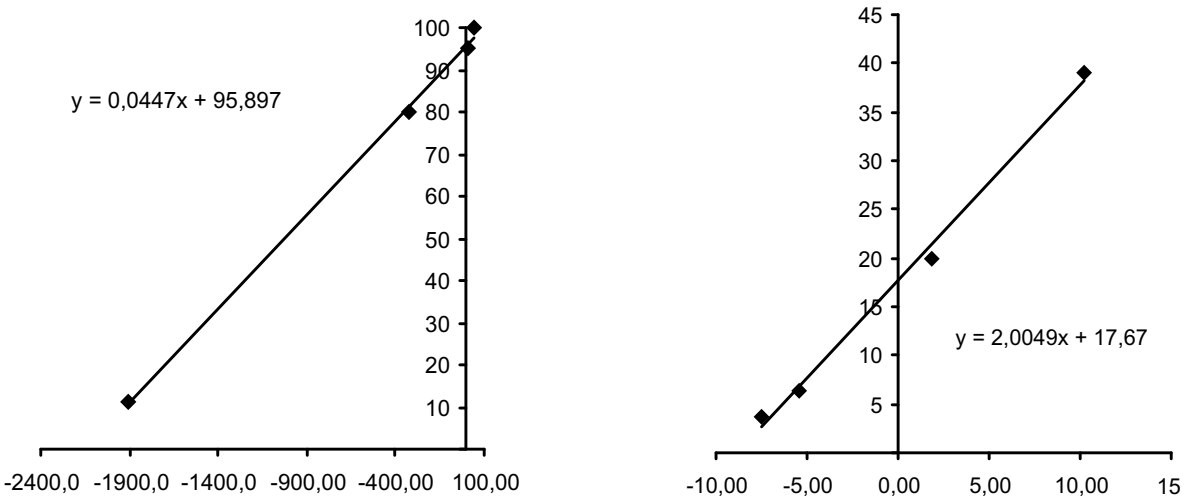
	LogKOWIN	tPSA
γ amanityna	-4.97	373.4
β amanityna	-9.06	393.7
α amanityna	-9.28	400.1

Dla niektórych leków można stwierdzić wysoką korelację pomiędzy takimi parametrami jak t1/2 *in vivo* a pochodną (aPSA/PSA) x LogD, ($R^2 = 0.9944$) przykład stanowią wybrane leki przeciwwirusowe.

	rymantadyna	amantadyna	karboksy oseltamiwir	zanamiwir
(aPSA/PSA)x LogD	10.23	1.87	-5.38	-7.51
t1/2 *in vivo*	39	20	6.3	3.8

PSA w powiązaniu z innymi parametrami fizjochemicznymi pozwala potwierdzić korelację z wartością dostępności biologicznej podobnie jak w przypadku samego PSA, $R^2 = 0.9982$.

	rymantadyna	amantadyna	karboksy oseltamiwir	zanamiwir
(PSA x LogD)	38.13	9.57	-325.41	-1904.15
F (%) *in vivo*	100	95	80	11

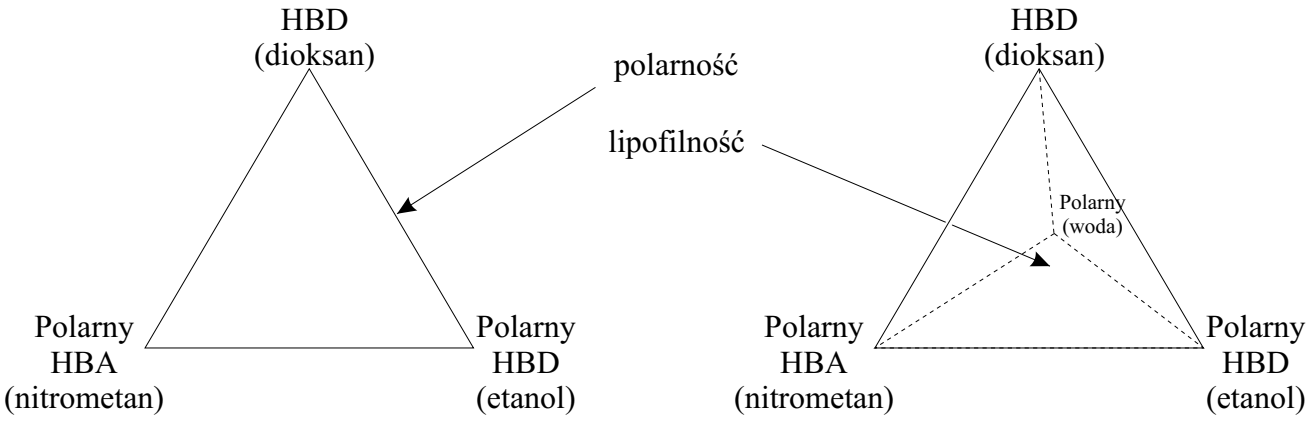


Ryc. Od lewej: Zależność [(aPSA/PSA) x LogD] a okresem półtrwania *in vivo*. Zależność (PSA x LogD) a dostępnością biologiczną *in vivo* wybranych leków przeciwwirusowych stosowanych w leczeniu grypy.

Polarność leku (ang.: *Drug Polarity*).

Substancje polarne to cząsteczki które posiadają spolaryzowany ładunek na swej powierzchni są więc dipolami. Związki polarne to najczęściej związki o budowie niesymetrycznej. Związki chemiczne o symetrycznie rozmieszczonych atomach są najczęściej niepolarne. Polarne rozpuszczalniki maja zdolność solwatacji innych cząsteczek polarnych. Solwatacja polega na otaczaniu cząsteczkami polarnego rozpuszczalnika (np. wody) cząsteczek polarnego związku. Polarność cząsteczki jest wypadkową kilku parametrów topologicznych. O jej wartości decydują takie parametry jak liczba donorów protonu HBD (ang.: *Hydrogen Bond Donors*), liczba akceptorów protonu HBA (ang.: *Hydrogen Bond Acceptors*) oraz polaryzacja związku najczęściej wyrażana w angstremach sześciennych (ang.: *Polarizability*). W warunkach doświadczalnych można ją wyznaczyć na podstawie interakcji cząsteczki z trzema różnymi typami eluentów: etanolem (silnie polarny donor protonów), dioksanem (słabo polarny donor protonów) i nitrometan (silnie polarny akceptor protonów).

Polarność = f [HBD + HBA + polaryzacja]



Ryc. Analiza współczynników rozdziału cząsteczki w analizie polarności i lipofilności.

Polarność jest więc cechą bardzo niejednorodną i określa tylko do pewnego stopnia charakter zachowań cząsteczki leku w żywym organizmie niż ściśle go definiuje. Wraz z lipofilnością decyduje o rozmieszczaniu leku w organizmie czyli jego dyspozycji oraz szybkości tego procesu w makroskali - skali całego organizmu. Większość leków to związki słabo polarne w przeciwieństwie do ich metabolitów. Większość metabolitów to związki polarne łatwo ulegające eliminacji drogą nerkową. Polarność jest więc w znacznym stopniu związana z okresem półtrwania w fazie eliminacji i eliminacją leku. Ze wzrostem polarności skraca się średni czas przebywania leku w organizmie. Silnie polarne leki nie pokonują niektórych barier specjalizowanych takich jak bariera krew/mózg. Znając wartość polarności i lipofilności leków można podzielić je na kilka klas:

- silnie polarne / słabo lipofilne
- polarne / silnie lipofilne
- silnie polarne / silnie lipofilne
- polarne / słabo lipofilne

Stosunek lipofilności (LogD) w zależności od stopnia dysocjacji, do polarności (P) decyduje o ukierunkowaniu dyspozycji leku w organizmie i steruje większością procesów kinetycznych. Decyduje o przepuszczalności dla układów błonowych w skali makro (Perm). Jest swego rodzaju kluczem kinetycznym leku. Zarejestrowane obecnie leki w zależności od stosunku między lipofilnością a polarnością podzielić można na trzy grupy w zależności od przewagi jednej grupy cech (LogP) nad drugą (P):

Perm = LogD > P Perm = LogD = P = Perm LogD < P = Perm

W przypadku dużych różnic w polarności i lipofilności wyrażonej jako LogD, Vd i przepuszczalność w skali makro a także MRT zwykle są zależne w większym stopniu od lipofilności albo od polarności. Polarność jest wypadkową wielu cech związku. Do pewnego stopnia opisuje ją całkowity moment dipolowy który wyraża stopień polaryzacji związku.

Rozpuszczalność w wodzie -Sw (ang.: *Water Solubility*):

Rozpuszczalność związku w wodzie jest jedną z podstawowych cech jakie kwalifikują substancję chemiczną do zastosowań leczniczych. Rozpuszczalność leku w wodzie powinna przekraczać wartość 52 μg/ml. Rozpuszczalność w wodzie jest funkcją trzech innych cech substancji chemicznej: krystalizacji, solwatacji i jonizacji.

$$\mathbf{Sw = |krystalizacja| + |solwatacja| + |jonizacja|}$$

Sw - rozpuszczalność w wodzie

Zdolność do krystalizacji charakteryzuje ciała stałe, stopień jonizacji opisuje elektrolity, natomiast solwatacja cechuje głównie leki neutralne i polarne. Wypadkowa wszystkich trzech cech decyduje o rozpuszczalności leku w wodzie. Zarówno organizm człowieka jak i zwierząt w większości składa się z wody. Rozpuszczalność wyrażona na przykład jako: 12 μg / ml oznacza że w 100 mililitrach wody można rozpuścić jedynie 1.2 mg substancji. Stąd dawka substancji powinna być mniejsza lub równa iloczynowi tak wyrażonej wartości rozpuszczalności (Sw) i objętości cieczy (V) w jakiej ulegnie rozpuszczeniu w obrębie organizmu lub poza nim. Jeżeli za krytyczną z punktu widzenia rozpuszczalności objętość płynu dla przewodu pokarmowego człowieka uznać równą 250 ml (Dressman J.B., Reppas C. 2000), to w optymalnych warunkach dawkowania i rozpuszczalności powinna zostać spełniona zasada:

$$\mathbf{250 > D / Sw} \qquad \mathbf{D < Sw \times V} \text{ lub } \mathbf{D = Sw \times V}$$

Stąd gdy Sw = 120 μg/ml a objętość w jakiej lek ma zostać rozpuszczony wynosi V= 250 ml. maksymalna masa substancji która ulegnie rozpuszczeniu może wynieść 120 μg x 250 ml = 30 mg (D). Wartość tego rodzaju obliczeń ma duże znaczenie w praktyce projektowania leków. Obecnie rozpuszczalność w wodzie określa tzw. liczba dawki DN (ang.: *Dose Number*). Można więc przyjąć że kompartment docelowy zawiera na przykład 5 ml płynu to znaczy że rozpuszczeniu ulegnie nawet 0.6 mg związku. Jeżeli wartość tą związemy z dawką jednorazową leku podaną dla przykładu *per os*, to może okazać się że dawka leku jest zbyt duża w stosunku do objętości w której ma ulec rozpuszczeniu. Łatwo więc przewidzieć czy lek powinien mieć raczej postać typowej tabletki (brak problemu z rozpuszczalnością), czy powinien zostać rozpuszczony przed połknięciem w określonej objętości wody (tabletka musująca).

Liczba dawki - DN jest narzędziem optymalizacji farmakokinetycznej i farmaceutycznej leku. DN jest to stosunek ilości leku podanego doustnie do maksymalnej ilości leku jaka rozpuszcza się w 250 ml mieszaniny, o składzie symulującym warunki wchłaniania (w pH 1-8), (Hendriksen B.A. i wsp. 2002). Zgodnie z wytycznymi WHO lek posiadający liczbę dawki mniejszą lub równą 1 jest uważany za dobrze rozpuszczalny w wodzie. Leki posiadające liczbę dawki większą od 1 uważa się za leki słabo rozpuszczalne w wodzie (Kasim N.A. i wsp 2003).

$$\mathbf{DN = (Ds / 250) / Sw}$$

Sw - rozpuszczalność w wodzie w mg/ml
Ds - moc dawki (ang.: *Dose Strength*)

Rozpuszczalność w wodzie i liczba dawki nie jest jedynym parametrem ujmującym rozpuszczalność jako narzędzie optymalizacji leku. Kolejnymi są liczba wchłaniania AN (ang.: *Absorption Number*) oraz liczba rozpuszczalności DiN (ang.: *Dissolution Number*). Liczba wchłaniania AN jest to stosunek średniego czasu przechodzenia cząsteczek leku przez badaną przestrzeń kinetyczną do stałej szybkości wchłaniania

AN = MRT / Ka lub **AN = MTT / Ka** lub **AN = MTT / MAT**

MTT - średni czas przechodzenia (lub obecności MRT) leku przez daną przestrzeń kinetyczną
MAT - średni czas absorpcji leku
MRT - średni czas przebywania leku w organizmie
Ka - stała szybkości wchłaniania

Stąd dla klasy leków których DN > 1 frakcja absorbowana - F to:

$$F = 1 - \exp(-2 \times AN)$$

Wraz z wydłużeniem czasu wchłaniania liczba wchłaniania maleje. Liczba ta maleje również wraz ze skróceniem czasu przebywania leku w badanej przestrzeni kinetycznej. Liczba rozpuszczalności DiN jest to stosunek średniego czasu przechodzenia cząsteczek leku przez badaną przestrzeń kinetyczną do stałej szybkości rozpuszczalności:

DiN = MRT / K(diss) lub **DiN = MRT / MdT**

MTT - średni czas przechodzenia (lub obecności MRT) leku przez daną przestrzeń kinetyczną
MdT - średni czas rozpuszczania leku
K(diss) - stała szybkości rozpuszczalności

Podobnie jak w przypadku DN wraz z wydłużeniem czasu rozpuszczania liczba rozpuszczalności maleje. Liczba ta maleje również wraz ze skróceniem czasu przebywania leku w badanej przestrzeni kinetycznej (Martinez M.N., Amidon G.L. 2002; Hendrixen B.A. i wsp. 2003). Rozpuszczalność leku w wodzie jest wypadkową jego polarności oraz lipofilności. Zależność między rozpuszczalnością w wodzie a współczynnikiem rozdziału oktanol / woda LogP(o/w) opisuje zależność:

LogSw = 1.17 - (1.38 x LogP(o/w)) skąd **LogP(o/w) = (1.17 - LogSw) / 1.38**

Lub dla słabych elektrolitów których lipofilność zależna jest od stopnia dysocjacji:

$$LogSw = -2.17 - 0.0082 \times LogP_{(o/w)} - 0.134 \times LogP_{(o/w)}^2$$

Leki podawane drogą doustną można więc podzielić na cztery grupy lub klasy w zależności od stopnia rozpuszczalności w wodzie - S (ang.: *Solubility*) oraz zdolności do pokonywania barier biologicznych - P (ang.: *Permeability*) (Pelkonen O. i wsp. 2001):

-o dużej rozpuszczalności i dużej przenikalności błon biologicznych
HS:HP (ang.: *High Solubility:High Permeability*)
-o małej rozpuszczalności i małej przenikalności błon biologicznych
LS:LP (ang.: *Low Solubility:Low Permeability*)
-o dużej rozpuszczalności i małej przenikalności błon biologicznych
HS:LP (ang.: *High Solubility:Low Permeability*)
-o małej rozpuszczalności i małej przenikalności błon biologicznych
LS:HP (ang.: *Low Solubility:High Permeability*)

Rozpuszczalność można obliczyć także dla ciał stałych dla których temperatura topnienia jest większa od 25 ^{0}C. W tym celu można posłużyć się wzorami:

$$Log(1/Sw) = 1.214 \times LogP_{(o/w)} - 0.85 + 0.0095 \times (T_m - 25)$$

$$LogSw = 0.8 - LogP_{(o/w)} - 0.01 \times (T_m - 25)$$

$$\mathbf{LogSw = 0.5 - LogP_{(o/w)} - 0.01 \times (Tm - 298)}$$

Tm - temperatura topnienia dla ciał stałych powyżej 25 ^{0}C (ang.: *Melting Temperature*)
Jeżeli w 25 ^{0}C substancja jest cieczą (Tm - 25) = 0

Obecnie najczęściej stosowaną metodą służącą do oznaczania rozpuszczalności związków jest nefelometria laserowa (Kariv I. i wsp 2002). Przeprowadza się także symulacje mające na celu wykrycie zależności pomiędzy rozpuszczalnością a różnymi parametrami fizykochemicznymi opisującymi cząsteczkę. Narzędziem obliczeniowym są w tym wypadku sieci neuronowe (Engkvist O., Wrede P. 2002). Przyjmuje się że rozpuszczalność wyrażona jako LogSw poniżej -5 charakteryzuje związki nierozpuszczalne. Wartości pomiędzy -5 a -3 charakteryzują związki średnio rozpuszczalne. Natomiast wartości powyżej -3 charakteryzują substancje bardzo łatwo rozpuszczalne. Na każdym etapie ADME duże znaczenie odgrywa rozpuszczalność związku która zależna jest między innymi od pH. Stąd w celu obliczenia rozpuszczalności S przy określonym pH skorzystać można z równań:

Dla słabych kwasów:

$$\mathbf{S_{(pH,A)} = S_{(A)} \times (1 + 10^{pH,A-pKa})}$$

Dla słabych zasad:

$$\mathbf{S_{(pH,B)} = S_{(B)} \times (1 + 10^{pKa-pH,B})}$$

Dla związków amfifilowych:

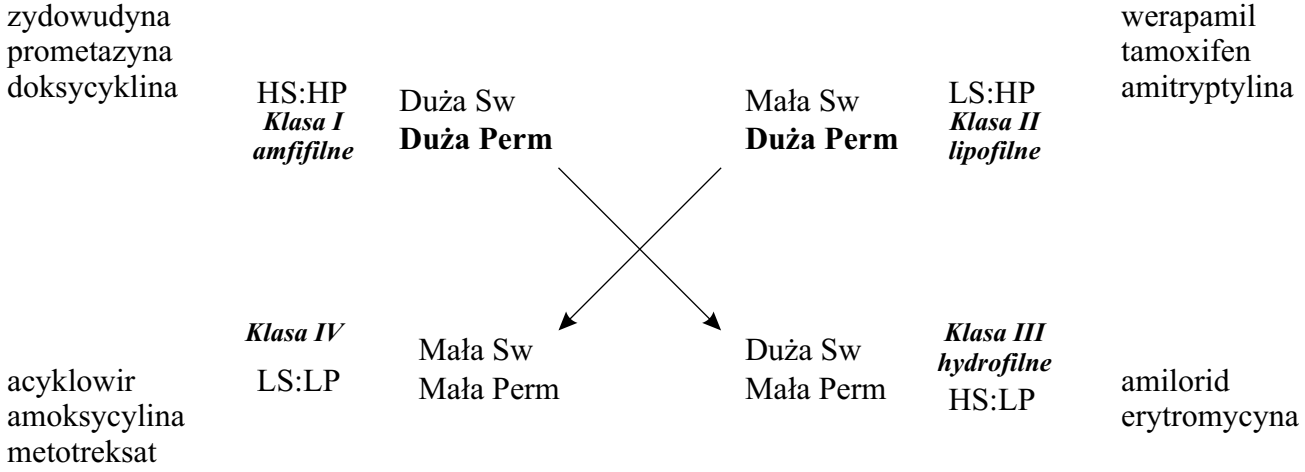
$$\mathbf{S_{(pH,AB)} = S_{(AB)} \times (1 + 10^{pH,A-pKa2} + 10^{pKa1-pH,B})}$$

S(pH,A) - rozpuszczalność kwasu przy danej wartości pH
S(pH,B) - rozpuszczalność zasady przy danej wartości pH
S(A) - rozpuszczalność kwasu
S(B) - rozpuszczalność zasady

W warunkach szerokich granic pH w jakich lek ma ulegać rozpuszczaniu oblicza się tzw. współczynnik rozpuszczalności. W przypadku kwasów nosi nazwę współczynnika rozpuszczalności kwasu ASF (ang.: *Acid Solubility Factor*), (HendriksenB.A. i wsp. 2002).

$$\mathbf{ASF = (S_{(L)} / S_{(H)}) \times (1 + 10^{pKa-pH})}$$

S(L) - rozpuszczalność w dolnej granicy pH
S(H) - rozpuszczalność w górnej granicy pH
pH - dla górnej granicy pH



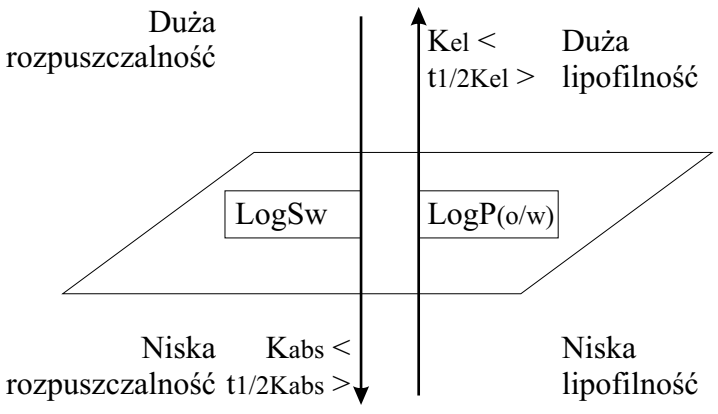
Rys. Związek między rozpuszczalnością, przepuszczalnością a lipofilnością leków - biofarmaceutyczny podział leków.

Stosunek wartości rozpuszczalności substancji w wodzie do wartości współczynnika rozdziału LogP(o/w) ma wpływ na wchłanianie i eliminację leku. Zwykle wysoka wartość LogP(o/w) wiąże się z określonymi cechami kinetyki leku (Jorgensen W.L., Duffy E.M. 1994; Proost J.H. i wsp. 1997; Lombardo F. i wsp 2000; Waterbeemd H. i wsp. 2001). Najważniejsze to między innymi:

- wzrost dostępności biologicznej leku
- większa aktywność wewnętrzna substancji
- wzrost stopnia wiązania z białkami
- wzrost objętości dystrybucji leku
- zwiększony klirens wątrobowy
- słaba rozpuszczalność w wodzie

Od każdej z tych cech istnieje jednak cała gama wyjątków. Przykładem jest wpływ lipofilności związku na wydzielanie substancji wraz z żółcią. Niekiedy nie jest on obserwowany lub opisywany jako czynnik zmniejszający wydalanie wraz z żółcią (Proost J.H. i wsp. 1997). Najczęściej jednak istnienie takiej zależności potwierdza się. Za powód braku takiej zależności w niektórych przypadkach podaje się konkurencję o systemy transportujące w obrębie woreczka żółciowego i przewodów żółciotwórczych. Przy skrajnie wysokich wartościach lipofilności związku transport przez ściany komórkowe słabnie. Efekt ten związany jest z tendencją do kumulacji substancji w lipofilnej części błon biologicznych. Podobnie w przypadku skrajnie silnych amfifili. W tym wypadku przyczyną jest silna absorpcja na powierzchni błon (Balaz S., Lukacova V. 2002). Jednym z najważniejszych rozpuszczalników w technologii pozyskiwania nowych leków, stosowanym szeroko w analizie typu HTS oraz w licznych próbach stabilnościowych, a także przechowywaniu substancji czynnych jest DMSO (Balakin K.V. i wsp. 2004). Zaledwie około 1/6 leków nie jest rozpuszczalna w DMSO. Świadczy to o uniwersalności rozpuszczalnika a co za tym idzie standardowego medium dla związków o bardzo różnej budowie, ładunku lipofilności etc..

Analiza rozpuszczalności, zdolności do penetracji błon biologicznych, oraz lipofilności dala podstawy do stworzenia biofarmaceutycznej klasyfikacji leków - BCS (ang.: *Biopharmaceutical Clasification System*). Podstawowym założeniem w tym systemie jest uznanie rozpuszczalności za podstawową cechę modulującą procesy absorpcji a co za tym idzie dostępność biologiczną itd.. Aby lek mógł być wchłaniany w wysokim procencie musi dobrze rozpuszczać się w miejscu deponowania w organizmie. Dotyczy to również leku lipofilnego. Wzrost lipofilności wiąże się więc zwykle z wydłużeniem okresu półtrwania (maleje wartość Kel). Wzrost rozpuszczalności wiąże się najczęściej ze skróceniem fazy wchłaniania (rośnie wartość Ka). Na obie wartości i ich wzajemne odniesienie wpływa pH kompartmentu w którym następuje wchłanianie, pKa substancji, wolna energia solwatacji, elektroujemność i wiele innych czynników związanych z chemizmem tego procesu. Optymalizacja postaci leku zmierza do uzyskania związku o pożądanej lipofilności (LogD dla danego pH) przy wysokiej wartości rozpuszczalności.



Ryc. Związek między lipofilnością a rozpuszczalnością leku.

Lipofilność - efektywny współczynnik rozdziału oktanol/woda - $LogD^{7.4}$.

Stopień lipofilności leku częściowo zjonizowanego opisuje LogD. Wyraża on współczynnik rozdziału między wodnym buforem o pH równym 7.4 a n-oktanolem (Lombardo F. i wsp 2001). Parametr ten ma szczególne znaczenie dla słabych elektrolitów których stopień jonizacji zależny jest od pH środowiska. LogD jest więc pochodną LogP która opisuje w sposób praktyczny lipofilność w zależności od stopnia dysocjacji. Wartość LogD jest efektywną wartością rozdziału oktanol / woda obejmującą stopień jonizacji związku. LogD zależny jest dla słabych elektrolitów od stopnia zdysocjowania i pH środowiska w jakim znajduje się cząsteczka. Stosunek LogD do LogP(o/w) opisują równania:

Dla słabych kwasów:

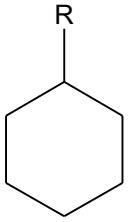
$$\mathbf{Log\ D_{(A)} = Log\ P_{(o/w)} - Log(1 + 10^{pH-pKa})}$$

Dla słabych zasad:

$$\mathbf{Log\ D_{(B)} = Log\ P_{(o/w)} - Log(1 + 10^{pKa-pH})}$$

Wysokie wartości Log D charakteryzują substancje poddawane procesom metabolicznym w ramach rodziny enzymów P-450. Niskie wartości LogD są charakterystyczne dla leków o niskim klirensie nerkowym i wysokim klirensie wynikającym z procesów metabolicznych. Zwykle związki silnie lipofilne wykazują znaczna zmienność niektórych parametrów farmakokinetycznych. Związki hydrofilne zwykle cechuje zmienność na niższym poziomie. LogP opisuje lipofilność związku niezjonizowanego. Obecnie wartość LogP obliczana jest za pomocą oprogramowania bazującego na wytyczaniu korelacji o jak największym stopniu dopasowania. Algorytmy stosowane w różnych programach zbudowane są zwykle na podstawie różnych grup testowych. Różnych pod względem ilości oraz rodzaju wybranych leków. Stąd pewne różnice w obliczeniach wykonanych za pomocą różnych programów. W piśmiennictwie znaleźć można wiele różnych akronimów na określenie współczynnika rozdziału oktanol woda. W zależności od zastosowanego algorytmu i producenta oprogramowania są to między innymi:

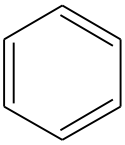
LogP	ALogP	KOWIN
CLogP	LogKOW	XLogP
MiLogP	ACDLogP	QLogP



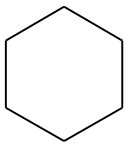
R -	MiLogP	CLogP	LogKOW	tPSA
NH_2	1.134	1.37	1.63	26.02
O	1.521	0.87	1.13	17.07
$N(CH_3)_2$	1.667	2.05	2.31	3.23
$NHCH_3$	1.719	1.51	2.10	12.02
OH	1.828	1.27	1.64	20.22
COOH	1.482	1.84	2.36	37.30
OCH_3	2.380	1.98	2.34	9.23
H	2.588	3.35	3.18	0.0
CH_3	2.964	3.87	3.59	0.0
Cl	3.009	3.19	3.36	0.0
Br	3.244	3.33	3.45	0.0
CH_2CH_3	3.398	4.40	4.08	0.0

Ryc. Wpływ różnych podstawników przyłączonych
do pierścienia na różnice wartości współczynnika rozdziału oktanol woda
w zależności od zastosowanego algorytmu (MiLogP; LogKOW,CLogP) i tPSA.

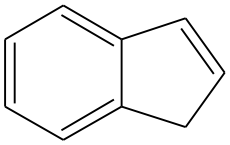
MiLogP = 1.894



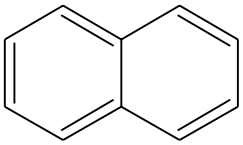
MiLogP = 2.128



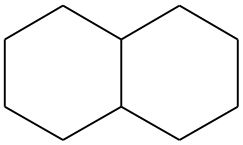
MiLogP = 2.588



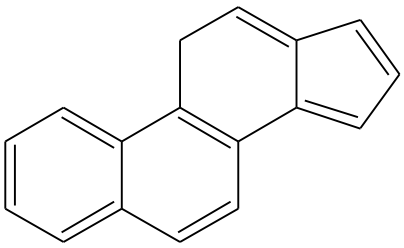
MiLogP = 3.118



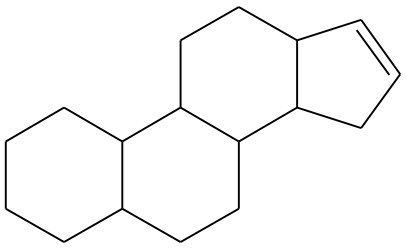
MiLogP = 3.419



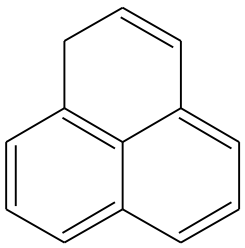
MiLogP = 3.676



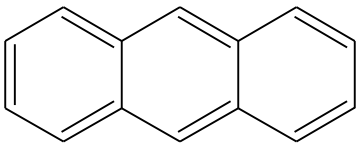
MiLogP = 4.217



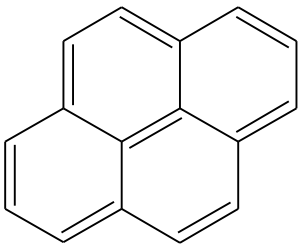
MiLogP = 4.738



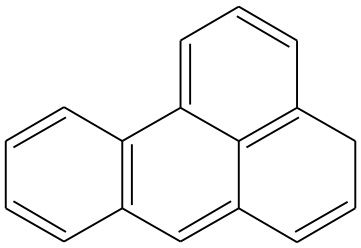
MiLogP = 4.409



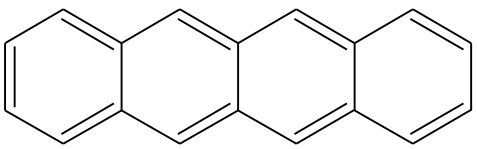
MiLogP = 4.709



MiLogP = 5.359

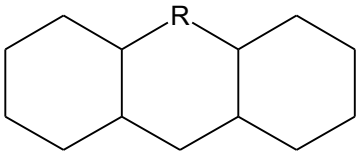


MiLogP = 5.699



MiLogP = 6.00

Ryc. Wpływ liczby pierścieni i wiązań nienasyconych na lipofilność leku.



R -	MiLogP	tPSA
CH-Br	4.980	0.0
S	4.714	0.0
CH_2	4.544	0.0
O	3.824	9.2
NH	2.907	12.0

Ryc. Wirtualny model obrazujący wpływ czterech różnych podstawników w obrębie pierścienia na charakter zmian MiLogP i tPSA.

Podstawowe metody obliczeniowe umożliwiające określenie lipofilności substancji to metody (Renxiao W. i wsp. 2000):

- analizy fragmentów struktury
  PROLOGP; SYBYL; SANALOGP; CLOGP; KLOGP; KOWWIN; CHEMICALC-2

- analizy na podstawie składu atomowego
  MOLCAD; Tsar; SIMLOGP; XLOGP

- analizy konformacji zwiazku
  HINT; ASCLOGP

	LogKOW	CLogP	MiLogP	ALogP	XLogP
moksydektyna	6.70	7.18	6.18	5.29	3.01
doramektyna	5.26	5.68	6.00	4.32	3.08
iwermektyna	4.61	5.39	5.69	4.37	2.84
milbemycyna b	4.58	4.59	4.27	4.57	1.70
dimadektyna	4.45	4.92	4.85	4.55	1.97
eprinomektyna	4.44	4.79	4.89	3.90	1.92
awermektyna	4.11	4.86	5.25	4.04	2.27

Ryc. Zestawienie różnic w analizie współczynnika rozdziału oktanol woda obliczonego z zastosowaniem kilku różnych algorytmów.

Stosowanie różnych algorytmów i różnych programów obliczeniowych w celu wyznaczenia LogP zawsze wskazywać będzie na pewne różnice w wyniku. Powodem tego jest stosowanie różnych grup leków w grupie na której wytworzono i przetestowano algorytm (ang: *Training Set*). Algorytmy takie tworzone są również w oparciu o różną ilość związków testowych. Na przykładzie pochodnych iwermektyny stwierdzić można niewielkie różnice pomiędzy LogKOW, ClogP, MiLogP oraz AlogP. Jednak znacznie odbiega od średniej uzyskanej z a pomocą tych algorytmów wynik uzyskany w wyniku obliczenia XLogP. Pomiędzy różnego typu algorytmami wyznacza się zależności na przykład dla MiLogP i CLogP, oraz pomiędzy współczynnikiem rozdziału chloroform woda a LogP oktanol/ woda (Selassie C.D. 2003).

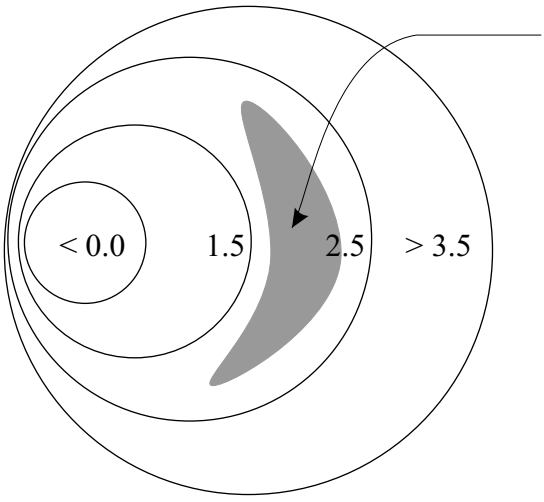
$$\textbf{MiLogP = 0.959 x CLogP + 0.08} \qquad n = 12107 \quad r^2 = 0.973$$

$$\textbf{LogP}_{\textbf{(chloroform/woda)}} \textbf{= 1.012 x LogP}_{\textbf{(oktanol/woda)}} \textbf{- 0.513} \qquad n = 72 \quad r^2 = 0.811$$

LogP wyrażony jako współczynnik rozdziału oktanol / woda jest parametrem bardzo niejednorodnym. Niesie ze sobą bardzo złożoną informacje na temat możliwości osiągania przez cząsteczki leku różnych przestrzeni organizmu. O ile hydrofilność jest parametrem bardzo dokładnie definiowanym jako zdolność związku do rozpuszczania się w wodzie to lipofilność wyrażona jako LogP(o/w) wymaga bardziej złożonych objaśnień. Przykładem substancji skrajnie lipofilnych są np.

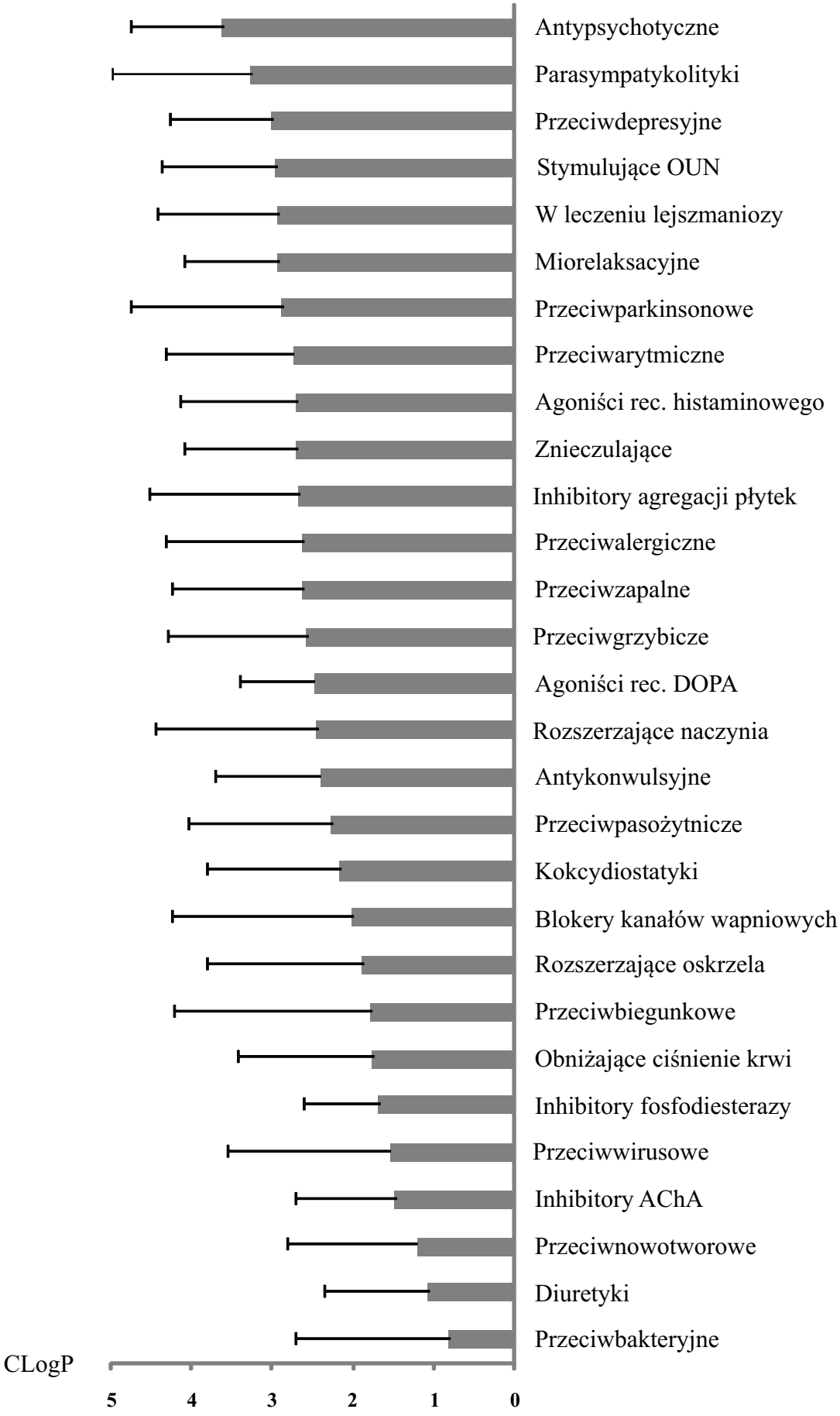
	LogKOW
- ubichinon	16.5
- zeaksantyna	14.9
- kantaksantyna	14.1
- astaksantyna	13.3
- sfingomielina	10.9
- alfa tokoferol	9.9
- montelukast	8.4

Hydrofilność jest parametrem który opisuje stopień rozpuszczalności w wodzie. Współczynnik rozdziału oktanol / woda nie opisuje jednak rozpuszczalności w tłuszczach lecz w oktanolu. Jest więc pochodną o bardziej złożonym charakterze. Korelacja między rozpuszczaniem się substancji w oktanolu i tłuszczach jest bardzo wysoka. Jednak złożony charakter parametru jakim jest współczynnik rozdziału oktanol woda nie zawsze daje możliwość prostej interpretacji kinetyki leku na podstawie tak opisanej lipofilności. Wynika to z faktu że o ile hydrofilność to zjawisko rozpuszczania leku w wodzie to na wyrażenie lipofilności składa się hydrofilność - czyli możliwość rozpuszczania się w wodzie i polarność wyrażona sumą interakcji pomiędzy cząsteczka leku a nitrometanem, etanolem i dioksanem. Problem bezpośredniego odniesienia współczynnika lipofilności do rzeczywistego układu doświadczalnego związany jest z brakiem ściśle opisanej matrycy - substancji która jest "standardem" tłuszczu żywego organizmu tak jak jest w przypadku hydrofilności i wody. Oczywiście na hydrofilność również duży wpływ ma polarność jednak można ten parametr uściślić nadal stosując to samo medium - wodę. W przypadku lipofilności wyrażonej jako LogP(o/w) nie jest to do końca możliwe. Wynikiem tego jest ograniczona możliwość wnioskowania o rozmieszczaniu leku w tłuszczach jedynie na podstawie lipofilności wyrażonej jako współczynnik rozdziału oktanol / woda. Można więc powiedzieć że leki lipofilne zwykle cechuje:



LogP/LogD < 0 dobra rozpuszczalność w wodzie
LogP/LogD > 1.5 lecz < 2.5 wartość optymalna z punktu widzenia e-ADME
LogP/LogD > 3.5 dobra rozpuszczalność w tłuszczach

Ryc. Kierunek optymalizacji wartości stosunku LogP/LogD w projektowaniu e-ADME.



Ryc. Średnia wartość CLogP w obrębie wybranych grup leków (n = 1945 substancji), (Analiza na podstawie bazy danych TerraBase Inc. 1996-2008).

- duża objętość dystrybucji długi okres półtrwania , oraz długi MRT
- niski stopień wydalania wraz z moczem
- duży stopień wiązania z białkami
- znaczne powinowactwo do P-gp oraz białek w obrębie CYP
- niska polarność
- znaczny udział metabolizmu wątrobowego
- większa zmienność międzyosobnicza parametrów PK

Lecz nie zawsze będzie mógł na to wskazać jedynie współczynnik rozdziału oktanol / woda. Stosunek LogP do LogD jest przedmiotem analizy w trakcie optymalizacji leków w fazie przedklinicznej. Problem optymalizacji rozpuszczalności leku w obrębie tkanek i przestrzeni organizmu przy jednocześnie optymalnej wartości lipofilności, rozwiązuje często właściwy dobór soli dla substancji lecznicze w przypadku klasycznych leków niskocząsteczkowych. Stąd testuje się często całe szeregi soli w odniesieniu do jednej substancji czynnej w celu właściwego "cofania" dysocjacji. Działanie takie pozwala na uzyskanie odpowiedniej postaci krystalicznej czy uzyskanie również oczekiwanej kinetyki rozpuszczania na przykład w obrębie przewodu pokarmowego.

	LogP	tPSA
fosforan sodowy prednizolonu	-4.84	147
celobiozyd prednizolonu	-0.56	147
prednizolon	1.63	94.8
octan prednizolonu	2.4	100.9
sól sodowa ampicyliny	-3.41	115.5
ampicylina	1.35	112.7
	LogKOW	PSA
ketokonazol	4.45	82.2
oleinian ketokonazolu	12.09	73.2

Właściwości fizykochemiczne a przepuszczalność - Perm (ang.: *Permeability*).

Przepuszczalność jest parametrem mówiącym o szybkości z jaką cząsteczki leku pokonują błonę lub układ błon biologicznych. Jest funkcją dwóch podstawowych cech fizjochemicznych leku wielkości cząsteczki i zdolności do przyłączenia protonu (Ponce Y.M. i wsp. 2003). Jest wielkością która odnosi się do wielu parametrów farmakokinetycznych mierzalnych metodami *in vivo*. Jej wartość można odnieść wprost do takich parametrów i zjawisk jak:

- stała szybkości wchłaniania leku
- stałe szybkości transportu pomiędzy przestrzeniami biofazy
- średni czas przechodzenia leku przez przestrzenie biofazy
- dostępność biologiczna leku
- osiąganie przestrzeni docelowej

Optymalna wartość przepuszczalności błony przy zoptymalizowanych parametrach podania leku (odpowiednia postać leku, przestrzeń podania, pH kompartment podania, pK leku etc.) gwarantuje dynamiczną dyspozycję leku w w organizmie.

Przepuszczalność w warunkach *in vitro* badana jest najczęściej na hodowlach komórkowych lub sztucznych układach błonowych. Typowe rozwiązania dotyczące sztucznych układów błonowych to IAM (ang.: *Immobilized Artificial Membranes*) lub PAMPA (ang.: *Artificial Membrane Permeation Assay*). Badania na hodowlach komórkowych pozwalają między innymi opisać reaktywność leku w stosunku do P-gp. Pozwala także na śledzenie wpływu aktywnych układów transportujących na transfer błonowy leków. Obecnie stosuje się wiele algorytmów ilustrujących przepuszczalność standaryzowanych linii komórkowych *in silico*. Zależność między przepuszczalnością (ang.: *Permeability*) błony zbudowanej na bazie Caco-2 a PSA ilustruje równanie:

$$\mathbf{Perm_{(Caco\text{-}2)} = - 0.008 \times MW - 0.043 \times PSA - 5.165}$$

$$\mathbf{Perm_{(Caco\text{-}2)} = - 0.008 \times MW - 0.043 \times (- 0.85 + 8.6 \times HBD + 12.4 \times HBA) - 5.165}$$

Właściwa przepuszczalność błon biologicznych charakteryzująca lek gwarantuje odpowiednią penetrację tkanek. Obecnie przepuszczalność leku w powiązaniu z jego rozpuszczalnością klasyfikuje się w czterech grupach (Dressman J.B., Reppas C. 2000; Avdeef A. 2001). Podział zależny jest od stopnia lipofilności oraz rozpuszczalności, a wypadkową obu właściwości jest odpowiednia wartość przepuszczalności dla błon biologicznych. Obecnie za wartości słabej przepuszczalności dla błony zbudowanej na bazie Caco-2 uważa się poziom ok. 20×10^{-6} cm/s, średnia wartość to ok $20 - 80 \times 10^{-6}$ cm/s, natomiast wysoką przepuszczalność cechuje wartość powyżej 80×10^{-6} cm/s (Testa B. i wsp. 2001). Standardowe analizy szybkości przechodzenia przez sztuczne układy błonowe wykonywane są także na komórkach linii MDCK (ang.: *Madin-Darby Canine Kidney Cells*). W przypadku błony wytworzonej na bazie takich komórek za niską przepuszczalność przyjmuje się wartości poniżej 2.5×10^{-6} cm/s natomiast dużą przepuszczalność cechuje substancje o szybkości powyżej 50×10^{-6} cm/s (Irvine J.D. i wsp. 1999).

Duże znaczenie dla zjawisk transportu przez układy błonowe ma obecność i średnica jaką posiadają obecne w niej pory. *In vivo* jest to jedna z ważniejszych dróg transportu leków hydrofilnych w organizmie. W przypadku drobnych naczyń krwionośnych ich średnica i liczba najczęściej uzależniona jest od funkcji organów lub tkanek jakie zaopatrują.

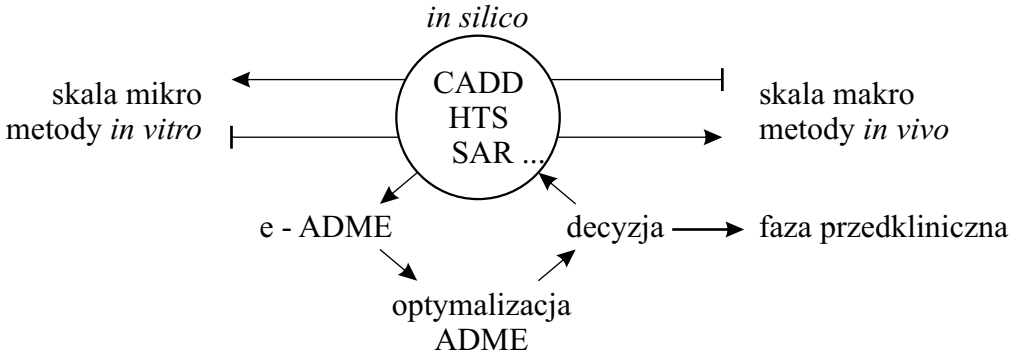
Pory:	nabłonek jelita cienkiego	< 8 A
	kapilary w obrębie mięśni	< 60
	kapilary kłębuszka nerkowego	< 100
	kapilary w obrębie wątroby	< 1000

Ryc. Pory i ich średnica w różnych tkankach.

Linie komórkowe które pozwalają na badania przepuszczalności błon biologicznych w układach *in vitro* dostępne są także w postaci zmodyfikowanej. Błona tego typu może na przykład zawierać komórki ze specyficznym układem transportowym lub glikoproteiną P.

Optymalizacja PK *in silico*.

Jeszcze bliższa typowym rozważaniom farmakokinetycznym jest symulacja wartości wybranych parametrów farmakokinetycznych na podstawie analizy budowy chemicznej związku. Przykładem może być zależność między PK a lipofilnością wyrażoną jako Log P(o/w) oraz masą cząsteczkową MW. W przypadku tego rodzaju analiz parametry związków chemicznych wytypowanych do skalowania można poddać normalizacji korzystając z cech gwarantujących najlepsze dopasowanie do modelu. Uzupełnieniem i drogą do uzyskania równań zależności są również przekształcenia logarytmiczne i wielomianowe. Dwuwymiarowe obrazowanie zależności nie zawsze jest jednak możliwe do osiągnięcia. Strategia obliczeń których dane obejmują parametry fizykochemiczne leku a w tym przypadku określane także jako parametry fizjochemiczne (ang.: *Physiochemical Parameters*) jest złożona. Z jednej strony zależności między pojedynczymi parametrami fizjochemicznymi a farmakokinetycznymi jest najczęściej trudna do uchwycenia. Z drugiej strony metody skalowania i transformacji danych często przedstawiają trudne do interpretacji równania. Przyczyna trudności w określaniu zależności pomiędzy parametrami fizjochemicznymi a parametrami farmakokinetycznymi wynika ze złożoności oddziaływań chemicznych jakim cząsteczka leku podlega *in vivo*. Nie stanowią one bowiem prostych procesów lecz zwykle łączą w często przeplatające się wielokrotnie zjawiska transportu, metabolizmu, łączenia z białkami i inne. U podstaw każdej fazy kinetycznej leży duża liczba zupełnie różnych reakcji chemicznych i biochemicznych. Stąd rzadko w sytuacji tak złożonych losów leku w organizmie, jeden parametr fizykochemiczny będzie wykazywał znaczną korelację z parametrem farmakokinetycznym opisującym skutek wielu zjawisk natury chemicznej. Znanych jest wiele przykładów prób skalowania parametrów farmakokinetycznych z danych jakimi są parametry fizjochemiczne na przykład frakcji leku związanej z białkami i objętości dystrybucji (Lombardo F. i wsp. 2002). Jednak nie zawsze gwarantują one zadowalające efekty bez użycia metod wstępnej transformacji danych (Kratochwil N.A. i wsp 2002). Powoduje to zwykle zmniejszenie wartości współczynnika korelacji Pearson'a poniżej 0.900. Szczególne znaczenie mają powstające obecnie metody wstępnej transformacji danych dotyczących grupy badanych cech substancji. Dopiero po przygotowaniu danych wyjściowych dokonuje się prób odnalezienia korelacji np. z parametrami farmakokinetycznymi *in vivo* lub *in vitro*. Jednym ze sposobów przetwarzania danych wyjściowych może być także molekularny *fingerprint* badanego związku (ang.: *Molecular Fingerprint*), (Bajorath J. 2002). Obecnie w ramach selekcji wirtualnej metody obliczeniowe SAR łączy się z innymi technikami farmakometrycznymi bazując na nowoczesnych rozwiązaniach informatycznych (Bartzatt R. i wsp. 2003; Veselovsky A.V., Ivanov A.S. 2003). Dotyczy to między innymi łączenia ich z algorytmami genetycznymi, implementując powstałe technologie obliczeniowe w obrębie sieci neuronowych (Godden J.W. i wsp. 2003). Techniki takie pozwalają w grupie związków odnaleźć subpopulacje i opisać ich przydatność do dalszych badań. Przedmiotem analizy cech wspólnych wielu grup związków staje się idea wyodrębniania subpopulacji bez użycia obliczeń opartych na średniej arytmetycznej. Narzędziem jest szybkie przetwarzanie danych o lekach, zgrupowanych w dużych bazach danych - HTS (ang.: *High Throughput Screening*).



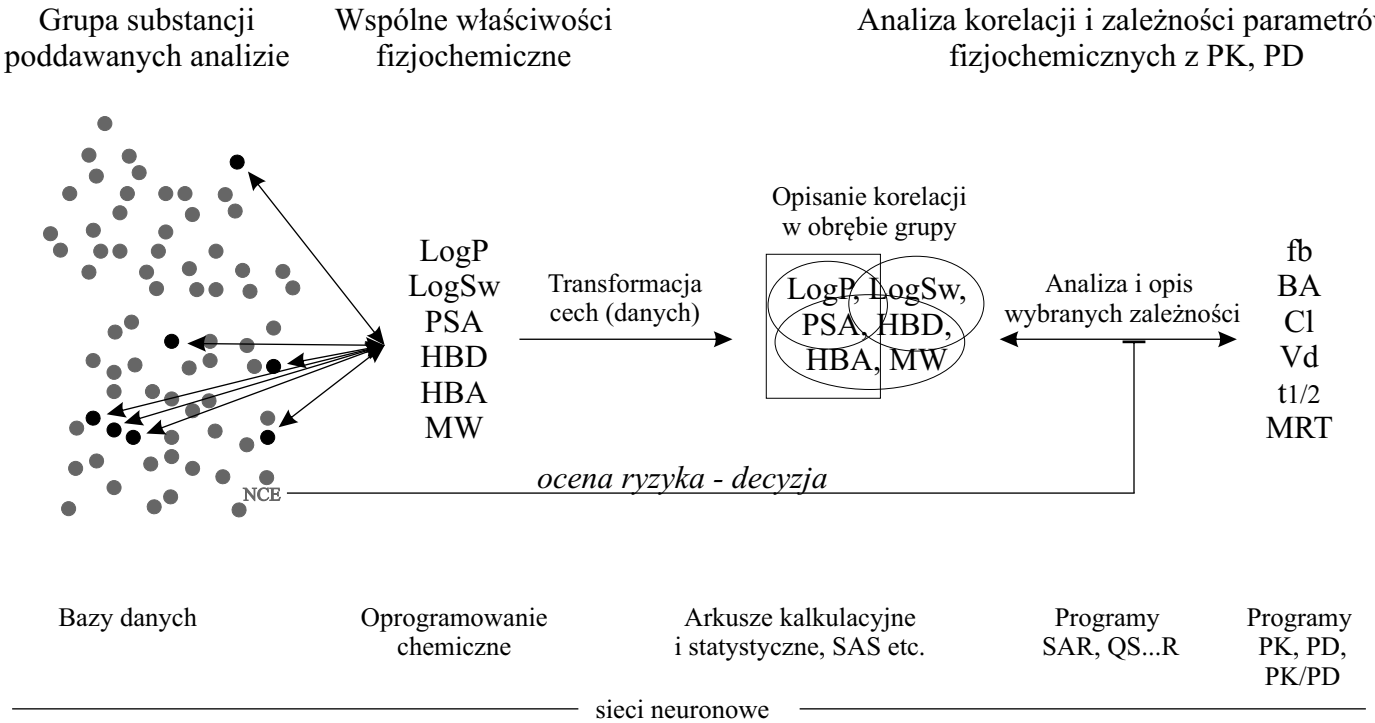
Rys. Miejsce metod obliczeniowych wspomagających projektowanie leków.

Umożliwia to szybkie określanie korelacji pomiędzy wybranymi cechami, oraz wychwytywania cech struktur farmakoforowych (Tomoko N. 2003). W chwili obecnej istnieje wiele technik komputerowego "wspomagania" projektowania leku w fazie przedklinicznej określanych wspólnym skrótem - CADD (ang.: *Computer Aided Drug Design; Computer Aassisted Drug Design*), (Waterbeemd H. i wsp. 1998).

Taka metodyka i miejsce badań wymaga dwutorowego podejścia do właściwych analiz farmakokinetycznych. Optymalizacja farmakokinetyczna w fazie projektowania leków w badaniach przedklinicznych przebiega dwoma torami. W skali makro, dotyczącej organizmu kierunek analiz zmierza od organizmu, poprzez organy do celu jakim jest pojedyncza komórka lub białko. W skali molekularnej kierunek jest odwrotny. Ma to swoje odbicie we wzajemnym uzupełnianiu wyników analizami PK *in vivo* i *in vitro*. Ukierunkowanie w tym względzie wymaga metod odpowiednich dla danego etapu. W ramach takiego postępowania kluczową funkcję pełnią specjalistyczne techniki obliczeniowe. Najnowocześniejsze obecnie techniki obliczeniowe obejmują swym zasięgiem cztery podstawowe kierunki:

- zależności budowa związku - właściwości QSPR (ang.: *Quantitative Structure-Property Relationship*)
- zależności budowa związku - aktywność QSAR (ang.: *Quantitative Structure-Activity Relationship*)
- zależności budowa związku - metabolizm QSMR (ang.: *Quantitative Structure-Metabolism Relationship*)
- zależności budowa związku - metabolizm QSTR (ang.: *Quantitative Structure-Toxicity Relationship*)

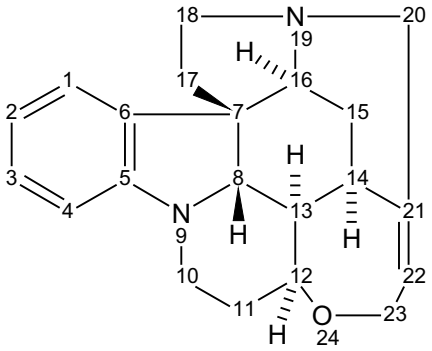
Dodatkowe modyfikacje tych metod obejmują modelowanie wielowymiarowe: 3D, 4D lub 5D. Wielowymiarowe metody poszukiwania korelacji pozwalają na precyzyjne opisanie grup farmako i toksykoforowych. Zapewnia to prowadzenie selekcji wirtualnej nowych substancji chemicznych - NCE oraz weryfikację wielu starszych leków. Duże znaczenie dla rozwoju metod szybkiej analizy danych w technikach HTS i SAR ma kodowanie informacji o budowie chemicznej. W chwili obecnej najczęściej prezentowanym liniowym kodem opisującym budowę chemiczną jest kod SMILES (ang.: *Simplified Molecular Input Entry System*), (Waterbeemd H. i wsp. 1998).



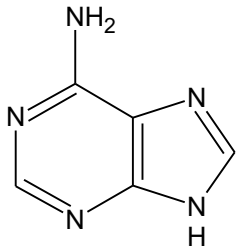
Rys. Schemat optymalizacji we wczesnej fazie badań nad nowymi lekami.

Jednym z prostszych schematów szybkiej analizy typu SAR jest przekształcenie informacji o cząsteczce do zapisu SMILES i poddania go dalszej obróbce za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Tego typu profil farmakokinetyczny (e-ADME) tworzy kilka podstawowych etapów, podobnie jak w klasycznej analizie:

- CAS (ang.: *Chcemical Abstract Service Number*), lub wzór chemiczny
- SMILES
- obliczenia e -ADME
- wnioskowanie dotyczące prognozowania losów leku w organizmie



strychnina



witamina B4

strychnina; SMILES: c1ccc4c(c1)[C@@]32CCN7C2CC\6C5[C@@H]3N4CCC5OC/C=C/6C7
witamina B4; SMILES: c12c(ncn1)ncnc2N

Rys. Przykład liniowego zapisu typu SMILES wzorów chemicznych.

Analizę e-ADME umożliwia wiele obecnych na rynku programów komputerowych. Po wprowadzeniu kodu SMILES najczęściej umożliwiają one natychmiastowe uzyskanie wyników dotyczących badanej cząsteczki. Podstawowe parametry jakie badane są we wstępnej analizie SAR dotyczą zwykle analizy takich parametrów jak tPSA, PSA, LogP(o/w), LogSw etc. Poniżej przedstawiono parametry skróconej analizy kilku wybranych związków:

	kod SMILES
geraniol	C(=C(/CC\C=C(\C)C)C)/CO
metronidazol	c1c(n(c(n1)C)CCO)[N+]([O-])=O
ibuprofen	c1(ccc(cc1)CC(C)C)C(C)C(O)=O
propranolol	c12ccccc2cccc1OCC(CNC(C)C)O
myrtekaina	C=1(C2C(C(CC=1)C2)(C)C)CCOCCN(CC)CC
amoksycylina	C1(C(N2C1SC(C2C(=O)O)(C)C)=O)NC(C(c3ccc(cc3)O)N)=O
minocyklina	c21c(ccc(c1C(C=3C(C2)CC4C(\C(=C(/C(C4(C=3O)O)=O)C(=O)N)O)N(C)C)=O)O)N(C)C
tetrandryna	c21CCN(C6c1cc(c(c2)OC)Oc3c4C(N(CCc4cc(c3OC)OC)C)Cc5cc(c(cc5)OC)Oc7ccc(C6)cc7)C
taxoter	C\1C3(CC(/C(=C/1CC(C(C2C(CC5C(C2C3OC(=O)c4ccccc4)(OC(=O)C)CO5)O)=O)O)C)OC(C(O)C(NC(=O)OC(C)(C)C)c6ccccc6)=O)O

© Grabowski T., Biofarmacja i Farmakokinetyka

		geraniol	metronidazol	ibuprofen	propranolol	myrtekaina	amoksycylina	minocyklina	tetrandryna	taxoter	
Masa cząsteczkowa	Da	154,2	171,2	206,3	259,3	265,4	365,4	457,5	622,8	779,8	a)
Refrakcja molowa		49,7	41,0	60,8	79,0	81,8	91,5	116,0	178,1	195,9	a)
Objętość molowa		177,9	117,8	200,3	237,1	285,1	236,2	294,5	531,1	553,5	a)
Parachor		413,5	328,6	497,6	606,1	674,7	717,9	907,3	1350,3	1596,0	a)
Współczynnik refrakcji		1,470	1,612	1,518	1,580	1,485	1,701	1,717	1,585	1,625	a)
Napięcie powierzchniowe	dyna/cm	29,1	60,4	38,0	42,6	31,3	85,3	90,0	41,7	69,1	a)
Gęstość	g/cm	0,866	1,450	1,029	1,093	0,930	1,540	1,550	1,172	1,400	a)
Polaryzacja		19,7	16,2	24,1	31,3	32,4	36,3	46,0	70,6	77,7	a)
R (rugosity)		0,493	0,365	0,504	0,523	0,575	0,533	0,511	0,602	0,593	b)
CI (cohesive index)		0,003	0,019	0,005	0,009	0,000	0,040	0,043	0,000	0,036	b)
G (globularity)		2,36	2,78	2,40	2,45	2,37	2,40	2,69	2,78	2,86	b)
MiLogP		3,3	-0,3	3,3	3,3	3,6	-0,6	-2,3	5,0	3,7	c)
LogP(o/w)		3,6	0,0	4,0	3,5	4,6	1,0	-0,1	7,6	2,0	e)
SR		4,4	2,1	4,6	4,3	5,1	2,7	2,0	7,0	3,4	b)
LogSw		-2,8	-0,8	-3,7	-3,1	-4,1	-2,0	-3,8	-10,4	-6,6	e)
tPSA	A^2	20,2	83,9	37,3	41,5	12,5	133,0	164,6	61,9	224,5	c)
PSA	A^2	57,3	164,9	86,4	35,8	10,1	252,1	214,4	64,7	205,4	d)
SASA	A^2	360,9	323,0	397,3	453,0	495,6	443,4	575,8	882,3	934,0	d)
fPSA	%	15,9	51,1	21,7	7,9	2,0	56,9	37,2	7,3	22,0	e)
HBA		1,0	6,0	2,0	3,0	2,0	8,0	10,0	8,0	15,0	c)
HBD		1,0	1,0	1,0	2,0	0,0	5,0	6,0	0,0	5,0	c)
DA (drugability)		0,91	0,41	0,59	0,45	0,56	0,04	-0,05	0,15	-0,11	A

Rys. Analiza podstawowych parametrów chemicznych i fizjochemicznych wybranych leków.

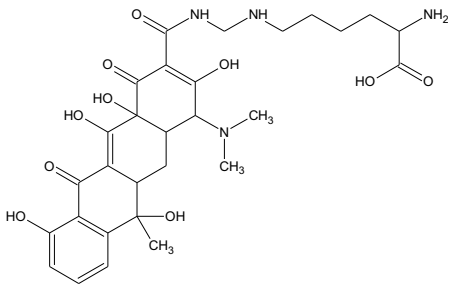
a) ACD / ChemSketch
b) doniesienia literaturowe
c) Molinspiration
d) Vega OpenGL (SASA, PSA dla promienia Van der Waalsa = 1.4 A)
e) EPI Suite
A równanie przytoczone w tekście (Grabowski T. 2003)

www.biokinetica.pl

Kod ten pomaga przetworzyć informację z trój lub dwuwymiarowej struktury na ciąg łatwy do przetwarzania w aplikacjach służących obliczeniom typu e-ADME. Programy oferujące analizę danych w oparciu o kod SMILES mogą służyć w przesiewowej analizie podobieństwa strukturalnego czy farmakoforowego cząsteczek leków.

Limecyklina (CAS 992-21-2)

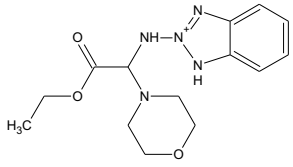
SMILES: c12C(=O)C3=C(O)C4(O)C(=O)C(C(=O)NCNCCCCC(N)C(=O)O)=C(O)C(N(C)C)C4CC3C(O)(C)c1cccc2O



Analiza podobieństwa farmakoforowego:

	Stopień podobieństwa:
COc4ccc(CCNC3C(O)C2CCOC(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C2C3(O)CO)cc4OC	0.805
O=C(NN=CC(O)C(O)C(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C(O)CO)c2ccccc2Cl	0.798
O=C(OC3C2CCOC(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C2C4(CO)OC34)c5ccc(O)cc5	0.780
O=C(OC3C2C=COC(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C2C4(CO)OC34)c5ccc(O)cc5	0.780
CC(C)OCC5OC(OC3OCCC4C(OC(=O)c1ccc(O)cc1)C2OC2(CO)C34)C(O)C(O)C5OC(C)C	0.741
COC(=O)C(Cc1ccccc1)NC(=O)C(CC(=O)O)NC(=O)C(N)CC(=O)O	0.739
CC(C)(C)C(=O)Nc1ccccc1C(=O)NC(CC(=O)O)C(=O)O	0.738
Cc4cc(C)[n+](CC3OC(OC2CC(N)C(N)C(OC1OC(CO)C(O)C(N)C1O)C2O)C(O)C(O)C3O)c(C)c4	0.736
Cc4cc(C)[n+](CC3OC(OC2CC(N)C(N)C(OC1OC(CO)C(O)C(N)C1O)C2O)C(N)C(O)C3O)c(C)c4	0.736
CC(=O)Nc1cc(NC(C)=O)c(OCCO)cc1OCCO	0.728
O=C(NC1CCCNC1=O)c2ccccc2C(=O)NC3CCCNC3=O	0.725
CCOC(=O)C2C(c1ccc(OC)cc1)C(C(=O)OCC)C(O)(C(F)(F)F)NC2(O)C(F)(F)F	0.725
CCOC(=O)C2C(c1ccccc1O)C(C(=O)OCC)C(O)(C(F)(F)F)NC2(O)C(F)(F)F	0.723
CC(C)C(NC(=O)c1ccccc1NC(=O)C(C)(C)C)C(=O)N2CCOCC2	0.723
C=CCNC(=O)c1cc(OCCCCCCCCCCCC)c(C(=O)NCC=C)cc1OCCCCCCCCCCCC	0.720
NC(=O)NN=Cc1cc(C=NNC(N)=O)c(N)cc1N	0.719
COc5ccc(C(=O)OC3C2CCOC(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C2C4(CO)OC34)cc5	0.719
COc5ccc(C(=O)OC3C2C=COC(OC1OC(CO)C(O)C(O)C1O)C2C4(CO)OC34)cc5	0.719
CC(C)(NC(=O)c1ccc(C(=O)NC(C)(C)C(=O)O)cc1)C(=O)O	0.713
CC(C)(NC(=O)NC1CCCCC1O)c3cccc(C(C)(C)NC(=O)NC2CCCCC2O)c3	0.712
CC(C)(C)OC(=O)Nc1ccc(Br)cc1C(=O)N(C(=O)NC2CCCCC2)C3CCCCC3	0.712
COC(=O)C(Cc1ccccc1)NC(=O)C(CC(=O)O)N(CCC(C)(C)C)CCC(C)(C)C	0.711
CCOC(=O)C(NN2=Nc1ccccc1N2)N3CCOCC3	**0.710**
CCOC(=O)C1=C(C)NC(=O)NC1c2cccc(OC)c2O	0.706

2-[(2-ethoxy-1-morpholin-4-yl-2-oxoethyl)amino]-1H-1,2,3-benzotriazol-2-ium



Rys. Przykład prostej analizy wykazania podobieństwa grup farmakoforowych.

SMILES jest tylko jedną z wielu form kodowania budowy chemicznej, jednak najbardziej rozpowszechnionym. Obecnie kodowanie informacji o budowie chemicznej wykorzystuje wiele programów komputerowych, również o architekturze typu klient - serwer opartych na www (ang.: *World Wide Web*). Taka synchronizacja danych pozwala łączyć informacje przedstawione różnymi środkami wyrazu obecnymi w technikach obliczeniowych w ramach PK. Liczne aplikacje dostępne za pośrednictwem www pozwalają scalać wyniki analiz wstępnych SAR z podstawowymi informacjami o ADME substancji uzyskanych w kompletnych profilach farmakokinetycznych (Ertl P., Jacob O. 1997). Stanowi to podstawę do dalszych rozważań na temat właściwości farmakoforów i toksykoforów badanej cząsteczki. Niejednokrotnie aplikacje te udostępniają bazy danych o właściwościach fizykochemicznych i fizjochemicznych tysięcy różnych leków.

Badania mające na celu wykazanie podobieństwa do leku są często wykorzystywanym typem badań przy zawężaniu grup kandydatów o skonkretyzowanej potencjalnej aktywności w oczekiwanym kierunku. Służą także badaniu zależności typu SAR/PK. Stąd miedzy innymi badania:

- mające na celu wytyczenie struktur które cechują leki podobne do tych aktywnych w stosunku do CNS (Engkvist O. i wsp 2003).
- opisujące budowę związku typową dla leków a o aktywności przeciwbakteryjnej (Cronin M.T.D. i wsp. 2002).
- opisujące wiązanie z białkami (Kier L.B. i wsp. 2002)

Przykłady poszukiwań w tym zakresie można mnożyć.

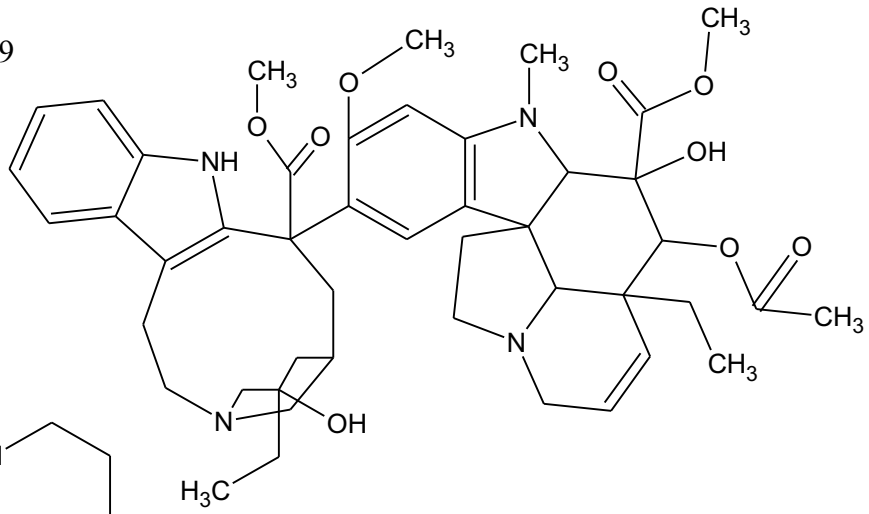
Szybko rozwijającym się narzędziem optymalizacji farmakokinetyki leku są techniki obliczeniowe i symulacyjne z zakresu SBDD - czyli projektowania leków w oparciu o modyfikację cząsteczki (ang.: *Structure Based Drug Design*). Programy komputerowe dają możliwość optymalizacji i kontrolowania procesu łączenia grup funkcyjnych leku z docelową strukturą białka receptorowego (Kubinyi H. 1998; Kubinyi H. 1999). Programy takie pozwalają między innymi na rozpoznawanie miejsc wiązania leku, opis wiązań chemicznych umożliwiających kontakt obu struktur oraz fragmentaryczne dopasowywanie farmakoforów oraz budowę cząsteczek leków *de novo*. Duża ilość informacji płynących z analizy SAR badanej cząsteczki wymaga stosowania programów decyzyjnych, statystycznej analizy danych oraz specjalistycznego oprogramowania. Znając jednak opisywane zasady można przy wyborze kierować się wynikami prostych równań i algorytmów. Jednym z prostszych może być algorytm opisujący "podobieństwo" do leku DA - (ang.: *Drugability*). Wynik większy od zera charakteryzuje leki natomiast mniejszy od zera wskazuje na prawdopodobieństwo zaistnienia licznych problemów w fazach ADME w warunkach *in vivo* (Grabowski T. 2003).

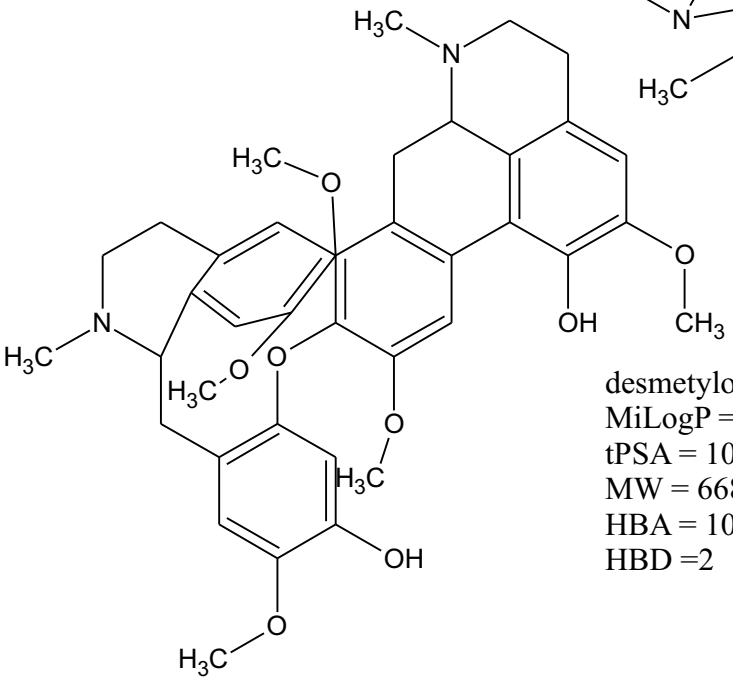
$$DA = ((12 - (HBA + HBD) + (- tPSA + 150) - [(-MiLogP + 3) / (MiLogP + (-MiLogP + 3)]^2)) / \sqrt{Mw^2}$$

DA	MW	LogP	tPSA	HBA	HBD
1,00	100	3,0	60	1	1
0,59	150	2,5	70	2	2
0,38	200	2,0	80	3	3
0,26	250	1,5	90	4	4
0,17	300	1,0	100	5	5
0,11	350	0,5	110	6	6
0,07	400	0,0	120	7	7
0,03	450	-0,5	130	8	8
0,01	500	-1,0	140	9	9
-0,02	550	-1,5	150	10	10
-0,03	600	-2,0	160	11	11
-0,09	700	-2,5	200	12	12

Rys. Przykład szybkiej analizy danych opisujących podobieństwo do leku - DA (ang.:*Drugability)*.

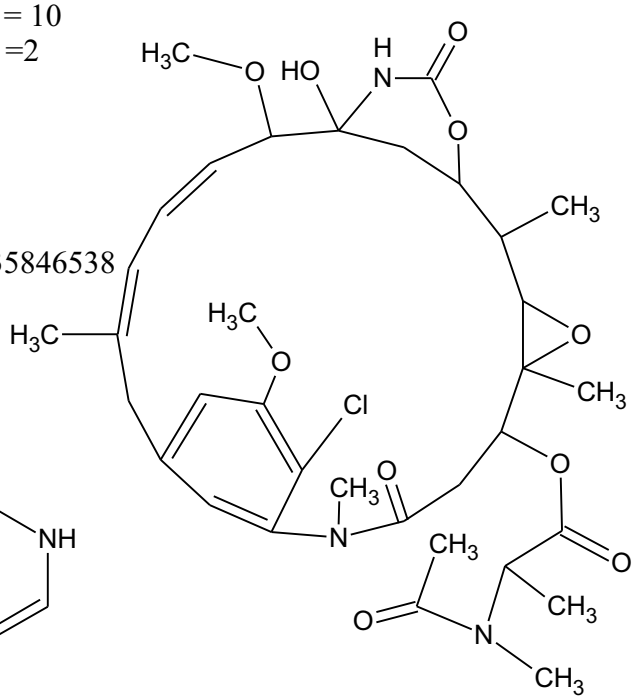
winkrystyna CAS: 146679
MiLogP = 3.184
tPSA = 151.211
MW = 809.9
HBA = 13
HBD =2



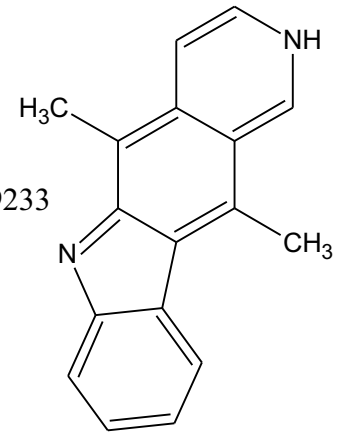


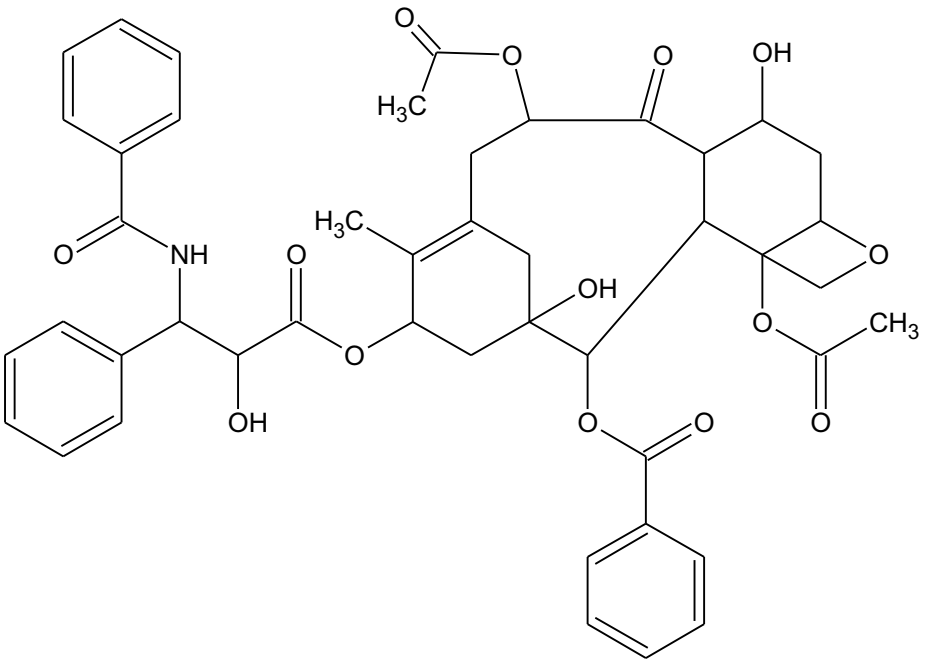
desmetylotalikarpina CAS: 61193406
MiLogP = 4.625
tPSA = 102.33
MW = 668.8
HBA = 10
HBD =2

majtansyna CAS: 35846538
MiLogP = 2.946
tPSA = 156.48
MW = 692.2
HBA = 13
HBD =2



elliptycyna CAS: 519233
MiLogP = 4.42
tPSA = 25.78
MW = 245.3
HBA = 2
HBD =0





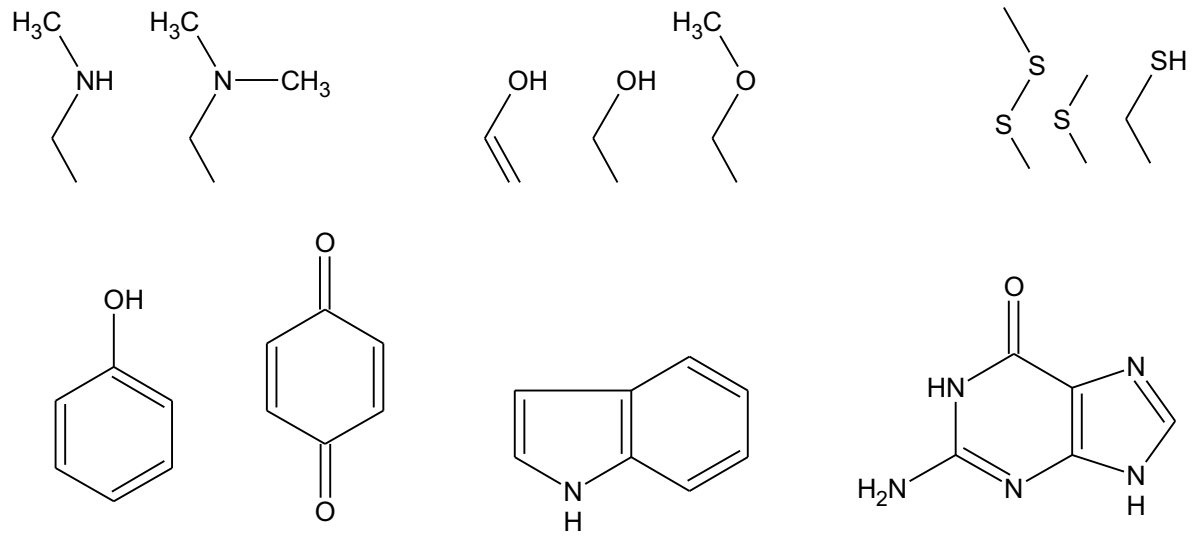
taxol CAS: 33069624
MiLogP = 4.019
tPSA = 221.3
MW = 825.8
HBA = 15
HBD =4

Rys. Przykłady struktur związków pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwnowotworowym. Wybrane związki są przykładem kompromisu pomiędzy oczekiwaniami wobec właściwości fizjochemicznych cząsteczki a aktywnością i odpowiedzią organizmu w warunkach klinicznych.

Metody przesiewowego poszukiwania substancji leczniczych są doskonalone i wciąż rozwijane. Jednak wiele ze znanych leków np stosowanych w terapii chorób nowotworowych mimo braku optymalnych właściwości DMPK jest stosowana z wyboru. Optymalizacja DMPK poprzez zmianę struktury cząsteczek oraz zmiany podstawników nie zawsze zwiększa możliwości stosowania leku w terapii.

Szybka analiza elektrochemiczna w fazie przedklinicznej HTV (ang.: *High Throughput Voltammetry*).

Nowe możliwości w technikach HTS oraz w optymalizacji farmakokinetycznej leku w fazie przedklinicznej stworzyły nowoczesne metody analityczne. Od dawna znanym narzędziem służącym do określania lipofilności związku jest rozdział na kolumnach chromatograficznych metodami HPLC. Metody HPLC mają do dyspozycji co najmniej kilka różnego typu detektorów. jednak większość z nich stanowi jedynie źródło sygnału który sam w sobie nie stanowi większego źródła informacji o leku. Nieco inaczej rysuje się zastosowanie detekcji elektrochemicznej. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele nowoczesnych detektorów elektrochemicznych o różnej budowie i oprogramowaniu. Detekcja elektrochemiczna w fazie przedklinicznej jest jednym z ciekawszych z punktu widzenia analityki narzędzi służących do określania stabilności leku. Ten typ detekcji pozwala na uzyskanie sygnału - piku w przypadku zredukowania lub utlenienia substancji na elektrodzie do której przyłożono określony potencjał w stosunku do potencjału elektrody referencyjnej. Możliwość przebiegu takiej reakcji uzależniona jest od rodzaju związku, jego budowy przestrzennej, grup funkcyjnych, potencjału elektrody, pH roztworu i składu fazy ruchomej. Jest to jedna z nielicznych sytuacji w analityce, gdzie obserwowane zjawisko można odnieść do zbliżonych reakcji mających miejsce w żywym organizmie. Dotyczą one zarówno metabolizmu leków, stabilności leku (utlenianie), w tym także stabilności metabolicznej oraz toksyfikacji leku. Dla wybranych grup związków procesy oksydacyjne *in vivo* są podstawową formą ich degradacji w żywym organizmie. Umożliwiają to tzw. "miękkie punkty" w ich strukturze (ang.: *Soft Spots*). Punkty struktury chemicznej podatne na reakcje redox. Można więc stworzyć podobny układ doświadczalny w warunkach *in vitro* tj. za pomocą rozdziałów chromatograficznych HPLC-EC. Detekcja elektrochemiczna pozwala na wstępne zakwalifikowanie NCE do grupy mniej lub bardziej odpornych na degradację osydoredukcyjną w ramach efektu pierwszego przejścia. Można także próbować na tej podstawie szukać korelacji między wartością potencjału oksydoredukcyjnego *in vitro* a wartością wybranych parametrów farmakokinetycznych *in vivo*.W zależności od wysokości potencjału zastosowanego w analizie można doprowadzić np do częściowego, lub przeprowadzać stopniowe utlenianie cząsteczki (Gamache P i wsp. 2003). W ten sposób można badać produkty degradacji oksydacyjnej leków w układach typu: HPLC - UV- EC -ESI/ API/ MS, HPLC - DAD- EC -ESI/MS/MS itp... Na podstawie analizy danych wielu związków stwierdzono że w zależności od wartości potencjału potrzebnego do wywołania reakcji utleniania można zaszeregować leki do określonych grup.



Ryc. Grupy funkcyjne umożliwiające analizę bardziej złożonych pod względem budowy chemicznej leków w oparciu o reakcje typu redoks.

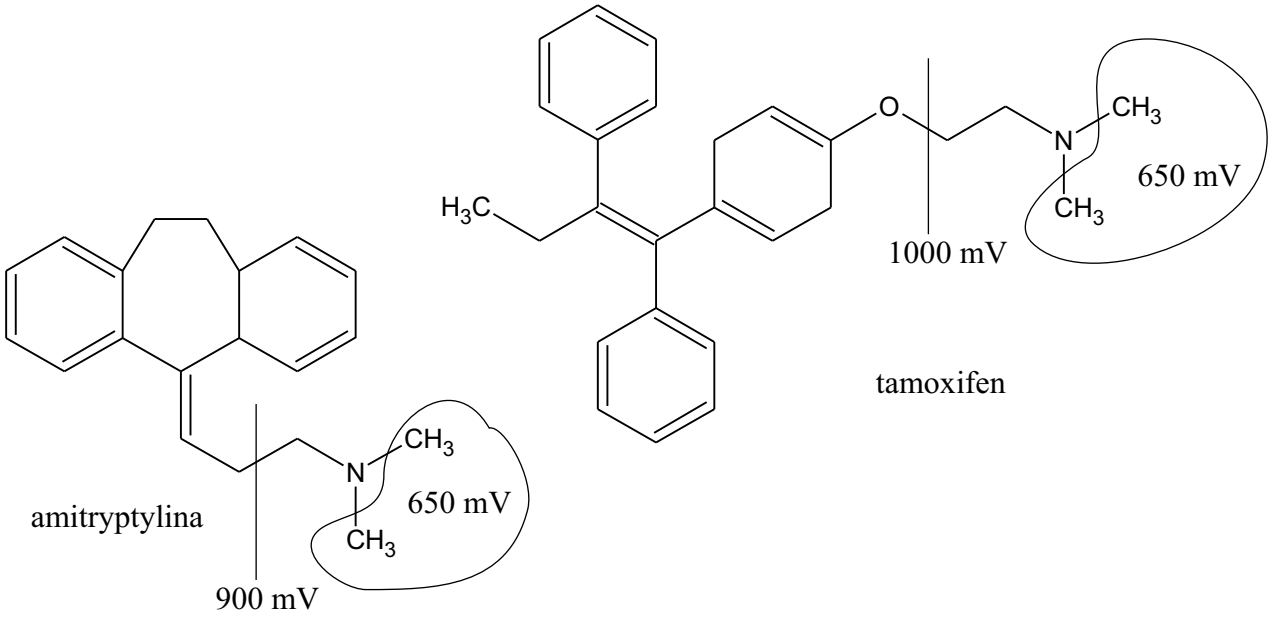
1. Niestabilne - łatwo utleniające się:
potencjał potrzebny do wywołania reakcji utleniania < 550 mV

2. Średnio stabilne - utleniające się przy wyższych potencjałach:
potencjał potrzebny do wywołania reakcji utleniania 550 mV - 900 mV

2. Stabilne - utleniające się bardzo wysokich potencjałach:
potencjał potrzebny do wywołania reakcji utleniania > 900 mV

katechina	120	skopoletyna	600	wekuronium	900
hydrochinon	200	naryrutyna	660	dapson	900
dopamina	200	naryngina	660	sulfametoksazol	900
kwercetyna	300	umbiliferon	660	amitryptylina	900
paracetamol	300	tyramina	700	sulfadiazyna	900
hesperydyna	360	chloropromazyna	700	fenacetyna	950
kaptopril	400	winorelbina	700	homoharyngtonina	1000
eugenol	420	klenbuterol	700	pindolol	1000
kapsaicyna	450	kw. arystolochiowy	700	rokuronium	1100
guanina	540	astemizol	750	fluoksetyna	1100
tyrozyna	540	acyklowir	775	trimetoprim	1200
tryptofan	540	guanozyna	780		
primachina	550	benidypina	800		
		diklofenak	800		
		tetracyklina	850		
		tamoxifen	850		
		prokainamid	850		
		azytromycyna	850		

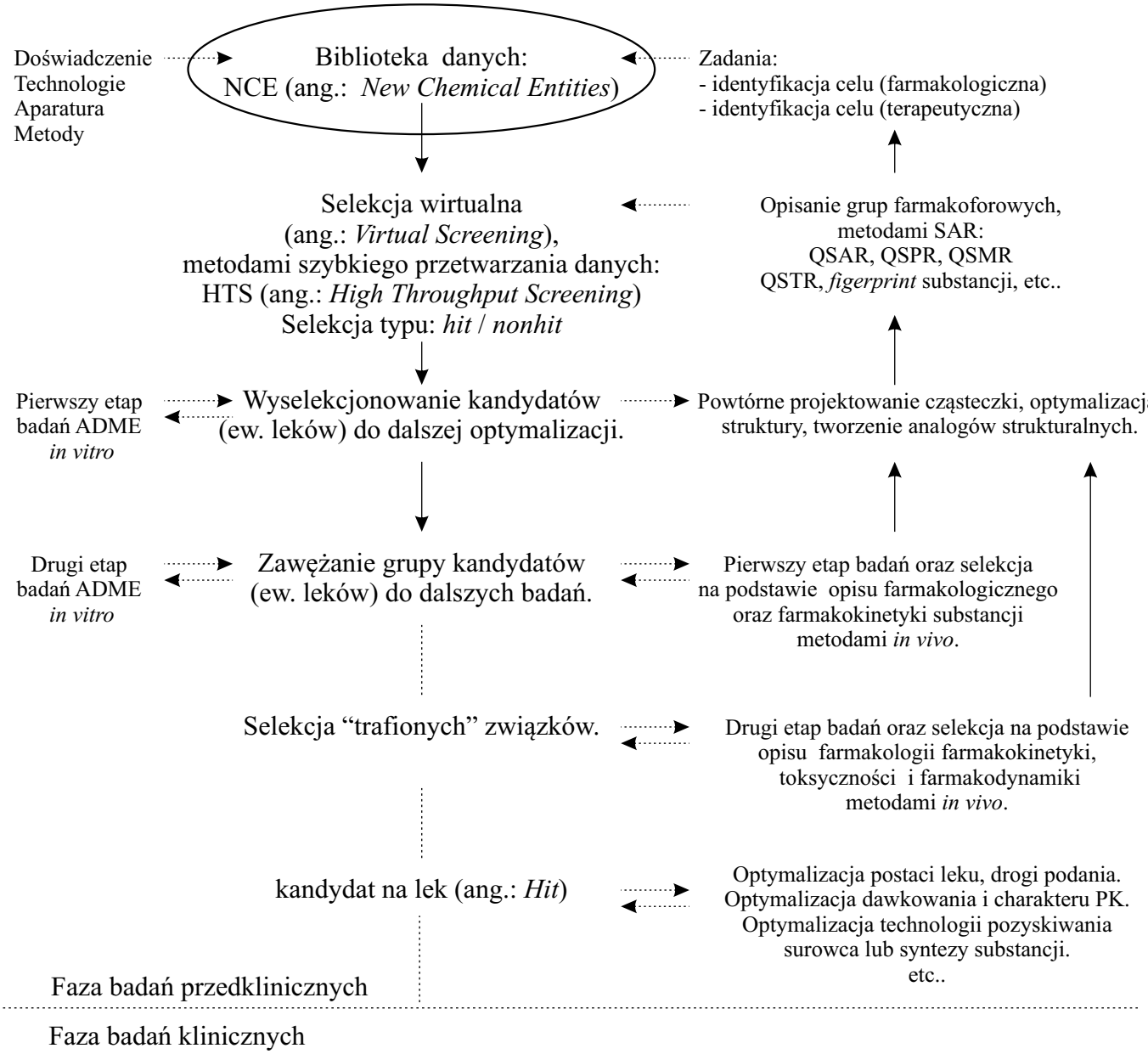
Ryc. Przykłady związków które można poddać analizie za pomocą detekcji elektrochemicznej. Przybliżone wartości potencjałów podano przy potencjale dodatnim w mV.



Ryc. Degradacja oksydacyjna leków przy różnych wartościach przyłożonego potencjału.

Strategia planowania badań nad lekami w fazie przedklinicznej.

Nowoczesna strategia planowania rozwoju i kolejności badań nad lekiem scala wiele metod i technik obliczeniowych. Wykorzystuje metody badawcze stosowane zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Tu zaś sięga od doświadczeń na izolowanych tkankach, izolowanych błonach, narządach, aż po hodowle komórkowe, izolowane struktury subkomórkowe i białka. Skala rozwiązań w tym zakresie jest w chwili obecnej bardzo szeroka. Nowoczesne metody obliczeniowe pozwalają na użycie nie tylko wyspecjalizowanych programów na poszczególnych etapach realizacji określonego projektu. Metody biostatystyczne, programy decyzyjne oraz sieci neuronowe pozwalają scalać uzyskane rezultaty. Taki sposób koordynowania badań, pozwala stosować nowoczesne metody planowania oraz rozwój odpowiednich struktur decyzyjnych w zakresie planowania badań nad nowymi lekami.

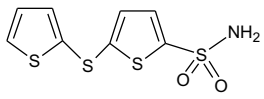


Rys. Strategia i metody badań nad lekami w fazie przedklinicznej (*targeting / drug selection / optimisation*)
(Meibohm B., Derendorf H. 2000; Atterwill C.K. i wsp. 2002;
Engels M.F.M. i wsp. 2002; Stenberg P. i wsp 2002).

Obecnie farmakokinetyka jest jedną z dziedzin które uczestniczą w każdym etapie projektowania leku. Od wyznaczenia celu - *target*, aż do wprowadzenia leku na rynek sprzedaży a także po tym fakcie. Pierwsze dwie fazy procesu rozwoju leku obejmują wyznaczenie celu terapeutycznego i selekcję tak zwanych hitów. Już na tym etapie podstawowym narzędziem analizy jest farmakokinetyka *in silico*. Analiza e-LADME pozwala na zweryfikowanie leków już dobrze znanych i poszukiwanie nowych kierunków zastosowania substancji stosowanych od dawna w farmakoterapii. Kolejnym elementem planowania jest szybka analiza farmakokinetyczna bibliotek setek tysięcy danych cech nowych związków która jest procesem wymagającym walidacji i oceny statystycznej.

$$\mathbf{HIT_{(n)} = T_{(n)} \times S_{(n)} \times D}$$

HIT(n) - liczba hitów (ang.: *Hit's Number*)
T(n) - liczba celów (ang.: *Target Number*)
S(n) - liczba analizowanych związków (ang.: *Structure Number*)

Cel terapeutyczny:	Inhibitor anhydrazy węglanowej	Receptor tachykininy (NK)	Receptor 5-HT4	Receptor D2	Receptor CCR3
Wyjściowa grupa związków:	98 850	150 000	150 000	120 000	120 000
Liczba HIT'ów:	13	53	93	42	43
Kandydat na lek:		PRX-96026	PRX-93046	PRX-92026	PRX-94042

Ryc. Przykład HTS dużych grup danych umożliwiających wykrycie kandydatów na leki.

Każdy kolejny element dochodzenia do wykrystalizowania grupy kandydatów na lek wymaga oceny PK/PD w związku ze stosowaniem leku w określonym typie schorzeń. Badanie przedkliniczne w wymiarze farmakokinetyki nie służą jednak tylko ocenie parametrów PK. Jest to podstawowy etap projektowania dawki leku i doboru schematu dawkowania leku. Jednocześnie celem analizy PK jest ustalenie bezpieczeństwa stosowania leku poprzez analizę TK/TD a w przypadku leków weterynaryjnych dodatkowo rozszerzona o analizę pozostałości leku w tkankach zwierząt. Ostatnim etapem projektowania leku jest faza w której paradoksalnie nastąpiło już zaaprobowanie substancji w określonej postaci leku przez odpowiedni organ administracyjny. Również w fazie gotowego produktu analiza farmakokinetyczna jest niezbędnym narzędziem oceny leku, oceny ewentualnej równoważności innych preparatów, oraz w sytuacji wykrycia możliwości nowych wskazań.

- Cel - wytyczenie celu terapeutycznego (nie leku)
- Selekcja Hitów
- Optymalizacja
- Aprobata urzędu rejestracji
- Faza po rejestracyjna

Faza *non -drug* (bez udziału leku)
Faza z udziałem leku

Tworzenie baz danych, próbkowanie danych (ang.: *Drug Clustering; Drug Mapping*).

Jednym z punktów wyjścia w projektowaniu i prowadzeniu optymalizacji od NCE do fazy potencjalnych leków jest określenie celu terapeutycznego. Etap ten wymaga posiłkowania się bazami danych na temat leków oraz określonych grup schorzeń. Przykładem bazy danych celów terapeutycznych jest TTD (ang.: *Therapeutic Target Database*), (Chen X. i wsp. 2002). Działania takie połączone z odpowiednią selekcją celu farmakologicznego - substancji o pożądanych parametrach farmakokinetycznych pozwala rozpocząć proces projektowania leku z użyciem metod HTS (Gund P. 1999; Landro J.A. i wsp. 2000; Engels M.F.M. i wsp. 2002). Jest to więc etap łączenia selekcji farmakologicznej (terapeutycznej) z chemiczną.

Duże znaczenie dla początkowej fazy selekcjonowania kandydatów na leki mają liczne techniki wspomagające właściwe obliczenia, przygotowujące dane do obróbki. Pozwalają one tworzyć bazy danych i próbkować i opisywać zgrupowane związki (Xu J., Hagler A. 2002). Najważniejsze metody próbkowania danych dotyczących struktury chemicznej, parametrów topologicznych czy cech farmakoforów zgrupowane są w obrębie działań typu:

- porównania do struktury generycznej
- metody fingerprintu molekuły (”matematycznego odcisku palca”)
- wielowymiarowych modeli farmakoforowych i toksykoforowych
- próbkowanie oparte na analizie regresji
- drzewa decyzyjne (zasady i reguły)
- mapowanie hierarchiczne struktur
- mapowanie niehierarchiczne

Jednym z bardzo nowoczesnych trendów tworzenia bibliotek do obróbki typu HTS jest użycie analizy NMR (Fejzo J. i wsp. 2003; Jacoby E. i wsp. 2003). Wśród wspomnianych technik często stosowane jest przygotowywanie molekularnego fingerprintu badanej substancji. Polega ona na opisaniu cząsteczki za pomocą ścieżki informacji zbudowanej z bitów, reprezentujących określone cechy związku. Taki “odcisk palca“ dla którego informacją stają się cechy budowy związku istotne z punktu widzenia LADME zostaje poddany dalszym analizom. Może mieć postać pojedynczej ścieżki danych - bitów, czyli zbudowany z pojedynczej ścieżki kluczy odpowiadających wartościom cech budowy. Jest to tzw. *keyed fingerprint; structural keys fingerprint*. Jeżeli dane zebrane są w kilku ścieżkach zachodzących na siebie - opisujących dokładniej zmapowane cechy,.jest to tzw. *hashed fingerprint*. Inne modyfikacje dotyczą zapisu w postaci ścieżek bitów wielowymiarowych (3D, 4D) modeli farmakoforowych. Określa się je jako *multiple-point fingerprints* (Bajorath J. 2002). W modelach selekcji wirtualnej wykonywanych na podstawie cząsteczkowego fingerprintu - FDVS (ang.: *Fingerprint Dependent Virtual Screening*), do porównywania danych standardowo wykorzystuje się:

- metody geometrii Euklidesowej
- badanie korelacji
-współczynnik opisujące podobieństwo np. współczynnik Tanimoto TC (ang.: *Tanimoto Coefficient*).

$$\mathbf{TC = c \ / \ a + b - c}$$

A - ilość bitów wspólnych dla substancji X i Y
b - ilość bitów charakterystycznych wyłącznie dla substancji X
c - ilość bitów charakterystycznych wyłącznie dla substancji Y

Współczynnik Tanimoto jest jednym z pierwszych wskaźników opisujących podobieństwo pomiędzy dwoma cząsteczkami. W celu wykazania takiego podobieństwa - SC (ang.: *Similarity Coefficient*) lub jego braku stosuje się także inne współczynniki(Raymond J.W., Willet P. 2002; Holliday J.D. i wsp 2003; Willett P 2003):

Współczynnik Cosine:

$$SC = c / \sqrt{a \times b}$$

Współczynnik oparty na geometrii Euklidesowej:

$$SC = a + b - 2 \times c / n$$

Proste współczynniki matematyczne:

$$SC = c + d \ / n$$

Współczynnik Russel - Rao:

$$SC = c / n$$

Współczynnik Forbes:

$$SC = c \times n / a \times b$$

Współczynnik wg. Kulczyńskiego:

$$SC = 0.5 \times [(c / a) + (c / b)]$$

Współczynnik Baroni-Urbani:

$$SC = \sqrt{c \times d} + c \ / \sqrt{c \times d} \ + a + b - c$$

Współczynnik Fossum:

$$SC = n (c - 0.5)^2 / a \times b$$

Współczynnik Yule:

$$SC = n \times c - a \times b / c \times d + (a - c) \times (b - c)$$

Współczynnik Stiles:

$$SC = Log [(n \times c - a \times b) - 0.5 \times n]^2 / a \times b \times (n - b) \times (n - a)$$

Współczynnik Pearson'a:

$$SC = n \times c \ - a \times b / \sqrt{n \times a \times b \times (n - b) \times (n - a)}$$

Współczynnik Dennis'a:

$$SC = n \times c - a \times b / \sqrt{n \times a \times b}$$

Współczynnik Sokal Sneath::

$$SC = c / 2 \times a + 2 \times b - 3 \times c$$

Współczynnik Dice:

$$SC = 2 \times c / a \times b$$

Substancja wzorcowa - D (ilość bitów = 9)

Substancja porównywana - NCE (ilość bitów = 8)

Porównanie - D/NCE (ilość bitów wspólnych = 3)

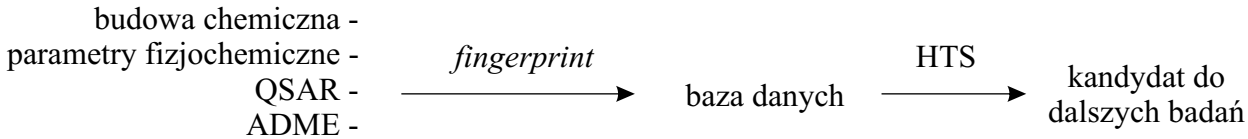
Rys. Typowy sposób dokowania i porównywania danych metodą fingerprintu.

Metoda molekularnego fingerprintu pozwala grupować w postaci bazodanowej nie tylko cechy budowy czy parametry fizjochemiczne leku. Pozwala także na przetwarzanie parametrów farmakokinetycznych leków i tworzenie baz danych właściwości PK. Stąd ciągły rozwój tej metody grupowania danych. Może ona służyć przetwarzaniu wielu różnych typów grup danych charakteryzujących związek. Umożliwia to praktyczne i szybkie selekcjonowanie danych o setkach tysięcy związków chemicznych i porównywanie ich do związku wzorcowego.Wzorcem jest w tym wypadku substancja o pożądanych parametrach farmakokinetycznych i fizjochemicznych. Taka analiza danych ilustruje obecne trendy w badaniach, mających na celu wprowadzanie na rynek nowych leków. Proces optymalizacji właściwości farmakokinetycznych leku metodami CADD nie polega obecnie na znalezieniu substancji o największym potencjale farmakodynamicznym. Celem jest uzyskanie związku o charakterystyce optymalnej jednocześnie wielokierunkowej. Oczekiwania obejmują tu zarówno farmako i toksykokinetykę, farmako i toksykodynamikę, jak i farmakoekonomikę produkcji i sprzedaży leku. Równoczesne wykorzystanie wiedzy zebranej w postaci oprogramowania bazodanowego, doniesień w piśmiennictwie jest gwarantem sukcesu w zaplanowanym procesie optymalizacji. Wymaga doświadczenia, użycia nowoczesnych technologii oraz zastosowania nowoczesnych zasad planowania badań i wnioskowania. Równomierny nacisk na wszystkie wymienione drogi dochodzenia od NCE do "prototypu" leku pozwala uniknąć problemów towarzyszących tzw. "ślepej technologii" projektowania leków (Testa B. i wsp. 2001).

Selekcja kandydatów.

Farmakokinetyka obecna jest na każdym etapie prowadzenia optymalizacji w procesie wykrywania-selekcjonowania leków (ang.: *Lead Optimisation In Drug Development*). Ma swoje odzwierciedlenie w technikach VS, HTS, SAR etc.. Jest głównym narzędziem opisowym w badaniach *in vivo*, *in vitro* oraz standardowo stosowanych licznych obecnie technikach skalowania. Selekcja kandydatów na leki w fazie przedklinicznej ma zwykle charakter wielostopniowy. Badania farmakokinetyczne oraz szybka selekcja metodami obliczeniowymi pozwala na znaczne zawężenie grupy wielu potencjalnych kandydatów do kilku, kilkunastu substancji. Punktem wyjścia do nowoczesnego projektowania leków są jednak przede wszystkim narzędzia o charakterze bazodanowym. Metody farmakometryczne oraz szereg znanych zależności pomiędzy właściwościami badanej substancji a efektem terapeutycznym pozwalają opisywać grupy farmako i toksykoforowe. Umożliwia to wstępne projektowanie i symulowanie dyspozycji leku w organizmie.

Selekcja kandydatów w późnej fazie przedklinicznej obejmuje między innymi badania parametrów farmakokinetycznych opisujących poszczególne fazy ADME. Są one ukierunkowane na zbadanie problemów typowych dla danej fazy kinetycznej, wiążąc je z przyszłym zastosowaniem leku. Dla leków podawanych inną drogą niż dożylna zwykle najważniejsze pytania dotyczą przebiegu fazy wchłaniania z miejsca podania. Zawsze, niezależnie od drogi podania leku szczególną uwagę na tym etapie przywiązuje się do analizy metabolizmu i eliminacji leku. Ma to szczególne znaczenie w postaciach leku typu pro-drug.



Rys. Źródła informacji dla metody fingerprintu na etapie tworzenia baz danych.

Najważniejsze informacje jakich wymaga nowoczesne projektowanie leków zbierane w trakcie optymalizacji farmakokinetycznej to miedzy innymi:

- charakterystyka fizjochemiczna cząsteczki i opis e-ADME (CADD/PK/TK)	*in silico*
- charakterystyka cząsteczki jako celu dla układów enzymatycznych wątroby	*in vitro, in vivo*
- badania na hodowlach komórkowych i badanie przepuszczalności	*in vitro,*
- badania dotyczące przepuszczalności na sztucznych układach błonowych	*in vitro*
- określenie stopnia wiązania z białkami krwi	*in vitro, in vivo*
- określenie toksyczności substancji	*in vivo*

Specyfika obliczeń farmakokinetycznych CPKP.

Różnorodność metod obliczeniowych używanych dla określenia kompletnego profilu farmakokinetycznego leku - CPKP jest obecnie znaczna. Obliczenia farmakokinetyczne wykonane niezależnie od modelu często oparte są na założeniach statystycznych wynikających ze statystycznego rozumowania i opisu przebiegu badanego procesu kinetycznego. Obliczenia te wykonywane są w ramach teorii momentów statystycznych - SMT (ang.: *Statistical Moment Theory*). Inne sposoby obliczeniowe proponuje teoria kompartmentowa a jeszcze inne modele fizjologiczne. Często subtelne różnice w różnych sposobach obliczania parametrów farmakokinetycznych mają ogromne znaczenie dla sfery działań praktycznych. Coraz większe znaczenie zdobywają modele hybrydowe. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych w oparciu o tzw. momenty statystyczne (MRT, MTT, VRT, CVRT, MAT, AUMC), pozwalają wraz z obliczeniami modelowymi wynikającymi z teorii kompartmentowej rozmieszczania leków w organizmie na kontrolowaną wielotorową analizę danych doświadczalnych. Obecnym kierunkiem zmian w technikach obliczeń farmakokinetycznych jest tworzenie modeli mieszanych gdzie do szczegółowej charakterystyki leku na każdym etapie zmian jego kinetyki dostosowuje się optymalną formę obliczeń.

Śledzenie kinetyki leku może być utrudnione wtedy gdy pełen opis PK dotyczy badań porównawczych jeszcze na etapie projektowania leku w trakcie optymalizacji jego parametrów DMPK. Błąd wynikający ze źle opisanej fazy kinetycznej utrudnia interpretację różnic pomiędzy postaciami leku itp. grupami doświadczalnymi itd.. Problem ten częściowo wyklucza stosowanie analityki chemicznej na odpowiednio wysokim poziomie. Takie postępowanie prowadzi do uzyskania szeregu prawidłowych danych wykorzystywanych do dalszych obliczeń. Pozostaje właściwy dobór opisu matematycznego. Problem błędu obliczeniowego w farmakokinetyce nie dotyczy jedynie nieodpowiedniego dopasowania formy obliczeń do rodzaju danych. Znacznym utrudnieniem w interpretacji losów leku w organizmie przynosi także wprowadzanie niezwykle złożonych, zaawansowanych technologicznie postaci leków, o kontrolowanym sposobie uwalniania substancji czynnej. Ocena takich preparatów może sprawiać problem jeszcze na etapie badania szybkości rozpadu i szybkości uwalniania w układach *in vitro*. Każdy czynnik wprowadzający nowe zjawisko kinetyczne na drodze jaką lek pokonuje w organizmie wymaga dokładnego opisu matematycznego, statystycznego, odniesienia do fizjologii narządu lub tkanki itd..

W większości wypadków tradycyjną formą analizy losów leku w organizmie jest analiza oparta na klasycznych modelach. Analiza PK oparta na modelach fizjologicznych opiera się na danych dotyczących przepływu płynów takich jak krew, mocz, płynu mózgowo rdzeniowego, chłonki lub żółci. Wspólnym mianownikiem w takich modelach są miedzy innymi klirens poszczególnych narządów i stopień ekstrakcji leku. Modele te mimo oczywistych różnic są silnie związane z analizą kompartmentową.

Parametry farmakokinetyczne obliczone niezależnie od przyjętego modelu mają różne znaczenie i wartość dla opisu badanej substancji. Z jednej strony opisują wykres funkcji i przybierają formę wskaźników matematycznych. Z drugiej strony opisują procesy fizykochemiczne jakim podlega badany lek przybierając formę wskaźników opisujących kinetykę procesu chemicznego. Z lekarskiego punktu widzenia najbardziej interesującymi są parametry odnoszące się bezpośrednio do właściwości klinicznych stosowanego leku.

Wiele parametrów farmakokinetycznych w postaci jednej liczby bądź zakresu wartości niesie znaczną ilość informacji. Trudno więc o wyodrębnienie w całej grupie tych specyficznych parametrów sztywnych ram i granic. Przynależność do poszczególnych grup jest sprawą dyskusyjną. Przyczyną jest stopniowanie i logika kolejności obliczeń parametrów farmakokinetycznych od obliczeń matematycznych poprzez charakterystykę procesów chemicznych do przedstawienia wartości wybranych parametrów klinicznych.

Niektóre parametry farmakokinetyczne opisują jednolite pod względem matematycznym procesy kinetyczne. Jednak znakomita większość pozostałych parametrów jest najczęściej wypadkową kilku procesów kinetycznych - wchłaniania, dystrybucji i eliminacji.

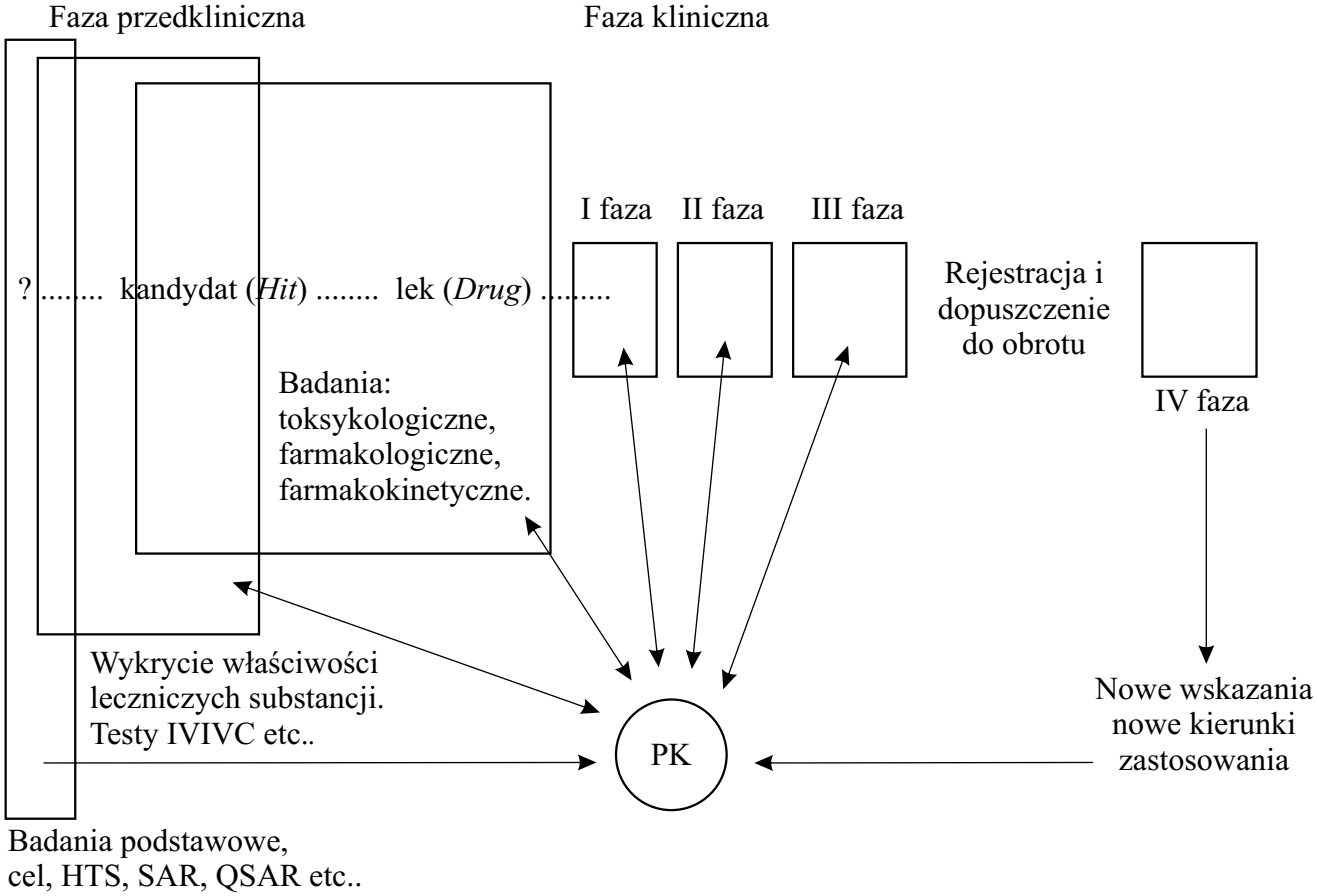
Złożoność zjawisk jakie opisują profile farmakokinetyczne leków wymaga niejednokrotnie złożonych metod obliczeniowych. Prawidłowy dobór wzajemnie uzupełniających się, różnych metod obliczeniowych gwarantuje wystarczająco szeroki, optymalny opis badanego leku.

Projektowanie badań kompletnych profili farmakokinetycznych leków.

Badania farmakokinetyczne dotyczą najczęściej badania jednorazowego i wielokrotnego podania leku dla różnych wielkości dawki. W niektórych przypadkach kompletne profile farmakokinetyczne opisuje się po podaniu jednorazowym w sześciu lub dziesięciu rosnących dawkach. Celem takich analiz jest wykluczenie lub potwierdzenie i opisanie zmian rzędowości poszczególnych procesów kinetycznych. Dla leków dla których konieczne jest wykonanie kompletnych badań, podstawowych parametrów farmakokinetycznych głównie dokonuje się obliczeń:

- pola powierzchni pod krzywą stężeń
- stałej szybkości eliminacji, wchłaniania oraz dystrybucji
- okresu półtrwania w odniesieniu do obliczanych stałych szybkości
- klirensu całkowitego (totalnego)
- objętości dystrybucji
- stężenia początkowego i lub maksymalnego
- czasu osiągnięcia stężenia maksymalnego

Wnioski dla przeprowadzonych obliczeń obejmują przede wszystkim:
Obliczenia dawkowania leku w celu osiągnięcia danego poziomu stężenia terapeutycznego w danym przedziale czasowym. Stwierdzenie czy wybrana droga podania leku stwarza szansę stosowania leku w praktyce. Lub czy lek wymaga innej drogi podania ewentualnie innej postaci.



Rys. Miejsce badań farmakokinetycznych w badaniach klinicznych i przedklinicznych leków.

Wskazówki z piśmiennictwa. Praca doświadczalna.

Wskazówki z piśmiennictwa: charakterystyka fizykochemiczna substancji badanej. Praca doświadczalna.

CZAS POBIERANIA PRÓBEK ⟷ **METODA ANALITYCZNA**

- liczba punktów pobrania
- LSM - walidacja modelu
- obliczenie minimalnego AUC resztkowego optymalizacja LOQ/t_{last}/AUCresztkowe
- AUC resztkowe < 20% AUC totalnego (tylko dla próbkowania < 72 h; niektóre agencje rejestrujące)
- ustalenie t_0 oraz t_{last}
- obliczenie $t_\alpha = t_{(infinity)}$
- obliczenie stałej szybkości dla fazy eliminacji
- wstępne obliczenia t1/2 eliminacji
- liczba punktów [Σ(C-T) < LLOQ] < 20 %

- wybór metody analitycznej (HPLC; UPLC; GC; PCR, ELISA), oraz rodzaju detekcji (UV; FL; EC; Ms^n)
- analiza klasyczna / stereochemia
- metody pobierania i konserwowania próbek
- badania stabilności analitów i wzorców metody oczyszczania i przygotowania próbek do analiz
- określenie stopnia wiązania leku przez białka tkanek poddawanych analizie.
- ocena pH, pKa, lipofilności $LogP_{o/w}$ (a tym samym zmienności PK)
- metoda analityczna (parametry analizy, ocena odzysku itd.)
- ocena metody, LOQ, LOD, elementy walidacji metody i pełna walidacja
- próby analiz próbek doświadczalnych

INTERWAŁY POBIERANIA PRÓBEK ⟷ **KRZYWA C-T I JEJ OCENA**

- spodziewany tlag (ograniczenie próbkowania)
- C-T zależne od gatunku (czas chronologiczny)
- bariera cyklu dzień / noc
- C-T niezależne od gatunku (skalowanie allometryczne)
- rozdzielenie minimalnej liczby punktów czasowych na wszystkie fazy kinetyczne, jakim lek podlega w organizmie (zmienność PK)
- modyfikowanie - optymalizacja ilości punktów czasowych pobierania tkanek do analiz

- wykreślenie próbnych krzywych i ich ocena
- zbadanie zależności pomiędzy wielkością dawki a kształtem krzywej (liniowość / nieliniowość kinetyki)
- określenie ilości koniecznych do podania dawek jednorazowych
- ocena krzywej pod kątem parametrów fizjochemicznych leku

- wstępne doświadczenia na niewielkiej grupie probantów (pilotażowe)
- wstępne transformacje allometryczne
- krzywe C-T dla podania kasetowego
- krzywe C-T dla mikrodawkowania

Wskazówki z piśmiennictwa. Praca doświadczalna.

Wskazówki z piśmiennictwa: charakterystyka farmakologiczna substancji badanej. Praca doświadczalna.

Rys. Schemat postępowania w trakcie przygotowań analitycznych do klasycznego układu CPKP.

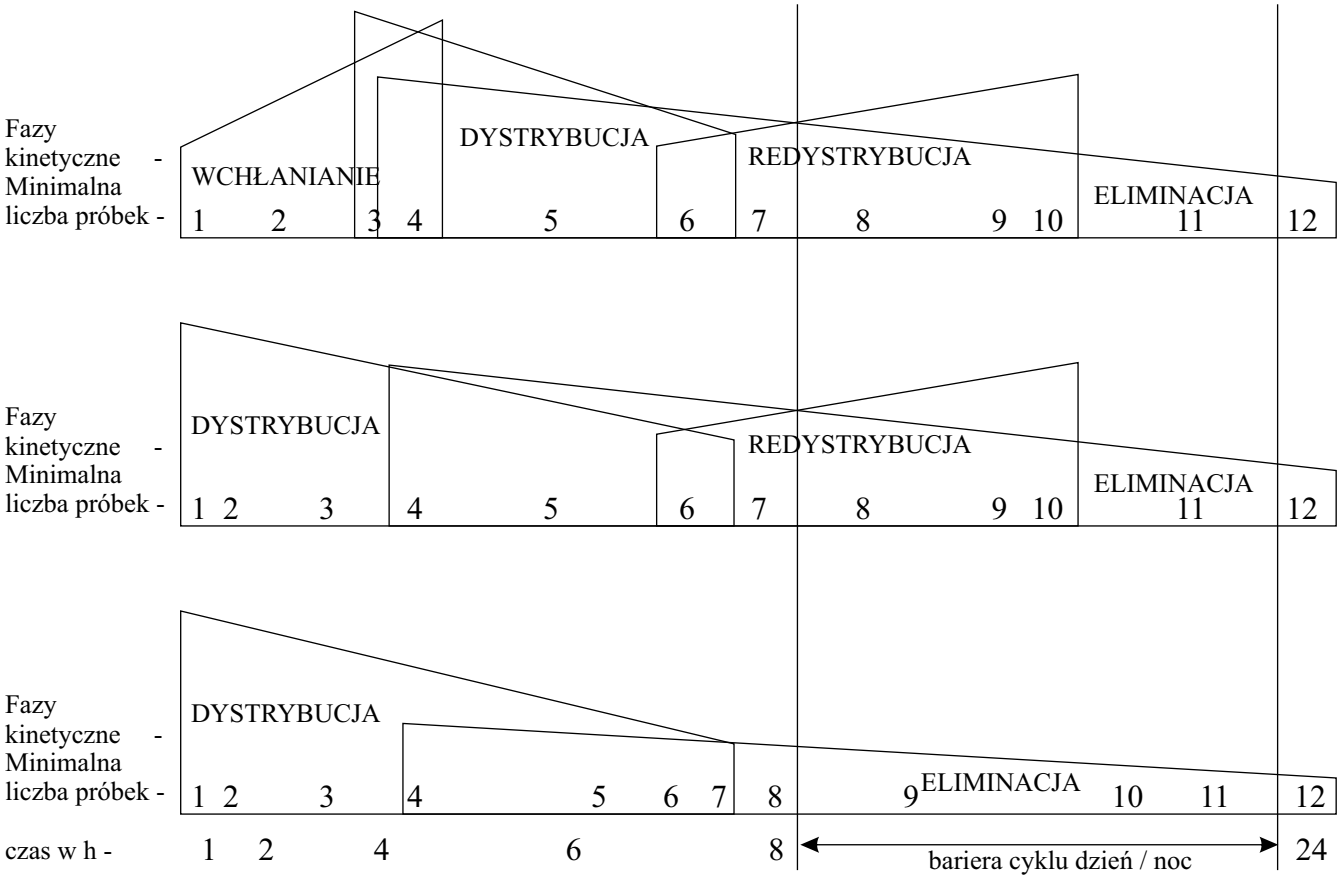
Kolejne etapy modelowania farmakokinetycznego obejmują:

- określenie profilu metabolicznego leku
- badania określające dostępność biologiczną leku
- badania interakcji z innymi lekami w ramach procesów farmakokinetycznych

Właściwa kolejność przygotowania badań farmakokinetycznych gwarantuje niewielką ilość błędów w obliczeniach końcowych.

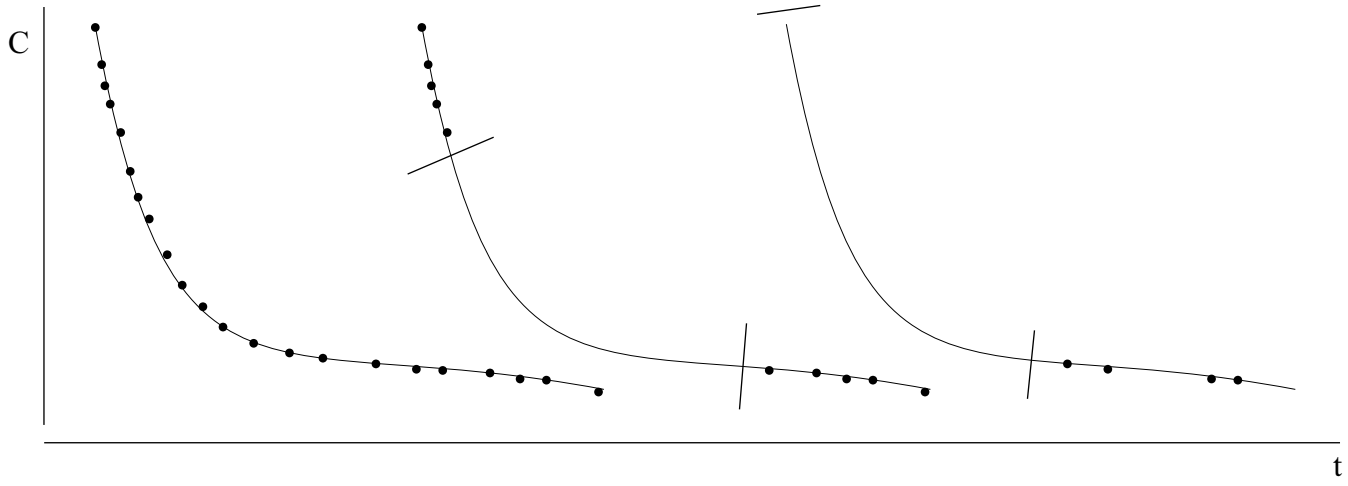
Próbkowanie w analizie PK (ang.: *Sampling Points*).

Zakładając typowy przebieg krzywej C-T, minimalną liczbę 12-15 punktów czasowych należy rozdzielić na cztery typowe fazy kinetyczne - wchłaniania, dystrybucji, redystrybucji i eliminacji. Zwyczajowym zakresem interwału próbkowania w analizie PK jest próbkowanie w okresie równym 3 x t1/2 leku dla fazy eliminacji i nie dłużej niż 4 x t1/2 (WHO 2005). Nie wszystkie fazy możliwe będą do opisania w przypadku każdego badanego profilu farmakokinetycznego. Faza wchłaniania nie będzie widoczna po podaniu donaczyniowym. Faza redystrybucji widoczna będzie tylko w niektórych przypadkach. Powodem jej wystąpienia może być krążenie leku pomiędzy wątrobą a przewodem pokarmowym. Faza eliminacji i dystrybucji może w modelu jednokompartmentowym przedstawiać się na wykresie w postaci prostej. Na każdą z czterech domniemanych faz kinetycznych w przypadku 12-15 punktów poboru prób do badań należy przeznaczyć co najmniej 3-4 punkty. Dla całego eksperymentu t = 0 będzie stanowić początek fazy wchłaniania lub początek fazy dystrybucji w przypadku podania donaczyniowego. Natomiast tlast określać będzie granicę badań przebiegającą w fazie eliminacji leku.



Rys. Schemat pobierania prób do analiz w trakcie przygotowań do klasycznej analizy PK.
Metody rozmieszczania punktów poboru próbek na hipotetycznej krzywej C-T
zależne od charakteru profilu farmakokinetycznego leku.

Punkty graniczne charakteryzujące każdą z faz pozwalać będą na optymalne dopasowanie hipotetycznej krzywej do rzeczywistej dynamiki zmian stężenia leku w tkance. Pozwala to zwiększyć dokładność w wytyczaniu i opisie granic faz kinetycznych. Wyznaczanie punktów pobierania prób C-T jest rożne w różnego typu doświadczeniach z zakresu badań farmakokinetycznych. W przypadku badań podstawowych na poziomie selekcji tzw. hit'ów (ang.: *Hits*) grupą danych C-T wymaganych do analizy może być nawet jeden punkt. W przypadku badań farmakokinetycznych w ramach terapii monitorowanej stężeniem leku w organizmie grupą odniesienia mogą być dwa punkty C-T. Tak dzieje się w przypadku obliczania stałej szybkości eliminacji leku. W przypadku badań kompletnych profili farmakokinetycznych leków ilość punktów krzywej jest znacznie większa. W przypadku badań porównawczych leków w których wartością brana pod uwagę jest AUC ilość pobieranych prób jest największa. Wynika to z potrzeby jak najdokładniejszego opisu pola powierzchni pod krzywą C-T. W przypadku badań farmakokinetycznych mających na celu optymalizację postaci leku lub badanie tylko kilku parametrów ilość prób C-T jest mniejsza.

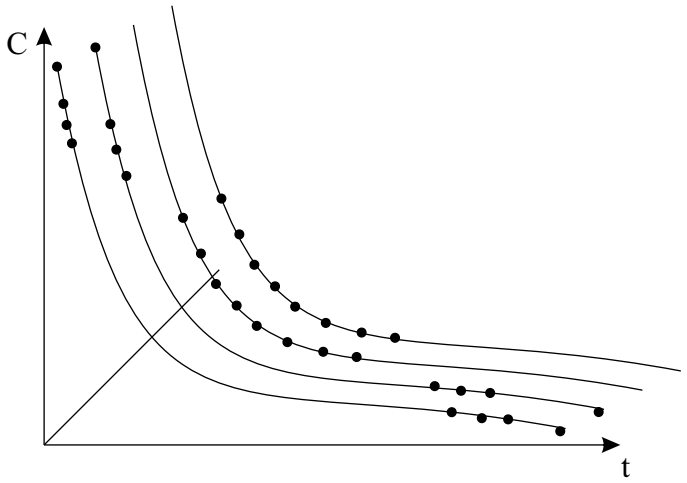


Ryc. Układy C-T (od lewej) pełny profil farmakokinetyczny - (analiza: Co, AUC, Vd, MRT, AUMC, Cl, t1/2α, t1/2β itd.); optymalizacja postaci leku o dobrze znanej farmakokinetyce - (analiza Co i t1/2β); monitorowanie eliminacji leku u pacjenta - (analiza t1/2β)

Ważnym punktem w projektowaniu interwału pobierania próbek jest wpływ na rytm dobowy związany z cyklem dzień / noc. Jego zaburzenia mogą znacznie modyfikować nachylenie końcowego odcinka krzywej C-T i znacznie zmieniać stałą szybkości eliminacji leku. Stąd często rezygnuje się z pobierania próbek pomiędzy 8 a 24 godziną od podania 1 dawki. Dotyczy to badań nad kinetyką leków o krótkich i średnich okresach półtrwania po jednorazowym podaniu (Dixit R. i wsp. 2003). Próbkowanie dla leków o bardzo długich okresach półtrwania (>24h dla klasycznych leków niskocząteczkowych) można zakończyć na 72 godzinie od podania leku (WHO 2005).Dokładne śledzenie zmian stężenia leku w czasie zapewnia duża liczba punktów pobrania próbek i duża liczba powtórzonych układów doświadczalnych. Nie jest to jednak wyjście w przypadku badań prowadzonych na dużych grupach doświadczalnych. Każdy dodatkowy punkt generuje dodatkowe koszty często pozostając bez wpływu na ostateczny wynik. Stąd liczne sposoby zmniejszania liczby pobieranych próbek w badaniu. Celem zmniejszania liczby próbek w badaniach PK jest nie tylko czynnik ekonomiczny, lecz także liczne ograniczenia natury technicznej i etycznej (PK u dzieci noworodków, TDM w chorobach nowotworowych etc.) (Reed M.D. 1999; Sparreboom A. i wsp 1999; Panetta J.C. i wsp. 2003). Możliwość wprowadzenia LSM (ang.: *Limited Sampling Methods*) w badaniu uwarunkowana jest walidacją modelu oraz możliwością zastosowania uzyskanych w ten sposób danych w oczekiwanym celu. W niektórych przypadkach ograniczenie liczby próbek w badaniu nie jest możliwe z uwagi na ograniczenia prawne (badania biorównoważnosci leków) jednak w wielu wypadkach pozwala ono przyśpieszyć przebieg badania zmniejszyć koszty przy zapewnieniu odpowiedniej jakości badania.

Często stosowana w farmakokinetyce doświadczalnej metoda ograniczania liczby prób w badaniu to metoda kroczącej analizy krzywej C-T. Polega ona na pobieraniu prób badanych dla każdego obiektu doświadczalnego w różnych punktach czasowych. Umożliwia to przygotowanie kompletnego profilu farmakokinetycznego leku, nawet w skrajnie niekorzystnych z punktu widzenia technicznego, warunkach dla badacza.

Innym sposobem wprowadzenia LSM do badań PK są metody statystyczne - korelacyjne, opisu krzywej C-T. Polegają one zwykle na znalezieniu dwóch lub trzech punktów C-T których wartość wykazuje największą korelację z badanym parametrem PK. Oznacza to że należy wstępnie przygotować model badania w którym określa się pełny profil farmakokinetyczny leku np dla 20 probantów. Chcąc znaleźć dwa punkty C-T wykazujące największą korelację z uzyskanym np. AUC, sprawdza się korelacje każdego punktu dla 20 powtórzeń i formułuje równanie. Równanie pozwalające na obliczanie np. AUC leku tylko na podstawie dwóch punktów C-T (wcześniej opisanych odpowiednim zwalidowanym modelem).

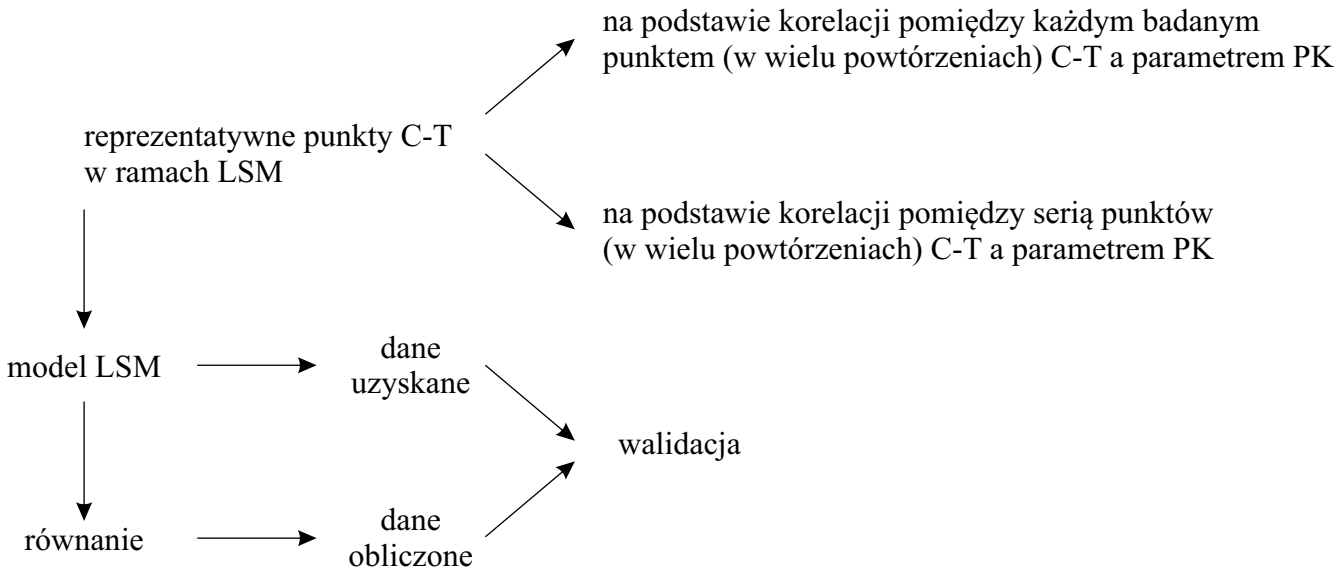


Ryc. Model analizy 20 punktów C-T dla czterech probantów (w sumie 80 punktów), ograniczony do 30 punktów.

Model taki wymaga walidacji której podstawowymi parametrami opisu jest RSD, Bias, R^2. Drugim zbliżonym sposobem poszukiwania reprezentatywnych punktów C-T które można zastosować do stworzenia równania opisującego badany parametr PK jest metoda testowania krótkich serii danych C-T. W tym celu przeprowadza się w wielu powtórzeniach serie analiz PK na podstawie kilku układów punktów C-T i bada korelacje z zanalizowanym parametrem. Są to sekwencje typu:

serie czasów pobrania próbek w godzinach:		lub punkty czasowe	
0,5 / 1 / 2	$R^2 = 0.35$	0,5	$R^2 = 0.35$
0,5 / 4 / 8	$R^2 = 0.68$	1,0	$R^2 = 0.33$
4 / 8	$R^2 = 0.95$	2,0	$R^2 = 0.38$
0,5 / 1 / 2 / 4 / 8	$R^2 = 1.00$	3,0	$R^2 = 0.65$
		4,0	$R^2 = 0.99$
		6,0	$R^2 = 0.75$
		8,0	$R^2 = 0.98$

R^2 - korelacja z np. Cmax, AUC, Vd itd.



Ryc. Tworzenie strategii optymalnego pobierania próbek.

Takie równania wytyczono między innymi w monitorowaniu terapii takimi związkami jak (Sparreboom A. i wsp. 1999; Panetta J.C. i wsp. 2003):
busulfan:

$$\mathbf{AUC = 122 + 0.97 \times C_{(0.5h)} + 13.94 \times C_{(6.0h)}}$$

piritrexim:

$$\mathbf{AUC = 3.19 \times C_{(3.0h)} + 6.54 \times C_{(6.0h)} + 1.11}$$

9- amino kamptotecyna:

$$\mathbf{AUC = 9.612 \times C_{(3.0h)} + 13.77 \times C_{(11.0h)} - 44.11}$$

topotekan:

$$\mathbf{AUC = 499 \times C_{(2.0h)} + 0.85 \times D(mg/m^2)}$$

cyklofosfamid:

$$\mathbf{AUC = 40.18 \times C_{(24h)} + 8.79 \times C_{(4.0h)} + 0.83 \times C_{(1.0h)} + D(mg/m^2) / 1000}$$

Proponuje się również układy pobierania próbek typu 3 x 4 lub 3 x 5. Polegają one na podzieleniu krzywej C-T na trzy okresy w których rozkłada się liczba 4 lub pięciu pobrań. Czas ostatniego pobrania określa się zwykle na cztery lub pięć x t1/2 leku w fazie eliminacji.

- pierwsze pięć prób C-T (1-5) w czasie do $t = t_{max}$
- kolejne pięć prób C-T (6-10) w czasie od $t = t_{max}$ do $t = t_{1/2kel}$
- kolejne pięć prób C-T (11-15) w czasie od $t = t_{1/2beta}$ do $t = 5 \times t_{1/2kel}$

Innym sposobem projektowania liczby prób C-T w eksperymencie może być równanie:

$$\mathbf{N = SD + (n \times PK)} \quad \text{lub} \quad \mathbf{N = SD + (n \times PK) + 2}$$

N - liczba punktów C-T
SD - odchylenie standardowe
n x PK - liczba parametrów PK obliczanych na podstawie eksperymentu

Liczba ochotników badaniach PK (ang.: *Sampling Size*).

Liczbę ochotników w badaniach farmakokinetycznych zwykle uzależniona jest od typu badania i jego celu. W badaniach o charakterze doświadczalnym często liczba ochotników w grupie nie przekracza 10. W wielu badaniach farmakokinetycznych liczba ta oscyluje w granicach 10-15. W przypadku badań farmakokinetycznych mających na celu określenie biorównoważności liczba ta nie powinna być niższa niż 20. Liczba ochotników zależna jest od t1/2kel leku i zwykle wzrasta wraz z jego wydłużeniem. Wzrasta także w przypadku dużej zmienności dla uzyskanych wyników parametrów farmakokinetycznych. Liczba ochotników w badaniu zawsze jest przybliżona do wartości liczby dokonanych pomiarów oraz średniej korelacji pomiędzy pomiarami (Vickers A.J. 2003).

$$\mathbf{n \geq [1 + MR^2 \times (m - 1)] / m}$$

n - liczba probantów
m - liczba pomiarów
MR^2 - średnia korelacja pomiędzy pomiarami

W chwili obecnej liczbę probantów jaką należy uzyskać w badaniu oblicza się przy użyciu specjalistycznego oprogramowania. Przy obliczaniu liczby probantów najczęściej brane po uwagę są dwa błędy statystyczne (Linnet K. 1999; Jones S.R. 2003). Błąd pierwszego typu - α, relacjonujący fałszywie dodatnie wyniki, oraz błąd drugiego typu - β, opisujący warunki wystąpienia fałszywie negatywnych wyników. Dla przedziału ufności dla α na poziomie 0.05 $z\alpha = 1.96$ natomiast dla błędu drugiego typu na poziomie 0.8 $z\beta = 0.8416$ (Panetta C.J. i wsp 2003; Leon A.C. 2004). Dla takich założeń przyjąć można:

$$\mathbf{n \geq [(1.96 + 0.84)^2 \times SD^2] / P^2} \qquad \mathbf{n \geq (7.84 \times SD^2) / P^2}$$

n - liczba probantów
SD - odchylenie standardowe obliczonego parametru PK
P^2 - dopuszczalny błąd obliczonego parametru PK (dokładność)

Analizę ilości probantów można przeprowadzić także w stosunku do określonej czułości - SN (95%) i specyficzności SP (80%) prowadzonej analizy PK. .

$$\mathbf{n_{(SN)} \geq \{1.96^2 \times [SN \times (1 - SN)] / \alpha^2\} / p} \qquad \mathbf{n_{(SP)} \geq \{1.96^2 \times [SP \times (1 - SP)] / \alpha^2\} / (1 - p)}$$

p - częstość występowania oczekiwanej cechy

Liczba osobników biorących udział w badaniu biorównoważności może być obliczona na podstawie wielu różnych formuł. Jedną z częściej stosowanych jest formuła opisująca liczbę probantów na podstawie założeń takich jak zmienność parametrów farmakokinetycznych leku, zakładana różnica pomiędzy lekami oraz błąd w zakresie wystąpienia fałszywie dodatnich i negatywnych wyników (Chow S.C., Liu J.P. 2000).

$$\mathbf{n \geq |Z\alpha + Z\beta|^2 \times |CV/\delta|^2 + 0.5 \times |Z\alpha|^2}$$

Dla α	$Z\alpha$	$Z\alpha/2$	Dla β	$Z_{1-\beta}$
0,2	0,842	1,282	70	0,524
0,15	1,036	1,440	75	0,674
0,1	1,282	1,645	80	0,842
0,075	1,440	1,780	85	1,036
0,05	1,645	1,960	90	1,282
0,01	2,326	2,576	95	1,645

δ - różnica między lekami (%)
CV - zmienność PK leku (%)

W przypadku badań biorównoważności leków ważnym czynnikiem decydującym o liczbie probantów biorących udział w badaniu jest zmienność PK leku. Ze wzrostem zmienności rośnie liczba probantów w badaniu.

		Zα/2						
		0,001	0,01	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2
		3,291	2,576	1,960	1,780	1,645	1,440	1,282
CV = PK 20 %								
δ = 20 %								
		liczba osobników w eksperymencie						
	Z1-β							
70	0,524	20,0	12,9	8,1	6,9	6,1	4,9	4,1
75	0,674	21,1	13,9	8,9	7,6	6,7	5,5	4,6
80	0,842	22,5	15,0	9,8	8,5	7,5	6,2	5,3
85	1,036	24,1	16,4	10,9	9,5	8,5	7,2	6,2
90	1,282	26,3	18,2	12,4	11,0	9,9	8,4	7,4
95	1,645	29,8	21,1	14,9	13,3	12,2	10,5	9,4
99	2,326	37,0	27,3	20,3	18,5	17,1	15,2	13,8
CV = PK 25 %								
δ = 20 %								
70	0,524	28,2	18,3	11,6	9,9	8,7	7,1	5,9
75	0,674	30,0	19,8	12,8	11,0	9,8	8,0	6,8
80	0,842	32,1	21,6	14,2	12,3	11,0	9,2	7,9
85	1,036	34,7	23,7	15,9	14,0	12,6	10,6	9,2
90	1,282	38,1	26,6	18,3	16,2	14,7	12,6	11,1
95	1,645	43,5	31,2	22,2	19,9	18,3	15,9	14,2
99	2,326	54,7	40,9	30,6	27,9	26,0	23,2	21,2
CV = PK 30 %								
δ = 20 %								
70	0,524	38,2	24,9	15,8	13,5	11,9	9,7	8,2
75	0,674	40,8	27,1	17,5	15,1	13,5	11,1	9,4
80	0,842	43,8	29,6	19,6	17,1	15,3	12,7	11,0
85	1,036	47,5	32,7	22,1	19,4	17,5	14,8	12,9
90	1,282	52,4	36,8	25,6	22,7	20,6	17,7	15,6
95	1,645	60,2	43,4	31,2	28,0	25,7	22,4	20,1
99	2,326	76,4	57,4	43,3	39,5	36,8	32,9	30,1
CV = PK 35 %								
δ = 20 %								
70	0,524	50,0	32,8	20,8	17,9	15,8	12,8	10,8
75	0,674	53,6	35,7	23,2	20,0	17,8	14,7	12,5
80	0,842	57,7	39,1	26,0	22,6	20,3	17,0	14,6
85	1,036	62,8	43,3	29,4	25,9	23,4	19,8	17,3
90	1,282	69,4	48,9	34,1	30,3	27,6	23,7	20,9
95	1,645	80,0	57,9	41,7	37,5	34,5	30,2	27,0
99	2,326	102,0	76,9	58,2	53,2	49,6	44,5	40,7

Decyzja o mocy analizy zakresie błędu jest czynnikiem w znacznym stopniu decydującym o liczbie osobników w badaniu BE.

wartość $|\mathbf{Z}\alpha + \mathbf{Z}\beta|^2$

	$Z\alpha/2$						
	0,001	0,01	0,05	0,075	0,1	0,15	0,2
	3,291	2,576	1,960	1,780	1,645	1,440	1,282
$Z_{1-\beta}$							
0,524	14,55	9,61	6,17	5,31	4,71	3,86	3,26
0,674	15,72	10,56	6,94	6,03	5,38	4,47	3,83
0,842	17,07	11,68	7,85	6,88	6,18	5,20	4,51
1,036	18,72	13,05	8,98	7,93	7,19	6,13	5,37
1,282	20,90	14,88	10,51	9,38	8,56	7,40	6,57
1,645	24,36	17,81	12,99	11,73	10,82	9,51	8,56
2,326	31,55	24,03	18,37	16,87	15,77	14,18	13,02

liczba probantów

W przypadku badań biorównoważności leków różnica pomiędzy lekami najczęściej określana jest jako σ = 20 %. Oznacza to że dwudziestoprocentowa różnica pomiędzy preparatami nie ma wpływu na równoważność terapeutyczną leków. W zależności od celu analizy PK liczbę osobników które biorą udział w fazie doświadczalnej badań PK można również obliczyć na podstawie współczynnika korelacji r.

$$\mathbf{n} \geq \{|\mathbf{Z}\alpha + \mathbf{Z}_{1-\beta}|^2 / [1/4 \times (\mathrm{Log}[(1 + r) / (1 - r)])]\} + 3$$

lub na podstawie dwóch współczynników korelacji r1 i r2, w tym celu należy poddać je wcześniej transformacji do wartości z1 i z2.

$$\mathbf{z_1 = 0.5 \times Log[(1+r_1) / (1-r_1)]} \qquad \mathbf{z_2 = 0.5 \times Log[(1+r_2) / (1-r_2)]}$$

$$\mathbf{n \geq 4 \times |Z\alpha + Z_{1-\beta}|^2 / (z_1 - z_2)^2}$$

Podobnej formuły można użyć w celu obliczenia liczby probantów dla pojedynczej grupy w przypadku gdy celem jest porównanie dwóch populacji.

$$\mathbf{n \geq |Z\alpha + Z_{1-\beta}|^2 / \{0.00061 \times [(\arcsin\sqrt{p1}) - (\arcsin\sqrt{p1})]^2\}}$$

P1 i p2 - czynnik w badanej populacji (60 % = 0.6)

Obliczenia liczby probantów dotyczące pojedynczej populacji z zastosowaniem uwarunkowania błędem pierwszego rzędu można przeprowadzić korzystając z formuły:

$$\mathbf{n \geq |Z\alpha/2|^2 \times SD / P}$$

SD - odchylenie standardowe
P - dokładność (uzyskane wyniki na przykład obejmują błąd w zakresie 2h od średniej)

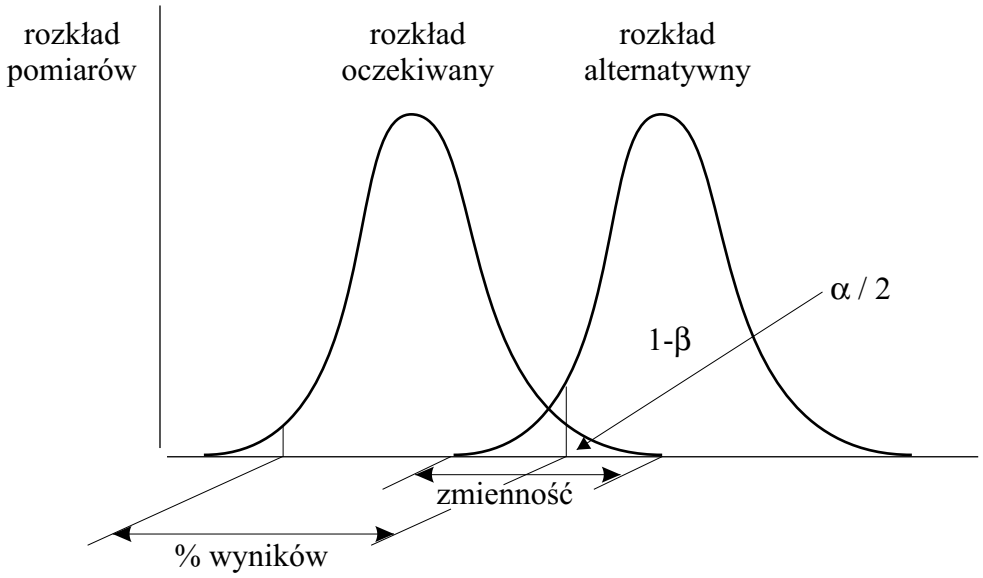
Kolejna metoda obliczania liczby probantów w badaniu klinicznym zakłada udział pojedynczej średniej - M.

$$\mathbf{n \geq [|Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}|^2 \times SD^2] / (Ms - Mp)^2}$$

Ms - średnia dla próbki (ang.: S*ample Mean*)
Mp - średnia dla próbki (ang.: *Population Mean*)
SD - odchylenie standardowe

Lub dla dwóch średnich - M1; M2 (dwie grupy):

$$\mathbf{n} \geq [|\mathbf{Z_{1-\alpha/2}} + \mathbf{Z_{1-\beta}}|^2 \mathbf{x} (\mathbf{SD_1}^2 + \mathbf{SD_2}^2)] / (\mathbf{M_1} - \mathbf{M_2})^2$$



Ryc. Zależność pomiędzy błędem pierwszego, drugiego rzędu oraz zmiennością parametru.

Projektowanie schematu doświadczeń.

Analiza parametrów farmakokinetycznych wymaga przeprowadzania fazy doświadczalnej najczęściej na kilku grupach osobników. Przyczyną jest często bardzo duża zmienność obliczanych parametrów. Stąd jeden osobnik musi uczestniczyć w badaniu dwu lub wielokrotnie w celu określenia stopnia i źródeł zmienności. Stosowaną od dawna formą układu grup osobników w badaniach PK jest kwadrat łaciński. Jeżeli odnieść go do badań biorównoważności to w najprostszej formie przybiera postać:

	Faza I		Faza II	
Sekwencja I	T	*okres*	R	pierwsza grupa osobników
Sekwencja II	R	*wymywania*	T	druga grupa osobników
		= 5 do10 x t1/2kel		

Gdzie T to grupa osobników która otrzymała lek testowany a R grupa która otrzymała lek referencyjny. Kwadrat łaciński stosowany jest również w bardziej rozbudowanych układach(Chow S., Liu J. 2000):

T	R	R
R	T	T

T	R	T	R
R	T	R	T

T	T
R	R
R	T
T	R

T	T	R	R
R	R	T	T
T	R	R	T
R	T	T	R

W przypadku badań biodostępności leku dla jednej dwóch czy trzech formulacji leku kwadrat łaciński przyjmuje formę.

A	B	C	D
B	C	D	A
C	D	A	B
D	A	B	C

A	D	B	C
B	A	C	D
C	B	D	A
D	C	B	A

Kwadrat łaciński Metoda Williamsa

R	T3	T1	T2
T1	R	T2	T3
T2	T1	T3	R
T3	T2	R	T1

T1	T2	T3
T2	T3	R
T3	R	T1
R	T1	T2

4 fazy x 4 sekwencje metoda Williamsa 3 fazy x 4 sekwencje niekompletnie skrzyżowane

Gdzie A może oznaczać lek referencyjny B, C, D leki testowane. W takim układzie doświadczalnym kwadrat łaciński doczekał się modyfikacji metodą Williamsa. Metoda ta umożliwia ograniczenie do minimum powtarzania po sobie kolejnych sekwencji (na schemacie w ramkach). W praktyce likwiduje to efekt przenoszenia pierwszego rzędu, do następnej grupy - ang. *carryover* (leku, efektu etc.). W bardzo złożonych układach doświadczalnych z wieloma zmiennymi stosuje się metodę kwadratu greko- łacińskiego:

A	B	C		α	β	γ		Aα	Bβ	Cγ
B	C	A	+	γ	α	β	=	Bγ	Cα	Aβ
C	A	B		β	α	γ		Cβ	Aα	Bγ

osobnik							
1	R	T1	T2	lub	R	T1	T2
2	R	T2	T3		T2	R	T3
3	R	T3	T1		T3	T1	R
4	T1	R	T3				
5	T2	R	T1				
6	T3	R	T2				
7	T1	T3	R				
8	T3	T2	R				
9	T2	T1	R				

Przykład projektu badania zrównoważonego kontrolą (R),
T1,2,3 testowane preparaty, 3 różne drogi podania, dawki etc.

We wszystkich badaniach przeprowadzanych w układzie krzyżowym można zaobserwować co najmniej trzy rodzaje efektów związanych z projektem doświadczenia:

- efekt związany z podaniem leku
- efekt związany z fazą badania
- efekt związany z sekwencją
- efekt przenoszenia (ang.: *Carryover*)

R	T
T	R

W takim układzie doświadczalnym:

- różnica pomiędzy średnią wyniku w sekwencji I lub II pomiędzy R i T związana jest z lekiem
- różnica pomiędzy średnią wyniku w sekwencji I i II pomiędzy R i R lub (T i T) związana jest z fazą
- różnica pomiędzy stosunkiem średniej R/T w obrębie sekwencji związany jest z sekwencją
- przy założeniu że w sekwencji I średnia wyniku R < T, a w sekwencji II średnia wyniku T < R obserwowany jest efekt przenoszenia. pomiędzy fazami
- jeżeli jedyną zmienną jest efekt związany z lekiem, efekt przenoszenia może być jednostronny

Projektowanie badań w układzie skrzyżowanym najczęściej odbywa się łącznie z randomizacją osobników. Jest to losowe przypisanie danego osobnika do określonej fazy i sekwencji badania.

osobnik:	Faza I,	Faza II,	sekwencja I
1	A	B	
2	A	B	
3	B	A	
4	A	B	
5	B	A	
6	B	A	
7	A	B	
8	B	A	
9	A	B	
10	A	B	
11	B	A	
12	B	A	

osobnik:	Faza I,	Faza II,	sekwencja II
1	B	A	
2	B	A	
3	B	B	
4	B	A	
5	A	B	
6	A	B	
7	B	A	
8	A	B	
9	B	A	
10	B	A	
11	A	B	
12	A	B	

Projektowanie i wybór modelu obliczeniowego.

Model farmakometryczny i jego kształt zależny jest od charakteru danych doświadczalnych oraz celu badawczego. Model obliczeniowy reprezentują zwykle podstawowe zbiory jakimi są (Law A.M., McComas M.G. 2001; Motulsky H., Christopoulos A. 2003):

- dane doświadczalne pochodzące z obserwacji
- dane doświadczalne pochodzące z dopasowania za pomocą modelu
- parametry farmakokinetyczne opisujące grupy danych
- grupy danych podlegające transformacji różnego typu np. skalowanie allometryczne danych itp.

Dane:

Dane w modelach farmakokinetycznych dotyczą zbiorów opisujących stężenia i czasy ich odnotowania C-T (ang.: *Concentration - Time*). Dane surowe (ang.: *raw data*) - pozyskane w trakcie badania przetwarza się w celu uzyskania jednolitego jak najlepiej dopasowanego modelu. Stąd badacz dysponuje danymi z obserwacji (ang.: *Observed*), $[C\text{-}T]_{obs}$ i danymi obliczonymi na podstawie dopasowanego do nich modelu - (ang.: *Predicted*) $[C\text{-}T]_{pred}$. Obecnie zarówno liczba punktów pobrania jak i liczba ochotników w badaniu obliczana jest przez specjalnie do tego celu zaprojektowane programy komputerowe.

Koncepcja modelu:

Punktem wyjścia do projektowania właściwego modelu dla zebranej grupy danych jest cel badań. Obecnie najpopularniejsze modele obliczeniowe stosowane w farmakometrii to modele hybrydowe - mieszane takie jak PK/PD, modele fizjologiczne, statystyczne i kompartmentowe. W związku z szerokimi możliwościami obliczeniowymi wymienionych modeli stawiane są różne cele badań oraz opisywane liczne modele hybrydowe.

Cel badania:

Celem badania może być zarówno optymalizacja cząsteczki leku w ramach badań nad NCE jak i badania biorównoważności czy terapia monitorowana stężeniem leku. Nie każdy model obliczeniowy spełni oczekiwania poznawcze badacza stąd trudno o gotowe rozwiązania. Jednym z częściej stosowanych obecnie modeli obliczeniowych w farmakokinetyce jest model hybrydowy - mieszany. Model taki wykorzystuje założenia różnych metod obliczeniowych i ukierunkowany jest na uzyskany efekt - informację prowadzącą do optymalizacji etapu badania.

Parametryzacja:

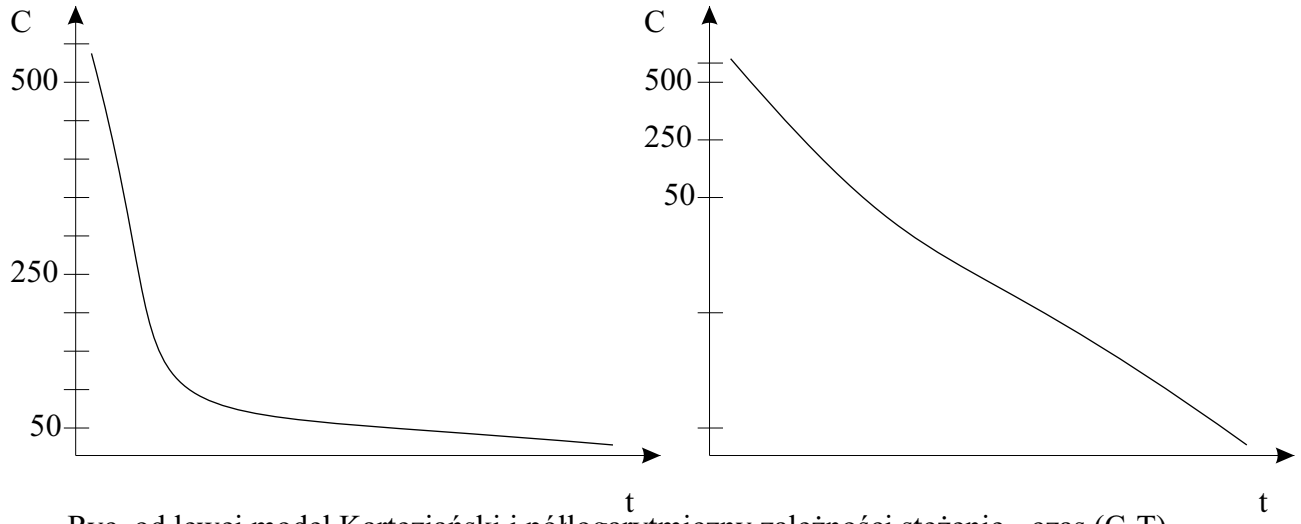
Różne modele wymagają stosowania specyficznych parametrów dostosowanych do ich funkcji i zakresu opisu badanych zjawisk. Niektóre rodzaje parametrów mają w farmakokinetyce czy toksykokinetyce bardzo szerokie zastosowanie. Przykładem mogą być stałe szybkości, klirens czy objętość dystrybucji. Można więc wyróżnić co najmniej kilka grup różnych rodzajów parametrów. Istnieją one w ramach założeń opisujących stosowane modele obliczeniowe (Parker R.S., Doyle F.J. III 2001; Dixit R. i wsp. 2003):

- chemiczne
- fizjochemiczne
- fizykochemiczne
- fizjologiczne
- statystyczne
- matematyczne
- kliniczne

Parametryzacja modelu farmakokinetycznego sięga również w modele farmakometryczne z takich dziedzin jak farmakodynamika czy analiza lub optymalizacja profilu metabolicznego. Parametryzacja takiego układu wymaga ustalenia tzw. punktów granicznych (ang.: *End points*) oraz określenia jednostek.

Wizualizacja modelu:

Wizualizacja modelu obejmuje wizualizacje matematyczną i graficzną. Modele farmakokinetyczne opisywane są najczęściej za pomocą odpowiednich algorytmów. Algorytmy opisujące zachowanie się cząsteczek leku obrazują procesy zachodzące na różnych poziomach organizacyjnych organizmu rozumianego jako biofaza. Poziom ten równie dobrze opisać można w skali komórkowej jak i w skali układowej, narządowej czy całego organizmu. Służą temu różne metody obliczeniowe. Obecnie rzadkością jest opis matematyczny modelu wykonywany bezpośrednio przez badacza. Zwykle narzędziem służącym do opisania modelu jest odpowiedni program obliczeniowy przeznaczony do obliczeń farmakokinetycznych bądź toksykokinetycznych. Najczęstszą formą przekazu graficznego są generowane przez specjalistyczne oprogramowanie wydruki kartezjańskie lub pół logarytmiczne zależności stężenie - czas.



Ryc. od lewej model Kartezjański i półlogarytmiczny zależności stężenie - czas (C-T).

W analizie danych z dużych populacji stosuje się wykresy scatterowskie, wykresy najmniejszych kwadratów, dystrybucyjne korelacyjne etc..

Wybór odpowiedniego modelu:

Do określania dopasowania modelu do danych uzyskanych z obserwacji stosuje się różnego typu kryteria dopasowania R, R^2 AIC (ang.: *Akaike Information Criterion*), MSC (ang.: *Model Selection Criteria*), BIC (ang.: *Bayesian Information Criterion; Schwarz Criterion - SC*), F (ang.: *Fischer Criterion; FIC*), PIC (ang.: *Posterior information criterion*), PLS (ang.: *Partial Last Squars*). Najczęściej stosowanymi kryteriami informującymi o stopniu dopasowania modelu PK do danych pochodzących z obserwacji są kryteria Akaik'e - AIC i kryterium Bayesowskie Schwarza - BIC; SC. Wyniki analiz wykonanych za pomocą obu kryteriów pozwalają wybrać z zaproponowanych sposobów modelowania najodpowiedniejszy (Riviere J.E. 1999; Schoenwald R.D. 2002). Sposób najlepszego dopasowania do danych z obserwacji określany jest najczęściej na podstawie:

- liczby danych
- liczby powtórzeń
- liczby określanych na podstawie modelu parametrów PK

		Model 1		Model 2		Model 3	
T	C(obs)	C(pred)	n obs	C(pred)	n obs	C(pred)	n obs
6	102	101	1	101,9	1	101,9	5
8	70	69	1	70,1	1	70,8	5
12	33	32	1	32	1	32	5
24	24	23,5	1	24	1	24	5
48	15	14,9	1	14,8	1	14,8	5
56	6	6	1	6,1	1	6,1	5
		P	= 1	P	= 4	P	= 8
		n	= 6	n	= 6	n	= 6
		WSS	= 3,26	WSS	= 1,07	WSS	= 0,34
		AIC	= 9,09	AIC	= 8,40	AIC	= 9,52
		MSC	= 8,24	MSC	= 8,35	MSC	= 6,56
		BIC	= 8,88	BIC	= 7,57	BIC	= 7,86
		CV	= 1124	CV	= 1136	CV	= 1140
		BIAS	= 0,0144	BIAS	= 0,0044	BIAS	= 0,0016
		R	= 0,9999	R	= 0,9999	R	= 0,9998
		R^2	= 0,9999	R^2	= 0,9998	R^2	= 0,9997

T - czas pobrania próbki
C(obs) - stężenie stwierdzone
C(pred) - stężenie obliczone na podstawie stworzonego modelu
n obs; - liczba powtórzeń
n - liczba serii danych
P - liczba parametrów obliczonych na podstawie wykonanego doświadczenia
AIC - kryterium Akaike
BIC - kryterium Bayesowskie
WSS - ważona suma kwadratów odchyleń
R - współczynnik liniowości Pearsona
R^2 - kwadrat współczynnika Pearsona

Ryc. Dobór właściwego modelu na podstawie kryteriów informacyjnych i podstawowych statystyk..

Znaczenie kryteriów opisują liczby dodatnie a model o większym stopniu dopasowania i większym prawdopodobieństwie dopasowanego do danych surowych opisu ma niższą wartość liczbową. Zachowując więc stałą wartość AIC dla trzech różnych modeli na poziomie < 10 można stwierdzić że modele posiadające dużą liczbę dokładnych danych pozwalają na obliczanie większej liczby parametrów. Liczbę tę można dokładnie określić i dopasować do wybranego modelu. Określenie najlepszego stopnia dopasowania do badanych ciągów danych umożliwiają metody SSR (OLS), SSM, WSS (WSSR; WLS), ELS.

Suma kwadratów odchyleń - SSR; OLS; RSS (ang.: *Sum of the Squared Deviations, Ordinary Last squers*):

$$\mathbf{RSS = \Sigma (X(obs) - X(pred))^2}$$

X(obs) - wartość badana pochodząca z obserwacji
X(pred)- wartość badana pochodząca z obliczeń
Σ - suma

Suma kwadratów odchyleń pomiędzy wartościami obliczonymi a wartością średnią - SSM, TSS (ang.: *Sum of the Squared Deviations of Mean*):

$$\mathbf{SSM = \Sigma (X_{(obs)} - X_{(M)})^2}$$

X(M) - wartość średnia badana pochodząca z obserwacji

Suma kwadratów odchyleń pomiędzy wartościami obliczonymi a wartością średnią próbki - ESS (ang.: *Residual Sum of Squares*):

$$\mathbf{ESS = \Sigma (X_{(pred)} - X_{(M)})^2}$$

M - średnia próbki obliczonej

Przy czym: $\mathbf{SSM = RSS + E}$ $\mathbf{SSR^2 = ESS / SSM}$

Ważona suma kwadratów odchyleń pomiędzy wartościami obliczonymi a wartością średnią - WSS; WSSR, WLS (ang.: *Weighted sum of the Squared Deviations; Weighted least Squars*):

$$\mathbf{WSS = \Sigma W x (X_{(obs)} - X_{(pred)})^2}$$

W - 1 / obserwacja

Poszerzony model najmniejszych kwadratów ELS (ang.: *Extended Least Squers*):

$$\mathbf{ELS = \Sigma [W x (X_{(obs)} - X_{(calc)})^2 + Ln\ VarX_{(calc)}]}$$

Kryterium Akaike - AIC (ang.: *Akaike Information Criterion*):

$$\mathbf{AIC = n\ x\ Ln(WSS) + 2\ x\ p} \qquad \mathbf{AIC = -\ 2\ x\ Ln(ML) + 2\ x\ p}$$

$$\mathbf{AIC = n\ x\ Ln[\Sigma\ W\ x\ (X_{(obs)} - X_{(calc)})^2] + 2\ x\ p}$$

n - liczba obserwacji(danych)
p - liczba parametrów
ML - maksymalne prawdopodobieństwo (ang.: *Maximum Likelihood*)

Kryterium Bayesowskie - Schwarz'a BIC(ang.: *Schwarz Criterion; BIC - Bayesian Information Criterion*):

$$\mathbf{BIC = n\ Ln(WSS) + p\ Ln(n)} \qquad \mathbf{BIC = -\ 2\ x\ Ln(ML) - Ln(n)\ x\ p}$$

Kryterium Kubinyi'a - FIT:

$$\mathbf{FIT = [R^2 / (1-R^2)]\ x\ [(n-p) / (n+p)^2]}$$

Kryterium wyboru modelu modelu - MSC (ang.: *Model Selection Criterion*):

$$\mathbf{MSC = Ln\{[\Sigma\ W\ x\ (X_{(obs)} - MX_{(obs)})^2] / [\Sigma\ W\ x\ (X_{(obs)} - X_{(pred)})^2]\} - [(2\ x\ p) / n]}$$

MX(obs) - średnia dla próbki w ramach obserwacji

Jednym z narzędzi jakimi posługuje się farmakokinetyka jest między innymi analiza wariancji. Analiza taka może obejmować jeden lub wiele czynników. Jest to typowe narzędzie do opisania danych farmakokinetycznych niejednorodnych, wykazujących określoną zmienność. Warunkiem zastosowania analizy wariancji jest rozkład normalny parametrów badanych i niezależny sposób ich uzyskania (Doerffel D. 1989). Kolejnym narzędziem w analizie statystycznej danych jest kowariancja czyli średnia iloczynów odchyleń dla badanych par danych. W celu wyznaczenia wariancji - Var (ang.: *Variance*) oraz współczynnika wariancji - CV (ang.: *Coefficient of Variation*) w procentach, w obliczeniach populacyjnych stosuje się wzory:

$$\mathbf{Var = SSM / (n -1)}$$

$$\mathbf{CV = (100 \times SD) / M}$$

M - średnia arytmetyczna (ang.: *Arithmetic Mean*)
SD - odchylenie standardowe (ang.: *Standard Deviation*)

$$\mathbf{CV = \sqrt{Var}}$$

Wyznacza się także standardowy błąd średniej - SEM (ang.: *Standard Error of Mean*):

$$\mathbf{SEM = SD / \sqrt{n}}$$

Walidacja modelu:

Walidacja modelu farmakokinetycznego zwykle obejmuje określenie czułości modelu oraz porównania z danymi doświadczalnymi. Obliczanie czułości modelu opartego na algorytmie można przeprowadzić korzystając z równania (Hendriksen B.A. i wsp. 2002):

$$\mathbf{S = (a_{(calc)} / b_{(calc)}) \times (b / a)}$$

S - czułość (ang.: *Sensitivity*)
a,b - parametry znane
a(calc), b(calc) - parametry które ulegają zmianie, obliczeniu, ekstrapolacji itd.

Często stosowanymi parametrami oceny uzyskanej wartości jest względne odchylenie standardowe RSD (ang.: *Relative Standard Deviation*).

$$\mathbf{RSD = SD / M}$$

SD - odchylenie standardowe
M - średnia

Pochodną względnego odchylenia standardowego jest współczynnik wariancji CV (ang.: *Coefficient of Variation*).

$$\mathbf{CV = RSD \times 100\ \%}$$

Parametrem wykorzystywanym do określenia błędu systematycznego jest BIAS.

$$\mathbf{BIAS = [(Obs - Pre) / Obs] \times 100\ \%}$$

Obs - wartość zaobserwowana (ang.: *Observed*)
Pred - wartość obliczona (ang.:*Predicted*)

R^2 oraz AIC mogą być nie tylko metodami oceny modelu PK. Pozwalają również ocenić dane surowe czyli szeregi danych C-T. Metody te wykorzystać można w ocenie zależności zmian C-T leku i jego metabolitu. Ponieważ zmiana stężeń metabolitu we krwi jest wypadkową zmian stężenia leku proces ten powinien być możliwy do opisania poprzez wykazanie mniejszej lub większej korelacji pomiędzy zmianami stężenia leku a zmianami stężenia metabolitu. Podobnie kryterium Akaike może stać się narzędziem analizy i odpowiedzieć na pytanie: Czy punktem wyjścia do uzyskania szeregu Metabolit[C-T] jest szereg danych Lek[C-T] (obserwowane). W pewnym sensie szereg Metabolit[C-T] można potraktować jako dane wynikające (ang.: *Predicted*) z szeregu Lek [C-T] (ang.: *Observed*).

Stąd stosunek AIC / R^2 pozwala ocenić i porównać jakościowo zmiany stężenia leku i metabolitu w czasie w jednej grupie doświadczalnej lub porównać różne grupy doświadczalne. Ze wzrostem tej wartości (zawsze jest większa od zera) rozbieżność pomiędzy zmianami stężenia leku i metabolitu rośnie. Im wartość jest mniejsza tym większa jest zależność kinetyki metabolitu od zmian stężenia leku.

T	L	M	L	M	L	M	L	M
0,033	3	0,02	3	0,02	3	4	3	0
0,5	15	12	15	12	15	3	15	18
1	33	66	33	66	33	8	33	43
1,5	56	124	56	124	56	9	56	60
2	84	198	84	185	84	3	84	139
2,5	40	136	40	120	40	8	40	55
3	32	62	32	31	32	13	32	36
4	12	33	12	89	12	25	12	25
5	9	22	9	195	9	4	9	11
6	4	15	4	4	4	3	4	8
8	2	8	2	66	2	1	2	4
12	0,2	4	0,2	33	0,2	3	0,2	0,5
24	0,02	0,01	0,02	8	0,02	2	0,02	0,1
AIC / R^2	**140.00**		**237.00**		**1011.00**		**111.41**	

Ryc. Symulacja czterech przypadków szeregów danych C-T dla L (leku) i M. (metabolitu). Korelację między zmianą stężenia w każdym przypadku opisuje stosunek AIC / R^2.

Błędy w projektowaniu i analizie parametrów farmakokinetycznych CPKP.

Błędy dotyczące grupy doświadczalnej:

Prawidłowe właściwości grupy na której przeprowadzane są badania farmakokinetyczne w przypadku badań kompletnych profili farmakokinetycznych oraz PK pierwszej fazy opisują szczegółowo zasady GCP (ang.: *Good Clinical Practice*) formułowane dla medycyny i weterynarii odpowiednio w ramach dyrektyw ICH oraz VICH (ang.: *International Conference on Harmonisation*). Podstawowymi parametrami włączenia do grupy na której ma zostać określony kompletny profil farmakokinetyczny jest zbieżność takich parametrów jak: wiek, masa ciała, powierzchnia ciała, płeć, rasa, profil metaboliczny, a dla leków wydalanych wraz z moczem GFR w przeliczeniu na 1.73 m^2 powierzchni ciała (człowiek). Podstawowe punkty krytyczne doboru probantów obejmują:

- genotypowanie

Celem jest wyłowienie szybkich i wolno metabolizujących. W populacji japońskiej, chińskiej oraz wśród eskimosów ok. 90 % osobników zalicza się do szybko metabolizujących.

- kontrolę GFR

Szczególnie ważny punkt w stosunku do leków wydalanych wraz z moczem. Obecnie porównanie wyników opiera się na normalizacji wyniku w stosunku do powierzchni ciała (1.73 m^2).

- perfuzję tkanek

Kontrola pracy układu krążenia, ma na celu potwierdzenie zbliżonej wartości perfuzji tkanek.

- określenie aktywności enzymatycznej wątroby

Pozwala wykluczyć przypadki w których aktywność enzymatyczna wątroby odbiega od normy. Wskazuje także na ewentualne anomalie produkcji białek.

- kontrolę poziomu białek we krwi -AAG i HSA

Pozwala na wykluczenie przypadków z nieprawidłowym stężeniem białek osocza (nietypowe wartości wiązania leku przez białka - nietypowa dystrybucja i eliminacja)

Badanie ma potwierdzić aktywność poszczególnych enzymów wątrobowych na prawidłowym poziomie.

Błędy dotyczące ilości zebranych danych:

Przyczyną błędu w przeprowadzonych badaniach może być niewłaściwe zdefiniowanie punktów czasowych pobieranych prób tkanek. Błąd przy zbyt małej liczbie punktów będzie wzrastał wraz z odejściem od liniowego charakteru przebiegu faz dystrybucji i eliminacji (model jednokompartmentowy). Błąd wzrastać będzie także w przypadkach nie uchwyconych zniekształceń krzywej C-T, wynikających na przykład z redystrybucji leku w wyniku krążenia żółć-przewód pokarmowy-krew. Błąd wynikający z niewłaściwego rozplanowania punktów czasowych służących wykreśleniu krzywej oraz AUC może również wykluczyć z obrazu krzywej fazę wchłaniania leku. Faza ta może nie być możliwa do zaobserwowania lub opisana w przypadku zbyt małej liczby danych. W przypadku gdy profil zmian stężenia leku we krwi jest częściowo opisany lub znany z badań przedklinicznych ilość danych (punktów poboru krwi lub osocza do badań) powinna wzrastać, szczególnie w przedziałach ilustrujących znaczne zmiany w dyspozycji leku.

Błędy dotyczące metody analitycznej:

Najczęściej wykorzystywaną metodą w badaniach PK jest HPLC i UPLC. Błędy analityczne przekładające się na błędy w obliczeniach farmakokinetycznych, zwykle związane są ze zbyt małą czułością metody a najczęściej ze zbyt wysokimi wartościami LOQ lub LOD. Stąd eksperyment zakończony zostaje zbyt wcześnie z uwagi na brak możliwości oznaczenia stężeń leku w zbyt niskich jak na opracowaną metodę stężeniach. Częsty problem stanowi także niewielka objętość prób (osocze) i niedoskonałe techniki oczyszczania matryc biologicznych do analiz chromatograficznych.

Wykluczeniu błędów w tej fazie służy optymalizacja wartości resztkowego pola powierzchni pod krzywą. Dostosowanie wartości resztkowego pola powierzchni do standardów międzynarodowych pozwala uniknąć także błędu obliczeniowego dotyczącego wartości MRT oraz t1/2kel. Najtrudniejszymi z punktu widzenia analityki problemami optymalizacji metody w badaniach kompletnych profili farmakokinetycznych są:

- optymalizacja i spełnienie zasad:

$$\mathbf{LOQ / \beta < AUC_{(0-\alpha)} / 5} \quad \text{lub} \quad \mathbf{(10 \times \sigma / S) / \beta < AUC_{(0-\alpha)} / 5} \quad \text{lub} \quad \mathbf{C_{last} < C_{max} / 10}$$

(nie dotyczy eksperymentu w którym próbkowanie sięga 72 godziny od podania leku WHO (2005))

$$\mathbf{[N_{(LOQ)} < LOQ] < PK_{(CV\%)}} \quad \text{lub} \quad \mathbf{[N_{(LOQ)} < LOQ] < (NS / 5)}$$

$$\mathbf{3 \times t_{1/2} > t_{(last)} < 4 \times t_{1/2}} \quad \text{[WHO (2005)]}$$

LOQ - granica oznaczalności - (ang.: *Limit Of Quantitation*)
σ - wartość szumów
S - czułość
β - stała szybkości eliminacji
AUC(0-a) - pole powierzchni pod krzywą między czasem równym 0 a punktem czasowym ta
N(LOQ) - liczba prób w eksperymencie w których stężenie jest poniżej LOQ (ang.: *Number of Samples Below LOQ*)
PK(CV%) - zmienność parametrów farmakokinetycznych (ang.: *Pharmacokinetics Variability*)
NS - liczba próbek w badaniu PK (ang.: *Number of Samples*)

- zastosowanie optymalizacji etapów:

  - sprawdzenia trwałości analitu w badanej matrycy
  - przechowywanie próbek w stanie głębokiego mrożenia
  - rozpoznania właściwości fizykochemicznych analitu (pKa, pH, LogP, polarność)
  - rozpoznania właściwości fizykochemicznych i dobór standardu wewnętrznego
  - przygotowania próbek do oczyszczania
  - rozdziału analizy stężeń frakcji wolnej leku od frakcji związanej z białkami
  - optymalizacja metod denaturacji
  - optymalizacji metod oczyszczania złożonych matryc biologicznych
  - minimalizacja kroków w trakcie opracowywania metody przygotowania próbek do analizy

- dostosowanie typu detekcji do właściwości analitu
  dobór najbardziej specyficznej metody detekcji dla danego związku. Jeżeli analit wykazuje fluorescencję bez tworzenia pochodnych to ten typ detekcji jest bardziej specyficzny od UV lub DAD. Jeżeli analit umożliwia uzyskanie dużej odpowiedzi detektora (ang.: *Response*) amperometrycznego czy elektrochemicznego to jest to detekcja znacznie bardziej specyficzna od UV lub DAD. Jeżeli laboratorium posiada spektrometr masowy jest to najbardziej specyficzny typ detekcji umożliwiający bezsporną identyfikację w badaniach PK.

- walidacja metody badawczej oraz wykonanie badań stabilności analitu i standardu wewnętrznego.
- kontrola jakości QC (ang.: *Quality Control*) w trakcie prowadzenia analiz PK.

Błędy obliczeniowe:

Duże błędy w obliczeniach mogą być wynikiem kilku niewielkich błędów w części analitycznej i w fazie klinicznej. W przypadku wymienionym powyżej mogą dotyczyć błędu w obliczeniach stałej szybkości eliminacji leku (a co za tym idzie klirensu oraz t1/2kel). To może przyczynić się do zaproponowania niewłaściwego interwału dawkowania leku.

Zadania terapii monitorowanej stężeniem leku.

Badania farmakokinetycznych mających na celu uzyskanie pełnego profilu farmakokinetycznego leku CPKP (ang.: *Complete Pharmacokinetics Profile*) różnia sie celem i metodyką z terapią monitorowaną stężeniem leku w organizmie - TDM - (ang.: *Therapeutic Drug Monitoring*). Prowadzi ona głównie do optymalizacji dawkowania leku w określonym przypadku terapeutycznym (Aronson J.K. i wsp. 1993). Terapia monitorowana stosowana jest obecnie zarówno w medycynie jak i w weterynarii. Pobieranie prób do badań analitycznych odbywa się tu znacznie rzadziej. Zazwyczaj ma na celu uchwycenie jednej fazy kinetycznej leku. Klasyczne działania w obrębie terapii monitorowanej mają na celu między innymi:

- kontrolę przebiegu fazy ustalonych wahań stężenia leku - *steady state* (> 3 x t1/2kel)
- kontrolę adekwatności dawki do uzyskiwanego efektu terapeutycznego
- wykluczanie i kontrolę niepożądanych działań leku -ADRs (ang.: *Adverse Drug Reactions*) zależnych od dawki
- stwierdzania ewentualnych zmian w pracy głównych organów odpowiedzialnych za eliminację leków z ustroju
- obserwację zmian dotyczących możliwych do zaistnienia interakcji
- modyfikacji schematów dawkowania

Obecnie w celu dokładnego określania działań zmierzających do osiągania stężenia docelowego spotkać można akronim TCI (ang.: *Target Drug Concentration*). Taki termin znajduje uzasadnienie w podstawowych formułach dotyczących obliczania wartości dawki leku.

$$D_L = C_T \times Vd$$

$$D_M = C_T \times Cl$$

DL - dawka inicjująca (ang.: *Loading Dose*)
DM - dawka podtrzymująca (ang.: *Maintenance Dose*)
CT - stężenie docelowe (ang.: *Target Concentration*)
Vd - objętość dystrybucji
Cl - klirens

Terapia monitorowana stężeniem leku w organizmie wykorzystuje obecnie najnowocześniejsze, praktyczne rozwiązania i metody szybkiej analizy farmakokinetycznej. Analiza taka zwykle prowadzona jest w oparciu o szybkie testy określające stężenie leku w organizmie lub o analizę typu PK/PD. Stosuje się w tym celu między innymi jednoczesne zastosowanie specyficznego oprogramowania i urządzeń dozujących lek (pompy infuzyjne sterowane za pomocą odpowiedniego oprogramowania) (Walton R. i wsp. 1999). Takie rozwiązania zastosowano miedzy innymi w:

- leczeniu postaci ostrej astmy teofiliną
- stosowaniu anestetyków takich jak midazolam czy fentanyl
- podawanie antykoagulantów takich jak heparyna czy warfaryna
- infuzjach oksytocyny
- leczeniu aminoglikozydami
- leczeniu nitroprusydkiem

Działania niepożądane leków - ADR (ang.: *Adverse Drug Reactions*).

Niepożądane działania leków podzielić można na grupy A, B, C, D, E. Mogą być wynikiem właściwości substancji leczniczej, lub postaci leku. Przyczyną ich wystąpienia są interakcje z innymi lekami lub pożywieniem. Częstą przyczyną wystąpienia ADR jest nieodpowiednie dawkowanie lub przy lekach o małym indeksie terapeutycznym i wąskim przedziale dawkowania brak kontroli nad kinetyką leku - TDM. Jeden lek może jednocześnie powodować ADR kilku różnych typów. Określić można przynajmniej kilka grup różnych czynników zwiększających możliwość pojawienia się niepożądanych działań leku. Czynnikami zwiększającymi ryzyko wystąpienia ADR są między innymi:

- wiek (osoby starsze, dzieci, noworodki)
- dysfunkcja organów decydujących o eliminacji leków
- brak informacji o ADR dla danego leku
- uwarunkowania genetyczne lub osobnicze
- zwiększenie ilości stosowanych jednocześnie leków
- nadużywanie środków odurzających i stosowanie używek
- brak wystarczająco specyficznej metody lub testu w ramach TDM

Główne grupy działań niepożądanych leków.

Typ A: Działania te są zwykle przewidywalne i wynikają z cech substancji leczniczej. Są zawsze zależne od dawki.Ten typ działań niepożądanych charakteryzuje bardzo niska śmiertelność. Najczęściej są wynikiem nieodpowiedniego dawkowania leku. Określa się je mianem ubocznych działań leku (ang.: *Side Effects*). Są najczęściej spotykaną grupa działań niepożądanych.

Typ B: Działania te wynikają z nieznanych cech substancji leczniczej i są niezależne od dawki. Charakteryzuje je znaczna śmiertelność. Działania typu B są trudne do przewidzenia lub nieprzewidywalne. Przyczyną ich występowania są różnice genetyczne lub specyficzne mechanizmy immunologiczne. Działania te spotykane są rzadziej.

Typ C: Są to działania pozostawiające trwałe zmiany w organach i tkankach. Najczęściej pojawiają się przy długotrwałym leczeniu danym lekiem.

Typ D: Są to tzw. reakcje opóźnione (ang.: *Delayed Reactions*) które ujawniają się dopiero po pewnym okresie od stosowania leku. Należą do nich karcynogenność i teratogenność.

Typ E: Reakcje wykluczające lek ze stosowania.

ADR o mechanizmie immunologicznym.

Wśród niepożądanych działań leków ważne miejsce zajmują AADR czyli działania niepożądane leków o mechanizmie immunologicznym (ang.: *Allergic Adverse Drug Reactions*). Dotyczą one najczęściej leków o masie cząsteczkowej powyżej 1000 D. Zwykle takie właśnie cząsteczki mogą zostać potraktowane jako antygen i uczestniczyć w niekorzystnych w danym przypadku terapeutycznym reakcjach immunologicznych. Można je podzielić na:

AADR typu I - reakcje anafilaktyczne
AADR typu II - reakcje cytotoksyczne
AADR typu III - reakcje nadwrażliwości typu późnego
AADR typu IV - opóźnione zależne od limfocytów typu T, np. wyprysk kontaktowy

Interpretacja obliczeń.

Wykonując obliczenia farmakokinetyczne dokonywany jest opis wielu nakładających się procesów. Często ich przebieg w uproszczeniu opisuje się akronimem LADME. Obecnie rozbudowywanym często do LADMER na podkreślenie analizy efektu - R (ang. *Response*). W badaniach farmakokinetycznych najczęściej obliczane parametry dotyczą procesów mieszczących się w pojęciach A,D,M,E.

L (ang.: *Liberation; Drug Release,* niem.: *Losungsgeschwindigkeitskonstante, Arzneistofffliberation)*- *uwalnianie* leku z jego postaci farmaceutycznej.

Poprzez odpowiednie sporządzenie postaci leku osiągnąć można żądane cechy w technologicznie możliwym do uzyskania zakresie. Zakres ten najczęściej wytycza fizykochemiczna charakterystyka substancji czynnej i rzutuje na wszystkie kolejne procesy farmakokinetyczne. Szybkość uwalniania substancji czynnej jest jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących postać leku. Proces uwalniania leku do pewnego stopnia jakościowo opisuje tlag - czas opóźnienia wchłaniania.

A (ang.: *Absorption*; niem.: *Absorption, Resorption*) - *wchłanianie* substancji czynnej, wchłanianie z miejsca podania do krwi - kompartmentu centralnego.

Proces wchłaniania można obserwować na krzywej stężeń od momentu podania leku do uzyskania jego maksymalnego stężenia we krwi. Temu i następnemu procesowi kinetycznemu towarzyszy już w mniejszym lub większym stopniu proces dystrybucji i eliminacji z ustroju. Proces wchłaniania w niektórych przypadkach może być trudny lub niemożliwy do zaobserwowania na przykład po donaczyniowym podaniu leku.

D (ang.: *Distribution*; niem.: *Distribution, Verteilung*) - *dystrybucja* leku w organizmie. Proces dystrybucji leku jest procesem który na osi stężeń obserwować można zawsze (z wyjątkiem kinetyki *flip-flop*).

W trakcie tej fazy kinetycznej lek rozmieszczany jest w organizmie i jednocześnie eliminowany. Punktem od którego zwykle określa się początek fazy dystrybucji jest maksymalne stężenie leku jakie zarejestrowano we krwi. Jednak proces ten częściowo zachodzi już w fazie wchłaniania leku.

M (ang.: *Metabolism*; niem.: *Metabolismus*) - *metabolizowanie* leku.

Reakcje metaboliczne jakim ulegają leki to głównie przemiany zachodzące w wątrobie (I Faza: utlenianie, redukcja, hydroliza; II Faza: sprzęganie). Skutek tych reakcji dla fazy wchłaniania i w badaniach biodostępności opisywany jest w farmakokinetyce między innymi jako “efekt pierwszego przejścia”.

E (ang.: *Excretion*; niem.: *Ausscheidung*) - *wydalanie* leku. Wydalanie leku oraz procesy metabolizmu gwarantują jego eliminację.

Eliminacja z organizmu jest procesem na który składa się wiele złożonych procesów. Każdy z nich odgrywa określoną rolę w stosunku do poprzedzających ten etap faz kinetycznych. Zaburzenia którejkolwiek ze składowych procesów eliminacji leku z ustroju zmienia jego farmakokinetykę leku. Celowe zmiany tej fazy kinetycznej prowadzą najczęściej do przedłużenia czasu przebywania leku w organizmie a tym samym wydłużenia t1/2kel oraz czasu trwania stężenia efektywnego leku. Zmiany w eliminacji leku wynikające ze stanów patologicznych organizmu (niewydolność nerek, schorzenia wątroby) nieuwzględnione przy formułowaniu dawki leczniczej mogą prowadzić w konsekwencji do groźnych powikłań i pojawienia się działań niepożądanych leku ADRs (ang.: *Adverse Drug Reactions*).

Wzajemne nakładanie się procesów kinetycznych często uniemożliwia selektywne opisywanie wyróżnionych faz i stanowi źródło błędu w obliczeniach. Przyjęta metoda doświadczalna i analityczna oraz charakter samego leku, mogą nie zagwarantować możliwości selektywnej obserwacji kolejnych procesów kinetycznych. W takim wypadku jedynie precyzyjne, wielotorowe obliczenia i symulacje dla których punktem wyjścia są dane doświadczalne mogą doprowadzić do stworzenia prawidłowego opisu farmakokinetyki leku.

Podział parametrów farmakokinetycznych:

Parametry farmakokinetyczne to obecnie rozległa grupa różnego typu współczynników. W grupie tej wyróżnić można co najmniej kilka umownych podgrup. Podział w przypadku parametrów farmakokinetycznych jest dalece umowny. Na sens poszczególnych parametrów nakładają się zarówno:

- źródło parametru - model farmakokinetyczny
- historyczne sklasyfikowanie parametru
- zastosowanie parametru (kliniczne / matematyczne / statystyczne / hybrydowe)

Farmakokinetyka jest dziedziną pozwalającą w sposób bardzo elastyczny dostosowywać model obliczeniowy oraz grupy parametrów w celu uzyskania żądanej informacji. Konsekwencją jest również duża dowolność łączenia różnego typu parametrów farmakokinetycznych w celu dokonania opisu farmakokinetyki leku. Stąd różnice w klasyfikacji parametrów ulegają ciągłemu zacieraniu. Proces ten nasila się wraz z rozwojem nowych metod obliczeniowych i nowych sposobów analizy. Podział parametrów farmakokinetycznych - PK (ang.: *Pharmacokinetic Parameters*) w zależności od sposobu opisywania krzywej C-T:

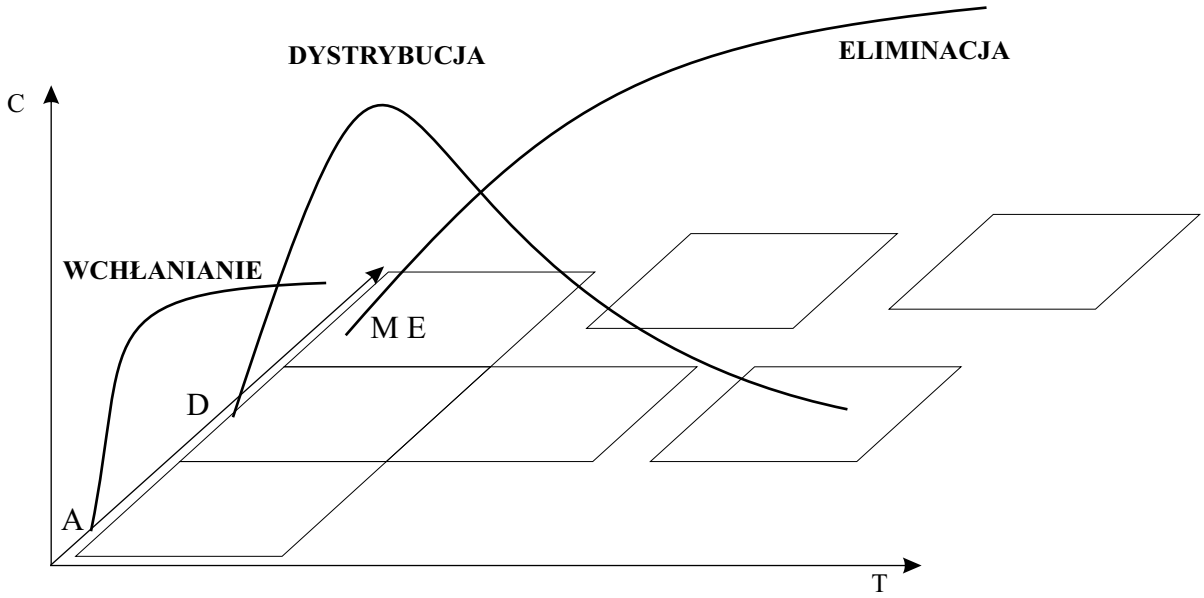
Wartości ilustrujące procesy

Matematyczne i statystyczne		Fizykochemiczne		Kliniczne i fizjologiczne	
AUC	Co	K_{12}		Vd	F
AUMC	C_{max}	K_{21}		$t_{1/2kel}$	Cl, GFR
MRT	t_{lag}	K_{10}			wiązanie z białkami
MAT	α	K_{20}			współczynniki ekstrakcji
MTT	β; k_{el}	K_m			współczynniki allometryczne
A		V_{max}			
B					

Rys. Podział parametrów farmakokinetycznych w zależności od sposobu w jaki opisują procesy farmakokinetyczne.

Parametry składające się na opis krzywej relacjonującej procesy farmakokinetyczne.

Wykres krzywej stężeń (C-T) na podstawie której oblicza się parametry farmakokinetyczne stanowi odbicie wielu procesów i przemian jakim lek ulega w organizmie jednocześnie są to procesy zachodzące równolegle - procesy równoczesne (Danek A. 1979). Obraz krzywej C-T rysuje się od momentu podania leku do jego eliminacji. Poszczególne fragmenty krzywej oraz jej opis w postaci obliczeń farmakokinetycznych najczęściej nie oddaje przebiegu każdego z badanych procesów kinetycznych z osobna, od ich zainicjowania do zakończenia. Jednak część parametrów farmakokinetycznych opisujących zmienność C-T cechuje w tym względzie duża selektywność.

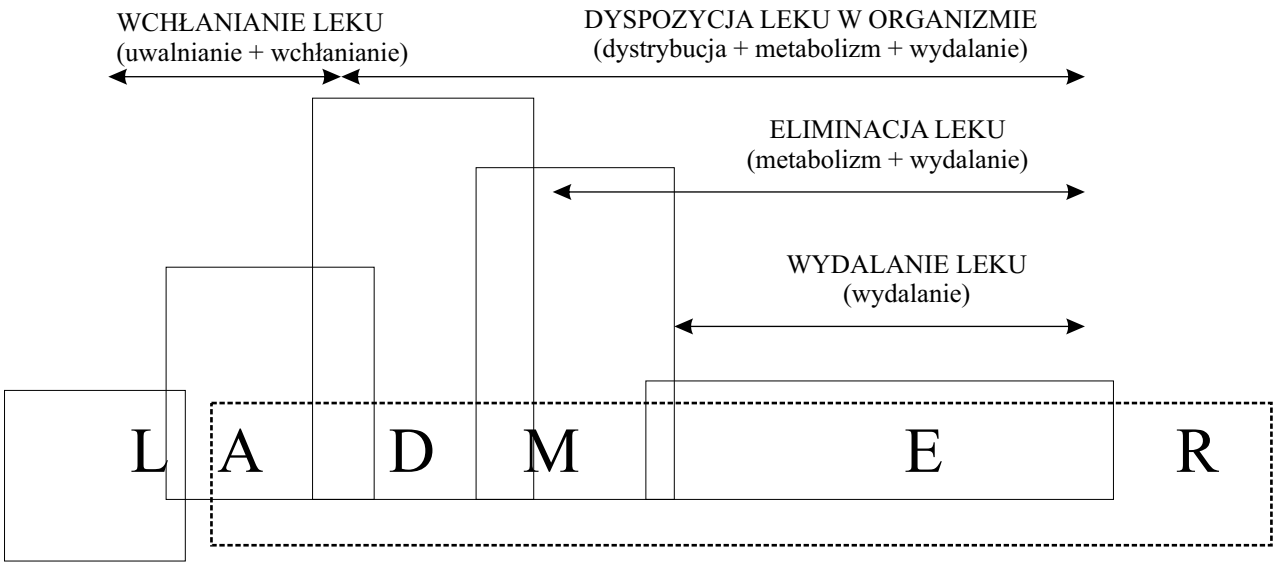


Rys. Typowy przebieg równoległych (jednoczesnych) procesów farmakokinetycznych.

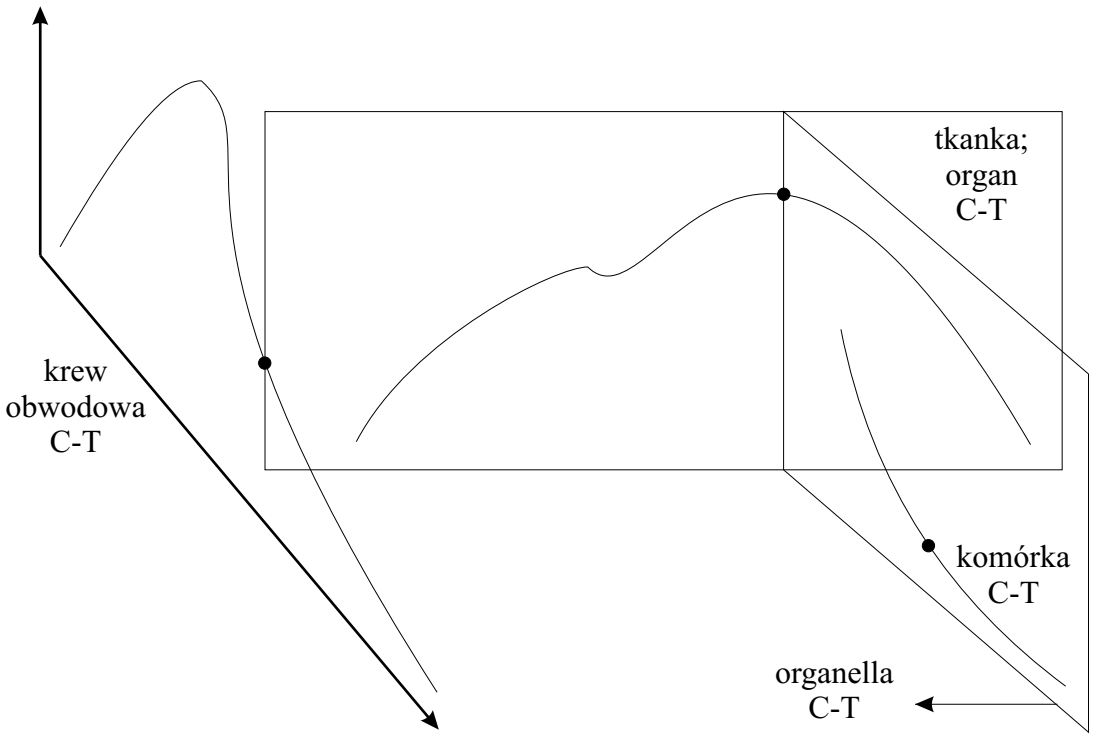
W niektórych przypadkach po podaniu leku zamiast krzywej ilustrującej wiele procesów dyspozycji leku widoczna jest wyłącznie faza wchłaniania. Takie zjawisko ilustrują modele farmakokinetyczne typu *flip - flop* (Boxenbaum H. 1998). Procesy te charakteryzuje tak długa faza wchłaniania że proces eliminacji leku nie jest widoczny ponieważ tak naprawdę krzywa C-T w fazie końcowej opisuje koniec fazy wchłaniania. Jest to swego rodzaju pułapka wynikająca z nietypowej charakterystyki PK. Cechuje ją miedzy innymi to że t1/2kel po podaniu parenteralnym jest zwykle znacznie krótszy od t1/2kel uzyskanego dla innych dróg podania. Stąd analiza geometrii przebiegu krzywej zmian stężeń leku w organizmie jest jedynie "wierzchołkiem góry lodowej" wielu procesów najczęściej trudnych do uchwycenia bez przeprowadzenia dokładnych obliczeń.

Podstawy empiryczne dla obliczeń farmakokinetycznych stworzyła kinetyka reakcji chemicznych. Dziedzina ta udostępnia wiele praw i formuł pozwalających charakteryzować przebieg reakcji chemicznych odwracalnych i nieodwracalnych. Dużą część pewników opracowanych na potrzeby chemii fizycznej zaadaptowano i nadal adaptuje się dla potrzeb obliczeń farmakokinetycznych. Podobnie w obu dziedzinach w trakcie analizy matematycznej materiału doświadczalnego istnieje wiele możliwości popełnienia błędu. Kinetyka chemiczna podobnie jak farmakokinetyka zajmuje się między innymi charakteryzowaniem kinetyki reakcji oraz czynnikami modyfikującymi ich przebieg (Espenson J.H. 1981). W kinetyce chemicznej do takich czynników zalicza się między innymi:

- stężenia reagentów oraz produktów i możliwości katalizy
-czynniki fizyczne takie jak temperatura, ciśnienie, przepływ
- właściwości cieczy w jakiej dochodzi do reakcji, lepkość, stała dielektryczna, pH



Rys. Związek między poszczególnymi parametrami farmakokinetycznymi a procesami jakimi leki ulegają w organizmie. (L - uwalnianie, A - wchłanianie, D - dystrybucja, M - metabolizm, E - eliminacja, R - "odpowiedź" celu farmakodynamicznego (ang.: *Response*))

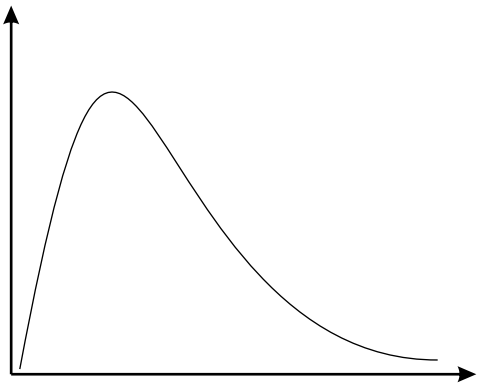


Rys. Każda krzywa C-T wytworzona w drodze eksperymentu *in vivo* na podstawie analizy stężenia leku w krwi obwodowej, jest jedynie wypadkową wielu innych krzywych. Krzywe z których powstaje obserwowana zależność C-T w krwi obwodowej, są wypadkową kolejnych procesów na niższym poziomie organizacyjnym biofazy.

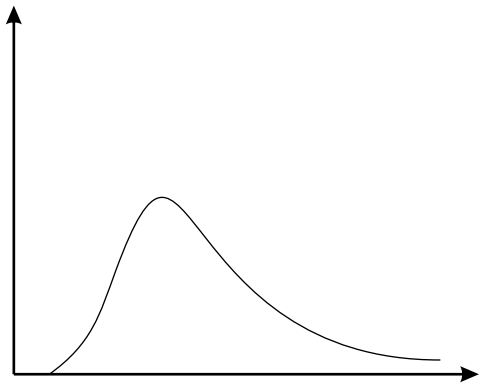
Obecnie badania farmakokinetyczne mają na celu opisywanie nie tylko przebiegu poszczególnych procesów jakie dostępne są dla analityka. Stanowić mają dopiero podstawę do opisu zmian charakteru leku w celu uzyskania pożądanych parametrów w zakresie LADME (optymalizacja DMPK). Podstawowe prawidła kinetyki chemicznej pozwalają więc na badanie i modyfikowanie faz kinetycznych zarówno po stronie dostępności farmaceutycznej, dostępności biologicznej jak i procesów eliminacji i metabolizmu.

Istnieje jednak możliwość wielotorowego charakteryzowania przebiegu procesów farmakokinetycznych (w myśl klasycznych zasad chemii fizycznej) wynikiem którego mogą być równania kinetyczne nie spełniające wszystkich zasad kinetyki chemicznej. W tych wypadkach szczególnie przydatne jest odejście od typowych klasycznych obliczeń farmakokinetycznych na rzecz opisu w ramach modeli hybrydowych. Przebieg krzywych C-T ilustrujących zmiany kinetyki leku są pierwszym etapem analizy farmakokinetycznej. Przebieg krzywych może być bardzo zróżnicowany w zależności od metod i rodzaju badanych procesów.

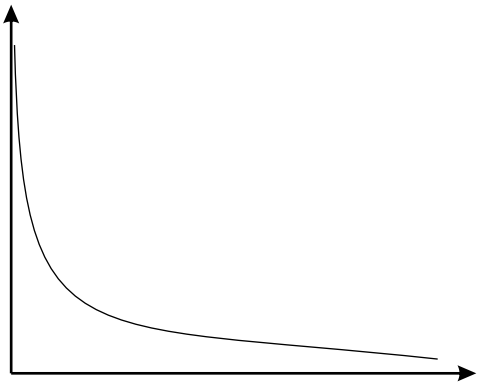
Obserwowane na krzywej C-T zmiany stężenia leku w osoczu ilustrują wiele procesów jednocześnie. Dopiero wnikliwa analiza matematyczna pozwala scharakteryzować ich poszczególny udział w losach leku w organizmie.



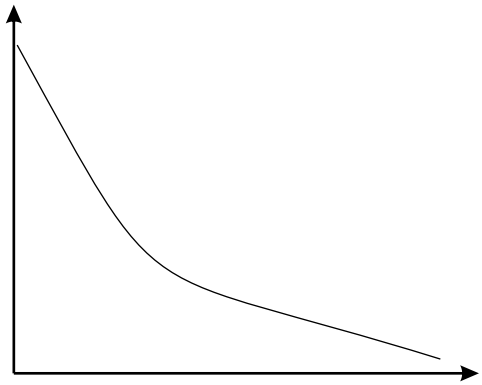
Jednorazowe doustne podanie leku. Krzywa przedstawia szybki przebieg fazy wchłaniania.



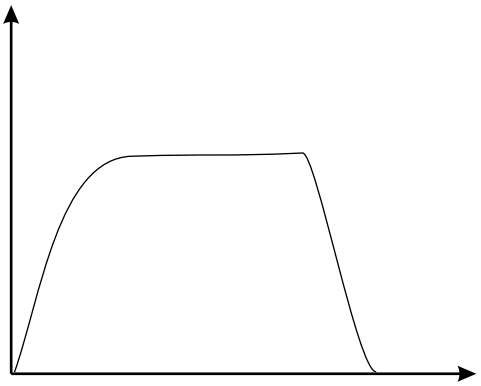
Jednorazowe doustne podanie leku. Krzywa przedstawia wolny przebieg fazy wchłaniania oraz długi czas opóźnienia wchłaniania.



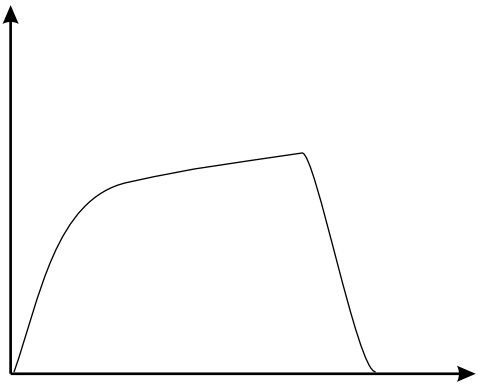
Jednorazowe dożylne podanie leku. Krzywa przedstawia szybki, dynamiczny przebieg fazy dystrybucji.



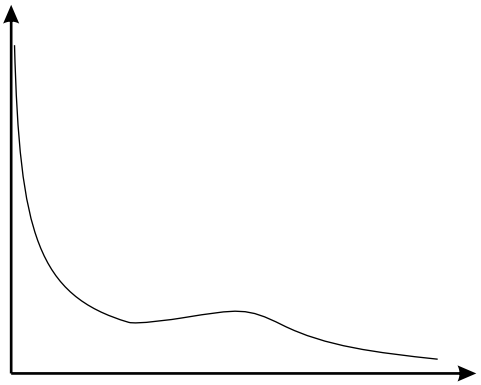
Jednorazowe dożylne podanie leku. Krzywa przedstawia wolny przebieg fazy dystrybucji.



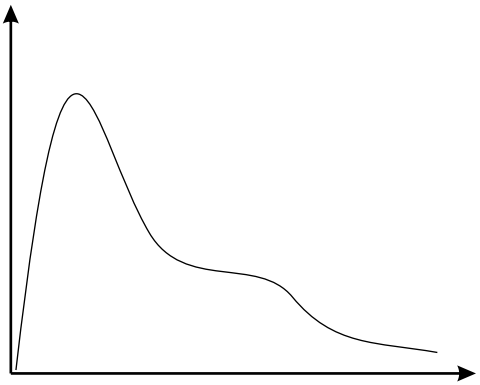
Długotrwały wlew dożylny leku w którym stała szybkości wlewu = stałej szybkości eliminacji. Krzywa przedstawia szybką eliminację i długą fazę *plateau*.



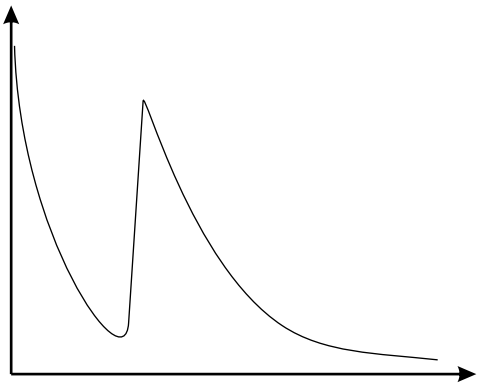
Długotrwały wlew dożylny leku w którym szybkości wlewu > szybkości eliminacji. Krzywa przedstawia szybką eliminację i długą fazę *plateau*.



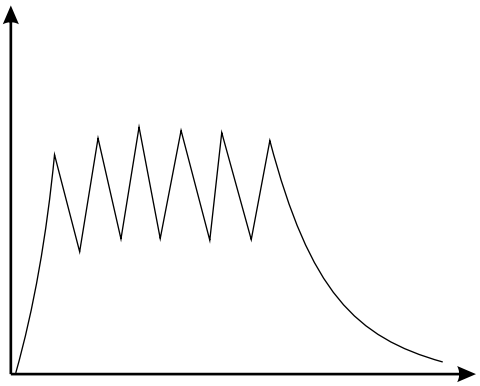
Jednorazowe dożylne podanie leku. Krzywa przedstawia szybki przebieg fazy dystrybucji, oraz pik redystrybucyjny w fazie eliminacji.



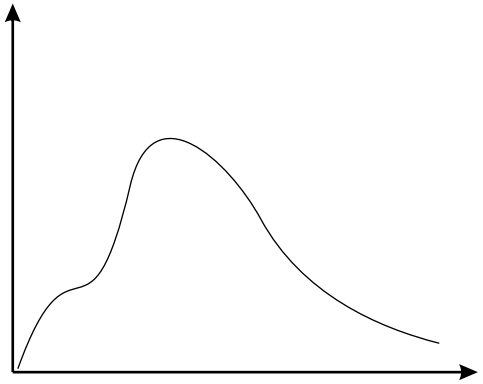
Jednorazowe doustne podanie leku. Krzywa przedstawia szybki przebieg fazy wchłaniania oraz pik redystrybucyjny we wczesnej fazie eliminacji.



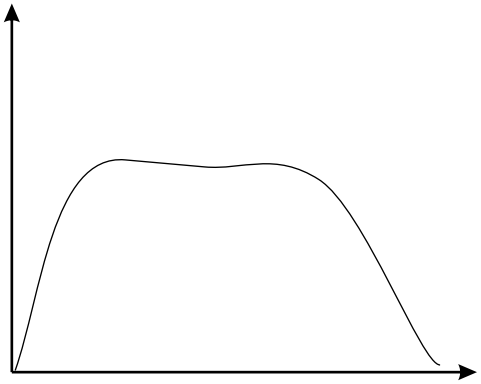
Dwukrotne dożylne podanie leku. Krzywa przedstawia dwa skoki stężeń po dwóch podaniach leku.



