

Farmakokinetyka

(L)

I. Zagadnienia

1. Termodynamiczny opis układów biologicznych.
2. Kinetyka reakcji chemicznych.
3. Modelowanie metabolizmu.
4. Stężenia glukozy we krwi, cukrzyca, próba glukozowa.

II. Zadania

1. Badanie modelu układu symulującego metabolizm glukozy:
 - a) „pacjenci z cukrzycą”.
 - b) „pacjenci poddani terapii”.
2. Dobór „terapii insulinowej”.
3. Rezultaty „terapii insulinowej”.

III. Wykonanie ćwiczenia

Działanie farmakologiczne leków zależy od ich stężenia w płynach ustrojowych, które jest funkcją podawanej dawki, sposobu podawania, masy organizmu oraz szybkości metabolizowania i wydalania. W farmakokinetyce badany jest związek pomiędzy podaniem leku, czasem jego dystrybucji i stężeniem w różnych częściach organizmu. Najprostsze modelowanie farmakokinetyczne - które ma miejsce w ćwiczeniu - dotyczy jednego kompartmentu, tj. przestrzeni, w której lek jest jednorodnie rozmieszczony oraz kinetycznie homogeniczny. Oznacza to, że jego stężenie w dowolnym miejscu kompartmentu jest jednakowe oraz, że każda cząsteczka leku może go opuścić z równym prawdopodobieństwem. Ponadto zastosowany w ćwiczeniu model dotyczy tzw. farmakokinetyki pierwszorzędowej, w której stopień eliminacji leku jest proporcjonalny do jego stężenia. W następstwie podania określonej dawki leku w formie szybkiej iniekcji dochodzi do wzrostu jego stężenia w organizmie oraz zwiększenia metabolizmu i wydalania. W układzie zawierającym jeden kompartment, chwilowe stężenie leku C_t opisuje funkcja:

$$C(t) = C_s + C_{in} \cdot \exp\left(-\frac{CL_s}{V_d} \cdot t\right) \quad (1)$$

gdzie:

C_s - ustabilizowane stężenie leku przed iniekcją

C_{in} - przyrost stężenia, jaki nastąpił w chwili $t = 0$, (w chwili iniekcji),

t - czas jaki upłynął od chwili $t = 0$,

CL_s - całkowity klirens leku, czyli hipotetyczna objętość kompartmentu, z której w jednostce czasu lek zostałaby całkowicie wyeliminowany,

V_d - objętość dystrybucji.

Klirens można wyznaczyć ze stężeń substancji w naczyniu **N** (patrz układ pomiarowy), t.j. C_0 - stężenia w chwili $t=0$ oraz C_1 - stężenia po 1 minucie od chwili $t=0$; czyli spadku stężenia ΔC_1 jak również objętości płynu V_1 , który przepłynął przez naczynie **N** w ciągu minuty. Związek pomiędzy tymi wielkościami ma postać:

