



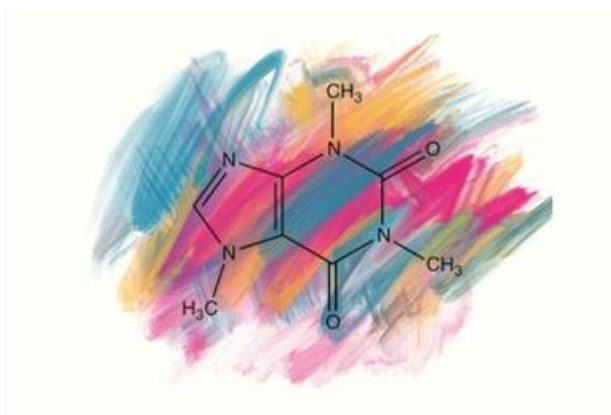
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ -
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
&
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Φαρμακοκινητική μελέτη της καφεΐνης χορηγούμενης από διαφορετικές οδούς σε πειραματόζωα»

«Pharmacokinetic study of caffeine administered *via* different routes in experimental animals»



ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΑΠΑΚΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ευτυχία Ασπροδίνη, (Επιβλέπουσα) Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών-Τοξικολογίας,
Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συν-επιβλέπων)

Άννα Βασιλάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ: ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ-ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ.....	7
Φαρμακοκινητική.....	7
<i>Οδοί χορήγησης φαρμάκων</i>	7
<i>Απορρόφηση</i>	15
<i>Κατανομή</i>	21
<i>Μεταβολισμός</i>	24
<i>Απέκκριση</i>	27
Φαρμακοδυναμική	29
ΚΑΦΕΪΝΗ	32
Φαρμακίνητική της καφεΐνης	32
ΣΚΟΠΟΣ	34
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	35
Πειραματόζωα	35
Αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης καφεΐνης.....	35
<i>Αποτελέσματα αναλυτικής μεθόδου- Ανάλυση χρωματογραφήματος</i>	37
<i>Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου</i>	39
<i>Παρασκευή εσωτερικού προτύπου</i>	40
<i>Παρασκευή κινητής φάσης</i>	40
<i>Παρασκευή πυκνού διαλύματος καφεΐνης (caffeine stock solution)</i>	40
<i>Κατασκευή Καμπύλης Βαθμονόμησης</i>	40
<i>Προκατεργασία Δειγμάτων</i>	42
<i>Ανάλυση αποτελεσμάτων</i>	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	43
Καμπύλη βαθμονόμησης	43
<i>Έλεγχος γραμμικότητας</i>	44
Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χορήγησης IP	45
Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χορήγησης IV	47

Υπολογισμός AUC.....	48
Υπολογισμός όγκου κατανομής (Vd)	48
Υπολογισμός κάθαρσης (Cl).....	48
Υπολογισμός $T_{1/2}$, T_{max} , C_{max}	51
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε φαρμακοκινητική μελέτη αποσκοπεί στην κατανόηση της πορείας και των μεταβολών που υφίσταται ένα ξενοβιοτικό από τη στιγμή που θα εισέλθει στον οργανισμό μέχρι να αποβληθεί. Οι ξενοβιοτικές ουσίες περιλαμβάνουν συνθετικές χημικές ενώσεις όπως φάρμακα, εντομοκτόνα, χημικά που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες κτλ και φυσικές χημικές ενώσεις που παράγονται από φυτά, ζώα, μύκητες και βακτήρια. Τέσσερις φαρμακοκινητικές ιδιότητες καθορίζουν την έναρξη, τον χρόνο και τον βαθμό της δράσης του ξενοβιοτικού: η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση. Η καφεΐνη είναι μία ψυχοδραστική ουσία με την πιο εκτεταμένη εκούσια πρόσληψη από τον άνθρωπο παγκοσμίως. Έχει καρδιοτονωτική και διουρητική δράση και ενεργοποιεί το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η καφεΐνη μεταβολίζεται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της σε ξανθίνες και ουρακίλες κυρίως από το ένζυμο CYP1A2 και δευτερευόντως από τα CYP2A6, XO, NAT2.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η φαρμακοκινητική του ξενοβιοτικού καφεΐνη σε επίμυες χορηγούμενη από δύο οδούς: ενδοφλέβια και ενδοπεριτοναϊκά. Τα δείγματα αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η καφεΐνη και το εσωτερικό πρότυπο (Internal standard, IS) παρακεταμόλη απομονώθηκαν με εκχύλιση υγρού-υγρού με μίγμα χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης (85/15 v/v), αναλύθηκαν σε στήλη C₁₈ και κινητή φάση 0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (80/20/2 v/v) και ανιχνεύθηκαν στα 273 nm. Η καφεΐνη και το IS εκλούσθηκαν σε 16 min και 7 min, αντίστοιχα χωρίς χρωματογραφικές παρεμβολές.

Από την φαρμακοκινητική μελέτη της καφεΐνης βρέθηκε ότι όσον αφορά στην ενδοφλέβια χορήγηση η σταθερά αποβολής είναι $K_{eliv}=0,259$, η $AUC_{iv}=23,067\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, ο $T_{1/2iv}=2,6\text{h}$, ο $Vd=0,334\text{mL}$ και η $Cl=0,087\text{L}/\text{kg}/\text{h}$. Αντίστοιχα, οι τιμές των φαρμακοκινητικών παραμέτρων όσον αφορά στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση ήταν: $K_{elip}=0,202148$, $AUC_{ip}=12,453\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, $T_{1/2ip}=3,4\text{h}$, $Vd=1,986\text{mL}$ και $Cl=0,402\text{L}/\text{kg}/\text{h}$.

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στη μελέτη αποτελεί υπόδειγμα μεθόδου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής οποιασδήποτε άλλης χημικής ουσίας, φαρμάκου ή ξενοβιοτικού.

ABSTRACT

Every pharmacokinetic study aims to describe the changes that a xenobiotic undergoes after its entry into the body via different routes of administration until it is excreted. Xenobiotics include synthetic chemical compounds such as drugs, pesticides, chemicals used in industry, etc. as well as natural chemical compounds produced by plants, animals, fungi and bacteria. The onset, duration and extent of the action of a xenobiotic is determined by four pharmacokinetic properties: absorption, distribution, metabolism and excretion. Caffeine is the most extensively self-administered psychoactive substance worldwide. It is characterized by cardiostimulant and diuretic effects and is a central nervous system stimulant. Caffeine is metabolized mainly by the enzymes CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2. The metabolic products of caffeine include xanthines and uracils.

In the present study we investigated the pharmacokinetic profile of the xenobiotic caffeine administered intravenously and intraperitoneally to rats. Samples were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Caffeine and the internal standard (IS) paracetamol were isolated from samples by liquid-liquid extraction (chloroform/isopropanol 85/15 v/v). Extracts were analyzed by reversed-phase HPLC on a C₁₈ column with mobile phase 0.1% acetic acid/methanol/acetonitrile (80/20/2 v/v) and detected at 273 nm. Caffeine and IS elution times at 16 and 7 min, respectively, with no interferences from impurities.

The values of the pharmacokinetic parameters of caffeine following i.v. administration were: $K_{el_{iv}}=0,259$, $AUC_{iv}=23,067\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, $T_{1/2_{iv}}=2,6\text{h}$, $V_d=0,334\text{mL}$ and $Cl=0,087\text{L}/\text{kg}/\text{h}$. The respective values of the pharmacokinetic parameters of caffeine following i.p. administration were: $K_{el_{ip}}=0,202148$, $AUC_{ip}=12,453\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, $T_{1/2_{ip}}=3,4\text{h}$, $V_d=1,986\text{mL}$ and $Cl=0,402\text{L}/\text{kg}/\text{h}$.

The experimental procedure described in the present study can be applied in any study designed to determine the pharmacokinetics of other drugs, chemicals or xenobiotics.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ: ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ-ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

Φαρμακοκινητική

Οι φαρμακοκινητικές μελέτες προσδιορίζουν τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός επιδρά σε μια χορηγούμενη σε αυτόν ουσία μέσω της απορρόφησης (Absorption), της κατανομής (Distribution), του μεταβολισμού (Metabolism) και της απέκκρισης (Excretion). Η γνώση της φαρμακοκινητικής των διαφόρων ξενοβιοτικών και ειδικότερα των φαρμάκων είναι πολύ σημαντική καθώς για να δράσει ένα φάρμακο θα πρέπει να βρίσκεται στη σωστή θέση, στην κατάλληλη συγκέντρωση και για το απαιτούμενο χρονικό διάστημα, ώστε να έχει το επιθυμητό αποτέλεσμα και να μην προκαλέσει τοξικότητα. Οι φαρμακοκινητικές αρχές επιτρέπουν την επιλογή της καταλληλότερης οδού χορήγησης, ανάλογα με τις ιδιότητες του φαρμάκου, την κατάλληλη δόση και συχνότητα χορήγησης καθώς και την αλληλεπίδραση δύο οι περισσότερων ουσιών που συγχωρηγούνται την ίδια περίοδο σε έναν οργανισμό (Harvey et al., 2015).

Οδοί χορήγησης φαρμάκων

Η καταλληλότερη οδός χορήγησης καθορίζεται με βάση:

- τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, όπως η υδατο- και λιποδιαλυτότητα, ιδιότητες που σχετίζονται με τον βαθμό ιονισμού της δραστικής ουσίας
- τους επιθυμητούς θεραπευτικούς στόχους, όπως η ταχύτητα απορρόφησης και έναρξη της δράσης, η διάρκεια της χορήγησης ή η επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων σε ένα συγκεκριμένο όργανο ή ιστό
- την ανάγκη παράκαμψης του μεταβολισμού «πρώτης διόδου» (first pass metabolism)
- την κατάσταση του ασθενή

Οι κύριες οδοί χορήγησης περιλαμβάνουν την εντερική, την παρεντερική και την τοπική.