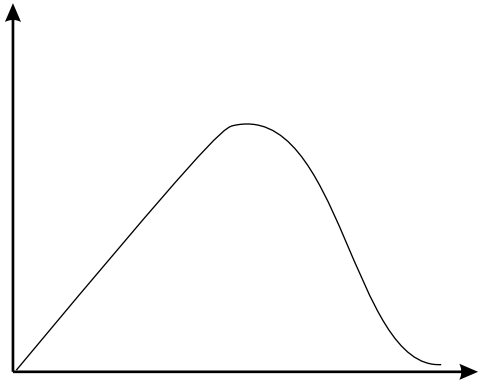
Wielokrotne podanie leku - pierwsza dawka nasycajca i kolejne - podtrzymujce. Krzywa przedstawia kilka skoków stężenia maksymalnego i minimalnego.



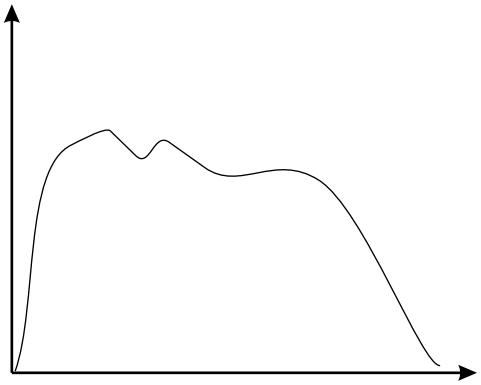
Dwufazowa kinetyka wchłaniania (p.o.).



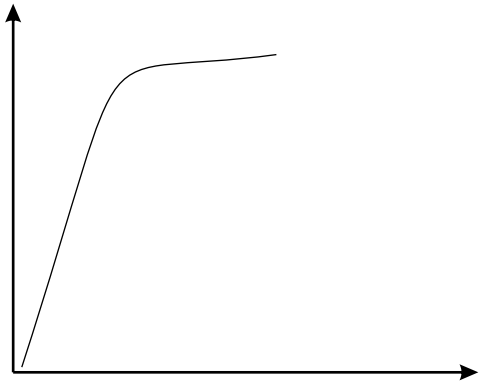
Jednorazowe doustne podanie leku o modyfikowanym uwalnianiu. Krzywa przedstawia wolny przebieg fazy eliminacji i długą fazę rejestracji wysokich stężeń.



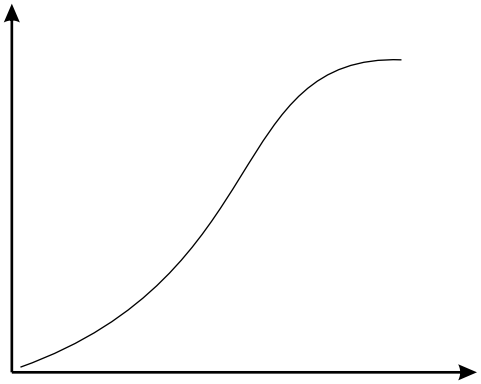
Jednorazowe doustne podanie leku. Efekt *flip-flop* długa faza wchłaniania maskuje eliminację leku.



Jednorazowe doustne podanie leku o modyfikowanym uwalnianiu. Krzywa ilustruje kilka narostów stężenia leku po jednorazowym podaniu.

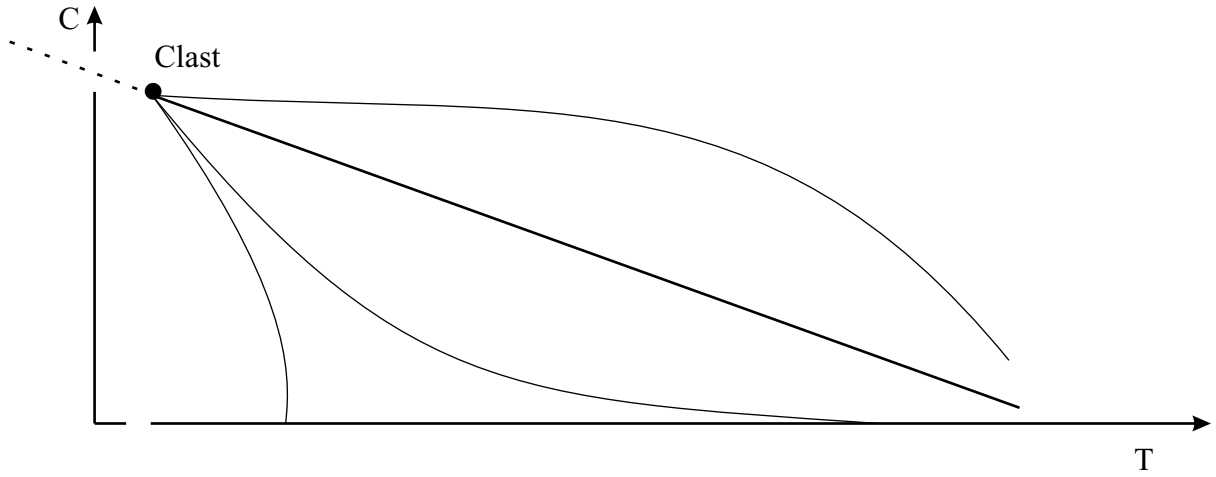


Badanie szybkości uwalniania substancji. Krzywa przedstawia szybki przebieg fazy uwalniania



Badanie szybkości uwalniania substancji. Krzywa przedstawia wolny przebieg fazy uwalniania

Jak wygląda kurs zmian stężenia leku poza ostatnim punktem stężenia który obejmuje jeszcze metoda analityczna ? Najczęściej przyjmuje się iż przebieg zmian stężenia jest liniowy. Jednak bez potwierdzenia bardzo czułymi metodami analitycznymi pozostaje to jedynie hipotezą. Można jednak założyć że w stosunku do leków o niskim PSA i wartości LogP > 0 prawdopodobieństwo nieliniowej kinetyki na poziomie bardzo niskich stężeń poza Clast wzrasta. Obecnie proponuje się kilka modeli kinetyki leków lub pozostałości leków w organizmie poza tlast.



Ryc. Liniowy i nieliniowe modele zmian stężenia leku poza Clast.

Drogi podania leku.

Znaczny wpływ na przebieg ADME ma droga podania leku. Najczęściej stosowane drogi podania leków to droga: dożylna - i.v., podskórna - s.c., podjęzykowa s.l., Domięśniowa - i.m., doustna - p.o., doodbytnicza - p..R.. Uregulowania prawne ICH definiują 120 różnych dróg podania leków (ICH M5EWG 2005). Wybór drogi podania leku to sposób na godzenia kinetyki leku, od momentu podania poprzez dyspozycję w organizmie z efektem w obrębie kompartmentu docelowego - efektorowego.

Droga podania:	i.v.	s.c.	i.m.	s.l.	p.o.	p.r.
Lipofilność / szybka absorpcja	- **Mniejsze znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Wolna absorpcja**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**
pH środowiska / absorpcja	- **Mniejsze znaczenie**	**Mniejsze znaczenie**	**Mniejsze znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**
Masa cząsteczki / perfuzja	- **Mniejsze znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**
Powierzchnia absorpcji	- **Bez znaczenia**	**Ograniczona objętością**	**Ograniczona objętością**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**	**Duże znaczenie**
Czas transportu leku do osocza	- **Brak opóźnienia**	**Z opóźnieniem**	**Z opóźnieniem**	**Bardzo krótki**	**Z opóźnieniem**	**Z opóźnieniem**
Unaczynienie / dostępność	- **Bez znaczenia**	**Bardzo duże znaczenie**	**Bardzo duże znaczenie**	**Bardzo korzystne unaczynienie**	**Zwiększa wchłanianie**	**Zwiększa wchłanianie**
Perystaltyka GI / dostępność	- **Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Modyfikuje wchłanianie**	**Modyfikuje wchłanianie**
Efekt pierwszego przejścia	- **Obecny**	**Ograniczony**	**Ograniczony**	**Ograniczony**	**Obecny**	**Ograniczony**
Objętość	- **Mniejsze znaczenie**	**Ograniczone**	**Ograniczone**	**Ograniczone**	**Mniejsze znaczenie**	**Ograniczone**
Lek rozpuszczalny w wodzie	- **Najczęściej**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**	**Bez znaczenia**

Rys. Wpływ wybranych czynników i drogi podania na kinetykę leków.

Podanie kasetowe w badaniach farmakokinetycznych (ang.: *Cassette Dosing*; *N- in- One Dosing*).

Klasyczne metody podawania leków operują zwykle podaniem jednorazowym leku ponawianym w ściśle określonych interwałach dawkowania. SID - raz dziennie; BID - dwa razy dziennie, TID - trzy razy dziennie, QID - cztery razy dziennie (lub w określonym interwale co na przykład 7 dni 7QID) itd.. W pracach doświadczalnych podanie kilku substancji biologicznie aktywnych ma na celu zwykle analizę interakcji farmakokinetycznych zachodzących pomiędzy lekami. Interakcje w przypadku podania kilku substancji aktywnych w dawkach leczniczych są łatwe do zaobserwowania, lecz jeśli nie są przedmiotem badania utrudniają analizę PK wybranego leku. Podanie kasetowe leków jest stosowane w pracach badawczych wymagających szybkiej selekcji lub opisu profilu PK dla kilku substancji. Ten typ podania jako metoda badawcza stosowany jest standardowo w działach R&D przemysłu farmaceutycznego już od roku 1990. Istota metody polega na podaniu jedną drogą (np. doustną, dożylną) kilku substancji jednocześnie w bardzo niskich dawkach. Ilość tą zwykle ogranicza się do n = 10. Po jednoczesnym podaniu 7 - 8 leków pobiera się krew do badań i opisuje kompletny profil farmakokinetyczny dla wszystkich substancji oddzielnie. Warunkiem tego rodzaju doświadczeń jest odpowiednia metoda przygotowania osocza do analizy chemicznej. Zaletą tego podania jest fakt iż w fazie badań przedklinicznych znacznie zmniejszony w eksperymencie jest udział zwierząt lub ludzi. Pozwala to zarówno zmniejszyć koszty jak i zwiększyć tempo badań wstępnych. Mając do dyspozycji jedną próbkę dla jednego punktu czasowego, uzyskiwana jest informacja o kilku wartościach stężenia dla kilku leków jednocześnie (Christ D.D. 2001; White R., Manitpisitkul P. 2001; Ward K.W. i wsp. 2001). Taki sposób przeprowadzenia doświadczenia dotyczącego jednorazowego podania kilku leków jednocześnie - *casette dosing* wymaga także przygotowania metody analitycznej umożliwiającej tzw. analizę kasetową CA (ang.: *Casette Analysis*) (Timmerman P.M.M.B.L. i wsp. 2001). W przypadku NCE zwykle w ramach tego typu podania stosuje sie przynajmniej jedną substancje o znanej charakterystyce C-T jako swego rodzaju wskaźnik. Ten sposób szybkiej analizy wielu profili farmakokinetycznych na jednym obiekcie doświadczalnym ma zarówno wiele wad jak i wiele zalet. Typowe problemy charakteryzujące powyższą metodę to:

- interakcje na poziomie metabolicznym
- interakcje farmaceutyczne (różna rozpuszczalność, aktywność chemiczna itd.)
- interakcje wynikające z konkurencji o miejsca wiązania z białkami
- ograniczenie objętości dawki i ilości leków (zwykle maksymalnie 10)
- problemy wynikające z niskiej selektywności metody analitycznej

Jedną z ważnych zalet metody jest możliwość podania leku o znanej charakterystyce PK jako swego rodzaju standardu wewnętrznego. Metodą podania kasetowego można badać profil enzymatyczny probanta oraz czynność nerek. Metoda ta pozwala na tworzenie mieszanin którymi można oceniać wybrane elementy LADMER w farmakokinetyce doświadczalnej. Obecnie promuje się również metodę podania kasetowego jako sposób na kompleksowe szacowanie aktywności enzymatycznej. Metodę oceny aktywności zaproponowano między innymi z zastosowaniem pięcioskładnikowej mieszaniny leków - swego rodzaju koktajlu (Zhou H. i wsp. 2004). Jeden z bardziej znanych to "*Pittsbourgh coctail*" złożony z kofeiny, chlorzoksazonu, dapsonu, debrisochiny i mefenytoiny. Koktajl taki stosowano do oceny aktywności enzymatycznej CYP1A2, CYP2E1, CYP3A, CYP2D6, CYP2C19 i N acetylo transferazy. Koktail ten doczekał się wielu modyfikacji stworzono także wiele innych mieszanin leków w celu dokonania podania kasetowego i oceny profilu metabolicznego w farmakokinetyce doświadczalnej.

1. kofeina	1. kofeina	1. kofeina
2. chlorzoksazon	2. omeprazol	2. chlorzoksazon
3. dapson	3. dekstrometorfan	3. midazolam
4. debrisochina	4. midazolam	4. metoprolol
5. mefenytoiny		5. mefenytoina
		6. diklofenak

Rys. Przykłady zastosowania podania kasetowego w wyznaczaniu aktywności enzymatycznej (składniki).

Inne zastosowanie podania kasetowego to kompleksowe szacowanie czynności nerek. Za pomocą mieszanin złożonych z sinistryny, kwasu para aminohippurowego, racemicznego pindololu i flukonazolu szacuję się czynność nerek. Podanie tego typu mieszaniny pozwala szacować filtrację kłębuszkową - GFR, sekrecję i reabsorpcję kanalikową. W podaniu kasetowym metodą oceny danych eksperymentalnych jest zwykle pole powierzchni danego leku - wskaźnika, stosunek pól składników do siebie, klirens składowych podania etc.. Obecne przepisy określające zakres badań w fazie przedklinicznej oraz we wczesnym etapie pierwszej fazy badań klinicznych pozwalają na zastosowanie tzw. mikrodawkowania (EMEA, CHMP 2004). Stwarza to nowe możliwości dla podania kasetowego które może zostać wykonane techniką mikrodawkowania. Podobnie jak w klasycznym podaniu kasetowym wymaga to jednak zastosowania odpowiednio czułej i selektywnej metody analitycznej.

Mikrodawkowanie w farmakokinetyce doświadczalnej (ang.: *Microdosing, Ultra - low dosing*).

Mikrodawkowanie jest metodą podawania leku polegającą na stosowaniu niezwykle małych dawek. Celem takiego dawkowania jest przybliżenie profilu farmakokinetycznego leku bez narażania człowieka na jego działanie na etapie badań FIH (ang.: *First In Human*) dla NCE (ang.: *New Chemical Entities*). Taki sposób dawkowania ma szczególnie duże znaczenie w optymalizacji farmakokinetyki leków w fazie przedklinicznej lub tzw. *pre - 1 phase*. Niezwykle małe dawki leku (np. 150 x niższe od dawki zapewniającej efekt terapeutyczny) wymagają również analizy ilościowej leku lub jego metabolitów na poziomie wielokrotnie niższym od typowej analizy. Mikrodawkowanie to termin opisujący dawkę równa lub mniejszą od jednej setnej dawki gwarantującej oczekiwany efekt. Założeniem jest również wielkość typowej dawki która powinna być równa lub mniejsza 100 mikrogramów (EMEA, CHMP 2004). Wymaga to zastosowania specjalnych technik detekcyjnych takich jak np. AMS - akceleracyjnej spektromertrii masowej (ang.: *Accelerator Mass Spectrometry*), MS/MS czy PET - pozytronowej tomografii emisyjnej (ang.: *Positron Emission Tomography*) (Sarapa N. 2003). Typowe stężenia leku notowane w tkankach po zastosowaniu mikrodawkowania osiągają poziom attogramów na ml lub zeptogramów na ml. Dla porównania obecnie większość klasycznych metod bioanalitycznych w przypadku klasycznego dawkowania wymaga granic oznaczalności na poziomie nanogram / ml.

10^{-9}g	=	1 nanogram	=	0,000000001	grama
10^{-18}g	=	1 attogram	=	0,000000000000000001	grama
10^{-21}g	=	1 zeptogram	=	0,0000000000000000000001	grama

Przygotowanie matrycy biologicznej do analizy PK.

Obecnie nie tylko etap przygotowania próbek ale także kolekcja samych prób często wykonywana jest za pomocą zrobotyzowanych zestawów typu RBS (ang.: *Robotic Blood Samplers*). Takie rozwiązania stosuje się np. w przypadku badania kinetyki leków na szczurach które praktycznie umieszczone są w robocie pobierającym próbki krwi i przygotowującym osocze w systemie 96 dołkowym do analizy LC-MS/MS. Krwiopochodne matryce biologiczne w farmakokinetyce to surowica, osocze lub pełna krew. Pobierane są w trakcie doświadczeń PK w zależności od ich typu od rodzaju leku, oraz metody analitycznej. W procesie automatyzacji różnych etapów badań farmakokinetycznych ścierają się dwie technologie. Technologie 96 dołkowe, ich zwielokrotnione odpowiedniki, oraz technologie oparte na klasycznych probówkach, kolbkacj itp.. Automatyczne systemy pobierania próbek połączone z układami LC-MS dysponującymi 96 dołkowym autosamplerem znacznie ułatwiają i przyspieszają badania farmakokinetyczne typu FIA (ang.: *First In Animal*) wykonywane na zwierzętach laboratoryjnych. Optymalizacja analizy PK rozpoczyna się już w momencie doboru czynników hamujących krzepniecie krwi (Sadagopan N. i wsp. 2001). W przypadku opisywania kompletnych profili farmakokinetycznych leków we krwi i osoczu, jest to pierwszy krok optymalizacji analityki farmakokinetycznej. Wiadomo że zastosowanie antykoagulantów nie pozostaje bez wpływu na wynik analizy chromatograficznej leków i jest często przyczyną znacznych różnic w analizie stężenia leku we krwi (Kohek M.B.F. i wsp. 2002). Dobór antykoagulanta w badaniach PK ma wpływ na:

- rozdział chromatograficzny (LC) / metoda detekcji
- wiązanie leku z białkami krwi
- ekstrakcje cząsteczek leku z matrycy (SPE, LLE)
- rozpad lub stabilność estrów (szczególnie w przypadku prodrug)

To z kolei znajduje odzwierciedlenie w obliczonych parametrach farmakokinetycznych. Precyzję wykonywanych analiz, dokładność obliczeń gwarantuje także właściwy dobór czynnika hamującego krzepnięcie krwi. Stąd standardowo, planując badania PK wykonuje się wcześniej analizę prób osocza z dodatkiem standardu i antykoagulantów w kilku różnych wariantach (jakościowych i ilościowych). W przypadku leków zawierających wiązanie estrowe (np. reszty kwasu fosforowego) zwykle stosowane są sole EDTA. Powodem jest helatowanie jonów metali w osoczu które są niezbędnym kofaktorem aktywizującym esterazy osoczowe. W przypadku estrów kwasu octowego funkcję ochronną może spełniać fluorek potasu. Stosowane w badaniach antykoagulanty to głównie (Guder W.G. i wsp 2002, Mollnes T.E. i wsp 2002; FDA 2003):

- EDTA sól dwupotasowa (w stężeniach 1.2 - 2 mg/ml krwi w przeliczeniu na bezwodne EDTA)
- EDTA sól trójpotasowa (w stężeniach 1.2 - 2 mg/ml krwi w przeliczeniu na bezwodne EDTA)
- EDTA sól dwusodowa (w stężeniach 4.1 - 6.8 mM/L krwi w przeliczeniu na bezwodne EDTA)
- cytrynian trójsodowy (22 - 26.3 g/L) wraz z kwasem cytrynowym (3.27 - 8 g/L) w postaci zbuforowanych roztworów
- heparyna sól sodowa, litowa, amonowa, wapniowa, magnezowa o masie cząsteczkowej 3-30 Kda (w ilości 12-30 IU/ml krwi, 1 IU = 0.007692 mg wzorca heparyny)
- hirudyna (w stężeniu 10 mg/ml krwi)
- lepirudyna (w stężeniu 50 mg/ml krwi)
- szczawian potasu (w ilości 4 -5 mg/ml)
- cytrynian sodu (w ilości 6.6 mg/ml)

W przypadku dobierania optymalnych antykoagulantów do badanego analitu powinno się przetestować metodę analityczną dla kilku typowych antykoagulantów takich jak cytryniany, heparyna i EDTA. Takie testowanie matrycy powinno obejmować również zjawisko hemolizy w przypadku stosowania w badaniu surowicy lub osocza. Dodatek zhemolizowanej krwi do osocza lub surowicy pozwala na porównanie i wykluczenie wpływu hemolizy na analizę chromatograficzną analitu.

Szczegółowe zalecenia dotyczące stosowania antykoagulantów w diagnostyce laboratoryjnej oraz transportu i pozyskiwania takich matryc jak surowica osocze lub krew regulują organizacje międzynarodowe (Guder W.G. i wsp. 2002; FDA 2003). Do pozyskania osocza w znaczeniu definicji WHO służy krew zawierająca antykoagulant i odwirowana przy przeciążeniu 2 - 3 x 10^3g w czasie 15 minut. Osocze stanowi frakcja pozbawiona komórek. Do pozyskania surowicy w znaczeniu definicji WHO służy całkowicie skoagulowana krew którą poddano odwirowaniu przy przeciążeniu 1.5 x 10^3g w czasie 10 minut. Krzepniecie krwi zdrowego człowieka odbywa się w czasie ok. 6-12 min w temperaturze pokojowej (Pawelski S., Maj S. 1987). Przeciążenie - rcf (ang.: *Relative Centrifugal Force*) dla wirówki obliczyć można z wzoru:

	Surowica	Osocze / heparyna	Osocze / EDTA	Osocze / cytryniany
fencyklidyna	+			
dehydroepiandrosteron	+			
metotrexat	+			
flunitrazepam	+			
dopamina			+	
androstendion	+			
metadon	+	+		
barbiturany	+	+		
morfina	+	+		
benzodiazepiny	+	+		
katecholaminy	+	+		
insulina	+	+	+	
lidokaina	+	+	+	
amfetaminy	+	+	+	
kortyzol	+	+	+	
cystatyna c	+	+	+	
amiodaron	+	+	+	
amitryptylina	+	+	+	
digitoksyna	+	+	+	
digoksyna	+	+	+	+
fenobarbital	+	+	+	+
fenytoina	+	+	+	+
prymidon	+	+	+	+
prokainamid	+	+	+	+
salicylany	+	+	+	+
testosteron	+	+	+	+
teofilina	+	+	+	+
kw. acetylosalicylowy	+	+	+	+
amikacyna	+	+	+	+
gentamycyna	+	+	+	+
wankomycyna	+	+	+	+
karbamazepina	+	+	+	+
disopyramid	+	+	+	+

Ryc. Brak wpływu antykoagulanta na analizę stężenia analitu (+), (WHO 2002).

$$\mathbf{rcf = 1.118 \times r \times (rpm / 1000)^2}$$

rpm - liczba obrotów na minutę (ang.: *Rotations Per Minute*)
r - długość ramienia rotora wirówki

Stabilność niektórych analitów w próbkach biologicznych jest bardzo ograniczona. Przykładem jest kilka związków oznaczanych w moczu przechowywanym w temperaturze - 20 °C:

morfina - 12 msc
kodeina - 12 msc
amfetamina - 12 msc
dietyloamid kwasu lizergowego (LSD) - 2 msc

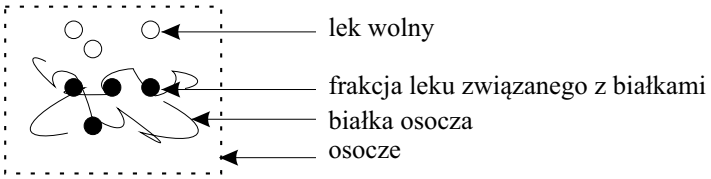
Stąd przydatność próbki w badaniach farmakokinetycznych jest również ograniczona czasem przechowywania (WHO 2002). Dobór anykoagulanta w badaniach farmakokinetycznych ma potencjalny wpływ na zachowanie się analitu w trakcie rozdziału chromatograficznego oraz na trwałość analitu oraz pozostałych składników matrycy. Trwałość niektórych leków w matrycach takich jak surowica, osocze, krew, mocz czy płyn mózgowo rdzeniowy została określona dla różnych zakresów temperatur (Guder W.G. i wsp. 2002). Stwierdzono że w większości przypadków mrożenie próbek biologicznych w temperaturze - 25 °C zabezpiecza analit. Jednak standardem stało się mrożenie w znacznie niższych temperaturach - ok. - 75 °C. Przechowywanie matryc biologicznych w niskich temperaturach zwykle nie zabezpiecza jednak endogennych struktur i związków przed powolną destrukcją.

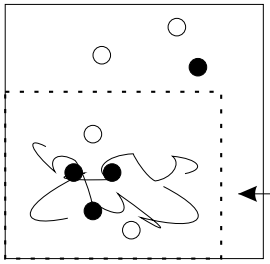
Wpływ EDTA na analizę chromatograficzną stężenia leku tłumaczy się wpływem inhibitorowym tego związku na esterazy. W praktyce nie zawsze jednak oznacza to że, EDTA jest w stanie uchronić dany związek przed hydrolizą (Timmerman P.M.M.B.L., de Vries L. i wsp. 2001). Obecnie wiele wyspecjalizowanych w analizie PK laboratoriów analitycznych określa jakiego rodzaju antykoagulant powinien znaleźć zastosowanie w analizie danego leku.

antykoagulant:	Na heparyna	Li heparyna	szczawian potasu
	werapamil terazosyna sparfloksacyna pseudoefedryna ketoprofen itrakonazol ibuprofen docetaksel	losartan	propionian flutikazonu

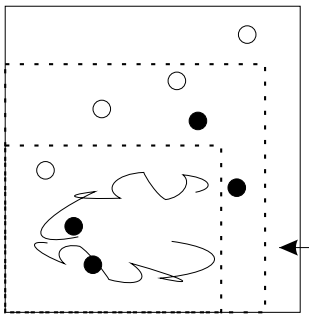
antykoagulant:	EDTA	K_2EDTA	K_3EDTA	Na_2EDTA
	sotalol cyklosporyna nabumeton acyklowir	tukrezol cypropiroks	terakonazol sumatryptan rifabutyna oksykodon ondansetron meklocyklina leuprolid gliburyd aceklofenak	benazepril

Rys. Przykłady antykoagulantów proponowanych w analityce PK określonych leków.

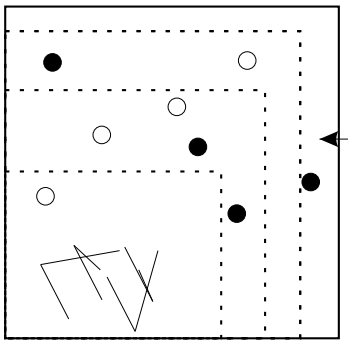




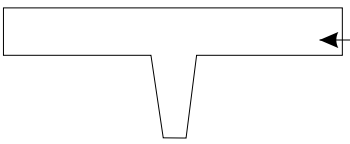
faza rozpuszczania i ekstrakcji: woda, bufory,
(wyłapywanie jonów np metali w przypadku leków tworzących chelaty - EDTA, kwas szczawiowy;
Wstępne oczyszczanie metodami LLE;
Ekstrakcja kwaśnych leków o charakterze słabych elektrolitów powinna odbywać się przy pH niższym od pKa leku o 2 jednostki opisuje to "zasada dwóch jednostek pH" (ang.: *2 pH unit rule*). Ekstrakcja zasadowych leków o charakterze słabych elektrolitów powinna odbywać się przy pH wyższym od pKa leku o 2 jednostki.)



wstępna denaturacja lub wypieranie leku z połączeń z białkami
(albuminy - leki kwaśne - kwasy organiczne
AAG - leki neutralne i zasadowe, roztwory zasad, aminy)



właściwa denaturacja i niszczenie struktur białek lub zmiana pH gwarantująca rozluźnienie wiązań lek- białko
(kwasy, zasady, enzymy, organiczne rozpuszczalniki:
metanol, acetonitryl etc.)



filtracja lub odwirowanie wytrąconych z roztworu białek

ekstrakcja ciecz / ciecz LLE
(ang.: *Liquid Liquid Extraction*)

oczyszczanie próbki

ekstrakcja ciecz ciało stałe SPE
(ang.: *Solid Phase Extraction*) itp.

HPLC
GC etc. → analiza chemiczna → analiza DMPK

Rys. Denaturacja białek osocza w analityce farmakokinetycznej - PP (ang.: *Protein Precipitation*).

Wpływ heparyny na analizę farmakokinetyczną tłumaczy się tym, że aktywizuje enzym lipazę lipoproteinową która przyczynia się do degradacji triglicerydów do wolnych kwasów tłuszczowych. Te z kolei mogą konkurować o miejsca wiązania białek z cząsteczkami leku (Spector A.A. 1975; Smet R. i wsp 2001; Sefer S., Degoricija V. 2003). Z drugiej strony podkreśla się iż albuminy osocza człowieka - HSA (ang.: *Human Serum Albumin*) posiadają aktywność właściwą esterazom. Aktywność katalityczną HSA hamują kwasy tłuszczowe. Prawdopodobnie hydroliza leków katalizowana przez HSA jest procesem stereoselektywnym. Fakt ten stawia w nowym świetle kinetykę leków będących estrami. Stwierdzono że HSA stabilizuje we krwi struktury niektórych ksenobiotyków (Salvi A. i wsp. 1997). Wiadomo że aktywność katalityczna HSA znacznie spada w środowisku takich rozpuszczalników jak metanol acetonitryl czy DMSO (w stężeniu 1-5%). Katalityczna aktywność HSA spada także w trakcie mrożenia i suszenia (Salvi A. i wsp. 1997). Dobór antykoagulantów w analityce farmakokinetycznej związany jest także z optymalizacją oczyszczania metodami SPE. Wstępem do właściwej procedury przygotowywania próbki do analizy jest często jej wstępne oczyszczanie. Jedną z metod jest w tym wypadku LLC. Oczyszczanie takie ma na celu usunięcie różnego typu lipidów interferujących w rozdziale chromatograficznym z analitami. Stosuje się w tym celu wytrząsanie z mieszaninami odpowiednich ekstrahentów (v/v).

heksan : aceton	(9:1)	- tłuszcze neutralne
chloroform : metanol	(1:4)	- tłuszcze polarne (OUN)
chloroform : metanol	(1:1)	- cholesterol, sterole
chloroform : metanol	(2:1)	- fosfatydyloseryna
aceton : izopropanol	(3:2)	- fosfatydyloetanoloamina
heksan : izopropanol	(3:2)	- fofatydylocholina, sfingomieliny
heksan : dietyloeter	(4:1)	- fosfolipidy
dichlorometan : metanol	(9:1)	- tłuszcze

W analizie farmakokinetycznej bardzo często matrycą jest pełna krew lub osocze. Stąd pierwszym punktem przygotowania prób do analiz, jest zwykle uwolnienie związanego z białkami osocza leku - PP (ang.: *Protein Precipitation*). Jest to jeden z ważniejszych elementów preparatyki osocza w fazie przygotowania próbki. Zwykle leki we krwi związane są albo z albuminami albo z alfa 1 kwaśną glikoproteiną - AAG (Israili Z.H., Dayton P.G. 2001). Albuminy są białkami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie wiążącymi głównie leki - słabe kwasy. W środowisku o pH < 3.0 albuminy są także rozpuszczalne w 80-100% metanolu, etanolu i acetonie (Budavari S. i wsp. 1996). W przypadku stosowania kwasów jako czynników denaturujacych, obecność tych rozpuszczalników w pewnych warunkach nie będzie więc sprzyjała wypadaniu białek z roztworu. AAG wiąże leki zasadowe i neutralne. Znane są jednak przypadki leków zasadowych wiążących się z albuminami i leków - słabych kwasów wiążących się z AAG. I jedna i druga klasa białek wiąże głównie leki lipofilne. To że lek ma charakter słabej zasady nie oznacza jednak że będzie wiązany wyłącznie przez AAG. Stosunek ilości AAG do albumin w osoczu wypada na korzyść albumin. Ich stężenie w osoczu wielokrotnie przewyższa stężenie AAG. Stąd mimo charakteru zasadowego pewna część leku będzie wiązana także przez albuminy. Wiadomo, że o połączenia leków z AAG konkurują zasady, lipidy, plastyfikatory stosowane w sprzęcie analitycznym i jony metali ciężkich (Israili Z.H., Dayton P.G. 2001). Część leków wiązana jest przez lipoproteiny obecne we krwi (amfoterycyna B). Wiele leków wiąże się ze strukturami błonowymi, lub dyfunduje do wnętrza komórek. Informacje te pociągają za sobą odpowiednią strategię niszczenia struktur 2,3,4 rzędowych białek w celu uwolnienia związanych z nimi cząsteczek leku (Herskovits T.T. i wsp. 1970).

albuminy	- głównie leki lipofilne kwaśne	- związany lek wypierają z połączeń kwasy
AAG	- głównie leki lipofilne neutralne i zasadowe	- związany lek wypierają z połączeń zasady

Denaturacja białek osocza powinna zapewniać równoczesną blokadę jonów uwalnianych do środowiska próbki. Ma to szczególnie duże znaczenie w przypadku leków tworzących chelaty. Wymaga zatem odpowiedniego składu rozpuszczalnika w jakim zawieszone jest osocze. Rozpuszczalnik jakim zawsze jest pewna ilość wody może jednocześnie zawierać czynnik denaturujący np. kwas, sól kwasu lub zasadę ewentualnie polarne rozpuszczalniki organiczne.

Jednak jeżeli czynnik denaturujący może współzawodniczyć o miejsca wiązania leku w białkach, poprawia to wydajność procesu. Denaturacja białek osocza powinna więc przebiegać wieloetapowo. Wymaga uwzględnienia takich czynności jak:

- rozpuszczenie próbki (leku niezwiązanego z białkami)
-wstępna modyfikacja miejsc wiążących lek z białkami
- wstępne oczyszczanie metodami LLE
- właściwa denaturacja białek

Objętość czynnika denaturującego (w przypadku osocza) dla acetonitrylu to zwykle 1-3 objętości próbki. Rozpuszczalnik to zwykle co najmniej połowa lub objętość równa objętości próbki. Faza rozpuszczania wymaga zastosowania odpowiedniego dla danego leku rozpuszczalnika. Wstępna modyfikacja miejsc wiązania leku może odbywać się bądź w drodze konkurencji o miejsce wiązania, bądź w drodze stopniowego niszczenia struktur białek. Rozpuszczanie próbki jest fazą przygotowania materiału do dalszych etapów oczyszczania. W przypadku denaturacji czy precypitacji próbki kolejny etap prowadzi do całkowitej denaturacji białek której efektem jest uzyskanie fragmentów nierozpuszczalnych w wodzie. Zniszczone białka i ich fragmenty podlegają odwirowywaniu lub sączeniu. Obecnie w ramach optymalizacji procesu denaturacji coraz częściej stosuje się enzymy tnące białka na fragmenty o określonej wielkości (aktynaza E). Denaturacja białek osocza to nie jedyny problem preparatyki tej i innych tkanek wykorzystywanych do analizy farmakokinetycznej. Wiele leków wiąże się z białkami obecnymi w strukturach komórkowych. Dyfunduje także do substruktur komórkowych. Uwolnienie tej puli leku wymaga podobnych kroków jak w przypadku samego osocza. Wstępnym etapem jest homogenizacja tkanki i umieszczenie jej w rozpuszczalniku. Proces denaturacji i degradacji białek musi jednak osiągnąć także kompratment komórkowy analizowanej tkanki. Obejmuje więc zastosowanie buforów, czynników denaturujących i odpowiednio dobranych rozpuszczalników, w celu uzyskania rozpuszczonego w ekstrakcie z tkanki leku. Denaturacja białek matrycy jest zależna od rodzaju czynnika denaturujacego, jego stężenia, temperatury oraz czasu kontaktu z czynnikiem. W przypadku alkoholi wiadomo, że zależne jest to również od ich hydrofilności (Herskovits T.T., Gadegbeku B. i wsp. 1970). Metanol jest wśród alkoholi jednym ze słabszych czynników denaturujących. Zaproponowano szereg zdolności do denaturacji białek globularnych osocza w którym pierwsze miejsce jako najsłabszy związek zajmuje metanol.

	logP(o/w)	pKa
- metanol	- 0.77	15.3
-etanol	-0.31	15.9
- propanol	0.25	16.1
- butanol	0.88	16.1
- glikol etylenowy	-1.76	14.4
- glikol propylenowy	-1.04	-
- glikol dietylenowy	-	-
- glicerol	-1.76	14.4
(acetonitryl	-0.34	-4.3)

Faza PP w analityce farmakokinetycznej spełnia ważną funkcję niezależnie od stopnia wiązania leku z białkami osocza. Jest ważnym punktem przygotowania próbki do analizy zarówno w przypadku leków w znaczny stopniu wiążących się z białkami, jak i tych związanych z niewielkim procencie. Pozwala bowiem na usunięcie z próbki rozpuszczonych w niej białek. Jeżeli w trakcie przygotowania próbki nie wykonano denaturacji białek może to stanowić przyczynę kilku różnych zagrożeń i błędów.:

- związanie części leku z białkami
- niekontrolowana denaturacja białek w złożu SPE
- denaturacja białek rozpuszczonych w próbce na kolumnie chromatograficznej (HPLC, UPLC)

- szybsze zużycie prekolumny i właściwej kolumny (HPLC, UPLC)
- niska jakość chromatogramów, problemy z integracją piku analitu (HPLC, UPLC)
- interferencja zanieczyszczeń z pikiem analitu

Wstępna denaturacja białek stanowi podstawowy etap oczyszczania próbki do badań farmakokinetycznych. Robotyzacja, automatyzacja i postępująca miniaturyzacja w laboratoriach analizy farmakokinetycznej znacznie podnosi wydajność analiz oraz ich jakość. Wszystkie tego typu urządzenia sterowane są za pomocą odpowiednich programów komputerowych. Czynności wykonywane przez urządzenia półautomatyczne i roboty laboratoryjne w badaniach PK umożliwiają między innymi:

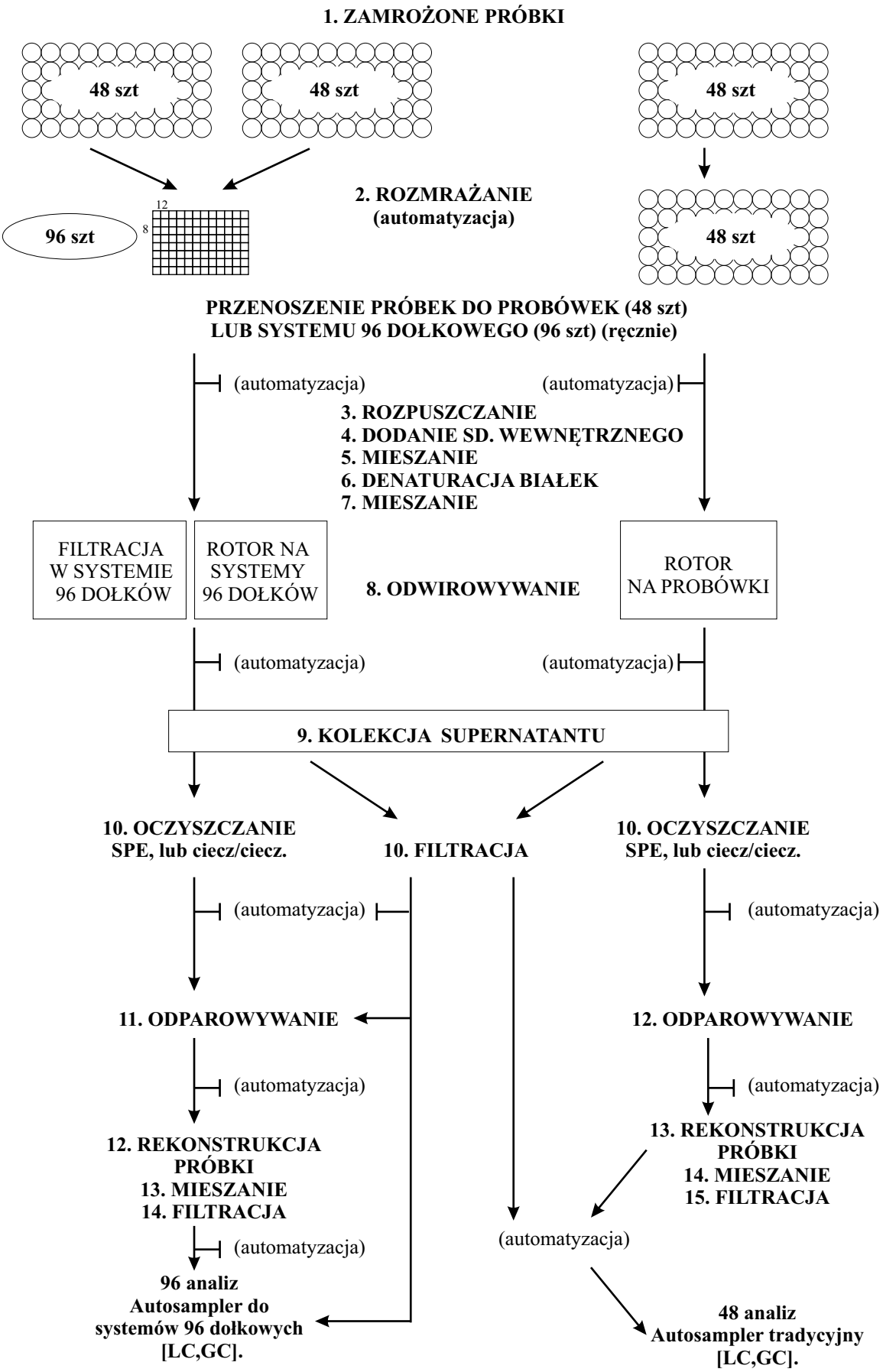
Pobieranie prób:
- roboty, mikrodializa

Przygotowanie próbki:
- mieszanie, rozpuszczanie, denaturacja białek, filtracja (roboty pracujące z użyciem probówek lub systemu 96 dołków)
- zatężanie pod strumieniem azotu (urządzenia pracujące z użyciem probówek, kolbek, lub systemów 96 dołkowych)
- filtracja białek (roboty pracujące w systemie 96 dołków)
- oczyszczanie metodą ekstrakcji do fazy stałej (roboty pracujące z użyciem klasycznych kolumienek SPE, systemów kolumienek o pojemności 1-5 ml w postaci zestawów 48 sztuk etc., oraz wzorowane na systemie 96 dołków) lub LLE

Wykonanie analizy:
- autosamplery (pracujące w tradycyjnym systemie probówek o małych pojemnościach lub pobierające próbkę z płytki 96 dołkowej)

Dynamiczny rozwój technik analitycznych ostatnich lat, spowodował znaczny postęp w optymalizacji analityki PK leków. Powstające nowe narzędzia i metody przygotowywania prób biologicznych do analiz przyczyniają się do coraz szerszych opracowań dotyczących dyspozycji ksenobiotyków w organizmie. Opracowania te dotyczą nie tylko leków lecz także toksyn. W chwili obecnej dzięki znacznemu postępowi technicznemu można śledzić także kinetykę metabolitów obserwowanych substancji. Do ich identyfikacji stosuje się wysokiej klasy sprzęt analityczny wyposażony w oprogramowanie o charakterze bazodanowym. Nowoczesna analityka umożliwia precyzyjne śledzenie kinetyki związków optycznie czynnych co pozwala przytaczać wyniki coraz większej liczby badań z tego zakresu (Buszewski B. 1999; Krzek J. 2002). Techniki analityczne takie jak IR, NMR przyczyniły się także do znacznego postępu w budowaniu wirtualnych modeli i baz leków (Engels M.F.M. i wsp. 2003; Fejzo J. i wsp. 2003). Obecne trendy rozwoju metod analitycznych oraz uwarunkowania jakościowe prowadzonych analiz prowadzą do znacznej automatyzacji analityki PK. Obecne standardy prowadzenia analiz zawartości leku w tkance wymagają wprowadzania automatów i robotów laboratoryjnych w badaniach farmakokinetycznych. Pozwalają one w znacznym stopniu zmniejszyć niebezpieczeństwo błędu ludzkiego, przypadkowej utraty próbki etc.. Zapewniają odpowiednia jakość i znacznie skracają czas przygotowania próbki do właściwej analizy. Analiza próbek biologicznych najczęściej wymaga zastosowania od kilku do kilkunastu typowych etapów.
Najczęściej stosowane w praktyce elementy przygotowania tkanki do analizy to:

- wstępne rozpoznanie wpływu substancji hamującej krzepniecie krwi (EDTA, heparyna) na analizę oraz fazę oczyszczania
- zamrożenie próbki -20 -25 C^{o} przechowywanie w warunkach kontrolowanych (monitorowanie temperatury)
- rozmrożenie próbki
- pobranie określonej objętości próbki do analizy
  - stosowanie klasycznych rozwiązań - probówki, kolbki etc..
  - technologia 96 dołkowa



Rys. Możliwości automatyzacji przygotowywania dużej ilości prób do analizy PK (z uwzględnieniem najczęściej stosowanych kroków).

- homogenizacja próbki
    - dla tkanek (mięśnie, wątroba, tłuszcz itp.) za pomocą odpowiednich homogenizatorów
    - rozpuszczenie próbki
- dodanie standardu wewnętrznego
- denaturacja białek
    - potwierdzenie stabilności leku i standardu wewnętrznego wobec czynnika denaturującego białka
    - chemiczne czynniki denaturujące:
        CH_3OH, 20 % TCA, H_3PO_4 , 0.1M CH_3COOH, 6M HCl
        CH_3CN (1-3 objętości próbki) , 10 mM NH_4OH, 10 N KOH itp.
        mieszaniny różnych substancji denaturujacych
    - fizyczne czynniki denaturujące (łaźnia ultradźwiękowa)
    - denaturacja enzymatyczna
    - denaturacja białek stężonymi roztworami soli chaotropowych
    - solubilizacja białek słabymi roztworami soli chaotropowych
- odwirowanie lub/i sączenie supernatantu
    - systemy w postaci dołków do szybkiej filtracji
- kolekcja supernatantu
- sączenie
- oczyszczanie (ciecz/ciecz lub ciecz/ciało stałe)
    - systemy mini kolumienek w układzie ciecz/ciało stałe
    - systemy w postaci dołków do szybkiego oczyszczania w układzie ciecz/ciało stałe po 48 sztuk, 96 sztuk lub więcej
- tworzenie pochodnych
    - upochadnianie do UV
    - upochadnianie do FL (kompleksy ze związkami dającymi fluorescencję etc.)
    - upochadnianie do EC (wstępna redukcja w celu uzyskania grup łatwo ulegających utlenieniu na przykład. witamina K)
    - upochadnianie w celu detekcji MS związków nie posiadających ładunku
- odparowywanie
    - pod strumieniem azotu lub powietrza
    - w warunkach podciśnienia
- rekonstrukcja próbki - rozpuszczanie
- sączenie lub filtracja poprzedzające właściwą analizę

Większość z wymienionych wyżej etapów może zostać wykonana za pomocą maszyn.W laboratoriach zajmujących się standardowo analizami PK dużych ilości próbek automatyzacja koreluje w sposób korzystny z jakością. Pewną trudnością w automatyzacji pracy pracowni analiz farmakokinetycznych jest kompatybilność sprzętu automatycznego i półautomatycznego. Ujednolicenie to ma na celu dostosowanie sprzętu do probówek lub płytek 96 dołkowych. Zastosowanie wymienionych rozwiązań nie musi wiązać się z ich wzajemnym wykluczaniem. Oba typy "transportu" próbki w laboratorium mogą w niektórych punktach zazębiać się bez zagrożeń dla płynności analiz.

Daleko posunięta automatyzacja pracy laboratorium farmakokinetycznego jest celowa jedynie w przypadku przygotowywania dużej liczby analiz dziennie (>50-100 sztuk w obrębie jednego projektu). Opracowanie linii przygotowywania prób do analiz w trybie zautomatyzowanym oznacza nie tylko możliwość przygotowania dużej liczby analiz. Wymaga odpowiedniego zaplecza chromatograficznego tj. najczęściej odpowiedniej liczby chromatografów cieczowych zaopatrzonych w wymagany system detekcji. Przygotowanie 100 próbek do analizy HPLC wymaga około 2 dni pracy klasycznego chromatografu. Zakładając czas jednej analizy równy 30 minut (co w przypadku matryc biologicznych jest bardzo prawdopodobne), wykonanie 100 analiz trwa około 50 godzin.

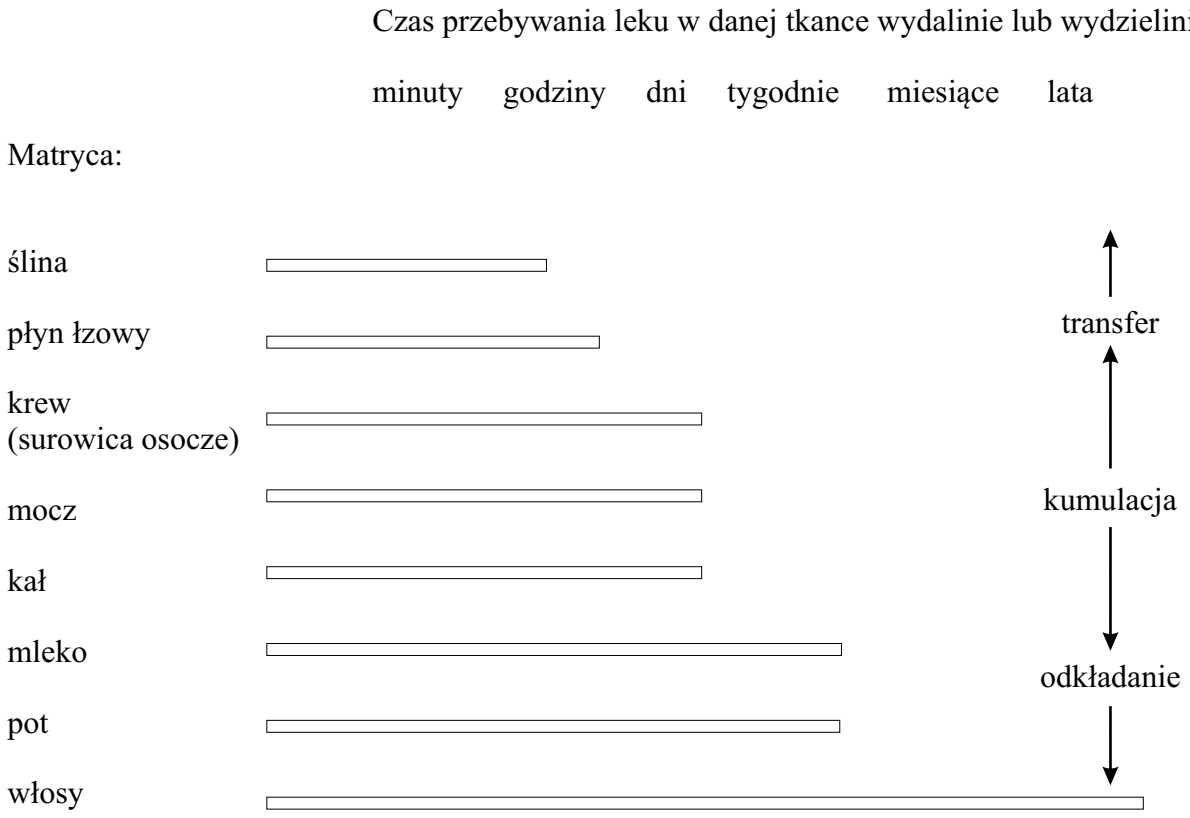
Efekt chaotropowy w analityce PK.

Efekt chaotropowy wykorzystywany jest na różnych etapach prac bioanalitycznych. Substancje chaotropowe stosowane są jako dodatek do faz ruchomych w technice HPLC, UPLC w celu usprawnienia rozdziału chromatograficznego. W analizie farmakokinetycznej substancje takie jak SDS czy SLS stosowane są często w mieszaninach stosowanych w fazie przed ekstrakcyjnej. Zwiększają one siłę jonową roztworów doprowadzając do uwolnienia cząsteczek leku związanych z białkami. Większość substancji chaotropowych w dużym stężeniu wykazuje działanie denaturujące. Znaczna cześć substancji chaotropowych zmienia oddziaływanie białko - lek poprzez zmiany pomiędzy cząsteczkami roztworów wodnych. W niewielkich stężeniach substancje chaotropowe destabilizują struktury białek poprzez zmianę charakteru interakcji cząsteczek białek z cząsteczkami wody (Salvi G. i wsp. 2005). Związki takie zmieniają uporządkowanie cząsteczek wody indukując solubilizację niektórych leków (Forman H.J., Kennedy J. 1977). Substancje chaotropowe mają wiec zarówno właściwości denaturujące, doprowadzają do depolimeryzacji, ułatwiają rozpuszczanie (Hatefi Y., Hanstein W.G. 1969; Sachs J.N. Woolf T.B. 2003). Związki chaotropowe obniżają gęstość roztworów wodnych, są mniej polarne od wody, ich mechanizm działania wiąże się często z niszczeniem struktur solwatacyjnych wody. Ma to szczególne znaczenie w przypadku związków zjonizowanych gdyż solwatacja w ich przypadku jest silniejsza. Lek zjonizowany w roztworze jest bardziej hydrofilny niż forma niezjonizowana. Przykłady związków chaotropowych:

CH_3COOH	SDS	chlorowodorek guanidyny
KSCN	SLS	mocznik
NaSCN	suramina	
NaCl	kwas ursodeoksycholowy	
NaI	kwas litocholowy	
$HClO_3$	kwas deoksycholowy	
NaF	$NaCLO_4$	

Przygotowanie matrycy biologicznej do analizy chemicznej:

Szczególną pozycję w nowoczesnej analityce farmakokinetyka zawdzięcza trudnym do przygotowania matrycom biologicznym. Materiał do badań farmakokinetycznych stanowią w warunkach *in vivo* zawsze tkanki lub płyny biologiczne człowieka lub zwierząt. Często analizowaną matrycą są tkanki zwierząt które przeznaczone są do spożycia przez człowieka w celu określenia pozostałości leków weterynaryjnych w ich tkankach. Płyny biologiczne poddawane analizie to najczęściej krew, mocz, żółć, chłonka, płyn mózgowo rdzeniowy, ślina, łzy i mleko. Kinetykę zmian stężenia leku można określi w ramach prawie każdej tkanki wydzieliny czy płynu ustrojowego. Jednak wnioski zebrane na tej podstawie nierozerwalnie łączą się z szeregiem procesów które doprowadziły do rozmieszczenia leku w danej przestrzeni oraz czas w jakim procesy te miały miejsce. Stąd różne zastosowanie różnych tkanek i płynów biologicznych w różnych gałęziach farmakokinetyki wynikające z czasu przebywania leku w danej przestrzeni.



Tkanki zwierząt poddawane analizie to najczęściej mięśnie, wątroba, nerki, tłuszcz. W przypadku drobiu analizie poddaje się również jaja. Różne kierunki badań farmakokinetycznych wykorzystują różnego rodzaju tkanki i płyny do osiągnięcia zamierzonych celów. Kompletne profile farmakokinetyczne opracowywane są zwykle na podstawie znajomości zmian stężeń leków we krwi. Badania mające określić poziom pozostałości leków w tkankach najczęściej wykorzystują do analiz takie tkanki jak mięso lub tłuszcz ewentualnie całe organy. Badania farmakokinetyczne prowadzone w ramach terapii monitorowanej najczęściej wymagają określenia stężenia leku w osoczu lub moczu. Obecnie proponuje się także matryce zastępcze takie jak ślina lub łzy. W matrycach tych lek znajduje się w postaci wolnej a jego stężenie koreluje ze stężeniem frakcji wolnej leku w osoczu. Przygotowanie złożonych pod względem chemicznym często niejednorodnych matryc do analiz zwykle przysparza wiele trudności. Najczęściej stosowane techniki oczyszczania złożonych matryc biologicznych to SPE (ang.: *Solid Phase Extraction*), SPME, ekstrakcja ciecz-ciecz, a obecnie również mikrodializa.

Ekstrakcja do fazy stałej doczekała się licznych modyfikacji pozwalających na oczyszczanie różnorodnych matryc biologicznych (Posyniak A. 1998). Dużą zaletą tej techniki przygotowywania prób do analiz jest dostępność wielu aplikacji dotyczących leków. Obecnie w analizie farmakokinetycznej SPE często stosowane jest przy okazji detekcji MS lub MS/MS. Przygotowanie analiz tą techniką pozwala w znacznym stopniu usunąć substancje interferujące z analitami lub standardem wewnętrznym. Jednocześnie w przypadku badań pozostałości pozwala na absorbowanie na złożu niewielkich ilości badanej substancji zawartej w próbce której objętość może być dość duża. Ma to szczególne znaczenie w analizie pozostałości leków weterynaryjnych w tkankach zwierząt przeznaczonych do spożycia (Posyniak A. 1998). W kolejnych etapach analizy SPE pozwala na zwiększenie osiąganej granicy oznaczalności. Obecnie w typowych laboratoriach farmakokinetycznych dominującą technologią SPE jest technologia 96 dołkowa i jej wielokrotności. Polega ona na zastosowaniu płytki zaopatrzonej w 96 niewielkich rozmiarów kolumienek SPE (system analogiczny do stosowanych w testach immunochemicznych ELISA, PCR itd.). Do typowych zastosowań PK są to najczęściej systemy o pojemności 2-2.5 ml. Wymagają zastosowania odpowiednich robotów laboratoryjnych lecz zapewniają wysoką wydajność i jakość prowadzonych analiz. Procedura kondycjonowania, nanoszenia próbki, oczyszczania i elucji jest zbliżona do klasycznych metod SPE. Proponowane rozwiązania techniczne dotyczą w tym wypadku zastosowania zarówno podciśnienia, jak i ciśnienia "pozytywnego" czyli generowanego za pomocą procesorów, u wlotu kolumienki.

Technika mikrodializy jest szczególnie przydatna narzędziem w rękach specjalistów zajmujących się farmakokinetyką. Pozwala bowiem łączyć fazę pobierania matrycy do badań z jej wstępnym oczyszczaniem (pobieranie tylko frakcji wolnej leku). Wadą tej techniki jest jednak niewielka objętość uzyskanej próbki - dializatu. Zdobywa ona jednak coraz więcej zwolenników z uwagi na bardzo duże możliwości jakie stwarza w analityce PK (Herkner H. i wsp 2001; Jukhadar C. i wsp 2001). Pobieranie próbek do analiz metodą mikrodializy pozwala bezpośrednio zmierzyć stężenie leku w wielu różnych przestrzeniach żywego organizmu. Przestrzeniach trudno dostępnych dla klasycznych metod analityki PK. Pozwala to ominąć żmudną drogę budowania złożonych modeli matematycznych. Taka analiza prowadzona równocześnie z charakterystyką zmian stężenia leku w czasie w osoczu umożliwia opisanie praktycznych korelacji. Umożliwia także rozwój nowoczesnych metod modelowania PK/PD na różnych poziomach analizy PK w organizmie jednocześnie. Technika mikrodializy jest szczególnie przydatna w stosunku do leków, których efekt zależny jest od utrzymania odpowiedniego stężenia efektywnego w kompartmencie docelowym. Jest to jedna z bardziej precyzyjnych technik służących do określania stosunku AUC leku w tkankach do AUC w osoczu. Wybór techniki oczyszczania materiału zależny jest od specyficznych właściwości danej tkanki czy płynu jak i właściwości fizykochemicznych oznaczanej substancji.

Optymalizacja takiego układu jest więc wypadkową wielu czynników. Nie zawsze matryce takie jak na przykład osocze, wymagają specjalnych technik oczyszczania. Jednak dobrze przygotowane i oczyszczone próbki wpływają na poprawienie parametrów walidacyjnych metody analitycznej.

Jakość próbki w badaniach farmakokinetycznych:

Pobranie tkanki i przygotowanie do właściwej analizy chemicznej jest punktem w którym po raz pierwszy można zweryfikować jakość próbki.W przypadku najczęściej pobieranych próbek takich jak osocze lub surowica wyróżnia się kilka zasadniczych problemów jakościowych. Należą do nich zmiany barwy i zmiany dotyczące zawartości, konsystencji etc.. Znakomita większość testów immunochemicznych oraz znaczna liczba metod bioanalitycznych HPLC, UPLC całkowicie odrzuca udział próbek zawierających artefakty z analizy jakościowej i ilościowej. Wpływają one zarówno na wyniki analiz uzyskiwane za pomocą detektorów UV, DAD, EC jak i FL. Im mniej selektywny i specyficzny jest system detekcji tym większy wpływ wywierają artefakty i substancje towarzyszące na wynik analizy. Mimo walidacji metody analitycznej zgodnie z obecnie precyzowanymi wymogami znacznej części owych wpływów z przyczyn technicznych nadal nie można całkowicie wyeliminowań. Zasady dobrej praktyki klinicznej GCP obligują bezwzględnie do formułowania dodatkowego opisu próbek zmienionych w jakikolwiek sposób a służących do analizy farmakokinetycznej leku. Podobnie zasady dobrej praktyki laboratoryjnej wymagają ewidencjonowania i dodatkowego opisu nieprawidłowości w badanych próbkach. Próbki źle pobrane lub nieodpowiednio przygotowane opisuje się jako:

- próbki hemolityczne (ang.: *Haemolytic Sample*)
  analiza wizualna - czerwona próbka stężenie hemoglobiny > 300 mg/L

- podbarwione barwnikami żółciowymi (ang.: *Icteric Sample*)
- opalescencja
- próbki ze strątami: (ang.: *Turbidity*)
  - strącone białka
  - strącony włóknik

- próbki lipemiczne (ang.: *Lipemic Sample*)

  analiza wizualna - mętna próbka (surowica, osocze) stężenie triglicerydów > 300 mg/dL
  analiza wizualna - mętna próbka (krew) stężenie triglicerydyów > 1000 mg/dL

Poza wymienionymi czynnikami wadami zmniejszającymi znacznie jakość prowadzonych badań farmakokinetycznych są błędy związane z:

- niewłaściwą objętością próbki
- oznakowaniem próbki
- przechowywaniem
- transportem

Próbka do momentu w którym nie podda się jej procesom konserwacji chemicznej lub mrożenia jest żywą tkanką lub jej fragmentem. Pierwsze drastyczne zmiany jej właściwości fizykochemicznych z punktu widzenia biologii rozpoczyna moment konserwacji próbki.

Różnice tkanek pobranych przyżyciowo w analizie PK:

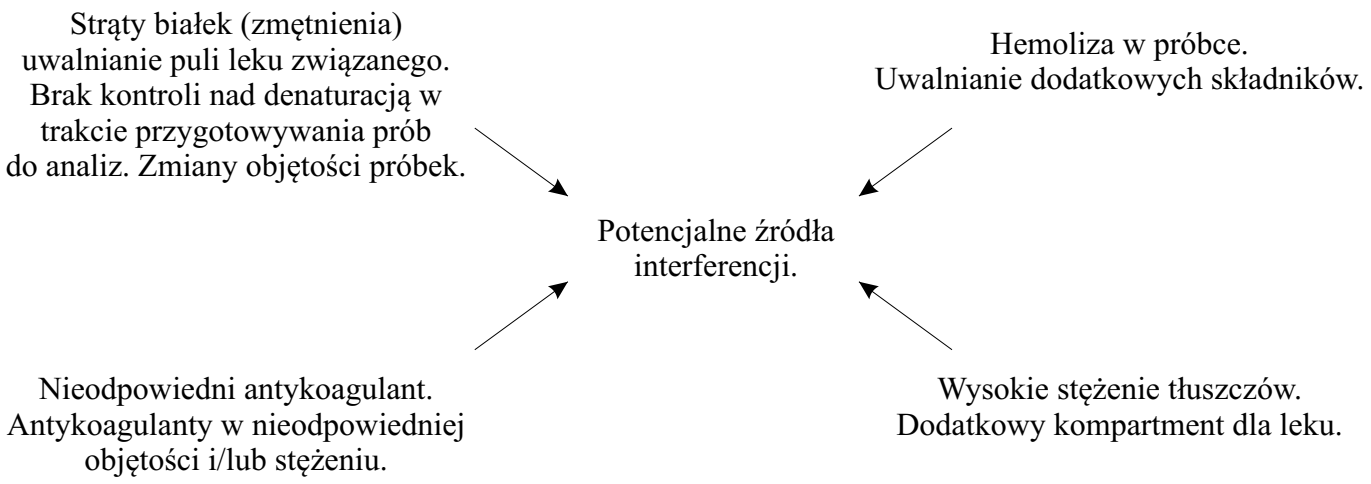
Przed mrożeniem lub konserwacją:	Po mrożeniu i zakonserwowaniu;
- prawidłowe struktury	- nieprawidłowe struktury
- białek	- nieodwracalne zmiany części białek
- tłuszczów	- tłuszczów
- komórek	- rozpad komórek
- brak konserwantów	- obecność konserwantów (niektóre leki)

Różnice między składem próbki "zerowej" a próbkami eksperymentalnymi (po podaniu leku).

Tkanka wzorcowa (bez podania leku):	Tkanka po podaniu leku (badana):
- nie zawiera cząsteczek leku	- zawiera cząsteczki leku
- nie zawiera metabolitów leku	- może zawierać metabolity leku
- różnice w technice pobierania np.: surowica krew lub osocze pobrane w stacji krwiodawstwa	- różnice w technice pobierania np.: surowica, krew lub osocze pobrane w ośrodku badań klinicznych lub wiwarium itd.

Nawet niewielkiego stopnia hemoliza próbek jest trudnym do zweryfikowania czynnikiem wpływającym na wyniki analizy HPLC. Szczególnie w przypadkach gdzie próbki nie podlegają przed właściwą analizą rygorystycznym procedurom oczyszczania i ekstrakcji analitu. Podstawowym problemem w takich wypadkach jest to ze hemoglobina oraz produkty jej rozpadu pochłaniają światło UV w różnym stopniu i zakresie. Stąd próbki hemolityczne w przypadku braku odpowiednich procedur LLE czy SPE nie powinny być analizowane za pomocą detekcji UV-vis czy DAD. Obecność barwników podnosi linię podstawową rozdziałów zwiększa szum a często dryft linii bazowej i jest źródłem dodatkowych pików. Hemoliza nie jest tylko uwolnieniem hemoglobiny z komórek. W trakcie hemolizy często ponad dziesięciokrotnie wzrasta liczba jonów potasu, stężenie dehydrogenazy mleczanowej, aminotransferazy aspartamowej i innych substancji uwalnianych z wnętrza erytrocytów. Hemoliza zaburza wiec kruchą równowagę pomiędzy różnymi procesami biochemicznymi i fizykochemicznymi jakim lek ulega w żywym organizmie i jego tkankach. Całkowite wyeliminowanie hemolizy jak i każdego innego artefaktu próbki jako potencjalnego źródła błędu wymaga porównania dwóch procedur walidacyjnych - tkanki prawidłowej i nieprawidłowej.

Innym artefaktem trudnym do wykrycia wzrokowo jest podbarwienie barwnikami żółciowymi próbki. Wzrost stężenia bilirubiny lub biliwerdyny we krwi lub brak kontroli nad ich poziomem na różnych etapach doświadczenia może mieć znaczny wpływ na analizę PK. Bilirubina jest substancją aktywną elektrochemicznie i fluoryzującą. Współczynnik rozdziału oktanol woda dla bilirubiny wynosi MiLogP = 4.95, pole polarne powierzchni jej cząsteczki tPSA = 166.1 angsztremów, masa cząsteczkowa ok 583 Da, pKa = 6.8-9.3. W organizmie wiąże się z białkami krwi konkurując z lekiem o miejsca wiązania. Uczestniczy więc czynnie w modyfikacji procesów dystrybucji i eliminacji leku. Jej obecność w osoczu lub surowicy wzrokowo jest często trudna do określenia. W niewielkich ilościach może być identyfikowana jako słaba hemoliza. Współczynnik rozdziału oktanol woda dla biliwerdyny wynosi MiLogP = 3.38, pole polarne powierzchni jej cząsteczki tPSA = 166.1, masa cząsteczkowa ok 581 Da, pKa = 5.0-7.2.



Ryc. Potencjalne zagrożenia w analizie PK związane z przygotowaniem próbki.

Jednym z częściej spotykanych artefaktów poza hemolizą czy podbarwieniem barwnikami żółciowymi jest także zmętnienie prób. Zwykle jest to normalny objaw zwiększenia ilości tłuszczów we krwi po spożyciu pokarmu (2- 6 godzin). Jednak powinno mieć ono charakter raczej opalescencji niż zmętnienia. Znaczne zmętnienie próbek osocza lub surowicy świadczy najczęściej o bardzo dużym stężeniu lipidów lub wręcz o lipemii. Obecność związków tłuszczowych w osoczu lub surowicy moduluje kinetykę leku poprzez wpływ w fazie eksperymentu jak i analizy chemicznej. Wynika to z pojawienia się dodatkowego kompartmentu w tkance jakim jest kompartment tłuszczowy. Jeżeli lek jest polarny i słabo lub silnie lipofilny będzie rozmieszczać się dodatkowo w cząsteczkach tłuszczu (ksantofile). Jeżeli cząsteczkami tymi są chylomikrony to lek taki może być za ich pomocą transportowany i ulegać dystrybucji do innych tłuszczowców w organizmie. Chylomikrony to cząsteczki o wielkości 100 do 1000 nm, nie różnicujące się elektroforetycznie. Można je jednak oddzielić z frakcji próbki przez ultrawirowanie w czasie 10 minut przy przeciążeniu 10000 x g. Jeżeli przyczyną lipemii są formacje tłuszczów o mniejszych średnicach i masach to ich odwirowanie wymaga wirowania w czasie 30 min przy przeciążeniu co najmniej 40000 x g. Próbek lipemicznych nie wolno poddawać głębokiemu mrożeniu. Przed zabezpieczeniem ich jako próbek do badania PK należy poddać je wirowaniu w celu oddzielenia nadmiaru tłuszczów. Tą i inne procedury postępowania z próbkami nieprawidłowymi regulują akty prawne o zasięgu międzynarodowym (WHO 1999).

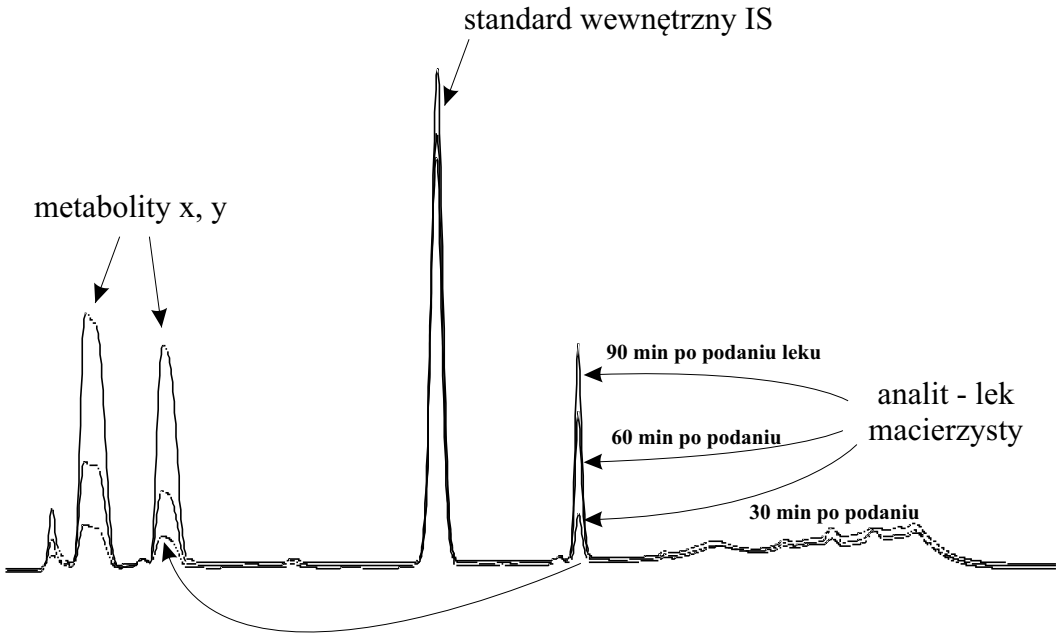
Niedomogą metod bioanalitycznych służących oznaczaniu leków w tkankach jest procedura walidacji. Większość kroków w walidacji metod bioanalitycznych zapożyczona jest z analityki farmaceutycznej. Obydwie gałęzie posiadają wiele wspólnych celów i cech jednak znacznie różni je specyfika badanego materiału. Przykładem trudnego do oszacowania wyniku jest odzysk obliczany na podstawie porównania próbki zawierającej badaną tkankę i lek z próbką zawierającą w miejscu tkanki wodę oraz lek w tej samej ilości i stężeniu.

osocze + lek + IS	woda + lek + IS
- zachodzi proces wiązania z białkami	- brak precyzyjnej oceny
- uwalnianie leku z połączeń z białkami	- brak precyzyjnej oceny
- obecność barwników, jonów, soli oraz innych składników matrycy	- brak precyzyjnej oceny
- wpływ matrycy na układ doświadczalny (złoże SPE, szkło etc.)	- brak precyzyjnej oceny
- sposób rozpuszczania się leku w tkance (zwykle inny niż w wodzie)	- brak precyzyjnej oceny
- ocena zachowania się wolnych cząsteczek leku (w wodzie rozpuszczona sól)	- j.w.
- ilość leku jaka została wykryta po oczyszczeniu próbki badanej (bez oceny procesów cząstkowych)	- tak
- informacja o źródle różnic w zachowaniu się leku pomiędzy matrycą badaną a wodą	- brak możliwości analizy

- rekonstrukcja próbki w badaniach DMPK zwykle przeprowadzana jest za pomocą fazy ruchomej lub specyficznych dla analitów i metody mieszanin. Punktem odniesienia do obliczenia odzysku może być również standard analitu i IS w mieszaninie rekonstrukcyjnej.
- słuszne wydaje się porównanie wyniku ekstrakcji osocze + lek + IS oraz woda + lek +IS z wynikiem analizy mieszanina rekonstrukcyjna (MRek) z rozpuszczonym lekiem i IS nie poddana procedurom ekstrakcji. W przypadku różnicy pomiędzy MRek + lek + IS a układem woda + lek + IS można wnioskować o tym iż ocenie podlega układ (woda + lek + IS) który nie powinien być punktem odniesienia do oceny ekstrakcji osocze + lek + IS

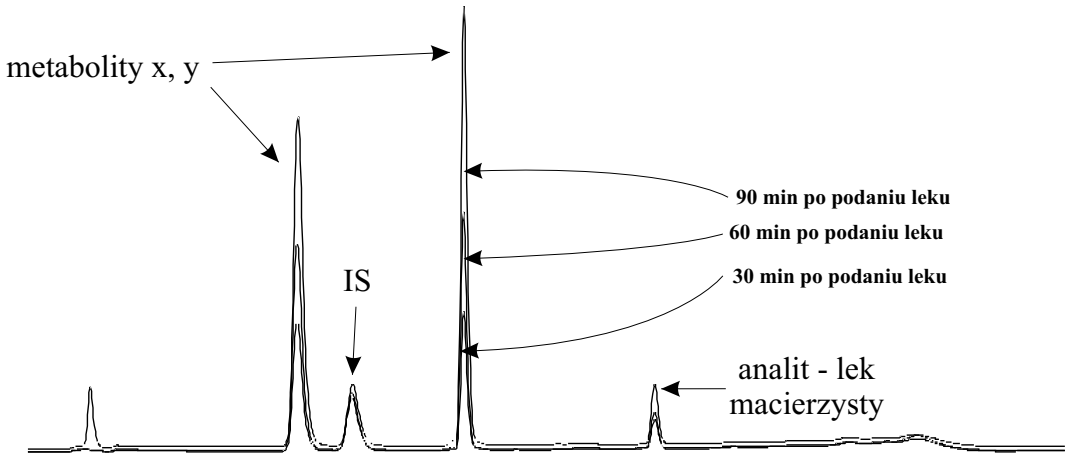
Obraz metabolitów na rozdziale chromatograficznym:

Duża część metod bioanalitycznych daje możliwość analizy ilościowej i jakościowej leku macierzystego. Jednoczesna analiza leku macierzystego oraz jego metabolitów zwykle jest bardzo trudna i wymaga opracowania dodatkowych metod. Wynika to z najczęściej zdecydowanie polarnego charakteru metabolitów.To że metoda analityczna zwalidowana jest pod kątem jednego analitu tj. leku macierzystego nie oznacza jednak że na rozdziale chromatograficznym (szczególnie UV) obraz metabolitów nie będzie widoczny. Polarne metabolity w przypadku ustalenia warunków analizy dla leków słabo lub silnie lipofilnych a jednocześnie słabo polarnych osiągać będą bardzo krótkie czasy retencji lub nie będą w ogóle ulegać rozdziałowi chromatograficznemu na kolumnie. Najczęściej będą więc widoczne w postaci wysokiego piku pojawiającego się tuż po nastrzyku wraz z obrazem pozostałości białek oraz innych związków towarzyszących matrycom biologicznym takim jak osocze surowica czy krew. W wielu wypadkach metabolity będą widoczne w pierwszej fazie rozdziału gradientowego w przypadku rozpoczynania elucji fazą z dużym udziałem buforu a małym udziałem eluentów takich jak acetonitryl czy metanol.
Profil metaboliczny większości leków jest złożony i najczęściej metabolizowane są co najmniej do kilku różnych pochodnych. Pewnym niebezpieczeństwem dla poprawności analiz farmakokinetyki leku jest obecność metabolitów które w niewielkim stopniu różnią się budową chemiczną od leku macierzystego. Substancje takie mogą w równie niewielkim stopniu różnic się od leku macierzystego właściwościami fizykochemicznymi takimi jak LogP czy pKa. W praktyce oznacza to że retencja tych związków w technikach chromatograficznych będzie podobna lub identyczna z lekiem macierzystym. To z kolei oznacza że pik analitu może być zafałszowany nakładającym się obrazem metabolitu mimo pełnej walidacji. Zagrożenie takie szczególnie dotyczy metod tradycyjnych takich jak HPLC-UV. Techniki oparte na spektrometrii mas praktycznie wykluczają takie zafałszowania ze względu na niezwykle dużą rozdzielczość i selektywność.

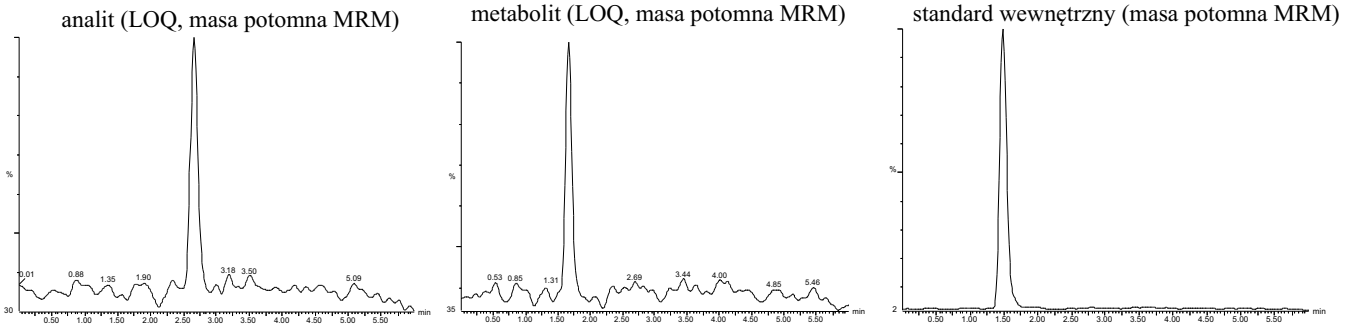


Ryc. Chromatograf HPLC, kolumna UPLC, detekcja FL, matryca - osocze oczyszczanie LLE: obraz trzech nałożonych chromatogramów ilustrujących zmiany stężenia leku macierzystego(po 30, 60 i 90 minutach - absorbcja) po jednorazowym podaniu leku *per os*.

Polarne metabolity najczęściej będą charakteryzować na rozdziałach chromatograficznych czasy retencji krótsze od leku macierzystego. Metabolity o podobnych właściwościach fizykochemicznych będą uzyskiwać czasy retencji podobne do związku macierzystego. Metabolity o większej lipofilności od leku macierzystego mogą charakteryzować czasy retencji dłuższe od leku macierzystego (odwrócony układ faz). Niebezpieczeństwo zafałszowania piku anality jego metabolitem wzrasta wraz ze zwiększaniem się masy cząsteczkowej leku macierzystego. Zagrożenie to rośnie ponieważ w przypadku związków o masie cząsteczkowej równej kilkaset daltonów zmiana polegającą na modyfikacji jednej z wielu grup funkcyjnych w efekcie ma niewielki wpływ na zmiany parametrów fizykochemicznych substancji. W przypadku detektorów tradycyjnych takich jak UV, PDA czy DAD problem jest tak długo nierozstrzygnięty jak długo nie ma możliwości określenia specyficzności metody z zastosowaniem syntetycznych metabolitów w fazie walidacji i projektowania metody. Niezwykle bezpieczne od względem tego typu zafałszowań są analizy z zastosowaniem detekcji MS/MS ponieważ zwykle nawet na detektorach niższej klasy różnica nawet 1 daltona w masie cząsteczkowej jest zdecydowanie możliwa do wychwycenia. Duża masa cząsteczkowa związku niema w tym wypadku znaczenia.



Ryc. Chromatograf HPLC, kolumna UPLC, detekcja FL, matryca - osocze oczyszczanie LLE: obraz trzech nałożonych chromatogramów ilustrujących zmiany stężenia dwóch metabolitów (po 30, 60 i 90 minutach - absorbcja) po jednorazowym podaniu leku per os.



Ryc. Chromatograf HPLC, kolumna HPLC, detekcja MS/MS, jonizacja ESI tryb MRM, matryca - osocze oczyszczanie LLE: obraz jednoczesnej analizy trzech kanałów ilustrujących typowy obraz metabolitu leku oraz standardu wewnętrznego w analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Optymalizacja oczyszczania metodami SPE:

Częstym problemem w analityce farmakokinetycznej jest odpowiednie oczyszczenie materiału biologicznego. Zwykle stosowanymi metodami po wykonaniu denaturacji białek jest oczyszczanie metodą ciecz/ciecz lub ciecz/ciało stałe - SPE. Mimo dużej liczby dostępnych aplikacji optymalizacja procesu oczyszczania nie zawsze przynosi oczekiwane rezultaty. Najczęściej spotykanym problemem jest niewielki odzysk analitu po przeprowadzonym oczyszczaniu, brak powtarzalności metody, lub rzadziej słabo oczyszczona próbka.

Zarówno metody SPE tradycyjne jak i realizowane w systemach 96 dołkowych cechuje podobna metodyka i zasady postępowania. Różnice pojawiają się najczęściej w związku z automatyzacją optymalizowanej metody. Najlepsze efekty w farmakokinetyce daje przeprowadzanie oczyszczania metodami SPE z fazą wstępną przygotowania próbki - PP (ang.: *Protein Precipitation*), (rozpuszczanie, denaturacja itd..). Dobór kolumienki SPE zależny jest od:

- rodzaju matrycy biologicznej
- objętości próbki
- stosunku analit / zanieczyszczenia
- właściwości chemicznych samego analitu
- pH próbki
- wstępnej obróbki matrycy

Wybierając złoże SPE należy kierować się podstawowymi właściwościami badanego analitu. Stąd zaproponować można uproszczony schemat doboru SPE dla leków o masie cząsteczkowej poniżej 1000 - 2000 Da.

- rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych
  - rozpuszczalne metanolu
    złoża: CN, Diol, C18, Silica
  - rozpuszczalne heksanie
    złoża: NH2, Diol, Silica, C18,C8
- rozpuszczalne w wodzie
  złoża: C18, C8, C2, Fenyl, CN, NH2, Silica

W zakresie doboru złoża do analitu można kierować się także licznymi obecnie aplikacjami prezentowanymi przez producentów sprzętu SPE. Bardzo szeroko stosowane są kolumienki C18 jednak nie zawsze można zaadoptować je do każdego typu związku i matrycy.

Przygotowanie złoża SPE do pracy - kondycjonowanie:

Wstępną fazą właściwego oczyszczania SPE jest przygotowanie złoża kolumienki do przyjęcia próbki. Kolumienki SPE standardowo konfekcjonowane są z suchym złożem. Dobre efekty daje zalanie takiego złoża eluentem:

- polarnym (metanol) w przypadku złóż hydrofobowych (C_{18},C_8)
- niepolarnym (dichlorometan) w przypadku złóż polarnych (silica)

Kolejnym krokiem jest pozostawienie złoża nawet na kilkanaście minut. Dopiero następnym etapem jest podanie roztworu kondycjonującego.

Następnym etapem jest usunięcie roztworu kondycjonującego wodą w objętości dwukrotnie większej od poprzedniej. Ostatnim etapem kondycjonowania jest podanie roztworu o składzie chemicznym i pH zbliżonym do tego jaki posiada próbka.

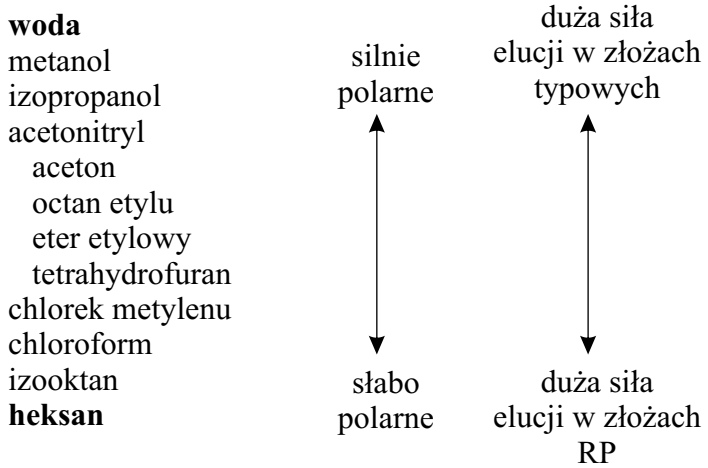
Etapy przygotowania złoża:

k1 - kondycjonowanie złoża metanolem, acetonitrylem lub izopropanolem
(500 mg złoża / k1 ≥ 5 ml) typowe
objętości to 5-10 ml na 500 mg złoża
k2 - wymycie k1 wodą w objętości k2 = k1 jeżeli k1 > 2 ml
k2 = 2 x k1 jeżeli k1 ≤ 2 ml
k3 - zalanie złoża eluentem o składzie zbliżonym do składu próbki nawarstwianej na złoże (roztwory kwasów, zasad, bufory itp.)

Etapy k2 i k3 często łączy się ze sobą podając jeden roztwór np wody o pH równym pH próbki, podaje się bufory etc.. W przypadku kolumienek RP-C18 dobrze przygotowane złoże w czasie zalewania metanolem zmienia zabarwienie i nabiera charakterystycznego szklisto szarego koloru. Przygotowanie złoża kolumienki SPE do pracy znajduje wiele analogii do przygotowania do pracy kolumny w HPLC. Im większą ilość złoża zawiera kolumienka tym większe znaczenie dla optymalizacji oczyszczania ma jej przygotowanie. Modyfikacje SPE zmierzają obecnie do tworzenia rodzaju szybkiego filtru którego zadaniem jest jedynie filtracja i usunięcie zdenaturowanych białek z medium. Metody pozwalające korzystać z tego rodzaju materiałów posiłkują się w fazie wstępnej precypitacją białek ale już bez ich odwirowywania, natomiast w połączeniu z sączeniem na filtrze - kolumience. Filtry tego rodzaju znacznie przyśpieszają pracę na SPE i mają duże zastosowanie w systemach 96 dołkowych itp.

Nanoszenie przygotowanej próbki na złoże SPE:

Optymalizacja nanoszenia próbki na złoże dotyczy głównie objętości próbki, składu, szybkości nanoszenia (szybkość przepływu przez złoże). Zwykle na 200 mg złoża nanosi się co najmniej 0.5 ml próbki. Objętość próbki najczęściej zależna jest od fazy wstępnej - denaturacji i rozpuszczania. Sama próbka w przypadku takich matryc jak osocze lub mocz ma zwykle objętość 0.5 - 1.0 ml. W przypadku prób tkanek objętość ta jest zwykle znacznie większa. Odzysk w metodzie zależny jest od objętości nanoszonej matrycy. W przypadku nowych metod powinien zostać oszacowany dla różnych objętości nanoszonej próbki. Szybkość nanoszenia próbki na złoże ma duży wpływ na parametry oczyszczania. W zależności od wielu czynników optymalne jest nanoszenie próbki przy dużym lub małym przepływie przez złoże. Przyjmuje się że prędkość przepływu



Rys. Zależność między polarnością rozpuszczalników, a siłą elucji ze złoża SPE.

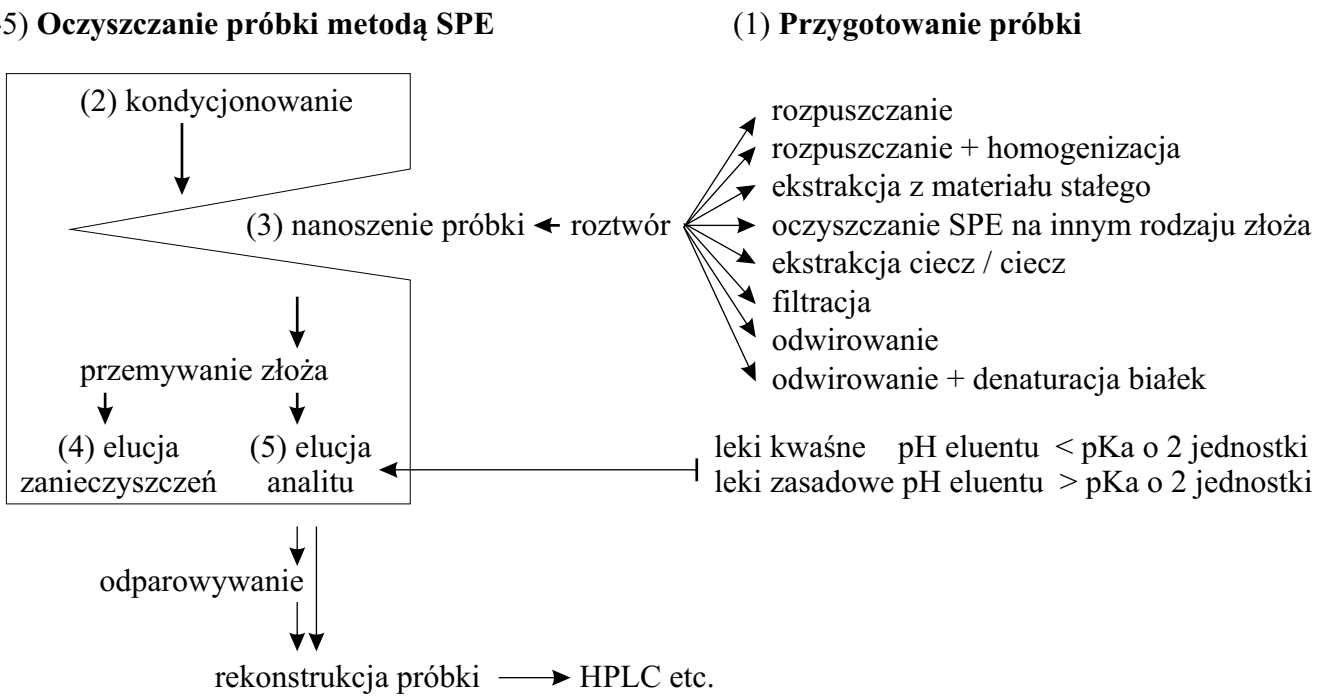
Im większa masa złoża tym przepływ musi być większy. Odzysk z kolumienek SPE podobnie jak w przypadku objętości nanoszonej próbki może być różny dla różnych szybkości nanoszenia próbki czy elucji analitu. Nagłe zmiany szybkości przepływu w trakcie oczyszczania na SPE zwykle odbijają się niekorzystnie na uzyskanych wynikach. Każdy etap optymalizacji oczyszczania próbek biologicznych na SPE zawiera trzy podstawowe elementy wymagające sprawdzenia dla każdego zastosowanego eluentu czy próbki.

Optymalizowane etapy:	kondycjonowanie / oczyszczanie / elucja			
fazy optymalizacji dla każdego etapu:	1	2	3	4
- objętości	duża	mała	duża	mała
- stężenia	mała	duża	mała	duża
- szybkości przepływu	mała	mała	duża	duża

Przygotowanie próbki do oczyszczania metodą SPE wpływa znacznie na jakość rozdziałów chromatograficznych. Promuje się metody nanoszenia na złoże osocza z pominięciem fazy denaturacji białek w celu zwiększenia efektywności - szybkości oznaczeń. Takie postępowanie niesie jednak ze sobą pewne zagrożenia dotyczące precypitacji białek w złożu kolumienki. Precypitacja białek w złożu kolumienki zawsze zaburza przepływ stosowanych eluentów. W większości wypadków jako proces odwracalny może zmniejszać efektywność oczyszczania. Zawsze zmniejsza kontrolę nad procesami zachodzącymi na złożu kolumienki. Wstępne przygotowanie prób biologicznych zawsze wpływa korzystnie na przebieg i efekt oczyszczania metodami SPE.

Przemywanie złoża i usuwanie zanieczyszczeń:

Objętość stosowana w tej fazie to 5-10 ml na 500 mg złoża. Najczęściej stosowane przemywanie złoża to operacja dwustopniowa. Pierwszym eluentem służącym do wymywania zanieczyszczeń jest woda. Kolejnym jest roztwór wody i metanolu (5-50%) lub wody i acetonitrylu (5-50%). Dobrym eluentem usuwającym tłuszcze z próbki jest bufor z dodatkiem metanolu lub acetonitrylu (10-30%) lub heksan.



Rys. Łączenie SPE z innymi metodami przygotowania i oczyszczania próbek.

Do oczyszczania złoża można także stosować substancje w których nie rozpuszcza się analit . W niektórych przypadkach fazę tą pomija się i po naniesieniu próbki przechodzi się do fazy suszenia lub elucji.

Suszenie złoża:
Suszenie złoża jest konieczne wtedy gdy końcowe wymywanie analitu ze złoża wymaga zastosowania eluentu który nie miesza się z fazą zastosowaną do przemywania i usuwania zanieczyszczeń. Kolumienki można suszyć stosując powietrze, azot, dwutlenek węgla. Można także stosować wirowanie, szczególnie w przypadku roztworów o dużej lepkości. Zwykle skrócenie czasu suszenia wpływa korzystnie na odzysk analitu.

Elucja analitu ze złoża:
Elucja z wcześniej wysuszonego złoża to elucja ze złoża którego stan przypomina nieco złoże nowej suchej kolumienki. Stąd podanie eluentu którym wymywany będzie analit ma także za zadanie przywrócić podstawowe właściwości i charakterystykę złoża.

Wybór rozpuszczalnika w fazie elucji związany jest zarówno z rodzajem zastosowanego złoża jak i rozpuszczalnością leku. Czas kontaktu złoża z mieszaniną użytą do elucji powinien wynosić 1-4 minut. Typową objętością jaką dokonuje się wymywania analitu jest 5-10 ml / 500 mg złoża. Wymywanie dwu lub trzystopniowe mniejszą objętością eluentu jest zwykle efektywniejsze od jednorazowego (zatrzymanie przepływu). Do wymywania najczęściej stosuje się metanol, aceton, fazę ruchomą, acetonitryl, octan etylu, tetrahydrofuran. Stosuje się również roztwory zawierające 1-5% kwasu mrówkowego lub octowego ewentualnie trójetyloaminę lub tójmetyloaminę, octan etylu + aceton w stosunku 1:1 etc.. Dodatek kwasu zwykle zwiększa odzysk leków kwaśnych. W tym celu stosuje się np.. 5% kwas octowy w octanie etylu, 0.1% kwas mrówkowy w metanolu, 0.2% kwas trójfluorooctowy w acetonie. Optymalizację tego etapu przeprowadza się zwykle pod kontrolą stosunku lek / standard wewnętrzny D/IS (ang.: *Drug / Internal Standard*). Im większy jest ten stosunek tym bardziej selektywna jest elucja leku. Nie zawsze duża objętość eluentu ma korzystny wpływ na ten parametr.
Elucja kwaśnych leków o charakterze słabych elektrolitów powinna odbywać się przy pH niższym od pKa leku o 2 jednostki. Elucja zasadowych leków o charakterze słabych elektrolitów powinna odbywać się przy pH wyższym od pKa leku o 2 jednostki.

Zagęszczanie próbki:
Odparowywanie próbki stosuje się w przypadku gdy elucja analitu nie została wykonana przy użyciu fazy ruchomej. W praktyce laboratoryjnej wykonuje się ją często i w tym wypadku. Często do analizy HPLC, UPLC podaje się próbkę rozpuszczoną w eluencie służącym do wymywania próbki. Można ją wtedy pobrać do naczynia miarowego i uzupełnić do żądanej objętości. W ten sposób skraca się metodę o czas potrzebny na rekonstrukcję objętości odparowanej próbki.

Rekonstrukcja próbki:
Jest ostatnim etapem przygotowania próbki polegającym na jej rozpuszczeniu w określonej objętości fazy ruchomej do HPLC lub wybranego rozpuszczalnika.

Automatyzacja:
Automatyzacja SPE daje obecnie duże możliwości szybkiego przygotowania dużej ilości złożonych pod względem chemicznym próbek. Gwarantuje wysoką jakość parametrów walidacyjnych opracowanej metody a w szczególności specyficzność.

Obecnie na rynku dostępne są zarówno roboty obsługujące SPE tradycyjne (pojedyncze kolumienki) jak i w systemach 96 dołkowych. SPE jest jedną z wielu metod oczyszczania złożonych matryc do analizy chromatograficznej. Zarówno w farmakokinetyce jak i w innych dziedzinach nie wyklucza zastosowania innych metod ekstrakcji w fazie przygotowania próbki. Stąd w ofercie wielu producentów pojawia się coraz więcej materiałów służących do jednoczesnej obróbki wielu prób z zastosowaniem bądź szybkiego sączenia bądź zminiaturyzowanego systemu SPE. Oferowane materiały obsługiwane są przez zrobotyzowane zestawy - wielokanałowe i wielofunkcyjne pipety.

Funkcje tych urządzeń sterowane są za pomocą odpowiedniego oprogramowania. Układy tego rodzaju łączy się także ze zrobotyzowanymi stacjami pobierania próbek np. krwi. Zaawansowane technologie pobierania przygotowywania i analizy próbek w analityce farmakokinetycznej mają szczególne znaczenie w przedklinicznej fazie projektowania leków.

CAS	Nazwa	Polarność (Snyder)	BP	MiLogP	CLogP	SMILES	pKa ; pKb
124-18-5	dekan	- 0,3	174,1	4,64	5,98	C(CCCCCCCC)C	
26635-64-3	izooktan	- 0,4	99,2	3,71	4,80	CCCCCC(C)C	
103-50-4	eter benzylowy	3,3	288,3	3,71	3,30	O(Cc(cccc1)c1)Cc(cccc2)c2	
142825	heptan	0	98,4	3,33	4,40	C(CCCCC)C	
110-54-3	heksan	0,0	68,9	2,90	3,87	C(CCCC)C	
56235	czterochlorek wgla	1,6	76,5	2,72	2,88	C(Cl)(Cl)(Cl)Cl	
79016	trichloroetylen	1	87,2	2,62	2,63	C(=CCl)(Cl)Cl	
110-82-7	cykloheksan	0,0	80,7	2,59	3,35	C(CCCC1)C1	
108-88-3	toluen	2,3	110,6	2,45	2,64	c(cccc1)(c1)C	
78-86-4	chlorobutan	1,0	101,0	2,45	2,52	C(Cl)(CC)C	
67-66-3	chloroform	4,4	61,7	2,39	1,95	C(Cl)(Cl)Cl	
75-34-3	dichloroetan	3,7	83,4	2,25	1,78	C(Cl)(Cl)C	
71-43-2	benzen	3,0	79,0	2,13	2,14	c(cccc1)c1	43,00
98-95-3	nitrobenzen	4,5	210,8	1,73	1,88	O=N(=O)c(cccc1)c1	
100-47-0	benzonitryl	4,6	191,1	1,62	1,58	N#Cc(cccc1)c1	
108-94-1	cykloheksanon	4,5	155,7	1,52	0,87	O=C(CCCC1)C1	22,00
123-86-4	octan butylu	3,9	126,0	1,51	1,77	O=C(OCCCC)C	
1634-04-4	eter tertbutylowy	2,9	55,2	1,49	1,19	O(C(C)(C)C)C	-3,70
75-09-02	dichlorometan	3,4	40,0	1,47	1,25	ClCCl	
76-03-09	TCA		196,5	1,10	1,68	O=C(O)C(Cl)(Cl)Cl	0,51
110-86-1	pirydyna	5,3	115,3	1,02	0,64	n(cccc1)c1	5,23
71363	butanol	3,9	117,2	1,00	0,82	OCCCC	16,10
78-93-3	metylo etylo keton	4,5	80,0	0,96	0,32	O=C(CC)C	14,70
109999	tetrahydrofuran (THF)	4,2	66,0	0,78	0,53	O(CCC1)C1	-2,08
34590-94-8	propanol	4,3	82,4	0,77	-0,12	COC(C)COCC(C)O	17,10
141-78-6	octan etylu	4,3	77,1	0,64	0,71	O=C(OCC)C	25,00
67641	aceton	5,4	56,2	0,53	-0,21	O=C(C)C	20,00
76-04-0	kwas octowy	6,2	117,9	0,41	0,81	O=C(O)C(F)(F)Cl	4,80
115106	eter dimetylowy	2,8	25 -	0,28	-0,05	O(C)C	
79-20-9	octan metylu	4,4	56,3	0,23	0,18	O=C(OC)C	25,00
64175	etanol	5,2	78,5	0,13	-0,23	OCC	15,90
79-24-3	nitroetan	5,3	114,0	0,10	0,25	O=N(=O)CC	8,60
76051	TFA		73,0	0,07	0,37	O=C(O)C(F)(F)F	0,52
75-05-08	acetonitryl	6,2	81,6	0,04	-0,39	N#CC	-4,30
123-91-1	dioksan	4,8	101,0	-0,16	-0,39	O(CCOC1)C1	-2,92
67-56-1	metanol	6,6	65,0	-0,27	-0,76	OC	15,30
109-86-4	metoksy etanol	5,7	124,6	-0,35	-0,61	O(CCO)C	14,80
75-52-5	nitrometan	6,0	78,0	-0,37	-0,28	O=N(=O)C	10,21
86-07-04	dimetyloformamid	6,4	153,0	-0,41	-1,04	O=CN(C)C	-0,3
107-21-1	glikol	6,9	197,3	-0,90	-1,37	OCCO	
75-12-07	formamid	7,3	210,5	-0,94	-1,51	O=CN	-0,48
67-68-5	DMSO	6,5	189,0	-1,03	-1,38	O=S(C)C	
7732-18-5	woda	9,0	100,0	-1,38		HOH	15,70
4097- 89-6	trójetyloamina	1,8	89,5	-2,93	-1,01	N(CCN)(CCN)CCN	10,80

Rys. Wybrane parametry fizykochemiczne najczęściej stosowanych ekstrachentów i eluentów w technikach LC.

Polarność przedstawiona za pomocą współczynnika Snyder'a odnosi się do wartości w współczynników rozdziału pomiędzy trzema roztworami testowymi.

E - etanol (silnie polarny donor protonów)
D - dioksan (słabo polarny donor protonów)
N - nitrometan (silnie polarny akceptor protonów)

Stąd

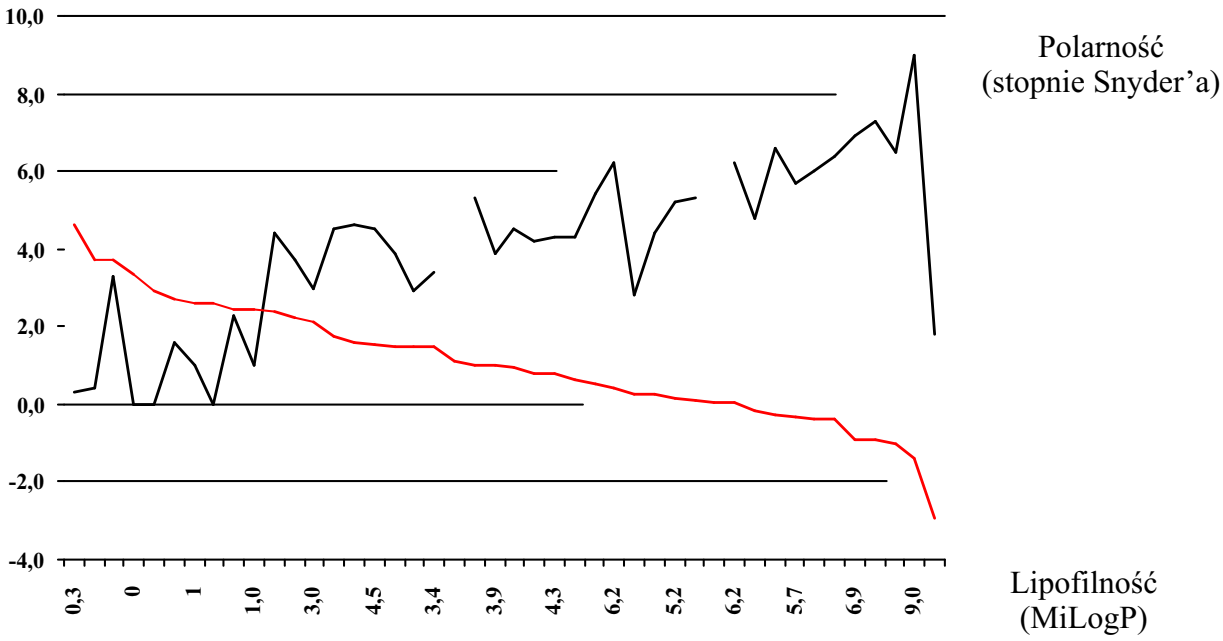
$$\mathbf{P = \log k_{(S/E)} + \log k_{(S/D)} + \log k_{(S/N)}}$$

P - współczynnik polarności Snyder'a
logK(S/E) - współczynnik rozdziału analit / etanol
logK(S/D) - współczynnik rozdziału analit / dioksan
logK(S/N) - współczynnik rozdziału analit / nitrometan
- Ilości analitów znormalizowane są pod względem MW

W myśl zasady

lipofilność = hydrofilność - polarność

Hydrofilność związku jest wypadkową kilku różnych współczynników rozdziału relacjonujących kilka różnych typów wiązań pomiędzy cząsteczkami. W stosunku do dwóch składników roztworu dla których wartość polarności jest znana polarność końcową roztworu można obliczyć z wypadkowej na podstawie procentowego udziału.



Ryc. Zależność między polarnością a lipofilnością najczęściej stosowanych ekstrachentów w technikach LC.

$$P' = (P_1 \times C1) + (P_2 \times C2)$$

P' - wartość współczynnika polarności Snyder'a dla roztworu
P1 - współczynnik polarności Snyder'a pierwszego składnika
P2 - współczynnik polarności Snyder'a drugiego składnika
C1 - procentowy udział w roztworze pierwszego składnika
C2 - procentowy udział w roztworze drugiego składnika

Przykład obliczania polarności mieszanin:

Etanol :Trójetyloamina (9:1) (%/%)

P'= 5.2 x 0.9 + 1.8 x 0.1 = 4.68 + 0.18 = 4.86

Etanol : Woda (7:3) (%/%)

P'= 5.2 x 0.7 + 9 x 0.3 = 3.64 + 2.7 = 6.34

Acetonitryl : Woda (7:3) (%/%)

P'= 6.2 x 0.7 + 9 x 0.3 = 4.34 + 2.7 = 7.04

Metanol : Woda (7:3) (%/%)

P'= 6.6 x 0.7 + 9 x 0.3 = 4.62 + 2.7 = 7.32

Kwas	**pKa**	**Zasada**	**pKb**
nadchlorowy	-10	hydrazyna	5.9
solny	-7	amoniak	4.7
azotowy	-1.3	anilina	4.6
trójchlorooctowy	0.7	glicyna	4.2
chromowy	0.8	trójmetyloamina	4.2
siarkowy	1.0	alanina	4.1
szczawiowy	1.3	metyloamina	3.4
dichlorooctowy	1.3	dimetyloamina	3.3
siarkawy	1.9	etyloamina	3.3
fosforowy	2.2		
aminooctowy	2.4		
fluorooctowy	2.6		
chlorooctowy	2.9		
winowy	3.0		
salicylowy	3.0		
mlekowy	3.1		
cytrynowy	3.1		
jodooctowy	3.1		
azotawy	3.3		
moczowy	3.4		
cyjanowy	3.7		
mrówkowy	3.8		
askorbowy	4.1		
benzoesowy	4.2		
octowy	4.8		
węglowy	6.4		
borowy	9.2		

Ryc. Zestawienie wartości pKa i pKb najczęściej stosowanych kwasów i zasad w analityce PK (Galus Z. 1996).

Analiza chemiczna matrycy biologicznej w badaniach PK:

Metody analityczne które znalazły trwałe zastosowanie w badaniach PK to metody chromatograficzne, elektroforetyczne oraz immunochemiczne. Większość metod analitycznych stosowanych w badaniach farmakokinetycznych stanowią metody rozdziału chromatograficznego (Peng G.W., Chiov W.L. 1990; Aced G., Mockel H.J. 1991). Powszechnie stosowane są w tym celu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC (ang.: *High Performance Liquid Chromatography*) metody chromatografii gazowej GC (ang.: *Gass Chromatography*) oraz elektoforezy kapilarnej CE (ang.: *Capillary Electrophoresis*).

	CPPK	TDM	Identyfikacja, tożsamość.	Pozostałości leków w tkankach.
Niski koszt analizy		+		
Szybkość analizy		+		
Szybkość przygotowania próbki		+		
Selektywność	+	+	+	+
Specyficzność	+	+	+	+
Czułość	+		+	+
Zakres	+			+
Jakość oprogramowania	+		+	+
Autosampler, autoinjector	+		+	+
Termostatowanie próbek	+		+	+
Detekcja UV	+	+		+
Detekcja DAD		+	+	
Detekcja MS/MS	+	+	+	+
Detekcja EC	+		+	+
Detekcja FL	+	+	+	+
Detekcja ELSD	+	+	+	
Detekcja RI	+			+
Metody UPLC	+	+	+	+
Metody HPLC	+	+	+	+
Metody GC		+	+	
Metody NMR			+	+
Metody CE, MEKC	+	+		+
Metody immunochemiczne		+	+	
Analiza z wykorzystaniem wielu detektorów jednocześnie	+		+	+

Rys. Priorytety sprzętowe oraz cechy metod analitycznych w badaniach farmakokinetycznych.

Techniki immunochemiczne mają pewne znaczenie w analityce związanej z badaniami parametrów farmakokinetycznych. Jednak mimo dużej szybkości przeprowadzanych oznaczeń oraz znacznej selektywności cechuje je najczęściej słaba specyficzność. Wybór metody analitycznej w badaniach PK podyktowany jest podobnie jak w przypadku przygotowania materiału do analizy właściwościami badanej substancji. Techniki te mają także różne zastosowanie w zależności od typu badań farmakokinetycznych. Innymi priorytetami rządzi się analityka w ramach terapii monitorowanej innymi farmakokinetyka opisująca kompletne profile PK substancji. Obecnie w analityce farmakokinetycznej najczęściej wykorzystywanymi metodami są analizy wykonywane za pomocą HPLC z detekcją MS. Standardem w farmakokinetyce jest stosowanie detekcji MS/MS. Wiele leków i metabolitów leków posiada kilka maksimów absorpcji światła co można wykorzystać zarówno w fazie tworzenia metody analitycznej jak i identyfikacji na etapie analizy z zastosowaniem detektorów typu PDA (Lai C.K. i wsp 1989).

	maksimum absorpcji UV (nm)			
dotypina	303	263	231	211
chloropromazyna	345	302	278	240
prometazyna	337	293	269	234
tioridazyna	310	274	235	215

perfenazyna	320	255	210
hydralazyna	304	260	211
metoklopramina	309	270	215
propranolol	290	230	215
chinidyna	332	240	212
ofloksacyna	327	295	230
klozapina	300	260	216
furosemid	344	275	235
molindyna	301	256	211
buspiron	302	239	211
nitrazepam	310	260	219
flinitrazepam	313	253	220
klonazepam	310	240	211
metakwalon	308	267	227
kloksazolam	340	265	239
tiotiksen	308	259	231
zuklopentiksol	325	267	227
kwas mefenamowy	349	281	223
M (średnia)	**316**	**260**	**220**
SD (odchylenie)	17	16	9

Rys. Przykłady związków posiadających kilka maksimów absorpcji UV.

Zwykle badacz ograniczony jest stężeniem analitu w próbce lub słabą absorpcją analitu. Stąd zastosowanie wielu innych systemów detekcji w celu osiągnięcia żądanej granicy oznaczalności i granicy detekcji. Zasadniczy podział tych metod uwarunkowany właściwościami fizyko chemicznymi badanych substancji scala wiele wspólnych metod detekcji. W farmakokinetyce i szeroko pojętej biofarmacji wykorzystywane są np. układy GC-ICP-MS oraz HPLC-ICP-MS, gdzie układ detekcyjny to emisyjny spektrometr atomowy. Każde wyspecjalizowane w analizie farmakokinetyki leków laboratorium posługuje się obecnie technikami HPLC-MS i UPLC-MS. Takie techniki w przypadku HPLC, UPLC warunkują granice oznaczalności na poziomie 1 - 100 pg/ml. Najczęściej stosowane układy dla HPLC to RP-HPLC/UPLC - układy odwróconych faz.

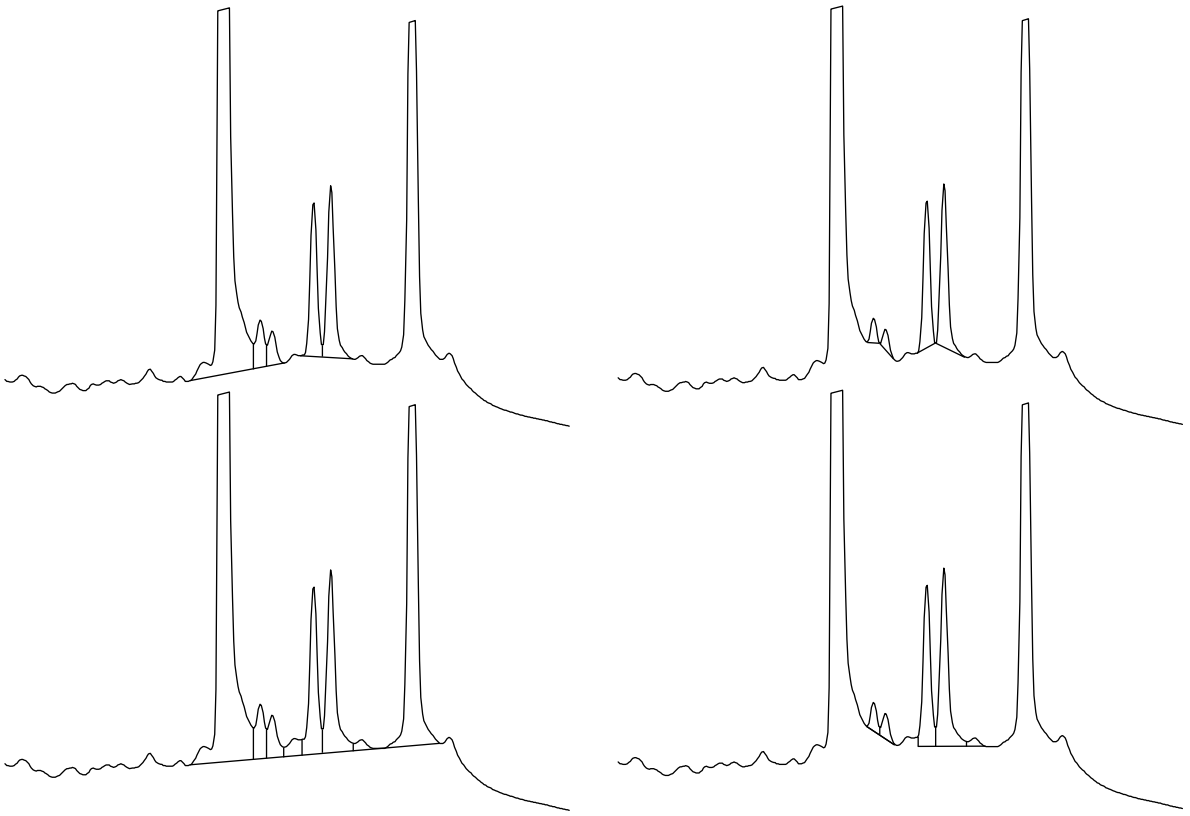
Znane są jednak i wykorzystywane w farmacji także IP-HPLC - chromatografia cieczowa tworzenia par jonowych, IE-HPLC - chromatografia cieczowa wykluczeniowa, kationowymienna, anionowymienna i in. (Pohl P., Szpunar J. 2001). Detekcja badanych związków najczęściej przeprowadzana jest detektorami typu DAD (ang.: *Diode Array Detector*) dla technik LC, ewentualnie UV-Vis. Często pojawia się jednak problem braku absorpcji światła przez badaną substancję co w przypadku HPLC wymusza zmianę detektora na fluorescencyjny. Najczęściej spotykana detekcja w aparatach GC to detekcja typu FID. Obie metody analityczne (LC/GC) łączy detekcja MS (ang.: *Mass Spectrometry*). Jedną z ciekawszych metod detekcji która zanotowała ogromny postęp w ostatnich latach jest detekcja elektrochemiczna. Detekcja elektrochemiczna pozwala na analizę ilościową związków nie pochłaniających światła UV lub trudnych do analizy metodami FL. Detekcja elektrochemicznych zapewnia niezwykle dużą specyficzność analizy i zmniejszenie liczby szumów i dodatkowych sygnałów z tła złożonych matryc biologicznych. Detekcja tego typu umożliwia także uzyskanie dużej czułości metody analitycznej i niskich wartości LOQ, LOD. Dość dużą specyficzność analizy chemicznej w badaniach farmakokinetycznych zapewnia również detekcja fluorescencyjna. Większość związków fluoforowych przy fali wzbudzenia średnio 485 nm (+/- 90) daje emisję światła o długości fali średnio 545 nm (+/- 90). Ważniejsze grupy i wiązania dające możliwość pomiaru za pomocą detektora fluorescencyjnego to między innymi:

- grupa nitrylowa: -O-N=O
- wiązania tioeterowe: -S-
- wiązania dwusiarczkowe: -S-S-
- wiązania ketonowe: =C=O
-grupa aldehydowa: -CHO

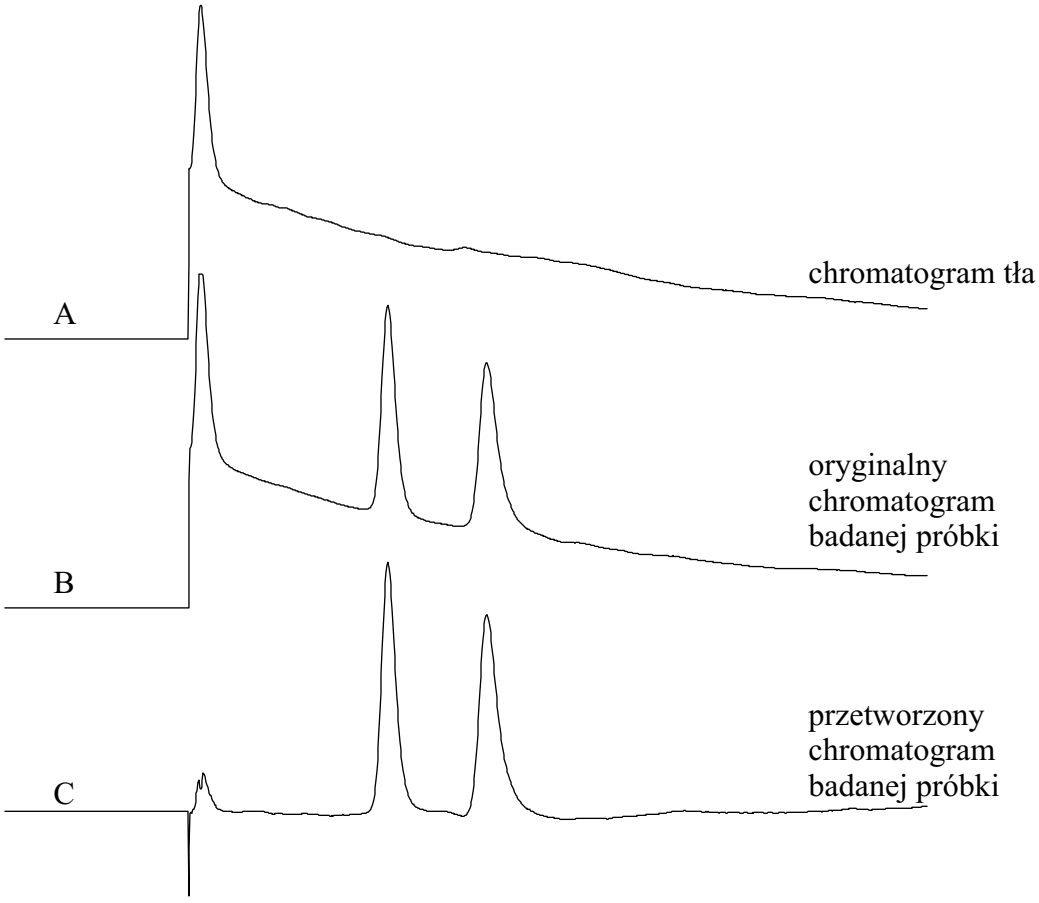
Jednak wiele związków których stężenia analizowane są w tkankach czy płynach ustrojowych nie wykazuje auto fluorescencji (ang.: *Native Fluorescence*).

dapoksetyna	interferon b	melatonina
bromokryptyna	witamina B2	ochratoksyna A
aflatoksyna M1, B, G	serotonina	naproksen
warfaryna	dekstrometorfan	lurtotekan
kokaina	morfina	neopteryna
tiabendazol	rofekokxib	kodeina
hypokrelina A	triamteren	norepinefryna
epinefryna	dopamina	oktopamina
dihydroksybenzylamina	michellamina B	tryptamina
wenlafaksyna	synefryna	forfenicynol
doksorubicyna	citalopram	klozapina
fluoksetyna	haloperidol	maprotylina
trazodon	ritodryna	8 metoksypsoralen
kromakalim	forfenicynol	N - acetylo serotonina
kwas aminobenzoesowy	aminakryna	ajacyna
kwas antranilowy	lipofuscyna	propranolol
aminoaktynomycyna D	eskuletyna	aminokumaryna
atabryna	auramina	siarczan berberyny
hydroksykumaryna	metoksykumaryna	mitramycyna
piren	pironina	rodamina
tetracyklina	apomorfina	furosemid
metolazon	itrakonazol	umbiliferon
dekstrometorfan	atenolol	nadolol
topotekan	akrydyna	

Ryc. Przykłady substancji wykazujących fluorescencję bez wstępnej derywatyzacji.

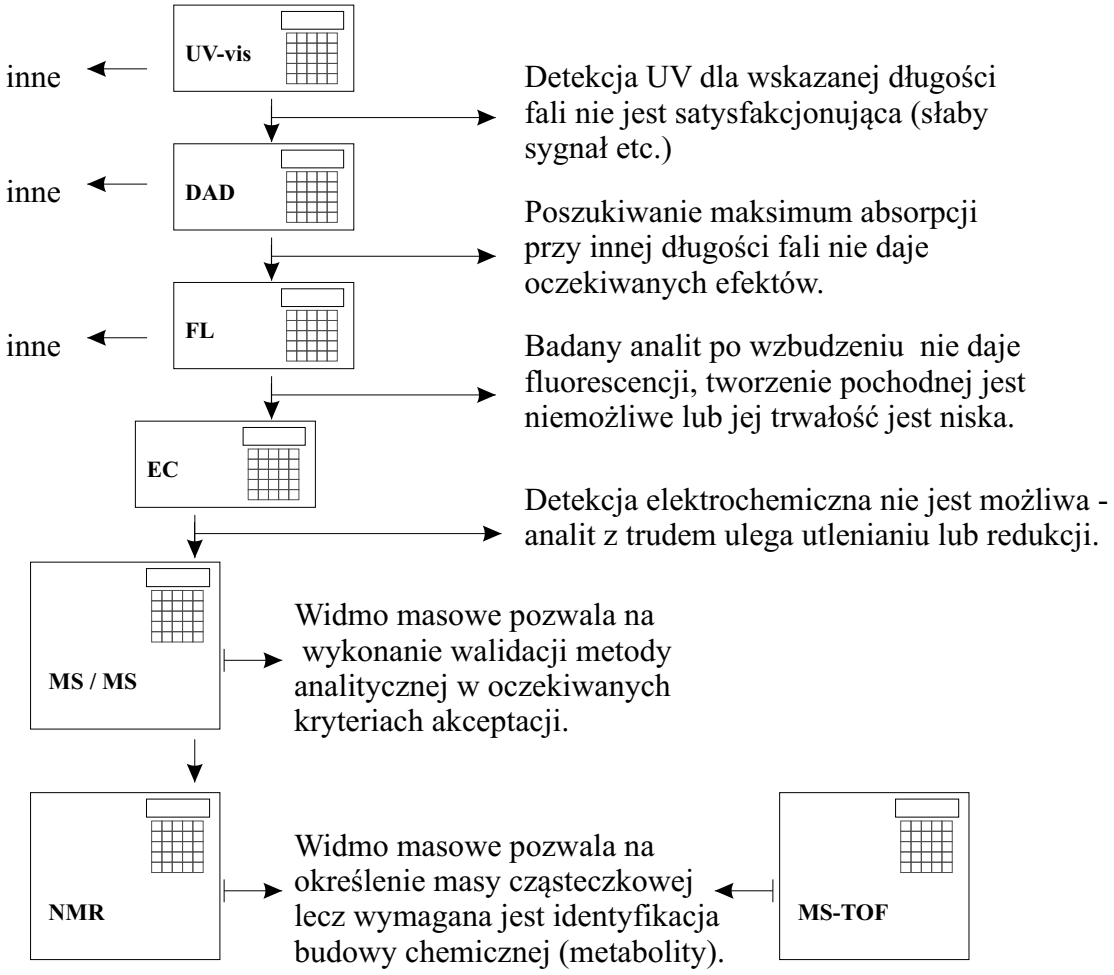


Rys Metody analizy chromatogramu (detekcja HPLC - UV).

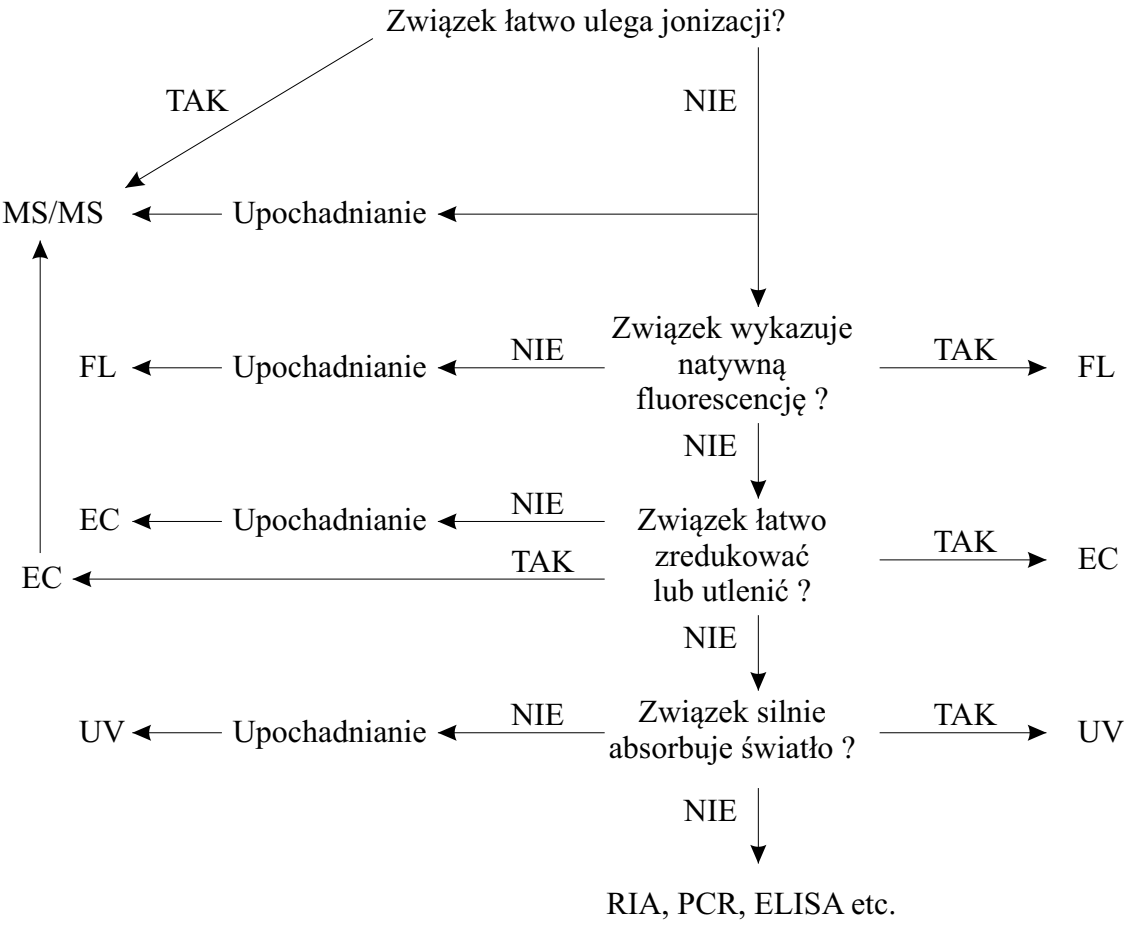


Rys Cyfrowa obróbka chromatogramu - odejmowanie tła (detekcja HPLC- EC)
C = B - A.

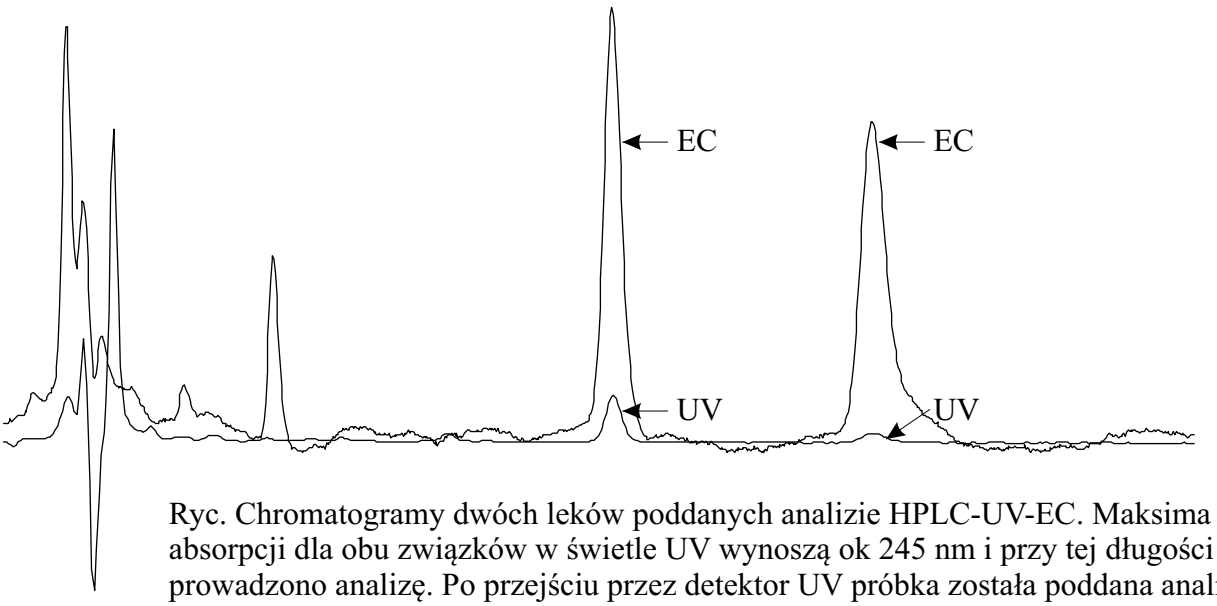
Takie substancje dopiero po skompleksowaniu czy derywatyzacji polegającej na przekształceniu do odpowiednich pochodnych mogą być analizowane z zastosowaniem detekcji FL. Obecnie wiele substancji o znaczeniu diagnostycznym, leków czy toksyn można poddać analizie za pomocą detekcji FL ponieważ emitują fale świetlne po uprzednim wzbudzeniu bez derywatyzacji. Właściwość ta nie zawsze jest silnie wyrażona stąd nie zawsze pozwala na osiągnięcie wymaganych poziomów LOQ, LOD.W przypadku badań farmakokinetyki metabolitów niezwykle cenną grupę technik stanowią: HPLC-MS, IR oraz NMR. Pozwalają one na uzyskanie informacji o masie cząsteczkowej nieznanej substancji, rodzaju grup funkcyjnych jakie posiada oraz strukturze chemicznej. Najczęściej stosowane obecnie rozwiązania MS-LC dla celów analizy farmakokinetycznej to analizatory z wieloma układami kwadrupolowymi, oraz pracujące na zasadzie tzw. pułapki jonowej. Metody analityczne opracowane na potrzeby badań farmakokinetycznych podlegają procedurom oceny i opisu - procedurom walidacyjnym. Właściwą walidację metody poprzedza faza walidacji wstępnej. Po niej przygotowywana jest właściwa procedura walidacyjna metody. Dodatkowym badaniem związanym z walidacją metody analitycznej w farmakokinetyce są: badania stabilności długoterminowej, krótkoterminowej, badania stabilności roztworów wzorców oraz stabilność prób kontroli jakości stosowanych w badaniu. Ilość parametrów walidacyjnych potrzebnych do opisania metody zależy od rodzaju i zakresu prowadzonych badań dotyczy cech jakościowych i ilościowych. Walidacja metody analitycznej pozwala stwierdzić czy dwa układy badań PK mogą stanowić obiekt porównania.



Rys. Dobór systemu detekcji do właściwości analitu w badaniach farmakokinetycznych.

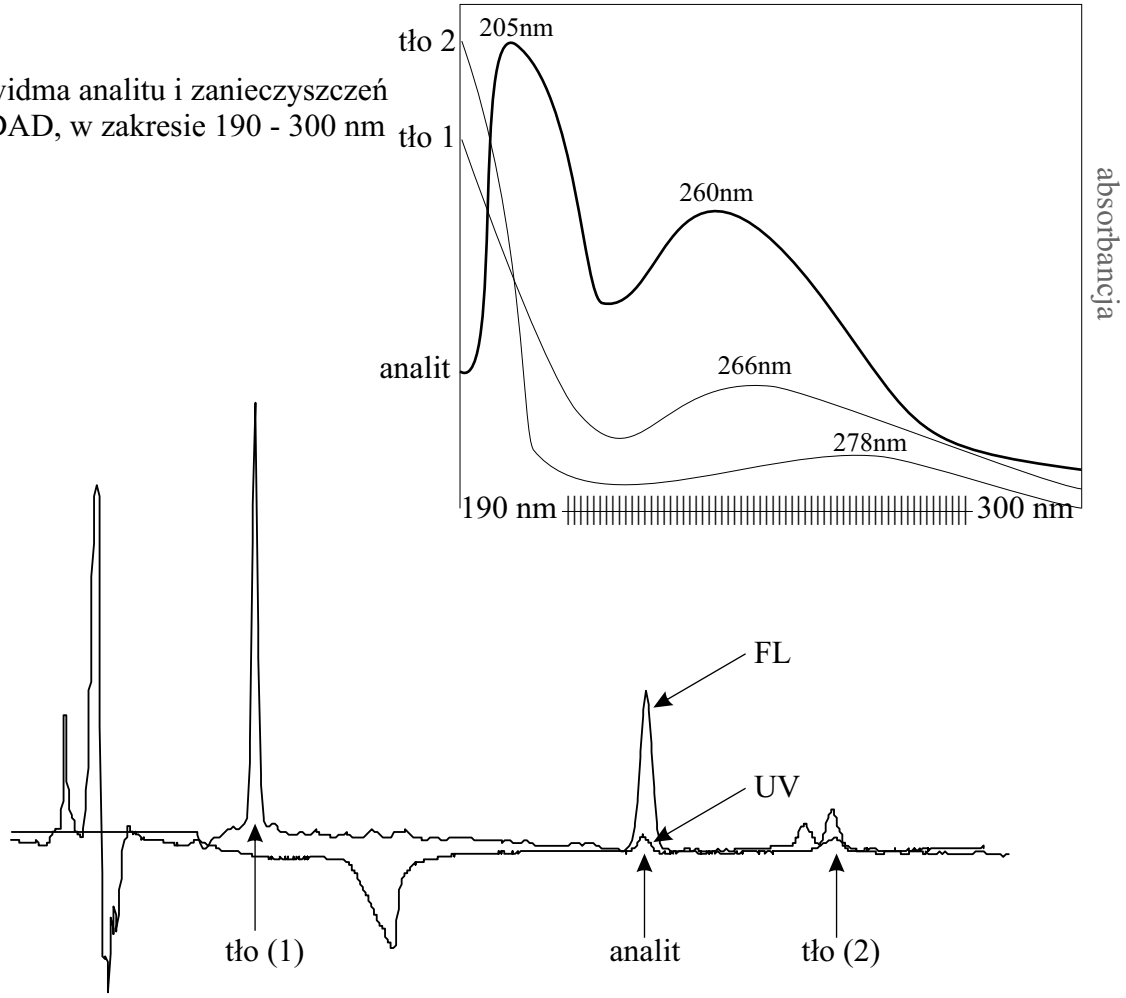


Rys. Dobór systemu detekcji i zmiany właściwości analitu (pochodne) w analityce PK.



Ryc. Chromatogramy dwóch leków poddanych analizie HPLC-UV-EC. Maksima absorpcji dla obu związków w świetle UV wynoszą ok 245 nm i przy tej długości fali prowadzono analizę. Po przejściu przez detektor UV próbka została poddana analizie na detektorze elektrochemicznym, potencjał +1.1 V. Stężenia od lewej 10 i 16 ng/ml.

Analiza widma analitu i zanieczyszczeń
HPLC - DAD, w zakresie 190 - 300 nm



Ryc. Chromatogramy leku poddanego analizie HPLC-UV-FL. Maksimum absorpcji w świetle UV wynosi ok 260 nm i przy tej długości fali prowadzono analizę.
Po przejściu przez detektor UV próbka została poddana analizie na detektorze fluorescencyjnym przy wzbudzeniu 255 nm i emisji 369 nm. Stężenie analitu 30 ng/ml.

CECHY JAKOŚCIOWE	***CECHY ILOŚCIOWE***
Granica detekcji (LOD)	Zakres roboczy
Selektywność	Zakres liniowy
Specyficzność	Granica oznaczalności (LOQ)
Odporność metody	Powtarzalność
na zmianę warunków	Odtwarzalność
	Czułość (S)
	Poprawność

Projektowanie metody analitycznej w analityce farmakokinetycznej jest działaniem dwuetapowym . Zawsze powinno rozpoczynać je dogłębne rozpoznanie literaturowe. Pierwszy etap projektowania metody obejmuje przygotowanie rozdziału chromatograficznego w oparciu o stubstancje standardowe. Drugi etap obejmuje przygotowanie próbki biologicznej do analizy. Projektowanie metody analitycznej w farmakokinetyce polega między innymi na właściwym doborze sprzętowym.

- zastosowanie aparatu (HPLC, GC etc) odpowiedniej jakości
- dobór odpowiedniego dla analitu oraz matrycy systemu lub systemów detekcji
- dobór odpowiedniej dla analitu i matrycy kolumny chromatograficznej
- parametry pracy autosamplera (temperatura)

Kolejnym etapem jest opracowanie metody oznaczania badanych substancji na wybranym oprzyrządowaniu a tu w szczególności:

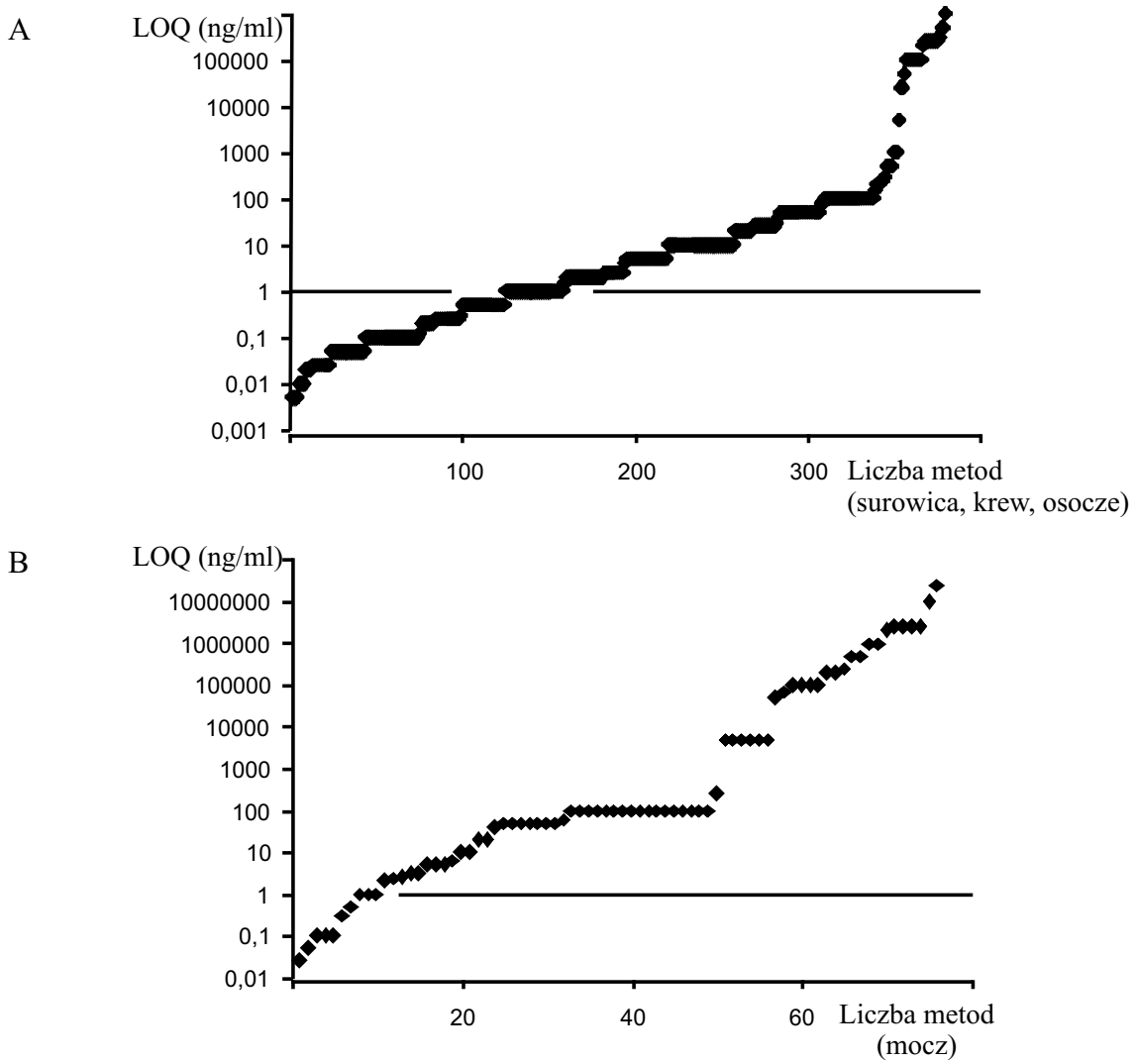
- optymalizacja składu fazy ruchomej (rozdziały izokratyczne lub gradienowe)
- optymalizacja prędkości przepływu fazy
- optymalizacja temperatury pracy kolumny chromatograficznej (gradient temperaturowy)
- optymalizacja czasu retencji badanego analitu
- optymalizacja objętości szybkości nastrzyku i stężenia (LOD, LOQ)
- określenie czasu potrzebnego do przeprowadzenia analizy
- określenie stabilności gotowej próbki w autosamplerze

Przygotowanie próbki do analizy wymaga najczęściej spełnienia odpowiednich wymagań przechowywania, zabezpieczenia analitu przed rozpadem (np. enzymatyczna hydroliza), oraz oczyszczenia.Analityk w trakcie projektowania metody określa:

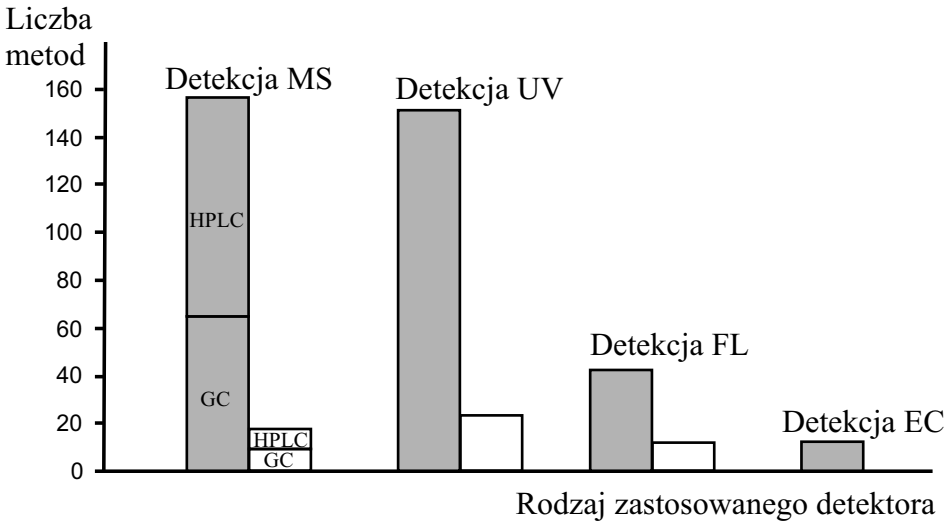
- czy oczyszczanie próbki jest wymagane
- jaką metodą oczyszczać próbkę
- jak oderwać lek od struktur białek
- jak uwolnić cząsteczki leku z tkanki lub z komórek
- jak zabezpieczyć cząsteczki leku przed rozpadem po rozmrożeniu próbki
- jaki standard wewnętrzny dobrać do analitu (podobne pH, pKa, LogP, polarność, podobny mechanizm rozdziału i sposób detekcji wybraną techniką)

Połączenie postępowania dotyczącego przygotowania próbki i metody analitycznej umożliwia końcową optymalizację metody i przygotowanie jej do fazy walidacji. Obecne trendy rozwoju technik analitycznych wykorzystywanych w farmakokinetyce zmierzają do automatyzacji przygotowywania prób do analiz. Ma to szczególne znaczenie w przypadku laboratoriów wykonujących dużą liczbę analiz z wieloma powtórzeniami. Automatyzacja ma na celu zwiększenie wydajności i zmniejszenie błędu wynikającego z udziału człowieka. Procesy analityczne zautomatyzowane w znacznym stopniu, ułatwiają osiągnięcie wymaganych dla danego typu badań parametrów walidacyjnych metody.
Automatyzacja metod dotyczy także ciągłych zmian konstrukcyjnych sprzętu analitycznego oraz jego miniaturyzacji. Związane jest to między innymi z ograniczaniem zużycia odczynników służących do przeprowadzenia analizy. Kolejne udogodnienia zmierzają do wprowadzania na rynek takich konstrukcji i rozwiązań które w znacznym stopniu skracają fazę optymalizacji przeprowadzanego rozdziału. Mają one charakter gotowych testów specyficznych dla danego związku. Analizę chromatograficzną matryc biologicznych w znacznym stopniu ułatwia oprogramowanie gwarantujące dokładne obliczenia pól powierzchni, wysokości oraz ocenę geometrii pików. Obliczenia te zwykle prowadzone są w odniesieniu do wcześniej przygotowanych krzywych standardowych wykonanych dla badanej substancji lub z zastosowaniem standardu wewnętrznego. Obecnie stosowane programy obsługujące chromatografy i dokonujące obliczeń zaopatrzone są w różnorakie metody określania pól powierzchni pików i rozbudowane narzędzia do dekonwolucji. Jednymi z bardziej zaawansowanych narzędzi informatycznych są rozwiązania umożliwiające cyfrową obróbkę chromatogramów. Pozwalają one wykonywać na uzyskanych obrazach różnego rodzaju przekształcenia ułatwiające ich ocenę.

Poddano analizie grupę 456 metod HPLC i GC wykorzystywanych przez laboratoria kontraktowe zajmujące się analizą biorównoważności i farmakokinetyki leków. W grupie tej znalazło się 380 metod oznaczania leków w osoczu krwi i surowicy oraz 76 metod oznaczania leku lub metabolitów w moczu. W grupie metod stosowanych do wykrywania leku we krwi osoczu i surowicy aż 43.3 % stanowiły metody z zastosowaniem detekcji typu MS, 41.9 % detekcja typu UV a 11, 6 % stanowiły metody HPLC-FL. Aż 41,5 % zastosowanych dla tej grupy matryc biologicznych metod wymagało LOQ na poziomie równym lub niższym 1 ng/ml. W grupie metod stosowanych do wykrywania leku w moczu 33.3 % stanowiły metody z zastosowaniem detekcji typu MS, 44.4 % detekcja typu UV a 22.2 % stanowiły metody HPLC-FL. Aż 14.5 % zastosowanych dla tej matrycy metod wymagało LOQ na poziomie równym lub niższym 1 ng/ml.



Ryc. Wartości LOQ w metodach analitycznych DMPK.
A - osocze, krew, surowica (n = 380); B - mocz (n = 76).



Ryc. Udział poszczególnych systemów detekcji w metodach analitycznych DMPK (n = 456).
Pola ciemne - osocze, krew, surowica; pola jasne - mocz.

Spektrometria mas w analizie DMPK.

Spektrometria mas MS (ang.: *Mass Spectrometry*) zajmuje szczególne miejsce wśród metod detekcji leku i ich metabolitów. Ma szczególne znaczenie dla jakości obliczeń i analiz toksykokinetycznych. Wynikiem analizy za pomocą spektrometru mas jest sygnał którego charakterystykę określa stosunek sygnał/szum. Sygnał ten odpowiada masie cząsteczkowej związku MW i pozwala na analizę jakościową i ilościową. Możliwość posługiwania się wartością MW umożliwia precyzyjną identyfikację zarówno leku jak i metabolitów. Jak wiadomo masa cząsteczkowa metabolitów zmienia się w zależności od tego jakim procesom metabolicznym lek uległ w organizmie. Spadek masy towarzyszy zwykle reakcjom metabolicznym I fazy. Niewielki wzrost masy do ok. 32 Da również może towarzyszyć reakcjom metabolicznym I fazy. Wzrost masy ponad 42 Da towarzyszy zwykle reakcjom metabolicznym II fazy. Zmiana masy cząsteczkowej podyktowana jest reakcjami które mają zwykle za cel zmianę charakterystyki fizykochemicznej związku wyjściowego. Podstawowym celem jest przemiana związku do pochodnej - metabolitu o właściwościach polarnych i hydrofilnych.

Zmiana MW (Da):	Proces metaboliczny:	Faza metaboliczna:	Dotyczy grup funkcyjnych:
- 43.9898	dekarboksylacja	FI	
- 42.0471	3 x demetylacja	FI	
- 28.0314	2 x demetylacja	FI	
- 15.9949	dehydroksylacja	FI	
- 14.0157	demetylacja	FI	
- 12.0365	oksydacja + 2 x demetylacja	FI/FI	
- 2.0157	alkohol do ketonu (redukcja)	FI	
+ 1.9792	oksydacja + demetylacja	FI/FI	
+ 2.0157	redukcja	FI	
+ 14.0157	metylacja	FII	-OH; NH2
+ 15.9949	oksydacja (+O)	FI	
+ 15.9949	hydroksylacja (-H;+OH)	FI	
+ 15.9949	epoksydacja (-H;+OH)	FI	
+ 30.0106	metylacja + oksydacja	FII/FI	
+ 31.9898	2 x hydroksylacja	FI	
+ 42.0106	acetylacja	FII	-NH2;-SO2NH2; -OH
+ 47.9847	3 x hydroksylacja	FI	
+ 57.0215	koniugacja - glicyna	FII	-COOH
+ 70	łączenie z kwasem pirogronowym		
+ 79.9568	sulfatacja	FII	-NH2;-SO2NH2; -OH
+ 103.0092	koniugacja - cysteina	FII	-COOH
+ 107.0041	koniugacja - tauryna	FII	-COOH
+ 119.0041	koniugacja - S cysteina	FII	-COOH
+ 148.0007	glukuronidacja + 2 x demetylacja	FII/FI	
+ 162.0164	glukuronidacja + demetylacja	FII/FI	
+ 162.155	koniugacja - glukoza	FII	
+ 163.9956	glukuronidacja + oksydacja + 2 x demetylacja	FII/FI/FI	
+ 176.0321	glukuronidacja	FII	- OH; -COOH; -NH2; -SH
+ 178.0113	glukuronidacja + oksydacja + demetylacja	FII/FI/FI	
+ 192.0270	glukuronidacja + oksydacja	FII/FI	
+ 289.0732	koniugacja - glutation	FII	epoksydy; halidy
+ 305.0682	koniugacja - S glutation	FII	
+ 352.0642	glukuronidacja x 2	FII	

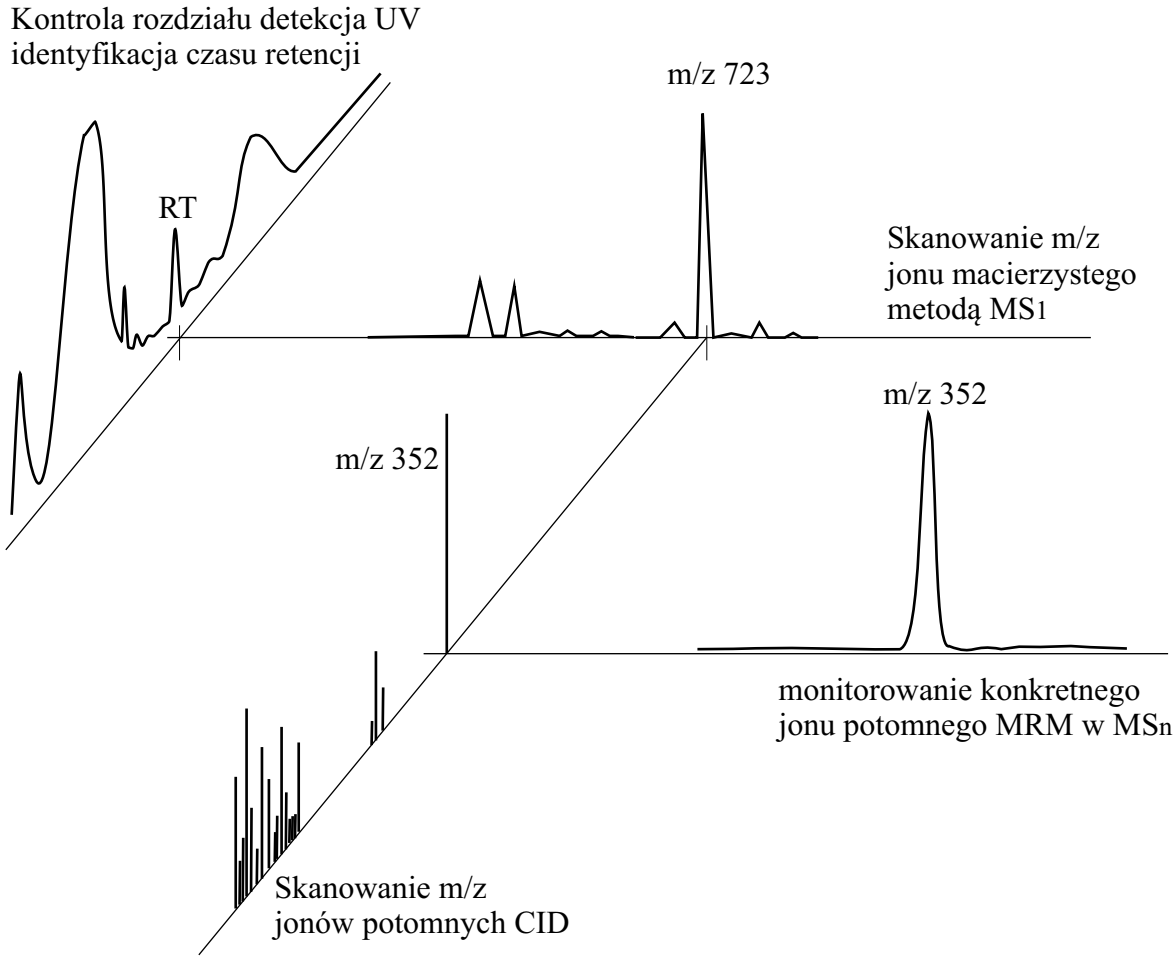
Ryc. Przykłady zmian masy cząsteczkowej metabolitu w stosunku do substancji macierzystej (leku) w zależności od rodzaju przemiany metabolicznej jakiej ulega lek.

Spektrometria mas jest obecnie najczęściej stosowaną techniką detekcji leku i jego metabolitów w tkankach wydzielinach, wydalinach, płynach fizjologicznych etc.. Dzięki niezwykle dużej selektywności i specyficzności pomiaru pozwala skutecznie unikać zafałszowań wyniku analizy chemicznej związanych z wpływem matrycy. Główne kierunki stosowania technik detekcji typu MS w farmakokinetyce to:

- szybka analiza parametrów topologicznych kandydatów na leki w ramach SAR
- analiza stężeń leku w badaniach PK, PK/PD, TK, TK/TD etc
- identyfikacja metabolitów leków
- symulacja procesów metabolicznych fazy pierwszej (oksydacja, redukcja) metodą EC / MS
- analiza i projektowanie produktów przemian leków typu *pro - drug*
- analiza stężeń leku w ramach TDM (ang.: *Therapeutic Drug Monitoring*)
- metabolomika, *fingerprint* metaboliczny

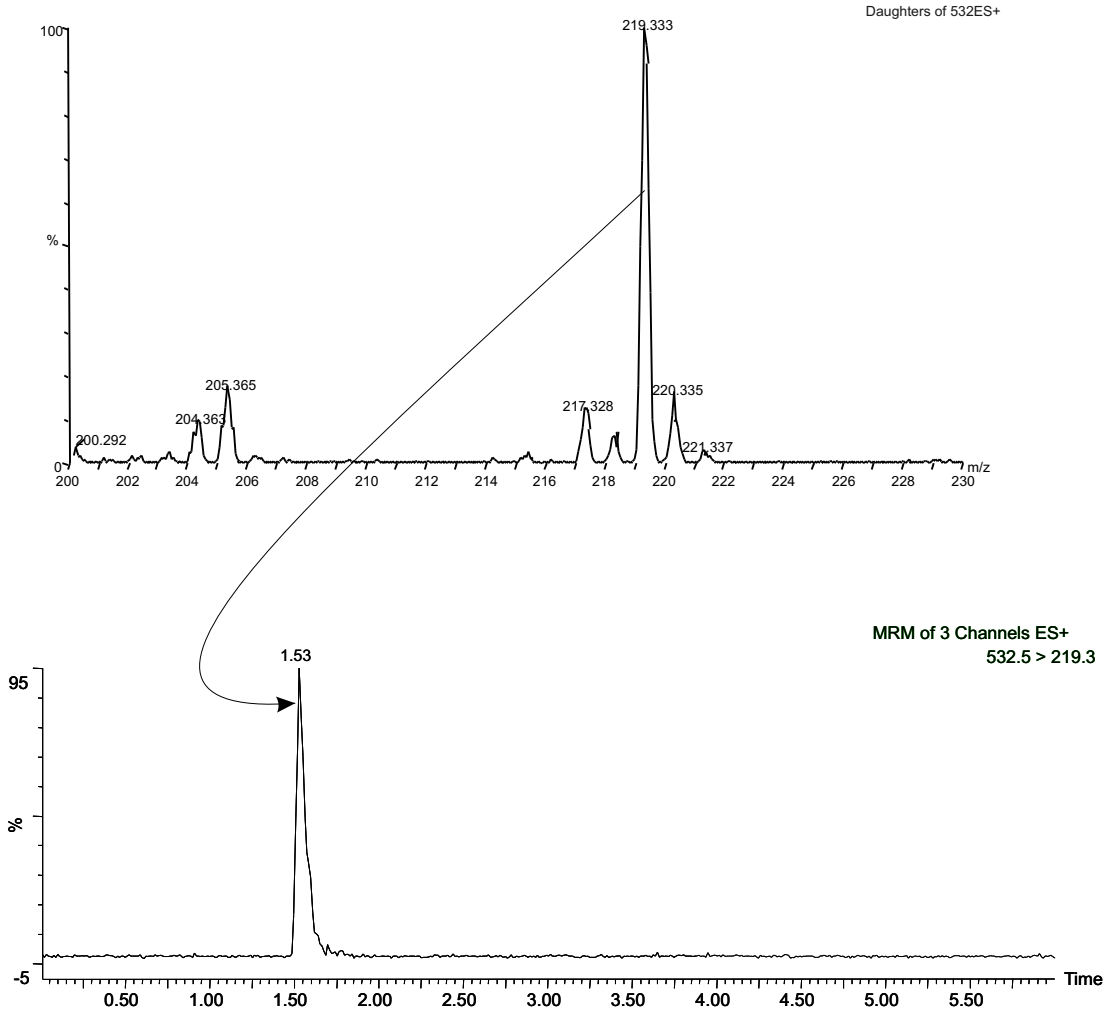
Ogromne możliwości zastosowania spektrometrii mas w analizie DMPK to zasługa selektywności i specyficzności metod MS. Możliwości te wzrastają dzięki stosowaniu różnych metod analizy MS takich jak na przykład:

- rozpad aktywowany kolizją CID (ang.: *Collision Induced Dissociation*)
- monitorowanie tworzenia jonów metastabilnych MRM (ang.: *Metastable Reaction Monitoring*)



Ryc. Typowy sposób selekcji wybranych jonow potomnych (MRM)
w analizie metodą MS/MS.

A



Ryc. Skan jonów potomnych powstałych po rozpadzie związku macierzystego(532.5 Da; kolizja z argonem) w zakresie mas od 200 do 230 daltonów (A), końcowy chromatogram uzyskany na detektorze MS/MS w trybie MRM - rejestracja jonu potomnego (stężenie 7 ng/ml osocza) o masie 209.3 Da. Metoda jonizacji elektrosprej dodatni (ESI+).

Jakość metody analitycznej w farmakokinetyce.

Użycie określonej metody zawsze przekłada się na jakość wykonanych na tej podstawie obliczeń farmakokinetycznych. Im większa jest asymetria piku tym większa jest groźba popełnienia błędu przy obliczaniu podstawowych parametrów farmakokinetycznych na przykład AUC. W celu samodzielnego obliczenia pola powierzchni piku na podstawie jego wysokości można użyć wzoru:

$$P = 0.5 \times W_{0.5h} \times h$$

P - pole piku
W0.5h - szerokość piku w połowie jego wysokości
h - wysokość piku

Błąd przeprowadzonych w ten sposób obliczeń wynosi ok. 6.1%.
Dla pików niesymetrycznych wykorzystać można metodę Condala-Boscha i wykorzystać formułę:

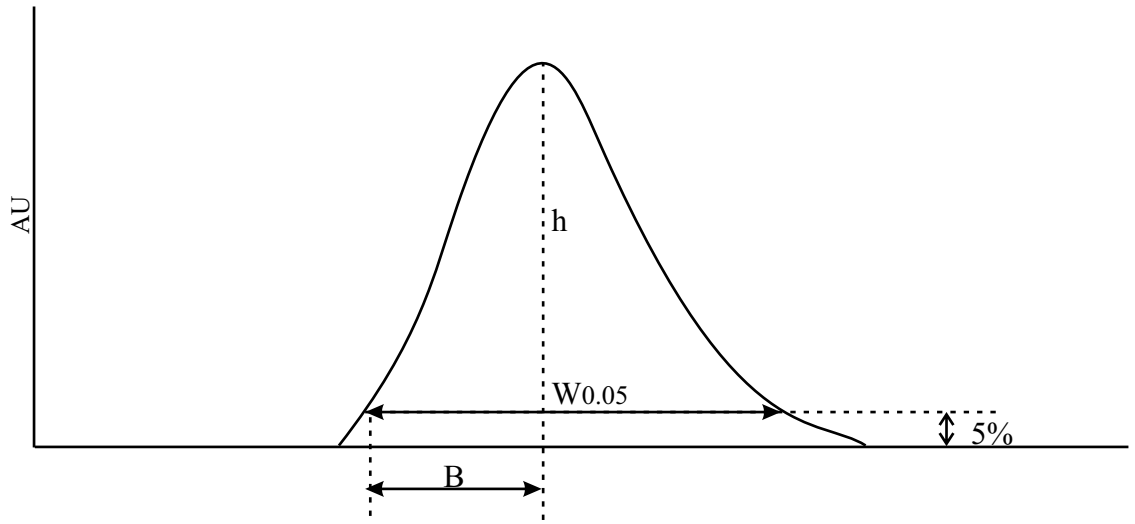
$$P = [(W_{0.15h} + W_{0.85h}) / 2] \times h$$

P - pole piku
W0.15h - szerokość piku w punkcie 15 % jego wysokości
W0.85h - szerokość piku w punkcie 85 % jego wysokości
h - wysokość piku

Błąd przeprowadzonych w ten sposób obliczeń wynosi ok. 0.5% (Kocjan R. 2000). Dość częstym problemem w trakcie optymalizowania metod chromatografii cieczowej (HPLC) jest tzw. “ogonowanie” piku. Zjawisko to polega na asymetrii piku dotyczącej najczęściej prawego stoku chromatogramu. Obecnie można kwalifikować pik posiadający cechy asymetrii i określać go jako właściwy lub nie do dalszych etapów przygotowywania metody analizy leku. Asymetria pików wprowadza znaczny błąd w obliczenia pola powierzchni chromatogramów a co za tym idzie błąd obliczeń farmakokinetycznych. Problem jest poważny w przypadku wysokich stężeń ("ogon" buduje zbyt dużą wartość stężenia), jak i stężeń małych bliskich LOD lub LOQ ("ogon" stanowi znaczny procent piku). Do opisu współczynnika symetrii można posłużyć się wzorem:

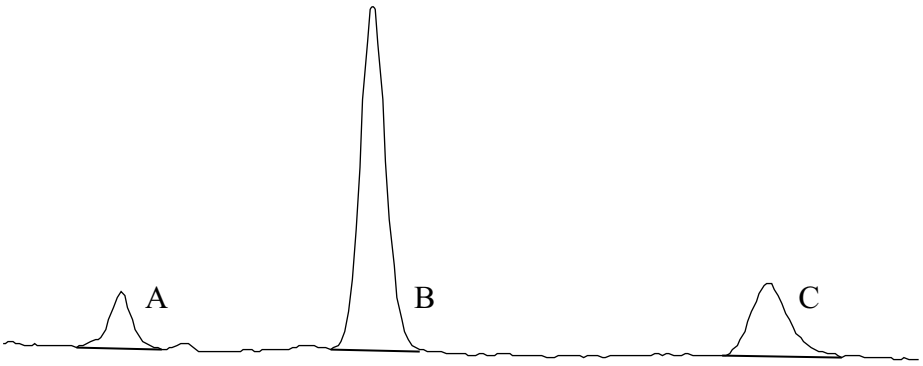
$$T = W_{0.05h} / (2 \times B)$$

W0.05h - szerokość piku na wysokości 5 % od jego podstawy
B - szerokość piku na wysokości 5 % od jego podstawy i stoku do osi symetrii
T - współczynnik symetrii



Rys. Pik asymetryczny i sposób wyznaczenia współczynnika asymetrii

O tym jaki procent błędu jest akceptowany dla danej substancji leczniczej oraz metody decydują monografie szczegółowe (USF NF 1995;USF NF 2002). Aby określić przydatność danej metody analitycznej w badaniach skomplikowanych matryc biologicznych, jakimi są tkanki należy ocenić metodę najczęściej w zakresie wytyczonym przez uzyskane parametry farmakokinetyczne. Jednym z ważniejszych wskaźników charakteryzujących metodę analityczną jest jej liniowość określona w granicach stężeń leku jakie spodziewane są w danym przypadku oznaczać. Parametry jakościowe piku analizowanego analitu obrazują najdokładniej, złożone obliczenia wykonywane przez oprogramowanie sterujące danym systemem badawczym w ramach systemu sprawdzania odpowiedniości - SST (ang.: *System Suitability Test*).



	A		**B**		**C**
Czas retencji:	3.35		4.47		6.24
Pole piku:	504.59		3449.46		1103.16
Wysokość piku:	70.15		431.32		92.13
Współczynnik podziału pików:	2.35		3.47		5.24
Rozdzielczość:		5.90		6.86	
Współczynnik ogonowania (T):	0.94		1.06		1.34
Liczba półek teoretycznych (N):	5421		6862		6423

Ryc. Przykład realnej analizy jakości trzech pików z wykorzystaniem parametrów obliczanych w ramach SST.

Jednym z podstawowych parametrów oceny wartości rozdziału chromatograficznego jest liczba półek teoretycznych. Pozwala porównywać wyniki analiz i zmian dokonywanych w układzie LC na etapie przygotowywania metody bioanalitycznej. Pozwala także kontrolować jakość rozdziału w trakcie przeprowadzania większej liczby rozdziałów.

$$N = F \times (RT / W)^2$$

F - współczynnik równy	5.54	(Farmakopea Europejska) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	50 % wysokości piku
F - współczynnik równy	5.55	(Farmakopea Japońska) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	50 % wysokości piku
F - współczynnik równy	16	(Farmakopea US) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	61 % wysokości piku
F - współczynnik równy	16	(Równanie 4 Sigma) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	13.4 % wysokości piku
F - współczynnik równy	25	(Równanie 5 Sigma) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	4.4 % wysokości piku
F - współczynnik równy	9	(Równanie 3 Sigma) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	32.4 % wysokości piku
F - współczynnik równy	4	(Równanie 2 Sigma) oraz W - szerokość piku na wysokości równej	60.7 % wysokości piku

lub w metodzie opartej na analizie asymetrii piku :

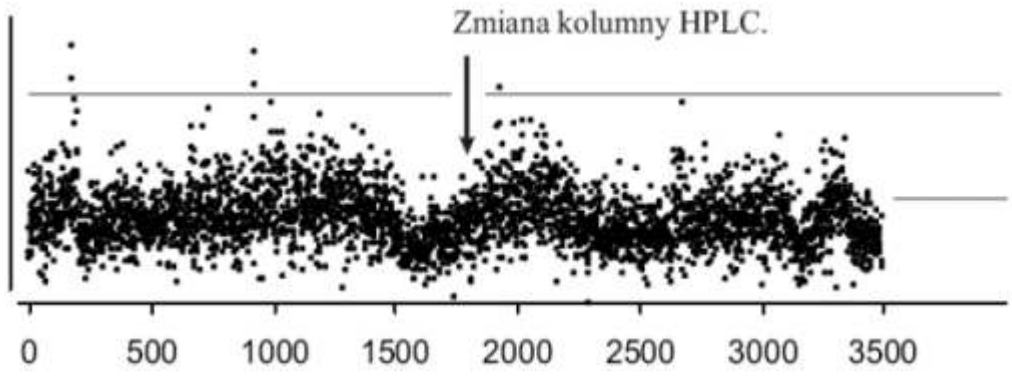
$$N = [F \times (RT / W)^2] / [(A / B) + 1.25)]$$

W - szerokość piku na wysokości 10 % wysokości piku
A - czas końca piku - RT
B - RT - czas początku piku
RT - czas retencji piku
N - liczba półek teoretycznych

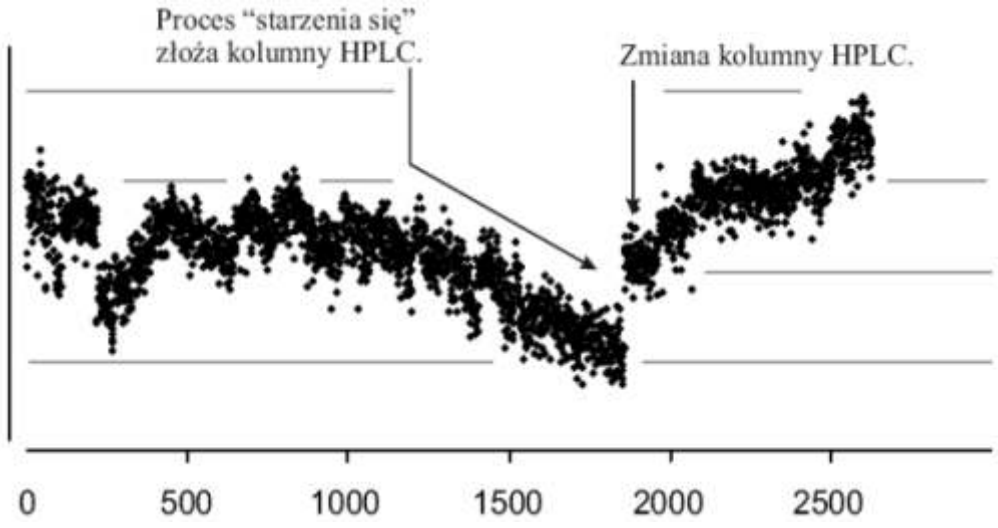
W farmakokinetyce granice liniowości metody powinny obejmować zakres stężenia maksymalnego oraz minimalnego leku. Parametrami tymi są - Co, Cmax oraz Clast. Na tym etapie opracowywania metody analitycznej oraz projektowania badań klinicznych splatają się ze sobą parametry oceny metody analitycznej oraz parametry farmakokinetyczne. Stężenia maksymalne jakie uzyskiwane są podczas przeprowadzanych w ramach badań farmakokinetycznych eksperymentów są do pewnego stopnia elementem kontrolnym służącym optymalizacji układu analityka - doświadczenie -obliczenia. Wspólny wymiar dla obu zakresów działania, analitycznego i doświadczalnego w prowadzonych obliczeniach ma resztkowe pole powierzchni.

Standard wewnętrzny w analityce PK:

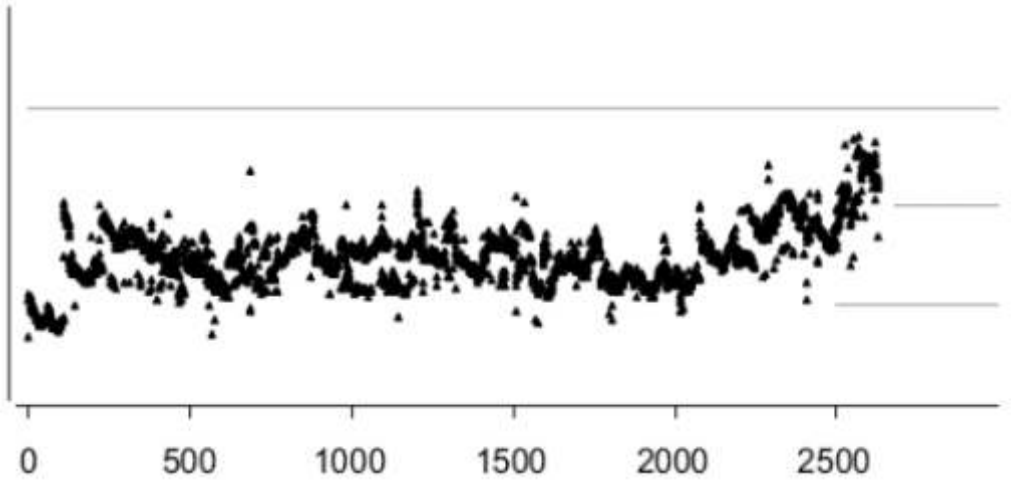
Jednym ze sposobów na ciągłe monitorowanie ewentualnego błędu w fazie analitycznej badań PK jest stosowanie standardu wewnętrznego - IS (ang.: *Internal Standard*). Standard wewnętrzny jest najczęściej homologiem, znakowanym analitem lub substancją zbliżoną chemicznie do oznaczanego leku. Nie jest to jednak regułą. Najważniejszą cechą standardu wewnętrznego nie jest podobieństwo struktury. Nie zapewnia to podobnych właściwości fizykochemicznych. Często okazuje się iż standard wewnętrzny jest substancją zupełnie różną od badanego analitu po względem struktury jednak podobnie zachowuje się w trakcie ekstrakcji analitu oraz oczyszczania próbki, wykazuje podobną retencję w układzie analitycznym. Standard wewnętrzny zabezpiecza pod względem jakościowym przebieg analiz PK z uwagi na uczestnictwo we wszystkich fazach przygotowywania próbki aż do analizy oraz uczestniczy i jest punktem odniesienia w samej analizie chemicznej. Monitorowanie zachowania się standardu wewnętrznego w trakcie prowadzenia serii analiz DMPK umożliwia śledzenie ewentualnych zmian w układzie analitycznym (aparatura; przygotowanie próbki etc.). IS podlega tak jak każdy inny analit procedurze sprawdzania odpowiedniości jednak nie jest to jedyna możliwość jego kontroli dotycząca jakości przeprowadzanego eksperymentu.



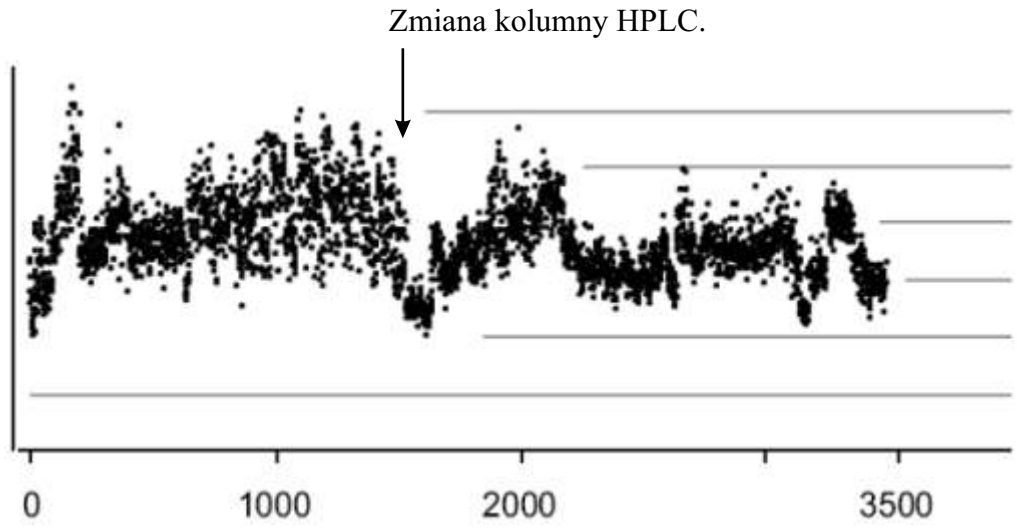
Ryc.: Analiza HPLC - ESI - MS/MS. Stosunek sygnał / szum dla 3.5 tys. analiz IS.



Ryc.: Analiza HPLC - ESI - MS/MS. Stosunek wysokość piku / pole powierzchni piku dla 2.7 tys. analiz IS.



Ryc.: Analiza HPLC - ESI - MS/MS. Szum linni podstawowej 2.7 tys. analiz IS.



Ryc.: Analiza HPLC - ESI - MS/MS. Pole powierzchni piku IS 3.5 tys. analiz.

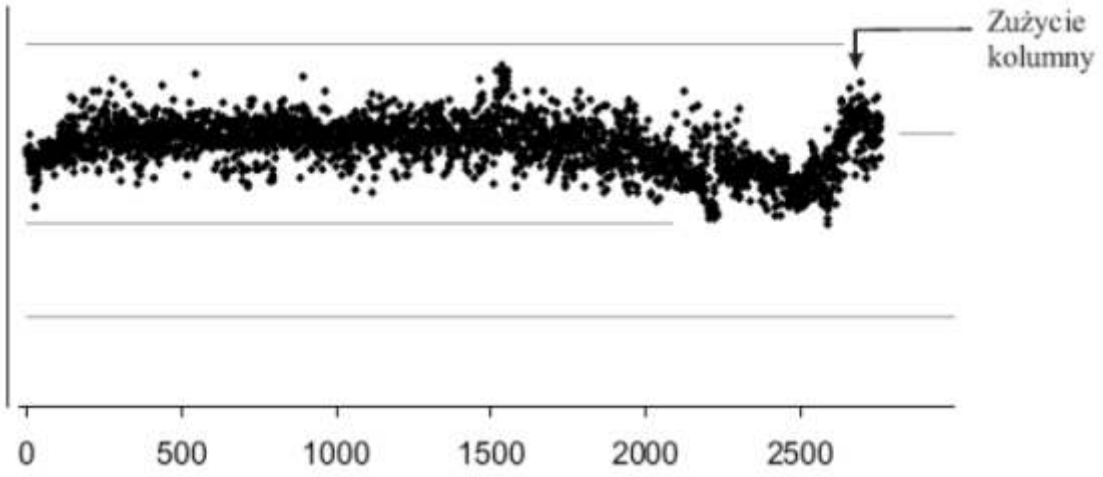
Nie każdy z analizowanych parametrów opisujących zachowanie się IS w dużych seriach analiz w badaniach DMPK niesie ze sobą równie dużą liczbę informacji. Szczególnie jeśli ma stanowić podstawę do opisu lub śledzenia jakości prowadzonych badań.

Najważniejsze cechy optymalnie dobranego standardu wewnętrznego w analityce PK:

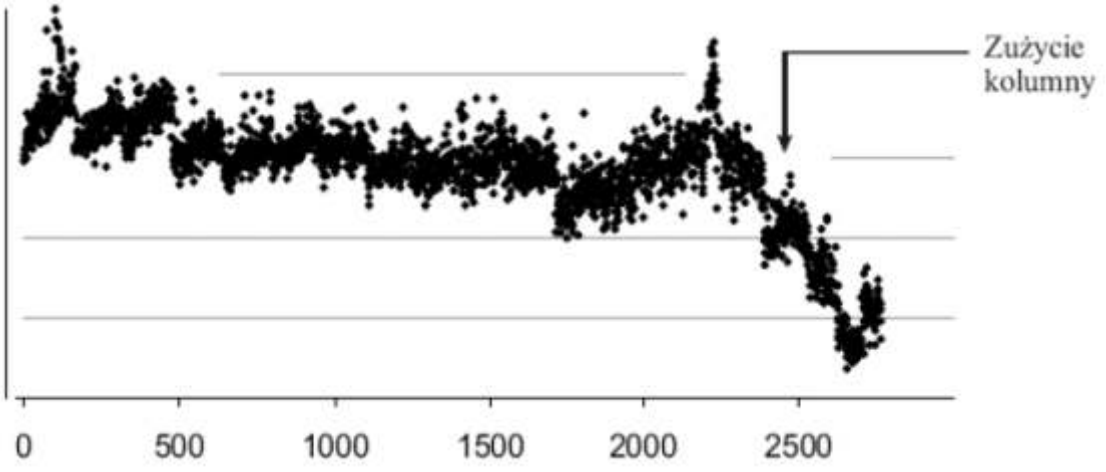
- odpowiedź w tych samych warunkach pracy detektora co analit
- podobna (lecz nie identyczna) wartość LogP
- podobna (lecz nie identyczna) wartość pKa
- podobne zachowanie w trakcie ekstrakcji LLC lub oczyszczania SPE lub PP
- zbliżona stabilność
- w przypadku analiz typu MRM na detektorach MS/MS często pożądany jest rozpad jonu macierzystego IS na fragmenty podobne do fragmentów uzyskanych po rozpadzie cząsteczek analitu.

Najczęściej popełniane błędy w trakcie doboru IS w analityce PK:

- odpowiedź dla IS w tych samych warunkach pracy detektora co analit jest wielokrotnie niższa (tendencja powinna być odwrotna)
- identyczna wartość LogP (może skutkować przy podobnym pKa identyczną retencją, co w klasycznych systemach detekcji wyklucza możliwość zastosowania)
- identyczna wartość pKa (j.w.)
- zdecydowanie różne od analitu zachowanie się IS w trakcie ekstrakcji LLC lub oczyszczania SPE (bardzo niski i różny w stosunku do analitu odzysk z ekstrakcji)
- niska lub różna od analitu wartość stabilności (w autosamplerze, w trakcie prowadzenia serii analiz, w cyklach mrożenia)
- w przypadku analiz na detektorach MS/MS ewentualna supresja tworzenia jonów badanego analitu przez jony IS (łatwe do potwierdzenia lub wykluczenia doświadczalnie).
- w przypadku stosowania dużych stężeń IS na detektorach MS/MS możliwość przenoszenia przez autosampler IS do kolejnej próbki (łatwe do potwierdzenia lub wykluczenia doświadczalnie).



Ryc.: Analiza EC-HPLC. Wzrost wartości współczynnika ogonowania (ang.: *tailing factor*) piku IS 2.7 tys. analiz.



Ryc.: Analiza EC-HPLC. Spadek liczby półek teoretycznych (USP) piku IS 2.7 tys. analiz.

Jakość projektu badania w podstawowych doświadczeniach PK.

Wspólny wymiar analizie chemicznej i projektowi badania klinicznego nadaje resztkowe pole powierzchni. Parametr ten jest zależny zarówno od charakteru i przebiegu fazy eliminacji leku jak i jakości prowadzonych analiz oraz dopasowania projektu doświadczalnego do charakteru leku (ilość i interwał pobierania prób do analiz). Pole resztkowe jest parametrem, który uzależniony jest zarówno od czułości metody jak i rozplanowania punktów próbkowania w analizie PK. Wskaźnik charakteryzujący metodę analityczną jakim jest czułość - S (ang.: *Sensitivity*) określa wartość tangensa kąta krzywej kalibracyjnej w stosunku do osi X. Dla wartości kąta 45^0 S = 1. Czułość metody określa się dla danego przedziału stężeń.

$$\mathbf{S = tg\ \alpha}$$

Znajomość czułości metody pozwala na obliczenie granicy wykrywalności - LOD (ang.: *Limit of Detection; Limit of Decision; Limit of Determination; Minimum Detectable Net Concentration*) i granicy oznaczalności - LOQ (ang.: *Limit of Quantitation; Limit of Quantification; Quantification Limit ; Limit of Reporting*) w metodzie.

$$\mathbf{LOD = 3.3\ x\ \sigma\ /\ S} \qquad \mathbf{LOQ = 10\ x\ s\ /\ S}$$

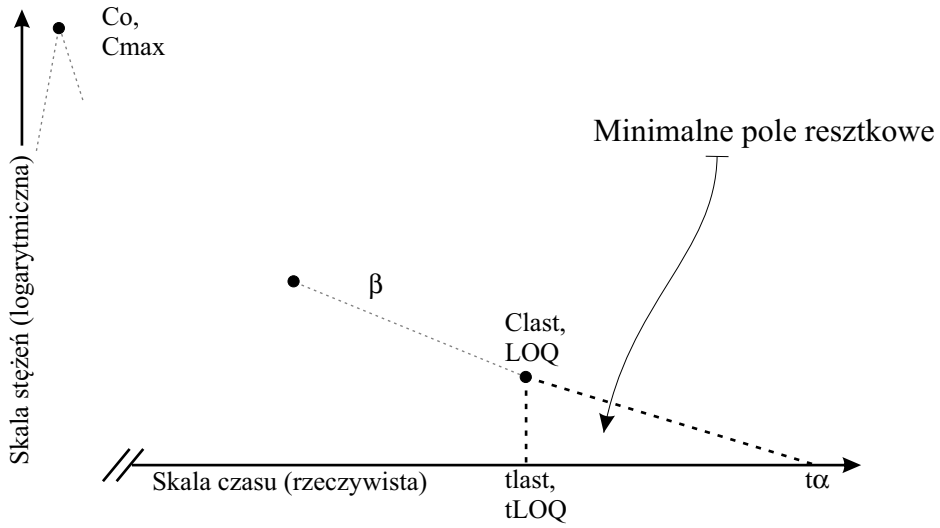
Określając oba parametry należy posłużyć się znajomością średniej wartości szumów (σ) i czułością (S). Granica oznaczalności powinna swoją wartością być zbliżona do wartości Clast czyli ostatniego stężenia jakie zarejestrowano w trakcie analizy krzywej zależności stężenie / czas. Spełnienie takiego założenia prowadzi do uzyskania resztkowego pola powierzchni o najmniejszej możliwej do uzyskania wartości dla wybranej techniki analitycznej. Najmniejsze zatem pole powierzchni resztkowe jakie można uzyskać w planowanym doświadczeniu równe jest:

$$\mathbf{AUC_{(resztkowe\ min.)} = LOQ\ /\ \beta}$$

gdzie

$$\mathbf{t_{LOQ} = t\alpha + (Ln\ LOQ\ /\ \beta)}$$

β - stała szybkości eliminacji (kel)



Rys. Związek pomiędzy granicą oznaczalności a wartością pola resztkowego.

W przypadku prowadzenia badań biorównoważności leków pole powierzchni pod krzywą w granicach od t = 0 do tlast czasami określa się jako $AUC_{(0\text{-}LOQ)}$ (FDA,CVM 2000). Obecnie przepisy FDA dopuszczają wartość pola resztkowego na poziomie 20%. Stosunek wartości pola resztkowego do pola $AUC_{(0\text{-}a)}$ stosowany jest dla podania jednorazowego a $AUC_{(0\text{-}t)}$ dla wielokrotnego. Dalej porównywany jest do wartości pola $AUC_{(0\text{-}LOQ)}$ co wyraża zależność:

$$\mathbf{AUC_{(0\text{-}t)} / AUC_{(0\text{-}\alpha)} < 0.8} \qquad \text{jeżeli tlast} < 72 \text{ h}$$

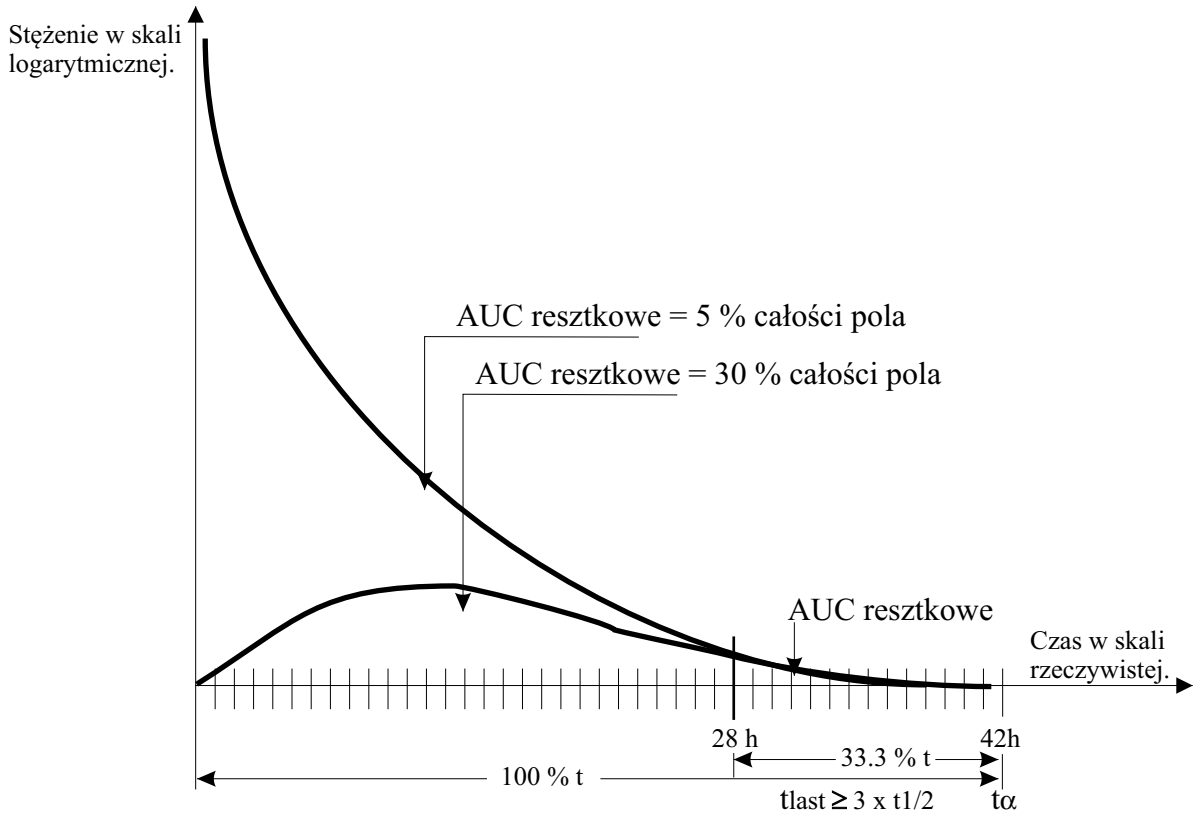
$$\mathbf{AUC_{(0\text{-}t)} / AUC_{(0\text{-}\alpha)} \geq 0.8} \qquad \text{jeżeli tlast} > 72 \text{ h}$$

Pole resztkowe może stanowić wartość która pozwoli na porównanie jakościowe dwóch analogicznych eksperymentów. Pozwala stwierdzić czy wyniki eksperymentów w postaci parametrów farmakokinetycznych mogą zostać porównane. Wynik porównania określa podobieństwo w jakości przeprowadzonych eksperymentów - Z. W tym celu można wykorzystać równania analogiczne do służących do obliczania dostępności biologicznej. Jednak wartości pól powierzchni powinny być wyrażone jako część całości obliczonego pola w procentach.

$$\mathbf{Z = (AUC_{(o\text{-}t)A} \times AUC_{(rem)A}) / (AUC_{(o\text{-}t)B} \times AUC_{(rem)B})}$$

Jeżeli istnieje możliwość wykonania błędnego porównania ze względu na różnice w szybkości stałej eliminacji to powinna ona zostać ujęta we wzorach.

$$\mathbf{Z = (AUC_{(o\text{-}t)A} \times AUC_{(rem)A} \times \beta_B) / (AUC_{(o\text{-}t)B} \times AUC_{(rem)B} \times \beta_A)}$$



Rys. Rola ta w ocenie rozkładu punktów pomiarowych i analizy ilościowej leku w próbkach.

Pole resztkowe nie jest jednak jedynym wskaźnikiem właściwie zaprojektowanego schematu doświadczenia. Nie jest również najlepszym środkiem do oceny dwóch eksperymentów służących badaniom porównawczym na przykład badaniu biodostępności leku. Dla dwóch krzywych o takiej samej charakterystyce fazy eliminacji kończących się w tym samym punkcie czasowym Clast, pole to ma różne znaczenie. Dla krzywej dla podania donaczyniowego w przypadku znacznej wartości AUC(0-Clast) wartość pola resztkowego będzie niewielka i z powodzeniem zakwalifikuje badania do kolejnych etapów obliczeń. Dla krzywej tego samego leku o tej samej charakterystyce fazy eliminacji uzyskanej w drodze podania pozanaczyniowego i niewielkiej wartości Cmax oraz dużej tlag pole resztkowe może stanowić zbyt duży procent wartości AUC(0-Clast). To z kolei może dyskwalifikować badania mimo identycznej metody analitycznej. Resztkowe pole powierzchni jest parametrem zależnym od wartości Cmax lub Co. Pola resztkowe jako sposób oceny zależny jest od drogi podania leku nie jest więc obiektywnym narzędziem tego typu analizy. Obiektywną oceną za pomocą resztkowego pola powierzchni jest jedynie porównanie dwóch układów doświadczalnych charakteryzujących się brakiem różnic w drodze podania, dawce (ew. niewielkie różnice), oraz wartości tlast.

Parametrem który ocenia dwa układy doświadczalne w sposób obiektywny jest tα. tα to hipotetyczny punkt czasowy jaki wyznacza końcowy fragment krzywej obrazującej proces eliminacji w wyniku przecięcia z osią czasu. Znając wartość pola resztkowego można obliczyć tα korzystając z wzoru:

$$t\alpha = [(2 \times AUC(rem)) / Clast] + tlast$$

tα - hipotetyczny punkt przecięcia krzywej C-T z osią czasu w fazie eliminacji
AUC(rem) - resztkowe pole powierzchni
Clast - ostatnie stężenie jakie zanotowano w ostatniej pobranej próbie
tlast - czas pobrania ostatniej próby

Różnica miedzy tα a tlast daje odpowiedź na pytanie jaki udział procentowy w zaplanowanym eksperymencie od zera do tα stanowi ta różnica. Wartość ta niezmiennie oceniać będzie całą krzywą bez względu na jej kształt, drogę podania, niezależnie od Cmax lub Co. Rola pola resztkowego jako narzędzia oceny jest znaczna. Jednak generowane jest ono głównie poprzez wartości związane ze stężeniem w określonym punkcie a nie czasem. Należy zauważyć że wartości stężeń zależne są od dawki i często różnice wartości sięgają od części ng do setek mg zależnie od drogi podania. Zmienność po stronie projektowania odcinków czasowych dla właściwego scharakteryzowania leku jest znacznie mniejsza i sięga od kilkunastu, 24 godzin do 36, 72 godzin. Jest to podyktowane wartością okresu półtrwania leków (dla podania jednorazowego) które dla klasycznych leków wahają się zwykle od kilku do kilkunastu godzin. Stąd obiektywizm takiej oceny jest znacznie większy. Przyjmuje się że pełny opis profilu farmakokinetycznego dla jednorazowego podania leku dotyczy okresu równego lub większego od trzech okresów półtrwania leku. W sytuacji takiej stężenie leku w punkcie Clast wynosi 12.5 % (około 1/10) stężenia Cmax. Oznacza to że:

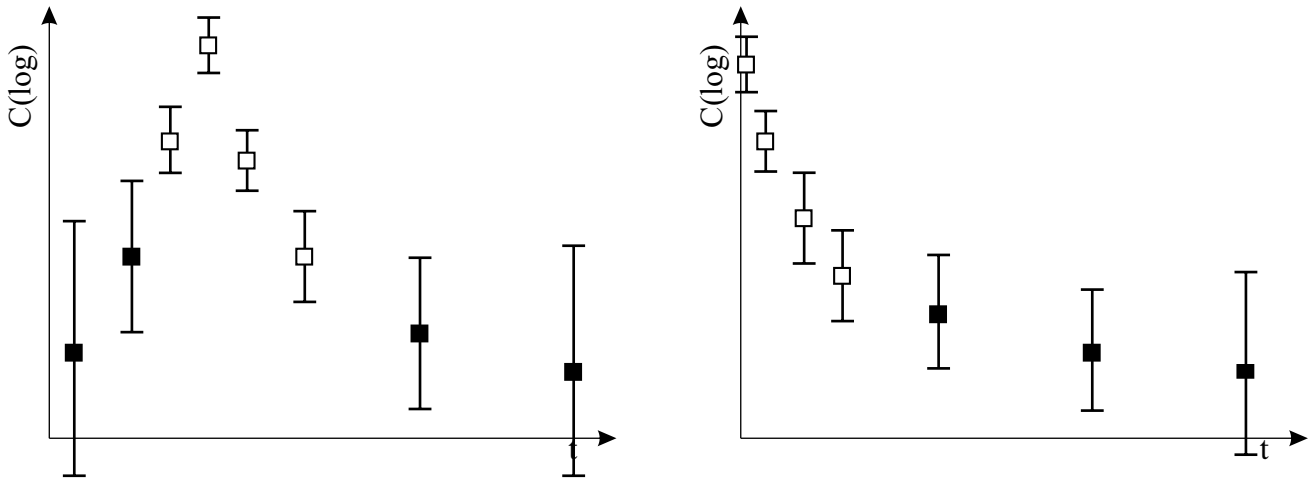
$$tlast \leq 3 \times t_{1/2} \quad \text{stąd}$$

$$Clast \leq Cmax / 10$$

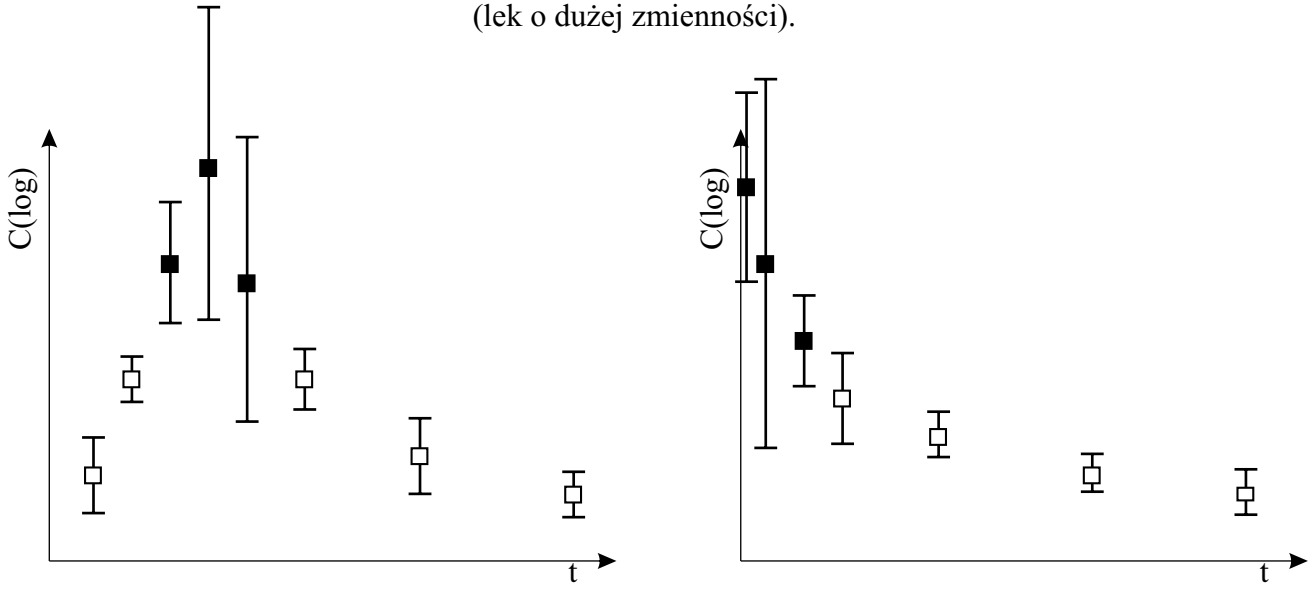
Stałą szybkości eliminacji powinien charakteryzować fragment krzywej położony przynajmniej w odległości równej 1.44 x t1/2kel od punktu t = 0. Natomiast pole resztkowe powinno być równe lub mniejsze od wartości pola całkowitego podzielonego przez 5 (20 %), stąd:

$$AUC(resztkowe) \leq AUC(całkowite) / 5$$

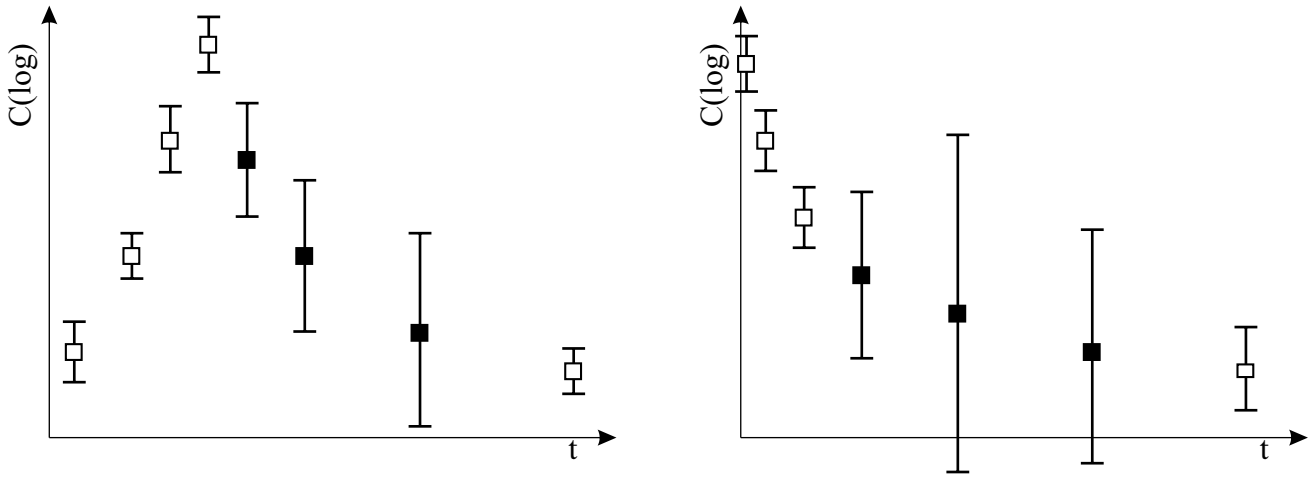
Metoda analityczna zastosowana w przeprowadzanym badaniu parametrów farmakokinetycznych musi spełnić wymagania walidacji - oceny metody. W przypadku metod źle ocenionych lub pozbawionych takiej oceny efekt przeprowadzonego badania może być wątpliwy lub obarczony znacznym błędem.



Rys. Duże wartości RSD% dla poszczególnych stężeń (C-T) generowane źle zoptymalizowaną metodą analityczną lub różnicami w fazie wchłaniania i/lub eliminacji (lek o dużej zmienności).

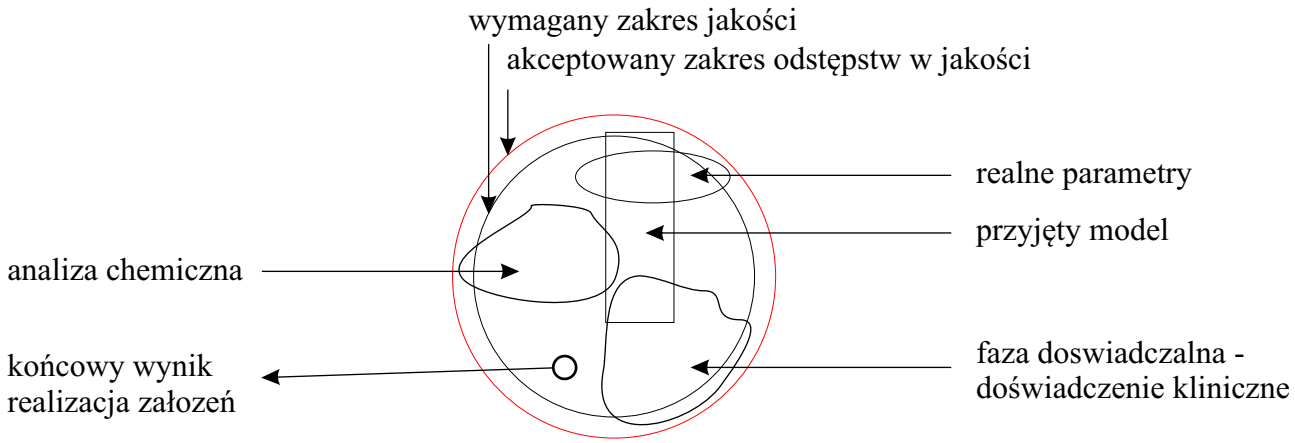


Rys. Duże wartości RSD% dla poszczególnych stężeń (C-T) generowane dużą zmiennością Cmax lub Co, lub źle dobranymi punktami poboru prób.



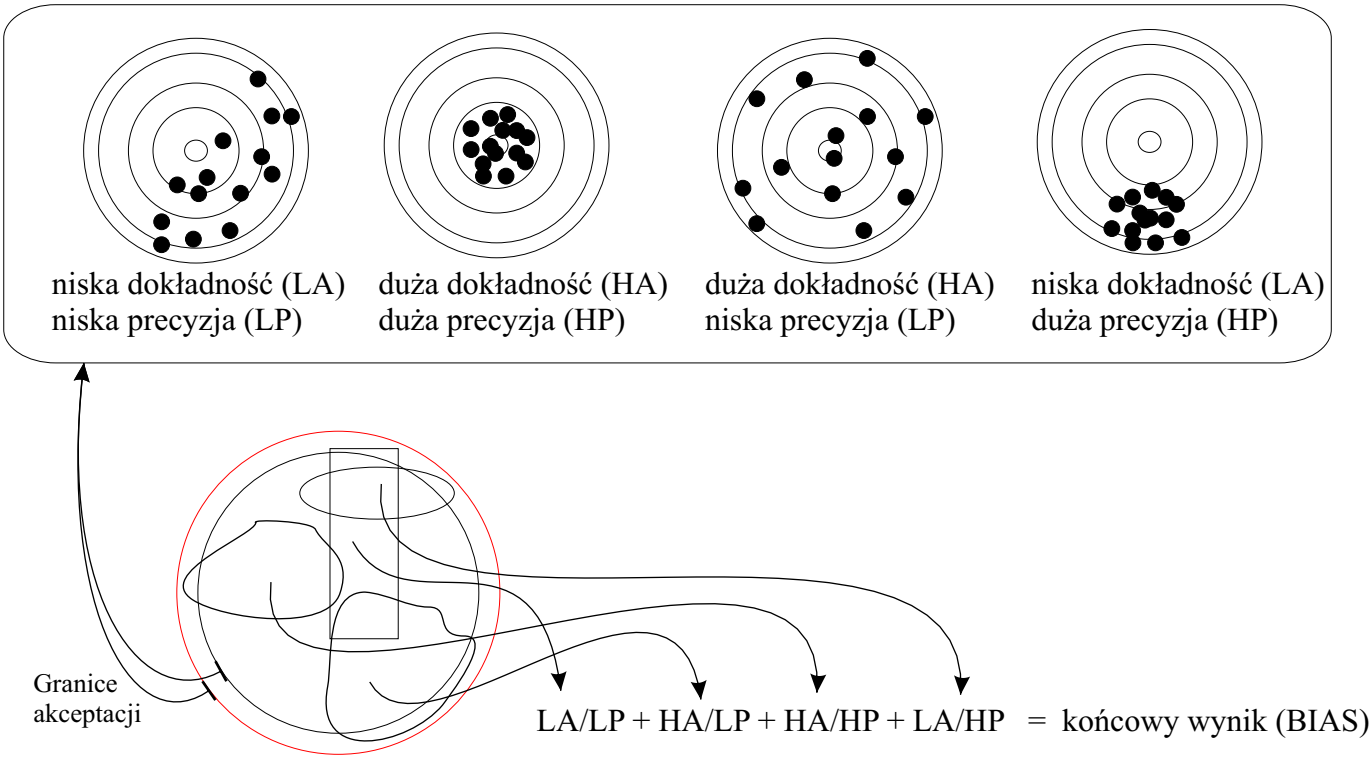
Rys. Duże wartości RSD% dla poszczególnych stężeń (C-T) generowane zmiennością w badanej grupie (krążenie wątrobowo jelitowe).

Jakość doświadczeń mających na celu określenie parametrów farmakokinetycznych jest wypadkową zapewnienia jakości w kilku różnych obszarach. Metoda analityczna jest tylko jednym z nich, kolejnym jest model obliczeniowy i jego dobór, metodyka i sposób wykonania obliczeń PK oraz sposób zaprojektowania i wykonania doświadczenia klinicznego. Wszystkie te etapy w trakcie badań farmakokinetycznych podlegają ocenie jakości przeprowadzenia analiz i doświadczeń oraz celowości i zasadności doboru modeli oprogramowania itd.. Ocena ta dla prawidłowo przeprowadzonego doświadczenia nie powinna wychodzić poza obszar akceptowalnych różnic i odchyleń dla wszystkich etapów.



Ryc. Zapewnienie i analiza kontroli jakości w doświadczeniach PK.

W stosunku do każdego z wymienionych wyżej działań / etapów analizy PK, w ramach przyjętych kryteriów akceptacji podstawowymi pojęciami zapewniającymi utrzymanie i kontrolę jakości są dokładność (ang.: *Accuracy*) i precyzja (ang.: *Precision*).



Ryc. Sumaryczna analiza dokładności i precyzji składowych analizy PK.

Znając wartość zmienności kinetyki leku (wcześniej prowadzone badania) można zaplanować bezpieczną wartość LLOQ (ang.: *lower Limit of Quantitation*) oraz HLOQ (ang.: *Higher Limit of Quantitation*). Rozszerzenie tych wartości należy przeprowadzić po to aby zmienność wartości stężeń notowanych w tkankach nie spowodowała wykroczenia niektórych punktów stężenia poza krzywą kalibracyjną stąd:

Dla leków o wysokiej zmienności PK (RSD > 30%):

HLOQ ≥ Cmax / 0.3 **LLOQ ≤ Clast x 0.3**

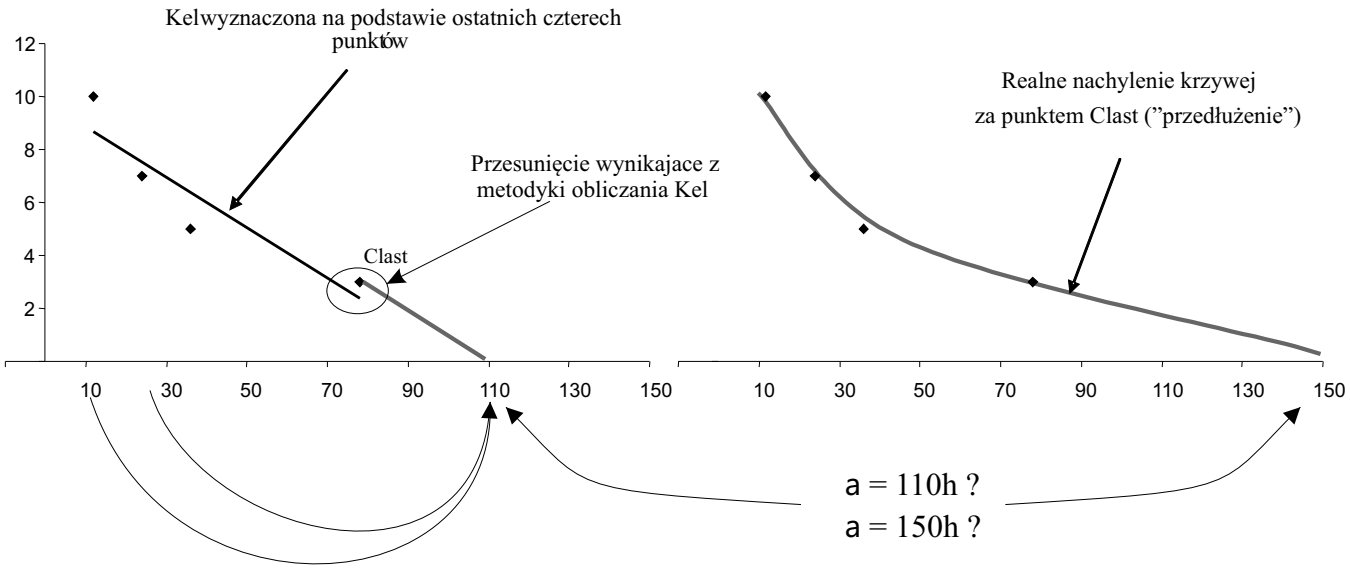
Dla leków o niskiej zmienności PK (RSD < 30%):

HLOQ ≥ Cmax / 0.7 **LLOQ ≤ Clast x 0.7**

Wartość pola resztkowego nie jest najlepszym parametrem oceny przebiegu zarówno badania klinicznego jak i analizy stężenia leku w tkance. Zwyczajowo zwykło się charakteryzować prostą ograniczającą pole resztkowe jako "przedłużenie" krzywej w fazie eliminacji. Nie jest to jednak zgodne z praktyką wyznaczania nachylenia krzywej w fazie eliminacji (wyznaczania stałej szybkości eliminacji). Obecnie wartość tą wyznacza się na podstawie analizy 3 do 5 punktów C-T metodą ważenia. Stąd obliczone nachylenie nie jest przedłużeniem krzywej lecz wypadkową analizy procesów eliminacji i często również dystrybucji. Krzywa ograniczająca pole resztkowe nie jest zatem "przedłużeniem" krzywej w fazie eliminacji w znaczeniu geometrii analitycznej. Jest wynikiem ekstrapolacji lub przeniesienia obliczonego nachylenia na punkt Clast co definiuje ten parametr jako twór zupełnie nie odzwierciedlający realnych procesów jakim lek ulega w organizmie. W wielu wypadkach wyznaczanie stałej szybkości eliminacji rozpoczyna się jeszcze w punktach C-T w 12 czy 24 godzinie po podaniu leku. Natomiast punkt przecięcia krzywej ograniczającej pole resztkowe z osią czasu wypada nierzadko po stu i więcej godzinach. W takiej "odległości" od podania leku (sto i więcej godzin) trudno definiować lub przewidywać charakter kinetyki leku na podstawie danych płynących z punktu C-T położonego na dziesięciokrotnie nieraz krótszym odcinku krzywej.