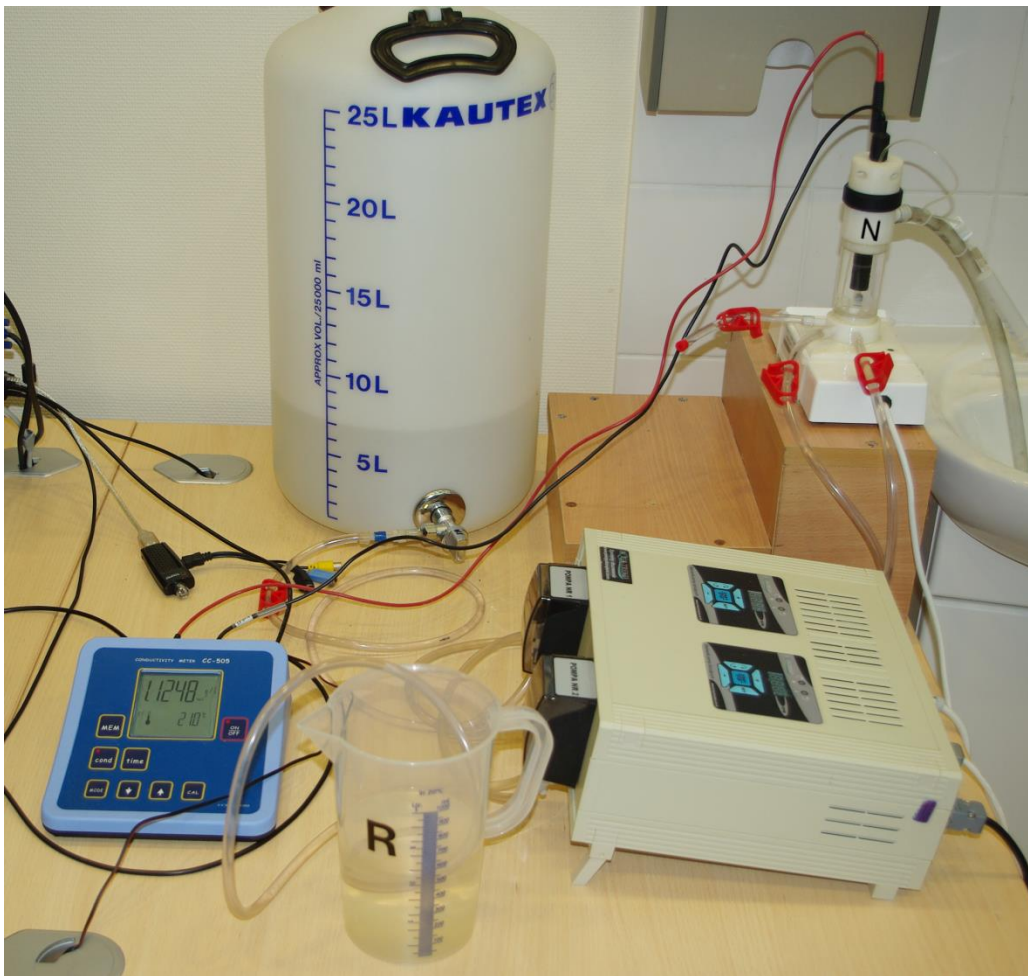
$$CL_s = \frac{\Delta C_1}{C_0} \cdot V_1 \quad (2)$$

Wielkość $\frac{CL_s}{V_d}$ w równaniu (1) nazywana jest stałą eliminacji leku. Matematycznie jest to parametr funkcji eksponencjalnej, który można wyznaczyć pomiarów stężenia $C(t)$. Parametr ten, jest związany z okresem półtrwania leku $T_{1/2}$ (czasem, po którym stężenie leku obniży się do połowy) równaniem:

$$\frac{CL_s}{V_d} = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \quad (3)$$

Celem eksperymentu jest zamodelowanie zmian stężenia glukozy, w trakcie badań jej metabolizmu w organizmie człowieka. Ze względu na łatwość pomiaru w ćwiczeniu używany jest chlorek sodu zamiast glukozy.