Εντερική χορήγηση:

1. Από το στόμα (p.os.): η χορήγηση από το στόμα παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως την εύκολη χορήγηση/αυτοχορήγηση, την απορρόφηση του φαρμάκου καθόλο το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ) καθώς και το ότι αποτελεί μια πολύ οικονομική και ασφαλή επιλογή. Ωστόσο, μπορεί να αποδειχθεί μη αποτελεσματική για φάρμακα που απορροφώνται σε υψηλό βαθμό από το ΓΕΣ καθώς υπάρχει περίπτωση καταστροφής του φαρμάκου από γαστρικά οξέα και πεπτικά ένζυμα ή μεταβολισμού του κατά την πρώτη δίοδο από το ήπαρ. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαδικασιών υπάρχει περίπτωση να φτάνει τελικά στη συστηματική κυκλοφορία ώστε να καταλήξει στον ιστό ή στο όργανο-στόχοελάχιστη ποσότητα του φαρμάκου. Η p.os. χορήγηση παρουσιάζει, επίσης, και πρακτικές δυσκολίες όπως παρενέργειες (ναυτία και έμετο), άσχημη γεύση, αργή δράση σε επείγουσες περιπτώσεις και αδυναμία χορήγησης σε ασθενείς που δεν έχουν τις αισθήσεις τους.
2. Υπογλώσσια: τα πλεονεκτήματα της υπογλώσσιας χορήγησης είναι η άμεση απορρόφηση και η είσοδος του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία μέσω του υπογλώσσιου τριχοειδούς δικτύου, παρακάμπτοντας το δυσμενές γαστρεντερικό περιβάλλον και το μεταβολισμό πρώτης δίοδου. Ωστόσο, μόνο μικρές δόσεις φαρμάκων μπορούν να χορηγηθούν.

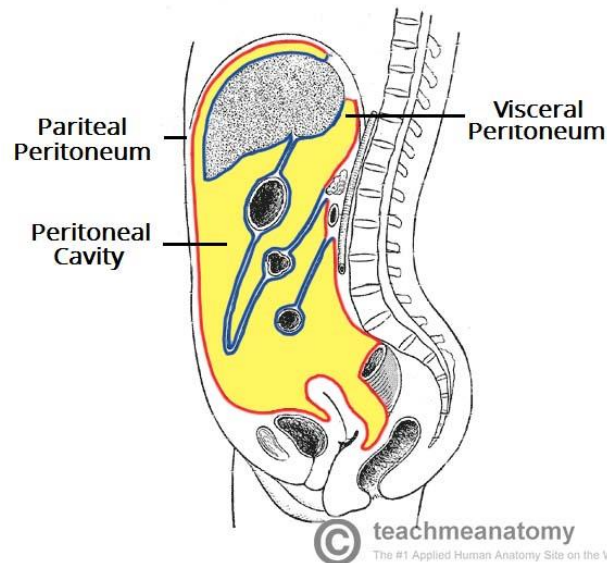
Παρεντερική χορήγηση: κατά τη χορήγηση αυτή το φάρμακο εισάγεται κατευθείαν στη συστηματική κυκλοφορία εξασφαλίζοντας, έτσι, υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και ταχεία έναρξη της δράσης του. Περιλαμβάνει τις παρακάτω οδούς:

1. Ενδοφλέβια (intravenous-i.v.): επιτρέπει την χορήγηση φαρμάκου σε μεγάλες συγκεντρώσεις και παρακάμπει την φάση απορρόφησης εξασφαλίζοντας 100% βιοδιαθεσιμότητα αλλά και μέγιστο βαθμό ελέγχου της συγκέντρωσης του φαρμάκου που εισάγεται στη συστηματική κυκλοφορία, καθώς δεν υπάρχουν απώλειες της αρχικής δόσης. Ωστόσο, υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης προβλημάτων όπως πρόκληση λοιμώξεων λόγω μόλυνσης στο σημείο έγχυσης ή επαγωγή αιμόλυσης και κίνδυνος εμβολισμού, ενώ και το κόστος είναι υψηλότερο.

2. Ενδομυϊκά (intramuscular-i.m.): τα φάρμακα που χορηγούνται ενδομυϊκά μπορούν να βρίσκονται είτε σε υδατικά διαλύματα, εξασφαλίζοντας γρήγορη απορρόφηση, είτε σε ειδικά σκευάσματα αποθήκευσης, τα οποία παρέχουν τη δυνατότητα αργής και σταθερής απορρόφησης. Κάποια φάρμακα προκαλούν πόνο ή ακόμα και μώλωπες στο σημείο έγχυσης.
3. Υποδόρια (subcutaneous-s.c.): τόσο η ενδομυϊκή όσο και η υποδόρια έγχυση, παρέχουν απορρόφηση του χορηγούμενου φαρμάκου μέσω απλής διάχυσης με αποτέλεσμα να είναι πιο αργή σε σχέση με την ενδοφλέβια χορήγηση. Η απορρόφηση μπορεί να επιβραδυνθεί ακόμα περισσότερο με τη ταυτόχρονη χορήγηση αγγειοσυσταλτικού. Η οδός αυτή, ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο για αιμόλυση ή θρόμβωση αλλά απαιτεί προσοχή σε φάρμακα τα οποία μπορεί να προκαλέσουν έντονο ερεθισμό και να οδηγήσουν ακόμα και σε τοπική νέκρωση στο σημείο της έγχυσης.

Τοπική και άλλες οδοί χορήγησης, όπως εισπνοή από το στόμα, ρινική εισπνοή, διαδερμική και ορθική χορήγηση επιλέγονται για πιο εξειδικευμένες περιπτώσεις, είτε αυτό αφορά τις ιδιότητες του φαρμάκου και το όργανο-στόχο, είτε την κατάσταση υγείας του ασθενή (Harvey et al., 2015).

Μια πολύ ενδιαφέρουσα οδός παρεντερικής χορήγησης αποτελεί η **ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (intraperitoneal-I.P.)**. Η χορήγηση αυτή περιλαμβάνει έγχυση του φαρμάκου στο περιτόναιο, έναν λεπτό ορογόνο υμένα ο οποίος επενδύει την κοιλιακή κοιλότητα και περιβάλλει τα σπλάχνα. Συγκεκριμένα, περιβάλλει όργανα της κοιλιάς, όπως το λεπτό και το παχύ έντερο εκτός από ένα μέρος του ορθού, τον στόμαχο, την σπλήνα και το ήπαρ. Διακρίνεται σε δύο πέταλα, το σπλαχνικό και το τοιχωματικό και ανάμεσα τους υπάρχει η περιτοναϊκή κοιλότητα η οποία περιέχει μικρή ποσότητα υγρού, χρήσιμου για λίπανση και ολίσθηση (Karla et al., 2022, Pannu et al., 2015) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Απεικόνιση της περιοχής του περιτόναιου και των οργάνων που περιβάλλονται από αυτό (<https://teachmeanatomy.info/abdomen/areas/peritoneum/>).

Στους ανθρώπους εφαρμόζεται σπάνια σε κάποιες περιπτώσεις αντικαρκινικής θεραπείας όμως πλέον αποτελεί μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες οδούς κατά τη διεξαγωγή μελετών με τρωκτικά ως πειραματικά μοντέλα. Η χορήγηση αυτή επιτυγχάνεται με την στήριξη του τρωκτικού σε ύπτια θέση, με το κεφάλι του κεκλιμένο χαμηλότερα από το πίσω μέρος του σώματος, και την εισαγωγή της βελόνας στο κάτω τεταρτημόριο της κοιλιάς (σε γωνία $\sim 10^\circ$). Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται κατά την χορήγηση αυτή καθώς υπάρχει κίνδυνος τυχαίας διείδυσης της βελόνας στα σπλάχνα (Εικόνα 2)(Shoyaib et al., 2019).



Εικόνα 2: Απεικόνιση IP χορήγησης στο κάτω τεταρτημόριο και υπό γωνία ~ 10 μοιρών (<https://researchanimaltraining.com/articles/intraperitoneal-injection-in-the-mouse/>).

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα: (Shoyaib et al., 2019).

Πλεονεκτήματα IP χορήγησης:

- μεγάλοι όγκοι διαλύματος: έως 10 ml/kg μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια σε τρωκτικά
- αποφυγή της γαστρεντερικής οδού και, επομένως, πιθανής αποικοδόμησης/τροποποίησης των φαρμάκων
- ταχύτερη και υψηλότερη απορρόφηση σε σύγκριση με την από του στόματος, ενδομυϊκή ή υποδόρια χορήγηση

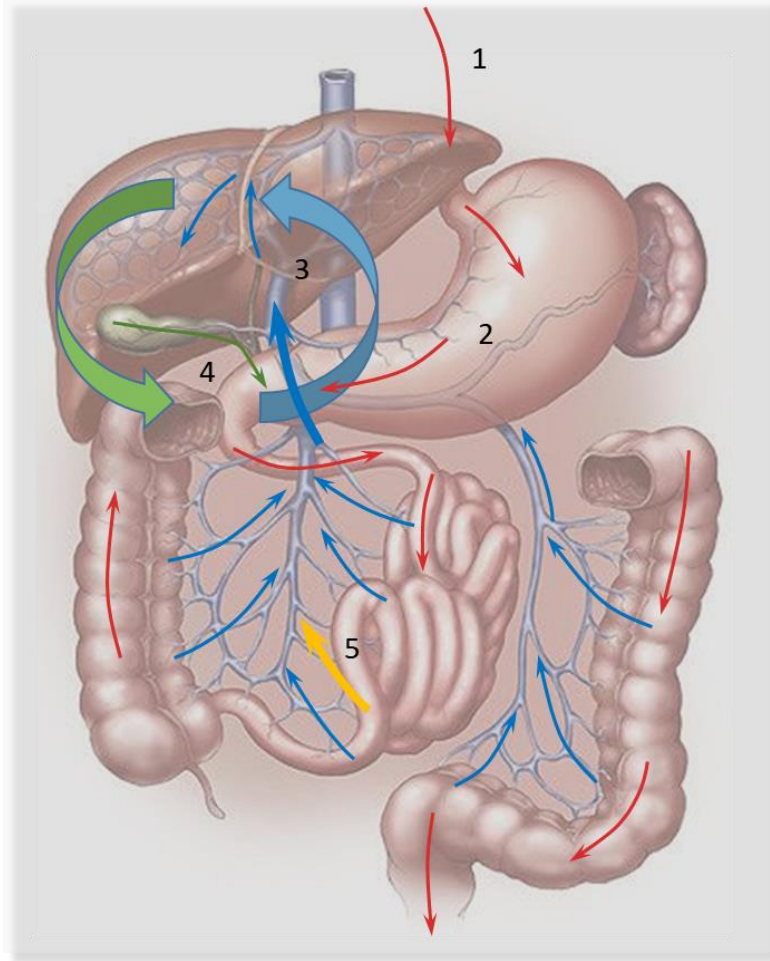
Μειονεκτήματα IP χορήγησης:

- παρότι παρακάμπτεται από το έντερο, και κατά συνέπεια οποιαδήποτε διαδικασία αδρανοποίησης του φαρμάκου λόγω μεταβολισμού πρώτης διόδου, το φάρμακο εξακολουθεί να υπόκειται σε μεταβολισμό πρώτης διόδου από το ήπαρ καθώς οι ουσίες που απορροφώνται από την περιτοναϊκή κοιλότητα καταλήγουν στην πυλαία φλέβα η οποία μεταφέρει το φάρμακο στο ήπαρ
- η τεχνική της ένεσης και η ακρίβειά της μπορεί να επηρεάζει το αποτέλεσμα της χορήγησης IP. Ένα συνηθισμένο λάθος που σχετίζεται με τη IP χορήγηση του φαρμάκου (~20% των περιπτώσεων) είναι η παρακέντηση του δέρματος σε πολύ έντονη γωνία, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη SC χορήγηση αντί για την IP
- απαιτείται ακρίβεια στο σημείο χορήγησης. Για παράδειγμα μελέτη που διεξήχθη σε ανθρώπους έδειξε ότι ο χρόνος για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης ινσουλίνης στο πλάσμα σε υγιείς εθελοντές διέφερε περίπου 2 φορές κατά τη χορήγηση του παράγοντα σε θέση πάνω έναντι κάτω από το εγκάρσιο μεσόκολο
- λιγότερο συχνά, η ανακριβής χορήγηση IP μπορεί να εγχύσει φάρμακα στη γαστρεντερική οδό στο οπισθοπεριτόναιο ή στην ουροδόχο κύστη

- ερεθιστικές ενώσεις μπορεί να προκαλέσουν ειλεό και περιτοναϊκή φλεγμονή οι οποίες μπορεί περαιτέρω να εξελιχθούν σε συμφύσεις
- μεγάλοι όγκοι (>10 ml/kg σε τρωκτικά) μπορεί να οδηγήσουν σε πόνο, χημική περιτονίτιδα, σχηματισμό ινώδους ιστού, διάτρηση κοιλιακών οργάνων, αιμορραγία και αναπνευστική δυσχέρεια

Παρότι στο πείραμα που θα αναλυθεί στη συνέχεια η χορήγηση της καφεΐνης έγινε ενδοφλέβια και ενδοπεριτοναϊκά, συνεπώς παρακάμπτεται το ΓΕΣ καθώς και οι διεργασίες που πραγματοποιούνται σε αυτό, κρίνεται σημαντική η γνώση όλων των δυνατών επιδράσεων που μπορεί να δεχθεί το φάρμακο ώστε να μπορούμε να κατανοήσουμε απόλυτα το κομμάτι της απορρόφησης και της βιοδιαθεσιμότητας καθώς και των αλλαγών που παρατηρούμε ανάλογα με την οδό που επιλέγουμε. Το φάρμακο ακολουθεί τη μεγαλύτερη δυνατή πορεία στον οργανισμό όταν χορηγείται από το στόμα. Παρακολουθώντας, λοιπόν, αυτήν την πορεία μπορούμε να δούμε αναλυτικότερα όλες τις διεργασίες και μεταβολές που υφίσταται και επηρεάζουν τόσο την βιοδιαθεσιμότητα όσο και την δραστικότητά του.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, το φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα (1) μετακινείται κατά μήκος όλου του ΓΕΣ (2). Κατά τη μετακίνηση αυτή ποσότητα φαρμάκου απορροφάται από το ΓΕΣ ενώ η υπόλοιπη καταλήγει στο ήπαρ, μέσω της πυλαία φλέβας (3), όπου λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός πρώτης διόδου. Κατόπιν, μέρος του μεταβολισμένου φαρμάκου επανεισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και κατανέμεται σε ολόκληρο το σώμα. Μικρότερο μέρος του μεταβολισμένου φαρμάκου μπορεί να επανεισαχθεί στο ΓΕΣ μέσω της χολής (4) ακολουθώντας την εντεροηπατική κυκλοφορία. Μέσα στο ΓΕΣ μπορεί να διασπασθεί από την β-γλυκουρονιδάση των βακτηρίων του εντέρου και η ελεύθερη μορφή του να ακολουθήσει εκ νέου την εντεροηπατική κυκλοφορία (5) (Εικόνα 3) (Harvey et al. 2015).



Εικόνα 3: Απεικόνιση της πορείας του φαρμάκου κατά την p.os. χορήγηση. Το φάρμακο μετακινείται κατά μήκος του ΓΕΣ και καταλήγει στο ήπαρ όπου λαμβάνει χώρα ο μεταβολισμός πρώτης διόδου. Τα κόκκινα βέλη αναπαριστούν την πορεία του φαρμάκου, ενώ τα μπλε, κίτρινα και πράσινα τα σημεία απορρόφησης και επαναρρόφησης του.

(https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Επομένως, κατά την έλευση του φαρμάκου στο ήπαρ και την διαδικασία που πραγματοποιείται κατά την ηπατική κάθαρση παρατηρούνται τα εξής (Εικόνα 4):

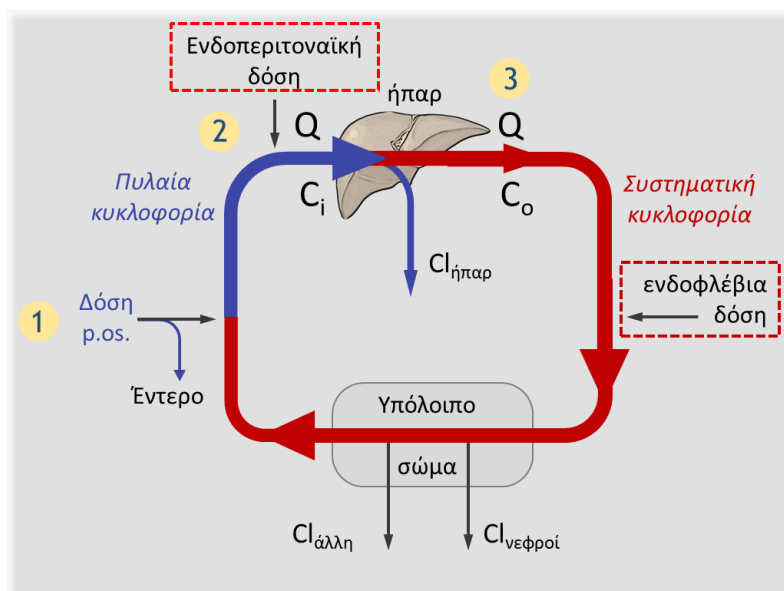
1. μέρος της χορηγούμενης δόσης αποβάλλεται μέσω του εντέρου είτε με μεταβολισμό είτε με τα κόπρανα
2. ένα άλλο μέρος της χορηγούμενης δόσης χάνεται, πριν βρεθεί στην συστηματική κυκλοφορία, λόγω μεταβολισμού στο ήπαρ (μεταβολισμός πρώτης διόδου)

3. ο λόγος εκχύλισης του φαρμάκου (extractionratio) αποτελεί το ποσοστό του φαρμάκου που απομακρύνεται από το αίμα κατά τη διέλευσή του από το ήπαρ και ισούται με την ροή του αίματος (Q) επί την διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ του εισερχομένου (inputconcentration, C_i) και εξερχομένου (outputconcentration, C_o) φαρμάκου:

$$\text{Extraction ratio} = Q \times (C_i - C_o)$$

Αφού έχει επιτευχθεί η συγκέντρωση σταθερής κατάστασης στο πλάσμα, ο λόγος εκχύλισης αποτελεί μέτρο της αποβολής του φαρμάκου από το όργανο αυτό (Εικόνα 4).

Φάρμακα με μεγάλο λόγο εκχύλισης έχουν μεγάλο μεταβολισμό πρώτης διόδου. Η βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων αυτών μετά από χορήγηση από του στόματος είναι χαμηλή (Harvey et al., 2015).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης του φαρμάκου κατά τη διέλευση του από το ήπαρ. Επισημαίνονται τα σημεία εισαγωγής του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος ανάλογα με την οδό χορήγησης

(https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Η Φαρμακοκινητική διακρίνεται σε τέσσερις θεμελιώδεις ενότητες:

Απορρόφηση

Η απορρόφηση από το σημείο της χορήγησης επιτρέπει την είσοδο του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν τον ρυθμό και την έκταση της απορρόφησης αποτελούν το περιβάλλον στο οποίο απορροφάται το φάρμακο, τα χημικά χαρακτηριστικά του καθώς και η οδός χορήγησης. Η οδός χορήγησης αποτελεί, επίσης, καταλυτικό παράγοντα και για τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Όλοι οι οδοί χορήγησης, με εξαίρεση της ενδοφλέβια, μπορεί να οδηγήσουν σε μερική απορρόφηση του φαρμάκου και κατά συνέπεια σε χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα.

Μηχανισμοί απορρόφησης φαρμάκων

Παθητική Διάχυση

- Απορρόφηση του φαρμάκου με βάση τη βαθμίδωση συγκέντρωσης.
- Δεν περιλαμβάνει φορέα.
- Μικρή εξειδίκευση → λιποδιαλυτά φάρμακα διαπερνούν εύκολα τις λιπιδικές διπλοστιβάδες των μεμβρανών.

Διευκολυνόμενη Διάχυση

- Είσοδος φαρμάκου στο κύτταρο μέσω εξειδικευμένων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών φορέων → μεταβολές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών-φορέων επιτρέπουν ή εμποδίζουν τη διέλευση φαρμάκων ή ενδογενών μορίων.
- Υπόκειται σε κορεσμό και αναστολή από μόρια με ανταγωνιστική δράση.
- Δεν απαιτείται ενέργεια για την μεταφορά του φαρμάκου.
- Υδατοδιαλυτά φάρμακα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσω υδατικών διαύλων ή πόρων.

Ενεργός μεταφορά

- Συμμετέχει ειδική πρωτεΐνη – μεταφορέας.
- Είναι δυνατή η μεταφορά ενάντια στο πρηνές συγκέντρωσης.
- Υπόκειται σε αναστολή και σε κορεσμό καθώς ο αριθμός των μορίων-μεταφορέων είναι πεπερασμένος.

- Παρουσιάζει υψηλή εξειδίκευση.
- Απαιτεί ενέργεια.

Ενδοκυττάρωση και εξωκυττάρωση:

- Μεταφορά φαρμάκου μεγάλου μεγέθους.
- Η ενδοκυττάρωση περιλαμβάνει εγκόλπωση το φαρμάκου από την κυτταρική μεμβράνη και μεταφορά εντός κυττάρου με αποκοπή του κυστιδίου που περιέχει το φάρμακο, ενώ η εξωκυττάρωση ακολουθεί την αντίστροφη πορεία.
- Πολλά κύτταρα χρησιμοποιούν εξωκυττάρωση για την έκκριση ουσιών.