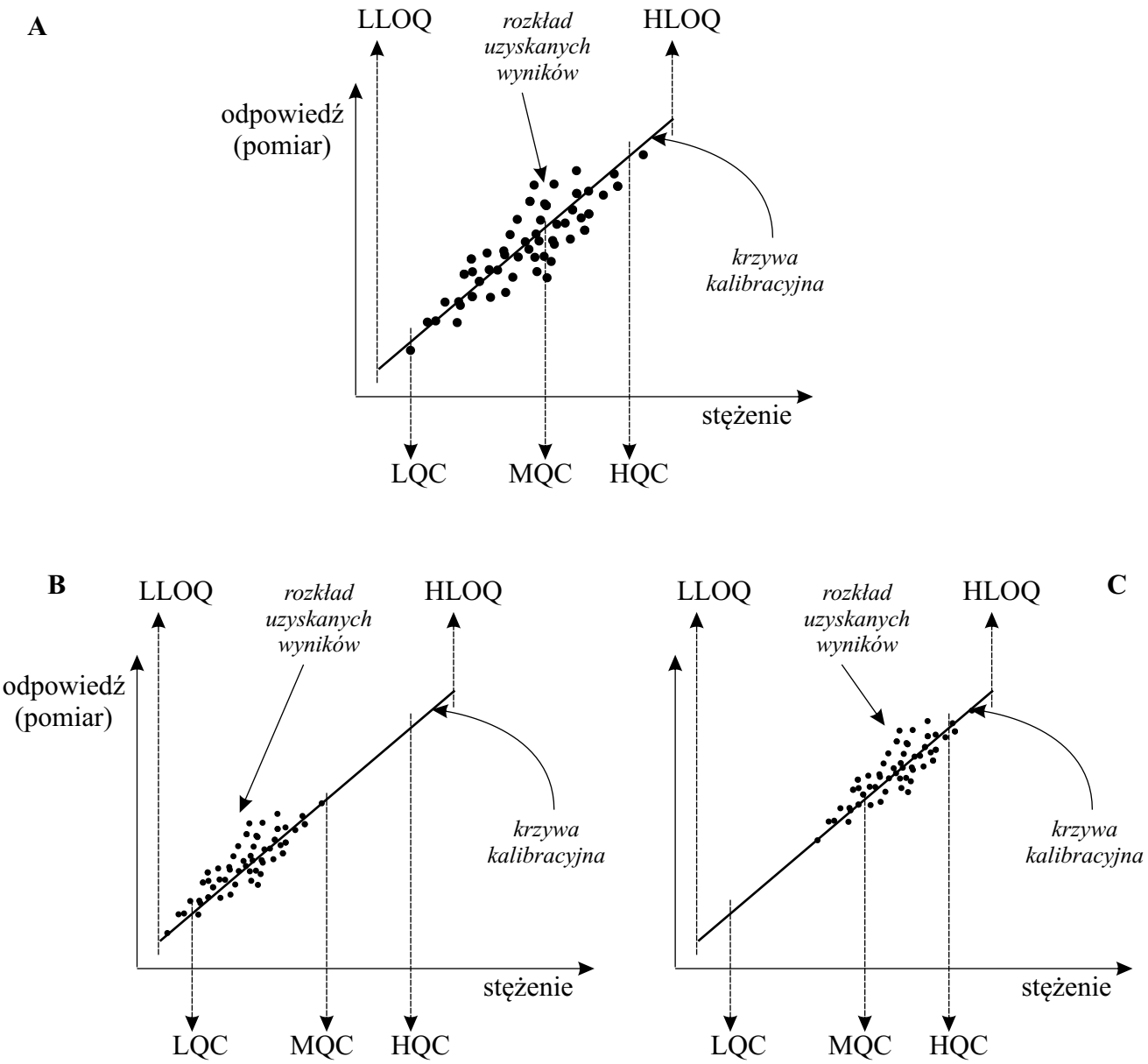
Przykład:

C:	10	7	5	3
T:	12	24	36	72

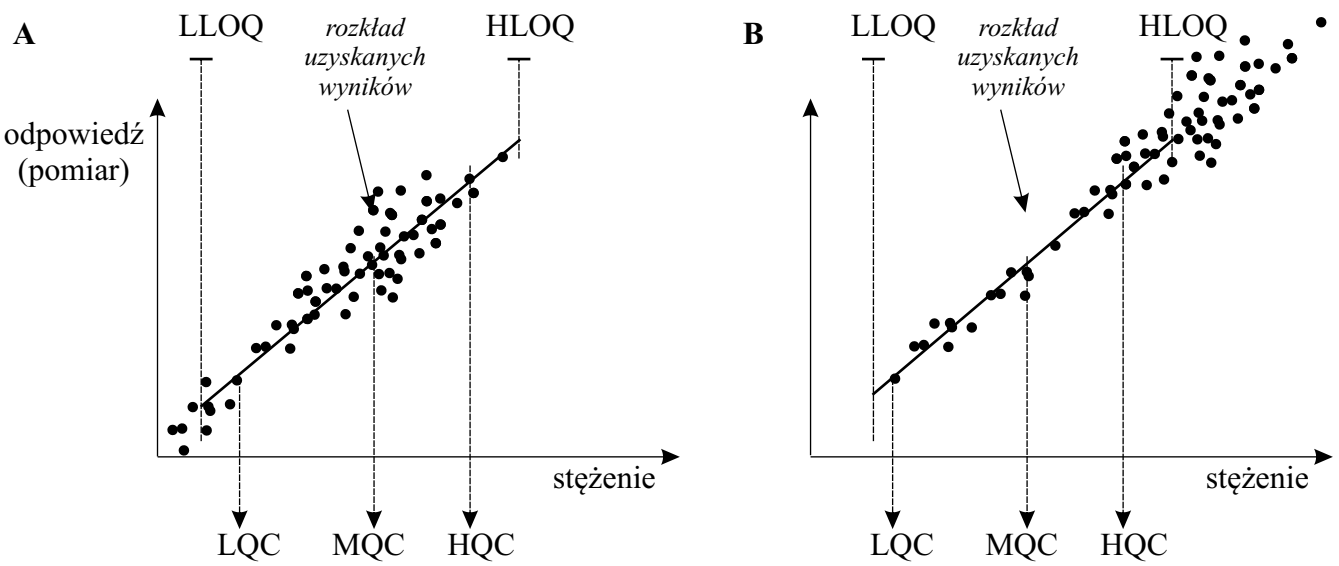


Ryc. Odcinek pomiędzy 12 a 24 godziną od podania nie może dokładnie opisywać kinetyki leku 90 godzin później.

Optymalizacja HLOQ oraz LLOQ czyli zakresu krzywej kalibracyjnej w analityce PK sytuuje w analizie również punkty kontroli jakości QC. Zakres stężeń dla tych punktów zwykle obejmuje stężenie poniżej HLOQ stężenie zbliżone do centralnej wartości krzywej kalibracyjnej oraz stężenie nieco wyższe od LLOQ. Stąd w analityce PK wymagane są co najmniej trzy punkty kontroli jakości Low QC, Medium QC, High QC. Prawidłowe określenie zakresu krzywej kalibracyjnej pozwala więc na optymalne wytyczenie wartości prób kontroli jakości. Te z kolei swoim zasięgiem będą w sposób proporcjonalny obejmować wszystkie oznaczane stężenia leku.

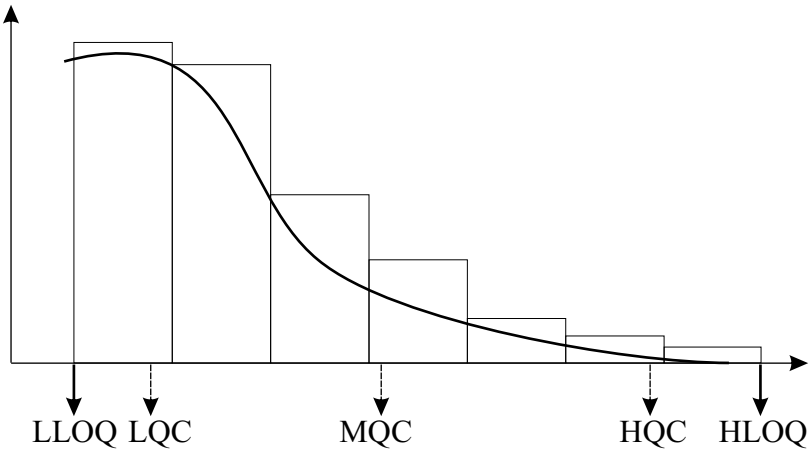


Ryc. Optymalizacja zakresu krzywej kalibracyjnej oraz punktów kontroli jakości w badaniach PK.
A - zakres krzywej kalibracyjnej oraz rozkład stężeń prób kontroli jakości odzwierciedla rozkład analizowanych stężeń - układ jest zoptymalizowany.
B- zakres krzywej kalibracyjnej oraz rozkład stężeń prób kontroli nie odzwierciedla rozkładu analizowanych stężeń MQC i HQC znajdują się poza zakresem analizowanych stężeń.
C- zakres krzywej kalibracyjnej oraz rozkład stężeń prób kontroli nie odzwierciedla rozkładu analizowanych stężeń LQC znajduje się poza zakresem analizowanych stężeń.



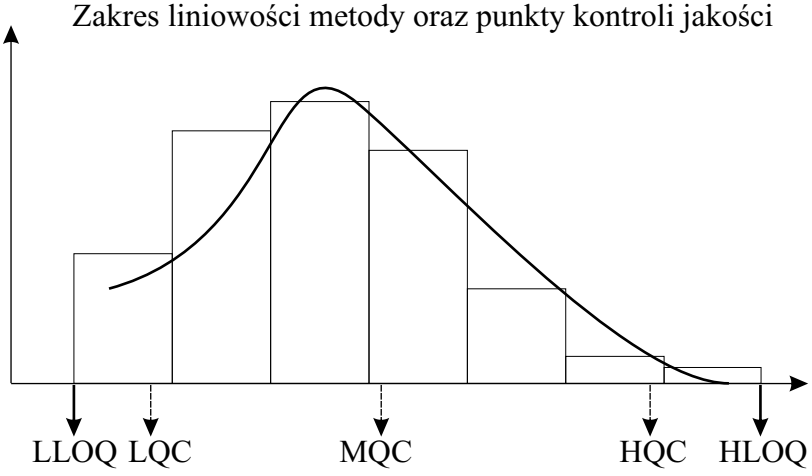
Ryc. Optymalizacja zakresu krzywej kalibracyjnej (LLOQ-HLOQ)w badaniach PK.
A - zakres krzywej kalibracyjnej oraz rozkład stężeń prób kontroli jakości nie obejmuje szeregu prób poniżej LLOQ. LLOQ ma zbyt wysoką wartość. B- zakres krzywej kalibracyjnej oraz rozkład stężeń prób kontroli jakości nie obejmuje szeregu prób powyżej HLOQ. HLOQ ma zbyt niską wartość.

Liczba analiz odpowiadających stężeniem poszczególnym fragmentom krzywej kalibracyjnej w analizach PK z przewagą liczby niskich stężeń (np. jednorazowe podanie doustne z długim tlag).



Zakres liniowości metody oraz punkty kontroli jakości

Liczba analiz odpowiadających stężeniem poszczególnym fragmentom krzywej kalibracyjnej w analizach PK z przewagą liczby wysokich stężeń (np. jednorazowe podanie postaci leku o przedłużonym uwalnianiu).



Zakres liniowości metody oraz punkty kontroli jakości

Ryc. Związek między typem analizy PK a analizą jakości metody analitycznej.

Koszty w projektowaniu metod bioanalitycznych:

Ocena kosztów metod bioanalitycznych zależna jest od wielu czynników związanych nie tylko z analityką. Koszt analiz zależny jest również od rodzaju analizy PK. Inaczej kształtują się koszty metod analitycznych stosowanych np w ramach terapii monitorowanej stężeniem leku, inaczej w przypadku opisania profilu PK jednego leku w wąskiej grupie doświadczalnej, a inaczej w przypadku badań biorównoważności leku. Jednym z czynników decydujących o kosztach jest także standard pracy laboratorium potwierdzony odpowiednimi certyfikatami. Analizy w laboratoriach certyfikowanych zwykle są droższe z uwagi na dużą liczbę podjętych w czasie kwalifikacji laboratorium zobowiązań sprzętowych dokumentacyjnych, jakościowych etc.. Zakres prac w laboratoriach zajmujących się analizami leków w matrycy biologicznej jest bardzo szeroki. Dotyczy wiec różnej skali liczby przeprowadzanych analiz

Czynniki wpływające na koszty:	Wzrost kosztów:	Obniżenie kosztów:
Jakość substancji referencyjnych i stosowanych odczynników:	Wysoka jakość stosowanych odczynników podnosi koszty analiz.	
Liczba oznaczanych analitów:	Analiza kilku substancji wobec standardu wewnętrznego, znacznie podnosi koszty.	Analiza pojedynczej substancji wobec krzywej standardowej, obniża koszty.
Granica oznaczalności - LOQ i zakres liniowosci:	Niskie wartości LOQ i szeroki zakres liniowości metody zwykle zwiększa koszty analiz.	Wysoka wartość LOQ i wąski zakres liniowości metody zmniejsza koszty analiz.
Liczba próbek:	Niewielkie serie analiz przy pełnej walidacji metody, podnoszą koszty.	Duże serie próbek obniżają koszty pojedynczej analizy.
Czas przygotowania jednej serii analiz (maksymalne wypełnienie autosamplera) / czas wykonania analiz:	Metody w których czas przygotowania serii prób > 5 h a wykonania analiz > 24 h zwiększają koszty.	
Typ analizowanej matrycy:	Bogate pod względem chemicznym matryce zwiększają koszty.	
Derywatyzacja:	Konieczność tworzenia pochodnych zwiększa koszty.	
Techniki oczyszczania matryc biologicznych:	Stosowanie metod typu SPE zwykle podnosi koszty analiz.	
Typ detekcji:	Bardzo specyficzne i selektywne detektory obniżają koszty analiz	
Jakość sprzętu analitycznego:	Wysoka jakość sprzętu analitycznego zwykle obniża koszty analiz.	
Standard laboratorium:	Koszt analiz w laboratoriach certyfikowanych zwykle jest wyższy.	

Ryc. Czynniki wpływające na koszty analiz matryc biologicznych.

Laboratoria bioanalityczne typu TDM (ang.: *Therapeutic Drug Monitoring*) - Laboratoria takie wykonują analizy niewielkich serii prób korzystając niejednokrotnie z szybkich gotowych testów. Przeprowadzają zwykle od kilku do kilkudziesięciu analiz dziennie.

Laboratoria bioanalityczne typu DMPK (ang.: *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*) - Laboratoria takie wykonują analizy dużych serii prób korzystając zwykle z opracowanych i zwalidowanych przez siebie metod. Przeprowadzają zwykle od kilkudziesięciu do kilkuset analiz dziennie.

Laboratoria bioanalityczne typu HTS (ang.: *High Troughput Screening*) - Laboratoria takie wykonują analizy bardzo dużych serii prób korzystając również z opracowanych i zwalidowanych przez siebie metod. Zwykle analizy przeprowadzane są z użyciem metod *96 well* i detekcji MS/MS. Przeprowadzają zwykle powyżej kilku tysięcy analiz dziennie.

System dobrej praktyki laboratoryjnej w analizie DMPK:

System jakości GLP (ang.: *Good Laboratory Practice; DPL - dobra praktyka laboratoryjna*) powstał w celu weryfikowania badań naukowych. Niska jakość badań prowadzonych w USA w latach 70 tych doprowadziła do uruchomienia prac nad powstaniem systemu. W latach 1976-78 inspektorzy FDA przeprowadzili pierwszą kontrolę pilotażową w 98 laboratoriach w Europie i USA która była jednym z pierwszych etapów wprowadzania systemu w życie. Podstawowym założeniem GLP jest takie prowadzenie badań oraz taka ich organizacja która umożliwia pełne odtworzenie powtórzenie i weryfikację wszystkich uzyskanych danych i wyników w dowolnym momencie po zakończeniu badania. Wiąże się to w praktyce z prowadzeniem rozległej i dokładnej dokumentacji ilustrującej każdy etap prowadzonych badań. System w równym stopniu obejmuje prace w zakresie farmakokinetyki leku przeznaczonego dla człowieka jak i farmakokinetyki leków weterynaryjnych. W chwili obecnej wiele dyrektyw oraz przewodników zawiera informacje o zakresie stosowania systemu i wymogach jego stosowania. Jednak większość obecnych zapisów nie precyzuje bezwzględnego wymogu stosowania systemu w opisywanych badaniach. W większości dokumentów zapisy definiują stosowanie systemu słowami "powinien", "zgodnie z" etc. etc..

... should be followed ....
... should be conducted according to ...
... preferred ...
... in compliance with ...
... consistent with the principles ...
...would be conducted in compliance with...
...will be performed in a manner consistent with...

Pojedyncze dokumenty opisują stosowanie systemu GLP w sposób precyzyjny możliwy do jednoznacznej interpretacji.

... must be performed ...

Taki sposób formułowania dyrektyw agencyjnych pomimo upływu ponad 30 lat od momentu rozpoczęcia prac nad systemem GLP nadal daje możliwość niejednoznacznej interpretacji większości stworzonych dotychczas zapisów. Do dzisiaj żadna z dyrektyw agencji tworzących podstawy polityki jakości dla badań farmakokinetycznych nie zapisała precyzyjnej definicji zakresu stosowania GLP z użyciem formuły o certyfikowanym laboratorium GLP - "*GLP certified Test Facilities*" w znaczeniu przyjętym przez OECD. Tak niejednoznaczne definiowanie miejsca przeprowadzenia badań niejednoznacznie rozdziela termin zgodnie z GLP z terminem w ramach sytemu GLP.

GLP = Dobra Praktyka + Dobra Praktyka

Prowadzenia Badań Naukowych **Zarządzania Badaniami**

Definicja: Good Laboratory Practices. Accredited Technical Training Worldwide, CfPA The Center for Professional Advancement, Amsterdam 2007

W systemie GLP pracuje każda jednostka która taki system wdrożyła i weryfikuje ten system drogą cyklicznych audytów jednostki certyfikującej (uczestniczy w programie monitorowania systemu w ramach OECD). Warunkiem wykonywania badań w systemie GLP lub zgodnie z GLP jest weryfikacja badania, personelu, wyposażenia oraz jednostki przez zewnętrzne, niezależne i upoważnione do tego typu kontroli jednostki. Laboratorium które nie jest weryfikowane drogą cyklicznych audytów upoważnionej do tego typu instytucji nie wykonuje badań ani zgodnie z systemem GLP ani w ramach systemu GLP ponieważ prowadzona działalność nie jest zweryfikowana pod tym kątem „…*a facility that is not a member of an OECD GLP compliance monitoring programme*" (UK Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency - MHRA, 2007).

System dobrej praktyki laboratoryjnej powstał w celu weryfikacji jakości badań naukowych, sam system w obrębie jednostki również wymaga weryfikowania przez upoważnione do tego niezależne instytucje. Zasięg systemu dobrej praktyki laboratoryjnej w odniesieniu do badań farmakokinetycznych ilustrują liczne przewodniki oraz dyrektywy największych agencji rejestrujących:

„ …. *Bioequivalence should be conducted under Good Laboratory Practice (GLP) …..*" (1)

„ *Studies on pharmacodynamics (....) should be conducted according to the principles Good Laboratory Practice (GLP) …..*" (2)

„ *All pharmacokinetics studies (...). Studies conducted folowing Good Laboratory Practice (GLP) indications are preferred*" (3)

„*Target animal safety studies (margin of safety and other laboratory safety studies) must be performed in conformity with the principles of Good Laboratory Practices (GLP; 21 CFR Part 58)*" (4)

„*Good laboratory practice guidelines apply to the nonclinical studies with the drug metabolite designed to evaluate safety*" (5)

(6)

„*In some circumstances, results of secondary pharmacodynamic studies may make a pivotal contribution to the safety evaluation for potential adverse effects in humans, and these are normally conducted in compliance with GLP*"

" is important to ensure the quality and reliability of nonclinical safety studies. This is normally accomplished through the conduct of the studies in compliance with GLP"

"It has to be emphasized that data quality and integrity in safety pharmacology studies should be ensured even in the absence of formal adherence to the principles of GLP. When studies are not conducted in compliance with GLP, study reconstruction should be ensured through adequate documentation of study conduct and archiving of data."

"Safety pharmacology investigations can be part of toxicology studies; in such cases, these studies would be conducted in compliance with GLP."

"Primary pharmacodynamic studies <u>do not need to be conducted</u> in compliance with GLP."

"Generally, secondary pharmacodynamic studies do not need to be conducted in compliance with GLP.(...) In some circumstances, results of secondary pharmacodynamic studies may make a pivotal contribution to the safety evaluation (...) and these are normally conducted in compliance with GLP.

"It is expected that all preclinical safety studies supporting the safety of an exploratory IND application will be performed in a manner consistent with good laboratory practices (GLP) (21 CFR Part 58)." (7)

"Although GLP compliance is not mandatory for pharmacodynamic and pharmacokinetic studies, they should be of high quality and consistent with the principles of GLP." (8)

"Studies providing acute toxicity information can be limited to the clinical route only and such data can be obtained from non-GLP studies if clinical administration is supported by appropriate GLP repeated dose toxicity studies." (9)

"In some specific situations (e.g. microdose studies; see Section 7) acute toxicity or single dose studies can be the primary support for single dose studies in humans (...) These studies should be performed in compliance with GLP and lethality should not be an intended endpoint." (9)

"Toxicokinetic studies retrospectively designed to generate specific sets of data under conditions which closely mimic those of the toxicity studies should also conform to GLP when they are necessary for the evaluation of safety."

"The requirement for residues studies to be conducted in accordance with the OECD Principles of Good Laboratory Practice (GLP) was introduced by the APVMA on 1 January 2003." (11)

"(...) compliance with Good Laboratory Practice (GLP) standards will be mandatory for all residue studies, including both the animal and laboratory phases that are conducted in Australia. Overseas studies will be subject to comparable standards of GLP." (12)

"Applicable principles of GLP should be followed in the conduct of chemical analysis(...)" (13)

Piśmiennictwo szczegółowe:

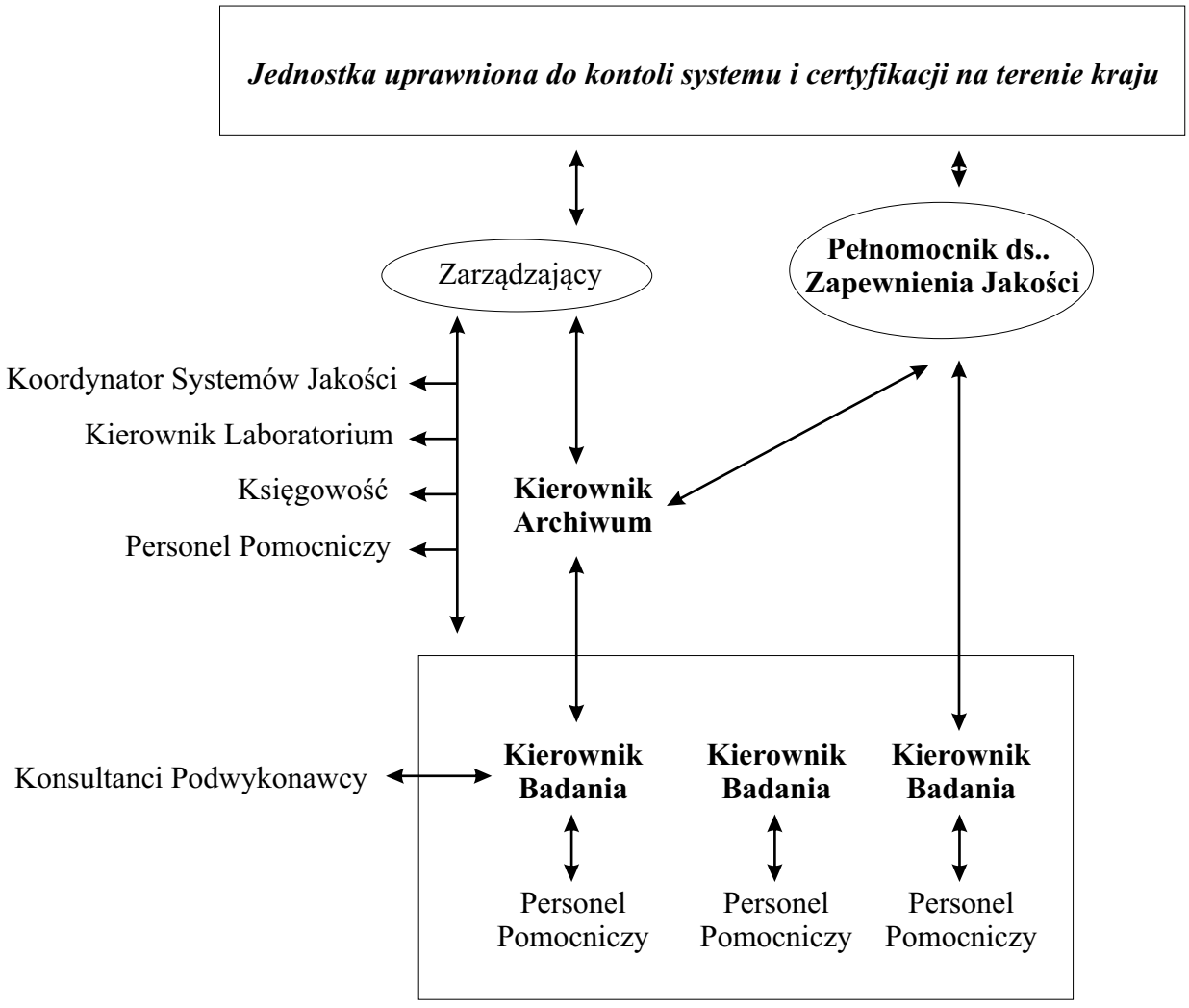
1 Guidance for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products EMEA/CVMP 2001
2 Guideline for the demonstration of efficiacy for veterinary medicinal products containing antimicrobial substances EMEA/CVMP 2003
3 Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species EMEA/CVMP 2000
4 Guidance for Industry Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products VICH GL 43 DRAFT GUIDANCE 2006
5 Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry (FDA) 2008
6 Guidance for Industry S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals (FDA, ICH), S7A
7 Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers Exploratory IND Studies FDA CDER 2006
8 GUIDELINE ON STRATEGIES TO IDENTIFY AND MITIGATE RISKS FOR FIRST-INHUMANCLINICAL TRIALS WITH INVESTIGATIONAL MEDICINAL PRODUCTSDoc. Ref.EMEA/CHMP/SWP/28367/07 EMEA 2007
9 ICH Topic M 3 (R2) Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals CPMP/ICH/286/95, 2008
10 ICH Topic S 3 A Toxicokinetics: A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicology Studies CPMP/ICH/384/95, 1995
11 Vet volume 3 Part 5A: Residues APVMA 2007
12 Veterinary drug residue analytical methods Residue Guideline No. 26 NRA APVMA 2009 http://www.apvma.gov.au/guidelines/rgl26.shtml
13 MULTISOURCE (GENERIC) PHARMACEUTICAL PRODUCTS: GUIDELINES ON REGISTRATION REQUIREMENTS TO ESTABLISH INTERCHANGEABILITY Working document QAS/04.093/Rev.4, 2005

W konsekwencji system GLP wpływa na:

Podniesienie jakości badań
Wzrost przejrzystości organizacji badań
Szkolenie i jakość personelu
Jakość projektów badań
Jakość stosowanego sprzętu
Jakość stosowanych odczynników
Jakość stosowanego oprogramowania
Możliwość weryfikacji przebiegu badania
Możliwość odtworzenia badania

Ale także:

Wzrost kosztów szkolenia personelu
Koszty utrzymania i kontroli sprzętu
Koszty stosowanych odczynników
Koszty stosowanego oprogramowania
Nadmierna rozbudowa dokumentacji
Trudności w stosowaniu systemu w niestandardowych badaniach przedklinicznych
Kryteria interpretacji jakości badań zależne od agencji narodowych (rejestrujących leki)
Dowolność interpretacji niedoprecyzowanych dyrektyw i przewodników (często brak odniesień do GLP)
Koszty badań



Rys. Schemat organizacyjny ilustrujący realizację badań DMPK w systemie GLP.

Rzędowość procesów farmakokinetycznych.

Rzędowość procesów kinetycznych (ang.: *Order*) opisuje dynamikę zmian C-T w zależności od podanej dawki leku (nie należy mylić pojęcia rzędowości i cząsteczkowości reakcji). Rzędowość reakcji jest pojęciem wywodzącym się ze zjawisk kinetyki chemicznej i stosowanym do opisu przebiegu reakcji chemicznych w oparciu o dane ilościowe dotyczące zmian ilości po stronie substratów i reagentów w czasie. Znając rząd obserwowanych zmian C-T można stwierdzić czy wielkość obliczanych parametrów farmakokinetycznych zmienia się proporcjonalnie do dawki leku. Znając rząd reakcji kinetycznej można modyfikować obliczenia farmakokinetyczne stosownie do dynamiki zmian stężenia leku w tkance. Najczęściej obserwowane krzywe C-T w farmakokinetyce nie posiadają na całym swoim przebiegu jednego określonego typu rzędowości. Przykładem może być długotrwały wlew donaczyniowy który zwykle w początkowej fazie charakteryzują procesy pierwszego rzędu a dopiero później rzędu zerowego. Podanie leku w formie iniekcji dożylnej dla większości leków które charakteryzuje szybka dystrybucja do tkanek opisuje stała szybkości procesu dystrybucji pierwszego rzędu i najczęściej stała szybkości eliminacji pierwszego rzędu. Stałe szybkości eliminacji dla większości leków obliczane są w ramach założeń kinetyki reakcji pierwszego rzędu. Jednak eliminacje niektórych leków może opisywać kinetyką drugiego rzędu (eliminacja przeciwciał). Kinetyka zerowego rzędu towarzyszy zwykle modyfikowanym postaciom leków o kontrolowanym uwalnianiu substancji czynnej. Stałe szybkości opisujące proces uwalniania oraz stałe szybkości opisujące proces wchłaniania najczęściej zgodne są z kinetyką zerowego rzędu. Niektóre leki charakteryzuje stała szybkości wchłaniania obliczana zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Duży wpływ na rzędowość procesy farmakokinetycznego ma postać leku i droga podania leku. Procesy farmakokinetyczne zgodne z kinetyką drugiego rzędu dotyczą np. stałych szybkości opisujących asocjację leku z białkami. Podobnie często w ramach kinetyki reakcji drugiego rzędu opisywany jest proces łączenia leku z receptorem oraz reakcje enzymatyczne - metaboliczne etc. W zależności od charakteru szybkości zmian kinetyki względem dawki leku określić można trzy główne rodzaje rzędowości najczęściej spotykane w kinetyce dyspozycji leków:

Procesy zerowego rzędu:	W procesach kinetycznych zerowego rzędu w odstępach czasu stężenie substancji badanej zwiększa się stale o tę samą wartość.
Procesy pierwszego rzędu:	W procesach pierwszego rzędu szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia reagentów.
Procesy drugiego rzędu:	W procesach drugiego rzędu w odstępach czasu stężenie substancji badanej zwiększa się o wartość reagentów podniesioną do potęgi drugiej.

W procesach złożonych wykładnik potęgi reakcji kinetycznej może nie być liczbą całkowitą. W farmakokinetyce obliczenia związane z takim przebiegiem reakcji obliczane są w myśl założeń kinetyki nieliniowej Michaelis'a - Menten'a. Jeżeli szybkość zachodzącej reakcji - zmiany stężenia w czasie, określić można jako funkcję stężenia i czasu to szybkość reakcji w zależności od ich rzędowości można obliczyć z wzorów.

$$dc/dt = K \times C^0$$ - procesy zerowego rzędu

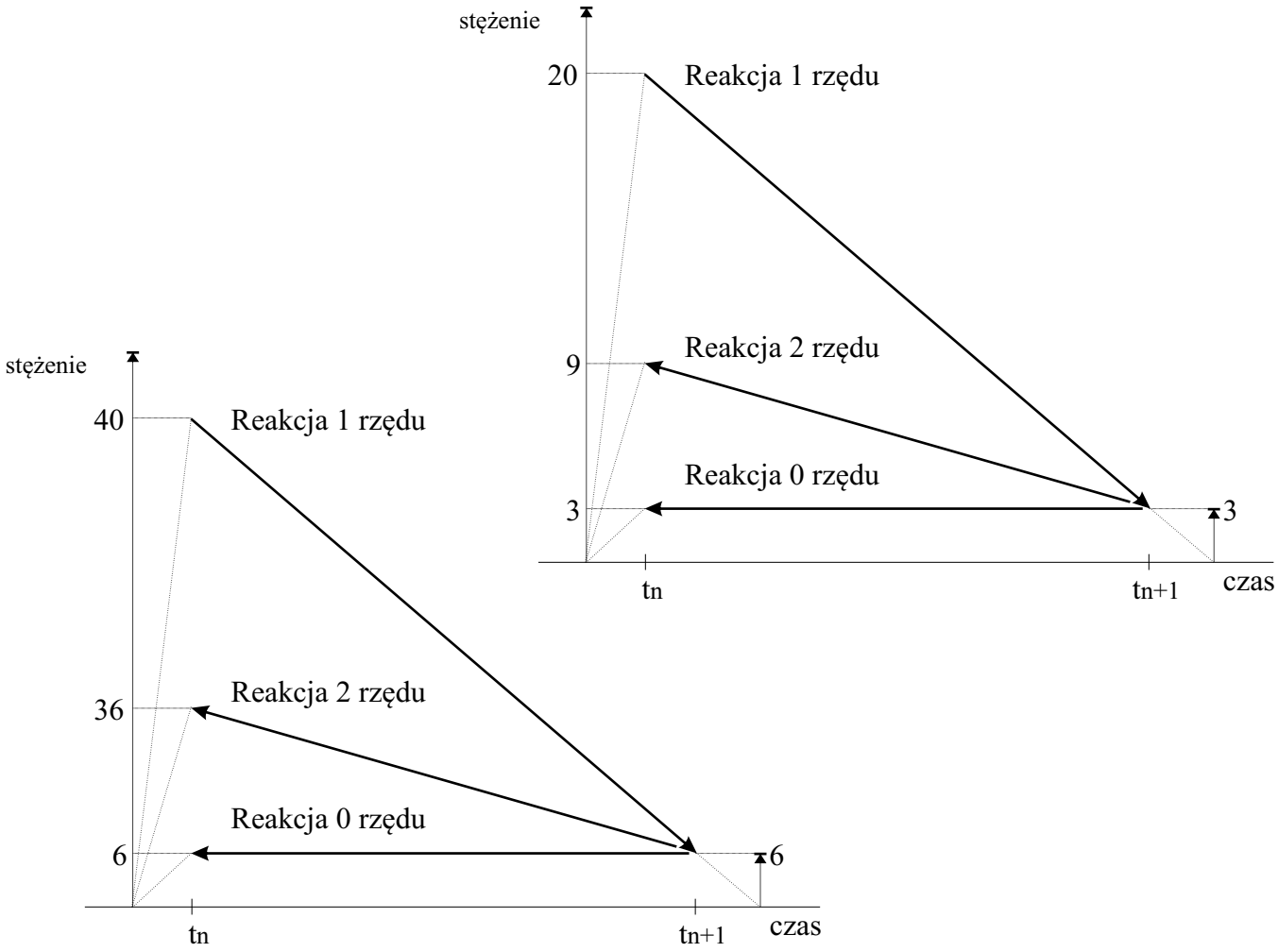
Opisuje je graficznie funkcja - $C = f(t)$

$$dc/dt = K \times C^1$$ - procesy pierwszego rzędu

Opisuje je graficznie funkcja - $LnC = f(t)$

$$dc/dt = K \times C^2$$ - procesy drugiego rzędu

Opisuje je graficznie funkcja - $1/C = f(t)$



Rys. Graficzne zależności dotyczące szybkości przebiegu i rzędowości reakcji farmakokinetycznych.

0,1,2 - wykładnik opisujący rzędowość procesu
k - stała szybkości dla danego procesu kinetycznego
C -aktualna wartość stężenia
dc /d t - kinetyka zmian stężenia w czasie

tak więc szybkość procesu (reakcji) opisuje w tym wypadku iloczyn stałej szybkości i stężenia początkowego. Stężenie to zmienia się dla rzędu reakcji = n.

$$\mathbf{K \times C^{n}}$$

Rzędowość procesów farmakokinetycznych może ulegać zmianom w czasie przebywania leku w organizmie - przestrzeni kinetycznej. Dla krzywej C-T zmiany rzędowości w zależności od dawki mogą uwidaczniać się w różnych fazach kinetycznych w różny sposób. Oznacza to że rzędowość procesu wchłaniania leku może nie być zależna od dawki natomiast zależność od dawki wykazywać będzie przebieg fazy eliminacji. Badanie i opisywanie zmian rzędowości w takich wypadkach może nastręczać wieleu problemów. Porównywanie wartości pól powierzchni pod krzywymi dla różnych dawek nie opisze takiego przypadku w sposób prawidłowy.

Natomiast prawidłowy opis zagwarantuje porównanie wartości t1/2β uzyskanego dla różnych wartości dawek. Zmiany rzędowości mogą nie dotyczyć procesów związanych z eliminacją, czy procesów związanych z wchłanianiem za to np. uwidaczniają się w ramach procesów dystrybucyjnych. Należy wtedy porównać wartości PK charakteryzujące procesy dystrybucyjne. Dla modelu dwukompartmentowego wybiórczy opis zmian charakteru dystrybucji zagwarantują między innymi stałe szybkości dla procesów przemieszczania leku pomiędzy kompartmentem tkankowym i centralnym. Nie zawsze jednak zmiany rzędowości w określonej fazie kinetycznej łatwe są do analizowania dzięki wybiórczym porównaniom parametrów farmakokinetycznych. Przyczyną jest fakt iż procesy farmakokinetyczne są typowe dla kinetyki procesów równoczesnych. Stąd interpretacja efektów zmian rzędowości często wymaga jeszcze dokładniejszych metod opisu kinetyki leku i precyzyjnego modelowania. Efekty takich badań sprowadzają się jednak do praktycznych wniosków na podstawie których można zaznajomić się ze złożonością zjawisk wchłaniania i dyspozycji leku w organizmie. Informacje te można wykorzystać między innymi w fazie projektowania postaci leku. Zmiany rzędowości mogą wybiórczo wpływać tylko na niektóre fazy kinetyczne i w efekcie niektóre parametry farmakokinetyczne. Istotą takiego zachowania się leków jest złożoność mechanizmów transportu i eliminacji leków. Szczególnie w przypadku gdy procesy te zachodzą z udziałem enzymów (metabolizm) lub specyficznych mechanizmów transportu z udziałem białek o ograniczonej wydolności. Po przekroczeniu pewnych wartości dawek rząd reakcji dla danego procesu transportu czy reakcji metabolicznej może ulegać zmianie w wyniku wysycenia i zmiany efektywności działania układu.

	proces 0 rzędu	proces II rzędu	proces I rzędu
równania krzywych:	$C_n = -k \times (t_2 - t_1) + C_{n+1}$	$1/C_n = -k \times (t_2 - t_1) + 1/C_{n+1}$	$\ln(C_n) = -k \times (t_2 - t_1) + \ln(C_{n+1})$
stała szybkości procesu:	$k \times (t_2 - t_1) = C_n - C_{n+1}$	$k \times (t_2 - t_1) = 1/C_n - 1/C_{n+1}$	$k \times (t_2 - t_1) = \ln(C_n / C_{n+1})$
stąd:	$k = (C_n - C_{n+1}) / (t_2 - t_1)$	$k = [1/(t_2 - t_1)] \times (1/C_n - 1/C_{n+1})$	$k = [1/(t_2 - t_1)] \times \ln(C_n / C_{n+1})$
lub		$k = (1/C_n - 1/C_{n+1}) / (t_2 - t_1)$	$k = \ln(C_n / C_{n+1}) / (t_2 - t_1)$

Jeżeli w równaniach zmianie ulegać będzie wartość Cn a wartość K pozostanie stała oznacza to że proces jest odpowiednio 0, II lub I rzędu.

stąd

$t_{1/2} = C_{n+1} / 2 \times K$	$t_{1/2} = 1 / (K \times C_{n+1})$	$t_{1/2} = \ln(2) / K$
t1/2 jest wprost proporcjonalny do stężenia początkowego	*t1/2 jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia początkowego*	*t1/2 jest niezależny od stężenia początkowego*
jednostki k:(mg / ml - s)	(ml / mg - s)	(1 / s)

Ryc. Porównanie i charakterystyka stałej szybkości w procesach 0, II i I rzędu.

Badanie rzędowości procesu - n.

Rzędowość badać można na dwa sposoby. Dla jednej reakcji lub procesu - w metodzie tej kolejne pomiary dla kolejnych fragmentów jednej krzywej pozwalają obliczyć rzędowość względem czasu. Druga metoda polega na przeprowadzeniu kilku doświadczeń i porównaniu krzywych na tym samym odcinku czasu lecz przy różnych stężeniach początkowych. W ten sposób obliczamy rząd reakcji względem stężenia.

Jedną z prostszych metod badania rzędowości procesu kinetycznego jest różnicowa metoda Van't Hoffa (Kamieński B. 1980). Metoda wymaga przeprowadzenia dwóch doświadczeń farmakokinetycznych. Każde musi być wykonane przy użyciu innej dawki. Dla określonej fazy kinetycznej bądź całej krzywej należy w obu przypadkach obliczyć stałe szybkości. Metoda polega na porównaniu obu stałych i obliczeniu wykładnika rzędowości procesu.

$$n = (\mathrm{Log}K_a - \mathrm{Log}K_b) / (\mathrm{Log}C_{oa} - \mathrm{Log}C_{ob})$$

Ka - stała szybkości dla stężenia wyjściowego Coa
Kb - stała szybkości dla stężenia wyjściowego Cob

Powyższą formułę zilustrować można także równaniem odwołującym się do dwóch wartości porównywanych biologicznych okresów półtrwania i stężeń początkowych (Danek A. 1978).

$$t_{1/2a} / t_{1/2b} = (C_{oa} / C_{ob})^{n-1}$$

I określić wartość rzędowości procesu na podstawie okresu półtrwania.

$$n = 1 + [\ \mathrm{Log}(t_{1/2a} / t_{1/2b}) / \mathrm{Log}(C_{oa} / C_{ob})]$$

Stałe szybkości jakie znajdą się w powyższej formule mogą zostać wyznaczone zarówno w ramach modelowania kompartmentowego jak i analizy momentów statystycznych. Mogą więc posłużyć tu zarówno współczynniki opisujące szybkość wchłaniania, dystrybucji, eliminacji jak i ich odpowiedniki obliczone na podstawie znajomości MRT czy MAT.

Badanie rzędowości reakcji farmakokinetycznych nie tylko w przypadku całych krzywych kinetycznych, lecz także poszczególnych faz stanowi cenne źródło wiedzy w badaniach porównawczych leków. Znajomość rzędowości pozwala określić jakościowo zjawiska transportu na poszczególnych etapach przemian jakim lek ulega w organizmie. Zwykle rzędowość kinetyki leku nie przyjmuje wartości całkowitych. Liczby ułamkowe opisujące rzędowość wskazują na złożoność procesów jakim lek ulega w organizmie. Im większe znaczenie dla poszczególnych faz kinetycznych przyjmują procesy transportu, metabolizm, lub inne procesy modyfikujące charakter i szybkość danego procesu kinetycznego tym wartość opisująca rzędowość bardziej jest oddalona od liczby całkowitej.

Farmakokinetyka procesów nieliniowych.

Procesy liniowe to takie procesy których rzędowość jest stała na całym przebiegu badanego procesu. Reakcje nieliniowe to takie których rzędowość w czasie jest zmienna. Podstawą analizy liniowości parametrów farmakokinetycznych w zależności od danego czynnika np. dawki jest równanie:

$$\mathbf{PK = a \times D^b} \text{ stąd } \mathbf{AUC = a \times D^b} \text{ lub } \mathbf{Cl = a \times BMI^b} \text{ itp.}$$

W przypadku wielu leków można zaobserwować wyraźny trend do zmian wartości parametrów farmakokinetycznych zależnie od wartości dawki. Kompletne profile farmakokinetyczne takich leków oblicza się w ramach modeli obliczeniowych kinetyki nieliniowej. Już w 1913 roku Leonor Michaelis i Maud Menten zaproponowali model obliczeniowy dla reakcji przebiegających z udziałem enzymów - reakcji o zmiennej rzędowości zależnej od etapu reakcji.

Pierwszy etap reakcji $S + E \underset{\mathbf{n=1}}{\overset{\mathbf{n=2}}{\rightleftharpoons}} ES$ Drugi etap reakcji $ES \xrightarrow{\mathbf{n=1}} E + P$

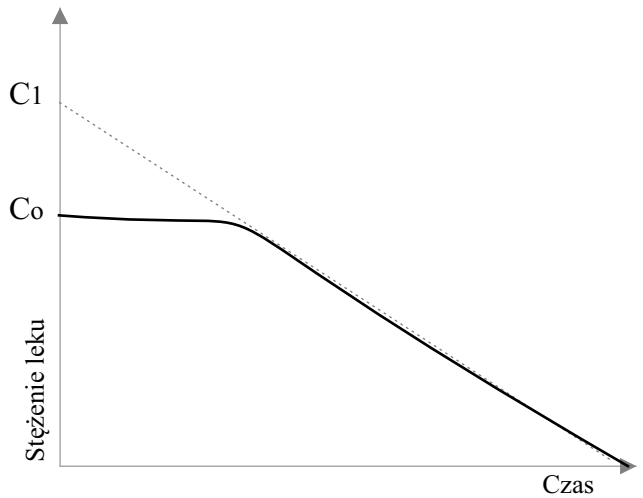
n - rzędowość procesu
S - substrat
E - enzym
P - produkt

Tego typu reakcje opisuje dodatkowy parametr - stała Michaelis'a - Menten'a - Km, którą obliczamy z równania:

$$\mathbf{K_m = (K_{n=1(rII)} + K_{n=1(rI)}) / K_{n=2}}$$

Kn=2 - stała szybkości reakcji drugiego rzędu dla pierwszego etapu
Kn=1(rI) - stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla pierwszego etapu
Kn=1(rII) - stała szybkości reakcji pierwszego rzędu dla drugiego etapu

Drugim parametrem charakteryzującym przebieg reakcji tego typu jest Vmax - maksymalna szybkość reakcji. W przypadku krzywych farmakokinetycznych jednym ze sposobów obliczenia Km jest wykorzystanie wartości ekstrapolowanej stężenia leku na podstawie przebiegu fragmentu krzywej (Gibaldi M., Perrier D. 1982).



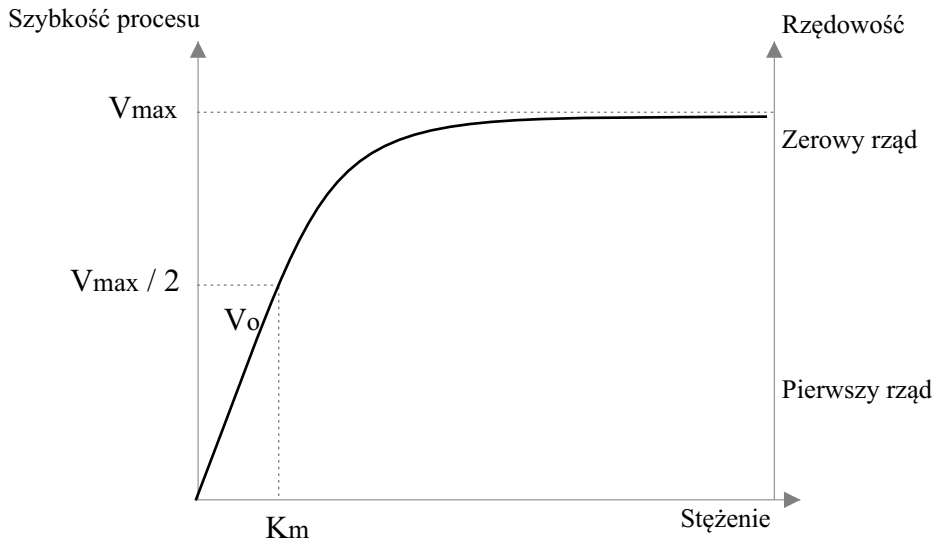
Rys. Podanie dożylne leku charakteryzujące się nieliniowym przebiegiem fazy eliminacji.

Km obliczamy w takim wypadku korzystając z formuły: $\mathbf{K_m = C_o / [2.303 \times Log(C_1 / C_o)]}$

Związek CYP3A4	Km
kolchicyna	5600,0
zileuton	820,0
karbamazepina	450,0
amiodaron	310,0
senecjonina	280,0
alprazolam	265,0
zatosetron	245,5
Abbott-66193	230,0
dapson	170,0
fentanyl	117,0
chinina	106,1
tamoksifen	98,0
adinazolam	91,8
testosteron	90,5
buprenorfina	89,0
erytromycyna	61,0
klozapina	61,0
(S)-werapamil	49,0
omeprazol	49,0
klarytromycyna	48,7
windezyna	24,7
deksametazon	23,2
diltiazem	23,0
simwastatyna	20,9
ritonawir	20,0
onapriston	19,6
irynotekan	18,4
taksol	18,0
kortyzol	15,2
ryfabutyna	10,9
mifepriston	10,5
tazofelon	9,9
terfenadyna	9,6
nifedypina	9,0
lilopriston	8,8
rapamycyna	8,1
cyklosporyna	7,4
felodypina	6,9
winblastyna	6,8
takrolimus	6,2
E3810	4,4
cyklosporyna	4,0
chinidyna	4,0
midazolam	3,8
1-nitropyren	3,3
tirilazad	1,8
indanawir	1,3
taksoter	1,1
sangwinawir	0,4

Związek CYP2B6	Km
S - mefenytoina	564,0
lidokaina	537,6
imipramina	383,0
dekstrometorfan	350,0
amitryptylina	144,4
werapamil	137,4
7-etoksykumaryna	115,0
diazepam	113,0
bupropion	107,5
benzfetamina	93,4
3-cjano-7-etoksykumaryna	71,3
testosteron	50,5
midazolam	46,1
4-chlorometylo-7-etoksykumaryna	33,7
RP73401	22,5
antypiryna	17,7
cynaryzyna	17,2
1,2-dibromoetan	9,7
7-etoksy-4-trifluorometylokumaryna	1,7
benzyloksyresorufina	1,3

Ryc. Przykłady wartości Km substratów CYP2B6 oraz substratów CYP3A4 (Ekins S. i wsp. 1999; Ekins S. i wsp. 1999).



Rys. Zależność szybkości reakcji od stężenia w procesach nieliniowych

Stała Michaelis'a - Km stanowi wartość stężenia wyznaczoną połową maksymalnej szybkości reakcji Vmax. Dodatkowym parametrem charakteryzującym procesy nieliniowe jest szybkość początkową reakcji - Vo.
Szybkość tę obliczoną dla różnych wartości stężenia opisują równania Michaelis'a - Menten'a.

Stężenie > Km	zerowy rząd reakcji	**Vo = (Vmax x C) / (Km + C)**
Stężenie < Km	proces pierwszego rzędu	**Vo = (Vmax x C) / Km**
Stężenie = Km	zmienna rzędowość	**Vo = Vmax / 2**

Stosunek wartości początkowej szybkości do maksymalnej szybkości reakcji i stałej Km ilustrują równania:

Eadie - Hofstee

$$\mathbf{Vo = Vmax - [(Vo / C) \times Km]}$$

Lineweaver'a - Burk'a

$$\mathbf{1 / Vo = Km / (Vmax \times C) + 1 / Vmax}$$

Stąd stała szybkości eliminacji (β) dla modelu jednokompartmentowego i podania dożylnego jest wypadkową stosunku maksymalnej szybkości reakcji do stałej Michaelis'a - Menten'a.

$$\mathbf{\beta = Vmax / Km}$$

Dla modelu dwukompartmentowego spełniona jest zależność:

$$\mathbf{K10 = Vmax / Km}$$

K10 - stała szybkości eliminacji z kompartmentu centralnego

Stąd wartość okresu półtrwania w fazie eliminacji wyniesie:

$$t_{1/2kel} = [0.693 \times (Km + C)] / Vmax$$

C - stężenie leku

Nieco inną zależność od procesów liniowych ilustruje dla procesów nieliniowych wartość pola powierzchni pod krzywą obliczanego na podstawie objętości dystrybucji.

$$AUC = D^2 / (2 \times Vd^2 \times Vmax) \qquad \text{lub} \qquad AUC = Co^2 / Vmax$$

D - dawka
Co - stężenie początkowe
Vd - objętość dystrybucji

Wartość klirensu ciała również zależna jest od stałej Km oraz wartości maksymalnej szybkości reakcji.

$$Cl = [(Vmax \times Vd) / (Km + C)] + (\beta \times Vd)$$

W przypadku procesów enzymatycznych o ograniczonej wydolności dotyczących metabolizmu leków, klirens wewnętrzny wątroby - Cl(int) charakteryzują formuły:

Stężenie > Km	zerowy rząd reakcji	$Cl_{(int)} = LW \times (Vmax / Km)$
Stężenie < Km	proces pierwszego rzędu	$Cl_{(int)} = LW \times [Vmax / (Km + C)]$

LW - masa wątroby (ang.: *Liver Weight*)

Przyczyną kinetyki nieliniowej leków jest wiele procesów fizjologicznych. Najczęstszym powodem nieliniowości w kinetyce są:

- indukcja enzymatyczna
- aktywny transport
- wiązanie z białkami
- zmiana pH środowiska
- słaba rozpuszczalność

Wykazanie zjawiska braku liniowości na którymkolwiek etapie profilu farmakokinetycznego leku wymaga korekcji w zakresie obliczeń dotyczących dawkowania. Zależność pomiędzy dawka podaną i uzyskanym stężeniem a dawką nową i nową wartością stężenia ilustruje zależność:

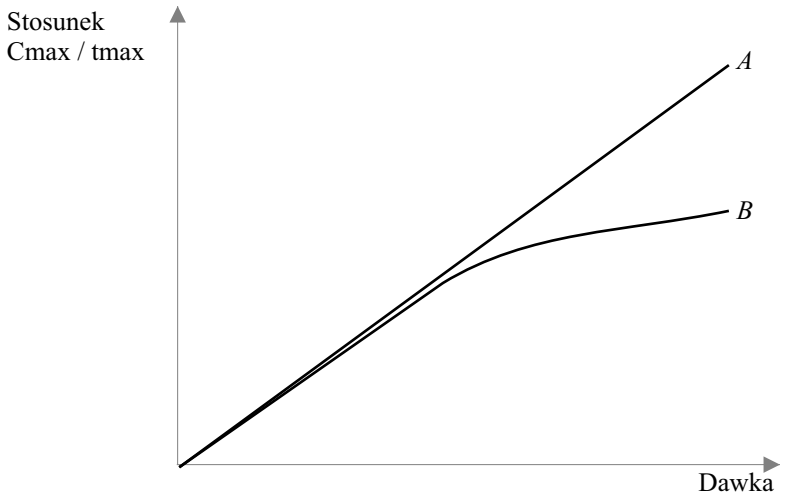
$$Dn = D \times [(Km + C) \times Cn] / [(Km + Cn) \times C]$$

Dn - nowa dawka
D - dawka
Cn - stężenie żądane dla nowej dawki
C - stężenie uzyskane dla dawki pierwszej

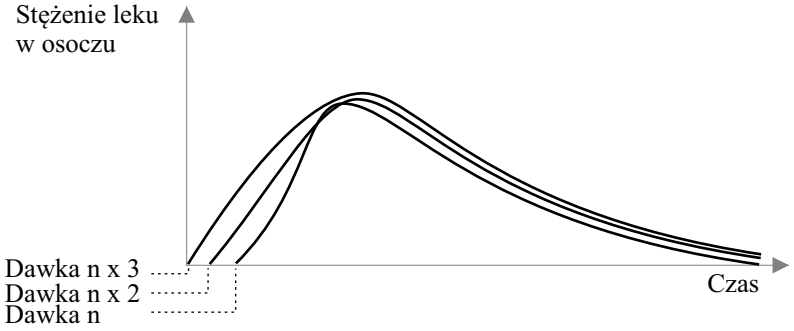
Dawka dzienna leku również zależna jest od Vmax i Km.

$$D = Vmax - (Cl \times Km)$$

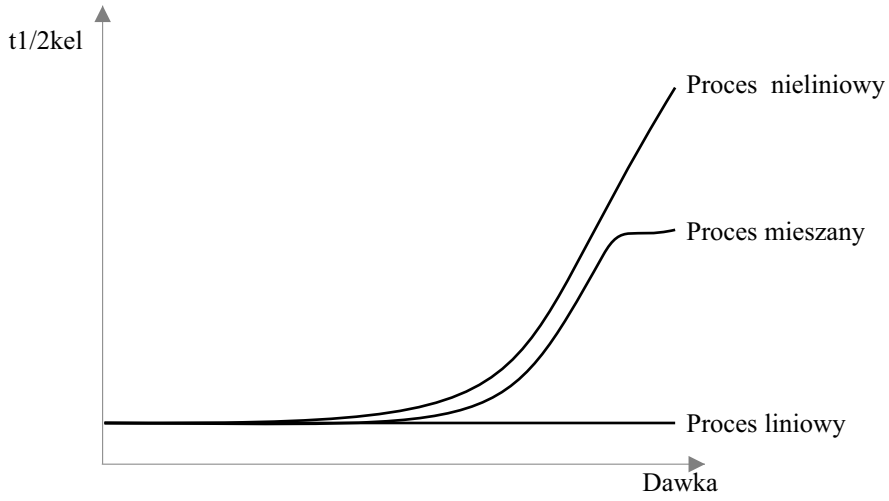
D - dawka dzienna
Cl - klirens leku



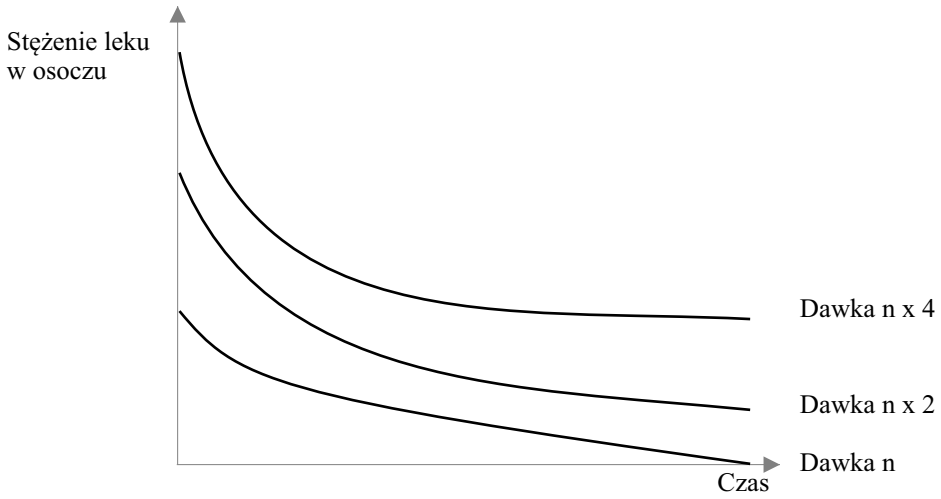
Rys. Zależność między wartością stosunku Cmax / tmax a dawką w przypadku liniowego (A) i nieliniowego (B) przebiegu fazy wchłaniania leku.



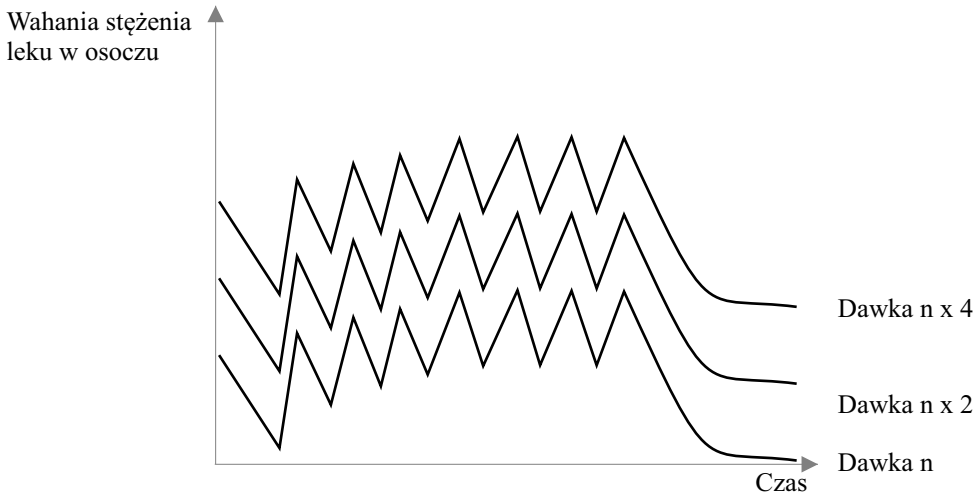
Rys. Zależność między dawką a nachyleniem krzywej C-T, w procesach nieliniowej absorpcji leku. Podanie pozanaczyniowe.



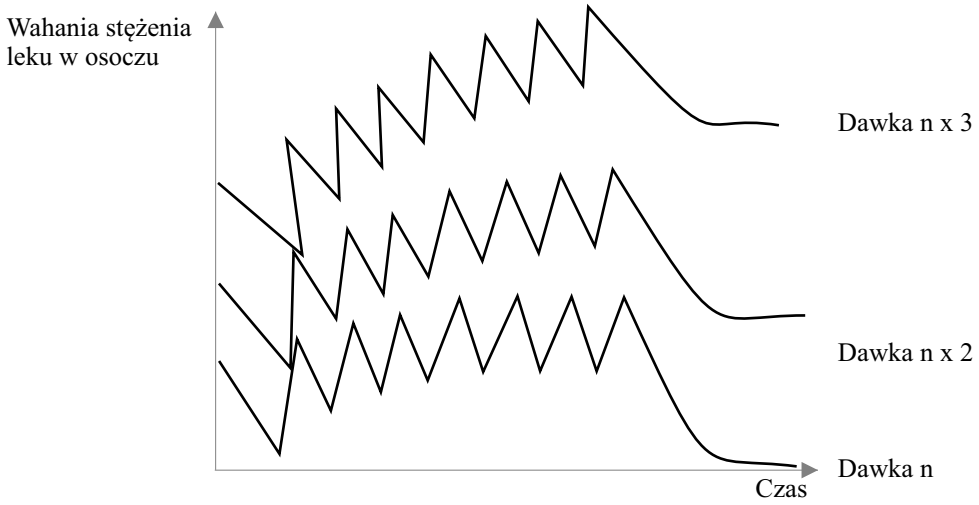
Rys. Zależność między wartością okresu półtrwania w fazie eliminacji leku a dawką w procesach liniowych, nieliniowych i mieszanych.



Rys. Zależność między dawką a nachyleniem krzywej C-T, w procesach nieliniowej eliminacji leku.



Rys. Szybkość narastania stanu ustalonych wahań stężenia leku w procesach liniowej kinetyki leku.



Rys. Szybkość narastania stanu ustalonych wahań stężenia leku w procesach kinetyki nieliniowej.

Dawkę dzienną wyrażoną szybkością dawkowania - DR (ang.: *Dosing Rate*) obliczamy korzystając z wzorów:

$$DR = (Vmax \times Css) / (Km + Css)$$

Stąd podanie donaczyniowe.

$$D / \tau = (Vmax \times Css) / (Km + Css)$$

Podanie pozanaczyniowe.

$$(F \times D) / \tau = (Vmax \times Css) / (Km + Css)$$

lub dla wlewu dożylnego:

$$Ko = (Vmax \times Css) / (Km + Css)$$

W przypadku obliczeń dotyczących czasu osiągnięcia stanu ustalonych wahań stężenia leku po podaniu wielokrotnym dla procesów nieliniowych można skorzystać z równania:

$$tn\% = [(Km \times Vd) / (Vmax - D)^2] \times [(2.3 \times Vmax) - (n\% \times D)]$$

tn% - czas zaistnienia stanu ustalonego na określonym poziomie
Vd - objętość dystrybucji
D - dawka
n% - procent stanu ustalonego wyrażony jako część jedności (95 % = 0.95)

Korzystając z równań określających szybkość dawkowania w procesach nieliniowych wyprowadzić można wzór na wartość stężenia w stanie ustalonym dla określonej dawki.

$$Css = (- Km \times D) / (D - Vmax)$$

Jednym z poważniejszych problemów w analizie braku liniowości faz kinetycznych jest wielostopniowy mechanizm zjawiska nieliniowości. Najczęściej kinetyka nieliniowa leków utożsamiana jest tylko z kinetyką procesu metabolizmu leku, częściej jednak brak liniowości jest skutkiem kilku procesów o różnym natężeniu. Wieloetapowe zmiany rzędowości reakcji w obrębie jednej lub kilku faz kinetycznych nie zawsze dają się opisać w ramach pojedynczego równania Michaelis'a - Menten'a. Najczęściej przyczyną tego są wielokrotne i wieloetapowe zmiany w zakresie transportu i równocześnie metabolizmu leku jakim podlega w danej przestrzeni kinetycznej. Opisanie nieliniowej kinetyki leku nastręcza wielu trudności związanych z istnieniem często kilku elementów decydujących o jej charakterze. Dane zebrane w postaci wykresów C-T mogą maskować pewne elementy szczególnie w końcowej fazie wchłaniania i początkowej eliminacji. Stąd określenie mechanizmu nieliniowości wymaga często znacznie szerszej kolekcji próbek (nie tylko osocza) oraz użycia różnych wzajemnie uzupełniających się badań modelowych.

Badania porównawcze z użyciem kilku dawek leku mogą opisać nieliniowy charakter zmian krzywej AUC. Nakładanie na jednym układzie współrzędnych kilku krzywych C-T pozwala zademonstrować charakter i kierunek zmian. Ważnym narzędziem w świetle analizy porównywanych krzywych jest DNAUC (ang.: *Dose Normalized Area Under the Curve*) czyli pole powierzchni pod krzywą normalizowane dawką (Ward K.W. i wsp. 2001).

Porównanie parametrów PK z kilku doświadczeń z zastosowaniem kilku różnych dawek jest jednym z prostszych sposobów zbadania liniowego lub nieliniowego charakteru kinetyki leku w poszczególnych fazach. Jest to również jeden z celów analizy w trakcie badań PK z eskalacją dawki w fazie I badań klinicznych leków oryginalnych. Schemat eskalacji dawki w kolejnych eksperymentach obejmuje ciąg

matematyczny - ciąg liczbowy w którym każdy z kolejnych wyrazów uzyskujemy dodając wyraz bezpośrednio poprzedzający oraz wyraz definiowany jako różnicę ciągu: 1,2,3,4,5,6

geometryczny - ciąg liczbowy w którym każdy z kolejnych wyrazów uzyskujemy mnożąc wyraz bezpośrednio poprzedzający przez stałą (iloraz ciągu):

2,4,8,16,32 (2 - iloraz ciągu) lub 2,6,18,54,162 (3 - iloraz ciągu) etc.

ciąg Fibonacci'ego (suma dwóch poprzedzających wyrazów):

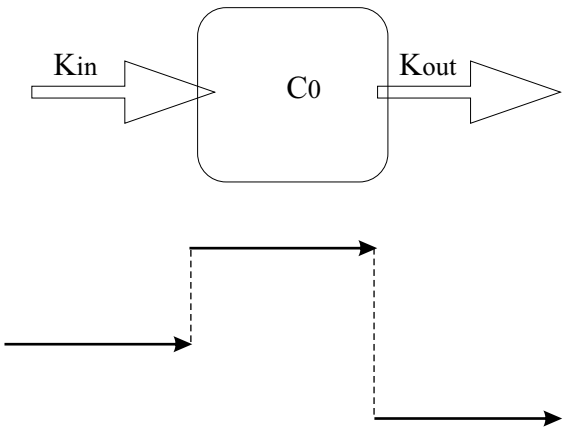
0, 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, 55, 89, 144, 233, 377, 610, 987, 1597, 2584, 4181

zmodyfikowany ciąg Fibonacci'ego:

0,2,3.3,5,7,9,12,16

Model fluktuacyjny (ang.: *Turnover Model*).

Model fluktuacyjny zwany również modelem zależnym (ang.: *Indirect Model*) jest jednym z najprostszych modeli stosowanych w farmakokinetyce i farmakodynamice. Opisuje on procesy w których procesy wchłaniania charakteryzuje kinetyka zerowego rzędu. Eliminacja w modelu fluktuacyjnym obejmuje procesy pierwszego rzędu.



Ryc. Fluktuacja stężenia w modelu zależnym.

Modele tego typu obejmują na przykład kinetykę enzymów która wymaga wytworzenia w ramach fizjologii pracy organizmu równowagi produkcji i degradacji. Za pomocą tego typu modelowania można śledzić kinetykę immunoglobulin oraz hormonów. Wartości Kin, Kout oraz C0 w tego typu modelu charakteryzują proste równania (Gabrielsson J., Weiner D. 2000):

$$\mathbf{C_0 = K_{in} / K_{out}} \qquad \mathbf{K_{out} = K_{in} / C_0} \qquad \mathbf{K_{in} = K_{out} \times C_0}$$

$$\mathbf{t_{1/2} = 0.693 / K_{out}}$$

Model tego typu wykorzystywany jest często w analizie PK/PD gdzie podanie leku (*in*) wywołuje określony efekt - reakcję w organizmie (*Direct*) która z czasem wygasa (Kout).

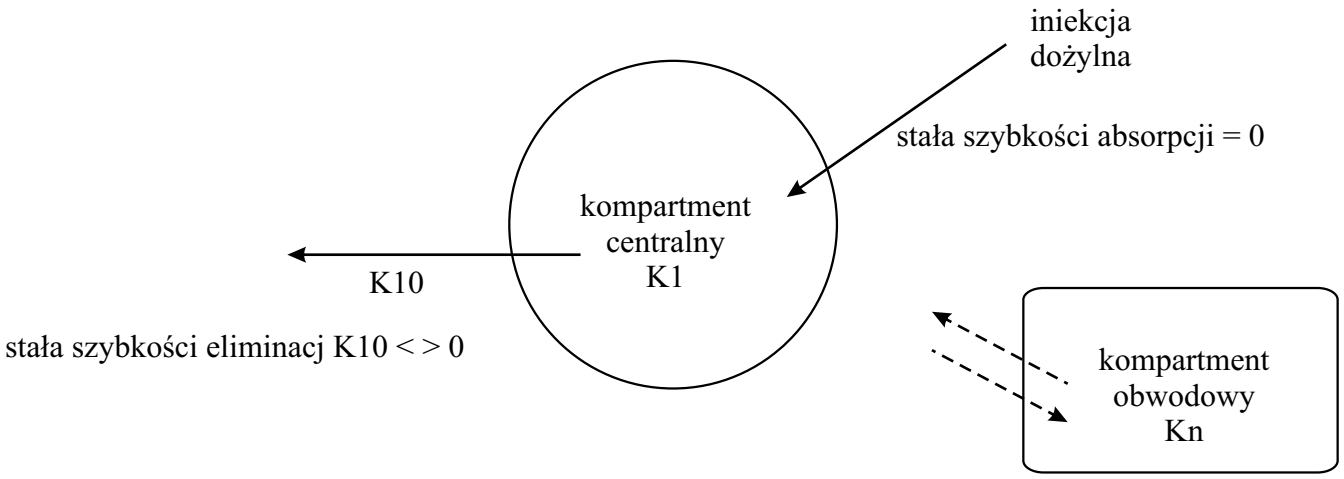
Podstawy teorii kompartmentowej rozmieszczenia leków.

W farmakokinetyce i farmakologii klinicznej mianem kompartmentu (ang.: *Compartment*; niem.: *Kompartiment*) określa się przestrzeń w organizmie w której lek rozmieszcza się równomiernie w jednostce czasu. Pojęcie to nie jest związane z istniejącymi barierami anatomicznymi czy fizjologicznymi, wiąże się natomiast z istnieniem w obrębie jednego kompartmentu (przestrzeni kinetycznej) zbliżonych stężeń leku w analizowanym punkcie czasowym. Dwa podstawowe kompartmenty jakie można wyróżnić w organizmie to kompartment centralny oraz kompartment obwodowy (Baggot J.D. 1977; Danek A. 1979; Brandys J., Danek A. 1984).

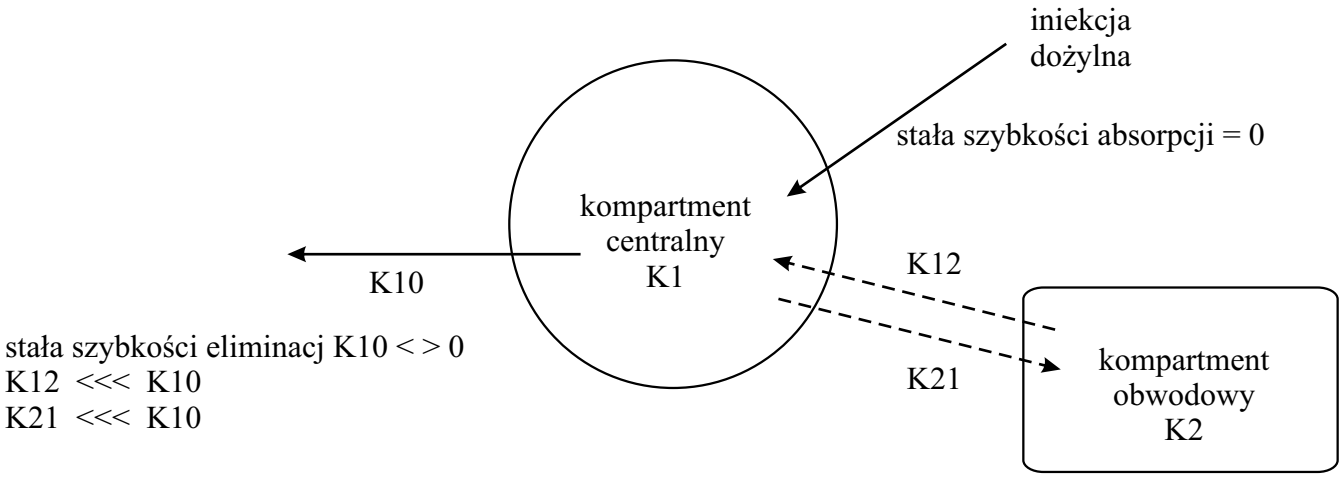
Za kompartment centralny uważa się krew (klasyczna definicja), czasami również płyn międzykomórkowy i dobrze ukrwione narządy. Pojęcie kompartmentu centralnego wiąże się ściśle z poziomem stężeń jakie leki osiągają w osoczu, które stanowi część całej objętości krwi. Pojęcie to rozszerzają zagadnienia wiązania leków przez białka krwi oraz transportu niektórych leków do wnętrza komórek krwi. Narządy dobrze unaczynione zwykle zawierają lek w stężeniu zbliżonym do stężenia notowanego w osoczu. W tym sensie kompartmentem peryferyjnym staje się każda inna przestrzeń do której zachodzi dystrybucja. Za kompartment tkankowy uważa się tkanki słabo unaczynione do których lek przenika długo zwykle osiągając w nich niższe stężenie. W niektórych tkankach lek rozmieszcza się szybko w znacznych ilościach. Proces ten zależny jest od budowy chemicznej i postaci leku, drogi podania, jego powinowactwa do określonych typów tkanek itd.. Zwykle poziom substancji leczniczej w kompartmencie tkankowym rośnie powoli i jest niższy od poziomów notowanych w kompartmencie centralnym. Kompartment efektorowy stanowi każde miejsce do którego dociera lek gwarantujące uzyskanie efektu terapeutycznego. Kompartmentem tym zwykle są tkanki objęte procesem patologicznym. Kompartmentem efektorowym dla leków o działaniu miejscowym może być powierzchnia skóry i komórki skóry lub dla leków podawanych w schorzeniach przewodu pokarmowego nabłonek jelit. Nie zawsze droga leku z miejsca podania do kompartmentu efektorowego musi być więc znacznie oddalona od miejsca podania leku. Jednak często trudnym zadaniem jest stworzenie takiej postaci leku która zagwarantuje zaistnienie substancji leczniczej w kompartmencie docelowym - efektorowym w pożądanym stężeniu przez określony czas.

Modelowanie za pomocą definiowania przestrzeni - kompartmentów w organizmie w których zachodzi dyspozycja leku zwykle obejmuje modele 1,2,3 kompartmentowe. Model jednokompartmentowy zwykle jest raczej wynikiem założenia postawionego przez badacza niż opisem stanu faktycznego. Jest to więc raczej wyidealizowany model w którym jednym z założeń jest to, że lek zaabsorbowany został do jednej przestrzeni. Kolejnym założeniem jest to, że lek ten tylko z tej przestrzeni jest eliminowany i nie ulega żadnym mechanizmom dystrybucji i redystrybucji. Zwykle podstawą tego typu założenia jest brak możliwości śledzenia procesów dystrybucji leku za pomocą narzędzi jakimi dysponuje modelowanie kompartmentowe. Jest to wiec model znacznie ograniczający dokładny opis kompletnego profilu farmakokinetycznego. Przeciwieństwem wyidealizowanego modelu jednokompartmentowego jest model jednokompartmentowy w którym bierze się pod uwagę istnienie kompartmentów peryferyjnych. Jednak transport leku w ich obrębie nadal nie jest możliwy do zdefiniowania za pomocą stałych szybkości czy eksponencjałów steżeń. Bliższe realiom fizjologii organizmu są modele dwukompartmentowe lub trójkompartmentowe. Obecnie analiza kompartmentowa kinetyki leku uzupełniana jest analizą na podstawie teorii momentów statystycznych. Oprócz wplatania obliczeń typowych dla modelu statystycznego często dodaje się również analizę opartą na modelach fizjologicznych. Powstają w ten sposób liczne modele hybrydowe.

Rozmieszczenie leku w organizmie jest wypadkową wielu czynników. Stężenie leku w tkance docelowej czyli w tzw. kompartmencie efektorowym powinno być zawsze na poziomie stężeń zapewniających wywołanie efektu. Jeżeli kompartment efektorowy jest kompartmentem uprzywilejowanym w stosunku do mechanizmów transportu leku, zapewnia to sukces terapeutyczny. Lek może bardzo dobrze penetrować tkanki i kompartment tkankowy. Nie zawsze oznacza to jednak że trafi w wymaganej części do receptora, tkanki lub układu tkanek które objęte są procesem patologicznym. Na kierunek i szybkość rozmieszczania leków pomiędzy kompartmentami z uwzględnieniem kompartmentu efektorowego wpływają między innymi:



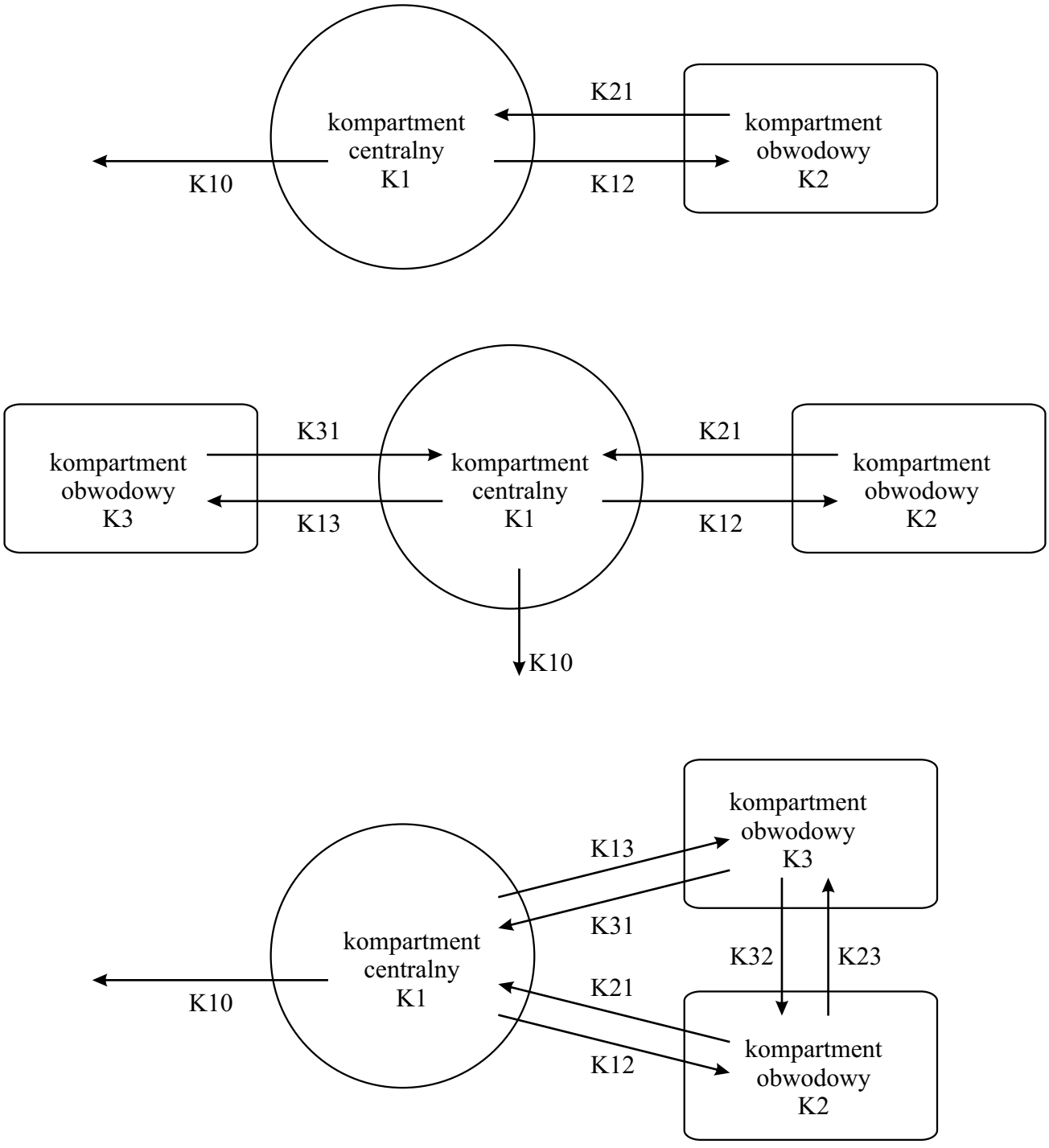
Rys. Założenia idealnego modelu jednokompartmentowego.
(np. iniekcja do gałki ocznej)



Rys. Założenia realnego modelu jednokompartmentowego.
(np. iniekcja do gałki ocznej z dystrybucją do
kompartmentu peryferyjnego - CNS)

Cechy drogi podania:

- podanie donaczyniowe (100 % dostępność)
- podanie doustne (zmniejszona dostępność)
- pokarmy i interakcje ze składnikami pokarmu
- perystaltyka przewodu pokarmowego
- krążenie wątrobowo jelitowe
- pH środowiska
- inne drogi podania



K10 - stała szybkości eliminacji leku z kompartmentu centralnego
K12 - stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu K2
K21 - stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu K2 do kompartmentu centralnego
K13 - stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do kompartmentu K3
K31 - stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu K3 do kompartmentu centralnego
K23 - stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu K2 do kompartmentu K3
K32 - stała szybkości redystrybucji leku z kompartmentu K3 do kompartmentu K2

Rys. Dyspozycja leku i sposoby jej modelowania w granicach wyznaczonych kompartmentów.

Cechy leku:

- lipofilność (właściwości elektrolitu lub ich brak)
- pole polarne cząsteczki leku - PSA
- stabilność
- wielkość cząsteczki
- aktywność wewnętrzna leku
- postać leku / efekt pierwszego przejścia
- inne cechy fizykochemiczne i fizjochemiczne leku

Cechy kompartmentów przez które wędruje lek:

- pH środowiska
- obecność mechanizmów transportujących
- efekt pierwszego przejścia
- interakcje z P-gp
- stopień wiązania z białkami
- trwałe wiązanie się z niektórymi tkankami
- interakcje farmakokinetyczne

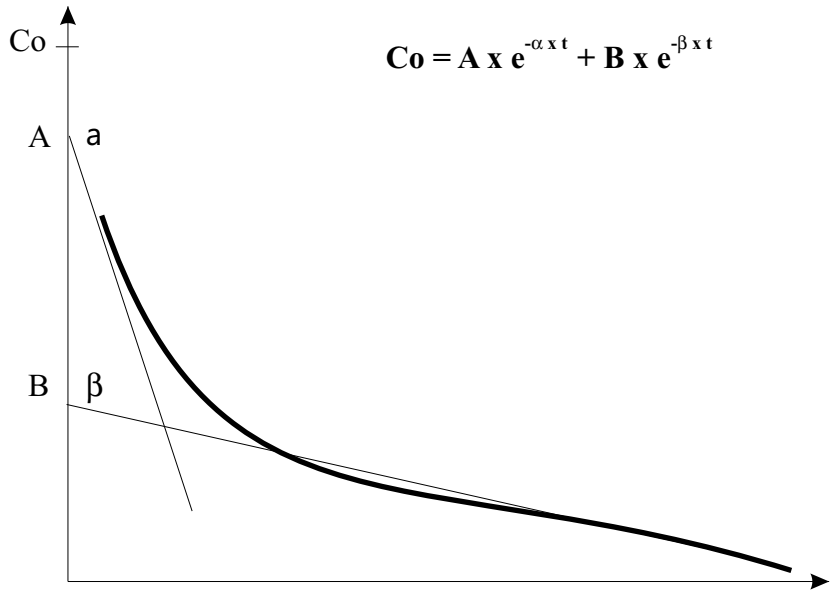
Cechy kompartmentu efektorowego - docelowego:

- cechy fizykochemiczne zapewniające ułatwiony transport do tkanki
- ukrwienie tkanki, perfuzja
- stopień wiązania z białkami tkanki
- szybkość transportu do kompartmentu efektorowego

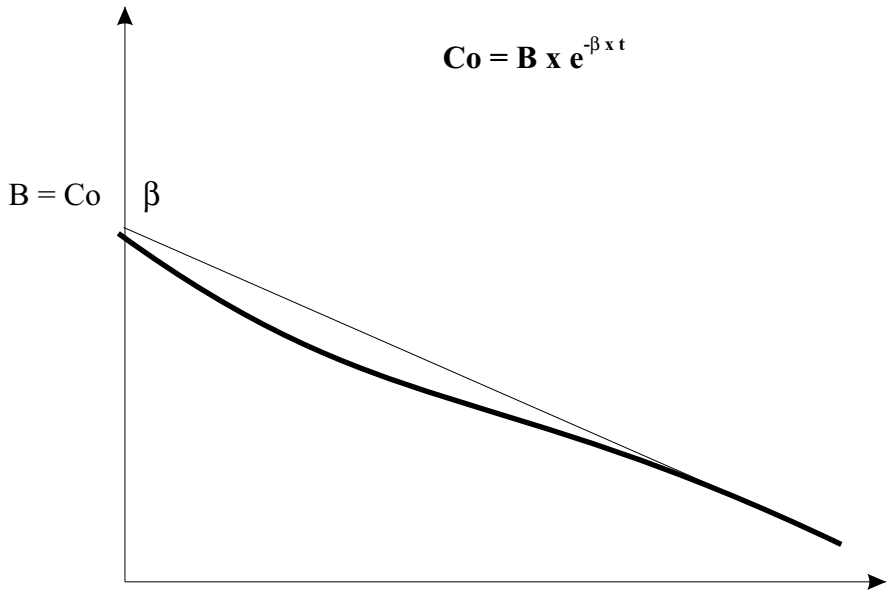
Istnienie kompartmentów czyli przestrzeni organizmu w których lek rozmieszcza się równomiernie (w czasie i stężeniu) ma wyraźne odzwierciedlenie w przebiegu krzywych C-T leku odnotowanych w płynach ustrojowych. Zróżnicowanie rozmieszczania leku w organizmie związana jest między innymi z istnieniem wielu wtórnych procesów kinetycznych redystrybucyjnych. Jednym z takich procesów jest zjawisko redystrybucji leku wynikającej z krążenia wątrobowo - jelitowego czyli enterohepatycznego - EHC (ang.: *Entero Hepatic Circulation*). Zjawisko to dotyczy znacznej grupy substancji leczniczych. Są to najczęściej substancje lipofilne. Zjawisko polega na tym że lek który dostał się do krwioobiegu może zostać wydzielony wraz z żółcią do światła przewodu pokarmowego gdzie ponownie może zostać wchłonięty.

Innym przypadkiem w którym możliwa do obserwowania jest wyraźna krzywa redystrybucyjna. jest ograniczenie wchłaniania leku w GIT w wyniku etapowego procesu przekazywania treści z żołądka do jelit. W takim przypadku należy określić szybkość procesu opróżniania żołądka - GER (ang.: *Gastric Emptying Rate*). GER zależne jest od objętości zawartości żołądka i wraz z objętością wzrasta, wydłuża się wraz ze wzrostem pH treści. GER wydłuża się także podczas ciąży. Taka sytuacja frakcjonowanego przekazywania leku do dalszych odcinków przewodu pokarmowego może zajść zarówno u człowieka jak i zwierząt. Dodatkowym problemem u ptaków może być obecność wola, a u przeżuwaczy przedżołądków. K r z y w e stężeń zależne są od wielu czynników. Czasami pozornie wskazują na błąd analityczny jednak zmiany stężeń jakie są obserwowane relacjonują złożone procesy zachodzące w organizmie. Redystrybucja leku ma wpływ na obliczenia większości parametrów farmakokinetycznych szczególnie AUC, Vd, Cl, t1.2, oraz stałej szybkości eliminacji. W przypadku modelu dwukompartmentowego z silnie wyrażoną fazą dystrybucji leku pozostaje jednak bez wpływu na stałą szybkości opisującą ten proces. Pominięta lub niewłaściwie opisana kinetyka i fizjologia procesów redystrybucji leku może prowadzić do błędnego określenia schematu dawkowania leku. Jest to szczególnie ważne w fazie projektowania leków nowych opartych na nowych substancjach leczniczych.

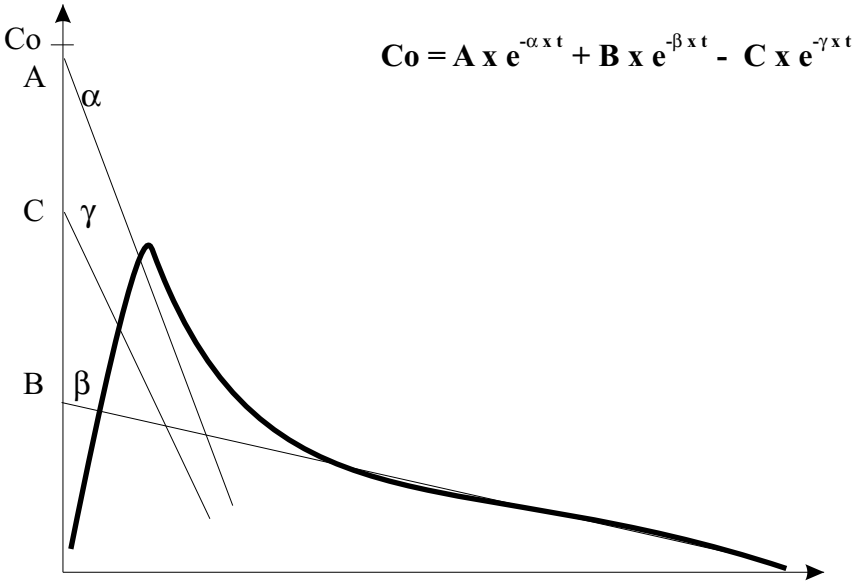
Typowe modele dwukompartmentowe wyodrębniają dwa podstawowe kompartmenty - centralny i tkankowy dotyczą najczęściej podania donaczyniowego leku. Po fazie dystrybucji leku z krwi do tkanek zachodzącej z dużą szybkością obserwować można długą i powolną fazę eliminacji leku. Im bardziej złożona jest kinetyka leku i im więcej obserwacji można poczynić w trakcie badań przebiegu krzywej stężeń tym bardziej złożonym procesom dystrybucji pomiędzy tkankami ulega lek. Taka sytuacja zmusza do opisywania wszystkich procesów kinetycznych z osobna oraz podjęcie próby łączenia danych z poszczególnych faz kinetycznych celem przedstawienia kompletnego profilu farmakokinetycznego leku.



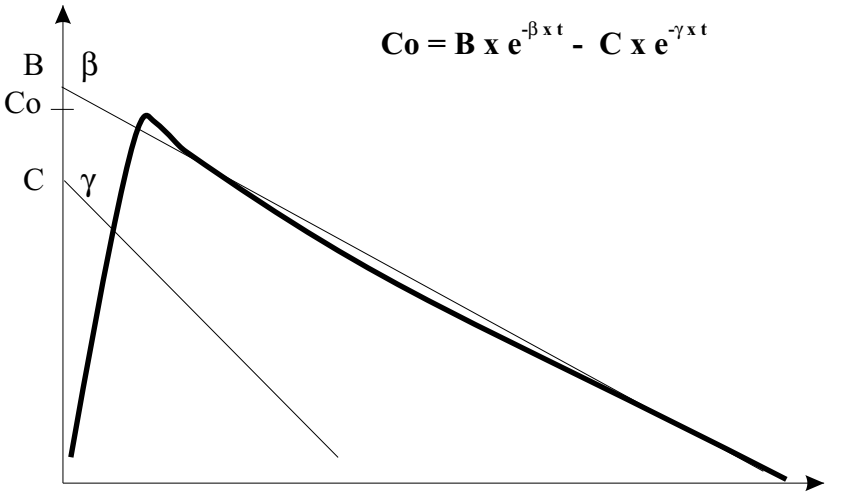
Rys. Przebieg krzywej C-T opisany typowymi parametrami dla modelu II kompartmentowego. Podanie dożylne faza dystrybucji i eliminacji.



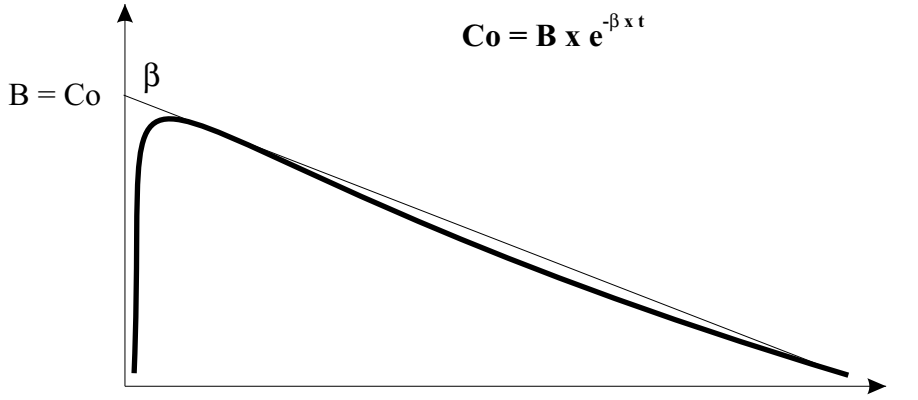
Rys. Przebieg krzywej C-T opisany typowymi parametrami dla modelu I kompartmentowego. Podanie dożylne faza eliminacji.



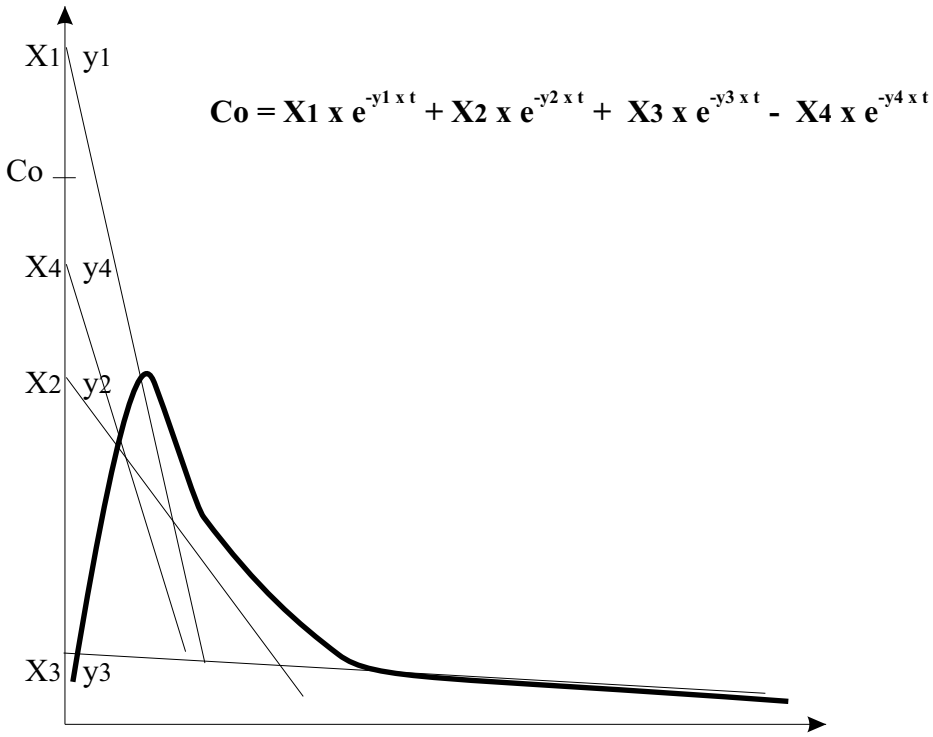
Rys. Przebieg krzywej C-T opisany typowymi parametrami dla modelu II kompartmentowego. Podanie pozanaczyniowe faza wchłaniania, dystrybucji i eliminacji.



Rys. Przebieg krzywej C-T opisany typowymi parametrami dla modelu I kompartmentowego. Podanie pozanaczyniowe faza wchłaniania I eliminacji.



Rys. Przebieg krzywej C-T opisany parametrami typowymi dla modelu I kompartmentowego. Podanie pozanaczyniowe faza eliminacji.



Rys. Przebieg krzywej C-T w modelu wielokompartmentowym.

Leki które cechuje prosta kinetyka zgodna z modelem jednokompartmentowym są łatwiejsze do opisywania i analizowania. Jednak z tego typu opisem wiążą się liczne ograniczenia. Typowym przykładem modelu jednokompartmentowego jest podanie leku do gałki ocznej. Ten rzadki sposób podania leku pozwala na jednolitą dystrybucję w obrębie zamkniętej przestrzeni oraz eliminację ze stałą szybkością. Istnienie kompartmentów - objętości uprzywilejowanych związane jest z wieloma cechami leku. Z cechami fizykochemicznymi i fizjochemicznymi substancji leczniczej, postacią leku, drogą podania leku, torami metabolicznymi. W chwili obecnej każda z wymienionych cech w fazie projektowania leku może być w znacznym stopniu modyfikowana w celu uzyskania pożądanych zmian w przebiegu LADME.

Stała szybkości wchłaniania - γ.

Stała ta wyraża szybkość wchłaniania leku (ang.:*Absorption Rate Constant*; niem.: *Absorptiongeschwindigkeitskonstante*). Opisuje dynamikę zmian stężenia leku w czasie jego wchłaniania (np. z przewodu pokarmowego). Stałą szybkości wchłaniania można obliczyć metodami:

- poprzez analizę odchyleń resztkowych
- Wagnera-Nelsona
- Loo - Riegelmana
- dekonwolucji danych
- wyznaczania stałej szybkości na podstawie danych pozyskanych z analizy stężeń w moczu

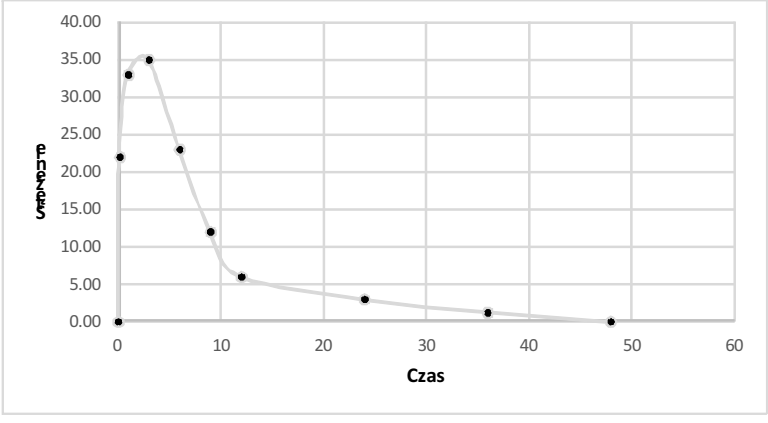
Metoda Wagnera Nelsona jest stosowana zwykle w odniesieniu do modeli jednokompartmentowych. Poniżej przedstawiono przykład obliczeń wykonanych tą metodą.

T	C Y	delta AUC	AUC	C+AUC*Kel X	Ln(X)	Ln(Y)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	3.376	
0.1667	22.00	1.83	1.83	22.12	1.962	
1	55.00	32.08	33.92	57.27		
2	65.00	60.00	93.92	71.30		
6	23.00	176.00	269.92	41.10		
9	12.00	52.50	322.42	33.62		
12	6.00	27.00	435.88	35.23		1.792
24	3.00	54.00	435.88	32.23		1.099
36	1.20	25.20	435.88	30.43		0.182
48	0.01	7.26	435.88	29.24		
		0.15	436.03	29.24		

ka/kel	ka	kel
126.43	8.4784	0.0671

t1/2ka	t1/2kel
0.08	10.34

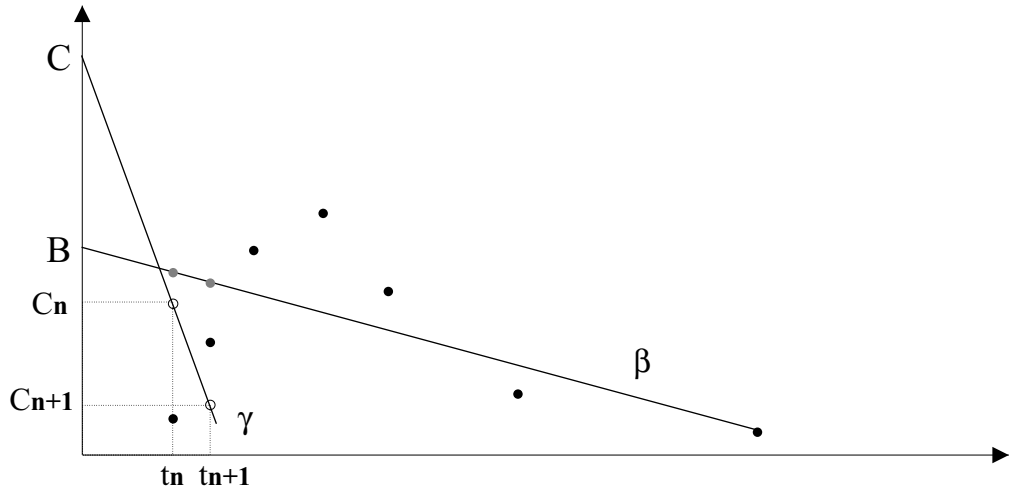
kd - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X-Y)
kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)
Clast/kel



Szybkość wchłaniania można również obliczyć na podstawie znajomości wartości conajmniej dwóch kolejnych stężeń których wartości uzyskuje się w drodze ekstrapolacji danych (ang. *stripping*). Źródłem dla wykonania obliczeń są więc wartości wyjściowe - pobrane z krzywej C-T oraz wartości je odzwierciedlające rzutowane na prostą ilustrującą proces eliminacji. Różnica pomiędzy tymi wartościami pozwala na wytyczenie biegu prostej opisującej proces wchłaniania leku. Określenie szybkości procesu absorpcji pozwala wytyczyć punkt przecięcia prostej z osią stężeń (C). Wartość tego stężenia jest składową stężenia początkowego i uwzględniana jest przy jego obliczaniu.

$$\gamma = (C_i - C_{ii}) / (t_{n+1} - t_n)$$

w ramach kinetyki procesów pierwszego rzędu Ci = Ln(Cn); Cii = Ln(Cn+1)
w ramach kinetyki procesów zerowego rzędu Ci = Cn; Cii = Cn+1



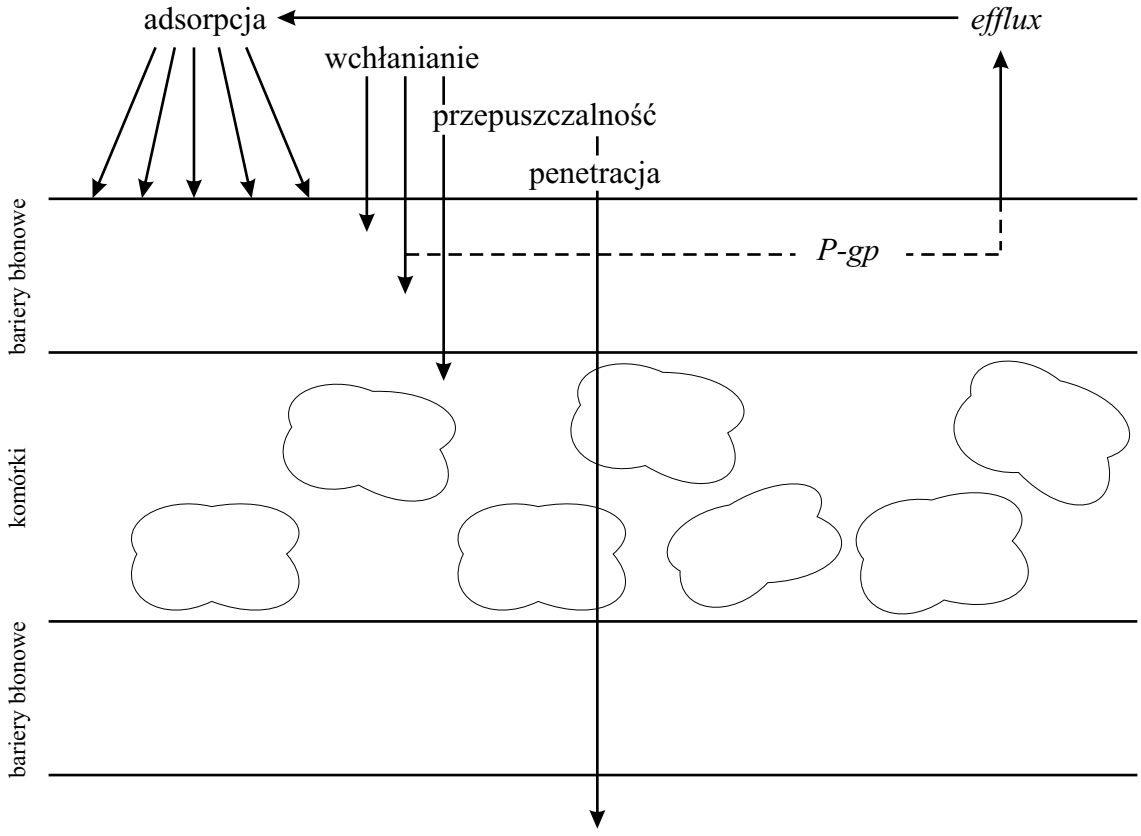
Rys. Metoda obliczania wartości stałej szybkości wchłaniania.

Stała szybkości wchłaniania zależna jest od wielu różnych czynników, głównie od drogi podania leku. W zależności od rodzaju terapii i przyczyn zaistniałej patologii czas wchłaniania leku z miejsca podania może być celowo skracany lub wydłużany. Jeżeli celem stosowania leku będzie uzyskanie stężenia leczniczego w długim odcinku czasu na powierzchni błony śluzowej lub skóry to pożądany będzie długi czas wchłaniania. Jeżeli jednak podamy doustnie lek który ma szybko osiągnąć stężenie terapeutyczne w określonych narządach to pożądany będzie krótki czas wchłaniania. Wchłanianie leku zależne jest między innymi od zdolności do pokonywania barier biologicznych. Choć organizm człowieka i zwierząt składa się głównie z wody to największe szanse w pokonywaniu barier lipidowo białkowych mają związki które dobrze się w nich rozpuszczają - związki lipofilne. Jednak nie jest to jedyna cecha która umożliwia pokonanie barier biologicznych. Duże znaczenie ma w tym wypadku stopień dysocjacji słabych elektrolitów, czyli zmiany pH w środowisku w jakim znalazł się lek. Jednak to, że lek jest w znacznym stopniu zdysocjowany nie zawsze musi oznaczać słabe wchłanianie. Nie oznacza to również wchłaniania na wymaganym poziomie. Jedną z kluczowych cech tkanki lub narządu z jakich lek jest wchłaniany jest przepływ krwi. Duże ukrwienie w obrębie na przykład jelita cienkiego gwarantuje szybkie wchłanianie. Znaczna powierzchnia pęcherzyków płucnych umożliwia także szybkie wchłanianie leków. Jeżeli priorytetem w leczeniu jest zagwarantowanie stężenia leczniczego przez długi czas czynniki zewnętrzne mają znaczny wpływ na fazę wchłaniania. Duże znaczenie dla szybkości wchłaniania mają zarówno fizjochemiczne cechy leku, jak i anatomia oraz fizjologia tkanki lub organu z którego są wchłaniane.

Lek podany do przewodu pokarmowego w odpowiedniej postaci może długo uwalniać substancję leczniczą. Jednak w wyniku zaburzeń w perystaltyce może zostać szybko usunięty wraz z kałem. Ponadto zwykle organizm narażony jest na interakcje leku ze składnikami pokarmu. Wybór postaci leku i dostosowanie jej do potrzeb terapeutycznych nie zawsze pozwala na rozwiązania optymalne. Często prowadzi do kompromisu związanego z modyfikacją nie tylko postaci leku i czasu wchłaniania lecz także modyfikacji substancji aktywnej leku. Proces wchłaniania leku opisywany między innymi za pomocą stałej szybkości wchłaniania, jest procesem wielofazowym. W jego skład wchodzą:

- adsorpcja (ang.: *Adsorption*)
- wchłanianie (ang.: *Absorption*)
- penetracja (ang.: *Penetration*)
- kumulacja (ang.: *Kumulation*)
- przepuszczalność (ang.: *Permeability*)
- wypompowywanie (ang.: *Efflux*)
- redystrybucja na poziomie błony lub komórki (ang.: *Redistribution*)

Każdy z wymienionych procesów kinetycznych jest obecnie opisywany za pomocą specyficznych dla niego metod. Nie tylko w fazie farmaceutycznej (dezintegracja postaci leku, rozpad postaci leku, rozpuszczenie leku) ale także w biofazie, ocenie zjawiska wchłaniania podlega wiele składowych (Sucker H. i wsp. 1978). Opis ten jest złożony i realizowany we wszystkich trzech środowiskach analizy PK czyli *in vivo*, *in vitro* oraz *in siliko*.



Rys. Kluczowe elementy fazy wchłaniania.

Czas opóźnienia wchłaniania - tlag.

tlag w ujęciu klasycznym obejmuje czas jaki mija od podania leku do znalezienia się we krwi. W niektórych badaniach PK czas opóźnienia wchłaniania opisuje jakościowo także inne kierunki transportu. Zwykle czas ten przyjmuje wartość równą zero. Tak dzieje się w przypadku donaczyniowego podania leku np w postaci iniekcji. Czas ten opisuje opóźnienie z jakim rozpoczyna się proces wchłaniania leku i nazywany jest czasem opóźnienia wchłaniania - tlag (ang.: *Lag Time*; niem.: *Verzogerungszeit*). Obliczenia czasu opóźnienia wchłaniania najczęściej ograniczają się w rozpatrywanym układzie do prognozowania wartości punktu przecięcia krzywej stężeń z osią czasu. Do obliczenia wartości tlag można użyć wartości składowych stężenia początkowego uzyskanych po wykonaniu charakterystyk procesów absorpcji (C; γ) i eliminacji (B; β).

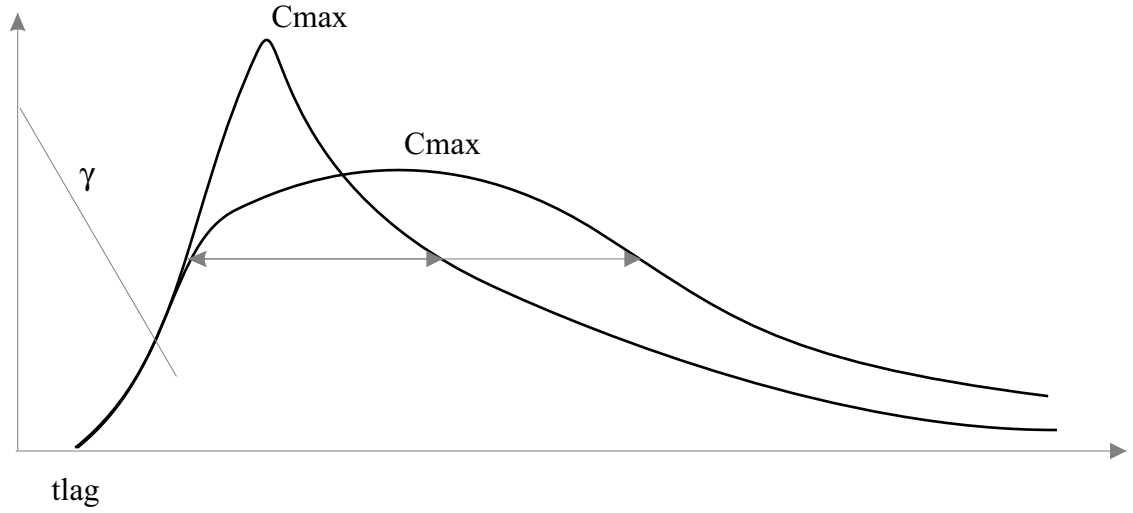
$$\mathbf{tlag = (LnB - LnC) / (\beta - \gamma)}$$

B - stężenie ekstrapolowane dla fazy eliminacji
C - stężenie ekstrapolowane dla fazy absorpcji
β - stała szybkości eliminacji
γ - stała szybkości absorpcji

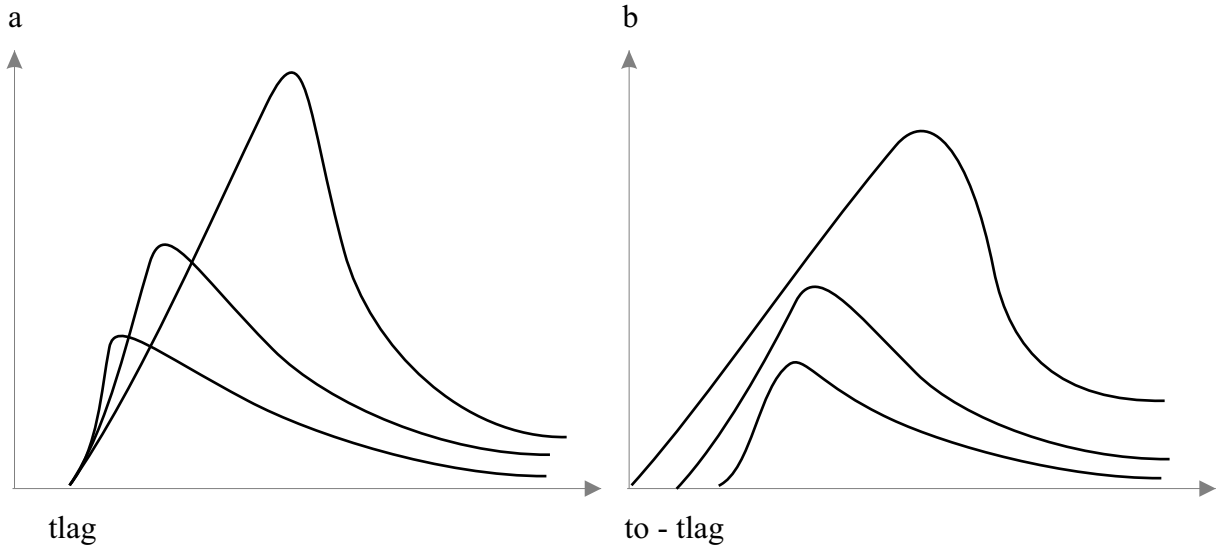
Czas opóźnienia wchłaniania leku jest bardzo ważnym parametrem który opisuje postać leku. Na dokładność wyznaczenia tego parametru znaczny wpływ ma czułość metody analitycznej, pozwalającej na wykrycie leku w odpowiednio niskich stężeniach. W celu dokładnego obliczenie tlag potrzebna jest także jak największa liczba danych dla krzywej C-T szczególnie w czasie od t(o) do tmax. Wydłużaniu czasu opóźnienia wchłaniania sprzyja wydłużenie czasu dezintegracji - rozpadu postaci leku oraz rozpuszczania substancji aktywnej. Najczęściej dotyczy to takich postaci leku jak tabletka lub drażetka. Struktura taka sprzyja wydłużaniu czasu uwalniania leku. Powoduje to niekorzystne zmiany fazy rozpuszczania substancji leczniczej w określonej przestrzeni kinetycznej. Nieco inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku postaci o kontrolowanym, powolnym uwalnianiu leku. Tutaj powolna dezintegracja postaci leku nie musi wiązać się z wydłużeniem czasu opóźniania wchłaniania. tlag poza cechami samej postaci leku może wydłużać wiele innych czynników:

- niewydolność krążenia, słaby przepływ krwi przez kompartment docelowy
- silne wiązanie leku z białkami
- zmiany patologiczne śluzówki przewodu pokarmowego
- niekorzystne zmiany pH środowiska
- duża ilość pokarmu
- zaburzenia perystaltyki
- wiązanie leku ze składnikami pokarmu i tworzenie niewchłanialnych kompleksów

Stosunek tlag / γ stanowi cenne narzędzie w przypadku porównywania fazy wchłaniania dwóch różnych postaci leku. Wartość ta określa do pewnego stopnia to czy opóźnienie we wchłanianiu zależne jest od postaci leku czy od innych mechanizmów towarzyszących wchłanianiu. W przypadku badania rzędowości fazy wchłaniania wartość tlag / γ jest również cennym narzędziem oceny roli postaci leku i mechanizmów towarzyszących wchłanianiu. Dla leków o długim czasie uwalniania sposobem na optymalizację farmakokinetyczną procesu wchłaniania jest porównywanie pola powierzchni trójkąta wytyczonego przez tmax, tlag, Cmax i opisanego przez stałą szybkości wchłaniania γ. Długi czas opóźnienia wchłaniania prawie zawsze kwalifikowany jest jako cecha niekorzystna. Zwykle długi czas tlag wiąże się ze skróceniem czasu trwania stężenia efektywnego a także pola powierzchni nad poziomem stężenia efektywnego. Długi tlag generuje zawsze większy błąd przy zaistniałych już błędach w dawkowaniu leku. Szczególnie gdy do danego przypadku terapeutycznego dobrany został zbyt długi interwał dawkowania τ. Stwarza to zagrożenie utworzenia długich luk czasowych w których stężenie terapeutyczne pomiędzy kolejnymi dawkami leku nie jest osiągane. W przypadku środków przeciwbakteryjnych prowadzi to do szybkiego rozwijania zjawiska oporności na stosowany lek.

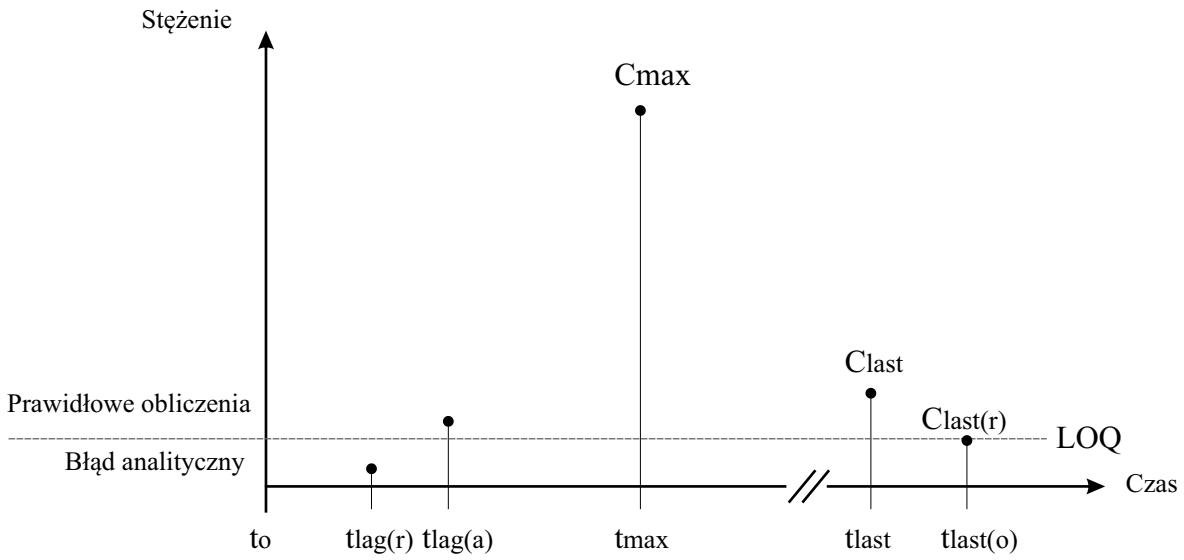


Rys. Symulacja krzywej C-T dla dwóch równych wartości tlag i γ i różnej wartości Cmax
Symulacja dla leku tradycyjnego i postaci o przedłużonym uwalnianiu substancji czynnej.



Rys. Zmiany fazy wchłaniania zależne od dawki z niezmienionym tlag - wykres a.
Zmiany tlag zależne od dawki leku - wykres b.

Czas opóźnienia wchłaniania jest ważnym parametrem opisującym kinetykę fazy wchłaniania. Często pewną trudność w jego wyznaczeniu w klasycznych modelach obliczeniowych może przysparzać zbyt małe zagęszczenie danych doświadczalnych. tlag ma ścisłe odniesienie do wartości tmax i t=o. Jednak w badaniach porównawczych dopiero bardzo dokładne metody analityczne i precyzyjne planowanie badań może zagwarantować odpowiednią analizę zmienności tlag. Szczególne znaczenie ma w tym wypadku również LOQ.



tlag(r) - prawdziwy czas opóźnienia wchłaniania
tlag(a) - czas opóźnienia wchłaniania obliczony w warunkach stosowanej metody analitycznej
to - czas = zero
tlast - czas analizy ostatniej próbki doświadczalnej
tlast(o) - optymalny czas analizy ostatniej próbki doświadczalnej
Clast - stężenie leku w ostatniej próbce doświadczalnej w warunkach stosowanej metody analitycznej
Clast(r) - realne stężenie leku w ostatniej próbce doświadczalnej
LOQ - granica oznaczalności
Cmax - stężenie maksymalne
tmax - czas wystąpienia stężenia maksymalnego

Rys. Związek pomiędzy LOQ a tlag.

Stąd prawidłowość obliczeń dotyczących fazy absorpcji oraz tlag gwarantuje spełnienie zasady:

$$\mathbf{LOQ < C_{tlag}}$$

Ctlag - stężenie wyznaczone na osi Y przez tlag

Stała szybkości dystrybucji - α.

Stała szybkości dystrybucji (ang.: *Distributionrateconstans;* niem.: *Verteilungsgeschwindigkeitskonstante*) charakteryzuje przebieg procesów dystrybucji opisując ich dynamikę. Na opisane procesy składają się w tym wypadku procesy dystrybucji leku z osocza.

Jednym ze sposobów obliczania stałej jest analiza oparta na wartości conajmniej dwóch stężeń których ekstrapolowane odpowiedniki oraz czas ich rejestracji określają prędkość procesu (ang. *stripping*). W celu obliczenia stałej podobnie jak w przypadku stałej β należy wybrać parę danych jakie pobrane zostaną do obliczeń. Takich danych które opiszą proces dystrybucji leku do tkanek.

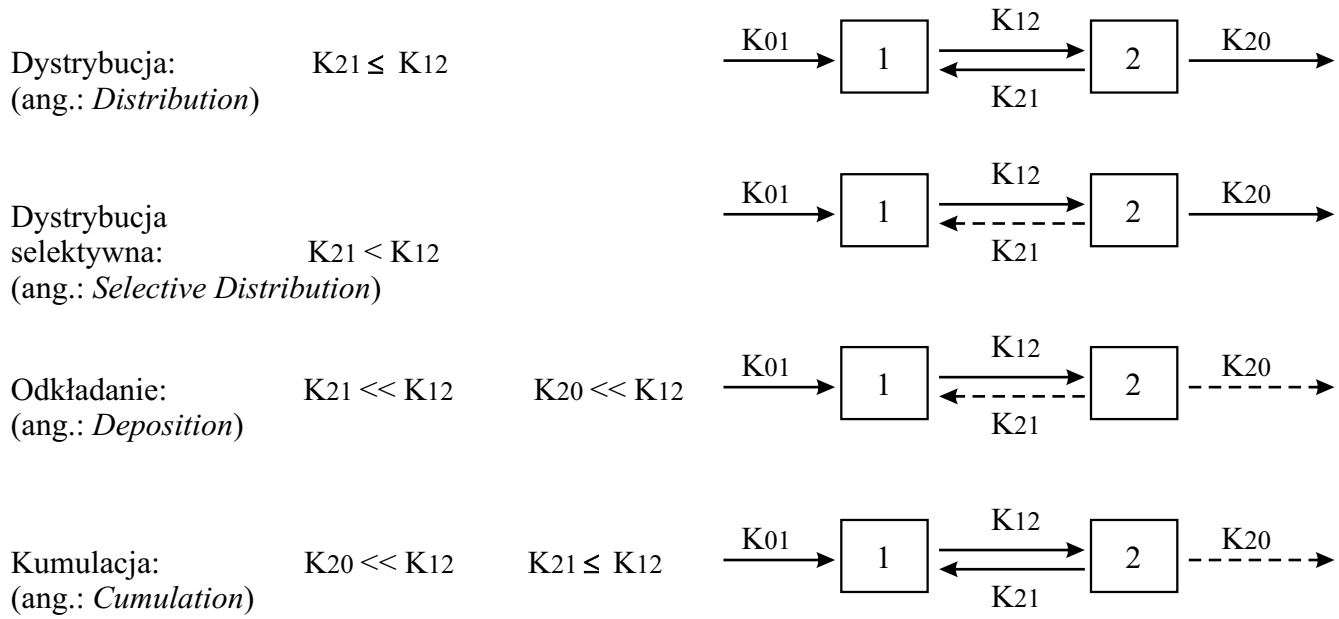
$$\alpha = (Ci - Cii) / (tn+1 - tn)$$

w ramach kinetyki procesów pierwszego rzędu Ci = Ln(Cn exp); Cii = Ln(Cn exp+1)
w ramach kinetyki procesów zerowego rzędu Ci = Cn exp; Cii = Cn exp+1

Rys. Metoda obliczania wartości stałej szybkości dystrybucji.

Stała tą w modelach kompartmentowych obliczyć można jedynie dla modelu w którym możliwa jest do wyodrębnienia faza dystrybucji (model dwukompartmentowy). Dzięki znajomości tego parametru można między innymi określić okres półtrwania leku w tej fazie. Analiza przebiegu fazy dystrybucji pozwala stwierdzić jak szybka jest dystrybucja leku do tkanek z krwi oraz w kierunku przeciwnym. Dzięki znajomości stałej szybkości dystrybucji leku do tkanek można obliczyć klirens dystrybucyjny leku. Dla dokładnie wyznaczonej krzywej C-T możliwe jest dla niektórych leków obserwowanie procesów redystrybucji. Najczęściej dotyczą one krążenia wątrobowo jelitowego leku. Faza dystrybucji leku najczęściej dobrze wyrażona jest na wykresach C-T dla donaczyniowego podania leku. Zwykle szybkiej dystrybucji z kompartmentu centralnego do tkanek ulegają leki lipofilne a jednocześnie niezwiązane z białkami krwi. Proces wiązania leku z białkami krwi ogranicza dystrybucję leku. Jednak pomiędzy frakcją związaną i frakcją podlegającą dystrybucji zachodzi stan dynamicznej równowagi którego charakter w znacznym stopniu uwarunkowuje przebieg krzywej C-T. Dystrybucja leku w organizmie nie kończy się jednak na osiągnięciu określonej tkanki. Dystrybucja leku trwa aż do momentu związania ostatnich wolnych cząsteczek leku w trwałych związkach z tkankami i do czasu eliminacji wszystkich wolnych cząsteczek leku. Kierunki dystrybucji leku w tkankach zależne są w głównej mierze od jego cech fizykochemicznych oraz specyficznych torów metabolicznych jakim ulega. Duże znaczenie w dystrybucji leku pomiędzy tkankami mają procesy transportu aktywnego leku, pKa, pH. Pośredniczą w nich osocze, chłonka, żółć, ślina, soki trawienne.

Faza dystrybucji dla wielu substancji jest niejednorodnym i wieloetapowym okresem zmian stężenia leku w wielu różnych układach błonowych, tkankach i komórkach jednocześnie. Jest procesem o znacznej dynamice w trakcie którego dochodzi nie tylko do zmian ilościowych ale również najważniejszych zmian jakościowych cząsteczek leku. O dystrybucji leku w skali makro decyduje jednoczesne pojawienie się wielu procesów wchłaniania w skali mikro. Faza dystrybucji wiąże się więc nierozerwalnie z wchłanianiem a dokładnie z procesami penetracji i przenikania. Ekspansja cząsteczek leku opisywana bezpośrednio stałą szybkości dystrybucji oraz objętością dystrybucji modulowana jest przez mechanizmy eliminacji. Eliminacja i jej odniesienie do procesów redystrybucyjnych pozwala definiować różne rodzaje dystrybucji w relacji organizm - tkanka.



1 - organizm
2 - tkanka
K01 - stała szybkości absorpcji
K20 - stała szybkości eliminacji
K12 - stała szybkości dystrybucji leku do tkanki
K12 - stała szybkości redystrybucji leku z tkanki

Rys. Podział procesów dystrybucji definiowany procesami redystrybucji i eliminacji w skali makro.

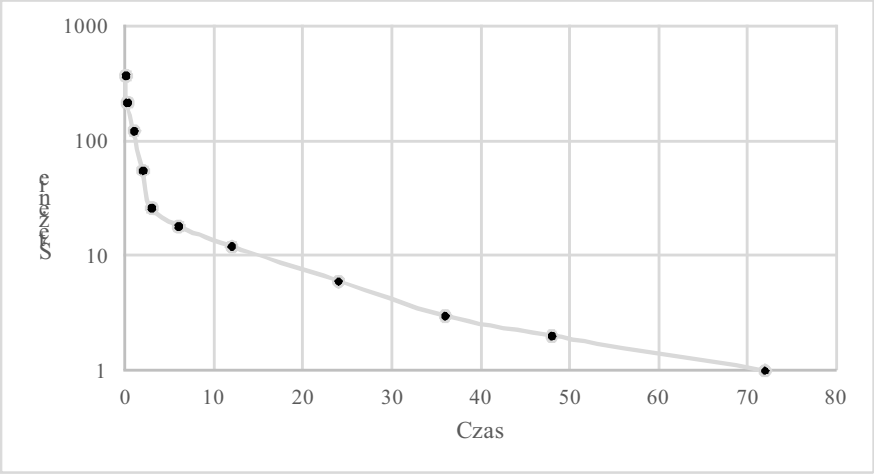
Poniżej przedstawiono przykładowe obliczenia stałej szybkości dystrybucji.

T	C	B x e^(kel*t)		
	X	Y	Ln(X-Y)	Ln(X)
0.0833	368.50	4.77	5.90	
0.25	215.00	4.75	5.35	
1	122.00	4.64	4.77	
2	55.00	4.51		
3	26.00	4.37		
6	18.00	3.99		
12	12.00	3.33		
24	6.00	2.32		
36	3.00			1.099
48	2.00			0.693
72	1.00			0.000

B	kd	kel
4.786	1.0944	0.0303

t1/2ka	t1/2kel
0.63	22.89

kd - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X-Y)
kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)
B - punkt przecięcia z osią Y prostej wyznaczonej dla T oraz X



Stała szybkości eliminacji - β.

Stała szybkości eliminacji (ang.: *Elimination Rate Constans;* niem.: *Eliminations - geschwindigkeitskonstante*) charakteryzuje przebieg procesów eliminacji i opisuje ich szybkości. Na opisane procesy składają się w tym wypadku wszystkie składowe procesów eliminacji w organizmie. Szybkość eliminacji w wymiarze innych parametrów farmakokinetycznych jest wypadkową objętości dystrybucji i klirensu.

$$\beta = Cl_{(b)} / Vd$$

Fakt ten ma duże znaczenie w ustalaniu dawkowania leku, monitorowania jego stężenia w osoczu i interpretacji procesów jakim lek ulega w fazie dystrybucji i eliminacji. Przy stałej wartości klirensu wzrost objętości dystrybucji powoduje wydłużenie czasu oczyszczania organizmu z leku. Efektem jest większa wartość stałej szybkości eliminacji a co za tym idzie wydłużenie okresu półtrwania leku. Praktyczne zastosowanie informacji płynących z tej zależności ma miejsce np. w przypadku określania dawki leku w przeliczeniu na beztłuszczową masę ciała.
W sytuacji stałej wartości objętości dystrybucji, wzrost wartości klirensu powoduje przyspieszenie eliminacji leku z ustroju. To z kolei przyczynia się do zmniejszenia wartości β i skrócenia okresu półtrwania w fazie eliminacji. Stałą szybkości eliminacji można obliczyć na podstawie znajomości co najmniej wartości dwóch stężeń i odpowiadających im czasów w których zostały zarejestrowane. W celu obliczenia stałej należy określić parę danych jakie pobrane zostaną do obliczeń i opiszą analizowany proces kinetyczny.

$$\beta = (Ci - Cii) / (t_{n+1} - t_n)$$

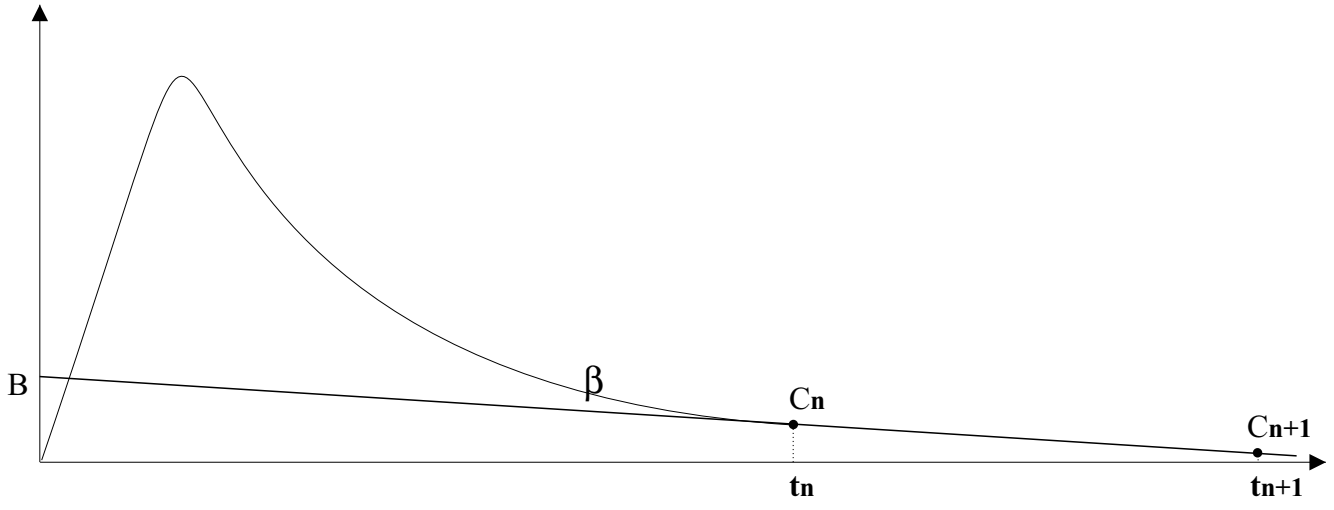
w ramach kinetyki procesów pierwszego rzędu Ci = Ln(Cn); Cii = Ln(Cn+1)
w ramach kinetyki procesów zerowego rzędu Ci = Cn; Cii = Cn+1

W przypadku klasycznego modelu jednokompartmentowego stała tą można obliczyć również korzystając z formuły:

$$\beta = 1 / MRT$$

w modelu dwukompartmentowym:

$$\beta = (K_{10} \times K_{21}) / (K_{12} + K_{21})$$



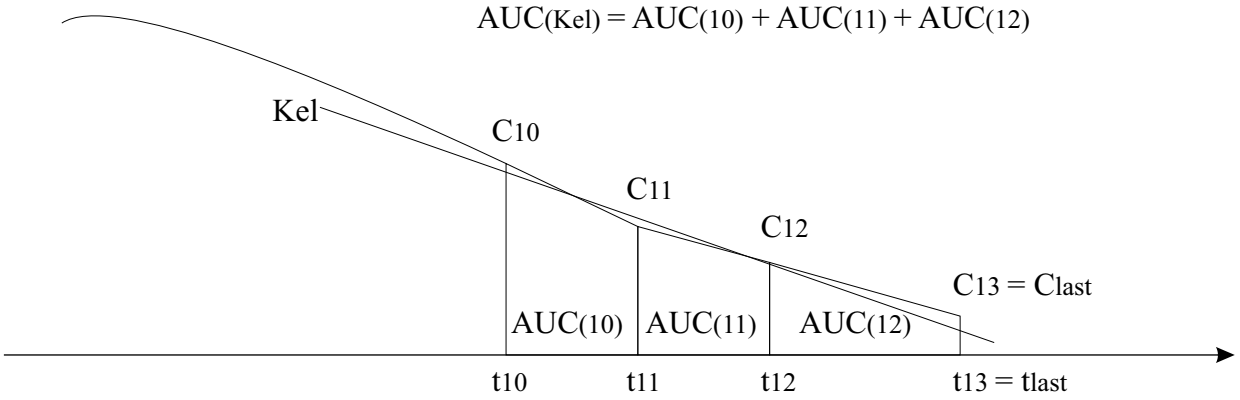
Rys. Dane do obliczania wartości stałej szybkości eliminacji.

Stała szybkości eliminacji reprezentuje szybkość procesów eliminacji w skład których wchodzą zarówno procesy wydalania - E (ang.: *Excretion*) jak i metabolizmu (ang.: *Metabolism*) - M. Stąd można ją określić jako sumę stałych szybkości opisujących te dwie grupy zdarzeń.

$$\beta = K_E + K_M$$

KE - stała szybkości dla procesów wydalania
KM - stała szybkości dla procesów metabolizmu

Stała β w modelu jednokompartmentowym często opisywana jest jako K, Kel lub λz. Zależna jest od nachylenia końcowego odcinka krzywej C-T, który w praktyce traktowany jest jako styczna. Wszelkie różnice w jej wartości mają poważny wpływ między innymi na wartość okresu półtrwania leku w fazie leiminacji ($t_{1/2/\beta}$). W czasie wyłaniania par danych do obliczania stałych prędkości często rodzi się pytanie które z danych reprezentują w pełni obserwowany proces. Pobór par danych kontrolować można porównując obliczone na ich podstawie pole powierzchni AUC(expo) z polem powierzchni AUC (o-α). Przy optymalnym modelu i obliczeniu A,B, α,β, pola: AUC(expo) i AUC (o-α) powinny mieć zbliżone wartości. Znaczne różnice w wartości tych pól wskazują najczęściej na błędne typowanie danych i złe dopasowanie danych do modelu. Obecnie do obliczania tej wartości pobiera się zwykle od 3 do 5 par danych z końcowego odcinka krzywej C-T. Jednak pobieranie danych z ostatniej pary zwiększa błąd w wykonywanych obliczeniach PK. Powodem tego są warunki jakie muszą spełniać metody analityczne w badaniach PK. Punkty w krzywej kalibracyjnej w metodzie analitycznej może cechować zmienność w poszczególnych etapach walidacji na poziomie do 15 %. Jednak w przypadku LOQ który często tożsamy jest z wartością Clast odchylenie to może sięgać 20%. Stąd ostatni pomiar nie jest zupełnie równoważny poprzedzającym. Poddając analizie wiele krzywych C-T w analizie porównawczej często uwzględnia się procentowy udział AUC które odczytano w granicach punktów poboru danych do obliczeń stałej szybkości eliminacji w stosunku do AUC totalnego..



Ryc. Analiza AUC w przedziale punktów poboru danych do obliczeń stałej szybkości eliminacji.

Eliminacja leku z organizmu jest procesem ściśle uzależnionym od szybkości i miejsca wchłaniania oraz kierunku dystrybucji leku. Modelowanie tych dwóch faz często pozwala optymalizować eliminację i zmienić wartość stałej szybkości eliminacji do oczekiwanej wartości. Mechanizm eliminacji leku z punktu widzenia fizjologii jest uzależniony od trzech podstawowych elementów:

- obecności enzymów modyfikujących cząsteczkę leku
- przepływu krwi i innych płynów ustrojowych przez tkanki
- aktywnego wypompowywania leku (ang.: *Efflux*) przez białka typu P-gp

Z punktu widzenia farmakokinetyki eliminację w największym stopniu definiują:

- budowa chemiczna leku
- droga podania leku
- postać leku

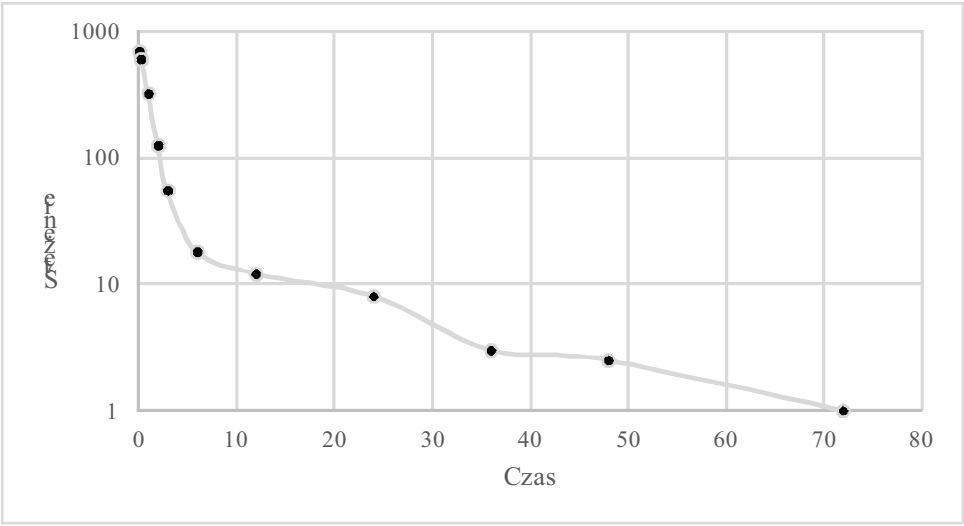
Poniżej przedstawiono przykładowe obliczenia stałej szybkości eliminacji w różnych wariantach na jednej grupie danych.

T	C	Warianty kel					
		LnC	LnC	LnC	LnC	LnC	LnC
0.0833	688.00						
0.25	599.00						
1	321.00						
2	125.00						
3	55.00						
6	18.00	2.890	2.890				
12	12.00	2.485	2.485	2.485			
24	8.00	2.079	2.079	2.079	2.079		
36	3.00	1.099		1.099	1.099		1.099
48	2.50	0.916	0.916		0.916	0.916	0.916
72	1.00	0.000	0.000			0.000	0.000

kel						RSD%
0.0439	0.0435	0.0578	0.0485	0.0382	0.0316	18.53
B						
15.370	15.965	16.667	12.750	5.500	5.107	40.49
t1/2kel=ln(2)/kel						
15.80	15.95	12.00	14.30	18.16	21.93	19.00

kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)

B - punkt przecięcia z osią Y prostej wyznaczonej dla T oraz C



Farmakokinetyka flip-flop

Farmakokinetykę flip-flop charakteryzuje różnica między stałą szybkości wchłaniania oraz eliminacji na korzyść tej drugiej. Wartość ka w kinetyce tego typu jest większa od kel (wchłanianie przebiega wolniej niż eliminacja). Stąd jeśli w obu wypadkach poniżej mamy do czynienia z procesami pierwszego rzędu:

$$Ka = 0.05\ h^{-1} \text{ to } t1/2ka = \ln(2)/0.05 = 13.86\ h$$

$$Kel = 0.5\ h^{-1} \text{ to } t1/2kel = \ln(2)/0.5 = 1.386\ h$$

Kinetyka flip-flop dotyczy wyłącznie leków podanych drogą pozanaczyniową. Warunkiem jej wystąpienia jest obecność fazy wchłaniania leku. W przypadku kinetyki flip-flop typowe metody obliczeniowe odnoszące się do parametrów farmakokinetycznych zwykle powodują obliczenie parametrów PK obarczonych błędem. Dotyczy to w szczególności takich parametrów jak stała szybkości eliminacji czy MRT. W takim przypadku wartość stałej szybkości eliminacji jest uwarunkowana wartością stałej szybkości wchłaniania. Rzeczywista wartość kel w przypadku wystąpienia kinetyki flip-flop może być wyznaczona dopiero po podaniu dożylnym. Natomiast faktyczna wartość ka po podaniu pozanaczyniowym może być wyznaczona na podstawie analizy końcowego fragmentu krzywej zmian stężeń (residuals stripping).

$$\mathbf{LogCp = LogKa \times F \times [(D/V) \times (ka-kel)]-ka \times (t/2.3)}$$

$$\mathbf{Cl = kel \times V}$$

$$\mathbf{V1 = kab / V}$$

$$\mathbf{f = (Cp + Kel \times AUC0\text{-}t) / (Kel \times AUC0\text{-}t)}$$

jeżeli kel =1/tmax lub Kel/Ka = 1

$$\mathbf{MAT = MRT-(1/kel)}$$

$$\mathbf{ka=1/[MRT-(1/ke)]}$$

V – objętość dystrybucji obliczona dla kompartmentu centralnego
V1 – objętość dystrybucji obliczona dla kompartmentu wchłaniania
F – biodostępność
D – dawka
Cp – stężenie w osoczu w czasie t
f – frakcja która uległa wchłonięciu
MRT – średni czas przebywania leku w organizmie
MAT – średni czas wchłaniania leku

Czynniki które zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia kinetyki typu flip-flop to:

- formulacje o wydłużonym lub kontrolowanym uwalnianiu
- formulacje o wydłużonej lub kontrolowanej dyfuzji substancji czynnej
- dekanoniany, enantany (flufenazyna, haloperidol)
- wysycenie procesu wchłaniania
- ograniczenie eliminacji
- marskość wątroby
- obniżona eliminacja wraz z moczem
- podanie podskórne lub domięśniowe

Przykłady leków w przypadku których zidentyfikowano kinetykę typu flip-flop

feksofenadyna
dobesylan wapnia
karbowir
kwas meklofenamowy
indometacyna (drób)
amprolium (drób)
kwas foliowy (świnia)
sulfadimetoksyna (wielbłąd)
danofloksacyna (bydło)
katechiny, epikatechiny (szczur)
epitiostanol (szczur)
metyloprednizolon (szczur)
amoksycylina z kwasem klawulanowym (koza)
difloksacyna (koń)
oksytetracyklina (owca)
cilostazol
wildagliptyna
dabigatran
ludzki rekombinowany interferon beta (królik)

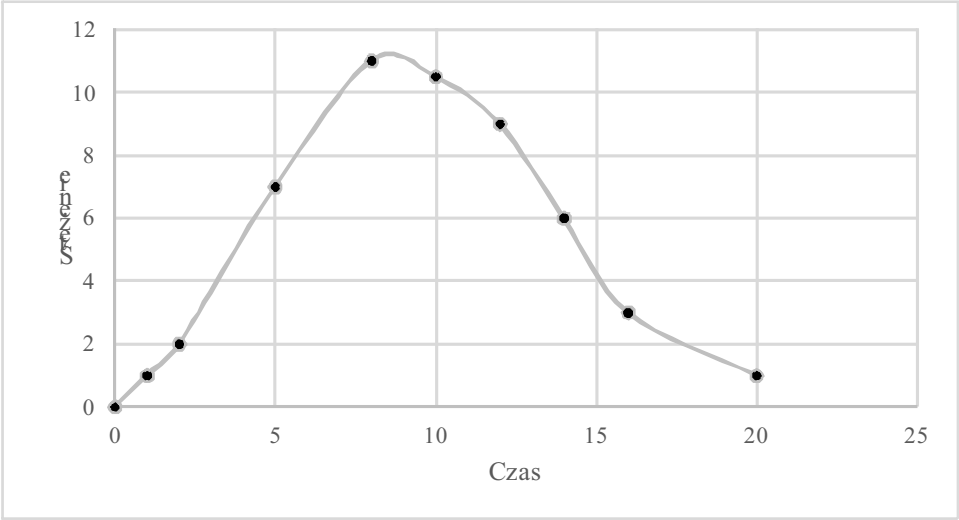
Przykład różnic w wartościach Kab oraz Kel w kinetyce typu flip-flop podano poniżej:

T	C	delta AUC	AUC	C+AUC*Kel		
	Y			X	Ln(X)	Ln(Y)
0	0.00	0.00	0.00	0.00	3.558	
1	1.00	0.50	0.50	1.15	3.525	
2	2.00	1.50	2.00	2.59	3.481	
5	7.00	13.50	15.50	11.58	3.158	
8	11.00	27.00	42.50	23.55		
10	10.50	21.50	64.00	29.39		
12	9.00	19.50	115.50	43.10		
14	6.00	15.00	115.50	40.10		1.792
16	3.00	9.00	115.50	37.10		1.099
20	1.00	8.00	115.50	35.10		0.000
		3.39	118.89	35.10		

ka/kel	ka	kel
0.28	0.0834	0.2952

t1/2ka	t1/2kel
8.31	2.35

kd - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X-Y)
kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)
Clast/kel



Referencje:

Yáñez JA, Remsberg CM, Sayre CL, Forrest ML, Davies NM. Flip-flop pharmacokinetics--delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. Ther Deliv. 2011 2(5):643-72.

Garrett ER. The Bateman function revisited: a critical reevaluation of the quantitative expressions to characterize concentrations in the one compartment body model as a function of time with first-order invasion and first-order elimination. J Pharmacokinet Biopharm. 1994 Apr;22(2):103-28

Garrett ER. Simplified methods for the evaluation of the parameters of the time course of plasma concentration in the one-compartment body model with first-order invasion and first-order drug elimination including methods for ascertaining when such rate constants are equal. J Pharmacokinet Biopharm. 1993Dec;21(6):689-734. Erratum in: J Pharmakinet Biopharm 1994 Apr;22(2):179.

Stałe szybkości.

Obliczenia stałych szybkości ilustrujących szybkość z jaką przebiega proces chemiczny wychodzą z założenia iż można obliczyć szybkość każdego procesu jeżeli znana będzie wartość zmian stężenia w przedziale czasu w którym ta zmiana zachodzi. Wiedząc że stężenie substancji spada od Cn do wartości Cn+1 a proces ten odbywa się w przedziale czasowym usytuowanym pomiędzy czasem tn a tn+1 można przedstawić równanie opisujące szybkość zachodzącego procesu w zależności od rzędowości badanej fazy kinetycznej.

kinetyka pierwszego rzędu $K = (LnC_n - LnC_{n+1}) / (t_{n+1} - t_n)$

kinetyka zerowego rzędu $K = (C_n - C_{n+1}) / (t_{n+1} - t_n)$

Równania te pozwalają określić stałą szybkości badanego procesu dla tzw. badań trwałościowych leków. Przydatną formułą jest tu równanie pozwalające na obliczenie czasu przydatności leku do leczenia. Przy obliczaniu czasu trwałości wykorzystano stałą szybkości rozpadu substancji aktywnej.

$$T = (2.303 / K) \times Log (C_o / C_n)$$

T - czas po którym lek zwierać będzie substancję czynną w wartości > Cn
Cn - graniczne stężenie substancji czynnej przy której lek spełnia wymogi
K - stała szybkości spadku zawartości substancji aktywnej
Co - stężenie wyjściowe substancji aktywnej w danym leku

W kinetyce reakcji chemicznych znak ujemny bądź dodatni dla obliczonej stałej szybkości ilustruje wartość po stronie substratów i produktów.

Stałe szybkości określają szybkość procesów kinetycznych gwarantujących przemieszczanie się leku w organizmie. Stałe te wybiórczo mogą opisywać kolejne procesy farmakokinetyczne takie jak wchłanianie - A, dystrybucję - D i eliminację - E (metabolizm i wydalanie). Ich wzajemne porównanie prowadzi do obliczenia stanu dynamicznej równowagi pomiędzy poszczególnymi procesami kinetycznymi. Powiązanie danych dotyczących szybkości procesów kinetycznych A, D, E ze stężeniami jakie lek osiąga w tkankach pozwala obliczyć stałe szybkości przemieszczania się leku pomiędzy kompartmentami - K (Baggot J.D. 1977). Za pomocą wymienionych stałych można opisywać:

szybkość przechodzenia leku z kompartmentu centralnego (1) do obwodowego (2) - K_{12},

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10}$$

szybkość przechodzenia leku z kompartmentu centralnego (1) do obwodowego (2) - K_{12}, z uwzględnieniem eliminacji z kompartmentu obwodowego K20.

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{20}$$

szybkość przechodzenia leku z kompartmentu obwodowego (2) do centralnego (1) - K21,

$$\mathbf{k21 = (A \times \beta + B \times \alpha) / (A + B)}$$

lub

$$\mathbf{K21 = \alpha + \beta - k12 - k10}$$

lub uwzględniając eliminację z kompartmentu obwodowego

$$\mathbf{K21 = \alpha + \beta - k12 - k20}$$

szybkość eliminacji leku z kompartmentu centralnego - K10,

$$\mathbf{K10 = (\alpha \times \beta) / k21}$$

gdzie

$$\mathbf{K10 = Kr + Km + Kb}$$

Przy czym często Kel (β) dla modelu dwukompartmentowego i podania donaczyniowego opisywana jest jako:

$$\mathbf{K_{el} = (K10 \times k21) / (K12 + k21)}$$

$$\mathbf{K_{el} = (K20 \times k21) / (K12 + k21)}$$

Kr - stała szybkości eliminacji dla nerek
Km - stała szybkości eliminacji metabolicznej
Kr - stała szybkości eliminacji dla żółci

szybkość eliminacji leku z kompartmentu obwodowego - K20,

$$\mathbf{K20 = (\alpha \times \beta) / k12}$$

Stosunek stałych szybkości do siebie opisują równania:

$$\alpha + \beta = \mathbf{K12 + K21 + K10} \qquad \alpha + \beta = \mathbf{K12 + K21 + K20}$$

$$\alpha \times \beta = \mathbf{K12 \times K21 \times K10} \qquad \alpha \times \beta = \mathbf{K12 \times K21 \times K20}$$

Zwykle wartość stałych opisuje jednostka h^{-1}. Jeżeli więc wartość stałej wynosi 0.05 h^{-1} oznacza to że stężenie leku zmienia się w ciągu godziny o 5% aktualnej wartości. Szybkości zjawisk kinetycznych jakie można uchwycić w organizmie opisują:

- zmiany stężenia leku we krwi
- zmiany stężenia leku w tkankach
- zmiany stężenia metabolitów i części leku jaka została poddana procesom wydalania

Są to parametry opisujące typowe zmiany przebiegu C-T. Stężenie leku we krwi od momentu podania leku początkowo wzrasta (pozanaczyniowe podanie leku) osiąga stężenie maksymalne a później utrzymuje tendencję spadkową. Stężenie leku w tkankach organizmu wzrasta wraz z rozpoczęciem fazy dystrybucji leku czyli wraz z początkową fazą spadku stężenia leku we krwi. W momencie uruchomienia procesów metabolizmu i wydalania stężenie leku w tkankach także zaczyna spadać.

Po zakończeniu fazy wchłaniania leku stężenie leku w organizmie uzyskuje wartość maksymalną. Od tego momentu rozpoczyna się rozmieszczanie leku i eliminacja. Wzrasta więc stężenie metabolitów i leku poddanego procesom eliminacji. Stałe szybkości pozwalają obserwować procesy kinetyczne jakim lek ulega w organizmie a także w układach *in vitro*. Dają możliwość opisania:

Parametrów postaci farmaceutycznej:

- szybkości rozpadu (postaci leku)
- szybkości rozpadu substancji aktywnej (tzw. badania trwałościowe)
- szybkości rozpuszczania
- szybkości uwalniania

Parametrów zmian w biofazie:

- szybkości absorpcji
- szybkości dystrybucji
- szybkość procesów metabolicznych
- szybkości eliminacji

Typowe procesy farmakokinetyczne to procesy równoległe bądź procesy mające charakter reakcji następczych (Danek A. 1978). Oznacza to że równolegle z uwalnianiem następuje wchłanianie i że następczą fazą - rezultatem wchłaniani jest dystrybucja leku, natomiast jej konsekwencją jest eliminacja. Przyjmuje się także że poszczególne procesy składające się na całość drogi jaką lek przebywa w organizmie mają najczęściej charakter reakcji pierwszego rzędu. Porównywanie stałych szybkości pozwala ujawnić kiedy w badanym przedziale pojawia się stan równowagi i pozwala obliczyć stałą równowagi. Wartości te pozwalają na obliczanie stężenia w badanych przestrzeniach, lub organach.Porównanie takie dla reakcji równoległych umożliwia równanie:

$$K_1 + K_2 = 1 / t_n \times Ln [C_o / (C_o - C_n)]$$

K1 - stała szybkości pierwszej reakcji
K1 - stała szybkości drugiej reakcji
tn - czas odpowiadający stężeniu Cn
Cn - stężenie w czasie tn
Co - stężenie początkowe

Reakcje następcze typu wchłanianie - dystrybucja - eliminacja i charakteryzujące te fazy stałe szybkości mogą posłużyć za punkt wyjściowy do porównania tych stałych. Można wskazać równanie w którym porównanie stałej szybkości absorpcji i eliminacji umożliwi obliczenie tmax dla uzyskanej krzywej:

$$t_{max} = [1 / (\beta - \gamma)] \times Ln(\beta / \gamma)$$

β - stała szybkości eliminacji
γ - stała szybkości absorpcji

Stężenie początkowe - Co.

Stężenie początkowe Co jest parametrem informującym o wartości stężenia leku w osoczu w chwili równej 0. Wartość tego parametru trudna do określenia doświadczalnie obliczana jest najczęściej poprzez sumowanie stężeń ekstrapolowanych na osi stężeń. Prowadzone obliczenia zależne są od przebiegu krzywej oraz drogi podania leku (Baggot J.D. 1977).

Dla modelu dwukompartmentowego i donaczyniowej drogi podania leku:

$$Co = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t}$$

A - stężenie ekstrapolowane ilustrujące fazę dystrybucji leku
α - stała prędkości charakteryzująca przebieg fazy dystrybucji leku
B - stężenie ekstrapolowane ilustrujące fazę eliminacji leku
β - stała prędkości charakteryzująca przebieg fazy eliminacji leku (kel)
e - podstawa logarytmu naturalnego (= 2.71)

Dla modelu dwukompartmentowego i pozanaczyniowej drogi podania leku z wyraźną fazą absorpcji:

$$Co = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t} - C \times e^{-\gamma \times t}$$

C - stężenie ekstrapolowane ilustrujące fazę wchłaniania leku
γ - stała prędkości charakteryzująca przebieg fazy wchłaniania leku (kab)

Dla modelu jednokompartmentowego powyższe równania odpowiednio ulegają uproszczeniu:

$$Co = B \times e^{-\beta \times t}$$

Zależności pomiędzy stężeniem początkowym a innymi parametrami farmakokinetycznymi ilustrują formuły:

$$Co = AUC / MRT \qquad Co = AUC \times \beta \qquad Co = D / Vd$$

Stężenie maksymalne - Cmax.

W przypadku pozanaczyniowej drogi podania leku parametrem określającym najwyższe stężenie leku jakie zostało osiągnięte w osoczu jest stężenie maksymalne Cmax. Parametr ten opisany jest poprzez odpowiedni tmax czyli czas w jakim to stężenie zarejestrowano (Li Y. i wsp. 2004). Stężenie to określane jest w drodze doświadczalnej lub za pomocą odpowiednich obliczeń:

$$Cmax = [(F \times D) / Vd] \times e^{-\beta \times tmax}$$

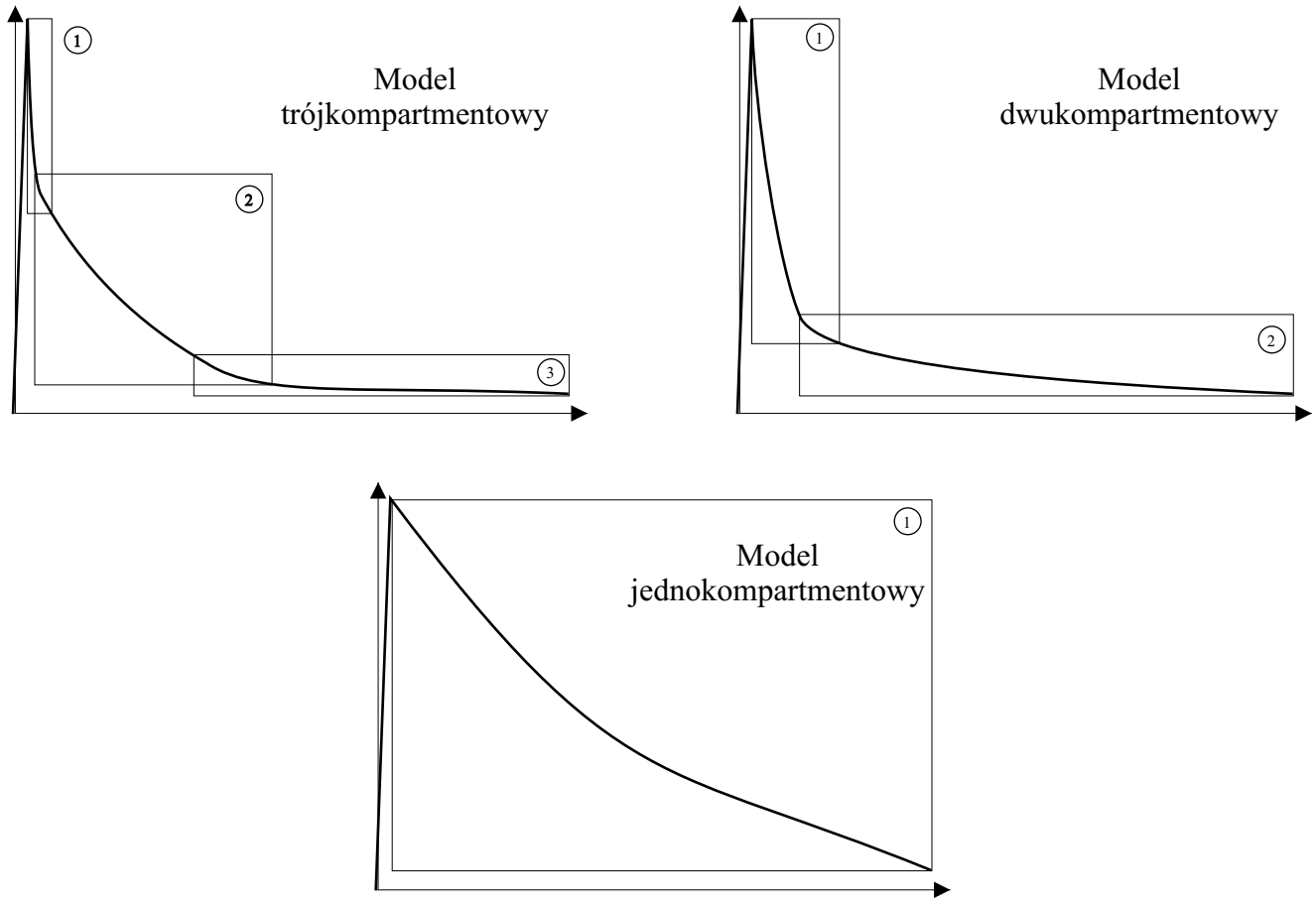
$$tmax = [2.303 / (\gamma - \beta)] \times Log (\gamma / \beta) \quad \text{lub} \quad tmax = (Ln\ \gamma - Ln\ \beta) / (\gamma - \beta)$$

F - dostępność biologiczna
D - dawka leku
Vd - objętość dystrybucji
γ - stała szybkości wchłaniania

Kwalifikowanie do modelu kompartmentowego

Prawidłowe kwalifikowanie danych do obliczeń farmakokinetycznych w modelu kompartmentowym umożliwia wykonanie dokładnych i rzetelnych obliczeń. Najczęściej stosowanymi formułami służącymi określeniu przynależności do modelu dwu lub jednokompartmentowego są kryteria przedstawione przez Wagnera-Nelsona (Notari R.E. 1978). Kwalifikowanie do modelu matematycznego przeprowadzić można, po określeniu matematycznej charakterystyki przebiegu badanej krzywej. Parametry farmakokinetyczne ilustrujące nachylenie poszczególnych fragmentów krzywej wraz z wartościami stężeń ekstrapolowanych umożliwiają porównanie poszczególnych fragmentów krzywej. Porównanie to zmierza do stwierdzenia czy zebrana grupa danych stanowi jednolity zbiór, czy można wyróżnić w nim kilka różniących się zbiorów danych. Jeżeli porównanie to daje wynik pozytywny a poszczególne fragmenty rozpatrywanej krzywej mają podobną charakterystykę matematyczną to model określony jest jako jednokompartmentowy. Jeżeli w analizowanej grupie danych wyróżnić można podgrupy świadczy to o złożonej kinetyce leku i modelu wielokompartmentowym.

Jeżeli	$\alpha > \beta$	to model jest dwukompartmentowy
Jeżeli	$\alpha / \beta > 1$	to model jest dwukompartmentowy
Jeżeli	$\mathbf{B / A + B < 0.5}$	to model zmierza ku dwukompartmentowemu
Jeżeli	$\mathbf{(K_{12} + K_{21}) < 20 \times K_{10}}$	to model zmierza ku dwukompartmentowemu
Jeżeli	$\mathbf{[(K_{21} - \beta) / (\alpha - \beta)] < 0.5}$	to model zmierza ku dwukompartmentowemu
Jeżeli	$\mathbf{(K_{21} \times K_{10}) / \beta^2 > 1}$	to model zmierza ku dwukompartmentowemu



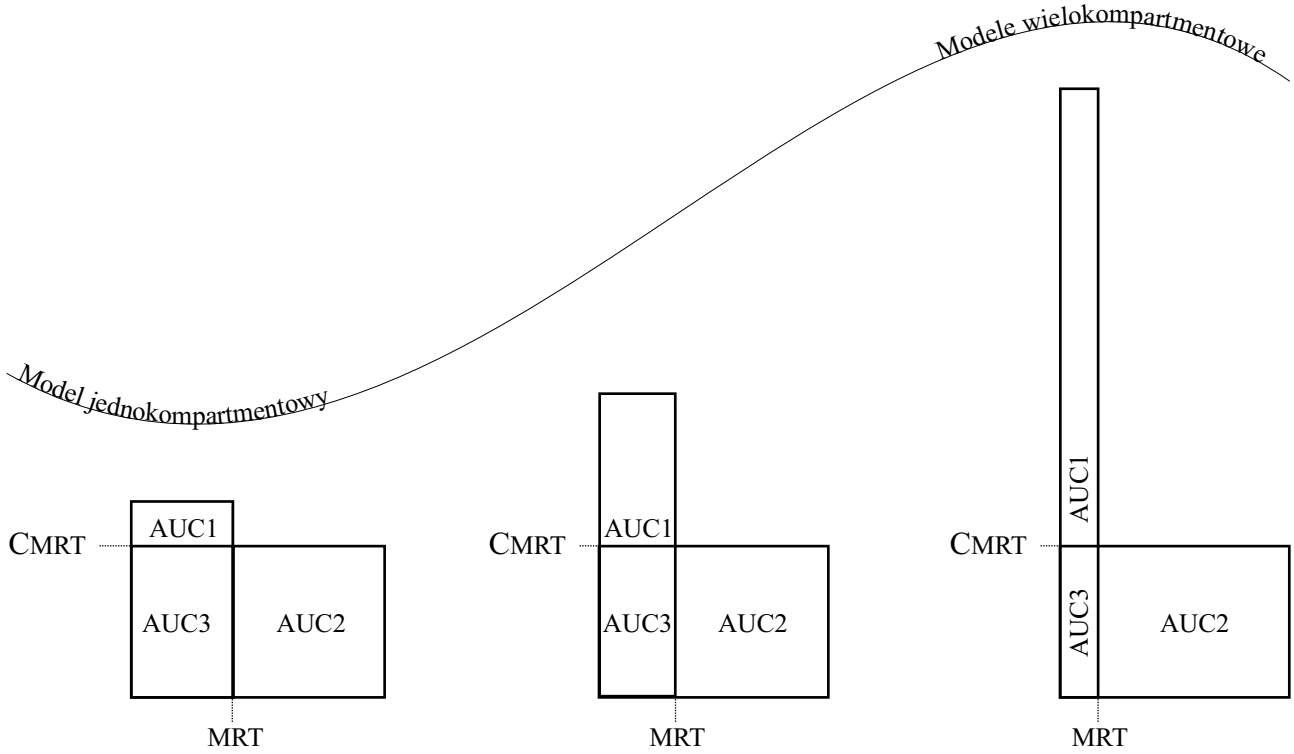
Rys. Kwalifikowanie do modelu jedno dwu, trój kompartmentowego wg. Wagnera-Nelsona.

Kwalifikowanie do modelu matematycznego na podstawie MRT.

W kwalifikowaniu do odpowiedniego modelu obliczeniowego pomocnym może być obliczenie średniego czasu obecności leku w organizmie - MRT (ang.: *Mean Residence Time*) wraz z CMRT czyli stężeniem jakie ten parametr opisuje. Wartość stężenia CMRT dzieli krzywą stężeń w płaszczyźnie poziomej. Wyznaczając pole powierzchni powyżej linii CMRT (AUC1) i razem z MRT poniżej - (AUC3). Obliczając stosunek wskazanych pól można określić czy badana krzywa należy do modelu jedno czy dwukompartmentowego.

stąd:

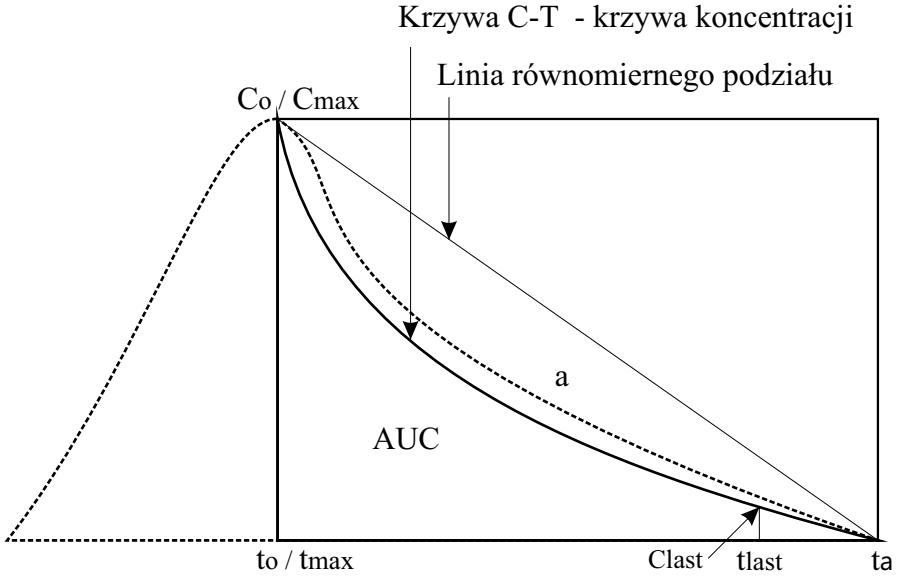
Jeżeli	**AUC1 < AUC3**	to model zmierza ku jednokompartmentowemu
Jeżeli	**AUC1 = AUC3**	to model zmierza ku jednokompartmentowemu
Jeżeli	**AUC1 > AUC3**	to model zmierza ku dwukompartmentowemu



Rys. Kwalifikowanie do modelu matematycznego na podstawie MRT i CMRT.
Dla wszystkich rysunków spełnione jest założenie: AUC1 + AUC3 = AUC2,
(MRT dzieli AUC na dwa równe pola)

Charakter przebiegu krzywej C-T jest różny w różnych przedziałach kinetycznych i odzwierciedla go geometria przebiegu krzywej kinetycznej. Do kwalifikowania do właściwego modelu obliczeniowego służyć może pole powierzchni pod krzywą (AUC) podzielone na trzy fragmenty: AUC1- pole powyżej CMRT, AUC3 - pole wytyczone przez CMRT i MRT, AUC2 - pole powierzchni poza MRT. Ponieważ MRT jest czasem dzielącym pole powierzchni pod krzywą na dwa równe pola, można opisać zmiany geometrii całej krzywej obliczając pole jakie zawiera przestrzeń ograniczona wznoszącą się krzywą stężeń a CMRT i MRT.

Podstawy statystyczne kwalifikowania do modelu jedno lub dwukompartmentowego stanowić może obliczanie współczynnika koncentracji Lorenza. Współczynnik ten określa stosunek pól tworzonych przez czworokąt opisany na AUC i przekątną tego czworokąta. Jeżeli współczynnik koncentracji wynosi 1 oznacza to że model jest jednokompartmentowy (pełna koncentracja). Jeżeli wartość ta jest mniejsza od jedności oznacza to że układ opisuje model dwu lub wielokompartmentowy (0 = brak koncentracji).



Rys. Zastosowanie obliczania współczynnika koncentracji Lorenza w kwalifikowaniu do modelu wielokompartmentowego.

Jeżeli tlast bliskie jest wartości ta otrzymujemy:

1/2 pola czworokąta = **a + AUC**

1/2 pola czworokąta = **(tlast x Co) / 2**

a + AUC = (tlast x Co) / 2

a = [(tlast x Co) / 2] - AUC

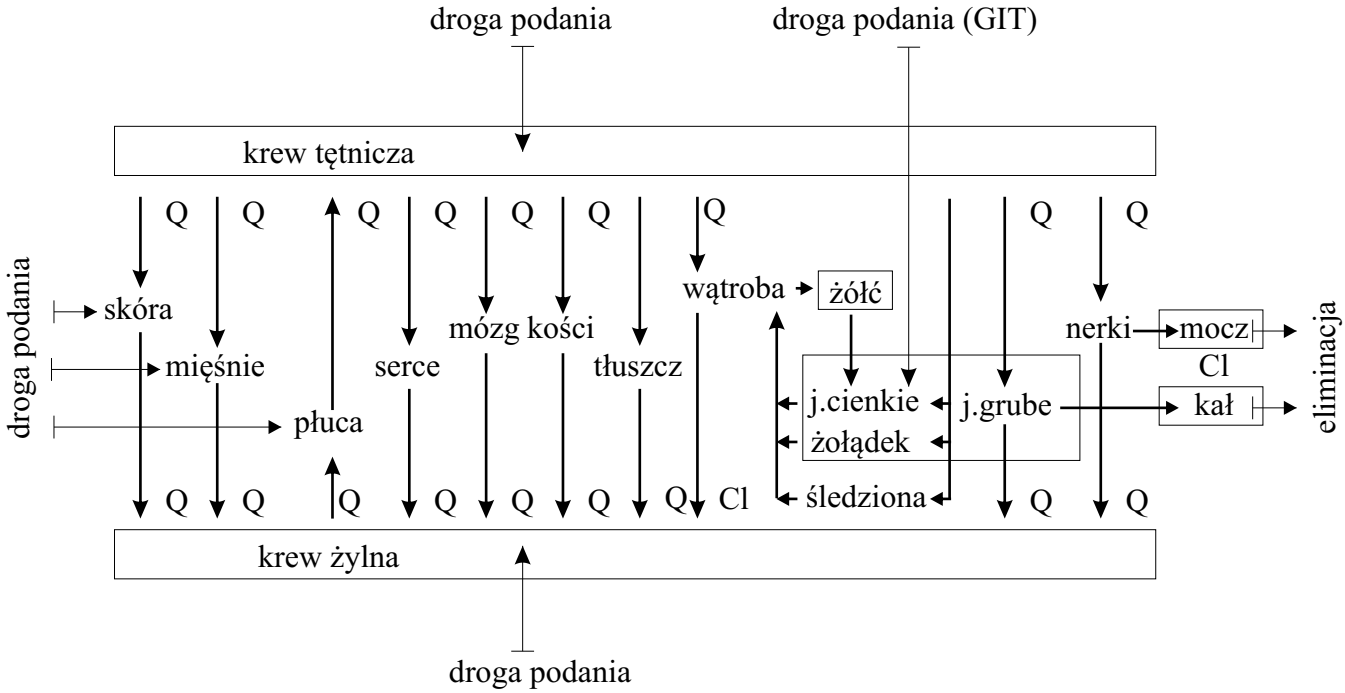
K_L = a / [(tlast x Co) / 2] lub **K_L = [[(tlast x Co) / 2] - AUC] / [(tlast x Co) / 2]**

K_L = a / [(tα x Co) / 2] lub **K_L = [[(tα x Co) / 2] - $AUC_{o-\alpha}$] / [(tα x Co) / 2]**

KL - współczynnik koncentracji Lorenza
AUC - pole powierzchni pod krzywą
a - pole powierzchni pomiędzy linią równomiernego podziału a krzywą koncentracji
tlast - czas pobrania ostatniej próby tkanki
Co, to - stężenie początkowe i czas dla podania donaczyniowego
Cmax, tmax - stężenie maksymalne i czas dla podania pozanaczyniowego
tα = [2 x AUC(resztkowe) / Clast] + tlast

Farmakokinetyka oparta o modele fizjologiczne - PBPK
(Ang.: *Physiologicaly Based Pharmacokinetics*).

Farmakokinetyka w ujęciu modeli fizjologicznych to szczególne odniesienie wartości parametrów fizykochemicznych leku do wartości opisujących fizjologię pracy wybranych narządów i tkanek. Niektóre substancje chemiczne zarówno w badaniach farmakokinetycznych jak i toksykokinetycznych wykazują szczególne powinowactwo do wybranych tkanek. Takie zachowanie molekuł badanego związku wymaga technik doświadczalnych i obliczeniowych pozwalających w sposób wybiórczy śledzić procesy dyspozycji. Predyspozycja do wybranych organów lub tkanek w modelach kompartmentowych jest trudna do interpretacji i opisu. Jednak oba kierunki prowadzenia badań i obliczeń w modelach hybrydowych wzajemnie się uzupełniają. Modele fizjologiczne dzielą organizm w jakim lek ulega procesom LADME najczęściej na narządy tkanki i krew. Źródłem danych są wartości przepływu krwi przez poszczególne przestrzenie kinetyczne, wartość klirensu jaka je charakteryzuje oraz współczynniki ekstrakcji. Cennym uzupełnieniem dla tego rodzaju obliczeń jest analiza momentów statystycznych badanego układu w wymiarze pojedynczych tkanek oraz całego organizmu. Farmakokinetyka oparta o modele fizjologiczne pozwala znacznie zbliżyć typowe obliczenia kompletnych profili farmakokinetycznych do metod skalowania allometrycznego. Ma to swoje odniesienie w licznych technikach badań PK *in vitro* na izolowanych narządach.



Rys. Przepływowy model fizjologiczny absorpcji dystrybucji i eliminacji leku.
Q - szybkość przepływu krwi, Cl - klirens, GIT - przewód pokarmowy
(ang.: *Gastro Intestinal Tract*).

Obecnie rola modelowania PBPK znacznie wzrosła w wyniku rozwoju technik *in vitro*. Modele fizjologiczne służą nie tylko kompletowaniu opisu farmakokinetycznego na podstawie obserwacji pojedynczych narządów. Pozwalają zarówno na kompletowanie CPKP jak i prowadzenie badań we wczesnej fazie badań przed klinicznych (Poulin P. i wsp 2002; Theil F.P. i wsp 2003). Modele te mogą być budowane oddzielnie dla poszczególnych faz kinetycznych lub osobno dla poszczególnych tkanek. Stwarza to dla tego typu modeli szerokie możliwości łączenia ich z innymi technikami farmakometrycznymi takimi jak:

- techniki obliczeniowe kwalifikujące do badań nad nowym lekiem (ang.: *Drug Input Parameters*)
- R of 5, SAR, QSAR

- techniki skalowania *in vitro* / *in vivo*
- techniki skalowania allometrycznego
- farmakodynamiczne metody obliczeniowe
- PK/PD

W toksykokinetyce zmiany dystrybucji lub nietypowa ekspozycja na czynnik chemiczny nie zawsze znajduje właściwe odzwierciedlenie w modelach kompartmentowych. Nie zawsze ujmują one w wystarczająco selektywny sposób różnice na poziomie narządowym czy tkankowym. Zasadnicza różnica pomiędzy modelami kompartmentowymi a fizjologicznymi dotyczy ich selektywności. Modele kompartmentowe doskonale ilustrują zmiany dyspozycji leków o charakterze liniowym. W warunkach żywego organizmu nie zawsze jednak dyspozycja leku jest liniowa lub ograniczona do dwóch, lub trzech kompartmentów. Modele fizjologiczne dają możliwość opisu różnorodnych szlaków kinetycznych leku nie bazując na jednym stężeniu w jednym kompartmencie (EPA/630/R-01/004, 2001). Stąd modele fizjologiczne stwarzają szerokie możliwości. PBTK czyli fizjologiczne modele toksykokinetyczne (ang.: *Physiologicaly Based Toxicokinetics*) są obecnie jednymi z częściej stosowanych w badaniach toksykokinetyki ksenobiotyków (Andersen M.E. 2003). Zarówno modele toksykokinetyczne jak i modele farmakokinetyczne prezentowane za pomocą parametrów fizjologicznych, w znacznym stopniu redukują różnice wyników zależne od różnic osobniczych czy gatunkowych. Wynika to z faktu zaistnienia w parametryzacji modelu danych dotyczących fizjologii przepływu i funkcji organu lub tkanki. Wykorzystywanie w typowych modelach kompartmentowych lub statystycznych wartości parametrów fizjologicznych sprzyja więc uzyskaniu wyników obarczonych niewielkim błędem. Przykładem może być użycie skalowanych wartości inuliny lub kreatyniny w przypadku obliczania klirensu nerkowego lub całkowitego (Dixit R. i wsp. 2003).

Modele fizjologiczne - przepływowe uwzględniają w przeprowadzanych obliczeniach głównie przepływ krwi przez organy i tkanki. Stąd wiedza o perfuzji tkanek jest dla tego rodzaju metod niezwykle ważna (Guyton A.C. 1976). Jednak sama wartość szybkości perfuzji - PR (ang.: *Perfusion Rate*) nie zawsze stanowi jedyną potrzebną do analizy informację o tkance. Oprócz tego ważnym parametrem jest masa organu, a także zawartość wody w badanej tkance. Głównie dla leków hydrofilnych można więc wyznaczyć współczynnik korekcyjny perfuzji tkanki dzięki znajomości ilości wody jaka jest w niej zgromadzona - W.

					X	Y	X/Y
	PR ml/min/ml	wody %	(PR/W) ml		Ceff = C(t1/2) L	Ceff = C(t1/2) L	
płuca	10	0,79	7,90		2,4	1,896	1,27
nerki	4	0,83	3,32		0,96	0,7968	1,20
tarczyca	2,4				0,576	0,576	
nadnercza	1,2				0,288	0,288	
v portae	0,8				0,192	0,192	
serce	0,6	0,79	0,47		0,144	0,11376	1,27
mózg	0,5	0,75	0,38		0,12	0,09	1,33
mięśnie	0,025	0,76	0,02		0,006	0,00456	1,32
skóra	0,024	0,72	0,02		0,00576	0,00415	1,39
kości	0,02	0,22	0,00		0,0048	0,00106	4,55
tłuszcz	0,003	0,1	0,00		0,00072	0,00007	10,00
	t1/2 = 2 h			suma	4,69656	3,9623232	

Rys. Zależność między perfuzją tkanki a stężeniem efektywnym. Model liniowego spadku stężenia po podaniu jednorazowym

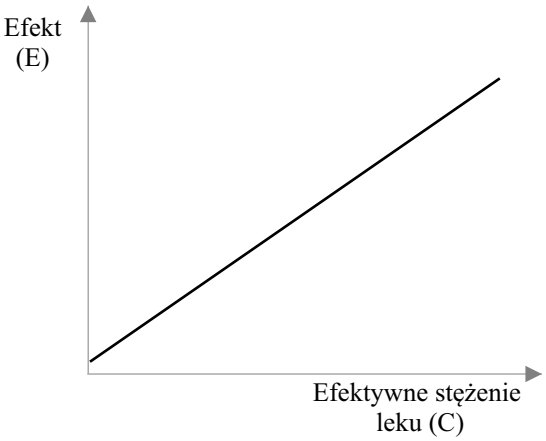
Znając wartość stężenia efektywnego oraz okres półtrwania w fazie eliminacji można więc wyliczyć, jaka ilość krwi przepływać będzie przez każdy mililitr tkanki, do momentu spadku stężenia leku we krwi poniżej stężenia efektywnego (X). Korzystając ze współczynnika korekcyjnego obliczyć można efektywny przepływ zależny od zawartości wody w tkance (Y).

Modelowanie PK / PD

Zależności między parametrami farmakokinetycznymi a farmakodynamiczmymi pozwalają na optymalizację dawkowania oraz optymalizację postaci leku w fazie projektowania. Farmakodynamika jest nauką badającą zależność między stężeniem a efektem. Analiza PK/PD to hybrydowy model analizy skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leku. Obecnie stosuje się kilka podstawowych rodzajów modelowania PK/PD. Są to:

- model liniowy
- model Log-liniowy
- model Emax
- model sigmoidalny Emax
- model stałego efektu (ang.: *Fixed Effect Model*)

Model stałego efektu jest najprostszym w obserwacji modelem PK/PD. Ilustruje on wyłącznie obecność lub brak efektu.



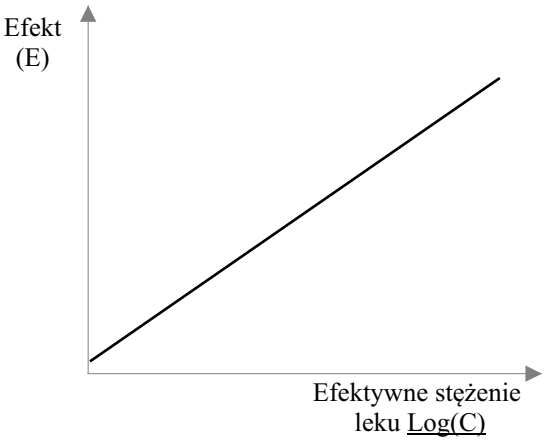
E = k x C

lub

E =E$_o$ + k x C

k - nachylenie
C - steżenie

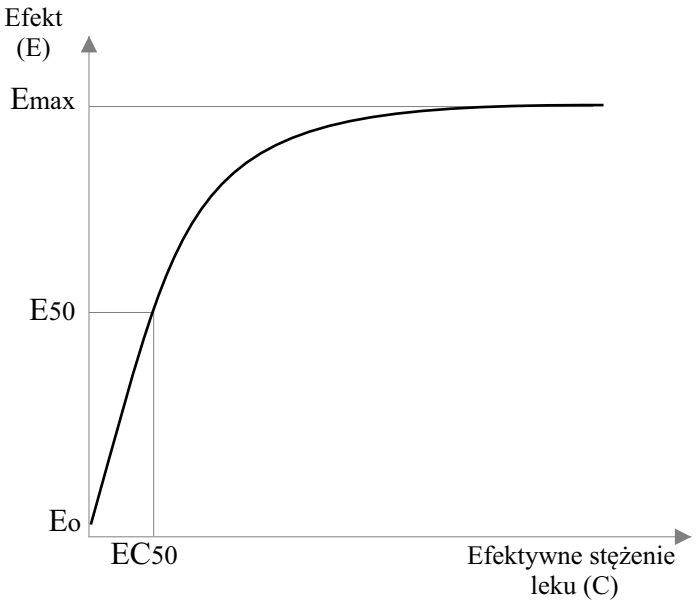
Rys. Model liniowy PK/PD.



E = k x Log(C) + b

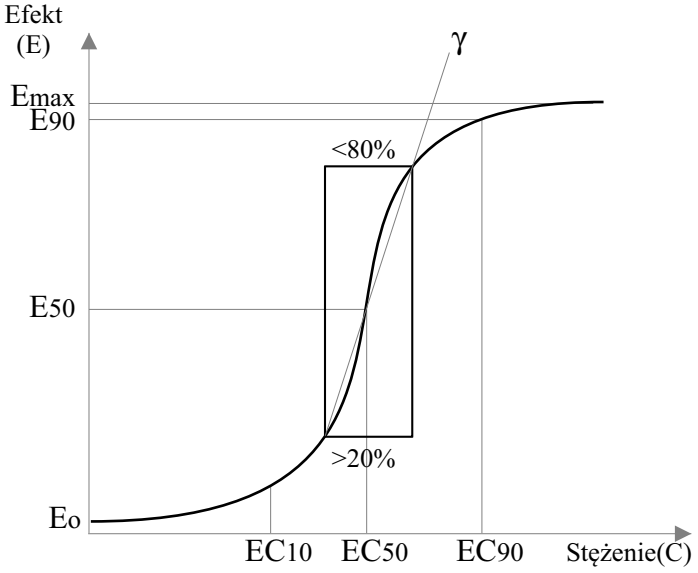
b - przecięcie (ang.: *Intercept*)

Rys. Model Log - liniowy PK/PD.



$$E = E_{max} \times C / EC_{50} + C$$

Rys. Model PK/PD oparty na analizie E max.



$$E = E_{max} \times C^{\gamma} / EC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}$$
$$\gamma = E_{max} / EC_{50}$$

Emax - Intensywność efektu
(ang.: *Eficiacy; Intensity*)

γ - selektywność modelu
(ang.: *Selectivity*)

EC50 - moc efektu
(ang.: *Potency*)

Rys. Typowy przebieg zależności stężenie/efekt - model sigmoidalny Emax.

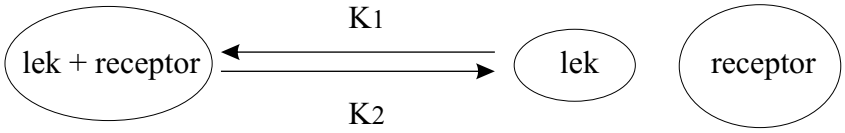
Zastosowanie modelowania PK/PD w przemyśle farmaceutycznym dotyczą kilku głównych kierunków. Są to między innymi (Sheiner L.B., Steimer J.L. 2000; Meibohm B., Derendorf H. 2001; Fox E i wsp. 2002):

- optymalizacja PK/PD w fazie przedklinicznej
- określenie aktywności wewnętrznej leku
- skalowanie allometryczne, dawkowanie i ekstrapolacja danych między gatunkami
- badania PK/PD i optymalizacja dawkowania w populacji docelowej
- zastosowanie w I,II,III,IV fazie badań klinicznych
- określenie indeksu terapeutycznego leku

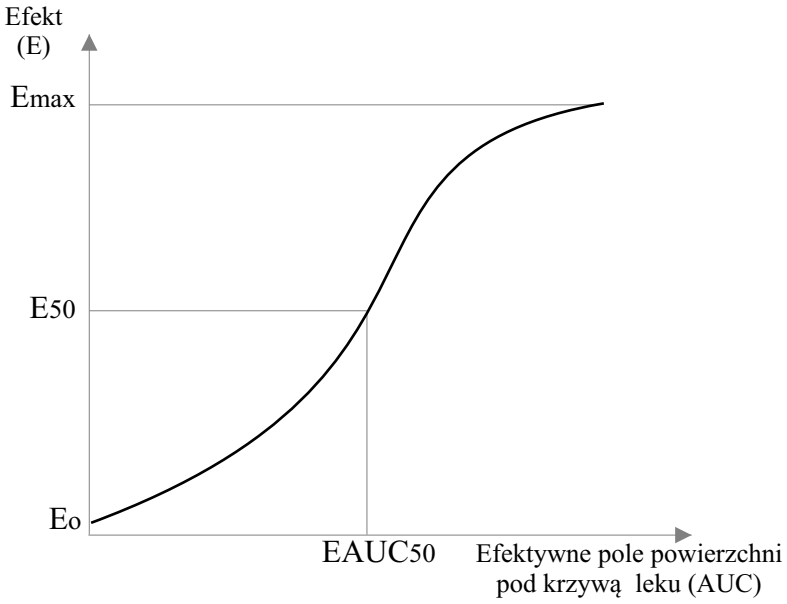
Modelowanie PK/PD jest cennym narzędziem uzupełniającym proces optymalizacji farmakokinetycznej postaci leku (Tutain P.L. 2002). Modele takie nie są jednak możliwe do zastosowania w każdym przypadku. Sens stosowania analizy PK/PD dotyczy jedynie leków których efekt działania jest zdecydowanie zależny od stężenia w innych wypadkach modele muszą być modyfikowane. Badanie zależności stężenie / efekt jest związane z analizą procesów nieliniowych. Łączenie parametryzacji modelu PK z parametryzacją PD pozwala odnieść efekty przeprowadzonych badań farmakokinetycznych do obserwacji i badań klinicznych dotyczących leku. Typowe parametry PD opisujące działanie leku w sigmoidalnym modelu Emax to:

- aktywność wewnętrzna leku (EC_{50}) (ang.: *Potency*)
- maksymalna skuteczność leku (E_{max}) (ang.: *Efficacy*)
- czułość modelu wyrażona stałą Hill'a (γ)

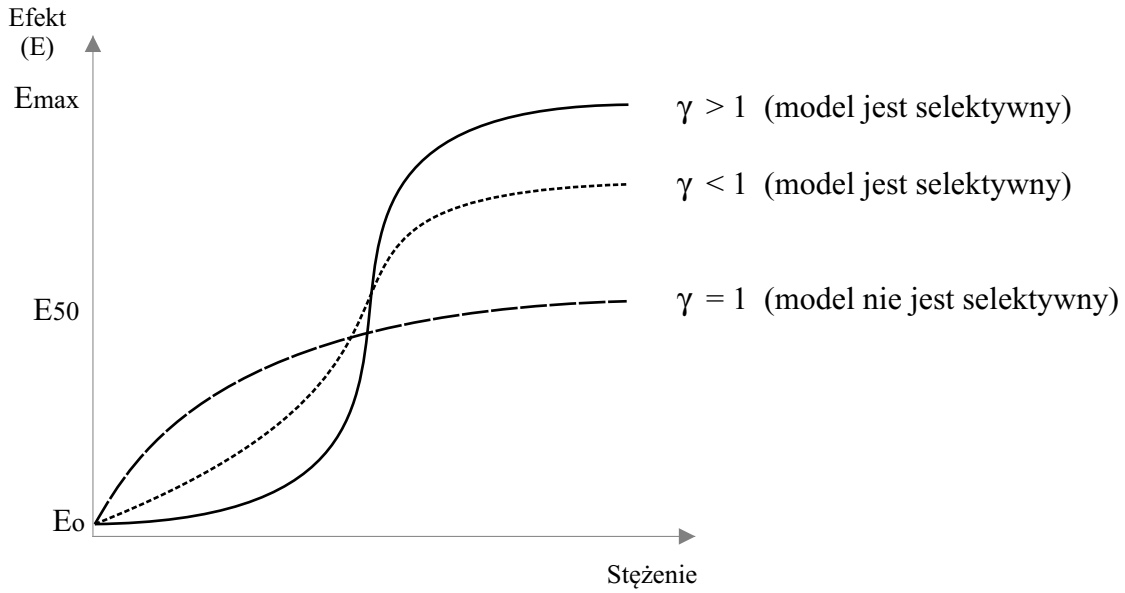
Budowanie modelu PK/PD polega nie tylko na porównaniu efektu z wartością stężenia lecz także a może przede wszystkim na porównaniu pojedynczych lub grup parametr ów farmakokinetycznych z efektem. Są to więc typowe modele hybrydowe.
Jednym z typowych równań opisujących zależność pomiędzy dawką leku (reprezentującą zarazem stężenie) a efektem w modelowaniu PK/PD jest zależność Hill'a:



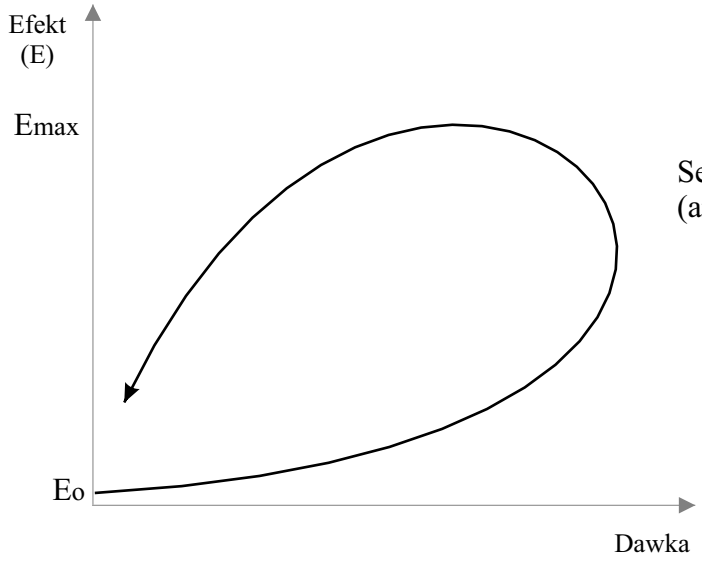
to: **$ED = K_2 / K_1$**



Rys. Przykład zależności PK/PD Efekt/AUC.

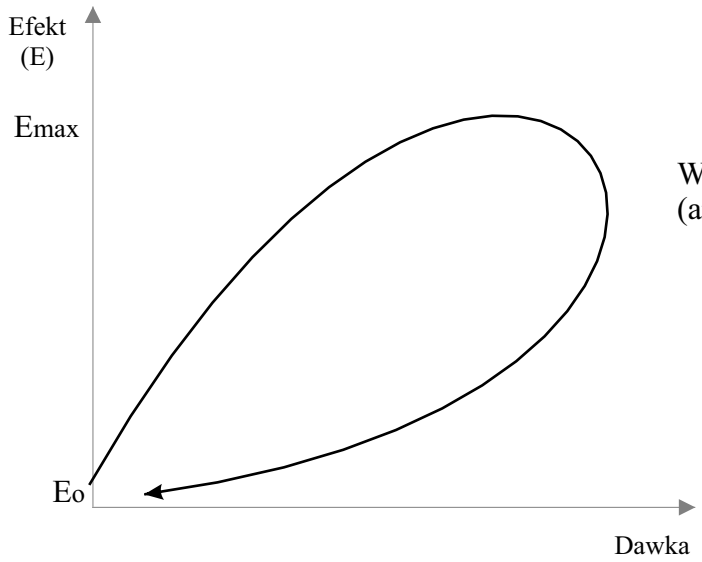


Rys. Ocena krzywej sigmoidalnej oraz jej nachylenia. Przykład różnych wartości stałej Hill'a.



Sensytyzacja wraz z rosnącą dawką.
(ang.: *Anti - Counter Clokwise Hysteresis*)

Rys. Ocena krzywej PK/PD obraz reakcji sensytyzacji.



Wysycenie (np. receptora) wraz z rosnącą dawką.
(ang.: *Counter Clockwise Hysteresis*)

Rys. Ocena krzywej PK/PD obraz reakcji wysycenia.

$$E = E_o + [(E_{max} \times D) / (ED_{50} + D)] \qquad \text{lub} \qquad E = E_o + [(E_{max} \times C) / (ED_{50} + C)]$$

lub wskazując na nachylenie sigmoidalnej części krzywej:

$$E = E_o + [(E_{max} \times D^{\gamma}) / (ED_{50} + D^{\gamma})] \qquad \text{lub} \qquad E = E_o + [(E_{max} \times C^{\gamma}) / (ED_{50} + C^{\gamma})]$$

$$E = E_o - [(E_{max} \times D^{\gamma}) / (ED_{50} + D^{\gamma})] \quad \text{(w modelu inhibicyjnym)}$$

E - efekt
E - efekt równy zero
Emax - efekt maksymalny
ED50 - dawka efektywna, gwarantująca 50% efekt
D - dawka
C - stężenie
γ - nachylenie krzywej

Powyższe formuły opisują modele farmakodynamiczne typu Emax. W badaniach farmakodynamicznych niejednokrotnie korzysta się również z modelowania liniowego lub półlogarytmicznego. Rodzaj modelu zależny jest od charakterystyki zmienności badanych zjawisk. Zależność tą można zapisać w sposób ujmujący szerzej problem modelowania PK/PD w formie:

$$E = E_o + [(E_{max} \times (PK)^{\gamma}) / (E(PK)_{50} + (PK)^{\gamma})]$$

PK - wybrany parametr farmakokinetyczny lub zależność PK

Równanie Hill'a może zmienić swoją składową PK w przypadku niektórych symulacji. Dla części leków znacznie ważniejsze od utrzymania odpowiednio wysokiego stężenia jest czas jego zaistnienia w kompartmencie efektorowym na określonym poziomie. Parametrem farmakokinetycznym który może w pewnym stopniu opisać ten proces jest AUC lub HVD - czas w którym stężenie maksymalne spada o połowę. Odpowiednie równania przyjmują wiec postać:

$$E = E_o + [(E_{max} \times AUC^{\gamma}) / (AUC_{50} + AUC^{\gamma})] \qquad E = E_o + [(E_{max} \times HVD^{\gamma}) / (HVD_{50} + HVD^{\gamma})]$$

Dawka efektywna EC jest pochodną stężenia efektywnego. Nie są to jednak pojęcia równoznaczne. ED jest pojęciem związanym z gotowym lekiem, natomiast EC z właściwościami substancji czynnej. Efektywne stężenie leku w badanej przestrzeni kinetycznej jest zależne od stopnia oczyszczania jej z leku oraz jej dostępności dla leku. Ponieważ dawka jest wyrażona w farmakokinetyce zależnością :

$$D = Cl \times AUC$$

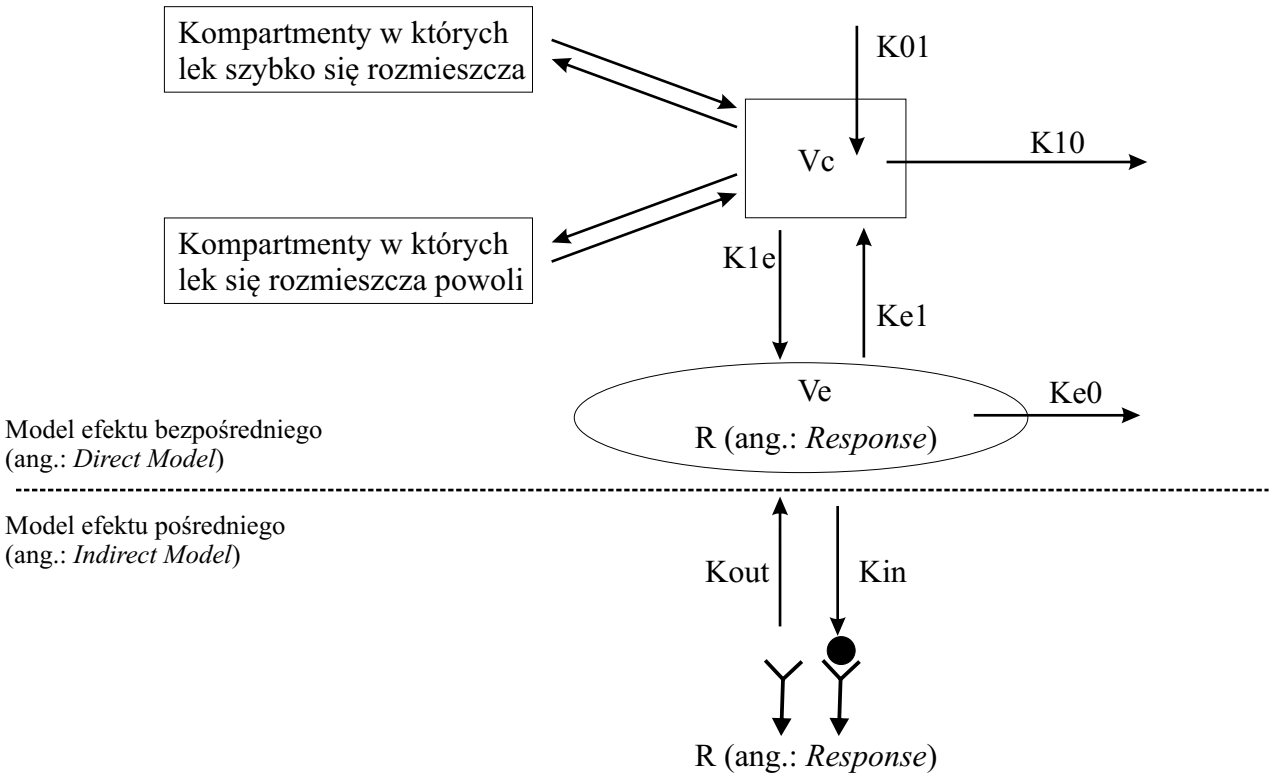
Analogicznie do badań PK gdzie dawka ilustruje zależność między polem AUC (opisującym dostępność) a stopniem oczyszczania organizmu, oblicza się ED oraz EC. Stąd w badaniach PK/PD dawka efektywna obliczana jest na podstawie równania:

$$ED_{50} = (Cl \times EC_{50}) / F \qquad EC_{50} = (ED_{50} \times F) / Cl$$

Cl - klirens
F - dostępność biologiczna leku

Wymienione wyżej równania z służą między innymi analizie PK/PD wielu antybiotyków gdzie składową ECn zastępuje najczęściej MIC o wartości = n.

$$E = E_o + [(E_{max} \times MIC^{\gamma}) / (MIC_{50} + MIC^{\gamma})]$$



Ve -objętość dystrybucji w kompartmencie efektorowym
Ke0 szybkość zanikania efektu w kompartmencie efektorowym w modelu bezpośrednim
Kout - szybkość zanikania efektu(liczba wolnych receptorów) w modelu pośrednim
Kin - szybkość narastania efektu (liczba okupowanych przez cząsteczkę receptorów) w modelu pośrednim
R - odpowiedź (ang.: *Response*)

Ryc. Schematyczny opis przełożenia obecności leku w organizmie na efekt.
Przejście fazy PK w PD.

Jednym z ważniejszych parametrów opisujących charakter zaistniałego efektu jest Ke0. Jest to stała szybkości ilustrująca szybkość zanikania efektu w kompartmencie docelowym mierzona wartością stężenia leku w kompartmencie docelowym i centralnym. Stała ta stanowi punkt wyjścia do obliczenia okresu półtrwania efektu w przestrzeni docelowej - t1/2e.

$$\mathbf{K_{e0} = \Delta C_e(t) / [\Delta C_p(t) - \Delta C_e(t)]}$$

$$\mathbf{K_{e0} = (K_{1e} \times V_c) / V_e} \quad \text{lub} \quad \mathbf{K_{e0} = Cl_d / V_e}$$

$$\mathbf{t_{1/2e(direct)} = 0.693 / K_{e0}} \quad \text{lub} \quad \mathbf{t_{1/2e(indirect)} = 0.693 / K_{out}}$$

Cld - klirens dystrybucyjny pomiędzy kompartmentem centralnym a efektorowym
ΔCe(t) - zmiana stężenia w czasie

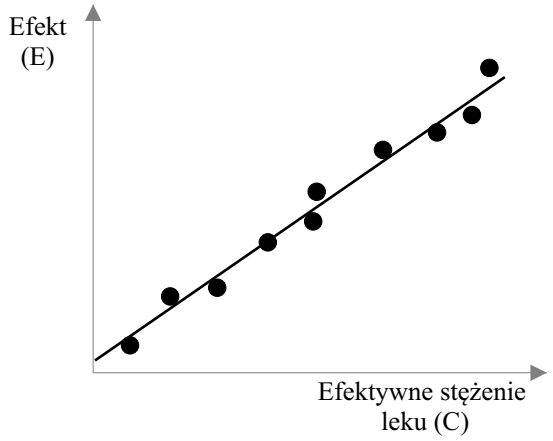
Innym parametrem charakteryzującym efekt jest czas wystąpienia stężenia maksymalnego w kompartmencie efektorowym - temax oraz odpowiedź - R (ang.: *Response*):

$$\mathbf{t_{emax} = Ln(K_{e0} / K_{10}) / (K_{e0} - K_{10})}$$

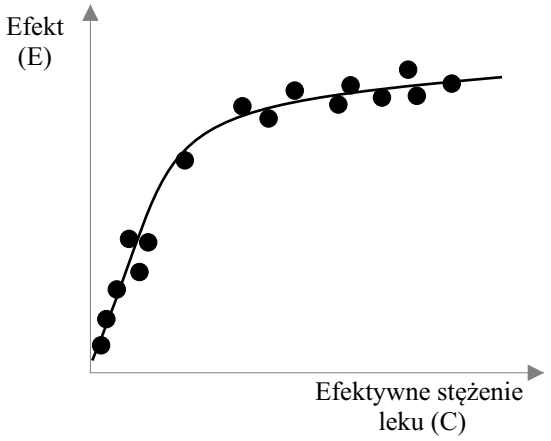
$$\mathbf{R = K_{in} / K_{out}}$$

Odpowiedź jest w tym wypadku wielkością ściśle farmakodynamiczną (model pośredni) której zakres ilustrują dwie stałe szybkości. Kin stała szybkości narastania efektu mierzona wielkością efektu. Kout stała szybkości zmniejszania się efektu - sygnału mierzoną wartością tego sygnału. Model PK/PD pośredni zakłada że sygnał - odpowiedź budowana jest za pośrednictwem kompartmentu efektorowego rozumianego jako fragment modelu. W modelach bezpośrednich gdzie efekt tworzony jest bezpośrednio w kompartmencie efektorowym stała szybkości ilustrująca zanikanie efektu jest Ke0. Modele bezpośrednie ilustrują efekt natychmiastowy który ściśle związany jest z odnotowaniem określonego stężenia leku w osoczu. Najczęściej ilustrowane są modelem sigmoidalnym, liniowym lub prostym modelem Emax. Inaczej dzieje się w przypadku leków których efekt nie jest bezpośrednio związany ze stężeniem osiąganym w osoczu. Dla tych leków w modelowaniu PK/PD notuje się opóźnienie efektu związane z pośrednim budowaniem efektu. Modele pośrednie opisują najczęściej krzywe histerezy. Krzywe te w zależności od sposobu działania na receptor mają przebieg zgodny (ang.: *Clockwise*) lub niezgodny z ruchem wskazówek zegara (ang.: *Anti Clockwise*). Ilustrują więc wysycenie receptorów w czasie, albo sensytyzację receptorów w czasie (Shoenwald R.D. 2002; Shargel i wsp. 2005).

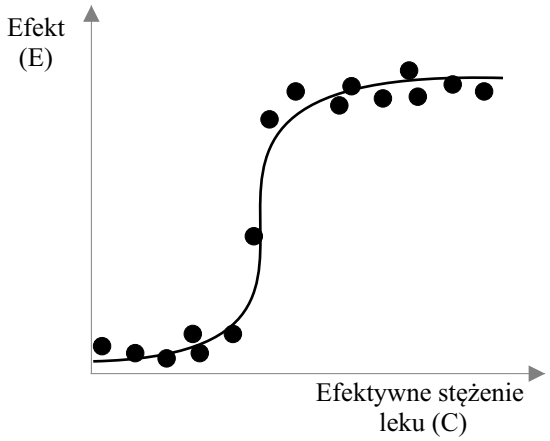
Projektowanie i analiza PK/PD.



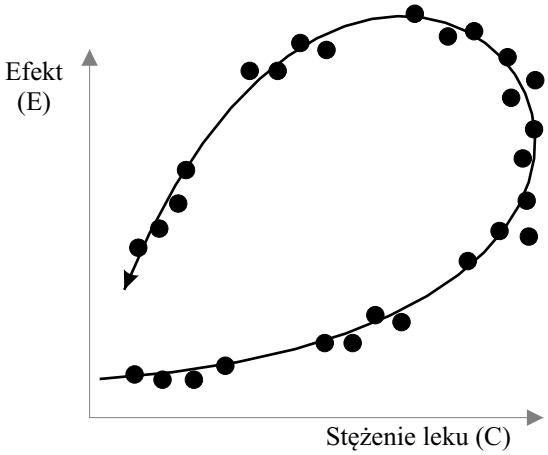
Rys. Próbkowanie z zastosowaniem technik PK/PD (pobieranie prób do analiz oraz monitorowanie efektu) model liniowy i log liniowy



Rys. Próbkowanie z zastosowaniem technik PK/PD (pobieranie prób do analiz oraz monitorowanie efektu) model Emax



Rys. Próbkowanie z zastosowaniem technik PK/PD (pobieranie prób do analiz oraz monitorowanie efektu) sigmoidalny model Emax



Rys. Próbkowanie z zastosowaniem technik PK/PD (analiza efektu w czasie - model pośredni z opóźnieniem efektu)

Parametryzacja modelowania PK/PD często odnosi się do punktów pomiarowych - zjawisk, a raczej procesów służących za pośredni wskaźnik działania leku w badanych warunkach (ang.: *End Points*). Takimi markerami na poziomie komórkowym mogą być np. apoptoza komórek, ich proliferacja, reakcja na chemokiny itp. (Lieberman R. i wsp. 1998). Modelowanie typu PK/PD znajduje zastosowanie również w analizie toksykokinetycznej. Znanym narzędziem jest modelowanie typu PK/TD wiążące toksykodynamikę z informacjami dotyczącymi charakteru farmakokinetyki badanego związku w rozpatrywanym układzie. Wśród modeli PK/PD można wyróżnić dwa podstawowe rodzaje(EPA/630/R-01/004, 2001):

- modele opisowe (ang.: *Descriptive*), np. kompartmentowe (fenomenologiczne)
- modele prognozujące (ang.: *Predictive*) np. fizjologiczne

Należy jednak zwrócić uwagę na to że modelowanie PK/PD lub PK/TD z założenia jest modelowaniem hybrydowym. Sama tylko analiza PD może wykorzystywać różne narzędzia i schematy matematyczne. Podstawowe metody analizy PK/PD dotyczące zależności dawka/efekt to między innymi:

- pomiary dla jednej wartości dawki lub efektu
- badania dla ciągu wzrastających dawek
- badania intensywności efektu
- zależność między częstotliwością efektu a dawką
- metody populacyjne
- badanie efektów pośrednich (nie farmakologicznych)

Analiza PK/PD oraz PK/TD relacjonuje zarówno skuteczność terapeutyczną leku w określonych granicach stężeń jak i dynamikę efektów toksycznych oraz narastanie przypadków działań niepożądanych. Pozwala obliczyć indeks terapeutyczny, czyli stosunek dawki toksycznej do dawki efektywnej gwarantujących 50 % efekt w badanej populacji.