Układ pomiarowy

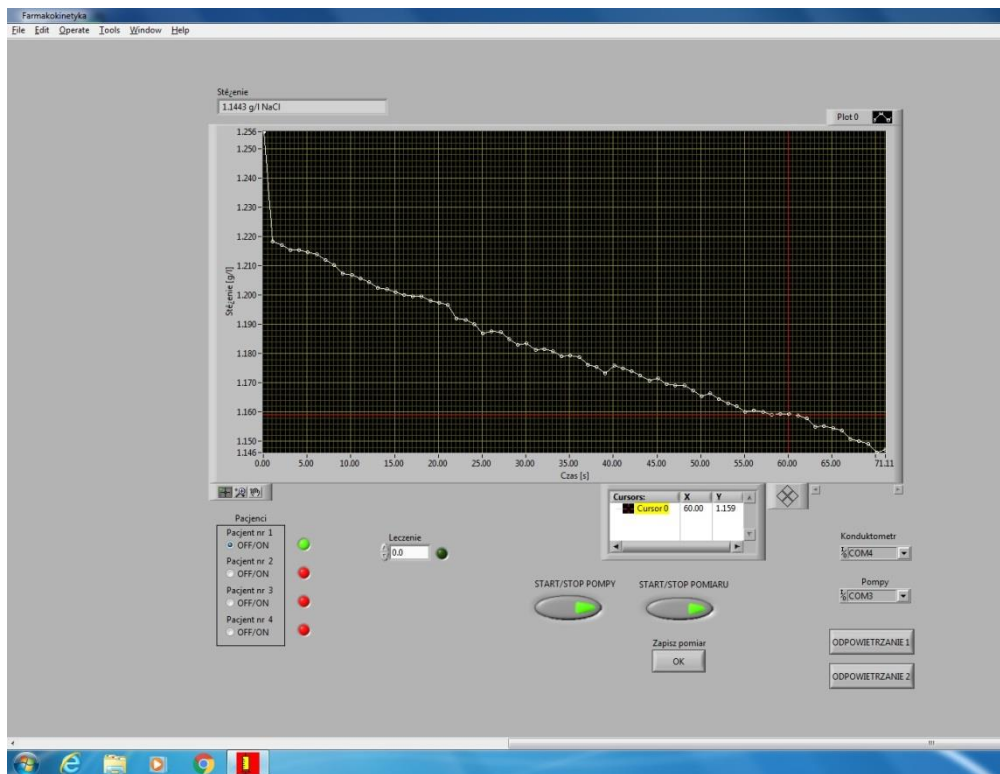


Rys. 1. Układ pomiarowy.

Widok układu pomiarowego przedstawiono na *Rys. 1*. Do położonego na **mieszadle magnetycznym** naczynia pomiarowego **N** pompy perystaltyczne podają wężykami silikonowymi płyny; **pompa P1** wodę, **pompa P2** wodny roztwór chlorku sodu. Objętość V_d (objętość dystrybucji) badanego w naczyniu **N** roztworu jest stała, co zapewnia znajdujący się na odpowiedniej wysokości otwór przelewowy. Natomiast stężenie znajdującego się w nim roztworu jest funkcją szybkości, z jaką poszczególne **pompy** podają do niego płyny.

Praca pompy jest sterowana programem komputerowym *Farmakokinetyka*, którego ikona znajduje się na pulpicie. Z programu można wybrać jedną z czterech prędkości, przy której stężenie roztworu będzie bliskie wartościom w hiperglikemii **Pacjenci: Pacjent nr 1, Pacjent nr 2, Pacjent nr 3 lub Pacjent nr 4**. Potwierdzeniem wyboru jest przyciśnięcie przycisku *START/STOP POMPY*. W naczyniu **N** znajduje się **elektroda konduktometru**, mierząca aktualne stężenie $C(t)$ roztworu. Wyniki pomiarów rejestruje komputer. Wypływający z naczynia **N** płyn jest kierowany do odpływu.

Podawanie do naczynia **N** przez **pompę P2** roztworu NaCl modeluje pracę „**pompy glukozonej**”, rozprowadzającej w organizmie glukozę powstałą w wyniku rozpadu glikogenu oraz glukozę wprowadzaną do organizmu ze źródeł zewnętrznych (posiłek, próba glukozy). Dzięki pracy **pompy P1** chlorek sodu jest rozcieńczany i wypłukiwany z naczynia pomiarowego. Modeluje to zużycie glukozy przez organizm, które jest związane z pracą „**pompy insulinowej**”. Przy ustalonych parametrach pracy **obu pomp**, po pewnym czasie ustabilizuje się stężenia roztworu w naczyniu – nastąpi stan stacjonarny. Oznacza to, że ilość chlorku sodu wpływająca do naczynia jest taka sama, jaka z niego wypływa. Stan ten zmienia szybka iniekcja do naczynia **N** dodatkowej porcji stężonego roztworu chlorku sodu, co w oczywisty sposób powoduje wzrost stężenia NaCl w naczyniu pomiarowym. Od tej chwili, wypływa z niego więcej chlorku sodu (farmakokinetyka pierwszorzędowa) niż do niego wpływa. Korzystając z równania (1) można dobrać stężenie chlorku sodu w układzie oraz czas jego półtrwania w taki sposób, aby ich wartości symulowały prędkość metabolizmu glukozy w organizmie człowieka. Badanie stężenia glukozy i ocenę szybkości jej metabolizowania przeprowadza się w trakcie wykonywania tzw. **próby glukozonej**. Jego wynik wpływa znacząco na ocenę zdolności organizmu do prawidłowego gospodarowania glukozą, czy też konieczności wdrożenia ewentualnego leczenia. Praca układu pomiarowego oraz akwizycja danych są obsługiwane przez program *Farmakokinetyka* (ikona  na pulpicie). Okno programu jest pokazane na *Rys. 2*.