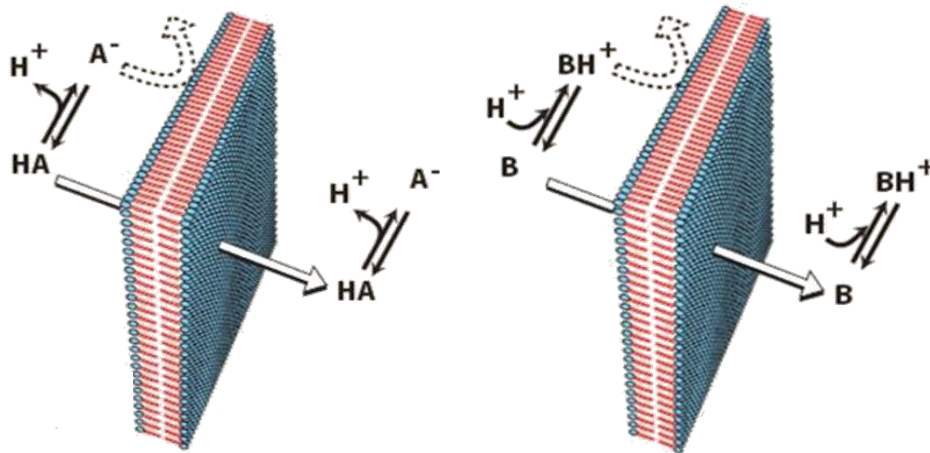
Παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση από το ΓΕΣ

1. Χημική φύση φαρμάκου: μοριακό βάρος, διαλυτότητα κτλ καθορίζουν τον μηχανισμό απορρόφησης.
2. Το pH στη θέση απορρόφησης: τα περισσότερα φάρμακα είναι ασθενής βάσεις ή οξέα → μόνο η μη ιονισμένη μορφή του φαρμάκου μπορεί να διέλθει τις κυτταρικές μεμβράνες



$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(\text{βάση})}{(\text{οξύ})}$$

Το φάρμακο βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή του όταν το pKa του φαρμάκου και το pH περιβάλλοντος ταυτίζονται. Όσο πιο κοντά στο pKa του φαρμάκου βρίσκεται το pH του περιβάλλοντος τόσο μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου μπορεί να απορροφηθεί από το σημείο αυτό (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Απορρόφηση ασθενών οξέων και βάσεων. Όσο πιο κοντά στο pK_a του φαρμάκου βρίσκεται το pH του περιβάλλοντός τόσο μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου μπορεί να απορροφηθεί από αυτό (Harvey et al., 2015).

όταν \uparrow το pH : λιγότερα HA και BH^+ \Rightarrow ασθενείς βάσεις απορροφώνται σε αλκαλικό περιβάλλον
 όταν \downarrow το pH : περισσότερα HA και BH^+ \Rightarrow ασθενή οξέα απορροφώνται σε αλκαλικό περιβάλλον

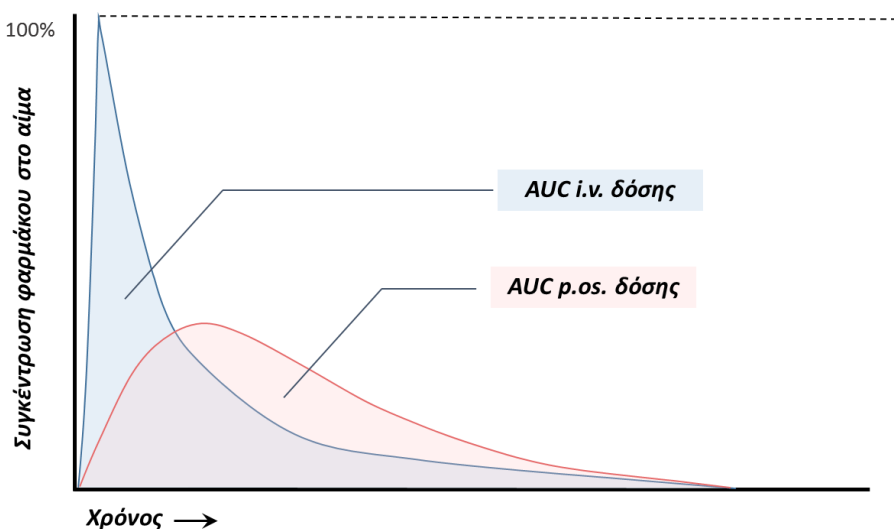
3. Αιματική ροή στη θέση απορρόφησης: υψηλότερη αιματική ροή ευνοεί την απορρόφηση σε σχέση με θέσεις απορρόφησης με χαμηλότερη αιματική ροή. Για παράδειγμα, στο έντερο που παρατηρείται υψηλότερη αιματική ροή από ότι στον στόμαχο έχουμε μεγαλύτερη απορρόφηση φαρμάκου.
4. Συνολική επιφάνεια διαθέσιμη για απορρόφηση: όσο μεγαλύτερη η επιφάνεια τόσο υψηλότερη απορρόφηση. Για παράδειγμα, υψηλότερη απορρόφηση στο έντερο από ότι στον στόμαχο καθώς η παρουσία μικρολαχνών εξασφαλίζει περίπου χίλιες φορές μεγαλύτερη επιφάνεια απορρόφησης.
5. Χρόνος επαφής φαρμάκου με την επιφάνεια απορρόφησης: παράγοντες που καθυστερούν τη μεταφορά του φαρμάκου από τον στόμαχο στο έντερο, όπως η λήψη τροφής και το στρες, επιβραδύνουν την ταχύτητα απορρόφησης, ενώ παράγοντες που επιταχύνουν την γαστρική κένωση αυξάνουν την ταχύτητα απορρόφησης (Harvey et al., 2015).

Βιοδιαθεσιμότητα

Ως βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται το ποσοστό του χορηγούμενου φαρμάκου που φτάνει στην συστηματική κυκλοφορία όταν χορηγείται από οδό άλλης της ενδοφλέβιας. Αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο για τον υπολογισμό της κατάλληλης δόσης φαρμάκου για μη ενδοφλέβιες οδούς χορήγησης.

Προσδιορισμός βιοδιαθεσιμότητας

Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας γίνεται με βάση τη σύγκριση της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο πλάσμα, μετά από χορήγηση από οποιαδήποτε οδό πλην της ενδοφλέβιας, προς τη συγκέντρωση του στο πλάσμα μετά από ενδοφλέβια χορήγηση. Παρακάτω απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα φαρμακοκινητικής καμπύλης για ενδοφλέβια και p.os. χορήγηση ενός φαρμάκου (Εικόνα 6):



Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση συγκέντρωσης της ουσίας στο αίμα σε συνάρτηση με το χρόνο για ενδοφλέβια και p.os. χορήγηση. Η σκιασμένη περιοχή κατά από την καμπύλη αντιστοιχεί στο AUC.

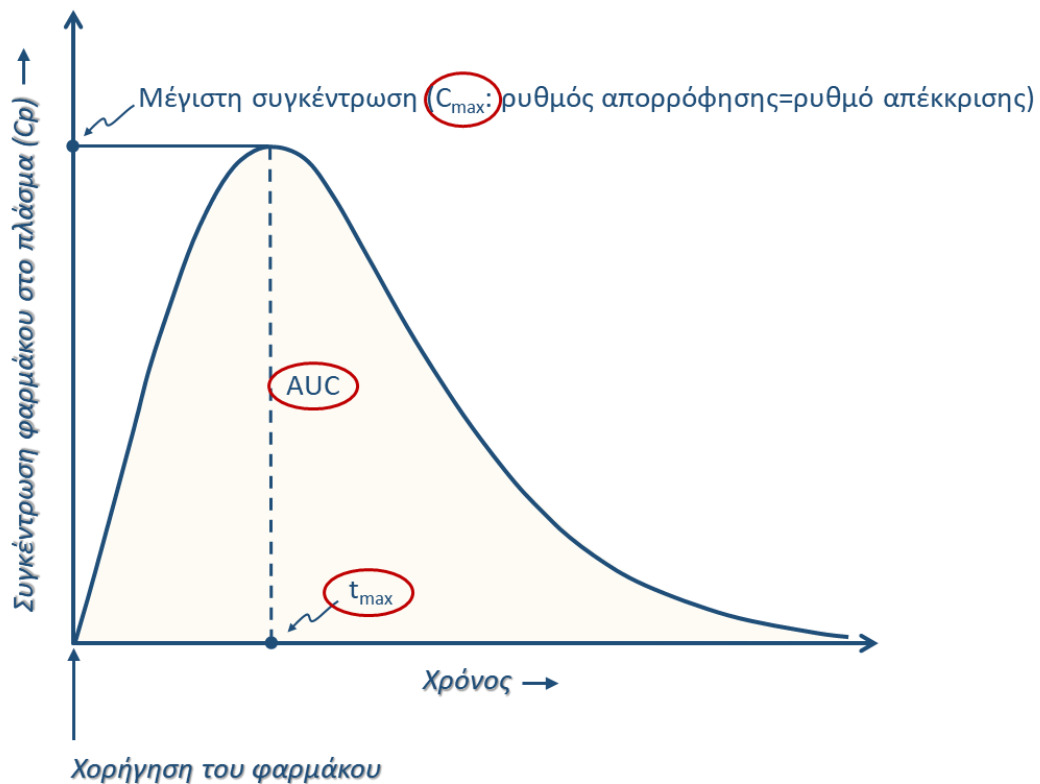
(<https://learning.eupati.eu/mod/book/tool/print/index.php?id=304&chapterid=148>).

Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC) αντιπροσωπεύει την συνολική έκθεση στο φάρμακο για όσο χρονικό διάστημα αυτό παραμένει στον οργανισμό και είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό της απόλυτης βιοδιαθεσιμότητας σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απόλυτη Βιοδιαθεσιμότητα} = \frac{(AUC)_{p.os.}}{(AUC)_{iv}} \times \frac{\Delta\acute{o}\sigma\eta_{iv}}{\Delta\acute{o}\sigma\eta_{p.os.}}$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου όταν αυτό λαμβάνεται από κάποια οδό συγκρίνεται πάντα με αυτή της ενδοφλέβιας χορήγησης καθώς μέσω αυτής της οδού το φάρμακο εισάγεται απευθείας στην συστηματική κυκλοφορία και αποτελεί το 100% της βιοδιαθεσιμότητας.