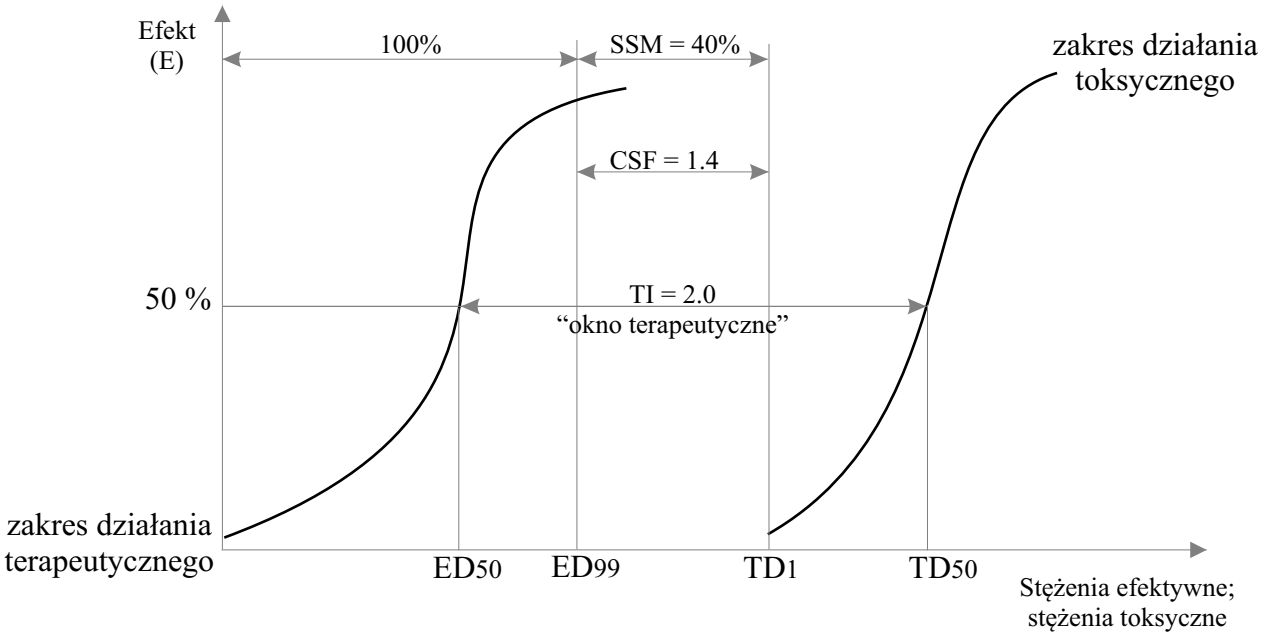
$$\mathbf{TI = TD_{50} / ED_{50}}$$

TI - indeks terapeutyczny (ang.: *Therapeutic Index*)
TD - dawka toksyczna (ang.: *Toxic Dose*)
ED - dawka efektywna (ang.: *Effective Dose*)

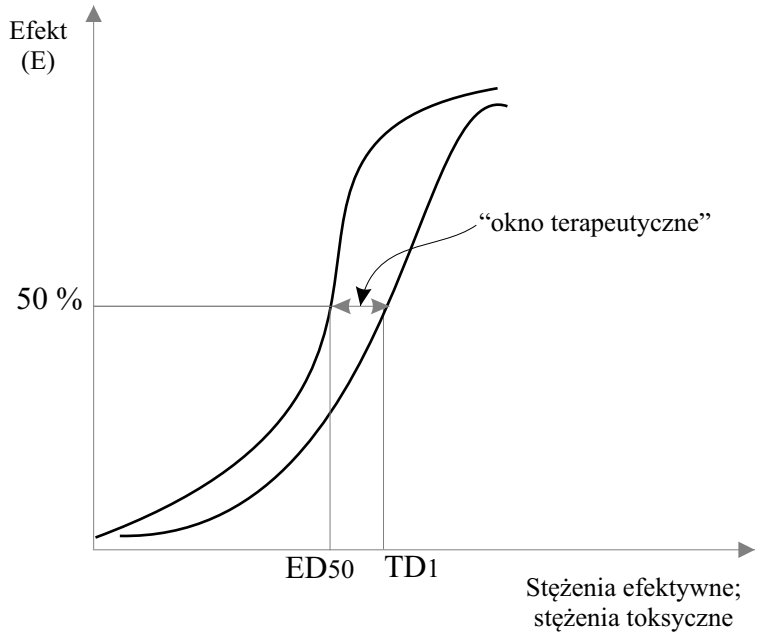
W przypadku analizy efektów działania chemioterapeutyku formuła może zawierać informację o maksymalnej dawce chemioterapeutyku tolerowanego przez organizm - MTD (ang.: *Maximum Tolerated Dose*), (Lieberman R. i wsp 1998). Pozwala to obliczyć indeks chemoterapeutyczny - CI (ang.: *Chemoprevention Index*)

$$\mathbf{CI = MTD / ED_{50}}$$

Indeks terapeutyczny wyrażony wyżej wymienionymi parametrami relacjonuje proces statyczny dotyczący jednej wartości stężenia zarówno po stronie działania terapeutycznego jak i toksycznego leku. Wartością ilustrującą dynamikę zmian obu kierunków działań jest stała szybkości relacjonująca narastanie efektu terapeutycznego oraz toksycznego. Stąd wartość dynamicznego indeksu terapeutycznego - DTI (ang.: *Dynamic Therapeutic Index*):



Rys. Przykład modelu PK/PD PK/TD.



Rys. Przykład modelu PK/PD PK/TD i wąskiego okna terapeutycznego leku.

$$\mathbf{DTI = (TD_{50} \times K_{(TD1\text{-}50)}) / (ED_{50} \times K_{(ED1\text{-}50)})}$$

$$\mathbf{K_{(TD1\text{-}50)} = [Ln(E_{50}) - Ln(E_1)] / (TD_{50} - TD_1)} \text{ oraz } \mathbf{K_{(ED1\text{-}50)} = [Ln(E_{50}) - Ln(E_1)] / (ED_{50} - ED_1)}$$

Indeks terapeutyczny jest liczbą która mówi ile razy dawka toksyczna jest wyższa od dawki efektywnej (50% efekt w populacji badanej dla obu dawek). Im większa jest różnica pomiędzy tymi parametrami i im większy jest TI tym bezpieczniejszy jest lek. Nie oznacza to jednak że wysoki indeks terapeutyczny gwarantuje zawsze brak działań niepożądanych. Ten problem bliżej opisuje kolejny parametr - pewny współczynnik bezpieczeństwa - CSF (ang.: *Certain Safety Factor*). Współczynnik ten opisuje granicę pomiędzy zakresem terapeutycznym dawkowania leku a dawką toksyczną o zasięgu 1 % populacji. Im współczynnik większy jest od jedności tym bezpieczniejszy jest badany lek.

$$\mathbf{CSF = TD_1 / ED_{99}}$$

Idąc dalej określić można standardowy margines bezpieczeństwa SSM (ang.: *Standard Safety Marign*) jaki cechuje badany model PK/TD.

$$\mathbf{SSM = [(TD_1 - ED_{99}) / ED_{99}] \times 100} \qquad \mathbf{SSM = [(TD_1 / ED_{99}) - 1] \times 100}$$

$$\mathbf{SSM = (CSF - 1) \times 100} \qquad \mathbf{CSF = (SSM / 100) + 1}$$

Porównanie wartości indeksu terapeutycznego oraz współczynnika bezpieczeństwa informuje o dynamice narastania efektu toksycznego - TED (ang.: *Toxic Effect Dynamics*) w zakresie 1 - 50%.

$$\mathbf{TED_{(1\text{-}50)} = TI / CSF}$$

Im wyższa jest wartość obliczona tym mniejsza jest dynamika narastania efektu toksycznego. Leki bezpieczne cechuje wysoka wartość TED oraz znaczny margines bezpieczeństwa. Wąski margines bezpieczeństwa w połączeniu z dużą dynamiką wzrostu efektów toksycznych stwarza potencjalne zagrożenia w farmakoterapii. Możliwość porównania dwóch leków o podobnym marginesie bezpieczeństwa i różnej dynamice narastania efektu toksycznego umożliwia równanie:

$$\mathbf{(SSM_{(a)} \times TED_{(1\text{-}50;a)}) / 100 \ : \ (SSM_{(b)} \times TED_{(1\text{-}50;b)}) / 100}$$

Bezpieczeństwo stosowania leków jest dziedziną leżącą na styku farmakokinetyki i toksykokinetyki. Nowoczesna toksykokinetyka posługuje się obecnie wieloma narzędziami obliczeniowymi wykorzystywanymi w skalowaniu efektu letalnego. Praktyczne odzwierciedlenie tego typu skalowania to zastosowanie modelu TK/TD czyli toksykokinetyczno / toksykodynamicznego. Ma on swoje odniesienie również do podstawowych informacji o przebiegu jakościowym ADME. Wyrażenie ilustrujące zależność między LD50 dwóch makrosystemów (np.: sczur i mysz) pozwala określić ADME jako funkcję ilustrującą toksykokinetykę związku (Zmuidinawicius D i wsp. 2003). LD50 jest dawką substancji wywołującą efekt letalny u 50 % osobników którym substancję podano. Parametr ten jest typowy dla analizy toksykodynamicznej. Wyraża go stopień powinowactwa toksykoforów cząsteczki do miejsca wiązania w organizmie - K(tox)oraz stężenie efektywne związku w organizmie - Ceff. Przy czym tak rozumiane Ceff jest wypadkową wszystkich procesów w ramach ADME.

$$\mathbf{LD_{50} = K_{(tox)} / Ceff}$$

Skalowanie pomiędzy LD50 dwóch organizmów jest możliwe w wyniku podobnego efektu tej samej substancji. Różnice najczęściej wywołane na jednym lub kilku etapach ADME mogą znacznie zmieniać wartości obliczone (Zmuidinavicius D. i wsp. 2003). Stąd we wzorze stosuje się współczynniki korygujące a i b.

$$\mathbf{Log\ LD_{50}\ (system1) = a + b\ x\ \ Log\ LD_{50}\ (system2)}$$

a, b - współczynniki korekcyjne zależne od gatunku i drogi podania

	R	a	b
mysz p.o. / mysz s.c.	0,82	0,28	0,94
mysz p.o. / mysz i.p.	0,80	-0,43	0,79
mysz s.c. / mysz i.p.	0,89	-0,23	0,94
mysz s.c. / mysz i.v.	0,81	-0,54	0,82
mysz i.p. / mysz i.v.	0,86	0,47	0,89
mysz s.c. / szczur i.p.	0,81	-0,37	0,73
mysz i.p. / szczur i.p.	0,91	0,01	0,92
mysz p.o. / szczur p.o.	0,87	-0,1	0,93
mysz p.o. / szczur i.p.	0,8	0,48	0,9
mysz p.o. / szczur i.v.	0,69	-0,64	0,5
szczur i.p. / mysz i.v.	0,79	-0,26	0,78
szczur p.o. / mysz s.c.	0,77	-0,37	0,71
szczur p.o. / mysz i.p.	0,73	-0,52	0,73
szczur p.o. / mysz i.v.	0,72	-0,54	0,7
szczur p.o. / szczur i.p.	0,81	0,53	0,86

LD50 - dawka powodująca efekt letalny u 50 % badanych zwierząt
system1, system2 - dwa organizmy poddane badaniu

Stąd ADME jako funkcja przyjmuje postać:

$$\mathbf{\mathit{f}(ADME) = Log\ LD_{50}\ (system1) - Log\ LD_{50}\ (system2)}$$

lub jako stężenie efektywne:

$$\mathbf{Log\ Ceff = Log\ LD_{50}\ (system1) - Log\ LD_{50}\ (system2)}$$

Powyższe rozważania są punktem wyjścia do szerokiej analizy TSAR (ang.: *Toxicity Structure Activity Relationship*) badanego leku (Zmuidinawicius D i wsp. 2003).

Indeks terapeutyczny (TI) a interwał dawkowania

Indeks terapeutyczny (ang.: *Therapeutic Index*) jest to w ujęciu klasycznym wartość wyrażająca stosunek dawki toksycznej lub letalnej do wartości dawki efektywnej. Przedział stężeń pomiędzy obiema wartościami określa się często jako okno terapeutyczne - TW (ang.: *Therapeutic Window*). Ze zwiększeniem wartości okna terapeutycznego wzrasta bezpieczeństwo leku. Znając wartość TI dla leku można obliczyć jaki interwał dawkowania (τ) jest bezpieczny a jednocześnie pozwoli na skuteczną terapię (Gibaldi M., Perrier D. 1982). Przyrównując odpowiednio do definicji wartość Cssmax do Cssmin można opisać zależność:

$$\mathbf{Cssmax / Cssmin = e^{\beta x \tau}}$$

Stąd:

$$\mathbf{\tau =< t_{1/2} x (LnTI / Ln2)}$$

Stąd dla różnych wartości okresu półtrwania w fazie eliminacji i różnych wartości indeksu terapeutycznego można obliczyć różne wartości minimalnego interwału dawkowania:

t1/2	1	2	3	5	8	10
TI	tau					
2	1,00	2,00	3,00	5,00	8,00	10,00
5	2,32	4,64	6,97	11,61	18,58	23,22
10	3,32	6,64	9,97	16,61	26,58	33,22
20	4,32	8,64	12,97	21,61	34,58	43,22
100	6,64	13,29	19,93	33,22	53,15	66,44

t1/2	12	14	18	20	24	30
TI	tau					
2	12,00	14,00	18,00	20,00	24,00	30,00
5	27,86	32,51	41,79	46,44	55,73	69,66
10	39,86	46,51	59,79	66,44	79,73	99,66
20	51,86	60,51	77,79	86,44	103,73	129,66
100	79,73	93,01	119,59	132,88	159,45	199,32

Rys. Symulacje ilustrujące zależność pomiędzy wartościami indeksu terapeutycznego, okresu półtrwania w fazie eliminacji i interwału dawkowania.

Po przekształceniu wzoru na granicę interwału dawkowania można powrócić do wartości indeksu terapeutycznego. Nie znając jego wartości dla danego leku można sprawdzić do jakiej wartości TI odwołano się przy projektowaniu dawkowania.

$$\mathbf{LnTI / Ln2 => \tau / t_{1/2}} \quad \text{stąd} \quad \mathbf{LnTI => \tau \times Ln2 / t_{1/2}}$$

Jeżeli rozpatrujemy proces pierwszego rzędu zakładając iż $t1/2 = Ln\ 2 / \beta$ otrzymujemy:

$$\mathbf{TI => e^{\beta x \tau}}$$

TI	β	τ
12	0,0002	12424,5
	0,002	1242,5
	0,02	124,2
	0,2	12,4
	2	1,2

TI	τ	β
12	0,5	5,0
	1,0	2,5
	4,0	0,6
	8,0	0,3
	16,0	0,2

Rys. Zależności pomiędzy indeksem terapeutycznym a wartościami interwału dawkowania i stałej szybkości eliminacji.

E - podstawa logarytmu naturalnego
τ - interwał dawkowania
β - stała szybkości eliminacji

Z formuły tej wyprowadzić można także zależność między TI a β.

$$\beta = < \mathbf{LnTI} / \tau \qquad \text{oraz} \qquad \tau = < \mathbf{LnTI} / \beta$$

Stąd znając wartość stałej szybkości eliminacji oraz wartość indeksu terapeutycznego obliczyć można bezpieczną wartość interwału dawkowania dla leku. Z drugiej strony dla zakładanych wartości interwału dawkowania w fazie symulowania opłacalności produkcji leku, farmakoekonomiki stosowania nowego preparatu określić można pożądany wymiar eliminacji. Idąc za możliwością wyrażenia wartości stałej szybkości eliminacji wartością MRT. Dla procesów pierwszego rzędu otrzymujemy:

$$\tau = < \mathbf{LnTI \times MRT}$$

oraz

$$\mathbf{MRT} = < \tau / \mathbf{LnTI}$$

$$\mathbf{TI} = > \mathbf{e}^{\tau / MRT}$$

Stąd w przypadku znanej wartości średniego czasu przebywania leku w organizmie i wartości indeksu terapeutycznego można również określić bezpieczną wartość interwału dawkowania. Z drugiej strony dla zakładanego interwału dawkowania można wstępnie określić wartość MRT podobnie jak w przypadku wartości stałej szybkości eliminacji. Wplatając w tok rozumowania wartość średniego stężenia w stanie ustalonym - Cavg = AUC / τ wiedząc że AUC x MRT = AUMC, uzyskujemy zależności:

$$\mathbf{TI} = > \mathbf{e}^{AUMC / Cavg}$$

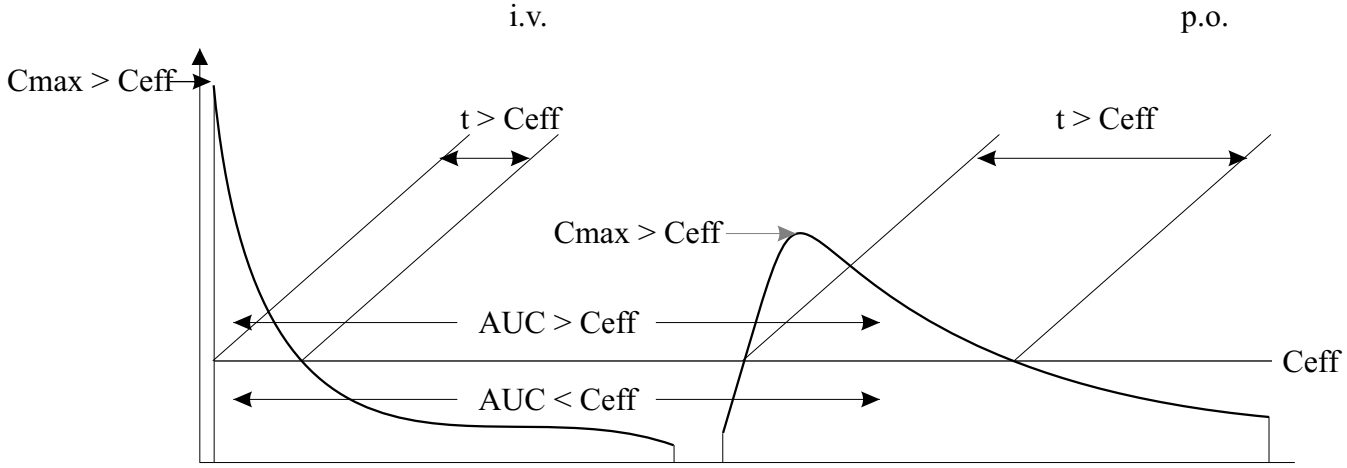
$$\mathbf{Cavg} = < \mathbf{Ln\ TI \times AUMC}$$

Stężenie efektywne - Ceff (ang.: *Effective Concentration*)

Stężenie efektywne to stężenie leku w tkance docelowej, którego wartość pozwala osiągnąć zamierzony efekt terapeutyczny. Kontrolę takiego stężenia ułatwia znajomość korelacji stężenia leku w osoczu ze stężeniem terapeutycznym leku w tkance objętej dysfunkcją lub wybranymi parametrami farmakokinetycznymi leku. W przypadku jednorazowego padania leku wartość tę można zamieścić na wykresie zależności stężenie czas stwierdzając czy w przypadku podanej dawki stężenie takie zostało osiągnięte. W praktyce znajomość stężenia efektywnego najczęściej zmierza do porównania z parametrami farmakokinetycznymi określającymi dla danego przypadku stężenia maksymalne.

W antybiotykoterapii Ceff zwykle równoznaczne jest z MIC. Analiza wartości ilustrujących zależność pomiędzy wzrostem bakterii patogennych a wybranymi parametrami farmakokinetycznymi kwalifikuje je do analizy PK/PD. Parametrami efektu czyli parametrami farmakodynamicznymi są w tym wypadku najczęściej

- MIC minimalne stężenie hamujące (ang.: *Minimal Inhibitory Concentration*)
- MBC minimalne stężenie bójcze (ang.: *Minimal Bactericidal Concentration*)
- MPC minimalne stężenie hamujące rozwój mutantów (ang.: *Mutant Prevention Concentration*)
- MEC minimalne stężenie efektywne (ang.: *Minimal Effective Concentration*)



Rys. Różnice w wartości stężenia efektywnego i czasu jego trwania w przypadku dwóch krzywych o jednakowej wartości AUC.

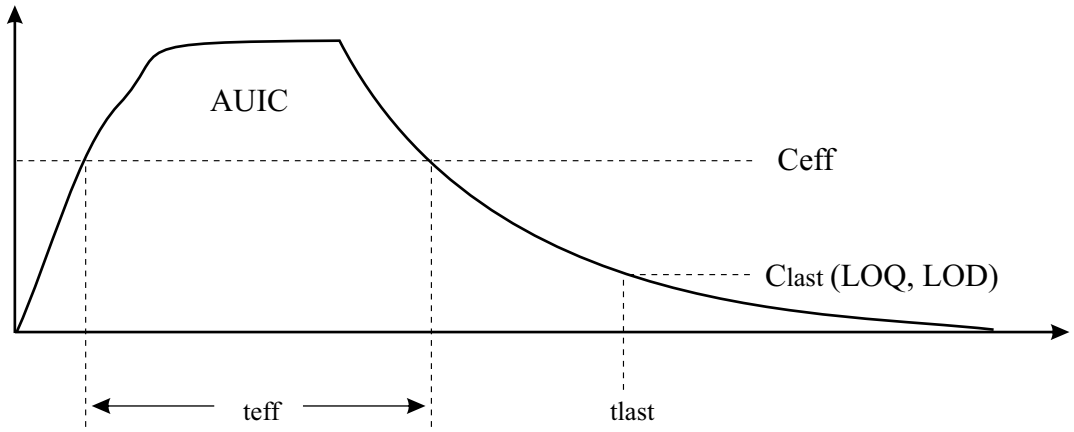
Często jednak samo określenie stosunku dawki efektywnej do parametrów farmakokinetycznych określających maksymalne stężenia graniczne nie do końca opisuje dany przypadek. Parametrem farmakokinetycznym który dodatkowo opisuje charakter Ceff jest czas trwania stężenia efektywnego - teff.

$$\mathbf{AUC = (AUC > C_{eff}) + (AUC < C_{eff})}$$

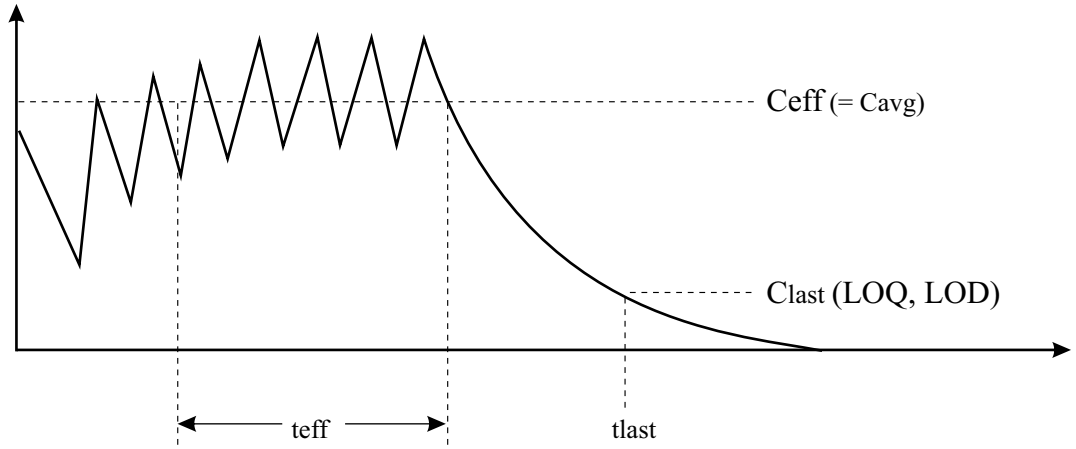
$$\mathbf{AUMC = (AUMC > C_{eff}) + (AUMC < C_{eff})}$$

$$\mathbf{AUE = (Cmax - Ceff)} / b$$

AUC - suma pól nad i pod linią Ceff
AUE - pole powierzchni nad linią Ceff



Rys. Prawidłowy stosunek granic wyznaczonych przez Clast (LOQ, LOD), tlast / Ceff, teff dla wlewu donaczyniowego.



Rys. Prawidłowy stosunek granic wyznaczonych przez Clast (LOQ, LOD), tlast / Ceff (Cavg), teff (tavg) dla wielokrotnego podania leku.

Dla dwóch krzywych o jednakowych wartościach AUC, t1/2β oraz Cmax dla jednej wartości Ceff uzyskać można zupełnie różne wartości teff. Obliczanie wartości tych parametrów ma ogromne znaczenie w badaniach porównawczych leków. Stosunek pola powierzchni do MIC określa się często skrótem AUIC (ang.: *Area under Inhibitory Serum Concentration; Area Under Inhibitory Curve*). Odnosi się on do stężenia - miana leku SIT (ang.: *Serum inhibitory titre*) które będzie wykazywać działanie inhibicyjne o wartości wyrażonej stężeniem MIC .

AUIC = AUC / MIC_{90}

Innym sposobem oceny efektu działania jest stosunek C_{max} / MIC_{90}, lub Cpo / MIC. Wartości te opisują miedzy innymi stopień nasilenia PAE (ang.: *Post-antibiotic Effect*). PAE to efekt działania antybakteryjnego po podaniu ostatniej dawki leku obecnego w tkankach w niewielkich stężeniach. Przyczyn tego efektu upatruje się w możliwości wiązania się antybiotyku z miejscami bytowania bakterii w tkankach. Ponieważ zwykle stężenia leku w tkance nie są możliwe do określenia, lecz efekt działania antybiotyku jest widoczny. Z punktu widzenia kinetyki zjawiska jakim jest PAE jest wypadkową czasu spadku ilości bakterii T do 1 x Log_{10} i czasu rozwoju populacji kontrolnej Tc. Wartość PAE w warunkach *in vitro* obliczamy korzystając z zależności:

$$\mathbf{PAE = T - T_C}$$

In vivo dodatkowym parametrem jest czas w którym stężenie leku w osoczu przewyższa wartość MIC (T > MIC) obliczamy korzystając z zależności:

Podanie donaczyniowe: $\mathbf{PAE = T - T_C - (T > MIC)}$

Podanie pozanaczyniowe: $\mathbf{PAE = T - T_C - (T > MIC) - t_{lag}}$

Kolejnym parametrem opisującym efekt PAE jest PA - SME efekt po podaniu antybiotyku wywołany stężeniem niższym od MIC (ang.: *Post Antibiotic Sub MIC Effect*). Definicja efektu obejmuje podanie pierwszej dawki antybiotyku - pierwszej ekspozycji i powtórnej ekspozycji dawki mniejszej od MIC (0.5 x MIC, 0.3 x MIC). Czas spadku ilości bakterii o wartość 1 x Log10 T_{PA} odnoszony jest do wartości czasu w populacji kontrolnej nie poddanej ekspozycji.

$$\mathbf{PAE = T_{PA} - T_C}$$

Leki których dystrybucja pozwala na osiągniecie dużych wartości PAE lub PAE - SME mają zwykle dłuższe interwały dawkowania przy zachowanej wysokiej skuteczności (Spangler S.K. 1997). PAE dzieli chemioterapeutyki na dwie grupy których analiza PK/PD dotyczy albo zależności T > MIC albo AUC > MIC.

Krótki lub brak PAE	zależność PK/PD	T > MIC
Długi PAE	zależność PK/PD	AUC / MIC
		Cmax / MIC

Czas w którym została przekroczona wartość stężenia efektywnego określa w toksykokinetyce czas w jakim organizm narażony jest na ewentualne działanie niepożądane podanego leku lub czas działania substancji toksycznej - czas działania toksycznego. Z punktu widzenia modelowania PK/PD antybiotyki dzieli się na dwie grupy:

- grupę w której efekt zależny jest od stężenia (Co; Cmax)
- grupę w której efekt nie jest zależny od stężenia

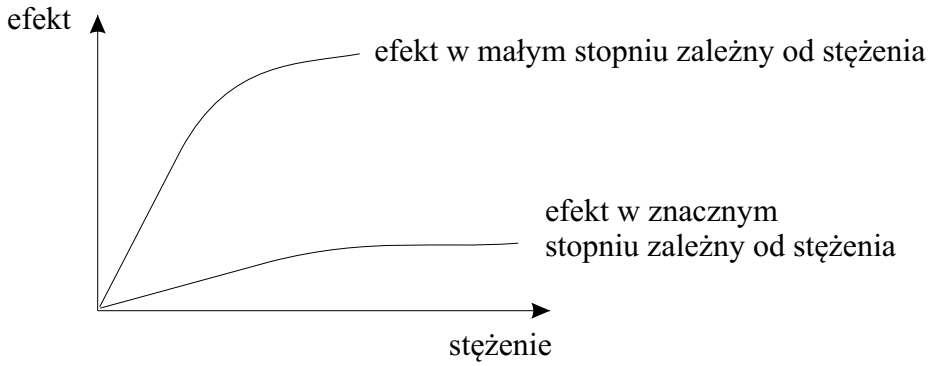
W grupie w której efekt zależny jest od stężenia dużą korelacje z efektem wykazują wszystkie czynniki wpływające na uzyskane stężenie maksymalne. Stąd także duża korelacja wartości AUC z oczekiwanym efektem (AUC:MIC). Zmiany niektórych faz obserwowane na krzywej C-T również wykazują dużą korelację z efektem. Stąd efektywność działania takich leków wzrasta w przypadku gdy rośnie stosunek:

$$\mathbf{Cmax > MIC}$$

$$\mathbf{AUC_{(>MIC)} > AUC_{(<MIC)}}$$

Maksymalny efekt uzyskany z zastosowaniem takich antybiotyków uwidacznia się dopiero w stężeniach 8 x MIC do 20 x MIC. W grupie w której efekt nie jest zależny od stężenia korelację z efektem wykazują wszystkie czynniki wpływające na parametry czasu np. średni czas przebywania leku w organizmie. Efekt uzyskany z zastosowaniem takich antybiotyków nie jest zależny od zmiany stężenia nawet w granicach 2 x MIC do 4 x MIC (Schoenwald R.D. 2002). Stąd efektywność działania takich leków wzrasta w przypadku gdy rośnie stosunek:

$$\mathbf{t_{eff} > t_{(o\text{-}tlast)}}$$



Ryc. Narastanie efektu stosowania leku zależne i niezależne od dawki.

W farmakologii klinicznej oba pojęcia (Ceff i teff) odnieść można do minimalnego stężenia hamującego chemioterapeutyku (MIC) i przedziału czasu w jakim zostało ono przekroczone lub osiągnięte warunkując hamowanie rozwoju patogenu. Dla wielu leków znacznie większe znaczenie przywiązuje się do określania czasu trwania stężenia efektywnego - teff (Burgess D.S. 1999). Znaczna korelacja czasu trwania stężenia efektywnego z efektem terapeutycznym chemioterapeutyków jest zjawiskiem znanym. W chwili obecnej dla danego mikroorganizmu określa się teff jako procent wartości interwału dawkowania - τ.

$$\tau\% = (\text{teff} \times 100) / \tau$$

Odnosząc zależność do MIC:

$$\tau\% = [(T > MIC) \times 100] / \tau$$

τ% - czas występowania stężenia efektywnego jako procent wartości interwału dawkowania

Kolejna informacja płynąca ze znajomości Ceff i teff to wartość pola powierzchni tej części krzywej która odcięta została wartością stężenia efektywnego. Stosunek pól położonych nad linią CE do pól położonych pod nią opisuje ilościowo rozkład dawki leku w przypadku badanego schematu doświadczalnego. Cechą stężenia efektywnego w danym układzie kinetycznym jest także to że jest ono zawsze wyższe od LOQ lub LOD. Ponadto we właściwie przeprowadzonym doświadczeniu czas teff charakterystyczny dla wartości tego stężenia i określonej wartości AUC powinien być krótszy od Clast czyli czasu pobrania ostatniej próby badanej tkanki do analizy. Tak więc znajomość takiego stężenia i czasu pozwala na wstępne zaprojektowanie charakteru badań farmakokinetycznych. Obliczenia i modelowanie PK/PD zwykle odnosi się do zmian stężenia frakcji leku niezwiązanej z białkami. Przyjmując za założenie to że tylko wolna postać leku może wykazywać działanie terapeutyczne i podlegać eliminacji:

$$AUC / MIC = (fu \times AUC) / MIC$$

W chwili obecnej jako odnośnik do dawkowania i korekcji dawki proponuje się dla różnych grup chemioterapeutyków różne korelacje pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi a farmakodynamicznymi (Ball P. i wsp. 2002). Trzy podstawowe grupy to zależności typu PK/PD to:

Cmax > MIC	**[Co > MIC; Cmax > MBC]**
T > MIC	**[T > MBC; MRT > MIC]**
AUC(0-24h) / MIC	**[(24 - AUC(o-α)) / MIC]** gdzie **AUC24 = D24 / Cl(b)**

Przykłady chemioterapeutyków i zależności PK/PD wykazujących dużą korelację z efektem działania:

Cmax > MBC	Fluorochinolony	
T > MBC	β - laktamy	
AUC(0-24h) / MIC	Fluorochinolony	**AUC(0-24h) / MIC = 50 - 100**
(24 - AUC(o-α)) / MIC	Glikopeptydy	
AUIC	Tetracykliny	
	Ketolidy	
	Makrolidy	(t1/2, PAE duże wartości)
	Azytromycyna	
	Flukonazol	
	Streptograminy	
	Aminoglikozydy	
Cmax / MIC	Aminoglikozydy	**Cmax / MIC > 8**
Co / MIC	Fluorochinolony	**Cmax / MIC > 10** - 12
	β - laktamy	**Cmax / MIC > 4**
	Ketolidy	
	Amfoterycyna B	
	Metronidazol	
T > MIC	β - laktamy	**T > MIC > 70%**
(Czas trwania MIC)	Klindamycyna	
	Makrolidy	(t1/2, PAE małe wartości)
	Flucytozyna	
	Oksazolidony	
	Karbapenemy	
	Monobaktamy	
	Cefalosporyny	

Na podstawie symulacji PK/PD określono dla antybiotyków sposób obliczania dawki uwzględniający wartość AUIE - czyli pola powierzchni nad stężeniem gwarantującym efekt (Tutain P.L. i wsp. 2002).

$$D_{(n)} = (AUIC \times MIC \times Cl_{(n)}) / (f_u \times F \times n)$$

lub

$$D_{(n)} = [AUIC \times MIC \times (D / AUC)] / (f_u \times F \times n)$$

n - godziny

Innym parametrem stosowanym w analizie PK/PD jest WAUC (ang.: *Weightet Area Under The Curve*) czyli ważona wartość AUC:

$$WAUC = (AUC / MIC) \times (teff / teffmax)$$

teffmax - czas stężenia efektywnego równy 24 h

To które zestawienie parametrów daje najlepszy opis przypadku zależny także w znacznej mierze od kompartmentu w którym lek ma osiągnąć docelowe stężenie oraz specyfiki patogenu (Auckenthaler R. 2002). Dla CNS największą korelację z efektem terapeutyczny ma czas trwania minimalnego stężenia bójczego T > MBC. Dla niektórych leków zamiast MIC wskaźnikiem gwarantującym dużą korelację z efektem jest stosunek MIC / MPC do wybranych parametrów kinetycznych. Modele typu PK / PD korzystają dla opisania powyższych zależności z równań farmakokinetyki populacyjnej.

$$\mathbf{T > MIC = [Ln\ (D / Vd / fu) - Ln(MIC)] / \beta}$$

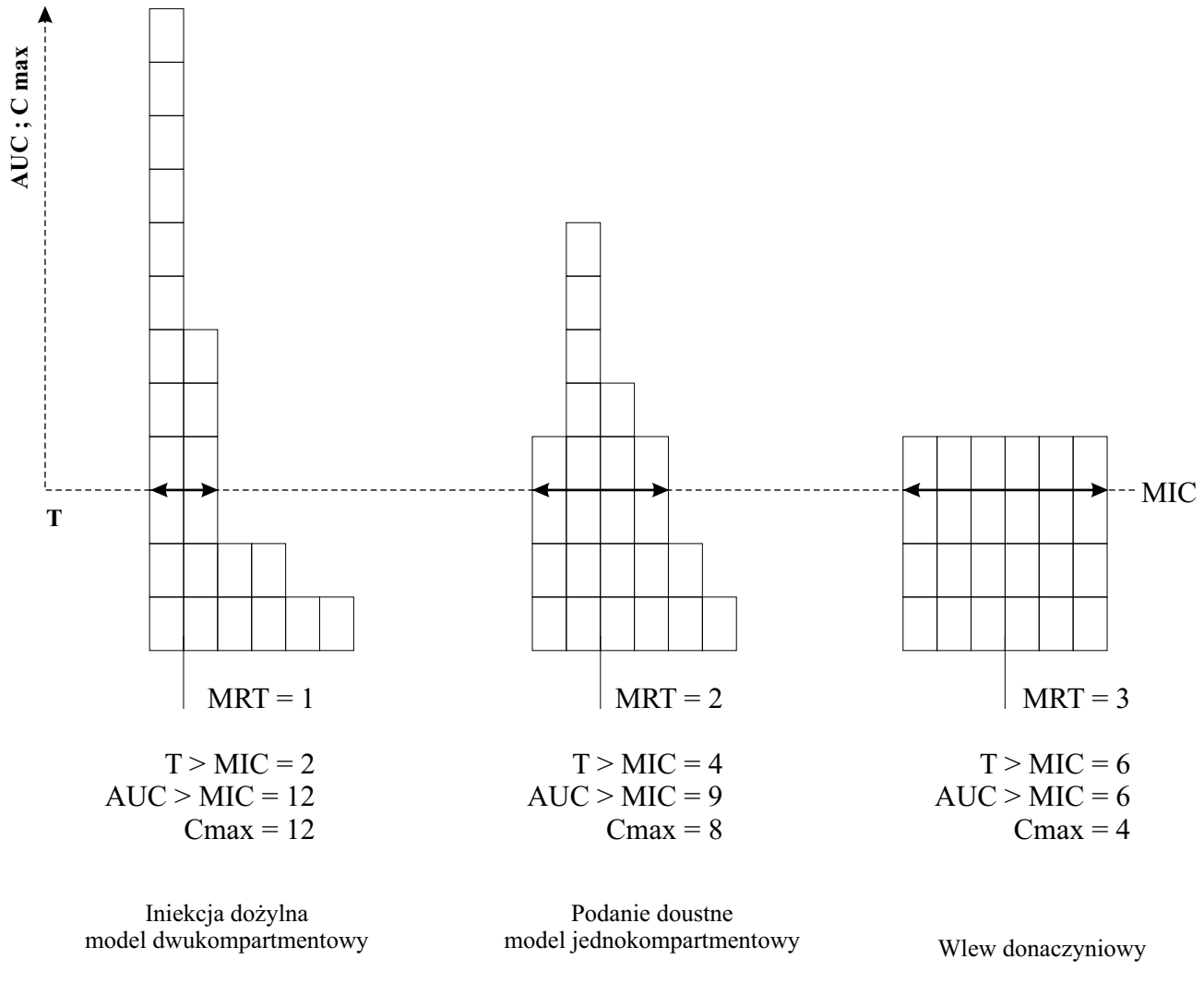
lub przyjmując że MRT = 1 / β

$$\mathbf{T > MIC = [Ln\ (D / Vd / fu) - Ln(MIC)] / (1 / MRT)}$$

Przyjmując że Vd = D/Co

$$\mathbf{T > MIC = [Ln\ (Co / fu) - Ln(MIC)] / \beta}$$

$$\mathbf{T > MIC = t1/2\beta \times Ln\ (Cmax / MIC) / Ln\ (2) + tmax}$$

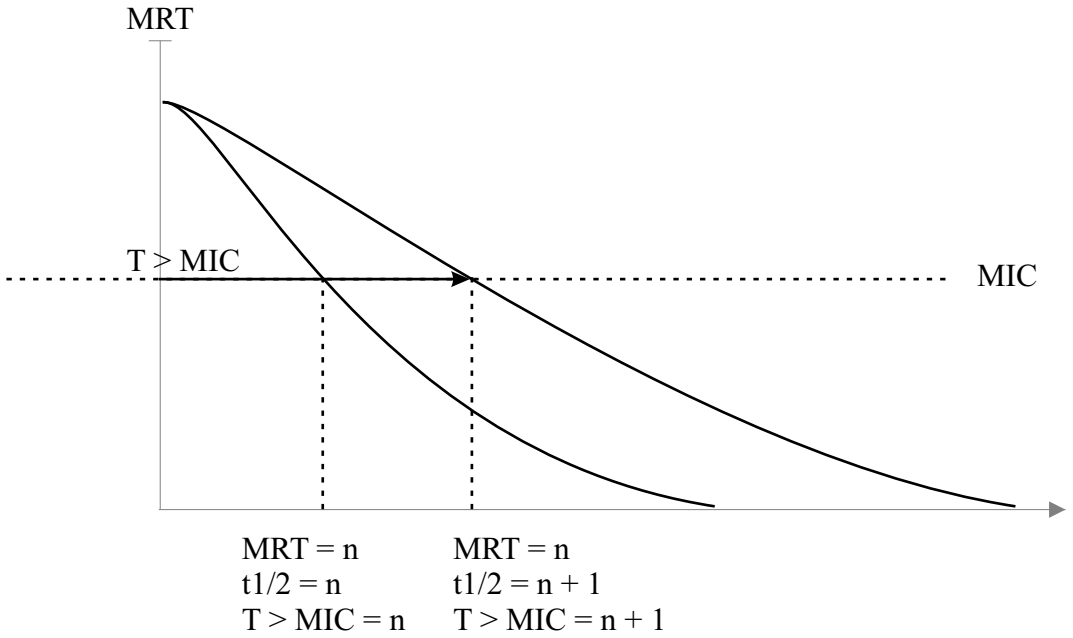


Rys. Symulacja analizy zależności PK/PD chemioterapeutyków.

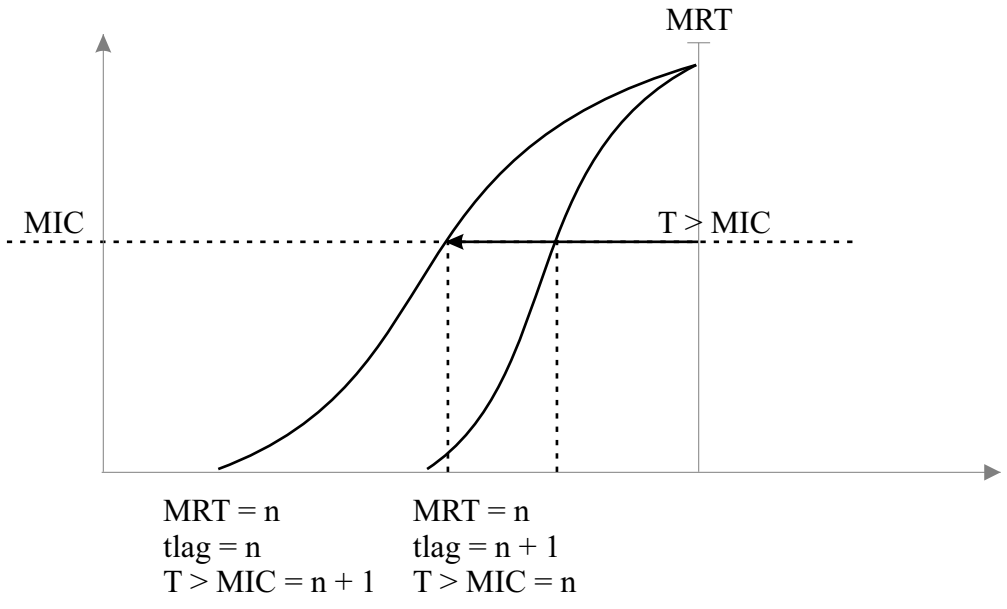
lub

$$\mathbf{T > MIC = [Ln\ (C_o / f_u) - Ln(MIC)] / (1 / MRT)}$$

Modyfikacje chemioterapeutyków zmierzające do zmiany przebiegu krzywej C-T opierają się na kilku podstawowych założeniach ściśle związanych z obserwacją LADME. Założenia te szczególnie wyraźnie zarysowują się dla klasycznych, typowych postaci leków których ocena PK/PD wyrażona jest wartościami T > MIC oraz AUC > MIC. Dla leków tych szybkie uwalnianie i wchłanianie sprzyja wzrostowi wartości T > MIC oraz AUC > MIC. Ważnym parametrem farmakokinetycznym służącym tego typu analizie PK/PD jest średni czas przebywania leku w organizmie - MRT.



Rys. Symulacja wpływu zależności MRT / t1/2 na wartość T > MIC.



Rys. Symulacja wpływu zależności MRT / tlag na wartość T > MIC.

Wydłużanie MRT na ogół będzie sprzyjać wzrastaniu wartości T > MIC. Zjawisko to pogłębiać będzie szybki przebieg faz L i A. Niska wartość MRT sprzyjać będzie zmniejszaniu wartości T > MIC. Sytuację tą pogłębiać będzie wydłużanie fazy M i E. Dla leków których ocena dotyczy porównania typu Cmax / MIC średni czas przebywania leku w organizmie opisuje kolejny związek. Ze wzrostem MRT wartości Co będą spadać i towarzyszyć będą spadkowi AUC > MIC. Inne relacje przedstawia stosunek wartości średniego czasu przebywania leku w organizmie do biologicznego okresu półtrwania leku. Dla dwóch modyfikacji tego samego układu którego wartość terapeutyczną opisuje T > MIC istnieje zależność:

- spadek wartości stosunku MRT / t1/2β towarzyszy wydłużaniu wartości T > MIC.
- wzrost wartości stosunku MRT / t1/2β towarzyszy skracaniu wartości T > MIC.

Zależność ta nabiera szczególnej wartości w przypadku nieliniowej kinetyki eliminacji leku. D l a l e k ó w podawanych drogą doustną lub innymi które mogą gwarantować dużą wartość tlag - czasu opóźnienia wchłaniania równie ważny jest stosunek MRT do tlag. Szczególna wartość zależności uwidacznia się w przypadku nieliniowej kinetyki wchłaniania leku.

- spadkowi wartości stosunku MRT / tlag towarzyszy zmniejszenie wartości T > MIC
- wzrostowi wartości stosunku MRT / tlag towarzyszy wydłużenie wartości T > MIC

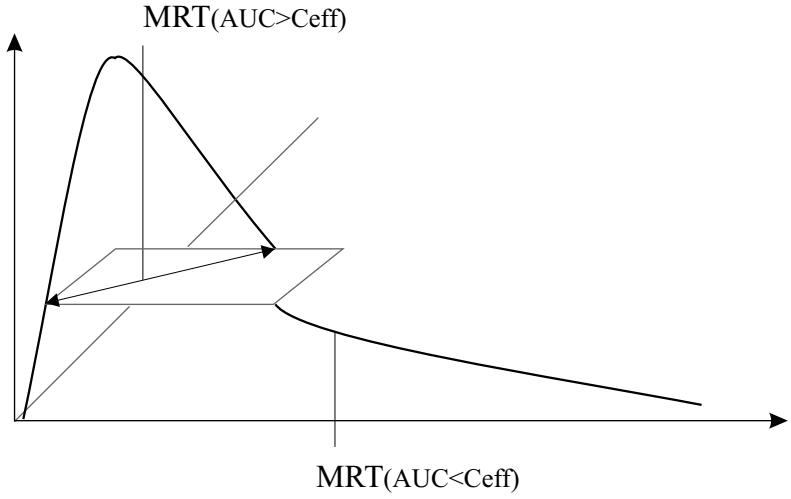
Stąd dla leków dla których wartość T > Ceff jest wskaźnikiem efektywności działania celowym jest szukanie korelacji pomiędzy MRT(AUC > Ceff), czyli średnim czasem obecności leku w czasie gdy jego stężenie przekracza Ceff, a parametrami klinicznymi. Oraz opis zależności:

$$\mathbf{MRT_{(AUC > Ceff)} / Ceff} \qquad \text{lub} \qquad \mathbf{MRT_{(AUC > MIC)} / MIC}$$

$$\mathbf{MRT = [AUMC_{(>Ceff)} / AUC_{(>Ceff)} + AUMC_{(<Ceff)} / AUC_{(<Ceff)}] / 2}$$

$$\mathbf{MRT = [MRT_{(AUC > Ceff)} + MRT_{(AUC < Ceff)}] / 2}$$

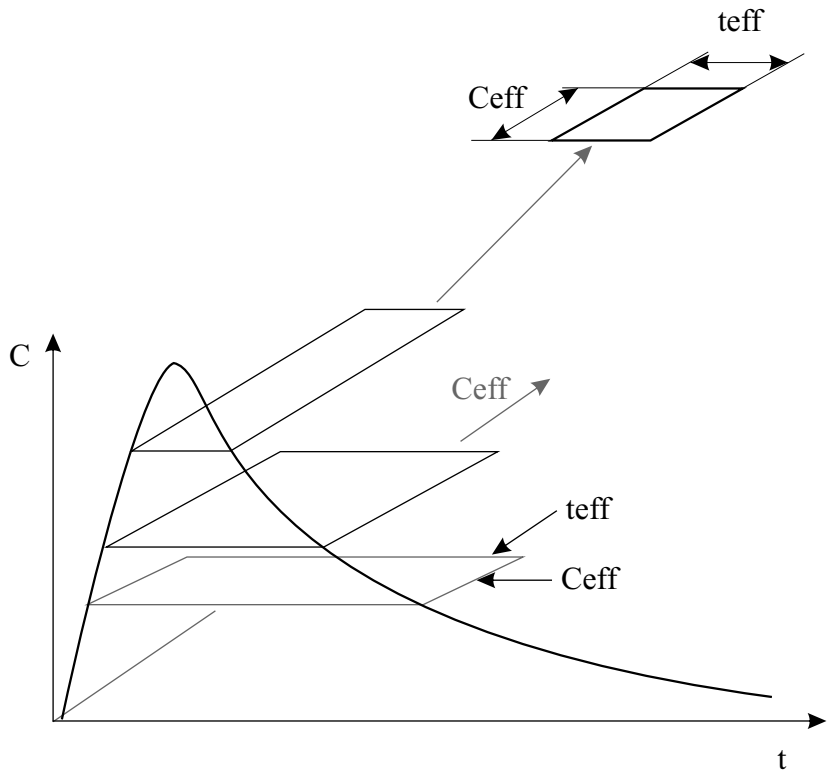
Dla leków w przypadku których korelacja czasu - T trwania stężenia efektywnego wykazuje największą korelację z efektem działania, MRT(AUC<Ceff) powinien mieć wartość zbliżoną do wartości T. Podobnie różnica pomiędzy MRT(AUC<Ceff) a MRT(AUC>Ceff) powinna być jak najbliższa 1.



Ryc. Stosunek MRT wyznaczonego w obrębie pola AUC > Ceff do MRT wyznaczonego w obrębie pola AUC < Ceff.

Jednym z elementów optymalizacji terapii oraz analizy PK/PD chemioterapeutyków jest również pole efektywne EA. Pole to obliczyć można dla każdego punktu stężenia efektywnego lub czasu w zakresie którego lek cechuje określone stężenie we krwi.

$$EA = Ceff \times teff$$



Ryc. Sposób obliczania pola efektywnego niezależnie od modelu obliczeniowego po jednorazowym podaniu leku.

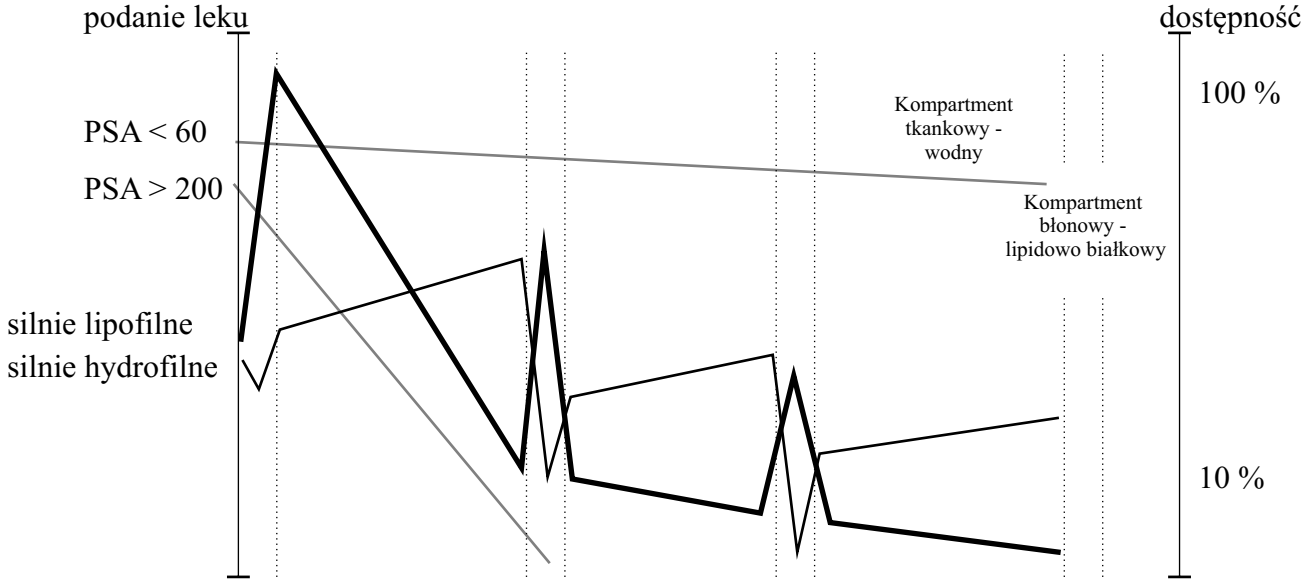
Stężenie efektywne leku powinno być zawsze stężeniem mieszczącym się w oknie terapeutycznym leku. Jednak często wykracza poza zakres okna terapeutycznego z uwagi na dużą zmienność wewnątrzosobniczą lub ze względu na wąski zakres okna terapeutycznego. Za leki o dużej zmienności przyjmuje się substancje w których wartość ta przekracza 30%. Pod względem zróżnicowania obu wymienionych parametrów leki można podzielić na cztery klasy(Chow S., Liu J. 2000):

	indywidualne okno terapeutyczne	zmienność wewnątrzosobnicza	LogP ?
Klasa A	wąski zakres	wysoka zmienność	1 <<
Klasa B	wąski zakres	niska zmienność	1 = <
Klasa C	szeroki zakres	niska zmienność	1 = >
Klasa D	szeroki zakres	wysoka zmienność	1 <

Leki o dużej wartości LogP - leki lipofilne zwykle wykazują znacznie większa zmienność niż leki hydrofilne stąd hipoteza i próba rozszerzenia klasyfikacji ABCD w zależności od wartości okna terapeutycznego i zmienności.

Transport leków przez błony, dyspozycja leków

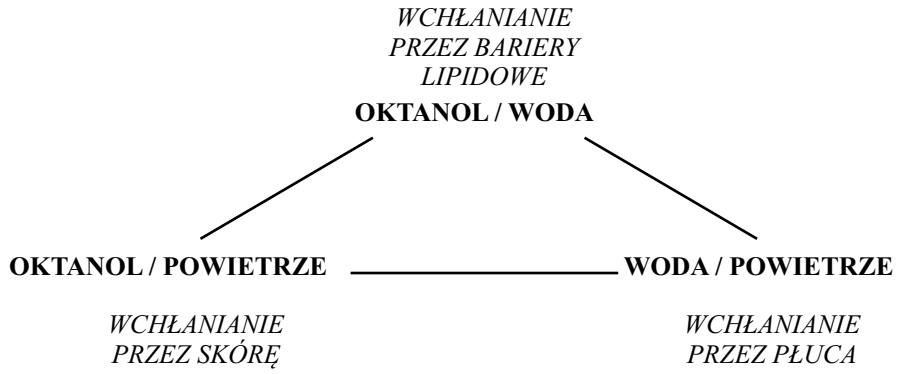
Procesy kinetyczne jakim leki ulegają w organizmie regulowane są przez wiele rodzajów transportu które umożliwiają ich dyspozycję. Każda z cząsteczek leku osiąga kompartmenty - przestrzenie organizmu tylko dzięki zjawiskom transportu i przepuszczalności. Transport leku w organizmie opisują między innymi parametry farmakokinetyczne ilustrujące całość jako zjawisko statystyczne. Są to między innymi MRT - średni czas obecności leku w organizmie lub MTT - średni czas przechodzenia leku przez organizm (ang. *Mean Transit Time*). Statystyczny opis drogi jaką leki pokonują w organizmie pozwala opisać omawiane zjawiska zarówno w skali makro jak i w skali komórki.Transport leku to zjawisko zachodzące pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a komórkami nabłonków lub płynu międzykomórkowego, krwią i tkankami. Fizjologiczną funkcją błon biologicznych a wśród nich błon specjalizowanych jest ochrona makroorganizmu oraz selektywność w stosunku do molekuł które chcą je pokonać. Stąd rodzaj transportu leku w znacznym stopniu wpływa na dostępność farmaceutyczną i dostępność biologiczną leku. Na szybkość przemieszczania się leku w organizmie znaczny wpływ mają procesy metabolizmu leku oraz jego wydalania, w ramach których pokonuje kolejne bariery oraz ulega licznym przekształceniom. Procesy te zachodzą z różnym nasileniem począwszy już od fazy wchłaniania. Rozważając tematykę transportu leków w organizmach zwierząt i człowieka należy przyjąć że są to makrokompartmenty tworzone przez wodę i bariery utworzone z białek i lipidów. Stąd tak ważna jest znajomość lipofilności leków - wpływającej w znacznym stopniu na ich dostępność. Cecha ta jest w wysokim stopniu skorelowana z transportem biernym przez błony komórkowe (Sawada G.A. i wsp. 1999; Testa B. 2001). Jednak znaczna lipofilność nie zawsze oznacza dużą dostępność szczególnie jeżeli do pokonania jest kilka warstw błon lipidowych oddzielonych kompartmentami o znacznym udziale wody. Niejednokrotnie ilość błon jaką lek musi pokonać podczas swej wędrówki w organizmie jest bardzo duża. Przykładem jest wątroba gdzie jeden centymetr sześcienny tkanki tworzy łącznie ponad 10 m^2 układów błonowych (Weisiger R.A., Zucker S.D. 2001)



Rys. Wpływ budowy błon biologicznych na rozmieszczenie leków silnie hydro i lipofilnych.

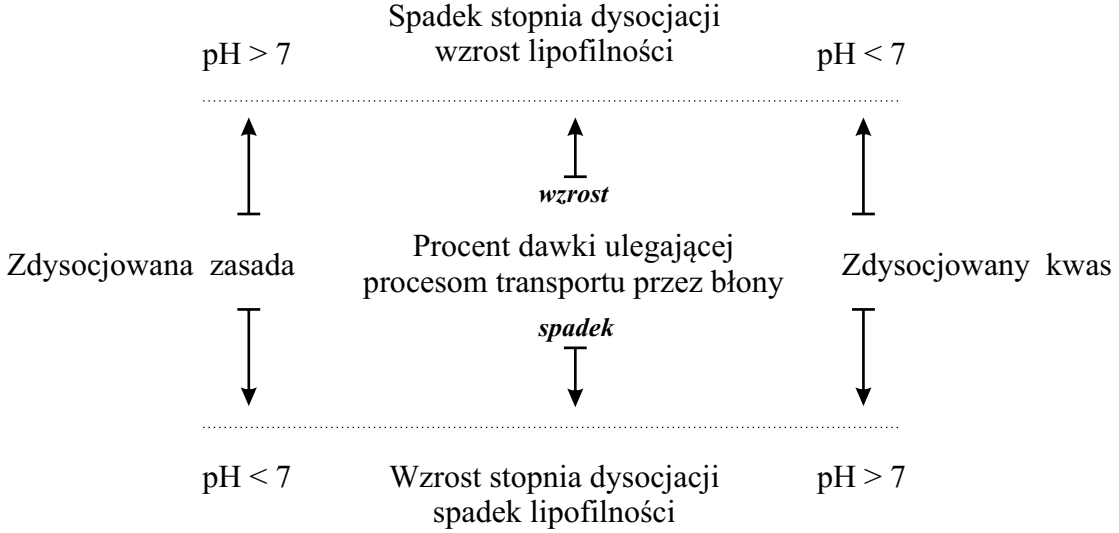
Lipofilność jest wypadkową polarności i hydrofilności leku. Ze wzrostem polarności związany jest wzrost hydrofilności związku. Spadek hydrofilności zwykle związany jest z mniejszą polarnością związku.

Lipofilność = Hydrofilność - Polarność



Rys. Związek współczynników rozdziału z dostępnością biologiczną leków.

Stwierdzono że największą dostępność biologiczną oraz zdolność do pokonywania różnego typu barier biologicznych mają leki słabo lipofilne LogP od 1,5 do 3,5 o małej powierzchni polarnej cząsteczki - PSA. Lipofilność jest wartością stałą dla leków które nie są elektrolitami. Dla substancji które mają właściwości kwasowe lub zasadowe lipofilność zależna jest od stopnia dysocjacji. Dla tej grupy leków lipofilność maleje z wzrostem stopnia zdysocjowania związku. Im lek jest bardziej zdysocjowany tym trudniej penetruje błony biologiczne. Dla zasad stopień dysocjacji rośnie wraz ze zmniejszaniem się pH roztworu w którym lek się znajduje. W roztworach o dużym pH dysocjacja zmniejsza się i lek występuje w postaci niezdysocjowanej. Odwrotnie dzieje się w przypadku leków o charakterze kwaśnym. Ze wzrostem pH stopień zdysocjowania rośnie natomiast spadek pH cofa proces dysocjacji. Wyjątkowe miejsce wśród elektrolitów - leków zajmują amfolity które w warunkach pKa które opisuje ich cząsteczki (pKb zasadowe i pKa kwasowe) mają zdolność buforowania stałej wartości lipofilności związku (Bouchard G. i wsp. 2002). Przykładem typowych amfolitów są cetyryzyna, labetalol, azapropazon. Śledzenie procesu dysocjacji leków o charakterze słabych zasad lub kwasów pozwala przewidzieć do pewnego stopnia ich skuteczność która wynika z współczynników rozdziału (oktanol/woda; woda/powietrze; oktanol/powietrze). Współczynniki te opisują wartości przenikania leku do odpowiedniego kompartmentu poprzez opis stopnia lipofilności. W przypadku niektórych substancji leczniczych, bądź trucizn efekt działania może być wprost proporcjonalny do wartości współczynnika rozdziału między wymienione fazy. Lipofilność leków określać można metodami pH - metryczną, woltametryczną lub HPLC w układzie faz odwróconych (RP).



Rys. Wpływ pH na dysocjację leków - słabych kwasów i zasad.

Najstarszą metodą obliczania współczynnika rozdziału oktanol / woda - ϕ opisywanego także jako logP jest metoda wytrząsania. Wynikiem jest obliczanie współczynnika na podstawie stężeń molowych w przeliczeniu na litr danej fazy. W tym celu wykorzystywane jest równanie:

$$\Phi = \mathbf{Log\ (C_{(oct)} / C_{(aq)})}$$

ϕ - współczynnika rozdziału oktanol / woda (LogPo/w)
C(oct) - stężenie leku w oktanolu
C(aq) - stężenie leku w wodzie

W chwili obecnej do obliczenia współczynnika rozdziału oktanol woda - LogP(o/w) lub współczynnika rozdziału oktanol woda w pKa 7.4 stosuje się programy w których wartość ta obliczana jest bezpośrednio po podaniu kodu SMILES lub numeru CAS. Znając procent leku jaki uległ dysocjacji w środowisku do którego został uwolniony z postaci leku można określić w jakiej mierze penetruje on błony biologiczne organizmu. Dla leków podawanych drogą parenteralną oczekiwane pKa w przypadku leków kwaśnych to < 4.4 a dla zasadowych > 10.4. W przypadku leków podawanych enteralnie pKa dla substancji o charakterze słabych kwasów powinno być < 4.5 a dla zasad > 8.5. Jest to pośredni wskaźnik skuteczności dla danej substancji związanej z jej dostępnością biologiczną, stąd:

Lek kwaśny	**pH > pKa**	silna dysocjacja
	pH < pKa	brak dysocjacji
Lek zasadowy	**pH > pKa**	brak dysocjacji
	pH < pKa	silna dysocjacja

Zatem dla kwasów i zasad procent dysocjacji obliczyć można korzystając z wzorów (Kostowski W. Kubikowski P. 1994):

$$\mathbf{A(\%) = 100 / [1 + 10^{(pKa - pH)}]} \qquad \mathbf{B(\%) = 100 / [1 + 10^{(pH - pKa)}]}$$

A(%) - procent leku o charakterze kwaśnym jaki uległ dysocjacji
B(%) - procent leku o charakterze zasadowym jaki uległ dysocjacji
pH - stężenie jonów wodorowych
pKa - stała dysocjacji

Powyższe wzory po przekształceniu pozwalają na obliczenie wartości pH dla żądanej wartości dysocjacji danego leku.

Dla leków o charakterze kwaśnym:

$$\mathbf{pH = pKa - Log\ [(100 / A(\%)) - 1]}$$

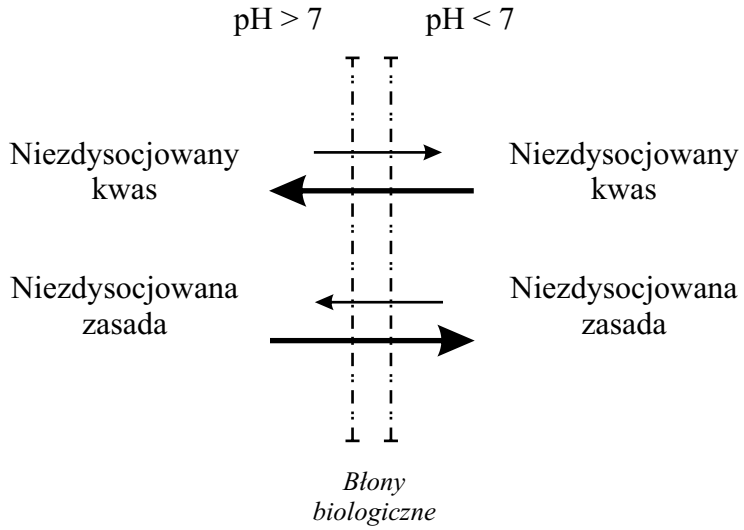
Dla leków o charakterze zasadowym:

$$\mathbf{pH = pKa + Log\ [(100 / B(\%)) - 1]}$$

Pozwalają także na obliczenie stężenia leku niezdysocjowanego Css.avg.un na podstawie znajomości średniego stężenia leku w fazie stacjonarnej Css.avg.

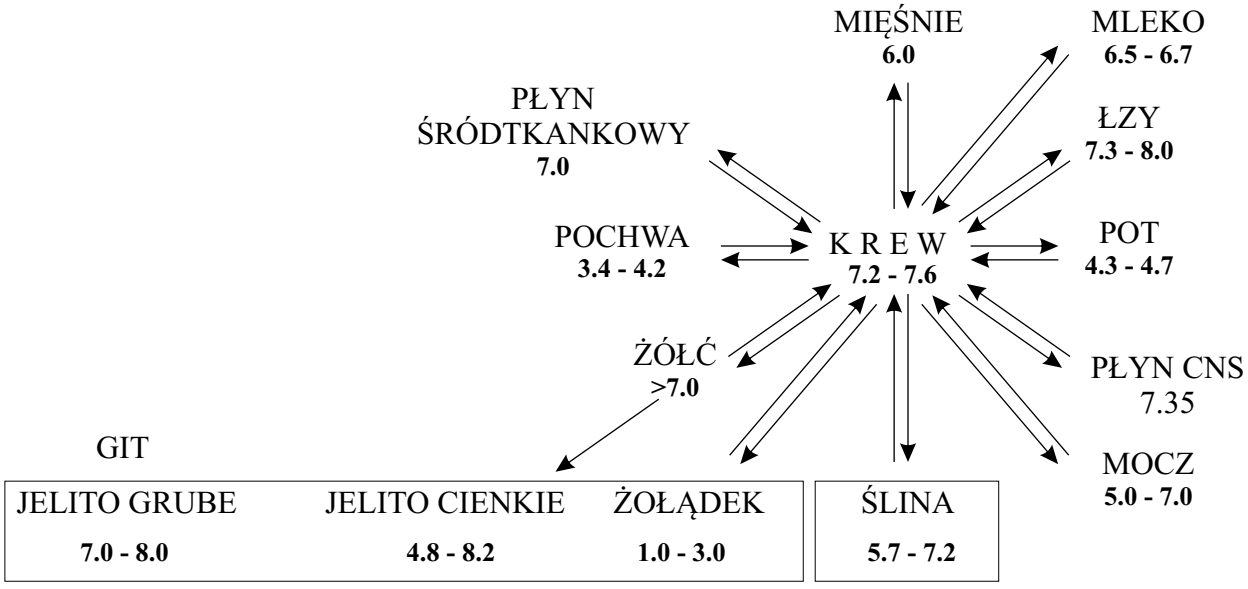
dla słabego kwasu: $\mathbf{C_{ss.avg.un} = C_{ss.avg} - [(C_{ss.avg} \times (100 / [1 + 10^{(pKa - pH)}])) / 100]}$

dla słabej zasady: $\mathbf{C_{ss.avg.un} = C_{ss.avg} - [(C_{ss.avg} \times (100 / [1 + 10^{(pH - pKa)}])) / 100]}$



Rys. Wpływ pH środowiska na kierunek transportu przez błony leków - słabych kwasów i zasad.

Optymalizacja farmakokinetyczna postaci leku pozwala w ten sposób uzyskać odpowiednio wysokie stężenie leku niezdysocjowanego w środowisku. W ramach procesów dyfuzji biernej kierunek transportu niezdysocjowanego leku regulowany będzie gradientem stężeń i różnicami w wartości pH po obu stronach błony. Niezdysocjowane kwasy podążać będą w kierunku środowiska (przestrzeni-kompartmentu) o wyższej wartości pH. Niezdysocjowane zasady będą transportowane w większym stopniu do do środowiska o niższej wartości pH. Po przejściu do tych kompartmentów stopień dysocjacji będzie wzrastać. Wartość pH środowisk - (przestrzeni - kompartmentów) organizmu do których wprowadzono lek w znacznej mierze moduluje procesy dystrybucji leku. Słabe wchłanianie z kompartmentu A do kompartmentu B może być równe procesom wzmożonego transportu substancji w kierunku odwrotnym.



Rys. Podstawowe kierunki dystrybucji zależne od uwarunkowań fizjologicznych, pKa leku, pH kompartmentów (pod nazwami) w organizmie człowieka.

	kwasy								
	pKa	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
jama ustna 6.2 - 7.2										
% dysocjacji		99,0	99,0	99,0	96,5	77,5	37,0	7,0	0,5	0,0
% dawki		1,0	1,0	1,0	3,5	22,5	63,0	93,0	99,5	100,0
żołądek 1.4 - 5.0										
% dysocjacji		59,5	50,5	45,0	25,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		40,5	49,5	55,0	75,0	95,5	100,0	100,0	100,0	100,0
dwunastnica 2.4 - 6.8										
% dysocjacji		85,0	59,5	50,5	49,0	43,0	19,0	2,5	0,0	0,0
% dawki		15,0	40,5	49,5	51,0	57,0	81,0	97,5	100,0	100,0
j. cienkie 4.7 - 7.0										
% dysocjacji		99,0	98,5	91,0	66,0	47,0	25,0	4,5	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,5	9,0	34,0	53,0	75,0	95,5	100,0	100,0
j. kręte 6.5 - 8										
% dysocjacji		99,5	99,0	99,0	97,5	87,0	57,0	26,5	4,5	0,0
% dawki		0,5	1,0	1,0	2,5	13,0	43,0	73,5	95,5	100,0
okrężnica i j. proste 5.0 - 8.0										
% dysocjacji		99,5	99,0	94,5	74,5	54,0	45,0	25,0	4,5	0,0
% dawki		0,5	1,0	5,5	25,5	46,0	55,0	75,0	95,5	100,0

	zasady								
	pKa	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0
jama ustna 6.2 - 7.2										
% dysocjacji		99,0	98,5	92,0	62,0	21,5	2,5	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,5	8,0	38,0	78,5	97,5	100,0	100,0	100,0
żołądek 1.4 - 5.0										
% dysocjacji		99,5	99,5	99,5	99,5	94,5	74,5	54,0	48,5	39,5
% dawki		0,5	0,5	0,5	0,5	5,5	25,5	46,0	51,5	60,5
dwunastnica 2.4 - 6.8										
% dysocjacji		99,5	99,5	97,0	80,0	56,0	50,0	48,5	39,5	14,0
% dawki		0,5	0,5	3,0	20,0	44,0	50,0	51,5	60,5	86,0
j. cienkie 4.7 - 7.0										
% dysocjacji		99,0	99,0	94,5	74,5	52,0	33,0	8,0	0,5	0,0
% dawki		1,0	1,0	5,5	25,5	48,0	67,0	92,0	99,5	100,0
j. kręte 6.5 - 8										
% dysocjacji		99,0	94,5	73,0	42,0	12,0	1,5	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	5,5	27,0	58,0	88,0	98,5	100,0	100,0	100,0
okrężnica i j. proste 5.0 - 8.0										
% dysocjacji		99,0	94,5	74,5	54,0	45,0	25,0	4,5	0,0	0,0
% dawki		1,0	5,5	25,5	46,0	55,0	75,0	95,5	100,0	100,0

Rys. Procent dysocjacji elektrolitu w zależności od pH odcinka przewodu pokarmowego oraz pKa kwasu lub zasady (obliczenia przy użyciu SAR(pKA)).

	kwasy pKa	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
płyn śródtkankowy 7.0 - 7.1										
% dysocjacji		99,0	99,0	99,0	99,0	91,0	52,5	10,0	0,5	0,0
% dawki		1,0	1,0	1,0	1,0	9,0	47,5	90,0	99,5	100,0
pot 4.3 - 4.7										
% dysocjacji		99,0	96,5	74,5	24,5	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	3,5	25,5	75,5	97,5	100,0	100,0	100,0	100,0
żółć 7.0 - 7.2										
% dysocjacji		99,0	99,0	99,0	99,0	92,0	55,5	11,0	0,5	0,0
% dawki		1,0	1,0	1,0	1,0	8,0	44,5	89,0	99,5	100,0
mocz 5.0 - 7.0										
% dysocjacji		99,0	99,0	94,5	74,5	49,5	25,0	4,5	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,0	5,5	25,5	50,5	75,0	95,5	100,0	100,0
krew 7.2 - 7.6										
% dysocjacji		99,5	99,0	99,0	99,0	95,5	70,0	20,5	2,0	0,0
% dawki		0,5	1,0	1,0	1,0	4,5	30,0	79,5	98,0	100,0
łzy 7.3 - 8.0										
% dysocjacji		99,5	99,0	99,0	99,0	97,0	78,0	33,0	5,0	0,0
% dawki		0,5	1,0	1,0	1,0	3,0	22,0	67,0	95,0	100,0
pochwa 3.4 - 4.2										
% dysocjacji		97,5	82,5	40,5	7,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		2,5	17,5	59,5	92,5	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0
mleko 6.5 - 6.7										
% dysocjacji		99,0	99,0	99,0	97,0	79,0	28,5	3,5	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,0	1,0	3,0	21,0	71,5	96,5	100,0	100,0
	zasady pKa	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0
płyn śródtkankowy 7.0 - 7.1										
% dysocjacji		99,0	98,5	89,0	47,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,5	11,0	53,0	92,0	100,0	100,0	100,0	100,0
pot 4.3 - 4.7										
% dysocjacji		99,5	99,0	99,0	99,0	96,5	74,5	24,5	2,5	0,0
% dawki		0,5	1,0	1,0	1,0	3,5	25,5	75,5	97,5	100,0
żółć 7.0 - 7.2										
% dysocjacji		99,0	98,5	88,0	44,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,5	12,0	56,0	93,0	100,0	100,0	100,0	100,0
mocz 5.0 - 7.0										
% dysocjacji		99,0	99,0	94,5	74,5	49,5	25,0	4,5	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,0	5,5	25,5	50,5	75,0	95,5	100,0	100,0
krew 7.2 - 7.6										
% dysocjacji		99,0	97,0	78,5	29,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	3,0	21,5	71,0	96,5	100,0	100,0	100,0	100,0
łzy 7.3 - 8.0										
% dysocjacji		99,0	94,0	66,5	21,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	6,0	33,5	79,0	98,0	100,0	100,0	100,0	100,0
pochwa 3.4 - 4.2										
% dysocjacji		100,0	99,5	99,0	99,0	98,5	91,5	58,5	16,5	1,5
% dawki		0,0	0,5	1,0	1,0	1,5	8,5	41,5	83,5	98,5
mleko 6.5 - 6.7										
% dysocjacji		99,0	99,0	95,5	70,5	20,0	2,0	0,0	0,0	0,0
% dawki		1,0	1,0	4,5	29,5	80,0	98,0	100,0	100,0	100,0

Rys. Procent dysocjacji elektrolitu w zależności od pH środowiska oraz pKa kwasu lub zasady (obliczenia przy użyciu SAR(pKA)).

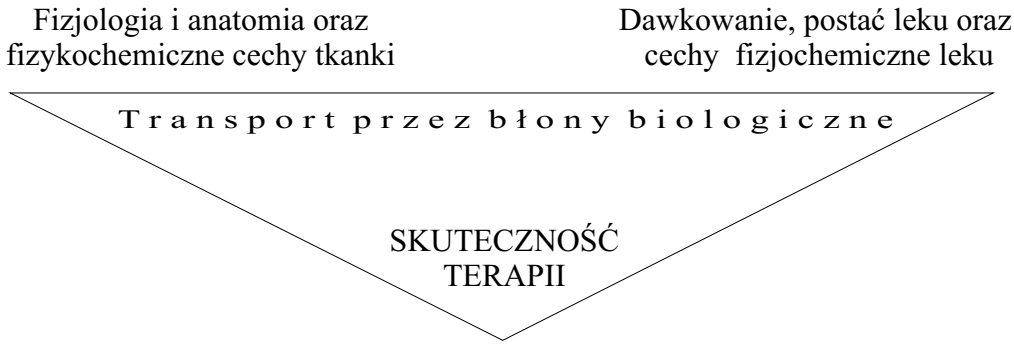
Jeżeli szybkość procesów transportu jest wprost proporcjonalna do stężenia leku to w farmakokinetyce procesy takie określa się liniowymi lub procesami pierwszego rzędu. Jeżeli szybkość transportu cząsteczek leku jest związana z wydolnością układów gwarantujących transport (transport aktywny) maleje ona ze zwiększaniem dawki leku. Procesy takie należą do zerowego lub drugiego rzędu i opisuje się je najczęściej w ramach założeń farmakokinetyki nieliniowej.

Znajomość wartości pKa pozwala przewidzieć do pewnego stopnia wędrówki cząsteczek leku w organizmie. Pozwala na to także znajomość wielkości cząsteczki jej polarności i lipofilności oraz innych parametrów fizjochemicznych. Nie bez znaczenia pozostają właściwości cząsteczki leku związane z jej konfiguracją przestrzenną. Dyspozycja nie dających się rozdzielić racematów często różna jest dla występujących w leku odmian chiralnych. Najczęściej odmiany optycznie czynne posiadają różne wartości pKa i w różny sposób zachowują się w kompartmencie o tej samej wartości pH. Jeżeli właściwość ta poparta jest różnicami w farmakodynamice obu odmian może to znacznie zmienić zastosowanie leku w praktyce. Stąd lek uwalniający do przewodu pokarmowego w sposób kontrolowany dwie frakcje o różnej wartości pKa może cechować się znaczną dostępnością biologiczną. Dla leków o charakterze słabych kwasów frakcja o pKa = 5 będzie zdysocjowana nawet w pH = 4 tylko w około 10 %. Natomiast frakcja o pKa = 9 także dopiero w pH = 8 będzie zdysocjowana w ok. 10 %. Dla leków o charakterze słabych zasad frakcja o pKa = 5 będzie zdysocjowana nawet w pH = 6 tylko w około 10 %. Natomiast frakcje o pKa > 8 ulegać będą całkowitej dysocjacji. Obecnie wiadomo że jonizacja związku nie zawsze uniemożliwia transport błonowy. Wiadomo że cząsteczki zjonizowane mnogą deponować się we frakcji fofatydylocholinowej błon biologicznych (Palm K. i wsp. 1999).

Informacje o wartości lipofilności związku mogą także pozwolić na wstępne zaszeregowanie leku do grupy leków eliminowanych drogą przemian w obrębie wątroby lub poprzez nerki. Leki silnie lipofilne najczęściej eliminowane są w drodze przemian metabolicznych w obrębie wątroby, natomiast leki hydrofilne poprzez filtrację w nerkach. Od tej zasady istnieje jednak wiele wyjątków oraz leków o mieszanej charakterystyce fazy eliminacji. Złożoność wieloetapowych faz transportu leku do tkanki lub organu docelowego często nie daje możliwości praktycznego opisu każdej z poszczególnych faz. Lek po pokonaniu bariery błony komórkowej nabłonków trafia do płynu międzykomórkowego a stąd do krwi i chłonki. Krew zapewnia dystrybucję leku w całym organizmie. Z kompartmentu centralnego lek pokonuje barierę krew płyn międzykomórkowy po raz kolejny. Następna bariera to błony komórkowe a po wniknięciu do komórek błony organelli komórkowych.

Zdolność do pokonywania błon biologicznych oraz rozmieszczania leku w organizmie lub narządach docelowych jest wypadkową dawkowania, cech fizjochemicznych leku, rodzaju pokonywanych barier oraz cech fizjologicznych i fizykochemicznego składu tkanki docelowej. Te podstawowe zbiory danych w rozpatrywanym układzie klinicznym decydują o skuteczności leku w ramach prowadzonej terapii.

Procesy aktywnego i pasywnego transportu leku przez błony biologiczne warunkują drogi dystrybucji leku w organizmie.



Rys. Optymalizacja farmakokinetyczna leku z punktu widzenia farmakologii klinicznej.

Zmiany dotyczące cech fizjochemicznych leku oraz drogi podania zmierzają do optymalizacji dystrybucji leku do narządu lub tkanek docelowych. Jest to jeden z etapów i jedno z narzędzi pozwalających w nowoczesny sposób optymalizować postać leku. Wpływa ono w zasadniczy sposób na dostępność biologiczną leku. Przeciwwagą dla procesów uwalniania, wchłaniania i dystrybucji są jednak procesy metabolizmu i eliminacji. Na tym etapie optymalizacja poprzez analizę procesów transportu przyjmuje wymiar zwiększenia bezpieczeństwa stosowania leku poprzez modyfikację schematów dawkowania. Analiza zdolności pokonywania barier biologicznych jest jednym z podstawowych elementów optymalizacji farmakokinetycznej leku. Zdolność do pokonywania wielu układów błonowych pozwala osiągać wysokie wartości objętości dystrybucji oraz długi okres półtrwania leku w organizmie. Nie zawsze jednak oznacza selektywność i właściwy poziom transferu leku przez błony specjalizowane. Obecnie do opisania możliwości transportu leku przez błony biologiczne stosuje się deskryptory fizjochemiczne odnoszące się do takich podstawowych właściwości jak:

- polarność
- lipofilność
- hydrofilność

Wypadkowa tych trzech wartości opisujących cały szereg cech leku decyduje o:

- skali i zakresie dystrybucji leku w organizmie
- selektywności zjawisk transportu
- szybkości procesów transportu

Białka transportujące, transport błonowy

Transport leków przez błony nieodłącznie wiąże się z niezwykle rozbudowanym systemem białek transportujących, różnego typu nośników, systemów nośnikowych, kanałów i porów. Aktywny transport zachodzący z udziałem białek ułatwia znacznie dostarczenie leku do określonej przestrzeni kinetycznej. Każdy z wymienionych niżej systemów jest potencjalnym modulatorem dyspozycji leków i toksyn w organizmach wyższych, w obrębie komórki grzyba, czy komórki bakteryjnej. W ramach szeroko rozumianego transportu przez błony biologiczne grzybów bakterii i organizmów wyższych wyróżnić można kilka typów systemów (Saier M.H. 2000):

Rodzaje transportu:

1. Kanałowy
   - kanały peptydowe
   - toksyny porotwórcze
   - kanały proteinowe
   - poryny proteinowe
2. Nośnikowy
   - uniportery
   - nośniki grup
   - aktywne transportery pierwszego stopnia
     - oparte na hydrolizie pirofosforanów
     - związane z dekarboksylacją
     - związane z transferem grup metylowych
     - bazujące na potencjale oksydoredukcyjnym
     - mechaniczne
     - związane z absorpcja światła
   - aktywne transportery drugiego stopnia
     - symportery kationów
     - antyportery kationów
     - antyportery typu roztwór - roztwór

Stosowany obecnie system klasyfikacji transporterów zakłada istnienie kilku odrębnych klas transporterów:

System:	klasy:
1. kanały i pory:	
1A kanały typu a	[1A1 - 1A45]
1B poryny typu b barrel	[1B1 - 1B26]
1C toksyny porotwórcze	[1C1 - 1C38]
1D kanały syntetyzowane niezależnie od rybosomów	[1D1 - 1D6]
2 transportery elektrochemiczne:	
2A symportery, antyportery, uniportery	[2A1 - 2A78]
2B kanały syntetyzowane niezależnie od rybosomów	[2B1 - 2B5]
2C transportery zależne od gradientu jonów	
3 aktywne transportery pierwszego rzędu:	
3A transportery zależne od hydrolizy fosforanów	[3A1 - 3A11]
3B transportery związane z dekarboksylacją	
3C transportery grup metylowych	
3D transportery związane z okydoredukcją	[3D1 - 3D8]
3E transportery związane z absorpcją światła	[3E1 - 3E2]

4 transportery grupowe [4A1 -43A6]
8 pomocnicze białka transportowe [8A1 -8A13]
9 niekompletnie opisane systemy transportowe

Ogromna liczba systemów transportu wytworzona przez żywe organizmy w procesie rozwoju filogenetycznego daje duże możliwości w przemieszczaniu się w organizmie większości cząsteczek leków. Bariery organelli komórek, błon komórkowych, tkanek oraz narządów poprzez swą wybiórczą chemiczną szczelność umożliwiają utrzymanie chomeostazy i eliminację zagrożeń. Z drugiej jednak strony muszą uczestniczyć czynnie i biernie w selekcji i transporcie endogennych substancji chemicznych, oraz tych dostarczanych z zewnątrz. Przeciwwagą i zabezpieczeniem mechanizmu absorpcji jest eksorpcja którą w przypadku układów transportujących gwarantują systemy białek wypompowujących odpowiedzialnych za tzw. *efflux*. Celem nowoczesnej optymalizacji farmakokinetycznej jest świadome zaprojektowanie losów cząsteczki która znajduje się w otoczeniu różnego typu środowisk chemicznych organizmu, oraz systemów transportujących.

Oporność na leki kodowana MDR

Oporność czyli brak efektu terapeutycznego po zastosowaniu leku może mieć wiele przyczyn. Na każdym etapie dyspozycji leku w organizmie może dojść do niekorzystnych z punktu widzenia farmakoterapii modyfikacji kinetyki leku. Jedną z przyczyn mogą być interakcje pomiędzy lekami, interakcje pomiędzy odmianami optycznymi, czy interakcje leków z pokarmem. Częstą przyczyną braku efektu dla danego leku jest zastosowanie go w nieodpowiedniej dawce, z nieodpowiednim interwałem dawkowania, lub wybór nieodpowiedniej drogi podania. W badaniach farmakokinetycznych duże znaczenie przywiązuje się do identyfikowania mechanizmów oporności na stosowany lek na poziomie komórkowym i błonowym. Zjawisko oporności nie dotyczy tylko komórki w znaczeniu kompartmentu docelowego. Oporność na stosowany lek może manifestować się już w fazie wchłaniania i transportu przy pierwszych napotkanych przez cząsteczkę barierach biologicznych (Giaccone G., Pinedo H.M. 1996). Najczęstszymi przyczynami oporności w rozumieniu farmakokinetyki są:

Mechanizm:	Umiejscowienie:	Wybrane parametry PK wymagające kontroli:
- zmniejszone wchłanianie	(w skali organizmu i w skali komórki)	F, AUC, γ, K_{12},
- zmniejszona dostępność kompartmentu docelowego		K_{12} / K_{21}, Vd, $t_{1/2}$
- zwiększona eliminacja	(w skali organizmu)	F, AUC, β, Cl, $t_{1/2}$, MRT
- ułatwione usuwanie	(w skali komórki)	
- zmniejszona aktywacja	(prodrug)	F, AUC, Cl(in), Cl(he)
- zwiększona inaktywacja	(efekt pierwszego przejścia)	F, AUC, Cl(in), Cl(he)
- zmniejszenie ilości kompleksów lek-cel		
- uszkodzenia cząsteczki leku	(enzymy bakteryjne)	

W skali całego organizmu oporność na leki wywołana może być ekspresją białek odpowiedzialnych za aktywne usuwanie z błon komórkowych lub komórek cząsteczek leku. Najdokładniej poznaną rodziną białek błonowych odpowiedzialnych między innymi za czynne wypompowywanie leków z komórek - *efflux* jest rodzina białek ABC (Loscher W, Potschka H 2005). ABC czyli zależne od ATP białka transportujące (ang.: *ATP Binding Casette Transporters*) dzięki hydrolizie ATP zyskują energię potrzebną do aktywnego transportu. Ten sam rodzaj mechanizmu wypompowywania leku z komórki opartego na pracy odpowiednich białek zidentyfikowano w przypadku niektórych bakterii (Grkovic S. i wsp. 2002). Przykładem są między innymi:

Actinobacter baumannii
Burkholderia pseudomallei
Escherichia coli
Neisseria gonorrhoeae
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas putida
Stenotrophomonas maltophilia
Bacillus subtilis
Staphylococcus auresus

W przypadku bakterii zjawisko oporności wywołanej mechanizmami aktywnego wypompowywania to tylko jeden z wielu sposobów obrony przed środkami przeciwbakteryjnymi. W podobny sposób bronią się przed ksenobiotykami komórki makroorganizmu.

Przykładem białka wypompowującego w obrębie makroorganizmu jest P - glikoproteina - P-gp (ang.: *P - Glycoprotein, Permeability - Glycoprotein*). Obecnie standardową procedurą identyfikacji substratów P-gp objęta jest każda nowa substancja lecznicza - NCE. Białko to kodowane w organizmie człowieka przez gen MDR1 oraz MDR3 (ang.: *Multidrug Resistance - Associaced Protein*) odnaleziono w komórkach wielu tkanek oraz narządów także zwierząt. Ekspresja P-gp została potwierdzona w obrębie jelit, ma wpływ na eliminację leków z żółcią (Annaert P.P. i wsp. 2001), pokonywanie bariery krew / mózg, oraz bariery łożyskowej. Ma również wpływ na eliminację leków drogą nerkową (Lin J.H., Yamazaki M. 2003). Białko P-gp znajduje sie miedzy innymi na powierzchni hepatocytów (kanaliki), na apikalnej części komórek nabłonka kanalików bliższych w nerce, na apikalnej części komórek nabłonka naczyń krwionośnych tworzących BBB (Lin J.H., Yamazaki M. 2003). Obecnie w badaniach farmakokinetycznych fazy przedklinicznej, na poziomie badań *in vitro* rozpoznanie możliwości usuwania leku przez P-gp jest metodą optymalizacji PK przyszłego leku. Niebezpieczeństwo częściowej tylko kontroli nad kinetyką leku jest tym poważniejsze gdyż substratami dla białka są zwykle leki o większej masie cząsteczkowej, lipofilne i zawierające pierścienie aromatyczne (Santoni-Rugiu E., Silverman J.A. 1997). Białko to odpowiada za wypompowywanie cząsteczek wielu leków o zupełnie różnej budowie i właściwościach fizykochemicznych. Nastręcza to znacznych problemów w trakcie farmakoterapii lekami podatnymi na działanie tego białka. Problemy te dotyczą zarówno tkanek zdrowych jak i patologicznie zmienionych. Z punktu widzenia dystrybucji leku w organizmie kinetyka leku może w takim wypadku zostać zmieniona na wielu etapach. Przykładem dużego problemu terapeutycznego jest np. leczenie chorób nowotworowych. Wiadomo bowiem że wiele nowotworów jest kompartmentem trudno dostępnym dla cząsteczek leku z uwagi na obecność P.-gp. Stąd dużą rolę przywiązuje się do badania interakcji pomiędzy lekami (substratami dla P-gp) stosowanymi obecnie w terapii a ewentualnymi inhibitorami (modulatory, chemosensytyzery) dla P-gp. Związki te podane równocześnie z lekiem gwarantują blokowanie funkcji P-gp. Pozwala to osiągnąć dla zastosowanego leku odpowiednią charakterystykę PK w trakcie całej terapii (Bates S.E. i wsp. 1996; Duhem C. i wsp. 1996; Rodriguez I., i wsp. 1999). Parametry farmakokinetyczne jakie najczęściej ulegają zmianie po zastosowaniu tego rodzaju leczenia to wzrost AUC leku i zmniejszenie wartości klirensu. Oprócz właściwości substratu niektóre związki chemiczne w tym także leki mogą być induktorami MDR. Część zaś może indukować syntezę P-gp jednak nie uczestniczyć w reakcji jako substrat dla białka.

Induktorami syntezy P-gp lub jej aktywatorami są między innymi:

ouabaina, antracykliny, winkrystyna, winblastyna, dexametazon, doksorubicyna, 3-metylo-cholantren, diacylogikol, Forbol 12, fenotiazyna, flawopirydol, galangina, genisteina, kemferol, kwercetyna

Działanie takie potwierdzono także w badaniach *in vitro* dla doksycykliny (Mealey K.L. i wsp 2002). Ponadto promieniowanie UV, wzrost temperatury oraz prawdopodobnie większość czynników zwiększająca aktywność MAPK (ang.: *Mitogen - Activated Protein Kinase*) i fosfolipazy C - PLC (ang.: *Phospholipase C*) na poziomie komórkowym. W badaniach *in vitro* potwierdzono bowiem wzrost ekspresji MDR wywołany przez te dwa czynniki (Yang J.M. i wsp. 2001).

Inhibitorami funkcji P-gp, są związki zaliczane do różnych klas leków oraz innych substancji chemicznych (Ito K. i wsp. 1998).

d-werapamil, nifedypina, bepridil, diltiazem, nikardypina, nitrendypina, propranolol, meflochina, chinakryna, chinidyna, kortyzol, hydrokortyzon, progesteron, testosteron, tamoxifen, megestrol, trakonazol, flufenazyna, trifluoperazyna, prochlorperazyna, cefoperazon, ceftriakson, erytromycyna, terfenadyna, rapamycyna, walinomycyna, takrolimus, HMF, lidokaina.

również: Tween 80 (Ferte J. 2000), Cremophor EL, Witamina E, Polisorbat 80

Inhibitorami P-gp lecz nie substratami są miedzy innymi:

azydopina, bergamotyna, lamelaryna, klarytromycyna, dimetylo-cyklodekstryna, iwermektyna, ketokonazol, staurosporyna, rezepina, testosteron.

Inhibitorami i substratami P-gp są miedzy innymi:

nobiletyna (flawony wyizolowane z soku grejpfruta *Citrus aurantium L.*) (Takanaga H. i wsp. 2000), apigenina, cromony, flawon, flawonon, flawopirydol, genistyna, genisteina, heptametoksyflawon, izoflawon, naryngina, naryngenina, kwercetyna, tangeretyna, amilorid, amiodaron, amitryptylina, atorwastatyna, chloropromazyna, klofazymina, kremofor EL, cyklosporyna A, daunrobicyna, daunomycyna, diltiazem, dipirydamol, erytromycyna, mitomycyna C, morfina, paklitaksel, docetaksel, fosfatydylocholina, propantelina, puromycyna, rodamina 123, topotekan.

Związki o działaniu inhibicyjnym na P-gp wywodzą się z różnych grup chemicznych i nadal trudno jest jednoznacznie określić korelację działania ze strukturą chemiczną związku (Ferte J. 2000). Wiadomo jednak że najczęściej są to związki lipofilne o charakterze kationów z dwoma pierścieniami aromatycznymi (Klopman G. i wsp. 1997). Dzięki najnowszym technikom obliczeniowym typu 3D - QSAR wykazano kilka wspólnych cech inhibitorów P-gp (Ekins S. i wsp. 2002). Farmakofory charakteryzujące aktywność inhibicyjną to między innymi:

- jedno miejsce zdolne do związania atomu wodoru w cząsteczce
- cztery miejsca zdolne do wiązania atomu wodoru
- obecność trzech pierścieni aromatycznych

Analiza zachowania się cząsteczki leku w przypadku kontaktu ze strukturą białka P-gp jest w tej chwili jednym z podstawowych narzędzi optymalizacji farmakokinetycznej leku. Dzięki sztucznym układom błonowym oraz hodowlom komórkowym z ściśle określonym poziomem P-gp można dokładnie określić to czy lek wykazuje powinowactwo do białka i jakiego typu. Nowe badania dotyczące możliwości interakcji leków znanych od dawna z białkiem P-gp przyczyniło się do zrozumienia mechanizmu wielu interakcji farmakokinetycznych.

Wiązanie leków z białkami

Wiązanie leków z białkami wynika ze specyficznej cechy białek jaką jest zdolność przenoszenia informacji w postaci cząsteczki związku chemicznego. Funkcja nośnikowa białek dotyczy również interakcji z cząsteczkami leków. Ponieważ białka zbudowane są z wielu różnych aminokwasów ich zdolność do związania cząsteczki leku jest ogromna. Zdolność ta wynika z dużej liczby różnych ładunków jakimi dysponują grupy funkcyjne aminokwasów jak i pułapki przestrzenne jakie tworzą struktury białek. Leki po wprowadzeniu do krwioobiegu łączą się z białkami krwi głównie z albuminami, globulinami, oraz alfa 1 kwaśną glikoproteiną (AAG), penetrują upostaciowane składniki krwi (komórki) lub obecne są w osoczu w formie wolnej. W trakcie dystrybucji do tkanek łączą się z białkami tkanek podobnie jak we krwi lub ulegają dalszej dyspozycji do komórek tkanek. Wśród białek obecnych w żywym organizmie można wskazać białka o charakterze kwaśny i zasadowym, o zupełnie różnych wartościach punktu izoelektrycznego (pI = (pKa1 + pKa2) / 2). Jest to cecha białek która jest przyczyną zróżnicowania powinowactwa do leków. Białka o charakterze słabych kwasów czy posiadające przewagę grup funkcyjnych o charakterze kwaśnym nad liczbą grup zasadowych, chętniej będą wiązać leki o charakterze słabych zasad i odwrotnie. Białka o charakterze słabych zasad czy posiadające przewagę grup funkcyjnych o charakterze zasadowym nad liczbą grup kwaśnych, chętniej będą wiązać leki o charakterze słabych kwasów. Zasada ta nie dotyczy wyłącznie interakcji z białkami osocza. Dotyczy również wiązania leku z innymi białkami jakie napotyka w trakcie swojej wędrówki przez organizm. Dotyczy to białek błon biologicznych białek transportowych etc.. Wreszcie dotyczy to również interakcji na poziomie: cząsteczka leku - białko receptorowe

białko	pI	charakter	wiązanie leków	białko w osoczu (%)
AAG	3,2	kwaśny	zasadowych kwaśnych	0,6
albuminy	4,7	neutralny	kwaśne neutralne zasadowe	51
globuliny	-	-	zasadowe kwaśne	48

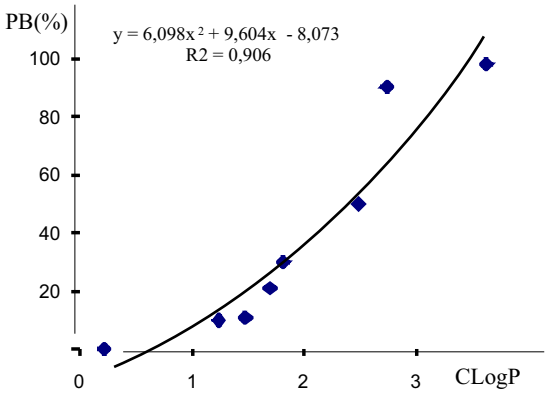
Połączenia leków z białkami pod względem chemicznym mają różny charakter i są mniej lub bardziej trwałe. Lek w obu kompartmentach (centralnym i tkankowym) występuje w dwóch frakcjach - związanej z białkiem i nie związanej - aktywnej - wolnej. Dwa różne leki mogą wypierać się wzajemnie z połączenia z białkiem w przypadku wysycenia miejsc dostępnych do wiązania leku. Lek związany z białkiem stanowi formę nieaktywną farmakologicznie i nie podlegającą procesom kinetycznym w ich klasycznym rozumieniu. Białka osocza wytwarzane są w znakomitej większości w wątrobie. Stąd również z tego powodu każda dysfunkcja tego organu może wpłynąć na zmianę poziomu frakcji wolnej leku we krwi. Największą część białek osocza stanowią albuminy (człowiek ok. 60%). Z tego 60% albumin znajduje się w przestrzeni śródkomórkowej a 40% w osoczu. Albuminy decydują o wiązaniu wielu grup leków nie tylko w obrębie krwi ale również w tkankach (Murray R.K. 1999). Słabo z albuminami łączą się leki hydrofilne z uwagi na to że posiadają one głównie miejsca wiązania dla substancji hydrofobowych. Najchętniej wiążą związki lipofilne o ujemnym ładunku (Kratochwil N.A. i wsp 2002). Stopień powinowactwa - Ka (ang: *Binding Affinity*) leku do albumin obliczyć można korzystając z równania:

$$\mathbf{LogKa = Log (fb / 1 - fb) - LogHSA}$$

HSA - stężenie albumin (ang.: *Human SerumAlbumin*)
Ka - stopień powinowactwa
fb - frakcja związana

Białka osocza cechuje różny zależny od klasy białka okres półtrwania. Drugą ważną z punktu widzenia farmakokinetyki cechą białek jest ich pojemność. Warunkuje ona maksymalną ilość leku jaką dany typ białka może związać. Trzecią cechą decydującą o stopniu wiązania leku z białkami jest powinowactwo leku do danego typu białka. Najłatwiej wiążą się z białkami leki lipofilne, ta zasada nie zawsze jednak znajduje precyzyjne potwierdzenie w obliczeniach typu SAR (ang.: *Structure Activity Relationship*), (Kratochwil N.A. i wsp. 2002; Schoenwald R.D. 2002). Analizę tego typu można jednak przeprowadzić nawet w stosunku do beta blokerów których wiązanie z białkami jest procesem enancjoselektywnym (Mehvar R, Brocks D.R. 2001).

	PB(%)	CLogP
sotalol	0	0.23
tymolol	10	1.25
metoprolol	11	1.49
acebutolol	21	1.71
bisoprolol	30	1.83
esmolol	50	2.50
propranolol	90	2.75
penbutolol	98	3.64



Stopień wiązania leku przez białka osocza - EPB (ang.: *Extend of Protein Binding*) obliczyć można porównując ilość leku związanego z całkowitą ilością leku we krwi (Szyszko E. 1984).

$$EPB = [fbP / (F \times D)] \times 100$$

fbP - ilość leku związanego z białkami osocza
F - dostępność biologiczna leku
D - dawka leku

Można więc powiedzieć że opisanie zależności lek-białka pozwala na określenie tej części dawki która odpowiada za efekt terapeutyczny w momencie kompletnego wysycenia białek. Jeżeli oczekiwany efekt jest wypadkową połączenia leku z odpowiednim receptorem to zależność tą w danej chwili opisywać będzie iloczyn trzech wartości:

$$ED = fu \times F \times D$$

ED - dawka wywołująca efekt terapeutyczny
fu - frakcja leku niezwiązana z białkami
D - dawka

W tym wypadku fu określa frakcję leku niezwiązaną z białkami tkanek i osocza. Powyższa formuła opisuje ilość leku jaka wywoła efekt terapeutyczny. Wartość dawki dla podania pozanaczyniowego pomniejszona jest także o wartość dostępności biologicznej leku . Natomiast ta część leku która dostała się do krwi i z nią dociera do tkanek, i receptorów pomniejszona jest dodatkowo o procent wiązania z białkami. W praktyce obliczeń farmakokinetycznych rozdzielenie wartości frakcji związanej i wolnej leku dla tkanek i krwi nie jest zadaniem łatwym. Obecnie pewnym ułatwieniem metodycznym jest stosowanie technik mikrodializy w trakcie pobierania próbek do analiz. Zależność pomiędzy stężeniami leku w osoczu ,w całej objętości krwi i w krwinkach ilustrują formuły:

$$C = (C_{RBC} \times HCT) + [Cp \times (1 - HCT)] \qquad Cp = [C - (C_{RBC} \times HCT)] / (1 - HCT)$$

$$C_{RBC} = [C - (Cp \times (1 - HCT)] / HCT$$

C - stężenie leku w całej objętości krwi
CRBC - stężenie leku w erytrocytach
Cp - stężenie leku w osoczu
HCT - hematokryt

Widać więc jak duże znaczenie dla obliczeń farmakokinetycznych już w fazie analizy stężenia leku w tkance ma hematokryt i możliwość gromadzenia się leku także w erytrocytach. Stosunek wartości frakcji leku wolnej obecnej w osoczu i stężenia leku w samym osoczu do całkowitego stężenia leku we krwi pozwala obliczyć stężenie frakcji wolnej leku we krwi.

$$\mathbf{fuB = (fup \times Cp) / C}$$

fup- stężenie frakcji wolnej w osoczu
fuB- stężenie frakcji wolnej we krwi

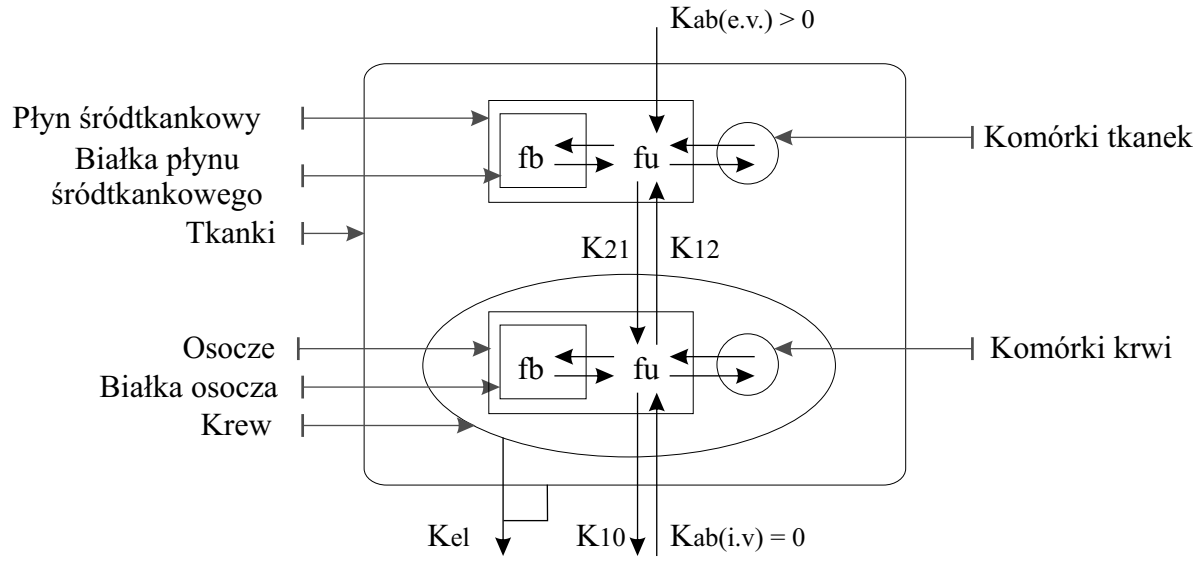
Stąd też stężenie leku w całej objętości krwi - C, i oddzielnie dla osocza - Cp, obliczyć można po przekształceniu do:

$$\mathbf{C = (Cp \times fuP) / fuB} \qquad \mathbf{Cp = (C \times fuB) / fup}$$

Stężenie leku w osoczu, leku niezwiązanego z białkami Cu można obliczyć również korzystając z wzoru (Berezhovskyi L.M. 2003):

$$\mathbf{Cu = Cp \times fup}$$

Stąd też klirens takiego leku równy będzie: $\mathbf{Clu = Cl / fup}$



K12 - stała szybkości transportu leku z krwi do tkanek
K21 - stała szybkości transportu leku z tkanek do krwi
Kel - stała szybkości eliminacji leku z krwi (K10)
Kab(e.v.) - stała szybkości wchłaniania dla podania pozanaczyniowego zwykle większa od zera
Kab(i.v.) - stała szybkości wchłaniania dla podania donaczyniowego równa zero

Rys. Wiązanie leków z białkami tkanek i krwi na tle procesów dystrybucji i eliminacji fu - frakcja wolna, fb - frakcja związana.

W trakcie analiz stężenia leku w osoczu metodami chromatograficznymi, zwykle przygotowanie prób wiąże się z całkowitą denaturacją białek i uwolnieniem puli leku związanego z białkami osocza. W takim wypadku oznaczenia dotyczą całkowitej ilości leku we krwi. Podobnie rzecz ma się w przypadku analiz tkanek. Stąd różnice i możliwość obliczania klirensu i objętości dystrybucji dla frakcji niezwiązanej w osoczu lub całkowitej ilości leku we krwi, objętości dystrybucji frakcji wolnej lub całkowitej ilości leku itd.. Standardowym postępowaniem w przygotowaniu analiz chemicznych prób krwi jest analiza osocza. Tak więc komórki krwi stanowiące znaczny procent tkanki najczęściej zostają pominięte jako składowa tego kompartmentu. Udział informacji o wartości stężenia leku niezwiązanego przez białka w obliczeniach farmakokinetycznych można więc w pewnym sensie przyrównać do roli wartości dostępności biologicznej leku. Stosunek frakcji wolnej leku i białek do kompleksu białko -lek wyraża równanie:

$$K_a = K_1 / K_2$$

Ka - współczynnik asocjacji
K1 - stała szybkości łączenia (lek + białko)
K2 - stała dysocjacji - szybkość rozpadu wiązania (lek- białko)

Frakcja leku wolna i związana w obrębie tkanek pozostaje w stanie dynamicznej równowagi. Jeżeli wolna część leku przejdzie z osocza do płynu śródkomórkowego tkanek, następuje uwolnienie części z puli leku związanego z białkami osocza w celu uzyskania nowego stanu równowagi. Jeżeli frakcja leku związanego w obrębie tkanek wzrasta na przestrzeni dłuższego czasu mamy do czynienia z gromadzeniem się leku. Dotyczy to najczęściej komórek i gromadzenia się w nich leków o szczególnym powinowactwie do danej tkanki. Podobny stan równowagi ustala się we krwi. Jeżeli ilość leku we krwi rośnie mimo wysycenia wszystkich miejsc wiążących lek w obrębie białek, a procesy eliminacji leku z krwi i dystrybucji do tkanek nie powodują zahamowania wzrostu stężenia leku, mamy do czynienia z kumulacją leku.

$$fu + FPS \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} fb$$

FPS - wolne miejsca wiązania

Powyższe równania pozwalają obliczyć wartość frakcji wolnej leku - fu.

$$fu = 1 / (1 + K_a \times FPS \times C_P)$$

CP - stężenie białka

Znaczenie wiązania leku z białkami i kontroli mechanizmów kierujących tym procesem w stanach patologii jest niezwykle ważne. Efekt terapeutyczny jest skorelowany ze stężeniem leku we krwi i jego wolnej frakcji w tkance docelowej. Fakt ten nabiera szczególnego znaczenia w przypadku chemioterapeutyków. Zwykle antybiotyki silnie wiążące się z białkami wykazują słabsze działanie. Stąd niekontrolowane zmiany w stopniu wiązania leku z białkami, mogą znacznie modyfikować stężenie części dawki odpowiedzialnej bezpośrednio za efekt farmakologiczny lub efekty niepożądane w trakcie leczenia. Stosunek wolnej frakcji leku w tkankach do frakcji wolnej leku znajdującej się we krwi związany jest bezpośrednio z właściwościami fizykochemicznymi i fizjochemicznymi leku, jego dostępnością i objętością dystrybucji. Jeżeli lek ma wybitne powinowactwo do struktur tkanek docelowych może się w nich gromadzić. W takim wypadku objętość dystrybucji może przekraczać całkowitą masę ciała (zakładając że 1 kg m.c. = 1L). Zwykle jeżeli lek jest słabo lipofilny, objętość dystrybucji leku może być bliska masie ciała. W przypadku leków gorzej pokonujących bariery błon biologicznych (najczęściej hydrofilne i jednocześnie polarne) objętość dystrybucji jest mniejsza od masy ciała. Zjawiska te związane są ściśle z dystrybucją wolnej frakcji leku z osocza do tkanek i na odwrót.

amiodarone	100,0	dicloxacillin	95,8	tacrolimus	85,0
atovaquone	99,9	bupivacaine	95,0	thiopental	85,0
calcitriol	99,9	buspirone	95,0	erythromycin	84,0
tolcapone	99,9	carvedilol	95,0	fentanyl	84,0
candesartan	99,8	clozapine	95,0	butorphanol	83,0
glyburide	99,8	flutamide	95,0	quetiapine	83,0
itraconazole	99,8	idarubicin	95,0	doxepin	82,0
rosiglitazone	99,8	lovastatin	95,0	praziquantel	82,0
toremifene	99,7	mebendazole	95,0	citalopram	80,0
naproxen	99,7	omeprazole	95,0	alendronate	78,0
felodipine	99,6	paroxetine	95,0	diltiazem	78,0
diclofenac	99,5	prazosin	95,0	diphenhydramine	78,0
flurbiprofen	99,5	raloxifene	95,0	methylprednisolone	78,0
glimepiride	99,5	valsartan	95,0	epirubicin	77,0
efavirenz	99,5	amitriptylline	94,8	fluvoxamine	77,0
sulfasalazine	99,3	docetaxel	94,0	doxorubicin	76,0
ketorolac	99,2	fluoxetine	94,0	minocycline	76,0
bumetanide	99,0	selegiline	94,0	chlorthalidone	75,0
chlorambucil	99,0	sibutramine	94,0	prednisone	75,0
fluvastatin	99,0	simvastatin	94,0	rifampin	75,0
ibuprofen	99,0	sulindac	94,0	carbamazepine	74,0
ketoconazole	99,0	tolbutamide	94,0	dapsone	73,0
montelukast	99,0	clindamycin	93,6	ondansetron	73,0
nabumetone	99,0	zileuton	93,4	alprazolam	71,0
nicardipine	99,0	amlodipine	93,0	rifabutine	71,0
pimozide	99,0	bromocriptine	93,0	chlorpheniramine	70,0
pioglitazone	99,0	cyclosporin	93,0	dolasetron	70,0
tamsulosin	99,0	ivermectin	93,0	lidocaine	70,0
warfarin	99,0	olanzapine	93,0	amantadine	67,0
zafirlukast	99,0	sufentanil	93,0	cefixime	67,0
cetirizine	98,8	trazodone	93,0	chloroquine	66,6
diazepam	98,7	valproic acid	93,0	fexofenadine	65,0
furosemide	98,6	donepezil	92,6	granisetron	65,0
nelfinavir	98,5	alfentanil	92,0	tetracycline	65,0
propofol	98,5	ceftriaxone	92,0	dofetilide	64,0
ritonavir	98,5	haloperidol	92,0	mexiletine	63,0
sertraline	98,5	nortriptyline	92,0	nitrofurantoin	62,0
glipizide	98,4	remifentanil	92,0	flecainide	61,0
mefloquine	98,2	zolpidem	92,0	indinavir	61,0
atorvastatin	98,0	sulfisoxazole	91,4	triamterene	61,0
cisapride	98,0	cocaine	91,0	capecitabine	60,0
entacapone	98,0	lorazepam	91,0	letrozole	60,0
losartan	98,0	paclitaxel	91,0	modafinil	60,0
midazolam	98,0	triazolam	90,1	nevirapine	60,0
saquinavir	98,0	amphotericin b	90,0	zaleplon	60,0
tamoxifen	98,0	finasteride	90,0	hydrochorothiazide	58,0
ticlopidine	98,0	imipramine	90,0	meperidine	58,0
delavirdine	97,6	indomethacine	90,0	lamotrigine	56,0
clorazepate	97,5	irbesartan	90,0	theophylline	56,0
repaglinide	97,4	melphalan	90,0	betaxolol	55,0
clofibrate	97,2	quinine	90,0	enalapril	55,0
benazepril	97,0	verapamil	90,0	esmolol	55,0
celecoxib	97,0	cefazolin	89,0	sulfamethoxazole	53,0
chlorpromazine	97,0	methadone	89,0	phenobarbital	51,0
gemfibrozil	97,0	phenytoin	89,0	azithromycin	50,0
isradipine	97,0	risperidone	89,0	nalbuphine	50,0
lansoprazole	97,0	doxycycline	88,0	acetylsalicylic acid	49,0
loratadine	97,0	hydralazine	87,0	clarithromycin	47,0
bicalutamide	96,0	propanolol	87,0	methotrexate	46,0
buprenorphine	96,0	quinidine	87,0	pravastatin	45,0
chlorpropamide	96,0	rofecoxib	87,0	amiloride	40,0
etoposide	96,0	clonazepam	86,0	anastrozole	40,0
nifedipine	96,0	cefotetan	85,0	ciprofloxacin	40,0
sildenafil	96,0	mirtazapine	85,0	metoclopramide	40,0
tiagabine	96,0	misoprostol	85,0	ropinirole	40,0

sirolimus	40,0	dalfopristin	20,0	gentamicin	10,0
moxifloxacin	39,4	gatifloxacin	20,0	levetiracetam	10,0
ganciclovir	39,0	imipenem	20,0	tobramycin	10,0
trimethoprim	37,0	cimetidine	19,0	zanamivir	10,0
cefotaxime	36,0	mercaptopurine	19,0	hydromorphone	7,1
lamivudine	36,0	amoxicillin	18,0	albuterol	7,0
baclofen	35,0	atropine	18,0	codeine	7,0
morphine	35,0	cefepime	17,0	pancuronium	7,0
nalmefene	34,4	sumatriptan	17,0	cidofovir	6,0
cefuroxime	33,0	procainamide	16,0	didanosine	5,0
levofloxacin	31,0	acyclovir	15,0	nicotine	4,9
ethambutol	30,0	methylphenidate	15,0	zalcitabine	4,0
vancomycin	30,0	pramipexole	15,0	gabapentin	3,0
naratriptan	29,0	ranitidine	15,0	oseltamivir	3,0
isosorbide dinitrate	28,0	tocainide	15,0	bupropion	0,8
venlafaxine	27,0	topiramate	15,0	Carboplatin	0,0
digoxin	25,0	cephalexin	14,0	ethosuximide	0,0
ofloxacin	25,0	rizatriptan	14,0	isoniazid	0,0
quinupristin	25,0	cyclophosphamide	13,0	isosorbide 5-mononitrate	0,0
zidovudine	25,0	cytarabine	13,0	lisinopril	0,0
zolmitriptan	25,0	fluconazole	11,0	ribavirin	0,0
felbamate	23,0	metoprolol	11,0		
ceftazidime	21,0	metronidazole	11,0		
acetaminophen	20,0	amikacin	10,0		
clonidine	20,0	busulfan	10,0		

Rys. Przykłady stopnia wiązania z białkami różnych klas leków
wartości podano w procentach.

fuT / fuB > 1	wiązanie leku w tkankach	**Vd > BW**
fuT / fuB = 1	średnio i słabo lipofilne związki	**Vd = BW**
fuT / fuB < 1	ograniczony transport przez błony	**Vd < BW**

fuT - wolna frakcja leku w kompartmencie tkankowym (pozanaczyniowym)
fuB - wolna frakcja leku w kompartmencie centralnym (krew)
Vd - pozorna objętość dystrybucji
BW - masa ciała

Obecnie dla białek biorących udział w którejkolwiek fazie ADME tworzy się bazy danych. Przykładem jest baza danych ADME-AP (ang.: *ADME - Associated Proteins*),(Sun L.Z. i wsp. 2002). Można za ich pomocą określić jaki wpływ może mieć określone białko na kinetykę danego związku.

Zmiany w wiązaniu leku z białkami często wiążą się z interakcjami pomiędzy lekami lub czynnikami endogennymi. Różnice w wiązaniu leków z białkami mogą być związane między innymi z wiekiem.

Pole powierzchni pod krzywą - AUC

AUC (ang.: *Area Under the Curve*; niem.: *Flache Under der Blutspiegelkurve; AUD - Area Under Data*) jest jednym z ważniejszych parametrów farmakokinetycznych. W sposób matematyczny przedstawia relację między ilością wprowadzonego do organizmu leku (dawka - D) a polem powierzchni jakie tworzy między osiami układu współrzędnych czas - stężenie(C-T) zakreślona krzywa. Stanowi punkt wyjścia do obliczenia wielu innych parametrów farmakokinetycznych. W farmakologii stanowi cenny punkt odniesienia w opisie farmakodynamiki leku. Znajomości pola powierzchni pod krzywą C-T pozwala obliczyć wartość dawki leku. Obecnie obliczaniu i analizie pola powierzchni pod krzywą w powiązaniu z analityką medyczną i farmaceutyczną, poświęca się coraz więcej uwagi. W badaniach porównawczych różnych leków stosuje się wartość pola powierzchni pod krzywą normalizowanego dawką - DNAUC (ang.: *Dose - Normalized Area Under the Curve*), (Ward K.W. i wsp. 2001). Tego typu normalizacja może być przeprowadzona za pomocą każdego typu danych których zmienność jest w znacznym stopniu skorelowana z wartością AUC. Można wiec zastosować w takim wypadku również masę ciała, powierzchnię ciała, klirens leku, czy aktywność enzymatyczną głównego szlaku metabolicznego etc..

$$\mathbf{DNAUC = AUC / D}$$

Pole powierzchni pod krzywą oblicza się za pomocą wielu różnych metod specyficznych dla interpolacji numerycznej lub ekstrapolacji danych. W ramach metod interpolacji stosowane są metody liniowe i nieliniowe (Yeh K.C., Kwan K.C. 1977; Storey B.E., Davies B.I. 1986; Rubinger D. i wsp. 1991; Purves R.D. 1992; Weiner P. i wsp. 1999; Gabrielsson J., Weiner D. 2000; Amisaki T. 2001).

Metody liniowe obliczania pola powierzchni pod krzywą C-T:

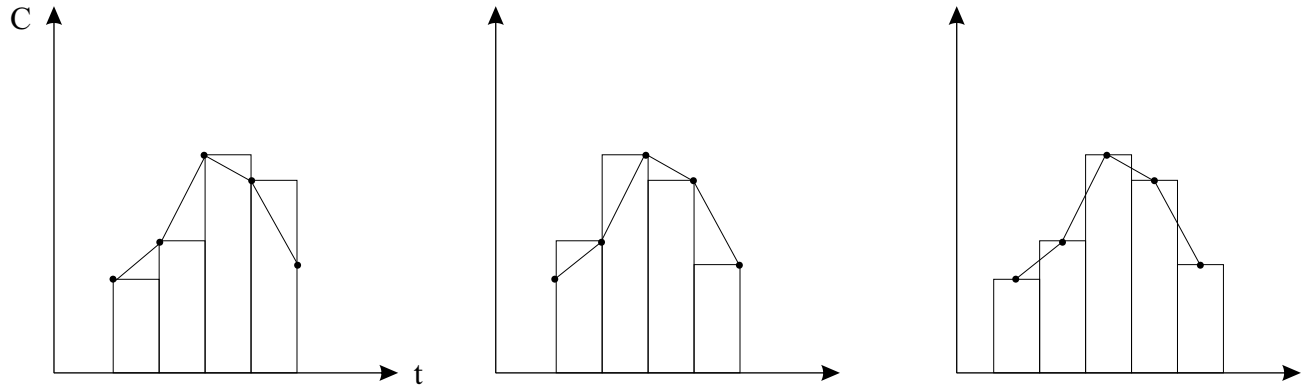
- metoda zliczania kwadratów (ang.: *Rectangle Rule*)
  - dopasowanie lewostronne
  - dopasowanie prawostronne
  - dopasowanie centralne
- metoda zliczania pól trapezów (ang.: *Linear Trapezoidal Rule*)
- logarytmiczna metoda zliczania pól trapezów (ang.: *Log - Linear Trapezoidal Rule*)

Metoda ekstrapolacji danych, wytyczanie eksponencjałów stężeń i stałych szybkości.

Metody nie liniowe obliczania pola powierzchni pod krzywą C-T:

- dopasowanie wielomianowe n - stopnia Lagrange
- metoda Simpsona'a 1/3
- metoda Simpson'a 3/8
- metoda Boole'sa
- metoda PTTO (ang.: *Parabola Through the Origin*)
- metoda Gaussa - Laguerre'a

Większość wymienionych metod można przedstawić w dwóch wersjach z dodaniem i bez pola resztkowego. Obecnie wszystkie wymienione wyżej metody stosowane są farmakokinetyce doświadczalnej. Jednak już tyko niektóre w analizie typu TTM czy badaniach biorównoważności dla celów rejestracyjnych. J e d n ą z prostszych metod jest metoda zliczania pól kwadratów pod kolejnymi punktami stężeń. Kwadraty te dopasowane są do punktów C-T lewo, prawostronnie lub centralnie. Metoda ta obarczona jest znacznym błędem obliczeniowym. Błąd ten wzrasta wraz z wzrostem różnicy tn+1 - tn. Analizę porównawczą i ocenę metod liczenia pól AUC w zależności od metody dopasowania można wykonać korzystając z podstawowych wzorów na BIAS i RMSE (ang.: *Root Mean Squared Error*)



Ryc. Metoda zliczania pól kwadratów.

$$\mathbf{BIAS = (AUC - AUCz) / (n \times AUCz)}$$

$$\mathbf{Precyzja = - Log \times (AUC - AUCz) / (AUCz)}$$

$$\mathbf{RMSE = \{[(AUC - AUCz)^2 / n]^{0.5}\} / AUCz}$$

AUC - AUC pochodzące z obliczeń
AUCz - AUC realne
n - liczba powtórzeń

Zliczanie pól poszczególnych kwadratów daje sumę pól powierzchni pod krzywą czyli pól powierzchni pod kwadratami.

$$\mathbf{AUC = (t_{n+1} - t_n) \times C_n}$$

Najczęściej stosowaną metodą obliczania AUC jest liniowa metoda sumowania pól trapezów. Stąd czasami stosowane przez autorów badań AUT - (ang.: *Area Under Trapezoids).* Metoda ta polega na obliczaniu i sumowaniu pól trapezów i trójkątów jakie tworzą się pomiędzy poszczególnymi odcinkami integrowanej krzywej. Równanie relacjonujące poszczególne odcinki prostych tworzące krzywą C-T to równanie linii prostej o wzorze:

$$\mathbf{y = a + bt}$$

$$\mathbf{y = [(t_n \times C_{n-1}) - (C_n \times t_{n-1})] / (t_{n+1} - t_n)} \qquad \mathbf{b = (C_n - C_{n+1}) / (t_{n+1} - t_n)}$$

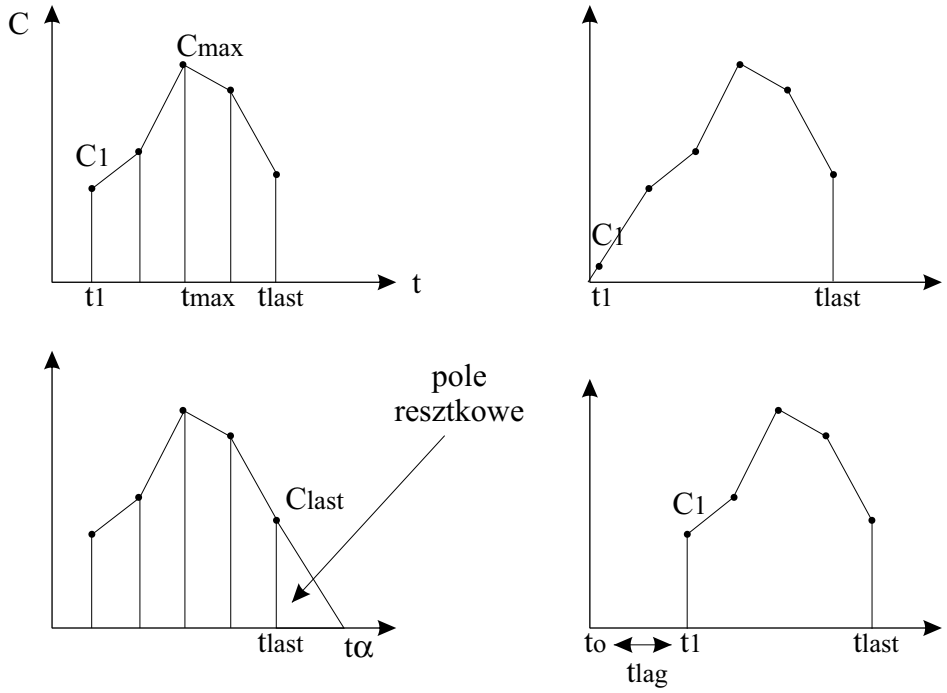
Obliczenia takie można zakończyć w ostatnim punkcie czasowym w jakim określono jeszcze wartość stężenia leku w osoczu. Taki sposób obliczania AUC pomija tzw. pole resztkowe. Wynikiem tak przeprowadzonych obliczeń jest uzyskanie wartości pola powierzchni pod krzywą w granicach od 0 do punktu czasowego równego tlast czyli AUC(0 - t).
liniowa metoda zliczania pól trapezów:

$$\mathbf{AUC_{(o-t)} = \Sigma [(C_n + C_{n+1}) / 2] \times (t_{n+1} - t_n)}$$

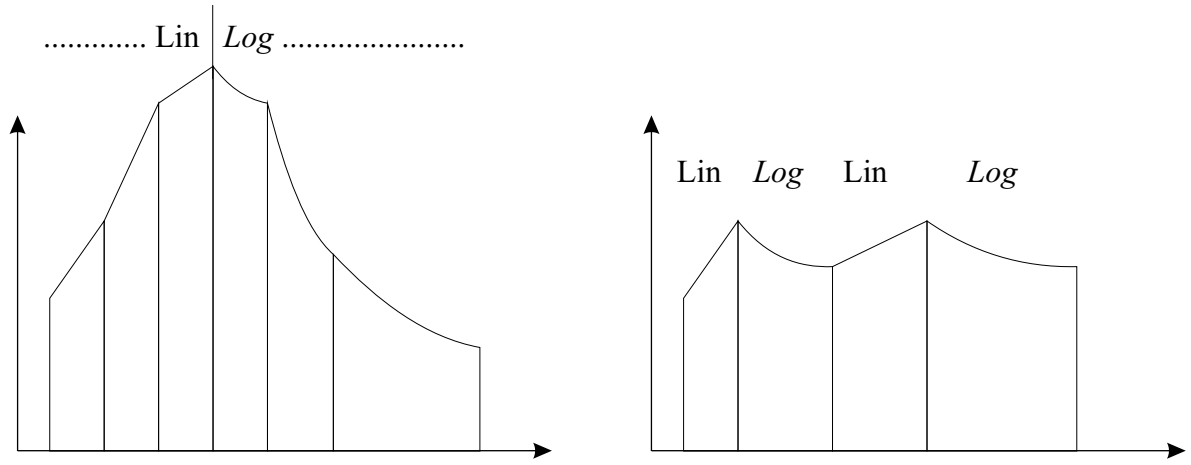
Cn, Cn+1 - wartości kolejnych stężeń
tn, tn+1 - wartości kolejnych punktów czasowych

logarytmiczna - liniowa metoda zliczania pól trapezów:

$$\mathbf{AUC_{(o-t)} = \Sigma [(C_n + C_{n+1}) / Ln(C_{n+1} / C_n)] \times (t_{n+1} - t_n)}$$

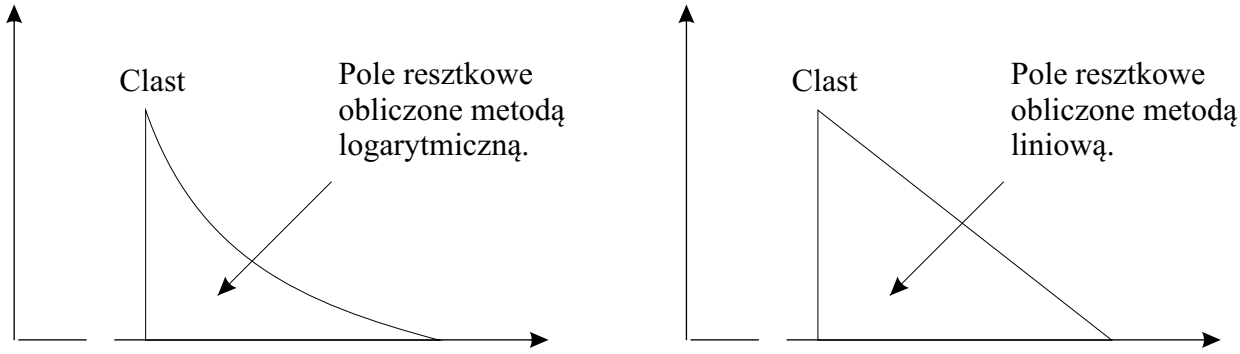


Rys. Obliczanie pola powierzchni pod krzywą metodą sumowania pól powierzchni trapezów i trójkątów, z udziałem lub bez udziału pola resztkowego oraz z uwzględnieniem lub bez uwzględniania czasu opóźnienia wchłaniania tlag.

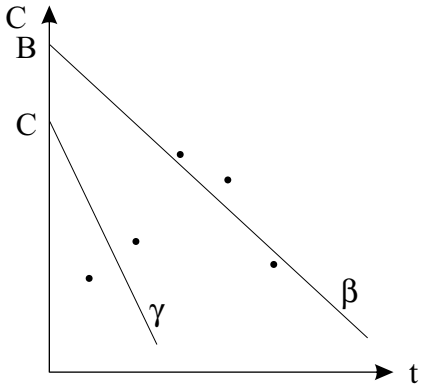


Rys. Obliczanie pola powierzchni pod krzywą metodą sumowania pól powierzchni trapezów i trójkątów mieszaną metodą logarytmiczno (Log) liniową (Lin).

W badaniach mających na celu potwierdzenie bądź wykluczenie biorównoważności jako metodę obliczania AUC stosuje się mieszany sposób liniowo logarytmiczny. Zasada metody polega na zliczaniu kolejnych pól metodą liniową zliczania trapezów aż do punktu Cmax. Począwszy od Cmax kolejne pola zliczane są liniową metodą log-trapezową aż do Clast. Od Clast do nieskończoności oblicza się pole trójkąta - pole resztkowe. Kolejną metodą jest metoda ekstrapolacji, w której pole powierzchni oblicza się na podstawie znajomości stałych prędkości ilustrujących nachylenie krzywej, oraz wartości stężeń ekstrapolowanych. Wynikiem tak przeprowadzonych obliczeń jest uzyskanie wartości pola powierzchni pod krzywą opisanego linią najlepszego dopasowania dla wartości stężeń ekstrapolowanych AUC(expo). Pole pod krzywą C-T obliczone tą metoda można przedstawić również z uwzględnieniem lub bez wartości pola resztkowego.



Rys. Różnica w obliczaniu pola powierzchni resztkowego metodą logarytmiczną i metodą liniową.



Rys. Obliczanie pola powierzchni pod krzywą metodą wyznaczania eksponencjałów.

$$\mathbf{AUC_{(expo)} = A / \alpha + B / \beta + C / .....}$$

α,β - stałe szybkości
A,B - wartości stężeń ekstrapolowanych

Powyższe równanie umożliwia również obliczanie frakcji pola odpowiednio dla każdej z analizowanych faz kinetycznych:

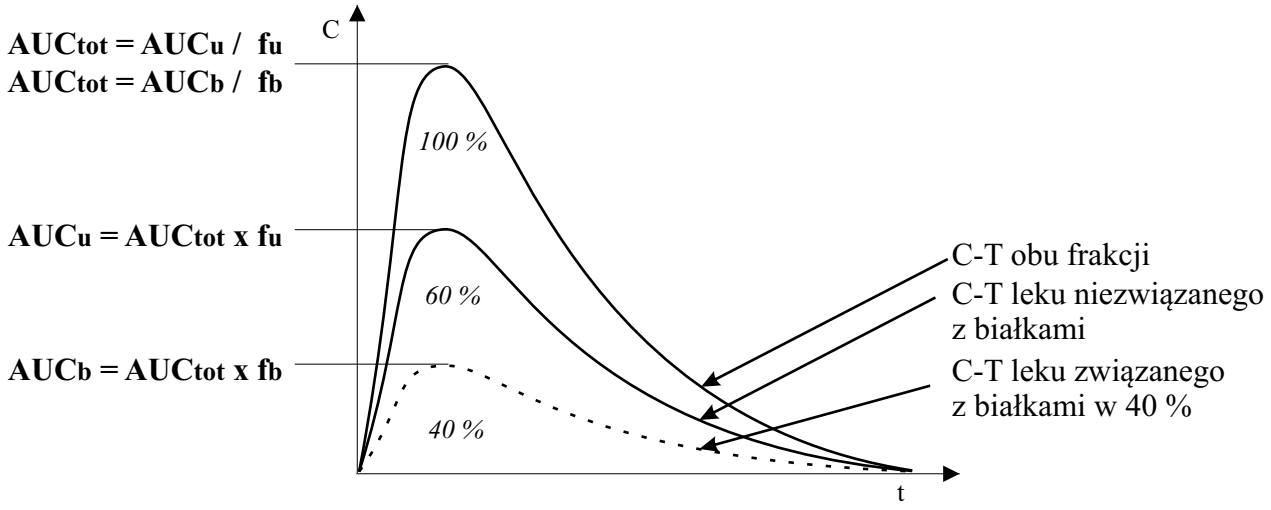
$$AUC(\alpha) = (\mathbf{A} / \alpha) / (\mathbf{A} / \alpha + \mathbf{B} / \beta) \qquad AUC(\beta) = (\mathbf{B} / \beta) / (\mathbf{A} / \alpha + \mathbf{B} / \beta)$$

Innym sposobem przeprowadzenia obliczeń jest określenie wartości pola trójkąta który powstałby w końcowym odcinku krzywej w przypadku osiągnięcia wartości stężenia = 0. Taki sposób prowadzenia obliczeń umożliwia przedstawienie sumy AUC i AUC resztkowego. Wynikiem tak przeprowadzonych obliczeń jest uzyskanie wartości pola powierzchni pod krzywą w granicach od 0 do punktu czasowego równego ta czyli AUC(0 -α).

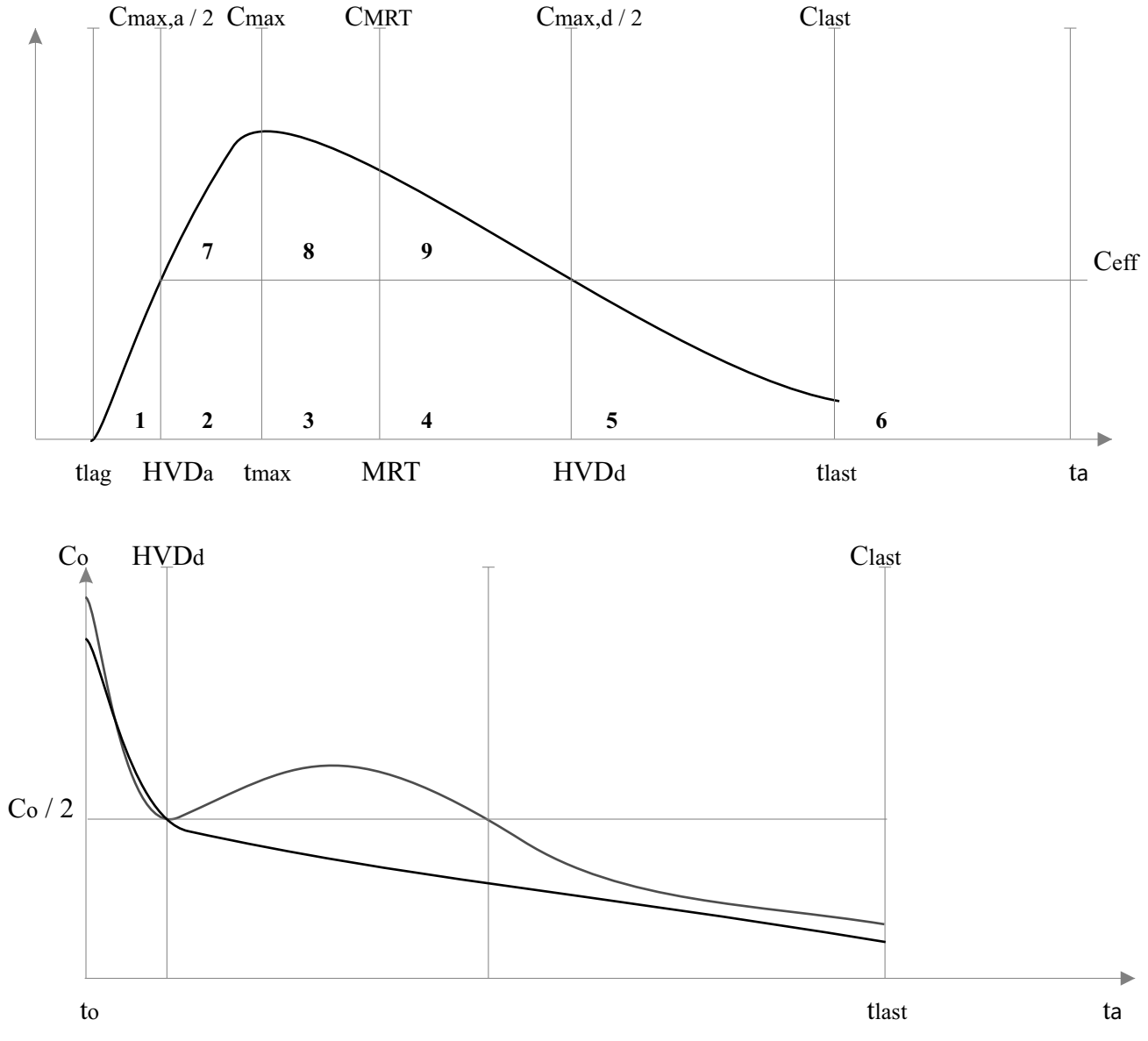
$$\mathbf{AUC_{(resztkowe)} = C_{last} / \beta} \qquad \mathbf{AUC_{(o\text{-}a)} = \Sigma [(C_n + C_{n+1}) / 2] \times (t_{n+1} - t_n) + (C_{last} / \beta)}$$

Clast - ostatnie zarejestrowane w eksperymencie stężenie

Pole powierzchni resztkowe do pewnego stopnia określa czy doświadczenia kliniczne dla danego przypadku zostały wykonane we właściwy sposób.



Rys. Różnice w wartości pól powierzchni pod krzywymi C-T dla frakcji leku niezwiązanego z białkami i całkowitej ilości leku w tkance dla wartości fu = 0.6.



Rys. Udział parametrów czasu w opisie farmakokinetycznym leku.
Możliwości wielokierunkowej analizy pola różnego rodzaju krzywych C-T.

Zbyt duże resztkowe pole powierzchni w porównaniu do pola powierzchni od 0 do punktu t (tlast), świadczy o tym że eksperyment został zakończony zbyt wcześnie. W praktyce oznacza to że ostatnia próba w której analizowano stężenie leku została pobrana zbyt szybko. W takich wypadkach powinno się oznaczyć stężenie leku w dodatkowym punkcie czasowym umiejscowionym po tlast. Pole powierzchni pod krzywą stężeń można przedstawić wyrażając proces farmakokinetyczny, na przykład dystrybucję (Schoenwald R.D. 2002). Stąd dla podania donaczyniowego i dwukompartmentowego modelu farmakokinetycznego AUDC (ang.: *Area Under Disposition Curve*) wynosi:

$$\mathbf{AUDC_{(expo)} = [(\alpha - \beta) / (A + B)]^2} \qquad \mathbf{AUDC_{(expo)} = [(\alpha - \beta) / Co]^2}$$

Pole resztkowe ogranicza pole trójkąta którego wierzchołkami są punkty opisane jako Clast, tlast, oraz punkt czasowy leżący na osi X łączący krzywą stężeń z tą osią - $t\alpha$. Wartość tego punktu można obliczyć posługując się formułą:

$$\mathbf{t\alpha = (2 \times AUC_{(resztkowe)} / Clast) + tlast} \qquad \text{stąd} \qquad \mathbf{tlast = t\alpha - (2 \times AUC_{(resztkowe)} / Clast)}$$

Zależność pomiędzy całkowitym polem powierzchni pod krzywą, polem resztkowym i stężeniem początkowym ilustruje schemat:

$$\mathbf{AUC_{(o-t)} = Co / \beta} \quad \mathbf{AUC_{(t-\alpha)} = Clast / \beta} \qquad \mathbf{AUC_{(o-\alpha)} = Co + Clast / \beta}$$

W praktyce, przygotowaniu prób osocza do analizy towarzyszy denaturacja białek. Prowadzi to do oznaczenia stężenia całości frakcji leku jaka znajduje się w danym punkcie czasowym we krwi. Oznaczenie leku w próbie bez niszczenia struktury białek i bez wprowadzenia zmian ładunku na ich powierzchni prowadziłoby do analizy stężenia tylko frakcji wolnej leku. Dla leków wiążących się z białkami w znacznym stopniu, błąd zaistniały w trakcie przeprowadzania denaturacji białek krwi lub innych tkanek będzie miał znaczny wpływ na takie parametry farmakokinetyczne jak dostępność biologiczna Cmax, Co. Błąd ten tuszować będzie także ewentualny brak liniowości procesów farmakokinetycznych. Dla leków słabo wiążących się z białkami ryzyko błędu dotyczącego przygotowania tej fazy metody analitycznej jest wielokrotnie mniejsze, ponieważ:

$$\mathbf{Cu = Cp \times fu}$$

Cu - stężenie leku niezwiązanego z białkami osocza
Cp - całkowite stężenie leku we krwi
fu - frakcja leku niezwiązana

$$\mathbf{AUCu = AUCtot \times fu} \quad \text{lub} \quad \mathbf{AUCu = AUCtot - AUCb}$$

$$\mathbf{AUCb = AUCtot \times fb} \quad \text{lub} \quad \mathbf{AUCb = AUCtot - AUCu}$$

$$\mathbf{AUCtot = [AUCu_{(o-t)} + AUCb_{(o-t)}] + [AUCu_{(t-\alpha)} + AUCb_{(t-\alpha)}]}$$

AUCu - pole powierzchni pod krzywą leku niezwiązanego z białkami
AUCb - pole powierzchni pod krzywą leku związanego z białkami
AUCtot - całkowite pole powierzchni pod krzywą
fb - frakcja leku związana
fu - frakcja leku niezwiązana

Opis parametrów farmakokinetycznych w tym AUC dla frakcji niezwiązanej z białkami ma szczególne znaczenie w badaniach prowadzonych w przypadkach uszkodzenia i nieprawidłowej funkcji narządów wydalniczych takich jak nerki czy wątroba (FDA, CDER, CBER 1999). Wpływają one w znacznym stopniu na kształt, wartość i przebieg AUC. Pole powierzchni pod krzywą C-T jest źródłem znacznej liczby danych szczególnie w badaniach porównawczych leków. Jest parametrem który można obliczać fragmentarycznie, oceniając wyrywkowo zmiany fragmentów pola.

Podział AUC w płaszczyźnie pionowej na fragmenty pól ilustruje do pewnego stopnia wchłanianie i dyspozycję leku w organizmie. Pozwala na badanie stosunku pomiędzy poszczególnymi fragmentami pola. Tego rodzaju obserwacje pozwalają na wnikliwą analizę wartości pola i zmian jego fragmentów umożliwiając prowadzenie optymalizacji technologii danej postaci leku.

$$AUC_{(to\text{-}HVDa)} = [(HVDa - tlag) \times (Cmax,a / 2)] / 2$$

$$AUC_{(HVDa\ -\ tmax)} = [(tmax - HVDa) \times (Cmax + (Cmax,\ a / 2))] / 2$$

$$AUC_{(tmax\ -\ HVDd)} = [(HVDd - tmax) \times (Cmax + (Cmax,\ d / 2))] / 2$$

$$AUC_{(tmax\ -\ MRT)} = [(MRT - tmax) \times (Cmax + CMRT)] / 2$$

$$AUC_{(HVDd\ -\ tlast)} = [(tlast - HVDd) \times (Clast + (Cmax,d / 2))] / 2$$

$$AUC_{(HVDa\ -\ HVDd)} = AUC_{(o\text{-}tlast)} - [AUC_{(to\text{-}HVDa)} + AUC_{(HVDd\ -\ tlast)}]$$

$$AUC_{(HVDa\ -\ HVDd)} = AUC_{(HVDa\ -\ tmax)} + AUC_{(tmax\ -\ HVDd)}$$

$$AUC_{(MRT\ -\ HVDd)} = [(HVDd - MRT) \times (CMRT + (Cmax,d / 2))] / 2$$

$$AUC_{(MRT\ -\ HVDd)} = (AUC_{(o\ -tlast)} / 2) - AUC_{(HVDd\ -\ tlast)}$$

Pole 7:

$$AUC = [(tmax - HVDa) \times (Cmax,a / 2)] / 2$$

Pole 8:

$$AUC = [(MRT - tmax) \times ((Cmax,d / 2) + (CMRT - (Cmax,d / 2)))] / 2$$

Pole 9:

$$AUC = [(HVDd - MRT) \times (CMRT - (Cmax,d / 2))] / 2$$

Wymienione wyżej składowe tworzą pole powierzchni nad stężeniem Cmax / 2. Jeżeli przyjąć wartość Cmax / 2 za równą MIC (ang.: *Minimal Ihibitory Concentration*) to suma pól 7,8,9 będzie równa AUC > MIC. Sumę tych pól można obliczyć korzystając z formuły:

$$AUC > Cmax = AUC_{(o\text{-}tlast)} - [AUC_{(to\text{-}HVDa)} + AUC_{(HVDd\ -\ tlast)} + ((HVDd - HVDa) \times (Cmax / 2))]$$

Wartość pola poniżej Cmax /2 wyraża równanie:

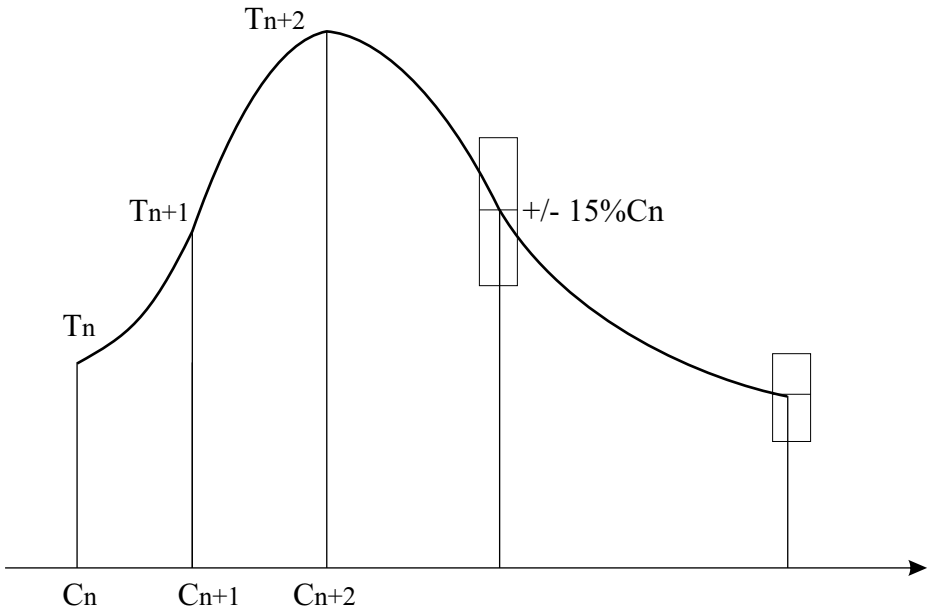
$$AUC < Cmax = AUC_{(to\text{-}HVDa)} + AUC_{(HVDd\ -\ tlast)} + ((HVDd - HVDa) \times (Cmax / 2))$$

Nieliniowe metody integracji krzywej C-T.

Dobór metody obliczenia wartości AUC generuje pytanie o sposób dopasowania krzywej do rzeczywistego przebiegu zmian C-T. AUC obliczane metodą zliczania pól trapezów określane bywa mianem AUT - pole powierzchni trapezów. Metoda zliczania pól trapezów wytycza proste pomiędzy punktami C-T relacjonującymi kinetykę zmian stężenia w czasie. Krzywą pomiędzy punktami C-T można analizować metodami nieliniowymi na przykład metodą Simpson'a. Metoda ta jest jedną z wielu metod numerycznej integracji danych i od dawna znajduje zastosowanie w farmakokinetyce (Lee F. Y. F i wsp. 1986; Le Floch J.P. i wsp. 1990; Cozzi P.J. i wsp. 1999). Podstawą dla jej stworzenia i zastosowania w farmakokinetyce jest metoda Lagrange'a. Polega ona na przeprowadzeniu dopasowania wielomianowego n - stopnia do punktów C-T. Równanie funkcji opisującej przebieg takiej krzywej jest równaniem krzywej wielomianowej:

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3$$

Metoda Simson'a wymaga parzystej liczby par danych C-T. Bierze pod uwagę nie jeden obszar typu Cn-Tn ; Cn+1-Tn+1 lecz dwa kolejne obszary krzywej tj. Cn-Tn ; Cn+1-Tn+1; Cn+2-Tn+2. Mając do dyspozycji 3 punkty czyli dwa pola reguła Simpson'a pozwala obliczyć pole pod krzywą o charakterze paraboli. Krzywą tą charakteryzuje dopasowanie wielomianowe najczęściej drugiego rzędu (Herbert M. i wsp. 1997; Cozzi P.J. i wsp. 1999; Fisher J. i wsp. 2004).



Ryc. Pole powierzchni pod krzywą dopasowania wielomianowego metodą Simpson'a.

W przypadku najczęściej stosowanej metody zliczania pól trapezów odcinki pomiędzy analizowanymi punktami to linie proste. Cały proces kinetyczny jest wiec potraktowany w mikroskali jako zbiór wielu procesów liniowych. Skala ta w rzeczywistości badań farmakokinetycznych nie jest jednak mikroskalą z uwagi na dość duże interwały czasowe stosowane w trakcie pobierania prób do analiz. Krzywa zmian stężenia leku w czasie w mikroskali jest rzeczywiście zbiorem linii prostych lecz tylko w takim rozumieniu w jakim koło jest zbiorem punktów i prostych które je łączą. Jednak w przypadku analizy profilu farmakokinetycznego leku czas pobrania ostatniej próbki przeznaczonej do analizy chemicznej może być bardzo odległy, równy na przykład 72 godziny. Jeżeli analiza miałaby obejmować mikroskalę i kolejne punkty czasowe miałyby mieć odstępy na przykład. 10 minutowe to analiza pojedynczego profilu wymagałaby 432 analiz. Pobierając za każdym razem 1 ml krwi oznaczałoby to pobranie 430 ml krwi od probanta.

Obecne regulacje pozwalają na pobranie od człowieka do 450 ml krwi (czyli w przybliżeniu 10% objętości krwi) w okresie do 3 miesięcy. Efektem byłoby uzyskanie obrazu krzywej zbudowanej z wielu odcinków prostych opartych na wytyczeniu 432 punktów C-T. Obecnie koszty analiz chemicznych oraz praktyka tego typu badań nie pozwala jednak na tak dogłębną analizę. Stąd często stawiane pytanie jak duży błąd obejmuje analizę pola powierzchni pod krzywą wykonaną metodą AUT.

AUT / AUC = 1

Dopasowanie i obliczanie AUC za pomocą zliczania kolejnych pól trapezów w sposób bardzo pobieżny relacjonuje autentyczny wygląd krzywej C-T. Grupa odcinków prostych nierzadko o interwałach 6:8 godzin czy 12:24 godziny nie może relacjonować wszystkich zachodzących w tych interwałach procesów. Taki stan rzeczy ma niewiele wspólnego z rzeczywistą mieszaną strukturą kinetyki leków. Przyczyną tego stanu jest wielotorowość procesów jakim lek ulega w organizmie ich niejednorodność i zupełnie różne nasilenie w różnych przestrzeniach i czasie. Efekty tych procesów mają różny wymiar a ich usytuowanie zarówno z matematycznego jak i medycznego punktu widzenia jest często trudne do sprecyzowania. Kwestia najlepszego dopasowania krzywej C-T do rzeczywistego przebiegu zmian stężeń wiąże się z parametrami metod analitycznych zastosowanych do określenia stężenia leku w badanej tkance. Krzywa kalibracyjna w metodzie bioanalitycznej wykazuje odchylenia +/- 15 % dla każdego punktu krzywej z wyjątkiem punktu LOQ gdzie wynosi ono nawet +/- 20 % . Oznacza to takie samo odchylenie wyniku dla każdego punktu krzywej C-T czyli takie samo odchylenie dla wartości Cmax czy Clast. Generowany w ten sposób błąd jest tym większy im wyższe jest stężenie, generując tym samym większą różnicę w przypadku dużych wartości pól. Błąd ten dla małych wartości stężenia jest niewielki. Jednak jeśli różnica tn - tn+1 jest duża błąd ten rośnie z uwagi na wzrost wartości mierzonego pola. W takim wypadku dywagacje dotyczące kwestii najlepszego dopasowania krzywej nie znajdują odbicia w praktyce. Z drugiej jednak strony są cennym narzędziem analizy porównawczej w przypadku gdy pobieranie próbek w określonym profilu C-T z różnych przyczyn jest bardzo rzadkie ewentualnie obarczone dużym błędem analitycznym.
Dla porównania dwóch pól o parametrach:

$t_1 = 0.1; C_1 = 225$
$t_2 = 0.3; C_2 = 125$

(krótki interwał czasowy / wysokie stężenie)

$AUC_{(C1-C2)} = 35$

Jeżeli błąd w oznaczeniu obu stężeń C1 i C2 wyniósł + 15% to pole AUC ma wartość 40.25
Jeżeli błąd w oznaczeniu obu stężeń C1 i C2 wyniósł - 15% to pole AUC ma wartość 29.75

$t_1 = 0.1; C_1 = 225$
$t_2 = 1.5; C_2 = 125$

długi interwał czasowy / wysokie stężenie)

$AUC_{(C1-C2)} = 245$

Jeżeli błąd w oznaczeniu obu stężeń C1 i C2 wyniósł + 15% to pole AUC ma wartość 281.75
Jeżeli błąd w oznaczeniu obu stężeń C1 i C2 wyniósł - 15% to pole AUC ma wartość 208.25

Błąd w przypadku obu pól jest taki sam w stosunku do wartości analizowanego pola czyli +/- 15 %. Jednak w przypadku pierwszego pola o wartości 35 wzrost wartości o 15 % spowodował wzrost wartości pola o około 5 jednostek. Wartość ta będzie odgrywać minimalną rolę w analizie totalnego pola obliczonego z kilkunastu punktów C-T.

W przypadku drugiego pola o wartości 245 wzrost wartości o 15% spowodował wzrost wartości pola o około 35 jednostek. Ten i kolejne tego typu błędy odegrają znaczną rolę w analizie totalnego pola obliczonego z kilkunastu punktów C-T. Przyczyną tego błędu nie będzie metoda analityczna (spełnia założenia +/- 15 %) ani dopasowanie krzywej C-T lecz rozmieszczenie i liczba punktów C-T w badaniu. Uproszczony wzór zliczania pola pod krzywą wielomianową Simpson'a 1/3:

$$\mathbf{AUC = [\ 1/3\ x\ (1\ /\ (1 + C_{n-1}^{2}))\ x\ 1]\ x\ (t_{n-1} - t_o) + [\ 1/3\ x\ (1\ /\ (1 + C_n^{2}))\ x\ 4]\ x\ (t_n - t_{n-1}) + [\ 1/3\ x\ (1\ /\ (1 + C_{n+1}^{2}))\ x\ 2]\ x\ (t_{n+1} - t_n) + [\ 1/3\ x\ (1\ /\ (1 + C_{n+1}^{2}))\ x\ 1]\ x\ (t_{n+1} - t_n)}$$

Jedną z metod nieliniowej integracji krzywej C-T jest metoda PTTO (ang.: *Parabola Through The Origin*)(Purves R.D. 1992). Zliczanie kolejnych pól pod krzywą polega na analizie paraboli przebiegającej zgodnie z równaniem $y = ax^2 + bx$.

$$\mathbf{AUC_{(PTTO)} = [(a_2\ x\ t_2^{3})\ /\ 3] + [(b_2\ x\ t_2^{2})\ /\ 2] + [a_n\ /\ 3\ x\ (t_{n+1}^{3} - t_n^{3})] + [b_n\ /\ 2\ x\ (t_{n+1}^{2} - t_n^{2})]}$$

Gdzie:

$$\mathbf{a_n = [1\ /\ (t_{n+1} - t_n)]\ x\ [(C_{n+1}\ /\ t_{n+1}) - (C_n\ /\ t_n)]}$$

$$\mathbf{b_n = (C_n\ /\ t_n) - (a_n\ x\ t_n)}$$

Frakcjonowanie pola powierzchni pod krzywą C-T

Pole powierzchni pod krzywą - AUC jest najczęściej obserwowanym przez eksperymentatora parametrem farmakokinetycznym. Niesie ze sobą bardzo dużą ilość informacji jednak wymagają one przetworzenia wartości na składowe. Stąd liczne techniki frakcjonowania lub normalizowania AUC. Jedną z prostszych metod wydzielenia frakcji AUC jest określenie pola powierzchni składowych AUC od 0 do wartości t i obliczenie ich udziału w procentach (Shargel L. i wsp 2004).

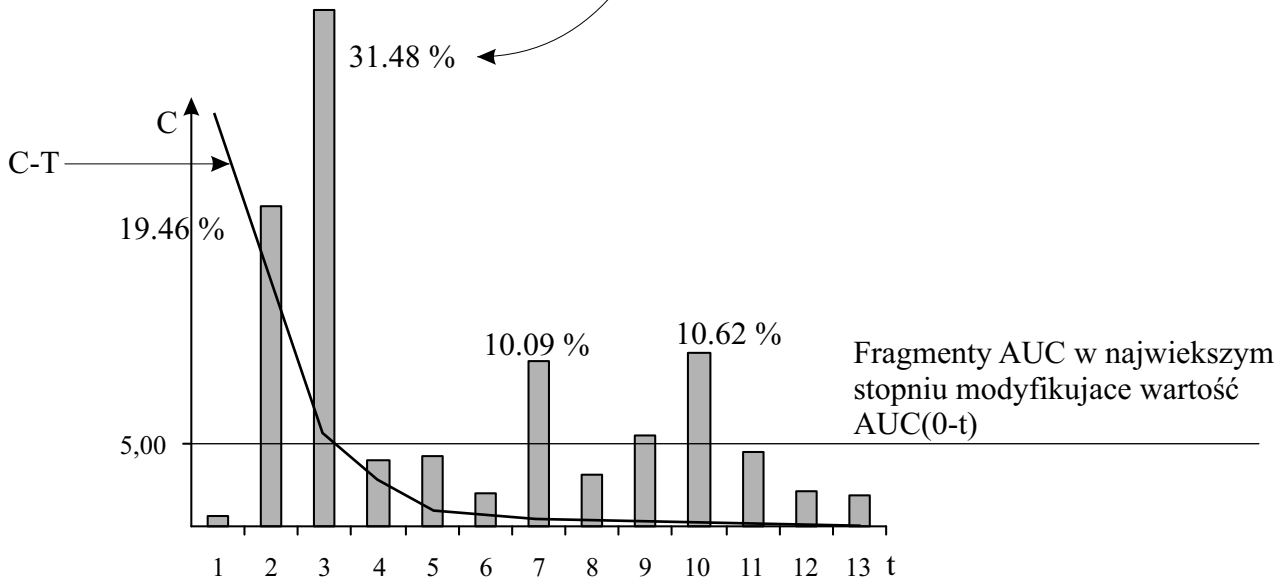
$$\mathbf{AUC_{(0-t)} = AUC_{(0-n)} + AUC_{(n-n+1)} + AUC_{(n+1-n+2)} .....}$$

lub

$$\mathbf{AUC_{(0-t = 100\%)} = AUC_{(0-n = 10\%)} + AUC_{(n-n+1= 25\%)} + AUC_{(n+1-n+2 = 40\%)} .....}$$

Procentowa wartość składowych pola AUC zwykle nie jest dobrze widoczna przy pobieżnej analizie wykresu zależności C-T. Stąd konieczność wykonania obliczeń procentowego udziału poszczególnych fragmentów pola w stosunku do całości. Procentowy udział poszczególnych wartości AUC uzależniony jest od wartości punktów czasowych i odpowiadających im wartościom stężeń jakie stwierdzono w tkance.

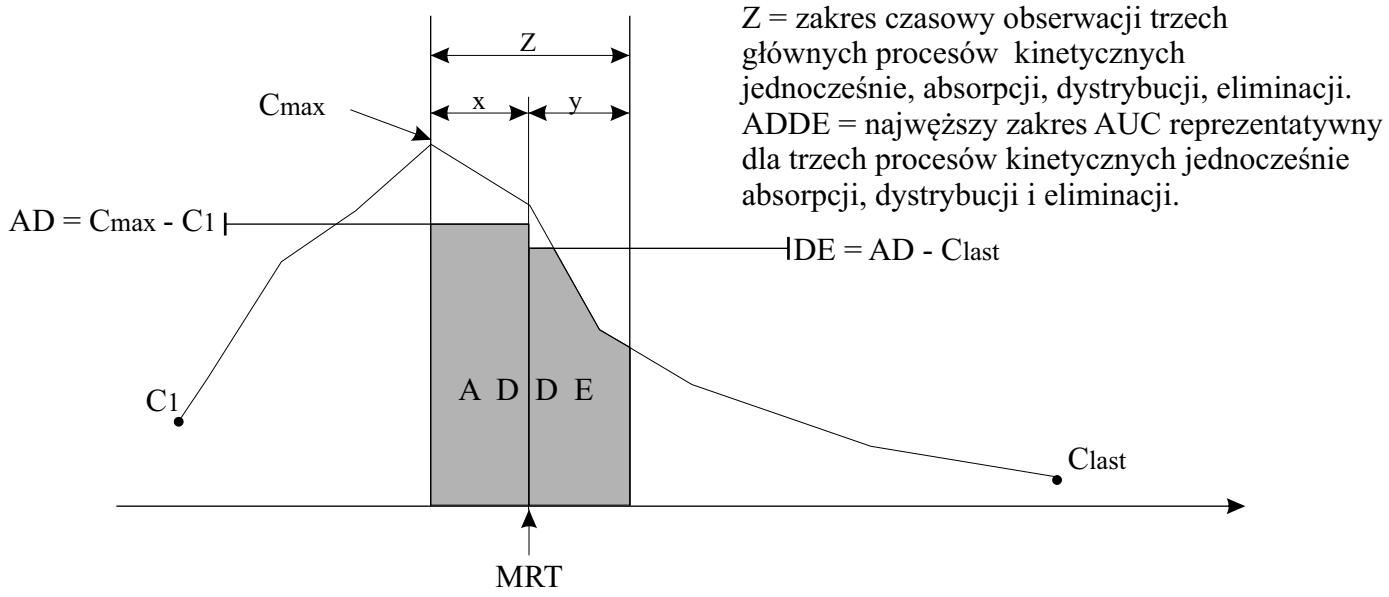
C	T	AUC(0-t)= 200.574	%AUC(0-t)
0.01	255.5	1.278	0.64
0.2	155.3	39.026	19.46
0.8	55.2	63.15	31.48
1	25.5	8.07	4.02
1.5	9.32	8.705	4.34
2	6.78	4.025	2.01
6	3.34	20.24	10.09
8	3	6.34	3.16
12	2.55	11.1	5.53
24	1	21.3	10.62
36	0.52	9.12	4.55
48	0.21	4.38	2.18
72	0.11	3.84	1.91



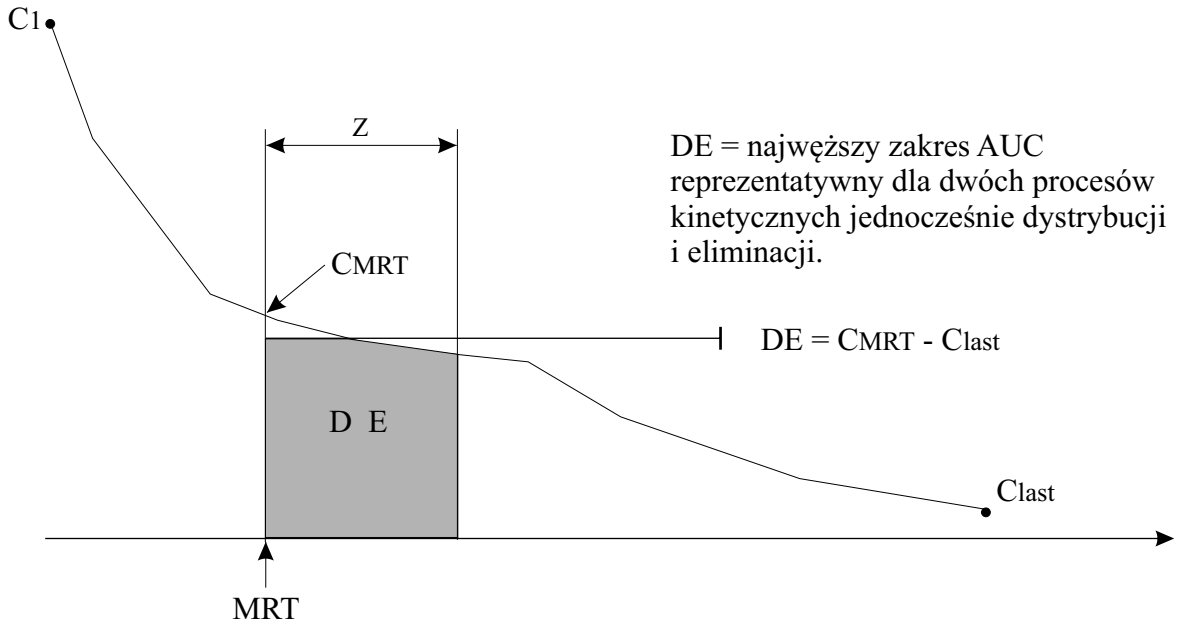
Ryc. Procentowy udział fragmentów pola powierzchni pod krzywą w AUC(0-t).

MRT jest niezwykle ważnym punktem odniesienia w badaniach porównawczych kinetyki leków. W rozumieniu MRT = AUMC(0-t) / AUC(0-t) jest to statystyczny odnośnik jednocześnie do wszystkich procesów kinetycznych zachodzących w stosunku do molekuł leku w biofazie. Stąd zastosowanie go jako odnośnika we frakcjonowaniu AUC(0-t) które również w pewnym sensie jest statystycznym obrazem lub wypadkową wszystkich procesów kinetycznych. Oba parametry mają wiec wspólny rodowód. Jeśli przyjąć powyższe założenia oznacza to że dla MRT można wytyczyć swego rodzaju przedział ufności. W przedziale tym znajdzie się fragment pola AUC ilustrujący w jednakowym stopniu wszystkie obserwowane procesy kinetyczne (zachodzące jednocześnie) oraz gdzie spełniona jest zasada:

Z = x + y lub **Z = (MRT - Cmax) x 2**



Ryc. Frakcjonowanie pola powierzchni pod krzywą C-T na przykładzie krzywej typowej dla podania doustnego leku.



Ryc. Frakcjonowanie pola powierzchni pod krzywą C-T na przykładzie krzywej typowej dla podania dożylnego leku.

Teoria momentów statystycznych - SMT (ang.: *Statistical Moments Theory*)

Teoria momentów statystycznych opisuje zjawiska dotyczące zmian stężenia leku w czasie za pomocą specyficznych parametrów statystycznych. Parametry te mogą ilustrować procesy farmakokinetyczne zarówno w skali mikro tj. w skali komórkowej jak i w skali całego organizmu. Opis statystyczny w farmakokinetyce najczęściej obejmuje obliczenia dotyczące tzw. momentów statystycznych, np.: średniego czasu przebywania leku w organizmie - MRT (komórce, tkance, narządzie, kompartmencie lub innej zdefiniowanej przez badacza przestrzeni kinetycznej), pola powierzchni pierwszego momentu AUMC etc.. Analizę tego typu opisuje często akronim - SHAM (ang.: *Slopes, Heights, Areas, Moments*) (Riviere J.E. 1999). Wartości parametrów SMT oraz ich pochodne pozwalają na opis zachowania się cząsteczek leku w organizmie. Pozwalają także na analizę porównawczą krzywych C-T. Ilustrowanie kinetyki leku parametrami statystycznymi dało nowe spojrzenie na analizę krzywych C-T. Umożliwiło analizę geometrii pól powierzchni z innego punktu widzenia - leku jako liczby pojedynczych cząsteczek umieszczonych w biofazie.

W skład analizy typu SHAM wchodzą zwykle takie parametry jak:

AUC	MAT	VRT	CV^2	Cl; t1/2; Vd(ss); Cpo;
AUDC	MRT	CVRT	CS^3	Cmax; tmax; Clast
AUMC	MTT		SRT	
AUMDC	MRN			
AUCC				

W przypadku analizy opartej na momentach statystycznych, parametry takie jak Cl, Vd, t1/2 obliczane są również na ich podstawie.

Pole powierzchni pierwszego momentu - AUMC

AUMC (ang.: *Area Under First Moment Curve*) jest parametrem określającym pole powierzchni pod krzywą, gdzie iloczyn stężenia i czasu wyrażony został funkcją czasu. Opisuje więc krzywą typu CT-T. Pole powierzchni pierwszego momentu obliczyć można korzystając z innych parametrów farmakokinetycznych.

$$\mathbf{AUMC = AUC \times MRT} \qquad \mathbf{lub} \qquad \mathbf{AUMC = AUC / Kel}$$

oraz

$$\mathbf{AUMC = C_{p(0)} / Kel^2}$$

MRT - średni czas obecności leku w organizmie
Kel - stała szybkości eliminacji
Cp(0) - stężenie początkowe leku po podaniu dożylnym

Sposoby obliczania pola powierzchni pierwszego momentu znajdują analogiczne rozwiązanie jak w przypadku obliczania pola powierzchni pod krzywą (AUC). Podobnie jak w przypadku pola powierzchni pod krzywą AUMC oblicza się za pomocą metod specyficznych dla interpolacji lub ekstrapolacji danych. W ramach metod interpolacji stosowane są metody:

- liniowa metoda zliczania pól trapezów bez resztkowego pola powierzchni:

$$\mathbf{AUMC_{(o-t)} = \Sigma\ [[(C_n \times t_n) + (C_{n+1} \times t_{n+1})] / 2] \times (t_{n+1} - t_n)}$$

- liniowa metoda zliczania pól trapezów bez resztkowego pola powierzchni:

$$\mathbf{AUMC_{(o-\alpha)} = \{\Sigma[[(C_n \times t_n) + (C_{n+1} \times t_{n+1})] / 2] \times (t_{n+1} - t_n)\} + [(C_{last} \times t_{last} / \beta) + (C_{last} / \beta^2)]}$$

- logarytmiczna metoda zliczania pól trapezów bez resztkowego pola powierzchni:

$$\mathbf{AUMC_{(o-t)} = \{\Sigma[[(C_{n+1} \times t_{n+1}) - (C_n \times t_n)] / Ln(C_{n+1} / C_n)] \times (t_{n+1} - t_n)\} -}$$

$$\mathbf{- \{(t_{n+1} - t_n)^2 \times [(C_{n+1} - C_n) / Ln(C_{n+1} / C_n)^2]\}}$$

W ramach ekstrapolacji danych:

$$\mathbf{AUMC_{(expo)} = A / \alpha^2 + B / \beta^2 + C / .....^2}$$

α - stała prędkości procesu dystrybucji
β - stała prędkości procesu eliminacji
A - wartość stężenia ekstrapolowanego odczytanego na osi Y dla fazy dystrybucji
B - wartość stężenia ekstrapolowanego odczytanego na osi Y dla fazy eliminacji

Pole powierzchni pierwszego momentu można przedstawić także wyrażając proces farmakokinetyczny , na przykład dystrybucję (Schoenwald R.D. 2002). Stąd dla dwukompartmentowego modelu farmakokinetycznego AUMDC (ang.: *Area Under Moment Disposition Curve*) wynosi:

$$\mathbf{AUMDC_{(expo)} = (A \times B) \times [(\alpha - \beta) / (\beta \times A + \alpha \times B)]^2}$$

$$\mathbf{AUMDC_{(expo)} = C_o \times [(\alpha - \beta) / (\beta \times A + \alpha \times B)]^2}$$

Pole powierzchni spotęgowanej krzywej AUCC.

AUCC (ang.: *Area Under the Squared Curve*) jest parametrem wykorzystywanym między innymi do określenia punktu ciężkości krzywej C-T. Opisuje on krzywą typu CC-T. Parametrami które pozwalają określić koordynaty środka krzywej są AUMC / AUC oraz AUCC / 2 x AUC.

$$\mathbf{AUCC_{(o-t)} = \Sigma [(t_{n+1} - t_n) / 2] \times (C_n + C_{n+1})^2}$$

Jedną z metod nieliniowej integracji krzywej C-T i pola AUMC jest metoda PTTO (ang.: *Parabola Through the Origin*)(Purves R.D. 1992).

$$\mathbf{AUMC_{(PTTO)} = [(a_2 \times t_2^4) / 4] + [(b_2 \times t_2^3) / 3] + [a_n / 4 \times (t_{n+1}^4 - t_n^4)] + [b_n / 3 \times (t_{n+1}^3 - t_n^3)]}$$

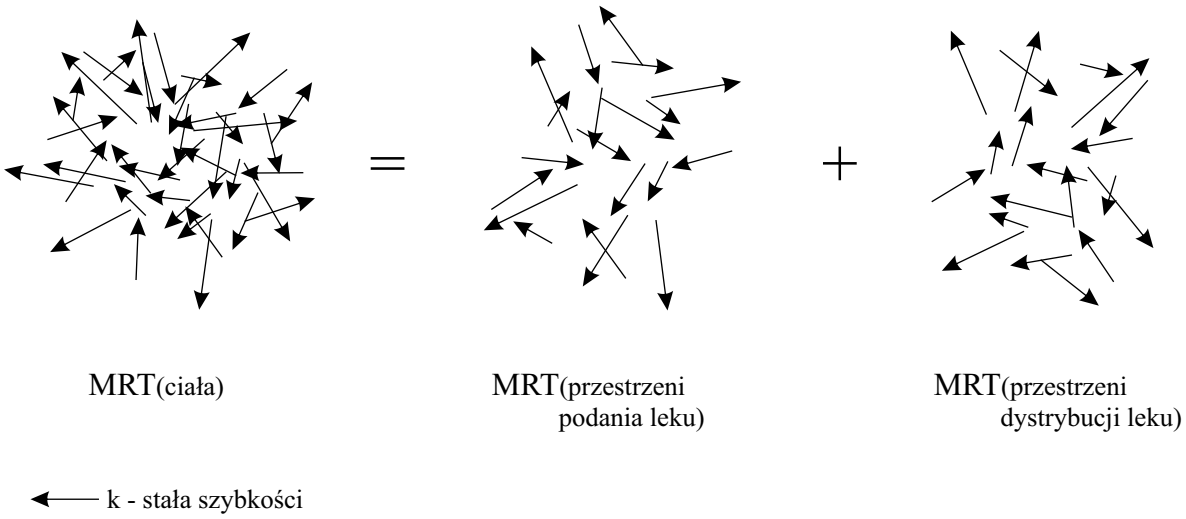
Gdzie:

$$\mathbf{a_n = [1 / (t_{n+1} - t_n)] \times [(C_{n+1} / t_{n+1}) - (C_n / t_n)]}$$

$$\mathbf{b_n = (C_n / t_n) - (a_n \times t_n)}$$

Średni czas przebywania leku w organizmie - MRT

MRT (ang.: *Mean Residence Time*; *Mean Life-span of Molecules*) jest jednym z nielicznych parametrów farmakokinetycznych które opisują geometrię analizowanego pola powierzchni pod krzywą. Jest to bowiem wartość czasu która w praktyce dzieli wykreślone pole AUC na dwie równe połowy w płaszczyźnie pionowej. Dzieje się tak jedynie w przypadku klasycznego modelu jednokompartmentowego. Do pewnego stopnia charakteryzuje więc jego geometrię w płaszczyźnie równoległej do osi stężeń. MRT całego organizmu jest wypadkową MRT przestrzeni podania leku i MRT tkanek i organów w obrębie których zachodzi dyspozycja. W mikroskali składową MRT są średnie czasy transportu leku - MTT (ang.: *Mean Transit Time*).



Ryc. Składowe średniego czasu obecności leku w organizmie.

Czas ten przyjmuje najczęściej wartość większą od okresu półtrwania w fazie eliminacji. Dla procesów pierwszego rzędu dla podania donaczyniowego stanowi odwrotność stałej szybkości opisującej proces eliminacji (Gibaldi M., Perrier D. 1982). Jest to czas w którym Vd równy jest Vss. Wartość MRT obliczamy korzystając z równań:

$$\mathbf{MRT = 1 / \beta} \qquad \mathbf{t_{1/2} = 0.693 / \beta}$$

$$\mathbf{MRT = 1.44 \times t_{1/2}} \qquad \mathbf{MRT = t_{1/2} / 0.693}$$

$$\mathbf{1 / \beta > 0.693 / \beta}$$

Stąd im większa jest różnica pomiędzy wartością $1 / \beta$ a np. AUMC / AUC tym model odleglejszy jest od jednokompartmentowego. Różnica między wymienionymi parametrami może wynikać z niejednorodnej i zróżnicowanej dystrybucji w obrębie badanej komórki, tkanki, narządu lub organizmu. W typowym modelu jednokompartmentowym po jednorazowym podaniu dożylnym MRT ciała jest praktycznie równe MRT kompartmentu centralnego. Jednak jest to tylko pozorne podobieństwo ponieważ tak obliczana wartość nadal reprezentuje zespół zmian i procesów jakim lek ulega w całym organizmie.

$\mathbf{MRT_{(T)}}$	$\mathbf{MRT_{(P)}}$
$\mathbf{1 / \beta = AUMC / AUC}$	$\mathbf{1 / k_{10} = AUMC / AUC}$
$\mathbf{(1 / \beta) / (AUMC / AUC) = 1}$	$\mathbf{(1 / k_{10}) / (AUMC / AUC) = 1}$

Jednak jeżeli można wytyczyć stała szybkości eliminacji leku z tkanek - k20 to można również wyznaczyć przybliżoną wartość MRT w tkankach, choć w istocie są to wartości MTT :

$$\mathbf{MRT = 1 / k_{20}} \qquad \text{lub} \qquad \mathbf{MRT = 1 / k_{21}}$$

Nieco inaczej problem rysuje się przy użyciu modeli wielokompartmentowych lub modeli w których wyróżnić można procesy przebiegające z różnymi stałymi szybkości. Opis MRT dla tego rodzaju analizy jest bardziej złożony (Mayersohn M., Hamilton R. 1993). Ponieważ model taki opisuje wiele stałych szybkości stąd np.:

$$\mathbf{MRT = 1 / \gamma + 1 / \alpha + 1 / \beta} \ .....$$

γ - stała szybkości absorpcji
α - stała szybkości dystrybucji
β - stała szybkości eliminacji

W obrębie modelu dwukompartmentowego można więc przyjąć że stosunek MRT do t1/2b ma wartości:

Jeżeli	$\mathbf{A/B < 2.56}$	to	$\mathbf{MRT > t_{1/2}}$
Jeżeli	$\mathbf{\alpha/\beta > 2.00}$	to	$\mathbf{MRT > t_{1/2}}$
Jeżeli	$\mathbf{A/B > 2.56}$	to	$\mathbf{MRT < t_{1/2}}$
Jeżeli	$\mathbf{\alpha/\beta < 2.00}$	to	$\mathbf{MRT < t_{1/2}}$

a - stała szybkości dystrybucji
b - stała szybkości eliminacji
A - wartości stężenia ekstrapolowanego w fazie dystrybucji
B - wartości stężenia ekstrapolowanego w fazie eliminacji

Nieco szerzej problematykę stosunku MRT do t1/2 dla fazy eliminacji relacjonują zasady i obliczenia zaprezentowane przez Sobol'a i Bialer'a. (Sobol E., Bialer M. 2004). Sposób w jaki można określić czy MRT będzie większy czy mniejszy od okresu półtrwania określić można znając procentowy udział frakcji leku obecnego w organizmie w fazie dystrybucji i w fazie eliminacji. Dotyczy to modelowania dwukompartmentowego i jednorazowego podania donaczyniowego leku.

$$\mathbf{f_1 = (A \times \beta) / [(A \times \beta) + (B \times \alpha)]}$$

$$\mathbf{f_2 = (B \times \alpha) / [(A \times \beta) + (B \times \alpha)]}$$

f1 - frakcja leku obecna w organizmie w fazie dystrybucji
f2 - frakcja leku obecna w organizmie w fazie eliminacji
A - wartość ekstrapolowanego stężenia dla fazy dystrybucji
B - wartość ekstrapolowanego stężenia dla fazy eliminacji
α - stała szybkości eliminacji dla fazy dystrybucji
β - stała szybkości eliminacji dla fazy eliminacji

Drugim wyznacznikiem relacji MRT i biologicznego okresu półtrwania jest wartość krytyczna CV(ang.: *Critical Value*) obliczana na podstawie wzoru:

dla podania donaczyniowego: $\mathbf{CV = 1 - Ln(2) / [1 - (\beta / \alpha)]}$

dla wlewu donaczyniowego: $\mathbf{CV_{inf} = [1 - Ln(2) + (\beta \times T/2)] / [1 - (\beta / \alpha)]}$

dla wlewu donaczyniowego: $\mathbf{CV_{po} = [1 - Ln(2) + (\beta / \gamma)] / [1 - (\beta / \alpha)]}$

γ - stała szybkości absorpcji
T - czas trwania wlewu

Stąd w modelu dwukompartmentowym w przypadku jednorazowego podania donaczyniowego:

MRT > t1/2β	jeżeli:	**CV ≤ [1- Ln(2)]**	i	**f1 < [1- Ln(2)]**
	lub	**[1- Ln(2)] > CV < 0.5**	i	**f1 < CV**
	lub	**0.5 > CV < 1**	i	**f1 < CV**
	lub	**CV > 1**		
MRT < t1/2β	jeżeli:	**CV ≤ [1- Ln(2)]**	i	**f1 > [1- Ln(2)]**
	lub	**[1- Ln(2)] > CV < 0.5**	i	**f1 > CV**
	lub	**0.5 > CV < 1**	i	**f1 > CV**

Jeśli przyjąć że do organizmu dostaje się jedna molekuła leku to MRT jest czasem od podania cząsteczki do jej eliminacji z organizmu. Z uwagi na to że w przypadku podania leku nie wszystkie molekuły zachowują się w sposób identyczny MRT jest średnim czasem. Opisuje więc przedział w jakim wszystkie cząsteczki leku przebywają w analizowanej przestrzeni kinetycznej (Brockmeier D. 1999). MRT pozwala dla procesów pierwszego rzędu (w fazie wchłaniania i eliminacji) i modelu jednokompartmentowego na obliczenie tmax. Ponieważ przy takich założeniach wartość MRT jest funkcją wartości stałej szybkości wchłaniania γ i eliminacji β (Volosow A., Bialer M. 1999).

$$\mathbf{MRT = (\gamma + \beta) / (\gamma \times \beta)}$$

$$\mathbf{t_{max} = MRT / [(Z^2 - 1) / (Z / Ln\ Z)]}$$

$$\mathbf{Z = \gamma / \beta \ lub \ \beta / \gamma}$$

Jeżeli $\gamma = \beta$ to: $\mathbf{MRT = 2 \times t_{max}}$ $\mathbf{MRT = 2 / \beta}$

Stężenie opisujące średni czas przebywania leku w organizmie - C_{MRT}

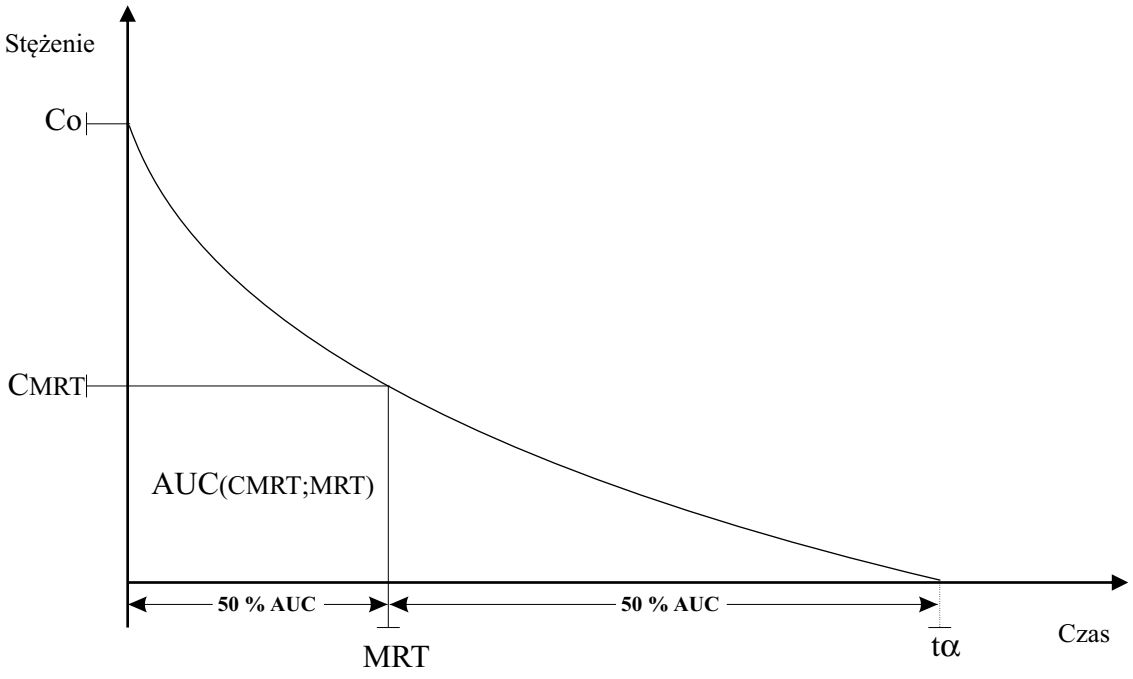
Wartością opisującą geometrię przebiegu krzywej stężeń jest także C_{MRT}, czyli stężenie wskazane na osi stężeń przez wartość MRT. Ten parametr farmakokinetyczny także opisuje geometrię przebiegu pola lecz w płaszczyźnie poziomej. Pozwala on na kwalifikowanie krzywej C-T w modelowaniu kompartmentowym. Uzupełnia w ten sposób analizę kompartmetową o statystyczny opis farmakokinetyki leku już we wstępnym etapie prowadzonych obliczeń.

$$\mathbf{C_{MRT} = C_n + [((C_n + C_{n+1}) \times (t_n - MRT)) / (t_{n+1} - t_n)]}$$

MRT dla podania donaczyniowego w modelu jednokompartmentowym stanowi czas w którym 63.2 % cząsteczek leku zostało poddane eliminacji z organizmu. Stąd C_{MRT} przyjmuje wartość stałej, której wielkość jest równa 36.8 % wartości stężenia początkowego - Co.

$$\mathbf{C_{MRT} = Co \times 0.386}$$

Średni czas przebywania leku w organizmie można odnieść do stanu równowagi w procesach chemicznych zwanego relaksacją. Zmianę takiego stanu równowagi określa się tu opisując tzw. czas relaksacji czyli taki czas po którym układ osiągnął w 38.6 % do nowego stanu równowagi (Kamieński B. 1980). Dla procesów pierwszego rzędu spełniony jest tu warunek:



Rys. MRT w wyznaczaniu geometrii przebiegu krzywej stężeń.

$$\mathbf{Ln\ (C_o / C)\ = 1}$$

Ponieważ

$$\mathbf{C_o / C = e^{-1}}$$

$$\mathbf{C_o / C = 0.386}$$

W przypadku jednorazowego podania donaczyniowego leku faza absorpcji leku nie występuje stąd można określić pole jakie wytycza w obrębie AUC jako pole kwadratu o wartości równej:

$$\mathbf{AUC_{(CMRT,MRT)} = C_{MRT} \times MRT}$$

Pole to wraz z polem położonym nad wektorem wskazującym na osi Y wartość C_{MRT} stanowi w obrębie krzywej C-T, połowę wartości całego pola powierzchni pod krzywą. Pole powierzchni jakie tworzy iloraz wartości C_{MRT} i MRT można również obliczyć znając prędkość procesów eliminacji - β.

$$\mathbf{AUC_{(CMRT,MRT)} = C_{MRT} / \beta}$$

Wartość C_{MRT} jest jedynie stałą kinetyczną jednak wartość pola jakie tworzy wraz z MRT opisuje geometrię przebiegu krzywej stężeń w jej początkowej fazie. Znaną metodą obliczania MRT jest wyrażenie stosunku AUMC (pola powierzchni pierwszego momentu) do AUC. W przypadku obliczania MRT dla całego organizmu dla frakcji wolnej leku lub wartości całkowitej:
Dla całego organizmu:

$$\mathbf{MRT = AUMC / AUC}$$

Powyższy wzór relacjonuje średni czas przebywania leku w całym organizmie mimo że najczęściej dane do obliczenia AUC i AUMC pochodzą z oznaczania stężeń leku we krwi. Zmiany wymienionych pól nie są jednak pochodna procesów (ADME) które zachodzą we krwi lecz w całym organizmie i różnych narządach oraz w kompartmentach komórkowych poza łożyskiem naczyniowym.

Zmiany AUC i AUMC relacjonują wiec kolejne fazy kinetyczne które zachodzą w całym organizmie a których ogólnym obrazem jest zmiana stężenia leku we krwi w czasie. Średni czas obecności leku w organizmie skorygowany ilością leku związanego z białkami obliczyć można korygując wzór o tę właśnie wartość:

$$\mathbf{MRT = AUMC / AUC}$$

odpowiednio dla łożyska krwi: $\mathbf{MRT_{(P)} = (AUMC / AUC) - (AUC / Co)}$

Za pomocą wymienionego wyżej wzoru obliczyć można MRT dla całego organizmu na przykład po podaniu dożylnym leku. Jednak jeżeli podanie leku nie jest dożylne to każda inna droga podania wymaga korekcji wzoru o fazę wchłaniania lub czasu podania - "udostępnienia" leku. Pojawia się statystycznie istotna różnica w MRT i MAT którą należy wykazać. MAT (ang.: *Mean Absorption Time*) jest często wymiennie stosowany z MIT (ang.: *Mean Input Time*).

$$\mathbf{MRT = (AUMC / AUC) - MAT} \qquad \mathbf{MRT = (AUMC / AUC) - MIT}$$

odpowiednio dla łożyska krwi:

$$\mathbf{MRT_{(P)} = [(AUMC / AUC) - MAT] - (AUC / Co)}$$

Ponieważ MRT jest częścią średniego czasu dyspozycji leku w organizmie - MDT (ang.: *Mean Disposition Time*). Jeżeli MIT czyli średni czas przebywania leku w kompartmencie podania jest równy zero MRT = MDT. Natomiast na MIT składają się średni czas rozpuszczania leku MdT (ang.: *Mean Dissolution Time*) oraz średni czas jego absorpcji MAT Stąd:

$$\mathbf{MIT = MdT + MAT} \quad \text{oraz} \quad \mathbf{MRT = MDT + MIT}$$

$$\mathbf{MRT = (AUMC / AUC) - (MDT + MAT)}$$

odpowiednio dla łożyska naczyniowego:

$$\mathbf{MRT_{(P)} = [(AUMC / AUC) - (MDT + MAT)] - (AUC / Co)}$$

Substytutem MDT dla podania pozanaczyniowego jest także czas opóźnienia wchłaniania:

$$\mathbf{MRT = (AUMC / AUC) - [t_{lag} + (1 / \gamma)]}$$

odpowiednio dla łożyska naczyniowego:

$$\mathbf{MRT_{(P)} = \{(AUMC / AUC) - [t_{lag} + (1 / \gamma)]\} - (AUC / Co)}$$

Dla wlewu donaczyniowego (MRT dla przestrzeni - kompartmentu podania):

$$\mathbf{MRT = MRT_{(i.v.)} + (T/2)}$$

Dla kompartmentu centralnego (kompartmentu podania):

$$\mathbf{MRT_{(P)} = AUC / Co} \qquad \mathbf{MRT_{(P)u} = [AUC / Co] \times fu}$$

$$\mathbf{MRT_{(P)} = 1 / k_{10}} \quad \textbf{gdyż} \quad \mathbf{k_{10} = Co / AUC}$$

γ- stała szybkości absorpcji
tlag - czas opóźnienia wchłaniania
T- czas trwania wlewu
k10 - stała szybkości eliminacji leku z kompartmentu centralnego
fu - frakcja leku nie związana z białkami
MRT(P) - średni czas przebywania leku w kompartmencie centralnym

Dla kompartmentu peryferyjnego (Nakashima E., Benet L.Z. 1988):

$$\mathbf{MRT_{(T)} = k12 / (k10 \times k21)}$$

k12 - stała szybkości przechodzenia leku z kompartmentu centralnego do peryferyjnego
k21 - stała szybkości przechodzenia leku z kompartmentu peryferyjnego do centralnego
MRT(T) - średni czas przebywania leku w tkankach

Taki sposób prowadzenia obliczeń MRT (na podstawie AUMC i AUC) prowadzi do obliczenia średniego czasu przebywania leku w całym organizmie. Wartość tą można jednak obliczyć także oddzielnie dla kompartmentu centralnego a dokładnie osocza oraz tkanek. Stąd otrzymujemy:

$$\mathbf{MRT_{(P)} = AUC / (D / Vd_{(c)})} \qquad \mathbf{MRT_{(T)} = MRT_{body} - MRT_{(P)}}$$

Vd(c)- objętość dystrybucji dla kompartmentu centralnego
D- dawka
MRT(T) - średni czas przebywania leku w tkankach
MRT(P) - średni czas przebywania leku w osoczu

Taki opis MRT wymaga obliczenia stężenia początkowego. Pozwala więc wiązać obliczenia w typowych modelach kompartmentowych z modelami opartymi na momentach statystycznych. Powyższa formuła jest również szerzej interpretowana wskazując na wartość MRT w przestrzeni peryferyjnej (Schoenwald R.D. 2002):

$$\mathbf{MRT_{(P)} = MRT_{body} - MRT_{(S)}} \qquad \mathbf{MRT_{(P)} = (AUMC/AUC) - (AUC/C_0)}$$

MRT(P) - średni czas przebywania leku w przestrzeni peryferyjnej
MRT(S) - średni czas przebywania leku w przestrzeni podania leku (ang.: *Initial Space; Sampling Space*)

Stosunek wartości MRT dla przestrzeni peryferyjnych do MRT miejsca podania relacjonowany jest w stanie ustalonych wahań stężenia leku w organizmie jako współczynnik rozdziału średniego czasu obecności leku - RTPC (ang.: *Residence Time Partition Coefficient*).

$$\mathbf{RTPC = MRT_{(p)} / MRT_{(s)}}$$

Można go obliczyć znając wartości objętości dystrybucji dla kompartmentu centralnego - Vd(c)oraz objętość dystrybucji dla stanu ustalonych wahań stężenia leku Vd(ss).

$$\mathbf{RTPC = (Vd_{(ss)} / Vd_{(c)}) - 1}$$

MRT jest wypadkową objętości jaka została udostępniona cząsteczkom leku oraz szybkości usuwania leku z tej objętości. Zatem zależny jest zarówno od objętości dystrybucji jak i klirensu. Wartość MRT dla tkanek można obliczyć znając tzw. klirens tkankowy (dystrybucyjny) - Cl(BT) (ang.: *Effective Permeation Clearance*) (Weiss M., Roberts M.S 1996).

$$\mathbf{MRT_{(T)} = V_{(T)} / Cl_{(T)}}$$

V(T) - objętość tkanki
Cl(T) - klirens tkankowy

MRT jest parametrem statystycznym można więc opisać za jego pomocą składowe całego procesu dyspozycji leku w organizmie. Stąd obliczenia MDRT; MRT(D) (ang.: *Mean Disposition Residence Time*) czyli średni czas przebywania leku w organizmie w odniesieniu do dyspozycji w organizmie.

$$\mathbf{MRT_{(D)} = Vd_{(ss)} / Cl_{(b)}}$$

Vd - objętość dystrybucji
Cl(b) - klirens całkowity

Tak jak każdy inny parametr farmakokinetyczny MRT w zależności od potrzeb także można normalizować wartością beztłuszczowej masy ciała lub innymi parametrami - (ang.: *Normalized Mean Residence Time*).

$$\mathbf{XnMRT = MRT / X}$$

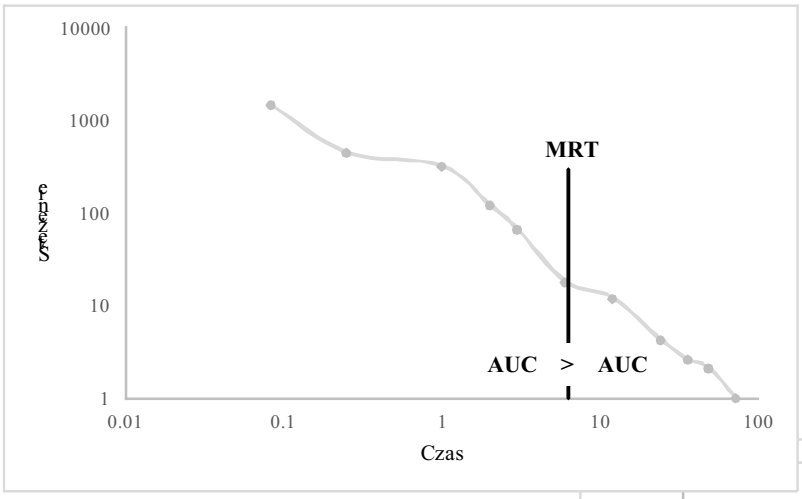
X = LBM - beztłuszczowa masa ciała
X =BMI - indeks masy ciała
X = BSA pole powierzchni ciała

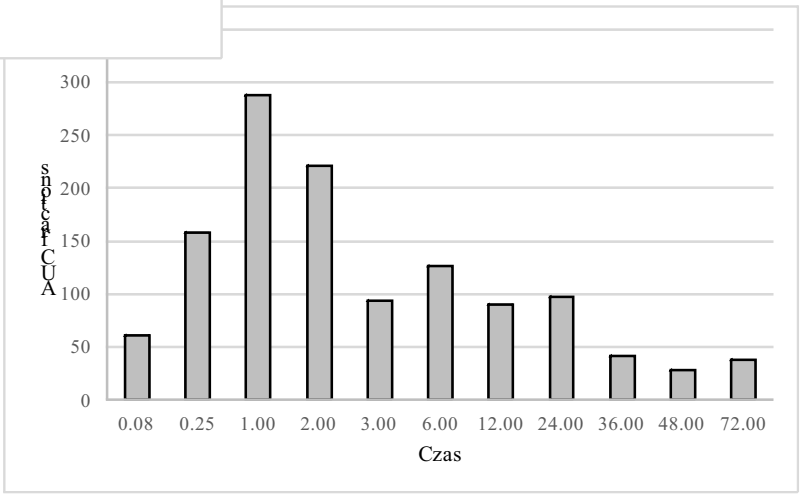
Poniżej przedstawiono przykład obliczeń MRT na podstawie AUC oraz AUMC w dwóch wersjach wraz z polem resztkowym oraz bez pola resztkowego dla danych reprezentujących model dwukompartmentowy.

T	C	AUC	AUMC	MRT	Kel
0.00	0.00	0.00	0.00	728.32	
0.0833	1456.33	60.68	5.06		
0.25	446.00	158.53	19.41		
1	321.56	287.84	162.40		
2	121.00	221.28	281.78		
3	66.30	93.65	220.45		
6	18.00	126.45	460.35		
12	12.00	90.00	756.00		
24	4.23	97.38	1473.12		
36	2.60	40.98	1170.72		0.956
48	2.12	28.32	1172.16		0.751
72	1.00	37.44	2085.12	514.22	0.000
tlast-infinity		36.73	3994.19		
					0.0272

0-t		
1242.54	7806.56	6.28
0-infinity		
1279.28	11800.74	9.22

kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)



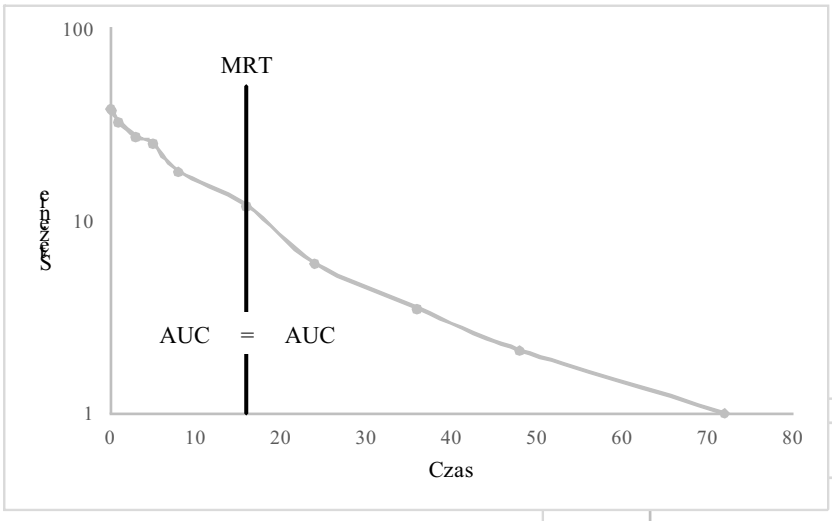


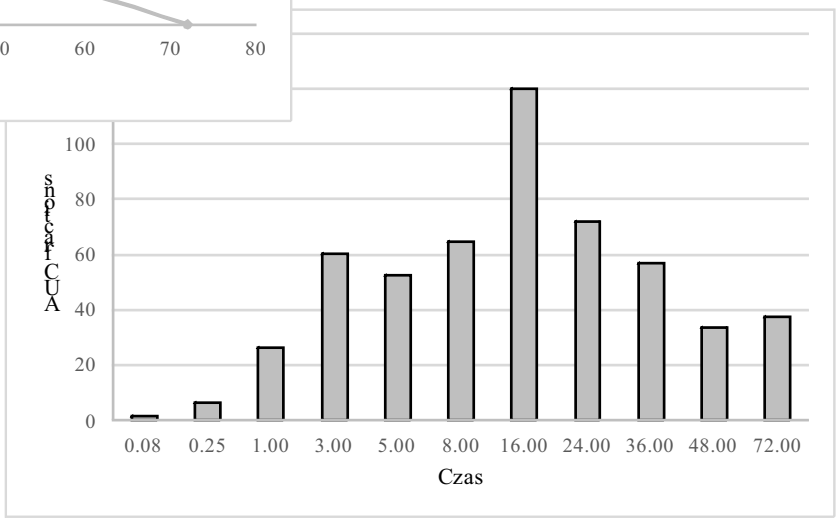
Poniżej przedstawiono przykład obliczeń MRT na podstawie AUC oraz AUMC w dwóch wersjach wraz z polem resztkowym oraz bez pola resztkowego dla danych reprezentujących model jednokompartmentowy.

T	C	AUC	AUMC	MRT	Kel
0.00	0.00	0.00	0.00	331.72	
0.0833	38.20	1.59	0.13		
0.25	37.50	6.31	1.05		
1	32.83	26.37	15.83		
3	27.33	60.16	114.82		
5	25.18	52.51	207.89		
8	18.00	64.77	404.85		
16	12.00	120.00	1344.00		
24	6.00	72.00	1344.00		
36	3.50	57.00	1620.00		1.253
48	2.12	33.72	1366.56		0.751
72	1.00	37.44	2085.12	200.16	0.000
tlast-infinity		29.15	2949.07		
					0.0343

0-t		
531.88	8504.25	15.99
0-infinity		
561.03	11453.32	20.41

kel - nachylenie obliczone dla kolumn T oraz Ln(X)





Pochodne MRT MAT i MTT

Obliczenia farmakokinetyczne prowadzące do opisania wartości MRT, MTT, MAT,VRT, CVRT pozwalają w sposób statystyczny zilustrować przebieg procesów farmakokinetycznych. Pozwalają niejednokrotnie obiektywnie ocenić jakość obliczeń przeprowadzonych przy użyciu innych modeli. Kolejnymi pochodnymi MRT są wariancja tego parametru VRT i współczynnik wariancji średniego czasu przebywania leku w organizmie CVRT. CVRT jest pochodną dającą obraz stopnia rozproszenia oraz postępu dystrybucji leku w organizmie.

$$\mathbf{VRT = (AUMC / AUC) - MRT^2}$$

$$\mathbf{CVRT = \sqrt{VRT} / MRT}$$

Parametrem bazującym także na teorii momentów statystycznych jest względny współczynnik rozproszenia CV^2(ang.: *Relative Dispersion; Normalized Variance; VM*^{2} *- Dispersion Ratio*). Współczynnik ten dla modelu jednorodnego i wykazującego znaczną homogenność przybiera wartość bliską 1.

$$\mathbf{CV^2 = VRT / MRT^2}$$

Wartość odchylenia od jedności świadczy w tym wypadku o złożonym charakterze procesów farmakokinetycznych w obrębie badanego modelu (Weiss M. 1999; Yano Y. i wsp. 2001). Kolejnym parametrem jest względne zakrzywienie dla badanego modelu CS^3(ang.: *Relative Skewness*) które można obliczyć znając zakrzywienie dystrybucji SRT (ang.: *Skewness of Distribution*).

$$\mathbf{SRT = \{2 + [3 \times (CV^2 - 1) + (9/5) \times (CV^2 - 1)^2]\} \times MRT^3}$$

$$\mathbf{CS^3 = SRT / MRT^3}$$

Parametrem wywodzącym się z teorii momentów statystycznych jest także średnia liczba obecnych w przestrzeni kinetycznej cząsteczek leku - MRN (ang.: *Mean Residence Number*). MRN jest parametrem który opisuje średnią liczbę (krotność), wejść cząsteczek leku do danej przestrzeni kinetycznej (Schoenwald R.D. 2002).

$$\mathbf{MRN = MRT / MTT}$$

lub:

$$\mathbf{MRN = (1 / k_{10}) / (1 / k_{21})}$$

stąd:

$$\mathbf{MRN = k_{21} / k_{10}}$$

Znając podstawowe wartości stałych szybkości można obliczyć liczbę kolejnych pasaży cząsteczki leku pomiędzy łożyskiem naczyniowym a przestrzenią tkankową (Toutain P.L. i wsp 1997):

$$\mathbf{MRN = (k_{21} + k_{31} + ...) / k_{10}}$$

$$\mathbf{MRN_{(P)} = MRN_{(T)} + 1}$$

MRN(P) - MRN dla krwi
MRN(T) - MRN dla tkanek
MTT - średni czas przechodzenia cząsteczki przez przestrzeń kinetyczną

Średni czas przechodzenia leku przez organizm MTT (ang.: *Mean Transit Time*)

Średni czas przechodzenia leku przez organizm; średni czas transportu - MTT (ang.: *Mean Transit Time*) opisuje stopień powinowactwa przestrzeni kinetycznej do leku jaki został do niej wprowadzony. Parametr ten jest pochodną MRT. Zjawiska fizykochemiczne o największym znaczeniu w kształtowaniu tego parametru to zjawiska transportu. W fazie wchłaniania leku na MTT duże znaczenie ma dostępność biologiczna leku. Już w momencie wchłaniania kształtuje ona wartość średniego czasu przechodzenia leku przez organizm. Na poziomie tkankowym o zachowaniu cząsteczek leku z punktu widzenia statystycznego opisu zjawisk PK decydują procesy (Weiss M., Roberts M.S. 1996):

- dyfuzji leku we wszystkich kierunkach (ang.: *Radial Diffusion*)
- transportu przez śródbłonki naczyń
- rozproszenie cząsteczek leku (ang.: *Convective Dispersion*)
- szybkość przepływu krwi lub chłonki
- objętość w której transportowany jest lek

Ich wpływ na MTT kształtuje między innymi stopień ukrwienia tkanek. W przypadku podania pozanaczyniowego MTT jako pochodna MRT jest sumą MAT i MRT.

$$\mathbf{MTT = MAT + MRT}$$

Natomiast dla podania donaczyniowego:

$$\mathbf{MRT = MTT}$$

Stąd dla podania donaczyniowego spełniona jest zależność:

$$\mathbf{AUMC / AUC = MTT = MRT + MAT}$$

MRT jest opisywany często jako suma pojedynczych MTT z różnych obszarów dyspozycji leku w organizmie.

$$\mathbf{MRT = \Sigma\ MTT_n}$$

Jednak średni czas transportu leku nie jest tym samym zjawiskiem co średni czas przebywania leku w określonej przestrzeni. Średni czas transportu i przechodzenia leku MTT wiąże się zwykle z szybkością przepływu krwi w obrębie określonej przestrzeni, natomiast MRT wiąże się z klirensem analizowanej przestrzeni stąd:

Średni czas przechodzenia leku przez łożysko naczyniowe:

$$\mathbf{MTT_{(P)} = 1 / k_{10}}$$

$$\mathbf{MTT_{(P)} = 1 / (k_{10} + k_{12} + k_{13} + ...)}$$

Średni czas przechodzenia leku przez tkanki:

$$\mathbf{MTT_{(T)} = 1 / k_{21}}$$

$$\mathbf{MTT_{(T)} = k_{12} / (k_{21} \times k_{10})}$$

k10 - stała szybkości eliminacji leku z łożyska naczyniowego
k12 - stała szybkości przechodzenia leku z łożyska naczyniowego do tkanek
k21 - stała szybkości przechodzenia leku z tkanek do łożyska naczyniowego

MTT można obliczyć nie tylko dla całego organizmu ale także w stosunku do pojedynczego organu (Weiss M., Roberts M.S. 1996). Wyniki takich obliczeń są szczególnie przydatne przy obliczaniu MTT dla organów nie posiadających funkcji eliminacyjnych i metabolicznych (Upton R.N., Doolette D.J. 2002). Szczególne znaczenie takich obliczeń, wynika z zastosowania ich miedzy innymi w symulacjach PK/PD. Punktem wyjścia do tego rodzaju obliczeń jest uzyskanie wartości pól powierzchni leku jaki dostaje się do organu AUC(in) i jaki jest z organu usuwany AUC(out). Transformacja danych C-T pozwala na obliczenie odpowiednich wartości AUMC(in) oraz AUMC(out). To z kolei zapewnia obliczenie odpowiednich wartości MRT(in) oraz MRT(out). Stąd jeżeli:

$$\mathbf{MRT_{(in)} = AUMC_{(in)} / AUC_{(in)}} \qquad \text{lub} \qquad \mathbf{MRT_{(out)} = AUMC_{(out)} / AUC_{(out)}}$$

To MTT organu jest równe: $\mathbf{MTT_{(org)} = MRT_{(in)} + MRT_{(out)}}$

Jeżeli do dyspozycji jest pole powierzchni pod krzywą ilustrującą stan równowagi stężeń (C(avg)) wywołany wlewem leku do organu to średni czas przechodzenia leku przez organ może ilustrować formuła (Rutland M. 2003):

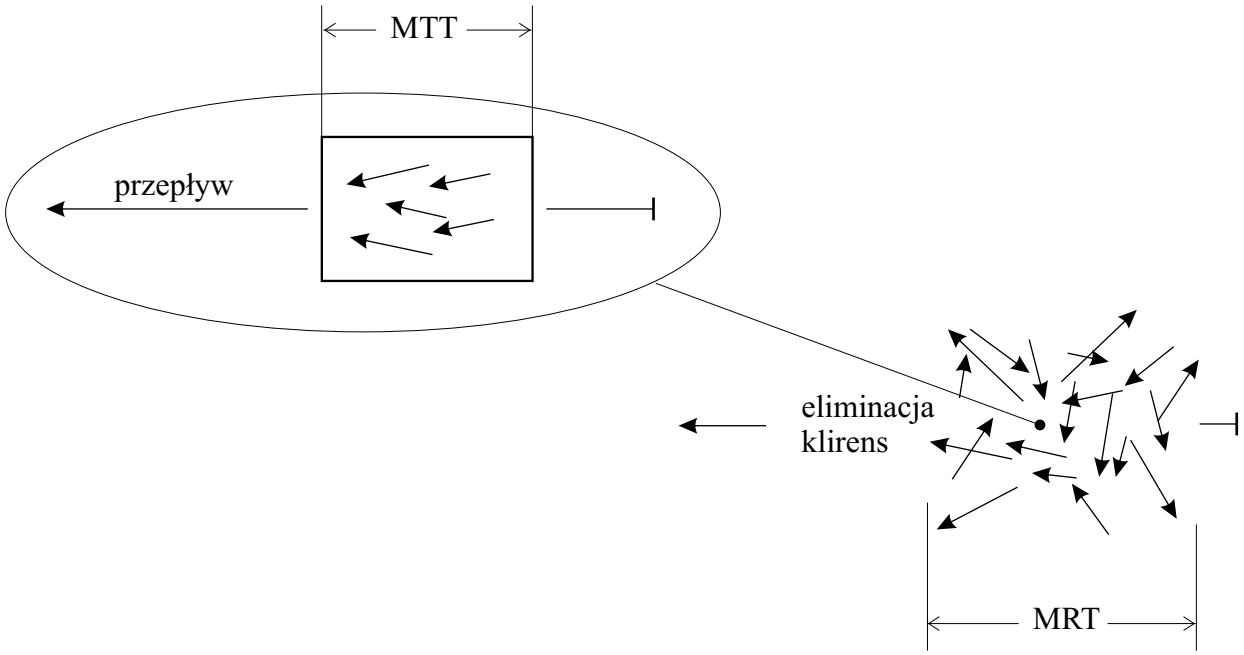
$$\mathbf{MTT = AUC / C_{(avg)}}$$

W przypadku łożyska naczyniowego wartość MTT dla krwi lub osocza obliczyć można korzystając z formuły:

$$\mathbf{MTT_{(P)} = V_{(P)} / Q}$$

I odpowiednio dla całego organizmu: $\mathbf{MTT_{(P)} = [V_{(P)} + V_{(T)}] / Q}$

V(P) - objętość krwi
V(T) - objętość dystrybucji leku w obrębie tkanek
Q - przepływ krwi



Ryc. Różnica między mikroskalą MTT a makroskalą MRT.