Rys. 2. Okno programu *Farmakokinetyka*.

Przygotowanie ćwiczenia:

- odważyć **14 g NaCl**, wsypać go naczynia miarowego **R**, wypełnić je wodą do objętości 1000 ml, dokładnie wymieszać i postawić je obok pompy w taki sposób, aby możliwe było pobieranie z niego roztworu przez **pompę P2**
- sprawdzić czy w naczyniu **KAUTEX** znajduje się woda i czy jest odkręcony kranik wypływowy, aby mogła pobierać ją **pompa P1**
- sprawdzić czy w naczyniu pomiarowym **N** znajdującym się na mieszadle magnetycznym umieszczona jest elektroda konduktometru
- włączyć listwę zasilającą pompy, mieszadło magnetyczne, konduktometr
- włączyć konduktometr – po dwukrotnym naciśnięciu przycisku **FUNCTION** pojawi się na ekranie przyrządu znaczek [*cond*]. Mierzona jest wtedy konduktancja roztworu w oparciu, o którą przyrząd oblicza i wyświetla jego stężenie
- nacisnąć przycisk $\frac{MEM}{PRINT}$, co powoduje przesyłanie danych do komputera celem rejestracji.

1. Rejestracja stężenia roztworu chlorku sodu

a) „pacjent z cukrzycą”

- uruchomić program *Farmakokinetyka*. W jego oknie wybrać wskazaną przez asystenta osobę z pośród **Pacjent nr 1, Pacjent nr 2, Pacjent nr 3 lub Pacjent nr 4**. Poszczególni pacjenci charakteryzują się różnym stopniem zaawansowania choroby.
- przyciskiem *START/STOP POMPY* programu *Farmakokinetyka* uruchomić pompy
- przyciskiem *START/STOP POMIARU* programu *Farmakokinetyka* uruchomić rejestrację stężenia roztworu w naczyniu **N**
- rejestrację należy prowadzić do chwili ustabilizowania się wartości stężenia płynu. Zanotować jego wartość korzystając z funkcji *cursora* i oznaczyć je jako C_0^{Ch} . W badaniu wartość ta odnosi się do poziomu glukozy w organizmie chorego pacjenta
- w międzyczasie pobrać do pięciomililitrowej strzykawki 5 ml płynu z naczynia **R** i wprowadzić energicznie do naczynia **N** przygotowany wcześniej w strzykawce roztwór NaCl przy pomocy znajdującego się w nim końcówki drenu. Czynność ta symuluje „**próbę glukozową**”.
- po upływie 2 s przyciskiem *START/STOP POMIARU* skasować dotychczas zarejestrowane wyniki.

Od tego momentu rejestrację prowadzić aż do stabilizacji stężenia (może to potrwać nawet 20 minut). Po tym czasie (Nie wciskając przycisku *START/STOP POMIARU*) przyciskiem *Zapisz pomiar* należy zapisać zarejestrowane dane.

Wyniki rejestracji w postaci pliku tekstowego zawierającego czasy rejestracji (pierwsza kolumna) i wartości stężenia NaCl (druga kolumna) należy zapisać w folderze grupy.