Εξίσου σημαντικές φαρμακοκινητικοί παράμετροι αποτελούν το C_{max} , και το T_{max} , δηλαδή η μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας στο πλάσμα και ο χρόνος που επιτυγχάνεται, αντίστοιχα (Εικόνα7).



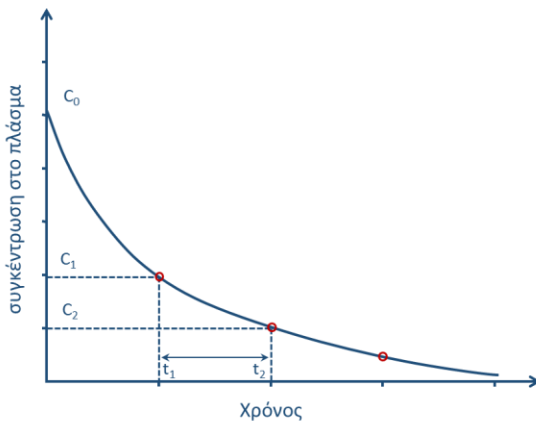
Εικόνα 7: Φαρμακοκινητική καμπύλη μονήρους δόσεως στη οποία επισημαίνονται οι πλέον σημαντικές φαρμακοκινητικές παράμετροι συγκεκριμένα οι AUC, C_{max} , T_{max} (https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Επισημαίνεται ότι κατά την IVχορήγηση το φάρμακο έχει την υψηλότερη συγκέντρωση τη στιγμή της χορήγησης και στη συνέχεια διαρκώς μειώνεται.

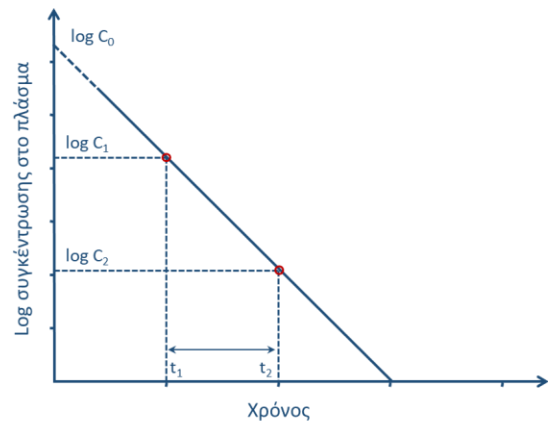
Μια ακόμα σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος είναι ο χρόνος ημιζωής της ουσίας ($T_{1/2}$), δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται ώστε η συγκέντρωση της ουσίας στο πλάσμα να μειωθεί στο μισό. Η πτώση της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στο πλάσμα περιγράφεται από τη σχέση: $C_t = C_0 e^{-kt}$, όπου C_t είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου σε μια χρονική στιγμή, C_0 η αρχική συγκέντρωση του φαρμάκου, k η σταθερά ρυθμού απομάκρυνσης και t η χρονική στιγμή που υπολογίζουμε την συγκέντρωση.

Η σταθερά απομάκρυνσης ενός φαρμάκου k_{el} υπολογίζεται από την κάθαρση του φαρμάκου (Clearance, Cl) και τον όγκο κατανομής του (Volume of distribution, V_d). Ο γενικός τύπος για τον υπολογισμό του k είναι: $k = Cl/V_d$ ή χρησιμοποιώντας την κλίση μιας ημιλογαριθμικής παράστασης συγκέντρωσης-χρόνου: $k_{el} = -\text{slope} \times 2,303$ (Εικόνα 8).

Απλή (Καρτεσιανή) γραφική παράσταση φαρμάκου που ακολουθεί κινητική ενός διαμερίσματος



Ημιλογαριθμική γραφική παράσταση για τον ρυθμό αποβολής φαρμάκου σε μοντέλο ενός διαμερίσματος



Εικόνα 8: Ημιλογαριθμική γραφική παράσταση των \log της συγκέντρωσης της ουσίας στο πλάσμα προς τον χρόνο (https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Αν λογαριθμίσουμε τη σχέση $C_t = C_0 e^{-kt}$ προκύπτει η σχέση

$$\log C_t = \log C_0 - (kt / 2,303).$$

Επίσης, για χρόνο $T_{1/2}$ η $C_{t_{1/2}} = C_0/2$. Άρα:

$$\log C_{t_{1/2}} = \log C_0 - (kt_{1/2} / 2,303) \Rightarrow$$

$$\log C_0/2 = \log C_0 - (kt_{1/2} / 2,303) \Rightarrow$$

$$-\log 2 = -kt_{1/2} / 2,303 \Rightarrow$$

$$t_{1/2} = (2,303 \times \log 2) / k \Rightarrow$$

$$t_{1/2} = 0,693/k$$

Παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων (Harvey et al., 2015)

- I) Μεταβολισμός πρώτης διόδου: εάν ένα φάρμακο μεταβολίζεται ταχέως στο ήπαρ ή και στα τοιχώματα του εντέρου τότε μειωμένη ποσότητα αυτού θα εισέλθει τελικά στη συστηματική κυκλοφορία.
- II) Διαλυτότητα φαρμάκου: ένα φάρμακο πρέπει να είναι λιπόφιλο σε μεγάλο βαθμό ώστε να μπορεί να απορροφηθεί δια μέσου λιπιδιακών μεμβρανών, αλλά και να παρουσιάζει κάποια διαλυτότητα σε υδατικά υγρά του σώματος ώστε να μπορεί να προσεγγίσει την επιφάνεια των κυττάρων. Για το λόγο αυτό τα περισσότερα φάρμακα θα πρέπει να είναι ασθενή οξέα ή ασθενείς βάσεις.
- III) Χημική αστάθεια: ορισμένα φάρμακα είναι ευαίσθητα στο όξινο pH του γαστρικού υγρού ή αποικοδομούνται από ένζυμα κατά την διέλευση τους από το ΓΕΣ.
- IV) Φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου: το μέγεθος του μορίου, η δομή του, η επικάλυψη και η παρουσία εκδόχων επηρεάζουν τον ρυθμό απορρόφησης.

Κατανομή

Το φάρμακο εγκαταλείπει αναστρέψιμα την κυκλοφορία του αίματος και εισέρχεται στο διάμεσο χώρο (εξωτερικό υγρό) και στα κύτταρα των ιστών

Παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή

1. Αιματική ροή: η αιματική ροή στα τριχοειδή των ιστών ποικίλλει λόγω της άνισης παροχής στα διάφορα όργανα. Μεγαλύτερη αιματική ροή σε έναν ιστό συνεπάγεται μεγαλύτερη κατανομή φαρμάκου στον ιστό αυτό.
2. Διαπερατότητα των τριχοειδών: εξαρτάται από τη δομή των τριχοειδών, που διαφοροποιείται ανάλογα με το κλάσμα της βασικής μεμβράνης που καλύπτεται χασματοσυνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και την χημική φύση του φαρμάκου.

3. Σύνδεση με πρωτεΐνες του πλάσματος ή/και του ιστού: η σύνδεση του φαρμάκου με πρωτεΐνες του πλάσματος επιβραδύνει τη μεταφορά του έξω από το αγγειακό διαμέρισμα καθώς μόνο η ελεύθερη μορφή φαρμάκου μπορεί να διέλθει τις κυτταρικές μεμβράνες και να κατανεμηθεί. Κύρια πρωτεΐνη δέσμευσης στο πλάσμα είναι η αλβουμίνη. Αντίστοιχα, η δέσμευση φαρμάκου από πρωτεΐνες των ιστών έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση του στον ιστό αυτό, θετικό σε περίπτωση που θέλουμε παρατεταμένη δράση στον συγκεκριμένο ιστό όμως σε υψηλά επίπεδα μπορεί να προκληθεί τοπική φαρμακευτική τοξικότητα.
4. Χημική φύση φαρμάκου: λιπόφιλα φάρμακα διεισδύουν ευκολότερα στις κυτταρικές μεμβράνες και κατανέμονται στους διάφορους ιστούς ενώ υδρόφιλα παραμένουν στον αγγειακό διαμέρισμα.

Όγκος κατανομής- Φαινομενικός όγκος κατανομής

Όγκος κατανομής: πρόκειται για τον συνολικό όγκο υγρών του σώματος στον οποίο κατανέμεται το φάρμακο μετά την απορρόφησή του. Μπορεί μόνο να εκτιμηθεί καθώς η μόνη μετρήσιμη συγκέντρωση του φαρμάκου είναι αυτή στη κυκλοφορία του αίματος.

Διαμερίσματα ύδατος που μπορεί να πραγματοποιηθεί διανομή φαρμάκου:

- Σωματικό συνολικό ύδωρ: φάρμακα με μικρό MB και λιπόφιλα κινούνται στο διάμεσο χώρο μέσω χασματοσυνδέσεων και περνούν μέσω μεμβρανών στο ενδοκυττάριο υγρό
- Εξωκυττάριο υγρό: φάρμακα με μικρό MB και υδρόφιλα μπορούν να κινούνται μέσω χασματοσυνδέσεων των τριχοειδών αγγείων προς το διάμεσο υγρό δεν εισέρχονται όμως στο ενδοκυττάριο υγρό καθώς δεν διαπερνούν λιπιδικές μεμβράνες
- Διαμέρισμα πλάσματος: φάρμακα με μεγάλο MB ή υψηλό βαθμό σύνδεσης με πρωτεΐνες του πλάσματος «παγιδεύονται» στο πλάσμα

Ο όγκος κατανομής υπολογίζεται από την σχέση:

$$Vd = \frac{D \text{ (mg/kg)}}{C_p \text{ (}\mu\text{g/mL)}}$$

όπου D = συνολική ποσότητα φαρμάκου στο σώμα

C_p = συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα

Ορισμένα φάρμακα κατανέμονται σε πολλά διαμερίσματα ύδατος και δεσμεύονται με κυτταρικά συστατικά. Αυτό οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα σε βαθμό που ο όγκος κατανομής να παίρνει τιμές μεγαλύτερες από τον συνολικό όγκο υγρών του σώματος. Στην περίπτωση αυτή ο όγκος κατανομής ονομάζεται «φαινομενικός» όγκος κατανομής.

Ο Vd σχετίζεται με τον χρόνο ημιζωής σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$t_{1/2} = \frac{0,693 \times Vd \text{ (mL)}}{Cl \text{ (L/kg/h)}}$$

όπου Cl = κάθαρση του φαρμάκου

↑Vd => το μεγαλύτερο μέρος του φαρμάκου έχει κατανεμηθεί στους ιστούς έξωθεν του πλάσματος => δεν είναι διαθέσιμο στα όργανα απέκκρισης => αύξηση χρόνου ημιζωής => αύξηση διάρκειας δράσης φαρμάκου (Harvey et al., 2015).