Jeżeli uznać MTT za parametr który relacjonuje jednorodność procesów dyspozycji leku w organizmie, to formuła ta może przybrać postać rozbudowaną o objętość innych przestrzeni kinetycznych.

$$\mathbf{MTT_{(P)} = (V_{(P)} + V_{(T)}) / Q}$$

V(T) - objętość tkanek

Wartość MTT dla tkanek wyraża również zależność pomiędzy MRT i MTT dla tkanek i krwi krążącej w łożysku naczyniowym (Schoenwald R.D. 2002). Stąd zależność:

$$\mathbf{MTT_{(T)} = (MRT_{(T)} - MRT_{(P)}) / (MRT_{(P)} / MTT_{(P)} - 1)}$$

stąd:

$$\mathbf{MTT_{(T)} = AUMDC / AUDC}$$

$$\mathbf{MTT = MRT / MRN}$$

AUMDC - pole powierzchni pierwszego momentu krzywej dystrybucyjnej
AUDC - pole powierzchni pod krzywą dystrybucyjną

Znając MTT oraz wariancję MTT czyli VTT można obliczyć względny współczynnik rozproszenia CV^2 (ang.: *Relative Dispersion; Normalized Variance; VM^2 - Dispersion Ratio*). Podobnie jak ma to miejsc w przypadku MRT .

$$\mathbf{CV^2 = VTT / MTT^2}$$

Średni czas wchłaniania leku - MAT

MAT (ang.: *Mean Absorption Time*; *Mean Arrival Time*) jest parametrem farmakokinetycznym który pozwala między innymi na porównanie wartości średniego czasu przebywania leku w organizmie dla podania donaczyniowego i pozanaczyniowego. Teoria momentów statystycznych opisuje ten parametr równaniami typowymi dla pochodnych MRT. Definiuje się go jako średni czas jaki potrzebują wszystkie molekuły leku na wejście do danej przestrzeni kinetycznej. Dopełnia więc informacje płynące z wartości obliczonej dostępności biologicznej (F). Pojęcie *mean absorption time* i *mean arrival time* można zrównać jednak tylko wtedy gdy 100 % leku uległo wchłonięciu. W praktyce obydwa pojęcia rozdziela się i w przypadku gdy MAT ma dotyczyć wchłaniania z miejsca podania leku nie musi mieć wartości równej *mean arrival time* (Svensson C.K. 2001). Wartość ta umożliwia porównanie średniego czasu rozpadu leków w zależności od postaci farmaceutycznej. Dla procesów pierwszego rzędu jest równy odwrotności stałej szybkości dla procesów wchłaniania - γ, ka (Gibaldi M., Perrier D. 1982). Parametr ten jest więc swoistym odpowiednikiem stałej szybkości wchłaniania.

$$\mathbf{MAT = 1 / k_a}$$

ka - stała szybkości wchłaniania

Jeżeli podanie leku dotyczy postaci stałych które dopiero w organizmie (przewód pokarmowy) ulegają rozpuszczaniu i uwalnianiu przed fazą wchłaniania to składową MIT jest MDT. MIT (ang.: *Mean Input Time*) jest pojęciem równoważnym MAT jeżeli postać leku nie wymaga w organizmie fazy rozpuszczania aby ulec wchłanianiu. W takim przypadku MIT = MAT. Jeżeli znany jest średni czas rozpuszczania leku - MdT (ang.: *Mean Dissolution Time*) wtedy równanie przyjmuje postać:

$$\mathbf{MIT = MdT + MAT}$$

Wyrażenie MDT można zastąpić parametrem tlag który opisuje opóźnienie wchłaniania wynikające z czasu potrzebnego na rozpad uwolnienie i rozpuszczenie substancji czynnej z postaci leku.

$$\mathbf{MIT = t_{lag} + MAT}$$

W procesach zerowego rzędu gdzie czas trwania absorpcji leku równy jest T wartość MAT jest równa :

$$\mathbf{MAT = T / 2}$$

T - czas trwania wlewu

MAT jest wyznacznikiem procesów absorpcji a wartość MAT pozwala na obliczenie wartości okresu półtrwania dla tej fazy farmakokinetycznej.

$$\mathbf{MAT = MRT_{p.o.} - MRT_{i.v.}}$$

Teoria momentów statystycznych pozwala na opisanie dodatkowych parametrów charakteryzujących proces wchłaniania. Są to liczba absorpcji - AN (ang.: *Absorption Number*) oraz liczba rozpuszczalności - DN (ang.: *Dissolution Nuber*). AN wyraża stosunek MTT do MAT i przy krótkich czasach absorpcji stosunek obu parametrów jest bliski jedności. DN wyraża stosunek MTT do średniego czasu uwalniania MDT (Hendriksen B.A. i wsp 2002).

Dostępność biologiczna - BA

Dostępność biologiczna leku - F; BA (ang.: *Bioavailability*; *Availability*; niem.: *Bioverfugbarkeit*, *Verfugbarkeit*) jest jednym z podstawowych parametrów farmakokinetycznych za pomocą którego można porównywać wartość dawki jaką znajdzie się w osoczu po podaniu do ustroju różnymi drogami. Jest parametrem określającym jakość i stopień zaawansowania technologicznego postaci leku. Dla substancji podawanych drogą donaczyniową dostępność biologiczna wynosi 100 %, lub w liczbach bezwzględnych równa jest 1. Oznacza to że 100 % podanej dawki trafiło do krwi (Bourne D.W.A. 1995-1999). Definicja ta nie obejmuje leków typu pro-drug. Dostępność biologiczną substancji opisuje pole powierzchni pod krzywą - AUC oraz jego podstawowe cechy takie jak tmax i Cmax. Różnice wartości F najczęściej określa się dla dwóch różnych leków podanych tą samą lub różnymi drogami podania, lub dwóch preparatów leczniczych różnych producentów. Aby określić tą różnicę oblicza się dostępność biologiczną leku. Wartość dostępności biologicznej w przypadku pozanaczyniowych dróg podania zwykle różni się od wartości uzyskanej po podaniu drogą dożylną. Wynikiem porównania dostępności biologicznej dla pozanaczyniowej i dożylnej drogi podania jest absolutna - bezwzględna dostępność biologiczna (Janicki S. i wsp. 2001). Inna droga podania zmienia wartość stężenia maksymalnego uzyskanego po podaniu leku, powoduje zmodyfikowanie także wartości pozostałych parametrów farmakokinetycznych a przede wszystkim wartości pola powierzchni pod krzywą. Konsekwencją tego najczęściej jest zmiana profilu dawkowania leku związana ze zmianą dostępności. Dostępność biologiczna leku pozwala na porównanie wartości charakteryzujących w sposób matematyczny przebieg i wartości pól powierzchni pod krzywymi C-T w celu przeanalizowania dwóch różnych przypadków. Określa więc ilościowo różnicę w wartości wchłoniętej dawki. Jeżeli obiektem porównania są dwa podania pozanaczyniowe np. domięśniowe i doustne to wynikiem jest obliczenie tzw. dostępności biologicznej względnej. Znaczny wpływ na dostępność biologiczną leku ma postać leku i technologia użyta do jej przygotowania. Dla różnego rodzaju postaci leków różne czynniki technologiczne mają znaczny wpływ na dostępność biologiczną leku.

roztwory	- lepkość, pH, promotory wchłaniania
zawiesiny	- wielkość cząsteczek, mikronizacja
maści	- skład podłoża, czas kontaktu
wkładki	- prędkość dyfuzji
tabletki	- czas rozpadu, czas uwalniania ,"okienka wchłaniania", buforowanie

Wynikiem przeprowadzonych w analizie dostępności biologicznej porównań jest procent wchłoniętej dawki F. W obliczeniach parametrów farmakokinetycznych w których rola dawki ma kluczowy charakter końcowy wynik przedstawiany jest zwykle w zależności od F (jeżeli nie wzięto jej pod uwagę w wyjściowej formule). Stąd często można się spotkać z zapisem wartości klirensu lub objętości dystrybucji dla pozanaczyniowych dróg podania leku w formie Vd x F = ... czy Cl x F = ...

Vd = 2.5 L
F = 0.86 (86 %)

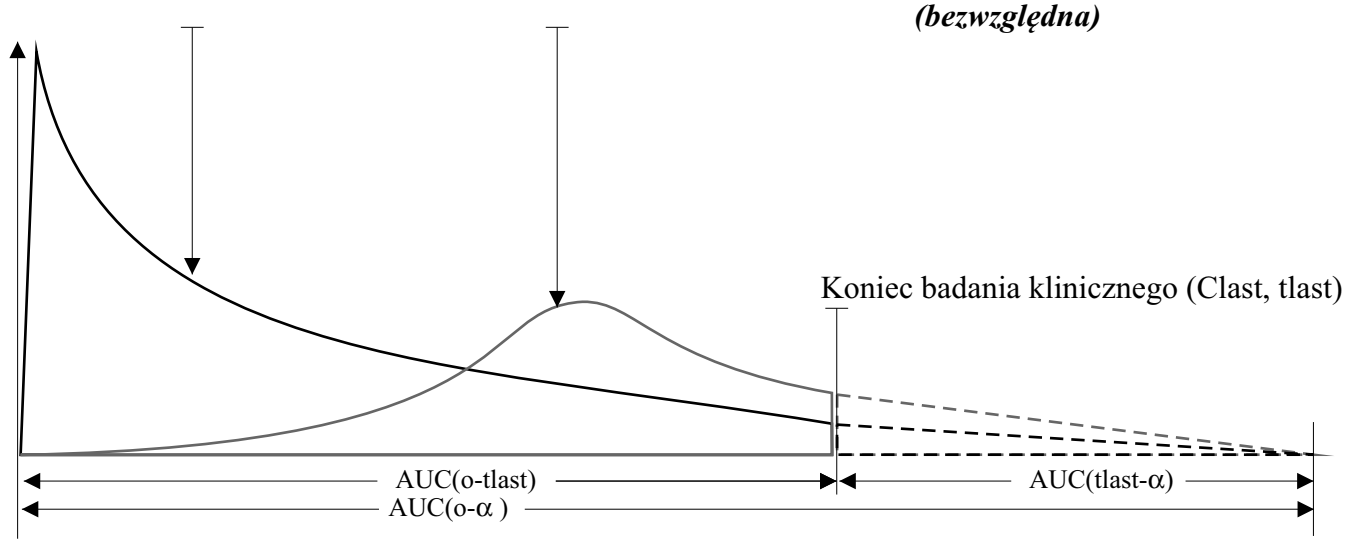
Vd x F = 2.5 x 0.86 = 2.15 L

Obliczenie wartości dostępności biologicznej leku najczęściej ogranicza się do porównania wartości pól powierzchni pod krzywymi (AUC) uzyskanymi dla dwóch dróg podania leku, lub dla dwóch preparatów leczniczych. W obliczeniach takich uwzględniona jest wartość dawki leku (D) oraz masa osobnika. Obliczenia takie mogą jednak być obarczone błędem wynikającym z ewentualnych różnic w eliminacji porównywanych leków z organizmu oraz rzędowości obserwowanych procesów kinetycznych. W takim wypadku formuła pozwalająca obliczyć wartość dostępności biologicznej leku ujmuje także wartość biologicznego okresu półtrwania - $t1/2\beta$. Precyzyjnym narzędziem w analizie dostępności biologicznej leku staje się w tym wypadku wartość klirensu ciała.

Preparat A Preparat B ***Biodostępność porównawcza*** (różne dawki)

Preparat A Preparat B ***Biodostępność względna*** (równe dawki)

Podanie donaczyniowe Podanie pozanaczyniowe ***Biodostępność absolutna (bezwzględna)*** (równe dawki)



Rys. Różnice w przebiegu i wartości pola powierzchni pod krzywą w zależności od drogi podania leku.

Uwzględnia on bowiem nie tylko wiadomości informujące o przebiegu i charakterystyce eliminacji leku z organizmu lecz odnosi się do objętości w jakiej lek został rozmieszczony - objętości dystrybucji. Pozwala to w znacznym stopniu niwelować ewentualne błędy obliczeniowe związane z różnicami w masie ciała sprawności procesów eliminacji w nerkach lub w wątrobie, oraz różnic w wartości szybkości eliminacji. Metody i wartości uzyskanych obliczeń ściśle uzależnione są od metod jakie przyjęto wcześniej do obliczania pól powierzchni pod krzywymi (AUC). Jeżeli pola powierzchni pod krzywymi obliczane były kilkoma różnymi metodami, obiektem porównania powinny być odpowiadające sobie pary danych. Szczególnej kontroli w eksperymencie opisującym dostępność biologiczną oparte jedynie na porównaniu wartości AUC, poddać należy wartości pól resztkowych. Obliczenia dostępności biologicznej mogą być zależne od innych parametrów farmakokinetycznych na przykład klirensu (De Mey C. 2000):

Zależne od AUC **$F = (AUC_{p.o.} \times D_{i.v.}) / (AUC_{i.v.} \times D_{p.o.})$**

Zależne od AUC_{rem} **$F = (AUC_{p.o.} \times D_{i.v.} \times AUC_{rem.p.o.}) / (AUC_{i.v.} \times D_{p.o.} \times AUC_{rem.i.v.})$**

Zależne od β **$F = (AUC_{p.o.} \times D_{i.v.} \times t_{1/2\beta i.v.}) / (AUC_{i.v.} \times D_{p.o.} \times t_{1/2\beta p.o.})$**

Zależne od $Cl_{(b)}$ **$F = (AUC_{p.o.} \times D_{i.v.} \times Cl_{(b)i.v.}) / (AUC_{i.v.} \times D_{p.o.} \times Cl_{(b)p.o.})$**

AUCi.v. - AUC po podaniu donaczyniowym leku (dożylnym)
AUCp.o. - AUC po podaniu pozanaczyniowym leku (doustnym)
AUCrem.i.v. - AUC resztkowe po podaniu donaczyniowym leku (dożylnym) (%)
AUCrem.p.o. - AUC resztkowe po podaniu pozanaczyniowym leku (doustnym) (%)
Di.v. - dawka dla podania donaczyniowego (dożylnego)
Dp.o. - dawka dla podania pozanaczyniowego (doustnego)
$t_{1/2\beta i.v.}$ - okres półtrwania leku dla podania donaczyniowego

t1/2βp.o. - okres półtrwania leku dla podania pozanaczyniowego
Cl(b)i.v. - klirens leku dla podania donaczyniowego
Cl(b)p.o. - klirens okres półtrwania leku dla podania pozanaczyniowego

Uwzględnianie procentowej wartości resztkowych pól powierzchni gwarantuje dwustronną ocenę wyniku badań dotyczącą zarówno właściwości kinetycznych leku jak i jakości przeprowadzonych analiz. Badanie biodostępności oraz porównywanie wartości tego parametru dla dwóch leków często stanowi punkt wyjścia do optymalizacji farmakokinetycznej postaci leku w fazie jego projektowania. Wykorzystanie powyższych równań daje możliwość analizowania wpływu różnych czynników na kinetykę leku. Różnice te często dość subtelne, ilustruje wynik porównania złożony nie tylko z udziału dawek oraz uzyskanych za ich sprawą wartości pól powierzchni pod krzywymi C-T. Umiejscowienie we wzorach wartości stałej szybkości eliminacji (w postaci t1/2β) lub średniego czasu obecności leku w organizmie ilustruje wpływ tego parametru na wynik porównania. Wynik taki może zostać w tym przypadku opisany na podstawie założeń matematycznych lub farmakostatystycznych. Umożliwia to kontrolę wartości uzyskanych wyników i właściwą interpretację obliczeń. Udział procesów eliminacji i ich wpływ na wynik badań porównawczych oraz biodostępności w precyzyjny sposób opisuje wartość klirensu totalnego. Wartość ta odnosi się nie tylko do stałej szybkości eliminacji ale opisuje szereg parametrów fizjologicznych związanych z metabolizmem i wydalaniem leku dla określonej objętości dystrybucji. Wymiar tak przeprowadzonej analizy stanowi o obiektywnej wartości obliczonych wskaźników. Ilustruje bowiem procesy kinetyczne właściwe jednostkom umożliwiając jednocześnie precyzyjne ich porównanie. Dwoma najważniejszymi procesami które modulują dostępność biologiczną jest wchłanianie i metabolizm. Metabolizm najczęściej definiowany jest parametrem takim jak klirens. Z kolei dostępność biologiczna wraz z okresem półtrwania definiuje dawkowanie leku. Sama dostępność biologiczna pozwala określić moc dawki - wielkość dawki. Natomiast okres półtrwania w fazie eliminacji pozwala zdefiniować częstotliwość dawkowania. Obie wartości - dostępność biologiczną i okres półtrwania wiąże bezpośrednio co najmniej jeden parametr - objętość dystrybucji. Badania porównawcze prowadzone na podstawie parametrów farmakokinetycznych dają możliwość analizowania złożonych procesów kinetycznych w sposób dynamiczny. Klasyczny podział faz farmakokinetycznych ilustrowany akronimem LADME zwraca uwagę na granice pomiędzy poszczególnymi procesami jednak wiadomo że większość z nich zachodzi jednocześnie. Badania porównawcze winny więc łączyć w sposób logiczny parametry kinetyczne opisujące procesy które mogą jednocześnie zachodzić w organizmie i modyfikować wzajemnie swój przebieg. Obliczenia dostępności biologicznej absolutnej najczęściej uwzględniają współczynniki ekstrakcji charakteryzujące organy lub tkanki przez które dyfunduje lek.

$$F = 1 - ER$$

$$F = F_{(abs)} \times (1 - ER_{(GIT)}) \times (1 - ER_{(h)})$$

GIT - przewód pokarmowy (ang.: *Gastro Intestinal Tract*)
ER - współczynnik ekstrakcji (ang.: *Extraction Ratio*)

Dostępność biologiczną wyraża więc wypadkowa stopnia ekstrakcji wszystkich tkanek jakie obejmuje faza dystrybucji leku (Ito K. i wsp. 1998). Precyzyjne obliczenia dotyczące wpływu poszczególnych narządów na dostępność biologiczną gwarantują między innymi modele fizjologiczne. Znaczny postęp w tym kierunku zapewniły liczne techniki badań *in vitro*. Ogól czynników decydujących o wartości dostępności biologicznej leku można zawęzić do kilku głównych kierunków:

- szybkość i stopień wchłaniania z miejsca podania
- rola P-gp oraz metabolizmu jelitowego (metabolizm w miejscu podania)
- silne wiązanie z wybranymi tkankami
- metabolizm wątrobowy

- krążenie wątroba - żółć- jelita - krew
- wchłanianie zwrotne w nerkach
- parametry fizjochemiczne leku

W chwili obecnej już we wczesnym etapie badań nad parametrami fizjochemicznymi leków dokonywana jest wstępna selekcja związków o dużej dostępności biologicznej (Veber D.F. i wsp. 2002). Tradycyjnym parametrem jaki stosowano w tego typu obliczeniach była lipofilność leku. Wykazano jednak że znacznie wyższą korelację z wartością dostępności biologicznej wykazuje wartość pola polarnej powierzchni cząsteczki PSA (ang.: *Polar Surface Area*). Przełom w metodach wczesnej fazy badań nad nowymi lekami zagwarantowało sformułowanie reguły pięciu przez Lipińskiego. Dostępność biologiczna leku jest również wskaźnikiem różnic obserwowanych w grupie której lek został podany. Podstawą dla różnicowania wyniku dostępności biologicznej są różnice w fizjologii wchłaniania. Wynikają one zwykle z różnicy wieku, płci, gatunku a także rasy (Grabowski T. 2001). Problem ten pojawia się zarówno w badaniach przeprowadzanych w medycynie jak i w weterynarii. W badaniach określających dostępność biologiczną leku pojawia się często problem pozornie większej dostępności po podaniu drogą na przykład doustną niż po podaniu tej samej substancji leczniczej drogą dożylną - SBA (ang.: *Suprabioavailability*). Przyczyny takiego stanu zwykle nie są łatwe do uchwycenia. Podstawowym powodem jest zwykle błąd,

- błąd w fazie klinicznej
- błąd w fazie bioanalitycznej
- błąd w części obliczeniowej

Miejscowa dostępność biologiczna - TBA (ang.: *Topical Bioavailability*). Parametr ten pozwala rozpatrywać stopień w jakim substancja lecznicza jest dostępna w przypadku leków o wchłanianiu miejscowym na przykład maści.

diazepam	100,0	bumetanide	81,0	etoposide	52,0
glimepiride	100,0	lansoprazole	81,0	meperidine	52,0
hydroxyurea	100,0	trazodone	81,0	metformin	52,0
ketorolac	100,0	anastrozole	80,0	ranitidine	52,0
letrozole	100,0	chloroquine	80,0	nortriptyline	51,0
levetiracetam	100,0	citalopram	80,0	triamterene	51,0
phenobarbital	100,0	ethanol	80,0	atropine	50,0
pseudoephedrine	100,0	felbamate	80,0	codeine	50,0
sulfamethoxazole	100,0	ibuprofen	80,0	fentanyl	50,0
tamsulosin	100,0	misoprostol	80,0	mirtazapine	50,0
valproic acid	100,0	modafinil	80,0	nelfinavir	50,0
levofloxacin	99,0	prednisone	80,0	nifedipine	50,0
metronidazole	99,0	oseltamivir	79,0	pimozide	50,0
naproxen	99,0	ethambutol	77,0	amiloride	49,0
rosiglitazone	99,0	tetracycline	77,0	amitriptylline	48,0
clonazepam	98,0	metoclopramide	76,0	cefixime	47,0
gemfibrozil	98,0	quinine	76,0	rizatriptan	47,0
indomethacine	98,0	amlodipine	74,0	amiodarone	46,0
lamotrigine	97,6	cyclophosphamide	74,0	ribavirin	45,0
minocycline	97,0	diphenhydramin	72,0	midazolam	44,0
ofloxacin	97,0	zolpidem	72,0	triazolam	44,0
dofetilide	96,0	furosemide	71,0	candesartan	42,0
gatifloxacin	96,0	hydrochorothiazide	71,0	entacapone	42,0
sulfisoxazole	96,0	melphalan	71,0	hydromorphone	42,0
theophylline	96,0	amantadine	70,0	imipramine	42,0
clofibrate	95,0	baclofen	70,0	chlorpheniramine	41,0
clonidine	95,0	busulfan	70,0	enalapril	41,0
glipizide	95,0	butorphanol	70,0	nalmefene	40,0
amoxicillin	93,0	carbamazepine	70,0	didanosine	38,0
dapsone	93,0	cetirizine	70,0	diltiazem	38,0
doxycycline	93,0	digoxin	70,0	metoprolol	38,0
isosorbide 5-mononitrate	93,0	flecainide	70,0	phenylephrine	38,0
lorazepam	93,0	irbesartan	70,0	sildenafil	38,0
nevirapine	93,0	methotrexate	70,0	losartan	35,8
rofecoxib	93,0	topiramate	70,0	cisapride	35,0
warfarin	93,0	acetylsalicylic acid	68,0	erythromycin	35,0
flurbiprofen	92,0	prazosin	68,0	lidocaine	35,0
ifosfamide	92,0	risperidone	66,0	nabumetone	35,0
methadone	92,0	dicloxacillin	65,0	azithromycin	34,0
clorazepate	91,0	indinavir	65,0	cefuroxime	32,0
cefazolin	90,0	chlorthalidone	64,0	chlorpromazine	32,0
cephalexin	90,0	calcitriol	63,0	topotecan	32,0
chlorpropamide	90,0	finasteride	63,0	zaleplon	31,0
fluconazole	90,0	trimethoprim	63,0	doxepin	30,0
phenytoin	90,0	zidovudine	63,0	nicotine	30,0
pramipexole	90,0	montelukast	62,0	fluvastatin	29,0
tiagabine	90,0	ondansetron	62,0	5-fluorouracil	28,0
tocainide	89,0	azathioprine	60,0	cyclosporin	28,0
betaxolol	89,0	cimetidine	60,0	idarubicin	28,0
acetaminophen	88,0	ciprofloxacin	60,0	venlafaxine	27,0
alprazolam	88,0	gabapentin	60,0	propanolol	26,0
zalcitabine	88,0	granisetron	60,0	lisinopril	25,0
chlorambucil	87,0	haloperidol	60,0	tacrolimus	25,0
clindamycin	87,0	olanzapine	60,0	morphine	24,0
mexiletine	87,0	tolcapone	60,0	atovaquone	23,0
nitrofurantoin	87,0	repaglinide	56,0	valsartan	23,0
lamivudine	86,0	clarithromycin	55,0	acyclovir	22,0
moxifloxacin	86,0	clozapine	55,0	isosorbide dinitrate	22,0
delavirdine	85,0	itraconazole	55,0	cytarabine	20,0
tolbutamide	85,0	ropinirole	55,0	isradipine	19,0
abacavir	83,0	verapamil	55,0	dalfopristin	18,7
disopyramide	83,0	diclofenac	54,0	benazepril	18,0
procainamide	83,0	allopurinol	53,0	nicardipine	18,0
methylprednisolone	82,0	fluvoxamine	53,0	pravastatin	18,0
stavudine	82,0	omeprazole	53,0		

hydralazine	16,0	medroxyprogesterone	10,0	simvastatin	5,0
felodipine	15,0	quetiapine	9,0	buspirone	3,9
sirolimus	15,0	oxybutynin	7,0	fluphenazine	2,7
sumatriptan	14,0	amphotericin b	5,0	naloxone	2,0
atorvastatin	12,0	cidofovir	5,0	raloxifene	2,0
Mercaptopurine	12,0	doxorubicin	5,0	zanamivir	2,0
nalbuphine	11,0	Lovastatin	5,0	nitroglycerin	1,0
				alendronate	0,7

Rys. Przybliżone wartości dostępności biologicznej wybranych leków (%).

Naddostępność biologiczna SBA (ang.: *Suprabioavailability*)

SBA jest zjawiskiem polegającym na odnotowaniu wyższych wartości AUC w badaniu wpływu danej drogi podania na dostępność niż po podaniu tej samej substancji czynnej drogą dożylną. W literaturze odnotowuje się coraz więcej takich przypadków analizy PK gdzie po podaniu równych dawek leku drogą dożylną i doustną AUC po podaniu doustnym leku jest wyższe niż po podaniu parenteralnym. Zjawisko to w dokumentach EMEA opisano jako *suprabioavailability* co można tłumaczyć jako naddostępność biologiczną leku. Na królikach wykazano wyższe AUC apomorfiny po podaniu s.c. niż po podaniu i.v.. SBC wykazano w wielu badaniach PK. Pozornie zjawisko takie nie powinno mieć nigdy miejsca ponieważ podanie leku bezpośrednio do łożyska krwi w postaci iniekcji teoretycznie zawsze dostarcza maksymalną liczbę cząsteczek leku do krwi. Przyczyną odnotowania SBA często są różnego typu błędy metodyczne w projektowaniu badania w fazie klinicznej, błędy analizy chemicznej pomiaru stężenia leku w tkankach itd.. Jednym z większych problemów w badaniach farmakokinetycznych leku jest często brak jednoczesnej analizy (HPLC) stężenia metabolitu jeżeli nie jest to koniecznym wymogiem (badania biorównoważności). Metabolizm leku polegać może na wytworzeniu między innymi (produktami) metabolitu nieznacznie różniącego się od związku macierzystego pod względem budowy chemicznej oraz takich właściwości jak pH, pKa, LogP. Oznacza to że analityk analizując stężenie leku i nie znając właściwości metabolitów oraz nie sprawdzając ich zachowania w trakcie projektowania metody analitycznej może oznaczać stężenie metabolitu i leku jednocześnie. Jeżeli metabolit różni się od leku nieznacznie pod kątem właściwości chemicznych, oznacza to że w obrazie chromatograficznym będzie uzyskiwać bardzo podobny lub nawet ten sam czas retencji co lek. Efektem takiego stanu może być częściowe przesunięcie - wydłużenie tmax, wzrost Cmax lub uzyskanie kilku punktów narostu stężenia oraz zawyżenie wartości obliczanego AUC.

Niebezpieczeństwo takie dotyczy również metod poddanych rygorystycznym procedurom walidacji. Walidacja metod bioanalitycznych w chwili obecnej nie zakłada testowania metody HPLC pod względem analizy interferencji piku analitu z pikami ewentualnych metabolitów. Największe niebezpieczeństwo popełnienia takiego błędu zachodzi przy stosowaniu mało selektywnych metod detekcji takich jak UV czy DAD. Nie można jednak całkowicie wykluczyć tego typu błędu na detektorach EC i FL. Błąd taki może również dotyczyć detekcji MS/MS, w tym również w trybie MRM.

Dla wielu leków oraz toksyn potwierdzono sytuację w której stężenie metabolitów leku po podaniu doustnym jest znacznie wyższe niż po podaniu dożylnym w tej samej dawce. Tak dzieje się w przypadku kinetyki nafimidonu którego metabolit - alkohol nafimidonowy produkowany jest na poziomie 30% wyższym po podaniu doustnym (szczury),(Graham D.J. i wsp. 1987). Metabolit difenhydraminy - metylodifenhydramina u człowieka wytwarzana jest w stężeniach 65% wyższych po podaniu doustnym niż dożylnym (Blyden G.T. i wsp. 1986). Podobny schemat powtarza się w metabolizmie telitromycyny a także eteru tertbutylowego (Perret C. i wsp. 2002). Przyczyną tego stanu rzeczy może być zjawisko metabolizmu jeszcze w obrębie GIT oraz w wyniku szybszego dostarczenia cząsteczki leku do wątroby z przewodu pokarmowego.

Dodając powyższy mechanizm do błędu popełnionego w fazie analitycznej wystąpienie zjawiska SBA wydaje się być nieuniknione. Jednocześnie nawet jeśli błąd analityczny nie dotyczy sytuacji w której metabolit bezpośrednio wpływa na kształt piku analitu to może dojść do interferencji pomiędzy analitem a metabolitem. Źródłem takich interferencji mogą być również inne składniki osocza których nie zweryfikowała walidacja na przykład tłuszcze lub barwniki żółciowe w analizie PK leku po podaniu pokarmu. Obecne wymogi walidacji metody analitycznej zgodnie z GLP nie ujmują weryfikacji tego typu błędu na etapie projektowania metody badawczej (również wpływu hemolizy w osoczu czy surowicy) .

Błędem w fazie badania klinicznego może być porównanie dwóch dróg podania leku bez sprawdzenia kwestii adhezji cząsteczek leku do powierzchni szkła lub tworzyw sztucznych (polipropylen). Jeżeli roztwór do podania doustnego przygotowany jest w szkle oznacza to ze iniekcja dożylna również powinna odbywać się z użyciem strzykawki szklanej etc..

Przyczyną SBA może być również zastosowanie dwóch różnych odmian krystalicznych leku lub odmiany amorficznej i krystalicznej. Stan fizyczny leku ma bardzo duży wpływ na parametry PK z uwagi na różne właściwości fizykochemiczne tej samej substancji w różnych postaciach fizycznych. Przyczyną wystąpienia SBA w badaniu może być również polimorfizm leku.

Polimorfizm substancji farmakologicznie aktywnych jest zjawiskiem polegającym na zdolności do zmiany stanu fizycznego leku z czasem lub pod wpływem różnych czynników fizycznych, technologicznych itd.. Przykładem leków których farmakokinetyka jest zależna od postaci fizycznej są ritonawir i palmitynian chlormafenikolu. Leki które wykazują polimorfizm mogą przechodzić na przykład z postaci krystalicznej w amorficzną. Przykładem leków silnie polimorficznych są: fenobarbiton, cymetydyna, sulfatiazol, karbamazepina (Morisette S.L. i wsp. 2004). Substancje krystaliczne z reguły są gorzej rozpuszczalne lecz bardziej stabilne. W przypadku substancji amorficznych jest odwrotnie stabilność jest niższa natomiast rozpuszczalność większa. Różnice związane ze stanem fizycznym substancji farmaceutycznej mają znaczny wpływ na wartość parametrów farmakokinetycznych. Najważniejsze parametry substancji zmieniające się wraz z postacią fizyczną leku to:

- objętość molowa
- gęstość
- higroskopijność
- temperatura topnienia
- aktywność termodynamiczna
- stabilność

Różnice związane z zastosowaniem różnych odmian fizycznych leku mogą być przyczyną obserwacji SBA. Substancje w przypadku których potwierdzono wpływ polimorfizmu na zachowanie w postaci leku oraz wpływa na farmakokinetykę leku to między innymi: ranitydyna, ampicylina, ritonawir, palmitynian chlormafenikolu, nowobiocyna, gryzeofulwina, indometacyna, kwas mefenamowy, celokoxib itd. (Chawla G., Bansal A.K. 2004). Substancje czynne w postaci krystalicznej (leki) są zwykle bardziej stabilne lecz mają najczęściej niższą dostępność biologiczną z uwagi na słabszą rozpuszczalność. Substancje czynne w postaci amorficznej są zwykle mniej stabilne lecz mają najczęściej wyższą dostępność biologiczną z uwagi na większą rozpuszczalność. Jeżeli w badaniu dostępności biologicznej absolutnej (dożylna droga podania / parenteralna / te same dawki) zastosowano dwie różne postacie fizyczne leku (krystaliczna / amorficzna) może to skutkować przekroczeniem wartości 100 % dla dostępności po podaniu parenteralnym. Przykładem substancji o dużym zróżnicowaniu kinetyki w zależności od formy krystalicznej lub amorficznej jest ritonawir.

Polimorfizm fizyczny leku (substancja w postaci płatków, kryształków, igiełek, sześcianów etc.)

Przechodzenie w różne postacie polimorficzne mogą indukować same procesy związane z wytworzeniem postaci leku (konwersja polimorficzna). Przykładem zróżnicowanej kinetyki w zależności od odmiany polimorficznej jest palmitynian chloramfenikolu. Stwierdzenie różnic w rozpuszczalności substancji na przykład na przestrzeni czasu może wskazywać na polimorfizm substancji. Brak kontroli, potwierdzenia lub wykluczenia takiego procesu dla zastosowanych w doświadczeniu klinicznym substancji może również prowadzić do błędu we wniosku o wartości dostępności absolutnej. Przykładami substancji w przypadku których polimorfizm indukuje zmiany kinetyki są sól sodowa warfaryny, famotydyna, ranitydyna. Podobnie jak polimorfizm wpływ na analizę PK leku ma obecność kokryształów w postaci krystalicznej leku (ang.: *Co-crystals*).

Zastosowanie substancji leczniczej związanej z różnymi typami cząsteczek (sole/woda) w badaniu klinicznym również może prowadzić do błędnego obliczenia dostępności biologicznej:

solwaty - substancja lecznicza + rozpuszczalnik
hydraty - substancja lecznicza + woda

Różne formy polimorficzne mają największy wpływ na dostępność biologiczną a także wynik badań biorównoważności w przypadku leków o których wchłanianiu decyduje głównie rozpuszczalność (FDA 2004, Pharmaceutical Solid Polymorphism). W przypadku gdy ocenie BE lub BA podlegają różne odmiany polimorficzne leku, pomiędzy którymi istnieją duże różnice w rozpuszczalności. W przypadku długiego czasu rozpadu postaci leku w stosunku do GER stanowi zwiększa to możliwość popełnienia błędu w badaniu

Zaniżona wartość dostępności biologicznej IBA (ang.: *Infrabioavailability*):

Wiele błędów w fazie klinicznej i w fazie analitycznej mogą przyczyniać się do zmniejszenia wartości dostępności biologicznej w stopniu większym niż miałoby to wynikać z rzeczywistych procesów. Jedna z przyczyn może być interferencja (tak jak w przypadku SBA) metabolitów lub innych składowych próbki z pikiem standardu wewnętrznego. Taka interakcja jest jednak łatwa do zidentyfikowania w trakcie analiz - piki IS w próbkach badanych mają pole wyższe niż w próbkach QC.

Dostępność farmaceutyczna (ang.: *Pharmaceutical Availability)* - PA.

Dostępność farmaceutyczna (ang.: *Pharmaceutical Availability*; niem.: *Pharmazeutische Verfugbarkeit*) lub równoważność farmaceutyczna jest pojęciem odnoszącym się do porównania składu i formulacji dwóch leków gotowych. Dwa leki są równoważne farmaceutycznie jeśli posiadają ten sam skład jakościowy i ilościowy zarówno w stosunku do substancji leczniczej jak i substancji pomocniczych. Do pewnego stopnia odzwierciedleniem równoważności farmaceutycznej jest testowanie parametrów uwalniania leku in vitro (ang.: *Dissolution Test*). Parametr ten charakteryzuje ilość substancji leczniczej uwolnionej w określonym przedziale czasu oraz szybkość tego procesu czyli dostępność farmaceutyczną. Szybkość uwalniania leku stanowi ważny parametr farmakokinetyczny opisujący postać leku. Na proces uwalniania leku wpływ ma zarówno czas rozpadu postaci leku umożliwiający uwolnienie leku jak i szybkość rozpuszczania substancji leczniczej. Ten rodzaj dostępności badany jest w praktyce poprzez określanie czasu uwalniania substancji leczniczej w środowisku imitującym środowisko docelowe leku (tabletka - woda lub sztuczny sok żołądkowy). Wynikiem tak przeprowadzonej analizy jest ilościowe oznaczenie ułamka substancji leczniczej jaka została uwolniona do środowiska. Parametrami charakteryzującymi ten proces są pole powierzchni pod krzywą oraz stała szybkości charakteryzująca ten proces. Szybkość z jaką zachodzi uwalnianie substancji leczniczej do środowiska opisuje stała szybkości uwalniania obliczona na podstawie znajomości wartości stężeń leku w roztworze dializacyjnym. Na tym etapie badań postaci leku określa się dwa ważne parametry kinetyczne - czas rozpadu - degradacji i szybkość uwalniania leku. Badania dostępności farmaceutycznej w przypadku niektórych leków wykazywać dużą korelację ze stężeniem leku osiąganym w osoczu.

Czynniki wpływające na zwiększenie dostępności farmaceutycznej:

- modyfikacje chemiczne i przeprowadzanie związku do łatwiej rozpuszczalnych pochodnych
- dobór odmiany krystalograficznej
- ułatwiona solwatacja
- maksymalne rozdrobnienie substancji trudno rozpuszczalnych
- solubilizacja
- substancje zmniejszające napięcie powierzchniowe
- buforowanie roztworu i "cofanie" dysocjacji leku, zmniejszanie lepkości środowiska
- zwiększanie powierzchni leku na syntetycznych nośnikach

Czynniki wpływające na zmniejszenie dostępności farmaceutycznej:

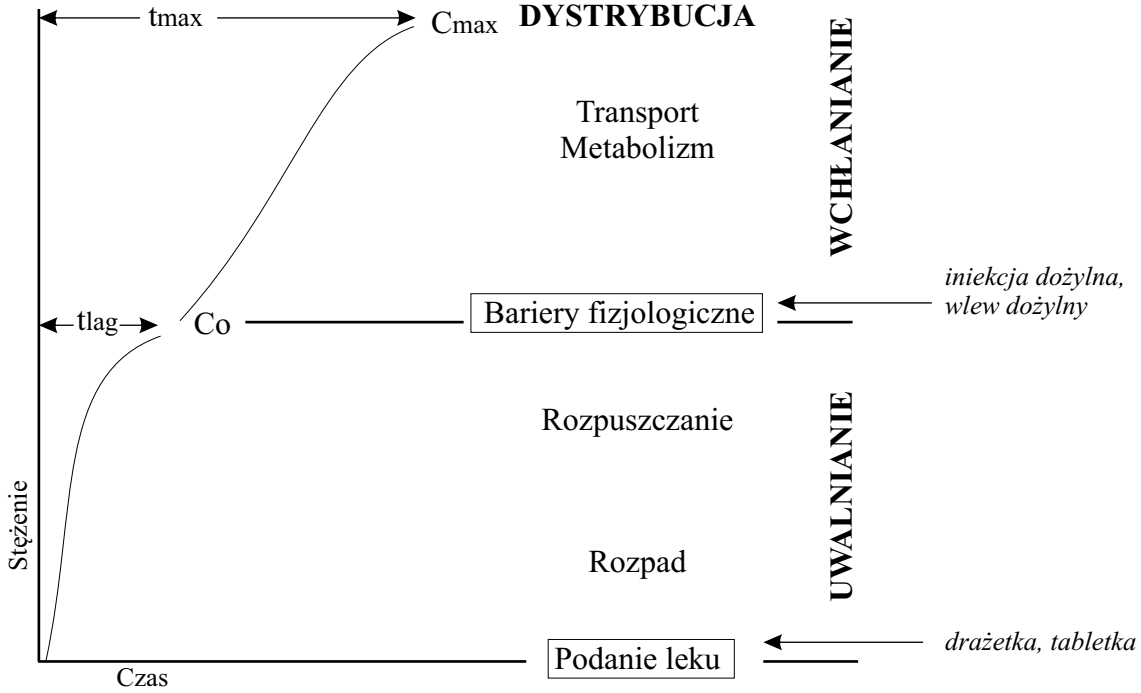
- lek trudno rozpuszczalny, zamknięcie leku w kapsułce
- substancja lecznicza w postaci grubych kryształów
- substancje zmniejszające napięcie powierzchniowe w dużej ilości
- lek zdysocjowany, duża lepkości środowiska, chelatowanie leku, kompleksowanie leku

Optymalizacja dostępności farmaceutycznej dotyczy modyfikowania i wprowadzania celowych zmian czasu rozpadu uwalniania i rozpuszczalności leku. Dla różnych rodzajów leków podawanych różnymi drogami badanie czasu rozpadu, postaci leku oraz szybkość rozpuszczania substancji leczniczej stanowi cenne narzędzie optymalizacji farmakokinetycznej. Szybkość rozpuszczania dla ciał stałych obliczyć można z formuły:

$$\mathbf{K = [(2.303 \times V) / (t_{n+1} - t_n) \times S] \times Log[(C_o - C_n) / (C_o - C_{n+1})]}$$

K - stała szybkości rozpuszczania
V - objętość cieczy
S - powierzchnia ciała stałego
tn - wartość czasu dla pierwszego i kolejnego punktu
Cn - wartość stężenia dla pierwszego i kolejnego punktu
Co stężenie początkowe

Badania dostępności farmaceutycznej doprowadziły do znacznego postępu w dziedzinie rozwoju nowoczesnych technologii wytwarzania postaci leków. Prowadzi to także do stosowania bardzo zaawansowanych technologicznie postaci leków (Janicki S., Fiebig A. 1996). Celowość wytwarzania zaawansowanych technologicznie postaci leków wiąże się z osiągnięciem żądanej charakterystyki kinetycznej w organizmie pacjenta.



Rys. Pierwsze fazy kinetyczne leku po jego podaniu. Faza uwalniania leku i faza jego absorpcji.

Optymalizacja leku w fazie projektowania postaci leku posługuje sie metodami *in vivo* i *in vitro*. Celem porównania i wykrycia korelacji w doświadczeniach *in vivo* i *in vitro* są wybrane parametry farmakokinetyczne Przykłady parametrów podlegających ocenie:

In vivo	*In vitro*
C_n po określonym tn	czas potrzebny do rozpuszczenia substancji
AUC	C_n w roztworze
$\gamma(K_{ab})$	stała szybkości dla procesu uwalniania
$t_{1/2}$	czas po którym uwolnione zostanie 63.2 % substancji czynnej

Średni czas rozpuszczania leku MdT (ang.: *Mean Dissolution Time*)

Częścią średniego czasu przebywania leku w przestrzeni podania leku czyli MIT jest MdT. MdT łatwo obliczyć drogą doświadczalną (krzywa obrazująca uwalnianie leku). Parametr ten często wykorzystywany jest w analizie biorównoważności leków metodami *in vitro*. Wyjątkiem są przypadki w których MdT > MAT. Znając początkową dawkę leku D(diss) oraz AUC(diss) nad krzywą wzrastającego stężenia rozpuszczanego leku można obliczyć MdT:

$$\mathbf{MdT = AUC_{(diss)} / D_{(diss)}}$$

MdT jest również punktem wyjścia do obliczenia liczby rozpuszczalności DNo (ang.: *Dissolution Number*):

$$\mathbf{DiN = MTT / MdT}$$

MTT - dla jelita cienkiego człowieka 270 min

Jest to czas który gwarantuje uwolnienie substancji leczniczej w 63.2 % . Jest to więc średni czas zaistnienia cząsteczek leku w roztworze. Stanowi odpowiednik MRT w typowych badaniach farmakokinetycznych (Brandys J. i wsp. 1984). Obliczenia wymaga znajomości pola powierzchni nad krzywą - AUC(diss); ABC (ang.: *Area Beyond Curve*) wzrastających stężeń uwalnianego do środowiska *in vitro* leku. Stąd MdT obliczamy korzystając z wzoru:

$$\mathbf{MdT = ABC / D}$$

gdzie dla procesów pierwszego rzędu stała szybkości rozpadu - K(d) równa jest:

$$\mathbf{1/MdT = K(d)}$$

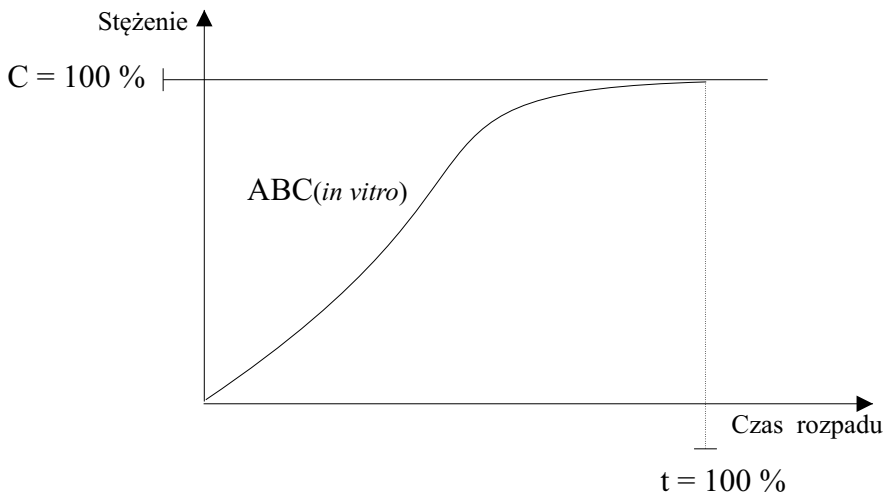
Średni czas rozpadu dla stałych postaci leku - MdT(s) jest wypadkową MdT(s) i wartości uzyskanej dla roztworu MDT(sol) (FDA, CDER 1997). MDT można odnieść do procesów zachodzących w in vivo uzupełniając jego wartość o współczynnik korekcyjny f:

$$\mathbf{MdT_{(s)} = MdT_{(s)} - MdT_{(sol)}} \qquad \mathbf{MdT_{(\textit{in vivo})} = f \times MdT_{(\textit{in vitro})}}$$

Skalowanie MRT dla warunków *in vivo* można przeprowadzić korzystając z formuły:

$$\mathbf{MRT = ABC_{(\textit{in vitro})} / AUC_{(\textit{in vivo})}}$$

Jednym z ważnych parametrów które również charakteryzują procesy uwalniania (rozpadu i rozpuszczania) jest czas opóźnienia wchłaniania. Zasadniczym problemem w badaniach dostępności farmaceutycznej jest takie konfigurowanie układów doświadczalnych *in vitro* aby jak najdokładniej naśladowały rzeczywiste bariery fizjologiczne w układach *in vivo*. W tym celu konstruuje się aparaturę służącą badaniu procesów uwalniania leku dla wielu różnych postaci leków. Służą temu zarówno urządzenia mechaniczne, gwarantujące uwalnianie leku w wyniku kontaktu z cieczą jak i układy membranowe z membranami z tkanek zwierząt, układy typu sztuczna nerka itp.. Obecnie w celu imitowania procesów zachodzących w obrębie barier fizjologicznych, w tym także barier specjalizowanych wykorzystuje się często modele z hodowlami komórkowymi.



Rys. AUC i ABC w badaniach uwalniania substancji w warunkach in vitro.

Korelacje parametrów *in vitro* / *in vivo* - IVIVC

Obecnie proponuje się kilka różnych rodzajów oceny pomiędzy parametrami postaci leku badanymi w układach IVIVC (ang.: *In vitro / In vivo Correlations*), (FDA, CDER 1997). Dzieli się je na kilka typów - A,B,C, oraz wieloraki C.

Poziom korelacji A:

Na poziomie tym bada się zależność pomiędzy procesem wchłaniania w układach *in vivo* i rozpuszczania w układach *in vitro*. Badania takie pozwalają określić czy istnieje liniowa zależność ilustrująca przebieg obu procesów. Jeżeli taka liniowa zależność zostanie potwierdzona uzyskane dane mogą posłużyć do skalowania parametrów farmakokinetycznych.

Poziom korelacji B:

Badania korelacji na poziomie B odbywa się zgodnie z założeniami teorii momentów statystycznych. Obiektem porównania są parametry farmakokinetyczne takie jak średni czas uwalniania w układach *in vitro* - MDT (ang.: *Mean Dissolution Time*) oraz średni czas przebywania leku w organizmie w układzie *in vivo*.

Poziom korelacji C:

Obiektem porównania jest wybrany parametr opisujący kinetykę rozpadu i uwalniania substancji czynnej. Przykładem może być czas po którym uwolnione zostało 90% substancji czynnej zawartej w leku w układzie *in vitro* i AUC lub Cl, Cmax, tmax w układzie *in vivo*.

Wieloraki poziom korelacji C:

Na tym poziomie badania korelacji obiektem porównania jest wiele parametrów (punktów) opisujących kinetykę rozpadu i uwalniania substancji czynnej. W stosunku do każdego z nich bada się korelację z parametrami uzyskanymi *in vitro*.

Badanie korelacji pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi *in vitro* i *in vivo* są obecnie jednym z częściej stosowanych narzędzi szybkiej analizy farmakokinetycznej. Służy ona między innymi optymalizacji farmakokinetycznej postaci farmaceutycznej leku (Modi N.B. i wsp. 2000).

Szybkość uwalniania substancji leczniczych z tabletek - Q

Określanie czasu uwalniania substancji leczniczej (Faza L - *Liberation* - uwalnianie) wykonuje się w przeznaczonych do tego aparatach. Badania takie dla tabletek przeprowadza się metodami:

- łopatkową
- wirującego koszyczka
- przepływową

Używa się do tego celu odpowiednich płynów, których skład uzależniony jest od rodzaju tabletek jakie poddawane są analizie. Wymienionymi metodami bada się zarówno tabletki o niezmodyfikowanej jak i zmodyfikowanej prędkości uwalniania substancji leczniczej. Wynikiem tak przeprowadzonych badań jest określenie w procentach ilości uwolnionej do płynu substancji czynnej w określonym czasie. Przeprowadzając analizę płynu do jakiego z tabletki uwalniana jest substancja lecznicza, za każdym razem uzupełnia się ogólną objętość płynu o objętość pobranej próby. Określenie dostępności substancji leczniczych z tabletek pozwala na wykonywanie badań porównawczych tej postaci leku. Wartość Q opisuje dawkę jaka trafiła po podaniu tabletki w danym czasie do środowiska (przewód pokarmowy). Nie jest to jednak wartość równoważna biodostępności rozumianej jako ułamek dawki wchłoniętej do krwiobiegu.

Dla procesu uwalniania substancji leczniczej z tabletki można określić szybkość uwalniania. Jeżeli wyznaczymy przynajmniej dwa punkty czasowe dla których określimy wartość stężenia leku w płynie to możemy obliczyć szybkość takiego procesu. Do tego celu można zaadoptować równanie służące obliczaniu wartości β dla typowych krzywych opisujących fazę eliminacji. W analogiczny sposób obliczyć można odpowiedniki niektórych typowych parametrów farmakokinetycznych takich jak t1/2, AUC. Parametry takie stanowić będą opis kinetyki procesu uwalniania, dla środowiska płynu uwalniającego tabletki (Vd), oraz substancji leczniczej w niej zawartej (FP V; USF NF 2002).

Biorównoważność leków - BE

Badania biorównoważności leków (ang.: *Bioequivalence*) dotyczą analizy porównawczej farmakokinetyki lub farmakodynamiki leku odtwórczego - generycznego i oryginalnego - referencyjnego. Stwierdzenie biorównoważności dwóch leków wymaga wykazania równoważności farmaceutycznej oraz podobnego zakresu dostępności biologicznej - BA dla tej samej wartości dawki substancji czynnej. Biorównoważność biologiczna (BE) wraz z równoważnością farmaceutyczną (PE) gwarantują potwierdzenie równoważności terapeutycznej dwóch leków (TE).

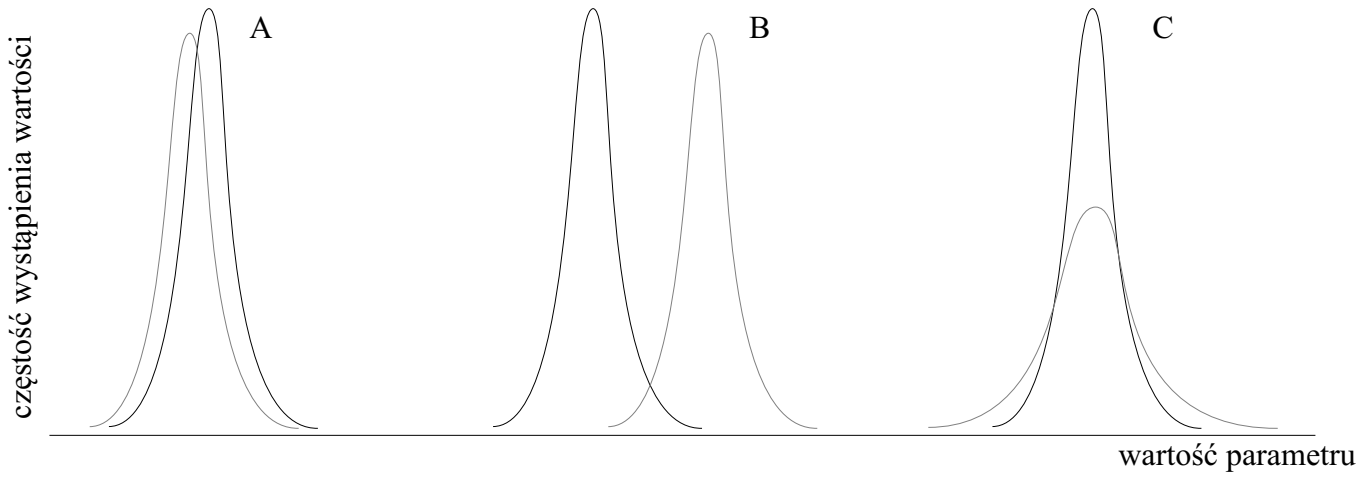
BE + PE = TE

Dopuszczalny zakres różnic w wartości dostępności biologicznej określają odpowiednie wytyczne. Dwa preparaty są równoważne pod względem farmaceutycznym jeśli posiadają te same substancje czynne w odpowiadającym sobie postaciach leku (Janicki S. i wsp. 2001). Badania biorównoważności pozwalają na wprowadzenie na rynek preparatów leczniczych odtwórczych w stosunku do preparatu oryginalnego. Proces ten ma miejsce po wygaśnięciu okresu ochrony patentowej na daną substancję jej postać etc. (zwykle jedną substancję chroni kilka lub kilkanaście odrębnych patentów).

Składowa preparatu oryginalnego	Liczba preparatów dostępnych na rynku polskim
- simwastatyna	10 preparatów
- zydowudyna	5 preparatów
- metronidazol	9 preparatów
- doksazosyna	9 preparatów
- tamoksifen	8 preparatów
- famotydyna	7 preparatów

Ryc. Liczba preparatów zawierających tą samą substancję czynną dostępnych w kraju (Pharmindex Kompendium 2004)

Stwierdzenie równoważności biologicznej dla dwóch preparatów leczniczych poprzez porównanie niektórych parametrów farmakokinetycznych ich substancji czynnych jest obecnie jedną z najdokładniejszych metod potwierdzania lub wykluczania biorównoważności leków.



Ryc. A równoważność wartości o częstości cechy, B równoważność częstości i jej brak w przypadku wartości cechy, C brak równoważności wartości i częstości.

Parametry farmakokinetyczne najczęściej porównywane to pole powierzchni pod krzywą - AUC, stężenie maksymalne leku w osoczu - Cmax oraz czas jego rejestracji tmax. Podstawowe zasady analizowania danych farmakokinetycznych polegają na określeniu różnicy wartości, częstotliwości i zmienności danego parametru (Chow S., Liu J. 2000). Jeżeli różnica ta w grupach doświadczalnych wykracza poza ustalone granice lek nie jest biorównoważny preparatowi referencyjnemu - BIE (ang.: *Bioinequivalence*) (FDA, CDER 2000; EMEA, CVMP 2000). Szczegółowe wskazówki dotyczące przebiegu badań mających na celu stwierdzenie biorównoważności leków regulują odpowiednie instytucje o zasięgu międzynarodowym (EMEA, FDA). Metody badań biorównoważności leków dotyczą między innymi:

In vitro

>Badanie szybkości uwalniania IVIVC

In vivo

>Badania farmakokinetyczne

Badania kliniczne

Izolacja	z tkanek (krew pełna, osocze, surowica) lub moczu.
Archiwizacja	przechowywanie prób badanych i archiwalnych
Analiza	stężenia substancji czynnej lub/i jej metabolitów
Obliczenia	parametrów farmakokinetycznych
Obliczenia	analiza statystyczna parametrów farmakokinetycznych
Wniosek	wniosek końcowy o biorównoważności lub jej braku

>Badania farmakodynamiczne

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2005 (FDA 2003):

- abakawir siarczan
- siarczan albuterolu
- aripiprazol
- kabergolina
- dalteparyna sól sodowa
- desirudina
- enalaprilu maleinian
- fentanylu cytrynian
- glimepiryd
- itrakonazol
- lamiwudyna
- prawastatyna sól sodowa
- sertralina chlorowodorek
- simwastatyna
- zydowudyna

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2006 (FDA 2003):

- adefowir
- alfuzosyna chlorowodorek
- azelaikowy kwas
- karbidopa
- karmustyna
- desloratadyna
- didanozyna
- finasteryd
- galantamina bromowodorek

- lomefloksacyna chlorowodorek o
- miwakurium chlorek
- tamsulozyna chlorowodorek

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2007 (FDA 2003):

- acyklowir
- alendronian sodu
- alprostadil
- betametazon dipropionian
- kalcypotrien
- karbamazepina
- karwedilol
- cetyryzyna chlorowodorek
- cetroreliks
- ciklopiroks
- felodypina
- gatyfloksacyna
- lewobetaksolol chlorowodorek
- risperidon

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2008 (FDA 2003):

- alprazolam
- bikalutamid
- buspiron chlorowodorek
- desmopresyna octan
- desogestrel
- deksmedetomidyna
- diwalproeks
- dorsolamid chlorowodorek
- gabapentyna
- ifosfamid
- lamotrygina
- leuprolid octan
- melfalan chlorowodorek

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2009 (FDA 2003):

- adenozyna
- anastrozol
- arbutamina chlorowodorek
- beklometazon dipropionian
- escitalopram
- felbamat
- fenofibrat
- fozinopril
- gadowesetamid
- lewetiracetam
- lozartan
- miglitol

Przykłady dat wygaśnięcia wybranych patentów, leków oryginalnych w roku 2010 (FDA 2003):

- adapalen
- apraklonidyna chlorowodorek
- azelastyna chlorowodorek
- biwalirudyna
- butenafina chlorowodorek
- butokonazol
- kaptopril
- cidofowir
- danaparoid
- deksrazoksan chlorowodorek
- docetaksel
- donepezil chlorowodorek
- eprosartan
- famcyklowir
- fomiwirsen
- gemcytabina chlorowodorek
- lepirudyna
- lewalbuterol chlorowodorek
- lewofloksacyna

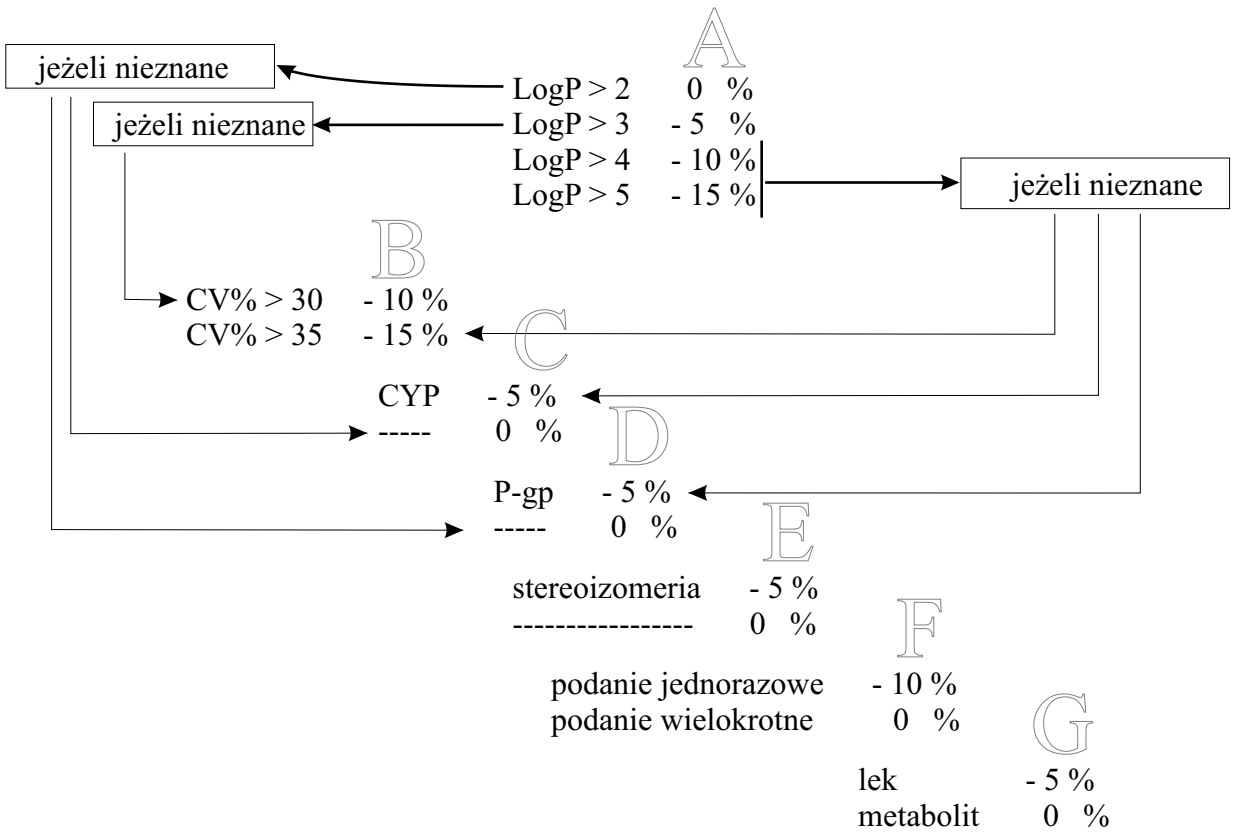
Projektowanie badań mających na celu określenie różnic kinetyki leku na podstawie znajomości parametrów farmakokinetycznych (uzyskanych w profilu stężenie / czas), rozpoczyna zwykle badaniami pilotażowymi. Badania takie w przypadku podania dawki jednorazowej obejmują między innymi określenie ilości prób tkanek jakie mają być pobrane do analiz oraz interwałów w jakich próby te powinny zostać pobrane.

Dla leków podawanych drogą donaczyniową pierwsze próby do analiz powinny być pobierane tuż po podaniu leku. W praktyce najczęściej jest to 1 minuta po podaniu leku. Ilość wszystkich prób w badaniach pilotażowych powinna wynosić przynajmniej 12 -18 łącznie z próbką pobraną przed podaniem leku. W praktyce jednak liczba ta zależna jest od okresu półtrwania leku w fazie eliminacji. Jeżeli eliminacja leku jest procesem długotrwałym zwiększa się również ilość punktów czasowych w których należy pobrać próbki do analiz. Ostatnia próba powinna być pobrana najwcześniej w punkcie czasowym równym 3 x t1/2kel licząc od Cmax uzyskanego podczas badania. Ostatnia faza badania w której krzywa C-T ma liniowy przebieg powinna być reprezentowana co najmniej przez cztery punkty czasowe. Powodem jest to że właśnie bazując na czterech ostatnich punktach C-T powinno się obliczać stałą szybkości eliminacji dla okresu półtrwania leku. Badania pilotażowe poprzedzające wykonanie projektu właściwego doświadczenia pozwalają zoptymalizować układ doświadczenia. Przyczynia się to do uzyskania krzywej stężeń precyzyjnie opisującej najważniejsze fazy kinetyki leku w organizmie. Badania kliniczne przeprowadzane w celu porównania właściwości farmakokinetycznych dwóch leków przeprowadzane są najczęściej w układzie krzyżowym tak aby w jednej grupie znajdowało się od 12 do 24 osobników. Odstęp czasu pomiędzy grupami w takim układzie doświadczalnym nie powinien być krótszy niż 3 lub 5 a nawet 10 x t1/2kel (w ustroju pozostaje wtedy ok. 0.097% dawki początkowej).Podawanie leków doustnych obostrzone jest licznymi wskazówkami dotyczącymi zachowania ustalonego rygoru badania. Podaniu leku drogą doustną powinno towarzyszyć podanie wody w ilości 240 (CPMP) lub > 150 ml (FDA). Woda podawana do picia powinna zawierać jak najmniejszą ilość wapnia. Woda dla probanta powinna być dostępna bez ograniczeń jednak pod kontrolą. Ograniczeniem jest podawanie wody bez kontroli na godzinę przed podaniem leku aż do 4 godzin od jego podania. Jeżeli u probanta po podaniu doustnym leku, w czasie lub przed czasem równym 2 x tmax wystąpią wymioty powinien zostać wykluczony z grupy. Pożywienie stosowane w trakcie prowadzenia badań klinicznych służących analizie porównawczej powinno być wystandaryzowane. W przypadku badania leków doustnych powinno być podane nie później niż 4 godziny od podania leku. W przypadku badań biorównoważności prowadzonych z lekami przeznaczonymi dla człowieka licznym obostrzeniom podlega grupa probantów.

Badania zwykle prowadzone są na zdrowych osobach w wieku 18 do 55 lat z współczynnikiem masy ciała BMI od 18 do 30. Jeżeli jednak lek skierowany jest dla osób w starszym wieku grupę probantów powinny tworzyć osoby w wieku powyżej 60 lat. Jeżeli lek skierowany jest dla obu płci, grupa probantów powinna składać się po połowie z obu. Zwykle wykluczeniu ulega osoba paląca papierosy. W trakcie badania oraz na 24 do 48 godzin przed podaniem leku probant nie może spożywać alkoholu.

Ryzyko wykazania braku równoważności biologicznej w badaniach in vivo rośnie wraz z ilością czynników które wpływają na wzrost zmienności parametrów farmakokinetycznych leku. Podstawowym parametrem fizjochemicznym leku który determinuje jego powinowactwo do białek określa objętość dystrybucji oraz wiele innych zjawisk jest LogP.

$$\mathbf{BIE_{(risk)} = 100 - [|A|+|B|+|C|+|D|+|E|+|F|+|G|]}$$



Ryc. Analiza ryzyka w projektowaniu badań biorównoważności.

Objętość dystrybucji - Vd

Definicja objętości dystrybucji (ang.: *Volume of Distribution* niem.: *Verteilungsvolumen*) wywodzi się z pojęć chemicznych dotyczących obliczania stężenia substancji w określonej objętości roztworu. Na jakie pytanie odpowiada parametr określany jako objętość dystrybucji ?

Przykład:

Dysponuję zbiornikiem cieczy. Nie znam objętości zbiornika. W zbiorniku rozpuszczam znaną ilość substancji (dawka leku). Wykonuję pomiar stężenia substancji w cieczy znajdującej się w zbiorniku. Na podstawie znajomości wartości stężenia i ilości substancji dodanej do zbiornika można określić w jakiej ilości cieczy została rozpuszczona substancja.

Rozwiązanie:

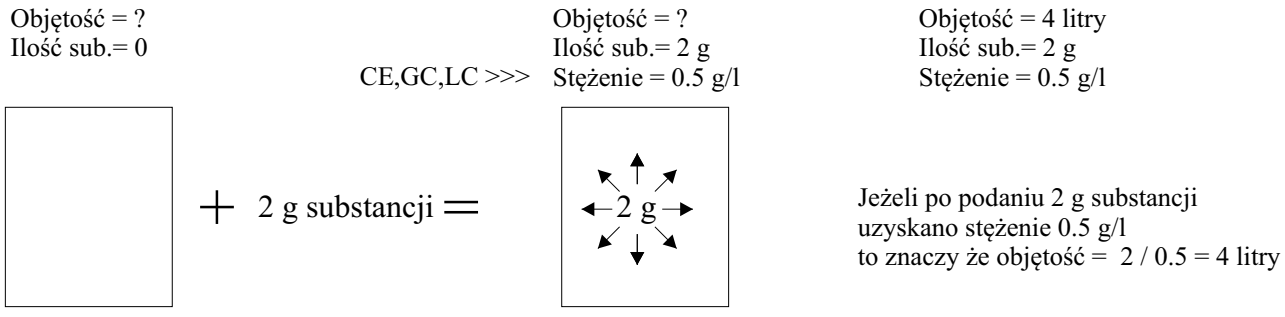
objętość zbiornika (Vd) = ilość dodanej substancji(Dawka) / stężenie substancji w cieczy (Co)

Pojęcie pozornej objętości dystrybucji odnosi się do faktu iż wartość stężenia jaka ujęta jest w obliczeniach objętości dystrybucji dotyczy jedynie osocza i nie relacjonuje wartości stężenia leku w innych kompartmentach. Metody pozwalające na obliczenia wartości objętości dystrybucji najczęściej zależne są od tego jak ilustrowana jest wartość stężenia jakie lek osiągnął w osoczu. Stąd liczne formuły pozwalające dostosować tok analizy do odpowiedniego rodzaju obliczeń. Jeżeli dawka wyrażona zostanie wartością masy leku to obliczymy Vd w jednostkach objętości. Jeżeli jednostka zostanie wyrażona wartością masy leku przypadającej na 1 kilogram masy ciała to Vd zostanie wyrażona jednostką masy przypadającą na objętość. Zatem będzie miała wymiar tzw. współczynnika dystrybucji - CD (ang.: *Coefficient of Distribution*). Podobna procedura prowadzi do obliczenia wartości klirensu normalizowanego. W farmakokinetyce dystrybucja leku wyraża się poprzez szybkość dystrybucji oraz stopień rozdysponowania cząsteczek leku w organizmie.

Vd = D / Co

D - dawka leku
AUC - pole powierzchni pod krzywą
Co - stężenie leku w czasie t=0
A,B - wartości stężeń ekstrapolowanych

Model dwukompartmentowy	jednokompartmentowy
A + B	B



Obliczenia parametru farmakokinetycznego jakim jest objętość dystrybucji można wykonywać dla różnych faz kinetycznych, korzystając z różnych danych wyjściowych. Vd obliczona dla kompartmentu centralnego (podanie donaczyniowe):

$$\mathbf{Vd_{(c)} = D / Co \quad lub \quad Vd_{(c)} = D / A + B}$$

Vd obliczona dla tkanek (podanie donaczyniowe):

$$\mathbf{Vd_{(tissue)} = Cl_{(d)} / K21}$$

Cl(d) - klirens dystrybucyjny
K21 - stała prędkości przechodzenia leku z kompartmentu obwodowego do centralnego

Vd obliczona na podstawie znajomości stężenia ekstrapolowanego B lub sumy eksponencjałów dla modelu dwukompartmentowego:.

$$\mathbf{Vd_{(expo)} = D / B} \quad \text{lub} \quad \mathbf{Vd_{(expo)} = D / (A + B)}$$

Vd obliczona dla stanu w którym zaistnieje stan równowagi pomiędzy stałymi opisującymi szybkość przechodzenia leku z kompartmentu centralnego do obwodowego K12 a szybkością przechodzenia leku z kompartmentu obwodowego do centralnego k21.

$$\mathbf{Vd_{(ss)} = Vd_{(c)} \times [(K12 + K21) / K21]} \quad \text{lub} \quad \mathbf{Vd_{(ss)} = Vd_{(c)} \times [1 + (K12 / K21)]}$$

lub dla modelu trójkompartmentowego $\mathbf{Vd_{(ss)} = Vd_{(c)} \times [1 + (K12 / K21) + (K13 / K31)]}$

Stąd $\mathbf{Vd_{(ss)} = Vd_{(tissue)} + Vd_{(c)}}$

Nawiązując do teorii momentów statystycznych V(ss) obliczyć można korzystając z formuł (Berezhovskiy L.M. 2003; Sobol E., Bialer M. 2004):

$$\mathbf{Vd_{(ss)} = (D \times AUMC) / AUC^2}$$

$$\mathbf{Vd_{(ss)} = (D \times AUC) / MRT}$$

$$\mathbf{Vd_{(ss)} = Cl / AUC}$$

Oraz dla leków o dużym powinowactwie do białek oraz małej wartości stałej dysocjacji ($k \leq 0.001$ s):

$$\mathbf{Vd_{(ss)} = (D \times AUC) / MRTuP}$$

Cl - klirens
D - dawka
AUMC - pole powierzchni pierwszego momentu
MRTuP - średni czas przebywania frakcji leku nie związanej z białkami osocza w organizmie
MRT - średni czas przebywania leku w organizmie

Stosunek Vd(c) do Vd(ss) określa procent ilości leku rozmieszczonego we krwi do leku rozmieszczonego w tkankach - współczynnik rozdziału krew / tkanki - Kp (Bjorkman S. 2002).

$$\mathbf{Kp = (Vd_{(c)} / Vd_{(ss)}) \times 100}$$

Vd obliczona dla fazy eliminacji leku.

$$\mathbf{Vd_{(\beta)} = [D / (\beta \times Co)] \times [(\alpha \times \beta) / K21]}$$

Vd obliczona na podstawie wartości pola powierzchni pod krzywą.

$$\mathbf{Vd_{(area)} = D / (\beta \times AUC)}$$

K12 - stała prędkości przechodzenia leku z kompartmentu centralnego do obwodowego
K21 - stała prędkości przechodzenia leku z kompartmentu obwodowego do centralnego
D - dawka leku

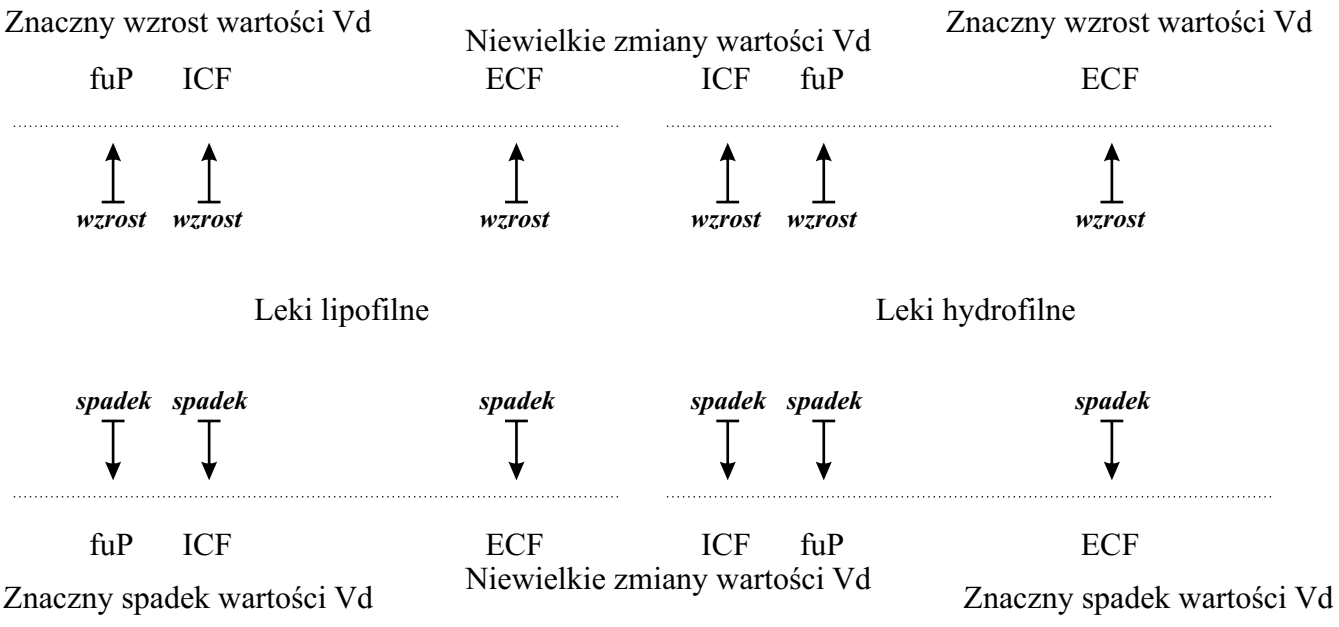
Zależność pomiędzy poszczególnymi formułami dla modelowania wielokompartmentowego ilustruje schemat.

$$\mathbf{Vd_{(expo)} > Vd_{(area)} > Vd_{(ss)} > Vd_{(c)}}$$

Dla modelu jednokompartmentowego spełniona jest prawidłowość:

$$\mathbf{Vd_{(expo)} = Vd_{(area)} = Vd_{(ss)}}$$

Objętość dystrybucji leku jest ściśle związana z wartością masy ciała. Objętość w której lek jest rozdysponowany po osiągnięciu kompartmentu centralnego zależna jest od objętości makrokompartmentu. Lek może zostać rozdysponowany nie tylko do przestrzeni hydrofilnych, ale szczególnie w przypadku leków lipofilnych do tkanki tłuszczowej i organów zawierających większa ilość tłuszczów (mózg). Dla dwóch osobników o różnej masie ważne jest w takim wypadku wnioskowanie o dawce nie tylko na podstawie masy ciała, lecz także beztłuszczowej masy ciała oraz powierzchni ciała. Wiele leków cechuje predyspozycja do osiągania kompartmentów o określonym charakterze fizykochemicznym i określonych parametrach fizjologicznych. O charakterze rozproszenia leku w obrębie tkanek zawsze jednak decyduje kompartment centralny poprzez wiązanie leku z białkami krwi.



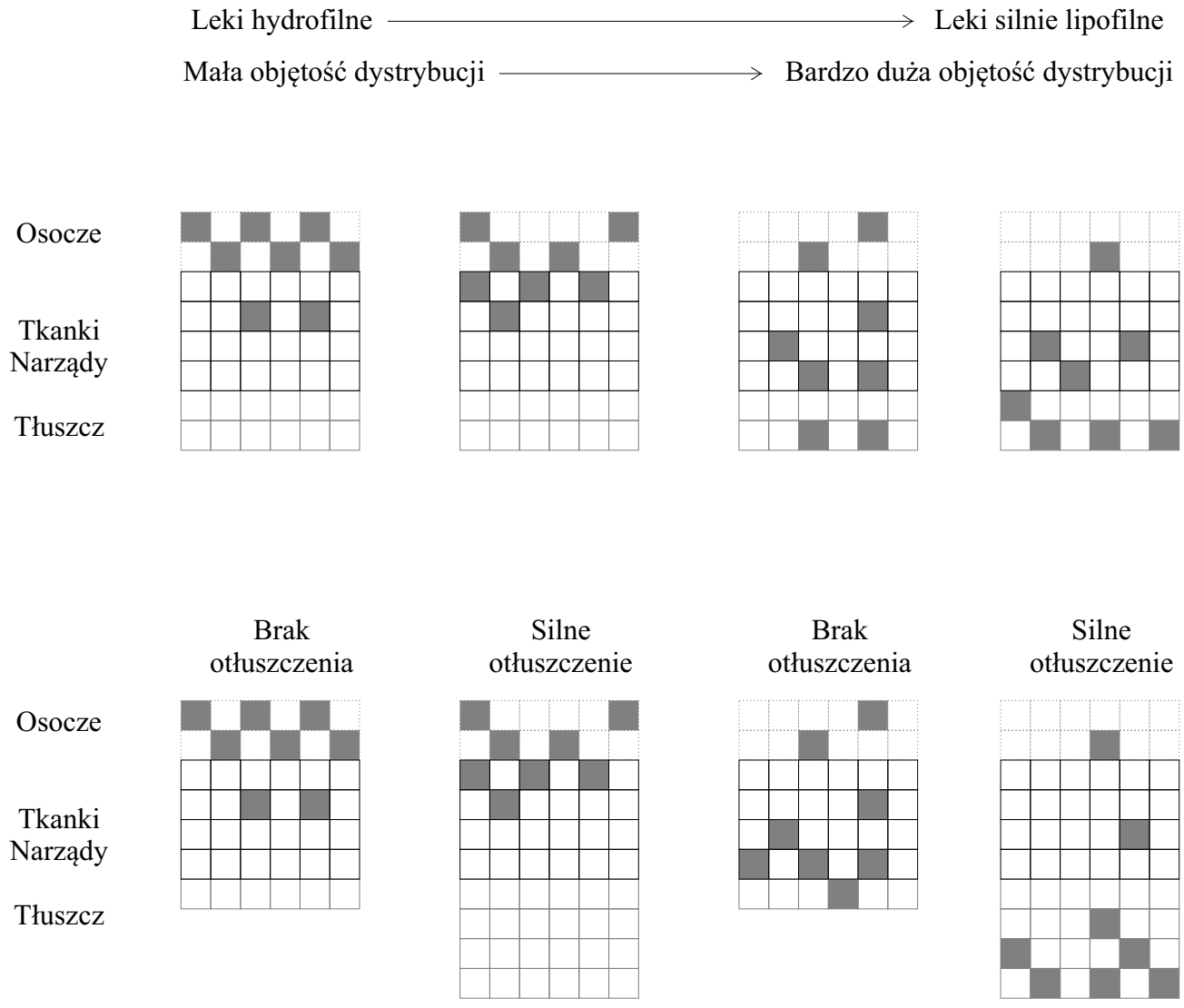
Rys. Wpływ frakcji leku niezwiązanej z białkami (fuP) oraz zmian objętości płynu poza (ECF) i wewnątrzkomórkowego (ICF) na wartość o bjętości dystrybucji leków hydro i lipofilnych..

Stąd tak ważna jest rola i znajomość procesów wiązania leku z białkami zarówno w obrębie osocza jak i tkanek. Wielkość cząsteczki leku również decyduje o wartości objętości dystrybucji. Leki o mniejszej masie molowej łatwiej wiążą się z białkami. Zwiększone wiązanie z białkami wpływa na mniejszą wartość objętości dystrybucji leku w tkankach, ponieważ dystrybucji do tkanek ulega frakcja wolna a nie związana leku. Jeżeli przyjąć że totalna objętość w jakiej lek zaistniał po wchłonięciu jest sumą objętości dystrybucji w obrębie osocza oraz tkanek to rolę białek ująć można równaniem:

$$\mathbf{Vd = Vd_{(c)} + Vd_{(t)} \times (fuP / fuT)}$$

Vd(c) - objętość dystrybucji w osoczu
Vd(t) - objętość dystrybucji w tkankach
fuP - frakcja leku niezwiązana z białkami osocza
fuT - frakcja leku niezwiązana z białkami tkanek

Stąd na przykład wartość objętości dystrybucji frakcji niezwiązanej, zgodnie z formułą zaproponowaną przez Toon'a i Rowland'a można obliczyć z wzoru (Davis A.M. i wsp. 2000):



Rys. Symulacja dystrybucji leków w zależności od lipofilności i zawartości tłuszczu w organizmie.

$$Vd_{(u)} = Vd / fu$$

Vd(u) - objętość dystrybucji leku wolnego od połączeń z białkami
Vd- objętość dystrybucji

Znając wartości całkowitej objętości wody - TBW, objętości płynu pozakomórkowego - ECF, objętości płynu wewnątrzkomórkowego - ICF, współczynnika rozdziału oktanol / woda - LogP, oraz frakcji leku niezwiązanej -fu objętość dystrybucji można wyrazić także za pomocą formuły:

$$Vd = ECF + [LogP \times fu \times (TBW - ECF)]$$

lub

$$Vd = ECF + (LogP \times fu \times ICF)$$

Stosunek ICF / ECF oraz jego ewentualne zmiany w organizmie ma duży wpływ na stosunek wartości oczekiwanych do obserwowanych w trakcie leczenia - terapia / ADR. Szczególne miejsce wartości współczynnika rozdziału oktanol / woda w powyższych równaniach związane jest z korelacją tego współczynnika z rozpuszczalnością w wodzie - S (ang.: *Solubility*) wynikającą z lipofilności lub hydrofilności związku. Objętość dystrybucji jest parametrem który opisuje jak dalece lek wysyca tkanki organizmu. Stąd rozmieszczenie leku w organizmie opisać można równaniem (Worboys P.D. i wsp. 1997):

$$Vd / C_o = ECF \times C_{(ECF)} + ICF \times C_{(ICF)}$$

Vd - pozorna objętość dystrybucji
Co - stężenie leku w chwili t = o dla podania i.v
ECF - objętość płynu pozakomórkowego
ICF - objętość płynu wewnątrzkomórkowego
C(ECF) - stężenie leku w płynie pozakomórkowym
C(ICF) - stężenie leku w płynie wewnątrzkomórkowym

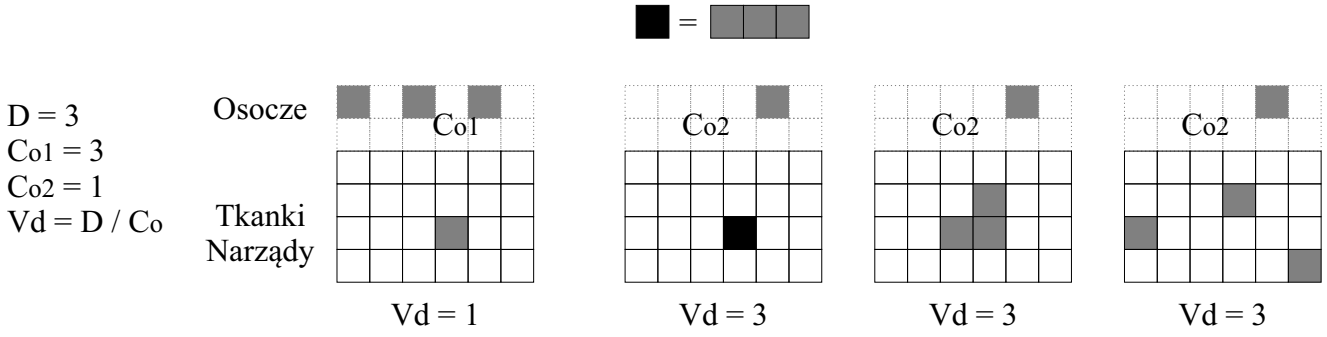
Znając masę ciała można stwierdzić iż objętość dystrybucji której wartość jest bliska:

około 10 % masy ciała - świadczy o dystrybucji leku w osoczu
około 20 % masy ciała - świadczy o dystrybucji leku także w płynie zewnątrzkomórkowym
około 40 % masy ciała - świadczy o dystrybucji leku także do wnętrza komórek
około 60 % masy ciała - świadczy o dystrybucji leku do większości płynów ustrojowych
około 100 % masy ciała - lub jest od niej większa świadczy o łączeniu się leku z tkankami takimi jak tłuszcz czy tkanka kostna. Lek trafia do kompartmentu głębokiego.

Dyspozycja leku w organizmie to proces złożony z dystrybucji redystrybucji i eliminacji. Proces dystrybucji leku z krwi nie kończy się nawet w momencie osiągnięcia przez cząsteczki leku tkanek. Tutaj także zachodzą procesy redystrybucyjne pomiędzy komórkami tkanek. Łącząc ten fakt z istnieniem miejsc wiązania leku (między innymi z białkami) i dynamiką procesów ciągłego przemieszczania cząsteczek leku, czyni to zjawiska dystrybucji dość złożonymi. Objętość dystrybucji leku najczęściej nie opisuje dokładnie stanu faktycznego lecz przybliżony stan w ramach zaistniałej w danej chwili równowagi. Duża objętość dystrybucji może świadczyć o dobrej penetracji całego organizmu. Może też nasuwać przypuszczenia obecności tkanek lub narządów predysponowanych do gromadzenia leku w znacznych stężeniach. Z punktu widzenia farmakoterapii obydwa zachowania dla wielu grup leków są interesujące. Z jednej strony pozwalają stworzyć lek docierający do wielu tkanek i narządów. Z drugiej strony przy procesach chorobowych dotyczących jednego układu lub narządu pozwalają na selektywne deponowanie leku w określonej tkance. Celem obliczeń dotyczących objętości dystrybucji może być uzyskanie wartości objętości dystrybucji leku - Vd w warunkach *in vitro* utrzymania hodowli komórkowej w określonym medium. W takim wypadku proponuje się równanie (Worboys P.D. i wsp. 1997):

Vd = ECF + ICF x P(cell/med)

P(cell/med) - współczynnik rozdziału komórki / medium



Rys. Symulacja wartości i znaczenia Vd w zależności od rozmieszczenia leku w organizmie.

Osiąganie przez cząsteczkę leku kompartmentu jakim jest tłuszcz zwykle wiąże się z wysoką wartością współczynnika rozdziału oktanol woda - LogP. Wiadomo jednak że nie jest to jedyny parametr który predysponuje leki do dyspozycji w obrębie tego kompartmentu. Aby lek mógł łatwo osiągać zwykle słabo unaczynioną tkankę musi doskonale penetrować wiele barier błonowych które napotyka na swej drodze. Jednym z parametrów których wartość opisuje możliwości cząsteczki leku w tym zakresie jest topologiczne pole polarne cząsteczki - tPSA. Objętość dystrybucji dla leków o większej od zera wartości LogP oraz niewielkiej wartości tPSA zwykle wiąże się z predyspozycją do deponowania w tkankach o większej zawartości tłuszczu co może skutkować zwiększoną objętością dystrybucji.

Analizując wartość objętości dystrybucji należy jednak zwrócić uwagę na to że jest to parametr będący wypadkową wszystkich procesów biochemicznych jakim lek ulega w czasie w organizmie. Parametr ten opisuje pośrednio wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i eliminację leku z organizmu.

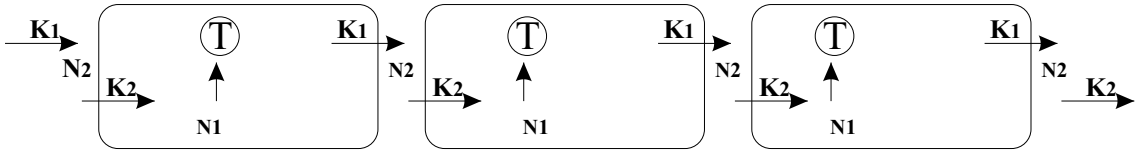
Związek	MW	MilogP	$LogS_w$	SR	tPSA	$Vd(ss)_{FAT\%}$
Lidokaina	234,43	2,481	-2,25	3,68	32,336	92,00
Triheksyfenedyl	301,34	4,725	-5,35	5,11	23,466	84,00
Klotiazepam	318,82	3,488	-3,64	4,32	32,673	84,00
Diazepam	284,75	2,805	-2,70	3,89	32,673	84,00
Prometazyna	284,42	4,098	-4,49	4,71	8,172	84,00
Fenytoina	252,27	2,698	-2,55	3,82	58,196	78,00
Tolbutamid	270,35	2,696	-2,55	3,82	75,267	78,00
Alfentanyl	418,54	0,544	0,42	2,44	85,504	64,80

Rys. Zależność między Vd w obrębie tłuszczu w organizmie człowieka a wybranymi parametrami fizjochemicznymi leków.
[dane dotyczące Vd(ss)FAT%, (Bjorkman S. 2002)]

tkanka	mysz	szczur	średnia
Tłuszcz	1000,0	1000,0	1000,00
Mózg	55,3	44,9	50,09
GIT	33,1	34,3	33,72
Skóra	24,1	40,1	32,08
Wątroba	29,9	12,0	20,99
Nerki	31,8	8,6	20,22
Płuca	28,8	11,2	20,01
Serce	23,1	2,1	12,56
Mięśnie	9,2	2,1	5,66
Erytrocyty	1,2	1,1	1,16
Osocze	0,8	0,3	0,59

Rys. Tabela ilustruje różnice w zawartości tłuszczu w tkankach i narządach szczura i myszy. Wartość liczbowa: procentowa zawartość tłuszczu / procentowa zawartość wody podzielona przez ten sam stosunek obliczony dla tkanki tłuszczowej x 1000. Na podstawie danych (El Masri H.A., Portier C.J.1998)

Obecne standardy rozwoju nowych substancji leczniczych zmierzają do uzyskiwania leków słabo lipofilnych. Cząsteczki leków o słabo wyrażonej lipofilności ale jednocześnie z niewielka liczbą grup funkcyjnych odpowiadających za wartość polarnego pola powierzchni uznawane są za najlepiej penetrujące układy błonowe. Zwiększanie pola powierzchni cząsteczki leku dostępnej dla cząsteczek rozpuszczalnika SASA w powiązaniu z optymalną lipofilnością związku prowadzi do uzyskania leków o dużej dostępności dla kompartmentu docelowego.



Ryc. Transfer słabo lipofilnych leków przez kolejne układy błonowe

K1 - stała szybkości transferu cząsteczek leku do przestrzeni z dużym udziałem substancji lipofilnych
K2 - stała szybkości transferu cząsteczek leku z przestrzeni z dużym udziałem substancji lipofilnych
T - cel cząsteczek leku
N1 - ilość cząsteczek leku w przestrzeni z większym udziałem rozpuszczalników hydrofilowych
N2 - ilość cząsteczek leku w przestrzeni z większym udziałem rozpuszczalników lipofilowych

Leki o skrajnie lipofilnych właściwościach charakteryzuje często niska dostępność biologiczna. Wiążą się bardzo silnie z lipidami osadzonymi w układach błonowych. Przy braku specyficznych dla danej cząsteczki mechanizmów transportu nie osiągają struktur docelowych w obrębie przestrzeni hydrofilnych (K1 >> K2). Leki o skrajnie hydrofilnych właściwościach również charakteryzuje często niska dostępność biologiczna. Ich dyspozycja w znacznym stopniu obejmuje przestrzenie hydrofilne. Z trudem jednak osiągają i pokonują kolejne układy błonowe. Przy braku specyficznych dla danej cząsteczki mechanizmów transportu nie pokonują struktur błonowych z dużym udziałem lipidów (K2 >> K1).

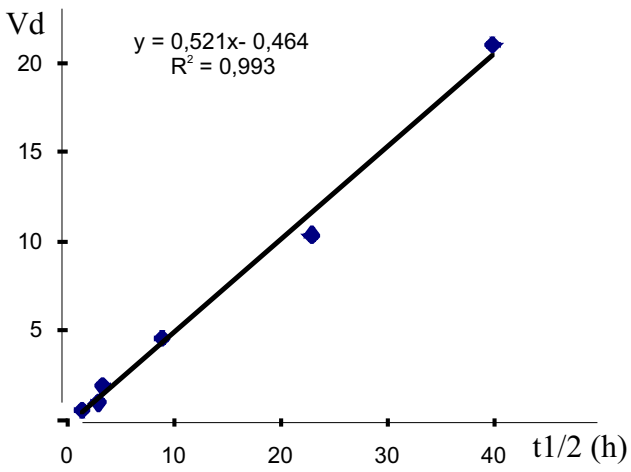
Leki o słabo hydrofilnych właściwościach predysponowane są do dyspozycji w przestrzeniach hydrofilnych. Ich dyspozycja w znacznym stopniu obejmuje przestrzenie hydrofilne, nie zawsze gwarantuje to jednak penetrację przestrzeni lipofilnych w błonach biologicznych i tkankach. Powoduje to wolniejszy transfer cząsteczek leku. Zakładając istnienie bardzo prostego układu w którym można ominąć aktywne formy transportu, zjawiska typu *efflux* etc. Słaba hydrofilność cząsteczek w takim modelu powoduje zatrzymywanie ich w pierwszych napotkanych przestrzeniach hydrofilowych dając niewielka objętość dystrybucji i duże stężenie ($K2 \geq K1$).

Leki o słabo lipofilnych właściwościach predysponowane są do dyspozycji w przestrzeniach lipofilnych. Ich dyspozycja w znacznym stopniu obejmuje przestrzenie lipofilne, co gwarantuje penetrację układów błonowych. To powoduje sprawniejszy transfer cząsteczek leku. Zakładając istnienie bardzo prostego układu j.w. Niska lipofilność cząsteczek w takim modelu gwarantuje ich transfer przez kolejne przestrzenie hydrofilowe, oraz kolejne bariery błonowe dając większą objętość dystrybucji i niższe stężenie ($K1 > K2$).

Objętość dystrybucji jest więc wypadkową wielu parametrów fizjochemicznych leku. One decydują o powinowactwie do określonych tkanek białek etc.. W objętości dystrybucji można wyróżnić dwa kierunki. Dystrybucję totalną - w przypadku gdy cząsteczki leku równomiernie rozmieszają się w wielu tkankach lub w wielu organach. Drugim typem jest dystrybucja o charakterze selektywnym, gdy cząsteczki leku rozmieszczają się głównie w wybranym typie tkanek lub określonym organie.

Leki lipofilne mają zwykle dużą objętość dystrybucji, co najczęściej jest konsekwencją ekspansywnej dyspozycji cząsteczek w całym organizmie. Jednocześnie wzrasta wartość biologicznego okresu półtrwania tych leków ze względu na dłuższy czas wycofywania cząsteczek leku z organizmu. Nie zawsze jednak wartość zarówno t1/2 leku dla fazy eliminacji jak i Vd zależne jest od lipofilności cząsteczki.

	Vd	t1/2	LogKOWIN
nimodypina	0,43	1,5	3,05
nikardypina	0,88	3,0	3,85
nifedypina	1,8	3,5	2,2
nisoldypina	4,5	9,0	3,26
felodypina	10,3	23	3,86
amlodypina	21	40	3,0



Ryc. Zależność między objętością dystrybucji a okresem półtrwania (brak zależności miedzy Vd i lub t1/2 z lipofilnością)

raloxifene	2348,0	chlorpheniramine	3,2	metformin	1,1
chloroquine	200,0	clonazepam	3,2	clindamycin	1,1
loratadine	120,0	isosorbide dinitrate	3,1	diazepam	1,1
amiodarone	66,0	cytarabine	3,0	finasteride	1,1
tamoxifen	55,0	granisetron	3,0	ganciclovir	1,1
fluoxetine	35,0	tocainide	3,0	lidocaine	1,1
azithromycin	31,0	hydromorphone	2,9	midazolam	1,1
fluvoxamine	25,0	indinavir	2,8	nicardipine	1,1
idarubicin	24,7	quinidine	2,7	risperidone	1,1
doxepin	24,0	pseudoephedrine	2,6	thalidomide	1,1
chlorpromazine	21,0	clarithromycin	2,6	triazolam	1,1
mefloquine	19,0	codeine	2,6	cimetidine	1,0
bupropion	18,6	nicotine	2,6	dapsone	1,0
haloperidol	18,0	naratriptan	2,4	didanosine	1,0
imipramine	18,0	cisapride	2,4	trazodone	1,0
nortriptyline	18,0	fludarabine	2,4	busulfan	1,0
amiloride	17,0	ketoconazole	2,4	prednisone	1,0
paroxetine	17,0	lisinopril	2,4	rifampin	1,0
olanzapine	16,4	zolmitriptan	2,4	acetaminophen	1,0
amlodipine	16,0	thiopental	2,3	tacrolimus	0,9
amitriptylline	15,0	ciprofloxacin	2,2	bupivacaine	0,9
donepezil	14,0	clonidine	2,1	allopurinol	0,9
itraconazole	14,0	naloxone	2,1	lamotrigine	0,9
misoprostol	14,0	moxifloxacin	2,1	abacavir	0,8
triamterene	13,4	albuterol	2,0	hydrochorothiazide	0,8
citalopram	12,3	atropine	2,0	azathioprine	0,8
butorphanol	12,0	bromocriptine	2,0	baclofen	0,8
sirolimus	12,0	cocaine	2,0	alfentanil	0,8
fluphenazine	11,0	paclitaxel	2,0	gabapentin	0,8
felodipine	10,0	sumatriptan	2,0	nabumetone	0,8
quetiapine	10,0	esmolol	1,9	quinupristin	0,8
saquinavir	10,0	ondansetron	1,9	cyclophosphamide	0,8
ivermectin	9,9	procainamide	1,9	erythromycin	0,8
bleomycin	9,7	selegiline	1,9	modafinil	0,8
ribavirin	9,3	letrozole	1,9	nifedipine	0,8
nalmefene	8,0	ofloxacin	1,8	amphotericin b	0,8
ropinirole	7,5	zileuton	1,8	felbamate	0,8
velafaxine	7,5	enalapril	1,7	doxycycline	0,8
pramipexole	7,3	gatifloxacin	1,7	metronidazole	0,7
betaxolol	7,0	levodopa	1,7	isosorbide 5-mononitrate	0,7
amantadine	6,6	propofol	1,7	alprazolam	0,7
celecoxib	6,1	sufentanil	1,7	ethosuximide	0,7
atorvastatin	5,4	ethambutol	1,6	irbesartan	0,7
clozapine	5,4	trimethoprim	1,6	thiotepa	0,7
nalbuphine	5,4	carvedilol	1,5	acyclovir	0,7
buspirone	5,3	hydralazine	1,5	zolpidem	0,7
verapamil	5,0	tetracycline	1,5	isoniazid	0,7
flecainide	4,9	buprenorphine	1,4	phenytoin	0,6
mexiletine	4,9	carbamazepine	1,4	pioglitazone	0,6
phenylephrine	4,9	gemcitabine	1,4	atovaquone	0,6
cyclosporin	4,5	neostigmine	1,4	fluconazole	0,6
diphenhydramine	4,5	zidovudine	1,4	prazosin	0,6
mirtazapine	4,5	levofloxacin	1,4	topiramate	0,6
meperidine	4,4	lamivudine	1,3	disopyramide	0,6
propranolol	4,3	lorazepam	1,3	cetirizine	0,6
metoprolol	4,2	minocycline	1,3	nitrofurantoin	0,6
fentanyl	4,0	oxybutynin	1,3	mercaptopurine	0,6
isradipine	4,0	ranitidine	1,3	methotrexate	0,6
methadone	3,6	tiagabine	1,3	ethanol	0,5
dofetilide	3,4	zaleplon	1,3	phenobarbital	0,5
metoclopramide	3,4	clorazepate	1,2	stavudine	0,5
diltiazem	3,3	mebendazole	1,2	zalcitabine	0,5
morphine	3,3	rofecoxib	1,2	repaglinide	0,5
nitroglycerin	3,3	methylprednisolone	1,2	levetiracitam	0,5
		sildenafil	1,2	theophylline	0,5

pravastatin	0,5	amikacin	0,3	diclofenac	0,2
melphalan	0,5	cefepime	0,3	glipizide	0,2
alendronate	0,4	cephalexin	0,3	ceftriaxone	0,2
dalfopristin	0,4	pancuronium	0,3	naproxen	0,2
fluvastatin	0,4	sulfamethoxazole	0,3	acetylsalicylic acid	0,2
ritonavir	0,4	5-fluorouracil	0,3	flurbiprofen	0,2
entacapone	0,4	rosiglitazone	0,3	ibuprofen	0,2
vancomycin	0,4	carboplatin	0,2	montelukast	0,2
oseltamivir	0,4	cefotaxime	0,2	sulfisoxazole	0,2
cidofovir	0,4	ceftazidime	0,2	cefotetan	0,1
etoposide	0,4	imipenem	0,2	chlorthalidone	0,1
lansoprazole	0,4	valsartan	0,2	clofibrate	0,1
omeprazole	0,3	zanamivir	0,2	gemfibrozil	0,1
tobramycin	0,3	valproic acid	0,2	warfarin	0,1
gentamicin	0,3	amoxicillin	0,2	bumetanide	0,1
cefexime	0,3	ketorolac	0,2	candesartan	0,1
remifentanil	0,3	cefuroxime	0,2	furosemide	0,1
chlorambucil	0,3	dobutamine	0,2	tolbutamide	0,1
indomethacine	0,3	Glyburide	0,2	tolcapone	0,1
cisplatin	0,3	tamsulosin	0,2	sulfasalazine	0,1
		cefazolin	0,2	chlorpropamide	0,1
		glimepiride	0,2	dicloxacillin	0,1

Rys.Przybliżone wartości Vd wybranych leków (L/kg)

Szczególne problemy z zakresu dystrybucji leków

Szczególne przypadki dystrybucji leków to problemy związane między innymi z dystrybucją leków w stanach otłuszczenia, szczególnych stanach fizjologicznych (ciąża) i pokonywaniem tzw. barier specjalizowanych. Do barier takich zaliczane są między innymi bariery:

- krew / mózg; krew / oko
- krew / płód
- krew / mocz
- krew / mleko
- krew / szpik kostny

Najczęściej stopień dystrybucji pomiędzy wymienionymi kompartmentami a kompartmentem centralnym - krwią opisują równania odwołujące się do wartości średniego stężenia w obu środowiskach. Ich wynikiem jest współczynnik relacjonujący wartość transferu przez bariery dzielące oba kompartmenty - osocza - P (ang.: *Plasma*) i kompartmentu badanego. Po stronie kompartmentu badanego analizie poddawane są zwykle płyny takie jak: płyn mózgowo rdzeniowy, krew, mleko, mocz, wody płodowe itp.. Rzadziej przedmiotem analizy są homogenaty tkanek.

(kompartment badany) / P = $C_{ss(kompartmentu\ badanego)}$ / C_{ssP}

Dystrybucja leków i toksyn w organizmie jest procesem uwarunkowanym najczęściej jednym z trzech głównych szlaków dystrybucyjnych, lub kilkoma jednocześnie. Szlaki te reprezentują:

- układ krążenia - sieć naczyń żylnych i tętniczych
- układ pokarmowy - drenaż organizmu przez przewód pokarmowy (GIT)
- układ limfatyczny - drenaż organizmu przez naczynia chłonne

Zakres dystrybucji zwykle wiąże się z udziałem kilku systemów co nierzadko czyni zjawisko dystrybucji bardzo złożonym. Złożoność zjawisk dystrybucji redystrybucji i równoczesny charakter procesów kinetycznych jakim ulega lek w dodatkowy sposób komplikują opis transferu przez bariery specjalizowane. Proces dystrybucji przez bariery specjalizowane jest procesem złożonym, związanym często z pokonywaniem przez cząsteczki leku kilku środowisk o zupełnie różnych właściwościach fizykochemicznych. Jednak transport leków przez takie układy nie podlega jedynie zasadom dystrybucji związanym z cofaniem lub postępowaniem jonizacji cząsteczki i nie tylko zmianami lipofilności, czy zmianom stężenia we krwi. Ważne są tu wskaźniki fizjologiczne określające możliwości i charakter procesu dystrybucji. Dotyczy to zjawiska dystrybucji zarówno w skali makro jak i złożonych mechanizmów regulatorowych na poziomie komórkowym. Wyprodukowanie jednego litra mleka przez krowę wymaga przepływu krwi przez gruczoł mlekowy na poziomie około 200 litrów. Między innymi i to zapewnia transfer wielu leków do mleka związany z ogromną perfuzją tkanki. Czynniki regulujące transport w skali mikro to między innymi układy białkowe wypompowujące ksenobiotyki z komórek i ograniczające ich wchłanianie i dystrybucję. Przykładem takiego białka jest P - glikoproteina. Jej rola dla procesów dyspozycji leków w organizmie jest ogromna i dotyczy nie tylko zjawisk związanych z dystrybucją przez bariery specjalizowane. W wielu przypadkach decyduje także bezpośrednio o przebiegu faz ADE (Fromm M.F. 2000; Tanigawara Y. 2000; Ayrton A., Morgan P. 2001). Wiele leków może być dla P - glikoproteiny substratami - induktorami (ryfampicyna), znana jest również spora grupa inhibitorów jej funkcji. Znanymi inhibitorami funkcji tego białka są: cymetydyna, erytromycyna, chinidyna, ketokonazol i probencyd. Przyczynia się to do zaistnienia wielu interakcji farmakokinetycznych z udziałem tego systemu transportującego. P - glikoproteina zmienia absorpcję leków (wzrost zmienności lub brak liniowości kinetytki) przez barierę krew - mózg, wpływa na wchłanianie leków z przewodu pokarmowego. Może ograniczać klirens wewnętrzny wielu leków w obrębie wątroby i decydować o stopniu dystrybucji leku do dróg żółciowych. Obecna jest również w nerkach i może warunkować klirens nerkowy niektórych leków. Znajduje się także w jądrach i ciężarnej macicy.

Szczególne problemy w zakresie dystrybucji leków to nie tylko utrudnienia w pokonywaniu barier specjalizowanych. To również projektowanie leków wykazujących powinowactwo do systemów aktywnego transportu poprzez bariery błonowe. Problemem w zakresie planowania dystrybucji cząsteczek leku jest celowanie cząsteczek w określona tkankę lub kompartment. Obecnie wiele problemów dotyczących osiągania celu w organizmie rozwiązują wciąż nowe technologie formułowania postaci leku. Są to między innymi zaawansowane systemy nośnikowe takie jak liposomy. Rozwiązywanie szczególnych problemów w zakresie dystrybucji leków w organizmie związanych z barierami specjalizowanymi oraz celowaniem w tkankę lub przestrzeń wymaga dwojakiego typu optymalizacji.

- "upraszczania" przebiegu dystrybucji po podaniu leku
    - kontrola absorpcji
    - kontrola dystrybucji we wczesnej fazie
- kontrola wchłaniania do tkanki docelowej
- kontrola dystrybucji w tkance docelowej

Dystrybucja leków do ośrodkowego układu nerwowego - CNS (ang.: *Central Nervous System*)

Dystrybucja leków przez barierę krew / mózg - BBB (ang.: *Blood Brain Barrier*) odbywa się zwykle na drodze dyfuzji biernej, jednak dla niektórych leków procesom tym mogą towarzyszyć zjawiska transportu aktywnego. Obecnie w celu badania dystrybucji leków do CNS stosuje się techniki:

- *in silico*
  - SAR, QSAR
- *in vitro*
- perfuzja tkanki mózgowej (*in situ*)
- *in vivo*
  - określenie współczynnika rozdziału mózg/osocze
  - określenie BUI (ang.: *Brain Uptake Index*) oraz BEI (ang.: *Brain Efflux Index*)
  - techniki mikrodializy
  - podanie jednorazowe dożylne
  - podanie kasetowe

Barierę krew/mózg (BBB) u człowieka tworzy około 600 km naczyń krwionośnych o powierzchni ok 12 m^2 (Raub T.J. 2003). Mózg jest tkanką dość szczególną ponieważ praktycznie nie istnieje w jego obrębie dystrybucja poprzez przestrzeń międzykomórkową (Rapoport S.I. 1992). Perfuzja tkanki mózgowej jest niewielka i wynosi u człowieka poniżej 1 ml/min/g (Upton R.N., Doolette D.J. 1999). Ogólnie przyjęto że dystrybucji poprzez BBB ulegają tylko leki niezwiązane z białkami osocza. Jednak niektóre badania potwierdzają fakt przechodzenia części leków związanych z albuminami do CNS (Tanaka H., Mizojiri K. 1999). Mechanizm przechodzenia części leku związanego z albuminami w istocie miałby dotyczyć molekuł związanych z białkiem którego konformacja zmienia się w kontakcie z komórkami śródbłonka. Skutkuje to dysocjacją i dystrybucją cząsteczki leku przez barierę BBB. Zjawisko to jest niezwykle ważne z uwagi na wynikające stąd różnice badań *in vitro* i *in vivo* dotyczące ilości leku wolnego w osoczu i w OUN. W badaniach *in vivo* określa się tylko stopień wiązania leku z białkami. Przedmiotem badań nie jest zatem zjawisko ewentualnej dysocjacji cząsteczki lek - białko w kontakcie ze śródbłonkiem naczyń. Bardzo dobrze przenikają do płynu mózgowo rdzeniowego cząsteczki o niewielki rozmiarach i MW < 400 D. Zależność masy cząsteczkowej związku od parametrów fizjologii transportu przez kapilary w obrębie OUN ilustruje formuła:

$$\mathbf{Perm \times a = MW^{-0.63}}$$

Perm - przenikalność (ang.: *Permeability*)
a - stosunek objętości do powierzchni kapilar
MW - masa cząsteczkowa (ang.: *Molecular Weight*)

W modelach *in vivo* przenikalność można obliczyć stosując równanie (Doan K.M.M. i wsp. 2003):

$$\mathbf{Perm = [1 / (S \times C_0)] \times K}$$

Perm - przenikalność (ang.: *Permeability*)
S - powierzchnia błony
Co - stężenie wyjściowe
K - stała szybkości procesu

Najlepiej BBB penetrują leki o zdecydowanych właściwościach lipofilnych. Mózg jako tkanka wykazuje większą lipofilność niż krew. Wynika to między innymi z faktu iż osłonki mielinowe włókien nerwowych, mają funkcję izolatora, zbudowanego w głównej mierze właśnie z tłuszczów. Jeżeli lipofilność leku zależna jest od jego stopnia zdysocjowania to zdolność do pokonywania bariery krew / mózg jest tym większa im mniejszy jest stopień dysocjacji leku we krwi. Dla wielu leków dostępność dla przestrzeni jaką jest mózg jest wprost proporcjonalna do współczynnika rozdziału oktanol / woda.

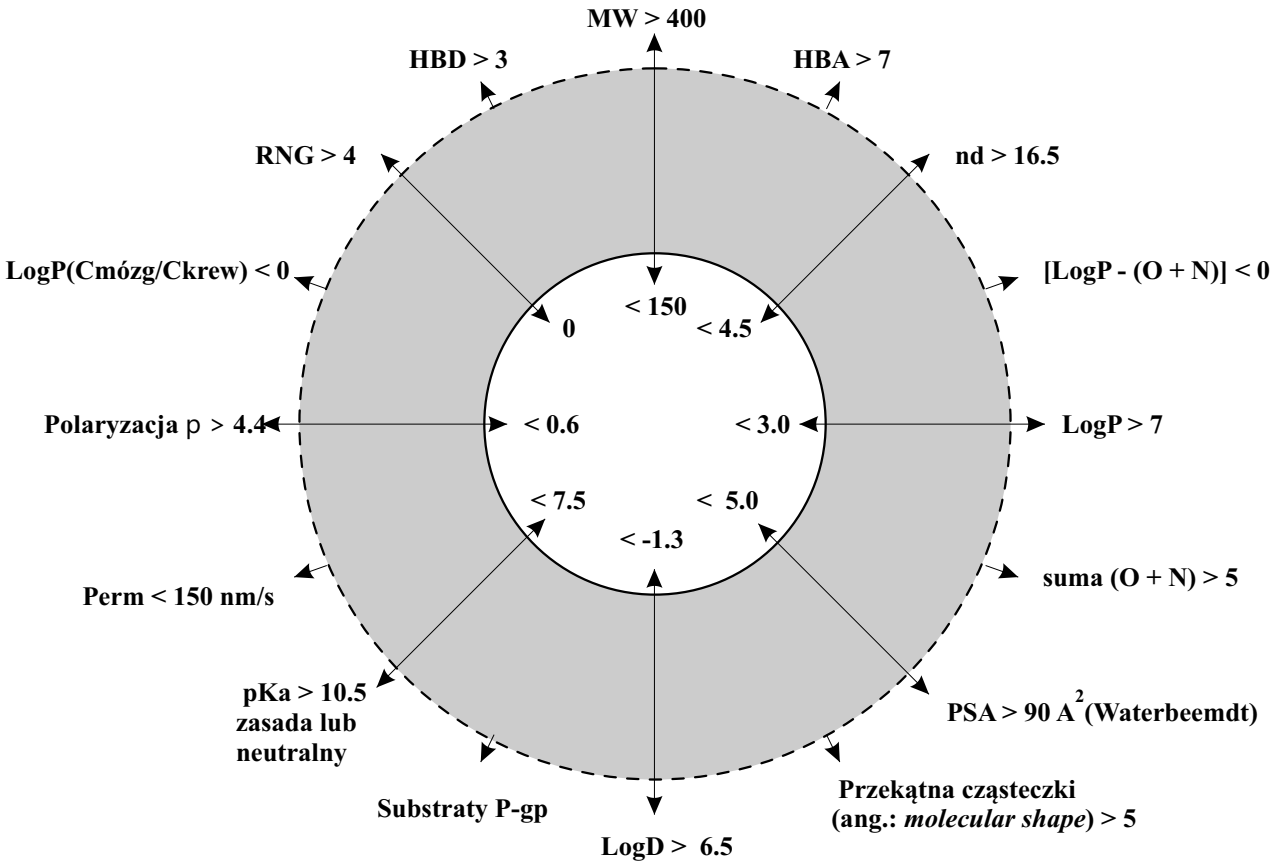
Stąd wykazano korelację między współczynnikami rozdziału oktanol / woda - P(o/w) i cykloheksan / woda - P(c/w) a przenikalnością przez barierę krew / mózg (Clark D.E. 2001).

$$\textbf{Log BB = - 0.485 x (LogP}_{(o/w)} \textbf{ - LogP}_{(c/w)}\textbf{) + 0.899}$$

W chwili obecnej najdokładniejszym wskaźnikiem opisującym transfer leku przez BBB są korelację pomiędzy współczynnikami rozdziału, polarnością i innymi fizykochemicznymi parametrami leku (Testa B. i wsp. 2001). Jeżeli jednak dostępność substancji jest niska a lek jest lekiem z wyboru duże znaczenie w terapii schorzeń mózgu mają wlewy do płynu mózgowo rdzeniowego prowadzone w postaci mikroinfuzji. Obecnie duże znaczenie w projektowaniu na poziomie molekularnym leków których dystrybucja ma obejmować CNS ma opis parametrów fizjochemicznych leku. Duże znaczenie dla obliczenia wartości stosunku stężenia leku w mózgu do stężenia leku we krwi wyrażonego jako Log ($C_{(OUN)} / C_p$) czyli Log BB (ang.: *Brain / Blood*) mają objętość cząsteczki - MV (ang.: *Molecular Volume*) oraz powierzchnia części polarnej PSA (ang.: *Polar Surface Area*). Udowodniono bowiem że dla wielu leków cechy te wykazują dużą korelację z Log BB, podobnie jak Log P i MW (Chun F.X. i wsp. 2001;Clark D.E. 2001).

$$\textbf{LogBB = - 0.016 x PSA + 0.547}$$

$$\textbf{LogBB = - 0.0322 x PSAd + 1.33}$$



Rys. Tarcza trafności wyboru substancji chemicznej do grupy leków których kompartmentem docelowym jest CNS. Duży procent tej grupy leków lokuje wartości wskazanych wyżej parametrów w części wykresu wyróżnionej szarym kolorem.

Lub

$$\mathbf{LogBB = - 1.037 \times 10^{-3} \times V^2 + 6.755 \times 10^{-3} \times MV - 0.01808 \times PSA - 0.1581}$$

$$\mathbf{LogBB = - 0.021 \times PSA - 0.003 \times MV + 1.643}$$

MV - objętość cząsteczki
PSA - powierzchnia części polarnej

Związek między PSA a LogP wyraża również inne równanie gdzie LogP jest wartością obliczeniową - obliczoną za pomocą algorytmu CLogP.

$$\mathbf{Log\ BB = - 0.0148 \times PSA + 0.152 \times LogP + 0.139}$$

Coraz większej liczbie parametrów fizjochemicznych, przypisuje się duże znaczenie w selekcji wirtualnej leków, których docelowym kompartmentem jest CNS (Clark D.E. 2001 ; Doan K.M.M. i wsp. 2002). Podobnie jak w innych technikach obliczeniowych *in silico* i tutaj istnieje kilka kierunków rozwoju technik obliczeniowych. Dwa podstawowe to badania przenikalności BBB na podstawie baz danych właściwości leków już znanych.

Związek	MW	$logD_{7,4}$	logP	$LogS_w$	SR	tPSA	$Log(MW^{-0,5})$	$Log(DxMW^{-0,5})$	BBB perm
Antypiryna	188,2	0,27	0,27	0,80	2,26	23,55	-1,14	-0,87	-0,17
Kofeina	194,2	-0,08	-0,08	1,28	2,04	58,44	-1,14	-1,22	-0,74
Chlorambucyl	304,2	1,13	3,7	-3,94	4,46	40,54	-1,24	-0,11	0,10
Kolchicyna	399,4	1,03	1,03	-0,25	2,75	83,09	-1,30	-0,27	-0,93
Daunomycyna	527,5	0,58	2,39	-2,13	3,62	185,84	-1,36	-0,78	-2,25
Digoksyna	781	1,14	1,14	-0,40	2,82	203,06	-1,45	-0,31	-2,69
Dopamina	153,2	-2,09	0,12	1,00	2,17	66,48	-1,09	-3,18	-0,83
Fluoksetyna	309,3	1,69	4,35	-4,83	4,87	21,26	-1,25	0,44	0,49
Glicyna	75,07	-5,83	-3,33	5,77	-0,04	63,32	-0,94	-6,77	-1,30
Hipoksantyna	138,1	-0,59	-0,59	1,98	1,71	69,81	-1,07	-1,66	-0,98
Levodopa	197,2	-5,04	-2,53	4,66	0,47	103,78	-1,15	-6,19	-1,78
Metotreksat	454,5	-1,46	-0,28	1,56	1,91	210,54	-1,33	-2,79	-3,02
Morfina	285,3	0,46	1,27	-0,58	2,90	52,93	-1,23	-0,77	-0,45
Fenyloalanina	165,2	-3,7	-1,19	2,81	1,33	63,32	-1,11	-4,81	-0,98
Fenytoina	252,3	2,44	2,52	-2,31	3,70	58,2	-1,20	1,24	-0,34
Propranolol	259,4	1,34	3,09	-3,09	4,07	41,49	-1,21	0,13	-0,01
Chinidyna	324,4	1,72	3,44	-3,58	4,29	45,59	-1,26	0,46	-0,01
Kwas salicylowy	138,1	-1,86	2,06	-1,67	3,41	57,53	-1,07	-2,93	-0,40
Kwas taurocholowy	515,7	-3,06	1,04	-0,27	2,76	144,16	-1,36	-4,42	-1,84
Testosteron	288,4	3,47	3,47	-3,62	4,31	37,3	-1,23	2,24	0,11
Teobromia	180,2	-0,79	-0,79	2,26	1,58	67,23	-1,13	-1,92	-0,98
Teofilina	180,2	0,02	0,05	1,10	2,12	69,3	-1,13	-1,11	-0,88
Kwas walproikowy	144,2	-0,02	2,53	-2,32	3,71	37,3	-1,08	-1,10	-0,03
Ksantyna	152,1	-0,81	-0,81	2,29	1,57	86,88	-1,09	-1,90	-1,27

Rys. Wybrane parametry SAR dla grupy leków. [(tPSA,MW; LogD; LogP;Log(D x $MW^{-0,5}$)), (Liu X. i wsp 2004)], SR na podstawie Dressman J.B. 2001, BBB perm na podstawie Clark D.E. 2001.

Reguła pięciu w stosunku do leków OUN jest stale rozszerzana i obecnie obejmuje liczne dodatkowe wskazówki opisujące cechy typowych leków pokonujących barierę BBB (Doan K.M. i wsp. 2002; Raub T.J. 2003; Bickel U. 2005).

- aktywność takich leków określa się jako niska lub bardzo niską
- nie są raczej substratami CYP2D6 i nie indukują CYP3A4
- nie są substratami dla P-gp a współczynnik rozdziału Cmózg/ Ckrew > 1.0
- nie posiadają zbyt dużego powinowactwa do albumin
- zwykle mają słaby ładunek dodatni a rzadko ładunek ujemny
- substancje OUN aktywne mają zwykle mniejszą wartość HBD od OUN nie aktywnych
- substancje OUN aktywne mają zwykle niską polarność i dużą objętość cząsteczki
- substancje OUN aktywne mają mniej wiązań ulegających rotacji (są mniej "elastyczne")

	CLogP	MiLogP	KOWin	*średnia*	tPSA
tetrahydrokanabinol	7.2	7.0	7.6	7.30	29.5
tubokuraryna	9.3	4.1	4.0	5.82	80.6
ibogaina	4.3	4.2	3.7	4.02	37.1
lobelina	4.3	3.9	3.7	3.97	40.5
cykutoksyna	2.5	4.3	4.6	3.77	40.5
harmalina	2.2	1.7	4.6	2.87	37.4
MDE	2.4	2.6	2.8	2.58	30.5
harmalol	1.6	1.4	4.1	2.38	48.4
LSD	2.7	1.9	2.3	2.27	39.3
kokaina	2.6	1.9	2.2	2.22	55.8
MDMA	1.9	2.1	2.3	2.08	30.5
amfetamina	1.7	1.8	1.8	1.78	26.0
strychnina	1.7	1.4	1.9	1.62	32.8
fizostygmina	2.0	1.5	1.3	1.58	44.8
psylocyna	1.4	1.3	1.5	1.39	36.4
bufotenina	1.4	1.3	1.5	1.39	36.4
kodeina	1.0	1.6	1.3	1.29	41.9
anabazyna	1.0	1.4	1.3	1.23	24.9
efedryna	0.9	1.4	0.7	1.00	32.3
meskalina	0.7	1.2	0.9	0.94	53.7
nikotyna	0.9	0.9	1.0	0.94	16.1
tyramina	0.8	1.0	0.9	0.88	46.3
katyna	0.6	0.9	0.2	0.55	46.3
skolpolamina	0.3	0.4	0.4	0.37	62.3
pilokarpina	-0.2	1.1	0.2	0.37	44.1
kofeina	- 0.04	- 0.6	0.2	- 0.15	61.8
muscymol	-0.7	- 0.2	- 0.8	- 0.56	72.3
muskaryna	0.9	0.2	-3.5	-0.84	29,5
M	2.0	1.8	1.9	1.9	42.1
SD	2.1	1.6	2.1	1.8	14.6

Ryc. Przykłady związków o silnie wyrażonym działaniu na obwodowe i centralne struktury układu nerwowego. Większość to związki lipofilne (LogP(o/w) ok. 2.0) które cechuje niska wartość topologicznego polarnego pola powierzchni (tPSA ok. 43 A).

Kolejny ważny kierunek to badanie substruktur cząsteczki leku. Pozwala ono na kwalifikowanie nowych leków do dalszych badań, na podstawie wykazania ich podobieństwa do budowy leków działających na OUN (Engkvist O. i wsp. 2003). Analiza substrukturalna jest nieco zbliżona do analizy QSAR grup farmakoforowych i ma wymiar statystyczny. Polega na potwierdzeniu w badanej grupie potencjalnych leków odpowiedniej liczby aktywnych w stosunku do struktur CNS grup funkcyjnych. Na tej podstawie leki można dzielić na CNS+ (wykazujące działanie na CNS) oraz CNS- (nie wykazujące takiego działania). Wskazać można także kluczowe grupy funkcyjne CNS+ oraz CNS-. Korzystając więc z odpowiedniego równania można do pewnego stopnia opisać podobieństwo do leku OUN+.

$$\mathbf{MSOF = F_{(CNS+)} / F_{(CNS+)} + F_{(CNS-)}}$$

MSOF - molekularny wyznacznik sumy wszystkich grup funkcyjnych (ang.: *Molecular Sum Over all Fragments*)
F(CNS+) - suma fragmentów - grup funkcyjnych charakterystycznych dla leków CNS+
F(CNS-) - suma fragmentów - grup funkcyjnych charakterystycznych dla leków CNS-

MSOF jest parametrem którego wartość nie przekracza 1.0. W przypadku gdy wartość parametru jest wyższa od 0.5 można podejrzewać związek o aktywność wobec struktur CNS (Engkvist O. i wsp. 2003). Jednym z wielu parametrów które mogą relacjonować dostępność substancji dla struktur ośrodkowego układu nerwowego jest współczynnik :

$$\mathbf{Log(D) \times Log(MW^{-0,5})}$$

Wartość reprezentująca zarówno współczynnik rozdziału oktanol woda jak i masę cząsteczkową leku, relacjonuje możliwości dystrybucji leku przez BBB (Murakami H. i wsp 2000; Liu X. i wsp 2004). Obliczenia typu SAR parametrów wykazujących znaczną korelację z przenikalnością bariery krew - mózg rozszerzyć można również na inne, nietypowe problemów dyspozycji leków w obrębie CNS. Jednym z pierwszych równań określających zależność pomiędzy parametrami topologicznymi a współczynnikiem rozdziału mózg / krew czyli Log BB było równanie Abrahama (Bickel U. 2005):

$$\mathbf{LogBB = -0.02 + 0.47 \times MR - 0.86 \times \pi - 0.59\alpha 2^{H} - 0.71 \times \beta 2^{H} + 0.90 \times MV + 0.56 \times I}$$

MR - refrakcja molowa (ang.: *Molar Refractivity*)
π - polaryzacja
$\alpha 2^{H}$ - kwasowość miejsc wiązania wodoru (ang.: *Hydrogen Bond Acidity*)
$\beta 2^{H}$ -zasadowość miejsc wiązania wodoru (ang.: *Hydrogen Bond Basicity*)
MV - objętość cząsteczki McGovan'a
I - współczynnik zależny od obecności grup karboksylowych

Jedną z bardziej typowych metod badawczych jest określenie współczynnika wychwytu przez CNS - BUI oraz współczynnika eliminacji BEI (Tunblad K. 2004). Parametry te oblicza się na podstawie równania:

$$\mathbf{BUI\ (\%) = (C_{[CNS]} / C_{[CNSref]}) / (D / D_{[ref]}) \times 100}$$

$$\mathbf{BEI\ (\%) = 1 - (C_{[CNS]} / C_{[CNSref]}) / (D / D_{[ref]}) \times 100}$$

C[CNS] - stężenie leku badanego w tkance mózgowej
C[CNSref]- stężenie leku referencyjnego w tkance mózgowej
D - dawka leku badanego
D[ref] - dawka leku referencyjnego

Inną metodą określenia wychwytu leku przez CNS jest określenie stałej szybkości - Kin na podstawie podania dożylnego leku i określenia stężenia leku w tkance mózgowej.

$$\mathbf{Kin = C_{[CNS]} / AUC_{[i.v.]}}$$

lub w przypadku wlewu *in situ*:

$$\mathbf{Kin = C_{(CNS)} / C_{(perf)} \times T}$$

C(CNS) - stężenie leku w tkance mózgowej
AUC[i.v.] - pole powierzchni pod krzywą stężeń C-T po jednorazowym podaniu dożylnym
C(perf) - stężenie leku w perfuzacie
T - czas trwania wlewu

Podobną metodą określa się klirens - Cl dla tkanki mózgowej

$$\mathbf{Cl_{(CNS)} = K_{el} \times V_{[CNS]}}$$

V[CNS] - objętość mózgu
Kel - stała szybkości eliminacji leku z mózgu

Oraz klirens leku opisujący jego transfer z krwi do mózgu po podaniu jednorazowym:

$$\mathbf{Clin = Kin \times Vd}$$

po podaniu leku w formie wlewu:

$$\mathbf{Clin = Kin \times (Vd / 2)}$$

Vd - objętość dystrybucji leku we krwi
Kin - stała szybkości transferu leku z krwi do mózgu

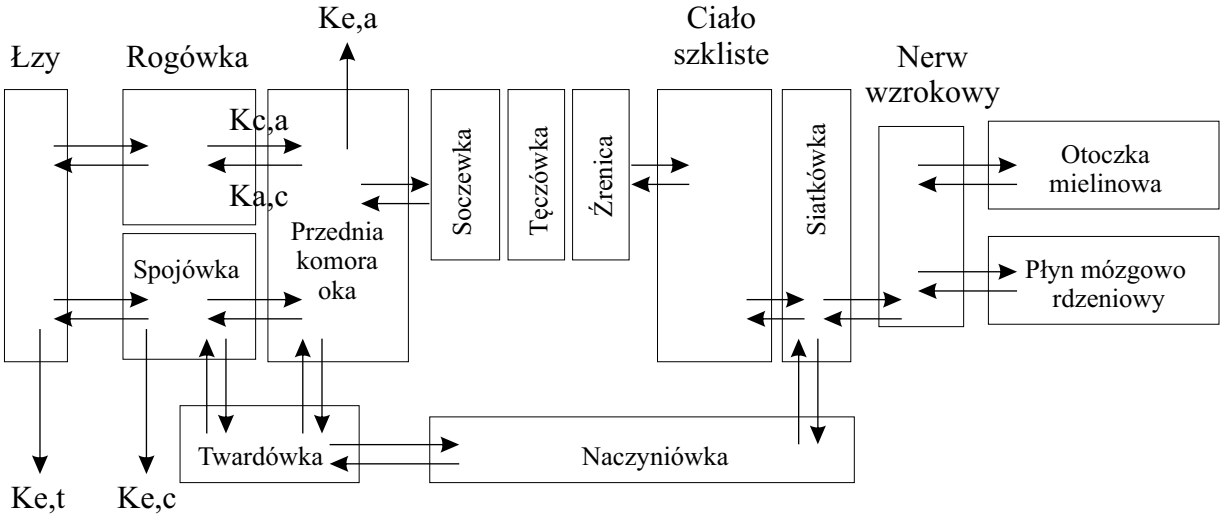
Jednym z ważniejszych aspektów analizy farmakokinetyki leków dla których docelową przestrzenia jest mózg stanowi analiza powinowactwa leku do białek rodziny ABC. Na granicy krew - mózg zlokalizowano co najmniej kilka różnych białek błonowych odpowiedzialnych za ATP zależny system wypompowywania cząsteczek leku (Loscher W., Potschka H. 2005). Stąd jedną ze standardowych procedur analizy farmakokinetyki leku jest w tym wypadku określenie powinowactwa do tych właśnie białek. Są to między innymi:

- Białko P-gp oznaczone także jako ABCB1
- MRP1 [ABCC1] - inhibitorami białka są probencyd, sulfinpirazon, cyklosporyna A, werapamil
- MRP2 [ABCC2]
- MRP3 [ABCC3] - inhibitorami białka są probencyd, sulfinpirazon, indometacyna
- MRP4 [ABCC4]
- MRP5 [ABCC5] - inhibitorami białka są probencyd, trekwensyna, sildenafil
- MRP6 [ABCC6]
- BCRP [ABCG2] - inhibitorem białka jest między innymi fumitremorgina

Dyspozycja leków w oku

Podanie leku którego przestrzenią efektorową jest oko i jego składowe zwykle wymaga bezpośredniego podania leku dospojówkowo w postaci kropli, lub do oka lub drogą donaczyniową w postaci iniekcji (np... ranibizumab). Nowoczesne technologie stosowane w formulacji postaci leku pozwalają obecnie na wytwarzanie bardzo zaawansowanych postaci leków stosowanych w chorobach oka. Są to między innymi plastry dorogówkowe oraz inplanty (Velez G., Witcup S.M. 1999). Nie zawsze podanie dospojówkowe zapewnia odpowiednio wysokie stężenie terapeutyczne leku wewnątrz oka. Przykładem może być ciprofloksacyna która podana enteralnie osiąga w oku wyższe stężenie niż po podaniu dospojówkowym (Cekic O. i wsp. 2000). Wiadomo że stopień dostępności leku z powierzchni rogówki zależny jest między innymi od lipofilności i masy cząsteczkowej leku. W przypadku twardówki wiadomo że większą korelację wykazuje średnica molekuły. Przez twardówkę lepiej wchłaniają się leki o większej kulistości i mniejszym sfałdowaniu (Ambati i wsp. 2000). Masa cząsteczkowa w tym wypadku ma mniejsze znaczenie (Koevary S.B. 2003). Wiadomo także że wchłanianie leków przez twardówkę zmienia się wraz z wiekiem. Z wiekiem zwiększa się bowiem hydratacja twardówki szczególnie w części tylnej (Boubriak O.A. i wsp. 2003; Boubriak O.A. i wsp. 2003). W modelach kompartmentowych oko najczęściej opisywane jest w ramach modelu jednokompartmentowego chociaż dokładna analiza wyróżnia w oku kilka kompartmentów. Modelem jednokompartmentowym opisać można dystrybucję leku z płynu łzowego do rogówki. Już w modelu dwukompartmentowym opisać można dyspozycję leku między rogówką a komorą przednią oka. W obliczeniach farmakokinetycznych stosuje się w przypadku oka także analizę w modelach fizjologicznych, symulacje *in silico* oraz modele populacyjne, PK/PD i hybrydowe (Mishima S. 1981; Morlet N. i wsp. 2000). Oko nie jest kompartmentem zamkniętym i "szczelnym" z punktu widzenia farmakokinetyki. Z uwagi na anatomię organu jest oddzielona od innych przestrzeni kinetycznych w organizmie. Wiadomo jednak że niektóre leki podawane do oka miejscowo (insulina) osiągają szybko wysokie stężenie w płynie mózgowo rdzeniowym i mózgu (Koevary S.B. 2003). Duże znacznie dla dyspozycji leków w oku ma między innymi bardzo różne unaczynienie substruktur oka. Najważniejsze czynniki wpływające bezpośrednio na kinetykę leku w obrębie oka to:

- parametry fizjochemiczne i topologiczne cząsteczki leku
- wybór postaci leku i drogi podania, lepkość leku (krople)
- kinetyka leku w worku spojówkowym oraz łzach
- wiązanie leku z białkami płynu łzowego
- przepuszczalność rogówki dla cząsteczek leku
- stała szybkości eliminacji leku z oka



Rys. Dyspozycja leków w oku.

Po podaniu leku do worka spojówkowego następuje jego rozmieszczenie w filmie tworzonym przez płyn łzowym znajdującym się dookoła oka. Dopiero stąd może podlegać procesom wchłaniania przez rogówkę (Mishima S. 1981). Podanie dospojówkowe leku w pierwszej fazie wiąże się z rozprowadzaniem go w objętości jaką tworzy płyn łzowy. U człowieka wynosi ona około 10 ml. Objętość leku jaka może być podana w postaci kropli do oka waha się w granicach 20-50ml. Absorpcja leku z płynu łzowego zależna jest w dużym stopniu od średniego czasu przebywania leku w płynie łzowym - MRT. Czas ten zależny jest głównie od lepkości postaci leku. Optymalne wartości dla kropli to 10 - 20 CS (ang.: *Centistockes*). Spojówka ma wielokrotnie większa powierzchnię od rogówki stąd duża część leku wchłaniana jest właśnie tutaj częściowo podlegając eliminacji. Część leku ze spojówki może dostać się do komory przedniej oka oraz twardówki. Spojówka również z powodu większych niż w rogówce przestrzeni międzykomórkowych może absorbować związki o dużej masie cząsteczkowej. W obrębie płynu łzowego zachodzi wiązanie leku z białkami płynu łzowego i jego rozmieszczenie w dwóch proponowanych obecnie warstwach jakie pokrywają rogówkę. Warstwa zewnętrzna płynu łzowego to warstwa o charakterze lipidowym natomiast warstwa wewnętrzna to warstwa zbudowana głównie z cząsteczek wody i mucyn. Warstwa ta tworzy formę żelu. pH łez waha się między 7.4 a 7.7. Na ogół leki podawane miejscowo nie przekraczają pH w granicach 6-9 (Koevary S.B. 2003). Część leku może już w fazie uwalniania leku być eliminowana drogą kanału nosowo łzowego. Najczęściej transfer z kompartmentu tworzonego przez płyn łzowy do rogówki przebiega dość szybko i przedstawiany jest za pomocą typowych równań opisującym model jednokompartmentowy. Maksymalne stężenie leku w rogówce ilustruje równanie:

$$\mathbf{t_{max,c}} = (\ln K_{e,t} / K_{e,c}) / (b - K_{e,c})$$

$t_{max,c}$ - stężenie maksymalne leku w rogówce
$K_{e,t}$ - stała eliminacji leku z łez
$K_{e,c}$ - stała eliminacji leku z rogówki

Przy założeniu że $K_{e,t}$ ma wartość wyższą od $K_{e,c}$ wartość stężenia początkowego w rogówce wyrazić można wzorem:

$$\mathbf{C_{o,c} = (K_{tc} \times C_{o,t}) / (K_{e,t} - K_{e,c})}$$

$C_{o,c}$ - stężenie początkowe w rogówce
$C_{o,t}$ - stężenie początkowe w płynie łzowym
$K_{e,t}$ - stała eliminacji leku z łez
$K_{e,c}$ - stała eliminacji leku z rogówki
$K_{t,c}$ - stała szybkości transportu leku z łez do rogówki

Przedstawione zależności pozwalają także wyprowadzić zależność ilustrującą przepuszczalność nabłonka rogówki:

$$\mathbf{P = (C_{o,c} \times V_c \times K_{e,t}) / (A \times C_{o,t})}$$

P - przepuszczalność bariery nabłonka rogówki
V_c - objętość rogówki
A - powierzchnia rogówki

Przekroczenie bariery jaką jest rogówka dla leku podanego dospojówkowo oznacza kierunek lokalizacji w komorze przedniej oka. Jednak w stosunku do większości stosowanych leków tylko do 10% dawki leku pokonuje barierę rogówkową. Bariera ta jest efektywną zaporą zarówno dla leków zdecydowanie hydrofilnych jak i silnie lipofilnych. Składa się z trzech warstw z których zewnętrzne warstwy nabłonkowe mają charakter lipofilny natomiast wewnętrzna - *stroma* hydrofilny. W czasie dystrybucji leku do komory przedniej oka zachodzi jego eliminacja jeszcze w czasie jego obecności w płynie łzowym. Pomiędzy rogówką a przednią komorą oka dochodzi zwykle do dwukierunkowego transportu leku z rogówki do wnętrza oka i z komory przedniej do rogówki. Proces ten osiąga stan ustalony wyrażony równaniem:

$$Kss = Kc,a / Ka,c$$

Kss - stała szybkości procesu eliminacji i wchłaniania do przedniej komory oka w stanie ustalonym
Kc,a - stała szybkości przechodzenia leku z rogówki do komory przedniej oka
Ka,c - stała szybkości przechodzenia leku z komory przedniej oka do rogówki

Wynikiem analizy dwukompartmentowej, kinetyki leku w układzie rogówka, komora przednia oka jest obliczenie wartości ekstrapolowanego stężenia dla fazy eliminacji - B. Wartość ta opisuje eliminację leku z komory przedniej oka stąd pozwala obliczyć stałą szybkości eliminacji z tego kompartmentu:

$$Ke,a = B \times [1 - Kss / (Cc / Ca)]$$

Ke,a - stała szybkości eliminacji leku z komory przedniej oka
B - wartość stężenia ekstapolowanego ilustrującego nachylenie krzywej C-T w fazie eliminacji
Cc - stężenie leku w rogówce
Ca - stężenie leku w komorze przedniej oka

Dyspozycja leku w oku zapewniająca wysokie stężenie w obrębie celu terapeutycznego jakim jest siatkówka nie zawsze gwarantuje osiągnięcie stężenia terapeutycznego. Wiele leków wiąże się w sposób odwracalny z barwnikami siatkówki co powoduje spadek stężenia części wolnej leku. W przypadku niektórych antybiotyków łatwo osiągających kompartment docelowy jakim jest oko, wykryto zależność między współczynnikiem rozdziału oktanol/woda a stałą eliminacji (Liu W. i wsp. 1998). Wykryto także liniowe zależności między LogP(o/w) a okresem półtrwania oraz LogP(o/w) a procentem penetracji struktur oka (ciprofloksacyna, fleroksacyna, ofloksacyna, sparfloksacyna). Stwierdzono że okres półtrwania dla tych leków w oku rośnie ze spadkiem LogP(o/w). Natomiast procent penetracji oka przez lek wzrasta ze wzrostem wartości współczynnika rozdziału oktanol/woda.

Dystrybucja leków w ciąży

Analiza dyspozycji leku w ciąży może być prowadzona w modelach kompartmentowych. Częściej jednak zarówno analiza farmakokinetyczna jak i toksykokinetyczna odbywa się w tym wypadku z wykorzystaniem modelowania typu PBPK lub PBTK. Szybkość dystrybucji leku z krwi matki do krwi płodu podobnie jak w przypadku bariery krew / mózg zależna jest głównie od procesów dyfuzji biernej. Podobnie i tutaj niektóre substancje pokonują barierę łożyskową z wykorzystaniem transportu aktywnego. W znacznym stopniu wchłaniają się leki lipofilne i jeżeli cecha ta zależna jest od stopnia zdysocjowania związku - niezdysocjowane. Transfer leku przez łożysko zależny jest także od przepływu krwi przez łożysko jego budowy, powierzchni i ewentualnych patologii. U człowieka Cmax leku u matki manifestuje się Cmax we krwi płodu z opóźnieniem równym około godziny (Kostowski W., Kubikowski P. 1994). Stosunek i współczynnik rozdziału między stężeniem leku w obrębie tkanek płodu i matki opisuje równanie (Syme M.R. i wsp. 2004):

$$F/M = (C_{uM} / C_{uF}) \times [(1+10^{pKa-pH_F}) / (1+10^{pKa-pH_M})] \times [Cl_{MF} / (Cl_{FM} + Cl_F)]$$

CuM - stężenie leku niezwiązanego z białkami w osoczu matki
CuF - stężenie leku niezwiązanego z białkami w osoczu płodu
pHM - pH osocza matki
pHF - pH osocza płodu
ClMF - klirens leku opisujący jego eliminację z krwi płodu do organizmu matki
ClFM - klirens leku opisujący jego eliminację z krwi matki do organizmu płodu
ClF - eliminacja leku z krwi płodu

Słabo przechodzą przez łożysko związki już o masie przekraczającej 500 Da. Bardzo słabo przez łożysko przechodzą związki hydrofilne o dużej masie cząsteczkowej (>1000 Da). We wczesnych fazach rozwojowych embrion jest przestrzenią zasadową stąd możliwość osiągania tego kompartmentu przez słabe kwasy (EPA/630/R-01/004, 2001). Na transfer leków przez trofoblast wpływ ma obecność P-gp która może znacznie modyfikować proces dystrybucji. Dyspozycja leku w obrębie płodu nie dotyczy tylko zajęcia przestrzeni jego krwi lub tkanek. Lek taki zostaje wydalany do wód płodowych które stanowią kolejny kompartment w którym zachodzi dystrybucja leku . Dystrybucja leku z kompartmentu centralnego matki do kompartmentu centralnego płodu dotyczy w równej mierze leku jak i jego metabolitów. Jednak metabolizm leku w organizmie matki zwykle przebiega odmiennie niż w obrębie płodu. Stąd dystrybucja i przemiany leków w organizmie płodu dotyczą często innego rodzaju metabolitów lub nie poddanego procesom metabolicznym leku. Dystrybucja płodowa może mieć zatem często zupełnie inny kierunek i powodować dyspozycję leku w innych przestrzeniach niż w organizmie dojrzałym. W obrębie wątroby płodu w największym stężeniu notuje się obecność CYP3A7 którego ilość w życiu dorosłym znacznie maleje. Aktywność CYP3A7 określa się na 30 do 75% aktywności CYP3A4 w organizmie dojrzałym. Notuje się także niskie poziomy: CYP1A1, CYP2C, CYP3A4 i CYP3A5 (EPA/630/R-01/004, 2001).

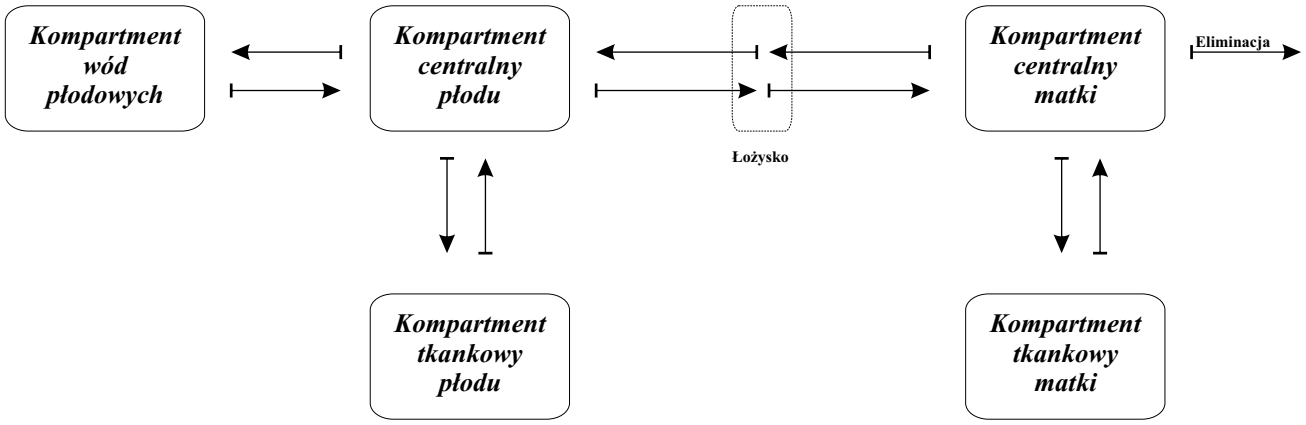
Łożysko jest w ciąży szczególnym miejscem któremu często przypisuje się wręcz rolę podobną do roli wątroby w organizmie dorosłego ssaka. Posiada ono zarówno enzymy oksydacyjne jak i prowadzące do koniugacji. Zlokalizowano w obrębie łożyska układy typu CYP1A1, CYP4B1, CYP19 oraz we wczesnej fazie ciąży CYP2C, CYP2D6 i CYP3A7. Z punktu widzenia farmakokinetyki jest to złożony system transportowy. System wyposażony w wiele obecnie nie do końca scharakteryzowanych ścieżek aktywnego transportu ksenobiotyków. Obecnie wyróżnia się co najmniej kilkanaście systemów transportujących w obrębie łożyska (Ganapathy V. i wsp. 2000). Są to odrębne układy odpowiadające za transport między innymi:

- serotoniny SERT (ang.: *Serotonin Transporter*) - znaczne powinowactwo do tego systemu posiadają trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne oraz kokaina. Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne wiążą się z nim lecz nie są transportowane.
- norepinefryny NET (ang.: *Norepinephrine Transporter*) - większe powinowactwo od norepinefryny do tego systemu ma amfetamina, znaczne powinowactwo wykazuje także kokaina.Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne wiążą się z nim lecz nie są transportowane.

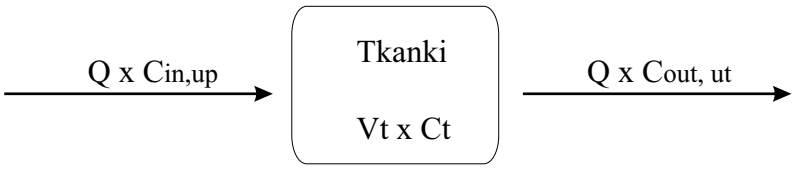
- OCT3 - system transportujący monoaminy lecz niezależny od jonów Cl i Na. Uczestniczy w transporcie dopaminy, norepinefryny, serotoniny i histaminy. Powinowactwo do tego systemu wykazują także: amfetamina i jej analogi, imipramina, desimipramina, klonidyna, cymetydyna, amilorid.
- OCTN2 - transporter karnityny (także propionylo i acetylokarnityny) zależny od jonów Na. Uczestniczy także w transporcie chinidyny, werapamilu, pyrylaminy i cefalorydyny, acetylokarnityny, pochodnych imipraminy, amfetaminy glibenklamidu.
- systemy transportujące związki mono - MCT (ang.: *Monocarboxylate Transporter*) i dwukarboksylowe - NaDC3 (ang.: *Dicarboxylate Transporters*) - Do systemu tego ma powinowactwo wiele leków o charakterze słabych kwasów np. kwas salicylowy i niektóre antybiotyki na przykład cefdinir.
- zależny od jonów Na system transportujący witaminy - SMTV (ang.: *Sodium / Multivitamin Transporter*). System ten może pośredniczyć w transporcie leków przeciwdrgawkowych (współzawodnictwo z biotyną) na przykład karbamazepiną.
- system transportujący nukleozydy - ENT (ang.: *Equilibrative Nucleoside Transporters*). Oprócz nukleozydów transportowanych w stanach fizjologii transportowi przez ten system ulegać mogą: niektóre leki rozszerzające naczynia wieńcowe (dilazep), analogi nukleozydów stosowane w leczeniu chorób nowotworowych takie jak cytarabina, fludarabina, oraz inne dideoksycytydyna, dideoksyinozyna, wykazuje powinowactwo do kladrybiny, cytarabiny, gemcytabryny, dilazepu, dipirydamolu.
- system transportujący folan (sól kwasu foliowego) - FOLT1 (ang.: *Folate Transporter*). Do systemu tego powinowactwo wykazuje między innymi metotreksat.
- P - glikoproteina (obecna również w nerkach wątrobie i innych barierach specjalizowanych na przykład BBB) odpowiedzialna jest za usuwanie ksenobiotyków z komórek (dla organicznych kationów rozpuszczalnych w tłuszczach). Ta ochronna funkcja dotyczy także P glikoproteiny obecnej w łożysku. Jej funkcję blokuje progesteron co ułatwia transfer ksenobiotyków do krążenia płodowego. Ma powinowactwo do digoksyny.
- protonowo kationowe systemy transportu związków organicznych (dla związków organicznych - kationów rozpuszczalnych w wodzie). Mają w łożysku podobne zadanie do P - glikoproteiny. Ich substratami są między innymi: cymetydyna, klonidyna, imipramina.
- system transportujący organiczne kationy - OCTN1 (ang.: *Organic Cation Transporter*). System ten ma podobną funkcję jak poprzedni - pompy protonowo kationowej dla kationów i anionów organicznych - antyportera. Substratami są dla niego między innymi werapamil i chinidyna.
- system transportu prostaglandyn dla którego fizjologicznymi substratami są protaglandyny i tromboksany. Powinowactwo do tego systemu ma także furosemid.
- system transportujący aminokwasy. Powinowactwo do niego wykazują między innymi analogi aminokwasów, gabapentyna, hormony tarczycy, analogi argininy.
- MRP - system transportujący - antyportowy (*Efflux*). Ma powinowactwo do sangwinaviru, taksolu, winkrystyny, morfiny glutationu i glukuronidów.

Systemy nośnikowe odpowiadające za transport i usuwanie ksenobiotyków z kompartmentu jakim jest łożysko wykazują powinowactwo do wielu grup leków. Decydują o dystrybucji do krwiobiegu płodu substancji o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej. Wiadomo także że białka odpowiedzialne za usuwanie ksenobiotyków z tego kompartmentu (P-gp) mogą być blokowane co może przyczynić się do zwiększonej dostępności płodu dla cząsteczek leku (Smit J.W. i wsp. 1999). Ciąża zwykle wiąże się ze zwiększeniem objętości dystrybucji leku w organizmie matki. Nie jest to jednak jedynie proces związany z możliwością zdobycia przez molekuły leku dodatkowych przestrzeni - kompartmentów. Po stronie fizjologii matki dochodzi bowiem do procesów mających różny wpływ na Vd. Ciąża przyczynia się do zmniejszenia motoryki przewodu pokarmowego oraz spadku pH żołądka. W ciąży wydłuża się również GER (ang.: *Gastric Emptying Rate*). To zaś może prowadzić do zmian we wchłanianiu leków podawanych doustnie i nietypowego przebiegu dystrybucji leku z przewodu pokarmowego do krwi. To skutkować będzie zmianami w przebiegu dystrybucji leku z krwi do płodu oraz z krwi do tkanek matki.

Zmiany w dyspozycji leku w obrębie tkanek i krwi matki wiążą się także ze zmniejszeniem ilości białek w osoczu (spada ilość albumin) i potencjalnym wzrostem ilości frakcji wolnej leku w osoczu - frakcji mobilnej, zdolnej do dalszej dystrybucji. Zwiększa się także objętość osocza oraz ECF co ma znaczny wpływ na Vd. Zwiększa się pojemność wyrzutowa serca. Innym zjawiskiem związanym z pracą układu krążenia są zmiany w perfuzji tkanek. Wzrasta przepływ krwi i ukrwienie większości tkanek, narządów, skóry z wyjątkiem mięśni szkieletowych. Wzrasta przepływ krwi przez kłębuszki nerkowe, tym samym rośnie GFR. Wzrostowi Vd towarzyszy wzrost ilości frakcji wolnej wielu leków. Zmiany w krążeniu i pracy serca mają poważne skutki dla dyspozycji leków. Wzrasta przepływ krwi przez wątrobę a to związane jest modyfikacją współczynnika ekstrakcji (ER) leku w organizmie matki. Wzrasta także aktywność CYP3A4.



Rys. Dystrybucja leków w czasie ciąży .



Rys. Zależność miedzy stężeniem leku a przepływem krwi przez tkanki

Q - przepływ krwi
Cin,up - stężenie leku niezwiązanego z białkami osocza doprowadzanego z krwią do tkanek
Cout,ut - stężenie leku niezwiązanego z białkami tkanek odprowadzanego z tkanek do krwi
Vt x Ct - stężenie leku w tkance o określonej objętości dystrybucji

Wydzielanie leków z mlekiem

W mleku człowieka znajduje się do 4% tłuszczu i do 0.9% białek. Problem dystrybucji leku do tkanek gruczołu mlekowego i mleka jest głównie problemem bezpieczeństwa. W medycynie szczególne ważne jest wykluczenie możliwości przedostania się aktywnej postaci leku lub metabolitów dysponujących aktywnością farmakologiczną. Ewentualne zagrożenia w tym zakresie wyjaśniane są na drodze badań farmakokinetycznych określających stosunek stężenia substancji badanej w mleku do stężenia w osoczu - M/P; M/S (ang.: *Milk / Plasma*; *Milk / Serum*) (Kari F.W. i wsp. 1996; Gerk P.M. i wsp. 2000). Stężenie leku w mleku obliczyć można stosując równanie:

$$\mathbf{Cm = M/P \times [(R \times F) / Cl]}$$

Cm - stężenie leku w mleku
M/P - współczynnik rozdziału mleko/osocze
R - szybkość dawkowania
F - dostępność biologiczna
Cl - klirens

W celu skalowania poziomu silnie lipofilnych ksenobiotyków w mleku stosuje się także współczynnik rozdziału mleko / tłuszcz (w obrębie ciała) - M/BFR (ang.: *Milk / Body Fat Ratio*). Wykryto bowiem dla takich przypadków bardzo dużą korelację . Przedstawiono również dla niewielkiej grupy leków zależność, między współczynnikiem biotransferu dla mleka od współczynnika rozdziału oktanol/ woda.

$$\mathbf{BTF = 6.2 \times 10^{-3} \times P_{(o/w)}}$$

Gdzie BTF relacjonuje stosunek stężenia ksenobiotyku w organizmie do dziennej dawki badanego związku. Znając wartości wybranych współczynników rozdziału można obliczyć współczynnik rozdziału mleko/osocze dla leków kwaśnych i zasadowych (EPA/630/R-01/004, 2001):

Dla leków kwaśnych:

$$\mathbf{Ln(M/P) = - 0.405 + 9.4 \times Ln(M_F/P_F) - 0.7 \times Ln(f_{up}) - 1.5 \times Ln[(0.995 \times f_{um}) + (0.045 \times M/L^{7.2})]}$$

Dla leków zasadowych:

$$\mathbf{Ln(M/P) = - 0.09 + 2.54 \times Ln(M_F/P_F) + 0.8 \times Ln(f_{up}) + 0.46 \times Ln[(0.995 \times f_{um}) + (0.045 \times M/L^{7.2})]}$$

M/P - współczynnik rozdziału mleko/osocze
MF - ultrafiltrat mleka
PF - ultrafiltrat osocza
fup - frakcja niezwiązana z białkami w osoczu
fum - frakcja niezwiązana z białkami w mleku
M/L7.2 - współczynnik rozdziału mleko / tłuszcz w pH 7.2

W weterynarii problem ten wykracza poza ramy bezpieczeństwa związane z jednym gatunkiem. W przypadku mleka przeznaczonego do spożycia przez człowieka (mleko krowie, kozie) problem przyjmuje znacznie szerszy wymiar. Wymaga bowiem dostosowania dawkowania i okresu karencji zalecanego przez producenta, do obowiązujących przepisów prawnych. Dotyczą one dopuszczalnych wartości stężeń pozostałości leków weterynaryjnych w mleku które pozwalają uznać je za produkt bezpieczny. Do mleka nie przechodzą leki związane z białkami krwi lub białkami w obrębie gruczołu mlekowego. Dystrybucji do mleka ulegają substancje niezwiązane z białkami, niezdysocjowane, lipofilne. Dobrze dyfundują do mleka niezdysocjowane słabe zasady z uwagi na to że mleko jest środowiskiem bardziej kwaśnym od krwi. Lipofilne związki znajdujące się w mleku lokują się głównie w tłuszczu mleka. Pewną granicą jest także masa cząsteczkowa. Związki o masie cząsteczkowej powyżej 200 bardzo słabo lub wcale nie są transportowane do mleka. Istnieje kilka podstawowych dróg transportu leków do mleka są to:

- dyfuzja bierna
- transport aktywny
- sekrecji apokrynowej

Z punktu widzenia farmakokinetyki mleko nie jest jednak kompartmentem zdolnym do magazynowania większej ilości ksenobiotyku. Jest to narząd który zapewnia jego swobodny transfer. Stosunek M/P opisuje ile razy stężenie substancji w mleku przewyższa jej stężenie w osoczu. Dla wielu leków współczynnik ten osiąga bardzo wysokie wartości. Obliczenia tego parametru można wykonać korzystając z wzorów:

$$M / P = C_{ssM} / C_{ssP}$$

$$M / P = [f_{(P.u)} \times f_{(P.un)}] / [f_{(M.u)} \times f_{(M.un)} \times (S / W)]$$

lub

$$M / P = [Css.avg_{(P.u)} \times Css.avg_{(P.un)}] / [Css.avg_{(M.u)} \times Css.avg_{(M.un)} \times (S / W)]$$

f(P.u) - frakcja nie związana z białkami osocza
f(M.m) - frakcja nie związana z białkami mleka
f(P.un) - frakcja nie zjonizowana w osoczu
F(M.un) - frakcja nie zjonizowana w mleku
S / W - stosunek stężenia substancji w mleku odtłuszczonym do mleka pełnego (ang.: *Skim Milk / Whole Milk*)
CssM - średnie stężenie w mleku
CssP - średnie stężenie w osoczu
Css.avg(P.u) - średnie stężenie w stanie stacjonarnym frakcji niezwiązanej z białkami osocza
Css.avg(M.m) - średnie stężenie w stanie stacjonarnym frakcji niezwiązanej z białkami mleka
Css.avg(P.un) - średnie stężenie w stanie stacjonarnym frakcji niezjonizowanej osocza
Css.avg(M.un) - średnie stężenie w stanie stacjonarnym frakcji niezjonizowanej mleka

W związku z różnicami jakie wiążą się z pH krwi i pH mleka, transfer do mleka substancji które są słabymi elektrolitami zależny jest w tym wypadku od pKa substancji i stopnia zjonizowania. Stąd znając pH środowiska i pKa substancji powyższe wzory można zrelacjonować w szerszej formie:
Dla słabego kwasu:

$$M / P = [Css.avg_{(P.u)} \times (Css.avg.P - [(Css.avg.P \times (100 / [1 + 10^{(pKa - pH)}])) / 100])] / [Css.avg_{(M.u)} \times \times (Css.avg.M - [(Css.avg.M \times (100 / [1 + 10^{(pKa - pH)}])) / 100]) \times (S / W)]$$

dla słabej zasady:

$$M / P = [Css.avg_{(P.u)} \times (Css.avg.P - [(Css.avg.P \times (100 / [1 + 10^{(pH - pKa)}])) / 100])] / [Css.avg_{(M.u)} \times \times (Css.avg.M - [(Css.avg.M \times (100 / [1 + 10^{(pH - pKa)}])) / 100]) \times (S / W)]$$

Css.avg.P - średnie stężenie substancji w osoczu w stanie stacjonarnym
Css.avg.M - średnie stężenie substancji w mleku w stanie stacjonarnym

Transport leków optycznie czynnych do mleka jest transportem stereoselektywnym. Stąd powyższych wzorów należałoby użyć w takim wypadku oddzielnie dla każdej formy szczególnie jeżeli fakt ten można wiązać z różnymi parametrami fizykochemicznymi odmian.

Ryc. Stosunek zawartości w mleku (M) ludzkim do stężenia w osoczu człowieka (P) dla wybranych substancji (wartości średnie). (Dharamsi A., Smith J. 2003)

Związek	M/P	Związek	M/P
kofeina	38,26	sertralina	0,89
amiodaron	8,8	moklobemid	0,72
cymetydyna	8,18	chinidyna	0,71
THC	8	haloperidol	0,695
bupropion	5,545	karbamazepina	0,69
hydroksychlorchina	5,5	metadon	0,68
sumatryptan	4,9	paroksetyna	0,678
prokainamid	4,15	teofilina	0,67
klozapina	3,55	flukonazol	0,655
metoprolol	3,36	desipramina	0,65
nitrofurantoina	3,235	lamotrygina	0,56
flekainid	3,15	zopiklon	0,51
pseudoefedryna	2,95	fenobarbital	0,5
nikotyna	2,9	propranolol	0,5
sulfasalazyna	2,685	chloropromazyna	0,5
morfina	2,35	fluoksetyna	0,478
acyklowir	2,35	kwas walproinowy	0,42
walacyklowir	2,35	risperidon	0,42
nortryptylina	2,29	lidokaina	0,4
metoklopramid	2,28	loperamid	0,37
citalopram	2,08	alprazolam	0,36
kodeina	1,9	doksycyklina	0,35
labetalol	1,7	klonazepam	0,33
diazepam	1,45	chinina	0,32
meksyletyna	1,45	fenytoina	0,315
zydowudyna	1,445	pyrymetamina	0,315
doksepina	1,37	gentamycyna	0,275
fluwoksamina	1,34	metylodopa	0,265
ofloksacyna	1,32	hydrochlorotiazyd	0,25
trimetoprim	1,25	domperidon	0,25
klomipramina	1,23	tolbutamid	0,245
Petydyna	1,215	oksazepam	0,215
nalbufina	1,2	feksofenadyna	0,21
topiramat	1,2	lorazepam	0,205
loratadyna	1,17	meflochina	0,2
Paracetamol	1,165	ryfampina	0,195
metronidazol	1,15	nefazodon	0,185
metformina	1	propafenon	0,15
cyprofloksacyna	1	zafirlukast	0,15
klarytromycyna	1	trazodon	0,142
etambutol	1	sulfasalazyna (sulfapir)	0,13
izoniazyd	1	dalteparyna	0,1245
diltiazem	1	propylotiouracyl	0,1
nifedypina	1	cefaleksyna	0,074
amitryptylina	1	sulfametoksazol	0,06
imipramina	1	ASA	0,055
werapamil	0,94	amoksycylina	0,0285
tetracyklina	0,93	ketorolak	0,026
hydralazyna	0,925	kaptopril	0,012
erytromycyna	0,92	naproksen	0,01

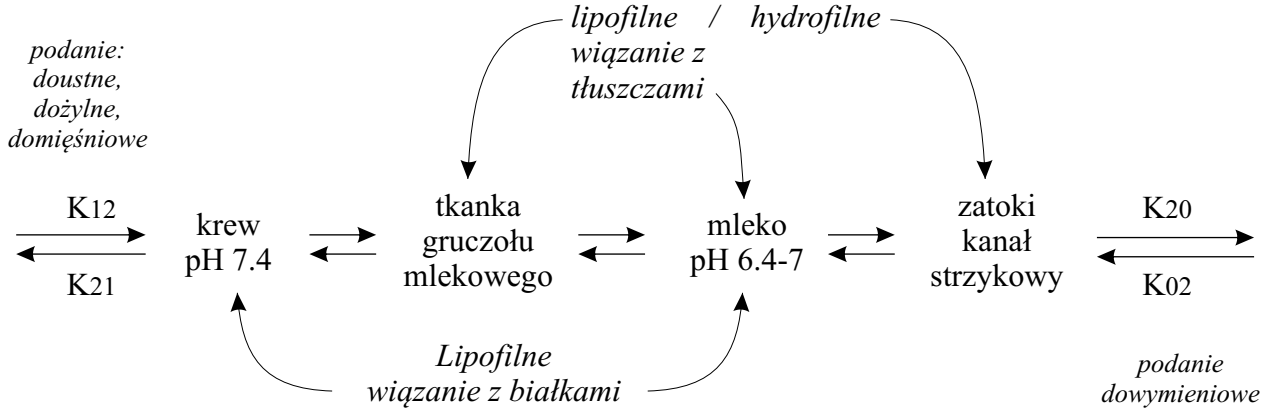
W farmakokinetyce weterynaryjnej jednym ze szczególnych problemów w zakresie dystrybucji leku do mleka i gruczołu mlekowego jest iniekcja dowymieniowa (ang.: *Intramammary Iniection*). Z uwagi na fizjologię gruczołu mlekowego u krów, również kóz i owiec oraz przemysłową produkcję mleka gruczoł mlekowy narażony jest na liczne zakażenia. Najczęściej w terapii gruczołu mlekowego stosuje się chemioterapeutyki podawane albo parenteralnie na przykład domięśniowo (eliminowane również z mlekiem) lub iniekcję dowymieniową (postać leku). Zaprojektowanie formulacji leku o wysokiej skuteczności napotyka jednak na wiele problemów. Jednym z nich jest fakt że większość stosowanych obecnie antybiotyków dowymieniowych ulega w pH mleka jonizacji co znacznie obniża możliwości transferu leku do tkanki gruczołu (Gehring R., Smith G.W. 2006). Również wartość efektywnego współczynnika rozdziału oktanol woda przyjmuje bardzo niskie wartości. Nie predysponuje to leku do penetracji błon biologicznych w obrębie wymienia. Celem stosowania leków dowymieniowych jest zarówno penetracja tkanki gruczołu mlekowego jak i działanie miejscowe w okresie zasuszenia w zatokach mlekonośnych i kanale strzykowym.

					LogD dla pH 3;4;7.4;8				
słabe zasady (B)		XLogP	tPSA	pKa	*3*	*4*	*6,5*	*7,4*	*8*
nowobiocyna	B	2,737	200,02	4,50	1,2	2,1	2,7	2,7	2,7
tylmikozyna	B	3,045	186,1	7,95	-2,2	-1,2	1,3	2,1	2,5
erytromycyna	B	1,983	193,9	10,63	-5,6	-4,6	-2,1	-1,2	-0,6
dihydro streptomycyna	B	-8,325	339,6	12,80	-7,1	-6,1	-3,6	-2,7	-2,1
pirlimycyna	B	0,91	111,04	11,18	-7,3	-6,3	-3,8	-2,9	-2,3
słabe kwasy (A)									
hetacylina	A	1,856	89,9	3,71	1,8	1,4	-0,9	-1,8	-2,4
ampicylina	A	0,25	112,7	4,9	0,2	0,2	-1,4	-2,3	-2,9
amoksycylina	A	-0,124	132,9	5,03	-0,1	-0,2	-1,6	-2,5	-3,1
kloksacylina	A	2,27	112,7	2,44	1,6	0,7	-1,8	-2,7	-3,3
cefapiryna	A	-0,251	125,9	3,58	-0,4	-0,8	-3,2	-4,1	-4,7
ceftiofur	A	0,416	177,4	2,76	0,0	-0,8	-3,3	-4,2	-4,8

Ryc. LogD dla różnych wartości pH dla grupy najczęściej stosowanych antybiotyków dowymieniowych.

			Stopień jonizacji leku przy pH 3;4;7.4;8				
słabe zasady (B)		pKa	*3*	*4*	*6,5*	*7,4*	*8*
nowobiocyna	B	4,50	96,9	76,0	1,0	0,1	0,0
tylmikozyna	B	7,95	100,0	100,0	96,6	78,0	47,1
erytromycyna	B	10,63	100,0	100,0	100,0	99,9	99,8
pirlimycyna	B	11,18	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9
dihydrostreptomycyna	B	12,80	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
słabe kwasy (A)							
amoksycylina	A	5,03	0,9	8,6	96,8	99,6	99,9
ampicylina	A	4,9	1,2	11,2	97,5	99,7	99,9
hetacylina	A	3,71	16,3	66,1	99,8	100,0	100,0
cefapiryna	A	3,58	20,8	72,5	99,9	100,0	100,0
ceftiofur	A	2,76	63,5	94,6	100,0	100,0	100,0
kloksacylina	A	2,44	78,4	97,3	100,0	100,0	100,0

Znając zakres dysocjacji antybiotyków w mleku można formułując postać leku stosować sole które pozwalają na "cofanie dysocjacji". Można również Próbować tworzyć postacie leku zmieniające pH środowiska po podaniu. W medycynie weterynaryjnej większość stosowanych w leczeniu *mastitis* antybiotyków ma niską wartości pola polarnego powierzchni co gwarantuje łatwy transfer błonowy. Największe szanse na transfer do antybiotyku do wymienia mają jednak leki będące słabymi zasadami o niskiej wartości pKa.



Ryc. Specyfika dystrybucji leków weterynaryjnych podawanych drogą dowymieniową.

			LogD dla pH 6-7.8				
	LogP	pKa	6	6,4	6,8	7,4	7,8
słabe	3	10	-1,0	-0,6	-0,2	0,4	0,8
zasady	2,5	9	-3,5	-2,5	0,0	0,9	1,5
	2	8	-2,3	-1,3	1,2	2,0	2,4
	1,5	7	-2,5	-1,5	0,9	1,4	1,5
	1	6	-0,3	0,7	2,6	2,7	2,7
	0,5	5	-1,5	-0,5	0,5	0,5	0,5
	3	5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	2,5	6	-0,5	0,5	2,4	2,5	2,5
	2	7	-1,3	-0,3	2,1	2,6	2,7
	1,5	8	-3,5	-2,5	0,0	0,8	1,2
	1	9	-3,3	-2,3	0,2	1,1	1,7
	0,5	10	-6,5	-5,5	-3,0	-2,1	-1,5
słabe	3	5,5	2,4	2,0	1,7	1,1	0,7
kwasy	2,5	5,0	1,5	1,1	0,7	0,1	-0,3
	2	4,5	0,5	0,1	-0,3	-0,9	-1,3
	1,5	4,0	-0,5	-0,9	-1,3	-1,9	-2,3
	1	3,5	-1,5	-1,9	-2,3	-2,9	-3,3
	0,5	3,0	-2,5	-2,9	-3,3	-3,9	-4,3
	3	3,0	0,0	-0,4	-0,8	-1,4	-1,8
	2,5	3,5	0,0	-0,4	-0,8	-1,4	-1,8
	2	4,0	0,0	-0,4	-0,8	-1,4	-1,8
	1,5	4,5	0,0	-0,4	-0,8	-1,4	-1,8
	1	5,0	0,0	-0,4	-0,8	-1,4	-1,8
	0,5	5,5	-0,1	-0,5	-0,8	-1,4	-1,8

Ryc. Optymalizacja LogD oraz stopnia jonizacji w warunkach pH 6-7.8.

Stosunek M/P obliczany jest również na podstawie frakcji wolnej leku oraz założeń związanych z poziomem jego jonizacji (Atkinson H.C., Begg E.J. 1990).

słabe zasady:

$$\mathbf{Ln(M/P) = 0.02477 + 2.28 \times Ln(Mu / Pu) + 0.886 \times Ln(fp) + 0.505 \times Ln(K)}$$

słabe kwasy:

$$\mathbf{Ln(M/P) = -0.405 + 9.36 \times Ln(Mu / Pu) - 0.69 \times Ln(fp) - 1.54 \times Ln(K)}$$

$$\mathbf{K = [(0.955 / fm) + 0.045 \times LPerm] \times fm}$$

$$\mathbf{Log(LPerm) = 1.29 \times LogP_{(o/w)} - 0.88}$$

fp - frakcja wolna w osoczu
fm - frakcja wolna w mleku
Mu/Su - stosunek frakcji wolnych z równania Henderson -Hasselbach'a

Otłuszczenie

Organizm zawsze dysponuje pewną fizjologiczną ilością tłuszczu w stosunku do całkowitej masy ciała. W przypadkach znacznego otłuszczenia przestrzeń którą stanowi tłuszcz staje się niezwykle ważnym czynnikiem modulującym kinetykę wielu leków. W przypadku fizjologii człowieka za nadwagę przyjmuje się stan w którym BMI > 25, natomiast o otłuszczeniu mówi się gdy BMI > 30. Tkanka tłuszczowa jest tkanką słabo unaczynioną. Perfuzja krwi przez tkankę tłuszczowa jest niewielka. Większe ilości tłuszczu krezkowego stanowią kompartment w niewielkim stopniu uczestniczącym w procesach metabolicznych. Otłuszczenie jest przyczyną upośledzenia pracy całego układu krążenia. Dla leków podawanych wziewnie duże znaczenie ma fakt iż znaczne otłuszczenie związane jest z mniejszą pojemnością życiową płuc (Adams J.P., Murphy P.G. 2000). W przypadku leków podawanych doustnie otłuszczenie wpływa na funkcję układu pokarmowego. Przyczynia się do zwiększenia GER oraz podwyższenia pH w żołądku. W stanach otłuszczenia całkowita ilość wody w organizmie - TBW ma małą wartość, stosunkowo większa jest objętość krwi krążącej. Spada przepływ krwi przez wątrobę co w przypadku leków o metabolizmie przepływozależnym może powodować znaczne zmiany kinetyki. Wzrasta natomiast przepływ krwi przez nerki - RBF oraz GFR. Przyczynia się to do szybszej eliminacji leków wydalanych głównie wraz z moczem. Substancje hydrofilne słabo lub wcale nie rozmieszczają się w tkance tłuszczowej. Problem pojawia się w przypadku leków lipofilnych które łatwo osiągają w tej tkance wysokie stężenie. Leki które wiążą się z tkanką tłuszczową mają dużą objętość dystrybucji. Czasami wartość obliczonej objętości dystrybucji może przekroczyć znacznie masę ciała. Jednak nie oznacza to że lek we właściwym stężeniu zaistniał w kompartmencie efektorowym. Dawkowanie leków w przypadkach nadmiernego otłuszczenia powinno obejmować obliczenia BSA, oraz LBW. W przypadku otyłości wzrasta zagrożenie ADR w stosunku do leków o małym indeksie terapeutycznym. Wiązanie leków z białkami osocza może być utrudnione w wyniku dużej ilości wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu i lipoprotein. Z drugiej jednak strony wzrasta ilość AAG co może przyczyniać się do wzrostu wiązania z białkami innych leków.

Zmiany w dystrybucji leków związane z wiekiem

Wraz z wiekiem oraz postępem procesów dojrzewania i starzenia zmienia się charakterystyka fizjochemiczna, fizjologia oraz anatomia wielu tkanek. W wieku młodym zmiany farmakokinetyki leków najczęściej dotyczą różnic wynikających z braku dojrzałości enzymatycznej narządów i tkanek (Nouws J.F.M. 1992). Drugim ważnym powodem istotnych różnic w PK wynikających z wieku, jest ciągły wzrost i zmiany w budowie tkanek oraz przepływie krwi przez narządy (Koren G. 1997;Comstock T.J. 2002; Scheuplein R. i wsp. 2002). Różnice farmakokinetyki leków i toksykokinetyki ksenobiotyków wynikające z wieku dotyczą trzech podstawowych faz kinetycznych - wchłaniania dystrybucji i eliminacji. Każdy wskaźnik fizjologiczny, lub czynnik anatomiczny modyfikujący którąkolwiek z faz zmienia kinetykę leku. Ogólnie różnice te można scharakteryzować dzieląc wiek dziecka na kilka faz:

	noworodek	niemowlę	dziecko
pH żołądka	wyższe(6-8)	wyższe	wyższe
GER	bardzo wolne	wolne	typowe*
produkcja pepsyny	niższa	niższa	typowe
produkcja trypsyny	bardzo niska	niższa	typowe
produkcja lipazy	bardzo niska	niższa	typowe
produkcja a - amylazy	bardzo niska	niższa	typowe
perystaltyka GIT	niższa	niższa	typowe
aktywność enzymatyczna	niższa	niższa	niższa
FFA we krwi (ang.: *Free Faty Acids*)	bardzo wysoki poziom		typowy
wiązanie z białkami (albuminy)	słabsze	słabsze	słabsze
całkowita ilość białek krwi	niska	niższa	typowa
GFR	niższa	niższa	typowa
RTS (ang.: *Renal Tubular Secretion*)	niska	niższa	typowa
Cl(r)	wyższy	typowy/wyższy	typowy
RBF	niski	niski	typowy
ECF	bardzo duża	bardzo duża	duża
ICF	mała	mała	typowa
TBW	większa	typowa	typowa
BrW (ang.: *Brain Weight*)	mała	niższa	nizsza
BSA (% wart. dorosłych)	bardzo mały	mały	mały
SC (ang.: *Stratum Corneum*)	bardzo cienka	cienka	typowa
Masa mięśni	bardzo mała	mała	mała

* - wartości osobnika dorosłego

Wchłanianie i dystrybucja:

Znanym zjawiskiem modyfikującym farmakokinetykę leku u dzieci jest zwiększona przepuszczalność barier specjalizowanych. Prawdopodobnie zwiększoną przepuszczalność dla leków cechuje także barierę krew / mocz. Zarówno u noworodków dzieci jak i zwierząt większa jest przepuszczalność bariery jelitowej, dotyczy to także przeżuwaczy (Nouws J.F.M. 1992). U wszystkich ssaków w pierwszych tygodniach i miesiącach życia, zachodzi większe prawdopodobieństwo tworzenia chelatów leków, z jonami wapnia obecnymi w mleku. U osobników młodocianych penetracja bariery krew / mózg jest większa niż u dorosłych. Różnice wynikające z wieku, we wzajemnym stosunku płynu pozakomórkowego ECF i wewnątrzkomórkowego ICF mają duże znaczenie w dystrybucji leku w organizmie. Wraz z wiekiem zmieniają się cztery ważne dla organizmu parametry fizjologiczne decydujące o dystrybucji leku w organizmie:

- rozmieszczenie wody
- rozmieszczenie tłuszczu
- ilość i powinowactwo białek
- perfuzja tkanek

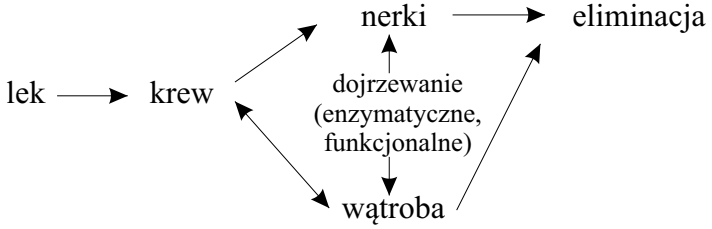
Metabolizm i eliminacja:

Dla większości leków metabolizowanych przez układ CYP w wątrobie okres półtrwania leków w fazie eliminacji u noworodków jest 3 - 9 razy dłuższy niż u dorosłych (Ginsberg G. i wsp. 2002). Ciekawym problemem kinetyki niektórych leków u dzieci jest szybsza eliminacja a tym samym krótszy okres półtrwania niż u niemowląt lub dorosłych. Przyczyna tego stanu nie została dokładnie wyjaśniona. W kinetyce leków u dzieci należy brać pod uwagę zmiany jakie równocześnie zachodzą w dwóch ważnych narządach eliminacyjnych - wątrobie i nerkach. Wspólnym mianownikiem wyrażającym te zmiany są parametry fizjologii krwi. U dzieci wiązanie leków z albuminami jest słabsze. Skład krwi jest inny i związane jest to między innymi z większą ilością barwników żółciowych oraz kwasów tłuszczowych we krwi. Ilość białek produkowanych przez niedojrzałą wątrobę jest niższa niż u dorosłych. Jakościowo wiązanie leku z białkami u dzieci ma także nieco inny charakter niż u dorosłych. Stąd inne wartości parametrów opisujących frakcję niezwiązaną leku we krwi. U dzieci poziom AAG stanowi 75-80% wartości osoby dorosłej. Poziom kwaśnej glikoproteiny może być o połowę niższy. Zmiany w wiązaniu z białkami dotyczą także interakcji z kwasami tłuszczowymi oraz bilirubiną. Przyczynia się to do modyfikowania schematu dawkowania leków u dzieci z uwagi na większą ilość leku nie związanego z białkami krwi (Mc Namara P.J., Alcorn J. 2002). W celu skalowania wartości frakcji leku wolnego u dzieci a podstawie wartości uzyskiwanych u osób dorosłych wykorzystuje się równanie:

$$\mathbf{fu,inf = 1 / [1 + (C_{(prot,inf)} / C_{(prot,ad)}) \times (1 - fu.ad) / fu,ad]}$$

fu,inf - frakcja wolna leku u dziecka
fu,ad - frakcja wolna leku u osoby dorosłej
C(prot,inf) - stężenie białka w osoczu dziecka
C(prot,ad) - stężenie białka w osoczu osoby dorosłej

Wszystkie te czynniki mogą wspólnie decydować o zwiększonej eliminacji drogą nerkową niektórych leków u dzieci w przeciwieństwie do noworodków i dorosłych. Istotną rolę w tym procesie odgrywa proces dojrzewania zarówno wątroby jak i nerek. Wypadkową obu procesów jest różna kinetyka leku na różnych etapach rozwoju. Jednym z podstawowych parametrów opisujących czynność nerek jest szybkość przesączania kłębkowego - GFR. U większości zwierząt oraz u człowieka okres w którym wartość GFR jest równa wartości osobników dorosłych jest dłuższy niż 2 tygodnie. U przeżuwaczy GFR noworodka przed upływem tygodnia jest zbliżona do wartości jaka cechuje zwierzę dorosłe (Nouws J.F.M. 1992).



Rys. Związek problemów zwiększonej eliminacji drogą nerkową z dojrzewaniem wątroby i nerek.

Zmiany w kinetyce dystrybucji leków wynikające z podeszłego wieku mają swoje źródło w znacznych zmianach parametrów fizjologicznych organizmu.

Objętości płynów i niektórych przestrzeni kinetycznych w wieku starszym ulegają dużym zmianom. Wpływa to w sposób bezpośredni na rozmieszenie leku w organizmie. Spada beztłuszczowa masa ciała - LBW (ang.: *Lean Body Weight*) spada także całkowita ilość wody w organizmie - TBW (ang.: *Total Body Water*). Zmniejsza się stężenie albumin natomiast wzrasta ilość AAG w osoczu. Beztłuszczowa masa ciała spada na korzyść zawartości tłuszczu w organizmie. Zmniejsza się masa kości oraz mięśni, spada przepływ krwi w mięśniach. Zmniejsza się również ilość produkowanej kreatyniny. Spada ilość wody w skórze, nasila się keratynizacja. Dla procesów metabolicznych leków ważnym faktem jest zmniejszanie się masy i objętości wątroby - LW (ang.: *Liver Weight*), zmniejsza się także przepływ krwi przez wątrobę - Q(h). Maleje zarówno przepływ czynnościowy jak i funkcjonalny krwi w obrębie wątroby. Szczególnie powyżej wieku 75 lat całkowity przepływ krwi przez wątrobę może zmniejszyć się nawet o 30 % (Zoli M. i wsp. 1999). Stwarza to znaczne niebezpieczeństwo wydłużania t1/2kel większości leków, zwiększenia dostępności biologicznej oraz znacznego zmniejszenia klirensu wątrobowego. Dla leków wydalanych wraz z moczem ważnymi parametrami zmieniającymi eliminację i dystrybucję leku są parametry pracy nerek. Wzrasta pH żołądka, zmniejsza się powierzchnia przewodu pokarmowego oraz skraca się MTT dla przewodu pokarmowego. Podobnie jak w przypadku wątroby wraz z wiekiem spada masa nerek oraz przepływ krwi przez nerki - RBF (ang.: *Renal Blood Flow*). Dla obu narządów skutkować to będzie spadkiem współczynnika ekstrakcji - ER. Spada szybkość filtracji kłębkowej - GFR (ang.: *Glomerular Filtration Rate*). Spadają także wartości sekrecji nerkowej - TS (ang.: *Tubular Secretion*), oraz aktywnej reabsorpcji kanalikowej - TR (ang.: *Tubular Reabsorption*). Wszystkie te procesy decydują o zmniejszeniu wartości klirensu nerek. Klirens kreatyniny spada. Jego wartość na podstawie wieku - A (ang.: *Age*) obliczyć można korzystając z wzorów na klirens kreatyniny lub produkcję dobową kreatyniny (Goldman R. 1954; Siersbaek- Nielsen K. i wsp. 1971; Jelliffe R. 2000):

$$\mathbf{Cl_{(sc)} = 29.305 - 0.203 \times A}$$

Cl(sc) -klirens kreatyniny mg/kg/dzień

$$\mathbf{P_{(sc)} = 1344.4 - 43.76 \times Cl_{(sc)}}$$

P(sc) - produkcja kreatyniny w mg / dzień

Zespół wymienionych zmian decyduje o nieprawidłowościach większości parametrów kinetycznych leków. Dystrybucja leków oraz droga jaką pokonują przez bariery biologiczne ulega znacznym zmianom. Przy braku uwzględnienia wieku w dawkowaniu leków, szczególnie leków o wąskim przedziale terapeutycznym zalecanych dawek niewłaściwie prowadzona terapia może przyczynić się do wystąpienia ADR o różnym stopniu nasilenia.

Redystrybucja i dystrybucja leków na poziomie komórkowym

Leki wnikając do komórek tkanek odpowiedzialne są za efekt terapeutyczny po wywołaniu specyficznej reakcji po stronie receptora. Wiele leków w tym niektóre chemioterapeutyki ulegają w obrębie komórek procesom redystrybucji wynikającym ze szczególnych właściwości fizykochemicznych leku, cytoplazmy lub organelli komórkowych. Cytoplazma komórek tworzona jest w znacznym procencie przez wodę (ok. 60 - 80%). Z punktu widzenia kinetyki leków ważnym faktem jest obecność w cytoplazmie białek w ilości około 10%. Jednym z procesów pozwalających komórkom pobierać substancje ze środowiska zewnętrznego jest pinocytoza. Lizę substancji ułatwiają komórce liczne lizosomy których pH jest kwaśne i wynosi poniżej 6. Leki o właściwościach słabych zasad znajdujące się w cytoplazmie lub przenikające przez błone cytoplazmatyczną dyfundować będą do wnętrza lizosomów, kumulować się będą także w mitochondriach. Zasadowe leki deponując się w strukturach lizosomów wraz ze zwiększaniem liczby cząsteczek leku podwyższają pH lizosomu. Podobnie w przypadku mitochondriów które są również kompartmentem kwaśnym do którego migrują cząsteczki słabych zasad. Tu jednak efekt podniesienia pH organellum komórkowego jest niższy z uwagi na mniejszą różnicę w pH mitochondriów i cytoplazmy (Siebert G.A. i wsp. 2003). Stosunek stężeń zależny od pH środowiska i pKa leku opisuje równanie:

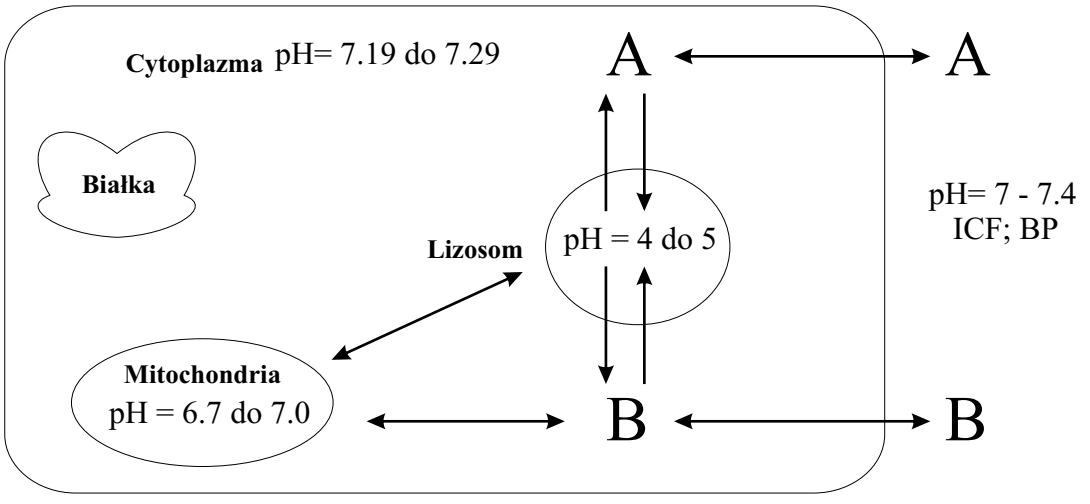
$$(1 + 10^{pKa} - pHn) / (1 + 10^{pKa} - pHn+1)$$

pHn - pH wewnątrz lizosomu
pHn+1 - pH cytoplazmy

Wychwytywanie jonów słabych lipofilnych zasad ma największe znaczenie farmakokinetyczne w przypadku organów których komórki bogate są w lizosomy i mitochondria takich jak:

- wątroba
- nerki
- płuca

Proces migracji do struktur o pH kwaśnym dotyczy przede wszystkim słabych zasad o właściwościach lipofilnych. Fagolizosomy po lizie zawartości uwalniają takie leki z powrotem do cytoplazmy. Drugim źródłem wymuszania specyficznej dla danej komórki dystrybucji są ruch cytoplazmy i pH cytoplazmy różne w różnych częściach komórki.



Rys. Mikrodystrybucja leków związana z różnicami pH. A - słabe kwasy, B - słabe zasady.
ICF - płyn śródkomórkowy (ang.: *Intracellular Fluid*), BP - osocze (ang.: *Blood Plasma*)

Ze znanych chemioterapeutyków w fagolizosomach lokalizują się makrolidy i aminoglikozydy, natomiast w cytoplazmie fluorochinolony i β laktamy. W kwaśnych kompartmentach na poziomie komórkowym lokalizują się także niektóre leki przeciwnowotworowe takie jak daunomycyna, doksorubicyna, rodamina czy winblastyna. Daunomycyna kumuluje się w strukturach o kwaśnym pH, stąd leki które wpływać będą na zmniejszenie różnicy pH pomiędzy organellami a pozostałymi strukturami subkomórkowymi zmieniać będą dystrybucję tego leku w komórce. Takimi lekami są blokery kanałów wapniowych Ca^{++} i inhibitory kalmoduliny (Moriyama Y. 1996; Roberts M.S., i wsp. 2002). W optymalizacji farmakokinetycznej tego rodzaju leków duże znaczenie ma modyfikowanie niekorzystnych kierunków redystrybucji i relokacji cząsteczek leku w organizmie. Taka optymalizacja jest konieczna na przykład wtedy gdy patogen lokalizuje się w cytoplazmie a lek w organellach komórkowych. Deponowanie leku w strukturach komórkowych wydłuża MTT. Czas przechodzenia leku przez organizm jest tym dłuższy im silniejsze jest wychwytywanie cząsteczek leków przez struktury subkomórkowe. Im bardziej złożony jest mechanizm ich wewnątrzkomórkowej redystrybucji tym dłuższy jest MTT w skali mikro oraz w skali makroorganizmu.

Narzędziem projektowania kinetyki leku jest między innymi taka zmiana budowy leku która zmieni charakter chemiczny cząsteczki (pH, pKa) na oczekiwany. Innym sposobem jest formułowanie nośników leków na przykład liposomów których struktura będzie ulegać degradacji w środowisku o ściśle określonym pH. Narzędziami wykorzystującymi interakcje farmakokinetyczne jest równoczesne stosowanie inhibitorów mechanizmów aktywnego wypompowywania leku z komórki. Innym sposobem jest wzmaganie aktywnego transportu leku do wnętrza komórki docelowej. Równie ważnym mechanizmem optymalizacji postaci leku jest w tym wypadku kontrola nad odpowiedzią komórki w znaczeniu immunologicznym i wzbudzanie odpowiedzi komórkowej o oczekiwanym charakterze. Ważnym problemem w dystrybucji i redystrybucji leków na poziomie komórkowym jest transport cząsteczek leku pomiędzy osoczem a komórkami krwi. Wiadomo że przynajmniej kilkadziesiąt różnych leków ulega dystrybucji do komórek krwi. Wiadomo również że w stosunku do leków optycznie czynnych przenikających do krwinek dystrybucja taka jest procesem stereoselektywnym (Hinderling P.H. 1997). Badania prowadzone w celu określenia współczynnika rozdziału pomiędzy komórkami krwi a osoczem dotyczą najczęściej określenia współczynnika C / P lub C / W (ang.: *Cell / Plasma*; *Cell / Water*). Nie bez znaczenia jest także określenie współczynnika podziału dla stężenia leku pomiędzy krwią a samym osoczem B / P lub krwią a surowicą krwi B / S (ang.: *Blood /Plasma*; *Blood / Serum*).

$$\mathbf{C / P = C_{(RBC)} / C_p} \qquad \mathbf{C / W = C_{(RBC)} / C_w} \qquad \mathbf{C / B = C_{(RBC)} / C_B}$$

stąd

$$\mathbf{C / P = (C / W) \times f_{up}} \qquad \mathbf{B / P = (C / P) \times HCT + (1 - HCT)}$$

C(RBC) - stężenie leku w krwinkach
Cp - stężenie leku w osoczu
CB - stężenie leku we krwi
Cw - stężenie leku w wodzie (bufor)
Fup - frakcja niezwiązana leku w osoczu
HCT - hematokryt

Dystrybucja tego rodzaju zależna jest zarówno od lipofilności leku jak i transportu związanego z różnicami pH środowisk oraz pKa związku. Wymienione procesy zależne są od temperatury co ma duże znaczenie dla badań *in vitro*, a *in vivo* duże znaczenie w dystrybucji leku w stanach patologii. Z wymienionych wskaźników tylko współczynnik rozdziału B / P jest zależny od wartości hematokrytu. Dystrybucja leku do komórek krwi pociąga za sobą konsekwencje w wartości klirensu pełnej krwi.

$$\mathbf{Cl_B = Cl_P / (B / P)}$$

lub

$$\mathbf{Cl_B = Cl_P / [(1 - HCT) + (C / P) \times HCT]}$$

ClB - klirens krwi
ClP - klirens osocza

Obliczenia farmakokinetyczne dotyczące zmian stężenia i relokacji leku wykorzystują wszystkie podstawowe metody obliczeniowe łącznie z metodami obliczeniowymi momentów statystycznych (Weiss M. 1999). Stąd średni czas przebywania leku w komórce można obliczyć znając objętość komórki oraz skalę klirensu wyrażoną właściwościami przepuszczalności błony komórkowej.

$$\mathbf{MRT_{(cell)} = V_{(cell)} / Cl_{(cell)}}$$

V(cell) - objętość komórki
Cl(cell) - klirens komórki

Podobnie dla modelu obejmującego komórkę przedstawić można względny stopień rozproszenia CV^2(ang.: *Relative Dispersion*). Gdzie miarą braku homogenności jest wartość różna od 1.

$$\mathbf{CV^2 - 1 = 2/3 \times [(L^2 / D_{(eff)}) / MRT_{(cell)}]}$$

L - średnica komórki
D(eff) - współczynnik dyfuzji efektywnej

Dystrybucja i wchłanianie leków przez przewód pokarmowy

Dla leków podawanych *per os* przewód pokarmowy zwykle jest pierwszym miejscem ograniczenia dostępności biologicznej leku (Chiou W.L. 2001). Dzieje się tak między innymi w wyniku zaistnienia efektu pierwszego przejścia (ang.: *First - Pass Gut Wall Metabolism*). Przewód pokarmowy opisuje więc odpowiedni współczynnik ekstrakcji. Można go wyrazić za pomocą stałych szybkości metabolizmu i wchłaniania (Testa B i wsp. 2001).

$$\mathbf{ER = K_G / (K_G / K_a)}$$

KG - stała szybkości metabolizmu dla przewodu pokarmowego
Ka - stała szybkości wchłaniania

Jedną z przyczyn zaistnienia wyraźnych mechanizmów metabolicznych jeszcze w ścianie jelit jest obecność specyficznych układów enzymatycznych. Jednym z enzymów szeroko prezentowanych w ścianie różnych odcinków przewodu pokarmowego jest CYP3A4. Jego całkowita ilość dla poszczególnych odcinków jelit waha się od ok. 10 nmoli w dwunastnicy, ok. 70 nmoli w jelicie cienkim do 22 nmoli w jelicie krętym i ok. 39 nmoli w jelicie czczym. Dla porównania wątroba człowieka o masie 1.5 kg zawiera ok 5.5 nmoli tego białka (Hall S.D. i wsp. 1999) Dla przewodu pokarmowego podobnie jak dla każdego innego organu lub tkanki można obliczyć współczynnik ekstrakcji który w tym wypadku będzie równy (Lin J.H. i wsp. 1999):

$$\mathbf{ER_{(g)} = [fb \times Cl_{(int,g)}] / [Q_{(g)} + fb \times Cl_{(int,g)}]}$$

lub

$$\mathbf{ER_{(g)} = [fb \times Cl_{(int,g)}] / [Cl_{(abs)} + fb \times Cl_{(int,g)}]}$$

ER(g) - współczynnik ekstrakcji jelita
fb- frakcja związana leku
Cl(int,g) - klirens wewnętrzny ściany jelita (ang.: *Intrinsic Clearance of Gut Wall*)
Cl(abs) - klirens absorpcyjny jelita (ang.: *Intestinal Absorption Clearance*)
Q(g) - przepływ krwi przez śluzówkę jelita

stąd klirens jelitowy równy jest:

$$\mathbf{Cl_{(g)} = [Q_{(g)} \times fb \times Cl_{(int,g)}] / [Q_{(g)} + fb \times Cl_{(int,g)}]}$$

Wartość klirensu jelitowego wywiera więc znaczny wpływ na dostępność leku i jego wchłanianie. Wraz z wartością frakcji metabolizowanej w wątrobie stanowią jeden z ważniejszych czynników decydujących o wielkości AUC podanego leku.

Dla podania dożylnego:

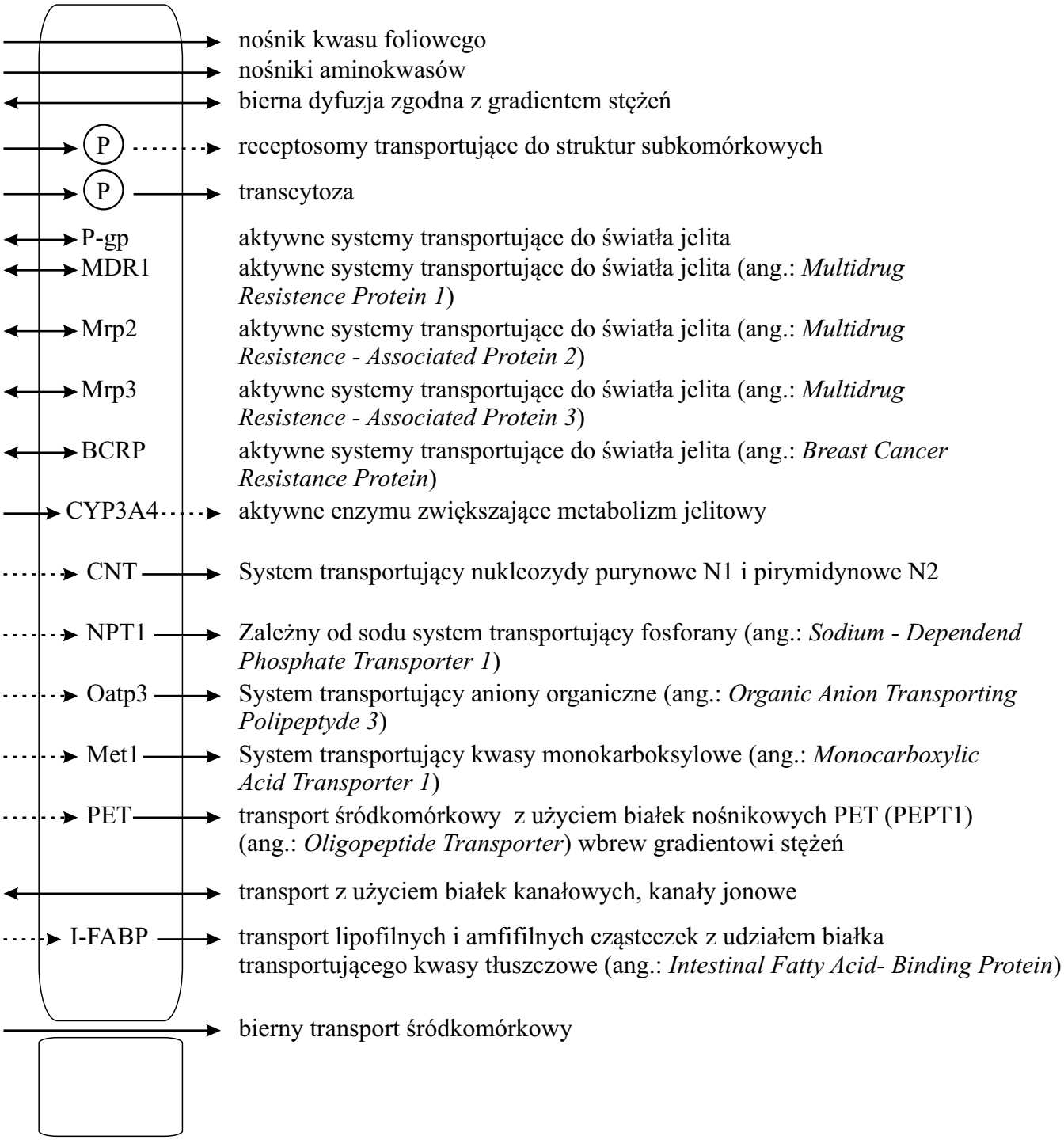
$$\mathbf{AUC = D / Cl_{(h)} + f_{(met)} \times Cl_{(g)}}$$

Dla podania doustnego:

$$\mathbf{AUC = F \times D / Cl_{(h)} + f_{(met)} \times Cl_{(g)}}$$

F - dostępność biologiczna leku
f(met) - frakcja leku poddana procesom metabolicznym w wątrobie
Cl(h) - klirens wątrobowy
Cl(g) - klirens jelitowy

Ściana przewodu pokarmowego to niezwykle złożony i zróżnicowany układ systemów nośników, układów białek transportowych oraz porów. Układ ten rozmieszony jest w całym przewodzie pokarmowym w sposób zróżnicowany i zmienny osobniczo. Stanowi to często przyczynę dużej zmienności w analizie biodostępności leków podawanych doustnie (Pang K.S. 2003; Velkov T. i wsp 2005).



Rys. Rodzaje transportu towarzyszące wchłanianiu w obrębie przewodu pokarmowego.

Sytuacja ta wymusza pewne cechy jakie powinna posiadać cząsteczka leku aby zapewnić jej dystrybucję w żądanej objętości organizmu. Wchłanianie w obrębie przewodu pokarmowego jest różne w różnych jego odcinkach. Leki hydrofilne o masie cząsteczkowej poniżej 255 wchłaniają się korzystając z przestrzeni między komórkami nabłonka jelit na drodze dyfuzji biernej. Znaczny wpływ na ich dostępność ma obecność żółci. Żółć i sole kwasów żółciowych mają znaczny wpływ na wchłanianie zarówno leków hydrofilnych jak i lipofilnych. Lipofilność samych kwasów żółciowych waha się w bardzo szerokich granicach pomiędzy -0.5 dla kwasu taurocholowego do 2.65 dla kwasu deoksycholowego stąd dla polarnych i hydrofilnych leków pełnią również rolę promotorów wchłaniania (Roda A. i wsp 1990;Bowe L.C. i wsp. 1997).

Duża zmienność składu środowiska w obrębie przewodu pokarmowego wpływa na duże zmiany jakościowe we wchłanianiu leków. Przyczyną jest między innymi pH które w zależności od fragmentu przewodu pokarmowego zmienia się w zakresie 1-8. Z przewodu pokarmowego dobrze wchłaniają się substancje lipofilne, o pH bliskim pH środowiska w którym się znajdują (Avdeef A. 2001). Wpływa to na mniejsze zjonizowanie cząsteczek leku a więc na większą dostępność. Nie jest to jednak zasada pozbawiona wyjątków. W wielu wypadkach dla leków o silnych właściwościach lipofilnych potwierdzono na hodowlach *in vitro* niskie wchłanianie. Często zjawiska takie dotyczą interakcji związków lipofilnych z komórkami nabłonka jelit które doprowadzają do syntezy P-gp - białka odpowiedzialnego za czynne wypompowywanie leków z komórek (ang.: *Efflux*). Podobnie jak w badaniach nad przepuszczalnością bariery krew/ mózg BBB, również w badaniach nad dystrybucją leków z jelit do kompartmentu centralnego wykorzystuje się pomiar PSA związku (Bohets H. i wsp 2001; Dressman J.B., Reppas C. 2000; Clark D.E. 2001). Dystrybucję po podaniu doustnym warunkuje wiele czynników wśród których wiele wypływa z cech fizjochemicznych samej substancji leczniczej (Pelkonen O. i wsp. 2001). Czynnikami od których w największym stopniu zależy wchłanianie leków z jelit są:

Czynniki fizjologiczne GIT:

- metabolizm jelitowy
- ruchy robaczkowe jelit i żołądka, MTT poszczególnych odcinków
- zmienne ukrwienie
- mechanizmy transportu aktywnego, rola P-gp
- zmienne pH w bardzo szerokich granicach
- obecność i cechy fizykochemiczne pokarmu: objętość, pH, temperatura, gęstość, lepkość
- skład pokarmu: białka, tłuszcze, węglowodany, ilość włókien etc.
- rola kwasów żółciowych i soku żołądkowego
- rytmy dobowe
- powierzchnia

Parametry fizjochemiczne leku:

- rozpuszczalność w wodzie Sw - stosunek Dawka / Sw < 250 ml
- współczynnik rozdziału oktanol /woda LogP(o/w)
- efektywny współczynnik rozdziału oktanol /woda LogD w granicach od 0 do 4
- powierzchnia polarna cząsteczki PSA < 113 A^2
- tPSA < 154 A^2 oraz LogP > 0 dla związków o masie cząsteczkowej między 255 a 580
- tPSA < 291 A^2 oraz LogP > 0 dla związków o masie cząsteczkowej powyżej 580

Ważnym czynnikiem decydującym o kinetyce leku na tym etapie jest liczba aktywnych atomów wodoru HBD (ang.: *Hydrogen Bond Donors*) ujęta w zasadzie pięciu Lipińskiego skorelowana w tym wypadku z PSA (ang.: *Polar Surface Area*) i masą cząsteczkową. Wypadkowa wymienionych czynników decyduje o wartości przenikalności (ang.: *Permeability*) jelita dla leków:

$$\mathbf{LogPerm_{(intest)} = - 2.546 \times - 0.011 \times PSA - 0.278 \times HBD}$$

Stosunek przenikalności do wartości rozpuszczalności w wodzie jest wyznacznikiem dostępności biologicznej leku po podaniu *per os*. Podział biofarmaceutyczny na cztery klasy związków został uzupełniają odniesienia do konkretnych problemów i zjawisk towarzyszących wchłanianiu z GIT (Pelkonen O. i wsp. 2001). Można więc wskazać na zależność między dostępnością a charakterystyką procesów i zjawisk które ją kontrolują w obrębie każdej klasy.

Średnica porów (Å)	Objętość treści (ml)	Wypełniony (pH)	Powierzchnia (m^2)	Na czczo (pH)	Objętość treści (ml)
	900	4.3 - 5.4	*żołądek* 0.11	1.4 - 2.1	300 - 500
		4.2 - 6.1	*dwunastnica* 0.09	4.9 - 6.4	
6 - 8	900-1000	5.2 - 6.2	*jelito cienkie* 60	6.5 - 7.4	500
2.9 - 3.8		6.8 - 7.5	*jelito kręte* 60	6.4	
< 2.3			*okrężnica* + *prostnica* 0.25	6.0 7.5	

Rys. Różnice w wartości pH i objętości treści poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego człowieka w zależności od wypełnienia pokarmem w stosunku do ich powierzchni.

HS:HP (ang.: *High Solubility: High Permeability*; klasa I):
- zależna od szybkości opróżniania żołądka - GER

HS:LP (ang.: *High Solubility: LowPermeability*; klasa III):
- zależna od średniego czasu przebywania w przewodzie pokarmowym - MTT, barier błonowych, błon specjalizowanych etc.

LS:HP (ang.: *Low Solubility: HighPermeability*; klasa II):
- zależna szybkości opróżniania żołądka - GER, stałej szybkości procesu rozpuszczania oraz szybkości uwalniania, zawartości tłuszczu i obecności żółci.