Opracowanie tego punktu ćwiczenia polega na wykonaniu wykresu przedstawiającego zmiany stężenia chlorku sodu w naczyniu **N**. W tym celu, należy zaimportować pliki z wynikami rejestracji stężenia NaCl do programu *Statistica* i wykonać wykres (Instrukcja programu *Statistica* pkt.8. *Tworzenie wykresów*). Reprezentujące wartości pomiarowe punkty wykresów powinny tworzyć obraz gładkiej krzywej, która przedstawia funkcję eksponencjalną; inne punkty, czy też odcinki krzywej powinny być z wykresu usunięte korzystając z funkcji *Brushing* (Instrukcja do programu *Statistica* pkt.8. *Tworzenie wykresów, formatowanie wykresów*). Po utworzeniu wykresu należy wyznaczyć parametry dopasowanej funkcji wykładniczej. (Instrukcja do programu *Statistica* pkt.12. *Fitowanie niestandardowych modeli do danych*). Parametry znalezionej funkcji pozwalają określić ustabilizowane po długim okresie czasu stężenie roztworu C_S^{Ch} , okres półtrwania leku $T_{1/2}^{Ch}$, który charakteryzuje szybkość metabolizmu, C_0^{Ch} stężenie w chwili $t=0$ oraz C_1^{Ch} czyli

stężenie po 1 minucie. Powyższe dane pozwalają określić stopień zaawansowania choroby oraz zaplanować terapię.

Należy zwrócić uwagę, że symbole, które występują we wpisanej w okienku (pokazanym na Rys. 38 instrukcji programu *Statistica pkt.12.*) dialogowym funkcji:

$$v_2 = A + B \cdot \exp(-k \cdot v_1)$$

odpowiadają symbolom użytym odpowiednio w równaniach (1) i (7):

Var2 – kolumna stężeń płynu $C(t)$ w dowolnej chwili t ,

Var1 – kolumna pomiarów czasów t

A - ustabilizowane stężenie C_s

B - przyrost stężenia ΔC , jaki ma miejsce po wykonanej iniekcji w wybranej chwili $t = 0$

k - zgodnie z równaniem (1) wielkość $\frac{CL_s}{V_d}$ jest parametrem funkcji wykładniczej, który jest

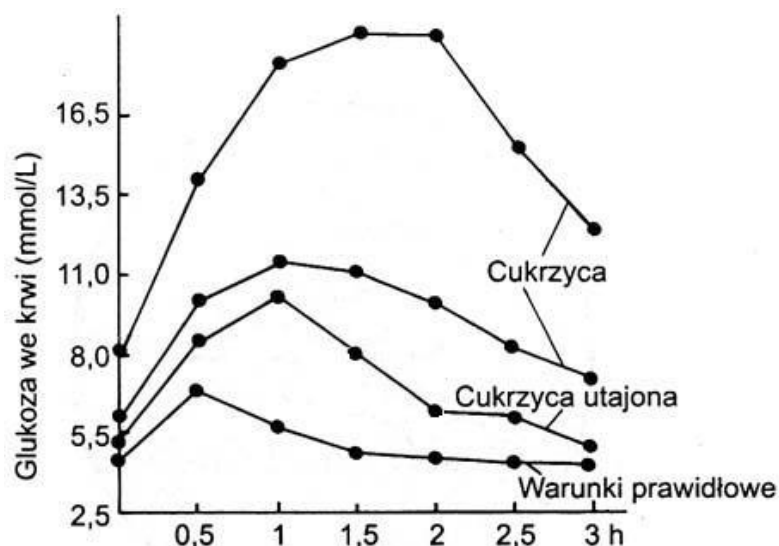
związany z poszukiwanym czasem półtrwania stężenia leku relacją;

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \approx \frac{0.7}{k} \quad (4)$$

2. Dobór terapii insulinowej

Idea terapii insulinowej polega na obniżeniu do właściwego poziomu stężenia glukozy u chorych na cukrzycę, drogą podawania odpowiedniej dawki insuliny. Dawkę leku określa się w trakcie badań pacjenta, przy czym istotny jest nie tylko sam poziom glukozy, ale również wynik „**próby glukozowej**”, pozwalającej również określić szybkość jej metabolizowania.

Stężenia glukozy we krwi na czczo i po doustnym podaniu 50 g glukozy (tzw. próba glukozowa) u pacjentów zdrowych i z cukrzycą przedstawiono na Rys. 3.