Σημειώνεται ότι η κάθαρση του φαρμάκου υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Cl = \frac{\text{Dose (mg/kg)}}{\text{AUC (}\mu\text{g}\cdot\text{h/mL)}}$$

Μεταβολισμός

Κινητική του Μεταβολισμού

Η βιομετατροπή των φαρμάκων μέσω διεργασιών του μεταβολισμού καταλύεται από ένζυμα. Η κινητική των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές υπακούει στην αρχή των Michaelis-Menten και συνοψίζεται στον παρακάτω τύπο:

$$V = \text{ρυθμός μεταβολισμού φαρμάκου} = \frac{V_{\max} [C]}{K_m + [C]}$$

όπου [C] η συγκέντρωση του φαρμάκου και K_m η σταθερά Michaelis.

Κινητική Πρώτης Τάξης

Στις περισσότερες κλινικές περιπτώσεις, το φάρμακο χορηγείται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, επομένως ισχύει $K_m \gg [C]$ και η εξίσωση περιορίζεται σε:

$$V = \text{ρυθμός μεταβολισμού φαρμάκου} = \frac{V_{\max} [C]}{K_m}$$

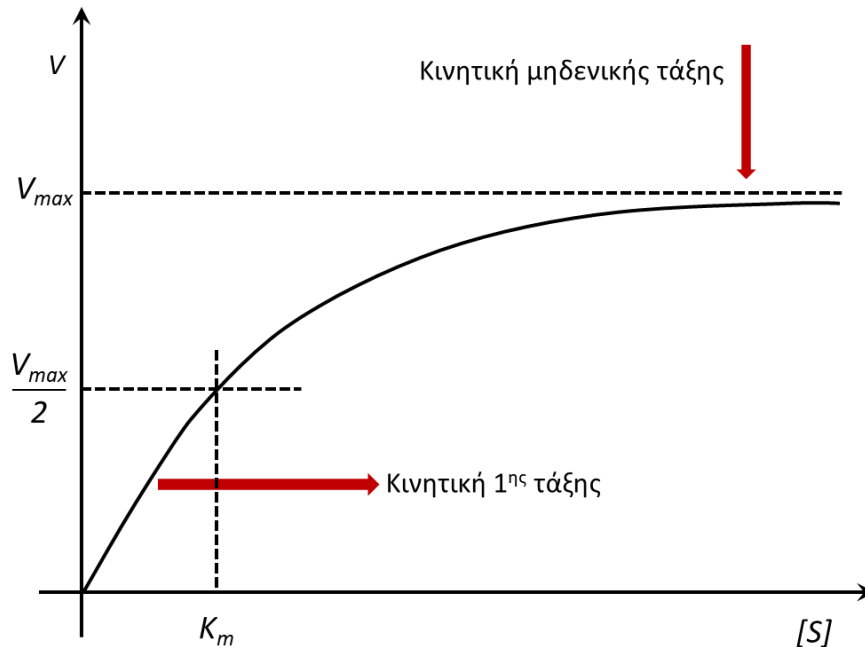
Δηλαδή, ο ρυθμός μεταβολισμού του φαρμάκου και απομάκρυνσής του είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (Διάγραμμα 2).

Κινητική Μηδενικής Τάξης

Ορισμένα φάρμακα χορηγούνται σε πολύ μεγάλες δόσεις, επομένως ισχύει $K_m \ll [C]$ και η εξίσωση περιορίζεται σε:

$$V = \text{ρυθμός μεταβολισμού φαρμάκου} = V_{\max}$$

Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι έχει επέλθει κορεσμός των ενζύμων λόγω υψηλής συγκέντρωσης ελεύθερου φαρμάκου και ο ρυθμός μεταβολισμού παραμένει σταθερός και ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του δηλαδή σταθερή ποσότητα φαρμάκου μεταβολίζεται στη μονάδα του χρόνου (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού του μεταβολισμού ενός φαρμάκου που υπόκειται σε κορεσμό σε συνάρτηση με το K_m .

Στόχος αντιδράσεων μεταβολισμού: τα λιπόφιλα φάρμακα πρέπει να βιομετατραπούν σε υδρόφιλα μόρια-μεταβολίτες ώστε να απεκκριθούν.

Αντιδράσεις Μεταβολισμού Φαρμάκων

Διακρίνονται δύο φάσεις μεταβολισμού φαρμάκων:

Φάση I

- Μετατροπή λιπόφιλων φαρμάκων σε περισσότερο πολικά (υδρόφιλα) με την εισαγωγή ή αποκάλυψη μιας πολικής ομάδας, όπως $-OH$ ή NH_2
- Συνίσταται σε αντιδράσεις αναγωγής, οξείδωσης ή υδρόλυσης
- Η φάση I του μεταβολισμού μπορεί να αυξήσει, να μειώσει ή και να αφήσει αμετάβλητη τη δραστικότητα του φαρμάκου, αν και συνήθως σε αυτή τη φάση το φάρμακο αδρανοποιείται
- Οι αντιδράσεις οξείδωσης στη φάση I, πλην της οξείδωσης των αμινών, καταλύονται κυρίως από το κυτόχρωμα P450 (CYP450) → πρόκειται για μια

υπερ-οικογένεια ισοενζύμων που βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα αλλά κυρίως σε αυτά του ήπατος και του γαστρεντερικού.

Φάση II

Οι αντιδράσεις Φάσεις II περιλαμβάνουν:

- αντιδράσεις σύζευξης που περιλαμβάνουν την προσθήκη μιας ευμεγέθους χημικής ομάδας με σκοπό τον σχηματισμό πολικών ουσιών, θεραπευτικά αδρανών και έτοιμων για απέκκριση.
- ομάδες προσθήκης: γλυκουρονικό οξύ,θειικό οξύ, οξικό οξύ
- ένζυμα αντιδράσεων σύζευξης: γλυκουρονυλοτρανσφεράση, θειοπυρινομεθυλοτρανσφεράση, S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, ακετυλοτρανσφεράση
- αντιδράσεις σύζευξης: γλυκουρονυλίωση, θείωση, ακετυλίωση

Μετά το μεταβολισμό, συνήθως, τα φάρμακα αδρανοποιούνται, κάποια όμως ενεργοποιούνται και μετατρέπονται σε φαρμακολογικά δραστικές ουσίες, για παράδειγμα πολλά αντικαρκινικά φάρμακα.

Παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων

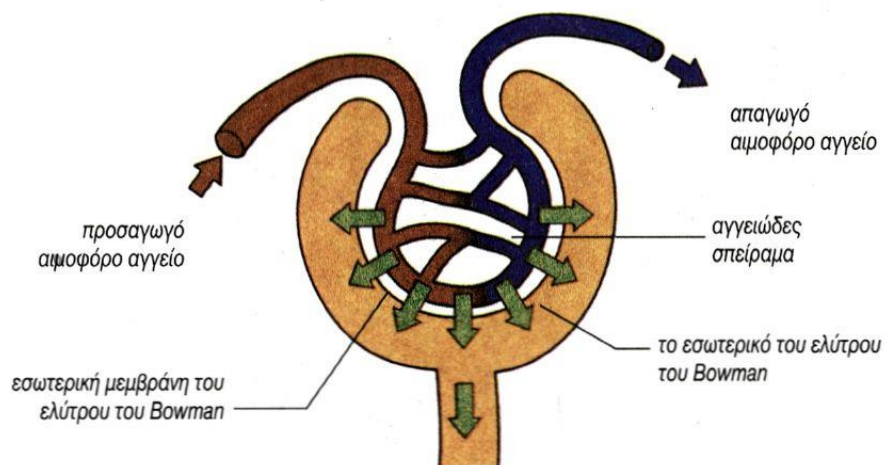
Στους παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων περιλαμβάνονται (Harvey et al., 2015):

1. Γενετικοί παράγοντες (φαρμακογονιδιοματική)
2. Διατροφικοί παράγοντες (πχ. αλκοόλ, κάπνισμα)
3. Ταυτόχρονη χορήγηση δύο ή περισσότερων φαρμάκων
4. Ηλικία (πχ. αλλαγές στον αριθμό και τη δραστικότητα των ενζύμων με την πάροδο του χρόνου)
5. Νόσοι (πχ. ασθένειες του ήπατος- κύριο όργανο του μεταβολισμού)

Απέκκριση

Αποβολή του φαρμάκου από τους νεφρούς:

Το φάρμακο φτάνει μέσω της νεφρικής αρτηρίας στο νεφρικό σπείραμα, ένα δίκτυο τριχοειδών αγγείων δια μέσου των οποίων πραγματοποιείται η διαδικασία της **σπειραματικής διήθησης**. Κατά τη διαδικασία αυτή η ελεύθερη μορφή του φαρμάκου διηθείται μέσω σπειραματικών τριχοειδών στο έλυτρο του Bowman και καταλήγει στο νεφρικό αυλό. Φάρμακα ή ποσότητα φαρμάκων που δεν διηθούνται εγκαταλείπουν το νεφρικό σπείραμα μέσω της απαγωγού νεφρικής αρτηρίας, η οποία περιβάλλει τον νεφρικό αυλό. Ο ρυθμός της σπειραματικής διήθησης κυμαίνεται μεταξύ 90-125 ml/min και δεν επηρεάζεται από το pH και τη διαλυτότητα των λιπιδίων. Ωστόσο, διηθούνται μόνο μόρια ελευθέρου φαρμάκου μοριακού βάρους <20kDa (Εικόνα 10).