LS:LP (ang.: *Low Solubility: Low Permeability*; klasa IV):
- zależna głównie od obecności pokarmu

Obecnie uważa się że PSA powyżej 113 opisuje leki o niskim stopniu wchłaniania w stosunku do HIA (ang.: *Human Intestinal Absorption*). Zakres 83 - 113 charakteryzuje substancje wchłaniane w średnim stopniu lub o zróżnicowanym stopniu wchłaniania. Dopiero wartości poniżej 83 lub nawet 60 cechują leki bardzo dobrze dostępne po podaniu *per os*. Równie ważny dla opisu procesów wchłaniania leków z przewodu pokarmowego jest współczynnik rozdziału oktanol / woda LogP(o/w) uwzględniający stopień dysocjacji leku (LogD) oraz powierzchnię (As) jaka dostępna jest procesom wchłaniania w danym pH. Czas w jakim lek dostępny jest procesom wchłaniania jest czynnikiem w znacznym stopniu modyfikującym wchłanianie. W takim wypadku szczególnie ważna jest właściwa interpretacja takich parametrów farmakokinetycznych jak tlag i ka. Jeżeli GER (ang.: *Gastric Emptying Rate*) jest krótszy od czasu jaki gwarantuje wchłonięcie leku z żołądka należy uwzględnić go w obliczeniach.

Czas całkowitego wchłanięcia leku można obliczyć znając stałą szybkości wchłaniania. Jeżeli na przykład stała szybkości wchłaniania wynosi 0.1 1/min oznacza to że w ciągu minuty wchłania się 10% leku. Stąd czas potrzebny na wchłonięcie 100% leku obliczyć można z wzoru odpowiadającemu MAT. Wyraża on bowiem w tym wypadku średni czas potrzebny na wchłonięcie leku z żołądka. Dotyczy to procesów zachodzących liniowo gdzie γ oznacza stała szybkości wchłaniania z żołądka:

Stąd jeżeli: **MAT = 1 / γ tlag >> 0 GET < MAT gdzie GET = objętość dawki / GER**

Dla słabych kwasów:

$$\mathbf{LogD_{(A)} = [Log\ P_{(o/w)} - Log(1 + 10^{pH-pKa}) \times As] \times [MAT / GET]}$$

Dla słabych zasad:

$$\mathbf{LogD_{(B)} = [Log\ P_{(o/w)} - Log(1 + 10^{pKa-pH}) \times As] \times [MAT / GET]}$$

Gdzie współczynnik GET (ang.: Gastric Emptying Time) / MAT określa stopień zoptymalizowania czasu wchłaniania do opróżniania żołądka. W przypadku jelit współczynnik ten powinien obejmować zależność między czasem wchłaniania leku z odpowiedniej części jelita na danej powierzchni w czasie przesuwania treści pokarmowej zawierającej substancję leczniczą. W tym wypadku czasem tym będzie MTT (ang.: *Mean Transit Time*). Współczynnik przenikalności jelit opisywany jest także jako stosunek stałej szybkości absorpcji γ do powierzchni jelita - *Area* i stężenia substancji w jelicie - C(intest) (Edgecombe S.C. i wsp. 2000; Bohets H. i wsp 2001).

$$\mathbf{Perm = \gamma / Area \times C_{(intest)}}$$

lub korzystając z wzoru na określenie pola powierzchni bocznej walca $P = 2\pi rh$:

$$\mathbf{Perm = Cl / 2 \times \pi \times R \times L}$$

Cl - klirens
R- promień jelita
L - długość odcinka jelita

Zatem objętość danego odcinka przewodu pokarmowego w stanie wypełnienia -Vd(intest), opisać można innym wzorem geometrycznym na objętość walca:

$$\mathbf{Vd_{(intest)} = \pi \times r^2 \times L}$$

Stąd teoretyczna dostępność biologiczna leku wchłanianego z jelita może zostać opisana równaniem:

$$\mathbf{F = 1 - e^{-[(Perm \times Area \times MTT) / V(intest)]}}$$

MTT - średni czas obecności leku w jelicie
Area - powierzchnia jelita
V(intest) - objętość jelita

Pochodna wymienionych równań jest liczba rozpuszczalności Dn (ang.: *Dissolution Number*):

$$\mathbf{Dn = [(Diff / r) \times S\ (4 \times \pi \times r^2) / (4/3 \times \pi \times r^3 \times D)] / Q / [(\pi \times R^2 \times L)]}$$

S - rozpuszczalność (wysycenie)
r - średnica cząsteczek
Diff - rozproszenie cząsteczek (cm^2 / min)
D - gęstość
Q - przepływ treści jelita (cm^3 / min)

Jeżeli maksymalna objętość w jakiej można rozpuścić lek równa jest V= D / Sw. Zakładając że rozpuszczalność substancji Sw jest zależna od jej pKa i pH środowiska w jakim się znajduje. Można zaproponować wzór na objętość w jakiej dawka może się rozpuścić w danym pH:
Dla słabego kwasu A, lub zasady B:

$$V_{(A)} = D / [S_{(A)} \times (1 + 10^{pH,A-pKa})] \qquad V_{(B)} = D / [S_{(B)} \times (1 + 10^{pKa-pH,B})]$$

Stąd decyzję o projektowaniu leku którego wchłanianie ma się odbywać w żołądku lub w jelicie cienkim można podjąć rozwiązując równanie:

$$V_{(stom)} / V_{(A)} = V_{(intest)} / V_{(A)} \quad \text{lub} \quad V_{(stom)} / V_{(B)} = V_{(intest)} / V_{(B)}$$

V(intest) - objętość treści jelit
V(stom) - objętość treści żołądka
D - dawka

W badaniach poświęconych rozpuszczalności leków w przewodzie pokarmowym zwraca się uwagę na znaczną korelację współczynnika rozpuszczalności - SR (ang.: *Solubilization Ratio*) z współczynnikiem rozdziału oktanol / woda (Johnson K.C., Swindell A.C. 1996; Hoerter D., Dressman J.B. 2001). Gdzie SR jest wyrażony jako stosunek rozpuszczalności leku w solach kwasów żółciowych - Sbs do rozpuszczalności w wodzie - Sw.

$$SR = Sbs / Sw \qquad SR = 0.64 \times LogP_{(o/w)} + 2.09$$

lub odnosząc sie do wartości LogSw: $$\text{średnio} = 0.64 \times [(1.17 - LogSw) / 1.38] + 2.09$$

Lub odpowiednio dla słabych kwasów:

$$Log\ P_{(o/w)A} = Log\ D_{(A)} + Log(1 + 10^{pH-pKa}) \qquad SR_{(A)} = 0.64 \times [Log\ D_{(A)} + Log(1 + 10^{pH-pKa})] + 2.09$$

Dla słabych zasad:

$$Log\ P_{(o/w)B} = Log\ D_{(B)} + Log(1 + 10^{pKa-pH}) \qquad SR_{(B)} = 0.64 \times [Log\ D_{(B)} + Log(1 + 10^{pKa-pH})] + 2.09$$

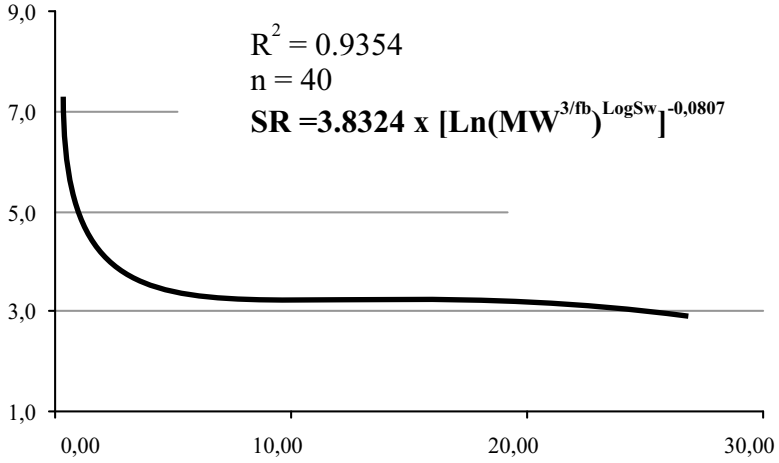
Korelacja SR z takimi parametrami jak frakcja leku związanego z białkami osocza - fb czy tPSA jest trudna do wykazania, jednak można wykazać tu pewne zależności: Stwierdzono również, że wielkość cząsteczek leku ma znacznie większe znaczenie dla procentu wchłoniętej dawki, w przypadku podawania niskich dawek słabo rozpuszczalnych leków (Johnson K.C., Swindell A.C. 1996). Parametr ten nie warunkuje już tak poważnie procesów wchłaniania w przypadku wysokich dawek leków słabo rozpuszczalnych w wodzie. W celu optymalizacji dawkowania we wczesnych fazach projektowania leków oblicza się także maksymalna dawkę jaka może być wchłonięta z danej przestrzeni kinetycznej - MAD (ang.: *Maximum Absorbable Dose*). Uwzględnia ona zarówno parametry PK jak i fizjochemiczne parametry cechujące lek. Obliczenie MAD pozwala stwierdzić jaka dawka leku przy danej wartości rozpuszczalności w wodzie może zostać wchłonięta ze światła przewodu pokarmowego przy określonej wartości szybkości transportu leku przez dany fragment GIT. Analiza najczęściej dotyczy jelita cienkiego człowieka może być również transponowana na inne gatunki z uwzględnieniem różnic w anatomii i fizjologii. Innym parametrem który pozwala zoptymalizować dawkowanie leku po podaniu *per os* jest minimalna akceptowana wartość rozpuszczalności dla danej dawki MAS (ang.: *Minimum Acceptable Solubility*). Wyrażenie matematyczne tego typu analizy opiera się na wartości Sw - rozpuszczalności w wodzie jednak może również odnosić się do LogP lub w stosunku do słabych elektrolitów LogD. Dopełnieniem charakterystyki dawki podanej drogą doustną jest określenie liczby dawki - DN (ang.: *Dose Number*). Takie podejście do badań nad optymalizacja farmakokinetyczną procesów wchłaniania po podaniu *per os* spowodowało wyodrębnienie szczególnych dla tej drogi podania modeli obliczeniowych.

Związek	Charakter	$logD_{7,4}$	logP	$LogS_w$	SR
2-Ethoksybenzemid	obojętny	1,34	1,34	-0,68	2,95
Albendazol	obojętny	3,29	3,29	-3,37	4,20
Alprazolam	obojętny	1,84	1,84	-1,37	3,27
Amiodaron	zasada	5	6,35	-7,59	6,15
Astemizol	zasada	4,14	5,14	-5,92	5,38
Betaxolol	zasada	0,42	2,4	-2,14	3,63
Bumetanid	kwas	0,31	3,21	-3,26	4,14
Karbamazepina	obojętny	1,54	1,54	-0,96	3,08
Ceriwastatyna	kwas	1,44	4,54	-5,10	5,00
Cianaoksacyna	kwas	-2,11	0,59	0,36	2,47
Clomipramina	zasada	3,27	5,25	-6,08	5,45
Clozapina	zasada	2,9	3,6	-3,80	4,39
Colchicyna	obojętny	0,82	0,82	0,04	2,61
Dichloralfenazon	obojętny	-0,32	-0,32	1,61	1,89
Glipizyd	kwas	0,13	1,64	-1,09	3,14
Gliburyd	kwas	2,19	4,29	-4,75	4,84
Inadapamid	obojętny	1,76	1,76	-1,26	3,22
Inadometacyna	kwas	0,89	3,79	-4,06	4,52
Isradypina	obojętny	3,75	3,75	-4,01	4,49
Ketoprofen	kwas	-0,09	2,71	-2,57	3,82
Losartan	kwas	0,83	4,13	-4,53	4,73
Mebendazol	obojętny	2,9	2,9	-2,83	3,95
Methokarbamol	obojętny	0,36	0,36	0,67	2,32
Metyrapon	obojętny	1,37	1,37	-0,72	2,97
Oxaprozyna	kwas	1,61	4,81	-5,47	5,17
Fensuksyimid	obojętny	0,68	0,68	0,23	2,53
Pimozyd	zasada	4,6	5,83	-6,88	5,82
Piroksykam	kwas	-0,31	0,82	0,04	2,61
Prometazyna	zasada	2,67	4,38	-4,87	4,89
Propefenon	zasada	1,63	3,85	-4,14	4,55
Sulfadoksyna	kwas	-0,73	0,93	-0,11	2,69
Sulinadak	kwas	-0,04	2,86	-2,78	3,92
Tamoxifen	zasada	5,02	6,34	-7,58	6,15
Tioridazyna	zasada	3,59	5,69	-6,68	5,73
Tolmetyna	kwas	-1,02	2,88	-2,80	3,93
Trimeprazyna	zasada	2,6	4,41	-4,92	4,91
Trioksasalen	obojętny	3,47	3,47	-3,62	4,31
Werapamil	zasada	2,57	4,1	-4,49	4,71
Propranolol	zasada	1,05	3,1	-3,11	4,07
Imipramina	zasada	2,38	4,48	-5,01	4,96
Chlorpromazyna	zasada	3,27	5,18	-5,98	5,41
Dipfenhydramina	zasada	1,52	3,11	-3,12	4,08
Diltiazem	zasada	1,81	2,29	-1,99	3,56
Desimipramina	zasada	1,04	4,08	-4,46	4,70
Chinidyna	zasada	2,12	3,35	-3,45	4,23
Prednison	obojętny	1,22	1,22	-0,51	2,87
Diazepam	obojętny	2,25	2,25	-1,94	3,53
Metoksalen	obojętny	1,97	1,97	-1,55	3,35
Diklofenak	kwas	1,09	4,49	-5,03	4,96
Ibuprofen	kwas	0,98	3,98	-4,32	4,64
Tolbutamid	kwas	1	3,13	-3,15	4,09
Amobarbital	obojętny	2,07	2,07	-1,69	3,41
Heksobarbital	obojętny	1,49	1,49	-0,89	3,04

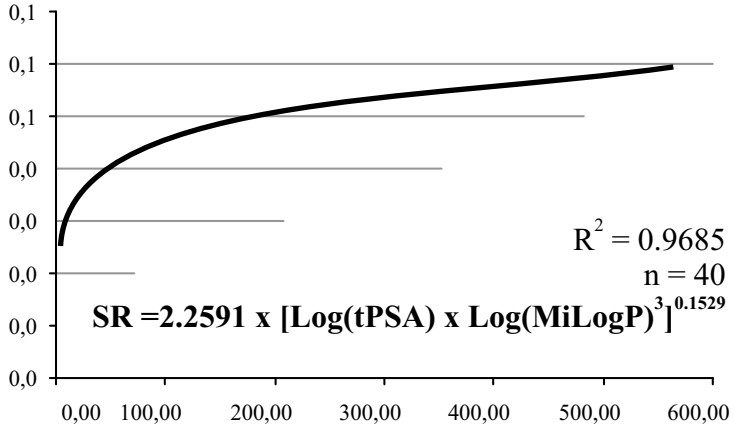
Rys. Przykładowe wartości SR (formuła Dressman), LogP (formuła Yalkowskiego), oraz LogD7,4 (Austin R.P. i wsp 2002).

n		LogSw	SR	MiLogP(o/w)	MW	fb	tPSA
1	amiodaron	-8,6	6,6	7,0	645	99,99	42,7
2	amlodypina	-3,0	4,0	3,0	409	99,93	99,9
3	alfentanyl	-1,8	3,5	2,2	417	99,91	85,5
4	aspiryna	-1,2	3,2	1,7	180	55,00	63,6
5	bupiwakaina	-4,1	4,6	3,8	288	99,95	32,3
6	chinina	-2,3	3,7	2,5	324	99,93	45,6
7	chlormetiazol	-1,8	3,4	2,1	162	65,00	12,9
8	disopyramid	-2,7	3,9	2,8	339	99,73	59,2
9	diltiazem	-2,7	3,9	2,8	415	99,72	59,1
10	ketamina	-2,6	3,8	2,7	238	27,00	29,1
11	diklofenak	-4,3	4,6	4,0	296	99,50	69,6
12	diazepam	-4,0	4,5	3,7	285	99,00	32,7
13	erytromycyna	-0,6	2,9	1,3	734	99,81	193,9
14	eltanolon	-4,3	4,6	4,0	319	99,00	37,3
15	felodypina	-5,9	5,4	5,1	384	100,00	64,6
16	fenobarbital	-2,1	3,6	2,4	232	50,50	75,3
17	fenytoina	-1,9	3,5	2,2	252	91,00	58,2
18	flukonazol	-2,4	3,7	2,6	306	11,00	81,7
19	flurbiprofen	-3,6	4,3	3,5	244	99,00	37,3
20	furosemid	-0,1	2,7	1,0	330	98,40	122,6
21	haloperidol	-4,6	4,8	4,2	376	99,91	40,5
22	ibuprofen	-3,4	4,2	3,3	206	99,00	37,3
23	indometacyna	-4,8	4,9	4,3	358	94,50	68,5
24	ketoprofen	-3,4	4,2	3,3	254	95,00	54,4
25	karbamazepina	-3,7	4,3	3,5	236	80,00	48,0
26	kofeina	-1,9	3,5	2,2	194	12,00	61,8
27	lidokaina	-2,2	3,7	2,5	234	67,00	32,3
28	lorazepam	-3,7	4,3	3,5	321	91,50	61,7
29	metotrexat	-1,0	3,1	1,6	454	53,00	210,5
30	morfina	-2,8	3,9	2,8	285	92,50	52,9
31	nifedypina	-3,1	4,0	3,1	346	99,96	110,4
32	naproksen	-3,0	4,0	3,0	230	99,40	46,6
33	nifedypina	-4,0	4,5	3,8	346	96,00	110,5
34	oksazepam	-3,7	4,4	3,5	287	98,40	61,7
35	pentobarbital	-1,7	3,4	2,07	226	61,00	75,3
36	prokaina	-2,2	3,7	2,5	236	6,00	55,6
37	tiopental	-2,4	3,7	2,6	242	85,00	58,2
38	triazolam	-3,9	3,7	2,5	343	99,89	43,1
39	testosteron	-4,3	4,5	3,7	288	60,00	37,3
40	warfaryna	-3,7	4,3	3,5	308	99,50	67,5

Rys. Porównanie wartości SR, tPSA i frakcji leku wiązanej przez białka osocza - fb.



Rys. Zależność między SR a MW LogSw i fb.



Rys. Zależność między SR a MiLogP i tPSA.

Są to modele typu PK/PS (ang.: *Permeability / Solubility*) oparte na podstawowych parametrach farmakokinetycznych takich jak stałe szybkości wchłaniania. Z drugiej strony na przepuszczalności - P zależnej od zjawisk transportu na korzyść lub niekorzyść dostępności (P-gp). A także na rozpuszczalności - S zależnej od innych zjawisk i parametrów fizjochemicznych (Stenberg P. i wsp. 2002).

$$\mathbf{MAD = Sw \times Ka \times V \times MTT} \qquad \mathbf{MAS = D / (Ka \times V \times MTT)}$$

$$\mathbf{MAD = [1.17 - (1.38 \times LogP)] \times Ka \times V \times MTT}$$

$$\mathbf{MAD_{(A)} = \{1.17 - [1.38 \times (LogD + Log(1+10^{pH-pKa}))]\} \times Ka \times V \times MTT}$$

$$\mathbf{MAD_{(B)} = \{1.17 - [1.38 \times (LogD + Log(1+10^{pKa-pH}))]\} \times Ka \times V \times MTT}$$

Sw - rozpuszczalność w wodzie (pH = 6.5; typowy zakres 0.0001 do 100 mg/ml)
Ka - stała szybkości absorpcji (zwykle od 0.001do 0.05 [1/min])
V - objętość treści kompartmentu (jelito cienkie człowieka w przybliżeniu 250 ml)
MTT - średni czas przebywania leku w danej przestrzeni (jelito cienkie człowieka = 270 min)
D - dawka docelowa
MAS - minimalna akceptowalna dla danej dawki docelowej rozpuszczalność
As - powierzchnia dostępna procesom wchłaniania
LogP - współczynnik rozdziału oktanol woda
LogD - współczynnik rozdziału oktanol woda elektrolitów
A;B - leki o charakterze słabych kwasów lub słabych zasad

Kluczowe znaczenie dla obliczenia MAS i MAD ma wartość stałej szybkości wchłaniania leku Ka:

	Ka (1/min)
ryfabutyna	0.003
pirydostygmina	0.004
terbutalina	0.005
N-acetyloprokainamid	0.006
probencyd	0.007
disopyramid	0.009
tianeptyna	0.010
tafenochina	0.012
acetazolamid	0.014
diltiazem	0.016
amoksycylina	0.017
alprazolam	0.018
metoprolol	0.020
propranolol	0.025
ofloksacyna	0.038
terfenadyna	0.047
lomefloksacyna	0.063
zydowudyna	0.067
ofloksacyna	0.070
takrolimus	0.075
antypiryna	0.080

MAS	**LogP**	**Sw**	**Ka**	**V**	**MTT**	**D**	**MAD**
mg/ml		mg/ml	1/min	ml	min	mg	mg
0.015	-2.5	100	0.001	250	270	1	6750.0
0.015	-2.4	90	0.001	250	270	1	6075.0
0.015	-2.3	80	0.001	250	270	1	5400.0
0.015	-2.2	70	0.001	250	270	1	4725.0
0.015	-2.0	50	0.001	250	270	1	3375.0
0.015	-1.5	25	0.001	250	270	1	1687.50
0.015	-0.8	10	0.001	250	270	1	675.00
0.015	-0.3	5	0.001	250	270	1	337.50
0.015	0.8	1	0.001	250	270	1	67.50
0.015	1.0	0.8	0.001	250	270	1	54.00
0.015	1.5	0.4	0.001	250	270	1	27.00
0.015	2.0	0.2	0.001	250	270	1	13.50
0.015	2.5	0.1	0.001	250	270	1	6.75
0.015	3.0	0.05	0.001	250	270	1	3.38
0.015	3.5	0.026	0.001	250	270	1	1.76
0.015	4.0	0.013	0.001	250	270	1	0.9
0.015	4.5	0.0065	0.001	250	270	1	0.44
0.015	5.0	0.0033	0.001	250	270	1	0.22
0.015	5.5	0.0016	0.001	250	270	1	0.11
0.015	6.0	0.0008	0.001	250	270	1	0.05
0.015	7.5	0.0001	0.001	250	270	1	0.007

Ryc. Symulacja wartości MAD i MAS dla dawki 1 mg (jelito cienkie człowieka).

Różnice w dystrybucji i farmakokinetyce leków związane z płcią

Precyzyjne badania farmakokinetyczne wymagają grup doświadczalnych lub docelowych ukierunkowanych pod względem płci. Wiadomo bowiem że różnice w kinetyce leków w wielu wypadkach związane są ze szczególnymi różnicami w fizjologii wynikającymi z różnicy płci (Ciccone G.K., Holdcroft A. 1999; Meibohm B. i wsp. 2002; Gandhi M. i wsp. 2004). Wpływ płci na parametry PK można uzasadnić czynnikami zależnymi od płci i specyficznymi dla płci. Czynniki specyficzne zwykle można pominąć na przykład w trakcie przeliczania dawki na masę ciała powierzchnię ciała, beztłuszczową masę ciała etc.. Różnice w farmakokinetyce leków związane z płcią często zależne są od wieku. Inaczej prezentują się w obrębie gatunku profile farmakokinetyczne uzyskane u osobników młodych a inaczej w podeszłym wieku. Najczęściej zjawisko to związane jest ze zmianami charakteru procesów metabolicznych leków w wątrobie związanych z wiekiem. Duże znaczenie dla farmakokinetyki leków ma specyfika hormonalna płci żeńskiej. W przypadku badań farmakokinetycznych brak kontroli nad cyklem może prowadzić do bardzo dużej zmienności wyników w niejednolitej pod tym względem grupie. Przyczyną większości różnic w kinetyce leków związanych z płcią są mechanizmy które z jednej strony bezpośrednio związane są z określoną fazą w ramach ADME. Natomiast z drugiej strony częściowo lub w całości podlega wpływowi bądź regulacji hormonalnej (Harm D.L. i wsp. 2001, Morris M.E. i wsp. 2003). Różnice w farmakokinetyce leków związane z płcią dotyczą zarówno człowieka jak i zwierząt. Jednak nie zawsze różnice zaobserwowane na zwierzętach laboratoryjnych znajdują odzwierciedlenie w fizjologii człowieka (Morris M.E. i wsp. 2003; Gandhi M. i wsp. 2004) .

Rodzaj różnicy	Płeć żeńska	Płeć męska
Wzrost	Mniejszy	Większy
Waga	Mniejsza	Większa
BMI	Mniejsza	Większa
Masa mięśni	Mniejsza	Większa
Ekspresja FATP-1mRNA (m. szkieletowe)	Większa	Mniejsza
Wychwyt glukozy (m. szkieletowe)	Większy	Mniejszy
Gęstość kości BMD	Mniejsza	Większa
Zawartość tłuszczu w organizmie	Większa	Mniejsza
Masa i objętość organów wewnętrznych	Mniejsza	Większa
Przepływ krwi przez organy	Mniejszy	Większy
Objętość osocza	Mniejsza	Większa
Ciśnienie krwi	Niższe	Wyższe
Ilość uderzeń serca	Większa	Mniejsza
Pojemność wyrzutowa serca	Mniejsza	Większa
Beztłuszczowa masa ciała	Mniejsza	Większa
Temperatura ciała	Wyższa	Niższa
Aktywność ruchowa	Mniejsza	Większa
Przemiana podstawowa BMR	Większa	Mniejsza
Aktywność dehydrogenazy alk. w śluzówce żołądka	Mniejsza	Większa
Jelitowy MTT	Mniejszy (faza lutealna)	Większy
Wydzielanie kwasu żołądkowego	Mniejsze	Większe
Żołądkowy GER	Mniejszy (ciąża)	Większy
Poziom AAG we krwi	Mniejszy (estrogeny)	Większy

Aktywność P-glikoproteiny	Mniejsza	Większa
Filtracja kłębuszkowa GFR	Mniejsza	Większa (masa ciała)
Klirens wątrobowy	Większy	Mniejszy
Ekspresja P-gp w wątrobie	Mniejsza	Większa
Klirens wątrobowy substratów P-gp	Większy	Mniejszy
Klirens kwasu moczowego	Mniejszy	Większy
Klirens PAH (szczur)	Mniejszy	Większy
Aktywność CYP1A2 (Kaukaz)	Mniejsza	Większa
Aktywność CYP3A4	Większa (1.4 x)	Mniejsza
Zawartość CYP3A4 w wątrobie	Większa	Mniejsza
Aktywność CYP2D6	Większa	Mniejsza
Aktywność CYP2E1	Mniejsza	Większa
Aktywność P-450	Mniejsza	Większa
Aktywność oksydazy ksantynowej	Większa	Mniejsza
Aktywność UGT1A6	Mniejsza	Większa
Aktywność COMT w RBC	Mniejsza	Większa
Aktywność transferazy glukuronozylowej	Większa	Mniejsza
Ekspresja Oatp mRNA (nerka szczura)	Mniejsza	Większa
Ekspresja rOAT1 (nerka szczura)	Mniejsza	Większa
Ekspresja rOCT2 mRNA (nerka szczura)	Mniejsza	Większa
Ekspresja mdr1a mRNA (wątroba szczura)	Większa	Mniejsza
Ekspresja mdr1b mRNA (wątroba szczura)	Mniejsza	Większa
Ekspresja MDR (wątroba szczura)	Większa	Mniejsza
Ekspresja Ntcp mRNA (wątroba szczura)	Mniejsza	Większa
Ekspresja CYP1B1 mRNA na leukocytach ob.	Większa	Mniejsza

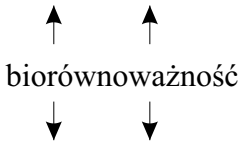
Dystrybucja i wchłanianie leków przez skórę

Skóra ssaków to znaczna powierzchnia która dla wielu leków stanowi dostępną i praktyczną w użyciu drogę podania. Różnice w dyspozycji leków wynikają w tym przypadku z różnic w budowie i grubości skóry w zależności od okolicy ciała. Wskazuje się także na znaczne różnice międzygatunkowe, w znaczeniu anatomicznym i czynnościowym (Riviere J.E. 1999). W wielu różnych formulacjach stosowanych na skórę umieszcza się leki których dostępność ma obejmować:

- warstwę powierzchniową zrogowaciałego naskórka - SC (łac.: *Stratum Corneum*)
- SC + skórę właściwą
- SC + skórę właściwą i tkankę podskórną

W pierwszym wypadku działania terapeutyczne obejmują najczęściej stany patologiczne naskórka, zmiany o charakterze miejscowym. Leki pokonujące warstwę SC mogą wywoływać działanie lecznicze w głębszych warstwach skóry. Te i pozostałe leki które penetrują tkankę podskórną obejmują swym zasięgiem już kompartment centralny (resorpcja). Mogą więc służyć jako droga podania substancji leczniczej o działaniu ogólnym. Wchłanianie leków przez skórę zachodzi w drodze transportu biernego. Największe szanse na penetrację skóry mają leki o względnie dużym współczynniku rozdziału oktanol / woda P(o/w). Wiadomo że polarne leki podobnie jak silnie niepolarne słabo wchłaniane są przez skórę (EPA/600/8-91/011B 1992; Sparr E., Wennerstrom H. 2001). Proces wchłaniania leku drogą skórną można opisać jako wynik adsorpcji i wchłaniania leku która umożliwia dalej biodostępność.

dawka - adsorpcja - absorpcja - biodostępność - efekt



dawka - adsorpcja - absorpcja - biodostępność - efekt

Dobrze przenikają przez warstwę SC leki o małej masie cząsteczkowej (Pirot F. i wsp. 1997; Sparr E., Wennerstrom H. 2001). MW > 500 Da bardzo ogranicza wchłanianie leków przez skórę. Stąd w celu obliczenia wartości tzw. relatywnej przenikalności dla skóry proponuje się równanie (Mitragorti S. 2003):

$$\mathbf{LogPerm = LogP_{(o/w)} \times (MW / 2.6)}$$

Znalezienie liniowej zależności pomiędzy wartością lipofilności masą cząsteczkową i przepuszczalnością przez skórę nie jest łatwe stąd w piśmiennictwie różne równania wyznaczone zależnie od wielkości i rodzaju grupy testowanych leków (Kielhorn J. i wsp. 2005):

$$\mathbf{LogPerm = 0.71 \times LogKOW - 0.0061 \times MW - 6.3} \qquad n = 93$$

$$\mathbf{LogPerm = 0.77 \times LogKOW - 0.0103 \times MW - 2.33} \qquad n = 107;\ r2 = 86;\ F = 317$$

Obecnie w ramach obliczeń PK korzysta się z wartości współczynnika rozdziału *stratum corneum* / woda LogP(sc/w). Współczynniki rozdziału pomiędzy innymi fazami np. powietrzem - A, również pozwalają opisać dyspozycję leków w skórze (Roy A., Georgopoulos P.G. 1997).

$$\mathbf{LogP_{(sc/A)} = LogP_{(sc/w)} / LogP_{(A/w)}} \qquad \mathbf{LogP_{(sc/w)} = LogP_{(o/w)}^{0.71}}$$

Stąd przepuszczalność przez skórę obliczamy korzystając z formuł:

$$\mathbf{LogPerm = - 6.3 + 0.71 \times Log\ P_{(o/w)} - 0.0061 \times MW}$$

Log Perm - przenikalność przez skórę (ang.: *Permeability*)
MW - masa cząsteczkowa

Oraz uwzględniając stopień dysocjacji związku, dla słabych kwasów:

$$\mathbf{LogPerm = - 6.3 + 0.71 \times [Log\ D + Log(1+10^{pH-pKa})] - 0.0061 \times MW}$$

Dla słabych zasad:

$$\mathbf{LogPerm = - 6.3 + 0.71 \times [Log\ D + Log(1+10^{pKa-pH})] - 0.0061 \times MW}$$

Leki lipofilne predysponowane są do łatwego wchłaniania i szybkiej dyspozycji w skórze. Bardzo duża lipofilność powoduje jednak iż lek osiąga warstwę SC i w niej pozostaje, nie dyfundując do głębszych warstw skóry. Wiele trucizn doskonale wchłania się przez skórę nie tylko dzięki lipofilności ale również niskiej wartości tPSA.

	miLogP	tPSA
aceton	0.53	17.071
acetonitryl	0.04	23.792
benzen	2.128	0.0
octan etylu	0.637	26.305
fenol	1.744	20.228
tetrahydrofuran	0.778	9.234

Niektóre relacje dotyczące badania wpływu lipofilności na dystrybucję przez skórę potwierdzają brak większej korelacji w małych grupach wybranych związków (Estrada E. i wsp. 2002). Proces ten opisuje ilościowo parametr B zależny od współczynnika rozdziału oktanol woda:

$$\mathbf{B = P_{(o/w)} / 10\ 000}$$

Leki nie zawsze mogą obyć się bez wstępnych zabiegów pozwalających na rozszczelnienie i właściwą hydratację SC (promotory wchłaniania). Fizjologiczna hydratacja SC to około 5-15% (skóra człowieka). Wxhłanianie leków przez skórę odbywa się zarówno drogą poprzez komórki - intracelularną jak i pomiędzy komórkami - intercelularną (transcelularną), oraz poprzez wytwory skóry takie jak mieszki włosowe gruczoły łojowe oraz potowe. U człowieka średnio na 1 cm^2 skóry przypada 20-250 gruczołów łojowych oraz 40 - 70 mieszków włosowych. Stąd na przykład na powierzchni 10 cm^2 będzie ich odpowiednio 2 - 2.5 tysiąca i 400 -700 mieszków włosowych. Struktura *stratum corneum* ma charakter wielowarstowego bruku i jest kompartmentem lipidowo-białkowym. U człowieka warstwa ta ma 10 - 40 μm. Obecne trendy wskazują na grupę leków amfifilowych jako najlepszych kandydatów na leki wchłaniane do skóry i przez skórę. Wielotorowy mechanizm pokonywania bariery SC polega z jednej strony na transporcie leku przez fazę białkową. Tą drogą wchłaniają się leki polarne przy założeniu że warstwa ta związała odpowiednią ilość wody. Z drugiej strony związki niepolarne wchłaniają się głównie przez fazę lipidową. Inna możliwość transportu to droga jaką gwarantują pory, gruczoły potowe oraz mieszki włosowe. Przez pory, mieszki włosowe, kanały potowe w drodze transportu biernego wchłania się wiele leków hydrofilnych (Mitragorti S. 2003). Wchłanianie leków przez *stratum corneum* jest ściśle zależne od hydratacji tej warstwy która może dojść do 50%. Dotyczy to także zwiększonej wilgotności powietrza przy której zwiększa się przepuszczalność skóry. Wchłanianie leków przez skórę jest różne w różnych regionach ciała a także zależne od płci. Wzrost temperatury skóry przyczynia się do znacznego wzrostu wchłaniania (EPA/600/8-91/011B 1992).

Ogromne znaczenie ma także stopień ukrwienia. Dystrybucja cząsteczek leku w obrębie SC zależna jest od kompozycji układu białka / lipidy i szczelności konstrukcji bruku jaką tworzą. Struktura SC może w zależności od stopnia hydratacji przyjmować charakter żelu (ang.: *Gel Phase*) lub fazy ciekłokrystalicznej (ang.: *Liquid Crystaline Bilayer*). Struktura żelu powoduje pogorszenie przepuszczalności skóry zarówno dla wody jak i substancji w niej rozpuszczonych nawet stukrotnie (Sparr E., Wennerstrom H. 2001). Czas który potrzebny jest na osiągnięcia tzw. stanu stacjonarnego w przypadku skóry można obliczyć korzystając z wzoru :

$$t_{lag} = L^2 / 6 \times D_{(sc)}$$

L - grubość *stratum corneum*
D(sc) - wartość dyfuzji dla sc

Współczynniki rozdziału są ważnym parametrem w modelowaniu farmakokinetycznym leków stosowanych na skórę. Jednym z bardziej użytecznych jest współczynnik rozdziału *stratum corneum* / podłoże P(sc/v) (podłoże maści, kremu etc.).

$$P_{(sc/v)} = C_{(sc)} / C_v$$

Cv - stężenie leku w podłożu
C(sc) - stężenie leku w *stratum corneum*

Przenikalność przez skórę można określić jako całkowity współczynnik przenikalności PT (ang.: *Total Permeability Coefficient*). W jego skład wchodzi wartość współczynnnika przenikalności *stratum corneum* oraz współczynnik przenikalności *dermis/ epidermis* - PD/E. W takich obliczeniach dla SC należy oddzielnie potraktować współczynnik przenikalności poprzez lipidy i oddzielnie poprzez pory (Warner K.S. i wsp. 2002).

$$P_T = 1 / [(1/Psc) + (1/P_{D/E})] \qquad Psc = P_L + P_P$$

Psc - współczynnik przenikalności dla *stratum corneum*
PL - współczynnik przenikalności drogą lipidową dla *stratum corneum*
PP - współczynnik przenikalności dla *stratum corneum* drogą porów

Duże znacznie dla wchłaniania leków przez skórę mają grupy funkcyjne oraz ugrupowania farmakoforowe decydujące o szybkości wchłaniania. Ugrupowania takie prawdopodobnie w odpowiedni sposób organizują cząsteczkę przestrzennie w stosunku do *stratum corneum*. Niektóre grupy funkcyjne zwiększają wchłanianie związków przez skórę np. N-CH_3, S-CH_3 lub -CH_2-CH_3 (Esatrada E. i wsp. 2002).

Odrębnym zagadnieniem w analizie farmakokinetycznej leków stosowanych na skórę jest metabolizm w obrębie skóry. Wiadomo obecnie że w obrębie skóry zachodzą procesy metaboliczne zarówno pierwszej jak i drugiej fazy (Kielhorn J. i wsp. 2005).

Procesy pierwszej fazy:

- Oksydacja (hydroksylacja; deaminacja; dealkilacja; epoksydacja; utlenianie aldehydów i alkoholi)
- Redukcja (azoredukcja; NO redukcja; redukcja chinonów)
- Hydroliza (estrów karboksylowych, siarczanowych i fosforanowych; peptydów; hydrolacja epoksydów)

Procesy drugiej fazy:
- Glukuronidacja, sulfatacja, koniugacja z glutationem, acetylacja, koniugacja z aminokwasami, metylacja

Aktywność procesów pierwszej fazy w obrębie skóry człowieka ocenia się na do 28% aktywności wątroby natomiast drugiej fazy na do50 % aktywności wątroby. Metabolizm w obrębie skóry jest jednak zależny również od powierzchni z jakiej wchłaniany jest lek. Również leki których cząsteczki mają dłużej przebywać w obrębie skóry są bardziej narażone na działanie enzymów metabolicznych.

Rozmieszczenie enzymów metabolicznych w skórze jest różne, odnaleźć je można już w *stratum corneum*.

Stratum corneum	- lipazy, fosfatazy, proteazy, sulfatazy, glikozydazy
epidermis	- dehydrogenazy alkoholowa i aldehydowa, CYP1A1, CYP1A2, S - transferaza glutationowa
mieszki włosowe	- CYP1A1, CYP1A2, S - transferaza glutationowa
gruczoły łojowe	

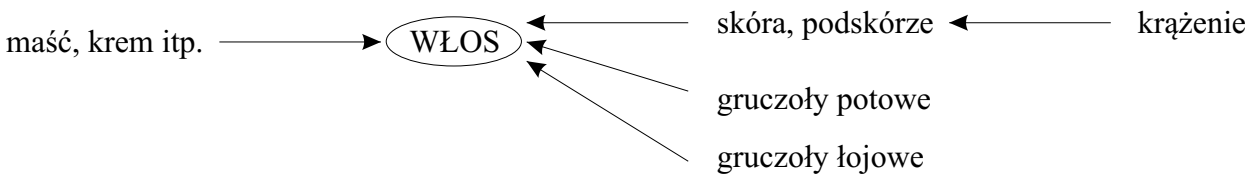
Dystrybucja leków do wytworów rogowych skóry

Włos jest wytworem skóry w którym może kumulować się wiele leków lub toksyn. Szybkość wzrostu włosów człowieka to 0.5 do1.5 cm w ciągu miesiąca (Bernard L. i wsp. 2002). Obecnie wiadomo że do włosów trafiają tylko nieliczne cząsteczki chemiczne o odpowiedniej charakterystyce. Wraz ze wzrostem lipofilności wzrasta stopień wiązania leków ze strukturami włosa. Również leki niezjonizowane wchłaniają się lepiej od zjonizowanych (Stout P.R. i wsp 1998; Stout P.R. i wsp 1998; Stout P.R. i wsp 2000). W największym stopniu deponowane są w obrębie włosa leki o wymienionych niżej cechach:

- związki niskocząsteczkowe
- lipofilne
- zawierające grupy - COOH
- związki kationowe i neutralne
- niezjonizowane

Wiadomo również że transport leków do włosa jest procesem wysycalnym, stereoselektywnym i cechuje go powinowactwo do określonych składowych i receptorów. Niektóre leki silniej wiążą się z włosami pigmentowanymi od pozbawionych pigmentu (Stout P.R., Ruth J.A. 1998). Analiza stężenia leku we włosach jest jednym z punktów końcowych dla procesów dystrybucji leku. Dystrybucja leku do włosów dotyczy kumulacji i odkładania lecz nie redystrybucji leku. Powoduje to że niejednokrotnie pozostałości substancji chemicznej można wykryć we włosach po latach od ekspozycji. Warunkuje to również wykorzystanie włosów jako źródła informacji o potencjalnych zagrożeniach. W kryminalistyce włosy wykorzystywane są najczęściej do wykrywania niektórych trucizn oraz substancji niedozwolonych takich jak:

- amfetamina, metamfetamina, MDA, MDMA, MDEA
- kokaina, benzyloekgonina,norkokaina, kokaetylen
- morfina, kodeina, heroina, 6 acetylomorfina
- oksykodon, oksymorfon, hydromorfon, hydrokodon
- tetrahydrokanabinol
- PCP



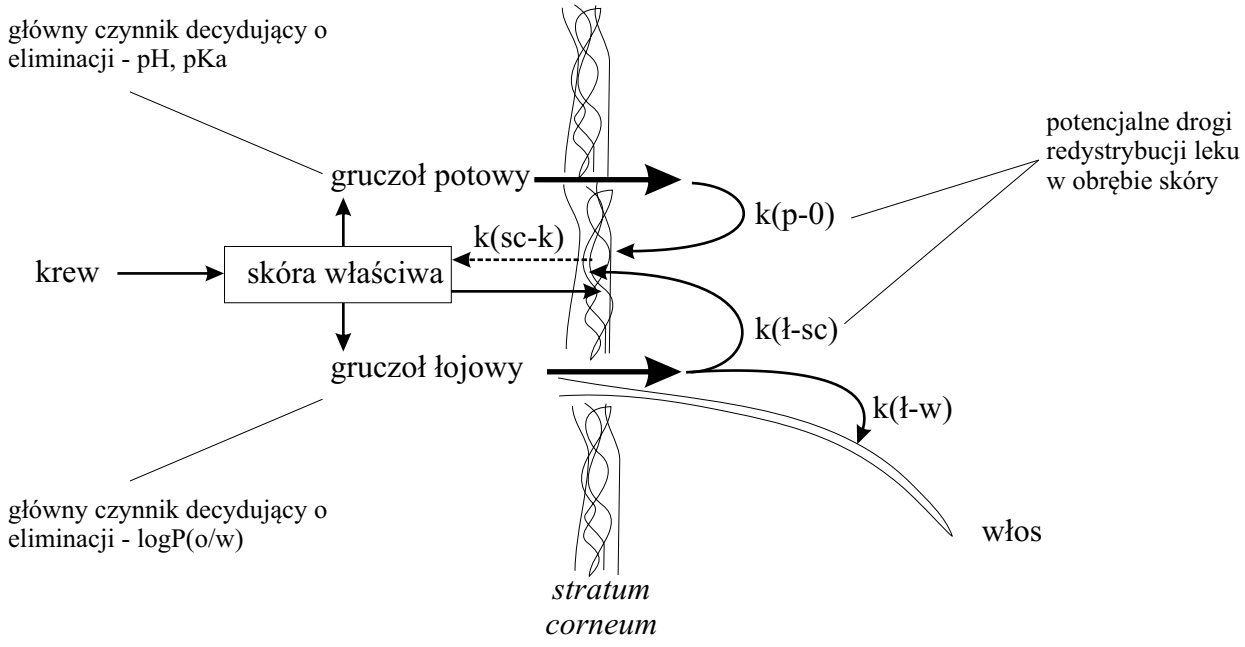
Ryc. Dyspozycja leków w obrębie włosa.

Dystrybucja leków wraz z potem

Wraz z potem wydzielane są najczęściej substancje o charakterze słabo zasadowym. Główną drogą transportu jest dyfuzja bierna zgodna z gradientem stężeń. Dzięki nowym standardom analizy chemicznej pot stał się medium w którym w sposób stosunkowo prosty można określi stężenie leku. Stężenia wykrywane w pocie są wypadkową eliminacji która ma charakter kumulacyjny. Stężenie mimo częściowej reabsorbcji wydzielanej wraz z potem substancji wzrasta wraz z wydłużeniem czasu próbkowania. Reabsorpcja po wydzieleniu wraz z potem dotyczy takich substancji jak MDMA, kokaina czy THC. Liczba substancji które można wykryć w pocie nie jest duża a aprobowanych metod służących do przesiewowych analiz np w kryminalistyce jest krótka. Dotyczy między innymi takich związków jak:

- etanol
- nikotyna, kotynina
-amfetamina, metamfetamina
- metadon
- kokaina, benzyloekgonina, ester metylowy ekgoniny
- fencyklidyna
- morfina, heroina, 6 acetylomorfina

Dla niektórych substancji takich jak etanol eliminacja wraz z potem przyjmuje liniową zależność w stosunku do zawartości etanolu we krwi. Wiadomo także że stężenie niektórych aminokwasów w pocie jest znacznie wyższe niż ich stężenie w osoczu krwi np.: seryna 24 krotnie cytrulina 13 krotnie. Większość substancji które wykrywane są w pocie w dużych stężeniach to substancje lipofilne. Prawdopodobnie nie jest to jednak wynik większego powinowactwa lipofilnych leków do gruczołów potowych lecz gruczołów łojowych. Dzięki gruczołom łojowym wydzielane jest na powierzchni skóry wiele substancji silnie lipofilnych takich jak iwermektyna, terbinafina, klofazymina, flukonazol itrakonazol i gryzeofulwina (Faergemann J. i wsp. 1994; Haas N. i wsp. 2002; Soube S. i wsp. 2004). Substancje te najczęściej kumulują się w obrębie *stratum corneum*.



Ryc. Eliminacja i redystrybucja leków wraz z potem.K(p-0) stała szybkości transferu leku wraz z potem na powierzchnie skóry;K(ł-w) stała szybkości transferu leku z łoju do włosa; K(ł-sc) stała szybkości transferu leku z łoju do *stratum corneum*; K(sc.-k) stała szybkości transferu leku ze *stratum corneum* do skóry właściwej.

Dystrybucja leków wraz z nasieniem

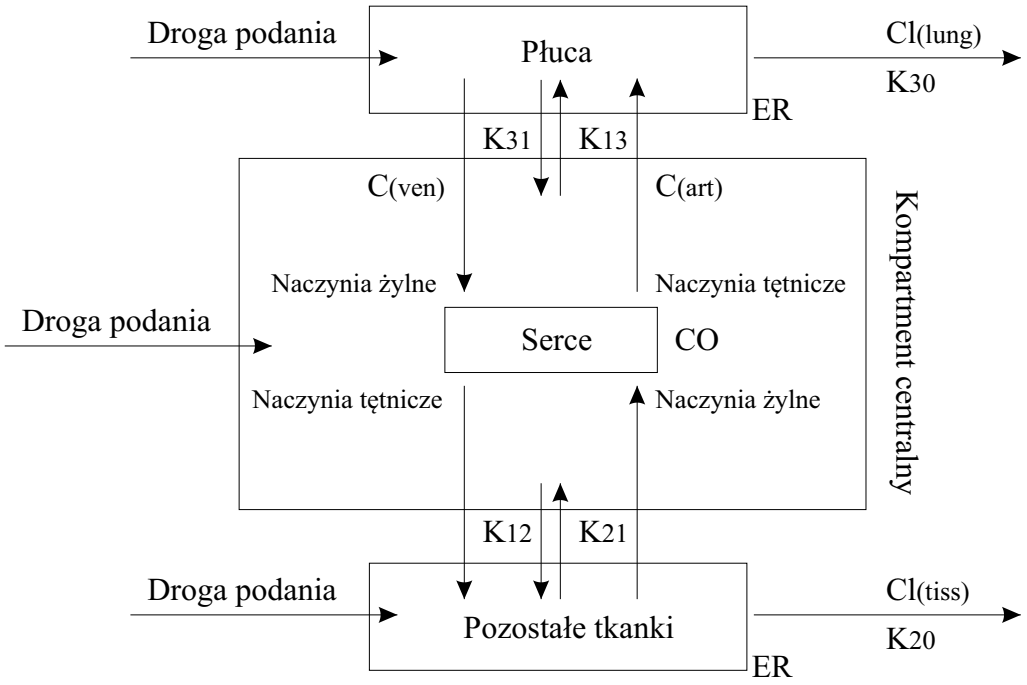
Zarówno w medycynie człowieka jak i w medycynie weterynaryjnej dystrybucja leku do nasienia jest coraz częściej śledzoną drogą wędrówki cząsteczek leku. Analiza stężenia leku pozwala formułować dwojakiego rodzaju wnioski. Zamierzona dystrybucja leków tą drogą jest ważnym z klinicznego punktu widzenia kierunkiem rozwoju farmakoterapii HIV. W przypadku niezamierzonej w sensie prowadzonej terapii dystrybucji leku do nasienia informacja o wpływie leku na jego jakoś pozwala korygować terapię mając na uwadze zagadnienia związane z płodnością. Analiza kinetyki oraz stężeń leku w nasieniu daje możliwość wyznaczenia współczynnika rozdziału SP/BP (ang.: *SeminalPlasma / Blood Plasma Ratio*).

	SP/BP
atazanawir (Ho)	0.1
kwas acetylosalicylowy (Ho)	0.12
fenytoina (Ho)	0.17
fenytoina (Cu)	0.2
lamiwudyna (Ho)	9.1
naltrekson (Cu)	14

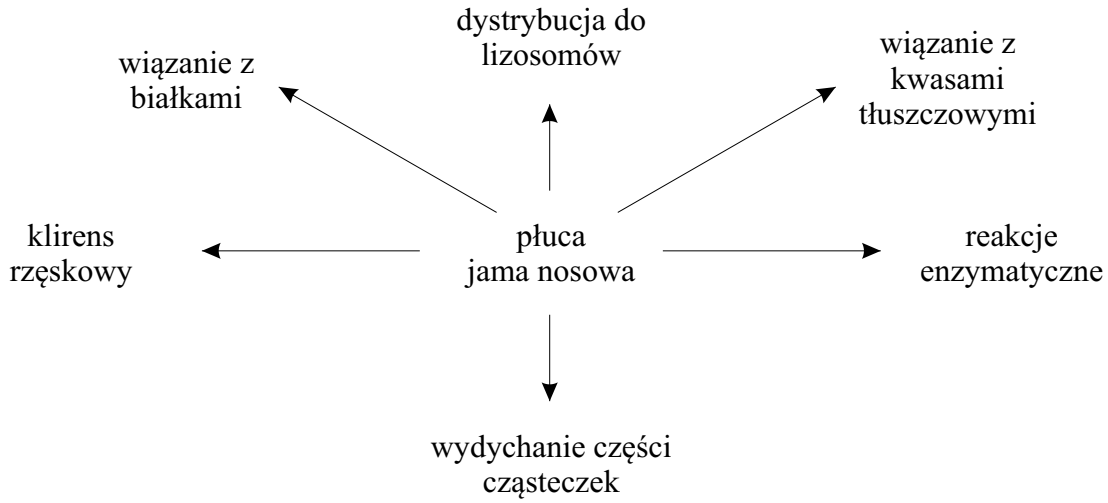
Dystrybucja leków w obrębie płuc

Płuca są szczególnie interesującym organem w badaniach farmakokinetycznych. Z punktu widzenia teorii kompartmentowej rozmieszczenia leków stanowią jeden zwarty kompartment o charakterze hydrofilnym. Nie wyklucza to jednak analizy wielokompartmentowej PK leku w płucach. Anatomicznie jest to organ parzysty o ogromnej powierzchni chłonnej ok. 160 m^2 która może gwarantować bardzo duże wchłanianie leku podanego wziewnie. Powierzchnia nie jest jednak w tym wypadku jedynym czynnikiem decydującym o znacznej dostępności większości leków podawanych tą drogą. Drugim ważnym czynnikiem jest ogromna perfuzja płuc związana z ich fizjologiczną funkcją. Jej wartość w płucach człowieka wynosi ok 14 ml/min/g. Stąd przez każde 300 gramów tkanki płucnej w czasie jednej minuty przepływa około 4.5 litra krwi. Dla porównania równoważna masa nerek na osiągnięcie perfuzji w takiej objętości potrzebuje około 4 minut. Stąd pokonanie bariery powietrze krew - ABB (ang.: *Air Blood Barrier*) jest znacznie ułatwione. Nabłonek wyścielający pęcherzyki płucne zbudowany jest z dwóch typów komórek zaopatrzonych w liczne pory o podstawowym znaczeniu dla transportu wielu leków.

Z punktu widzenia właściwości fizjochemicznych płuca są organem raczej hydrofilnym, zawierającym niewielkie ilości tłuszczów. Jednak związki lipofilne o charakterze słabych zasad i pKa > 8 mogą osiągać wyższe stężenia w płucach w strukturach lizosomów (Upton R.N., Doolette D.J. 1999). Niezależnie od lipofilności związku podanego drogą wziewną może on w obrębie płuc wiązać sie z kwasami tłuszczowymi ulegając estryfikacji czyli tworząc wiązania estrowe. Takie estry nie są wchłanialne i nie są aktywne farmakalogicznie. Tego typu reakcjom w obrębie płuc oraz jamy nosowej ulegają kortykosteroidy z grupa hydroksylową w pozycji 21. Przykładem leku który tworzy tego typu estry w drodze odwracalnej reakcji jest budesonid (Winkler J. i wsp 2004). Dobrze przez płuca wchłaniają się związki o małej masie cząsteczkowej, jednak stanowią one równie dobrą drogę podania dla związków o masie cząsteczkowej powyżej 500 Da oraz niektórych protein o masie cząsteczkowej nawet powyżej 40 -50 kDa (Crandall E.D., Matthay M.A. 2001). Transport tak dużych molekuł możliwy jest dzięki mechanizmom transportu interstycjalnego przez pory oraz dyfuzji przez komórki w drodze transcytozy. Mechanizmy transportowe w obrębie płuc to także transport za pomocą wyspecjalizowanych nośników oraz dyfuzji prostej.



Rys. Model kompartmentowy dystrybucji leku do płuc połączony z fizjologią ukrwienia narządu.



Ryc. Wybrane czynniki decydujące od dystrybucji i dostępności biologicznej leków podawanych drogą wziewną.

Płuca nie są barierą dla związków o znacznej wartości PSA nawet gdy %PSA powierzchni cząsteczki jest bardzo wysoki. W badaniach na wąskich grupach leków wykazano znaczną korelację wartości LogD z szybkością wchłaniania leku przez płuca oraz dostępnością biologiczną po podaniu tą drogą (Tronde A. i wsp 2003; Tronde A. i wsp 2003). Ważna w tym wypadku jest także wielkość cząstek jakie trafiają np. w postaci aerozolu do dróg oddechowych. Miejscem wychwytywania cząstek wielkości równej lub większej od 8 μm są głównie struktury górnych dróg oddechowych i nosa. Granica 3-8 mm zarezerwowana jest dla drzewa oskrzelowego oraz tchawicy. Przez aparat rzęskowy płuc zatrzymywane są głównie cząsteczki mniejsze od 5 μm. W słabiej urzęsionych regionach mogą ulegać wchłanianiu cząsteczki wielkości powyżej 3 μm, nie wykluczając w tym udziału makrofagów zlokalizowanych w płucach. Zmniejszanie wielkości cząsteczek w optymalizacji postaci leków podawanych wziewnie nie jest jednak nieograniczone. Nie zawsze musi iść w parze ze zwiększeniem dostępności leku. Cząsteczki mniejsze od 1 μm mogą bowiem opuszczać drogi oddechowe wraz z powietrzem wydychanym (Testa B. i wsp. 2001). Największą dostępność lekom podawanym drogą wziewną do płuc zapewnia średnica aerodynamiczna cząsteczek 1-3 μm. Ważnym parametrem cząsteczek które dostają się do płuc jest szybkość z jaką osiągają ten kompartment. Jest ona zależna między innymi od średnicy geometrycznej cząsteczek, średnicy aerodynamicznej, ich gęstości oraz ładunku. Szybkość tą obliczyć można korzystając z formuły (Edwards D.A. i wsp. 1998):

$$K = M \times G / 3x \pi \times \mu \times d$$

K - szybkość z jaką cząsteczki dostają się do płuc
M - masa cząsteczki
G - stała grawitacji
μ - lepkość powietrza
d - średnica cząsteczki

Celem obliczenia średnicy aerodynamicznej cząsteczek można posłużyć się równaniem:

$$d_a^2 = p \times d^2 / p_a$$

da - średnica aerodynamiczna
d - średnica cząsteczki
p - gęstość cząsteczki
p - gęstość aerodynamiczna (1g/cm^3)

Droga wziewna podania leku jest jedna z nielicznych które zapewniają wysoką dostępność biologiczną dla leków o znacznym polu polarnym powierzchni cząsteczki (Tronde A. 2002; Tronde A. i wsp. 2003;Tronde A. i wsp. 2003). Stanowi więc alternatywną drogę podania dla leków słabo wchłanianych z przewodu pokarmowego lub podobnie jak w przypadku drogi dospojówkowej nie pokonujących bariery krew - mózg. Wiadomo jednak że i tutaj na wchłanianie leków wpływ ma obecność białek wypompowujących czynnie leki czyli P-gp, MRP oraz LRP (ang.: *Lung Resistance Protein*). Stałą szybkości wchłaniania leku w płucach obliczyć można znając okres półtrwania leku uzyskany w przeprowadzanym doświadczeniu na podstawie rachunku masy i transportu leku.

$$\gamma = 0.693 / t_{1/2}$$

γ - stała szybkości absorpcji leku
t1/2 - okres półtrwania leku

Płuca mogą stanowić także narząd służący eliminacji ksenobiotyków. Funkcja ta wiąże się zarówno z eliminacją w wydychanym powietrzu jak i w wyniku metabolizmu enzymatycznego. Klirens płuc uzależniony jest od pojemności wyrzutowej serca - CO (ang.: *Cardiac Output*) i współczynnika ekstrakcji obliczonego dla płuc -ER (ang.: *Extraction Ratio*). Współczynnik ten można obliczyć znając stężenie leku we krwi dostarczanej do płuc C(art) i krwi opuszczającej płuca C(ven).

$$ER_{(lung)} = 1 - (C_{(art.)} / C_{(ven)})$$

$$Cl_{(lung)} = CO \times ER$$

Jedną z metod analizy parametrów farmakokinetycznych leków w płucach są metody porównawcze w układzie lek (d) : wskaźnik (i). Pozwalają one na obliczenie współczynnika ekstrakcji leku:

$$ER = [1- ((C_{(d)} / D_{(d)}) / (C_{(i)} / D_{(i)}))] \times 100$$

C(d) - stężenie leku
D(d) - dawka leku
C(i) - stężenie wskaźnika
D(i) - dawka wskaźnika

Metody te pozwalają także na wykreślenie współczynnika kumulacji leku w tkance płucnej - R (ang.: *Extraction Ratio*). Wcześniej należy wykreślić pola powierzchni pod krzywymi ilustrującymi zmiany stężeń wskaźnika i leku z uwzględnieniem recyrkulacji w warunkach *in vivo*.

$$R = [1 - (AUC_{(d)} / AUC_{(i)})] \times 100$$

AUC(d) - pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia leku
AUC(i) - pole powierzchni pod krzywą zmian stężenia wskaźnika

Jedną z częściej stosowanych metod określania dyspozycji leku w obrębie płuc jest obliczanie stosunku stężenia leku w surfaktancie - ELF (ang.: *Epithelial Lining Factor*) do stężenia leku w osoczu. Punktem wyjścia do analizy porównawczej są najczęściej wartości AUC pod krzywą zmian stężenia leku w czasie w ELF i AUC leku we krwi. Najczęściej wykorzystywaną metodą w takich badaniach, w celu pobierania prób jest metoda mikrodializy. Inną metodą śledzenia dyspozycji leku jest obliczanie stosunku stężenia leku w makrofagach pęcherzykowych - AM (ang.: *Alveolar Macrophages*) do stężenia leku w osoczu. W tym wypadku punktem wyjścia do analizy porównawczej jest również Określenie średniego stężenia leku w makrofagach w równoważnych punktach czasowych w odniesieniu do krwi.

ELF : 1 (osocze)		**AM : 1** (osocze)	
19,9	pirazynamid (Ho)	352	grepafloksacyna (Ra)
13,5	enroflokscyna (Ca)	213,5	klarytomycyna (Ho)
11,0	worikonazol (Ho)	92,8	garenoksacyna (Ho)
9,5	telitromycyna (Ho)	62,6	14-hydroksyklarytroromycyna (Ho)
9,0	etionamid (Ho)	27,5	gatyfloksacyna (Ho)
8,7	garenoksacyna (Ho)	20,4	marbofloksacyna (Ca)
6,4	klarytomycyna (Ho)	16,3	rifampicyna (Ho)
6,0	wankomycyna (Ho)	15,1	ciprofoksacyna (Ra)
5,7	grepafloksacyna (Ra)	10,3	enrofloksacyna (Ca)
4,9	ofloksacna (Ho)	4,7	ciprofoksacyna (Ca)
3,2	linezolid (Ho)	1,9	telawancyna (Ho)
1,7	gatyfloksacyna (Ho)		
1,2	lewofloksacyna (Ho)		
1,0	etambutol (Ho)		

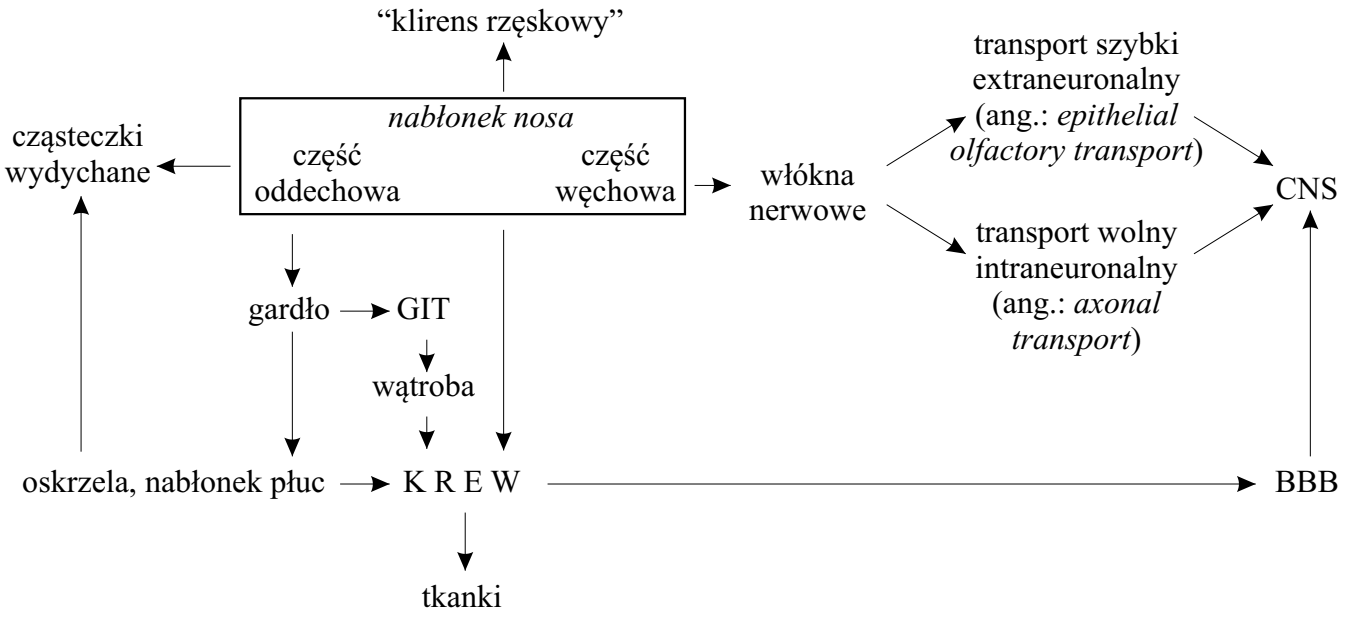
Rys. Przybliżone wartości stosunku ELF:osocze i AM:osocze leków których dystrybucja obejmuje płuca.

Dystrybucja i wchłanianie leków podanych donosowo

Droga donosowa podania leku znana jest od dawna, jednak stosunkowo niedawno zastosowano ją jako sposób na pokonanie bariery krew / mózg. Podanie donosowe pozwala na sterowanie do pewnego stopnia procesami dystrybucji i ukierunkowanie ich na określony rodzaj dyspozycji leku:

- działanie miejscowe
- zdobywanie innych przestrzeni organizmu dzięki szybkiemu transferowi do krwi np. desmopresyna, nafarelina, oksytocyna (Dahlin M. 2000)
- dyspozycję w strukturach OUN poprzez *filia olfactoria*

W przypadku niektórych leków współczynnik rozdziału mózg/krew po podaniu drogą donosową jest większy niż po podaniu dożylnym (Berlin C.M. i wsp. 1997). Dla niektórych substancji (propranolol, nikotyna) podawanych drogą donosową stężenie w osoczu jest równe stężeniu po podaniu dożylnym (Dahlin M. 2000). Donosowa droga podania leku podobnie jak podanie do worka spojówkowego pozwala na dostarczenie "niewygodnych" pod względem budowy chemicznej molekuł do centralnego układu nerwowego. Obecnie postacie leku podawaną do nosa to głównie krople proszki i aerozole. Wiele leków które należałoby dostarczać do CNS z zachowaniem dużej dostępności biologicznej ma skrajnie nieoptymalne parametry fizjochemiczne. Nie pozwala to na wygodne użycie leku bez zastosowania iniekcji wlewów etc. Leki takie nie mogą być podawane drogą doustną i na ogół sprawiają wiele problemów w optymalizacji postaci farmaceutycznej. Lekami tymi są często polarne i hydrofilne cząsteczki, białka, polisacharydy, szczepionki etc. Droga donosowa nie wymaga zatem formułowania bardzo złożonych i skomplikowanych postaci leku tworzenia systemów nośników dla leku itd. Pole powierzchni nabłonka nosa (obje jamy) człowieka to ok. 160 cm^2. Jest wiec około 7.5 razy mniejsza od powierzchni kapilar tworzących barierę krew / mózg. pH wydzieliny pokrywającej nabłonek nosa waha się w granicach 5.5 - 6.5. Najlepiej przez śluzówkę nosa wchłaniają się cząsteczki o kulistej powierzchni i średnicy 10 - 50 mikronów. Cechą nabłonka rzęskowego pokrywającego wnętrze nosa jest ruch. Ciągłe ruchy nabłonka powodują przesuwanie cząsteczek leku które absorbują na jego powierzchni. Stąd średni czas wchłaniania leku z powierzchni nabłonka powinien być krótszy niż czas przesuwania drobin obecnych na nabłonku. W praktyce jest to ok. 10 -20 min (Muller R.H., Hildebrand G.E. 1998). Jest to specyficzny rodzaj klirensu wywołany ruchami nabłonka migawkowego.



Ryc. Kierunki dyspozycji leku po podaniu donosowym

W obrębie śluzówki nosa zidentyfikowano co najmniej kilka układów enzymatycznych takich jak: CYP1A, CYP2A, CYP2E (Talegaonkar S., Mishra P.R. 2004). Transport leku z śluzówki nosa w głównej mierze zależny jest od lipofilności leku w mniejszym stopniu od masy cząsteczkowej i pozwala na transport cząsteczek o masie nawet do 6000 Da. Transport leków hydrofilnych prawdopodobnie odbywa się głównie przez pory. Transport ten ułatwiony jest faktem niewielkiej grubości lub brakiem w dalszych częściach jamy nosowej warstwy zrogowaciałej. Droga od śluzówki nosa do CNS prowadzi poprzez transport intraneuronalny - powolny oraz extraneuronalny - szybki. Transport intraneuronalny gwarantuje powolną dyspozycję leku w mózgu postępującą nawet w ciągu dni (0.1- 400 mm/dzień). Natomiast transport extraneuronalny pozwala dostarczać lek do mózgu nawet w kilka minut. Leki słabo lipofilne wchłaniają się dobrze po podaniu drogą donosową zarówno do krążenia ogólnego drogą żylną jak i poprzez ramiona nerwu trójdzielnego oraz nerwy węchowe do CNS. Różnice pomiędzy wchłanianiem leku drogą donosową i poprzez skórę są subtelne. Jednak drogę donosową wyróżnia możliwość znacznego transferu cząsteczek dużych, polarnych, oraz możliwość podania leku do CNS z pominięciem BBB.

Zarówno wchłanianie drogą donosową jak i wziewną ułatwia lotność substancji. Lotność związku określa do pewnego stopnia stała Henry'ego HLC (ang.: *Henry's Law Constans*). Jest to parametr który określa czy związek rozmieszcza się silniej w wodzie czy w gazie. Dla związków silnie lotnych stała Henry'ego jest większa od jedności.

Związek chemiczny:	HLC	LogKOW
heksan	1,7	3,3
pentan	1,29	2,8
czterochlorek węgla	0,028	2,8
chloroetan	0,011	1,6
toluen	0,006	2,5
octan propylu	0,00031	1,4
acetonitryl	0,000031	-0,2
metanol	0,000004	-0,6
fenol	0,000001	1,5
limonen	0,38	4,8
kamfen	0,16	4,3
pinen	0,0907	4,1
anisol	0,00032	2,1
1,4 - cyneol	0,000204	3,1
eukaliptol	0,000204	3,1
koniina	0,00004	2,6
mentol	0,000015	3,4
tymol	0,000001	3,5
delta THC	0,0000002	7,6
eugenol	0,00000005	2,7
nikotyna	0,000000003	1,0
simwastatyna	0,0000000003	5,2
terkonazol	0,000000000001	5,1
montelukast	0,000000000000005	8,4
minocyklina	0,00000000000000000000000004	0,7
neomycyna	0,0000000000000000000000000000000001	-9,4

Ryc. Przykłady wartości HLC dla wybranych toksyn i leków.

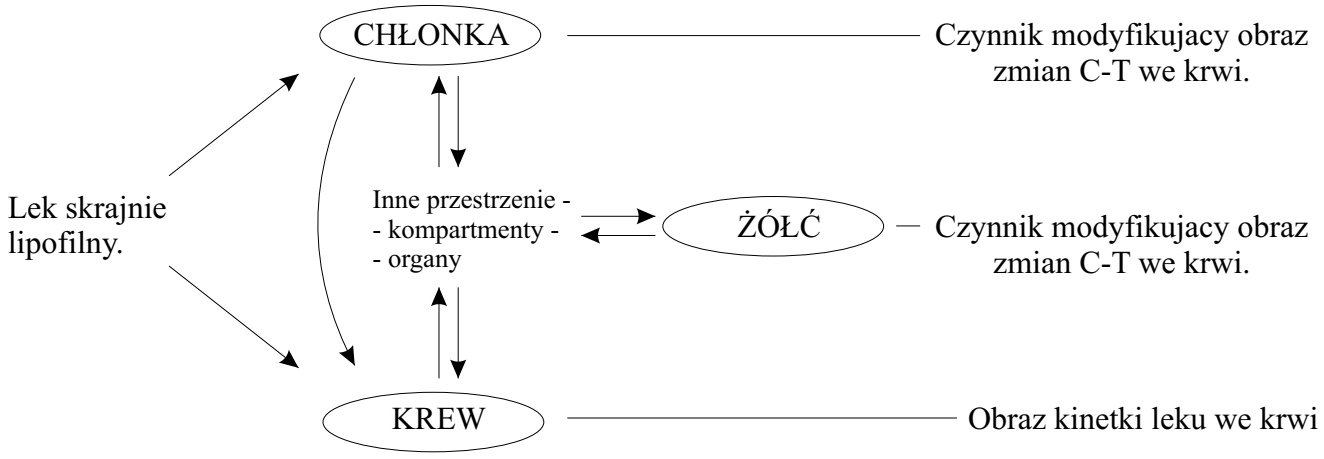
Dystrybucja leków drogą limfatyczną

Jednym z wielu sposobów na rozmieszczenie cząsteczek leku w organizmie jest jego transport drogą limfatyczną (Porter C.J.H., Charman W.N. 2001; Khoo S.M. i wsp. 2003). Transport leków tą drogą potwierdzony jest od dawna w wielu grupach leków (Buzard J.A. i wsp. 1961; Oelkers R. i wsp. 1996). Jest to jedna z podstawowych ścieżek dyspozycji złożonych postaci leków takich jak liposomy. W przypadku podania doustnego transport drogą limfatyczną dostępny jest molekułom o określonych parametrach fizjochemicznych. Zwykle tą drogą wchłaniane są związki:

- skrajnie lipofilne LogP > 5
- rozpuszczalne w długołańcuchowych triglicerydach
- również o znacznej masie cząsteczkowej > 16 kDa

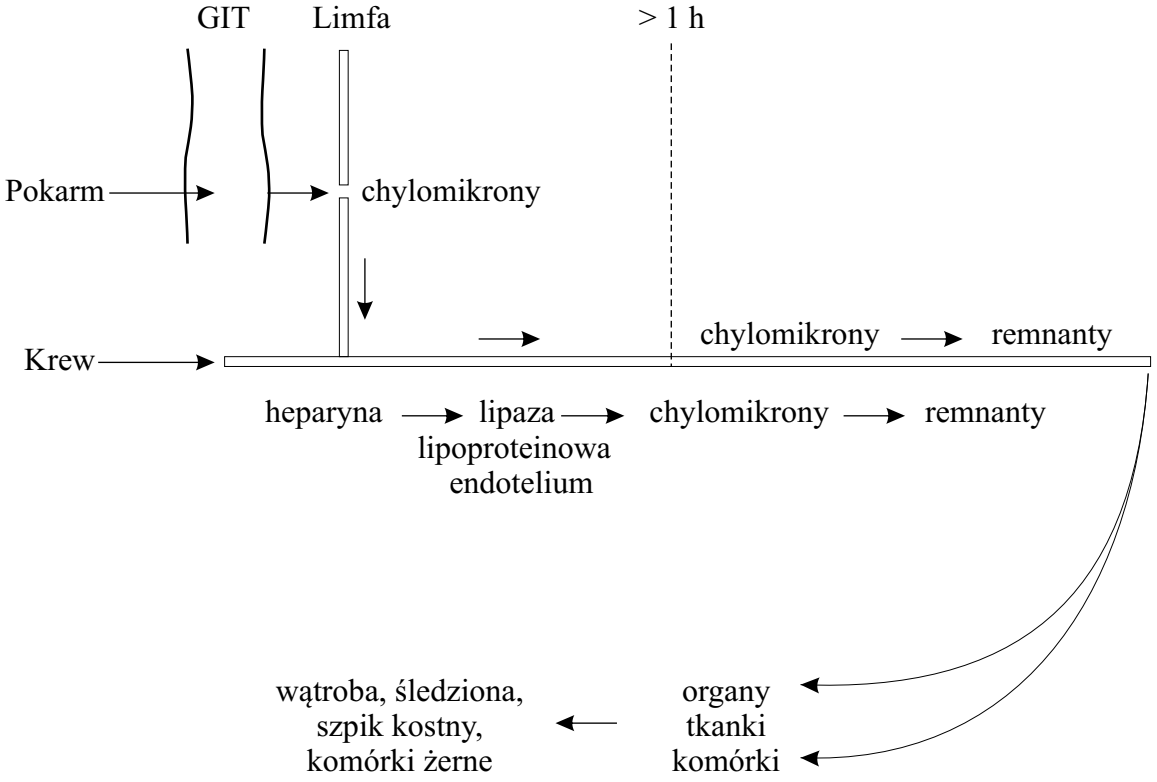
Znaczenie znajomości stężenia niektórych leków w limfie jest bardzo duże. U dorosłego człowieka objętość wytwarzanej w ciągu doby chłonki wynosi ok. 2 litry. Liczba skupisk tkanki limfatycznej grudek i węzłów chłonnych u człowieka wynosi od 400 do 500 (u kaczki tylko 4) (Jeltsch M. i wsp. 2003). Osiągnięcie stężenia terapeutycznego leku w kompartmencie który często stanowi drogę rozprzestrzeniania się komórek bakteryjnych czy rakowych jest niezwykle ważne.

Obecność leku w przestrzeni limfatycznej wiąże się z osiąganiem kompartemtu o znacznej lipofilności (chylomikrony i ich remnanty) lecz także zróżnicowanej polarności cząsteczek triglicerydów tam obecnych. Sam proces wchłaniania leków skrajnie lipofilnych i absorbowania ich do przestrzeni limfatycznych związany jest z transportem cząsteczek tłuszczów. Cząsteczki leków skrajnie lipofilnych dzięki asocjacji z tłuszczami mogą pokonywać ścianę jelita i wraz z cząsteczkami tłuszczu oraz dalej w postaci chylomikronów osiągać inne kompartmenty (Khoo S.M. i wsp. 2003). Stąd jednoczesne podanie tłuszczów w przypadku niektórych leków daje efekt wzrostu dostępności biologicznej leku. Sama obecność tłuszczów nie jest jedynym modyfikatorem wchłaniania zwiększającym adsorpcję leków do chłonki. Kofaktorem tego procesu są składniki żółci. Wykazano bowiem że obecność żółci może w istotny sposób zwiększać adsorpcję leków do chłonki. Przykładem jest mepitiostian i jego zwiększone wchłanianie z jelita do chłonki w obecności żółci (Ichihasi T. i wsp. 1992). Należy przy tym wziąć pod uwagę fakt że w przypadku niektórych gatunków (szczur) żółć uwalniana jest nie na zasadzie odruchu lecz w sposób ciągły. Udział leku w dyspozycji za pomocą dróg limfatycznych i chylomikronów może w przypadku leków skrajnie lipofilnych modyfikować obraz kinetyki leku opisywany jedynie zmianami stężenia leku w kompartmencie centralnym. Obecność tłuszczów w świetle jelita, obecność składników żółci, i interakcje fizykochemiczne z cząsteczkami leków tworzy niezwykle złożony obraz procesu transportu leku do chłonki. Prawdopodobnie kluczowe znaczenie dla tych procesów jest tworzenie micelli i mikroemulsji z udziałem cząsteczek leku.



Ryc. Dystrybucja leków skrajnie lipofilnych w obrębie różnych płynów ustrojowych.

W transporcie leków wraz z chłonką biorą udział nie tylko chylomikrony ale także ich resztki - remnanty (ang.: *Remnants*). Okres półtrwania chylomikronów w organizmie człowieka wynosi około 1 godziny (Hussain M.M. i wsp. 1989). Obraz szlaku dystrybucji cząsteczek leku tą drogą jest złożony i uwarunkowany fizjologicznym rozpadem chylomikronów, który opisać można odpowiednia wartością klirensu .



Ryc. Zarys dystrybucji niektórych leków wraz z chłonką.

Modyfikacja takiego obrazu kinetyki jest tym większa im większy jest procent leku transportowanego drogą chłonki. Lek który transportowany jest wraz z chłonką w istocie nie podlega efektowi pierwszego przejścia. Zatem zwiększa średni czas przebywania aktywnych (nie poddanych procesom metabolicznym) cząsteczek leku w organizmie (Ichihashi T. i wsp. 1991). Mimo wyraźnego powinowactwa leków lipofilnych do obecnych we krwi lub chłonce triglicerydów czy chylomikronów nie wszystkie badania w sposób jednoznaczny potwierdzają tą tezę. W procesie transportu leków oprócz chylomikronów biorą udział różne klasy trójglicerydów w tym:

VLDL - lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (30-80 nm)
IDL - lipoproteiny o średniej gęstości
LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości (18-25 nm)
HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości (7-12 nm)

W badaniach dotyczących wiązania z trójglicerydami pochodnych antracyklin wykazano że najsilniej wiąże się z nimi iodoksorubicyna a najsłabiej doksorubicyna (Chassany O. i wsp. 1994). Jednak w zależności od rodzaju algorytmu zastosowanego do obliczeń można uzyskać różne wyniki. Siła wiązania z trójglicerydami rośnie począwszy od doksorubicynę poprzez mitoksantron, epirubicynę, daunorubicynę, pirarubicynę, aklarubicynę, zorubicynę aż do iodoxorubicyny.

	LogKOWIN	MiLogP	CLogP	średnia
doksorubicyna	-2.37	-2.046	-2.111	-2.18
mitoksantron	2.28	-0.236	2/299	1.45
epirubicyna	1.27	-0.17	0.317	0.47
daunorubicyna	3.95	2.142	3.254	3.12
pirarubicyna	-	1.116	1.997	1.56
aklarubicyna	4.89	3.204	3.425	3.84
zorubicyna	4.23	2.699	2.231	3.05
iodoksorubicyna	-	-	-	-

Można więc przypuszczać że mechanizm powinowactwa leków do lipoprotein jest złożony i zależny nie tylko od wartości współczynnika rozdziału oktanol woda. Funkcje transportowe trójglicerydów w przypadku niektórych leków pełnią zasadniczą role w ich dyspozycji w organizmie. Jednym z przykładów jest cyklosporyna A. W przypadku tego leku dystrybucja jest ściśle uzależniona od poziomu lipoprotein w osoczu (Wasan K.M. i wsp. 2002). Obecnie wiadomo że w przypadku wielu leków transport z udziałem chylomikronów i lipoprotein jest jednym ze sposobów na ominiecie efektu pierwszego przejścia.

Wydzielanie leków wraz z śliną

Ślina jest płynem ustrojowym którego wydzielanie u człowieka sięga od 0.5 do 1.5 litra na dobę. Stanowi więc około 4.3 % masy ciała. Jest to wydzielina która z jednej strony może mieć znaczenie w terapii nakierowanej na określoną tkankę w sensie obszaru anatomicznego a jednocześnie stanowi medium diagnostyczne. W wielu wypadkach próbkowanie śliny umożliwia prowadzenie TDM dla takich leków jak: antypiryna, kofeina, karbamazepina, cisplatyna, paracetamol, fenytoina, cyklosporyna, diazepam, digoksyna, etosuksymid, irynotekan, lit, metadon, metoprolol, oksprenolol, prokainamid, prymidon, sulfanilamid, chinina, teofilina, tolbutamid. Pozwala również na wykrycie środków dopingujących lub niedozwolonych (barbiturany, benzodiazepiny, etanol, fencyklidyna, amfetaminy, opioidy, THC, MDMA, kokaina),(Hofman L.F. 2001; Kaufman E., Lamster I.B. 2002; Crouch D.J. i wsp. 2004). Pod względem analityki medycznej jest znacznie prostszym medium od osocza. Można je poddać analizie za pomocą detekcji MS/MS bez stosowania złożonych technik oczyszczania matrycy, jest łatwe do pobrania. Wiele leków wydzielanych jest wraz ze śliną uczestnicząc w krążeniu leku pomiędzy śliną przewodem pokarmowym a łożyskiem krwi. Poziom leku w ślinie zależny jest od drogi podania leku i jest procesem stereoselektywnym co wykazano w przypadku R (S/P = 3.8) i S (S/P = 2) tokainidu. W przypadku niektórych substancji całkowite stężenie leku w ślinie wyrażone polem powierzchni pod krzywą zmian stężeń jest wyższe niż w osoczu. Skrajnym przypadkiem jest MDMA gdzie stosunek S/P (ang.: *Saliva/Plasma Ratio*) wynosi ok. 18.

$$S/Pa = (1+10^{(pHs-pKa)} \times fp) / (1+10^{(pHp-pKa)} \times fs)$$

$$S/Pb = (1+10^{(pKa-pHs)} \times fp) / (1+10^{(pKa-pHp)} \times fs)$$

S/Pa- stosunek stężenia leku w ślinie do stężenia leku w osoczu (słabe kwasy)
S/Pb- stosunek stężenia leku w ślinie do stężenia leku w osoczu (słabe zasady)
fs - frakcja wolna leku w ślinie
fp - frakcja wolna leku w osoczu

pHs - pH śliny
pHp- pH osocza
pKa - pKa leku

	S/P		S/P
MDMA	18	kotynina	1,46
fenytoina	7,4	flukonazol	1,3
6-monoacetylomorfina	6	propranolol	1,25
karbamazepina	4,8	tiopental	1,24
metamfetamina	4	THC	1,2
chloropromazyna (Ra)	4	amobarbital (Ra)	1,18
dietylokarbamazyna	3,8	metadon	1,15
R- tokainid	3,8	lewetiracetam	1,11
metoprolol	3,8	busulfan	1,09
kodeina	3,7	etanol	1,07
morfina (Ra)	3	etosuksymid	1,04
lidokaina	2,9	epirubicyna	1
amfetamina	2,4	antypiryna	1
topotekan	2,3	linezolid	1
Lit	2,3	acetaminofen	1
petydyna	2	prymidon	1
norkodeina	1,7	moksyfloksacyna	1
proksyfilina	1,6	irynotekan	1
kokaina	1,5	buprenorfina	1
sparfloksacyna	1,5		

Ryc. Przybliżone wartości stosunku stężenia leku w ślinie (S) do osocza (P).

		pKb (słabe zasady)							
pH		**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
osocze	ślina	Stosunek S/P							
7,35	6,5	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62	317,23
7,35	6,7	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95	200,53
7,35	6,9	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59	126,89
7,35	7,1	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94	80,43
7,35	7,3	1,00	1,00	1,00	1,01	1,05	1,50	6,01	51,12
7,35	7,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62
7,35	7,7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95
7,35	7,9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59
7,35	8,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94
7,4	6,5	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62	317,23
7,4	6,7	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95	200,53
7,4	6,9	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59	126,89
7,4	7,1	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94	80,43
7,4	7,3	1,00	1,00	1,00	1,01	1,05	1,50	6,01	51,12
7,4	7,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62
7,4	7,7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95
7,4	7,9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59
7,4	8,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94
7,45	6,5	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62	317,23
7,45	6,7	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95	200,53
7,45	6,9	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59	126,89
7,45	7,1	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94	80,43
7,45	7,3	1,00	1,00	1,00	1,01	1,05	1,50	6,01	51,12
7,45	7,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,03	1,32	4,16	32,62
7,45	7,7	1,00	1,00	1,00	1,00	1,02	1,20	3,00	20,95
7,45	7,9	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,13	2,26	13,59
7,45	8,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,01	1,08	1,79	8,94

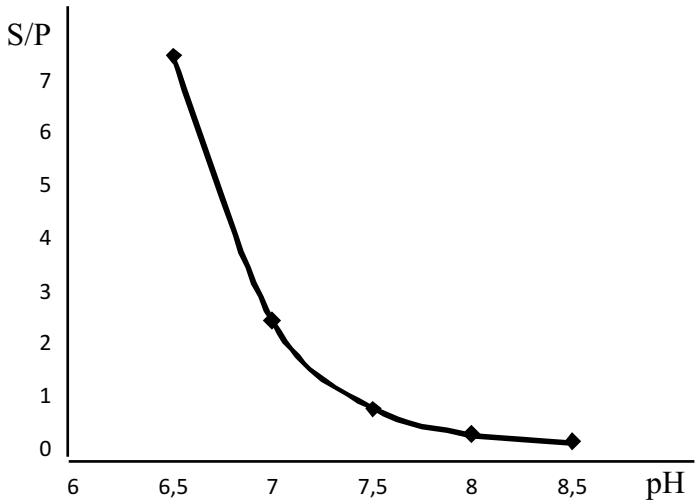
Ryc. Symulacja wartości stosunku S/P dla słabych zasad, wynikającej z wartości pH osocza, pH śliny oraz pKa leku. Symulacja uwzględniająca wartości frakcji wolnej leku w osoczu i ślinie wymaga podzielenia wartości tabelarycznej stosunku S/P przez fs/fp.

Dla wielu leków notuje się dużą zmienność między osobniczą wartości S/P. W niektórych przypadkach zmiana stężenia w ślinie jest wprost proporcjonalna do zmian stężenia w osoczu, jednak w wielu przypadkach nie można takiej zależności wykazać (brak liniowości). Liniowa zależność pomiędzy kinetyką zmian stężenia leku w ślinie i w osoczu jest często zależna również od dawki leku. Trudno obecnie na jednoznaczne wskazanie zależności pomiędzy strukturą chemiczną leku i jego właściwościami fizjochemicznymi a możliwością wydzielania wraz z śliną. Pewne znaczenie dla tego procesu ma wartość stałej dysocjacji oraz pH śliny. Jednak w wielu przypadkach wartości transferu obliczone na tej podstawie nie odzwierciedlały procesów zachodzących *in vivo*. Trudno odnaleźć jednoznaczną korelację pomiędzy wartością S/P a wartością lipofilności leku. Proces wydzielania leku wraz ze śliną jest również niezależny od wartości PSA. Analizy stężenia leku w osoczu i ślinie zwykle nie obejmują rozdzielnego obliczenia AUC dla obu procesów.

		pKa (słabe kwasy)							
pH		**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
osocze	ślina	Stosunek S/P							
7,35	6,5	0,14	0,14	0,14	0,15	0,18	0,41	0,84	0,98
7,35	6,7	0,22	0,22	0,22	0,23	0,26	0,46	0,86	0,98
7,35	6,9	0,35	0,35	0,36	0,36	0,38	0,55	0,88	0,99
7,35	7,1	0,56	0,56	0,56	0,56	0,58	0,70	0,92	0,99
7,35	7,3	0,89	0,89	0,89	0,89	0,90	0,92	0,98	1,00
7,35	7,5	1,41	1,41	1,41	1,41	1,39	1,29	1,08	1,01
7,35	7,7	2,24	2,24	2,24	2,23	2,19	1,86	1,23	1,03
7,35	7,9	3,55	3,55	3,55	3,54	3,44	2,76	1,47	1,06
7,35	8,1	5,62	5,62	5,62	5,60	5,43	4,20	1,10	1,10
7,4	6,5	0,13	0,13	0,13	0,13	0,16	0,37	0,82	0,98
7,4	6,7	0,20	0,20	0,20	0,20	0,23	0,43	0,84	0,98
7,4	6,9	0,32	0,32	0,32	0,32	0,34	0,51	0,86	0,98
7,4	7,1	0,50	0,50	0,50	0,50	0,52	0,64	0,90	0,99
7,4	7,3	0,79	0,79	0,79	0,80	0,80	0,85	0,96	0,99
7,4	7,5	1,26	1,26	1,26	1,26	1,25	1,19	1,05	1,01
7,4	7,7	2,00	2,00	1,99	1,99	1,96	1,71	1,20	1,02
7,4	7,9	3,16	3,16	3,16	3,15	3,08	2,55	1,43	1,05
7,4	8,1	5,01	5,01	5,01	5,00	4,86	3,87	1,10	1,10
7,45	6,5	0,11	0,11	0,11	0,12	0,14	0,34	0,80	0,98
7,45	6,7	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21	0,39	0,82	0,98
7,45	6,9	0,28	0,28	0,28	0,28	0,31	0,47	0,84	0,98
7,45	7,1	0,45	0,45	0,45	0,45	0,47	0,59	0,88	0,98
7,45	7,3	0,71	0,71	0,71	0,71	0,72	0,78	0,94	0,99
7,45	7,5	1,12	1,12	1,12	1,12	1,12	1,09	1,03	1,00
7,45	7,7	1,78	1,78	1,78	1,78	1,75	1,57	1,17	1,02
7,45	7,9	2,82	2,82	2,82	2,81	2,76	2,34	1,40	1,05
7,45	8,1	4,47	4,47	4,47	4,45	4,35	3,56	1,10	1,10

Ryc. Symulacja wartości stosunku S/P dla słabych kwasów, wynikającej z wartości pH osocza, pH śliny oraz pKa leku. Symulacja uwzględniająca wartości frakcji wolnej leku w osoczu i ślinie wymaga podzielenia wartości tabelarycznej stosunku S/P przez fs/fp.

Leki wydzielane wraz z śliną wchłaniają się do krwi jeszcze w obrębie jamy ustnej, dalej w zależności od stopnia jonizacji i lipofilności oraz PSA w żołądku i dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Stąd krzywa AUC jest zwykle wypadkową procesu krążenia leku i leku obecnego we krwi. Dla niektórych leków kinetyka wydzielania wraz ze śliną jest proporcjonalna do kinetyki zmian stężenia leku we krwi.W takich wypadkach można więc monitorować stężenie leku we krwi na podstawie zmian stężenia w ślinie. W wielu przypadkach leków do pewnego stopnia udaje się przewidzieć stopień wydzielania leku wraz z śliną na podstawie pH śliny osocza oraz pKa lub pKb leku. Najczęściej ze śliną wydzielane są związki o charakterze słabych zasad i niezbyt dużej masie cząsteczkowej. Kinetyka zmian stężenia leku w ślinie może często znacznie różni się od kinetyki zmian stężenia leku we krwi. W przypadku niektórych leków notuje się bardzo wysokie stężenia leku w kilka do kilkunastu minut od podania leku. Cmax oraz tmax dla krwi i śliny znajdują się w takich wypadkach w zupełnie różnych punktach.



Ryc. Zmiany wartości stosunku S/P kokainy, przy różnych wartościach pH śliny.
(Na podstawie: Device for detectinganalytes related to sample pH. US patent May 21,2002)

Okres półtrwania $t_{1/2kel}$

HLT (ang.: *Half Life Time*; niem.: *Halbwertszeit*). Okres półtrwania jest parametrem farmakokinetycznym który określa jaki czas potrzebny jest na to aby stężenie badanej substancji spadło o połowę od poziomu stężenia wyjściowego. Parametr ten pozwala miedzy innymi na precyzyjne określanie dawkowania leków (Notari R.E. 1978). W przypadku wyznaczania t1/2kel daje możliwość obserwacji tempa procesów eliminacji w skali całego organizmu. Pozwala odnieść wartość tempa eliminacji do klirensu całkowitego. Wraz z MRT, okres półtrwania w fazie eliminacji stanowi wskaźnik zróżnicowania faz kinetycznych w badanym przypadku. Okres półtrwania jest łatwym w użyciu i interpretacji wskaźnikiem używanym zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

$t1/2$ (organelle)
$t1/2$ (komórka)
$t1/2$ (tkanka) $= \Sigma (t1/2 + \ldots\ldots t1/2n)$
$t1/2$ (narząd) $= \Sigma (t1/2 + \ldots\ldots t1/2x) + \Sigma (t1/2 + \ldots\ldots t1/2y) + \Sigma (t1/2 + \ldots\ldots t1/2z) +$
$t1/2$ (organizm) $= \Sigma t1/2$(tkanek) $+ t1/2$(narządów)

Okres półtrwania leku jest parametrem który obliczyć można zarówno w skali całego organizmu jak i pojedynczej komórki, organu lub tkanki. Wpływ na jego wartość ma wiele czynników zależnie od rzędowości we wszystkich fazach kinetycznych w jakich lek uczestniczy w organizmie:

- uwalnianie (postać leku)
- absorpcja (stała szybkości wchłaniania, droga podania leku etc.)
- dystrybucja (stopień wiązania z białkami)
- metabolizm (efekt pierwszego przejścia, fizjologia pracy wątroby)
- eliminacja (przesączanie kłębuszkowe, fizjologia pracy nerek)

oraz

- parametry fizjochemiczne leku
- rzędowość procesów kinetycznych
- liniowość poszczególnych faz kinetycznych

Jeżeli dane doświadczalne pozwalają na analizę złożonych modeli farmakokinetycznych (np. model dwukompartmentowy) okres półtrwania można obliczać dla każdej z możliwych do wyodrębnienia i opisania faz kinetycznych (absorpcji $t_{1/2\gamma}$, dystrybucji $t_{1/2\alpha}$, eliminacji $t_{1/2\beta}$). Okres półtrwania w skali całego organizmu jest to czas jaki organizm potrzebuje na zmniejszenie stężenia leku we krwi o połowę w stosunku do stężenia początkowego. Okres półtrwania jest parametrem dynamicznym opisującym kinetykę badanego procesu z uwzględnieniem jego niejednorodności.

Okres półtrwania (Niesink R.J.M., Vries J., Holinger M.A. 1996) (ang.: *Half Life Time*; *Terminal Elimination Half Life Time, Effective HLT, Real HLT*) można obliczyć znając stałą szybkości dla fazy eliminacji w modelu dwukompartmentowym, lub stałą prędkości Kel (β) opisującą stopień nachylenia krzywej w modelu jednokompartmentowym.

	Wchłanianie	Dystrybucja	Eliminacja
W procesach zerowego rzędu:	$\mathbf{t_{1/2} = T / 2}$	$\mathbf{t_{1/2} = C_{n+1} / (2 \times \alpha)}$	$\mathbf{t_{1/2} = C_{n+1} / (2 \times \beta)}$
W procesach pierwszego rzędu:	$\mathbf{t_{1/2} = 0.693 \times MAT}$	$\mathbf{t_{1/2} = 0.693 / \alpha}$	$\mathbf{t_{1/2} = 0.693 / \beta}$
W procesach drugiego rzędu:		$\mathbf{t_{1/2} = 1 / (C_{n+1} \times \alpha)}$	$\mathbf{t_{1/2} = 1 / (C_{n+1} \times \beta)}$

Obliczenia dotyczące okresu półtrwania zależne są od rzędowości obserwowanych reakcji. Okres półtrwania dla znanej szybkości eliminacji i rzędowości można obliczyć z formuły (Pigoń K., Ruziewicz Z. 1976).

$$t_{1/2} = (2^{n-1} - 1) / [(n-1) \times \beta \times C_{n+1}^{n-1}]$$

n - rzędowość procesu
Cn+1 - stężenie
β - stała szybkości eliminacji

Zależność pomiędzy okresem półtrwania a rzędowością procesu kinetycznego ująć można również innym równaniem (Danek A. 1978).

$$t_{1/2} = 1 / C_{n+1}^{n-1}$$

Powyższe równania po przekształceniu pozwalają także obliczyć cząstkowe czasy postępu reakcji w zależności od β, C_{n+1}, i n (dla n < lub > 1). Tak więc czas po którym stężenie leku spadło do 75% można obliczyć z wzoru:

$$t_{0.75} = 1 / \{(\beta \times (n-1)) / [(1/(C_{n+1} \times 0.75)^{n-1}) / (1/C_{n+1}^{n-1})]\}$$

Okres półtrwania można także obliczyć znając zależności jakie łączą go z innymi parametrami farmakokinetycznymi.
- w procesach pierwszego rzędu i fazie eliminacji:

$$t_{1/2} = 0.693 \times MRT$$

- w farmakokinetyce nieliniowej:

$$t_{1/2} = (0.693 \times Vd) / Cl_{(b)}$$

MRT - średni czas przebywania leku w organizmie
Vd - objętość dystrybucji
Cl(b) - klirens całkowity
0.693 = ln2

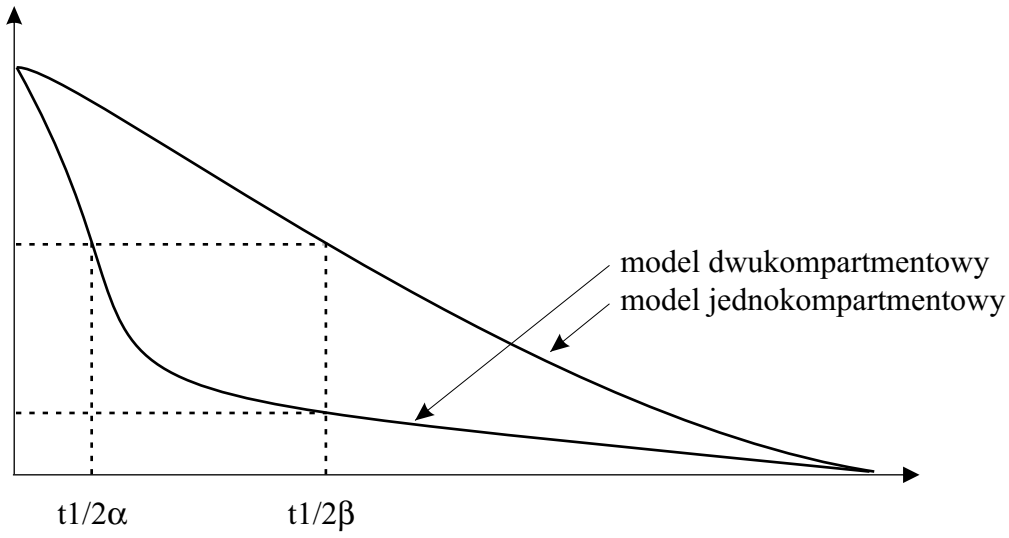
Zależność okresu półtrwania od masy ciała dla jednej drogi podania, tego samego leku ilustruje formuła:

$$t_{1/2} = (42 \times BW^{0.249}) / 60$$

BW - masa ciała
t1/2 - w minutach

Okres półtrwania zależny jest w znacznej mierze od szybkości przemiany podstawowej - BMR (ang.: *Basal Metabolic Rate*) i stosunku jej wartości do powierzchni ciała. Ze wzrostem BMR i zmniejszaniem się powierzchni ciała t1/2 maleje. Dla dużych gatunków przy znacznej powierzchni ciała i niskiej przemianie materii t1/2 rośnie. Szybkość metabolizmu wyrażona szybkością filtracji kłębkowej - GFR (ang.: *Glomerular Filtration Rate*) można obliczyć na podstawie znajomości masy ciała lub pola powierzchni ciała - BSA (Riviere J.E. 1999). Pozwala to na symulacje allometryczne biologicznego okresu półtrwania pomiędzy gatunkami i w obrębie gatunku. Punktem wyjścia do tego rodzaju analiz są informacje o powierzchni ciała i przemianie podstawowej. Okres półtrwania jest jednym z podstawowych parametrów służących do ustalania dawkowania leku dla gatunku dla którego okres półtrwania nie został opisany. Analiza allometryczna określa zależność między BMR a BW u ssaków równaniem:

$$BMR = 3.28 \times BW^{0.756}$$



Rys. Obliczanie wartości okresu półtrwania leku w zależności od modelu.

Biologiczny okres półtrwania $t_{1/2}$	% leku w organizmie	Ułamek początkowej dawki leku
	100 %	
1	50	1/2
2	25	1/4
3	12.5	1/8
4	6.25	1/16
5	3.125	1/32
6	1.56	1/64
7	0.78	1/128
8	0.39	1/256
9	0.195	1/512
10	0.097	1/1024
11	0.05	1/2048

Rys. Symulacja stężenia leku w tkance po n okresach półtrwania.

$$\mathbf{GFR = BW^{0.75}}$$

$$\mathbf{GFR = BSA^{0.67}}$$

Kalkulacje te oparte są na analizie allometrycznej i farmakokinetyce opartej na modelach kinetyki parametrów fizjologicznych - PBPK; PBK (ang.: *Physiologicaly Based Pharmacokinetics*) Liczba okresów półtrwania (n x t1/2) leku jest parametrem wskaźnikowym w planowaniu doświadczeń PK. Mają one na celu określanie parametrów farmakokinetycznych, lub badań dotyczących pozostałości leku w tkankach.

Okres półtrwania - parametr opisujący zmianę stężenia leku w organizmie jako wypadkową wszystkich procesów eliminacji leku, jest ważnym punktem orientacyjnym w planowaniu doświadczeń na grupach w układzie krzyżowym. Wskazania do projektowania ujęte w formie "4 okresy półtrwania leku od momentu ..... ", czy "10 okresów półtrwania leku po podaniu leku", dla każdego leku określają jaka ilość danego leku pozostała w organizmie i jaka część została poddana eliminacji we wskazanym punkcie czasowym. Procent leku jaki pozostał w organizmie dla znanego stężenia początkowego leku i określonej liczby okresów półtrwania obliczyć można z wzoru:

$$\mathbf{C_{(t1/2)} = Co / 2^n}$$

Jeżeli zechcemy obliczyć jaka liczba okresów półtrwania leku jest wymagana aby osiągnąć żądany spadek poziomu leku w organizmie należy posłużyć się wzorem:

$$\mathbf{n = Log_2 \ (Co / C_{(t1/2)})}$$

n - liczba okresów półtrwania
Co - stężenie początkowe leku
C(t1/2) - procent leku jaki pozostał w organizmie po n okresach półtrwania

Okres półtrwania leku najczęściej nie jest zależny od dawki. Jeżeli procesy eliminacji przy określonym stężeniu leku nie zostaną wysycone to zależność między dawką a biologicznym okresem półtrwania jest liniowa. Jeżeli jednak procesy eliminacji przy określonym stężeniu zostają wysycone to wykres zależności między dawką a okresem półtrwania przyjmuje postać sigmoidalną. Badając procesy dystrybucji i eliminacji leku dla wyznaczonych dla tych procesów stałych prędkości można określić zależność:

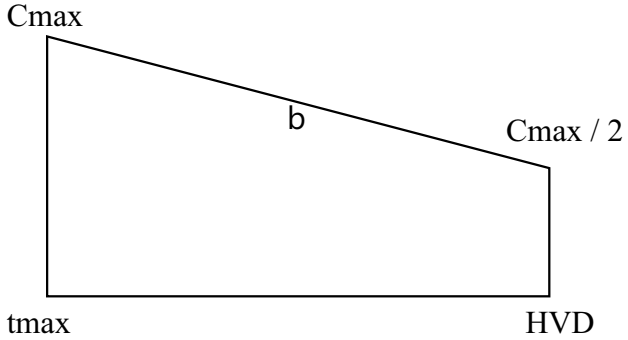
$$\mathbf{t_{1/2\alpha} > t_{1/2\beta}} \text{ gdy } \alpha < \beta \qquad \text{oraz} \qquad \mathbf{t_{1/2\alpha} < t_{1/2\beta}} \text{ gdy } \alpha > \beta$$

Logicznie bliskie pojęciom okresu półtrwania - HLT jest pojęcie okresu półtrwania dla wartości Cmax - HVD (ang.: *Half Value Duration*). Wartość ta opisuje po jakim czasie stężenie maksymalne spadnie do połowy swej wartości. W przypadku podania dożylnego przebiegającego z szybką dystrybucją leku do tkanek Cmax = Co. Stąd wartość HVD odpowiada wartości t1/2α.

$$\mathbf{HVD = 0.693 / \alpha}$$

α - stała szybkości dystrybucji leku

W przypadku gdy spadkowi stężenia maksymalnego odpowiada nachylenie krzywej równe β, HVD można obliczyć korzystając z równania pozwalającego obliczyć szybkość procesu eliminacji.



Rys. Graficzna metoda obliczania HVD.

$$\beta = Ln(C_1) - Ln(C_2) / (t_2 - t_1)$$

C1 = Cmax
C2 = Cmax/2
t2 = HVD
t1 = tmax

$$HVD = [(Ln(C_{max}) - Ln(C_{max} / 2)) / \beta] + t_{max}$$

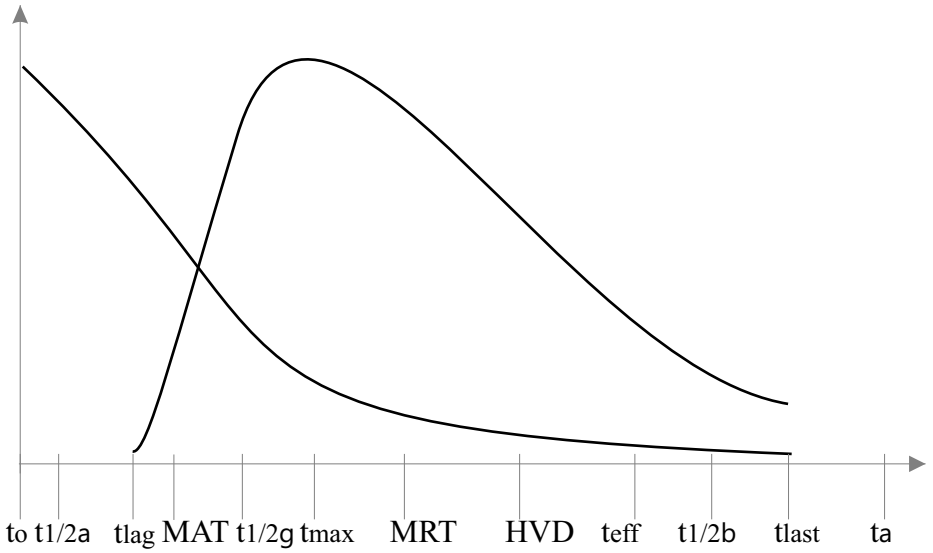
I odpowiednio dla przypadku w którym: MRT = 1 / β

$$HVD = [(Ln(C_{max}) - Ln(C_{max} / 2)) / (1 / MRT)] + t_{max}$$

Powyższa formuła przedstawia zależność między HVD a MRT ilustrując dłuższy czas HVD w momencie zwiększenia wartości MRT leku . Opisane równania dotyczą HVDd - czyli spadku stężenia maksymalnego w związku z nasileniem procesów dyspozycji leku w organizmie. Bliźniaczym parametrem jest HVDa ilustrujący czas uzyskania połowy stężenia maksymalnego od chwili równej t = zero lub tlag. Z punktu widzenia badań porównawczych leków przydatne informacje niesie za sobą nie tylko czas po którym stężenie maksymalne spada od połowę. Ważne informacje niesie ze sobą wartość pola jakie zamyka się pomiędzy Cmax a Cmax / 2. Przyjmuje się że leki można podzielić ze względu na długość okresu półtrwania. Podział ten uwzględnia również przybliżone wartości średniego czasu przebywania leku w organizmie:

Leki o bardzo krótkim	t1/2	do 1 h	odpowiada im MRT ok. 1.5 h
Leki o krótkim	t1/2	do 4 h	odpowiada im MRT ok. 6 h
Leki o średniej wartości	t1/2	do 10 h	odpowiada im MRT ok. 15 h
Leki o długiej wartości	t1/2	do 24 h	odpowiada im MRT ok. 35 h
Leki o bardzo długim	t1/2	powyżej 24 h	odpowiada im MRT powyżej 50 h

Parametry czasu są jednymi z częściej wytyczanych w farmakologii klinicznej i farmakokinetyce parametrów o charakterze podstawowym. Wiedząc że Ln(2) = 0.693 dla procesów pierwszego rzędu obliczanie t0.5; t0.6 etc wykonać należy korzystając z wzorów:



Rys. Udział parametrów czasu w opisie farmakokinetycznym leku.

$$t_{0.6} = \mathbf{0.511} / b$$

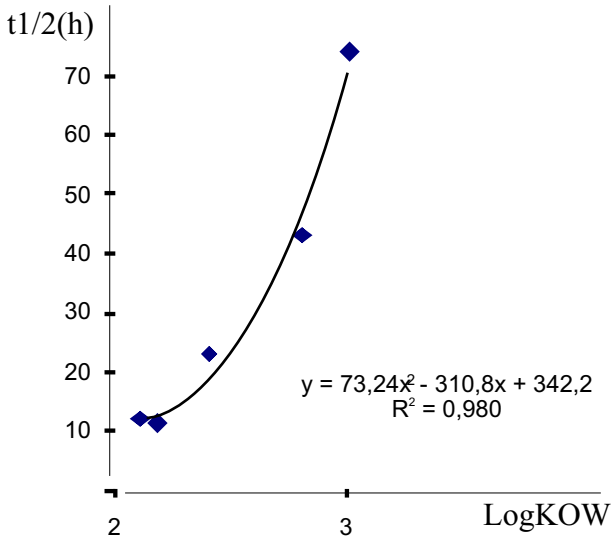
$$t_{0.7} = \mathbf{0.357} / b$$

$$t_{0.8} = \mathbf{0.223} / b$$

$$t_{0.9} = \mathbf{0.105} / b$$

Okres półtrwania w fazie eliminacji z tkanki , komórki czy na poziomie eliminacji z kompartmentu centralnego zależny jest od wielu cech leku i zjawisk jakim ulega w organizmie. Jednym z czynników który wpływa na czas eliminacji leku z organizmu jest jego lipofilność. Ponieważ duża lipofilność wiąże się zwykle ze zwiększoną dystrybucją cząsteczek do różnych tkanek, zwiększonym powinowactwem do wiązania się z białkami często również Ze zwiększoną predyspozycją leku do zjawisk redystrybucji skutkuje to najczęściej wydłużonym okresem półtrwania.

	t1/2 (h)	LogKOW
temazepam	11	2,19
alprazolam	12	2,12
klonazepam	23	2,41
diazepam	43	2,82
flurazepam	74	3,02



Ryc. Związek między LogKOW a okresem półtrwania wybranych leków.

phenobarbital	99,0	alprazolam	12,0	ganciclovir	4,3
clorazepate	93,0	clonidine	12,0	pseudoephedrine	4,3
atovaquone	62,5	clozapine	12,0	triamterene	4,2
sirolimus	62,3	lisinopril	12,0	glyburide	4,0
donepezil	59,7	tacrolimus	12,0	verapamil	4,0
ivermectin	56,5	pramipexole	11,6	propranolol	3,9
fluoxetine	53,0	celecoxib	11,2	baclofen	3,8
anastrozole	50,0	5-fluorouracil	11,0	fentanyl	3,7
chlorthalidone	47,0	bupropion	11,0	cefotetan	3,6
ethosuximide	45,0	enalapril	11,0	prednisone	3,6
letrozole	45,0	flecainide	11,0	atropine	3,5
diazepam	43,0	cyclosporin	10,7	ondansetron	3,5
azithromycin	40,0	tetracycline	10,6	propofol	3,5
amlodipine	39,0	modafinil	10,5	rifampin	3,5
digoxin	39,0	sulfamethoxazole	10,1	glimepiride	3,4
warfarin	37,0	trimethoprim	10,0	glipizide	3,4
olanzapine	33,1	zafirlukast:	10,0	hydroxyurea	3,4
chlorpropamide	33,0	candesartan	9,7	ciprofloxacin	3,3
citalopram	33,0	valsartan	9,4	clarithromycin	3,3
fluconazole	32,0	cetirizine	9,2	ketoconazole	3,3
epirubicin	31,2	mexiletine	9,2	meperidine	3,2
nortriptyline	31,0	lamivudine	9,1	metoprolol	3,2
chlorpromazine	30,0	theophylline	9,0	risperidone	3,2
raloxifene	28,0	thiopental	9,0	bleomycin	3,1
ribavirin	28,0	diphenhydramine	8,5	ethambutol	3,1
lamotrigine	27,0	metronidazole	8,5	cefexime	3,0
methadone	27,0	etoposide	8,1	paclitaxel	3,0
doxorubicin	26,0	flutamide	8,0	procainamide	3,0
exemestane	24,0	isradipine	8,0	clindamycin	2,9
clonazepam	23,0	loratadine	8,0	codeine	2,9
nabumetone	23,0	nalmefene	8,0	prazosin	2,9
sertraline	23,0	finasteride	7,9	triazolam	2,9
vincristine	22,6	sulfasalazine	7,6	sufentanil	2,7
dapsone	22,4	cyclophosphamide	7,5	phenylephrine	2,7
amiloride	21,0	dofetilide	7,5	busulfan	2,6
amitriptylline	21,0	gatifloxacin	7,4	cytarabine	2,6
felbamate	21,0	ceftriaxone	7,3	hydrochorothiazide	2,5
itraconazole	21,0	methotrexate	7,2	zolmitriptan	2,5
topiramate	21,0	bromocriptine	7,0	acyclovir	2,4
chlorpheniramine	20,0	cisapride	7,0	bupivacaine	2,4
mefloquine	20,0	levetiracitam	7,0	buspirone	2,4
atorvastatin	19,5	levofloxacin	7,0	dobutamine	2,4
amphotericin b	18,0	tamoxifen	7,0	hydromorphone	2,4
betaxolol	18,0	tamsulosin	6,8	indomethacine	2,4
clofibrate	18,0	sulfisoxazole	6,6	sildenafil	2,4
doxepin	18,0	gabapentin	6,5	topotecan	2,4
haloperidol	18,0	quinidine	6,2	buprenorphine	2,3
paroxetine	17,0	thalidomide	6,2	amikacin	2,3
calcitriol	16,5	disopyramide	6,0	cidofovir	2,3
mirtazapine	16,3	quetiapine	6,0	methylprednisolone	2,3
amantadine	16,0	ropinirole	6,0	pancuronium	2,3
doxycycline	16,0	tolbutamide	5,9	zileuton	2,3
imipramine	16,0	trazodone	5,9	carvedilol	2,2
minocycline	16,0	ofloxacin	5,7	cefazolin	2,2
moxifloxacin	15,4	vancomycin	5,6	tobramycin	2,2
carbamazepine	15,0	flurbiprofen	5,5	cefepime	2,1
fluvoxamine	15,0	granisetron	5,3	ranitidine	2,1
felodipine	14,0	ketorolac	5,3	acetaminophen	2,0
fexofenadine	14,0	metoclopramide	5,0	carbidopa	2,0
lorazepam	14,0	naratriptan	5,0	carboplatin	2,0
naproxen	14,0	isosorbide 5-mononitrate	4,9	cimetidine	2,0
valproic acid	14,0	montelukast	4,9	ibuprofen	2,0
docetaxel	13,6	velafaxine	4,9	nalbuphine	2,0
tocainide	13,5	butorphanol	4,8	nicotine	2,0
irbesartan	13,0	diltiazem	4,4	zalcitabine	2,0

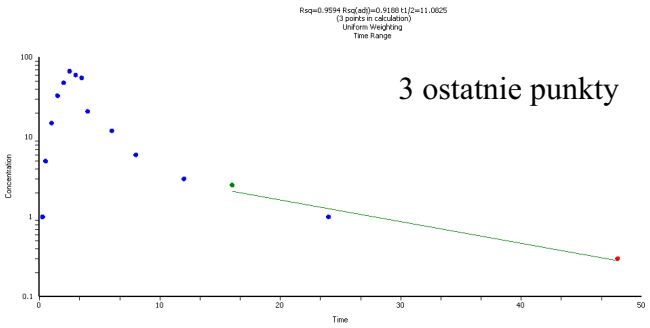
midazolam	1,9	nicardipine	1,3	bumetanide	0,8
morphine	1,9	tolcapone	1,3	cocaine	0,8
selegiline	1,9	mebendazole	1,1	repaglinide	0,8
zolpidem	1,9	cefotaxime	1,1	dicloxacillin	0,7
indinavir	1,8	diclofenac	1,1	fluvastatin	0,7
lidocaine	1,8	gemfibrozil	1,1	isosorbide dinitrate	0,7
nifedipine	1,8	naloxone	1,1	omeprazole	0,7
oseltamivir	1,8	stavudine	1,1	gemcitabine	0,6
pravastatin	1,8	zidovudine	1,1	cisplatin	0,5
metformin	1,7	abacavir	1,0	dalfopristin	0,5
amoxicillin	1,7	Alendronate	1,0	misoprostol	0,5
cefuroxime	1,7	nitrofurantoin	1,0	entacapone	0,3
alfentanil	1,6	sumatriptan	1,0	acetylsalicylic acid	0,3
ceftazidime	1,6	zaleplon	1,0	ethanol	0,2
erythromycin	1,6	quinupristin	1,0	azathioprine	0,2
didanosine	1,4	hydralazine	1,0	esmolol	0,1
levodopa	1,4	cephalexin	0,9	remifentanil	0,1
melphalan	1,4	imipenem	0,9		
furosemide	1,3	lansoprazole	0,9		
neostigmine	1,3	mercaptopurine	0,9		

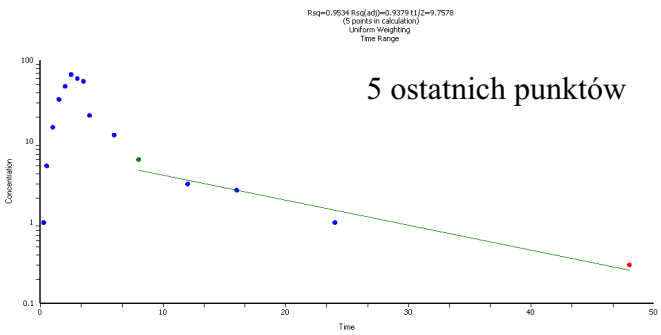
Rys. Przybliżone wartości okresu półtrwania w fazie eliminacji, wybranych leków (h).

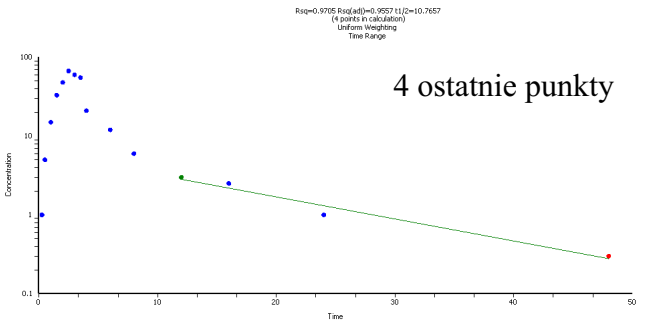
Wartość okresu półtrwania leku w fazie eliminacji zależna jest od wartości stałej szybkości eliminacji. W praktyce stała ta wyznaczana jest na podstawie kilku ostatnich par danych C-T. W zależności od tego ile par danych zostanie zakwalifikowanych do wyznaczenia kel, t1/2kel przybiera różne wartości. Nie zawsze duża rozpiętość idzie w tym wypadku w parze z realną oceną. Obecnie przyjmuje się ze przy prawidłowo zaprojektowanym badaniu PK do obliczenia kel powinno się wykorzystać co najmniej 3 do 4 ostatnich par danych. Jednak reguły dotyczące tego od którego momentu punkty C-T można kwalifikował do obliczania Kel nie są jasne. Prawidłowym wydaje się podejście w którym do wyznaczania kel kwalifikuje się pary C-T leżące poza $MRT_{0\text{-}Clats}$.

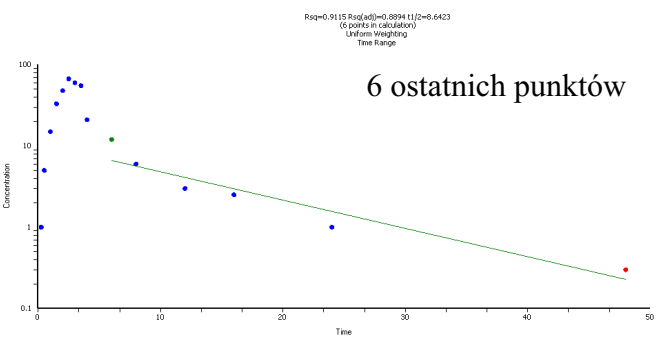
MRT = 6.5h

Czas h	Stężenie ng/ml	t1/2kel h	Liczba punktów
0.25	1		
0.5	5		
1	15		
1.5	33		
2	48		
2.5	67		
3	60		
3.5	55		
4	21		
6	12	8.6	6 ostatnich punktów
8	6	9.8	5 ostatnich punktów
12	3	10.8	4 ostatnie punkty
16	2.5	11.1	3 ostatnie punkty
24	1		
48	0.3		







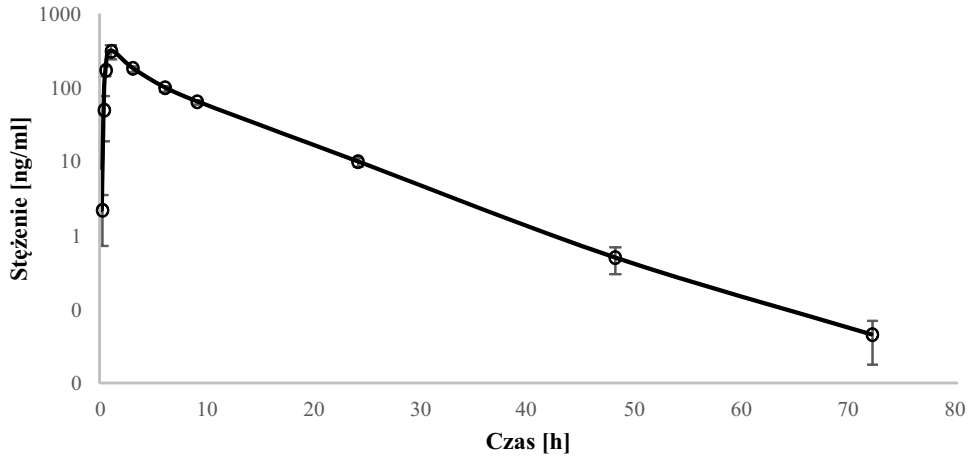


Ryc. Wpływ liczby punktów C-T kwalifikowanych do wyznaczania Kel na wartość t1/2kel.

Warunek w którym MRT = 1 / β jest możliwy do osiągnięcia tylko w nielicznych modelach. Nawet w modelach w niewielkim stopniu odchylonych od jednokompartmentowego stała szybkości eliminacji obliczona na podstawie MRT często istotnie różni się od stałej wyznaczonej metodą najmniejszych kwadratów w oparciu o dane obserwowane. Jest to jeden z najczulszych testów różnicujacych model jednokompartmentowy od wielokompartmentowego. Jeśli model jest jednokompartmentowy to β obliczone na podstawie MRT pozwala na wyznaczenie t1/2kel. Jeśli model nie jest jednokompartmentowy różnica rośnie a warunek: t1/2MRT = Ln2 / (1 / MRT) nie jest równe t1/2kel = Ln2 / β

Czas [h]	Stężenie [ng/ml]									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	k
0.1667	3.880	3.957	0.871	1.576	1.662	2.962	2.582	0.210	4.266	0.119
0.3333	107.646	40.817	20.541	97.664	47.224	42.649	75.519	13.485	31.237	27.362
0.5	197.663	164.885	121.876	164.674	147.646	190.368	197.111	154.903	207.918	214.070
1	234.392	300.697	313.880	428.050	254.295	236.207	262.399	397.881	398.002	357.195
3	189.764	185.424	166.795	210.460	197.986	193.385	155.991	196.189	172.662	199.225
6	108.716	110.385	88.828	98.092	89.433	109.248	89.241	109.629	110.925	102.513
9	70.493	75.033	63.454	59.151	61.816	60.442	64.769	69.180	68.512	63.823
24	11.324	10.614	6.987	11.431	10.682	11.030	11.130	8.373	9.592	9.586
48	0.516	0.662	0.368	0.459	0.108	0.567	0.330	0.574	0.897	0.550
72	0.018	0.072	0.084	0.014	0.054	0.072	0.069	0.039	0.016	0.014

Przykład 1: dane surowe, model jednokompartmentowy, jednorazowe podanie doustne



Ryc. Wykres półlogarytmiczny ilustrujący zależność czas-stężenie.

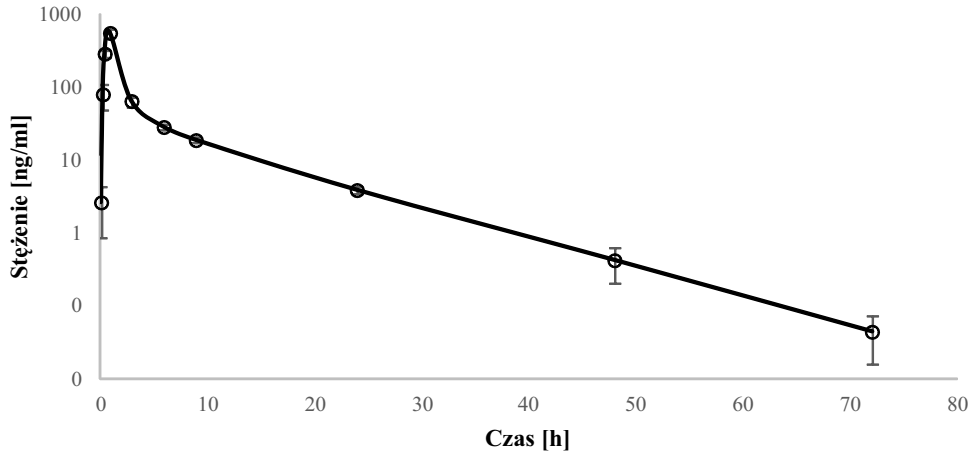
Id	$AUC_{0\text{-}Clast}$	$AUMC_{0\text{-}Clast}$	$MRT_{0\text{-}Clast}$	1/MRT	kel	$t_{1/2kel}$	$t_{1/2MRT}$
	ug x h/L	ug x h^2/L	h	h^{-1}	h^{-1}	h	h
A	2045.88	15331.78	7.49	0.1334	0.1343	5.16	5.19
B	2132.04	15653.56	7.34	0.1362	0.1039	6.67	5.09
C	1837.18	12169.63	6.62	0.1510	0.0921	7.53	4.59
D	2193.36	14593.62	6.65	0.1503	0.1400	4.95	4.61
E	1906.37	13616.89	7.14	0.1400	0.1102	6.29	4.95
F	1951.07	14520.01	7.44	0.1344	0.1047	6.62	5.16
G	1873.12	14036.19	7.49	0.1334	0.1060	6.54	5.19
H	2170.76	14185.76	6.53	0.1530	0.1117	6.21	4.53
I	2162.53	14910.80	6.90	0.1450	0.1339	5.18	4.78
k	2102.74	14124.82	6.72	0.1489	0.1361	5.09	4.66
M	**2037.51**	**14314.30**	**7.03**	**0.1426**	**0.1173**	**6.02**	**4.88**
SD	127.58	923.08	0.37	0.0075	0.0162	0.83	0.26
RSD%	6.26	6.45	5.28	5.2775	13.8036	13.78	5.28

Tab. Różnica między wartością t1/2kel oraz t1/2MRT.

Poniżej przedstawiono różnicę pomiędzy t1/2MRT = Ln2 / (1 / MRT) oraz t1/2kel = Ln2 / β wyznaczonymi dla danych ilustrujących model dwukompartmentowy i jednorazowe podanie doustne leku. Im model bardziej odbiega od jednokompartmentowego tym różnica pomiędzy obydwoma wartościami jest większa. Wizualna inspekcja danych surowych na wykresie półlogarytmicznym pozwala jednoznacznie zakwalifikować model do dwukompartmentowego.

Czas [h]	Stężenie [ng/ml]									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	k
0.1667	3.786	0.050	0.823	1.509	4.121	0.009	4.176	4.550	2.498	4.380
0.3333	120.232	110.535	98.375	34.828	51.360	94.635	52.435	50.593	111.686	64.516
0.5	312.808	244.144	286.221	304.586	223.032	303.141	320.584	328.087	249.389	278.503
1	487.212	537.886	642.323	475.225	590.809	530.391	641.469	645.954	457.973	493.034
3	63.938	60.799	53.041	52.772	74.432	76.403	64.166	75.547	45.611	71.275
6	25.993	23.979	24.343	28.740	27.946	28.952	28.091	31.827	30.499	31.033
9	20.513	20.912	17.508	17.778	17.683	17.756	19.719	15.999	20.741	17.168
24	4.400	4.274	3.863	4.251	3.444	3.800	4.025	3.146	3.447	3.603
48	0.377	0.436	0.571	0.843	0.495	0.147	0.334	0.595	0.153	0.208
72	0.083	0.005	0.062	0.012	0.059	0.012	0.068	0.033	0.077	0.023

Przykład 2: dane surowe, model dwukompartmentowy, jednorazowe podanie doustne



Ryc. Wykres półlogarytmiczny ilustrujący zależność czas-stężenie.

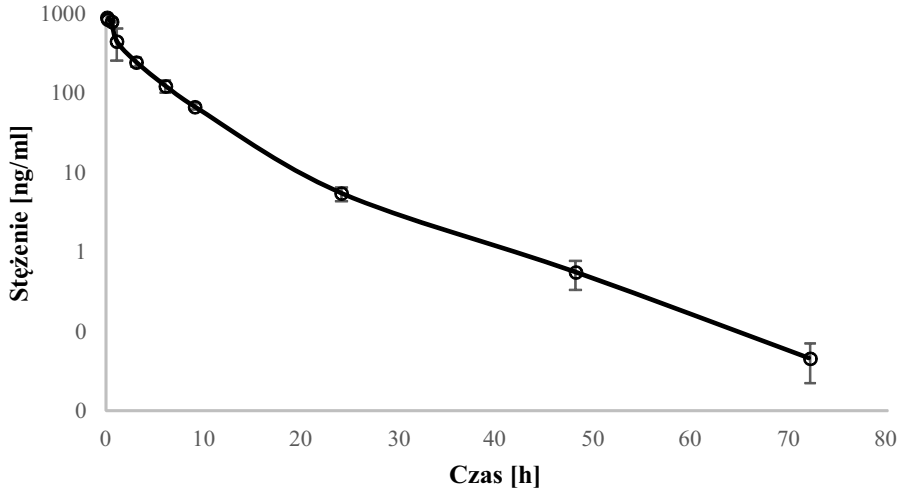
Id	$AUC_{0\text{-}Clast}$	$AUMC_{0\text{-}Clast}$	$MRT_{0\text{-}Clast}$	1/MRT	kel	$t_{1/2kel}$	$t_{1/2MRT}$
	ug x h/L	ug x h^2/L	h	h^{-1}	h^{-1}	h	h
A	1252.25	5842.36	4.67	0.2143	0.0827	8.38	3.23
B	1278.18	5807.52	4.54	0.2201	0.1423	4.87	3.15
C	1367.81	5629.21	4.12	0.2430	0.0860	8.06	2.85
D	1183.05	5971.07	5.05	0.1981	0.1223	5.67	3.50
E	1330.90	5504.59	4.14	0.2418	0.0849	8.17	2.87
F	1295.27	5210.14	4.02	0.2486	0.1192	5.82	2.79
G	1427.61	5769.15	4.04	0.2475	0.0851	8.15	2.80
H	1430.36	5487.14	3.84	0.2607	0.0947	7.32	2.66
I	1138.64	5047.45	4.43	0.2256	0.0793	8.74	3.07
k	1221.94	5095.84	4.17	0.2398	0.1053	6.58	2.89
M	**1292.60**	**5536.45**	**4.30**	**0.2339**	**0.1002**	**7.17**	**2.98**
SD	93.21	310.14	0.35	0.0179	0.0202	1.28	0.24
RSD%	7.21	5.60	8.07	7.6682	20.1689	17.85	8.07

Tab. Różnica między wartością t1/2kel oraz t1/2MRT.

Poniżej przykład przedstawiający różnicę pomiędzy t1/2MRT = Ln2 / (1 / MRT) oraz t1/2kel = Ln2 / β wyznaczonymi dla danych ilustrujących model dwukompartmentowy i jednorazowe podanie dożylne leku. Wizualna inspekcja danych surowych na wykresie półlogarytmicznym nie pozwala jednoznacznie zakwalifikować model do dwukompartmentowego.

Czas [h]	Stężenie [ng/ml]									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	k
0.0167	949.592	938.206	937.534	916.400	913.247	904.885	923.736	912.773	947.692	948.157
0.0833	863.884	896.828	864.616	895.170	898.201	896.748	860.504	885.900	880.619	868.428
0.5	816.532	812.693	826.967	831.831	820.993	847.850	803.569	816.523	811.443	852.185
1	137.156	384.367	644.421	642.222	709.508	709.323	323.059	189.447	570.336	345.902
3	224.978	298.667	269.306	230.828	223.562	230.535	224.758	279.120	275.499	283.175
6	94.224	138.250	124.234	96.440	97.528	137.849	153.180	144.568	132.019	150.196
9	76.053	72.879	63.724	70.140	64.302	73.956	74.924	55.660	73.414	71.059
24	6.406	4.618	7.437	4.296	6.895	5.876	4.393	5.338	4.705	6.938
48	0.552	0.942	0.380	0.516	0.549	0.501	0.980	0.145	0.643	0.576
72	0.027	0.054	0.024	0.079	0.084	0.042	0.081	0.026	0.031	0.024

Przykład 3: dane surowe, model dwukompartmentowy, jednorazowe podanie dożylne



Ryc. Wykres półlogarytmiczny ilustrujący zależność czas-stężenie.

Id	$AUC_{0\text{-}Clast}$	$AUMC_{0\text{-}Clast}$	$MRT_{0\text{-}Clast}$	1/MRT	kel	$t_{1/2kel}$	$t_{1/2MRT}$
	ug x h/L	ug x h^2/L	h	h^{-1}	h^{-1}	h	h
A	2462.13	13578.37	5.51	0.1813	0.1136	6.10	3.82
B	3039.39	14609.53	4.81	0.2080	0.0929	7.46	3.33
C	3206.49	14370.05	4.48	0.2231	0.1198	5.78	3.11
D	3033.30	12833.78	4.23	0.2364	0.0831	8.34	2.93
E	3097.15	13667.09	4.41	0.2266	0.0917	7.56	3.06
F	3312.25	14663.04	4.43	0.2259	0.1031	6.73	3.07
G	2824.47	14372.47	5.09	0.1965	0.0831	8.34	3.53
H	2603.50	12334.14	4.74	0.2111	0.1110	6.25	3.28
I	3190.21	14276.00	4.47	0.2235	0.1043	6.64	3.10
k	3019.80	15160.37	5.02	0.1992	0.1177	5.89	3.48
M	**2978.87**	**13986.48**	**4.72**	**0.2132**	**0.1020**	**6.91**	**3.27**
SD	257.23	832.55	0.37	0.0161	0.0130	0.91	0.26
RSD%	8.64	5.95	7.93	7.5683	12.7343	13.20	7.93

Tab. Różnica między wartością t1/2kel oraz t1/2MRT.

Czas "wymywania" leku z organizmu (ang.: *Wash-out period)*

Okres wymywania leku z organizmu definiowany jest jako czas potrzebny na usunięcie takiego procentu leku aby na tej samej grupie można było przeprowadzić kolejne badanie PK z wykluczeniem wpływu pozostałości stosowanego wcześniej leku na PK kolejnej fazy badania. Tak ujęta definicja okresu wymywania dotyczy jednak wyłącznie wash-out'u "chemicznego". Oznaczać może wymycie leku w sensie jego stężenia rejestrowanego w osoczu jednak nie musi oznaczać wash-out'u farmakodynamicznego. Czas potrzebny do "wymycia leku" w sensie chemicznym, zwykle opisywany jest krotnością okresu półtrwania leku w fazie eliminacji. Prawidłowe określenie czasu wymywania leku z organizmu pozwala uniknąć wielu błędów w projektowaniu badań farmakokinetycznych na grupach skrzyżowanych (cross-over studies). Okres wymywania leku z organizmu najczęściej obliczany jest na podstawie okresu półtrwania leku i lub jego metabolitów. Prawidłowo przeprowadzone obliczenia ujmują również jako dodatkowy czynnik zmienność wewnątrz i lub między osobniczą uzyskanych wartości PK.

	Zmienność DMPK (CV%)						
	0	20	30	40	50	60	
Krotność t1/2		procent wyeliminowanego leku (- zmienność)					
1 x t1/2	50,00	40,00	35,00	30,00	25,00	20,00	
2 x t1/2	75,00	70,00	67,50	65,00	62,50	60,00	
3 x t1/2	87,50	85,00	83,75	82,50	81,25	80,00	
4 x t1/2	93,75	92,50	91,88	91,25	90,63	90,00	
5 x t1/2	96,88	96,25	95,94	95,63	95,31	95,00	możliwy błąd na poziomie > - 5 %
6 x t1/2	98,44	98,13	97,97	97,81	97,66	97,50	
7 x t1/2	99,22	99,06	98,98	98,91	98,83	98,75	możliwy błąd na poziomie < - 3 %
8 x t1/2	99,61	99,53	99,49	99,45	99,41	99,38	
9 x t1/2	99,80	99,73	99,75	99,73	99,71	99,69	
10 x t1/2	99,90	99,88	99,87	99,86	99,85	99,84	możliwy błąd na poziomie < - 1 %
	procent wyeliminowanego leku (+ zmienność)						
1 x t1/2	50,00	60,00	65,00	70,00	75,00	80,00	
2 x t1/2	75,00	80,00	82,50	85,00	87,50	90,00	
3 x t1/2	87,50	90,00	91,25	92,50	93,75	95,00	
4 x t1/2	93,75	95,00	95,63	96,25	96,88	97,50	
5 x t1/2	96,88	97,50	97,81	98,13	98,44	98,75	możliwy błąd na poziomie > + 5 %
6 x t1/2	98,44	98,75	98,91	99,06	99,22	99,38	
7 x t1/2	99,22	99,38	99,45	99,53	99,61	99,69	możliwy błąd na poziomie < + 3 %
8 x t1/2	99,61	99,69	99,73	99,77	99,80	99,84	
9 x t1/2	99,80	99,84	99,86	99,88	99,90	99,92	
10 x t1/2	99,90	99,92	99,93	99,94	99,95	99,96	możliwy błąd na poziomie < + 1 %

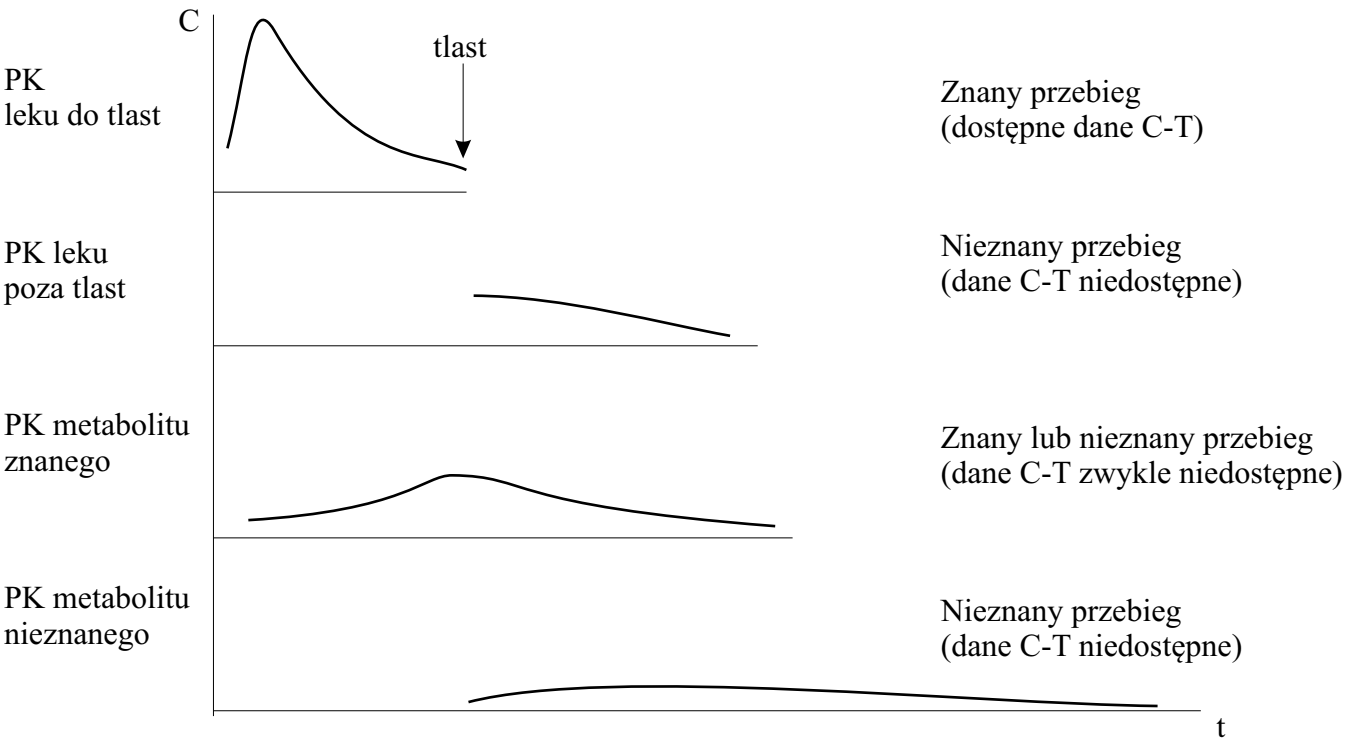
Ryc. Wpływ uwzględnienia analizy zmienności parametrów farmakokinetycznych na błąd w obliczaniu okresu wymywania leku.

Przy dużej zmienności analizowanych parametrów PK w skrajnych przypadkach okres wymywania równy nawet pięciu okresom półtrwania leku może spowodować błąd na poziomie około 5%. Dopiero zastosowanie okresu wymywania równego co najmniej 6 okresom półtrwania leku daje szanse na zakres błędu na poziomie niższym niż 3%. W przypadkach gdy okres półtrwania metabolitów jest dłuższy od leku macierzystego okres wymywania powinien być jeszcze dłuższy. Przytoczone obliczenia zakładają geometryczny spadek stężenia leku w organizmie w fazie eliminacji. W rzeczywistości wiedza na temat charakteru kinetyki wymywania leku poza punktem Clast często oparta jest na domysłach i zwykle trudna jest do przewidzenia. W wielu wypadkach wymywanie leku może mieć charakter ciągu matematycznego co trudne jest do zweryfikowania.

Trudnym do zweryfikowania źródłem błędu w badaniach ze zbyt krótkim okresem wymywania może być wpływ obecności metabolitów pozostałych po okresie wymywania zarówno na PK po podaniu kolejnej dawki leku jak i na błąd analizy chemicznej. Obecne wymogi metodyczne w zakresie walidacji metod analitycznych nie uwzględniają procedur które weryfikowały by tego rodzaju czynniki. Przyczyny rosnącego zagrożenia błędem w badaniach DMPK ze zbyt krótkim okresem wymywania to między innymi:

- pozostałości leku w tkankach, w płynach fizjologicznych w kompartmentcie głębokim
- pozostałości metabolitów w tkankach, w płynach fizjologicznych
- indukcja białek enzymatycznych (wpływ na przebieg kolejnej fazy)
- utrzymujący się efekt działania leku
- utrzymujące się efekty działania metabolitów (mogą nie zbyć znane)

Zmienność parametrów farmakokinetycznych jest najczęściej wartością różną dla różnych parametrów w obrębie jednego eksperymentu. Najbezpieczniejszą formą korygowania okresu wymywania leku obliczonego na podstawie t1/2 leku jest między innymi ujęcie wartości zmienności o największej wartości.



Ryc. Schemat źródeł zagrożeń błędem przy niedoprecyzowaniu okresu wymywania leku.

Ze względu na rodzaj substancji leczniczej oraz cel badania można więc wyróżnić co najmniej trzy rodzaje wash-out'u:

- farmakokinetyczny (leki drobnocząsteczkowe, leki biologiczne)
- farmakodynamiczny (leki drobnocząsteczkowe, leki biologiczne)
- wynikający z odpowiedzi układu immunologicznego na podany lek (leki biologiczne)

Czas "wymywania"efektu farmakodynamicznego

Okres wymywania leku można oszacować na podstawie stałej szybkości w fazie eliminacji. Jest to *wash-out* ponieważ ilustruje wyłącznie wymywanie leku w sensie spadku jego stężenia do bezpiecznego poziomu (z punktu widzenia badań *cross-over*). Danymi źródłowymi do takiej analizy okresu wymywania są wartości C-T czyli zmiana stężenia leku obserwowanego w osoczu surowicy lub krwi pełnej.
Wiele leków silnie wiąże się z wybranymi tkankami, posiada wybitne powinowactwo do wybranych struktur tkankowych lub komórkowych. Leki te często mają bardzo długi okres półtrwania (który obliczany jest na podstawie stałej szybkości eliminacji Kel) oraz często jeszcze dłuższy biologiczny okres półtrwania (obliczany na podstawie stałej szybkości eliminacji leku z kompartmentu efektorowego Ke0). Taki stan rzeczy powoduje iż obliczony dla leku okres wymywania w sensie wymywania PK może być krótszy od okresu wymywania PD. Efektem takiego stanu rzeczy jest zafałszowanie wyniku badania farmakokinetyki bądź toksykokinetyki leku z uwagi na niedostateczne wymycie leku z przestrzeni efektorowej. Za przestrzeń efektorową należy w tym wypadku uznać nie tylko przestrzeń celu farmakodynamicznego, ale również przestrzeń efektów które nie są związane z głównym mechanizmem działania leku. Dodatkowe niekontrolowane efekty mogą wiec zafałszować wyniki przeprowadzone po skrzyżowaniu grup.

jeżeli **Kel < Ke0** *wash-out* obliczony na podstawie Kel jest optymalny

jeżeli **Kel > Ke0** *wash-out* obliczony na podstawie Kel nie jest optymalny

W przypadku analizy PK *wash-out* oraz PD *wash-out* równanie służące określeniu okresu wymywania przyjmuje postać:

$$\textit{Wash-out period} = t_{1/2Kel} \times 5 \times (Kel/Ke0)$$

lub

$$\textit{Wash-out period} = t_{1/2Kel} \times 7 \times (Kel/Ke0)$$

itd.

$$\textit{Wash-out period} = t_{1/2Kel} \times 10 \times (Kel/Ke0)$$

Prawidłowe wyznaczenie wash-out'u farmakodynamicznego jest szczególnie ważne w przypadku gdy:

- celem badania jest wyznaczenie parametrów farmakodynamicznych
- jednym z efektów działania leku jest wpływ na jego farmakokinetykę

Wartość czasu wymywania leku opisuje bardzo wiele wytycznych agencji rejestrujących leki. Wytyczne te zmieniają się i od wielu lat prezentują nieujednolicone podejście do kwestii czasu wymywania leku z organizmu.

Wytyczne	Wash-out
ICH (1996) Guideline for Industry Structure and Content of Clinical Study Reports. ICH E3, 1-38	pointing to pharmacodynamic evidence that effect is prolonged compared to blood levels.
NIHS (1997) Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products .	5xt1/2kel
ICH (1998) STATISTICAL PRINCIPLES FOR CLINICAL TRIALS E9 ICH. 1-35.	sufficiently long for complete reversibility of drug effect.
EMA (2000) Guideline on statistical principles for veterinary clinical trials. EMEA/CVMP/816/00-final. 1-24	The wash out reversebility drug effect
FDA (2002) Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. 1-24.	>5xt1/2kel
ANVISA (2003) Resolution - RE no 896,	>7xt1/2kel
EMA (2004) GUIDELINE ON CLINICAL INVESTIGATION OF MEDICINAL PRODUCTS INDICATED FOR THE TREATMENT OF PSORIASIS London, CHMP/EWP/2454/02 corr, 1-18	The duration of the washout period should take into account pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of previously applied therapy
FDA (2006) Guidance for Industry BIOEQUIVALENCE GUIDANCE Center for Veterinary Medicine (CVM), 1-28.	10xt1/2kel
WHO (2006) Annex 7 Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series, No. 937, 347–390.	>5xt1/2kel
ICH (2009) GUIDANCE ON NONCLINICAL SAFETY STUDIES FOR THE CONDUCT OF HUMAN CLINICAL TRIALS AND MARKETING AUTHORIZATION FOR PHARMACEUTICALS M3(R2)	>6xt1/2kel
EMA (2010) GUIDELINE ON THE INVESTIGATION OF BIOEQUIVALENCE London, Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr ** , 1-27.	5xt1/2kel
EMA (2010) Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of diabetes mellitus. CPMP/EWP/1080/00 Rev. 1, 1-19	3 months
HC (2011) Data Requirements for Safety and Effectiveness of Subsequent Market Entry Inhaled Corticosteroid Products for Use in the Treatment of Asthma. 1-11	paralel vs cross-over pharmacodynamic wash-out
HC (2012) GUIDANCE DOCUMENT Conduct and Analysis of Comparative Bioavailability Studies. 1-39	Co<(Cmax x 0.05)
EMA (2013) VICH GL52 on Bioequivalence: blood level bioequivalence study EMA/CVMP/VICH/751935/2013, 1-19	5xt1/2kel
FDA (2013) Guidance for Industry Bioequivalence Studies with pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA. 1-20.	>5xt1/2kel
EMA (2013) VICH GL52 on Bioequivalence: blood level bioequivalence study. 1-19	The duration of the washout for the two-period crossover study is so long as to result in significant physiological changes in the study subjects
EMA (2014) Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev1, 1-13	A parallel group design may be necessary with substances with a long half-life and/or a high risk of immunogenicity.
FDA (2014) Guidance for Industry Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product. 1-15	A crossover study is recommended for a product with a short half-life (e.g., shorter than 5 days), a rapid PD response (e.g., onset, maximal effect, and disappearance in conjunction with drug exposure), and a low incidence of immunogenicity.
EMA (2015) Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. EMEA/CHMP/BMWP/32775/2005_Rev. 1, 1-12	The wash-out phase between study periods should take into account the duration of action of the investigated insulin preparation to avoid carry-over effects.

Tab. Kluczowe wytyczne odnoszące się do kwestii długości czasu wymywania leku z organizmu.

Klirens - Cl

Klirens ciała, klirens totalny, klirens całkowity (ang.: *Clearance*; niem.: *Clearance*) leku jest parametrem farmakokinetycznym który niezależnie od przyjętego modelu pozwala ocenić szybkość procesów eliminacji. Klirens całkowity leku to wartość która określa jaka objętość osocza została oczyszczona z leku w jednostce czasu, w wyniku procesów eliminacji zachodzących w organizmie. Opisując ten parametr innymi parametrami farmakokinetycznymi można powiedzieć że jest to określona objętość dystrybucji oczyszczona z leku ze znaną stałą szybkości eliminacji.

$$\mathbf{Cl_{(b)} = D / AUC}$$

$$\mathbf{Cl_{(b)} = Vd_{(ss)} / MRT} \quad \text{lub} \quad \mathbf{Cl_{(b)} = Vd_{(ss)} \times \beta}$$

D - dawka leku
F - ułamek wchłoniętej dawki
AUC - pole powierzchni pod krzywą
β - stała szybkości eliminacji

Pozwala to stwierdzić że klirens leku jest pojęciem ściśle związanym z wartością objętości dystrybucji leku oraz szybkością eliminacji czyli okresem półtrwania leku w fazie eliminacji ($\beta = 0.693 / t_{1/2}$). Zależność klirensu od objętości dystrybucji wiąże się miedzy innymi z masą ciała. W badaniach porównawczych (Ho) lub dotyczących grupy osobników można niwelować różnice wagi czy wzrostu stosując równanie:

$$\mathbf{Cl = Clstd \times (BW / BWstd)^{0.75}}$$

Clstd - klirens człowieka o typowej wadze i wzroście
Cl - klirens człowieka o nietypowej wadze i/lub wzroście
BWstd - masa ciała człowieka o typowej wadze i wzroście
BW - masa ciała człowieka o nietypowej wadze i/lub wzroście

Znajomość wartości klirensu pozwala w alternatywny sposób obliczyć okres półtrwania leku w fazie eliminacji.

Ponieważ: $\mathbf{Cl_{(b)} = 0.693 \times Vd / t_{1/2}}$

Klirens najczęściej utożsamiany jest z funkcją wydalniczą nerek. Jednak parametr ten można obliczyć oddzielnie dla każdego organu o zbliżonej funkcji lub procesu kinetycznego. Klirens całkowity, jest wartością w skład której wchodzą wartości klirensu nerkowego Cl(r) klirensu wątrobowego Cl(h) oraz klirensy pozostałych procesów wydalania i metabolizmu leku.

$$\mathbf{Cl_{(b)} = Cl_{(r)} + Cl_{(h)} + Cl_{(pozostały)}}$$

Klirens normalizowany -$Cl_{(b)/kg}$.

Klirens leku normalizowany w stosunku do wagi ciała obliczany jest zgodnie z wzorem:

$$\mathbf{Cl_{(b)} / kg = Cl_{(b)} / BW}$$

BW - (ang.: *Body Weight*), ciężar ciała

Klirens dystrybucyjny Cl(d):

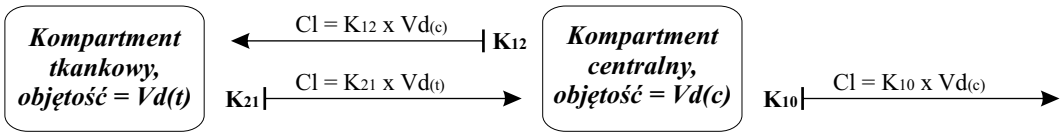
W przypadku klirensu totalnego obliczanego po podaniu donaczyniowym z szybką dystrybucją leku do tkanek, obliczyć można tzw. klirens dystrybucyjny.

Wartość ta wyrażona jest jako część klirensu całkowitego określona objętością dystrybucji kompartmentu centralnego i stałej szybkości procesu dystrybucji.

$$\mathbf{Cl_{(d)} = (Vd_{(c)} \times \alpha) - Cl_{(b)}} \quad \text{lub} \quad \mathbf{Cl_{(d)} = K12 \times Vd_{(c)}}$$

$$\mathbf{Cl_{(d)} = K21 \times Vd_{(t)}}$$

K12 - stała szybkości dla procesu dystrybucji z krwi do tkanek
K21 - stała szybkości dla procesu dystrybucji z tkanek do krwi
Vd(c) - objętość kompartmentu centralnego
Vd(t) - objętość kompartmentu tkankowego



Rys. Klirens jako wartość oczyszczania określonej objętości (Vd) dla znanych wartości stałych szybkości dystrybucji i eliminacji leku.

Klirens nerkowy Cl(r)

Leki w organizmie ulegają wielu możliwym procesom eliminacji. Proces ten w obrębie nerek zapewnia między innymi odpowiednia ilość kłębuszków nerkowych oraz wysoka perfuzja krwi. U dorosłego człowieka perfuzja ta wynosi 4 ml/min/g (Upton R.N., Doolette D.J. 1999). Dla większości leków jednym z najwydajniejszych i jednym z głównych sposobów wydalania leku jest eliminacja poprzez nerki stąd liczne metody obliczania klirensu dla tej drogi eliminacji. Opis klirensu nerkowego jest precyzyjną formą opisu wydajności eliminacji leku poprzez barierę specjalizowaną krew - mocz.

$$\mathbf{Cl_{(r)} = C_{(u)} \times V_{(u)} / C}$$

C(u) - stężenie leku w moczu
V(u) - objętość moczu wydalana w jednostce czasu
C - stężenie leku w osoczu

Klirens nerkowy można także opisać jako część klirensu totalnego (Berezhowskyi L.M. 2003). Jeśli uznać że klirens nerkowy to klirens wyłącznie frakcji wolnej leku w osoczu - fuP, to:

$$\mathbf{Cl_{(r)} = fuP \times Cl_{(b)}} \quad \text{lub} \quad \mathbf{Cl_{(u)} = fuP \times Cl_{(b)}}$$

W przeciwieństwie do klirensu totalnego klirens nerkowy dotyczy więc AUC(u) czyli pola powierzchni reprezentującej stężenie leku niezwiązanego z białkami osocza:

$$\mathbf{Cl_{(r)} = D / AUC_{(u)}}$$

Stąd klirens pozanerkowy równy jest:

$$\mathbf{Cl_{(nr)} = Cl_{(b)} - Cl_{(r)}}$$

Przepływ krwi przez nerki jest różny w zależności od wieku. U dzieci zwykle przepływ ten jest mniejszy, a okres półtrwania obrazujący wzrost GFR wynosi około 8 miesięcy (Hayton W.L. 2000).

Wydalanie przez nerki nie jest procesem jednolitym. Uzależnione jest od kilku ścieżek filtracji, wchłaniania i sekrecji odpowiedzialnych za efekt oczyszczania. Jest to następstwem złożonej budowy i mechanizmów kontroli fizjologii pracy nerki. Jeżeli na wydalanie nerkowe składają się:

$$\mathbf{UE = (GFR \times fuP) - (TR + TS)}$$

UE - wydalanie nerkowe (ang.: *Urinary Excretion*)
GFR - filtracja kłębuszkowa (ang.: *Glomerular Filtration Rate*)
TR - wchłanianie zwrotne w kanalikach nerkowych (ang.: *Tubular Reabsorption*)
TS, ATS - sekrecja do kanalików nerkowych (ang.: *Tubular Secretion, Active Tubular Secretion*)
FuP - frakcja niezwiązana z białkami w osoczu

To klirens nerkowy równy jest:

$$\mathbf{Cl_{(r)} = (GFR \times fuP) + (Cl_{(ATS)} + Cl_{(TR)})}$$

Cl(ATS) - klirens sekrecyjny
Cl(TR) - klirens reabsorpcyjny

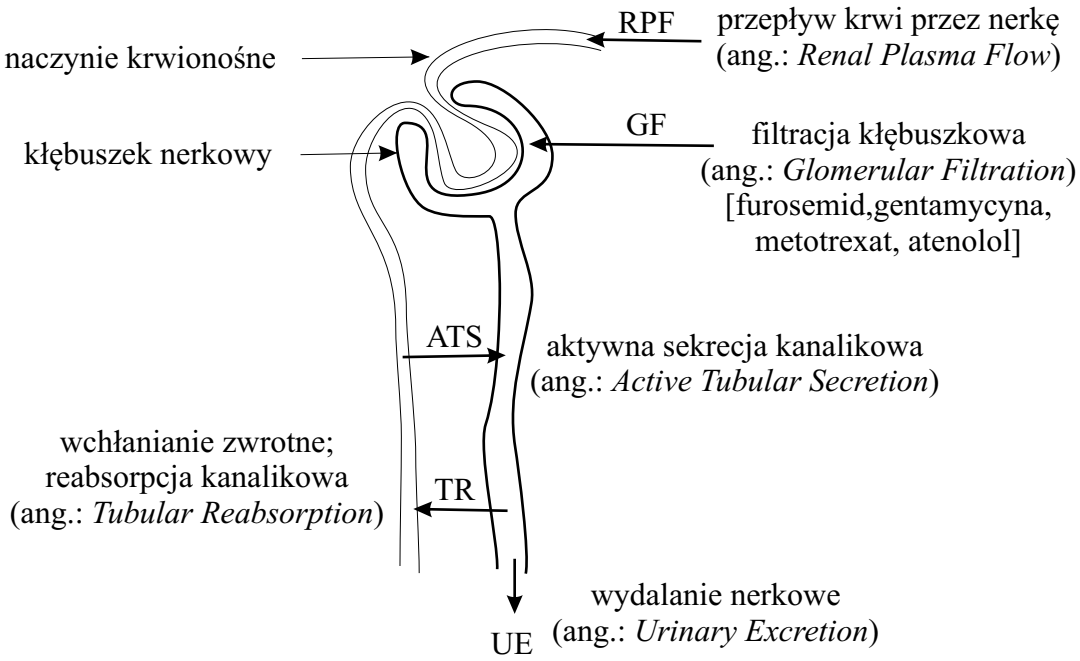
Na proces tworzenia moczu składa się więc wiele mechanizmów fizjologicznych których wypadkowa ma ogromny wpływ między innymi na przebieg fazy eliminacji leku. Nie bez znaczenia pozostaje wartość pH moczu które w zależności od charakteru leku może znacznie zmieniać jego transport w obrębie elementów czynnościowych nerki. Przesączanie w obrębie kłębka związane jest z obecnością porów przez które może przechodzić część substancji (nie związanych z albuminami). Przesączanie kłębkowe nie jest procesem efektywnym dla leków które w znacznym stopniu łączą się z białkami. Głównym mechanizmem transportu jest w tym elemencie morfologicznym dyfuzja bierna. Szybkość przesączania nerkowego - GFR zależna jest głównie od przepływu krwi i sprawności układu krążenia. Proces filtracji w kłębuszkach nerkowych można określić ilościowo korzystając z formuły:

$$\mathbf{F = GFR / Cp}$$

Cp - stężenie leku w osoczu (ang.: *Plasma Concentration*)
F - filtracja (ang.: *Filtration*)

Funkcja kanalika bliższego obejmuje wydzielanie kanalikowe - ATS (ang.: *Active Tubular Secretion*). Proces ten przebiega w ramach dyfuzji biernej lub transportu aktywnego. Ograniczanie wartości ATS prowadzi między innymi do wydłużania t1/2 leku który podlega temu procesowi. W kanaliku dalszym dochodzi do wytworzenia znacznego gradientu stężeń. Tu może dochodzić do wchłaniania zwrotnego wielu leków w drodze dyfuzji biernej. Szczególnie łatwo wchłanianiu zwrotnemu ulegają leki silnie lipofilne a w przypadku elektrolitów leki słabo zjonizowane. W mały stopniu wchłaniane zwrotnie są leki silnie zjonizowane i słabo lipofilne. Stąd w moczu kwaśnym dobrze resorbowane będą leki - słabe kwasy. Natomiast słabe zasady nie będą podlegać wchłanianiu zwrotnemu - wzmożone wydalanie. Zaś w moczu o pH zasadowym dobrze resorbowane będą leki - słabe zasady. Natomiast słabe kwasy nie będą podlegać wchłanianiu zwrotnemu - wzmożone wydalanie. Dla leków podlegających wchłanianiu zwrotnemu wartość klirensu nerkowego jest niższa od klirensu inuliny. Co za tym idzie stała szybkości eliminacji dla tych leków ma wartość mniejszą rośnie średni czas przebywania leku w organizmie oraz okres półtrwania (przy braku zmian Vd). Podstawowymi czynnikami warunkującymi wartość frakcji filtrowanej leku - Ff (ang.: *Filtration Fraction*) jest przepływ krwi - RBF (ang.: *Renal Blood Flow*) lub przepływ osocza - RPF (ang.: *Renal Plasma Flow*) przez nerkę oraz GFR. U człowieka Ff stanowi około 20 % objętości wyrzutowej serca.

$$\mathbf{Ff = GFR / RPF} \qquad \mathbf{Ff = 125}\ \text{(ml/min)} / \mathbf{660}\ \text{(ml/min)} = \mathbf{19\%}$$



Ryc. Schemat możliwości wydalania i reabsorpcji leków drogą nerkową.

$$\mathbf{RPF = RBF \times (1 - HCT)}$$

HCT - hematokryt

Tak więc klirens nerkowy można przedstawić jako iloraz współczynnika ekstrakcji ER dla nerek oraz przepływu krwi przez organ:

$$\mathbf{Cl(r) = RBF \times ER}$$

Jeżeli przyjąć że RPF dotyczy zjawisk filtracji leku niezwiązanego z białkami krwi to można parametr ten wyrazić właśnie wartością frakcji wolnej leku we krwi fuP (ang.: *Fraction Unbound in Plasma*). Stąd klirens filtracyjny wyniesie:

$$\mathbf{Cl(f) = fuP \times GFR}$$

Prawidłowość ta spełniona jest jedynie dla leków podlegających w nerce tylko procesom filtracji i w tym wypadku klirens filtracyjny Cl(f) równy jest klirensowi nerkowemu leku Cl(r). Jeżeli spełniona jest zależność:

$$\mathbf{Cl(r) > fuP \times GFR}$$

Oznacza to że lek podlega nie tylko procesom filtrowania lecz także wydzielania kanalikowego - ATS. Natomiast jeżeli spełniona jest zależność:

$$\mathbf{Cl(r) < fuP \times GFR}$$

Oznacza to że lek podlega procesom filtrowania oraz zwrotnemu wchłanianiu kanalikowemu. Wartość Klirensu sekrecyjnego - Cl(sec) obliczamy z wzoru:

$$\mathbf{Cl_{(sec)} = Cl_{(r)} - (GFR \times fuP)}$$

fuP - frakcja leku niezwiązanego z białkami w osoczu

Równie ważnym parametrem jest efektywny, lub skuteczny przepływ krwi przez nerkę - ERBF (ang.: *Effective Renal Blood Flow*). Współczynnik ten obliczyć można znając wartość hematokrytu - HCT i klirens para aminohipuranu sodu.

$$\mathbf{ERPF = Cl_{(PAH)} / (1 - HCT)}$$

$$\mathbf{ERPF = RPF / 0.9}$$

Zmiany parametrów farmakokinetycznych w chorobach nerek

Patologia w obrębie nerek jest często kluczowym problemem farmakokinetyki leku. Nerki są narządem wydalniczym którego sprawność w znacznym stopniu opisuje klirens leku lub substancji wskaźnikowych. Nie zawsze lek wydalany jest wraz z moczem, jednak zwykle przynajmniej częściowo wydalany jest tą drogą. Diagnozowanie zaistniałej dysfunkcji nerek na podstawie parametrów farmakokinetycznych pozwala uniknąć błędnej analizy profilu farmakokinetycznego leku. W klinice postępowania lekarskiego pozwala dostosować dawkowanie do indywidualnego pacjenta i prowadzić leczenie w granicach stężeń terapeutycznych leku. Ponadto w badaniach farmakokinetycznych schorzenia nerek zmieniają wartość obliczanej dostępności biologicznej leku, biorównoważności leków oraz ich skuteczności. Nerki podobnie jak wiele innych organów dysponują funkcjami metabolicznymi. Enzymy odpowiedzialne za metabolizm nerkowy leków rozmieszczone są w różnych częściach struktur czynnościowych narządu (Lohr J.W. i wsp. 1998).

kanalik bliższy - tu znajdują się układy enzymatyczne dehydrogenazy alkoholowej, reduktazy aldehydowej, karboksyloesterazy, cytochromu P-450, hydrolazy epoksydowej, N acetylotransferazy i innych.
kanalik dalszy - S transferaza glutationowa, N acetylo transferaza, Nmetylo transferaza, hydroksylaza steroidowa
kanalik zbiorczy - reduktaza aldozowa, hydroksylaza steroidowa

Zmiany funkcji metabolicznych nerek w stanach patologii szczególnie dla leków wydalanych w znacznym stopniu wraz z moczem, będą przyczyniać się także do zmian PK leku. Przykładem leku którego eliminacja zależna jest w znacznym stopniu od GFR (lek hydrofilny wydalany głównie drogą nerkową) jest amoksycylina. Okres półtrwania amoksycyliny wydłuża się wraz ze spadkiem wartości GFR czyli spadkiem filtracji kłębkowej.

$$\mathbf{t1/2 = 0.693 / (Knr + Kr)}$$

($K_{nr} > K_r$) leki wydalane głownie drogą pozanerkową
($K_{nr} < K_r$) leki wydalane głownie z moczem

Knr - stała szybkości wynikająca z procesów eliminacji drogą pozanerkową
Kr - stała szybkości wynikająca z eliminacji drogą nerkową

acetylsalicylic acid	903,0	diltiazem	11,8	flecainide	5,6
raloxifene	735,0	haloperidol	11,8	triazolam	5,6
doxorubicin	666,0	amitriptylline	11,5	paclitaxel	5,5
sibutramine	417,0	ropinirole	11,2	risperidone	5,4
flutamide	280,0	zolmitriptan	11,2	dofetilide	5,2
misoprostol	240,0	codeine	11,0	melphalan	5,2
nitroglycerin	195,0	granisetron	11,0	acetaminophen	5,0
esmolol	170,0	lovastatin	11,0	bromocriptine	5,0
exemestane	145,0	mercaptopurine	11,0	ribavirin	5,0
loratadine	142,0	nicardipine	10,4	lamivudine	5,0
hydroxyurea	72,0	ranitidine	10,4	vincristine	4,9
triamterene	63,0	entacapone	10,3	enalapril	4,9
dobutamine	59,0	fluphenazine	10,0	hydrochorothiazide	4,9
azathioprine	57,0	isradipine	10,0	oseltamivir	4,9
hydralazine	56,0	allopurinol	9,9	amantadine	4,8
remifentanil	50,0	nitrofurantoin	9,9	irinotecan	4,8
isosorbide dinitrate	46,0	amiloride	9,7	betaxolol	4,7
butorphanol	40,0	fluoxetine	9,6	clindamycin	4,7
sertraline	38,0	fexofenadine	9,4	quinidine	4,7
gemcitabine	37,8	repaglinide	9,3	ganciclovir	4,6
bupropion	36,0	lidocaine	9,2	busulfan	4,5
cocaine	32,0	mirtazapine	9,1	zolpidem	4,5
phenylephrine	29,9	erythromycin	9,1	cephalexin	4,3
nalbuphine	29,7	azithromycin	9,0	citalopram	4,3
atorvastatin	29,0	zileuton	9,0	diclofenac	4,2
idarubicin	29,0	carvedilol	8,7	lisinopril	4,2
topotecan	28,6	chlorpromazine	8,6	zalcitabine	4,1
buspirone	28,3	ethambutol	8,6	thiopental	3,9
propofol	27,0	paroxetine	8,6	cefotaxime	3,7
zidovudine	26,0	ketoconazole	8,4	chloroquine	3,7
morphine	24,0	cimetidine	8,3	fludarabine	3,7
itraconazole	23,0	pramipexole	8,2	prednisone	3,6
levodopa	23,0	stavudine	8,2	ofloxacin	3,5
docetaxel	22,6	losartan	8,1	rifampin	3,5
naloxone	22,0	oxybutynin	8,1	sirolimus	3,5
sumatriptan	22,0	albuterol	8,0	clonidine	3,1
venlafaxine	22,0	atropine	8,0	efavirenz	3,1
fluvoxamine	21,4	metformin	7,6	prazosin	3,0
dalfopristin	19,8	ciprofloxacin	7,6	donepezil	2,9
quetiapine	19,0	simvastatin	7,6	gatifloxacin	2,9
saquinavir	19,0	omeprazole	7,5	imipenem	2,9
nicotine	18,5	pseudoephedrine	7,3	baclofen	2,7
carbidopa	18,0	clarithromycin	7,3	amoxicillin	2,6
quinupristin	17,2	nortriptyline	7,2	bumetanide	2,6
meperidine	17,0	bupivacaine	7,1	chlorambucil	2,6
neostigmine	16,7	cisapride	7,0	tocainide	2,6
fluvastatin	16,2	isoniazid	7,0	toremifene	2,6
5-fluorouracil	16,0	nifedipine	7,0	levofloxacin	2,5
didanosine	16,0	zafirlukast	6,8	finasteride	2,3
propanolol	16,0	alfentanil	6,7	methadone	2,3
zaleplon	15,7	celecoxib	6,6	moxifloxacin	2,3
metoprolol	15,0	midazolam	6,6	thalidomide	2,2
nalmefene	15,0	cisplatin	6,3	irbesartan	2,1
verapamil	15,0	mexiletine	6,3	cidofovir	2,1
hydromorphone	14,6	lansoprazole	6,2	methotrexate	2,1
doxepin	14,0	diphenhydramine	6,2	trazodone	2,1
pravastatin	13,5	Methylprednisolone	6,2	ivermectin	2,1
mebendazole	13,4	metoclopramide	6,2	tiagabine	2,0
buprenorphine	13,3	olanzapine	6,2	amiodarone	1,9
cytarabine	13,0	clozapine	6,1	trimethoprim	1,9
fentanyl	13,0	naratriptan	6,1	cefepime	1,8
imipramine	13,0	sildenafil	6,0	isosorbide 5-mononitrate	1,8
abacavir	12,8	amlodipine	5,9	pancuronium	1,8
sufentanil	12,7	ondansetron	5,9	chlorpheniramine	1,7
felodipine	12,0	cyclosporin	5,7		
nelfinavir	12,0				

gemfibrozil	1,7	tacrolimus	0,9	benazepril	0,4
rofecoxib	1,7	modafinil	0,9	flurbiprofen	0,4
tetracycline	1,7	alprazolam	0,8	sulfisoxazole	0,3
furosemide	1,7	ibuprofen	0,8	sulfamethoxazole	0,3
dicloxacillin	1,6	cetirizine	0,7	topiramate	0,3
gabapentin	1,6	montelukast	0,7	fluconazole	0,3
zanamivir	1,6	etoposide	0,7	sulfasalazine	0,2
clonazepam	1,6	rosiglitazone	0,7	ceftriaxone	0,2
carboplatin	1,5	theophylline	0,7	tolbutamide	0,2
tolcapone	1,5	glimepiride	0,6	ethosuximide	0,2
indomethacine	1,4	tamsulosin	0,6	clorazepate	0,2
tamoxifen	1,4	dapsone	0,6	atovaquone	0,2
amikacin	1,3	letrozole	0,6	naproxen	0,1
carbamazepine	1,3	doxycycline	0,5	valproic acid	0,1
cefixime	1,3	glipizide	0,5	clofibrate	0,1
cyclophosphamide	1,3	felbamate	0,5	phenobarbital	0,1
glyburide	1,3	ketorolac	0,5	warfarin	0,0
metronidazole	1,3	valsartan	0,5	chlorthalidone	0,0
disopyramide	1,2	amphotericin b	0,5	chlorpropamide	0,0
pioglitazone	1,2	calcitriol	0,4		
Alendronate	1,1	mefloquine	0,4		
lorazepam	1,1	diazepam	0,4		
minocycline	1,0	lamotrigine	0,4		
levetiracetam	1,0	candesartan	0,4		
cefazolin	1,0	nabumetone	0,4		

Rys. Przybliżone wartości klirensu wybranych leków (ml/min/kg).

Kontrola GFR w badaniach farmakokinetycznych

Kontrola GFR ma szczególne znaczenie jako kryterium zaliczenia lub wykluczenia z grupy doświadczalnej. Dotyczy to przypadku tworzenia grupy na której ma zostać przeprowadzone badanie kliniczne farmakokinetyki leku. Szczególne znaczenie tej metody kontroli dotyczy leków eliminowanych wraz z moczem. Obecnie substancjami wskaźnikowymi najczęściej stosowanymi do określenia GFR są:

- kreatynina (Star R. i wsp. 2002)
- cystatyna C (Laterza O.F. i wsp 2002)
- inulina (Bostom A.G. i wsp 2002)
- ioheksol (Brandstrom E. i wsp. 1998; Johnsson E. i wsp. 1999)
- L-PGDS (syntaza prostaglandyny D) (Star R. i wsp. 2002)
- ^{51}Cr-EDTA (Bostom A.G. i wsp 2002; Kingdon E.J. i wsp. 2003)
- ^{99m}Tc-DTPA (Laterza O.F. i wsp 2002)
- ^{125}I-iotalamat (Bostom A.G. i wsp 2002)

W badaniach nad wartością klirensu nerkowego zwykle używa się substancji wskaźnikowych opisujących sprawność nerek niezależnie od stanu organizmu. Przykładem substancji której wydalanie przez nerki charakteryzuje liniowa zależność jest inulina. Jest to polisacharyd roślinny niewiążący się z białkami krwi i wydalany tylko w drodze filtracji kłębkowej. Kinetykę inuliny po jednorazowym podaniu tej substancji można opisać za pomocą typowych równań farmakokinetycznych modelu dwukompartmentowego (Sturgeon C. i wsp. 1998). Fizjologicznie szybkość filtracji kłębkowej GFR jest wprost proporcjonalna do klirensu inuliny Cl(in). Substancja ta nie podlega ani wchłanianiu zwrotnemu ani wydalaniu kanalikowemu.

$$\mathbf{GFR = Cl_{(in)}}$$

Korzystając z zależności dla GFR i Cl(in) można obliczyć klirens inuliny a równocześnie GFR na podstawie wzoru:

$$\mathbf{GFR = Cl_{(in)} = D_{(in)} / AUC_{(in)}}$$

Oraz kolejne parametry na przykład ilość inuliny usuniętą w drodze filtracji kłębkowej - I:

$$\mathbf{I = Cl_{(in)} / AUC_{(in)}}$$

Lub objętość dystrybucji inuliny:

$$\mathbf{Vd = Cl_{(in)} / \beta}$$

Kreatynina to substancja która u człowieka jest w równym stopniu wytwarzana jak i eliminowana. Eliminacja kreatyniny odbywa się w drodze oczyszczania nerkowego. Jednak wartość obliczonej GFR na podstawie zawartości kreatyniny w osoczu nie jest pozbawiony błędu. Produkcja kreatyniny zależna jest od masy ciała, płci oraz wieku. Klirens kreatyniny określa więc jednoznacznie wartość szybkości i sprawność mechanizmów przesączania kłębkowego. Aby obliczyć wartość klirensu kreatyniny wystarczy znać stężenie kreatyniny w osoczu SCR (ang.: *Serum Creatinine*), szybkość wydalania moczu i stężenie kreatyniny w moczu.

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = (U_{(cr)} \times V_{(u)}) / SCR}$$

lub

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = [(140 - wiek) \times BMI] / (SCR \times 72)}$$ mężczyźni

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = [(140 - wiek) \times BMI] / (SCR \times 72 \times 0.85)}$$ kobiety

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = 133 - (0.64 \times wiek)}$$ dla kobiet 93 % z uzyskanej wartości

U(cr) - stężenie kreatyniny w moczu
V(u) - szybkość wydalania moczu
BMI - współczynnik masy ciała

Obliczenia klirensu kreatyniny uzależnić można od stężenia albumin w osoczu.

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = BW \times (19 \times Albuminy + 32) / SCR}$$ mężczyźni

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = BW \times (13 \times Albuminy + 29) / SCR}$$ kobiety

Sanaka przedstawił powyższe wzory z uwzględnieniem aktualnej masy ciała. Równania te mają szczególne zastosowanie w terapii osób starszych. W systemie SI przyjmują postać :

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = ABW \times (2 \times Albuminy + 35) / 1.24 \times SCR}$$ mężczyźni

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = ABW \times (Albuminy + 22) / 0.87 \times SCR}$$ kobiety

W stosunku do osobników niedojrzałych z SCR < 5 mg/l Jelliffe przedstawił następujące równania:

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = [114 - (0.8 \times Wiek)] / SCR}$$ mężczyźni

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = 0.9 \times [114 - (0.8 \times Wiek)] / SCR}$$ kobiety

Dla dzieci do lat 16 zastosować można równanie Traub - Johnson'a.

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = (0.28 \times T \times BSA) / SCR}$$

T - wzrost
BSA - powierzchnia ciała

Precyzyjne obliczenia klirensu kreatyniny u dzieci gwarantuję także inne formuły (FDA, CDER, CBER 1998):

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = (0.45 \times T) / SCR}$$ poniżej jednego roku

$$\mathbf{Cl_{(cr)} = (0.55 \times T) / SCR}$$ od 1 do 12 lat

Wiedząc że klirens kreatyniny odpowiada wydolności procesu przesączania kłębkowego zaprezentowano wiele formuł pozwalających na wykonanie odpowiednich obliczeń:

$$\mathbf{GFR = 170 \times SCR^{-0.999} \times wiek^{-0.176} \times BUN^{-0.17} \times Albuminy^{0.318}}$$

$$\mathbf{GFR = 170 \times SCR^{-0.999} \times wiek^{-0.176} \times Y \times Z \times BUN^{-0.17} \times Albuminy^{0.318}}$$

$$\mathbf{GFR = 186 \times SCR^{-1.154} \times wiek^{-0.203} \times Y1 \times Z1}$$

BUN - azot mocznikowy we krwi (ang.: *Blood Urea Nitrogen*)
Z = 1.18 jeżeli dotyczy osoby rasy czarnej
Z = 1 jeżeli dotyczy osoby rasy białej
Y = 0.762 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 1 jeżeli dotyczy mężczyzny
Z1 = 1.212 jeżeli dotyczy osoby rasy czarnej

Z1 = 1 jeżeli dotyczy osoby rasy białej
Y1 = 0.742 jeżeli dotyczy kobiety
Y1 = 1 jeżeli dotyczy mężczyzny

Znane są także inne równania pozwalające na obliczenie GFR na podstawie stężenia kreatyniny w osoczu (Bostom A.G. i wsp 2002).

$$\mathbf{GFR = \{[(140 - wiek) \times BW] / (72 \times SCR)\} \times Y}$$

Y = 0.85 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 1 jeżeli dotyczy mężczyzny

$$\mathbf{GFR = \{[(98 - 0.8) \times (wiek - 20)] / SCR\} \times Y}$$

lY = 0.9 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 1 jeżeli dotyczy mężczyzny

$$\mathbf{GFR = Y / SCR - Z}$$

Y = 80 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 100 jeżeli dotyczy mężczyzny
Z = 7 jeżeli dotyczy kobiety
Z = 12 jeżeli dotyczy mężczyzny

$$\mathbf{GFR = \{BW \times [Y - (Z \times wiek)] \times [1 - (0.03 \times SCR)]\} / [(14.4 \times SCR) \times (70 / BW)]}$$

Y = 29.3 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 25.3 jeżeli dotyczy mężczyzny
Z = 0.203 jeżeli dotyczy kobiety
Z = 0.175 jeżeli dotyczy mężczyzny

$$\mathbf{GFR = \{[Y - (Z \times wiek)] \times BW \times 0.07\} / SCR}$$

Y = 25 jeżeli dotyczy kobiety
Y = 27 jeżeli dotyczy mężczyzny
Z = 0.175 jeżeli dotyczy kobiety
Z = 0.173 jeżeli dotyczy mężczyzny

$$\mathbf{GFR = (89.4 \times SCR^{-1.2}) + (55 - wiek) \times (0.447 \times SCR^{-1.1})} \quad \text{dla mężczyzn}$$

$$\mathbf{GFR = (60 \times SCR^{-1.1}) + (56 - wiek) \times (0.3 \times SCR^{-1.1})} \text{ dla kobiet}$$

Ponieważ klirens kreatyniny nie zawsze jest wystarczająco dokładnym wskaźnikiem opisującym GFR, poszukuje się nowych rozwiązań. Znana jest zależność między masą ciała a powierzchnią ciała oraz szybkością filtracji kłębkowej, ilustruje ją zależność:

$$\mathbf{BW^{0.75} = GFR = BSA^{0.65}}$$

Znalezienie markera który będzie mógł bezwzględnie i niezależnie od masy ciała wieku czy płci opisać dokładnie GFR nie jest łatwe. Obecnie duże nadzieje pokłada się w endogennej substancji - cystatynie C. Produkcja tego białka w organizmie jest stała i niezależna od płci wieku, masy ciała a nawet stanów gorączkowych, czy toczącego się w organizmie stanu zapalnego (Harmoinen A. 2001).

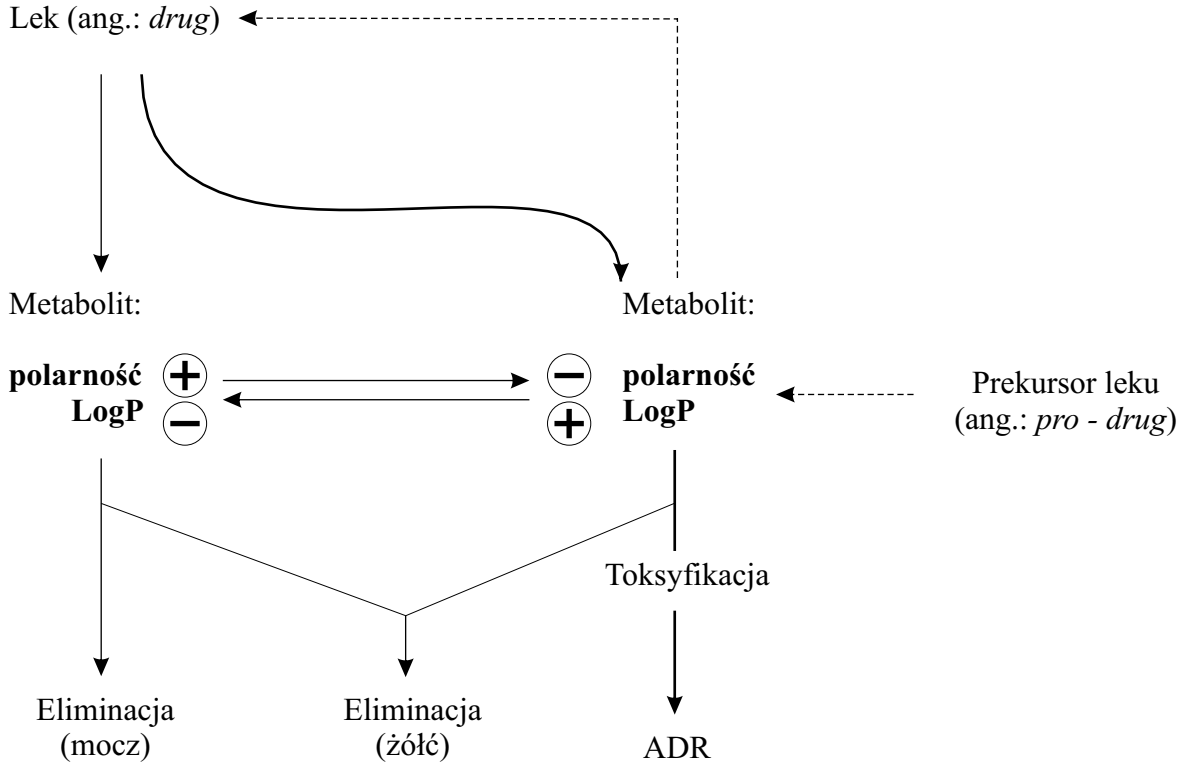
metformin	99,9	albuterol	46,0	metronidazole	10,0
amikacin	98,0	alendronate	45,0	phenylephrine	10,0
cefuroxime	96,0	felbamate	45,0	ropinirole	10,0
hydrochorothiazide	95,0	valacyclovir	44,0	nalmefene	9,6
oseltamivir	93,0	stavudine	43,1	mexiletine	9,0
lisinopril	92,0	flecainide	43,0	fentanyl	8,0
cephalexin	91,0	cefixime	41,0	hydralazine	8,0
gentamicin	90,0	topotecan	40,0	indinavir	8,0
pramipexole	90,0	tocainide	38,0	losartan	8,0
tobramycin	90,0	clarithromycin	36,0	dapsone	7,5
enalapril	88,0	didanosine	36,0	ketorolac	7,5
amoxicillin	87,0	etoposide	35,0	olanzapine	7,3
topiramate	85,0	hydroxyurea	35,0	doxorubicin	7,0
ceftazidime	84,0	ribavirin	35,0	morphine	7,0
gatifloxacin	83,0	valsartan	29,0	rifampin	7,0
methotrexate	81,0	rizatriptan	28,0	cyclophosphamide	6,5
cefazolin	80,0	ethosuximide	25,0	epirubicin	6,5
cefepime	80,0	fludarabine	24,0	hydromorphone	6,0
ethambutol	79,0	methadone	24,0	naproxen	5,5
vancomycin	79,0	phenobarbital	24,0	carbidopa	5,3
carboplatin	77,0	chlorpropamide	22,0	delavirdine	5,0
acyclovir	75,0	mercaptopurine	22,0	fluvoxamine	5,0
amantadine	75,0	sumatriptan	22,0	glipizide	5,0
fluconazole	75,0	moxifloxacin	21,9	idarubicin	5,0
pseudoephedrine	75,0	alprazolam	20,0	isosorbide 5-mononitrate	5,0
ganciclovir	73,0	metoclopramide	20,0	ondansetron	5,0
furosemide	71,0	quinine	20,0	paclitaxel	5,0
cetirizine	70,9	quinidine	18,0	methylprednisolone	4,9
cidofovir	70,1	theophylline	18,0	venlafaxine	4,6
lamivudine	70,0	zidovudine	18,0	diltiazem	4,0
levofloxacin	70,0	nicotine	17,0	nalbuphine	4,0
baclofen	69,0	irinotecan	16,7	prazosin	4,0
imipenem	69,0	granisetron	16,0	letrozole	3,9
ranitidine	69,0	quinupristin	15,1	modafinil	3,7
bleomycin	68,0	betaxolol	15,0	ritonavir	3,5
cefotetan	67,0	chlorpheniramine	15,0	abacavir	3,0
chlorthalidone	67,0	indomethacine	15,0	acetaminophen	3,0
neostigmine	67,0	isoniazid	15,0	amphotericin b	3,0
pancuronium	67,0	vincristine	15,0	capecitabine	3,0
procainamide	67,0	rifabutine	14,0	celecoxib	3,0
gabapentin	66,0	sulfamethoxazole	14,0	ethanol	3,0
levetiracetam	66,0	clindamycin	13,0	fluoxetine	3,0
bumetanide	65,0	Dextromethorphan	13,0	prednisone	3,0
zalcitabine	65,0	hydrocodone	13,0	risperidone	3,0
ofloxacin	64,0	tamsulosin	13,0	verapamil	3,0
trimethoprim	63,0	allopurinol	12,0	thiotepa	2,5
cimetidine	62,0	azithromycin	12,0	cisplatin	2,3
clonidine	62,0	erythromycin	12,0	irbesartan	2,2
dicloxacillin	60,0	fexofenadine	12,0	docetaxel	2,1
digoxin	60,0	melphalan	12,0	amitriptylline	2,0
atropine	57,0	zolmitriptan	12,0	atorvastatin	2,0
cefotaxime	55,0	cytarabine	11,0	azathioprine	2,0
chloroquine	55,0	minocycline	11,0	bromocriptine	2,0
disopyramide	55,0	clofibrate	10,8	bupivacaine	2,0
dalfopristin	53,0	donepezil	10,6	carvedilol	2,0
candesartan	52,0	citalopram	10,5	cocaine	2,0
dofetilide	52,0	5-fluorouracil	10,0	flurbiprofen	2,0
triamterene	52,0	amlodipine	10,0	imipramine	2,0
amiloride	50,0	anastrozole	10,0	lidocaine	2,0
ceftriaxone	50,0	benazepril	10,0	nortriptyline	2,0
ciprofloxacin	50,0	gemcitabine	10,0	paroxetine	2,0
naratriptan	50,0	lamotrigine	10,0	phenytoin	2,0
sulfisoxazole	49,0	lovastatin	10,0	triazolam	2,0
nitrofurantoin	47,0	meperidine	10,0	warfarin	2,0
pravastatin	47,0	metoprolol	10,0		

butorphanol	1,9	felodipine	1,0	tacrolimus	1,0
diphenhydramine	1,9	finasteride	1,0	tamoxifen	1,0
valproic acid	1,8	flutamide	1,0	thalidomide	1,0
bicalutamide	1,7	gemfibrozil	1,0	thiopental	1,0
methylphenidate	1,5	haloperidol	1,0	tolcapone	1,0
nelfinavir	1,5	ibuprofen	1,0	trazodone	1,0
tiagabine	1,5	isosorbide dinitrate	1,0	zaleplon	1,0
acetylsalicylic acid	1,4	itraconazole	1,0	zolpidem	1,0
mebendazole	1,1	ivermectin	1,0	glimepiride	0,5
alfentanil	1,0	ketoconazole	1,0	propanolol	0,5
atovaquone	1,0	lansoprazole	1,0	zileuton	0,5
bupropion	1,0	levodopa	1,0	repaglinide	0,3
busulfan	1,0	lorazepam	1,0	montelukast	0,2
carbamazepine	1,0	mefloauine	1,0	raloxifene	0,2
chlorambucil	1,0	midazolam	1,0	buspirone	0,1
chlorpromazine	1,0	misoprostol	1,0	calcitriol	0,1
cisapride	1,0	nabumetone	1,0	tolbutamide	0,1
clonazepam	1,0	nicardipine	1,0	nevirapine	0,0
clorazepate	1,0	nitroglycerin	1,0	quetiapine	0,0
clozapine	1,0	omeprazole	1,0	amiodarone	0,0
cyclosporin	1,0	oxcarbazepine	1,0	doxepin	0,0
diazepam	1,0	oxybutynin	1,0	isradipine	0,0
diclofenac	1,0	pimozide	1,0	nifedipine	0,0
efavirenz	1,0	rofecoxib	1,0		
esmolol	1,0	sertraline	1,0		

Rys. Przybliżone wartości frakcji leku wydalanej wraz z moczem w procentach.

Efekt pierwszego przejścia, klirens wątrobowy

Efekt pierwszego przejścia (ang.: *First Pass Effect*; niem.: *Erste Leberpassage*, *Effekt der Ersten Passage*) jest to efekt niskiego stężenia leku we krwi spowodowany szybkim metabolizowaniem dużej części leku w obrębie wątroby w krótkim czasie po podaniu. Czasami bywa określany mianem eliminacji metabolicznej. Niektóre leki metabolizowane są w dużym stopniu przez enzymy mikrosomalne wątroby. Stężenie tych leków po wchłonięciu do krwi szybko spada. Jeżeli nie są to leki typu pro-drug, ich skuteczność jest niska z uwagi na przemianę do najczęściej nieaktywnych metabolitów. Główny cel zmian metabolicznych to przeprowadzenie leku do zwykle mniej lipofilnych i bardziej polarnych metabolitów. Wyjątkami od tej reguły są procesy prowadzące do powstania silnie lipofilnych metabolitów zwykle o większej aktywności od związku macierzystego. Przykładem procesu metabolicznego pierwszej fazy który prowadzi zawsze do wzrostu lipofilności związku jest dekarboksylacja. Przykładem typowej reakcji koniugacji w procesach drugiej fazy jest koniugacja z kwasem glukuronowym. Koniugacja z kwasem glukuronowym najczęściej zwiększa polarność związku wyjściowego i znacznie obniża jego lipofilność. Dla niektórych związków część procesów metabolicznych prowadzi do wzrostu aktywności i lipofilności produktów przemian metabolicznych. W przypadku leków typu *pro-drug* jest to pożądany kierunek przemian. W wypadku innych związków produkty reakcji mogą być silnie toksyczne dla organizmu ponieważ w wyniku zmian budowy chemicznej związku dochodzi do jego toksyfikacji.

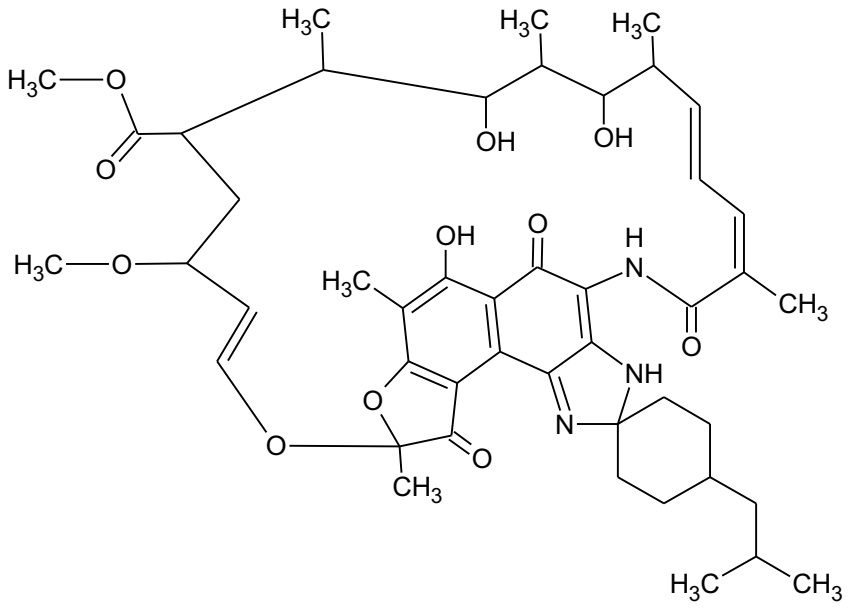


Ryc. Główne kierunki zmian polarności i lipofilności w procesach metabolicznych pierwszej i drugiej fazy.

Przykładem leku którego kierunek zmian struktury w procesach metabolicznych dotyczy między innymi spadku lipofilności jest werapamil (Pauli-Magnus C. i wsp. 2000).

			CLogP	
lek:		werapamil	4.46	
				metabolizm Faza I
metabolity:	6%	norwerapamil	3.93	N - demetylacja
	7%	D-703	3.99	demetylacja + redukcja
	22%	D-617	1.69	N - dealkilacja
	4%	D-620	1.55	N - dealkilacja + demetylacja

Werapamil jest lekiem który ulega głównie procesom metabolicznym pierwszej fazy. Metabolizm cząsteczek niektórych leków polega na rozrywaniu ich pierwotnych struktur co prowadzi do powstania wielu metabolitów często silnie lipofilnych i słabo polarnych. Przykładem takiego leku jest ryfabutyna której część metabolitów jest bardziej lipofilna od związku macierzystego (Utkin I. i wsp. 1997).



Ryc. Ryfabutyna.

	LogKOWIN	CLogP
Metabolit B	9.87	8.11
Metabolit E	9.31	n.d.
Metabolit A	9.34	7.59
Metabolit C	8.53	n.d.
Ryfabutyna	8.50	6.88
Metabolit D	8.26	n.d.
Metabolit F	6.70	5.61
Metabolit G	4.12	4.67

Ilość leku jaka zostaje poddana procesom metabolicznym w wątrobie można obliczyć i przedstawić w formie tzw. współczynnika ekstrakcji ER (ang.: *Extraction Ratio*). Współczynnik ten przyjmuje wartości od 0 do 1. Wartość 1 oznacza że 100% leku poddane zostało procesom metabolicznym w tkance wątrobowej. Jego wartość dla leków o wysokim współczynniku ER zależna jest głównie od przepływu krwi przez wątrobę - Q(h), oraz od wartości klirensu wątrobowego. Dla leków o niskich wartościach ER współczynnik ten w głównej mierze zależny jest od wiązania leku z białkami (fb) i sprawności mechanizmów enzymatycznych wątroby (Gibaldi M., Perrier D. 1982). Wszystkie substancje lecznicze ogólnie dzieli się na związki o małym średnim i dużym współczynniku ekstrakcji. ER dla wybranego organu lub tkanki można obliczyć korzystając z formuły:

$$\mathbf{ER = (C_{in} - C_{out}) / C_{in}}$$

Cin - stężenie leku dostarczanego z krwią do organu
Cout - stężenie leku po przejściu przez organ

dla wątroby

$$\mathbf{ER = Cl_{(h)} / Q_{(h)}}$$

lub

$$\mathbf{ER = Cl_{(int)} / Q_{(h)} + Cl_{(int)}}$$

Q(h) - przepływ krwi przez wątrobę
Cl(int) - klirens wewnętrzny wątroby

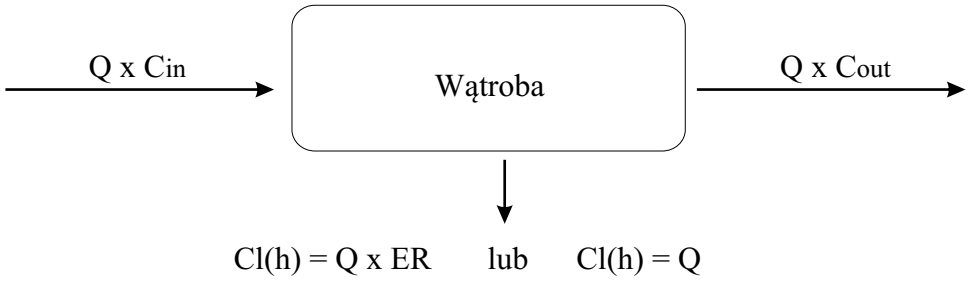
Stąd dla każdego organu jego klirens wyraża się jako:

$$\mathbf{Cl_{(org)} = Q \times ER}$$

Q - przepływ krwi przez organ

Zależność między przepływem wątrobowym a klirensem całkowitym ilustrowaną wartością współczynnika ekstrakcji obliczmy korzystając z formuły:

$$\mathbf{ER = Cl_{(b)} / Q_{(h)}}$$



Rys. Zależność między współczynnikiem ekstrakcji a przepływem i wartością klirensu

Znaczenie wartości współczynnika ekstrakcji jest bardzo duże w obliczeniach dotyczących wartości dostępności biologicznej leku. Dla donaczyniowego podania leku wartość dostępności biologicznej przyjmowana jest jako równa 1. Dla przypadku w którym podany lek trafia do krążenia organu eliminującego jakim jest wątroba, wartość ta pomniejszona jest o współczynnik ekstrakcji - ER.

$$\mathbf{F = 1 - ER}$$

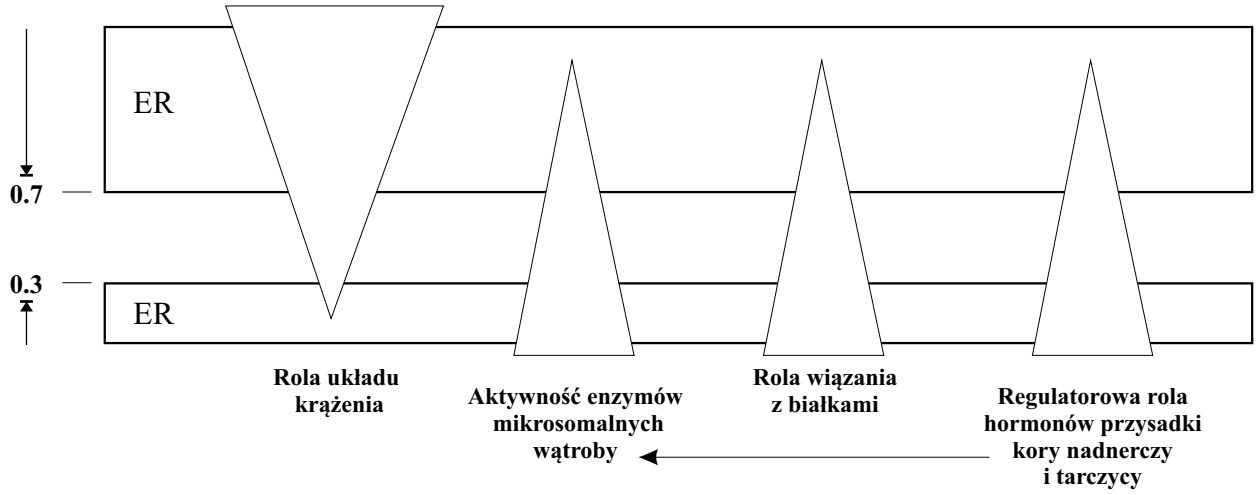
F - dostępność biologiczna leku

Konsekwencją wzoru są zależności:

$$\mathbf{Cl_{(h)} = D_{i.v.} / AUC_{i.v.}}$$

$$\mathbf{Cl_{(h)} = (F \times D_{p.o.}) / AUC_{p.o.}}$$

Dlatego też przyjąć można że dla leków których klirens wewnętrzny jest wielokrotnie mniejszy od wartości przepływu krwi przez wątrobę spełniona jest reguła - Cl(b) = Cl(int). W takich wypadkach wartość klirensu leku jest wskaźnikiem aktywności enzymów mikrosomalnych wątroby. Ponieważ klirens całkowity w przybliżeniu równy jest klirensowi wewnętrznemu wątroby.
Dla leków dla których klirens wewnętrzny jest znacznie większy od wartości przepływu krwi przez wątrobę wartość klirensu całkowitego w znacznie mniejszym stopniu zależna jest od wiązania leku z białkami.



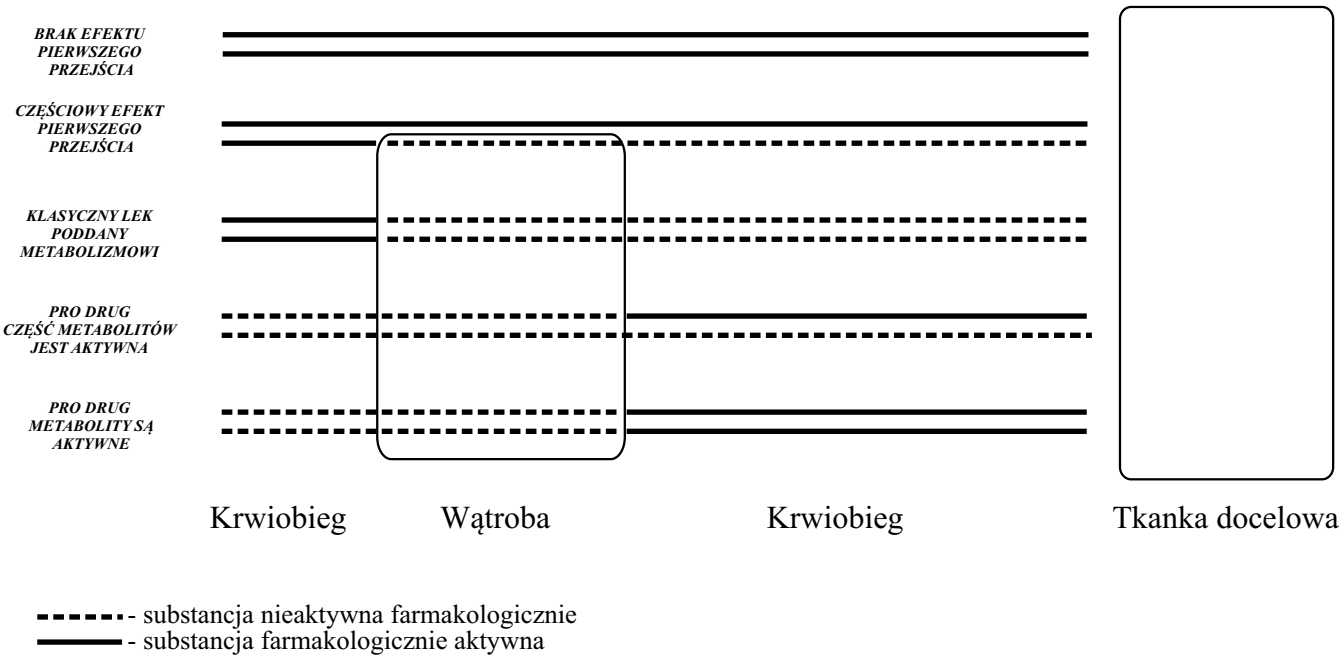
Rys. Mechanizmy fizjologiczne warunkujące charakter efektu pierwszego przejścia dla leków o różnym współczynniku ekstrakcji - ER.

Stąd także:

$$\mathbf{F = Q_{(h)} / Q_{(h)} + Cl_{(int)}}$$

$$\mathbf{F = 1 - (Cl_{(b)} / Q_{(h)})}$$

Tak więc można przyjąć że wraz ze wzrostem współczynnika ekstrakcji maleje dostępność biologiczna leku. Zaś w przypadku leków o znacznej wartości ER wartość dostępności biologicznej jest zależna od przepływu krwi przez wątrobę.



Rys. Zmiany stężenia leku w osoczu w wyniku metabolizmu wątrobowego.

Jeżeli **ER > 0.7** oraz **fu x Cl(int) > Q(h)** to **Cl(b)=Q(h)**

Natomiast dla podania donaczyniowego wartość pola powierzchni pod krzywą zależna jest od przepływu krwi przez wątrobę:

$$AUC_{(fu+fb)} = D / Q_{(h)}$$

$$AUC_{(fu)} = (D \times f_{(b)}) / Q_{(h)}$$

Jeżeli **ER < 0.3** oraz **fu x Cl(int) < Q(h)** to **Cl(b)= fb x Cl(int)**

Także dla podania naczyniowego dla powyższej zależności spełnione są równania:

$$AUC_{(fu+fb)} = D / (f_{(b)} \times Cl_{(int,h)})$$

$$AUC_{(fu)} = D / Cl_{(int,h)}$$

Równania te spełnione są także dla doustnej drogi podania leku (Ito K. i wsp. 1998). Znając wartość przepływu krwi przez *vena portae* można obliczyć wartość leku zaabsorbowanego z przewodu pokarmowego korzystając z równania (Iwatsubo T. i wsp. 1997):

$$F = Q_{(vp)} \times P_{(B/P)} \times [AUC_{(vp)} / AUC_{(a)}] / D$$

Q(vp) - przepływ przez żyłę wrotną
P(B/P) - współczynnik rozdziału krew / osocze
AUC(vp) - pole powierzchni pod krzywą dla stężenia leku w żyle wrotnej
AUC(a) - pole powierzchni pod krzywą dla stężenia leku w krwi tętniczej

Ilość leku jaka została poddana procesom metabolicznym - fm (ang.: *Fraction Metabolised;* MR - *Metabolic Ratio*) obliczyć można porównując wartość pól powierzchni krzywych C-T leku i metabolitów (Riviere J.E. 1999).

$$\mathbf{fm = AUC_{(leku)} / AUC_{(met)}}$$

Klirens wątrobowy jest wypadkową klirensu wewnętrznego - Cl(int) (ang.: *Intrinsic Clearance*) i wartości przepływu krwi przez ten organ.

$$\mathbf{Cl_{(h)} = Q_{(h)} / [Cl_{(int)} / (Q_{(h)} + Cl_{(int)})]}$$

gdzie:

$$\mathbf{ER = Cl_{(int)} / (Q_{(h)} + Cl_{(int)})}$$

Klirens wątrobowy jest składową klirensu całkowitego - klirensu ciała Cl(b). Stosunek klirensu wątrobowego do klirensu całkowitego opisać można wzorem:

$$\mathbf{Cl_{(h)} = fm \times Cl_{(b)}}$$

fm - frakcja poddana reakcjom metabolicznym w wątrobie

Z kolei klirens wewnętrzny może zostać scharakteryzowany jako składowa procesów metabolizmu, oczyszczania innymi ścieżkami oraz frakcji leku niezwiązanego z białkami krwi.

$$\mathbf{Cl_{(int)} = (fm \times Cl_{(b)}) / fu}$$

dla ER < 0.3
fu > 30 %

fu - frakcja niezwiązana z białkami

Lub

$$\mathbf{Cl_{(int)} = (fm \times Cl_{(b)}) / [fu \times (1 - ER)]}$$

dla ER > 0.3

fu - frakcja niezwiązana z białkami

Dla prostych reakcji biotransformacji w ramach procesów pierwszego rzędu w modelu jednokompartmentowym dla podania donaczyniowego wartość klirensu wewnętrznego wątroby równa jest:

$$\mathbf{Cl_{(int)} = LW \times (\beta + Co)}$$

β - stała szybkości eliminacji
LW - masa wątroby (ang.: *Liver Weight*)
Co - stężenie początkowe

Stosunek kliresnu wątrobowego do wartości dostępności biologicznej oraz klirensu nerkowego i klirensu po podaniu doustnym wyraża równanie (Iwatsubo T. i wsp. 1997):

$$\mathbf{CL_{(h)} = [Cl_{(oral)} \times F - Cl_{(r)}] / [1 + Cl_{(oral)} \times F / Q_{(h)}]}$$

F - procent leku wchłonięty z przewodu pokarmowego
Cl(oral) - klirens totalny z uwzględnieniem wartości dostępności biologicznej
Cl(r) - klirens nerkowy
Q(h) - przepływ krwi przez wątrobę

Zaistnienie efektu pierwszego przejścia w pełnym wymiarze zależne jest od tego czy dojdzie do transportu leku przez wątrobę i czy lek ulega procesom metabolicznym.

Jest więc w znacznej mierze zależny od tego które z części krwioobiegu uczestniczą w jego dystrybucji. Najmniejszy efekt pierwszego przejścia uwidoczni się po podaniu do tętnic, większy po podaniu do łożyska żylnego, jeszcze większy nastąpiłby po podaniu do żyły wątrobowej, oraz po podaniu doustnym. Osiąganie przez lek zlewiska krwi trafiającej do wątroby jest zależne również od rodzaju przeprowadzanej terapii i sposobu podania leku. Stąd w przypadku podania do gałki ocznej, do rdzenia kręgowego czy stosowana transdermalnego systemu terapeutycznego, lub iniekcji podskórnej efekt pierwszego przejścia będzie bardzo niewielki lub żaden. Dla leków ulegających w wątrobie biotransformacji lub podlegających recyrkulacji (redystrybucji) wątrobowej i przechodzących wraz z krwią przez wątrobę ważna jest znajomość klirensu wątrobowego - metabolicznego wątroby Cl(h).

Klirens wewnętrzny wątroby w warunkach *in vitro*

Obliczenia klirensu wewnętrznego wątroby w warunkach *in vitro* należy do standardowych metod wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym. Stanowi jeden z wielu etapów optymalizacji, skalowania i korygowania kinetyki przyszłego leku jeszcze w fazie badań przedklinicznych. Kalkulację klirensu *in vitro* opisać można zależnością:

$$\mathbf{Cl = K_{(met)} / fu}$$

K(met) - stała szybkości procesów metabolicznych jakim ulega substancja
fu - wolna frakcja dostępna układom enzymatycznym

Zależność między klirensem wątroby a klirensem wewnętrznym opisuje formuła (Austin R.P. i wsp 2002):

$$\mathbf{Cl = [(Q \times A \times B \times fup \times Cl_{(int)}) / fu_{(inc)}] / [Q + (A \times B \times fup \times Cl_{(int)}) / fu_{(inc)}]}$$

Cl - klirens wątroby
Cl(int) - klirens wewnętrzny
Q - przepływ krwi przez wątrobę
fup - frakcja leku niezwiązana z białkami osocza
fu(inc) - frakcja leku niezwiązana z białkami osocza poddana inkubacji
A - stała (ilość miligramów mikrosomów na 1 gram tkanki wątrobowej)
B - stała (ilość gramów tkanki wątrobowej na 1 kg masy ciała)

Na podstawie analizy SAR grupy leków opisano korelację między frakcją leku niezwiązaną z białkami osocza a poddaną inkubacji i niektórymi parametrami fizjochemicznymi wybranych leków (Austin R.P. i wsp 2002).