Rys. 3. Zmiany stężenia glukozy w próbie glukozowej.

Symulowany w ćwiczeniu dobór „terapii insulinowej” polega na obliczeniu, o ile należy zwiększyć prędkość podawanej przez **pompę P1** do naczynia pomiarowego wody, aby obniżyć stężenie chlorku sodu do prawidłowego poziomu. Szukany przyrost prędkości (**dawki leku** - Δn) można obliczyć, wiedząc z danych pomiarowych, że przybliżoną objętość V_1 (ml) przepływającego przez naczynie pomiarowe płynu w ciągu jednej minuty można przedstawić równaniem:

$$V_1 \approx 2.5 \cdot n_1 \text{ [ml]} \quad (5)$$

gdzie: n_1 jest liczbą z zakresu (1-100), w oparciu o którą komputer steruje objętością cieczy, jaką podaje w ciągu 1 minuty pompa **P1**.

Wstawiając równanie (5) do równania (2) i łącząc je z równaniem (3) oraz przyjmując $V_d = 100$ [ml], można napisać:

$$\Delta n = \frac{C_0^{Ch}}{\Delta C_1^{Ch} \cdot T_{1/2}^{Ch}} \quad (6)$$

Powyższa zależność pozwala obliczyć przyrost liczby impulsów Δn , którego zastosowanie spowoduje przejście układu charakteryzującego „pacjenta z cukrzycą”, w układ o parametrach odpowiadających „pacjentowi zdrowemu”.

Występujące w równaniu wielkości, C_0^{Ch} , ΔC_1^{Ch} oraz $T_{1/2}^{Ch}$ można określić z otrzymanej analitycznej postaci funkcji:

$$C(t) = A + B \cdot \exp(-k \cdot t) \quad (7)$$

1. $C_0^{Ch} = A + B$

2. $\Delta C_1^{Ch} = C_0^{Ch} - C_1^{Ch}$

3. $T_{1/2}^{Ch} = \frac{\ln 2}{k}$

3. Sprawdzenie skuteczności dobranej terapii.

W oknie programu *Farmakokinetyka* w opcji *Leczenie* wpisać obliczoną w oparciu o równanie (7) wartość Δn dla leczonego pacjenta

- przyciskiem **START/STOP POMPY** oraz **START/STOP POMIARU** programu *Farmakokinetyka* uruchomić rejestrację
- powtórzyć procedurę jak w punkcie 2.
- rejestrację stężenia prowadzić do momentu stabilizacji stężenia.

Wyniki rejestracji w postaci pliku tekstowego należy zapisać w folderze grupy.

Opracowanie tej części ćwiczenia polega na wykonaniu wykresu przedstawiającego przebieg stężenia roztworu w ciągu 7-miominutowej rejestracji na podstawie, którego należy określić (podobnie jak w przypadku „pacjenta z cukrzycą”) stężenie końcowe roztworu C_k^{ter} i półokres eliminacji leku $T_{1/2}^{ter}$.

Ocenić i skomentować skutki zastosowanej „terapii insulinowej”.

IV. Sprawozdanie (*farmakokinetyka.dotx*)

Sprawozdanie powinno zawierać:

1. Wykresy stężeń chlorku sodu, które są obserwowane po wykonanych „**próbach glukozowych**” w przypadku „**pacjenta z cukrzycą**” i pacjenta po zastosowaniu „**terapii insulinowej**”.
2. Wartość (wraz z obliczeniami) parametru Δn , którego zastosowanie spowoduje skuteczność „**terapii insulinowej**”.
3. Wartości odpowiednich stężeń chlorku sodu po wykonaniu próby glukozowej C_0^{Ch} , C_0^{ter} oraz po 1 minucie (60 sekundach) C_{60}^{Ch} i C_{60}^{ter} oraz czasy półtrwania $T_{1/2}^{Ch}$ i $T_{1/2}^{ter}$ dla „**pacjenta z cukrzycą**” i pacjenta po przeprowadzonej terapii.
4. Komentarz dotyczący skuteczności zastosowanej terapii.

V. Instrukcje

- Program *Statistica*.