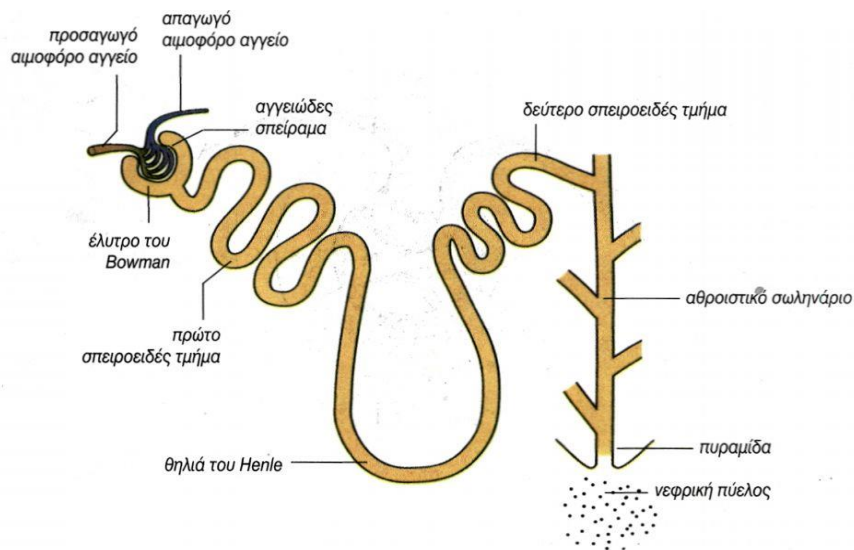


Εικόνα 10: Απεικόνιση του ελύτρου του Bowman, όπου πραγματοποιείται η σπειραματική διήθηση των ελευθέρων φαρμάκων που φτάνουν στο νεφρικό σπείραμα μέσω της νεφρικής αρτηρίας

(http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2666/Biologia A-Lykeiou_html-empl/index6.html).

Ακολουθεί η **έκκριση στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο του φαρμάκου** που βρίσκεται στη νεφρική αρτηρία με ενεργητική μεταφορά που πραγματοποιείται μέσω δύο συστημάτων, ένα για τα ανιόντα και ένα για τα κατιόντα, με χαμηλή ειδικότητα και επιτρέπει την μεταφορά πολλών διαφορετικών ενώσεων. Στην αγκύλη του Henle

πραγματοποιείται η συμπύκνωση ή η αραίωση των ούρων, καθοριστικό στάδιο επιλογής των μορίων και ενώσεων που θα αναρροφηθούν και αυτόν που θα απεκκριθούν. Η αγκύλη του Henle αποτελείται από το λεπτό κατιόν και το παχύ ανιόν σκέλος. Το λεπτό κατιόν σκέλος είναι διαπερατό σε νερό αλλά όχι σε ιόντα, επιτρέποντας την επαναρρόφηση νερού, ενώ το παχύ ανιόν σκέλος είναι διαπερατό σε ιόντα αλλά όχι σε νερό, επιτρέποντας την επαναρρόφηση ιόντων. Αυτή η μορφολογική και λειτουργική τους διαφορά σε συνδυασμό με την παράλληλη στοίχισή τους επιτρέπει την αραίωση ή συμπύκνωση των ούρων μέσω των πολλαπλών παλίνδρομων ρευμάτων. Στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο η συγκέντρωση του φαρμάκου αυξάνεται και υπερβαίνει αυτή του περιαγγειακού χώρου (Εικόνα 11). Τα μη φορτισμένα φάρμακα μπορούν να επαναρροφηθούν προς τη συστηματική κυκλοφορία → **επαναρρόφηση στα άπω σωληνάρια**. Τα φάρμακα που παραμένουν στο νεφρικό αυλό αποβάλλονται με τα ούρα (Harvey et al., 2015, Sherwood L., 2016).



Εικόνα 11: Απεικόνιση της πορείας που ακολουθεί το φάρμακο από τη διήθηση στο έλυτρο του Bowman έως το αθροιστικό σωληνάριο. Ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στο νεφρικό σωληνάριο επαναρροφάται, ενώ η ποσότητα που παραμένει αποβάλλεται μέσω των ούρων (<http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2666/Biologia A-Lykeiou.html-empl/index6.html>).

Φαρμακοδυναμική

Η φαρμακοδυναμική μελετά την επίδραση του φαρμάκου στον οργανισμό. Ουσιαστικά, περιγράφει την ποσοτική έκφραση δράσης του φαρμάκου στον οργανισμό. Η βιολογική απόκριση του οργανισμού στο φάρμακο καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τους μοριακούς στόχους του (Εικόνα 12).

Με την μελέτη των χαρακτηριστικών της σύνδεσης μπορεί να εκτιμηθεί η απόκριση του οργανισμού μετά τη λήψη μια ουσία/ ενός φαρμάκου.

Στα χαρακτηριστικά της σύνδεσης ενός φαρμάκου με τον υποδοχέα του περιλαμβάνονται:

- Η συγγένεια του φαρμάκου-προσδέτη με τους υποδοχείς
- Η κινητική αλληλεπίδρασης του φαρμάκου-προσδέτη με τον υποδοχέα

Κριτήρια Υποδοχέα:

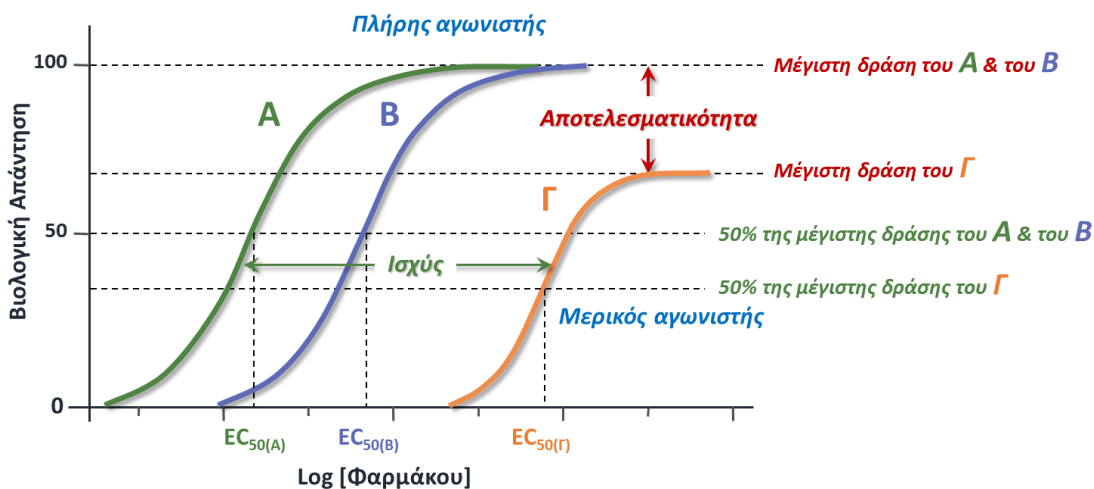
- Αναστρεψιμότητα σύνδεσης: τα περισσότερα φάρμακα συνδέονται στους υποδοχείς και σχηματίζουν προσωρινά ένα σύμπλοκο το οποίο μπορεί να διασπαστεί σε ελεύθερο φάρμακο και ελεύθερο υποδοχέα.
- Κορεσμός σύνδεσης: τα κύτταρα διαθέτουν συγκεκριμένο αριθμό υποδοχέων με αποτέλεσμα κάποια στιγμή να επέρχεται κορεσμός.

Καμπύλη δόσης-αποτελέσματος

Η έκταση της δράσης ενός φαρμάκου εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του στην περιοχή του υποδοχέα. Η συγκέντρωση αυτή είναι συνάρτηση της δόσης του χορηγούμενου φαρμάκου. Η δράση ενός φαρμάκου περιγράφεται από την γραφική παράσταση του μεγέθους της βιολογικής απάντησης σε συνάρτηση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του φαρμάκου σύμφωνα με την Εικόνα 12.

Αποτελεσματικότητα είναι η μέγιστη απάντηση που προκαλείται από ένα φάρμακο. Η αποτελεσματικότητα εξαρτάται από τον αριθμό συμπλόκων φαρμάκου-υποδοχέα καθώς επίσης και από την ικανότητα του υποδοχέα να προκαλέσει κυτταρικό αποτέλεσμα. Οι πλήρεις αγωνιστές (ουσίες που προσδένονται σε έναν υποδοχέα και προκαλούν βιολογικό αποτέλεσμα) έχουν την ικανότητα να προκαλούν το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα αντίθετα με τους μερικούς αγωνιστές οι οποίοι δεν έχουν αυτήν την ικανότητα (Εικόνα 12).

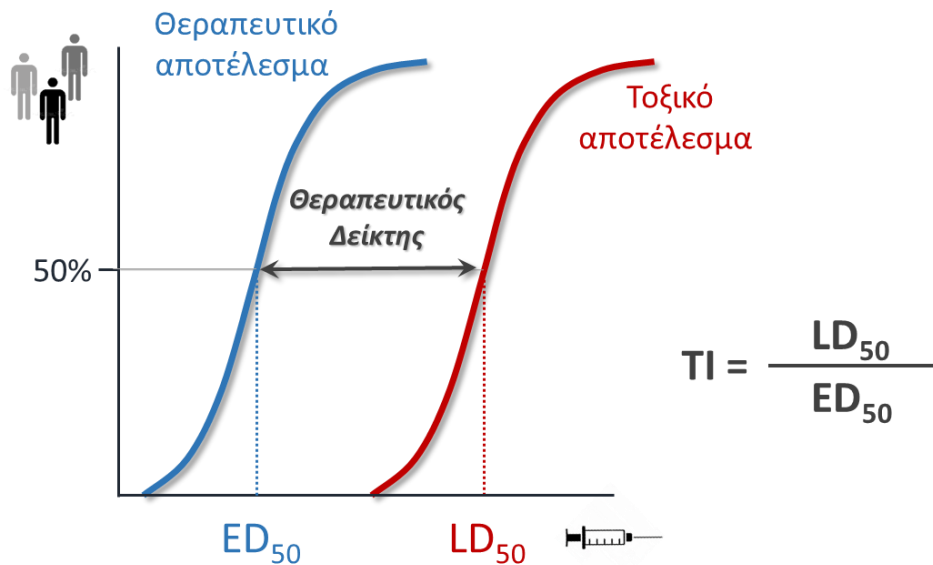
Ως **ισχύς** ορίζεται η συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται ώστε να παραχθεί το 50% της μέγιστης απόκρισης (Effective Concentration, EC_{50} , ή Effective Dose, ED_{50}). Όσο μικρότερη είναι η δόση που απαιτείται για να παραχθεί το 50% της μέγιστης απόκρισης τόσο πιο ισχυρό είναι ένα φάρμακο (Harvey et al., 2015).



Εικόνα 12: Διαγραμματική απεικόνιση σχέσης δόσης απόκρισης: στον οριζόντιο άξονα φαίνεται η δόση του φαρμάκου (σε λογαριθμική κλίμακα) ενώ στον κάθετο η απόκριση. Στο διάγραμμα απεικονίζεται η συγκριτική ισχύς και αποτελεσματικότητα τριών φαρμάκων (https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Οι δύο αυτές σημαντικές φαρμακοδυναμικές παράμετροι συμβάλλουν στην επιλογή του καταλληλότερου προς χορήγηση φαρμάκου (Harvey et al., 2015).