- dla leków o charakterze zasadowym i pKa > 7.4:

$$\mathbf{fu_{(inc)} = 1 / [C \times 10^{0.56LogP - 1.41} + 1]}$$

- dla leków o charakterze kwaśnym lub obojętnym i pKa < 7.4:

$$\mathbf{fu_{(inc)} = 1 / [C \times 10^{0.56LogD - 1.41} + 1]}$$

C - stężenie białek mikrosomalnych mg/ml
LogP - współczynnik rozdziału oktanol/woda
LogD - współczynnik rozdziału oktanol/woda dla pH 7.4

Jako współczynnik korekcyjny w równaniu na obliczanie klirensu wewnętrznego Cl(int) wątroby można użyć współczynnika obliczanego na podstawie informacji o wątrobie z jakiej izolowano hepatocyty. Istotną w tym wypadku informacją jest ilość hepatocytów przypadająca na 1 g tkanki organu czyli gęstość tkanki - D (ang.: *Density*), (Shibata Y. i wsp. 2000). Klirens wewnętrzny na hodowlach komórkowych określa się utrzymując hodowlę na standardowych płynach (William's - E) lub osoczu.

Stąd: **SF = LW x D**

SF - współczynnik korekcyjny (ang.: *Scaling Fctor*)
LW - masa wątroby (ang.: *Liver Weight*)
D - gęstość

$Cl_{(int.H.u)WE} = Cl_{(int.u)WE}$ x SF **$Cl_{(int.H)P} = Cl_{(int)P}$ x SF**

lub

$Cl_{(int.H)WE} = Cl_{(int.H.u)WE}$ x fu

Cl(int.H.u)WE -klirens wewnętrzny frakcji niezwiązanej hepatocytów w medium Williams - E
Cl(int.H)P -klirens wewnętrzny hepatocytów w osoczu
Cl(int.u)WE -klirens wewnętrzny hepatocytów w medium Williams - E
Cl(int)P -klirens wewnętrzny w osoczu
fu- frakcja wolna

Obach i współpracownicy zaproponowali następujące równanie na wiążące wartość klirensu wewnętrznego i okresu półtrwania w warunkach *in vitro* (Obach R.S. i wsp. 1999).

$Cl_{(int)} = (0.693 / t_{1/2})$ x (V / M) x (45 mg M / L) x (20g L / BW)

V - objętość poddana inkubacji
M - białka mikrosomalne (mg)
L - wątroba (g)
BW - masa ciała

Proponowane współczynniki korekcyjne stosowane w równaniu obejmują (Iwatsubo T. i wsp. 1997; Bachmann K.A., Ghosh R. 2001):

- 0.14 nmol P450 / 10^6 komórek
- 120 x 10^6 komórek / gram wątroby
- 0.32 nmol P450 / mg białek mikrosomalnych
- 45 do 52.5 mg białek mikrosomalnych / gram wątroby

Klirens określany w warunkach *in vitro* może stanowić podstawy do skalowania jego wartości na klirens *in vivo* pomiędzy gatunkami. Wykorzystuje się w tym celu współczynnik korekcyjny - SF (ang.: *Scaling Factor*) dla danego gatunku równy stosunkowi:

$SF = Cl_{(int,in\ vivo)} / Cl_{(int,\ in\ vitro)}$

Wykazano bowiem że dla tej samej substancji współczynnik ten w obrębie różnych gatunków może mieć zbliżoną wartość (Naritomi Y. i wsp. 2001). Stąd wartość klirensu *in vivo* dla danego gatunku obliczyć można korzystając z współczynników korekcyjnych opisanych dla innych gatunków.

$Cl_{(int,\ in\ vivo)} = Cl_{(int,\ in\ vitro)}$ x SF

Techniki *in vitro* pozwalają na skalowanie klirensu wewnętrznego obliczonego dla warunków *in vitro* do klirensu totalnego w warunkach *in vivo*. Schematyczne równanie dla tego typu obliczeń ujmuje równanie (Bachmann K.A., Ghosh R. 2001):

Cl(int) = L x V x 45

L - ilość gramów tkanki wątrobowej / kilogram masy ciała
V - objętość poddana inkubacji w ml / mg białek mikrosomalnych
45 - mg białek mikrosomalnych / gram wątroby

Skalowanie wartości klirensu wewnętrznego wątroby pomiędzy gatunkami wymaga proporcjonalnego zastosowania materiału biologicznego w badaniach. Proporcje ilości tkanek wynikają z różnic na poziomie histologii cytofizjologii i biochemii komórek (Rettie A.E. i wsp. 1988; Chaturvedi P.R. i wsp. 2001; Nebbia C. i wsp. 2001; Craigmill A.L., Cortright K.A. 2004).

	mysz	szczur	królik	człowiek	pies
1.	-	0.27	-	0.14	-
2.	0.72	0.66-0.82	0.94	0.32-0.38	-
3.	-	125-181	-	65-185	240
4.	-	44.8-49.7	7.8	48.8	77.9

koń	świnia	owca	krowa	koza
-	-	-	-	-
0.5	0.58	0.32	0.53	0.6
-	10	-	-	-
-	7.4	12.7	9.6	9.1

kaczka	indyk	kura	gęś	przepiórka
-	-	-	-	-
0.18	0.36	0.16-0.26	0.28	0.16
-	-	-	-	-
2.01	2.54	1.88	1.98	22.9

1. Ilość P450 w hepatocytach (nmol / 10^6 hepatocytów)
2. Ilość P450 w mikrosomach (nmol / mg białka)
3. Liczba hepatocytów w wątrobie (komórek / g wątroby x $10^{6)}$
4. Masa białek mikrosomalnych w watrobie (mg białka / g wątroby)

Zmiany parametrów farmakokinetycznych w chorobach wątroby

Wątroba jest kluczowym narządem odpowiadającym za detoksykację i metabolizm większości leków. Jej sprawność znacznie wpływa na zmiany parametrów farmakokinetycznych szczególnie w przypadku gdy lek podlega częściowemu lub całkowitemu metabolizmowi w wątrobie. Ważnym problemem jest w tym wypadku rola wiązania leku z białkami szczególnie dla leków o małym stopniu ekstrakcji. Okazuje się bowiem że niektóre leki związane z białkami mogą ulegać dysocjacji i trafiać do hepatocytów (Horie T. i wsp. 1988).

W przypadku proleków których metabolizm warunkuje powstanie aktywnych farmakologicznie związków część parametrów farmakokinetycznych zmieni się na niekorzyść substancji leczniczej w przypadku upośledzenia funkcji narządu. Szczególnie trudnymi zagadnieniami dotyczącymi modyfikacji parametrów kinetycznych są także zmiany w funkcji produkcji żółci oraz jej wydzielania do światła jelita.

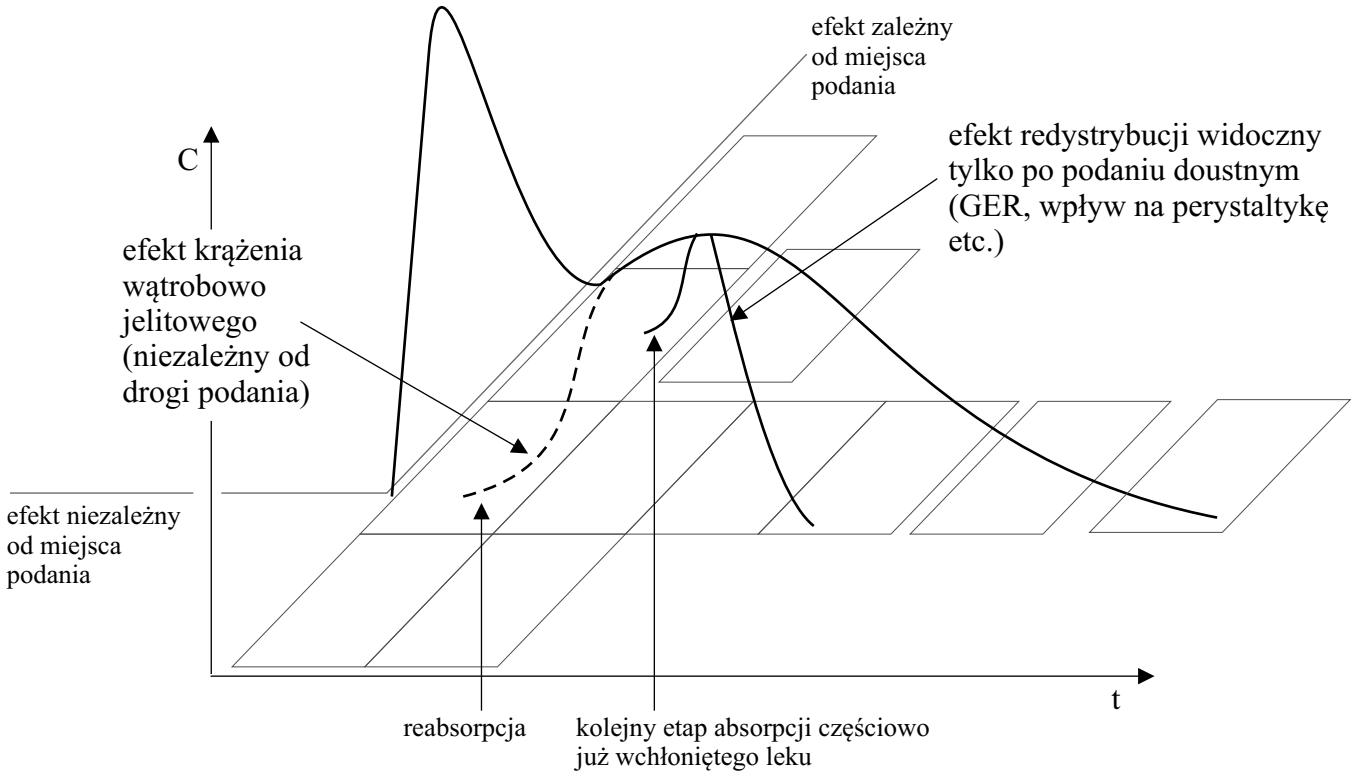
Dla leków podlegających efektowi pierwszego przejścia brak w pełni sprawnych szlaków metabolicznych jakim lek podlega w wątrobie powoduje wzrost stężenia leku aktywnego we krwi.
Zmiany te ilustrować będą między innymi rosnące pole powierzchni pod krzywą i większa wartość dostępności biologicznej leku. Takie zaburzenia metaboliczne prowadzić mogą do wytworzenia sytuacji w której lek osiąga stężenia toksyczne i stwarza zagrożenie dla makroorganizmu. Metabolizm leku może zostać zmieniony także wskutek wzbudzenia i podniesienia aktywności szlaków metabolicznych odpowiadających za przemiany danej substancji leczniczej. Wzrasta stała szybkości która ilustruje ilość powstałych metabolitów. Lek często nie osiąga stężenia efektywnego a skutek farmakologiczny jest niezauważalny. Drogą do częściowego lub całkowitego wykluczenia tego rodzaju niebezpieczeństw jest zmiana drogi podania leku lub zmiana postaci leku. Nie tylko sprawność wątroby jako centrum metabolicznego warunkuje typowy obraz kinetyki leku.
Wątroba jest organem którego masę w znacznej części stanowi krew. Przepływ krwi przez wątrobę na prawidłowym poziomie jest jednym z warunków kontroli nad kinetyką leku. Dla leków łatwo poddających się procesom metabolicznym o dużym współczynniku ekstrakcji klirens całkowity może być zależny od wartości przepływu krwi przez wątrobę. Złożoność odczytu danych farmakokinetycznych w stanach patologii wątroby nie zawsze gwarantuje uzyskanie jednoznacznych wniosków. Kinetyka leku jest wtedy wypadkową procesów zmieniających przepływ krwi, produkcję żółci i czynności enzymatycznej tego organu. Schorzenia wątroby z punktu widzenia ich wpływu na kinetykę leku można podzielić na trzy grupy:

- niedrożność przewodów i dróg żółciowych
- uszkodzenia wątroby
- marskość wątroby

Zmiany parametrów farmakokinetycznych na które najczęściej składa się w tym wypadku kilka czynników można również interpretować podając zieleń indocyjanową o znanej wartości klirensu.

Krążenie wątrobowo - jelitowe

Krążenie wątrobowo jelitowe leków jest zjawiskiem obserwowanym głównie dla leków lipofilnych o niezbyt dużej masie cząsteczkowej (MW < 600 D). Dla niektórych grup leków wykazano że wydzielanie wraz z żółcią rośnie ze wzrostem masy cząsteczkowej. Cholefil jest substancją wskaźnikową dla tego typu dystrybucji leku. Stosunek stężenia w żółci do stężenia w osoczu cholefilu jest równy 1. Nadal jednak trudno stwierdzić jakie dokładnie leki predysponowane są do tego rodzaju redystrybucji. Zjawisko redystrybucji polega w tym wypadku na tym że lek po wchłonięciu do krwioobiegu i osiągnięciu narządu jakim jest wątroba, trafia do żółci. W woreczku żółciowym może znajdować się w postaci wolnej nie poddanej procesom biotransformacji jak i postaci koniugatów. Wiadomo że koniugaty leków zwykle są bardziej polarne od nich samych. Z woreczka żółciowego wraz z żółcią lek lu koniugaty trafiają z powrotem do światła przewodu pokarmowego. W przypadku niektórych leków potwierdzono dodatkowo fakt dekoniugacji w świetle przewodu pokarmowego przez enzymy bakteryjne leku zmetabolizowanego wcześniej w wątrobie (Roberts M.S. i wsp. 2002). Szybkość wchłaniania wielu leków podanych *per os* jest zależna od obecności kwasów lub soli kwasów żółciowych w treści pokarmowej. Stąd w przypadku niektórych leków poprawa charakterystyki fazy wchłaniania w wyniku wydzielania ich do światła przewodu pokarmowego wraz z żółcią, co może manifestować się bardzo wyraźną krzywą redystrybucyjną (Bowe C.L. i wsp. 1997). Zarówno proces wchłaniania leku przez ścianę jelita, jak i jego metabolizm, oraz transport do pęcherzyka żółciowego są procesami stereoselektywnymi. Punktem zwrotnym w szacowaniu puli leku nie poddanego procesom metabolizmu, jaki wchłonięty został z przewodu pokarmowego jest również metabolizm leku w obrębie jelit. Tak więc śledzenie kinetyki procesów redystrybucji w cyklu wątrobowo jelitowym przysparza wielu trudności. Obraz krzywych C-T po jednorazowym podaniu leku do przewodu pokarmowego jest zaburzony. Szczególnie w fazie eliminacji. Łatwo zauważalne jest charakterystyczne "siodełko" - nasuwające wniosek o zatrzymaniu procesów eliminacji lub wręcz kolejny wzrost stężenia leku we krwi. Wzrost stężenia przypomina efekt jaki można uzyskać podając kolejną dawkę leku.



Rys. Redystrybucja, reabsorpcja i zmiany stężenia leku we krwi.

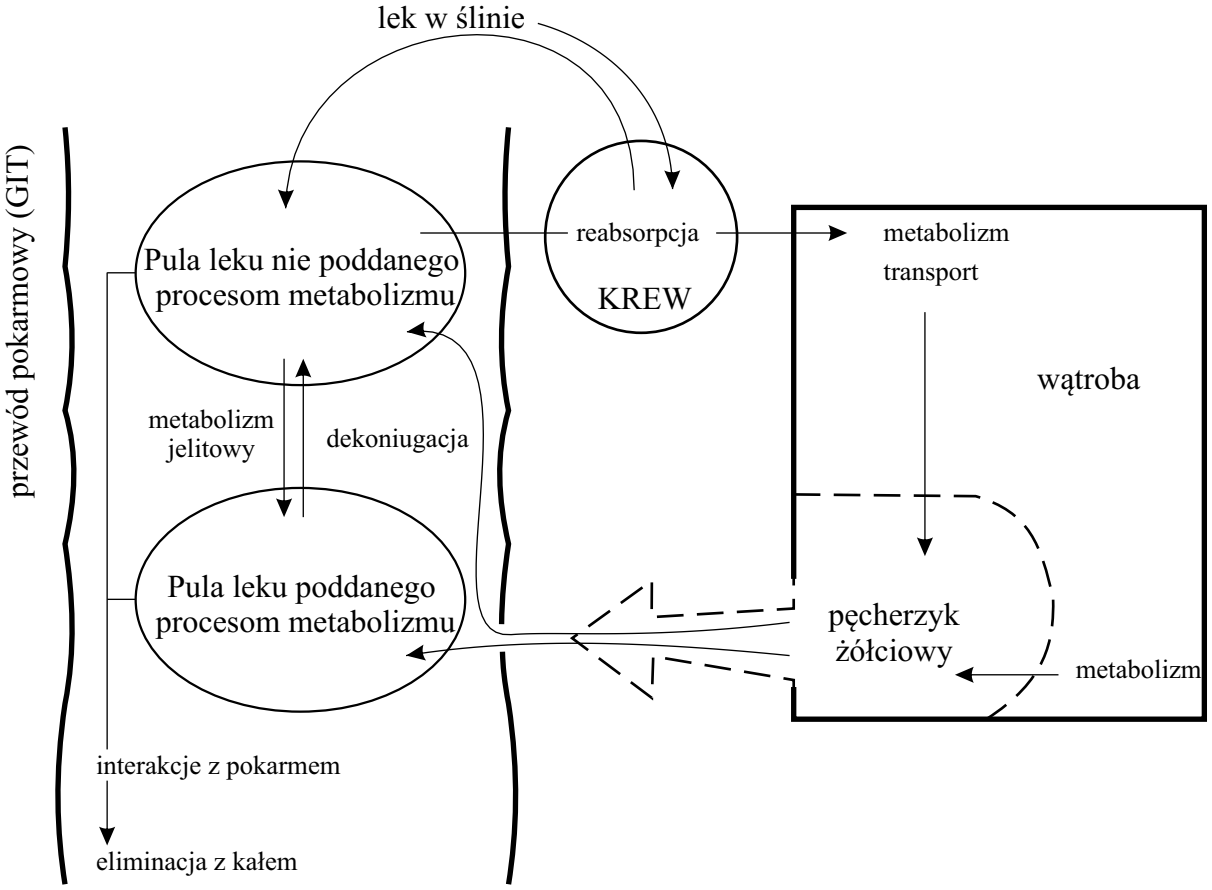
W niektórych wypadkach, po jednorazowym podaniu leku *per os* ilość kolejnych punktów narastającego stężenia może być większa od jednego. Niejednokrotnie duży wpływ na ten proces ma stymulacja wyrzutu żółci podaniem pokarmu. Jednak przyczyną "podwójnego" Cmax w krzywej C-T może być również:

- wpływ leku na motorykę przewodu pokarmowego
- wpływ leku na GER
- okienka wchłaniania w przewodzie pokarmowym

Opis matematyczny lub statystyczny procesu jest złożony. Przyjmując że dla jednej dawki cykl zaistnieje tylko raz należy zmodyfikować lub powielić co najmniej kilka typowych parametrów farmakokinetycznych. Można więc mówić o dwóch czasach opóźnienia wchłaniania. Pierwszy typowy dla opisu wchłaniania po podaniu doustnym, drugi od momentu zaistnienia w przewodzie pokarmowym leku pochodzącego z woreczka żółciowego. Ta druga dawka składa się jednak także z leku poddanego procesom metabolizmu i jednocześnie dekoniugacji w przewodzie pokarmowym.

$$\mathbf{D_{(GIT)} = [D_{(p.o.)} - D_{(GWM)}] + [D_{(g)} - D_{(gm)} + D_{(gm;d)}]}$$

D(GIT) - całkowita dawka leku wchłonięta z przewodu pokarmowego w jednym cyklu enterohepatycznym
D(p.o.) - dawka leku podana doustnie
D(GWM) - część dawki leku podanej doustnie poddana procesom metabolizmu w obrębie jelit
D(g) - dawka leku nie poddana metabolizmowi jaka trafia z woreczka żółciowego do jelit
D(gm) - dawka leku poddanego metabolizmowi jaka trafia z woreczka żółciowego do jelit
D(gm;d) - dawka leku poddanego metabolizmowi następnie dekoniugacji trafiająca z woreczka żółciowego do jelit



Rys. Cykl krążenia leku pomiędzy strukturami wątroby, pęcherzyka żółciowego i przewodu pokarmowego.

Cykl enterohepatyczny opisano zarówno u zwierząt jak i człowieka dla co najmniej kilkudziesięciu różnych leków. Znany jest fakt jego występowania ale także modyfikowanie go różnymi czynnikami. Znane są czynniki zwiększające efekt reabsorpcji i redystrybucji. Efekt ten manifestujący się w obrazie krzywych C-T kolejnymi fazami wzrostu stężenia leku we krwi powodują:

- indukcja wyrzutu żółci
- farmakologiczna (sole kwasów żółciowych, sekretyna)
- pokarmem po fazie głodzenia (dieta bogata w tłuszcz i białko)

Czynnikami wpływającymi na upośledzenie krążenia leku pomiędzy wątrobą i jelitami wyróżnić można między innymi:

- zatrzymanie produkcji żółci
- zmniejszenie produkcji kwasów żółciowych
- zatrzymanie uwalniania żółci z pęcherzyka żółciowego, kamica dróg żółciowych
- niektóre choroby wątroby
- niektóre choroby nerek (wpływ na P-gp)
- stany zapalne jelit
- stany odwodnienia
- interakcje z innymi lekami
- adsorbenty leków
- dieta węglowodanowa

Sam proces wydzielania żółci jest zjawiskiem chronokinetycznym. Zwiększone wydzielania żółci notuje się głównie w ciągu dnia. U człowieka produkcja żółci to około 15 ml/ kg m.c. na dobę. Natomiast produkcja samych kwasów żółciowych to ok. 20 - 30 g na dobę (Pawelski S., Maj S. 1987). Obecność soli kwasów żółciowych w świetle jelita prawdopodobnie decyduje o promocji wchłaniania zarówno leków hydrofilnych jak i lipofilnych (Bowe C.L. i wsp. 1997). Procesom wchłaniania leków towarzyszy jednocześnie wchłanianie kwasów żółciowych. 95% kwasów żółciowych wydzielonych do światła jelita wchłaniana jest zwrotnie do wątroby. Znaczne możliwości żółci w tym zakresie zdaje się pośrednio potwierdzać jej niejednorodny skład. Wiadomo bowiem że cechy poszczególnych kwasów żółciowych takie jak np. lipofilność są bardzo zróżnicowane (Roda A. i wsp. 1990). Krążenie watrobowo jelitowe leku stwierdzono między innymi w przebiegu dystrybucji takich związków jak: kwas mykofenolowy, kwas perfluorooktanowy, kwas glizyryzowy, ramatroban, ezetimib, flawopirydol, ochratoksyna, simwastatyna, lowastatyna, ampicylina, lewofloksacyna, gestoden, noretysteron, estrogen, estriol, troglitazon, chloramfenikol, eskuletyna, meropenem, indometacyna.
Obecność cyklu enterohepatycznego wpływa na wartość okresu półtrwania, pole powierzchni pod krzywą, również klirens leku oraz wartość objętości dystrybucji. Przy założeniu liniowej farmakokinetyki leku niema wpływu na wystąpienie naddostępności biologicznej (Peris-Ribera J.E. i wsp. 1992).

Analiza genomu w badaniach farmakokinetycznych.

Farmakogenetyka jako część większej gałęzi - farmakogenomiki jest narzędziem coraz częściej stosowanym w badaniach farmakokinetycznych. Podstawową cechą w tego typu badaniach jest analiza polimorfizmu czyli różnicy w sekwencji DNA w tym samym miejscu (łac.: *Locus*) genomu u różnych osobników (Rioux P.P. 2000). Jedną z częściej spotykanych rodzajów zmienności ludzkiego genomu jest polimorfizm w obrębie pojedynczego nukleotydu - SNP (ang.: *Single Nucleotide Polymorphism*). W chwili obecnej znanych jest 1.4 miliona SNP w obrębie całego ludzkiego genomu i liczba ta cały czas rośnie (Evans W.E. 2003). Zmienność genetyczna na poziomie 1% badanej populacji jest już czynnikiem wartym uwagi z punktu widzenia analizy danych farmakometrycznych (Evans W.E. 2003). Obecnie genotypowanie i śledzenie polimorfizmu genów odgrywa zasadniczą rolę na trzech etapach badań farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Analiza taka dotyczy:

- analizy polimorfizmu genów kodujących białka transportujące
  (P-gp, SLC15A1 - gen kodujący PEPT1, PEPT2 - transporter peptydów, 5-HTT (SERT) - transporter serotoniny, CHT1 - transporter choliny, NET T 182C - gen kodujący transporter norepinefryny)
- analizy polimorfizmu genów kodujących układy enzymatyczne
  (izoenzymy CYP)
- polimorfizmu genów kodujących cel - receptory
  (receptory B2 adrenergiczne, receptory dopaminowe D2, D3, D4, receptor estrogenowy, receptory serotoninowe 5HT2A, 5HT6, receptor rjanodynowy)

Pierwsze dwa zjawiska pozwalają na analizę w odniesieniu do grup doświadczalnych i eliminacji niekorzystnego z punktu widzenia badań populacyjnych rozrzutu wyników w analizie PK. Analiza polimorfizmu białek kodujących receptory ułatwia analizę danych głównie w badaniach farmakodynamicznych. Jeżeli można potwierdzić związek polimorfizmu genetycznego z cechami białek uczestniczących w procesach PK/PD leku, oznacza to że polimorfizm taki będzie manifestował się odpowiednią odpowiedzią w terapii prowadzonej danym lekiem. Z punktu widzenia farmakokinetyki badania farmakogenetyczne pozwalają niejednokrotnie rozwiązać wiele trudnych problemów związanych obecnie głównie z metabolizmem leków. Opisano 50 genów kodujących układ izoenzymów CYP. Badania farmakogenetyczne odnoszą się nie tylko do określonych szlaków metabolicznych w narządach predysponowanych do takiej funkcji. Pozwalają także śledzić różnice typu jeden gen jedno białko, jest to klasyczny model postępowania (Svensson C.K. I wsp. 2001). Jednym z podstawowych pojęć w rozpatrywaniu zagadnień z dziedziny farmakogenetyki jest fenotyp organizmu. Fenotyp to zespół cech zewnętrznych (kolor włosów, oczu itp.) pozwalających zaszeregować organizm do grupy o na przykład określonej aktywności enzymatycznej. Drugim pojęciem jest genotyp, czyli określona sekwencja nukleotydów w obrębie genu. Nie zawsze jednak zmiany genotypu manifestują się zmianami obserwowanymi w fenotypie. W praktyce kliniki stosowania leków informacje zdobyte dzięki badaniom farmakogenetycznym pozwalają kwalifikować lub wykluczać leki z danego przypadku terapeutycznego. Wyodrębniono grupy leków które są dla siebie swego rodzaju wskaźnikami tempa procesów metabolicznych. Pozwala to na określanie zależności - jeżeli wiadomo że lek x jest szybko metabolizowany to wiadomo że grupy leków b, c, d również będą szybko metabolizowane. Zajdzie więc prawdopodobieństwo zwiększenia dawki leku z tych grup. Powód takiego stanu rzeczy to istnienie tej samej ścieżki metabolicznej warunkowanej tym samym enzymem dla wszystkich tych substancji. Działania farmakogenetyków ściśle związane są z zagadnieniami terapii monitorowanej. Pozwalają między innymi na wykrywanie tzw. defektów enzymatycznych w konkretnych przypadkach. W szerszym zakresie pozwalają wykrywać "defekty" genetyczne w obrębie subpopulacji. Genetyczna zmienność populacji ludzkiej jest przyczyną zróżnicowania ścieżek metabolicznych wielu leków. W populacji w skali makro wyodrębnić można subpopulacje słabo, szybko i ultraszybko metabolizujące niektóre leki ze względu na odmienną aktywność enzymatyczną (Weinshilboum R. 2003).

	Słaby metabolizm (%)	Populacja
CYP2A6	20	Kaukaz
	2	USA (afroamerykanie)
CYP2D6	6.8	Szwecja
	1	Chiny
	7.5	USA (rasa biała), Europa
	2<	Azja, Afryka
	7	Kaukaz
CYP2C9	3	Anglia
	1	Japonia
	1	Azja
	1	USA (afroamerykanie)
	1	Kaukaz
CYP2C19	2.7	USA (rasa biała)
	4-7	USA (afroamerykanie)
	3.3	Szwecja
	5-17	Chiny
	20	Kaukaz
	20	Japonia
CYP2D6	7-10	Kaukaz
	6	Rosja
	7	USA (afroamerykanie)
	1.5	Azja
N -acetylotransferaza 2	52	USA (rasa biała)
	17	Japonia
O - metylotransferaza katecholowa	25	rasa biała
urydyno difosfo	4	Chiny
glukuronozylo	1	Japonia
transferaza 1A1	10.9	rasa biała

Super szybki metabolizm (ang.: *Ultrafast Metabolizers; Ultarapid Metabolizers*)

CYP2D6	1	Kaukaz
	1	Azja
	3.5	Rosja

Genotypowanie jest jednym z ważniejszych sposobów kreowania grup w badaniach farmakokinetycznych - populacyjnych. Wstępne genotypowanie uczestników badania pozwala na eliminację osobników nie przystających do grupy. Pozwala to na zmniejszenie zmienności między osobniczej w badaniu PK i wyeliminować dużą zmienność w obrąbie badanego parametru PK. Obecnie genotypowanie w farmakokinetyce dotyczy najczęściej opisu genów kodujących typ izoenzymów CYP. Obecnie w badaniach farmakokinetycznych wielu leków prowadzi się genotypowanie w różnych układach doświadczalnych.

CYP3A4	(diltiazem, dicetaxel i inne)
CYP3A5	(ifosfamid, midazolam, takrolimus etc.)
CYP2C19	(mefobarbital, amitryptylina, citalopram, lansoprazol, mefenytoina, omeprazol, heksobarbital, propranolol, fenytoina, proguanil)
CYP2C9	(lozartam, lornoxikam, warfaryna, tolbutamid, fenytoina, niesterydowe leki przeciwzapalne)
CYP2D6	(risperidon, atomoksetyna, loratydyna, amitryptylina, kodeina, debrischina, dekstrometorfan, enkainid, flekainid, fluoksetyna, guanoksan, metoksyamfetamina fenacetna, fenformina, sparteina)
CYP2E1	(uretan)
CYP2C8	(paklitaxel)
Dehydrogenaza dihydropirymidynowa (fluorouracyl)	
NAT2	(izoniazyd, hydralazyna, prokainamid, dapson, kofeina , amonafid, sulfonamidy)
Metylotransferaza tiopurynowa (merkaptopuryna, tioguanina, azatiopiryna)	
UGT1A1	(irynotekan)

Jednak genotypowanie dotyczy obecnie nie tylko właściwości układów enzymatycznych lecz także układów nośnikowych (Evans W.E. 2003). Genotypowaniu podlegają również geny kodujące aktywne układy ATP zależnych transporterów.

MDR1 C3435T SNP	(dikloksacylina, erytromycyna, docetaxel)
ABCC2	(irynotekan)
ABCG2	(topotekan, pitawastatyna)

Dowiedziono także że białko P-gp kodowane genem MDR1 ma wpływ na metabolizm leków w układzie izoenzymu CYP3A4 (Lan L. i wsp 2000;Goh B.C. i wsp. 2002; Dorne J.L.C.M. 2004). P-gp jest w stanie blokować dostęp cząsteczkom leku do wewnątrzkomórkowych układów metabolicznych. Potwierdzono również różną ekspresję P-gp kodowanego przez genotyp T/T i C/C (Hoffmeyer S. i wsp. 2000). Genotyp T/T zwykle wiąże się z mniejszą funkcją białka P-gp (Goh B.C. i wsp. 2002).

Źródła zmienności PK - HVDP, HVD

Zmienność parametrów farmakokinetycznych jest przyczyną licznych problemów metodycznych w badaniach nad farmakokinetyką i farmakodynamika leków. Ocena zmienności PK dotyczy analizy postaci leku o dużej zmienności PK czyli HVDP (ang.: *Highly Variable Drug Product*) lub substancji leczniczej o dużej zmienności PK czyli HVD (ang.: *Highly Variable Drug*). Wysoka zmienność parametrów farmakokinetycznych niektórych leków wymaga prowadzenia terapii monitorowanej stężeniem leku TDM. Celem w projektowaniu nowych leków jest uzyskanie preparatu leczniczego który charakteryzuje niska zmienność PK. Zmienność PK można obserwować na różnych poziomach:

- na poziomie jednego osobnika (zmienność wewnątrzosobnicza -porównanie dwóch formulacji leku zawierających tą samą substancję czynną)
- na poziomie międzyosobniczym w obrębie jednolitej pod względem etnicznym lub rasowym populacji (zmienność międzyosobnicza)
- zmienność pomiędzy populacjami (grupa etniczna; rasa etc.)
- zmienność wynikająca z obserwacji efektu przenoszenia

Przyczyny zmienności PK tkwią zarówno po stronie właściwości fizykochemicznych leku jak i organizmu który podlega ekspozycji na lek. Zmienność taka obserwowana jest w przypadku wielu leków zarówno w farmakokinetyce człowieka jak i w farmakokinetyce leków weterynaryjnych. Trzy główne źródła zmienności związane są z:

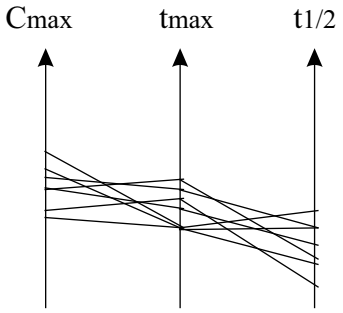
A cechami fizykochemicznymi substancji leczniczej:
- LogP
- PSA
- polimorfizm postaci krystalicznej
- odmiany optycznie czynne
- pH, pKa

B cechami postaci leku:
- obecność promotorów wchłaniania
- blokowanie P-gp
- droga podania
- cofanie dysocjacji
- złożone postacie o modyfikowanej szybkości uwalniania

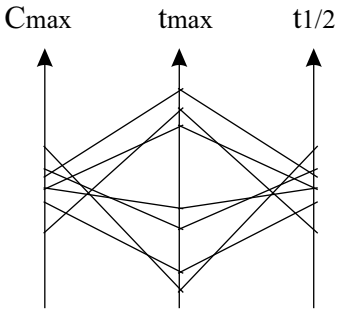
C specyfiką pacjenta:
- różnice rasowe, etniczne, defekty genetyczne
- ekspresja białek transportujących
- płeć, wiek
- ruch, tryb życia, sposób odżywiania, nałogi, nawyki, czynniki środowiskowe
- poziom białek krwi
- interakcje z innymi lekami
- przebieg choroby
- masa ciała

$$\mathbf{DMPK_{(Variability)} = \Sigma[A] + \Sigma[B] + \Sigma[C]}$$

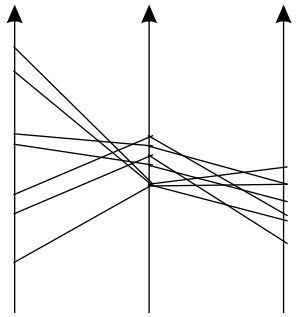
Bezpieczeństwo stosowania leku wzrasta wraz z malejącą wartością zmienności parametrów farmakokinetycznych leku. Zmienność PK może dotyczyć tylko wybranych parametrów lub wszystkich poddawanych analizie. Zjawisko to zależne jest od umiejscowienia i charakteru mechanizmu który w bezpośredni lub pośredni sposób zmienia wybrane lub przemiany jakim lek ulega w organizmie. Przyczyny zmienności na poziomie jednego osobnika (np. w badaniach biorównoważności) wynikają często z różnic związanych z postacią leku. Założenie to jest prawidłowe w przypadku braku innych czynników wpływających na jakość badania (GLP;GCP).



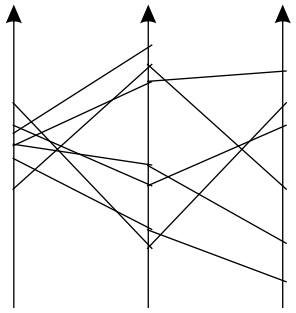
Niewielka zmienność PK.



Duża zmienność tmax.

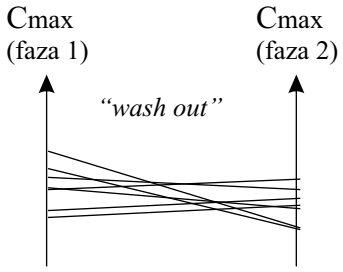


Duża zmienność Cmax.

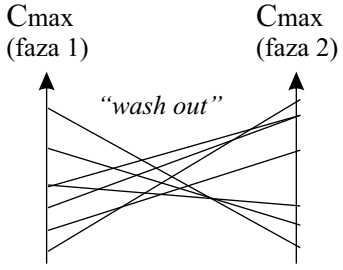


Duża zmienność tmax oraz t1/2.

Ryc. Analiza zmienności międzyosobniczej PK.



Niewielka zmienność Cmax (dwa eksperymenty PK z okresem wymywania leku).



Duża zmienność Cmax (dwa eksperymenty PK)

Ryc. Analiza zmienności wewnątrzosobniczej PK.

Przyczyny zmienności w obrębie grupy osobników jednolitej etnicznie, rasowo i kulturowo (medycyna człowieka) upatrywać można w takich czynnikach jak: poziom białek, płeć, wiek, BMI. W obrębie takiej grupy za zmienność PK odpowiedzialna jest również różna ekspresja P-gp na błonach specjalizowanych oraz różny profil metaboliczny probantów.

Przyczyny zmienności w przypadku dwóch odmiennych etnicznie i lub rasowo grup można upatrywać przede wszystkim w różnym profilu metabolicznym osobników oraz zróżnicowaniu ekspresji P-gp oraz innych systemów aktywnego transportu. Na te czynniki nakłada się obraz wszystkich wymienionych wcześniej cech (Goh B.C. i wsp. 2002; Dorne J.L.C.M. 2004).

Aby uniknąć błędu związanego ze zbyt dużą lub niekontrolowaną zmiennością parametrów farmakokinetycznych leków sformułowano wiele zasad i wskazówek dotyczących prowadzenia badań PK nad tego typu substancjami. Jedno z uregulowań harmonizacyjnych ICH precyzuje jakie leki w większym stopniu od innych predysponowane są do dużej zmienności PK związanej z różnicami rasowymi etnicznymi etc. (ICH 1998).

Leki w dużym stopniu predysponowane do dużej zmienności PK to leki:

- nie wykazujące liniowości kinetyki
- o nieliniowej i złożonej zależności PK/PD
- stabilne w wąskim zakresie pH
- będące mieszaninami substancji czynnej o różnych charakterystykach optycznych składników
- wąskim zakresie terapeutycznym, wąskim oknie terapeutycznym
- podlegające w dużym procencie procesom metabolicznym, leki typu *pro-drug*
- podlegające wielu różnym procesom metabolicznym

- skrajnie lipofilne LogP > 4.5, silnie wiążące się z białkami
- substraty dla CYP3A4 i jednocześnie substraty dla P-gp
- metabolizowane przez enzymy o dużym polimorfizmie genetycznym
- podawane drogą doustną
- na których wchłanianie jelitowe duży wpływ ma obecność pokarmu
- uczestniczące w cyklu enterohepatycznym
- stosowane w praktyce lekarskiej wraz z innymi lekami
- o bardzo dużej objętości dystrybucji, bardzo długim okresie biologicznego półtrwania
- o modyfikowanej postaci leku
- zawierające więcej niż jedną substancję czynną
- zawierające substancje (oprócz substancji farmakologicznie czynnej) - substraty dla P-gp

Leki w niskim stopniu predysponowane do dużej zmienności PK to leki:

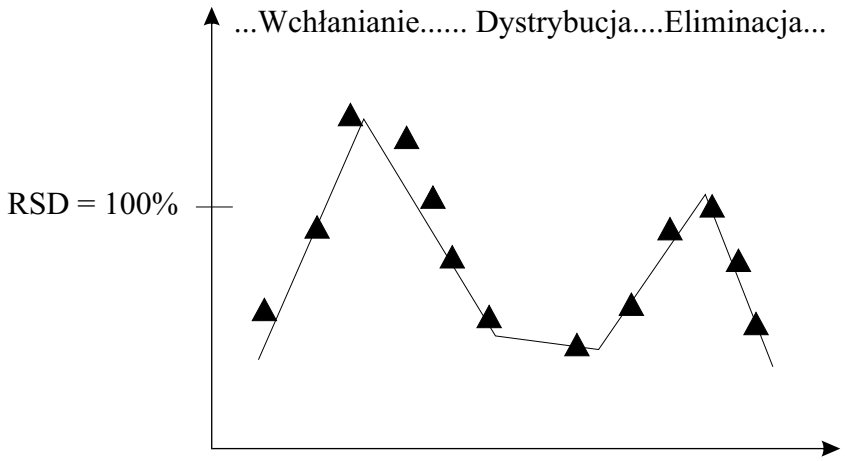
- wykazujące liniową kinetykę
- stabilne chemicznie w szerokim zakresie pH
- o liniowej zależności PK/PD
- szerokim zakresie terapeutycznym, szerokim oknie terapeutycznym
- podlegające w niewielkim procencie procesom metabolicznym
- słabo lipofilne, słabo wiążące się z białkami
-nie będące substratami dla P-gp
- nie metabolizowane przez enzymy o dużym polimorfizmie genetycznym
- na których wchłanianie jelitowe obecność pokarmu niema znaczącego wpływu
- nie wydzielane wraz z żółcią
- nie stosowane w praktyce lekarskiej wraz z innymi lekami
- zawierające jedną substancje czynną
- o niewielkiej objętości dystrybucji
- podawane drogami podania umożliwiającymi ominięcie lub kontrolę fazy wchłaniania

Określanie parametrów farmakokinetycznych jest nierozerwalnie związane z fazą kliniczną lub badaniami *in vitro*. Jednak część bioanalityczna badań również ma wpływ na zmienność uzyskanych parametrów farmakokinetycznych. Walidacja metody bioanalitycznej ma zabezpieczać jakość badania i kontrolować ewentualne niedociągnięcia. Z punktu widzenia bioanalityki zagrożenie wzrostem zmienności w obrębie obliczanych parametrów PK najczęściej związane jest z:

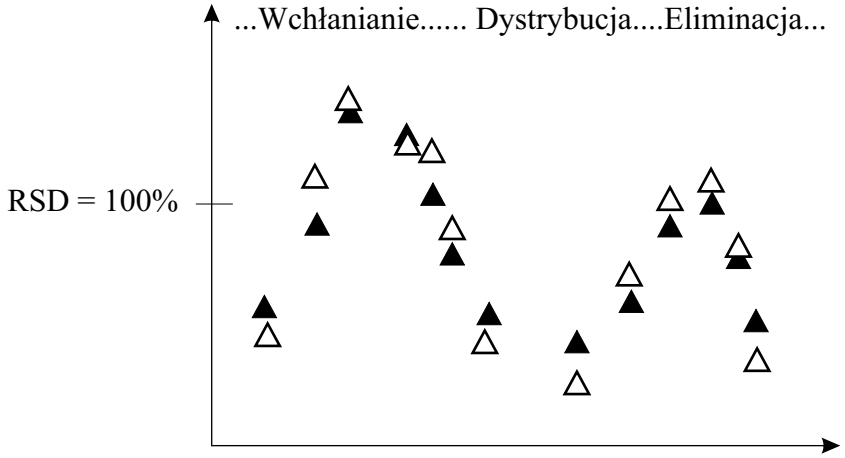
- doborem systemu detekcji leku w matrycy do możliwości laboratorium
- niskim odzyskiem w fazie ekstrakcji leku z matrycy biologicznej
- brak fazy oczyszczania matrycy biologicznej (skrócone procedury typu denaturacja + HPLC etc.)
- obecnością w matrycy metabolitów o podobnej charakterystyce chemicznej
  (interferencje / brak zróżnicowania z analitem lub IS)
- identyfikacja analitu i standardu wewnętrznego jedynie za pomocą porównania czasów retencji
- odwzorowywanie metod analitycznych bez sprawdzenia wpływu każdego etapu metody na wynik
- brak precyzyjnych kryteriów akceptacji rozdziału chromatograficznego (QC; SST)

Niskie zagrożenie wzrostu zmienności w obrębie obliczanych parametrów PK związane z metodą bioanalityczną gwarantuje:

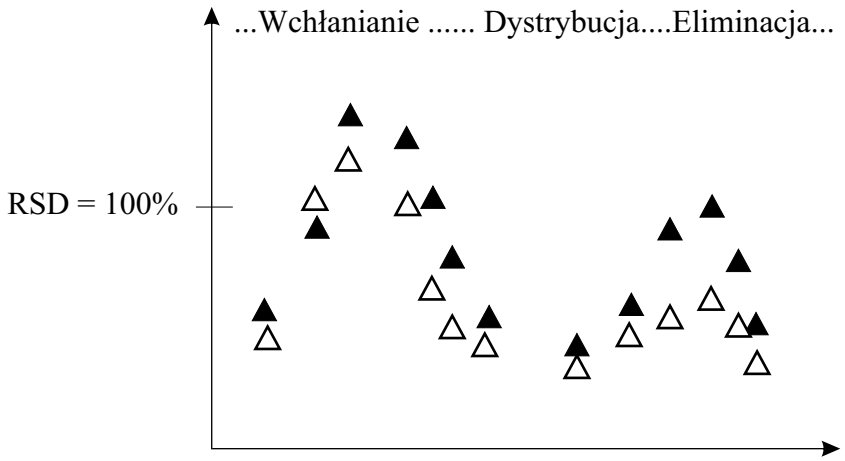
- dobór systemu detekcji do cech fizykochemicznych analitu
- pełne spektrum detekcyjne w zasięgu laboratorium (UV;DAD;FL;EC;MS/MS)
- stosowanie wyłącznie certyfikowanych materiałów
- wysoki odzysk w fazie ekstrakcji leku z matrycy biologicznej
- oczyszczanie matrycy biologicznej LLE, SPE etc.



Przykład rozkładu wartości RSD (%) dla każdego punktu C-T krzywej PK dla:
▲ - leku
△ - metabolitu

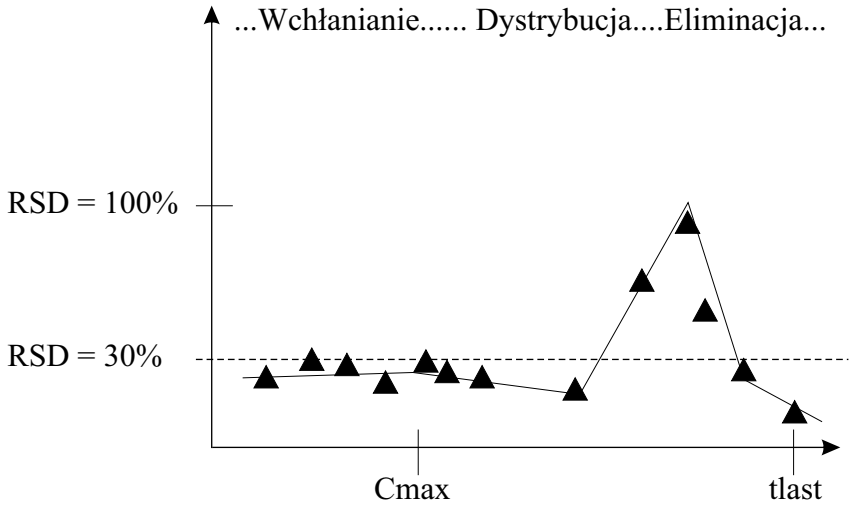


Zmienność dotycząca wartości stężenia metabolitu we wszystkich fazach jest zbliżona do wartości osiągniętych dla samego leku.

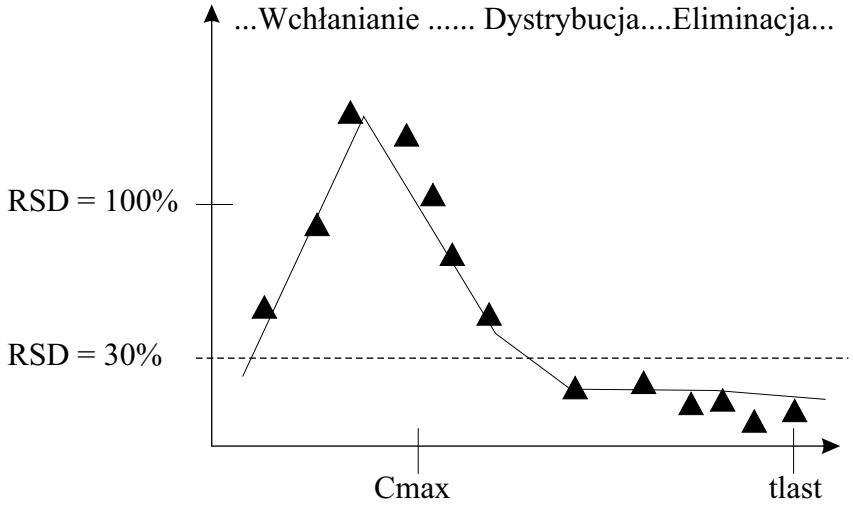


Zmienność dotycząca wartości stężenia metabolitu w fazie eliminacji jest mniejsza niż samego leku.

Ryc. Lek o dużej zmienności PK. Źródłem zmienności jest faza wchłaniania oraz eliminacja (dotyczy to zarówno zmienności kinetyki leku jak i aktywnego metabolitu)



Ryc. Lek o dużej zmienności PK. Źródłem zmienności jest faza eliminacji.Przyczyną dużej zmienności może być krążenie enterohepatyczne leku.



Ryc. Lek o dużej zmienności PK. Źródłem zmienności jest faza wchłaniania. Przyczyną dużej zmienności wyłącznie w fazie wchłaniania może być również nieoptymalna formulacja.

- brak w matrycy metabolitów o podobnej charakterystyce chemicznej lub możliwość ich identyfikacji (brak interferencji / zróżnicowanie z analitem i IS)
- identyfikacja widma masowego oraz DAD analitu i standardu wewnętrznego
- doświadczalne tworzenie metod na podstawie wielu doniesień piśmiennictwa
- określenie kryteriów akceptacji rozdziału (QC; SST)

Duża zmienność międzyosobnicza (ang.: *Between Subject Variability; Inter Subject Variability*) jest często przyczyną niepowodzenia w badaniu biorównoważności leków *in vivo*. Podnosi również koszty takich badań z uwagi na udział większej grupy probantów w badaniu BE. Duża zmienność międzyosobnicza nie zawsze musi oznaczać również dużą zmienność wewnątrzosobniczą (ang.: *Intra Subject Variability*) PK leku (Benet L.Z. 2006).

	Zmienność (CV%) międzyosobnicza:	Zmienność (CV%) wewnątrzosobnicza:
teofilina	31	11-14
karbamazepina	38	14-15
fenytoina	51	10-15
digoksyna	52	14-15
warfaryna	53	6-11

Analiza statystyczna liczby badań BE zakończonych niepowodzeniem dowodzi że procent takich badań znacznie wzrasta w przypadku gdy (Benet L.Z. 2006; Endernyi L. 2006) zmienność wewnątrzosobnicza wynosi > 35% (n = 1300; > 80% badań BE dało wynik negatywny). Jednym ze sposobów na obniżenie wartości zmienności PK w badaniach BE jest analiza farmakokinetyki po podaniu wielokrotnym. W przypadku niektórych leków zaobserwowano znacznie niższe wartości CV% po podaniu wielokrotnym niż po podaniu pojedynczym. W przypadku takich leków jak loratydyna CV% jest 2.9 razy niższa, werapamilu CV% 1.6 razy niższa, a w przypadku propafenonu CV% jest 2.2 razy niższa w warunkach *steady state* (Endernyi L. 2006).

Dawka a parametry farmakokinetyczne

Dawkę leku jaka dotarła do kompartmentu centralnego obrazuje pole powierzchni pod uzyskaną krzywą stężeń, dla tej przestrzeni kinetycznej. W przypadku każdej pozanaczyniowej drogi podania wysokość dawki określana jest we wzorach obliczeniowych jako F x D. Gdzie F stanowi procent wchłoniętej dawki. W przypadku części parametrów farmakokinetycznych sposób przedstawienia dawki warunkuje zróżnicowanie jednostek. Tak dzieje się w przypadku objętości dystrybucji jaką przedstawia się w ujęciu klasycznym w jednostce L - litr, gdy podana wartość dawki stanowi całkowitą ilość leku jaka została podana do organizmu (20 mg/kg, przy m.c. = 100 kg daje D = 2 000 mg). W przypadku gdy wartość dawki wyrażona jest ilością leku podaną na kilogram masy ciała objętość dystrybucji przyjmuje jednostkę L/kg (w ujęciu klasycznym jest to odniesienie do współczynnika dystrybucji).
Jak obliczyć wartość dawki znając parametry farmakokinetyczne oraz jest stosunek wartości dawki do klirensu całkowitego, objętości dystrybucji oraz pola powierzchni pod krzywą. Odpowiedź ilustrują równania:

$$D = (AUMC \times Cl_{(b)}) / MRT \qquad D = (AUC \times Vd) / MRT$$

$$AUC = AUMC / MRT \qquad Co = AUC / MRT$$

$$D = AUC \times Cl_{(b)} \qquad D = Co \times Vd$$

W procesach kinetycznych pierwszego rzędu parametry farmakokinetyczne przyjmują stałe wartości niezależnie od dawki. Pole powierzchni zmienia się wprost proporcjonalnie do podanej dawki. W przypadku gdy kinetyka leku nie jest procesem liniowym nawet niewielkie wahania dawki powodować mogą niekontrolowane zmiany parametrów farmakokinetycznych z trudnym do przewidzenia skutkiem terapeutycznym. Powyższe wzory to opis dawki z dwóch punktów widzenia. Dawka leku stanowi wartość pola powierzchni pod krzywą które uwarunkowane jest i kształtowane współczynnikiem oczyszczania czyli klirensem. AUC istnieje więc w ramach pewnych wartości klirensu całkowitego. Klirens ciała odnosi się jednak do określonej objętości dystrybucji a pole powierzchni pod krzywą może być traktowane jako ważny i technicznie użyteczny parametr kliniczny w fazie projektowania dawkowania. Szczególne znaczenie AUC ma w ramach badań porównawczych pól nad i pod poziomem wartości stężenia efektywnego. Stąd możliwe jest uzyskanie odpowiedzi na pytanie jaka dawka wymagana jest do uzyskania stosunku pól AUC1 i AUC2 na wymaganym poziomie przy znanej wartości klirensu.

$$D = (AUC_1 + AUC_2) / Cl_{(b)}$$

AUC1 - pole powierzchni nad CE
AUC1 - pole powierzchni pod CE

Dawka może zostać także wyrażona jako stężenie osiągnięte w danej przestrzeni kinetycznej - objętości dystrybucji danego leku. Jeżeli znana jest przestrzeń w jakiej lek się rozmieszcza to żądane stężenie dla antybiotyku o znanej wartości MIC można określić jako:

$$D = MIC \times Vd$$

MIC - minimalne stężenie hamujące

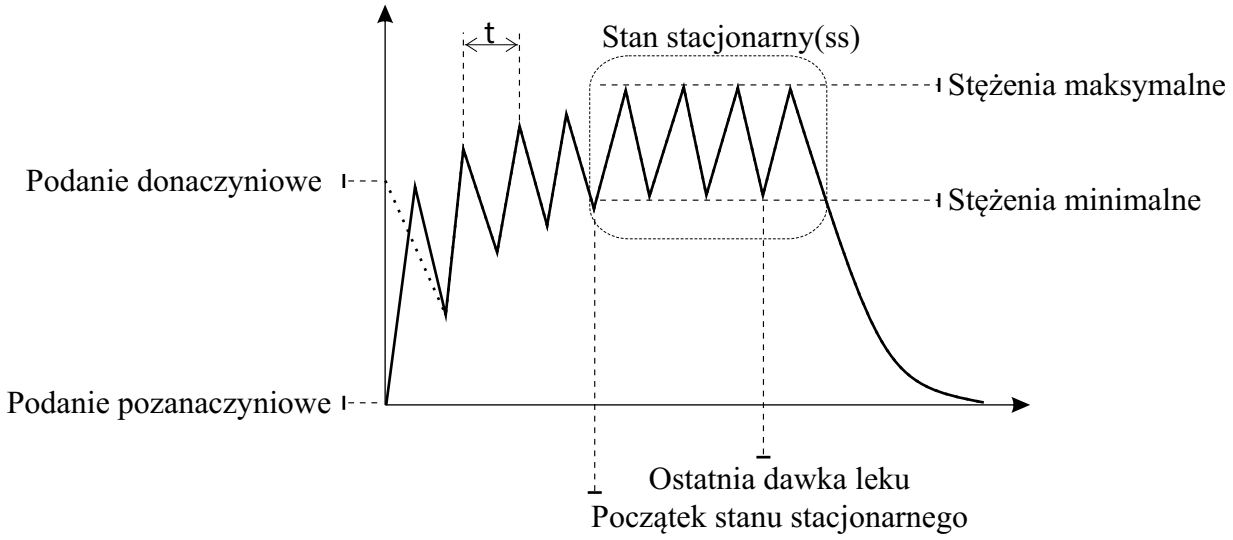
dla modelu dwukompartmentowego:

$$D = MIC \times Vd_{(ss)}$$

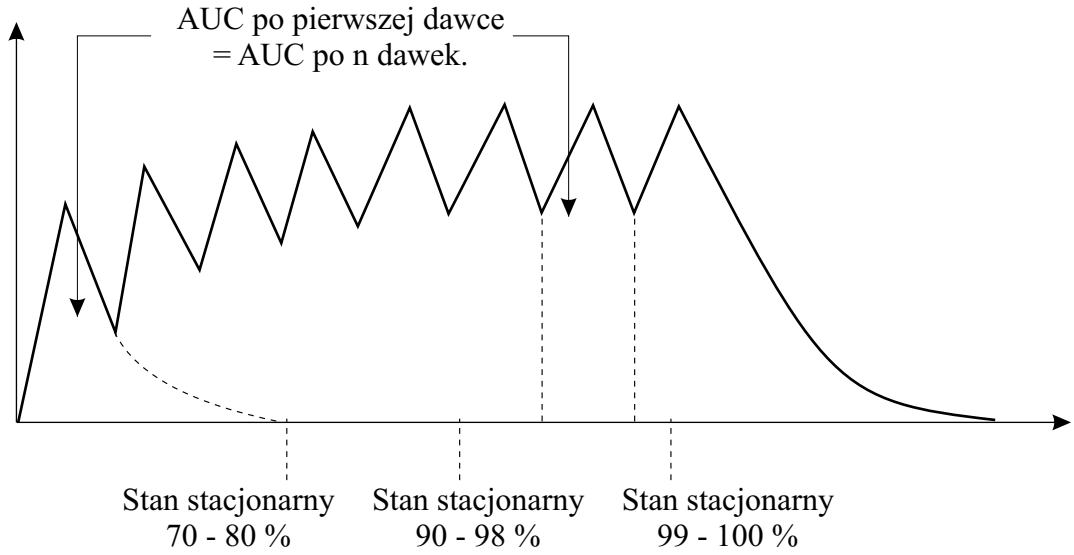
Wzór jest prawdziwy tj. relacjonuje dawkę efektywną tylko wtedy jeżeli stężenie w osoczu odpowiada efektywnemu stężeniu leku w tkankach (Boothe D.M. 2002).

Farmakokinetyka wielokrotnego podania leku

Cechą typowego wielokrotnego podania leku jest podanie kolejnej dawki przed upływem okresu równego 10 x t1/2. Jeżeli kolejne dawki leku podawane są w interwałach większych od czasu równego 10 x t1/2 to jest to wielokrotne jednorazowe podanie leku. Idea wielokrotnego podawania leku bierze początek w obserwacji która dowodzi istnienia wysokiej korelacji efektu leczniczego z uzyskaniem stężenia terapeutycznego w tkance docelowej. Wielokrotne podanie leku pozwala utrzymać malejące stężenie substancji leczniczej we krwi na stałym poziomie gwarantującym sukces terapeutyczny. Kolejne dawki leku powodują iż osiągany zostaje stały pułap wahań stężenia leku opisany granicami stężeń minimalnych i maksymalnych. Ten stan ustalonych wahań stężenia leku określa się mianem stanu stacjonarnego - ss (ang.: *Steady State*).



Rys. Idea wielokrotnego podania leku - granice stanu ustalonych wahań stężenia leku..



Rys. Sposób narastania wartości stanu stacjonarnego po n kolejnych dawek.
Stosunki wartości pól dla wielokrotnego podania leku.

Wartość pola powierzchni pod fragmentem krzywej po n dawkach określane jest jako AUCt,ss. Pozwala obliczyć współczynnik liniowości - LF (ang.: *Linearity Factor*) dla podania wielokrotnego.

$$\mathbf{LF = AUC_{t,ss} / AUC}$$

We wzorze AUC stanowi wartość powierzchni pola po jednorazowym podaniu leku. Problem właściwego dawkowania leków w celu uzyskania stężenia terapeutycznego w określonym czasie gwarantującym skuteczność leku ewoluował wraz z rozwojem farmakokinetyki. Pierwszym sposobem jaki pozwalał na uzyskanie wysokiego stężenia terapeutycznego było częste podawanie leku. Sposób ten groził jednak kumulowaniem się leku, powodował także wzrost kosztów leczenia. Kolejnym krokiem było więc decydowanie się na wyższe dawki leku podawane w dłuższym interwale czasowym. Powodowało to dłuższą eliminację leku, cel został więc osiągnięty. Zauważono jednak iż największa korelacja z osiąganym efektem terapeutycznym zachodzi nie z wysokością pojedynczej dawki lecz z czasem działania dawki terapeutycznej - czasem działania efektywnego leku. Wkrótce zaowocowało to mnogością leków gwarantujących przedłużone uwalnianie substancji leczniczej. Uzyskane w ten sposób stężenia były stężeniami efektywnymi, a czas ich trwania wydłużał się co doprowadziło do uzyskania wielu leków o dużej skuteczności. Rola nowoczesnych postaci leków w tym względzie jest niezwykle ważna (Müller R.H., Hildebrand G.E. 1998).

Problemem wielokrotnego dawkowania leku jest także czas w jakim wahania stężeń maksymalnych i minimalnych osiągają stały poziom. Stan stacjonarny pojawia się zazwyczaj po podaniu 4 - 5 dawek leku. Ten problem rozwiązuje jednak podanie dawki inicjującej odpowiednio wyższej, gwarantującej już w początkowej fazie leczenia uzyskanie oczekiwanego stężenia leku we krwi.
Aby obliczyć czas po jakim możliwy staje się żądany procent wartości stanu ustalonego dla leku o znanym okresie półtrwania należy skorzystać z formuły:

$$\mathbf{t_{ss} = - 1.44 \times Ln(1 - fss) \times t_{1/2}}$$

tss - czas uzyskania stanu ustalonego
fss - procent wartości stanu ustalonego
t1/2 - okres półtrwania w fazie eliminacji

Na przykład dla kolejnych wartości t 1/2 (wyrażonych w godzinach) stan ustalony o określonej wartości - tss w % osiągany jest po :

fss [%]		[t1/2]	tss
0.99	1	6.645	
0.98	2	11.290	
0.97	3	15.180	
0.96	4	18.579	
0.95	5	21.614	
0.94	6	24.359	
0.93	7	26.861	
0.92	8	29.157	
0.91	9	31.272	
0.90	10	33.226	

Natomiast procent stanu stacjonarnego fss (ang.: *Fraction Steady State*) dla określonej ilości dawek można obliczyć korzystając z równania:

$$\mathbf{fss = 1 - e^{-\beta \times n \times \tau}}$$

n - liczba dawek

W chwili obecnej najczęstszym sposobem podawania leków jest podanie dawki inicjującej i dawek podtrzymujących uzyskane stężenie. Ten sposób uzyskania stanu stacjonarnego wiązać się może także z zastosowaniem leku różnymi drogami podania. Jest to tzw. terapia zamienna i polega na rozpoczynaniu leczenia od drogi donaczyniowej i łączeniu jej z drogą doustną lub po kilku dawkach przejściu tylko na drogę doustną. Z wielokrotnym dawkowaniem leku w sposób nierozerwalny wiąże się pojęcie kumulacji leku w organizmie. Kwestię tą w sposób matematyczny opisują dwie zależności:

$$\mathbf{DR = D / \tau} \qquad \text{oraz} \qquad \varepsilon = \mathbf{t_{1/2} / \tau}$$

Pierwsza z wymienionych zależności to częstość dawkowania DR (ang.: *Dosing Rate*). Odwrotność stosunku t1/2 / τ określana jest mianem względnego przedziału dawkowania - ε (ang.: *Relative Dosing Interval*).

$$\varepsilon = \tau / \mathbf{t_{1/2}}$$

Wymiarem tego pojęcia jest tzw. stopień persystencji - fr (ang.: *Fraction of End Dosing Interval*), który określa ułamek wartości stężenia leku pod koniec danego przedziału dawkowania i równy jest:

$$\mathbf{fr = e^{-\beta \times \tau}}$$

Współczynnik kumulacji - R (ang.: *Accumulation Factor*; fel - *Fraction of Dose Eliminated*) określa różnicę pomiędzy wartością minimalnego stężenia leku w stanie stacjonarnym a minimalnym stężeniu leku po podaniu pierwszej dawki leku. Przedstawia część dawki leku poddaną eliminacji w czasie jednego interwału dawkowania. Obliczamy go korzystając z równań:

$$\mathbf{R = C_{ssmin} / C_{1min}}$$

Współczynnik ten można zilustrowac wykorzystując analogicznie pola AUC, AUMC czy stężenie średnie:

$$\mathbf{R = AUC_{t,ss} / AUC_1}$$

$$\mathbf{R = C_{ssmax} / C_{1max}}$$

$$\mathbf{R = 1 - e^{-\beta \times \tau}} \qquad \mathbf{R = 1.44 / \varepsilon}$$

Cssmin - stężenie minimalne w stanie stacjonarnym
Cssmax - stężenie maksymalne w stanie stacjonarnym
C1min - stężenie minimalne po podaniu pierwszej dawki
C1mmax - stężenie maksymalne po podaniu pierwszej dawki
AUCt,ss - pole powierzchni pod krzywą w stanie stacjonarnym
AUC1 - pole powierzchni pod krzywą po pierwszej dawce
1.44 = 1 / Ln2

Stosunek wartości współczynnika kumulacji - fel do wartości stopnia persystencji fr opisuje równanie:

$$\mathbf{fel = 1 - fr}$$

Obliczanie wartości dawki w stanie stacjonarnym

Najskuteczniejszą i najbardziej bezpieczną formą jest prowadzenie terapii z natychmiastowym monitoringiem stężenia leku po określonym czasie.

Pozwala to dopasować dawkowanie do konkretnego pacjenta, ewentualnie w przypadku wykrycia defektów enzymatycznych, metabolicznych związanych z eliminacją leku zamienić lek na inny. Takie postępowanie pozwala w bezpieczny sposób modyfikować dawkowanie leku obliczając kolejną zmodyfikowaną wartość dawki.

$$D_1 = D_2 \times (C_1 / C_2)$$

D1 - dawka nowa
D2 - dawka dotychczasowa
C1 - stężenie nowe
C2 - stężenie dotychczasowe

Stosunek dawki do stężenia maksymalnego przy założeniu dostępności biologicznej na poziomie 100% opisuje formuła:

$$D = C_{max} \times V_d$$

Dawkę pierwszą leku D_L (ang.: *Loading Dose*) i wartości dawek podtrzymujących - D_M (ang.: *Maintenance Dose*) opisują zależności:

$$D_L = (C_{max} \times V_{d(area)}) / F$$

$$D_M = [V_{d(area)} \times (C_{max} - C_{min})] / F$$

Obliczanie średniego stężenia w stanie stacjonarnym - Cavg

Parametrami farmakokinetycznymi które charakteryzują wielokrotne podanie leku są w fazie stanu stacjonarnego stężenie minimalne Cmin, stężenie maksymalne Cmax, stężenie średnie Cavg oraz τ czyli interwał dawkowania leku. Stężenie średnie obliczamy z wzorów:

$$C_{avg} = F \times AUC / \tau$$

$$C_{avg} = F / Cl_{(b)} \times D / \tau$$

$$C_{avg} = (F \times D) / (V_d \times \beta \times \tau)$$

$$C_{avg} = e^{(LnCmax + LnCmin) / 2}$$

Cavg - stężenie średnie w stanie stacjonarnym
F - dostępność biologiczna
t - interwał dawkowania
Cl(b) - klirens totalny
Vd - objętość dystrybucji

Stężenie maksymalne i minimalne przy wielokrotnym podaniu leku obliczamy z wzorów:

$$C_{max} = C_o \times [1 / (1 - e)^{-\beta\tau}]$$

$$C_{min} = C_o \times [e^{-\beta\tau} / (1 - e)^{-\beta\tau}]$$

Co - stężenie początkowe
e - podstawa logarytmu naturalnego
β - stała szybkości eliminacji
τ - interwał dawkowania

Zależność pomiędzy wymienionymi wartościami ilustruje formuła:

$$C_{min} = C_{max} \times e^{-\beta\tau}$$

Oraz stopień rozproszenia - DF (ang.: *Degree of Fluctuation*; PTF - *Peak Trough Fluctuaction*) obliczany z wzoru:

$$DF = [(C_{max} - C_{min}) / C_{avg}] \times 100\%$$

Parametr ten stanowi jeden z elementów badań porównawczych leków w trakcie określania biorównoważności dla wielokrotnego podania preparatów leczniczych (USF NF, 2002). Wartości rozproszenia dla podania wielokrotnego leku obliczyć można także poprzez wyrażenie wartości pól nad i pod Cavg. Stosunek ten wyrażają w takich obliczeniach pola powierzchni a parametr określa się jako procent fluktuacji stężenia wyrażony polem powierzchni pod krzywą - AUCF (ang.: *Percent Fluctuation of the Concentrations Determined From AUC*).

$$AUCF = [AUC_{(nad\ Cavg)} + AUC_{(pod\ Cavg)}] / AUC$$

W przypadku gdy chcemy określić dawkę lub interwał dawkowania przy wielokrotnym podaniu leku, można skorzystać z formuł zawierających informacje o dystrybucji eliminacji i biodostępności leku.

$$D = (C_{eff} \times Vd \times \beta \times \tau) / F$$

Obliczanie interwału dawkowania przy wielokrotnym podaniu leku - τ

$$\tau = (F \times D) / (C_{eff} \times Vd \times \beta)$$

Ceff - stężenie efektywne, terapeutyczne etc.
D - dawka
F - biodostępność

Interwał dawkowania można także obliczyć korzystając z informacji dotyczących stężenia minimalnego i maksymalnego:

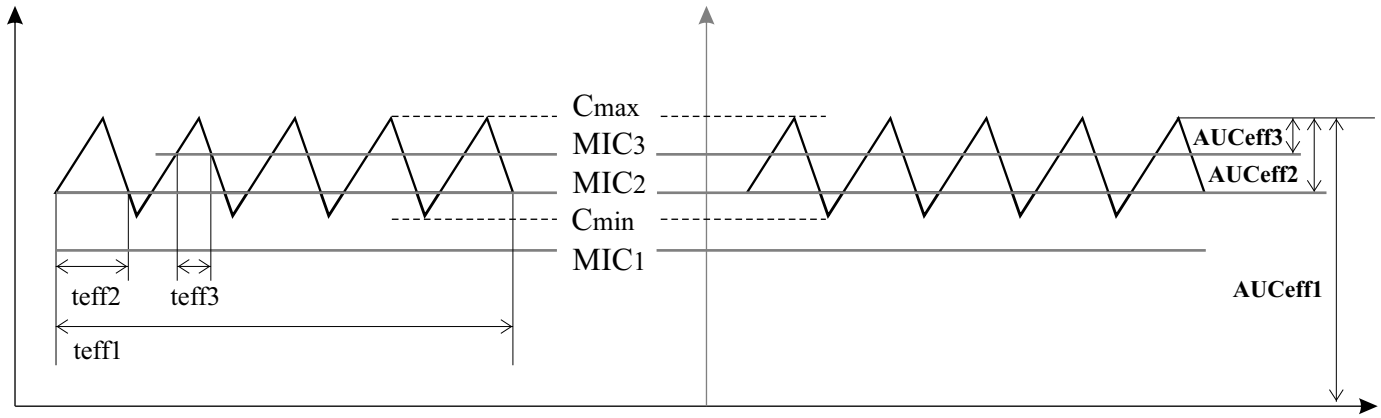
$$\tau = 1.44 \times t_{1/2} \times Ln (C_{max} / C_{min})$$

Zależność między biologicznym okresem półtrwania leku a interwałem dawkowania opisuje między innymi kumulację leku i fluktuację stężeń.

$t_{1/2} = \tau$	umiarkowana kumulacja oraz fluktuacja
$t_{1/2} < \tau$	brak kumulacji, niska fluktuacja
$t_{1/2} > \tau$	duża kumulacja i znaczna fluktuacja

Wielokrotne podawanie leku zmierza do przekroczenia lub osiągnięcia stężenia efektywnego. Schemat dawkowania w przypadku chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych wyraża stosunek AUC do wartości MIC dla danego drobnoustroju oraz inne reguły PK/PD.

Pole powierzchni nad prostą wyznaczającą w tym wypadku stężenie MIC odpowiada dawce leku która wywoła pożądany efekt terapeutyczny. Kolejnym parametrem który opisuje schemat dawkowania i jego skuteczność jest czas w którym wartość CE zostaje osiągnięta. Czas ten podobnie jak pole powierzchni nad MIC może mieć dwojaki wymiar. Dla terapii przeprowadzonej w danym czasie może stanowić zbiór odcinków. Można wtedy zanotować przedziały czasu w których stężenie leku spada poniżej wartości MIC. Może on zachować ciągłość w trakcie całej prowadzonej terapii. Wtedy w trakcie podawania leku aż do zakończenia terapii nie istnieją wartości stężenia leku niższe od wartości stężenia efektywnego -MIC. Obie wartości mogą dla danego leku i jego modyfikacji stanowić obiekt porównania.



Rys. Porównanie wartości czasu trwania stężenia efektywnego (teff) oraz pola powierzchni powyżej wartości stężenia efektywnego (AUCeff) dla trzech wartości tego stężenia (MIC).

Klirens kreatyniny i korekcja dawkowania

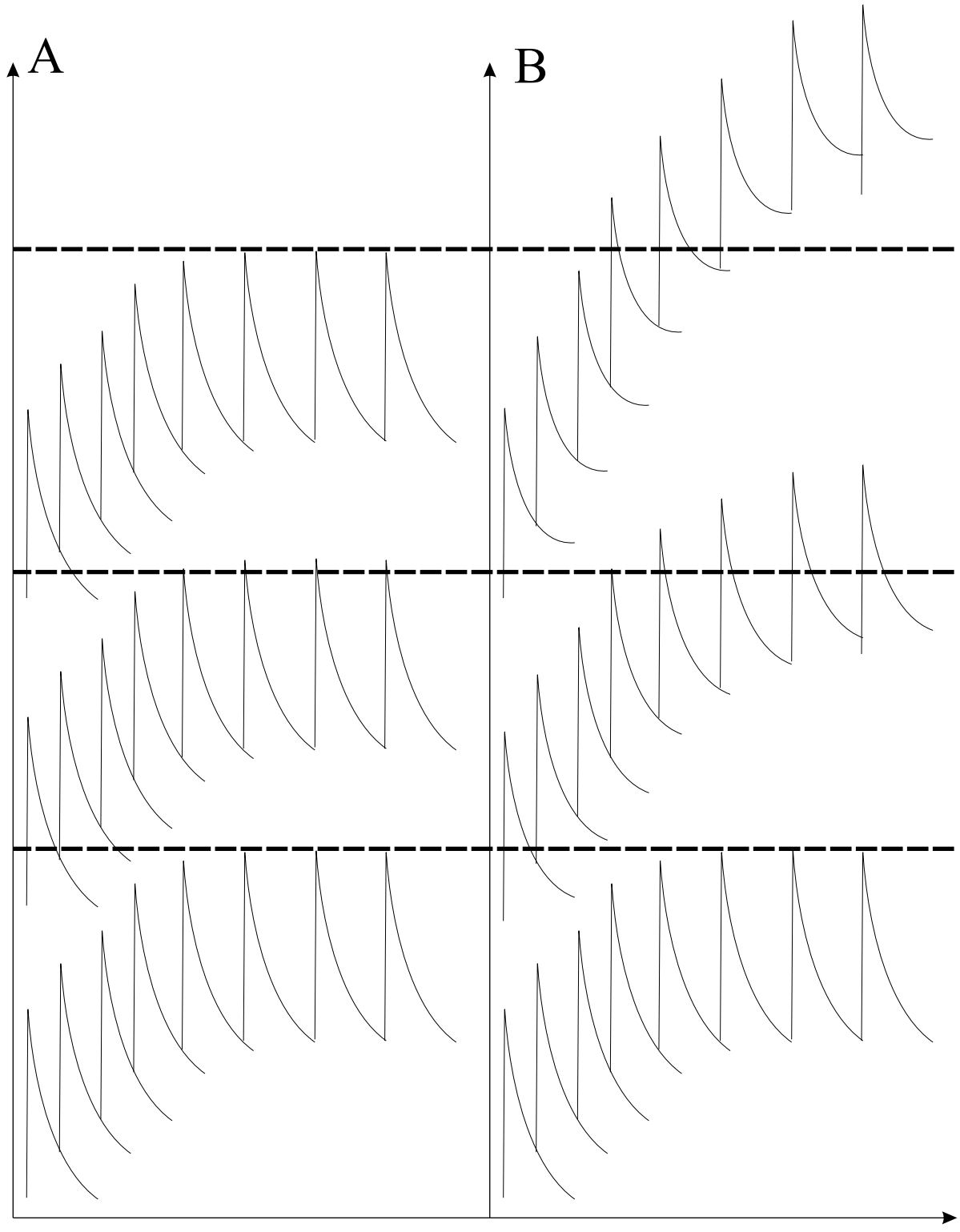
Określanie dawkowania leku dla indywidualnych pacjentów może ulegać modyfikacjom w zależności od szybkości wydalania leku. Jeżeli szybkość ta rośnie lub maleje najczęściej związane jest to z dysfunkcją organu lub określonego toru metabolicznego. Wartość klirensu dla podania wielokrotnego leku obliczamy z wzoru:

$$\mathbf{Cl_{(b)} = (D / \tau) / C_{avg}}$$

Cavg - stężenie średnie w stanie stacjonarnym
τ - interwał dawkowania

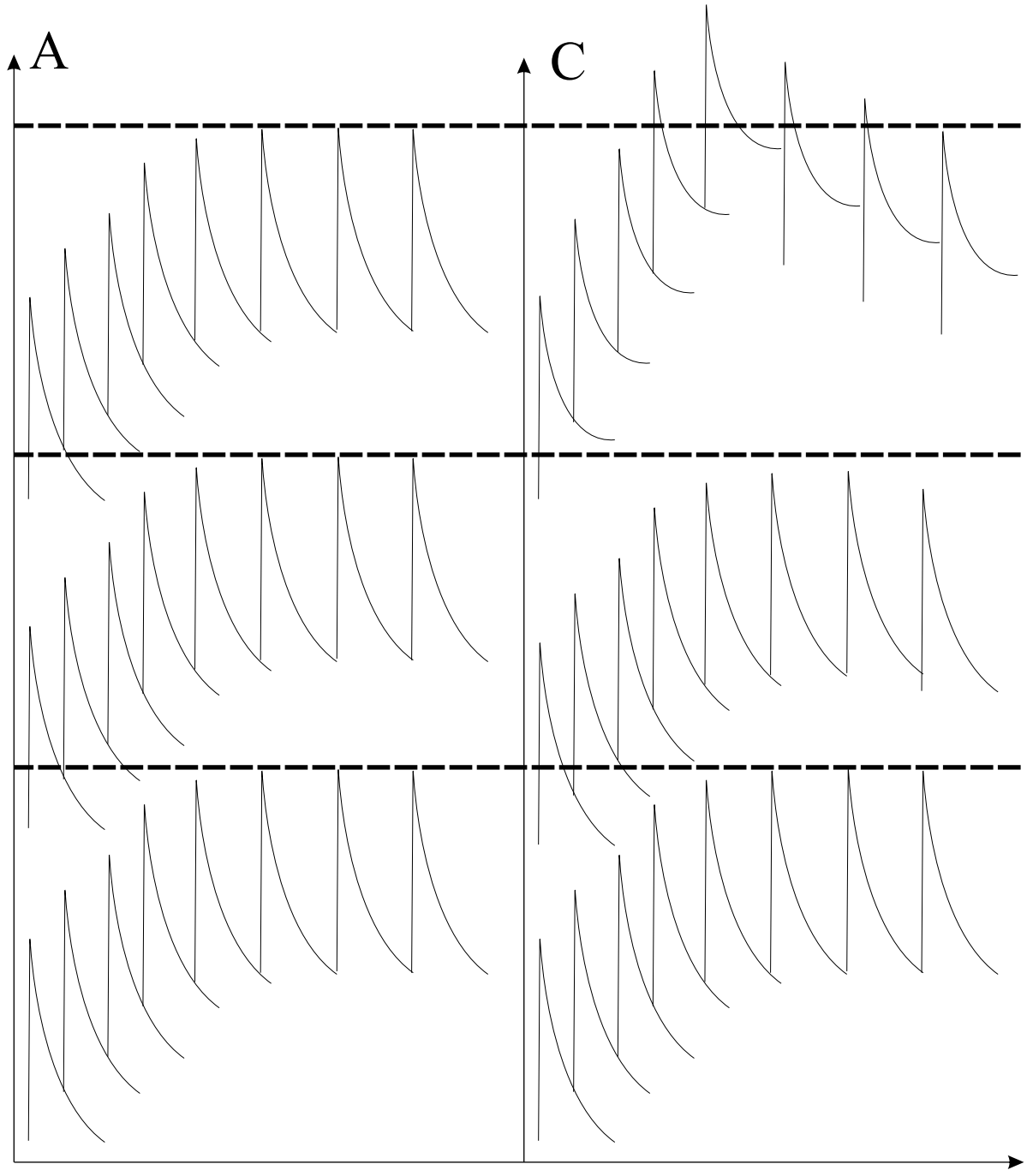
W przypadku leków wydalanych częściowo lub w całości przez nerki wykryto wysoką korelację pomiędzy klirensem kreatyniny a stałą szybkości eliminacji dla wielu leków. Zależność ta ma charakter liniowy co oznacza że ze zmniejszeniem klirensu kreatyniny szybkość eliminacji dla leku spada. W takiej sytuacji rośnie wartość okresu półtrwania. Aby zapobiec kumulacji leku w organizmie i prowadzić terapię w granicach stężeń terapeutycznych leku, dla potrzeb obliczania nowej dawki oblicza się nową wartość β. Substancje które wydalane są przez nerki w sytuacji gdy mocz nie jest wydalany (anuria) i klirens kreatyniny równy jest zero, nie są wydalane z ustroju.

Podanie wielokrotne leku nie zawsze ilustrowane jest za pomocą procesów liniowych. Współczynnik kumulacji obliczony w sposób prawidłowy a więc na podstawie wartości uzyskanych w fazie *steady state* również nie musi wykazywać zależności liniowej w odniesieniu do dawki.



Ryc. A - liniowa zależność pomiędzy wartością dawki (D) a współczynnikiem kumulacji (R). B - nieliniowa zależność pomiędzy wartością dawki a współczynnikiem kumulacji (rosnąca kumulacja wraz z dawką).

Jednym z ciekawszych efektów związanych z nieliniową kinetyką akumulacji po podaniu wielokrotnym leku jest spadek stężenia maksymalnego w fazie *steady state*. Typowym przykładem takiej kinetyki jest kinetyka akumulacji karbamazepiny w przypadku której Cmax w *steady state* przyjmuje wartości niższe niż po podaniu pierwszej dawki. przyczyną tego efektu jest autoindukcja enzymatyczna.



Ryc. A - liniowa zależność pomiędzy wartością dawki (D) a współczynnikiem kumulacji (R). C - nieliniowa zależność pomiędzy wartością dawki a współczynnikiem kumulacji malejąca kumulacja wraz ze wzrostem dawki).

Obliczanie dawki na podstawie parametrów farmakokinetycznych

Aby uzyskać stężenie leku w docelowej tkance na wymaganym poziomie lek najczęściej podaje się wielokrotnie. Powoduje to zwiększenie stężenia leku do oczekiwanego poziomu w czasie gdy poprzednia dawka leku poddana została częściowej eliminacji. W ten sposób obserwując stężenie leku we krwi można monitorować atypowy przebieg kinetyki. Stężenia te usytuowane są w granicach określonych jako Cmax i Cmin. W chwili obecnej dawkę leku podaje się najczęściej jako ilość leku na 1 kilogram masy ciała lub w przeliczeniu na powierzchnię ciała - na 1 metr kwadratowy ciała - BSA (ang.: *Body Surface Area*). Taki sposób obliczania dawki jest bowiem znacznie bardziej skorelowany z fizjologicznymi funkcjami organizmu w obrębie gatunku. Obliczanie dawki:

Na podstawie żądanego średniego stężenia leku we krwi:

$$D = (Vd \times C_{avg} \times \tau) / (1.44 \times t_{1/2} \times F)$$

Vd -objętość dystrybucji
Cavg - średnie stężenie leku we krwi
τ - interwał dawkowania
F - dostępność biologiczna (dla podania donaczyniowego = 1)

Wzór pozwala obliczyć dawkę leku jaką należy podać aby w stanie stacjonarnym uzyskać żądane średnie stężenie leku we krwi.Na podstawie żądanego minimalnego (lub efektywnego) stężenia leku we krwi:

$$D = [Vd \times CE \times (1 - e^{-\beta\tau})] / (e^{-\beta\tau} \times F)$$

CE - stężenie efektywne leku we krwi (np. MIC)
e - podstawa logarytmu naturalnego

Wzór pozwala obliczyć dawkę leku jaką należy podać aby w stanie stacjonarnym uzyskać żądane stężenie efektywne (CE) leku we krwi. Dla niektórych leków wymagane są jednak specyficzne sposoby dawkowania oparte na obserwacji procesu transportu do kompartmentu docelowego. Przykładem tak modyfikowanego dawkowania jest podawanie leków zawierających związki żelaza. Dla człowieka dawkę taką obliczamy z wzorów.

$$D_{(Fe)} = BW \times 0.66 \times \text{wartość niedoboru Hb}$$

D(Fe) - dawka żelaza (g)
BW - masa ciała
Hb - hemoglobina (g)

Niektóre leki wymagają szczególnych zmian w dawkowaniu. Zmiany stałej szybkości eliminacji można zastosować do obliczenia nowej wartości dawki, na podstawie nietypowej stałej szybkości.

$$D_{(n)} = (D \times \beta) / \beta_{(n)}$$

D - dawka typowa
D(n) - nowa dawka
β - stała szybkości eliminacji
β(n) nietypowa stała szybkości eliminacji

Lub odnosząc się do wartości klirensu:

$$(D / \tau)_{(n)} = [(D / \tau) \times Cl] / Cl_{(n)}$$

D / τ - dawka typowa (D / τ) = DR
D / τ (n) - nowa dawka
Cl - stała szybkości eliminacji
Cl(n) nietypowa wartość klirensu

Podobne skalowanie przeprowadza się w stosunku do obliczeń dawki dla dzieci (Comstock T.J. 2002).

$$\tau_{(Ad)} / \tau_{(Ch)} = t_{1/2(Ad)} / t_{1/2(Ch)}$$

$$\tau_{(Ch)} = \tau_{(Ad)} / (t_{1/2(Ad)} / t_{1/2(Ch)})$$

τ(Ad) - interwał dawkowania dla dorosłego
τ(Ch) - interwał dawkowania dla dziecka
t1/2(Ad) - okres półtrwania w organizmie dorosłego
t1/2(Ch) - okres półtrwania w organizmie dziecka

lub

$$D_{(Ch)} = D_{(Ad)} / [(Wiek_{(Ch)} + 12) / 3]$$

D(Ad) - dawka dla dorosłego
D(Ch) - dawka dla dziecka
Wiek(Ch) - wiek dziecka (w latach)

Farmakokinetyka wlewu donaczyniowego

Wlew donaczyniowy najczęściej opisywany jest jako wlew dożylny. Dotyczy tych spośród leków których stężenie terapeutyczne trudne jest do utrzymania stosując inne metody dawkowania. Wlew donaczyniowy i jego opis kinetyczny jest ściśle związany z wartościami szybkości wlewu - ko oraz czasu trwania wlewu - T.

$$\mathbf{K_o = D / T}$$

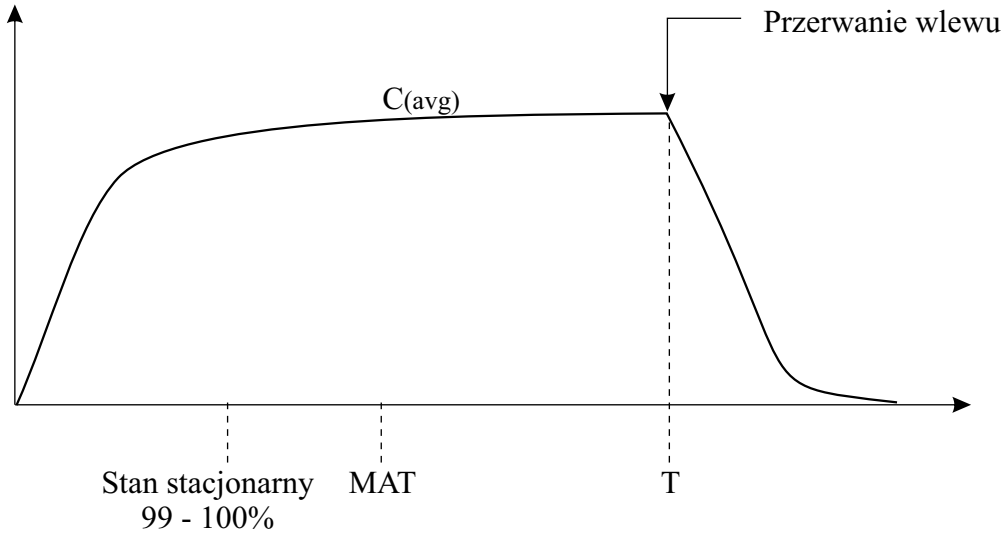
Ko - stała szybkości wlewu
D - dawka
T - czas trwania wlewu

Maksymalny czas trwania wlewu jest zależny miedzy innymi od rozpuszczalności w osoczu, szybkości przepływu krwi i dawki leku (Bittner B., Mountfield R.J. 202):

$$\mathbf{T_{(max)} = D / S(p) \times VPFR}$$

T(max) - maksymalny czas trwania wlewu
D - dawka
S(p) - rozpuszczalność w osoczu
VPFR - szybkość przepływu krwi żylnej (ang.: *Venous Plasma Flow Rate*)

Stała ta odnosi się do procesów zerowego rzędu. Ten sposób dawkowania substancji leczniczych dotyczy nie tylko substancji o silnie wyrażonym efekcie farmakologicznym ale także substancji zmieniających fizykochemiczny skład krwi, funkcje łożyska naczyniowego i dalej powodujące oczekiwany efekt terapeutyczny. Krzywa C - T wlewu donaczyniowego jest podobna do krzywej uzyskanej w drodze podania wielokrotnego leku. Jednak fazę narastania stężenia leku do przedziału ustalonych zmian stężenia leku we krwi zastępuje tutaj krzywa odpowiadająca jednocześnie Cmin, Cmax i Cavg. Podanie to charakteryzuje brak wahań stężenia wynikających z podawania kolejnych dawek leku. Stąd sposób obliczania stężenia średniego, a więc stężenia w stanie stacjonarnym związanego z współczynnikiem kumulacji i wartością klirensu.



Rys. Charakter krzywej C - T dla przypadku wlewu donaczyniowego.

$$C_{avg} = R / Cl$$

lub

$$C_{ss} = K_o / (Vd \times \beta)$$

Dla przypadku w którym wlew donaczyniowy przerwany zostanie przed osiągnięciem stanu ustalonego stężenie maksymalne obliczamy z wzoru:

$$C_{max} = [K_o \times (1 - e^{-\beta \times T})] / (Vd \times \beta)$$

Czas trwania wlewu (czas do momentu jego zakończenia) jest ważnym wskaźnikiem wykorzystywanym między innymi przy obliczaniu wartości średniego czasu absorpcji oraz objętości dystrybucji.

$$MAT_{inf} = T / 2$$

natomiast

$$MRT_{inf} = MRT_{iv} + (T / 2)$$

$$MTT = AUC / C_{(avg)}$$

$$Vd_{(ss)inf} = [(K_o \times T \times AUMC) / AUC^2] - [(K_o \times T^2) / (2 \times AUC)]$$

lub

$$Vd_{inf} = (K_o \times T) / (\beta \times AUC)$$

Pole powierzchni pod krzywą dla wlewu donaczyniowego obliczamy z formuły:

$$AUC_{inf} = (K_o \times T) / (Vd \times \beta)$$

Stąd wartość klirensu równa jest.

$$Cl_{inf} = (K_o \times T) / AUC$$

Różnice międzygatunkowe w farmakokinetyce

Duża część badań farmakokinetycznych prowadzona jest na zwierzętach. Dotyczy to zarówno zwierząt hodowlanych, użytkowych jak i zwierząt laboratoryjnych. Badania te prowadzone są w różnym celu i zakresie.Celem prowadzonych badań jest często uzyskanie modelu na podstawie którego można symulować kinetykę badanej substancji w organizmie człowieka. Zakres tego typu badań i analiz porównawczych jest obecnie niezwykle szeroki. Przeniesienie wyniku analizy farmakokinetyki leku z jednego gatunku na inny jest jednak często dość kłopotliwe i wymaga zastosowania metod skalowania allometrycznego. Przenoszenie danych kinetycznych w obrębie dwóch modeli charakteryzujących się różnicą gatunkową dotyczy obecnie wszystkich dróg podania. Nową ścieżką dla badań prowadzonych na zwierzętach jest podanie kasetowe. Odpowiednikiem tego typu działań w badaniach prowadzonych na człowieku jest farmakokinetyka leków podawanych w drodze mikrodawkowania. Problem różnic międzygatunkowych można nieco zminimalizować poprzez stosowanie układów *in vitro*, hodowli komórkowych badań *in situ* etc.. Badając kinetykę leku w sposób wybiórczy, poprzez fragmentaryczną analizę poszczególnych faz i zjawisk kinetycznych na modelu zwierzęcym można uniknąć znacznej kumulacji popełnianego błędu.

Różnice międzygatunkowe wynikają zarówno z anatomii całego organizmu, poszczególnych organów jak i fizjologii zwierząt i człowieka. Jest wiele przyczyn które przyczyniają się do zaistnienia błędu w skalowaniu i ocenie zjawisk jakim lek ulega w organizmie człowieka na podstawie modelu zwierzęcego. Istotą tych różnic są głownie różnice w:

- w budowie błon biologicznych
- w wiązaniu leków z białkami
- w charakterystyce zjawisk transportu
- ekspresji białka P-gp
- różna charakterystyka anatomiczna i różna fizjologia pracy przewodu pokarmowego
- różna charakterystyka metaboliczna
- fizjologii wydzielania żółci, mleka, potu etc.
- anatomiczne i fizjologiczne funkcji nerek
- różnice w pH porównywanych przestrzeni
- różnice ilościowe i jakościowe składu płynów ustrojowych
- różnice w wartości przemiany podstawowej
- różnice w funkcji układu krążenia, perfuzji tkanek
- różnice w masie i powierzchni ciała, odżywianiu
- różnice w masie i objętości treści przewodu pokarmowego
- różnice w rytmach dobowych
- różna zmienność badanej cechy w obrębie populacji

Mimo tak wielu różnic i błędów na które narażony jest transfer danych z modelu zwierzęcego na człowieka, nadal jest to jedno z najcenniejszych źródeł danych o kinetyce leku w fazie przedklinicznej. Analiza kinetyki leków na modelu zwierzęcym nie jest jednak jedynie źródłem danych PK służącym ewentualnej analizie danych PK człowieka. Badania farmakokinetyki leków na modelu zwierzęcym pozwala na transfer danych na inne gatunki zwierząt, nieraz naprowadzając na nowe rozwiązania optymalizacji PK leku. W przypadku badań farmakokinetycznych leków stosowanych u zwierząt często obserwowane są również różnice rasowe. Różnice te mają duże znaczenie z uwagi na świadomą ochronę cech zwierząt rasowych w procesie hodowli. Pozwala to na badanie kinetyki leku w obrębie gatunku w grupie wyselekcjonowanych wysoko rasowych zwierząt. Ekstrapolacja metodami skalowania allometrycznego kompletnych profili farmakokinetycznych leków zastosowanych na modelach zwierzęcych może wiec stanowić zadanie niezwykle trudne. Szczególnie w przypadku opisu różnic rasowych w obrębie gatunku i próbach skalowania profilu PK na inny gatunek zwierzęcia. Skalowanie pomiędzy gatunkami jest ułatwione w przypadku wykrycia wyraźnych podobieństw w np sposobie odżywiania, profilu metabolicznym, lub innych cechach (człowiek- szczur - świnia - pies - małpa). Duże różnice w fizjologii dwóch gatunków najczęściej dyskwalifikują uzyskane wyniki lub obciążają je znacznym błędem (ssaki - ptaki).

Przykładem różnicy wynikającej z perfuzji tkanek płynami ustrojowymi w zależności od gatunku jest porównanie perfuzji wątroby i mózgu.

Mózg = (B(FBR) / CSF(F)) x BrW **Wątroba = [(B(FH) / (BI(F)) x HW] x 8.045977**

Nerki = [(B(FK) / (U(F)) x KW] x 182.102

B(FBR) - szybkość przepływu krwi przez mózg (ml/min)
B(FBH) - szybkość przepływu krwi przez wątrobę(ml/min)
B(FK) - szybkość przepływu krwi przez nerki (ml/min)
CSF(F) - szybkość przepływu płynu mózgowo rdzeniowego (ml/h)
BI(F) - szybkość przepływu żółci (ml/dzień)
U(F) - szybkość przepływu moczu (ml/dzień)
BrW - masa mózgu
HW - masa wątroby
KW - masa nerek
8.045977 - mnożnik zastosowany w celu zrównania wartości stosunku do wartości obliczonych dla mózgu
182.102 - mnożnik zastosowany w celu zrównania wartości stosunku do wartości obliczonych dla mózgu

	mysz	*szczur*	*małpa(Rhesus)*	*człowiek*
Mózg	9.2	13.0	2592.0	50 000.0
Wątroba	12.7	49.3	2104.8	50 000.0
Nerki	75.8	67.0	1675.3	50 000.0

Dozymetria i skalowanie allometryczne w farmakokinetyce

Badania allometryczne często stanowią podstawę do prowadzenia badań farmakokinetycznych oraz skalowania PK w obrębie rożnych gatunków zwierząt (Vocci F., Farber T. 1988). W przypadku jednego gatunku pozwalają między innymi określać zależności pomiędzy poszczególnymi cechami fizjologicznymi a budową anatomiczną organizmu. Największą dokładność skalowania zwykle uzyskuje się w stosunku do leków, których metabolizm wątrobowy jest przepływozależny (Dixit R. i wsp. 2003). Podstawowe równanie stosowane do wyprowadzania zależności allometrycznych to równanie potęgowe (Dedrick R.L. 1999; Gabrielsson J., Weiner D. 2000):

$$Y = a \times BW^{b}$$

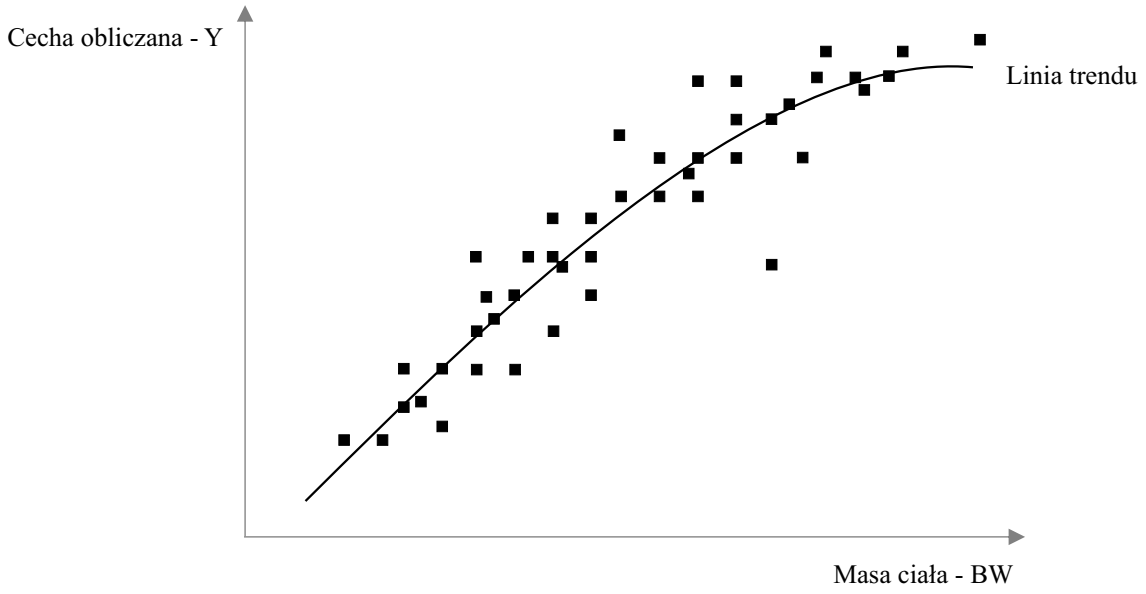
Y - parametr badany (klirens, masa organu, powierzchnia ciała itp.)
a, b - stałe
BW - masa ciała (jeżeli określa się zależność w stosunku do tej cechy)

Opisuje ono przebieg danych w klasycznym układzie współrzędnych w skali logarytmicznej. Równania allometryczne dotyczące skalowania parametrów farmakokinetycznych ze zwierząt na człowieka mają zwykle postać:

$$PK_H = PK_A \times (BW_H / BW_H)^{b}$$

PKH - wartość parametru u człowieka
PKA - wartość parametru u zwierzęcia
BWH - masa ciała człowieka
BWA - masa ciała zwierzęcia
b - stała

Stałe - wykładniki potęg w wymienionych równaniach dzielą się na trzy różne typy. Skalowanie parametrów dotyczących czasu na przykład okresu półtrwania w fazie eliminacji to wykładnik równy 0.25. Skalowanie parametrów dotyczących objętości na przykład objętości dystrybucji to wykładnik równy 1.0. Skalowanie parametrów dotyczących stałych szybkości wykonywane jest przy wykładniku równym 0.75 (Jang G.R. i wsp. 2001).



Rys. Badanie trendu zależności na podstawie danych doświadczalnych w skalowaniu allometrycznym.

Dane takie mogą być przedstawiane nie tylko za pomocą równania potęgowego. Zależności dla badanych związków mogą przedstawiać równania:

Wykładnicze: $Y = a \times 2.71^{b \times BW}$

Liniowe: $Y = a \times BW + b$

Logarytmiczne: $Y = a \times Ln(BW) + b$

Wielomianowe: $Y = a \times BW^2 + b \times BW + c$

Analiza allometryczna niektórych parametrów fizjologicznych o szczególnym znaczenia dla kinetyki leków ma duże znaczenie w fazie badań przedklinicznych. Działania dotyczące skalowania parametrów fizjologicznych w farmakokinetyce dotyczą najczęściej takich zjawisk jak:

- określenie stosunku masy ciała do parametrów charakteryzujących eliminację leków (ER, Cl, GFR etc.)
- opisu pracy układu krążenia (parametry pracy serca, cyrkulacja krwi w organizmie)
- przepływu krwi przez wybrane tkanki (nerki, wątroba, mózg)
- zależności między masą ciała lub PK a masą wybranych narządów lub tkanek
- szybkości wentylacji płuc
- zmian objętości wybranych przestrzeni kinetycznych - kompartmentów i ich korelacji z wybranymi parametrami kinetyki leków (Vd)

W przypadku analizy farmakokinetyki leków podawanych wziewnie jednym z parametrów analizy przy przenoszeniu dawkowania z gatunku na gatunek jest wartość wentylacji płuc - I (ang.: *Inhalation Ratio*) wyrażona w m^3/dzień.

$I = 0.4089 \times BW^{0.77}$ dla ptaków $I = 0.5458 \times BW^{0.8}$ dla ssaków

Bardzo ważne w skalowaniu parametrów farmakokinetycznych są również różnice dotyczące spożycia pokarmu FI (ang.: *Food Ingestion*) wyrażone w kg suchej masy na dzień, oraz wody WI (ang.: *Water Ingestion*) wyrażone w litrach na dzień.

$WI = 0.059 \times BW^{0.67}$ dla ptaków $FI = 0.582 \times BW^{0.651} \times 5$

$WI = 0.099 \times BW^{0.9}$ dla ssaków $FI = 0.687 \times BW^{0.822} \times 5$

Określono wiele innych zależności umożliwiających skalowanie zarówno w toksykokinetyce jak i farmakokinetyce.

$BV = 65.6 \times BW^{1.02}$ $HW = 5.8 \times BW^{0.98}$ $HR = 241 \times BW^{-0.25}$

$BCT = 17.4 \times BW^{0.25}$ lub $BCT = 21 \times BW^{0.21}$

$LuW = 11.3 \times BW^{0.98}$ $LW = BW^{0.87}$ $KW = BW^{0.85}$ $RR = 53.5 \times BW^{-0.26}$

$MW = 0.4 \times BW^{1.0}$ $Fb = 0.033 \times BW^{1.5}$ $SM = 0.0608 \times BW^{1.083}$ $SM_B = 0.065 \times BW^{1.07}$

$$MBW = 0.01 \times BW^{0.7}$$

$$TM = BW - [(0.01 \times BW^{0.7}) + (0.0608 \times BW^{1.08})]$$

$$TMb = BW - [(0.01 \times BW^{0.7}) + (0.0608 \times BW^{1.08}) + (65.6 \times BW^{1.02})]$$

BV - objętość krwi (ang.: *Blood Volume*)
HW- masa serca (ang.:*Heart Weight*)
KW- masa nerek (ang.: *Kidney Weight*)
HR - częstotliwość pracy serca (ang.:*Heart Rate*)
BCT- szybkość krążenia krwi (ang.: *Blood Circulation Time*)
LuW- masa płuc (ang.: *Lung Weight*)
LW- masa wątroby (ang.:*Liver Weight*)
RR- szybkość oddechu (ang.:*Respiratory Rate*)
MW- masa mięsni (ang.:*Muscle Mass*)
Fb - masa tłuszczu u ptaków (ang.:*Fat Mass*)
SM - masa kości (ang.:*Sceletal Mass*)
SMB - masa kości (ang.:*Sceletal Mass of Birds*)
MBW- masa mózgu u ssaków (ang.:*Mammalian Brain Weight*)
TM - masa tkanek z pominięciem mózgu i kości (ang.:*Tissue Mass*)
TMb - masa tkanek z pominięciem mózgu, kości, i krwi (ang.:*Tissue Mass*)

Obliczenia allometryczne mogą być podstawą do porównywania wartości klirensu, przepływu krwi przez nerki czy objętości dystrybucji (Obach R.S. i wsp. 1997).

$$Q_n = Q \times (BW_n / BW)^{0.75}$$

Q - przepływ krwi przez nerki
Qn - przepływ krwi nietypowy
BW - masa ciała
BWn - masa ciała nietypowa

$$Vd_n = Vd \times (BW_n / BW)^{1.0} \qquad Vd_{(h)} = fu_{(h)} \times Vd_{(a)} / fu_{(a)}$$

Vd - objętość dystrybucji
Vdn - objętość dystrybucji nietypowa
Vd(h) - objętość dystrybucji leku u człowieka
Vd(a) - objętość dystrybucji leku u zwierzęcia
fu(h) - frakcja wolna leku u człowieka
Fu(a) - frakcja wolna leku u zwierzęcia
BW - masa ciała
BWn - masa ciała nietypowa

Coraz częściej w ramach skalowania allometrycznego objętości dystrybucji u ssaków stosuje się parametr o znacznym stopniu korelacji z masą ciała - frakcjonowaną objętość dystrybucji Vd(f) (ang.: *Fractal volume of Distribution*)(Karalis V. i wsp. 2001). Parametr ten obliczamy korzystając z formuły:

$$Vd_{(f)} = (BW - Vd_{(p)}) \times [((Vd - Vd_{(p)}) / Vd) + Vd_{(p)}]$$

lub z uwzględnieniem organów o szczególnej predylekcji do leku:

$$Vd_{(f)} = OW \times [((Vd - Vd_{(p)}) / Vd) + Vd_{(p)}]$$

Vd(f) - frakcjonowana objętość dystrybucji
Vd(p) - objętość dystrybucji leku w osoczu
Vd - obliczona objętość dystrybucji (pozorna)
BW - masa ciała (1kg = 1 l)
OW - masa organu (1kg = 1 l)

$$Cln = Cl \times (BWn / BW)^{0.75}$$

Cl - klirens
Cln - klirens nietypowy
BW - masa ciała
Bwn - masa ciała nietypowa

$$Cl_{(in)} = 5.359 \times BW^{0.72} \quad \text{lub} \quad Cl_{(in)} = BW^{0.77}$$

$$Cl_{(SCR)} = BW^{0.69} \qquad Cl_{(PAH)} = BW^{0.8}$$

Cl(in) - klirens inuliny
Cl(SCR) - klirens kreatyniny
Cl(PAH) - klirens p-aminohipuranu Na

Skalowanie klirensu leków ze zwierząt na organizm człowieka ma duże znaczenie dla leków które wydalane są głównie wraz z moczem. Skalowanie to przeprowadza się nie wykluczając zjawiska aktywnego wydzielania kanalikowego, wchłaniania zwrotnego oraz filtracji kłębkowej (Mahmood I. 1998). Jedną z prób allometrycznej interpretacji współczynnika korekcyjnego służącego normalizacji wartości klirensu dla różnych gatunków stanowi równanie:

$$(GFR \times RBF) / (BW \times KW)$$

KW - masa nerek (ang.: *Kidney Weight*)
RBF - przepływ krwi przez nerki (ang.: *Renal Blood Flow*)
GFR - szybkość filtracji kłębuszkoweji (ang.: *Glomelural Filtration Rate*)

W chwili obecnej duże znaczenie przypisuje się współczynnikowi GFR / ECV w przypadku normalizacji wartości klirensu u dzieci do lat 6 (Peters A.M. i wsp. 1994) W celu obliczenia klirensu normalizowanego wyprowadzono równania zależne od złożoności procesów eliminacji (Hu T.M., Hayton W.L. 2001).

Dla leków wydalanych głównie drogą nerkową:

$$Cl = 0.65 \times BW + 0.008$$

Dla leków wydalanych w drodze metabolizmu ekstensywnego:

$$Cl = 0.75 \times BW + 0.033$$

Dla leków wydalanych zarówno drogą nerkową jak i w drodze metabolicznej:

$$Cl = 0.76 \times BW - 0.007$$

Na podstawie porównania wielu ksenobiotyków eliminowanych w różnym stopniu drogą nerkową oraz w wyniku przemian metabolicznych określono zależność między wartością klirensu a masą ciała:

$$Cl = 0.74 \times BW + 0.015$$

Cześć parametrów farmakokinetycznych a w tym także klirens z różnym powodzeniem próbuje się korelować z masą mózgu. Badany jest przy tym współczynnik Cl / BRW (ang.: *Brain Weight*). W przypadku analizy allometrycznej klirensu leków proponuje się trzy rodzaje punktu odniesienia do przeprowadzenia obliczeń. Są to masa mózgu, MLP i masa ciała. Mahmood sformułował zasadę eksponencjałów która opisuje która metoda (Cl x MLP i Cl x BW lub BW) daje dokładniejsze wyniki na podstawie analizy parametrów zwierząt (Mahmood I. i wsp. 2006).

Zasada eksponencjałów mówi o tym iż w przypadku gdy eksponencjały stosowane w równaniu wahają się między 0.55-0.7 najlepszą metodą skalowania klirensu jest proste równanie allometryczne (BW). W przypadku gdy eksponencjały stosowane w równaniu wahają się między 0.71-0.9 najlepszą metodą skalowania klirensu jest metoda Cl x MLP. W przypadku gdy eksponencjały stosowane w prostym równaniu (BW) są wyższe lub równe 1 najlepszą metodą skalowania klirensu jest metoda Cl x BW. W przypadku gdy eksponencjały stosowane w prostym równaniu (BW) są wyższe lub równe 1.3 wynik skalowania klirensu ze zwierzęcia na człowieka jest zwykle znacznie zawyżony. W przypadku gdy eksponencjały stosowane w prostym równaniu (BW) są niższe od 0.55 wynik skalowania klirensu ze zwierzęcia na człowieka jest zwykle znacznie zaniżony. Badania allometryczne pozwalają na przeprowadzanie skalowania wobec parametrów opisujących fizjologię organizmu zarówno w ramach kinetyki liniowej jak i nieliniowej. Przykładem skalowania parametrów kinetyki nieliniowej jest kinetyka etanolu. Obliczenia przeprowadzone zostały na podstawie danych dotyczących owiec, człowieka, królika, szczura i małp (Tannenbaum S.J., Mayersohn M. 2001).

$$\mathbf{Vd = 0.766 \times BW^{0.977}} \qquad \mathbf{V_{max} = 0.514 \times BW^{-0.184}}$$

$$\mathbf{Cl_{(int)} = 103.85 \times BW^{0.96}} \qquad \mathbf{Km = 0.0885 \times BW^{-0.239}}$$

Vd - objętość dystrybucji
Vmax - szybkość reakcji
Km - stała Michaelis'a
Cl(int) - klirens wewnętrzny

Klirens ciała Clb wraz z szybkościa przepływu krwi przez organizm wyraża w skali całego organizmu tzw. współczynnik ekstrakcji ER. Współczynnik ekstrakcji zaś determinuje wartość dostępności biologicznej leku F.

$$\mathbf{ER = Cl / Q} \qquad \mathbf{F = 1 - ER}$$

O klirensie w skali całego organizmu decyduje wartość objętości wyrzutowej serca oraz współczynnika ekstrakcji. Wartość pojemności wyrzutowej można obliczyć dla wybranego gatunku ssaka dzięki odkryciu zależności pomiędzy tą wartością a masą ciała.

$$\mathbf{Qcar = 180 \times BW^{-0.19}} \quad \text{stąd} \quad \mathbf{Cl_{(b)} = (180 \times BW^{-0.19}) \times ER}$$

Znając współczynnik ekstrakcji w skali organizmu można więc obliczyć wartość klirensu dla różnych gatunków ssaków. Współczynnik ekstrakcji dla głównych organów eliminacyjnych przyjęto za:

duży $\geq$ 0.7 (eliminacja dotyczy ponad 70% leku)
średni = 0.3
mały $\leq$ 0.1

W skali całego organizmu przyjęto wartości współczynnika ekstrakcji dla leku równe:

duży $\geq$ 0.35 (eliminacja dotyczy ponad 35% leku)
średni = 0.15
mały $\leq$ 0.05

Założenia te w praktyce pozwalają na obliczenie wartości różnic w dawkowaniu przy zakładanej dawce efektywnej EC pomiędzy gatunkami ssaków na podstawie ich masy ciała oraz współczynnika ekstrakcji w skali organizmu.

$$\mathbf{D = EC \times 24 \times (Cl / 1\text{-}ER)}$$

	BW	ER = 0.35	ER = 0.15	ER = 0.05	D1	D2	D3
mysz	0.023	129	55	18	129.0	55.3	18.4
gerbil	0.067	105	45	15	105.3	45.1	15.0
chomik	0.15	90	39	13	90.3	38.7	12.9
goryl	0.2	86	37	12	85.5	36.7	12.2
szczur	0.25	82	35	12	82.0	35.1	11.7
świnka m.	0.85	65	28	9	65.0	27.8	9.3
królik	2.5	53	23	8	52.9	22.7	7.6
kot	3	51	22	7	51.1	21.9	7.3
małpa	5	46	20	7	46.4	19.9	6.6
pies	10	41	17	6	40.7	17.4	5.8
wilk szary	36	32	14	5	31.9	13.7	4.6
owca	50	30	13	4	30.0	12.8	4.3
człowiek	70	28	12	4	28.1	12.0	4.0
delfin	110	26	11	4	25.8	11.1	3.7
świnia	200	23	10	3	23.0	9.9	3.3
tygrys	260	22	9	3	21.9	9.4	3.1
niedz polarny	500	19	8	3	19.3	8.3	2.8
krowa	500	19	8	3	19.3	8.3	2.8
koń	650	18	8	3	18.4	7.9	2.6
wielbłąd	760	18	8	3	17.9	7.7	2.6
słoń	5000	12	5	2	12.5	5.4	1.8

Ryc. Symulacja różnic w dawkowaniu dla EC = 1 na podstawie róznych wartości współczynnika ekstrakcji w skali całego organizmu oraz masy ciała (D1 odnosi się do ER = 0.35).

Różnice pomiędzy ukrwieniem i perfuzją poszczególnych tkanek lub organów nie zawsze pozwala w prosty sposób przenieść wartość PK z jednego gatunku na inny.

	ukrwienie (ml/min)	mózg (g)	ml/min/g tkanki
mysz	0,46	0,36	1,3
gerbil	1,13	0,98	1,2
świnka morska	4,9	4,4	1,1
chomik	1,45	1,4	1,0
szczur	1,3	1,8	0,7
pies	45	80	0,6
człowiek	700	1500	0,5
owca	150	400	0,4

	ukrwienie (ml/min)	wątroba (g)	ml/min/g tkanki
gerbil	5,6	2,1	2,7
szczur	13,8	10	1,4
świnka morska	46	38	1,2
mysz	1,8	1,75	1,0
człowiek	1450	1500	1,0
pies	309	320	1,0
chomik	6,5	6,9	0,9
owca	1033	1600	0,6

	ukrwienie (ml/min)	nerki (g)	ml/min/g tkanki
chomik	36	2	18,0
gerbil	2,82	0,55	5,1
szczur	9,2	2	4,6
pies	216	50	4,3
świnka morska	36	8,8	4,1
mysz	1,3	0,32	4,1
człowiek	1240	310	4,0
owca	722	250	2,9

Metody skalowania allometrycznego wniosły do farmakokinetyki wiele cennych narzędzi i metod analizy. Jednym z praktycznych przykładów jest skalowanie pomiędzy parametrami uzyskanymi *in vivo* a *in vitro* (Kielhorn J. i wsp. 2005).

in vivo (H) = in vivo (R) x [in vitro (H) / in vitro (R)]

H - wchłanianie leku przez skórę u człowieka
R - wchłanianie leku przez skórę u szczura

W przypadku ras zwierząt dużych określono wiele zależności pomiędzy ich masą ciała a masą ważnych z punktu widzenia rozmieszczenia leku w organizmie organów (Martinez M. i wsp. 2006):

LnKW = 0.8482 x BW + 0.8703

LnLW = 0.9807 x BW + 1.0721

LnHW = 0.9783 x BW + 0.7603

LnBrW = 0.7033 x BW + 1.027

LnLiW = 0.8791 x BW + 1.471

KW - masa nerek
LW - masa płuc
HW- masa serca
BrW - masa mózgu
LiW - masa wątroby

Skalowanie allometryczne dawki

Szczególnie w fazie przedklinicznej często zachodzi potrzeba obliczenia dawki całkowitej dla danego gatunku przy braku informacji na temat wielkości takiej dawki. W takim wypadku można posłużyć się informacjami na temat wartości dawki całkowitej u innego gatunku. Dane do przeliczenia stanowią wartość jednej z dawek i masy ciała obu gatunków. Formułę pozwalającą na allometryczne wyskalowanie dawki przedstawił Riviere (FDA, CVM 1993). Jednak równanie przybiera często różną postać a w starszych publikacjach operuje wykładnikiem potęgi równym 0.667 (Bachmann K. i wsp. 1996; Bachman K.A. Ghosh R. 2001).

$$D_1 = D_2 \times (BW_2 / BW_1)^{0.25}$$

$$D_2 = D_1 \times (BW_2 / BW_1)^{0.75} \quad \text{lub} \quad D_2 = D_1 \times (BW_2 / BW_1)^{0.667}$$

D1 - dawka całkowita dla gatunku o mniejszej masie
D2 - dawka całkowita dla gatunku o większej masie
BW1 - średnia masa ciała dla gatunku o mniejszej masie
BW2 - średnia masa ciała dla gatunku o większej masie

Wzór ten rozwinięto i zastosowano i przedstawiono jeszcze precyzyjniejsze skalowanie dawki ze zwierzęcia na człowieka. Skalowanie to można wykonać na podstawie dawki zastosowanej na zwierzęciu lub NOAEL określonym dla danego zwierzęcia. Innym problemem jest konwersja dawki z mg/m^2 do mg/kg i odwrotnie. Problem do pewnego stopnia rozwiązuje równanie (FDA, CDER, CBER 2002):

$$D_{(mg/m^2)} = D_{(mg/kg)} \times (9.09 \times BW^{0.33})$$

D - dawka

Skalowanie dawki ze zwierzęcia wyrażonej w mg/m^2 do mg/kg dla człowieka można przeprowadzić stosując formuły.

$$D_{(H;mg/kg)} = [D_{(A;mg/kg)} \times (9.09 \times BW_{(A)}^{0.33})] / (9.09 \times BW_{(H)}^{0.33})$$

D(H.....) - dawka dla człowieka
D(A.....) - dawka dla zwierzęcia

Skalowanie dawki między gatunkami może być również oparte na wartościach klirensu leku niezwiązanego z białkami krwi (Tutain P.L. 2002):

$$D_2 = (D_1 \times fu_1 \times Cl_2) / fu_2 \times Cl_1$$

1,2 oznaczenia dwóch różnych gatunków
Cl - klirens
fu - frakcja niezwiązana z białkami

Obecnie metoda skalowania parametrów farmakokinetycznych oraz skalowania dawek jest ważnym problemem metodycznym w badaniach farmakokinetycznych i toksykokinetycznych. Skalowanie takie odbywa się często w oparciu o hybrydowe modele farmakometryczne np. typu PBPK/PD. Zależności dotyczące wartości parametrów fizjologicznych mają tu najczęściej decydujące znaczenie. Przenoszenie wartości dawek ze zwierząt na człowieka odbywa się obecnie przy wykorzystaniu wcześniej obliczonych lub określonych przez odpowiednie instytucje współczynników skalowania - ISF (ang.: *Interspecies Scaling Facors*),(Andersen M.E. i wsp. 1995). Wskaźniki te opisują stopień zmiany dawki ekstrapolowanej z gatunków zwierząt laboratoryjnych na człowieka - ISF(PK). Inne biorą pod uwagę różnice pomiędzy reaktywnością organizmu zwierzęcia i człowieka - ISF(PD).

Stanowią więc odnośnik do ekspozycji - dawki, oraz uzyskania zamierzonego profilu farmakokinetycznego leku. Z drugiej strony modyfikują odpowiedź organizmu zależną od stężenia leku w kompartmecie docelowym w znaczeniu farmakodynamicznym. Dokładność skalowania dawki zależna jest od wcześniejszego wyznaczenia współczynników najlepiej opisujących różnice pomiędzy gatunkami. Wypadkowa tych współczynników służy do dalszych przeliczeń.

$$ISF = ISF_{(PK)} \times ISF_{(PD)} \times .....$$

Obliczenia allometryczne pozwalają na ekstrapolację danych w trakcie badań toksykokinetycznych na zwierzętach (Schneider K. 2000). Duże znaczenia badania mają w działaniach dotyczących bezpieczeństwa stosowania leków u zwierząt oraz produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia. Skalowanie allometryczne ma ogromne znaczenie między innymi w przypadku określania współczynników bezpieczeństwa dla żywności pochodzenia zwierzęcego w toksykokinetyce (Vocci F., Farber T. 1988). W badaniach odnoszących się do jakości mleka konsumpcyjnego opisano na przykład zależność pomiędzy azotem wydalanym wraz z moczem a azotem mocznikowym obecnym w mleku krowim (Kauffman A.J., Pierre N.R. 2001).

$$UN = 0.0259 \times (+/- 0.0006) \times BW \times MUN$$

UN - azot wydalany wraz z moczem (ang.: *Urinary Nitrogen*)
MUN - azot mocznikowy wydalany wraz z mlekiem(ang.: *Milk Urea Nitrogen*)

Metody skalowania allometrycznego pozwalają przeprowadzać porównania parametrów farmakokinetycznych które bazują nie tylko na porównaniu koncentracji leku w tkance. Metody te zmierzają do uwzględniania w skalowaniu międzygatunkowym efektów terapeutycznych lub toksycznych w połączeniu z masą ciała i powierzchnia ciała. Dodatkowym punktem odniesienia i normalizacji porównywanych danych staje się także transformacja czasu w znaczeniu chronologicznym do jednostek czasu w ujęciu fizjologicznym. Wynika to z zależności pomiędzy czasem chronologicznym a masą ciała, która to zależność jest = 0. Zależność masy ciała od czasu fizjologicznego wynosi 1/4. W ten sposób po normalizacji i transformacji danych PK przebieg wykresu C-T staje się w znacznej mierze niezależny od gatunku lub masy ciała osobnika. Skalowanie danych farmakokinetycznych najczęściej daje możliwość tylko częściowego przetransponowania danych. Skalowanie zawsze obarczone jest pewnym błędem wynikającym choćby z różnych szlaków metabolicznych dla jednej substancji podanej dwóm osobnikom różnych gatunków. Podobnych źródeł błędu wynikających ze specyficznych różnic pomiędzy przestrzeniami kinetycznymi do jakich trafia lek może być więcej. Nadal jednak skalowanie allometryczne jest jednym z precyzyjniejszych sposobów przeniesienia danych farmakokinetycznych u osobników różnych gatunków w układach:

człowiek - człowiek; człowiek - zwierzę; zwierzę - człowiek; zwierzę - zwierzę

Układy takie mogą być realizowane w celu uzyskania kompletnych profili farmakokinetycznych. W przypadku zwierząt laboratoryjnych mogą dotyczyć także skalowania parametrów obliczonych w modelach przepływowych na izolowanych narządach. Obiektem skalowania są także parametry farmakokinetyczne uzyskane w różnych układach doświadczalnych np.:

hodowle komórkowe *in vitro* / tkanka (kompartment) docelowy *in vivo*
sztuczne układy błonowe / tkanka (kompartment) docelowy *in vivo*
sztuczne układy błonowe / dystrybucja przez błony *in vivo*

Analiza allometryczna pozwala na skalowanie i normalizowanie parametrów fizjologicznych oraz farmakokinetycznych. Jednym z ważnych parametrów allometrycznych jest maksymalny czas życia - MLP (ang.: *Maximum Life - Span Potential*). Parametr ten obliczyć można korzystając z równania wyprowadzonego w 1959 roku przez Sacher'a (Mahmood I. 1999).

$$MLP = 185.4 \times BrW^{0.636} \times BW^{-0.225}$$ (masa w gramach)

$$MLP = 10.839 \times BrW^{0.636} \times BW^{-0.225}$$ (masa w kilogramach)

BrW - masa mózgu (ang.: *Brain Weight*)

	BrW (g)	BW (g)	MLP (lata)
mysz	0,36	23	2,80
gerbil	0,98	67	4,15
chomik	1,4	150	4,35
szczur	1,8	250	4,55
świnka morska	4,4	850	6,10
królik	14	2500	9,99
świnia	180	200000	18,91
wilk szary	120	36000	21,49
pies	80	10000	22,15
koń	500	650000	27,77
małpa (Rhezus)	90	5000	27,90
krowa	500	500000	29,46
owca	400	50000	42,92
delfin	840	110000	57,61
człowiek	1500	70000	92,22
słoń	7500	5000000	98,23
goryl	400	200	148,65

Parametr ten stosuję się także w skalowaniu wartości klirensu na podstawie masy ciała (Feng. M.R. i wsp. 2000). Jako współczynnik korekcyjny - kolejną zmienną Boxenbaum zaproponował w tym wypadku masę mózgu.

$$Cl = a \times BW^{b} / MLP \qquad Cl = a \times BW^{b} \times BrW^{c}$$

a,b,c - zmienne

Skalowanie allometryczne pozwala przeliczyć wartość okresu półtrwania w fazie eliminacji pomiędzy człowiekiem a szczurem (Bachman K.A. Ghosh R. 2001). Równanie zależne jest od wartość współczynnika rozdziału oktanol woda i dla typowych wartości tego parametru przyjmuje postać:

$$Log\ t_{1/2H} = 0.75 + 1.1 \times (Log\ t_{1/2R})$$

t1/2H - okres półtrwania u człowieka
t1/2R - okres półtrwania u szczura

Jeżeli jednak wartość LogP jest skrajnie wysoka można zastosować równania:

$$Log\ t_{1/2H} = 0.6 + 0.77 \times (Log\ t_{1/2R}) + 0.15 \times (Log\ t_{1/2R})^2 + 0.06 \times LogP_{(o/w)}$$

$$Log\ t_{1/2H} = 0.6 + 0.87 \times (Log\ t_{1/2R}) + 0.15 \times (Log\ t_{1/2R})^2$$

LogP(o/w) - współczynnik rozdziału oktanol woda

Skalowanie allometryczne umożliwia również skalowania takich parametrów jak czas trwania jednego cyklu oddechowego BT (ang.: *Breath Time*), oraz czas trwania jednego cyklu pracy serca HBT (ang.: *Heart Beat Time*)(Gabrielsson J., Weiner D. 2000).

$$\mathbf{BT = 0.169 \times BW^{0.28}} \qquad \mathbf{HBT = 0.0428 \times BW^{0.28}}$$

Stosunek BT/HBT u ssaków jest stały i wynosi około 4.0.

	HBT	BT	HBT/BT
mysz	0,1	0,4	3,9
gerbil	0,1	0,5	3,9
chomik	0,2	0,7	3,9
szczur	0,2	0,8	3,9
świnka morska	0,3	1,1	3,9
królik	0,4	1,5	3,9
świnia	1,3	5,2	3,9
wilk szary	0,8	3,2	3,9
pies	0,6	2,2	3,9
koń	1,8	7,2	3,9
małpa (Rhezus)	0,5	1,8	3,9
krowa	1,7	6,7	3,9
owca	0,9	3,5	3,9
delfin	1,1	4,4	3,9
człowiek	1,0	3,8	3,9
słoń	3,2	12,7	3,9
goryl	0,2	0,7	3,9

Skalowanie krzywej C-T w badaniach PK

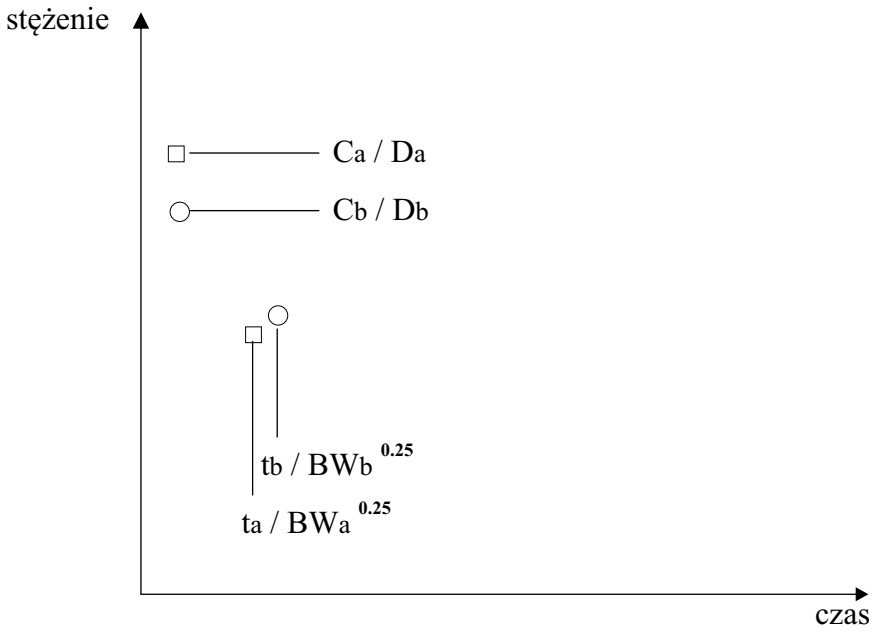
Skalowanie allometryczne dotyczy zarówno parametrów fizjologicznych, farmakokinetycznych jak i farmakodynamicznych. Metody skalowania allometrycznego znajdują obecnie duże zastosowanie w analizie wybranych współczynników PD, PK jak i kompletnych krzywych C-T. Pozwalają między innymi na porównywanie krzywych C-T uzyskanych dla różnych dawek tego samego leku w przypadku jednego gatunku (normalizacja wartości stężenia - C). Pozwalają także połączyć ten rodzaj transformacji danych z analizą pomiędzy gatunkami z różnymi wartościami czasów pobierania prób do analiz (normalizacja wartości czasu - T). Podstawy do normalizacji danych dotyczących stężeń uzyskanych w różnych układach doświadczalnych stanowi metoda normalizacji AUC do DNAUC, gdzie DNAUC = AUC / D. Ponieważ pole powierzchni pod krzywą wyraża dokładnie wartość dawki leku jaka dostała się do krwi, kolejne wartości stężeń C dzielone są przez wartość dawki D (Ward K.W. i wsp. 2001). Podstawy do normalizacji allometrycznej czasu stworzył Boxenbaum określając jednostkę czasu - kallynochron. Kallynochron to przedział czasu w którym zachodzi proces farmakokinetyczny w czasie którego w obrębie dwóch różnych gatunków oczyszczana jest ta sama objętość osocza na kilogram masy ciała (Gabrielsson J., Weiner D. 2000). Jednostka ta odwołuje się do zależnej od MLP oraz BW wartości klirensu leku u różnych gatunków zwierząt. Pozwala unifikować jednostki czasu chronologicznego do jednostek czasu fizjologicznego. W tym wypadku kolejne wartości czasu chronologicznego t dzielone są przez $BW^{0.25}$ jaki określono dla grupy .

$$C_N = C / D \qquad t_N = t / BW^{0.25}$$

stąd

$$\mathbf{C\ ;\ t} \text{ - po normalizacji } = \mathbf{(C / D)\ ;\ (t / BW^{0.25})}$$

C - wartość stężenia uzyskana doświadczalnie
CN - wartość stężenia znormalizowana
t - wartość czasu ustalona dla doświadczenia (czas chronologiczny)
tN - wartość czasu znormalizowana (czas fizjologiczny)
BW - masa ciała
D - dawka



Rys. Zastosowanie skalowania allometrycznego w analizie porównawczej leków.

Kolejną jednostką niezależną od różnic gatunkowych jest apolisychron. Jest to przedział czasu w którym w obrębie dwóch różnych gatunków eliminowana jest ta sama ilość leku i oczyszczana jest ta sama objętość osocza n masę ciała spotęgowaną współczynnikiem d.

$$t_H = t_H \times (BW_{(H)} / BW_{(A)})^{0.25} \quad \text{kallynochron}$$

$$t_H = t_H \times (BW_{(H)} / BW_{(A)})^{d-0.25} \quad \text{apolisychron}$$

tH - jednostka czasu w procesie PK człowieka
BW(H) - masa ciała człowieka
BW(H) - masa ciała zwierzęcia

Diagnostyka kompartmentu centralnego

Stosowanie leków wiąże się z zaistnieniem patologii w obrębie organizmu. Leczeniu farmakologicznemu zwykle towarzyszą liczne dodatkowe badania laboratoryjne wskaźników krwi. Znajomość wpływu tych wskaźników na podstawowe parametry i zjawiska farmakokinetyczne pozwala dostosować terapię do indywidualnego przypadku. Badania diagnostyczne i ich właściwa interpretacja kliniczna pozwala na świadome i bezpieczne stosowanie leków. Badania te oceniają między innymi rożne parametry kompartmentu centralnego. Przedstawiają między innymi ocenę fizykochemiczną (gęstość, lepkość, OB.), funkcjonalną (czas krwawienia, czas krzepnięcia) i strukturalną (stężenie hemoglobiny, stężenia białek, HCT) krwi (Pawelski S., Maj S. 1987). Część badań krwi najczęściej wykonywanych w laboratoriach diagnostycznych, ma duże znaczenie poznawcze dla zmiany losów leku w organizmie.

HCT - hematokryt

Hematokryt rośnie w przypadkach zmniejszenia objętości osocza, nadkrwistości. Stany odwodnienia powodować mogą uporczywe biegunki wymioty itp. Efektem takiego stanu rzeczy jest zmniejszenie objętości dystrybucji leku i większa koncentracja w kompartmencie centralnym. Spadek wartości hematokrytu związany jest najczęściej ze zwiększeniem objętości osocza, nadkrwistościami a także po dłuższym pobycie na znacznych wysokościach. Fizjologicznie spadek wartości hematokrytu obserwowany jest w czasie ciąży. U człowieka wzrost objętości krwi krążącej może wynieść nawet 30 - 40%. W takich wypadkach wzrasta znacznie objętość dystrybucji leku. Stężenia maksymalne po podaniu leku są niższe od obserwowanych w przypadku braku zmian w wartościach HCT.

Objętość krwi krążącej

Wzrost objętości krwi krążącej towarzyszy nadkrwistościom, niewydolności krążenia, nadczynności tarczycy. Także nerczycom i marskości wątroby. Zmniejszenie objętości krwi krążącej obserwowany jest po krwotokach, wymiotach, biegunkach, przy rozległych oparzeniach, obrzękach i w przebiegu wstrząsu. Zmiany w objętości krwi krążącej zmieniają objętość dystrybucji leku i zwykle wiążą się ze zmianami stałych szybkości redystrybucji leku z tkanek do krwi.

OB - odczyn Biernackiego

Spadek wartości odczynu Biernackiego obserwowany jest najczęściej przy nadkrwistościach. Wzrost parametru najczęściej świadczy o zwiększeniu frakcji α i γ globulin, i jednocześnie spadku ilości albumin. Spadek ilości albumin powoduje zwiększenie we krwi wolnej frakcji leków, które mogą się z nimi wiązać.

Stężenie hemoglobiny

Stężenie hemoglobiny maleje w niedokrwistościach, podczas ciąży, towarzyszy także stanom zwiększenia objętości osocza. Wzrost stężenia hemoglobiny towarzyszy odwodnieniom, biegunkom, wymiotom. Jest efektem nadkrwistości również po przebywaniu przez dłuższy czas na dużych wysokościach. Może mieć duże znaczenie dla dyspozycji w przypadku leków które lokują się w erytrocytach. W przypadku spadku wartości stężenia należy liczyć się z możliwością zwiększenia wartości objętości dystrybucji.

Stężenie białek krwi

Poziom lipoprotein ma znaczny wpływ głównie na wiązanie z nimi leków lipofilnych nie posiadających właściwości elektrolitów, oraz słabych zasad i kwasów. Dla analiz PK zwykle największe znaczenie ma stężenie dwóch frakcji białek - albumin i globulin.

Globuliny

Spadek ilości globulin może towarzyszyć niedoborom, nerczycom, cukrzycy. Wzrost ilości tej frakcji towarzyszy ostry i przewlekłym stanom zapalnym, marskości wątroby, zatruciom, a fizjologicznie ciąży.

Albuminy

Spadek ilości albumin obserwowany jest rzadko, jednak przy hipoalbuminemii wzrasta GRF a tym samym dla części leków może wzrastać wartość klirensu nerkowego. Białka te wiążą leki lipofilne o charakterze słabych kwasów. Wzrost ilości albumin notuje się w marskości wątroby, oparzeniach, wysiękach, upośledzeniu wchłaniania z jelit, niedoborach, nadczynności tarczycy, nadczynności kory nadnerczy.

α-1 kwaśna glikoproteina - AAG

AAG należy do tzw. białek ostrej fazy jest syntetyzowana w wątrobie. W czasie stanu zapalnego stężenie tego białka we krwi może znacznie wzrastać. Okres półtrwania AAG wynosi 5.5 dnia. Białko to wiąże leki lipofilne, neutralne lub o charakterze słabych zasad.

Czas protrombinowy Quicka

Czas protrombinowy jest ważnym parametrem klinicznym który może opisywać w pewnym stopniu klirens wątrobowy. Czas ten wykazuje zmienną korelację z klirensem wątroby. Wydłuża się u chorych na żółtaczkę mechaniczną, miażdżycę i w trakcie leczenia antykoagulantami (Pawelski S., Maj S. 1987). Wydłużony czas protrombinowy w połączeniu z wartością stężenia całkowitego bilirubiny jest jednym z parametrów określających stopień marskości wątroby. Pozwala obliczyć funkcję wyróżnienia - df (ang.: *Maddrey Discriminant Function*) :

$$\mathbf{df = (4.6 \times Pt) + STB}$$

Pt - czas protrombinowy (ang.: *Prothrombin Time*)
STB - stężenie bilirubiny w osoczu (ang.: *Serum Total Bilirubine*)

Masa ciała

Precyzyjne obliczenia dotyczące masy ciała pozwalają odpowiedzieć na pytania dotyczące między innymi zawartości wody w organizmie, masy beztłuszczowej itp. (Pawelski S., Maj S. 1987). Informacje te dodatkowo opisują charakter kompartmentów w jakich rozmieszcza się substancja lecznicza. Opis poszczególnych parametrów - kompartmentów ciała, ma znaczenie między innymi w badaniach nad lekami o dystrybucji selektywnej. Takie znaczenie ma na przykład znajomość ogólnej ilości wody w organizmie - TBE (ang.: *Total Body Water*) dla leków które nie rozmieszczają się w tkance tłuszczowej. Objętość wody w organizmie obliczamy korzystając z formuł:

$$\mathbf{V_{H_2O} = (0.55 \times BW) + 0.51}$$

VH_2O - objętość wody w organizmie
BW - masa ciała

$$\mathbf{V_{H_2O(\%)} = 100 \times 4.317 \times (3.96 / BW)}$$

$VH_2O(\%)$ - procent wody ustrojowej

Natomiast niedobór wody w organizmie człowieka pozwala obliczyć równanie:

$$\mathbf{V_{H_2Odef} = [1 - (40 / HCT)] \times BW \times 0.2}$$

VH_2O def - deficyt objętości wody w organizmie
HCT - hematokryt

Wzór na tak zwaną idealną masę ciała IBW (ang.: *Ideal Body Weight*) przy właściwym odżywianiu wyprowadził Lorentz:

$$\mathbf{IBW = T - 100 - (T-150) / 4}$$

T - wzrost

Idealną masę ciała obliczyć można także korzystając z formuł:

$$\mathbf{IBW = (0.9 \times T) - 88}$$ mężczyźni

$$\mathbf{IBW = (0.9 \times T) - 92}$$ kobiety

Znając gęstość tłuszczu człowieka i gęstość masy beztłuszczowej można obliczyć procent tłuszczu w masie ciała.

$$\mathbf{D = 0.8 \times (T^{0.242} / BW^{0.1}) + 0.162}$$

$$\mathbf{F(\%) = 100 \times (5.038 / D) - 4.593}$$

F(%) - procent tłuszczu
D - gęstość (ang.: *Density*)

Można także obliczyć beztłuszczową masę ciała - LBW (ang.: *Lean Body Weight*):

$$\mathbf{LBW = (T - 150) \times 0.9 + 50}$$ mężczyźni

$$\mathbf{LBW = (1.1 \times BW) - [128 \times (BW^2 / (100 \times T)^2)]}$$

$$\mathbf{LBW = (T - 150) \times 0.9 + 45}$$ kobiety

$$\mathbf{LBW = (1.07 \times BW) - [148 \times (BW^2 / (100 \times T)^2)]}$$

Poszczególne przestrzenie wypełnione płynami charakteryzować można przyjmując za punkt wyjścia ogólną ilość wody - TBW w organizmie człowieka za część masy ciała - BW.

$$\mathbf{TBW = 2/3 \times BW}$$

lub dla mężczyzn: **TBW = 2.447 - (0.09516 x Wiek) + (0.1074 x T) + (0.3362 x BW)**

dla kobiet: **TBW = - 2.097 + (0.1069 x T) + (0.2466 x BW)**

Oraz pozostałe kompartmenty:

ICF = 2/3 x TBW

ECF = 1/3 x TBW lub **ECF = TBW - ICF**

EVF = 2/3 x ECF

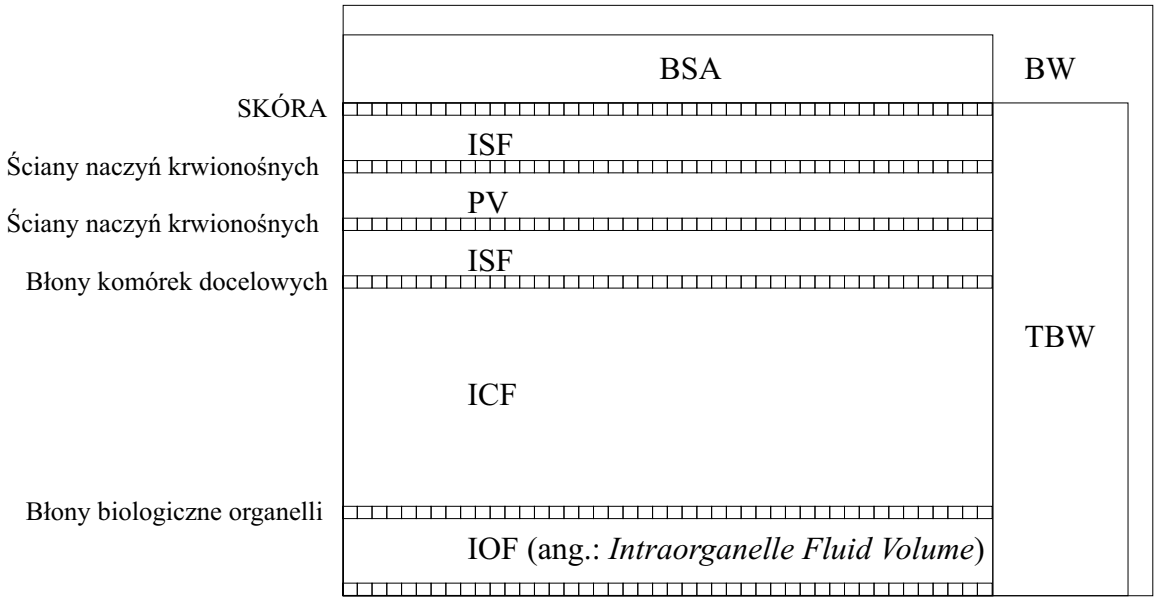
IVF = 1/3 x ECF

PV = 2/3 x TBV lub **PV = IVF x (1-HCT)** lub **PV = (Vinj x Cinj) / Cp**

CV = IVF x HCT lub **CV = (HCT + LCT) x V**

TBV = ECF - IVF lub **TBV = PV / (1 - HCT)**

ICF - objętość płynu wewnątrzkomórkowego (ang.: *Intracellular Fluid Volume*)
ECF - objętość płynu pozakomórkowego (ang.: *Extracellular Fluid Volume*)
EVF - objętość płynu pozanaczyniowego (ang.: *Extravascular Fluid Volume*; ISF - *Interstitial Fluid Volume*)
IVF - objętość płynu wewnątrznaczyniowego - krew (ang.: *Intravascular Fluid Volume*)
PV - objętość osocza (ang.:*Plasma Volume*)
CV - objętość komórek krwi (ang.:*Cell Volume*)
LCT - leukokryt (ang.: *Leukocrit*)
TBV - objętość całkowita krwi (ang.: *Total Blood Volume*)
V - objętość próbki krwi
Vinj - objętość podana donaczyniowo
Cinj - stężenie leku w danej objętości
Cp - stężenie w osoczu
T - wzrost
BW - masa ciała



Rys. Miejsca dyspozycji leku w organizmie i opis organizmu jako makrokompartmentu.

Zmiany wartości płynu wewnątrzkomórkowego i pozakomórkowego mają duże znaczenie dla wartości objętości dystrybucji. Ilość płynu pozakomórkowego - ECF może znacznie zmieniać się w przypadku wystąpienia obrzęków przesięków, wysięków, zapalenia otrzewnej czy oparzeń. W celu dokładnego dawkowania leków stosuje się liczne dodatkowe przeliczniki normalizujące totalną masę ciała jako zbiór kompartmentów. Jednym z podstawowych pojęć jest w tym zakresie współczynnik masy ciała - BMI (ang.: *Body Mass Index; Quetelet's Index)*. Współczynnik ten prawidłowo powinien wahać się w granicach 18.5 - 24.9. Świadczy on o nadmiernym otłuszczeniu lub ewentualnym niedożywieniu czy wyniszczeniu organizmu.

$$\mathbf{BMI = BW / T^2}$$

Innym parametrem jest beztłuszczowy indeks masy ciała - LBMI (ang.: *Lean Body Mass Index*), który obliczyć można między innymi na podstawie wysokości i masy ciała (Nevill A.M., Holder R.L. 1995)

$$\mathbf{LBMI = LBW / T^2} \quad \text{lub} \quad \mathbf{LBMI = T^2 / BW}$$

Powierzchnia ciała - BSA (ang.: *Body Surface Area*)

Pojęcie powierzchni ciała stosowane jest najczęściej w odniesieniu do obliczeń mających na celu normalizację punktu odniesienia w badaniu PK. W stosunku do większości leków znaleziono zależność pomiędzy takimi parametrami jak np. AUC a BSA. Stąd wiele leków dawkuje się w przeliczeniu na BSA a nie masę ciała. jednak znane są leki których kinetyka nie wykazuje korelacji z wartością BSA. Są to np. karboplatyna (korelacja z GFR) czy klirens docetaxelu (Kouno T. i wsp. 2003). Znane są liczne sposoby dokładnego obliczania powierzchni ciała pacjenta.

Metoda Gehan'a (Gehan E.A., George S.L. 1970):

$$\mathbf{BSA = 0.02350 \times T^{0.42246} \times BW^{0.51456}}$$

Lub w postaci logarytmicznej:

$$\mathbf{Ln(BSA) = -3.75080 + 0.42246\ Ln(T) + 0.51456\ Ln(BW)}$$

Metoda jest właściwa dla człowieka o wzroście 50 - 220 cm i masie ciała 4 - 132 kg

Metoda Dubois (Dubois D., Dubois E.F. 1916):

$$\mathbf{BSA = 0.007184 \times T^{0.725} \times BW^{0.425}}$$

Metoda jest właściwa dla człowieka o wzroście 73 - 184 cm i masie ciała 6 - 93 kg.

Metoda Haycock'a (Haycock G.B. i wsp. 1978):

$$\mathbf{BSA = 0.024265 \times T^{0.3964} \times BW^{0.5378}}$$

Metoda jest właściwa dla człowieka o wzroście 30 - 200 cm i masie ciała 1 - 120 kg.

Metoda Mosteller'a (Mosteller R.D. 1987):

$$\mathbf{BSA = \sqrt{(T \times BW) / 3600}}$$

Szczególnie mały błąd obliczeniowy dotyczący BSA dla człowieka o masie powyżej 80 kg cechuje metodę opartą na skalowaniu cząstkowym (Livingston E.H., Lee S. 2001). Dzięki metodzie tej wyprowadzono równanie właściwe dla ludzi o wadze powyżej 10 kg.

$$\mathbf{BSA = 0.1173 \times BW^{0.6466}}$$

Niewielki błąd obliczeniowy dla dzieci ważących poniżej 10 kg charakteryzuje równanie:

$$\mathbf{BSA = 0.1037 \times BW^{0.6724}}$$

Costeff w roku 1966 przedstawił jeszcze inną formułę pozwalającą na podstawie masy ciała określać jego powierzchnię (EPA/600/8-89/043, 1996):

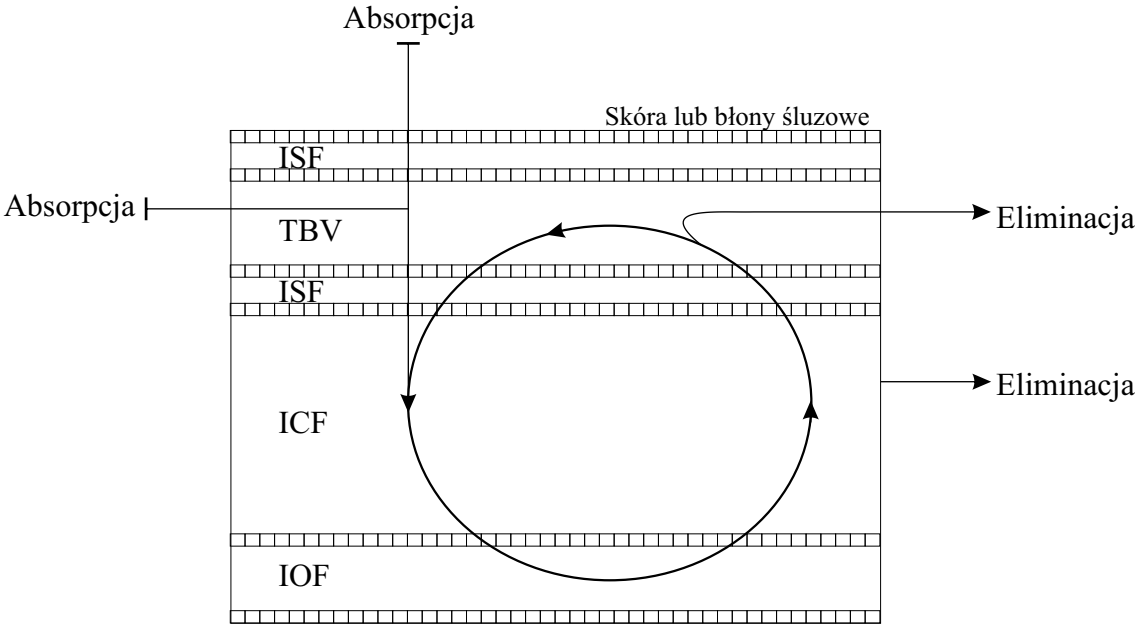
$$\mathbf{BSA = (4 \times BW + 7) / (BW + 90)}$$

Badania Adamsa z 1993 roku stały się podstawą do określenia zależności dotyczącej BSA dla dzieci (EPA-600-P-00-002B 2002):

$$\mathbf{BSA = T^{0.425} \times BW^{0.425} \times 71.84}$$

Sumując, charakter makrokompartmentu jaki stanowi organizm człowieka lub zwierząt w farmakokinetyce opisać można wyrażając jego masę, powierzchnię, ilość wody i procent tłuszczu. Parametry te stanowią między innymi podstawę do precyzyjnego dawkowania leku i łączą się z pojęciami objętości w jakich lek ulega dyspozycji. Znając wartości współczynnika masy ciała i całkowitej ilości wody w organizmie można obliczyć aktualną masę ciała ABW (ang.: *Actual Body Weight*). Wartość ta ma szczególne znaczenie dla obliczeń masy ciała u osób otyłych.

$$\mathbf{ABW = IBW + [0.4 \times (TBW - IBW)]}$$



Rys. Udział płynów organizmu gwarantujący absorpcję dystrybucję i eliminację leku.

Dzięki znajomości aktualnej masy ciała i odniesieniu jej do idealnej masy ciała można obliczyć masę ciała użytą do obliczenia dawkowania - DW (ang.: *Dosing Weight*).

$$\mathbf{DW = IBW + [0.4 \times (ABW - IBW)]}$$

Znając stosunek wartości całkowitej zawartości wody w organizmie do idealnej masy ciała można sklasyfikować daną osobę jako otyłą lub z opisać stopień niedowagi.

nadwaga $\mathbf{1.25 > TBW / IBW > 0.75}$ niedowaga

Korzystając z przedstawionych wcześniej formuł można wyprowadzić szereg równań i zależności ilustrujących związek poszczególnych objętości z BSA. W ten sposób korzystając z metody Mosteller'a obliczania powierzchni ciała można określić zależność pomiędzy BSA i wzrostem a całkowitą ilością wody w organizmie:

$$\mathbf{TBW = [(BSA^2 \times 3600) / T] \times 2/3}$$

Znając wartość objętości dystrybucji dla danego leku można obliczyć objętość dystrybucji w organizmie o określonych cechach. To przy znanym klirensie pozwala na podanie takiej dawki jaka wymagana jest w celu osiągnięcia określonego stężenia terapeutycznego. Znajomość objętości przestrzeni w jakich został rozdysponowany lek oraz stałych szybkości przemieszczania się leku pomiędzy tymi przestrzeniami pozwala śledzić jego kinetykę. Pozwala także świadomie ją modyfikować w celu zmiany charakteru niektórych parametrów farmakokinetycznych. W przypadku zwierząt laboratoryjnych w obliczaniu powierzchni ciała można posłużyć się wzorem z zastosowaniem współczynnika Meeh (Hawk C.T., Leary S.L. 1999).

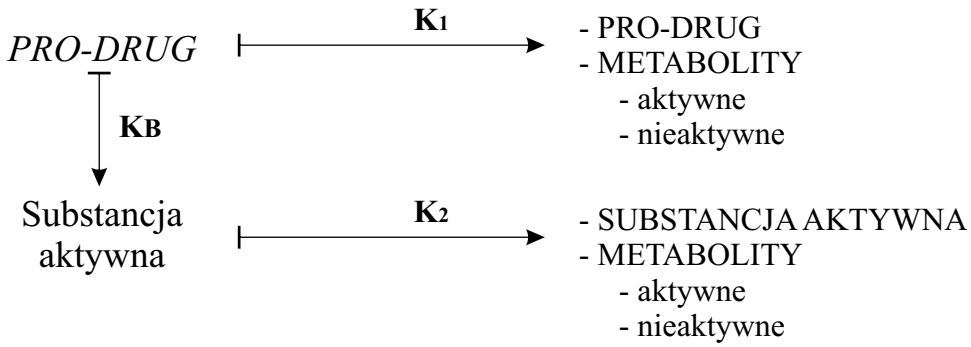
$$\mathbf{BSA = BW^{(2/3)} \times M \times 0.00001}$$

M. - współczynnik Meeh dla różnych gatunków:

wąż	= 12.5	pies < 4 kg	= 10.1	świnka morska	= 9.0
ptak	= 10.0	pies > 4 kg	= 11.2	małpa	= 11.8
kot	= 10.0	ryba	= 10.0	mysz	= 9.0
bydło	= 9.0	żaba	= 10.6	królik	= 9.75
owca	= 8.4	świnia	= 9.0	szczur	= 9.1

Optymalizacja parametrów farmakokinetycznych leków - pro leków

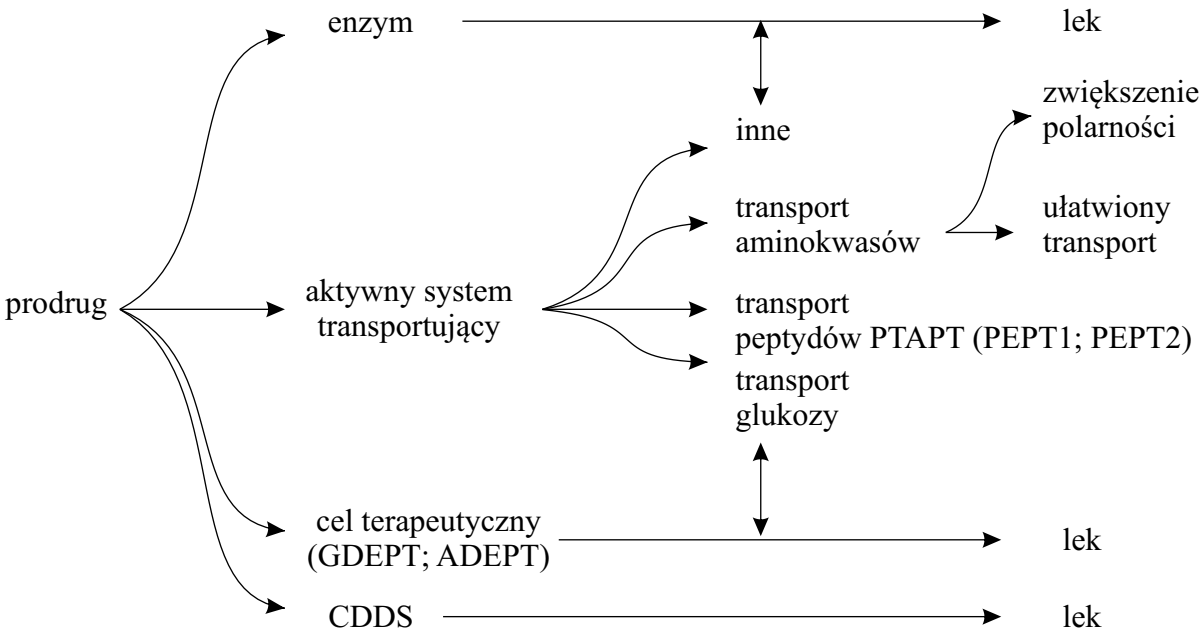
Optymalizacja farmakokinetyczna dotyczy zwykle dwóch kierunków działań poświęconych lekom. Są to terapia monitorowana i faza projektowania leków. Podstawowym sposobów optymalizacji PK leku jest dopasowanie do substancji czynnej odpowiedniej postaci leku i drogi podania. Formulacja *pro*-lek jest jednym z najbardziej zaawansowanych rozwiązań optymalizacji PK leku. Najczęściej leki tego typu umożliwiają doprowadzenie substancji farmakologicznie aktywnej do przestrzeni docelowej organizmu po przejściu przez wątrobę. Dla leków tego typu prędkość biotransformacji (K_B) "przed leku" do metabolitów aktywnych bądź pozbawionych aktywności farmakologicznej jest większa od sumy procesów eliminacji (K_1, K_2). Jeżeli stała szybkości eliminacji przed leku bezpośrednio do metabolitów jest większa od szybkości eliminacji rejestrowanej dla substancji czynnej pro-lek i jej metabolitów to postać leku przyjmuje formę *depot* (Pfeifer S. 1983).



Warunek: $K_B > K_1 + K_2$
Warunek *depot*: $K_1 > K_2$

Rys. Optymalizacja postaci leku poprzez formułowanie pro-leków.

Formułowanie leków typu pro-drug, pro-lek jest jednym z wielu sposobów modyfikowania i optymalizacji parametrów kinetycznych leku. Projektowanie leków często wiąże się z planowaniem zmian w farmakokinetyce leku w celu osiągnięcia korzystnych form stosowaniu leku. Zmiany te dotyczą zarówno fazy wchłaniania, dystrybucji jak i eliminacji leku z ustroju.

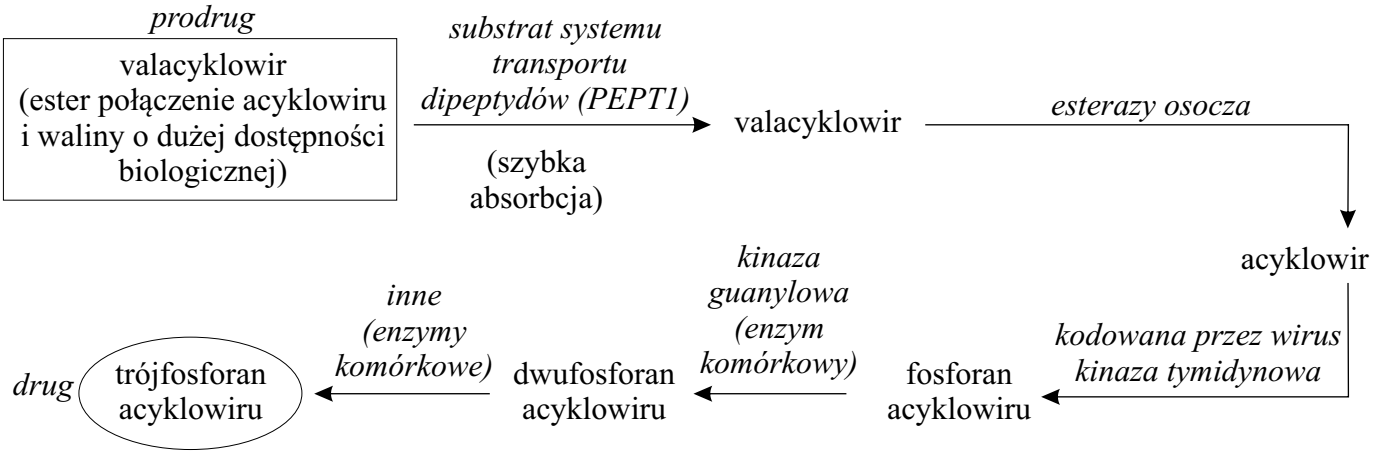


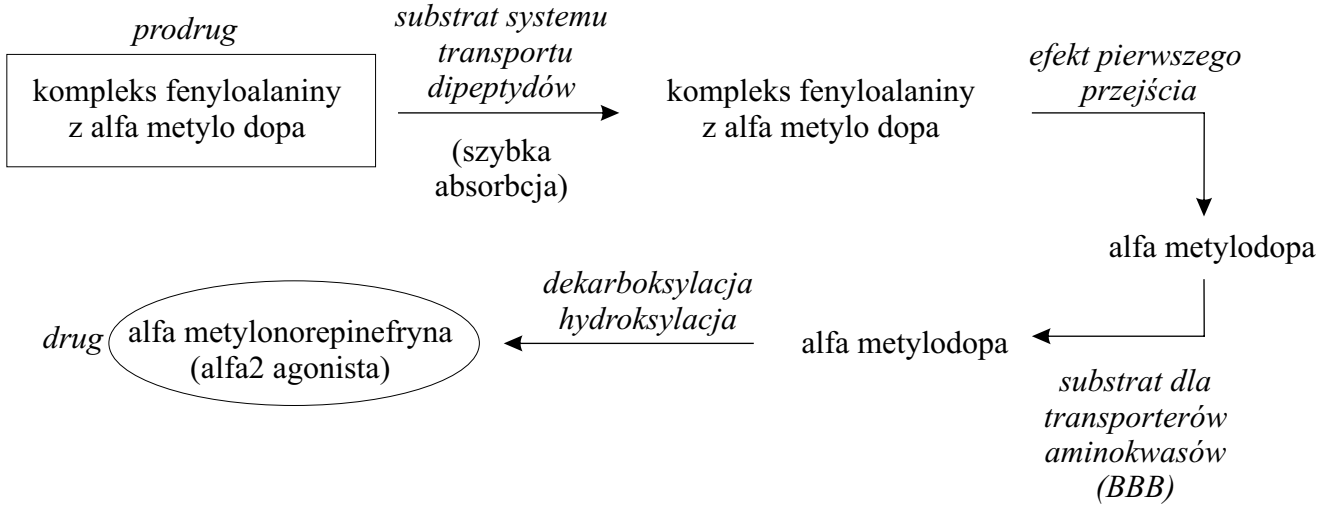
ADEPT (ang.: *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
GDEPT (ang.: *Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
PTAPT (ang.: *Peptide Transporter Associated Prodrug Therapy*)
VDEPT (ang.: *Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy*)
CDDS (ang.: *Chemical Drug Delivery Systems)*
MDEPT (ang.: *Macrophage Associated Enzyme Prodrug Therapy*)

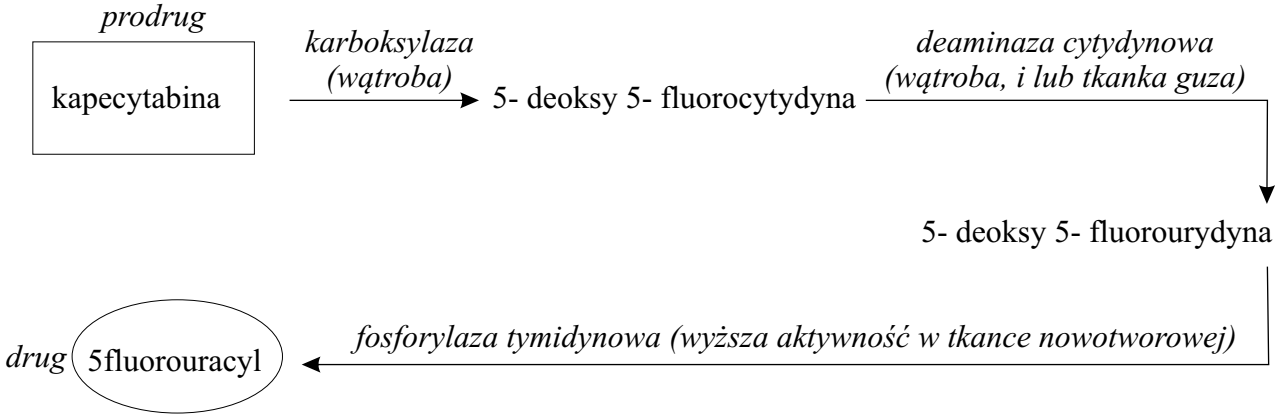
Ryc. Strategia rozwoju formulacji *prodrug* oraz *drug targeting*.

5 fluorocytozyna	deaminaza cytozynowa →	5 fluorouracyl
alaninian metrotreksatu	karboksypeptydaza A →	metotrexat
glukuronian epirubicyny	beta glukuronidaza →	epirubicyna
glukuronian deksametazonu	beta glukuronidaza →	deksametazon
glukuronian budesonidu	beta glukuronidaza →	budesonid
fosforan doksorubicyny	fosfataza alkaliczna →	doxorubicyna
fenoksyacetamid doksorubicyny	amidaza penicylinowa →	doxorubicyna
bakampicylina, piwapicylina (dobrze wchłaniane przez GIT estry)	esterazy →	ampicylina (hydrofilna słabo wchłaniana przez GIT)
fosfofenytoina sodowa (ester fosforanowy)	fosfatazy →	fenytoina (trudno rozpuszczalna w postaci iniekcji pH12)
L-DOPA (aktywnie transportowane przez BBB)	L-DOPA dekarboksylaza (w obrębie CNS) →	dopamina (cel - CNS)
sulfasalazyna	redukcja grupy azowej (enzymy bakteryjne) →	kwas aminosalicylowy + sulfapirydyna

Ryc. Przykłady leków typu *prodrug*.







Ryc. Przykłady “koni trojańskich”typu *prodrug* .

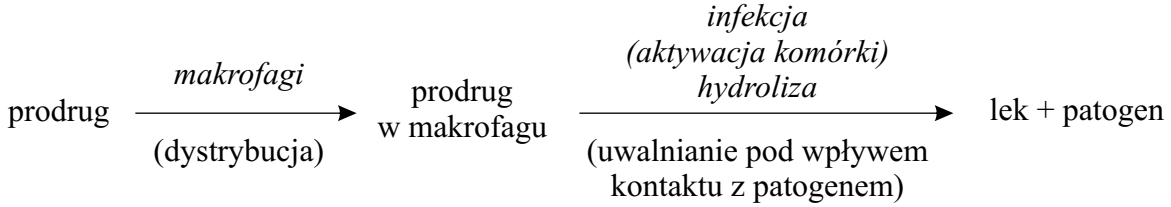
Obejmują więc swym zasięgiem każdą z faz kinetycznych (LADMER) w celu osiągnięcia efektu o pożądanej charakterystyce. Coraz więcej technologii modyfikowania substancji leczniczych umożliwia uzyskanie nowych wartości parametrów farmakokinetycznych których oczekuje producent gotowego leku. Projektowanie przed leku - pro drug ma obecnie na celu tworzenie swoistego "konia Trojańskiego" dla właściwego leku (enzymatyczna interwencja w strukturę), lub dla systemu transportu aktywnego w przypadku gdy problemem do rozwiązania jest niska dostępność biologiczna wynikająca z nieoptymalnych właściwości związku macierzystego. Innego typu celem jest cel terapeutyczny gdzie *pro drug* jest uaktywniany w obszarze celu terapeutycznego (leki przeciwwirusowe). Nierzadko formulacja *pro drug* ma na celu świadome zmniejszenie właściwości decydujących o wchłanianiu leku *per os* na rzecz późniejszego procesu uwalniania z pominięciem ADR. Przykładem są trudno wchłaniane *per os* koniugaty kwasu salicylowego i glicyny które dopiero po rozpadzie w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego gwarantują wchłanianie leku i osiągnięcie efektu terapeutycznego. Cała gama enzymów znajdujących się w różnych odcinkach przewodu pokarmowego wątroby, nerek, jelit oraz łożyska krwi gwarantują stosowanie formulacji typu *pro drug* której efektem jest uwolnienie aktywnej substancji. Coraz częściej celem dla *pro drug* nie jest jednak ominięcie efektu pierwszego przejścia lecz tworzenie pochodnych rozpoznawanych przez systemy aktywnego transportu które umożliwiają transfer molekuł leku w żywym organizmie. Są to najczęściej systemy transportu rozpoznające poszczególne aminokwasy peptydy lub polipeptydy. Systemy transportujace polipeptydy (PEPT) są systemami stereoselektywnymi które preferują L formy końcowych aminokwasów biorących udział w rozpoznawaniu i transporcie cząsteczki. Mimo to są jednak bardzo elastyczne na zmiany budowy chemicznej prodrug umożliwiając wprowadzanie wciąż nowych rozwiązań. W przypadku typowych rozwiązań *pro drug* to koniugat leku z substancja "zabezpieczającą" (np. zwiększającą hydrofilność a tym samym zmniejszającą natężenie procesów metabolicznych). W wyniku rozpadu enzymatycznego molekuły uwalniana jest substancja aktywna. Ten schemat stosuje się najczęściej w przypadku leków podawanych enteralnie. Najważniejsze enzymy z punktu widzenia projektowania tego typu formulacji to: glikozydazy (galaktozydaza, glukozydaza, arabinofuranozydaza, kzylopiranozydaza), glukuronidazy, deaminazy, esterazy.

Obecnie proponuje się nowy podział dla złożonej grupy leków typu prodrug. W całej grupie wyróżnia się leki typu:

- prodrug (lek macierzysty - substancja podawana jest całkowicie pozbawiona aktywności farmakologicznej)

-pochodne aktywne biologicznie (ang.: *Soft Drugs*) przykładem są estry substancji posiadających aktywność farmakologiczną

- leki "celowane" (ang.: *Targeted Drugs*) swoiste "konie trojańskie" których aktywność uzewnętrznia się tylko pod wpływem określonych czynników w określonych komórkach lub organach.



Ryc. Przykłady wykorzystania makrofagów jako biologicznego nośnika nanopartykuł formulacji typu *prodrug*.

Procesu optymalizacji PK większości leków rozpoczyna zrównoważenie trzech parametrów gwarantujących wchłanianie na odpowiednim poziomie. Jest to zwykle zmiana czasu przebywania leku w miejscu wchłaniania, udostępnienie jak największej powierzchni wchłaniania, uzyskanie odpowiednio wysokiego stężenia leku w kompartmencie docelowym. Faza wchłaniania jest krytycznym momentem optymalizacji leku. Jeżeli wchłanianie substancji jest zbyt niskie wymaga to zmiany drogi podania która nie musi być korzystna z punktu widzenia terapii, stosowania czy wytwarzania postaci leku.

W fazie wchłaniania leku częstym działaniem zmierzającym do modyfikowania PK jest zmiana mająca na celu zwiększenie lipofilności substancji leczniczej w celu lepszego wchłaniania przez błony biologiczne. Do tego celu mogą prowadzić zabiegi dotyczące zmiany jego struktury chemicznej (estryfikacja). Wynikiem takiego działania jest zwiększone wchłanianie leku czyli wzrost wartości AUC, F, Cmax, Co, oraz zmiany innych parametrów. Zmiany wchłaniania bez znacznych zmian postaci leku można uzyskać zmieniając drogę podania leku. Częstym zabiegiem zmieniającym wchłanianie jest wykorzystywanie korzystnych interakcji farmakokinetycznych. Dla leków których lipofilność zależna jest od stopnia dysocjacji ważnym zabiegiem jest cofanie dysocjacji i wybór odpowiedniej przestrzeni kinetycznej dla fazy wchłaniania.

Innym kierunkiem może być zmiana pH wybranego kompartmentu. Jeszcze innym sposobem jest wykorzystanie informacji o korzystnych dla leku zmianach pH kompartmentu w którym odbywa się wchłanianie, wskutek zaistniałej patologii. Wiadomo jednak że lipofilność leku nie jest gwarantem wysokiej wartości dostępności biologicznej. Jest jednym z parametrów fizjochemicznych leku którego optymalizacja może przynieść pożądaną charakterystykę LADMER. Regułą która umożliwia sklasyfikowania substancji leczniczej jako bardziej lub mniej korzystnej z punktu optymalizacji leku w fazie przedklinicznej jest reguła pięciu. Sumując optymalizacja wchłaniania substancji leczniczej jest wypadkową jej właściwości fizjochemicznych, cech środowiska podania leku i drogi podania leku oraz postaci leku. Wszystkie te czynniki znajdują swoje odbicie w przebiegu i charakterze pozostałych faz kinetycznych.

Optymalizacja procesów dystrybucji odwołuje się podobnie jak w fazie wchłaniania do podobnego zakresu tematycznego. Podobnie jak w fazie wchłaniania dystrybucja to optymalizacja powinowactwa do tkanek oraz zwiększanie możliwości pokonywania układów błonowych. Dystrybucja jest więc wypadkową cech samej cząsteczki leku (rzadziej postaci - liposomy) i liczby układów błonowych koniecznych do pokonania. Podstawowymi parametrami których optymalizacja przynosi znaczne efekty są więc parametry dotyczące charakteru związku. Jeżeli jedynym czynnikiem poddanym optymalizacji jest pole polarne cząsteczki PSA a jedynym parametrem ograniczającym dystrybucję jest ilość układów błonowych które musi ona pokonać to możliwości dystrybucji cząsteczki można opisać jako:

PSA / n

Gdzie n stanowi liczbę układów błonowych. Jeżeli tkanka docelowa jest tkanka lipofilną a lek podawany jest np drogą doustną to równanie można uzupełnić o kolejne czynniki wymagające optymalizacji - dopasowania:

(PSA x LogD) / (n x F)

Gdzie LogD stanowi współczynnik rozdziału oktanol woda a F dostępność biologiczną leku wyrażoną jako część jedności. Równanie to można poszerzyć o kolejne czynniki decydujące o powodzeniu optymalizacji cząsteczki leku i postaci leku:

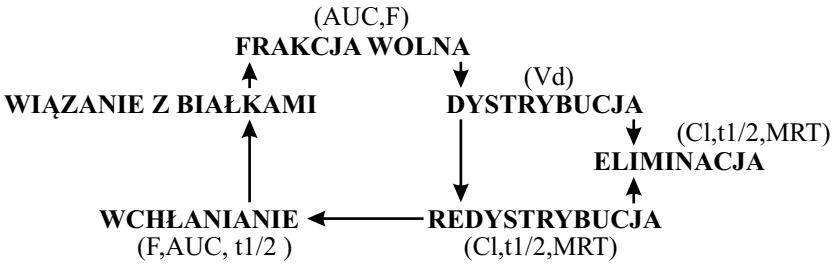
(PSA x LogD x .....) / (n x F x .....)

W fazie dystrybucji leku często dokonuje się zmian mających na celu zwiększenie selektywności danej substancji leczniczej. Zabiegi takie mają na celu zoptymalizowanie leku którego celem jest konkretna tkanka lub określony narząd. Tak wykonany lek osiąga odpowiednio wysokie stężenie - stężenie efektywne CE w tkance docelowej warunkując powodzenie terapii. Dystrybucja leków jest jednak procesem bardzo złożonym i warunki dystrybucji w stanie fizjologicznym organizmu często znacznie mogą odbiegać od warunków dyspozycji w stanach patologii. Wynik farmakokinetycznej optymalizacji procesów dystrybucji zależny jest najczęściej od wartości przepływu krwi przez organy lub tkanki docelowe, ważną rolę pełni pH kompartmentów które osiąga lek. Równie ważne są zmiany dotyczące eliminacji oraz objętości kompartmentów w których rozmieszcza się lek lub do których ma znaczne powinowactwo. P r o c e s o m dystrybucji towarzysza jednocześnie procesy redystrybucyjne. Zachodzą one z różnym nasileniem - szybkością i wydajnością oraz w różnej skali. Redystrybucja leków z kompartmentu obwodowego do krwi jest zjawiskiem którego rozmiar można dokładnie opisać i sprecyzować. Większym problemem są zjawiska redystrybucji do organów (z krwi do żołądka), lub krążenia wątrobowo jelitowe leku które są trudne do śledzenia *in vivo*. Z pomocą przychodzą tu jednak metody PBPK. Przykładem może być kontrola produkcji żółci lub jej uwalniania do światła jelita która nie jest zagadnieniem łatwym w analizie PK. Podobnie trudna w ocenie jest wartość GER zmieniająca dystrybucję leków podawanych doustnie.

W fazie eliminacji leku zmiany kinetyki łączą się najczęściej z kontrolą efektu “pierwszego przejścia”. Stężenie leków metabolizowanych w znacznym procencie przez wątrobę tuż po wchłonięciu do krwiobiegu zaczyna bardzo szybko spadać. Dzięki zmianom struktury chemicznej można zmienić zachowanie leku w fazie eliminacji czego efektem jest inny przebieg krzywej C-T. Skutkiem tego jest zwiększenie wartości AUC, β i okresu półtrwania (Zając M., Pawełczyk E. 2000). Techniki takie jak szybka analiza woltametryczna umożliwiają określenie stabilności metabolicznej leku jeszcze na etapie przedklinicznej analizy kandydatów na lek. Metabolizm leków to jednak nie tylko metabolizm wątrobowy. Enzymy mikrosomalne decydujące o procesach metabolicznych leków na przykład w obrębie przewodu pokarmowego, mięśni czy płuc mogą znacznie modyfikować fazę wchłaniania leku. W ramach projektowania przebiegu procesów metabolicznych duże znaczenie mają niekiedy pozytywne interakcje farmakokinetyczne dotyczące tej fazy. Najczęściej świadome zmiany fazy metabolizmu leku doprowadzają do zmiany postaci leku i równocześnie drogi podania. Optymalizacja procesów eliminacji leku wiąże się z optymalizacją i modyfikowaniem kilku lub wszystkich poprzednich faz kinetycznych. Problemy eliminacji leku na oczekiwanym poziomie najczęściej związane są z określoną postacią leku oraz jego oczekiwaną dystrybucją w organizmie. Optymalizacja eliminacji leku jest zwykle wynikiem działań zmierzających do uzyskania żądanej wartości biologicznego okresu półtrwania oraz MRT.

Interakcje leków - rola w farmakokinetyce

Z całej podanej dawki tylko niewielki procent leku wiąże się z receptorem wywołując efekt farmakologiczny. Aby cząsteczka leku mogła wywołać oczekiwaną reakcję po stronie receptora musi zostać dostarczona w określonej ilości i mieć do niego dostęp. W prawie każdym przypadku łącznego stosowania substancji leczniczych na tym etapie może dochodzić jednocześnie do wielu interakcji pomiędzy lekami. Interakcje te zwykle modyfikują działanie jednego, obu lub kilku zastosowanych leków w mniejszym lub większym stopniu. Wynik interakcji pomiędzy lekami może być mierzony nie tylko poprzez obserwację stanu pacjenta i ewentualnych działań dodatkowych, niepożądanych lub zniesienia działania leku - relacja PD. Wynikiem zaistnienia takich interakcji są mierzalne w sposób bezwzględny parametry farmakokinetyczne - PK i farmakodynamiczne - PD. Precyzyjną wielotorową matematyczną charakterystykę interakcji leków umożliwia modelowanie typu PK/PD. Najogólniej w ramach procesów kinetycznych ADME wyróżnić można dwie ważne grupy interakcji. Pierwsza to interakcje modyfikujące fazy wchłaniania i dystrybucji leku. Druga grupa to interakcje dotyczące fazy metabolizmu i eliminacji (Ascione F.J. 1976; Ito K. i wsp. 1998). Rozpatrując jednak interakcje farmakokinetyczne trudno w praktyce rozdzielać je i klasyfikować jako osobne zjawiska. Przyczyną tego jest fakt iż ADME, w wyniku zaistnienia interakcji - modyfikacji na jakimkolwiek etapie dyspozycji leku, może ulegać zmianom w każdej z kolejnych faz .



Rys. Związek między punktem zaistnienia interakcji PK a konsekwencjami w pozostałych fazach kinetycznych.

Uwalnianie i wchłanianie

Interakcje w fazie uwalniania związane są z niezgodnościami dotyczącymi dwóch substancji chemicznych z powodu niezgodności recepturowych i farmaceutycznych. Na tym etapie składniki dwóch leków mogą reagować ze sobą z wytworzeniem produktów modyfikujących działanie farmakologiczne poprzez zmianę charakteru procesu wchłaniania. Ta zmiana modyfikuje kształt wszystkich pozostałych faz kinetycznych najczęściej wiąże się ze zmniejszeniem AUC i spadkiem wartości dostępności biologicznej. Bywa jednak że brak kontroli nad kinetyką leku w takiej sytuacji powoduje nagły wzrost dostępności biologicznej leku oraz wydłużenie MRT.

Duże znaczenie dla interakcji farmakokinetycznych w fazie wchłaniania ma rodzaj i ilość pokarmu znajdującego się w przewodzie pokarmowym. Szczególne znaczenie ma ilość tłuszczów i wody, dla leków lipofilnych. Nie bez znaczenia pozostają procesy uwalniania do światła przewodu pokarmowego kwasów żółciowych które mogą w znacznym stopniu modyfikować wchłanianie wielu leków podawanych doustnie. Dla leków mających zdolność chelatowania jonów duża ilość bogatego w jony dwu i trójwartościowe pokarmu powoduje powstanie nie wchłanialnych kompleksów. Wreszcie, zdarzają się trudne do śledzenia interakcje dotyczące procesów redystrybucji leków które osiągają duże stężenia w żółci i ponownie trafiają do światła przewodu pokarmowego. Zmiany charakteru wchłaniania leków których lipofilność jest wykładnikiem stopnia jonizacji w środowisku, wynikają ze zmian pH jamy ustnej żołądka lub jelit. Zmiany te mogą być wywołane wprowadzeniem pokarmu, innego leku, bądź zmianami wynikającymi z procesów chorobowych.

Zmiany w motoryki przewodu pokarmowego dla postaci leku o określonym dla danego odcinka czasie rozpadu i uwalniania substancji leczniczej mogą także zmieniać kinetykę leku. Zmiany aktywności ruchowej żołądka i jelit mogą być powodowane pokarmami, innymi lekami lub procesem chorobowym. Niejednorodność dystrybucji dla leku wchłanianego w obrębie przewodu pokarmowego może wywoływać każda inna substancja modyfikująca GER (ang.: *Gastric Emptying Rate*). Wchłanianie mogą zmieniać niektóre pokarmy powodujące inhibicję enzymów decydujących o metabolizmie leków. Tak dzieje się w przypadku soku z grejpfruta. Składnikami soku są między innymi inhibitory CYP3A4 w obrębie przewodu pokarmowego (Takanaga H. i wsp. 2000). Stąd leki których metabolizm związany jest z funkcją enzymu uzyskują przy łącznym podaniu bardzo wysoką dostępność biologiczną. Niejednokrotnie stwarzają także zagrożenie wystąpienia ADRs.

Rola zjawisk patologicznych w fazie wchłaniania

Częstym zjawiskiem towarzyszącym wszystkim procesom chorobowym jest zespół zmian określany jako zapalenie (łac.: *Inflamatio*). Stan zapalny w większości wypadków zwiększa wchłanianie leków w związku ze zwiększeniem ukrwienia danej okolicy oraz w związku ze zwiększoną przepuszczalnością kapilar. Jest to zmiana jednego z trzech podstawowych fizykalnych czynników decydujących o wchłanianiu - ukrwienia (oraz szybkości przepływu krwi). Jednak zmiany o charakterze wytwórczym zmniejszają wchłanianie leku to zaś modyfikuje w sposób niekorzystny pozostałe dwa czynniki - powierzchnię wchłaniania oraz czas wchłaniania z danej powierzchni. Zmiany patologiczne w obrębie przewodu pokarmowego są jedną z najczęstszych przyczyn zmian kinetyki wchłaniania leków podawanych *per os*. Proces wchłaniania może modyfikować praca żołądka. O wchłanianiu z żołądka decyduje jego motoryka, ukrwienie i pH treści. Wzrost pH żołądka może być skutkiem długotrwałych schorzeń nerek. Wzrost pH będzie zmniejszał wchłanianie niektórych leków. Każde schorzenie powodujące zmiany fizjologii żołądka, modyfikuje wchłanianie leku w jego śluzówce. Dla leków podawanych doustnie nieregularna motoryka żołądka może prowadzić do okresowego przekazywania partii leku do jelit co zmienia charakter dystrybucji leku. Zmniejszona podaż żółci przyczynia się do spadku wchłaniania leków lipofilnych z jelit. Jelito cienkie dysponuje ogromną powierzchnią wchłaniania. Stąd zachowuje stałą zdolność wchłaniania leków mimo zaistniałej patologii, w szerszych granicach niż pozostałe odcinki przewodu pokarmowego. Duże zmiany we wchłanianiu z jelita cienkiego powodować będą jednak zmiany pH jego treści. Do pewnego stopnia zmiany te kompensowane są znaczną powierzchnią jelita. Duże znaczenie dla wchłaniania z przewodu pokarmowego ma sprawność układu krążenia. Zmniejszone ukrwienie przewodu pokarmowego zmniejszać będzie wchłanianie i dostępność leku. Krew i jej przepływ przez tkanki i organy mające kontakt z rozpuszczonym w obrębie GIT lekiem warunkuje dostępność leku i wchłanianie do kompartmentu centralnego. Bez przepływu krwi i właściwej pracy naczyń krwionośnych lek dostępny jest jedynie powierzchownym warstwom tkanek i nabłonków.

Dystrybucja:

W przypadku stosowania leków dla których faza wchłaniania nie jest mierzalna (podanie donaczyniowe) w ramach występujących interakcji może dochodzić do modyfikacji fazy dystrybucji oraz braku kontroli nad procesami redystrybucji pomiędzy tkankami. Najczęściej obserwowane zmiany dotyczą interakcji wywołanych konkurencją o miejsca wiązania leku z białkami krwi. Jeżeli lek eliminowany jest dzięki funkcji jednego narządu na przykład wątroby to proces eliminacji można opisać prostym równaniem ujmującym klirens wewnętrzny organu Cl(int) oraz stężenie frakcji wolnej leku we krwi fuB.

$$\mathbf{Cl(h) = Cl(int) \times fuB}$$

Zależność ta opisuje jak bardzo ważny jest fakt zwiększenia ilości wolnego leku we krwi dostępnego procesom eliminacji (Ito K. i wsp. 1998).

Ilość cząsteczek wiązanych z białkami może zostać zmniejszona co przyczynia się do podwyższenia stężenia maksymalnego, zwiększenia AUC, oraz zagrożenia znacznego przekroczenia wartości stężenia terapeutycznego. Interakcje te mają szczególne znaczenie dla leków w znacznym stopniu wiążących się z białkami (90%), o niskim indeksie terapeutycznym, długim okresie półtrwania i małej objętości dystrybucji (słabo penetrujących tkanki). Leki które zwiększają poziom niektórych frakcji białek na przykład AAG przyczyniać się będą do zwiększonego wiązania frakcji leków o charakterze słabych zasad. Leki zwiększające ilość frakcji albumin spowodują zwiększenie wiązania innych leków - słabych kwasów z białkami.

Rola zjawisk patologicznych w fazie dystrybucji

Patologia dotycząca funkcji układu krążenia jest częstą przyczyną zmian fazy dystrybucji leku do tkanek oraz jego metabolizmu i eliminacji. W przypadku leków w znacznym stopniu penetrujących tkanki, schorzenia serca powodują zmniejszenie wartości objętości dystrybucji i często wzrost stężenia maksymalnego leku we krwi. Najprawdopodobniej jest to wynikiem słabego przepływu krwi przez tkanki i słabej perfuzji. Dla leków które rozmieszczają się głównie w łożysku naczyniowym zmiany objętości dystrybucji wywołane schorzeniami serca zwykle są niewielkie.

Metabolizm

Interakcja leków w fazie ich przemian metabolicznych doprowadza do zmian w kinetyce dystrybucji redystrybucji oraz wydalania leku. W przypadku ograniczenia tempa przemian metabolicznych w stosunku do klasycznych (podlegających efektowi pierwszego przejścia) formulacji leków może dojść do wydłużenia okresu półtrwania, zwiększenia wartości AUC i wydłużenia średniego czasu przebywania leku w organizmie - MRT. Jednak ten sam układ dla leków typu *pro-drug* wywoła efekt odwrotny. Stężenie aktywnych farmakologiczne i pożądanych metabolitów będzie zbyt niskie aby wywołać oczekiwany efekt terapeutyczny. Najczęściej interakcje farmakokinetyczne tej fazy dotyczą współzawodnictwa o izoenzymy klasy CYP. Dotyczy to zarówno przypadku gdy za metabolizm leku odpowiada jeden izoenzym jak również wtedy gdy jest ich kilka. Dwa konkurujące ze sobą leki mogą więc stanowić dla enzymu albo substrat, albo inhibitor albo aktywator.

Eliminacja

W fazie eliminacji interakcje leków ilustrują głównie zmiany wartości klirensu całkowitego oraz klirensu narządów takich jak wątroba i nerki. Ich wartości są jednak ściśle uzależnione od wartości objętości dystrybucji i okresu półtrwania w fazie eliminacji. Stąd interpretacja uzyskanych danych nie zawsze prowadzi do ujawnienia interakcji tylko w fazie eliminacji. Często na wysokość opisywanych parametrów wpływ mają zmiany w fazach poprzedzających. Jeżeli jednak można je wykluczyć to najczęściej mają one związek z mechanizmami konkurencji o mechanizmy transportu, zmiany konformacji substancji czynnej, wchłanianie zwrotne z kanalików nerkowych, zmiany wywołane zmianą pH moczu itd.. Ewentualne interakcje w fazie eliminacji leków często mają początek już we wczesnych stadiach dystrybucji leku. Często przyczyną zwiększonej lub powolnej eliminacji leku mogą być interakcje lek - lek w fazie wiązania z białkami. Jeżeli do problemu wypierania z połączeń z białkami dołącza problem inhibicji i spadku wartości klirensu wewnętrznego narządów odpowiedzialnych za eliminację, dochodzi do wzrostu AUC i t1/2 oraz spadku wartości Clb (Ito K. i wsp 1998).

Rola zjawisk patologicznych w fazie eliminacji i procesach metabolizmu

W przypadku dwóch podstawowych narządów gwarantujących eliminację leku jakimi są nerki i wątroba choroby układu krążenia mogą znacznie modyfikować kinetykę leku. Słaby przepływ krwi w przypadku wątroby ma szczególne znaczenie dla leków o dużym współczynniku ekstrakcji ER > 0.7.

Leki takie określa się przepływozależnymi a ich przemiany metaboliczne w wątrobie zależne są od pojemności wyrzutowej serca. Dla leków o niskim współczynniku ekstrakcji ER znaczenie przepływu dla procesów detoksykacji jest niewielkie. Jednak słabe ukrwienie wątroby wiąże się między innymi także ze spadkiem jej aktywności metabolicznej. Zmiany degeneracyjne w obrębie miąższu wątroby mogą się manifestować między innymi spadkiem ilości albumin. Może to stanowić wskaźnik spadku aktywności metabolicznej organu. Często w takich wypadkach spadająca ilość albumin i wzrost ilości bilirubiny współzawodniczącej z cząsteczkami leku o miejsca wiązania jest przyczyną wzrostu stężenia leku we krwi. Temu zjawisku dla wielu leków towarzyszy wzrost objętości dystrybucji. Zmiany patologiczne w obrębie wątroby mogą także wpływać na fazę wchłaniania niektórych leków podawanych doustnie. Przyczyną są zaburzenia krążenia w obrębie *vena portae*. W przypadku nerek praca układu krążenia ma ogromne znaczenie między innymi dla leków które wydalane są w drodze filtracji kłębkowej. Choroby nerek mogą być przyczyną podwyższonego pH w obrębie żołądka. Przyczyniają się także do zmniejszenia wiązania leków z białkami. Zmniejszenie wiązania z białkami może dotyczyć zarówno białek osocza jak i białek tkanek co w przypadku niektórych leków może skutkować zmniejszeniem objętości dystrybucji.
Pracę obu organów bardzo modyfikują stany zapalne powodujące ich dysfunkcję. W przypadku nerek dysfunkcja pracy może objawiać się dość późno z uwagi na to że nerki są narządem parzystym o dość dużej wydolności. Dysfunkcja jednej nerki do pewnego stopnia może być kompensowana pracą drugiej nerki. Duże zmiany kinetyki leków w tej fazie towarzyszą farmakoterapii zatruć toksynami niszczącymi tkanki narządów miąższowych.

Monitorowanie parametrów farmakokinetycznych w warunkach możliwości zaistnienia interakcji leków jest tym trudniejsze że problemowi towarzyszy coraz bardziej zaawansowana technologicznie postać leku. Zadaniem tworzenia odpowiednio zaawansowanej dla danej substancji leczniczej postaci leku nie jest bowiem ochrona przed interakcjami. Jej projektowanie wykorzystuje znajomość subtelnych mechanizmów i procesów jakim lek poddawany jest w ustroju.

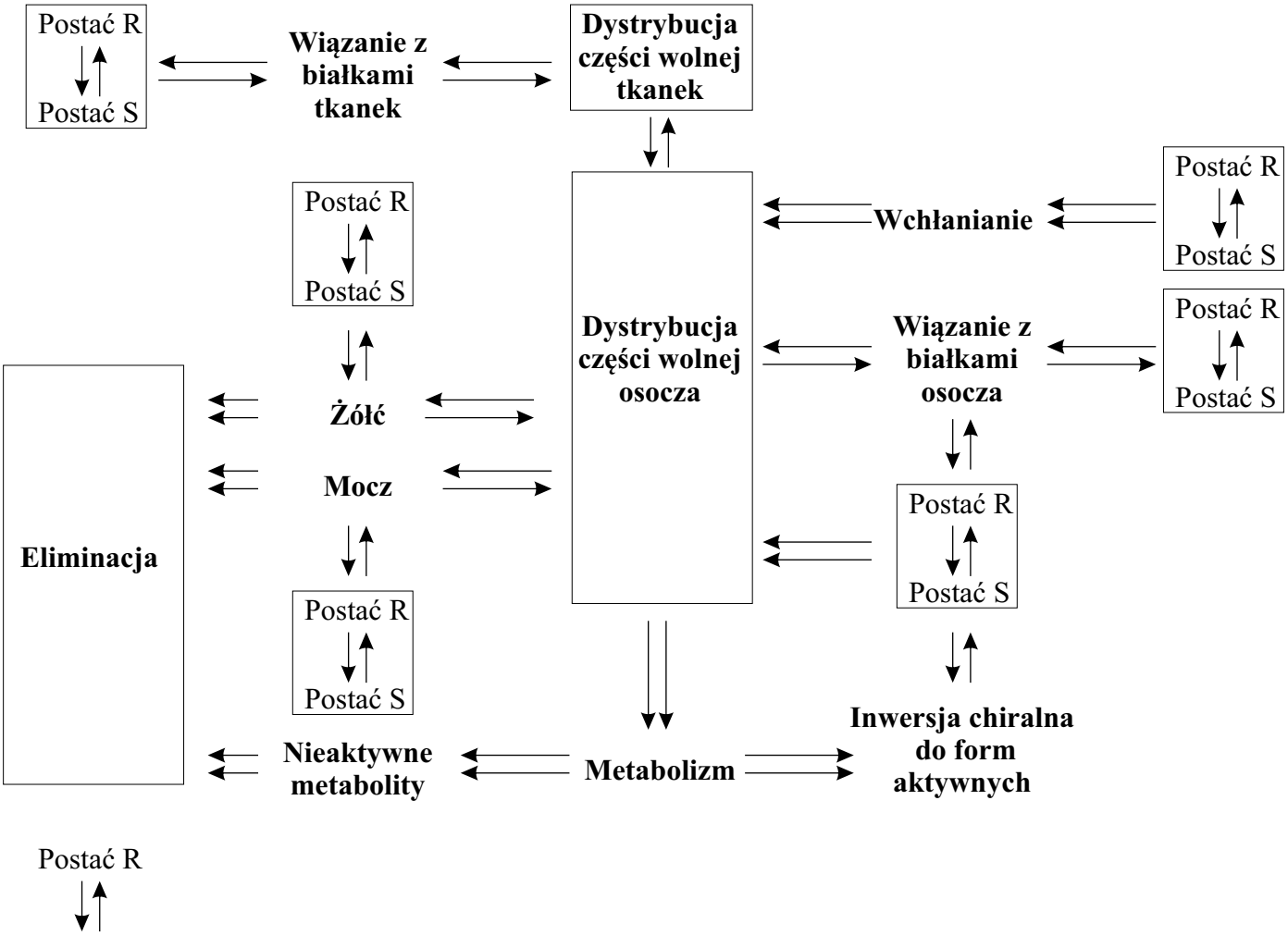
Farmakokinetyka związków chiralnych - SPK (ang.: *Stereoselective Pharmacokinetics*, *Enantioselecive Pharmacokinetics*)

Farmakokinetyka stereoselektywna jest szczególnym kierunkiem rozwoju klasycznej faramkokinetyki. Obiektem zainteresowania jest tu mieszanina form substancji leczniczej o różnym ukształtowaniu przestrzennym. Związków optycznie czynnych stosowanych w medycynie jest obecnie wiele. Ich liczba stale rośnie. Dzięki nowoczesnej analityce można jednak śledzić losy poszczególnych postaci substancji optycznie czynnych w organizmie od fazy wchłaniania po eliminację z ustroju. W chwili obecnej gama leków które można poddać analizie chiralnej jest bardzo szeroka, obejmuje między innymi takie substancje jak:

alprenolol	amlodypina	atropina
bupiwakaina	karprofen	klenbuterol
diltiazem	napropamid	naproksen
nikardypina	nikotyna	norleucyna
oktopamina	ofloksacyna	oksazepam
omeprazol	prilokaina	disopiramid
efedryna	fluoksetyna	heksobarbital
indapamid	izoksysupryna	ketamina
ketokonazol	mefenytoina	metadon
terbutalina	terfenadyna	werapamil

Analiza matryc biologicznych związków chiralnych jest dziedziną trudną. Niedopatrzenia w procedurze przygotowania matryc do oczyszczania, przeprowadzenie oczyszczania i sam rozdział chromatograficzny nie może mieć wpływu na właściwości badanej substancji. Metody analityczne dla tego rodzaju związków powinny wyróżniać się doskonałymi parametrami walidacyjnymi, co nie zawsze możliwe jest do spełnienia. Zafałszowania w odczycie stężeń poszczególnych składników racematu mogą znacznie zmniejszać czytelność krzywej C-T. Stąd prawidłowe wnioskowanie na podstawie takich krzywych może być utrudnione lub praktycznie niemożliwe. Nie zawsze odmiany optycznie czynne leku mają różne charakterystyki farmakokinetyczne. Zwykle jednak aby wykluczyć taką hipotezę należy przeprowadzić badania mające na celu określenie kompletnych profili farmakokinetycznych obu form. Określenie kinetyki każdej z form jaka ma znaleźć się w leku nie zawsze jednak jest równoznaczna ze znajomością kinetyki mieszaniny. Zdarza się że jedna z form może modulować farmakokinetykę drugiej. Problem narasta gdy odmian optycznych w racemacie jest więcej niż dwie. O farmakokinetyce stereoselektywnej można mówić zawsze wtedy gdy badana substancja jest optycznie czynna, jest izomerem optycznym lub geometrycznym i przynajmniej jeden z procesów transportu leku w organizmie zachodzi z udziałem białek lub transportu czynnego. Różnice w kinetyce substancji optycznie czynnych związane są najczęściej z różnicami wynikającymi z powinowactwa tych substancji do białek.

Na początku lat 80 - tych rozpoczęto prace nad kolumnami chromatograficznymi służącymi do rozdziału związków optycznie czynnych, wypełnionych białkami. Użyto w tym celu miedzy innymi albumin i kwaśnej glikoproteiny - AAG. Związków znacznie wcześniej poznanych i izolowanych z osocza. Wykorzystano w tym celu specyficzne właściwości białek osocza dzięki którym związki chiralne mogły być rozdzielane po umieszczeniu w fazie mobilnej. Białka te dysponują znaczną powierzchnią która stwarza wiele przestrzennych "pułapek" dla związków o określonym kształcie i konformacji przestrzennej. Pułapki te funkcjonują różnie dla form prawo i lewoskrętnych związków optycznie czynnych. Sposób wiązania z cząsteczkami leku jest zależny zarówno od ładunku jaki posiada lek jak i ładunku białka. Ładunek powierzchni białek wyrażający się gęstością elektronową powierzchni cząsteczki białka jest ściśle zależny od pH. Stąd znaczne zmiany w wiązaniu leków z białkami osocza powodować może zmiana pH osocza. Podobnych reakcji można spodziewać się w tkankach i innych miejscach dyspozycji leku. Zmiany w kinetyce związków chiralnych wynikają nie tylko z różnic we właściwościach związanych ze skręcalnością światła. Wiadomo bowiem że w wielu przypadkach różnice te idą w parze z różnicami we właściwościach fizykochemicznych składników, między innymi pH czy pKa. Ma to szczególne znaczenie dla dystrybucji i w szerszym świetle dyspozycji leku w organizmie.



Rys. Zależności decydujące o przebiegu ADME związków chiralnych.

L - efedryna łatwo rozpuszczalna w wodzie (higroskopijna)
D- efedryna słabo rozpuszczalna w wodzie

Obecnie wiadomo, że izomery geometryczne mają różne właściwości fizykochemiczne, czego nie można powiedzieć o enancjomerach. Lecz już w przypadku diastereoizomerów znowu można mówić o różnicach we właściwościach fizykochemicznych. Wypadkową różnic pomiędzy składnikami związków chiralnych są nie tylko różnice pomiędzy szybkością i stopniem wiązania z białkami lecz także procesami transportu. Skutkuje to często znacznymi różnicami związanymi z kierunkiem i stopniem dystrybucji leku do tkanek. Zupełnie osobnym problemem są różnice w metabolizmie obu odmian badanej substancji łącznie z możliwością inwersji chiralnej związku w wyniku procesów metabolicznych. Inwersja chiralna może prowadzić do przekształceń od leku niechiralnego do chiralnych pochodnych. Jednocześnie ze zmianą aktywności wewnętrznej z leku aktywnego do nieaktywnego lub odwrotnie. Wpływ na efekt farmakologiczny racematu ma między innymi stosunek ilościowy odmian optycznie czynnych.
Kinetyka związków optycznie czynnych jest zjawiskiem złożonym, wiązanie z białkami jednej z odmian optycznie czynnych może być uprzywilejowane wobec drugiej. Jeżeli towarzyszą temu różnice w aktywności wewnętrznej cząsteczek, lub wręcz w kierunku działania (ADR), badanie wzajemnych powiązań i interakcji takiego leku z innymi w fazie wiązania i uwalniania z wiązań z białkami może być bardzo trudne.

Leki chiralne bardzo często cechują interakcje pomiędzy składnikami racematów. Interakcje pomiędzy poszczególnymi odmianami optycznie czynnymi są często trudne do uchwycenia. Do badania przebiegu interakcji pomiędzy składnikami mieszaniny służą metody *in vitro* na hodowlach komórkowych. Jednak i te zjawiska nie opisują do końca złożoności farmakokinetyki leków chiralnych. Znacznie bardziej złożone od innych leków są interakcje pomiędzy dwoma różnymi substancjami leczniczymi z których każda posiada odmiany optycznie czynne. Równie złożone i stereoselektywne są interakcje leków chiralnych z innymi lekami nie posiadającymi takich właściwości (Zhou Quan i wsp. 2002). Nie zawsze jednak różnice w budowie przestrzennej cząsteczek tego samego związku muszą prowokować różnice w wiązaniu z białkami. Zmiany w kinetyce obu postaci mogą manifestować się w postaci różnych ścieżek metabolicznych. To zaś skutkować będzie różnicami w wielkości AUC, Cl, MRT i t1/2. Znanych jest wiele przykładów leków których odmiany optycznie czynne mają różną charakterystykę niektórych procesów kinetycznych (Schäfer-Korting M. 2002).

Wchłanianie

Jeżeli wchłanianie związków optycznie czynnych związane jest z transportem aktywnym to zwykle jest to proces stereoselektywny. Nie zawsze oznacza to jednak że każdy związek chiralny będzie dysponował frakcją uprzywilejowaną. Różnice w transporcie mimo jego stereoselektywności mogą być niedostrzegalne w warunkach *in vivo* i maskowane innymi procesami. Dostępność biologiczna związków chiralnych nie zawsze jest wymiernym wskaźnikiem procesu wchłaniania. Część związków optycznie czynnych cechuje bowiem stereoselektywna dystrybucja pogłębiona zjawiskami redystrybucji na przykład z żółcią do przewodu pokarmowego. Selektywność w reakcji wiązania z białkami lub procesami eliminacji może powodować znaczne różnice w ocenie dostępności biologicznej odmian optycznie czynnych. Nie musi jednak mieć to związku z selektywnością procesu wchłaniania. Brak jasności na którymkolwiek etapie dyspozycji leku chiralnego w organizmie może zatem przyczynić się do znacznego błędu obliczeniowego w trakcie obliczania dostępności biologicznej i ułamka zaabsorbowanej dawki.

D- dopa wchłania się słabiej od L - dopa
D- metotreksat wchłania się słabiej od L - metotreksatu
cis - likopen wchłaniany jest w większym stopniu niż trans - likopen (Boileau A.C. i wsp. 1999)
L - cefaleksyna hamuje wchłanianie D - cefaleksyny z jelit (Zhou Quan i wsp. 2002)

Dystrybucja

Dystrybucja związków chiralnych jest zawsze procesem stereoselektywnym gdyż wiąże się z rolą białek we krwi i tkankach. Leki chiralne wiążą się z białkami w zależności od powinowactwa danej formy do określonego białka a dokładnie pułapek przestrzennych jakie posiada w swej strukturze. Jest to jednak tylko jedno z zagadnień związanych z procesem wiązania z białkami. Odmiany optycznie czynne mogą wzajemnie konkurować o miejsca wiązania w obrębie białek. Oznacza to że na przykład odmiana S wypiera z połączeń z białkami formę R. Nie musi się to jednak wiązać z aktywnością danej odmiany. Jeżeli frakcja wypierana z połączeń (wolna) ma większą aktywność wewnętrzną, to istnieje prawdopodobieństwo modulowania efektu terapeutycznego procesem wiązania przez frakcję wypierającą. Tego typu interakcje pomiędzy składnikami mieszanin związków chiralnych mogą przyczyniać się do znacznych zmian PK i PD w populacjach docelowych. Ewentualne różnice potęgowane będą zmianami parametrów biochemicznych i fizjologicznych organizmu w stanach patologii. Stereoselektywność w wiązaniu z białkami dotyczy nie tylko białek osocza lecz także białek tkanek. Różnice w wiązaniu z białkami to jedna z najczęstszych przyczyn silnie wyrażonych różnic i stereoselektywności farmakokinetyki związku. Silne wiązanie jednej z frakcji optycznie czynnych powoduje znaczne różnice w objętości dystrybucji obu frakcji. Jeżeli wynika to nie tylko z selektywności procesu lecz także ze zmian wynikających z powinowactwa poszczególnych frakcji do danego białka proces ten modulowany jest wypieraniem i konkurencją o miejsca wiązania. Silne wiązanie substancji z białkami może przyczyniać się do zwiększania ilości frakcji wolnej we krwi odmiany przeciwnej (wypieranej z połączeń) a to może skutkować jej znacznie wyższym klirensem nerkowym.

Ciekawym zjawiskiem jest redystrybucja o charakterze stereoselektywnym wraz z żółcią. To zjawisko w połączeniu ze stereoselektywnością innych procesów kinetycznych może znacznie utrudniać wnioskowanie o kształcie farmakokinetyki leku w skali całego organizmu.

R- metadon ma większa objętość dystrybucji niż S - metadon (Kristensen K. i wsp. 1996)
R-(-) - disopiramid wiąże się słabiej z białkami krwi niż S-(+) - disopiramid (Lima J.J. i wsp. 1985)
Cis-cis - miwakurium ma większą objętość dystrybucji niż cis-trans, trans-trans (Lugo S.I. i wsp. 1998)
S - propranolol wiąże się silniej (konkuruje) z białkami osocza od R - propranololu (Zhou Quan i wsp. 2002)
R - sulbenicylina wiąże się z białkami osocza słabiej od S - sulbenicyliny (Itoh T. i wsp. 1998)
R - latamoksef wiąże się z białkami osocza silniej od S - latamoksef (j.w.)
R -karbenicylina wiąże się z białkami osocza silniej od S - karbenicyliny (j.w.)

Metabolizm:

Najczęściej omawiane różnice w metabolizmie związków chiralnych dotyczą metabolizmu wątrobowego. Szczególna zdolność związków optycznych do stereoselektywności w tej fazie wynika głównie z reakcji z enzymami - białkami. Metabolizm leków optycznie czynnych może być także modyfikowany za pośrednictwem ich izomerów.

R - propafenon opóźnia metabolizm S - propafenonu (Zhou Quan i wsp. 2002)
S - nitrendypina jest inhibitorem metabolizmu R - nitrendypiny (Zhou Quan i wsp. 2002)
R - werapamil ulega w mniejszym stopniu efektowi pierwszego przejścia od S - werapamilu
R - ketoprofen u większości gatunków transformowany jest do S ketoprofenu (gryzonie, pies, małpa, koń, kot) słoń azjatycki jest jedynym gatunkiem który przekształca odmianę S w R (Mahmood I. i wsp 2006)

Jednym z ciekawszych zjawisk w tym zakresie jest zjawisko inwersji chiralnej. Zjawisku temu podlegają związki optycznie czynne oraz niektóre związki nie posiadające takich właściwości. Inwersja chiralna prowadzi do zmiany konformacji przestrzennej (optycznej lub geometrycznej) leku - substratu i stworzenia produktu o odmiennej konformacji. Zjawisko to dotyczy także inwersji pierścienia. W ten sposób leki które nie mają atomów chiralnych uzyskują je w drodze inwersji chiralnej. Leki które są optycznie aktywne zmieniają izomerię. Efektem takich zmian może być powstanie metabolitu optycznie czynnego z nieczynnego optycznie leku i na odwrót. Inwersja chiralna jest zjawiskiem trudnym do śledzenia w warunkach *in vivo*. Inwersja chiralna nie zawsze ma miejsce w fazie metabolizmu. Najczęściej badania dotyczące inwersji chiralnej przeprowadzane są na liniach komórkowych, izolowanych mikrosomach, lub wyselekcjonowanych modelach-układach enzymatycznych *in vitro*. Obecnie poznano już wiele leków w przypadku których potwierdzono istnienie zjawiska inwersji chiralnej:

flobufen	(Skalova L. i wsp 2001)
ibuprofen	(Doki K. i wsp 2003)
pranoprofen	(Imai T. i wsp 2003)
ketoprofen	(Lees P. i wsp 2003)
fenoprofen	(San Martin M.F. i wsp 2002)
albendazol	(Virkel G. i wsp 2002)
talidomid	(Erikson T. i wsp 2001)
klopidogrel	(Reist M. i wsp 2000)
D-leucyna	(Hasegava H. i wsp 2000)
kwas tiaprofenowy	(Erb K. i wsp 1999)
pantoprazol	(Masubuchi N. i wsp 1998)
stirypentol	(Tang C. i wsp 1994)
lifibrol	(Walters R.R. i wsp 1994)
tolperizon	(Yokoyama T. i wsp 1992)

Eliminacja

Eliminacja związków optycznie czynnych wraz z żółcią może być zjawiskiem stereoselektywnym. Niesie to określone konsekwencje dotyczące stężenia leku we krwi, który dostał się tam z przewodu pokarmowego.Stereoselektywność może być związana z krążeniem wątrobowo jelitowym leku tylko dla jednej z frakcji optycznie czynnej substancji. Przykładem jest kinetyka R i S - flurbiprofenu u szczurów (Eeckkhoudt S.L. 1997). Zjawisko to ma znaczny wpływ na wiele parametrów farmakokinetycznych począwszy od AUC dla obu frakcji poprzez Vd na wartości klirensu kończąc.

Klirens leków optycznie czynnych może być stereoselektywny nie tylko dla odmian optycznie czynnych leku ale także w stosunku do aktywnych optycznie metabolitów. Tak dzieje się w przypadku pazinaklonu gdzie klirens R- metabolitów jest znacznie większy od S - metabolitów (Hussein Z. i wsp. 1993) Eliminacja stereoselektywna wynikająca z selektywności mechanizmów metabolicznych w wątrobie może odbywać się w sposób nieliniowy. Oznacza to że jedna z odmian optycznie czynnych może ulegać reakcjom metabolicznym które dla danej dawki zostają wysycone. Wynikiem takiego zróżnicowania jest wzrost pola AUC dla tej frakcji która przy tej samej dawce i wyższej nie wykazuje takich właściwości. Mówi się wtedy o nieliniowości farmakokinetyki odmian chiralnych wynikającej z różnic w metabolizmie. Nieliniowość ta ściśle związana jest z dawką i drogą podania leku. Efektem jest spowolnienie eliminacji odmiany dla której procesy metaboliczne są wysycalne przy znacznie niższej dawce niż jej przeciwna forma (Marier J.F. 1997; Gross A.S. i wsp.1997).

R- metadon ma dłuższy okres półtrwania niż S - metadon
R- ibuprofen ma krótszy okres półtrwania niż S - ibuprofen (Bannwarth B. i wsp. 1995)
(-)- meflochina ma dłuższy okres półtrwania niż (+)- meflochina (Gimenez F. i wsp. 1994)
R-(-) - ketamina hamuje eliminację S-(+) - ketaminy (Ihmsen H. i wsp. 2001)
(+) - terbutalina hamuje wchłanianie zwrotne w kanalikach nerkowych (-) - terbutaliny
R - sotalolol zmniejsza klirens nerkowy S - sotalololu (Zhou Quan i wsp. 2002)
R - flurbiprofen jest wydzielany z żółcią w większym stopniu niż S - flurbiprofen (Eeckkhoudt S.L. 1997)
R - karprofen jest wydzielany z żółcią w większym stopniu niż S - karprofen (Priymenko N. i wsp. 1998)
R - sulbenicylina ma mniejszy klirens nerkowy od S - sulbenicyliny (Itoh T. i wsp. 1998)
R - (+) - propranolol jest eliminowany wolniej od S - (+) - propranololu (Marier J.F. 1997)
Z - doksepina działa silniej antydepresyjnie niż E - doksepina (Yan J.H. i wsp. 2002)

Wchłanianie I dystrybucja::	Metabolizm:	Eliminacja:
- PK racematu	- PK racematu	- PK racematu
- PK racematu i R - formy	- PK racematu i R - formy	- PK racematu i R - formy
- PK racematu i S - formy	- PK racematu i S - formy	- PK racematu i S - formy
- PK R - formy	- PK R - formy	- PK R - formy
- PK S - formy	- PK S - formy	- PK S - formy
Sztuczne błony półprzepuszczalne itp.	Izolowane mikrosomy, enzymy.	Izolowane narządy.
Błony izolowane z tkanek zwierząt.	Izolowane komórki wątroby.	Hodowle komórkowe.
Przenikalność przez bariery specjalizowane.	Izolowane komórki, białka. jelitowe etc..	
Hodowle komórkowe.		
Wiązanie z białkami.		

Rys. Przykłady kierunków badań parametrów farmakokinetycznych leków chiralnych *in vitro* .

Aktywność wewnętrzna, toksyczność.

Z - doksepina działa silniej antydepresyjnie niż E - doksepina (Yan J.H. i wsp. 2002)
S(-) bupiwakaina jest mniej toksyczna od racemicznej bupiwakainy (Whiteside J.B., Wildsmith J.A.W. (2001)

Liczne zmiany jakim podlegają substancje chiralne w ramach ADME wymagają odpowiedniej techniki obliczeń oraz metod doświadczalnych. Jedną z tańszych metod analizy parametrów farmakokinetycznych leków chiralnych są badania *in vitro*. W stosunku do leków chiralnych umożliwiają one śledzenie różnych procesów kinetycznych metodą krok po kroku w wielu układach doświadczalnych. Tak przeprowadzone badania pozwalają na precyzyjne określenie mechanizmu interakcji farmakokinetycznych pomiędzy składowymi racematu we wszystkich przestrzeniach kinetycznych *in vivo*. Obecność kilku składowych wymaga stosowania wielokrotnych obliczeń parametrów farmakokinetycznych tzn. klirensu dla obu odmian Cl(R) oraz Cl(S) lub racematu Cl(R,S). Podobnie z obliczaniem objętości dystrybucji czy pola powierzchni pod krzywą. Te same zasady rządzą obliczaniem parametrów kinetycznych metabolitów optycznie czynnych powstałych w ramach inwersji chiralnej. Rzędowość kinetyki w celu jej dokładnego sprecyzowania powinna być określana dla każdego z wymienionych wyżej układów w kilku (4-8) dawkach po podaniu jednorazowym.

Chronofarmakokinetyka (ang.: *Chronopharmacokinetics; Chronokinetics*)

Chronofarmakokinetyka (chronokinetyka) jest dziedziną która zajmuje się opisem zależności dyspozycji leku w organizmie od rytmów biologicznych. Dziedzina ta ma swoje odwzorowanie w chronotoksykokinetyce i jest częścią chronofarmakologii. Wpływ rytmów biologicznych na farmakokinetykę leku związany jest nie tylko z rytmami dobowymi lecz także z dłuższymi rytmami. Rytmy biologiczne mają duże znaczenie w badaniach kinetyki leków w organizmach zwierząt także w związku ze zmianami dotyczącymi pór roku w rytmie rocznym (Edery I. 2000). Wszystkie rytmy charakteryzują parametry typowe dla opisu zjawisk falowych:

- amplituda (ang.: *Amplitude*) - odchylenie od średniej
- częstotliwość (ang.: *Frequency*) - ilość cykli w jednym okresie
- czas trwania (ang.: *Duration*)
- maksimum (ang.: *Acrophase*)
- okresowość (ang.: *Period*) - czas trwania kompletnego cyklu
- MESOR (ang.: *Midline Estimating Statistic of Rhythm*) - wartość średnia rytmu - linia bazowa

Duża część rytmów dobowych podzielona jest na stadia 12 godzinne w ramach tzw. rytmu dobowego (ang.: *Circadian Rhythm*; łac.: *Circa Diem*) co szczególnie dobrze widoczne jest w przypadku leków psychotropowych (Nagayama H. 1999). Rytmy takie mogą posiadać pojedyncze maksima lub wykazywać je w kilku punktach czasowych, posiadają więc różną częstotliwość. Stąd doświadczenia mające na celu opis chronofarmakokinetyki leku, powinny operować zawsze porównaniem wielu punktów czasowych. Najczęściej badane zjawiska w chronofarmakokinetyce i chronobiologii dotyczą rytmów:

Rytmy o częstotliwości poniżej 20 h - *ultradian*

- dobowy — częstotliwość 20-28 h, średnio 24 h - *circadian*

Rytmy o częstotliwości powyżej 28h - *infradian*

- tygodniowy — częstotliwość 4-10 dni, średnio 7 dni - *circaseptan*
- czternastodniowy — częstotliwość 11-17 dni, średnio 14 dni - *circadiseptan*
- dwudziestodniowy — częstotliwość 17-23 dni, średnio 20 dni - *circavigintan*
- menstrualny — częstotliwość 25-35 dni, średnio 30 dni - *circatrigintian*
- roczny — częstotliwość 10-14 miesięcy, średnio 12 miesięcy - *circannual*

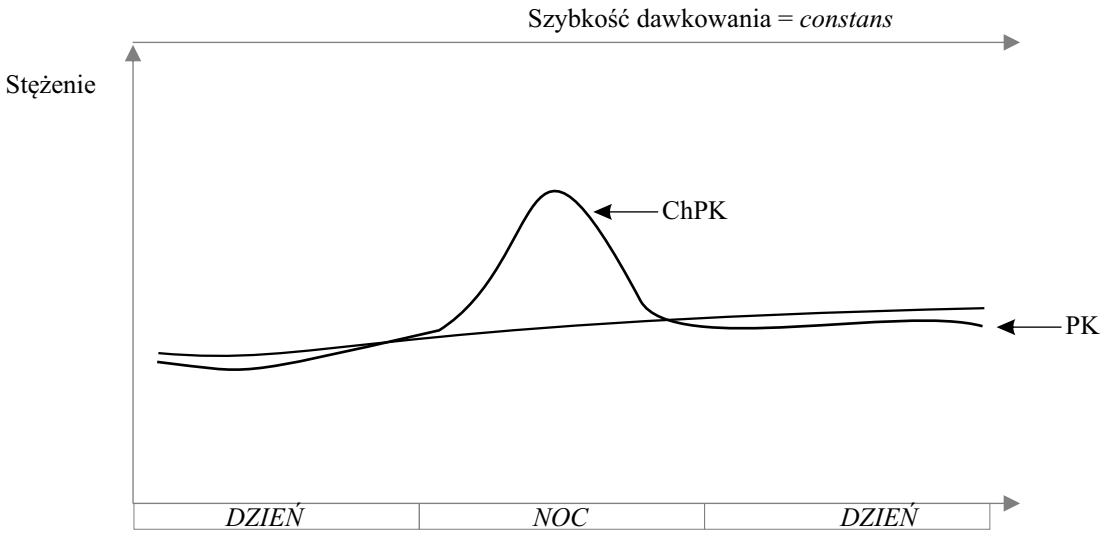
Bezpośrednią przyczyną obserwacji chronofarmakokinetyki wielu leków są zmiany w aktywności enzymów związanych z rytmem dobowym. Zmiany takie dotyczą także receptorów i systemów przekaźnikowych. Z tym zjawiskiem związana jest zależna od rytmu tolerancja na ksenobiotyki określana mianem chronotolerancji. Okresowe zmiany w strukturze błon komórkowych i receptorów określa się mianem chronestezji. Praktyczne wiadomości niosą informacje o istnieniu rytmów funkcjonalnych także dla całych organów. Przykładem może być praca płuc i różnice w ich funkcji w rytmie dobowym obserwowane u astmatyków i ludzi zdrowych (Spengler C.M., Shea S.A. 2000). Rytmy dobowe zależne są od stanów patologii co wykazano na przykładzie zmian stężenia leptyny we krwi kobiet otyłych. Rytm biologiczny dla leptyny cechuje jedno maksimum około północy oraz minimum między godzinami 9.00 -12.00. Wykazano że u kobiet otyłych stężenie leptyny we krwi na przebiegu całego rytmu było znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej (Langendonk J.G., Pijl H. i wsp. 1998). Przyczyną występowania cyklicznych (falowych) zmian w dyspozycji wielu leków w czasie jest zmiana niektórych parametrów fizjologicznych. Kluczowymi parametrami fizjologicznymi kontrolowanymi rytmem biologicznym decydującymi o farmakokinetyce leków są między innymi:

- ciśnienie krwi
- temperatura ciała
- objętość wydychanego powietrza
- zmiany w wydzielaniu soku żołądkowego
- szybkość opróżniania żołądka
- zmiany poziomu hormonów

Zmiany wartości powyższych parametrów wywołują określone skutki w większości faz kinetycznych jakim lek podlega w organizmie (Lemmer B., Bruguerolle B. 1994). Są one jedynie efektem ciągu zdarzeń który w przypadku rytmów okołodobowych składa się z trzech faz (Edery I. 2000). Pierwsza to odbiór informacji o warunkach światła lub ciemności oraz temperatury. Kolejne piętro odbierające informacje pełniące funkcję regulatorową u ssaków to SCN (ang.: *Nucleus Suprachiasmaticus*), oraz zegary peryferyjne zlokalizowane na poziomie komórkowym (geny-zegary; ang.: *Clock Genes*). Dopiero następny etap budowania rytmu to drogi zstępujące wywołujące efekty fizjologiczne ważne z punktu widzenia nowoczesnej farmakokinetyki.

Zmiana ciśnienia i przepływu krwi ma decydującą rolę dla dystrybucji leku. Ze zmianą perfuzji narządów i tkanek modyfikacji ulegają: efekt pierwszego przejścia dla leków przepływozależnych w wątrobie. Zmienia się więc metabolizm leku. Zmianom ulega charakter zjawisk redystrybucji leku z tkanek do krwi i z krwi do tkanek, wiązanie leku z białkami oraz poziom frakcji wolnej leku w kompartmencie docelowym. W nerkach zmianom ulega wartość filtracji kłębuszkowej. Parametr ten jest szczególnie ważnym czynnikiem decydującym o eliminacji leków wydalanych w dużej części wraz z moczem. Ukrwienie tkanek lub wręcz układów na przykład układu pokarmowego może w znacznym stopniu wpływać na wchłanianie leków. Wiadomo że treść żołądka wykazuje najniższe pH późnym popołudniem co ma znaczny wpływ na wchłanianie leków o charakterze słabych elektrolitów. Wreszcie przyczyną występowania wielu rytmów są zmiany poziomu hormonów takich jak kortyzol, melatonina, insulina, noradrenalina, czy aldosteron (Lemmer B. 1991).

Wiele czynników może w znacznym stopniu modyfikować chronofarmakokinetykę leków. W przypadku zależności farmakokinetyki od rytmów biologicznych jednym z ważniejszych czynników jest zaistniała patologia. Rytmy biologiczne a tym samym zjawiska zależności kinetyki od rytmów biologicznych uzależnione są od gatunku, płci a także wieku.



Rys. Wykres zmian stężenia leku w czasie. Krzywa typowa dla leku o kinetyce zależnej od rytmu dobowego - ChPK. Krzywa niezależna od rytmów biologicznych -PK.

Jedną z metod wykrywania zjawisk chronofarmakokinetyki leku jest monitorowanie stężenia leku w trakcie długotrwałego wlewu leku. W ostatnich latach ilość metod ułatwiających prowadzenie monitoringu rytmów dobowych w ramach badań farmakokinetycznych znacznie wzrosła (Bruguerolle B. 1998). Wprowadzaniu długotrwałych wlewów w sposób kontrolowany służą odpowiednio skonstruowane pompy. Doświadczenie polega na wprowadzeniu do organizmu leku ze stałą szybkością która pozwoli na utrzymanie stałego stężenia w fazie stacjonarnej, na przestrzeni doby lub kilku dni. Dokładna analiza pozwoli wykryć ewentualne odchylenia wartości stężenia. Odchylenia od stężenia średniego zweryfikowane i statystycznie istotne pozwalają śledzić rytm dobowy i potwierdzić jego wpływ na zmiany kinetyki leku. Podobnie jak w przypadku badania rzędowości i taki układ doświadczalny można zaprojektować dla różnych poziomów stężenia leku w fazie stanu stacjonarnego. W przypadku organów takich jak wątroba czy nerki sposobem na określenie zmian dobowych ich funkcji jest badanie kinetyki substancji o charakterze wskaźnikowym. Profil chronofarmakokinetyczny wątroby można określić badając kinetykę zieleni indocyjanowej - ICG (ang.: *Indocyanine Green*) (Lemmer B., Nold G. 1991). W przypadku wielu leków lipofilnych Cmax jest wyższe a tmax jest krótsze po podaniu porannym niż popołudniowym lub wieczornym. Większość rytmów dobowych człowieka ma swoje maksima w ciągu dnia. Śledzenie chronofarmakokinetyki leków może być szczególnie trudne w przypadku leków stereoselektywnych. Pewne różnice w skalowaniu parametrów farmakokinetycznych i fizjologicznych w obrębie różnych gatunków muszą być uwzględniane w przypadku zwierząt o wzmożonej aktywności w porze nocnej. Skalowanie allometryczne ze względu na różnice dotyczące maksimów rytmów dobowych może być obarczone znacznym błędem. Badania porównawcze leku wykonywane w różnych układach doświadczalnych powinny rozpoczynać się o tej samej porze. Wynika to z uwzględniania rytmów dobowych w projektowaniu badań klinicznych *in vivo*. W farmakologii weterynaryjnej ma to bardzo duże znaczenie szczególnie gdy lek podawany jest na przykład wraz z paszą. Decyzja o podawaniu leku z paszą dostępną cały czas lub w określonych porach nie może być dziełem przypadku. Potęgowany obecnością pokarmu przepływ krwi przez wątrobę może w znacznym stopniu wpływać na efekt pierwszego przejścia.

Znajomość podstawowych prawideł chronofarmakokinetyki pozwoliła na stwierdzenie zależności między przebiegiem krzywej C-T a interwałem pobierania próbek (badania CPKP po jednorazowym podaniu leku). W przypadku wielu zwierząt rezygnuje się z pobierania prób pomiędzy 8-24 h po podaniu leku, aby nie zmieniać charakteru krzywej (AUC). Zwykle w przypadku substancji o krótkich i średnio długich okresach półtrwania zmiany wartości pola w tym przedziale są niewielkie. Natomiast zmiana nachylenia końcowego odcinka krzywej może znacznie modyfikować stałą szybkości eliminacji (Dixit R. i wsp. 2003).

Znajomość podstawowych zasad chronofarmakologii pozwala na właściwe stosowanie leków i określanie właściwych pór stosowania leków. Pozwala to na dużą precyzję w optymalizacji farmakoterapii. W terapii lekami o kinetyce zależnej od rytmów dobowych należy śledzić ewentualne sezonowe zaburzenia przebiegu rytmów dobowych - SAD (ang.: *Seasonal Affecive Disorders*). Mogą one w sposób nieprzewidywalny zmieniać dyspozycję leku w organizmie. Obecnie w wielu ważnych grupach leków znajduje się co najmniej po kilka wykazujących zależność od rytmów biologicznych. Takie leki są zarówno wśród leków przeciwbakteryjnych (ampicylina,gentamycyna, gryzeofulwina), przeciwnowotworowych (5-fluorouracyl, cisplatyna, doksorubicyna, cyklosporyna) stosowanych w chorobach układu krążenia (propranolol, werapamil, digoksyna) oraz wielu innych (Lemmer B. 1991; Lemmer B. 1999).

Pozostałości leków w tkankach zwierząt.

Pozostałości leków weterynaryjnych w tkankach zwierząt przeznaczonych do spożycia to temat zajmujący szczególną pozycję w farmakokinetyce. Zagadnienie dotyczy bowiem efektu procesów dystrybucji i redystrybucji leku w tkance. W przypadku właściwego prowadzenia terapii zwierząt terapia taka nie stwarza zagrożeń dla zdrowia i życia człowieka spożywającego produkty takiego pochodzenia. Dawkowanie leków weterynaryjnych podlega licznym obostrzeniom. Dotyczy między innymi takiego formułowania dawki oraz prowadzenia terapii aby nie zostały przekroczone maksymalne poziomy pozostałości dla danego leku w tkankach przeznaczonych do spożycia - MRL. Maksymalny poziom pozostałości - MRL (ang.: *Maximum Residue limit*; USA - tolerancja - TOL, *Tolerance*), jest to parametr określający dopuszczalną ilość pozostałości leku w żywności. Przekroczenie wartości MRL dla danej substancji leczniczej zwykle wiąże się z nie stosowaniem się do określonych przez producentów leków okresów karencji dla leku. Ustalanie norm i aktów regulacyjnych w tym zakresie jest niezwykle złożone. Z punktu widzenia zagrożeń dla zdrowia człowieka ważny jest udział tkanki zawierającej pozostałości leku w dawce pokarmowej człowieka. Ten problem pogłębia inny rodzaj żywienia dorosłych, dzieci czy osób starszych. Każda grupa wiekowa w inny sposób będzie zagrożona źródłem takim jak mleko czy tłuszcz. Stąd specyficzny charakter obliczeń dla całkowitej dawki zaabsorbowanej w ciągu całego życia -ELI (ang.: *Estimated Lifetime Intake*), (EPA/600/8-89/043, 1996):

$$\mathbf{ELI = [F_{(0.1)} + 5Y \times F_{(1-5)} + 8Y \times F_{(6-13)} + 6Y \times F_{(14-19)} + 25Y \times F_{(20-44)} + 25Y \times F_{(45-70)}] / 70Y}$$

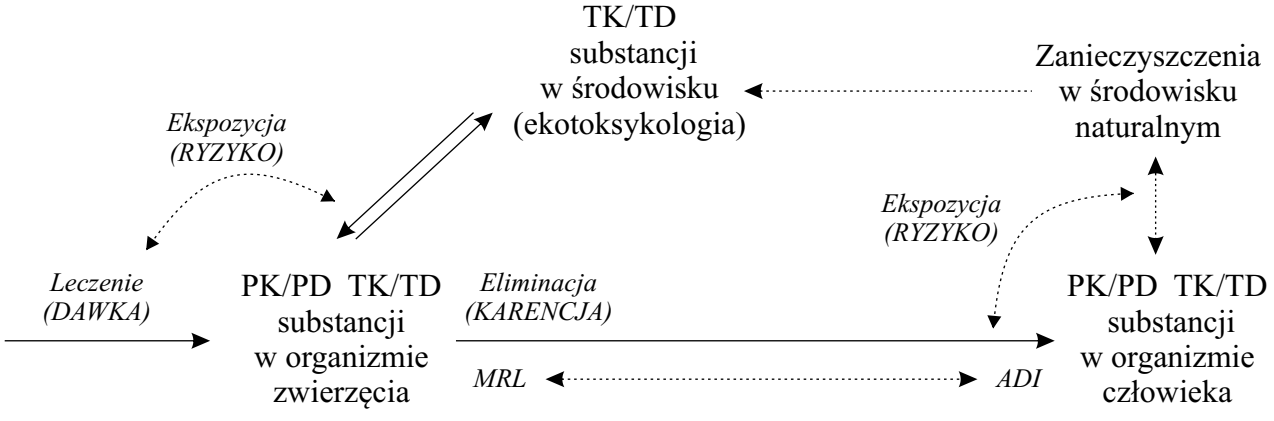
F - współczynnik spożycia charakterystyczny dla danej grupy wiekowej
6Y, 70Y .... - wiek

Toksykokinetyka bada między innymi efekty ekspozycji organizmów żywych na ksenobiotyki. Dla różnych dróg podania i różnego czasu ekspozycji stosuje się tu różne rodzaje obliczeń. Przykładem może być średnia dzienna dawka wchłaniana przez skórę - ADD (ang.: *Average Daily Dose*).

$$\mathbf{ADD = DR / BW \times T} \qquad \mathbf{ADD = (DA \times EV \times Y \times EF \times BSA) / (BW \times AT)}$$

AD - dawka zaabsorbowana przy jednorazowym kontakcie
Y - czas narażenia (lata)
BSA - pole skóry poddanej ekspozycji
AT = Y dla związków które nie są rakotwórcze
DR - dawkowanie (ang.: *Dosing Rate*)

EV - częstotliwość narażenia na kontakt
EF - częstotliwość ekspozycji (dni w roku)
BW - masa ciała
AT = 70 lat dla związków rakotwórczych (25 550 dni)
T - czas



Ryc. Zasięg nowoczesnej farmakokinetyki i toksykokinetyki w roli narzędzi kontroli zagrożeń środowiskowych.

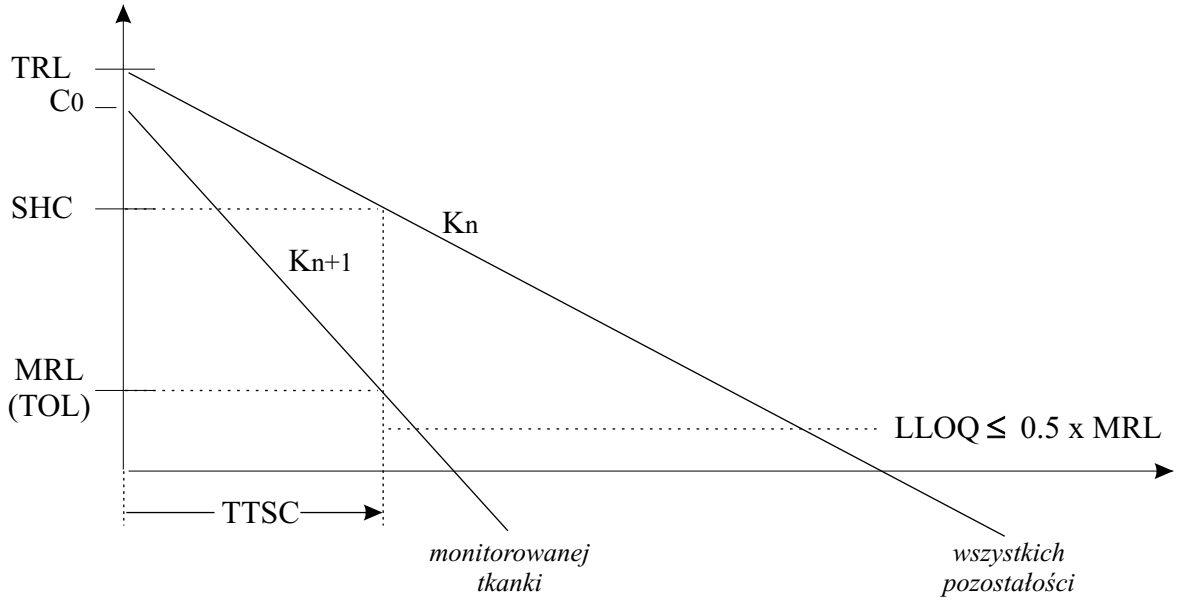
ADD / ADI > 1 ryzyko wystąpienia objawów niepożądanych
ADD / ADI < 1 brak ryzyka wystąpienia objawów niepożądanych

Badania przeprowadzane na zwierzętach dotyczą pozostałości leków weterynaryjnych w tkankach zwierząt przeznaczonych do spożycia bądź produktów pochodzenia zwierzęcego takich jak jaja lub mleko. Sposób przeprowadzania takich badań reguluje między innymi VICH. Zakres tych badań dotyczy między innymi takich kierunków jak (VICH 2002):

- toksyczność kumulacyjna / toksyczność po wielokrotnym podaniu leku
- toksyczność a reprodukcja
- embriotoksyczność
- genotoksyczność
- wpływ pozostałości na mikroflorę przewodu pokarmowego człowieka
- testy na aktywność farmakologiczną pozostałości leku w tkankach zwierząt
- immunotoksyczność
- neurotoksyczność
- karcynogenność
- toksyczność przewlekła

Badania pozostałości leków w tkankach i żywności pochodzenia zwierzęcego mają za zadanie oceniać ryzyko narażenia zdrowia lub życia człowieka który przeznacza je do spożycia. Parametry bezpieczeństwa takie jak MRL, WDT, ADI, NOAEL, LOAEL oraz wiele innych gwarantują odpowiednią jakość żywności i bezpieczeństwo przyjmowania jej wraz z ewentualnymi pozostałościami przez człowieka. Badania nad tymi parametrami oraz wartościami dawek i stężeń wyjściowych - BMD; BMC (ang.: *Benchmark Dose; Benchmark Concentration*) oparte są o założenia PKBK (farmakokinetyka w oparciu o parametry fizjologiczne) (Dourson i wsp. 2001). Współczynniki te przy założeniu odpowiednich dawek i stężeń wyjściowych gwarantują określenie odpowiedniego marginesu ekspozycji bezpieczeństwa MOE; MOS (ang.: *Marign Of Exposure; Margin Of Safety*).

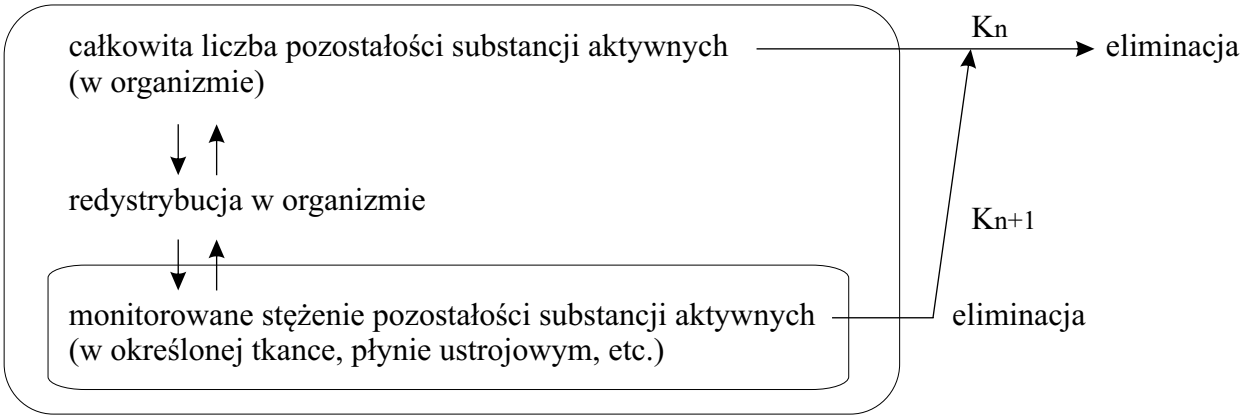
Kluczowym problemem w ramach obliczeń dotyczących pozostałości leków w tkankach jest określenie czasu wycofywania leku - WDT (ang.: *Withdrawal Time*). Parametr ten można odnieść do wartości interwału dawkowania, a sposób obliczania polega na ocenie wartości stężeń wyjściowych dopuszczalnych i ich odniesieniu do stałej szybkości eliminacji z określonej tkanki lub organu. Stałą szybkości eliminacji można zastąpić także wartością okresu półtrwania lub MRT (Riviere J. 1999).



Ryc. Zależności pomiędzy MRL / LLOQ / Co a czasem wycofywania leku z tkanki.

WDT = Ln (Co / MRL) / K lub **WDT = Ln (Co / MRL) x t1/2**

Co - stężenie początkowe
t1/2 - okres półtrwania w fazie eliminacji
K - stała szybkości eliminacji



Ryc. Różnica między monitorowaniem pozostałości w wybranej tkance a sumą pozostałości w całym organizmie.

Czas wycofywania leku z organizmu zwierzęcia jest to okres w jakim stężenie pozostałości leku we wszystkich monitorowanych tkankach spada poniżej wartości MRL dla monitorowanych tkanek. TTSC (ang.: *Time To Save Concentration*) to czas jaki mija do momentu w którym stężenie pozostałości jest niższe od wartości MRL dla danej tkanki. Maksymalna akceptowalna ilość wszystkich pozostałości - TRL (ang.: *Total Residue Level*) obliczana jest na podstawie wartości NOEL.

dla pozostałości w mięsie:

TRL = (NOEL x BW x 2) / SF

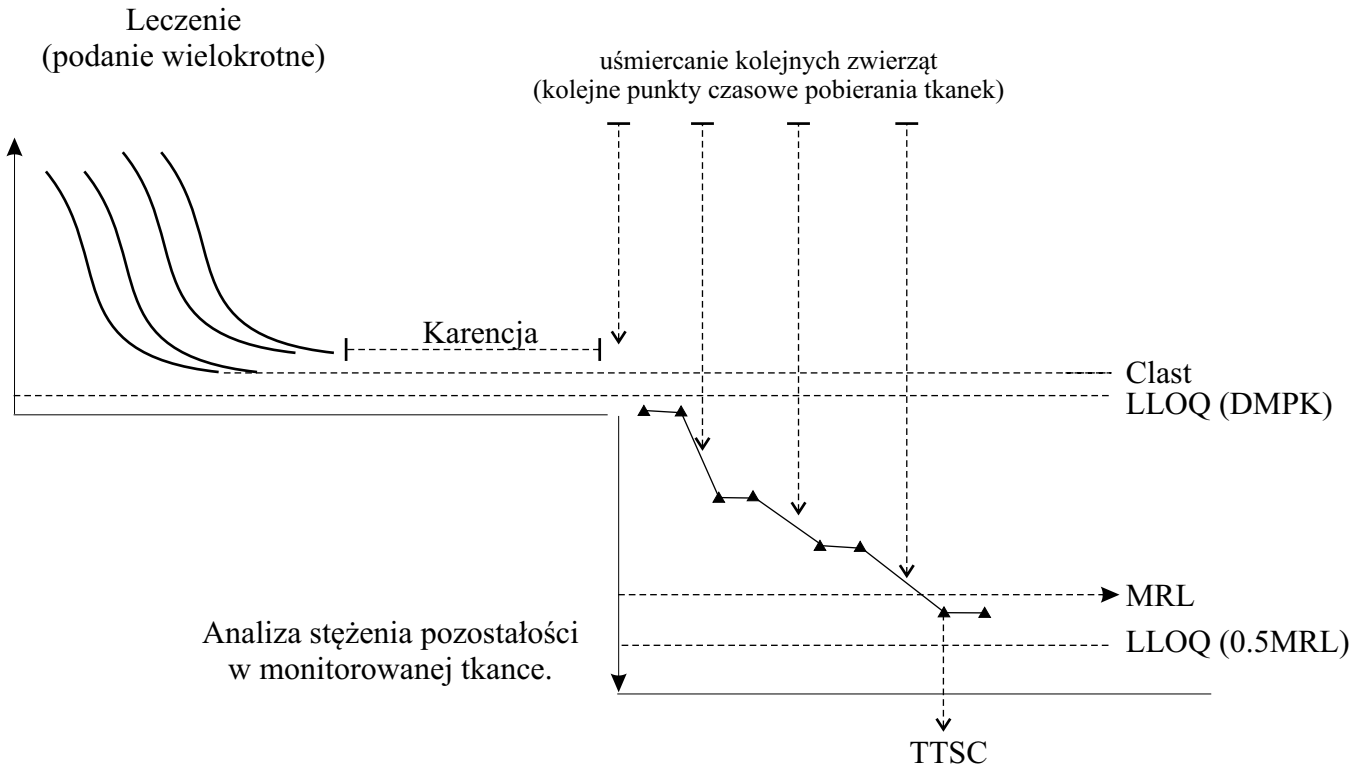
dla pozostałości w innych produktach pochodzenia zwierzęcego:

TRL = (NOEL x BW x 2 x CF) / SF

BW - masa ciała człowieka (60 kg)
SF - współczynnik bezpieczeństwa (100 - 1000)
CF - współczynnik konsumpcji (ang.: *Consumption Factor*)

Analiza toksyko lub farmakokinetyki pozostałości leków (lub metabolitów) w tkankach i produktach zwierząt (również miód) wymaga nieco innych metod analitycznych oraz doświadczalnych. Zasadnicza różnica dotycząca układu doświadczalnego dotyczy stosowania w badaniach tego typu. Pobieranie tkanek do analiz wiąże się z uśmiercaniem zwierząt w odpowiednich interwałach po podaniu leku. Proces uśmiercania zwierząt również obejmuje randomizacja.

- w przypadku zwierząt dużych zaleca się wykorzystanie 4 zwierząt na każdy z 3-5 punktów czasowych
- w przypadku drobiu zaleca się wykorzystanie 6 ptaków na każdy z 3-5 punktów czasowych
- w przypadku ryb zaleca się wykorzystanie 10 ryb na każdy z 3-5 punktów czasowych
- w przypadku jaj wyselekcjonowanie ptaków od których pobrane zostanie 10 jaj na każdy z punktów czasowych
- w przypadku miodu zaleca się wykorzystanie 5 próbek na każdy z punktów czasowych każda z innego ula



Ryc. Specyfika analizy DMPK połączonej z analizą pozostałości leku w tkance.

Uśmiercanie zwierząt wyklucza analizę w układzie kwadratu łacińskiego. Uniemożliwia tym samym analizę zmienności wewnątrzosobniczej uzyskanych parametrów. Analiza zmienności w badaniach kinetyki pozostałości leków ma szczególne znaczenie gdyż prawie zawsze dotyczy leków słabo lub silnie lipofilnych. Badania kinetyki pozostałości obejmują nie tylko problemy zmian stężenia leku w czasie w organach wewnętrznych i tkankach lecz także w miejscu podania leku (iniekcja). Zwykle w badaniu bierze od 16 do 40 zwierząt (EMEA) lub minimum 20 zwierząt (FDA). Metody bioanalityczne również wymagają innej niż farmakokinetyczne charakterystyki. Krzywe kalibracyjne na podstawie których oblicza się stężenie pozostałości leków weterynaryjnych są krzywymi złożonymi z trzech punktów stężeniowych. Są to 0.5 x MRL, MRL oraz 2 x MRL. Podobnie jak metody służące analizie farmakokinetycznej wymagają walidacji w pełnym zakresie oraz obecności prób kontroli jakości oraz SST.

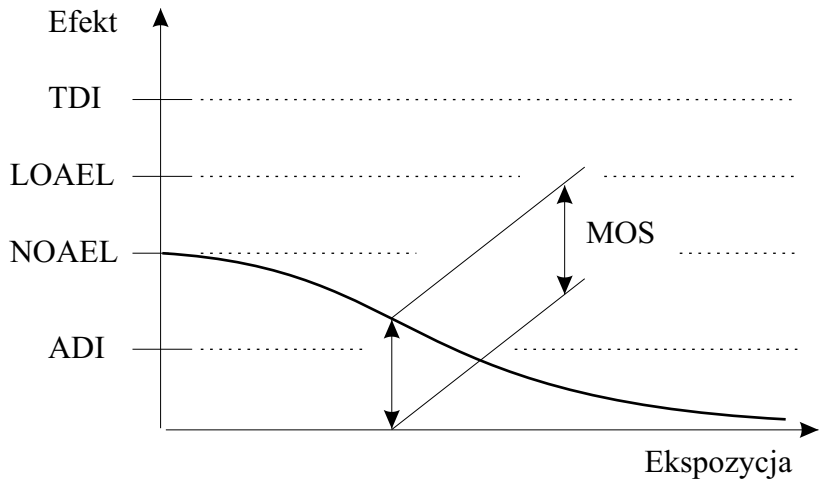
Maksymalna dawka dzienna - ADI (ang.: *Acceptable Daily Intake*) jest to maksymalna dawka która pobierana codziennie z pożywieniem przez całe życie nie wywoła żadnych efektów niepożądanych. Punktem wyjścia do jej obliczenia jest znajomość NOAEL (Barnes, Dourson 1988).

ADI (dawka dla człowieka) = NOAEL (dawka wyjściowa) / SF

SF - współczynnik bezpieczeństwa (ang.: *Safety Factor*) zależny od rodzaju substancji (10,100,1000)
NOAEL; NOEL; NEL (ang.: *No Observed Adverse Effect Level*; *No Observable Adverse Effect Level*; *No Obsrved Effect Level*; *No Effect Level*)
LOAEL; LOEL; LEL (ang.: *Lowest Observed Adverse Effect Level;Lowest Observed Effect Level; Lowest Effect Level*)

	NOEL mg/kg/bw	XlogP	tPSA
etoksazol	2500	5,9	30,8
tylmikozyna	36	3	186,2
epoksykonazol	20	4,2	43,2
tetrakonazol	16	4,4	39,9
doramektyna	1,5	5,2	170,1
moksydektyna	1	3,6	116,1
abamektyna	0,5	4,7	170,1
kw tolfenamowy	0,5	4,4	49,3
iwermektyna	0,15	5,2	170,1
raktopamina	0,13	3	72,7
ketoprofen	0,1	3,6	54,4
meloxikam	0,04	2,1	99,6

Ryc. Przykłady wartości NOEL dla wybranych związków chemicznych.



Ryc. Zależności pomiędzy poziomem stężenia związanym z efektem, czasem trwania ekspozycji a marginesem bezpieczeństwa MOS.

	ADI	NOEL		ADI	NOEL
kitasamycyna	0,5	1000	chlorfenwinfos	0,0005	0,05
krenit	0,5	1000	kloprostenol	0,0005	0,05
hydrazyd maleinianu	5	571	kumafos	0,0005	0,05
kloksacylina	0,2	500	izofenfos	0,0005	0,05
izoeugenol	0,2	500	paration	0,001	0,05
cefuroksym	0,4	400	forat	0,0005	0,05
imazamoks	2,8	282	propyl. tiomocznik	0,0005	0,05
imazetapir	2,8	276	wamidotion	0,005	0,05
imazapir	2,5	250	azafenidyna	0,0004	0,04
nikarbazyna	2	240	ioksynil	0,004	0,04
amoksycylina	0,2	200	famfur	0,00002	0,0375
imazapik	0,3	137	chlorpyrifos	0,003	0,03
awilamycyna	1	108	chlortetracyklina	0,003	0,03
fosetyl	1	103	etoprofos	0,0003	0,03
ardacyna	0,05	100	haloksyfop	0,0003	0,03
flumetsulam	1	100	izokarbofos	0,0002	0,03
linkomycyna	1	100	amitrol	0,0003	0,025
metylo mezosulfuron	1	100	fensulfotion	0,003	0,025
metylobenzokwat	0,05	100	ometoat	0,0003	0,025
spektynomycyna	1	100	foksim	0,00025	0,025
sulfatroksazol	0,05	100	etylo azynafos	0,002	0,02
daminozyd	0,7	75	karbofenotion	0,0002	0,02
spiramycyna	0,75	75	chlortiofos	0,0002	0,02
oktylinon	0,03	60	diazynon	0,001	0,02
klopyralid	0,5	50	fention	0,002	0,02
efrotomycyna	0,5	50	fipronil	0,0002	0,02
hydropren	0,5	50	metylo paration	0,0002	0,02
sulfadoksyna	0,05	50	mewinfos	0,002	0,015
asulam	0,02	40	zeranol	0,0002	0,015
poloksalen	0,02	40	dichlorowos	0,001	0,013
sekbumeton	0,02	40	aldikarb	0,001	0,01
cefalonium	0,02	39	dialifos	0,001	0,01
sulfadiazyna	0,02	37,5	disulfoton	0,001	0,01
metylo kresoksym	0,4	36	fenamifos	0,0001	0,01
metopren	0,4	35	prostianol	0,000005	0,01
trimetoprim	0,02	33	protiofos	0,0001	0,01
6 benzyladenina	0,02	30	alfa-trenbolon	0,0001	0,01
ceftiofur	0,03	30	profenofos	0,0001	0,0072
etofumesat	0,3	30	koumatetralyl	0,000003	0,0068
glyfosat	0,3	30	melengestrol	0,00005	0,005
tylozyna	0,3	30	altrenogest	0,000002	0,004
chlorheksydyna	0,2	25	bromadiolon	0,000002	0,004
kolistyna	0,2	25	monokrotofos	0,0003	0,003
fosamina	0,01	25	terbufos	0,0002	0,0025
heksaflurat	0,01	25	flokumafen	0,000001	0,0014
imazakwin	0,25	25	difetialon	0,0000006	0,00125
mefluidyd	0,25	25	brodifakum	0,0000005	0,001
nifursol	0,01	25	kadusafos	0,00001	0,001
nimidan	0,001	25	norgestomet	0,0000005	0,001
Wirginiamycyna	0,2	25	beta-trenbolon	0,00001	0,001

Ryc. Przykłady wartości NOEL (TGA,2002).

Dzienna dawka tolerowana, (ang.: *Tolerable Dayly Intake*) oblicza się na podstawie wyników testów toksyczności przewlekłej.

$$\mathbf{TDI = (LOAEL \times NOAEL)^{0.5} \times UF}$$

Mikrobiologiczne ADI czyli dzienną dawkę ksenobiotyku nie powodującą zmian we florze dalszych odcinków przewodu pokarmowego człowieka obliczamy z wzoru:

$$\mathbf{ADI = [((MIC_{50} \times CF_2) / CF_1) \times MCC] / FDM \times BW}$$

MIC - minimalne stężenie hamujące
MCC - masa zawartości okrężnicy = 220 g (ang.: *Mass Of Colonic Contens*)
FDM - część dawki dostępna dla mikroorganizmów (ang.: *Fraction Of An Oral Dose Available For Microorganisms*)
BW - masa ciała człowieka = 60 kg
CF1 - współczynnik korekcyjny dotyczący oporności = 1 do 5
Cf2 - współczynnik korekcyjny pomiędzy testami *in vivo* i *in vitro* = 2 do 10

obecnie proponuje się również (Gerniglia C.E, Kotarski S. 2005):

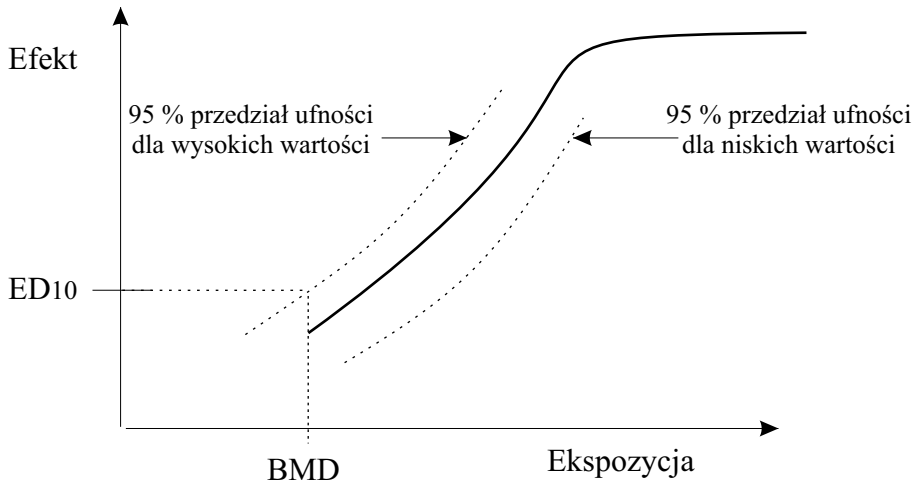
$$\mathbf{ADI = (MIC_{50} \times MCC) / (F \times SF \times BW)} \quad \text{(JECFA)}$$

MCC - masa zawartości okrężnicy (ang.: *Mass Of Colonic Contents*) (220g)
F - frakcja dawki dostępna po podaniu doustnym
SF - współczynnik bezpieczeństwa (ang.: *Safety Factor*)
BW - masa ciała człowieka

$$\mathbf{ADI = \{[(MIC_{50} \times CF2) / CF1] \times MCC\} / (F \times BW)} \quad \text{(CVMP)}$$

CF1 - współczynnik korekcyjny opisujący oporność na lek (skala 1-5)
CF2 - współczynnik korekcyjny wynikający z różnicy wzrostu w warunkach *in vitro* i *in vivo*

Stężenie bezpieczne - SHC (ang.: *Save Human Concentration*) jest to takie stężenie leku w tkankach przeznaczonych do spożycia które jest bezpieczne dla indywidualnego konsumenta.



Ryc. Zależności pomiędzy dawką efektywną dla 95 % przedziału ufności dla wartości niskich a BMD.

SHC = (ADI x BW) / współczynnik spożycia żywności

ADI - dopuszczalne dzienne spożycie (mg/kg/dzień)
SHC - ppm (mg/kg)
BW - ciężar ciała (średnia wartość dla człowieka = 60 kg)
Współczynnik spożycia żywności - stała wyrażona w kg (inna dla każdej ze spożywanych tkanek np. mięśni, nerek)

Jednym z kluczowych pojęć w toksykokinetyce jest wartość dawki referencyjnej - RfD utożsamiana często z ADI (ang.: *Reference Dose*). Jest to wartość którą można odnieść do wartości NOAEL. Jest parametrem wskaźnikowym wywodzącym się z wartości współczynnika NOAEL. Dodatkowe parametry opisujące dawkę referencyjną to współczynnik niepewności - UF (ang.:*Uncertainty Factor*) oraz współczynnik modyfikujący - MF (ang.: *Modifying Factor*).

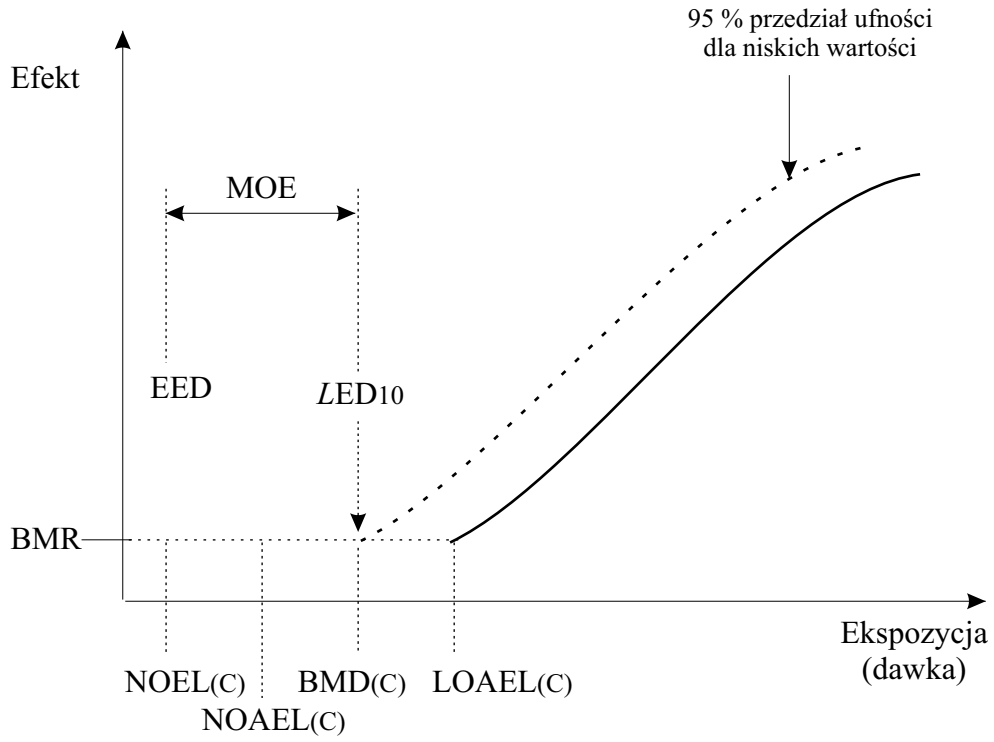
RfD = NOAEL / (UF x MF)

Kolejnym parametrem w ocenie ryzyka i zagrożeń w toksykokinetyce jest dawka regulatorowa RgD (ang.: *Regulatory Dose*). Jej wartość wraz z NOAEL opisuje margines ekspozycji MOE; MOS (ang.: *Marign Of Exposure , Marign Of Safety*). Margines ten jest wypadkową NOAEL lub POD (ang.: *Point Of Departure*) oraz dawki ekspozycyjnej EED (ang.: *Exposure Dose*). Dawka ekspozycyjna określa wszystkie drogi i źródła ekspozycji na związek (EPA 1993).

MOE = NOAEL(doświadczalny) / EED(dawka dla człowieka)

RgD = NOAEL / MOE stąd **RfD / RgD - MOE / (UF x MF)**

MOS = NOAEL /ekspozycja lub **MOE = POD / ekspozycja**



Ryc. Zależności pomiędzy RfD, NOEL, NOAEL, LOAEL. (C) stężenie, BMR (ang.: *Benchmark Response*), *L*ED10 (ang.: *Lower Confidence Limit (95%) On Effective Dose 10%*).

	Substancja	Gatunek	MRL (mg/kg)	Tkanki	ADI (mg/kg BW)	XlogP	
1	tiabendazol	Bo Ov Su	100	M L K F	100	1,6	***średnia XlogP***
2	diminazen	Bo	500	M	100	2,3	**1.7**
3	neomycyna	Bo Ov Su Av	500	M L F	60	-9,9	
4	streptomycyna	Bo Ov Su Av	500	M L F	50	-8,0	
5	ceftiofur	Bo Su	1000	M	50	0,4	
6	spiramycyna	Su	200	M	50	2,2	
7	sulfadymidyna	Bo Ov Su	100	M L K F	50	2,3	
8	albendazol	Bo Ov	100	M F Mi	50	3,3	
9	cypermetryna	Bo Ov Av	200	M L K	50	5,5	
10	spektynomycyna	Bo Su Av	300	M	40	-2,9	
11	tylmikozyna	Bo Su Ov	100	M F	40	3,0	
12	fluazuron	Bo	200	M	40	6,2	
13	flumechina	Bo	500	M	30	2,3	
14	klozantel	Bo	1000	M L	30	8,4	
15	danofloksacyna	Bo Av	200	M	20	1,9	
16	cyfultryna	Bo	20	M L K	20	5,6	
17	flubendazol	Su	10	M L	12	3,4	
18	florfenikol	Bo	200	M L K	10	1,7	
19	karprofen	Bo Eq	1000	F L K	10	3,8	
20	prilimycyna	BO	100	M	8	0,9	
21	tiamfenikol	Bo Av	40	M L K F	6	0,8	
22	lewamizol	Bo Ov Su	10	M K F	6	2,0	
23	flunixin	Bo	20	M	6	3,8	
24	kolistyna	wszystkie	150	M F L	5	-4,2	
25	gentamycyna	Bo Su	100	M F	4	-3,6	
26	fenbendazol	Bo Ov Su	100	M F K	4	4,1	
27	flumetryna	Bo	10	M K	4	7,4	
28	tetracykliny	Bo Su Ov	100	M	3	-0,3	
29	azaperon	Su	60	M F	3	2,5	
30	triklabendazol	Bo	200	M	3	5,8	
31	moksydektyna	Bo	20	M	2	3,6	
32	raktopamina	Bo Su	10	M	1	3,0	
33	abamektyna	Bo	100	L F	1	8,9	
34	iwermektyna	Bo	100	L	1	10,0	
35	erytromycyna	Kur	100	M L K F	0,7	2,0	
36	doramektyna	Bo	10	M	0,5	5,2	
37	enrofloksacyna	Bo Su Av	30	M L K	0,313	2,1	
38	octan flugestonu	Ov Cap	1	Mi	0,03	1,6	
39	octan melengestrolu	Bo	1	M	0,03	3,5	
40	klenbuterol	Bo Eq	0,2	M F	0,004	2,8	***średnia XlogP*** **3.1**

Bo - bydło; Eq - konie; Cap - kozy; Su - świnie; Av - ptaki
ADI - wartości ADI toksykologiczne, farmakologiczne i mikrobiologiczne
M - mięśnie, L - watroba, F - tłuszcz, K - nerki, Mi - mleko

Ryc. Przykładowe wartości ADI oraz MRL dla wybranych substancji,tkanek oraz gatunków. Zależność między ADI a XlogP.

	EPA ADI	WHO ADI	krotność (WHO/EPA)
Bromoetan	0,0014	1	714,3
Anilazyna (Dyrene)	0,0004	0,1	250
Oksamyl (Vydate)	0,0002	0,03	150
Metiram	0,0003	0,03	100
Profenofos (Curacron)	0,0001	0,01	100
Metyloparation	0,0003	0,02	66,7
Etylenotiomocznik (ETU)	0,0001	0,004	40
2,4-D (kwas+sole ETU)	0,01	0,3	30
Cyhalotryna	0,001	0,02	20
Diazinon	0,0001	0,002	20
Dimetoat	0,0005	0,01	20
Metoksychlor	0,005	0,1	20
Paration	0,0003	0,005	16,7
Mankozeb	0,003	0,03	10
Maneb	0,005	0,05	10

Ryc. Różnica pomiędzy ADI akceptowanym przez różne organizacje (pestycydy) (Gray G.M. 2004).

	CVMP ADI	WHO ADI	stosunek >/<
danofloksacyna	600	37	16,2
tetracyklina	3	30	10,0
tylmikozyna	4	40	10,0
gentamycyna	4	20	5,0
flumechina	8,25	37	4,5
enrofloksacyna	6,2	2	3,1
linkomycyna	10	30	3,0
ceftiofur	20	50	2,5
tiamfenikol	2,5	5	2,0
sarafloksacyna	0,4	0,3	1,3
prilimycyna	6	8	1,3

Ryc. Różnica pomiędzy ADI akceptowanym przez różne organizacje (Leki weterynaryjne).

Z wartości MOS obliczyć można również współczynnik narażenia HQ; RQ(ang.: *Hazard Quotient , Risk Quotient*):

HQ = UF / MOS lub **HQ = ekspozycja / RfD**

Wartość NOAEL może służyć skalowaniu równoważnej dawki leku - HED (ang.: *Human Equivalent Dose*) ze zwierzęcia na człowieka (FDA, CDER, CBER 2002). Parametr ten znany jest także jako współczynnik korekcyjny powierzchni ciała - BSA-CF (ang.: *Body Surface Area Conversion Factor*). Związek ten wykorzystywany jest szczególnie w fazie obliczania dawki leku w pierwszej fazie badań klinicznych. Skalowanie obejmuje masę ciała zwierząt laboratoryjnych dla których wyznaczono NOAEL oraz masę ciała człowieka.

$$\mathbf{HED = NOAEL \times (BW_{(A)} / BW_{(H)})^{0.33}}$$

BW(A) - masa ciała zwierzęcia
BW(H) - masa ciała człowieka

Jednak skalowanie to ma nieco inny charakter w przypadku obliczeń maksymalnej dawki tolerowanej dla człowieka - MTD (ang.: *Maximal Tolerated Dose*).

$$\mathbf{MTD = LD_{10} \times (BW_{(A)} / BW_{(H)})^{0.25}}$$

LD - dawka letalna

Wartość ADI do pewnego stopnia związana jest z lipofilnością substancji jaka jest monitorowana. Im ADI ma niższą wartość tym wyższa jest lipofilność monitorowanych substancji. Przynajmniej 80% wszystkich substancji dla których określono ADI (dla produktów pochodzenia zwierzęcego) to substancje średnio lub zdecydowanie lipofilne. Na 40 wymienionych w tabeli tylko 6 to substancje których XlogP < 0.

Farmakokinetyka terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych (Mab)

Farmakokinetyka terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych podobnie jak innych leków biologicznych w znacznym stopniu różni się od mechanizmów decydujących o PK małych cząsteczek. W przypadku leków biologicznych w większości wypadków mechanizmy decydujące o zmianie stężenia leku we krwi lub określonej przestrzeni organizmu mają zupełnie inne podstawy. Kluczową rolę w kinetyce małych cząsteczek odgrywa wątroba oraz nerki, czyli organy odpowiedzialne za eliminację leku. W przypadku małych cząsteczek lek może być metabolizowany a metabolity mogą być eliminowane wraz z moczem lub kałem. W przypadku leków biologicznych elementem decydującym o kinetyce leku w organizmie jest interakcja cząsteczek białka z układem immunologicznym. Leki biologiczne nie ulegają metabolizmowi w wątrobie.
Terapeutyczne przeciwciała monoklonalne tworzone są zwykle w oparciu o strukturę przeciwciał klasy G. Naturalne przeciwciała klasy IgG cechuje między innymi długi okres półtrwania (IgG 1,2,3 około 21 dni, IgG3 około 7 dni). Stąd terapeutyczne przeciwciała monoklonalne również cechuje niezwykle długi w stosunku do małych cząsteczek okres półtrwania w fazie terminalnej. Terapeutyczne MAb w przypadku gdy reprezentują pełną strukturę przeciwciała (fragment Fc oraz Fab) osiągają masę ponad 140 000 Da. Tak wysoka masa cząsteczkowa powoduje to że stanowią łatwiejszy cel dla układu immunologicznego, najczęściej nie są wydalane wraz z moczem i mają ograniczone możliwości dystrybucji.

Wchłanianie

Podstawowe mechanizmy związane z transportem leków biologicznych to endocytoza, pinocytoza lub transport bierny przez pory w przestrzeni międzykomórkowej. Wchłanianie jest zatem zależne od szczelności śródbłonka naczyń krwionośnych. W organach w których przestrzenie międzykomórkowe są większe (śledziona, wątroba) stężenie leków biologicznych jest wyższe niż w pozostałych organach i tkankach. Za wchłanianie leku biologicznego podanego np. drogą podskórną odpowiada przede wszystkim krążenie chłonki. Ze względu na to że chłonka w różny sposób zaopatruje różne okolice ciała w zależności od okolicy kinetyka wchłaniania może być różna. Ze względu na bardzo dużą masę cząsteczkową leków biologicznych podaj się je głównie w iniekcji domięśniowej, podskórnej lub w postaci krótkotrwałych wlewów dożylnych. W większości przypadków podanie leku biologicznego drogą dożylną związane jest z reakcjami które w efekcie powodują uwolnienie histaminy oraz miejscowe podrażnienia. Stąd praktycznie nie jest stosowane w przypadku leków biologicznych podanie leku w postaci szybkiej iniekcji dożylnej (bolus). Stosunkowo częstym zjawiskiem w przypadku leków biologicznych jest występowanie kinetyki typu flip-flop. Szczególnie w przypadku podskórnego podania leku. Wchłanianie leków biologicznych droga podskórną czy domięśniową najczęściej wiąże się z obniżeniem dostępności biologicznej bezwzględnej. Wchłanianie zachodzi niezwykle wolno stąd tmax niejednokrotnie ma wartość 5-8 dni.

Dystrybucja

Dystrybucja leku do tkanek w związku z dużą masą cząsteczkową oraz dużą polarnością i hydrofilnością leków biologicznych zwykle jest ograniczona. Dyfuzja w obrębie tkanek jest bardzo powolna a po przejściu przez śródbłonek naczyń krwionośnych dodatkowo utrudniona przez interakcję ze składowymi płynu sródkomórkowego. Procesy redystrybucyjne praktycznie nie są obserwowane w klasycznych badaniach po jednorazowym podaniu takich leków. W przypadku leków biologicznych znacznie rzadziej niż w przypadku małych cząsteczek obserwowana jest kinetyka dwu lub wielokompartmentowa. Nie obserwuje się również typowego kompartmentu głębokiego dla tego rodzaju leków. Leki biologiczne nie posiadają cech które pozwalałyby na ich deponowanie w kościach, tłuszczu, wytworach rogowych skóry czy zębach. Procesy dystrybucji leków biologicznych zwykle uzależnione są od transportu aktywnego związanego z wiązaniem się z określonym typem receptora. Po osiągnięciu płynu śródtkankowego leki biologiczne dość szybko są z niego eliminowane. Powodem tego stanu rzeczy jest krążenie chłonki która płynie w stosunkowo dużych naczyniach z dużymi przestrzeniami pomiędzy komórkami śródbłonka.

Klirens receptorowy

Spadek stężenia leku biologicznego we krwi związany jest z klirensem receptorowym który nie znajduje swojego odpowiednika w przypadku małych cząsteczek. W przypadku leków biologicznych element wiązania leku z celem farmakodynamicznym stanowi niezwykle istotną składową klirensu całkowitego leku. W przypadku małych cząsteczek proces ten praktycznie pozostaje bez znaczenia dla klirensu całkowitego. Na klirens leku biologicznego składa się wiele zjawisk i mechanizmów następujących często jednocześnie z różną dynamiką:

- tworzeniem się przeciwciał skierowanych przeciwko lekowi wiążących jego cząsteczki (binding antibodies - BAb)
- tworzeniem się przeciwciał skierowanych przeciwko lekowi wiążących jego cząsteczki i neutralizujące je (neutralising antibodies - NAb)
- wiązanie z receptorem farmakodynamicznym oraz eliminacja powstałych kompleksów
- wiązanie z receptorami dla fragmentu Fc (Mab) oraz wzbudzanie produkcji NAb, Bab
- wiązanie z receptorami dla fragmentu Fc (Mab) endocytoza i rozpad w lizosomach
- endocytoza przez komórki fagocytarne i proteliza w retikulum endoplazmatycznym
- niespecyficzna endo i pinocytoza (recykling IgG)
- katabolizm w komórkach śródbłonka
- internalizacja poprzez wiązanie z receptorem asialoglikoproteinowym (ASGPR)
- internalizacja poprzez wiązanie z receptorem mannozowym (MR)
- cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (antibody dependent cellular cytotoxicity - ADCC)
- cytotoksyczność zależna od układu dopełniacza (complement dependent cytotoxicity - CDC)

Okres półtrwania w fazie terminalnej

Spadek stężenia leków biologicznych po jednorazowym podaniu leku ma więc związek nie tylko z procesami eliminacyjnymi. Wynika między innymi z interakcji z receptorami takimi jak receptor neonatalny FcRn. Wiązanie z receptorem FcRn przeciwciał terapeutycznych stanowi kluczowy element pozwalający na uzyskanie długiego okresu półtrwania tych leków. Reakcja wiązania jest w tym wypadku zależna od pH. Wpływ wiązania MAb z FcRn na okres półtrwania leku jest niepodważalny. Nie udało się jednak znaleźć liniowej korelacji pomiędzy punktem izoelektrycznym przeciwciał monoklonalnych a klirensem czy okresem półtrwania w fazie terminalnej. Wiadomo również że interakcja leku z FcRn nie ma wpływu na proces jego dystrybucji w skali organizmu. W pewnym sensie faza terminalna w przypadku leków biologicznych odzwierciedla więc proces dystrybucji leku do wszystkich komórek posiadających receptor neonatalny. Stąd okres półtrwania MAb w fazie terminalnej tylko częściowo odzwierciedla mechanizmy eliminacyjne i nie jest pełnym odpowiednikiem okresu półtrwania w fazie eliminacji jaki wyznaczamy w przypadku małych cząsteczek.

Wpływ immunogenności na PK MAb terapeutycznych

Jedną z najważniejszych cech które mają znaczny wpływ na klirens, bezpieczeństwo stosowania oraz efektywność leków biologicznych jest ich immunogenność. Jednym z kluczowych elementów optymalizacji leku biologicznego jest modyfikowanie odpowiedzi humoralnej oraz komórkowej na etapie projektowania struktury leku. BAb lub NAb powstające po podaniu leku biologicznego często określane są wspólnym mianem ADA (anti drug antibodies). ADA powstają tuż po podaniu leku biologicznego i wpływają na ilość cząsteczek leku które mogą wchodzić w interakcję z receptorem farmakodynamicznym. Nie zawsze wysoki poziom ADA wiąże się z wysokim klirensem leku lub zmniejszoną efektywnością prowadzonej terapii. W wielu przypadkach lek biologiczny w związku z samym mechanizmem działania przyczynia się do znacznej supresji układu immunologicznego.

Często przyczynia się to do wytworzenia stanu immunotolerancji. Efektem może być zmniejszająca się liczba ADA po podaniu kolejnych dawek leku. Znacznie bardziej niebezpieczna dla pacjenta może być sytuacja w której nie dochodzi do wytworzenia tolerancji immunologicznej. W takich wypadkach kolejne dawki leku mogą powodować narastanie odpowiedzi immunologicznej. Aby zrozumieć jaką rolę ADA mają w odniesieniu do farmakokinetyki i farmakodynamiki leku biologicznego należy poznać ich naturę. Elementy które wymagają zdefiniowania w przypadku ADA to:

identyfikacja klasy przeciwciała, izotypu
specyficzność ADA (antyidiotypowe, antyizotypowe etc.)
udział ilościowy ADA (wysokie, niskie miano)
dynamika odpowiedzi (wczesne – IgM, późne – IgG)
powinowactwo do leku (niskie powinowactwo – IgM, wysokie powinowactwo – IgG)
rola przeciwciał przetrwałych (persistent)
rola przeciwciał obecnych wcześniej (preexisting)
rola przeciwciał przemijających (transient)
określenie procesu dojrzewania odpowiedzi immunologicznej wyrażanej poprzez ADA
stosunek ADA związanych z lekiem do niezwiązanych z cząsteczkami leku (NBAb)
określenie funkcji przeciwciał BAb/NAb
stopień wiązania leku przez NAb
potencjał do reakcji krzyżowych
czas w którym od podania następuje utrata efektywności w związku z ADA
profil zmian miana przeciwciał w czasie
serokonwersja
długotrwałe efekty generowane przez ADA
immunotolerancja na ADA

Rola receptorów dla fragmentu Fc terapeutycznych Mab klasy IgG

Jednym z kluczowych elementów wpływających na farmakokinetykę terapeutycznych MAb jest ich interakcja z receptorami dla fragmentu Fc przeciwciał. Receptory te rozmieszczone są na wielu komórkach immunokompetentnych w całym organizmie. Wiązanie z receptorem neonatalnym (FcRn) warunkuje długi okres półtrwania przeciwciała w fazie terminalnej. Wiązanie z tym receptorem chroni IgG przez proteolizą w lizosomach w trakcie recyklingu IgG po ich wcześniejszej pinocytozie lub endocytozie. Jeśli wiązanie z tym receptorem jest słabsze okres półtrwania może ulec znacznemu skróceniu. Poza receptorem FcgRIIB pozostałe typy receptorów odpowiedzialne są za napędzanie takich mechanizmów jak ADCC, CDC, czy różnicowanie się komórek immunokompetentnych. Tylko receptor FcgRIIB wyhamowuje odpowiedź immunologiczną poprzez wpływ na limfocyty B. Interakcja z tym receptorem może przyczyniać się do obniżenia produkcji przeciwciał przez limfocyty B. W tym również ADA. Obecnie wyznacza się stosunek pomiędzy wpływem leku biologicznego na grupę receptorów indukujących fazę efektorową układu immunologicznego do wyhamowujących jego odpowiedź. Kluczowe receptory dla fragmentu Fc IgG charakteryzuje polimorfizm który znajduje odbicie w ich funkcji, poniżej wymieniono najważniejsze z nich:

FcRn	
FcgRI a	
FcgRIIa a 131 H	większa siła wiązania
FcgRIIa a 131 R	
FcgRIIb 232 I	większa inhibicja funkcji limfocytów B
FcgRIIb 232 T	
FcgRIIc	
FcgRIIIa a 158 V	większa indukcja ADCC
FcgRIIIa a 158 F	
FcgRIIIb NA1	większa internalizacja IgG1, opsonizacja IgG3

Wpływ agregacji na farmakokinetykę Mab

Jednym z kluczowych elementów jakościowych Mab jest stabilność białka. Leki biologiczne znacznie łatwiej ulegają dezintegracji niż małe cząsteczki. Jednym z procesów będącym skutkiem starzenia się białka jest agregacja. Agregaty białek mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia pacjenta i powodzenia terapii. Są jednym z ważniejszych czynników indukujących odpowiedź immunologiczną. Wraz z rosnąca liczbą agregatów najczęściej rośnie klirens leków biologicznych. Aby zapobiegać agregacji poszukuje się również fragmentów sekwencji białka które w sprzyjających warunkach indukują procesy agregacji (*aggregate prone sequences* - APR). poniżej podano przykłady sekwencji które mogą przyczyniać się do zwiększonej agregacji białka.

ALLVN	LAILT	TNYNQ
ALVLIAFA	LFNIA	TTEYN
ALYLV	LFVEF	TVFIFP
CQQYN	LGIYF	VAYWYILFIG
DDHYC	LGLLG	VEALYL
ELLFFAK	LGQFLLFC	VFLGMFLY
FAAFV	LGVIW	VLIYF
FALFFTIF	LIGALLV	VLMISL
FAVWG	LLIYAA	VTLFF
FILFAVF	LLIYAASYL	VTMLV
FLSVFFSG	LLIYGA	VVCFL
FVQWLM	LLIYSASFLY	VVCLL
GLALL	LLMLL	VVITL
GLLYC	LMVFFGN	VVSVLTVL
GSFFL	LVFFA	VVSVLTVV
GSFFLY	LVYGA	VVYYSNSYWYF
GSFFLYS	NLFLLS	YCLQYD
IAALL	NVILFSVF	YCQQHNE
IFLFG	RGFFY	YCQQHY
IFTDF	SFFLY	YCQQNNN
IFYFYGTTY	SFFLYS	YCQQS
IGAIY	SVFIF	YCQQYS
IGYIS	SVFIFP	YFIAAV
IGYIY	SVFLFP	YIFSNYWIQWV
IMVTF	SVFLFPP	YISQFIIMY
ISLLLIQ	TEYNQ	YSVVLLL
IVTCVVV	TLFLVY	YVWQVL
IYYCV	TLLIIFK	YYWTWI

No	Czynnik oraz waga		Mechanizm	Potencjalny wpływ na PK/PD	
1.	Mannose 5 [4]	↑ ↓	MR	Cl	↑ ↓
2.	Mannose [15]	↑	MR	$t_{1/2kel}$	↓
3.	Mannose 7-9	-	MR	$t_{1/2kel}$, MRT	↓
4.	Man ↑ Fucose [7]↓	-	MR + ADCC	Cl	↑
5.	Alpha 1,3-galactose [26]	Y	Wiązanie z naturalnymi IgG anty alfa-Gal	Immunogenność, CL	↑
6.	Terminal N-acetyl-glucosamine – GlcNAc [2,3]	↑	MR, NK	Cl	↑
7.	Bisecting G1cNAc[24]	Y	↑ADCC	Cl	↑
8.	Cysteinylation [1]	↑	Agregacja	Cl	↑
9.	Isomerisation [11]	↑	Fab	(Fab wiązanie ↓)	-
10.	Disulfide bonds numer/position [18]	-	IgG rozpoznawanie izotypu, wpływ na region zawiasowy, FcgR, stabilność	Cl	-
11.	disulfide bond in the heavy chain variable domain [19]	↓	-	Siła działania leku	↓
12.	Deamidation of asparagine (Asn55,30) residues [2,8]	↑	Fab	(Fab wiązanie ↓)Cl,	↑
13.	Succinimide formation [6,9]		(+) ładunek	CL	↑
14.	N-terminal Pyroglutamate [5, 20]	↑	(-) ładunek	(Fab wiązanie ↓)bez wpływu	-
15.	bisecting N-acetylglucosamine (? 1,4) (GlcNAc) + fucose depeletion [16]	↑ ↓	FcgRIII powinowactwo ↑ ,ADCC	Cl	↑ ↓
16.	Acylation	↑ ↓	ładunek (pI)	Cl	↓ ↑
17.	Deamidation; N-terminal glutamine cyclization; glycation	↑	(-) ładunek	Cl	↓
		↓	(+) ładunek	Cl	↑
18.	C-terminal lysine residue	↑	(+) ładunek	Cl, (k_{ab}, t_{lag}, t_{max}, podanie *s.c*)	↑
		↓	(-) ładunek	Cl, (k_{ab}, t_{lag}, t_{max}, podanie *s.c*)	↓
19.	Charge differences (pI>0.5)	(-)	-	t1/2ke l[21]	↑
		(+)	Wychwyt nerkowy (scFv)	Cl_{ren}, Vd	↑
		(-)	–	Vd	↓
				Cl	↑
20.	Fucosylation (Asn297) [10, 16, 20]	↑	MR, FcgRIIIa, ADCC	Cl, aktywacja komórek immunokompetentnych	↓
		↓		Cl	↑
21.	N-acetylgalactosamine	↑	ASGPR	Cl	↑
22.	Galactosylation G0-G2[16,2]	↑	ASGPR ,Fc?RIII, MR, lektyny, C1q, CDC	Cl	↑
		↓		Cl	↓
23.	Sialylation [7, 17]	↑	(-) ładunek, ASGPR, FcgRIIIa (↓) ADCC (↓)	?Cl, działanie przeciwzapalne	↓
		↓	ASGPR	Cl	↑
24.	Alpha 2,6-linked sialic acids [16]	↑	wzrost ekspresji FcgRIIB	Działanie przeciwzapalne	↑
25.	Alpha?2,3-linked sialic acid [17]	↑	zahamowanie C1q, FcgR	Cl	↓
26.	histidine residues (H310, H433, H435, H436) [22]	–	Wiązanie z FcRn	$t_{1/2kel}$, MRT	-
27.	N-Cys bridge (upper hinge) [14]	↑ ↓	C1Q	Cl	↓ ↑
28.	Tryptophane (Trp 105)	↑	Fab	(Fab wiązanie ↓)	-

Tab. Kluczowe modyfikacje struktury wpływające na farmakokinetykę Mab.

↓↑– spada/wzrasta; ↔– bez wpływu; AIA – przeciwciała antyidiotypowe; ADCC – cytotoksyczność zależna od przeciwciał; ASGPR– receptor asialoglikoproteinowy; MR – receptor mannozowy; scFv – pojedynczy łańcuch fragmentu zmiennego; CDC – cytotoksyczność zależna od komplementu; FcgRIa – receptor dla fragmentu Fc przeciwciała; Y – obecność.

1. Banks DD, Gadgil HS, Pipes GD, Bondarenko PV, Hobbs V, Scavezze JL, Kim J,Jiang XR, Mukku V, Dillon TM. Removal of cysteinylation from an unpaired sulfhydryl in the variable region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody improves homogeneity, stability, and biological activity. J Pharm Sci. 2008 Feb;97(2):775-90.
2. Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum. MAbs. 2010 May-Jun;2(3):221-32.
3. Jones AJ, Papac DI, Chin EH, Keck R, Baughman SA, Lin YS, Kneer J, Battersby JE. Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys. Glycobiology. 2007 May;17(5):529-40.
4. Alessandri L, Ouellette D, Acquah A, Rieser M, Leblond D, Saltarelli M, Radziejewski C, Fujimori T, Correia I. MAbs. 2012 Jul-Aug;4(4):509-20.
5. Dick LW Jr, Kim C, Qiu D, Cheng KC. Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides. Biotechnol Bioeng. 2007 Jun 15;97(3):544-53.
6. Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods. Curr Pharm Biotechnol. 2008 Dec;9(6):468-81.
7. Vugmeyster Y, Xu X, Theil FP, Khawli LA, Leach MW. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. World J Biol Chem. 2012 Apr 26;3(4):73-92.
8. Huang L, Lu J, Wroblewski VJ, Beals JM, Riggin RM. In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS. Anal Chem. 2005 Mar 1;77(5):1432-9.
9. Yan B, Steen S, Hambly D, Valliere-Douglass J, Vanden Bos T, Smallwood S,Yates Z, Arroll T, Han Y, Gadgil H, Latypov RF, Wallace A, Lim A, Kleemann GR,Wang W, Balland A. Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain. J Pharm Sci. 2009 Oct;98(10):3509-21.
10. Yamane-Ohnuki N, Satoh M. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. MAbs. 2009 May-Jun;1(3):230-6.
11. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. J Pharm Sci. 2007 Jan;96(1):1-26.
12. Wei Z, Feng J, Lin HY, Mullapudi S, Bishop E, Tous GI, Casas-Finet J, Hakki F, Strouse R, Schenerman MA. Identification of a single tryptophan residue as critical for binding activity in a humanized monoclonal antibody against respiratory syncytial virus. Anal Chem. 2007 Apr 1;79(7):2797-805.
13. Jalpa Patel, Ruchi Kothari, Rashbehari Tunga, Nadine M. Ritter, and Binita S. Tunga Stability Considerations for Biopharmaceuticals, Part 1 Overview of Protein and Peptide Degradation Pathways (http://www.bioprocessintl.com)
14. Liu XY, Pop LM, Vitetta ES. Engineering therapeutic monoclonal antibodies. Immunol Rev. 2008 Apr;222:9-27.
15. Kilgore BR, Lucka AW, Patel R, Andrien BA Jr, Dhume ST. Comparability and monitoring immunogenic N-linked oligosaccharides from recombinant monoclonal antibodies from two different cell lines using HPLC with fluorescence detection and mass spectrometry. Methods Mol Biol. 2008;446:333-46.
16. Glycoengineering of Monoclonal Antibodies Dissertation Caterina Giorno (http://kops.ub.uni-konstanz.de/bitstream/handle/urn:nbn:de:bsz:352-opus-108732/Dissertation_Caterina_Giorno.pdf?sequence=1)
17. Dimitrov JD, Bayry J, Sibéril S, Kaveri SV. Sialylated therapeutic IgG: a sweet remedy for inflammatory diseases? Nephrol Dial Transplant. 2007 May;22(5):1301-4.
18. Strome SE, Sausville EA, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. Oncologist. 2007 Sep;12(9):1084-95.
19. Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. MAbs. 2012 Jan-Feb;4(1):17-23.
20. van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, den Bleker TH, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, De Baets MH, van de Winkel JG, Aalberse RC, Parren PW. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. Science. 2007 Sep14;317(5844):1554-7.
21. Igawa T, Tsunoda H, Tachibana T, Maeda A, Mimoto F, Moriyama C, Nanami M, Sekimori Y, Nabuchi Y, Aso Y, Hattori K. Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region. Protein Eng Des Sel. 2010 May;23(5):385-92.
22. Mezo AR, McDonnell KA, Castro A, Fraley C. Structure-activity relationships of a peptide inhibitor of the human FcRn:human IgG interaction. Bioorg Med Chem. 2008 Jun 15;16(12):6394-405.
23. Method of Modifying Isoelectric Point of Antibody Via Amino Acid Substitution in CDR (http://www.faqs.org/patents/app/20110076275#b#ixzz3ju2jvkQ8)
24. Zhiqiang An Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic. John Wiley & Sons, 1-896
25. Gao X, Ji JA, Veeravalli K, Wang YJ, Zhang T, Mcgreevy W, Zheng K, Kelley RF, Laird MW, Liu J, Cromwell M. Effect of individual Fc methionine oxidation on FcRn binding: Met252 oxidation impairs FcRn binding more profoundly than Met428 oxidation. J Pharm Sci. 2015 Feb;104(2):368-77.
26. Hmiel LK, Brorson KA, Boyne MT 2nd. Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. AnalBioanal Chem. 2015 Jan;407(1):79-94.
27. An Z, Forrest G, Moore R, Cukan M, Haytko P, Huang L, Vitelli S, Zhao JZ, Lu P, Hua J, Gibson CR, Harvey BR, Montgomery D, Zaller D, Wang F, Strohl W. IgG2m4, an engineered antibody isotype with reduced Fc function. MAbs. 2009 Nov-Dec;1(6):572-9.

Wytyczne i wymogi w badaniach farmakokinetycznych

Motorem napędzającym badania farmakokinetyczne na całym świecie jest przemysł farmaceutyczny. Farmakokinetyka i farmakometria stanowią jedno z podstawowych narzędzi które pozwala optymalizować charakterystykę leku. Badania prowadzone przez przemysł obejmują fazę niekliniczną oraz kliniczną. Aby ujednolicić jakość badań farmakokinetycznych prowadzonych w różnych fazach agencje rejestrujące leki w skali globalnej przedstawiają różnego typu wymogi do których prowadzący badania powinni się dostosować. Część z tych wymogów prezentowanych w postaci wytycznych agencyjnych jest ujednolicona w skali globalnej i prezentowana przez ICH, jednak znaczna część wytycznych nadal nie jest ujednolicona. Oznacza to że każda z agencji przedstawia wytyczne obejmujące ten sam zakres tematyczny, jednak odnosi się do niego w specyficzny dla siebie sposób. Stąd projektując badania farmakokinetyczne służące procesowi optymalizacji leku i dalej jego rejestracji należy uważnie śledzić wymogi różnych agencji. Zwykle leki rejestrowane są tylko w określonych regionach, obszarach, stąd jednym z podstawowych elementów optymalizacji badań jest rozumienie wytycznych obejmujących te obszary. Każdy fragment badania PK objęty jest obecnie grupą wytycznych. Dostosowanie się do ich zakresu ułatwia projektowanie badań oraz utrzymanie optymalnego poziomu jakościowego badania PK (grupy wytycznych A-D).

Kluczowe wytyczne dotyczące różnych elementów badań farmakokinetycznych prowadzonych w fazie nieklinicznej oraz klinicznej przedstawiono poniżej:

A1-A3 Dobrostan zwierząt, badania na zwierzętach (Animal care, welfare)

1. EC, Appendix A of the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ets no. 123) guidelines for accommodation and care of animals (article 5 of the convention) approved by the multilateral consultation. 2006
2. EC, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. 2010
3. EC, Commission Implementing Decision of 14 November 2012 establishing a common format for the submission of the information pursuant to Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (notified under document C(2012) 8064) (Text with EEA relevance) (2012/707/EU)
4. FDA, Guidance for Industry Animal Models - Essential Elements to Address Efficacy Under the Animal Rule. 2009
5. FDA, Good Laboratory Practice Regulations; Minor Amendment: Toe Clipping. 1989
6. FDA, Guidance for Industry Source Animal, Product, Preclinical, and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans. 2003
7. FDA, Guidance for Industry Animal Models - Essential Elements to Address Efficacy Under the Animal Rule. 2009
8. ICH, Guidance for Industry M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. 2010
9. ICH, Guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.
10. OECD, Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. 2000

B1-B3 Metoda bioanalityczna, optymalizacja i walidacja

1. EMA, Guideline on bioanalytical method validation EMEA/CHMP/EWP/192217/2009
2. FDA, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, May 2001

C1 Analiza chemiczna w badaniach PK, jakość badań

1. EMA, Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for paediatric indications. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/169215/2005
2. OECD, No 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17. 1997
3. EC, Commission directive adapting to technical progress the principles of good laboratory practice as specified in Council Directive 87/18/EEC on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances.1999/11/EC. 1999

C2 Analiza farmakokinetyczna i projektowanie badań PK

1. BMV, Japan Guideline for Bioequivalence Studies of Generic Products, February 2012
2. EMA, Guideline On The Investigation Of Bioequivalence CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr 2
3. EMA, Guideline on the Investigation of Drug Interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 - Corr.*, 2010
4. EMA Guidance on triggers for inspections of bioequivalence trials. EMA/244111/2013. 2013
5. EMA, Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. EMA/CHMP/37646/2009
6. EMA, Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins. Doc. Ref. CHMP/EWP/89249/2004. 2007
7. EMA, Guideline on the role of pharmacokinetics in the development of medicinal products in the paediatric population. Doc. Ref. EMEA/CHMP/EWP/147013/2004. 2007
8. EMA Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms. EMA/CHMP/EWP/280/96 Rev1. 2013
9. EPA, Use of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models to Quantify the Impact of Human Age and Interindividual Differences in Physiology and Biochemistry Pertinent to Risk (Final Report). 2006
10. FDA, Guidance for Industry Exposure-Response Relationships — Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications 2003
11. FDA, Guidance for Industry Bioequivalence Guidance, November 2006
12. FDA, Guidance for Industry Population Pharmacokinetics 1999
13. FDA, Guidance for Industry Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations. 2005
14. FDA, Guidance for Industry Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies. 2002
15. FDA, Guidance for Industry Providing Clinical Evidence of Effectiveness for Human Drug and
16. Biological Products. 1998
17. FDA Guidance for Industry Protocol Development Guideline for Clinical Effectiveness and Target Animal Safety Trials. 2001
18. FDA, Food and Drug Administration Meeting of the Advisory Committee for Pharmaceutical Science and Clinical Pharmacology. Revising the Bioequivalence (BE) Approaches for Critical Dose Drugs. Use of Partial Area Under the Curve (AUC) for Products with a Complex Pharmacokinetic (PK) Profile. 2010
19. ICH, Pharmacokinetics: Guidance for repeated dose tissue distribution studies S3B.1994
20. WHO, WHO Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series, No. 929, 2005
21. WHO, WHO Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series 937. 2006
22. WHO, Harmonization Project DRAFT Document for Public and Peer Review. Principles of characterizing and applying physiologically-based pharmacokinetic and toxicokinetic models in risk assessment. 2008.

C3 **Analiza statystyczna (badania kliniczne, PK)**

1. EMA, Points to consider on adjustment for baseline covariates. CPMP/EWP/2863/99. 2003
2. FDA, Statistical Methods for Obtaining Confidence Intervals for Individual and Population Bioequivalence Criteria. 2012
3. FDA, Guideline for the format and content of the clinical and statistical sections of an application. 1988
4. FDA, Guidance for Industry E9 Statistical Principles for Clinical Trials.1998

D1-D7 **Raportowanie badań farmakokinetycznych**

1. EMA, Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses. Doc. Ref. CHMP/EWP/185990/06. 2008
2. EMA, Appendix IV of the Guideline on the Investigation on Bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1): Presentation of Biopharmaceutical and Bioanalytical Data in Module 2.7.1. EMA/CHMP/600958/2010/Corr.*, 2011
3. EMA, Guidance document on the content of the <Co-> Rapporteur's day 80 critical assessment report for generic medicinal products (Article 10.1 only). 2013
4. FDA, Guidance for Industry M4S: The CTD - Safety Appendices. 2001

A1-D7 **Jakość badań farmakokinetycznych**

1. EMA, Annex VII To Procedure For Conducting GCP Inspections Requested By The EMEA: Bioanalytical Part, Pharmacokinetic And Statistical Analyses Of Bioequivalence Trials. EMEA/INS/GCP/97987/2008. 2008
2. FDA, Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. 1999
3. FDA, Guidance for Industry Bioequivalence Guidance. 2006
4. FDA, FDA Background Package For Meeting of Drug Safety and Risk Management Advisory Committee (DSaRM). 2012
5. FDA, 21 CFR Part 58. 19x87
6. ICH, Guidance for Industry Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products VICH GL43. 2009
7. ICH, Guidance for Industry M4S: The CTD - Safety Appendices. 2001

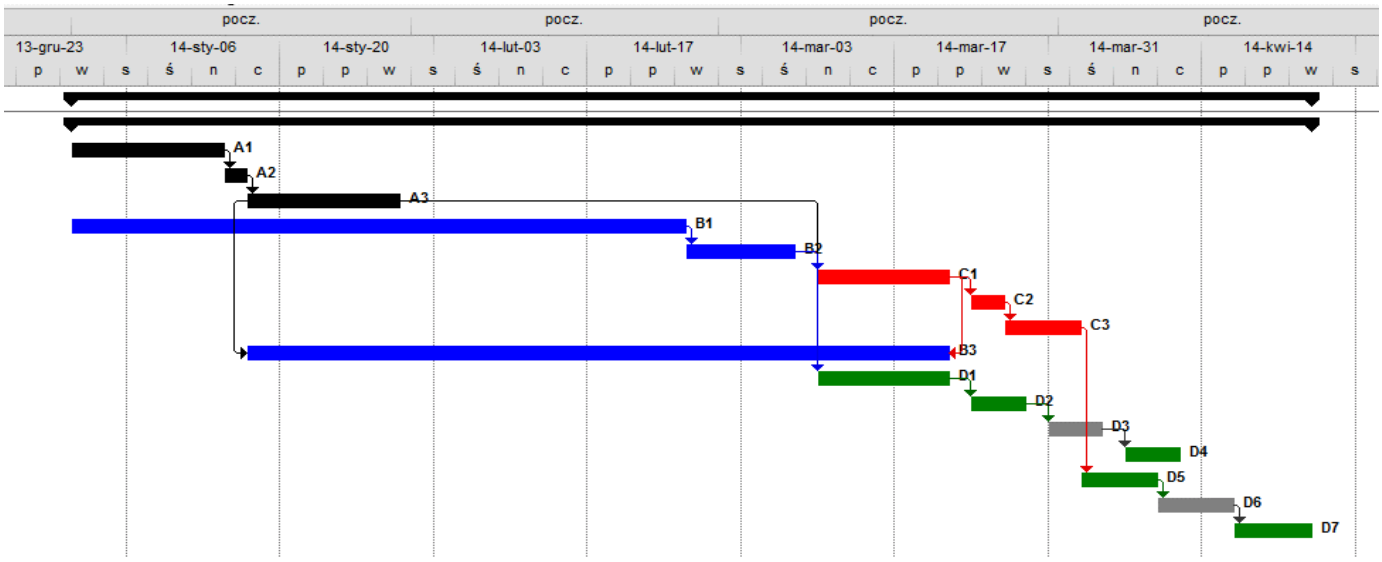
A1-D7 **cd. Jakość formulacji zastosowanej w badaniach**

1. ICH, Q8 (R2) Note for guidance on pharmaceutical development. 2009
2. EMA, Note for guidance on development pharmaceutics. CPMP/QWP/155/96. 1988

Typowy plan badania PK z udziałem zwierząt doświadczalnych obejmuje kilka faz:

Nazwa zadania	Czas trwania	Rozpoczęcie	Zakończenie	Poprzedzające zad.	Wytyczne
badanie farmakokinetyki leku na zwierzętach	**81 dn**	**śro, 14-01-01**	**śro, 14-04-23**		
PK, badanie	**81 dn**	**śro, 14-01-01**	**śro, 14-04-23**		
aklimatyzacja zwierząt	10 dn	śro, 14-01-01	wto, 14-01-14		A1
podział na grupy, randomizacja, dane wstępne	2 dn	śro, 14-01-15	czw, 14-01-16	3	A2
podanie leku + pobieranie prób	10 dn	pią, 14-01-17	czw, 14-01-30	4	A3
optymalizacja metody	40 dn	śro, 14-01-01	wto, 14-02-25		B1
walidacja metody analitycznej	8 dn	śro, 14-02-26	pią, 14-03-07	6	B2
analiza chemiczna próbek	10 dn	pon, 14-03-10	pią, 14-03-21	5;7	C1
analiza farmakokinetyki	3 dn	pon, 14-03-24	śro, 14-03-26	8	C2
analiza statystyczna	5 dn	czw, 14-03-27	śro, 14-04-02	9	C3
stabilność długoterminowa	46 dn	pią, 14-01-17	pią, 14-03-21	5RR;8ZZ	B3
częściowy raport walidacyjny	10 dn	pon, 14-03-10	pią, 14-03-21	7	D1
kompletny raport z walidacji	5 dn	pon, 14-03-24	pią, 14-03-28	12	D2
komentarze i poprawki	5 dn	pon, 14-03-31	pią, 14-04-04	13	D3
końcowy raport walidacyjny	5 dn	pon, 14-04-07	pią, 14-04-11	14	D4
wstępny raport analityczny + farmakokinetyczny	5 dn	czw, 14-04-03	śro, 14-04-09	10	D5
komentarze i poprawki	5 dn	czw, 14-04-10	śro, 14-04-16	16	D6

Każdy z etapów badania PK wymaga zaznajomienia się z regulacjami pozwalającymi w efekcie na przeprowadzenie takiego badania zgodnie ze sztuką. Podobnie jak terminarz poszczególnych działań również wytyczne opisujące sposób projektowania badań PK zazębiają się i opisują często kilka etapów jednocześnie.



Rys. Wykres Gantta ilustrujący przykładowe ramy czasowe realizacji poszczególnych elementów badania PK.

Nazewnictwo - akronimy

Farmakokinetykę nadal można zaliczyć do dziedzin stosunkowo "młodych". Stąd mogłoby wydawać się że zróżnicowanie związane ze stosowaniem różnych akronimów skrótów i sposobów skracania nazw parametrów jest w tym wypadku czymś typowym. Należy jednak wziąć pod uwagę to że farmakokinetyka jest jedną z niewielu gałęzi nauk podstawowych tak szeroko opisywanych w dyrektywach i przewodnikach wszystkich agencji rejestrujących leki na świecie. Poza instytucjami wyznaczonymi do rejestracji leków również liczne agencje i organizacje pozarządowe wymieniają w swoich dokumentach część parametrów farmakokinetycznych (akronimy). Niestety wśród agencji nadal niema jednomyślności w nazewnictwie i często w dokumentach jednej instytucji można odnaleźć dokumenty w których stosowane są skrajnie różne formy zapisu tego samego parametru. Dotyczy to również parametrów towarzyszących opisom leków wywodzącym się z innych nauk podstawowych.

Akronim	WHO	IUPAC	FDA	EMEA
AUC	area under the concentrationtime curve	area under the concentration-time curve (A)	area under the curve	Area Under the Curve area under the concentration/time curve
AUMC		area under the moment curve (Am)	area under the moment curve	
Cl	clearance		clearance (CL, Cl)	clearance (CL, Cl)
Cmax	peak concentration	maximum concentration (cmax)	peak drug concentration peak concentration (CMAX)	Concentration maximum Maximum concentration concentration at peak peak-concentration time
tmax	Tmax		time of maximum concentration (Tmax)	time until Cmax is reached (Tmax) time to reach peak time of maximum concentration
F	bioavailability		BA/BE,bioavailability/ bioequivalence	Bioavailability (BA)
PBTK	physiologically based toxicokinetic			
PBPK		physiologically based pharmacokinetics modeling	physiologically based pharmacokinetic	
kel		elimination rate (K)	terminal or elimination rate constant (λz, Kel)	terminal rate constant elimination rate constants (Kel, k, Ke, λz)
t1/2	terminal elimination half-life elimination half-life	half time half life	terminal half-life half-life	terminal half-life (T1/2) plasma concentration half-life half-life
Vd	apparent volume of distribution	volume of distribution (V_d)	volume of distribution (Vd)	volume of distribution (VD)
LogP(o/w)	octanolwater partition coefficient (Pow)	octanolwater partition coefficient (Kow) octanol water partition coefficient (POW) octan-1-olwater partition coefficient (P_{ow})	Octanol/Water Partition Coefficient (Kow) n-Octanol/Water Partition Coefficient	n-octanol/water partition coefficient (Kow; LogP)
BW	body weight (bw, BW)	body weight (b.w., b.wt.)	body weight (BW)	body weight (BW; bw)

Wykaz skrótów:

A

a - stała szybkości fazy dystrybucji
a - stosunek powierzchnia / objętość kapilar
A - stężenie ekstrapolowane dla fazy dystrybucji
A - absorpcja
AADR - ADR o mechanizmie immunologicznym
AAG - a-1 kwaśna glikoproteina
ABB - bariera krew powietrze
ABC - pole powierzchni nad krzywą
ABC - ATP zależne białka błonowe
ABW - aktualna masa ciała
ACDLogP - współcz. rozdziału oktanol woda
ADD - średnia dawka dzienna
ADI - dopuszczalne dzienne spożycie
ADME - absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja
ADR - niepożądane działania leku
ADRs - j.w.
AIC - kryterium informacyjne Akaike
ALogP - współcz. rozdziału oktanol woda
AMS - akceleratorowa spektrometria masowa
AN - liczba absorpcji
API - jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
aPSA - apolarne pole powierzchi
ASF - współczynnik rozpuszczalności dla kwasów
ATP - adenozynotrójfosforan
ATS - aktywne wydzielanie kanalikowe
AUC - pole powierzchni pod krzywą
AUCC - spotęgowane pole powierzchni
AUCF - fluktuacje stężenia na bazie AUC
AUD - pole powierzchni pod krzywą danych
AUDC - pole powierzchni pod krzywą dystrybucji
AUE - pole powierzchni powyżej MEC
AUIE - pole powierzchni dla MIC
AUMC - pole powierzchni pierwszego momentu
AUMDC - pole powierzchni pierwszego momentu krzywej dystrybucyjnej
AUT - pole powierzchni pól trapezów

B

b - stała szybkości fazy eliminacji
B - stężenie ekstrapolowane dla fazy eliminacji
BA - biodostępność
BBB - bariera krew mózg
BCT - szybkość krążenia krwi
BE - biorównoważność
BEI - współczynnik eliminacji z mózgu
BFR - współczynnik zaw. tłuszczu w organizmie
BIAS - błąd systematyczny
BIC - Bayesowskie kryterium dopasowania
BIE - brak równoważności biologicznej
BMC - stężenie wyjściowe
BMD - gęstość kości
BMD - dawka wyjściowa
BMI - współczynnik masy ciała
BMR - szybkość przemiany podstawowej
BP - punkt (temperatura) wrzenia
BSA - powierzchnia ciała
BSA-CF - współczynnik korekcyjny BSA
BTF - współczynnik biotransferu
BUI - współczynnik wychwytu przez mózg
BV - objętość krwi
BW - masa ciała

C

C - stężenie ekstrapolowane dla fazy absorpcji
C - stężenie
CA - analiza kasetowa
CADD - komputerowe wspomaganie projektowania leków
CAS - numer chemicznego serwisu informacyjnego
CATD - komputerowe wspomaganie projektowania badań klinicznych
Cavg - stężenie średnie w stanie stacjonarnym
CD - współczynnik dystrybucji
CD - podanie kasetowe
CE - stężenie efektywne
CE - elektroforeza kapilarna
CI - współczynnik spójności ciał stałych
Cl - klirens
CI - indeks chemoterapeutyczny
CLogP - współcz. rozdziału oktanol woda
Cmax - stężenie maksymalne
Cmin - stężenie minimalne
CMRT - stężenie dla MRT
CNS - ośrodkowy układ nerwowy
CO - pojemność wyrzutowa serca
COMT - metylotransferaza katecholowa
CPKP - kompletny profil PK leku
CS^3 - względne zakrzywienie
CSF - pewny współczynnik bezpieczeństwa
C-T - krzywa zależności stężenie czas
CV - objętość komórek krwi
CV - współczynnik wariancji
CV^2 - względne rozproszenie
CVRT - współczynnik wariancji MRT
CYP - rodzina izoenzymów metabolicznych

D

D - gęstość
D - dystrybucja
D - dawka
DAD - detektor diodowy
DF - stopień rozproszenia
DiN - liczba rozpuszczalności
DL - pierwsza dawka
DM - dawka podtrzymująca
DMPK - metabolizm i farmakokinetyka leku
DMSO - dimetylosulfotlenek
DN - liczba dawki
DNAUC - AUC normalizowane w stosunku do dawki
DR - szybkość dawkowania
DRC - tarcza trafności wyboru
DS - moc dawki
DSI - dipolowy współczynnik rozpuszczalności
DTI - dynamiczny indeks terapeutyczny
DW - masa ciała obliczona do dawkowania

E

e - względny przedział dawkowania
E - eliminacja
EC - stężenie efektywne
EC - detekcja elektrochemiczna
ECF - objętość płynu pozakomórkowego
ED - dawka efektywna
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctwoy
EHC - krążenie wątrobowo jelitowe
ELI - dawka pobrana w ciągu całego życia
ELISA - test immunoenzymatyczny
ELS - poszerzony model najmniejszych kwadratów
ELSD - detektor fotodysperdyjny
EMA - (EMEA) Europejska agencja do spraw produktów medycznych
ENT - system transportu nukleozydów
EPB - stopień wiązania z białkami
ER - współczynnik ekstrakcji
ERPF - efektywny przepływ krwi przez nerki
ESI - jonizacja elektrosprejem
ESS - suma kwadratów odchyleń
EVF - objętość płynu pozanaczyniowego

F

f - współczynnik rozdziału oktanol / woda
F - dostępność biologiczna
fbP - frakcja związana w osoczu
fB - frakcja wolna we krwi
FDA - amerykańska agencja ds. żywnosci i leków
FDVS - selekcja wirtualna zależna od met. fingerpritu
fel- współczynnik kumulacji
Ff - frakcja poddana filtracji
FFA - frakcja wolnych kwasów tłuszczowych
FL - detekcja fluorescencyjna
fm - frakcja metabolizowana
FIA - po raz pierwszy na zwierzętach
FIH - po raz pierwszy na człowieku
FOLT - system transportu folanu
FPS - wolne miejsca białek dla wiązania leków
fr - stopień persystencji
fss - procent wartości stanu ustalonego
fuP - frakcja wolna w osoczu
fuP - frakcja wolna w tkankach

G

g - stała szybkości fazy absorpcji
G - kulistość
GC - chromatografia gazowa
GCP - zasady dobrej praktyki klinicznej
GER - szybkość opróżniania żołądka
GF - filtracja kłębkowa
GFR - szybkość filtracji kłębkowej
GIT - przewód pokarmowy
GLP - dobra praktyka laboratoryjna

H

HED - dawka równoważna dla człowieka
HBA - miejsca wiązania dla atomów wodoru
HBD - aktywne atomu wodoru
HCT - hematokryt
HDL- lipoproteiny o wysokiej gęstości
HIA - absorpcja z jelit człowieka
HLT - okres półtrwania
HPLC - wysokosprawna chrom. cieczowa
HR - szybkość pracy serca
HSA - albuminy osocza ludzkiego
HTS - metody szybkiej selekcji danych
HTV - szybka selekcja woltametryczna
HVD - okres półtrwania dla Cmax
HW - masa serca

I

IAM - unieruchomione sztuczne układy błonowe
IBW - idealna masa ciała
ICF - objętość płynu wewnątrzkomórkowego
ICH - międzynarodowy komitet harmonizacji

ICG - zieleń indocyjanowa
IE - wykluczanie jonów
IFABT - białko jelita wiążące kwasy tłuszczowe
IOF - objętość płynu organelli komórkowych
IPC - plazma wzbudzana indukcyjnie
ISF - objętość płynu interstycjalnego
ISF - współczynnik skalowania między gatunkowego
IU - jednostki międzynarodowe
IVF - objętość płynu wewnątrznaczyniowego
IVIVC - korelacje parametrów *in vitro* / *in vivo*

K

K - stała szybkości procesu kinetycznego (l)
Ko - stała szybkości wlewu
Km - stała Michaelis'a - Menten'a
KOWIN - współczynnik rozdziału oktanol woda
KW - masa nerek

L

L - uwalnianie
LADME - uwalnianie + ADME
LBMI - beztłuszczowy indeks masy ciała
LBW - beztłuszczowa masa ciała
LC - chromatografia cieczowa
LCT - leukokryt
LD - dawka letalna
LDL - lipoproteiny o niskiej gestości
LF - współczynnik liniowości
LLE - ekstrakcja ciecz ciecz
LOD - granica wykrywalności
LogBB - Współczynnik rozdziału krew mózg
LogD - współcz. rozdziału oktanol woda w pH 7.4
LogKOW - współczynnik rozdziału oktanol woda
LogP - współczynnik rozdziału oktanol woda
LOQ - granica oznaczalności
LRP - białko oporności na leki obecne w płucach
LSD - dietyloamid kwasu lizergowego
LSM - metoda ograniczonego pobierania próbek
LuW - masa płuc
LW - masa wątroby

M

M - metabolizm
M - średnia
MAD - maksymalna dawka wchłanialna
MAPK - kinaza aktywowana mitogenem
MAT- średni czas absorpcji leku
MBW - masa mózgu ssaków
MBC - minimalne stężenie bakteriobójcze
MDCK - komórki nabłonka nerki psa Martin - Darby
MDR - białko warunkujące oporność na leki
MDT - średni czas rozpadu
MdT - średni czas rozpuszczania
MEC - minimalne stężenie efektywne
MEKC - micelarna elektrokinetyczna elektroforeza kapilarna
MEL - minimalny poziom efektywny
MESOR - średnia wartość dla rytmu
Met - transporter kwasów monokarboksylowych
MF - współczynnik modyfikujący
MIC - minimalne stężenie hamujące
MiLogP - współczynnik rozdziału oktanol woda
ML - maksymalne prawdopodobieństwo
MOE - margines ekspozycji
MOS - margines bezpieczeństwa
MPC - minimalne stężenie hamujące rozwój mutantów
MR - współczynnik metaboliczny
MR - refrakcja molowa
MS - spektrometr masowy
MS / MS - podwójna spektrometria masowa
MRL - maksymalne stężenie pozostałości leku
MRN - średnia liczba cząsteczek
MRP - białko oporności na leki
MRT - średni czas obecności leku w organizmie
MSC - kryteria selekcji modelu
MSOF - molekularny wyznacznik sumy wszystkich grup funkcyjnych
MTD - maksymalna dawka tolerowana
MTL - maksymalna dawka tolerowana
MTT - średni czas przechodzenia leku przez organizm
MV - objętość cząsteczki
MW - masa cząsteczkowa
MW - masa mięśni

N

NCA - analiza pozakompartmentowa
NCE - nowe substancje chemiczne
NMR - magnetyczny rezonans jądrowy
NONMEM - mieszane nieliniowe modelowanie efektu
NOSA - niepolarne pole powierzchni
NPT - Na zależny transporter związków fosforu

O

OATP - transporter anionów organicznych
OB - odczyn Biernackiego

Obs - wartość obserwowana
OCTN - transporter kationów organicznych
OLS - metoda najmniejszych kwadratów

P

p - przenikalność
PA - dostępność farmaceutyczna
PA - parachor
PAE - efekt przeciwbakteryjny ostatniej dawki
PAE-SME - jw. w stężeniu poniżej MIC
PAH - para aminohipuran Na
PAMPA - badanie przepuszczalności przez sztuczne układy błonowe
PBK - PK w oparciu o parametry fizjologiczne
PBPK - j.w.
PBTK - toksykokinetyka w oparciu o parametry fizjologiczne
PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy
PD - farmakodynamika
PET - system transportujący peptydy
PET - emisyjna tomografia pozytronowa
P-gp -P - glikoproteina
pH - stężenie jonów wodorowych
PK - farmakokinetyka
pKa - stopień dysocjacji
PLOT - techniki przedklinicznej optymalizacja leku
PP - denaturacja (precypitacja) białek
PR - szybkość perfuzji
Pre - wartość oczekiwana
PSA - pole powierzchni polarnej
Pt - czas protrombinowy
PTF - stopień fluktuacji
PTTO - parabola poprowadzona przez źródło danych
PV - objętość osocza

Q

Q - czas uwalniania leku
QC - kontrola jakości
Qh - przepływ krwi przez wątrobę
QLogP - współczynnik rozdziału oktanol woda
QSAR -obliczenia zal. struktura / aktywność
QSMR -obliczenia zal. struktura / metabolizm
QSPR -obliczenia zal. struktura / właściwości
QSTR -obliczenia zal. struktura / toksyczność

R

R - współczynnik kumulacji
R - współczynnik korelacji Pearson'a
R - współczynnik sfałdowania
R^2 - kwadrat współczynnika korelacji Pearson'a
RBC - erytrocyty
RBF - przepływ krwi przez nerkę
rcf - siła przeciążenia
RBS - zautomatyzowany system pobierania krwi
rf - funkcja wyróżnienia
RfD - dawka referencyjna
RgD - dawka regulatorowa
RI - detekcja refraktometryczna
R - of - 5 - reguła pięciu
RP - układ faz odwróconych
RPF - przepływ osocza przez nerkę
rpm - liczba obrotów na minutę
RR - szybkość oddychania
RSD - względne odchylenie standardowe
RSS - suma kwadratów odchyleń
RTPC - współczynnik rozdziału średnich czasów obecności leku
RTS - sekrecja kanalikowa w nerkach

S

S - czułość metody
S - rozpuszczalność
S - prawdopodobny czas przeżycia
SAD - depresja zimowa
SAR - analiza budowa / aktywność
SASA - powierzchnia cząsteczki dostępna dla rozpuszczalnika
SBDD - projektowanie leku oparte na zmianie budowy cząsteczki
SC - stężenie bezpieczne
SC - warstwa zrogowaciała skóry
SC - kryterium Schwarz'a
SC - współczynnik podobieństwa
SCN - *nucleus suprachiasmaticus*
SCR - stężenie kreatyniny w osoczu
SD - odchylenie standardowe
SDS - siarczan sodowy dodecylu
SE - efekt uboczny
SEM - odchylenie standardowe średniej
SF - współczynnik bezpieczeństwa
SF - współczynnik korekcyjny
SHAM - nachylenia, punkty, pola, momenty
SHC - stężenie bezpieczne dla człowieka
SIT - miano inhibicji w osoczu
SLS - siarczan laurylowy sodu
SM - masa szkieletu
SMILES - uproszczony system zapisu budowy chemicznej

SMT - teoria momentów statystycznych
SMTV - system transportu witamin Na zależny
SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SPE - ekstrakcja do fazy stałej
SR - współczynnik rozpuszczalności
SRT - zakrzywienie dystrybucji
SSM - standardowy margines bezpieczeństwa
SSM - suma kwadratów odchyleń w stos. do średniej
SSR - suma kwadratów odchyleń
SST - system testowania odpowiedniości
STB - całkowite stężenie bilirubiny w osoczu
Sw - rozpuszczalność w wodzie

T

t - interwał dawkowania
t - czas
T - czas trwania wlewu donaczyniowego
T - współczynnik asymetrii
t 1/2 - okres półtrwania
TBA - zewnętrzna dostępność biologiczna
TBV- całkowita objętość krwi
TC - wspólczynnik Tanimoto
TCA - kwas trójchlorooctowy
TCI - terapia monitorowana stężeniem leku
TD - dawka toksyczna
TDM - terapia monitorowana stężeniem leku
TED - dynamika narastania efektu toksycznego
TFA - kwas trójfluorooctowy
THF - tetrahydrofuran
TI - indeks terapeutyczny
TK - toksykokinetyka
tlag - czas opóźnienia wchłaniania
Tm - temperatura topnienia
tmax- czas odnotowania Cmax
TOL - tolerancja
TOF - czas przelotu jonów
tPSA - topologiczne pole polarne powierzchni
TR - wchłanianie zwrotne w kanalikach nerkowych
TS - wydzielanie do kanalików
TSS - suma kwadratów odchyleń średniej
tss - czas osiągnięcia stanu ustalonego
TTD - baza danych celów terapeutycznych
TTS - transdermalny system terapeutyczny
TW - okno terapeutyczne

U

UE - wydalanie nerkowe
UF - współczynnik niepewności
UPLC - ultra wydajna chromatografia cieczowa
UV - detekcja w nadfiolecie
UV-vis - detekcja w nadfiolecie i świetle widzialnym

V

V - objętość
Var - wariancja
Vd - objętość dystrybucji
VICH - międzynarodowy komitet harmonizacji badań weterynaryjnych
VLDL - lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości
VM^2 - współczynnik rozproszenia
Vmax - maksymalna szybkość reakcji
VPFR - szybkość przepływu krwi żylnej
VRT - wariancja MRT

W

WAUC - ważone pole powierzchni pod krzywą C-T
WHO - Światowa Organizacja Zdrowia
WLS - metoda ważonych najmniejszych kwadratów
WSS - ważona suma kwadratów odchyleń
WSSR - j.w.

X

XLogP - współczynnik rozdziału oktanol woda

Wykaz skrótów nazwy oryginalne:

A

a - distribution rate constant
a - capillary area / tissue
A - absorption
A - extrapolated concentration for distribution
AADR - allergic adverse drug reaction
AAG - a-1 acid glycoprotein
ABB - air blood barrier
ABC - area beyond the curve
ABC - ATP casette binding transporters
ABW - actual body weight
ACDLogP - octanol water partition coefficient
ADD - average daily dose
ADI - acceptable daily intake
ADME - absorption, distribution, metabolism, excretion
ADR - adverse drug reaction
ADRs - adverse drug reactions
AIC- Akaike information criterion
ALogP - octanol water partition coefficient
AMS - accelerator mass spectrometry
AN - absorption number
API - atmospheric presure ionisation
aPSA - apolar surface area
ASF - acid solubility factor
ATP - adenosine triphosphate
ATS - active tubular secretion
AUC - area under the curve
AUCC - area under squared curve
AUCF - concentration fluctuations from AUC
AUD - area under data
AUDC - area under disposition curve
AUE - area under effective concentration
AUIE - area under inhibitory concentration
AUMC - area under the first moment of curve
AUMDC - area under moment disposition curve
AUT - area under trapezoids

B

b - elimination rate constant
B - extrapolated concentration for elimination
BA - bioavailability
BBB - blood brain barrier
BCT - blood circulation time
BE - bioequivalence
BEI - brain efflux index
BFR - body fat ratio
BIC - Bayesian information criterion
BIE - bioinequivalence
BMC - benchmark concentration
BMD - bone mineral density
BMD - benchmark dose
BMI - body mass index
BMR - basal metabolic rate
BP - boiling point
BSA - body surface area
BSA-CF - BSA conversion factor
BTF - biotranspher factor
BUI - brain uptake index
BV - blood volume
BW - body weight

C

C - extrapolated concentration for absorption
C - concentration
CA - casette analysis
CADD - computer aided drug design
CAS - chemical abstract service number
CATD - computer aided clinical trial design
Cavg - average steady state concentration
CD - coefficient of distribution
CD - casette dosing
CE - effective concentration
CE - capillary electrophoresis
CI - cohesive index for solid
Cl - clearance
CI - chemoprevention index
CLogP - octanol water partition coefficient
Cmax - maximum concentration
Cmin - minimum concentration
CMRT - MRT concentration point
CNS - central nervous system
CO - cardiac output
COMT - catechol methyl transpherase
CPKP - complete PK profile
CSF - certain safety factor
CS^3 - relative skewness
C-T - concentration - time curve
CV - cell volume
CV - coefficient of variation
CV^2- relative dispersion (normalized variance)
CVRT - coefficient variacy of MRT
CYP - CYP izoenzyme metabolic family

D

D - density
D - distribution
D - dose
DAD - diode array detector

DF - degree of fluctuation
DiN - dissolution number
DL - loading dose
DM- maintenance dose
DMPK - drug metabolism and pharmacokinetics
DMSO - dimethylsulfoxide
DN - dose number
DNAUC - dose-normalized AUC
DR - dosing rate
DRC - disk of rightness choice
DS - dose strenght
DSI - dipole solvation index
DTI - dynamic therapeutic index
DW - dosing weight

E

e - relative dosing interval
E - elimination
EC - effective concentration
EC - electrochemical detection
ECF - extracellular fluid volume
ED - effective dose
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid
EED - exposure dose
EHC - entero hepatic circulation
ELI - estimated lifetime intake
ELISA - enzyme linked immunosorbent assay
ELS - extended least squers
ELSD - evaporative light scattering detector
EMA - (EMEA) European Medicinal Agency
ENT - equilibrative nucleoside transporter
EPB - extend of protein binding
ER - extraction ratio
ERPF - effective renal plasma flow
ESI - electrospray ionisation
ESS - residual sum of squares
EVF - extravascular fluid volume

F

f - octanol / water partition coefficient (LogP(o/w))
F - bioavailability
fbP - bound plasma fraction
fB - free blood fraction
FDA - Food and Drug Administration
FDVS - fingerprint dependent virtual sreening
fel- fraction of dose eliminated
Ff - filtration fraction
FFA - free fatty acids
FIA - first in animal
FIH - first in human
FL - fluorescence detection
fm - metabolized fraction
FOLT - folate transporter
FPS - free protein sites
fr - fraction of end dosing interval
fss - fraction steady state
fuP - unbound plasma fraction
fuT - unbound tissue fraction

G

g - absorption rate constant
G - globularity
GC - gas chromatography
GCP - good clinical practice
GER - gastric emptying rate
GF - glomerular filtration
GFR - glomerular filtration rate
GIT - gastro-intestinal tract
GLP - good laboratory practis

H

HED - human equivalent dose
HBA - hydrogen bond acceptors
HBD - hydrogen bond donors
HCT - hematocrit
HDL - high density lipoproteine
HIA - human intestinal absorption
HLT - half life time
HPLC - high performance liquid chromatography
HR - heart rate
HSA - human serum albumin
HTS - high throughput sreening
HTS - high throughput voltammetry
HVD - half value duration (for Cmax)
HW - heart weight

I

IAM - immobilized artificial membranes
IBW - ideal body weight
ICF - intracellular fluid volume
ICH - international commitee of harmonisation
ICG - indocyanine green
IE - ion exclusion
IFABP - intestinal fatty acids binding protein
IOF - intraorganelle fluid volume
IPC -
ISF - interstitial fluid volume
ISF - interspecies scaling factor
IU - international unit
IVF - intravascular fluid volume
IVIVC - *in vitro* / *in vivo* correlations

K

K - rate constant (l)
Ko - infusion rate constant
Km - Michaelis - Menten constants
KOWIN - octanol water partition coefficient
KW - kidney weight

L

L - liberation
LADME - liberation + ADME
LBMI - lean body mass index
LBW - lean body weight
LC - liquid chromatography
LCT - leukocrit
LD - lethal dose
LDL - low density lipoprotein
LF - linearity factor
LLE - liquid liquid extraction
LOD - limit of detection
LogBB - brain blood partition coefficient
LogD - octanol water partition coefficient at pH 7.4
LogKOW - octanol water partition coefficient
LogP - octanol water partition coefficient
LOQ - limit of quantitation
LRP - lung resistance protein
LSD - lisergic acid diethylamide
LSM - limited sampling method
LuW - lung weight
LW - liver weight

M

M - metabolism
M - mean
MAD - maximum absorbable dose
MAPK - mitogen activated protein kinase
MAT- mean absorption time
MAT - mean arrival time
MBW - mammalian brain weight
MBC - minimal bactericidal concentration
MDCK - Madin - Darby canine kidney cells
MDR - multidrug resistance associated protein
MDT - mean desintegration time
MdT - mean dissolution time
MEC - minimum effective concentration
MEKC - micellar electrokinetic chromatography
MEL - minimally efective level
MESOR - midline estimating statistic of rhythm
MET - monocarboxylic acid transporter
MF - modifying factor
MIC - minimum inhibitory concentration
MiLogP - octanol water partition coefficient
ML - maximum likelihood
MOE - marign of exposure
MOS - marign of safety
MPC - mutant prevention concentration
MR - metabolic ratio
MR - molar refractivity
MRL - maximum residue limit
MRN - mean residence number
MRP - multidrug resistance protein
MRT - mean residence time
MS - mass spectrometry
MS / MS - dual mass spectrometry
MSC - model selection criterion
MTD - maximum tolerated dose
MSOF - molecular sum over all fragments
MTL - maximally tolerated level
MTT - mean transit time
MV - molecular volume
MW - molecular weight

N

NCA - non - compartmental analysis
NCE - new chemical entities
NMR - nuclear magnetic resonance
NONMEM - nonlinear mixed effect model
NPSA - non polar surface area
NPT - Na dependent phosphate transporter

O

OATP - organic anion transporter
OB - Biernacki reaction
Obs - observed
OCTN - organic cation transporter
OLS - ordinary last squers

P

p - permeability
PA - pharmaceutical bioavailability
PA - parachor
PAE - post antibiotic effect
PAE-SME - post antibiotic sub MICeffect
P-gp - P - glycoprotein
PAH - para aminohipurate Na
PAMPA - artificial membrane permeation assay
PBK - physiologically based pharmacokinetics
PBPK - physiologically based pharmacokinetics
PBTK - physiologically based toxicokinetics

PCR - polymerase chain reaction
PD - pharmacodynamics
PET - oligopeptide transporter
PET - positron emission tomography
pH - log of reciprocal of hydrogen ion concentration
PK - pharmacokinetics
pKa - log of reciprocal of the dissociation constant, 1/LogK
PLOT - preclinical lead optimization technology
PP - protein precipitation
PR - perfusion rate
Pre - predicted
PSA - polar surface area
Pt - prothrombin time
PTF - peak trough fluctuation
PTTO - parabola trought the origin
PV - plasma volume

Q

Q - liberation time
QC - quality control
Qh - hepatic blood flow
QLogP - octanol water partition coefficient
QSAR - quantitative structure-activity relat.
QSMR - quantitative structure-metabolism relat.
QSPR - quantitative structure-property relat.
QSTR - quantitative structure-toxicity relat.

R

R - accumulation factor
R - rugosityR - Pearson correlation factor
R^2 - Squer of Pearson correlation factor
RBC - red blood cells
RBF - renal blood flow
RBS - robotic blood samplers
rcf - relative centrifugal force
rf - Maddrey discriminant factor
RfD - reference dose
RgD - regulatory dose
RI - refractive index detector
RP - reverse phase
RPF - renal plasma flow
rpm - rotation per minute
RR - respiratory rate
R - of - 5 - rule of five
RSD - relative standard deviation
RSS - sum of squared deviations
RTPC - residence time partition coefficient
RTS - renal tubular secretion

S

S - method sensitivity
S - solubility
S - survival probability time
SAD - sesonal affective disorders
SAR - structure activity relationship
SASA - solvent accesible surface area
SBDD - structure based drug design
SC - safe concentration
SC - stratum corneum
SC - Schwarz criterion
SC - similarity factor
SCR - serum creatinine
SCN - nucleus suprachiasmaticus
SD - standard deviation
SDS - sodium dodecyl sulphate
SE - side effect
SEM - standard error of mean
SF - safety factor
SF - scaling factor
SHAM - slopes, heights, areas, moments
SHC - save human concentration
SIT - serum inhibitory titre
SLS - sodium laureth sulphate/sodium lauryl sulphate
SM - skeletal mass
SMILES - simplified molecular input entry system
SMT - statistical moment theory
SMTV - sodium / multivitamine transporter
SNP - single nucleotide polymorphism
SPE - solid phase extraction
SR - solubilization ratio
SRT - skewness of distribution
ss - steady state
SSM - standard safety marign
SSM - sum of squared deviations of mean
SSR - sum of squared deviations
SST - system suitability test
STB - serum total bilirubin
Sw - solubility in water

T

t - dosage interval
t - time
T - infusion time
T - tailing factor
t 1/2 - half life
TBA - topical bioavailability
TBV- total blood volume
TC - Tanimoto coefficient
TCA - trichloroacetic acid

TCI - target concentration intervention
TD - toxic dose
TED - toxic effect dynamics
TFA - trifluoroacetic acid
THF - tetrahydrofuran
TI - therapeutic index
TK - toxicokinetics
tlag - lag time
Tm - melting temperature
tmax - time describing Cmax
TOL - tolerance
TOF - time of flight
tPSA - topological polar surface area
TR - tubular reabsorption
TR - tubular secretion
tss - steady state time
TSS - sum of squared deviations of mean
TTD - therapeutic target database
TTS - transdermal therapeutic system
TW - therapeutic window

U

UE - urinary excretion
UF - uncertainty factor
UPLC - ultra performance liquid chromatography
UV - ultraviolet detection
UV - vis - ultraviolet / visible light detection

V

V - volume
Var - variance
Vd - volume of distribution
VICH - Veterinary International Commette of Harmonisation
VLDL - very low density lipoproteins
Vmax - maximal velocity
VM^2 - dispersion ratio
VPFR - venous plasma flow rate
VRT - variacy of MRT

W

WAUC - weighted area under the curve
WHO - World Health Organization
WLS - Weighted least squers
WSS - weighted sum of the squared deviations
WSSR - j.w.

X

XLogP - octanol water partition coefficient

Tłumaczenia wybranych terminów na j. niemiecki

A

absorption - resorption, absorption, aufnahme
accumulation - kumulation
AUC - fläche unter der konzentrations-zeit-kurve

B

BA bioverfügbarkeit, biologische verfügbarkeit, systemische verfügbarkeit
BBB - blut-hirn-schranke
BE - bioäquivalenz
biliary excretion - biliäre exkretion, ausscheidung mit der galle
biotransformation biotransformation, metabolismus, metabolisierung, stoffwechsel

C

Cl - clearance
Cmax - spitzenspiegel, maximalkonzentration
compartments - kompartimente

D

distribution - verteilung
Vd - verteilungsvolumen
dose effect - dosis-wirkungsbeziehung

E

elimination - ausscheidung, inaktivierung
entero-hepatic recirculation - entero-hepatischer kreislauf
excretion - exkretion ausscheidung
extrarenal fraction - extrarenale dosisfraktion metabolisierte fraktion, extrarenal eliminierte fraktion

F

first-pass-effekt - siehe präsystemischer metabolismus
first order kinetics - kinetik erster ordnung
free fraction - freie fraktion des arzneimittels

L

linear kinetics - lineare kinetik

M

multiple dose regimens - mehrfachdosierung

P

prodrug - propharmakon, vorstufe
protein binding eiweissbindung, proteinbindung, plasmaproteinbindung

S

SS fliessgleichgewicht, gleichgewichtszustand

T

trough plasma concentration - tiefstspiegel, talspiegel
t /2 - plasmahalbwertszeit, halbwertszeit, eliminationshalbwertszeit

Wykaz jednostek:

Parametr:	*jednostki:*		*parametry homologiczne:*
PSA	A^2		SASA, tPSA, aPSA, PSAd
MW	Da		
MV	A^3		
AUC, AUIC	mg x h / L		niezależnie od zakresu obliczanego pola (0-tlast), (0-t),(0-a)
AUMC	mg x h^2 / L		niezależnie od zakresu obliczanego pola (0-tlast), (0-t),(0-a)
D	mg / kg	[mg / m^2]	D_L, D_M
ADI	mg / kg / dzień		RfD
C	mg / L		również C_{max}, C_{ssmax}, C_{ssmin}, C_o LOD, MEC, LD, MIC, MBC, Km, EC, LOQ
Cl	L / h	[L / h / kg]	Cl_r, Cl_h
GFR	L / h		GF
Vd	L	[L / kg]	Vd_{ss}, V_c, V_b
V	L		V_u, TBW, PV
MV	A^3		
K	1 / h		a, b, g, K_{12}, K_{21}, K_{10}
V_{max}	(mg / L) / h		
$t_{1/2}$	h		t_{lag}, t_{max}, t, MTT, MAT, MDT, HVD, PAE, PAE-SME
p	cm / s		
a	cm^2 / cm^3		
BSA	m^2		
BW	kg		LBW, LW, DW
BA	%		BE, EPB, TBA, PTF
BMI	współczynniki		f, ER, LBMI, LF, R, TI, rząd reakcji

Ważne organizacje międzynarodowe:

WWW **EMA**
European Medicines Agency
http://www.emea.eu.int

WWW **ICH**
International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration For Human Use
http://www.ich.org

WWW **VICH**
International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Veterinary Products
http://vich.eudra.org

WWW **HOA**
Heads Of Agencies
http://www.medagencies.org

WWW **HEVRA**
Heads Of European Veterinary Regulatory Authorities For Medicinal Products
http://www.hevra.org

WWW **FEDESA**
European Federation Of Animal Health
http://www.fedesa.be

WWW **FDA**
U.S. Food And Drug Administration
http://www.fda.gov

WWW **CDER**
Center For Drug Evaluation And Research
http://www.fda.gov/cder

WWW **CBER**
Center For Biologics Evaluation And Research
http://www.fda.gov/cber

WWW **CFSAN**
Center For Food Safety And Applied Nutrition
http://www.cfsan.fda.gov

WWW **WHO**
World Health Organization
http://www.who.int

WWW **EPA**
U.S.Environmental Protection Agency
http://www.epa.gov

Piśmiennictwo

1. Abraham M.H. (2002) The high-throughput prediction of physicochemical and biological properties from structure. pps file 1-36
2. Aced G., Mockel H.J. (1991) Liquidchromatographie. Apparative, theoretische und methodische grundlagen der HPLC. VCH s. 1-169
3. Adams J.P., Murphy P.G. (2000) Obesity in anaesthesia and intensive care. Br J Anaesth 85:1 s. 91-108
4. Ambati J., Canakis C.S., Miller J.W., Gragoudas E.S., Edwards A., Weissgold D., Kim I., Delori F.C., Adamis A.P. (2000) Diffusion of high molecular weight compounds through sclera. Invest Ophthalm and Vis Sci 41 s. 1181-1185
5. Amisaki T. (2001) Gaussian quadrature as a numerical integration method for estimating area under the curve. Biol Pharm Bull 24:1 s. 70-77
6. Andersen M.E. (2003) Toxicokinetics modeling and its applications in chemical risk assessment Tox Lett 138 s. 9-27
7. Andersen M.E., Clevel H III, Krishnan K. (1995) Tissue dosimetry, pharmacokinetics modeling, and interspecies scaling factors. Risk Anal 15:4 s. 533-537
8. Annaert P.P, Turncliff R.Z., Booth C.L., Thakker D.R., Brouwer K.L.R. (2001) P-glycoprotein-mediated *in vitro* biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. 29 s. 1277-1283
9. Aronson J.K., Hardman M., Reynolds D.J.M. (1993) ABC of monitoring drug therapy. BMJ s. 1-36
10. Ascione F.J. (1976) Evaluations of drug interactions. American Pharmaceutical Association & The National Professional Society of Pharmacist. s. 427-453
11. Atkinson H.C., Begg E.J. (1990) Prediction of drug distribution from physiochemical characteristics. Clin Pharmacokinet. 25:4 s. 151-167
12. Attervill C.K., Wing M.G. (2002) *In vitro* preclinical lead optimisation technologies (PLOTs) in pharmaceutical development. Tox Lett 127 s. 143-151
13. Auckenthaler R. (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral b - lactam antibiotics as a two dimensional approach to their efficacy. J of Atimic Chem 50:T1 s. 13-17
14. Austin R.P., Barton P., Cocroft S.L.,Wenlock M.C., Riley R.J. (2002) The influence of nonspecyficmicrosomal binding on apparent intrinsic clearance and it's prediction from physiochemical properties. Drug Met and Disp 30 s. 1497-1503
15. Avdeef A. (2001) Physicochemical profiling (solubility, permeability, and charge state). Curr Top in Med Chem. 1:4 s. 1-76
16. Ayrton A., Morgan P. (2001) Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. Xenobiotica 31:8-9 s. 469-497
17. Bachmann K., Pardoe D., White D. (1996) Scaling basic toxicokinetics parameters from rat to man. Environ Health Perspect 104:4 s. 400-407
18. Bachman K.A., Ghosh R. (2001) The use of *in vitro* methods to predict *in vivo* pharmacokinetics and drug interactions. Curr. Drug Met 2 s. 1-16
19. Baggot J.D. (1977) Principles of drug disposition in domestic animals: The Basis of Veterinary Clinical Pharmacology. W.B. Saunders Company s. 1-238
20. Bajorath J. (2002) Virtual screening in drug discovery: Methods, expectations and reality. Curr Drug Disc 3 s. 24-28
21. Balakin K.V., Ivanenkov Y.A., Skorenko A.V., Nikolsky Y.V., Savchuk N.P., Ivaschenko A.A. (2004) In silico estimation of DMSO solubility of organic compounds for bioscreening. J of Biom Scree 9:1 s. 22-31
22. Balaz S., Lukacova V. (2002) Subcellular pharmacokinetics and its potential for library focusing. J of Mol Graph and Mod 20 s. 479-490
23. Ball P., Baquero F., Cars O., File T., Garau J., Klugman K., Low D.E., Rubinstein E., Wise R.(2002) Atibiotic therapy of community respiratory tract infestions: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. J of Antimic Chemoth 49 s. 31-40
24. Bannwarth B., Lapicque F., Pehourcq F., Gillet P., Schaeverbeke T., Laborde C., Dehais J., Gaucher A., Netter P. (1995) Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in human cerebrospinal fluid. Br J Clin Pharmacol 40:3 s. 266-269
25. Barnes D.G., Dourson M. (1988) Reference dose (RfD): Description and use in health risk assessments. Regulatory Toxicol. And Pharmac. 8, s. 471 - 486
26. Barragry T.B. (1994) Veterinary drug Therapy. Lea & Febiger s. 263-275
27. Bartzatt R., Cirillo S.L., Cirillo J.D., Donigan L. (2003) Bifunctional constructs of aspirin and ibuprofen (NSAIDs) that express antibacterial and alcylation activity. Biotech Appl Biochem
28. Bates S.E., Wilson W.H., Fojo A.T., Alvarez M., Zhan Z., Regis J., Robey R., Hose C., Monks A., Kang Y.K., Chabner B. (1996) Clinical Reversal of multidrug Resistance. The Oncologist 1 s. 269-275
29. Benet L.Z. (2006) Concerns of helthcare practitioners and patients. Int Reg Workshop BE & Dissolution s. 37-49
30. Berezhovskiy L.M. (2003) Determination of volume distribution at steady state with complete consideration of the kinetics of protein and tissue binding in linear pharmacokinetics. J of Pharm Sci 93:2, s. 364-374
31. Berlin C.M. & Committee on Drugs. (1997) Alternative routes of drug administration - Advantages and disadvantages (subject reviev) Pediatrics 100:1 s. 143-152

32. Bernard L., Vuagnat A., Peytavin G., Hallouin M.C., Bouhour D., Nguyen H.T., Vilde J.L., Bricaire F., Raguin G., Truchis P., Ghez D., Duong M., Perrone C. (2002) Relationship in levels of indinavir in hair and virologic response to highly active antiretroviral therapy. Ann of Int Med. 137:8 s. 656-660
33. Bickel U. (2005) How to measure drug transport across the Blood - Brain Barrier. NeuroRx 2 s. 15-26
34. Bittner B., Mountfield R.J., (2002) Intravenous administration of poorly soluble new drug entities in early drug discovery: The potential impact of formulation on pharmacokinetics parameters. Curr Op in Drug Disc & Dev 5:1 s. 59:71
35. Bjorkman S. (2002) Prediction of volume of distribution of a drug: which tissue-plasma partition coefficients are needed. J of Pharm and Pharm 54, str 1237-1245
36. Blyden G.T., Greenblatt D.J., Scavone J.M., Shader R.I. (1986) Pharmacokinetics of diphenhydramine and a demethylated metabolite folowing intravenous and oral administration. J of Clin Pharm 26, s. 529-533
37. Bohets H., Annaert P., Mannens G., Beijsterveldt L., Anciaux K., Verboven P., Meuldermans W., Lavrijsen K. (2001) Strategies for absorption screening in drug discovery and development. Curr Top in Med Chem 1 s. 1-17
38. Boileau A.C., Merchen N.R., Wasson K., Atkinson C.A., Erdman J.W. (1999) Cis - lycopene is more bioavailable than trans - lycopene *in vitro* and *in vivo* in lymph-cannulated ferrets. J. Nutr. 129 s. 1176-1181
39. Boothe D.M. (2002) Optimizing antibacterial therapy for small animals using the professional flexible label. Texas A&M University, Dep. Vet. Phys. and Pharm.
40. Bostom A.G. Kronenberg F., Ritz E. (2002) Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. J Am Soc Nephrol 13 s. 2140-2144
41. Boubriak O.A., Urban J.P.G., Akhtar S., Meek K.M., Bron A.J. (2000) The effect of hydration and matrix composition on solute diffusion in rabbit sclera. Exp Eye Res 71 s. 503-514
42. Boubriak O.A., Urban J.P.G., Bron A.J. (2003) Differential effects of aging on transport properties of anterior and posterior human sclera. Exp Eye Res 76 s. 701-713
43. Bouchard G., Pagliara A., Carrupt P.A., Testa B., Gobry V., Girault H.H. (2002) Theoretical and experimental exploration of the lipophilicity of zwitterionic drugs in the 1,2- dichloroethane / water system. Pharm Res 19:8 s. 1150-1159
44. Bourne D.W.A. (1995-1999) A First Course in Pharmacokinetics and Biopharmaceutics.
45. Bowe L.C., Mokhtarzadeh L., Venkatesan P., Babu S., Axelrod H.R., Sofia M.J., Kakarla R., Chan T.Y., Kim J.S., Lee H.J., Amidon G.L., Choe S.Y., Walker S., Kahne D. (1997) Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. Proc Natl Acad Sci 94 s. 12248-12223
46. Boxenbaum H. (1998) Pharmacokinetics tricks and traps. J Pharm and Pharmaceut Sci 1:3 s. 90-91
47. Brander G.C., Pugh D.M., Bywater R.J. (1982) Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics. IV ed. Baillič re Tindal s. 402-411
48. Brandstrom E., Grzegorczyk A., Jacobsson L., Friberg P., Lindahl A., Aurell M. (1998) GFR measurement with iohexol and 51 Cr-EDTA. A comparision of the two favoured GFR markers in Europe. Nephrol Dial Transplant 13 s. 1176-1182
49. Brandys J., Danek A. (1984) Zarys biofarmacji. wyd. II PZWL Warszawa, s. 18-272
50. Brouillard F., Tondelier D., Edelman A., Baudouin-Legros M. (2001) Drug resistance induced by ouabaine via the stimulation of MDR1 gene expresion in human carcinomatous pulmonary cells. Canc Res 61 s. 1693-1698
51. Bruguerolle B. (1998) Chronopharmacokinetics. Current status. Clin Pharmacokinet 35:2 s. 83-94
52. Brockmeier D. (1999) Mean time concept and component analysis in pharmacokinetics. Int J of Clin Pharm and Ther 37:11 s. 555-561
53. Burgess D.S. (1999) Pharmacodynamic Principles of Antimicrobial Therapy in the Prevention of Resistance American College of Chest Physicians. ed. Lipincott / Williams & Wilkins
54. Buszewski B. (1999) Chromatografia i inne techniki separacyjne u progu XXI wieku. s. 19-508
55. Buzard J.A., Conklin J.D., Buller R.H. (1961) Lymphatic transport of selected nitrofuran derivatives in the dog. Am J Physiol 201 s. 492-494
56. Caporal-Gautier J., Nivet J.M. (1998) Walidacja metod analitycznych. Raport komisji SFSTP - Metodologia. Pharmaceutica 04.12.2000, s. 1-26
57. Cerniglia C.E., Kotarski S. (2005) Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobials agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. I Vet Pharm Ther 28 s. 3-20
58. Chassany O., Urien S., Claudepierre P., Bastian G., Tillement J.P. (1994) Binding of antracycline derivatives to human serum lipoproteins. Anticancer Res 14:6A s. 2353-2355
59. Chaturvedi P.R., Decker C.J., Odinecs A. (2001) Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. Curr Op in Chem Biol 5 s. 452-463
60. Chawla G., Bansal A.K. (2004) Challenges in polimorphism of pharmaceuticals. CRIPS 5:1 s.1-12
61. Chen X., Ji L., Chen Y.Z. (2002) TTD: Therapeutic target database. Nucl Acid Res 30:1 s. 412-415
62. Chiou W.L. (2001) The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absorption: Clarification and recommendation of terminology. J of Pharmacok and Pharmacod 28:1 s. 3-6
63. Chow H., Tolle K.M., Roe D.J., Elsberry V., Chen H. (1997) Application of neural networks to population pharmacokinetics data analysis. J of Pharm. Sc. 86:7 s. 840-845
64. Christ D.D. (2001) Cassette dosing pharmacokinetics: valuable tool or flawed science. Drug met and Disp 29:7 s 935

65. Chun F.X., Xiao C.C., Quan L.W., Sen Y.Q. (2001) Predicting blood - brain barrier penetration of drugs by polar molecular surface area and molecular volume. Acta Pharm Sin 22:7 s. 663-668
66. Ciccone G.K., Holdcroft A. (1999) Drugs and sex differences: a review of drugs relating to anaesthesia. Brit J of Anast 82:2 s. 255-265
67. Clark D.E. (2001) Prediction of intestinal absorption and blood brain barrier penetration by computational methods. Comb Chem & High Throug Scren 4 s. 477-496
68. Craigmill A.L., Cortright K.A. (2004) Interspecies considerations in the evaluation of human food safety for veterinary drugs. AAPS Pharm Sci 4(4)art 34 s. 1-11
69. Comstock T.J. (2002) Variability: Age (children). VCU School of Pharmacy, PHA 606 s. 1-20
70. Cozzi P.J., Bajorin D.F., Tong W., Nguyen H., Scott J., Warren D. Heston W., Dalbagni G. (1999) Toxicology and Pharmacokinetics of Intravesical Gemcitabine: A Preclinical Study in Dogs. Clin Canc Res 5 s. 2629-2637
71. Crandall E.D., Matthay M.A. (2001) Alveolar epthelial transport. Am J Respir Crit Care Med 162 s. 1021-1029
72. Crivori P., Cruciani G., Carrupt P.A., Testa B. (2000) Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. J. Med Chem. 43 s. 2204-2216
73. Crouch D.J., Day J., Baudys J.(2004) Ewaluation of saliva/oral fluids as an alternate drug testing speciment. NIJ Report 605-3, University of Utah, Center for Human Toxicology s.2-77
74. Dahlin M. (2000) Nasal administration of compoundsactive in central nervous system. Ac Univ Upps 240 s. 1-49
75. Danek A. (1978) Chemia fizyczna. PZWL Warszawa s. 279-320
76. Danek A. (1979) Farmakokinetyczne metody badania leków. TZF Polfa Warszawa, s. 11-116
77. Davis A.M., Webborn P.J.H., Salt D.W. (2000) Robust assessment of statistical significance in the use of unbound / intrinsic pharmacokinetics parameters in Quantitative Structure - Pharmacokinetic Relationship with lipophilicity. Drug Metab and Disp 28:2 s. 103-106
78. Dedrick R.L. (1999) Animal scale up. Drug Delivery and Kinetics Resource, NIH s. 1-43
79. De Mey C. (2000) Spezielle Pharmakokinetik. s. 1-25
80. Dharamsi A., Smith J. (2003) Drugs in breast milk 2003. Clin Pharm Bull s. 1-29
81. Didziapetris R.,Japertas P., Petrauskas P. (2003) Clasification analysis (C-SAR) in predicting P-gpsubstrate specyfity. Pharma Algorithms ppt 1-18
82. Dixit R., Riviere J., Kirshnan K., Andersen M.E. (2003) Toxicokinetics and physiologically based toxicokinetics in toxicology and risk assesment. J of Tox and Env Health part B 6 s 1-40
83. Doan K.M.M., Humphreys J.E., Webster L.O., Wring S.A., Shampine L.J., Serabjit-Singh C.J.,Adkison K.K., Polli J.W. (2002) Passive permeability and P-glycoprotein-mediatet efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. J of Pharm and Exp Ther 303:3 s. 1029-1037
84. Dobecki M. (1997) Walidacja metod w analizie chemicznej. Instytut Medycyny Pracy w Łodzi s. 1-83
85. Doerffel K. (1989) Statystyka dla chemików i analityków. WNT s. 101-104; 114-165
86. Doki K., Hayakawa T., Lin W., Yanaguimoto H., Ding G., Inotsume N. (2003) Effects of absorption rate on the pre-systemic chiral inversion of ibuprofen in rabbits. J Pharm Pharmacol. 55:8 str 1091-1097
87. Dorne J.L.C.M. (2004) Impact of inter-individual differences in drug metabolism and pharmacokinetics on safety evaluation. Fund and Clin Pharm 18 s. 609-620
88. Dourson L.M., Andersen M.E., Erdreich L.S., MacGregor J.A. (2001) Using human data to protect the public's health. Regulatory Tox and Pharm 33 s. 234-256
89. Dressman J.B., Reppas C. (2000) *In vitro - in vivo* correlations for lipophilic poorly water - soluble drugs. Eur J Pharm Sci 11:2 s. 73-80
90. Dubois D., Dubois E.F. (1916) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. Arch Int Med 17:8 s. 63-71.
91. Duhem C., Ries F., Dicato M. (1996) What does multidrug resistance (MDR) expression mean in the clinic. The Oncologist 1 s. 151-158
92. Edery I. (2000) Circadian rhythms in a nutschell. Physiol Genomics 3 s. 59-74
93. Eeckhoudt S.L., Evrard P.A., Verbeeck R.K. (1997) Biliary excretion and enterohepatic cycling of R - and S - flurbiprofen in the rat. Drug Met and Disp 25:4 s. 428 - 430
94. Edgecombe S.C., Stretch G.L., Hayball P.J. (2000) Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. J Nutr 130 s. 2996-3002
95. Edwards D.A., Ben-Jebria A., Langer R. (1998) Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 85:2 s. 379-385
96. Egan W.J., Lauri G. (2002) Prediction of intestinal permeability. Adv Drug Del Rev 54 s. 273-289
97 Ekins S., Bravi G., Wikel J.H., Wrighton S.A. (1999) Three - dimensional - quantitative structure activity relationship analyses of cytochrome P-450 3A4 substrates. J of Pharm and Exp Ther 291:1 s. 424-433
98 Ekins S., Bravi G., Ring B.J., Gillespie T.A., Gillespie J.S., Wandenbranden M., Wrighton S.A., Wikel J.H. (1999) Three - dimensional - quantitative structure activity relationship analyses of substrates for CYP2B6. J of Pharm and Exp Ther 288:1 s. 21-29
99. Ekins S., Boulanger B., Swaan P.W., Hupcey M.A.Z. (2002) Towards a new age of virtual ADME/TOX and multidimensional drug discovery. J of Comp Aided Mol Des 16 s. 381-401

100. Ekins S., Kim R.B., Leake B.F., Dantzing A.H., Schuetz E.G., Lan L.B., Yasuda K., Shepard R.L., Winter M.A., Schuetz J.D., Wikel J.H., Wrighton S.A. (2002) Three-dimensional quantitative structure - activity relationships of inhibitors of P - glycoproteine. 61:5 s. 964-973
101. El Masri H.A., Portier C.J. (1998) Physiologically based pharmacokinetics model of primidon and its metabolites phenobarbital and phenylethylmalonamide in humans, rats and mice. Drug Met and Disp 26:6 585-594
102. Endernyi L. (2006) Assessment of bioequivalence for highly variable drugs. Int Reg Workshop BE & Dissolution s. 95-107
103. Engel T.P. (2002) Computer symulation techniques. J Clin Monit 17 s. 3-9
104. Engels M.F.M., Wouters L., Verbeeck R., Vanhoof G. (2002) Outlier mining inhigh troughput screening experiments. J of Biomol Scr 7:4 s. 341-351
105. EMEA, CHMP (2004) Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose. CPMP/SWP/2599/02/Rev 1
106. EMEA, CVMP (1998) Validation: Methodology / 591 / 98 Final s. 1-11
107. EMEA, CVMP (1998) Validation: Definition. / 590 / 98 Final s. 1-6
108. EMEA, CVMP (2000) Conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. / 016-00 Consultation s. 1-11
109. EMEA, CVMP (2000) Guideline for the Conduct of Pharmacokinetic studies in target animal species. / 133-99 Final s.1-7
110. EMEA, CVMP / (2000) Note for Gudiance on Statistical Principles for Veterinary Clinical Trials 816-00 Consultation. s. 1-26
111. Engels M.F.M., Wouters L., Verbeeck R., Vanhoof G. (2002) Outlier mining in high throughput screening experiments. J of Biomol Scr 7:4 s 341-351
112. Engkvist O., Wrede P., Rester U. (2003) Prediction of CNS activity of compound libraries using substructure analysis. J Chem Inf Comput Sci 43:1 s. 155-160
113. Engkvist O., Wrede P. (2002) High -throughput, *in silico* prediction of aqueous solubility based on one- and two - dimensional descriptors. J Chem Inf Comput Sci 42 s. 1247-1249
114. Ensom H.H.M., Davis G.A., Cropp C.D., Ensom R.J. (1998) Clinical Pharmacokinetics in the 21st Century. Clin. Pharm. 34 s. 265-279
115. EPA/600/8-91/011B (1992) Dermal exposure assessment:Principles and applications. Interim report s. 1-389
116. EPA (1993) Reference dose (RfD): Description and the use in health Risk Assesments. Background Document 1 A
117. EPA/600/8-89/043 (1996) Exposure factors hanbook. Draft report. s. 1-712
118. EPA-600-P-00-002B (2002) Child-specific exposure factors handbook. Interim report. s. 1-448
119. EPA/630/R-01/004 (2001) Exploration of perinatal pharmacokinetic issues. Final report. s. 1-267
120. Erb K., Brugger R., Williams K., Geisslinger G. (1999) Stereoselective disposition of tiaprofenic acid enantiomers in rats. Chirality. 11:2 str 103-108.
121 Eriksson T., Bjorkman S., Hoglund P. (2001) Clinical pharmacology of thalidomide. Eur J Clin Pharmacol. 57:5 str 365-376
122. Ertl P., Jacob O. (1997) WWW - based chemical information system. J of Mol Str (Teochem) 419 s. 113-120
123. Espenson J.H. (1981) Chemical kinetics and reaction mechanisms McGraw-Hill, Inc. s. 1-19
124. Estrada E., Uriarte E., Gutierrez Y., Gonzalez H. (2002) Quatntitative structure - toxicity relationships using TOPS-MODE. 3. Structural factors influencing the permeability of commercial solvents through living human skin. SAR and QSAR in Envir Res 14:2 s. 145-163
125. Evans W.E. (2003) Pharmacogenomics: marshalling the human genome to individualise drug therapy. Gut 52 Supp II s. ii10-ii18
126. Faergemann J., Zehender H., Millerioux L. (1994)Levels of terbinafine in plasma, stratum corneum,dermis–epidermis (without stratum corneum),sebum, hair and nails during and after 250 mg terbinafine orally once daily for 7 and 14 days. Clin and Exper Derm 19, s. 121-126
127. Farmakopea Polska (1999) wyd. V tom V PTF s.119-129
128. Farrier D.S. (2000) Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis.
129. FDA, CDER (1997) Extended release oral dosage forms: Development evaluation and application of *in vitro* / *in vivo* correlations. Guidance for industry. s. 3-27
130. FDA, CDER, CBER (1998) Pharmacokinetics in patients with impaired renal function - study design data analysis, and impact on dosing and labeling. Guidance for industry. s. 1-15
131 FDA, CVM (1993) Freedom of Information Summary. NADA 141-036
132. FDA, CDER CBER (1999) Pharmacokinetics in patients with impaired hepatic function - study design data analysis, and impact on dosing and labeling. Guidance for industry. s. 1-156
133. FDA, CDER, CBER (1999) Population pharmacokinetics. Guidance for industry. s. 3-35
134. FDA, CDER (1999) Bioanalytical methods validation for human studies. Shah, 12/14/98Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human.
135. FDA, CDER (2000) Bioequivalence Expanded Companion Document. Div Bioequivalence Task Force. 2/21/97, Poster: N/A

136. FDA, CVM (2000) Guidance for industry, Bioequvivalence guidance, no 10
137. FDA, CDER, CBER (2002) Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Draft Guidance. s. 1-26
138. FDA, CBER (2003) Guidance for industry An acceptable circular of information for the use of human blood and blood companents. s. 11
139. FDA, CDER (2004) Guidance for industry. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. s. 1-13
140. Fejzo J., Lepre C., Xie X. (2003) Application of NMR screening in drug discovery. Curr Top in Med Chem 3 s. 81-89
141. Feng R.M., Lou X., Brown R.R., Hutchaleelaha A. (2000) Allometric pharmacokinetics scaling:Towards the prediction of human oral pharmacokinetics. Pharm Res 17:4 s. 410-418
142. Ferte J. (2000) Analysis of the tanglet relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. Eur J Biochem 267 s. 277-294
143. Fisher J. W., Florian J. A., Parker R. S., Venook A. P., Ratain M. J., Egorin M. J.(2004) Evaluation of potentially excessive plasma gemcitabine (dFdC) concentrations produced by 30-minute dFdC infusions. J of Clin Onc 22:14 s. 2004-2019
144. Forman H.J., Kennedy J. (1977) Effects of chaotropic agents versus detergents on dihydroorotate dehydrogenase. J of Biol Chem 252:10 s. 3379-3381
145. Fox E., Curt G.A., Balis F.M. (2002) Clinical trial design for target - based therapy. The Oncol 7 s. 401-409
146. Fromm M.F. (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS Accumulation of drugs. Int J Clin Pharmacol Ther 38:2 s. 69-74
147. Gabrielsson J., Weiner D. (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics data analysis. 3 ed. Swed Pharm Press s. 3 - 924
148. Galus Z. (1996) Ćwiczenia rachunkowe z chemii analitycznej. PWN s. 344
149. Gandhi M., Aweeka F., Greenblatt R.M, Blaschke T.F. (2004) Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44 s. 499-523
150. Gamache P., Smith R., McCarthy R., Waraska J., Acworth I. (2003) ADME/Tox profiling using coulometric electrochemistryand electrospray ionisation mass spectrometry. Spectroscopy 18:6
151. Ganapathy V., Prasad P.D., Ganapathy M.E., Leibach F.H. (2000) Placental transporters Relevant to drug distribution across the maternal - fetal interface. Persp in Pharm 394:2 s. 413-420
152. Gehan E.A., George S.L. (1970) Estimation of human body surface area from height and weight. Cancer Chemother Rep 54:2 s. 25 - 35
153. Gehring R., Smith G.W. (2006) An overwiew of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to tread bovine mastitis. J Vet Pharm Ther, 29 s. 237-241
154. Gerk P.M., Oo C.Y., Paxton E.W., Moscow J.A., Mcnamara P.J. (2000) Interactions between cimetidine, nitrofurantoine, and probencid active transport into rat milk. J of Pharm and Exp Ther 291:1 s. 175-180
155. Gerk P.M., Vore M. (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance - associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. J Pharm Exp Ther 302 s. 407-415
156. Ghose A.K., Visvanadhan V.N., Wendoloski J.J (1999) A knowledge - based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterisation of known drug databases. J Comb Chem 1 s. 55-68
157. Giaccone G., Pinedo H.M., (1996) Drug resistance. The Oncologist 1 s. 82-87
158. Gibaldi M., Perrier D. (1982) Pharmacokinetics. sec. ed., Marcel Dekker, Inc. s. 45-475
159. Ginsberg G., Hattis D., Sonawane B., Russ A., Banati P., Kozlak M., Smolenski S., Goble R. (2001) Evaluation of child/adult pharmacokinetics differences from database derived from the therapeutic drug literature. Tox Sci 66 s. 185-200
160. Gimenez F., Pennie R.A., Koren G., Crevoisier C., Wainer I.W., Farinotti R. (1994) Stereoselective pharmacokinetics of mefloquine in healthy Caucasians after multiple doses. Pharm Sci 83:6 s. 824-827
161. Girdwood R.H. (1984) Clinical pharmacology. XXV ed. Bailliére Tindall, s. 20-24
162. Godden J.W., Furr J.R., Bajorath J. (2003) Recursive median partitioning for virtual screening of large databases. J Chem InfComput Sci 43 s. 182-188
163. Goh B.C., Lee S.C., Wang L.Z., Fan L.,Guo J.Y., Lamba J., Schuetz E., Lim R., Lim H.L., Ong A.B., Lee H.S. (2002) Explaining interindividual variability of docetaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in asians trough phenotyping and genotyping strategies. J of Clin Onc 20:17 s. 3683-3690
164. Goldman R. (1954) Creatinine excretion in renal failrue. Proc Soc Exp Biol Med 85 s. 446-448
165. Grabowski T., Świtała M. (1999) Minocycline pharmacokinetics in hens. mat. VI Congress of Monitoring Therapy, Wrocław s. 137
166. Grabowski T. (2001) Minocycline pharmacokinetics in hens and turkeys. Zesz Nauk AR we Wrocławiu 418, Wet LXI s. 73-89
167. Grabowski T. (2003) Podstawy obliczeń metodami SAR we wczesnej fazie badań nad nowymi lekami. Prob Ter Monit 14:1 s 35
167. Grabowski T. Jaroszewski J.J. (2008) Bioavailability of veterinary drugs in vivo and in silico. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics - doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.01034.x
168 Graham D.J., Hama K.M, Smith S.A., Kurz L.,Chaplin M.D., Hall D.J. (1987) Disposition of nafimidone in rats. Drug Met and Disp 15:4 s. 565-570

169. Gray G.M. (2004) The precautionary principle in practice comparing US EPA and WHO pesticide risk assesment. Risk in Perp 12:1 s. 1-6
170. Grkovic S., Brown M.H., Skurray R.A. (2002) Regulation of bacterial export systems. Micro and Mol Biol Rev 66:4 s. 671-701
171. Gross A.S., Mikus G., Ratge D., Wisser H., Eichelbaum M. (1997) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of gallopamil. J of Pharm and Exp Ther 281:3 s. 1102-1112
172. Guder W.G. - chairman working group (2002) Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2 s. 1- 62
173. Gund P. (1999) Empirical vs. "rational" methods of discovering new drugs. Pac Symp Biocomp s. 438-443
174. Guyton A.C. (1976) Textbook of medical physiology. 5 th ed. s.251
175. Gysling E., Galeazzi R.L. (1997) Kinetik-Glossar Infomed-Verlags AG Jahrgang 18: 22 Physiol 91 s. 2374-2383
176. Haas N., Lindemann U., Frank K., Sterry W., Lademann J., Katzung W. (2002) Rapid and preferential sebum secretion of ivermectin: a new factor that may determine drug responsiveness in patients with scabies. Arch Dermatol. 38(12) s.1618-1619
177. Hatefi Y., Hanstein W.G. (1969) Solubilisation of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents. Bioch 69 s. 1129-1136
178. Hall S.D., Thummel K.E., Watkins P.B., Lown K.S., Benet L.Z., Paine M.F., Mayo R.R., Turgeon D.K., Bailey D.G., Fontana R.J., Wrighton S.A. (1999) Molecular and physical mechanisms of first - pass extraction. Drug Met and Disp 27:2 s. 161-166
179. Hanqinf W. (1999) Chemical property calculation through JavaScript and applications in QSAR. Molecules 4 s. 16-27
180. Harm D.L., Jennings R.T., Meck J.V., Powell M.R., Putcha L., Sams C.P., Schneider S.M., Shackelford L.C., Smith S.M., Whitson P.A. (2001) Genome and hormones: Gender differences in physiology Invited review: Gender issues related to spaceflight: a NASA perspective. J Appl
181. Harmoinen A. (2001) Evaluation and improvement of clinical chemical laboratory tests for glomerular function. Act Univ Temp 838 s. 1-70
182. Hasegawa H., Matsukawa T., Shinohara Y., Hashimoto T. (2000) Assessment of the metabolic chiral inversion of D-leucine in rat by gas chromatography-mass spectrometry combined with a stable isotope dilution analysis. Drug Metab Dispos. 28:8 str 920-924
183. Hawk C.T., Leary S.L. (1999) Formulary for laboratory animals. sec ed. s. 143
184. Haycock G.B., Schwartz G.J., Wisotsky D.H. (1978) Surface area: A height weight formula validated in infants, children and adults. The Journal of Pediatrics 93:1 s. 62 - 66
185. Hayton W.L. (2000) Maturation and growth of renal function: Dosing renally cleared drugs in children. AAPS PharmSci 2:1 art 3 s. 1-8
186. Hendriksen B.A., Felix M.V.S., Bolger M.B. (2003) The composite solubility versus pH profile and its role in intestinal absorption prediction. AAPS PharmSci 5:1 s. 35-49
187. Herbert M., Bijan B., Karuna J., Maes M. (1997) Fluoxetine, but not Tricyclic Antidepressants, Potentiates the 5-Hydroxytryptophan-Mediated Increase in Plasma Cortisol and Prolactin Secretion in Subjects with Major Depression or with Obsessive Compulsive Disorder. Neuropsychopharm 17 1-1.10.1038/sj.npp.1390327
188. HerknerH., Muller M.R., Kreischitz N., Mayer B.X., Frossard M., Joukhadar C., Klein N., Lackner E., Muller M. (2002) Closed-Chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. Am J Respir Crit Care Med 165 s. 273-276
189. Herskovits T.T., Gadegbeku B., Jaillet H. (1970) On the structrural stability and solvent denaturation of proteins. I Denaturation by alcohols and glycols. J of Biol Chem 245:10 s. 2588-2598
190. Hinderling P.H. (1997) Red blood cells: Neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharm Rev 49:3 s 279-295
191. Hoerter D., Dressman J.B. (2001) Influence of physiochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. Adv Drug Deliv Rev 46 s. 75-87
192. Hofman L.F. (2001) Human saliva as a diagnostic specimen. J Nutr 131:1621S-1625S, s. 1-5
193. Hoffman E., Charette J., Stroobant V. (1998) Spektrometria mas. WNT s. 5-316
194. Hoffmeyer S., Burk O., Richter von O., Arnold H.P., Brockmoller J., Johne A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P - glycoprotein expression and activity *in vivo*. PNAS 97:7 s. 3473-3478
195. Holliday J.D., Salim N., Whittle M., Willett P. (2003) Analysis and displays of the size dependence of chemical similarity coefficients. J Chem Comput Sci 43 s. 819-828
196. Horie T., Mizuma T., Kasai S., Awazu S. (1988) Confirmational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. Am J Physiol 254 s. 465-470
197. Hu T.M., Hayton W.L. (2001) Allometric scaling of xenobiotic clearance: uncertainty versus universality. AAPS Pharm Sci 3:4 art 29 s. 1-14

198. Hussain M.M., Mahley R.W., Boyles J.K., Lindquis P.A., Brecht W.J., Innerarity T.L. (1989) Chylomicron metabolism. J of Biol Chem 264:30 s. 17931-17938
199. Hussein Z., Mulford D.J., Bopp B.A., Granneman G.R. (1993) Differences in the stereoselective pharmacokinetics of pazinaclon (DN-2327), a new anxiolytic, and its active metabolite after intravenous and oral single doses to dogs. Drug Metab Disp 21 s. 805 - 810
200. ICH (1994) Note for guidance on toxicokinetics: The assessment of systemic exposure in toxicity studies. s. 1-14
201. ICH (1997) Testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. s. 1-7
202. ICH (1998) Ethnic factors in the acceptabilityof foreign clinical data. s. 1-17
203. ICH (2005) Routes of administration controlled vocabulary. s. 1-13
204. Ichichashi T., Kinoshita H., Yamada H. (1991) Absorption and disposition of epithiosteroids in rats (2): Avoidance of first pass metabolism of mepitiostane by lymphatic absorption. Xenob 21:7 s. 873-880
205. Ichichashi T., Kinoshita H., Takagishi Y., Yamada H. (1992) Effect of bile on absorption of mepitiostane by the lymphatic system in rats. J Pharm Pharmacol 44:7 s. 565-569
206. Ihmsen H., Geisslinger G., Schuttler J. (2001) Stereoselective pharmacokinetics of ketamine: R(-)-ketamine inhibits the elimination of S(+)-ketamine. Clin Pharmacol Ther 70:5 s. 431-438
207. Imai T., Nomura T., Aso M., Otagiri M. (2003) Enantiospecific disposition of pranoprofen in beagle dogs and rats. Chirality. 15:4 str 312-317
208. Irvine J.D., Takahashi L., Lockhart K. (1999) MDCK (Martin - Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. J Pharm Sci 88 s. 28-33
209. Israili Z.H., Dayton P.G. (2001) Human alpha-1-glycoproteinand its interactions with drugs. Drug Metab Rev 33:2 s. 161-235
210. Ito K., Iwatsubo T., Kanamitsu S., Ueda K., Suzuki H., Sugiyama Y. (1998) Prediction of pharmacokinetics alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver.Pharm Rev 50:3 s. 387-410
211. Itoh T., Watanabe N., Ishida M., Tsuda Y., Koyano S., Tsunoi T., Shimada H., Yamada H. (1998) Stereoselective disposition of sulbenicillin in humans. Ant Agents and Chem 42:2 s. 325 - 331
212. Iwatsubo T., Suzuki H., Sugiyama Y. (1997) Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the *in vivo* metabolic clearance of YM 796 by the liver from *in vitro* data. J of Pharm and Exp Ther 283:2 s. 462-469
213. Iwatsubo T., Hirota N., Ooie T., Suzuki H., Shimada N., Chiba K., Ishizaki T., Green C.E., Tyson C.A., Sugiyama Y. (1997) Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. Pharm Ther 73 s. 147-171
214. Jacoby E., Davies J., Blommers M.J.J. (2003) Design of small molecule libraries for NMR screening and other applications in drug discovery. Curr Top in Med Chem 3 s. 11-23
215. Jain R.K. (1999) Understanding barriers to drug delivery: High Resolution *in vivo* imaging is key. Clin Canc Res 5 s. 1605-1606
216. Janiec W., Krupińska J. (1995) Farmakodynamika. wyd. III PZWL.
217. Jang G.R., Harris R.Z., Lau D.T. (2001) Pharmacokinetics and its role in small molecule drug discovery research. Med Res Rev 21:5 s. 382-396
218. Janicki S., Fiebig A. (1996) Farmacja stosowana. Wyd. II PZWL s. 185-189
219. Janicki S., Sznitowska M., Zieliński W. (2001) Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków. Ośrodek Informacji Naukowej "POLFA" s. 5-256
220. Jelliffe R. (2002) Estimation of creatinine clearance in patients with unstable renal function, without a urine speciment. LAPK s. 1-12
221. JeltschM., Tammela T., Alitalo K. (2003) Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. Cell Tissue Res 314 s. 69-84
222. Johnson E., Attman P.O., Samuelsson O., Haraldsson B. (1999) Improved clearance of iohexol with longer haemodialysis despite similar Kt/V for urea. Nephr. Dial Transplant 14:2407-2412
223. Johnson K.C., Swindell A.C. (1996) Guidance in the setting of drug particle size specifications minimize variability in absorption. Pharm Res 13:12 s. 1795-1798
224. Jones S.R., Carley S., Harrison M. (2003) An introduction to power and sample size determination. Emerg Med J 20, s 453-458
225. Jorgensen W.L., Duffy E.M. (1994) Prediction of drug solubility from Monte Carlo Simulations. J Pharm Sci 83 s. 948-951
226. Joukhadar C., Derendorf H., Muller M. (2001) Microdialysis A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. Eur J Clin Pharmacol 57 s. 211-219
227. Kamieński B. (1980) Chemia fizyczna. Wyd. IV s. 776 - 890
228. Kari F.W., Weaver R., Neville M.C. (1996) Active transport of nitrofurantoin across the mammary epithelium *in vivo*. J of Pharm and Exp Ther 280:2 s. 664-668
229. Kariv I., Rourick R.A., Kassel D.B., Chung D.Y. (2002) Improvement of "Hit -to-lead" optimization by integration of *in vitro* HTS experimental modelsfor early determination of pharmacokinetics properties. Comb Chem & High Throug Screen 5 s. 459-472
230. Karalis V., Claret L., Iliadis A., Macheras P. (2001) Fractal volume of drug distribution: It scales proportionally to body mass. Pharm Res 18:7 s. 1056-1060

231. Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennernas H., Hussain A.S., Junginger H.E., Stavchansky S.A., Midha K.K., Shah V.P., Amidon G.L. (2003) Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical clasification. Mol Pharm 1:1 s. 85-96
232. Kaufman E., Lamster I.B. (2002) The diagnostic applications of saliva - a review. Crit Rev Oral Biol Med 13(2) s. 197-212
233. Kauffman A.J., Pierre N.R. (2001) The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. J Dairy Sci Oct. 84:10 s. 2284-2294
234. Khoo S.M., Shackleford D.M., Porter C.J.H., Edwards G.A., Charman W.N. (2003) Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs. Pharm Res 20:9 s. 1460-1465
235. Kielhorn J., Melching-Kollmus S., Mangelsdorf I. (2005) Dermal absorption. Fraunhofer Institute Toxicology and Experimental Medicine, Hannover Germany. s. 1-137
236. Kier L.B., Hall L.M., Hall L.H. (2002) QSAR modeling of drug binding to protein b lactam serum binding and albumin binding affinity. MDL Discovery Predictive Science s. 1-24
237. Kingdon E.J., Knight C.J., Dustan K., Irwin A.G., Thomas M., Powis S.H., Burns A., Hilson A.J.W., Black C.M. (2003) Calculated glomerular filtration rate is a useful screening tool to identify sclerodrma patients with renal impairment. Rheumat 42 s. 26-33
238. Klopman G., Shi L.M., Ramu A. (1997) Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. Mol Pharm 52 s. 323-334
239. Kocjan R. (2000) Chemia analityczna T. II Analiza instrumentalna. PZWL Wyd. I s. 349-450
240. Koevary S.B. (2003) Pharmacokinetics of topical ocular drug delivery: potential uses for the treatment of diseases of the posterior segment and beyond. Curr Drug Metab 4:3 s. 213-222
241. Kohek M.B.F., Leme C.R.M., Nakamura I.T., Oliveira S.A., Lando V., Mendonca B.B. (2002) Effect on EDTA and sodium citrate on hormon measurements by fuorometric (FIA) and immunofluorometric (IFMA) methods. BMC Clin Pharm 2:2 s. 1-4
242. Koren G. (1997) Therapeutic drug monitoring principles in the neonate. Clin Chemistry 43:1 s. 222-227
243. Kouno T., Katsumata N., Mukai H., Ando M., Watanabe T. (2003) Standarization of the body surface area (BSA) formula to calculate the dose of anticancer agents in Japan. Jpn J Clin Oncol 33:6 s. 309-313
244. Kramer S.D., Wunderli-Allespach H. (2001) Physicochemical properties in pharmacokinetics lead optimization. IL Farmaco 56 s. 145-148
245. Kratochwil N.A., Huber W., Muller F., Kansy M., Gerber P.R. (2002) Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharm 64 s. 1355-1374
246. Kristensen K., Blemmer T., Angelo H.R., Christrup L.L., Drenck N.E., Rasmussen S.N., Sjogren P. (1996) Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients. Ther Drug Monit 18:3 s. 221-227
247. Krysicki W., Włodarski L. (1991) Analiza matematyczna w zadaniach. PWN wyd. XVII s. 378-385
248. Krzek J. (2002) Sympozjum LEK. Problemy analityczne w ocenie czystości i farmakokinetyki leku. s. 8-116
249. Kubinyi H. (1998) Combinatorial and computational approaches in structure - based drug design. Curr Op in Drug Disc and Dev 1:1 s. 16-27
250. Kubinyi H. (1999) Chance favors the prepared mind - from serendipity to rational drug design. J of Rec and Sig Trans Res 19:1-4 s. 15-39
251. Kuemmerle H.P. (1976) Farmakologia kliniczna i farmakoterapia. PZWL. s. 5-74
252. Lai C.K., Lee T., Au K.M., Chan A.Y.W. (1989) Uniform solid phase extraction procedurefor toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode - array detection. Clin Chem 43:2, s. 312-325
253. Lambert H.P., O'Grady F.W. (1994) Antybiotyki i chemioterapia. Wydawnictwo Medyczne, s.286-300; 318; 382; 466; 499
254. Lan L., Dalton J.T., Schuetz E.G. (2000) Mdr1 limits CYP3A4 metabolism *in vivo*. Mol Pharm 58:10 s 863-869
255. Landro J.A., Taylor I.C.A., Stirtan W.G., Osterman D.G., Kristie J., Hunnicutt E.J., Rae P.M.M., Sweetnam P.M. (2000) HTS in the new millennium the role of pharmacology and flexiblity. J of Pharm and Tox Meth 44 s. 273-289
256. Langendonk J.G., Pijl H., Toornvliet C., Burggraaf J., Froelich M., Schoemaker R.C., Doornbos J., Cohen A.F., Meinders A.E. (1998) Circadian rhythm of plasma leptin levels in upper and lower body obese women: Influence of body fat distribution and weight loss. J Clin Endocrinol Metab 83 s. 1706-1998
257. Laterza O.F., Price C.P., Scott M.G. (2002) Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate ? Clin Chem 48:5 s. 699-707
258. Lauterburg B.H. (2002) Grundlagen der Pharmakotherapie. Institut für Klinische Pharmakologie, Universität Bern s. 1-16
259. Laurence D.R., Bennet P.N. (1980) Clinical pharmacology. V ed. Churchil Livingstone, s. 242-247
260. Law A.M., McComas M.G. (2001) How to build valid and credible simulation models. Proc. of the 2001 Winter Simulation Conference s. 22-29
261. Lee F.Y.F., Coe P., Workman P. (1986) Pharmacokinetic basis for the comparative antitumour activity and toxicity of chlorambucil, phenylacetic acid mustard and ,-difluorochlorambucil (CB 7103) in mice. Can Chem and Pharm 17:1 s. 21-29

262. Lees P., Taylor P.M., Landoni F.M., Arifah A.K., Waters C. (2003) Ketoprofen in the cat: pharmacodynamics and chiral pharmacokinetics. Vet J. 165:1 str 3-4
263. Le Floch J.P., Escuyer P., Baudin E., Baudon D., Perlemuter L. (1990) Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. Diabetes Care. 13:2 s.172-175.
264. Lemmer B. (1991) Circadian rhythms and drug delivery. J of Controlled Release 16 s. 63-74
265. Lemmer B., Bruguerolle B. (1994) Chronopharmacokinetics. Are they clinically revelant. 26:6 s. 419-427
266. Lemmer B. (1999) Chronopharmacokinetics - Implications in drug treatment. 51:8 s. 887-890
267. Lemmer B., Nold G. (1991) Circadian changes in estimated hepatic blood flow in healthy subjects. Br J Clin Pharmac 32 s. 627-629
268. Leon A.C. (2004) Sample -size requirements for comparisions of two groups of repeated observations of a binary outcome. Eval Hel Prof 27:1, s 34-44
269. Lieberman R., Crowell J.A., Hawk E.T., Boone C.W., Sigman C.C., Kelloff G.J. (1998) Development of new cancer chemoprevention agents: role of pharmacokinetics / pharmacodynamics and intermediate endpoint biomarker monitoring. Clin Chem 44:2 s. 420-427
270. Lima J.J., Boudoulas H., Shields B.J. (1985) Stereoselective pharmacokinetics of disopyramide enantiomers in man. Drug Metab Dispos 13:5 s. 572-577
271. Lin J.H., Chiba M., Baillie T.A. (1999) Is the role of the small intestine in first - pass metabolism overemphasized ? Pharm Rev 51:2 s. 135-157
272. Lin J.H., Yamazaki M. (2003) Role of P - glycoprotein in pharmacokinetics. Clinical implications. Clin Pharm 42:1, s. 59-98
273. Linnet K. (1999) Necessary sample size for method comparison studies based on regrssion analysis. Clin Chem 45:6, s 882-894
274. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv Drug Del Rev 23 s. 3-25
275. Lipinski C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. J of Pharm and Tox Met 44 s. 235-249
276. Lipinski C.A. (2001) The design of drug-like properties. Lipinski ACD European Workshop s. 1-26
277. Lipinski C.A. (2002) Single-Mode compound retrieval for QSAR, QSPR data sets, and batch mode exact structure searching. J of Pharm Sci 91:12 s. 2470-2472
278. Liu W., Liu Q.F., Perkins R., Drusano G., Louie A., Madu A., Mian U., Mayers M., Miller M.H. (1998) Pharmacokinetics of sparfloxacin in the serum and vitreus humor of rabbits: Physiochemical properties that regulate penetration of quinolone antimicrobials. Ant Ag and Chem 42:6 s. 1417-1423
279. Liu J.P., Chow S.C. (2000) Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies. II ed. Marcel Dekker, Inc. s. 1-535
280. Livingstone E.H., Lee S. (2001) Body surface area prediction in normal weight and obesepatients. Am J Phys Endo Metab 281:E s. 586-591
281. Liu X., Tu M., Kelly R.S., Chen C.,Smith B.J. (2004) Development of computational approach to predict blood brain barrier permeability. Drug Metab and Disp 32 s. 132-139
282. Li Y., Zhao X., Ji Q., Xu J., Sun R. (2004) A nomogram for prediction of absorption rate coefficient. Chin Med J 117:5 s. 689-694
283. Lohr J.W., Willsky G.R., Acara M.A. (1998) Renal drug metabolism. Pharm Rev 50:1 s. 107-141
284. Lombardo F., Obach R.S., Shalaeva M.Y., Gao F. (2002) Prediction of volume distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding. J Med Chem 45:13 s 2867-2876
285. Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F., Abraham M.H. (2000) ELogPoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. J Med Chem 43:15 s. 2922-2928
286. Lombardo F., Shalaeva M.Y., Tupper K.A., Gao F. (2001) ELogDoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2 Basic and neutral compounds. J Med Chem 44:15 s. 2490-2497
287. Loscher W., Potschka H. (2005) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding casette gene family. NeuroRx 2 s. 86-98
288. Lugo S.I., Liang Z., Eddington N.D. (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mivacurium stereoisomers in beagle dogs using twitch height and train-of-four response. Biopharm Drug Dispos 19:8 s. 485-491
289. Mahmood I. (1998) Interspecies scaling of renally secreted drugs. Life Sci 63:26 s. 2365- 2371
290. Mahmood I. (1999) Prediction of clearance, volume of distribution and half-life by allometric scaling and by use of plasma concentrations predicted from pharmacokinetics constants: a comparative Study. J. Pharm. Pharmacol. 51 s. 905-910
291. Mahmood I.,Martinez M.,Hunter R.P. (2006) Interspecies allometric scaling: Part I:prediction of clearance in large animals. I Vet Pharmacol Therap 29 s. 415-423
292. Marier J.F., Pichette V., Souich P. (1997) Stereoselective disposition of propranolol in rabbits. Role of persystemic organs and dose. Drug Met and Disp 26:2 s. 164-169

293. Martinez M.N., Amidon G.L. (2002) A mechanistic approach to underestanding the factors affecting drug absorption: A reviev fundamentals. J of Clin Pharm 42 s. 620-643
294. Martinez M., Mahmood I., Hunter R.P. (2006) Interspecies allometrical scaling: prediction of clearance in large animal species: Part II: mathematical considerations. I Vet Pharmacol Therap 29 s. 425-432
295. Masubuchi N., Yamazaki H., Tanaka M. (1998) Stereoselective chiral inversion of pantoprazole enantiomers after separate doses to rats. Chirality. 10:8 str 747-753
296. Mayersohn M., Hamilton R. (1993) Relationship between the terminal disposition half-life and mean residence time in multicompartment models. Drug Metab Dispos 21:6 s. 1172-1173
297. Mc Namara P.J., Alcorn J. (2002) Protein binding predictions in infants. AAPS PharmSci 4 s. 1-7
298. MealeY K.L., Barhoumi R., Burghard R.C., Safe S., Kochevar D.T. (2002) Doxycycline induces expression of P glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. Antimicrob Ag and Chem 46:3 s. 755-761
299. Mehavr R., Brocks D.R. (2001) Stereospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta adrenergic blockers in humans. J Pharm and Pharmaceut Sci 4:(2) s. 185-200
300. Meibohm B., Beierle I., Derendorf H. (2002) How important are gender differences in pharmacokinetics ? Clin Pharm 41:5 s. 329-342
301. Meibohm B., Derendorf H. (2002) Pharmacokinetics / pharmacodynamics studies in drug product development. J of Pharm Sci 91:1 s. 18-31
302. Meszáros J. (1994) Elementy farmakokinetyki. w Farmakologia. Kostowski W., Kubikowski P. wyd. IV PZWL, s. 49-73
303. Miller R. (2000) Population pharmacokinetics. Parke - Davis Pharmaceutical Research s. 1-9
304. Mishima S. (1981) Clinical pharmacokinetics of eye. Invest Ophthalm Vis Sci 21 s. 504-541
305. Mitragotri S. (2003) Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. J of Contr Rel 86 s. 69-92
306. Modi N.B., Lam A., Lindemulder E., Wang B., Gupta S.K. (2000) Application of *in vitro - in vivo* correlations (IVIVC) in setting formulation release specifications. Biopharm Drug Disp 21 s. 321- 326
307. MollnesT.E., Brekke O.L., Fung M., Fure H., Christiansen D., Bergeseth G., Videm V., Lappegard K.T., Kohl J., Lambris J.D. (2002) Essential role of the C5a receptor in *E. coli*- induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin- based human whole blood model of inflamation. Blood 100:5 s. 1869 - 1877
308. Morisette S.L.,Almarsson O., Peterson M.L., Remenar J.F., Read M.J., Lemmo A.V., Ellis S., Cima M.J., Gardner C.R. (2004) High-troughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. Adv Dr Del Rev 56, s. 275-300
309. Moriyama Y. (1996) Membrane energization by proton pumps is important for compartmentalization of drugs and toxins: A new type of active transport. J of Exp Biol 199 s. 1447-1454
310. Morlet N., Graham G.G., Gatus B., McLachan A.J., Salonikas C., Naidoo D., Goldberg I., Lam C.M. (2000) Pharmacokinetics of ciprofloksacin in the human eye:a clinical study and population pharmacokinetics analysis. Ant Ag and Chem 44:6 s. 1674-1679
311. Morris M.E., Lee H.J., Predko L.M. (2003) Gender differences in the membrane transport of endogenous and exogenous substances. Pharm Rev 55:2 s. 229-240
312. Morrison T.R., Boyd R.N. (1985) Chemia organiczna. tom I PWN s. 45-49
313. Mosteller R.D. (1987) Simplified Calculation of Body Surface Area. N Engl J Med 317 :17 s. 1098
314. Motulsky H., Christopoulos A. (2003) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software, Inc. s. 1-350
315. Müller R.H., Hildebrand G.E. (1998) Technologia nowoczesnych postaci leków. wyd. I PZWL, s. 18-86; 151-203; 291-317
316. Murakami H., Takanaga H., Matsuo H., Ohtani H., Savada Y. (2000) Comparision of blood brain barrier permeability in mice and rats using in situ perfusion technique. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279 s. 1022 - 1028
317. Murray R.K., Granner K.D., Mayes P.A., Rodwell V.W. (1994) Harper's biochemistry. XXII ed. Prentice-Hall International Inc. s. 734-770
318. Nagayama H. (1999) Influences of biological rhythms on the effects of psychotropic drugs. Psychosomatic Med 61 s. 618-629
319. Nakashima E., Benet L.Z. (1988) General treatment of mean residence time, clearance, and volume parameters in linear mammillary models with elimination from any compartment. J of Pharm and Bioph 16:5 s.475-492
320. Naritomi Y., Terashita S., Kimura S., Suzuki A., Kagayama A., Sugiyama Y. (2001) Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. Drug Met and Disp 29:10 s. 1316-1324
321. Nebbia C., Ceppa L., Dacasto M., Nachtmann C., Carletti M. (2001) Oxidative monensin metabolismand cytochrome P450 3A content and functions in liver microsomes from horses, pigs, broiler chicks, cattle and rats. I Vet Pharm Ther 24 s. 399-403
322. Nevill A.M., Holder R.L. (1995) Body mass index: a measure of fatness or leanness? British J Nutr 73:4 s. 507-16
323. Niesink R.J.M., Vries J., Holinger M.A. (1996) Toxicology principles and applications. CRC Press, s. 137-183
324. Notari R.E. (1978) Wstęp do biofarmacji i farmakokinetyki. wyd. II Warszawa PZWL, s. 15-305

325. Notari R.E. (1973) Pharmacokinetics and molecular modification: implications in drug design and evaluation. J. Pharm. Sci. 62 s. 865-881
326. Nouws J.F.M. (1992) Pharmacokinetics in immature animals: A review. J Anim Sci 70 s. 3627-3634
327. Obach R.S. (1999) Prediction of human clearance of twenty nine drugs from hepatic microsomal clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecyfic binding to microsomes. Drug Met and Disp 27:11 s. 1350-1359
328. Obach R.S., Baxter J.G., Liston T.E., Silber B.M., Jones B.C., Macintyre F., Rance D.J., Wastall P. (1997) The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters from Preclinical and *in vitro* Metabolism Data. The J of Pharm and Exp Therap 283 s. 46-58
329. Oelkers R., Ionac M., Erb K., Brune K., Geisslinger G. (1996) Transfer of different nonsteroidal antiinflammatory drugs via the lymphatic system in the rat. Drug Metab and Disp 24:10 s. 1107-1110
330. Opera T.I., Davis A.M., Teague S.J., Leeson P.D. (2001) Is there a difference between leads and drugs ? A historical perspective. J Chem Inf Comp 41, s. 1308-1315
331. Opera T.I. (2002) Virtual screening in lead discovery: A vievpoint. Molec 7 s. 51-62
332. Orzechowska-Juzwenko K. Podstawy Farmakokinetyki Klinicznej. wyd. II Akademia Medyczna we Wrocławiu, s. 9-110
333. Palm K., Luthman K., Ros J., Grasjo J., Artursson P. (1999) Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH -dependent transport of cationic drugs. J of Pharm and Exp Ther 291:2 s. 435-443
334. Panetta J.C., Iacono L.C., Adamson P.C., Stewart C.F. (2003) The importance of pharmacokinetics limited sampling models for childchood cancer drug development. Clin Canc. Res. 9 s. 5068-5077
335. Pang K.S. (2003) Modeling of intestinal drug absorption: Roles of transporters and metabolic enzymes (for the gillette review series) Drug met and Disp 31:12 s. 1507-1519
336. Parker R.S., Doyle F.J. III (2001) Control - relevant modeling in drug discovery. Adv Drug Del Rev 48 s. 211-228
337. Pauli-Magnus C.,Richter O., Burk O., Ziegler A.,Mettang T.,Eichelbaum M.,Fromm M.F. (2000) Characterisation of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. J of Pharm and Exp Ther 293:2 s. 376-382
338. Pawelski S., Maj S. (1987) Normy i kliniczna interpretacja badań diagnostycznych w medycynie wewnętrznej. wyd IV PZWL s. 17-208, 579-599
339. Pechstein B., Cawello W. (2002) Collection of terms, symbols, equatations, and explanations of common pharmacokinetics and pharmacodynamics parameters and some statistical functions. AGAH Working group PK-PD modeling. s. 3-22
340. Pelkonen O., Boobis A.R., Gundert-Remy U. (2001) In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability. Eur J Clin Pharmacol 57:9 s. 621-629
341. Peng G.W., Chiov W.L. (1990) Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetics studies J.Chromat. Biomed. Appl. 51 s. 3-50
342. Peris-Ribera J.E., Torres-Molina F., Garcia-Carbonell M.C., Aristorena J.C., Granero L. (1992) General treatment of the enterohepatic recirculation of drugs and its influence on the area under the plasma level curves, bioavailability, and clearance. Pharm Res 9:10, s. 1306-1313
343. Perret C., Lenfant B., Weinling B., Wessels D.H., Scholtz H.E., Montay G., Sultan E. (2002) Pharmacokinetics and absolute oral bioavailability of an 800 mg oral dose of telitromycin in healthy young and elderly volunteers. Chemoth 48 s. 217-223
344. Peters A.M., Gordon I., Sixt R. (1994) Normalization of glomerular filtration rate in children: body surface area, body weight or extracellular fluid volume. J Nucl Med 35:3 s. 438-44
345. Pfeifer S. (1983) Drugs and the organism (IV). Prodrugs a means of drug optimization. Pharmazie 38:10 s. 663-666
346. Pigoń K. Ruziewicz Z. (1976) Chemia fizyczna. cz. II Politechnika Wrocławska s. 186-261
347. Pirot F., Kalia Y.N., Stinchcomb A.L., Keating G., Bunge A., Guy R.H. (1997) Characterization of the permeability barrier of human skin *in vivo*. Pharmacology 94 s. 1562-1567
348. Pohl P., Szpunar J. (2001) Techniki sprzężone w analizie specjacyjnej. cz. II s. 10
349. Ponce Y.M., Perez M.A.C., Zaldivar V.R., Ofori E., Montero L.A. (2003) Total and local quadratic indices of the "Molecular pseudograph's atom adjacency matrix". Application to prediction of Caco-2 permeability of drugs. Int J Mol Sci 4 s. 512-536
350. Porter. C.J.H. (2001) Intestinal lymphatic drug transport: an update. Adv Drug Del Rev 50 s. 61-80
351. Posyniak A. (1998) Wykrywanie i oznaczanie pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego metodą chromatografii cieczowej. PIWet Puławy s. 3-116
352. Poulin P., Theil F.P. (2002) Prediction of pharmacokinetics prior to *in vivo* studies. II Generic physiologically based pharmacokinetics models of drug disposition. J of Pharm Sci 91 s. 1358-1370
353. Prescott J.F., Baggot J.D. (1988) Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Blackwell Scientific Publications, s. 214-228
354. Proost J.H., Roggeveld J., Wierda J.M.K.H., Meijer D.K.F. (1997) Relationship between chemical structure and pchysiochemical properties of series of bulky organic cations and their hepatic uptake and biliary excretion rates. J of Pharm and Exp Ther 282:2 s. 715-726

355. Pryimenko N., Garnier F., Ferre J.P., Delatour P., Toutain P.L. (1998) Enantioselectivity of the enterohepatic recycling of carprofen in the dog. Drug Met and Disp 26:2 s. 170-176
356. Purves R.D. (1992) Optimum numerical integration methods for estimation of area under the curve (AUC) and area under the moment curve (AUMC). J of Pharm and Biopharm 20:3 211-226
357. Quan Z., Tong-Wei Y., Su Z. (2002) Effects of stereochemical aspects on drug interactions in pharmacokinetics. Acta Pharmacol Sin 23:5 s. 385-392
358. Rapoport S.I. (1992) Drug delivery to the brain: Barrier modification and drug modification methodologies. W, Bioavailability of drugs to the brain and blood - brain barrier. U.S. Department of Health and human services. S.121-137
359. Raub T.J. (2003) Early preclinical evaluation in support of hit identification and lead optimisation for brain exposure. AAPS Workshop ppt. slides
360. Reed M.D. (1999) Optimal sampling theory: An Overviev of its application to pharmacokinetics studies in infants and children. Ped. 104 s. 627-632
361. Reist M., Roy-de Vos M., Montseny J.P., Mayer J.M., Carrupt P.A., Berger Y., Testa B. (2000) Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: a pharmacokinetic and mechanistic investigation. Drug Metab Dispos. 28:12 str 1405-1410
362. Renxiao W., Ying G., Luhua L. (2000) Calculating partition coefficient by atom additive method. Persp in Drug Disc and Des 19: s. 47-66
363. Rettie A.E., Boberg M., Rettenmeier A.W., Baillie T.A. (1988) Cytochrome P-450 catalyzed desturation of valproic acid in vitro. J of Biol Chem 263:27 s. 13733-13738
364. Rioux P.P. (2000) Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: Methods and applications. Am I Health Syst Pharm 57:1 s. 887-898
365. Riviere J.E. (1999) Comparative Pharmacokinetics Principles, Techniques, and Applications. Iowa State University Press /AMES s. 11-308
366. Roberts M.S., Magnusson B.M., Burczynski F.J., Weiss M. (2002) Enterohepatic circulation physiological, pharmacokinetics and clinical implications. Clin Pharm 41:10 s. 751-790
367. Roda A., Minutello A., Angellotti M.A., Fini A. (1990) Bile acid structure - activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1 - octanol / water partition coefficient and reverse phase HPLC. J of Lip Res 31 s. 1433-1443
368. Rodriguez. I., Abernethy D.R., Woosley R.I. (1999) P-glycoprotein in clinical cardiology. Ciculation 99 s. 472-474
369. Rowland M., Tozer T.N. (1989) Clinical pharmacokinetics concepts and applications. II ed.Lea & Febiger s. 1-525
370. Roy A., Georgopoulos P.G. (1997) Mechanistic modeling of transport and metabolism in physiological systems. Technical Report CCL/EDMAS-02 Computational Chemodynamics Laboratory Environmental and Occupational health Sciences Institute (EOHSI) s. 1-125
371. Rubinger D., Krause I., Alcoby-Gibbs M., Popovtzer M.M. (1991) A simple test of intestinal absorption of calcium in rats. Nephron.57:2 s. 206-9.
372. Rugiu - Santoni E., Silverman J.A. (1997) Functional characterization of the rat mdr1b encoded P- glycoprotein: not all inducing agents are substrates. Carcinogenesis 18:11 s. 2255-2263
373. Rutland M. (2003) Database deconvolution. Nucl Med Comm 24:1 s 101-106
374. Sachs J.N., Woolf T.B. (2003) Underestanding the Hofmeister effect in interactions between chaotropic anions and lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. J Am Chem Soc 125 s. 8742-8743
375. Sadagopan N.,Li W., Cook J.,Nieto B., Ashton B., Weller D., Fountain S., (2001) Effect of anticoagulant in plasma matrices on discovery bioanalitycal LC-MS/MS assays. 49 th ASMS Conference of Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, May 27-31 2001
376. Saier M.H. (2000) A functional - phylogeneticlassification system for transmembrane solute transporters.Microb and Mol Biol Rev 64:2 s. 354-411
377. Salvi A., Carrupt P.A., Mayer J.M., Testa B. (1997) Esteraze-like activity of human serum albumin toward prodrug esters of nicotinic acids. Drug Met and Disp 25:4 s. 395-398
378. Salvi G., Rios P.D.L., Vendruscolo M. (2005) Effective interactions between chaotropic agents and proteins. Prot 61, s. 492-499
379. San Martin M.F., Soraci A., Fogel F., Tapia O., Islas S. (2002) Chiral inversion of (R)-(-)-fenoprofen in guinea-pigs pretreated with clofibrate. Vet Res Commun. 26:4 str 323-332
380. Sarapa N. (2003) Early human microdosing to reduce attrition in clinical drug development. Am Pharm Outs.
381. Sawada G.A., Barsuhn C.L., Lutzke B.S., Houghton M.E., Padbury G.E., Ho N.F.H., Raub T.J. (1999) Increased lipophilicity and subsequent cell partitioning decrease passive transcellular diffusion of novel, higly lipophilic antioxidants. J of Pharm and Exp Therap 288:3 s. 1317-1326
382. Schäfer-Korting M. (2002) Pharmakokinetik / pharmakodynamik. FU Berlin Pharmakologie s. 1-89
383. Scheuplein R., Charnley G., Dourson M. (2002) Differential sensitivity of children and adults tochemical toxicity. Reg Tox and Pharm 35 s. 429-447
384. Schneider K. (2000) Biologische Grundlagen für Sicherheits- / Extrapolationsfaktoren. Forschungs und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH, FoBiG, Freiburg s. 1-26
385. Schoenwald R.D. (2002) Pharmacokinetics in drug discovery and development. CRC PRESS s. 3-426

386. Sefer S., Degoricija V. (2003) About drug dialyzability. Acta Croat Clin 42 s. 257-267
387. Selassie C.D. (2003) History of quantitative structure activity relationship. John Wiley& Sons, Inc. s. 1-48
388. Seńczuk W. (1999) Toksykologia PZWL wyd. III s. 30- 168
389. Shargel L., Wu - Pong S., YU A.B.C. (2004) Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics 5 ed. McGraw-Hill s.17-892
390. Sheiner L.B., Steimer J.L. (2000) Pharmacokinetics / pharmacodynamic modeling in drug development. Annu Rev Pharm Toxicol 40 s. 67-95
391. Shibata Y., Takahashi H., Ishii Y. (2000) A convenient *in vitro* screening method for predicting *in vivo* drug metabolic clearance using isolated hepatocytes suspended in serum. Drug Metab and Disp 28:12 s. 1518-1523
392. Siebert G.A., Hung D.Y., Chang P., Roberts M.S. (2003) Ion-trapping, microsomal binding, and unbound drug distribution in the hepatic retention of basic drugs. J of Pharm and Exp Ther 308:1 s. 228-235
393. Siersbaek-Nielsen K., Moholm Hansen J., Kampmann J., Kristensen M. (1971) Rapid evaluation of creatinine clearance. Lanc. i s 1133-1136
394. Skalova L., Szotakova B., Lamka J., Kral R., Vankova I., Baliharova V., Wsol V. (2001) Biotransformation of flobufen enantiomers in ruminant hepatocytes and subcellular fractions. Chirality. 13:10 str 760-764
395. Słomski P., Słomski P. (1996) Podręczny słownik medyczny angielsko - polski i polsko - angielski. wyd I PZWL s. 11-1083
396. Smet R., Kaer J., Liebich H., Lesaffer G., Verstraete A., Dhondt A., Duym P., Lameire N., Vanholder R. (2001) Heparin - induced releaseof protein - boundsolutes during hemodialysis is an *in vitro* artifact.Clin Chem 47:5 s. 901-909
397. Smit J.W., Huisman M.T., Tellingen O., Wiltshire H.R., Schinkel A.H. (1999) Absence or pharmacological blocking of placental P - glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. J Clin Invest 104 s. 1441-1447
398. Sobol E., Bialer M. (2004) Mathematical Comparison Between Volume of Distribution (V) and Volume of Distribution at Steady-State (Vss) Utilizing Model-Independent Approach Bioph & Drug Disp 25 s. 99-101
399. Satoshi Sobue, Kaneo Sekiguchi, Toshitaka Nabeshima (2002) Intracutaneous Distributions of Fluconazole, Itraconazole, and Griseofulvin in Guinea Pigs and Binding to Human Stratum Corneum. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 48:1 s. 216–223
400. Spangler S.K., Lin G., Jacobs M.R., Appelbaum P.C. (1997) PAE of sanfetrinem compared with those of six other agents against 12 penicillin susceptible and resistant Pneumococci. Antimicrob. Agents and Chemotherapy 41:10 s. 2173 - 2176
401. Sparr E., Wennerstorm H. (2001) Responding phospholipid membranes - interplay between hydratation and permeability. Biophys J 81 s. 1014-1028223.
402. Sparreboom A., Jonge M.J.A., Punt C.J.A., Loos W.J., Nooter K., Stoter G., Porrno M.G., Verweij J. (1999) Prediction of the systemic exposure to oral 9 - amino - 20 (S) camptothecin using single - sample analysis. Drug Met and Disp 27:7 s. 816-820
403. Spector A.A. (1975) Fatty acid binding to plasma albumin. J of Lip Res 16 s. 165-179
404. Spengler C.M., Shea S.A. (2000) Endogenous circadian rhythm of pulmonary function in healthy Humans. Am J Respir Crit Care Med 162 s. 1038-1046
405. Star R., Hostetter T., Hortin G.L. (2002) New markers for kidney disease. Clin Chem 48:9 s. 1375-1376
406. Stenberg P. (2001) Computational models for the prediction of intestinal membrane permeability. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 247, Acta Un Upsal s. 3-66
407. Stenberg P., Bergstrom C.A.S., Luthman K., Artursson P. (2002) Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development. Clin Pharmacokinetics 41:11 s. 877-899
408. Storey B.E. Davies B.I. (1986) A simple computer program for calculating areas under concentration- time curves. J. Antimicrob. Chemother 18 s. 281-285
409. StoutP.R., Ruth J.A. (1998) Comparision of *in vivo* and *in vitro* deposition of rhodamine and fluorescein in hair. Drug Met and Disp. 26:10 s. 943-948
410. StoutP.R., Claffey D.J., Ruth J.A. (1998) Fentanyl in hair. Chemical factors involved in accumulation and retention of fentanyl in hair after external exposure or *in vivo* deposition. Drug Met and Disp. 26:7 s. 689-700
411. StoutP.R., Dehn D., Ruth J.A. (1998) Deposition and retention of radiolabeled serum costituens in hair after systemic administration. Drug Met and Disp. 26:9 s. 900-906
412. StoutP.R., Ruth J.A. (1999) Deposition of [3H] cocaine, [3H] nicotine, and[3H] flunitrazepam in mouse hair melanosomes after systemic administration. Drug met and Disp. 27:6 s. 731-735
413. StoutP.R., Claffey D.J., Ruth J.A. (2000) Incorporation and retention of radiolabeled S-(+)- andR-(-)-methamphetamine and S(+)- andR (-) - N-(n-butyl)- amphetamine in mouse hair after systemic administration. Drug Met and Disp. 28:3 s. 286-291
414. Sturgeon C., Sam A.D., Law W.R. (1998) Rapid determination of glomerular filtration rate by single - bolus inulin: a comparision of estimation analyses. J Appl Physiol 84:6 s. 2154-2162
415. Sucker H., Fuchs P., Speiser P. (1978) Pharmazeutische technologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart s. 638; 239-280
416. Sun L.Z., Ji Z.L., Chen X., Wang J.F., Chen Y.Z. (2002) ADME-AP: database of ADME associated proteins. Bioinf 18:12 s. 1699-1700

417. Svensson C.K., Edwards D.J., Corcoran G.B. (2001) Principles of drug disposition. PSC3310 Course of professional pharmacy program. Wayne State University
418. Syme M.R., Paxton J.W., Keelan J.A. (2004) Drug transfer and metabolism by the human placenta. Clin Pharm 43 B:1 s. 1-28
419. Tafil Klawe M., Klawe J. (2003) Podręczny słownik medyczny polsko - niemiecki i niemiecko - polski. wyd II PZWL s. 9-1240
420. Takanaga H., Ohnishi A., Yamada S., Matsuo H., Morimoto S., Shoyama Y., Ohtani H., Sawada Y. (2000) Polymetoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P - glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. J of Pharm and Exp Ther 293:4 s. 230-236
421. Talegaonkar S., Mishra P.R. (2004) Intranasal delivery An approach to bypass the blood brain barrier. In J Pharmacol 36:3 s. 140-147
422. Tanaka H., Mizojiri K. (1999) Drug protein binding and blood - brain barrier permeability. J of Pharm and Exp Ther 288:3 s. 912-918
423. Tang C., Zhang K., Lepage F., Levy R.H., Baillie T.A. (1994) Metabolic chiral inversion of stiripentol in the rat. II. Influence of route of administration. Drug Metab Dispos. 22:4 str 554-560
424. Tanigawara Y. (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. Ther Drug Monit 22:1 s. 137-140
425. Tannenbaum S.J., Mayersohn M. (2001) Drugs that undergo Michaelis-Menten elimination can be allometrically scaled: ethanol as a prototype drug. AAPS Pharm. Sci. 3: 3
426. Taylor W.J., Caviness M.H.D. (1988) A textbook for the clinical application of therapeutic drug monitoring. s. 3-30
427. Testa B.,Waterbeemd H., Folkers G., Guy R.H. (2001) Pharmacokinetic optimization in drugresearch. WILEY-VCH, Verlag Helvetica Chimica Acta - Zurich
428. TGA, Therapeutic Goods Administration (2002) ADI List. Acceptable daily intakes for agricultural and veterinary chemicals. Commonwealth Australia s. 1-39
429. Theil F.P., Guenter T.W., Haddad S., Poulin P. (2003) Utility of physiologically based pharmacokinetics models to drug development and rational drug discovery candidate selection. Tox Lett 00 s. 1-21
430. The United States Pharmacopoeia, The Nationaly Formulary (1995) USP23 NF18 s. 1776-1777
431. The United States Pharmacopoeia, The Nationaly Formulary (2002) USP25 Nf20 s. 1990-1991
432. Tomoko N. (2003) Using general regresion and probablistic neural networks to predict human intestinal absorption with topological descriptors derived from two-dimensional chemical structures. J Chem Inf Comput Sci 43 s. 113-119
433. Tronde A. (2002) Pulmonary drug absorption. *In vitro* and *in vivo* investigations of drug absorption across the lung barrierand its relationto drug physiochemical properties. Act Univ Upsaliensis s.1-86
434. Tronde A., Norden B., Marchner H., Wendel A.K., Lennernas H., Hultkvist Bengtsson U. (2003) Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs *in vivo* in rats: Structure - absorption relationships and physiochemical profiling of inhaled drugs. J of Pharm Sci 92:6 s. 1216-1233
435. Tronde A., Norden B., Jeppsson A.B., Brunmark P., Nilsson E., Lennernas H., Hultkvist Bengtsson U. (2003) Drug absorption from the isolated perfused rat lung - correlations with drug physiochemical properties and epithelial permeability. J of Drug Targ 11:1 s. 61-74
436. Tunblad K. (2004) Bood-brain barrier transport of drug across species with the emphasis on health , disease and modeling. Acta Un Ups s. 1-80
437. Tutain P.L., Bechu D., Hidiroglou M. (1997) Ascorbic acid disposition kinetics in the plasma and tissues of calves. Am J Physiol 273 s. 1585 - 1597
438. Tutain P.L. (2002) Pharmacokinetic / pharmacodynamic integration in drug development and dosage regiment optimisation for veterinary medicine. AAPS PharmSci 4:4 art 38 s. 1-32
439. Tutain P.L., Castillo J.R.E., Bousquet - Melou A. (2002) The pharmacokinetic - pharmacodynamic approach to a rational dosage regiment for antibiotics. Res in Vet Sci 73 s. 105-114
440. Upton R.N., Doolette D.J. (1999) Kinetics aspects of drug disposition in the lungs. Clin and Exp Pharm and Phys 26 s. 381-391
441. Upton N.R., Doolette D.J. (2002) A quantitative alternative to the hysteresis plot for measurement of drug transit time. J of Pharm and Tox Meth 47 s. 45-51
442. Utkin I., Koudriakova T., Thompson T., Cottrell C., Iatsimirskaja E., Barry J., Vouros P., Gerber N. (1997) Isolation and identification of major urinary metabolites of rifabutin in rats and humans. Drug Met and Disp 25:8 s. 963 - 969
443. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W. Kopple K.D. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J Med Chem 6:45 s. 2615-2623
444. Velez., Witcup S.M. (1999) New developments in sustained release drug delivery for the treatment of intraocular disease. Br J Ophthalm 83 s. 1225-1229
445. Velkov T., Chuang S., Wielens J.,Sakellaris H., Charman W.N., Porter C.J.H., Scanlon M.J. (2005) The interaction lipophilic dugs with intestinal fatty acid- binding protein. J Biol Chem 280:18 s. 17769-17776
446. Veselovsky A.V., Ivanov A.S. (2003) Strategy of computer - aided drug design. Curr Targ - Inf Dis 3 s. 33-40
447. Vickers A.J. (2003) How many repeated measures in repeated measures design. Statistical issues for comparative trials. Med Res Meth 3:22, s 1-9
448. VICH (2002) Studies to evaluate the safety of residues of veterinary drugs in human food: General approach to testing. s. 1-5

449. Virkel G., Lifschitz A., Pis A., Lanusse C. (2002) In vitro ruminal biotransformation of benzimidazole sulphoxide anthelmintics: enantioselective sulphoreduction in sheep and cattle. J Vet Pharmacol Ther. 25:1 str 15-23
450. Viswanadhan V.N., Balan C., Hulme C., Cheetham J.C., Sun Y. (2002) Knowledge based approaches in the design and selection of compound libraries for drug discovery. Curr Opp in Drug Disc and Dev 5:3 s. 400-406
451. Vocci F., Farber T. (1988) Extrapolation of Animal Toxicity Data to Man. Reg. Tox. And Pharm 8 s. 389-398
452. Volosow A., Bialer M. (1999) Use of mean residence time to determine the magnitude of difference between rate constants and to calculate tmax in the Bateman equatation. Biopharm Drug Dispos 20 s. 3-9
453. Walters R.R., Hsu C.Y. (1994) Chiral assay methods for lifibrol and metabolites in plasma and the observation of unidirectional chiral inversion following administration of the enantiomers to dogs.Chirality. 6:2 str 105-115
454. Walton R., Dovey S., Harvey E., Freemantle N. (1999) Computer support for determining drug dose: systematic review and meta-analysis. BMJ 318 s. 984-990
455. Ward K.W., Proksch J.W., Levy M.A., Smith B.R. (2001) Dvelopment *in vivo* preclinical screen model to estimate absorption and bioavailability of xenobiotics. Drug Metab. And Disp. 29:1 s. 82-88
456. Ward J.P, King J.R. (2003) Mathematical modeling of drug transport in tumour multicell spheroids and monolayer cultures. Math Biosci 181 s. 177-207
457. Warner S.K., Li K., He N., Suhonen M., Chantasart D., Bolikal D., Higuchi W.I. (2002) Structure-activity relationship for chemical skin permeation enhancers: Probing the chemical microenvironment of the site of action. J of Pharm Sci 92:6 s. 1305-1322
458. Wasan K.M., Ramaswamy M., Kwong M., Boulanger K.D. (2002) Role of plasma lipoproteins in modyfing the toxic effects of water - insoluble drugs: Studies with cyclosporine A. AAPS PharmSci 4:4 s. 1-6
459. Waterbeemd H., Carter R.E., Grassy G., Kubinyi H., Martin Y.C., Tute M.S., Willet P. (1998) Glossary of therms used in computational drug design. Tech. Rep. 2:17 Alban Molecular Research Inc. s. 1-15
460. Waterbeemd H., Smith D.A., Jones B.C. (2001) Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. J Comput Aided Mol Des 15:3 s 273-286
461. Weiner P., Berar-Yanay N., Davidovich A., Magadle R. (1999) Nocturnal Cortisol Secretion in Asthmatic Patients After Inhalation of Fluticasone Propionate Chest 16 s. 931-934
462. Weinshilboum R. (2003) Inheritance and drug responce. New En J of Med 348:6 s. 529-537
463. Weisiger R.A., Zucker S.D. (2001) Transfer of fatty acids between intracellular membranes: roles of soluble binding proteins, distance, and time. Am J Physiol Gastrointest Liver Phys 21 s. 105-115
464. Weiss M (1999) Cellular pharmacokinetics: Effects of cytoplasmic diffusion and binding on organ transit time distribution. J of Pharmacokin and Biopharm 27:3 s. 233-255
465. Weiss M., Roberts M.S. (1996) Tissue distribution kinetics as determinant of transit time dispersion of drugs in organs:Application of a stochastic model to the rat hindlimb. J of Pharm and Biopharm 24:2 s. 173-196
466. White R.E., Manitpisitkul P. (2001) Pharmacokinetics theory of cassette dosing in drug discovery screening. Drug Metab and Disp 29:7 s. 957-966
467. Whiteside J.B., Wildsmith J.A.W. (2001) Developments in local anaesthetic drugs. Br J of Anaesth 87:1 s. 27-35
468. WHO (2005) Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidlines on registration requirements to establish interchangeability. Working doc. QAS/04.093/Rev. 4, 30 November 2005, s. 1-39
469. Willett P. (2003) Similarity - based approaches to virtual screening. Biochem Soc Trans 31:3 s. 603-606
470. Winkler J., Hochhaus G., Derendorf H. (2004) How the lung handles drugs. Proc Am Thorac Soc 1 s. 356-363
471. Witkiewicz Z., Soczewiński E., Suprynowicz Z. (1996) Nomenklatura chromatograficzna. tłum z ang. PTCh s. 5-87
472. Worboys P.D., Bradbury A., Houston J.B. (1997) Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. III. Relationship between metabolic clearance and slice uptake rate. Drug Met and Disp 25:4 s. 460-467
473. Xu J., Hagler A. (2002) Chemoinformatics and drug discovery. Molecules 7 s. 566-600
474. Yan J.H., Hubbard J.W., McKay G., Korchinski E.D., Midha K.K. (2002) Absolute bioavailability and stereoselective pharmacokinetics of doxepin. Xenobiotica 32:7 615-623
475. Yang J.M., Vassil A.D., Hait W.N. (2001) Activation of phospholipase C induces the expression of the multidrug resistance (MDR1) gene trough the Raf-MAPK pathway. Mol Pharmacol 60:4 s. 674-680
476. Yano Y., Beal S.L., Sheiner L.B. (2001) Evaluating pharmacokinetics / pharmacodynamics model using the posterior predictive check. J of Pharmacok and Pharmacod 28:2 s. 171-192
477. Yeh K.C., Kwan K.C. (1978) A comparision of numerical integrating algorithms by trapezoidal, Lagrange, and Spline approximation. J of Pharm and Bioph 6:1 s. 79-98
478. Yokoyama T., Fukuda K., Mori S., Ogawa M., Nagasawa K. (1992) Determination of tolperisone enantiomers in plasma and their disposition in rats. Chem Pharm Bull (Tokyo). 40:1 str 272-274
479. Zając M., Jelińska A., Muszalska I., NogowskaM., Stanisz B. (2000) Ocena jakości substancji leczniczych i preparatów farmaceutycznych według wymagań farmakopealnych i ICH. Wydawnictwo Kontekst, Poznań s. 10-17
480. Zając M., Pawełczyk E. (2000) Chemia leków. AM Poznań s. 11-40
481. Zhou H., Tong Z., McLeod J.F. (2004) "Coctail"Approaches and strategies in drug development: Valuable tool or flawed science. J of Clin Pharm 44 s. 120-134

482. Zmuidinavicius D, Japertas P., Petrauskas A., Didziapetris R. (2003) Progress in toxicoinformatics: The challenge of predicting acute toxicity. Curr Top in Med Chem 3:4 s. 1-14
483. Zmuidinavicius D, Didziapetris R. Japertas P., Avdeef A., Petrauskas A. (2002) Classification analysis (C-SAR) in predicting human intestinal absorption. Pharma Algorithms 1-20 ppt
484. Zoli M., Magalotti D., Bianchi G., Gueli C., Orlandini C., Grimaldi M., Marchesini G. (1999) Total and functional hepatic blood flow decrease in parallel with ageing. Age and Ag 28 s. 29-33

The book was cited by:

Intellipharm, LLC, Software & Consulting For The Pharmaceutical Scientist (2000-2007) www.intellipharm.com

Brucka - Jastrzębska E., Protasowicki M. (2004) Elimination Dynamics of Nickel, Administered by a Single Intraperitoneal Injection in Common Carp, Cyprinus Carpio L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 34(2), 181-192

Brucka - Jastrzębska E., Protasowicki M. (2004) Elimination Dynamics of Cadmium, Administered by a Single Intraperitoneal Injection in Common Carp, Cyprinus Carpio L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 34(2), 167-169

Pośniak M., Galwas M. (2007) Ocena narażenia dermalnego. *Bezpieczeństwo Pracy* 11, 14-17

Szałek E., Murawa D., Grześkowiak E., Kamińska A., Połom K. (2008) Pharmacokinetic changes of orally administered drugs in patients after gastrectomy. *Anestezjologia i Ratownictwo*, 2, 448-453

Balcerkiewicz M. (2008) Farmakokinetyczna ocena wybranych, modelowych postaci leku z bupiwakainą i ropiwakainą. UM Poznań

Brzezińska E., Włodno P. (2010) Structure-activity relationship of benzodiazepine derivatives. Part IV. Cholecystokinin antagonists *Scientific Review in Pharmacy,* 1, 16-26

Zawidzka-Bielska I (2012) Chronofarmakokinetyczne Badania Propofolu. Praca dr. Pod kierunkiem Prof. dr hab. n. farm. Edmunda Grześkowiaka , Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Broncel M. (2013) Ocena biorównoważności leku generycznego olanzapiny – Zolaxa Rapid firmy Polpharma. *Farmacja praktyczna*, Suplement 1-7.

Dobrowolska E., Woroń J., Serednicki W., Wordliczek J. (2014) Malnutrition – implications for pharmacotherapyin the Intensive Care Unit. *Anestezjologia i Ratownictwo,* 8, 339-348

© Tomasz Grabowski 2000-2015 All rights reserved. Wszelkie prawa zastrzeżone. ISBN 978-83-925171-0-8