Οι φαρμακοδυναμική μελέτη ενός φαρμάκου αποσκοπεί, επίσης, στην κατανόηση της σχέσης δόσης-απόκρισης και κατ'έπекταση τον προδιορισμό των ορίων μεταξύ αποτελεσματικής και τοξικής δόσης.



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και της τοξικότητας ενός φαρμάκου σε συνάρτηση με τη δόση και το ποσοστό των ανθρώπων που επηρεάζει η αντίστοιχη δόση με τον έναν η τον άλλο τρόπο (https://eclass.uth.gr/courses/MED_U_220/).

Therapeutic Index (TI) - Θεραπευτικός Δείκτης: ο θεραπευτικός δείκτης ενός φαρμάκου υπολογίζεται από το λόγο της δόσης που προκαλεί τοξικότητα στο ήμισυ του πληθυσμού (TD₅₀) προς τη δόση η οποία προκαλεί το ήμισυ της αποτελεσματικής απόκρισης (ED₅₀):

$$TI = (TD_{50}) / (ED_{50})$$

Ο TI αποτελεί μέτρο της ασφάλειας ενός φαρμάκου (Εικόνα 13).

ΚΑΦΕΪΝΗ

Η καφεΐνη είναι μια ψυχοδραστική ουσία με τη μεγαλύτερη εκούσια πρόσληψη από τον άνθρωπο παγκοσμίως. Εντοπίζεται σε ποικίλες συγκεντρώσεις στους κόκκους, στα φύλλα και στους καρπούς ορισμένων φυτών και παρουσιάζει εντομοκτόνο δράση. Στον άνθρωπο δρα ως διεγερτικό του κεντρικού νευρικού συστήματος με καρδιοτονωτική και διουρητική δράση. Συνήθως, καταναλώνεται ως ρόφημα από εγχύσεις κόκκων του φυτού *Coffea Arabica*, καθώς και από άλλα ροφήματα και τρόφιμα. Σε αντίθεση με άλλες ψυχοδραστικές ουσίες, η χρήση της είναι νόμιμη και μη ρυθμιζόμενη/ελεγχόμενη σχεδόν σε όλες τις χώρες (Lau et al., 1995).

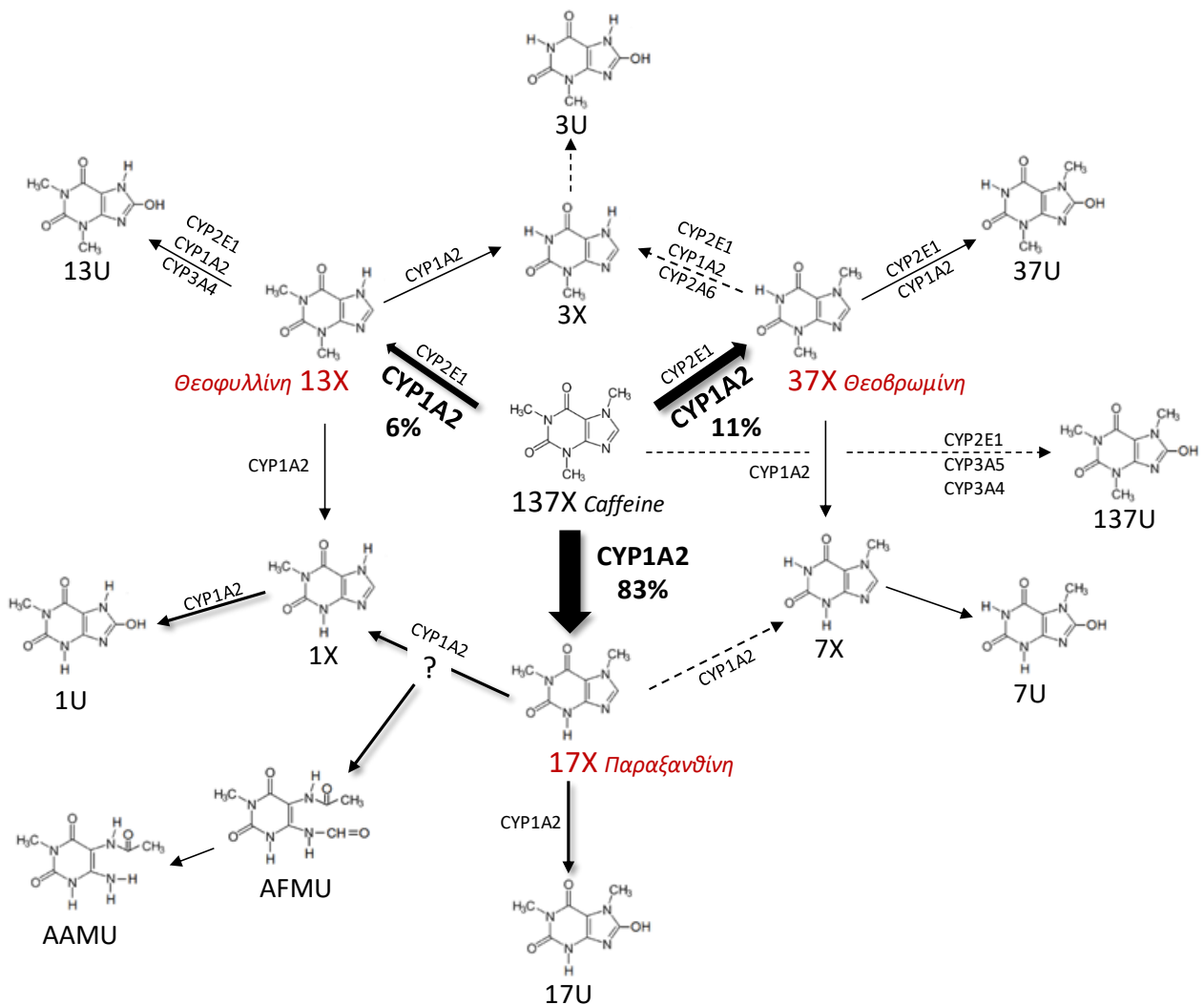
Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη) είναι αλκαλοειδές που προέχεται από τα φυτά με μοριακό τύπο $C_8H_{10}N_4O_2$ και μοριακό βάρος 194,19.

Φαρμακινητική της καφεΐνης

Η καθαρή μορφή της καφεΐνης αποτελεί λευκή σκόνη με πικρή γεύση (Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research, 2001). Χαρακτηρίζεται από ταχεία απορρόφηση στον άνθρωπο, μικρή σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και ελάχιστο μεταβολισμό πρώτης διόδου, συνεπώς υψηλή βιοδιαθεσιμότητα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής κατά μέσο όρο προσδιορίζεται στις 5 ώρες αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 1,5 έως 9 ώρες ανάλογα με τον οργανισμό καθώς και γενετικές και περιβαλλοντικές διαφοροποιήσεις που επηρεάζουν τον μεταβολισμό της καφεΐνης.

Κύρια ένζυμα του μεταβολισμού της καφεΐνης αποτελούν τα CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και οι βασικοί μεταβολίτες είναι ξανθίνες και ουρακίλες (Lau et al., 1995).

Παρακάτω βλέπουμε μια πολύ αναλυτική εικόνα με τις αντιδράσεις βιομετατροπής που δέχεται η καφεΐνη, τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις καθώς και του μεταβολίτες της (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Μεταβολικές οδοί που ενέχονται στον μεταβολισμό της καφεΐνης. Με έντονα βέλη απεικονίζονται οι κύριες αντιδράσεις μεταβολισμού, ενώ βέλη με διακεκομμένη γραμμή υποδηλώνουν ελάσσονες μεταβολικές οδούς. Επίσης, στην εικόνα διακρίνονται τα ένζυμα που καταλύουν κάθε αντίδραση. Εικόνα τροποποιημένη από διατριβή της Μ. Μπουνίτση, 2020.

<https://freader.ekt.gr/eadd/index.php?doc=47277&lang=el>

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της καφεΐνης όταν αυτή χορηγείται από διαφορετικές οδούς, με τους εξής επιμέρους στόχους:

- ορθός χειρισμός πειραματόζων και ικανότητα χορήγησης φαρμάκων ενδοφλέβια, περιτοναϊκά καθώς και αιμοληψίας
- ανάπτυξη και πιστοποίηση αναλυτικής μεθόδου για την μέτρηση της καφεΐνης στο αίμα
- προσδιορισμός των φαρμακοκινητικών παραμέτρων περιοχή κάτω από την καμπύλη AUC, όγκος κατανομής Vd, κάθαρση Cl, χρόνος ημίσειας ζωής T1/2, μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα Cmax και χρόνος επίτευξης μέγιστης συγκέντρωσης στο αίμα Tmax της καφεΐνης μετά από χορήγησή της από διαφορετικές οδούς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα αρσενικοί αρουραίοι (n=3). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν με απόλυτο σεβασμό στα ζώα και με την πρόκληση του ελάχιστου δυνατού πόνου σύμφωνα με την ισχύουσα εθνική νομοθεσία (AnimalAct, PD 160/91) και της οδηγίας της ΕΕ σχετικά με την έρευνα σε πειραματόζωα.

Τα πειραματόζωα δεν θυσιάστηκαν με την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας καθώς μετά την πλήρη απομάκρυνση της καφεΐνης εντός εικοσιτετράωρου (χρόνος ημίσειας ζωής της καφεΐνης ~5 ώρες) και με δεδομένη την μικρή ποσότητα που τους χορηγήθηκε θεωρήθηκε ότι η λειτουργία των πειραματοζώων ήταν φυσιολογική.

- Στον πρώτο αρουραίο έγινε αιμοληψία χωρίς να έχει προηγηθεί χορήγηση καφεΐνης με σκοπό την απομόνωση του ορού και την χρησιμοποίησή του στην πρότυπη καμπύλη.
- Στο δεύτερο αρουραίο, βάρους 244gr, χορηγήθηκαν 244μl διαλύματος καφεΐνης 5mg/ml περιτοναϊκά. Επομένως, το πειραματόζωο έλαβε δόση 5mg/kg.
- Στον τρίτο αρουραίο βάρους 250gr, χορηγήθηκαν 100μl διαλύματος καφεΐνης 5mg/ml ενδοφλέβια. Επομένως, έλαβε δόση περίπου 2mg/kg.

Στη συνέχεια, και τα δύο ζώα υποβλήθηκαν σε αιμοληψία (πλάγιες φλέβες της ουράς), ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Μετά την αιμοληψία, ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων και απομόνωση του ορού.

Το διάλυμα καφεΐνης παρασκευάστηκε με την ανάμιξη 50mg καφεΐνης σε 10ml νερού.

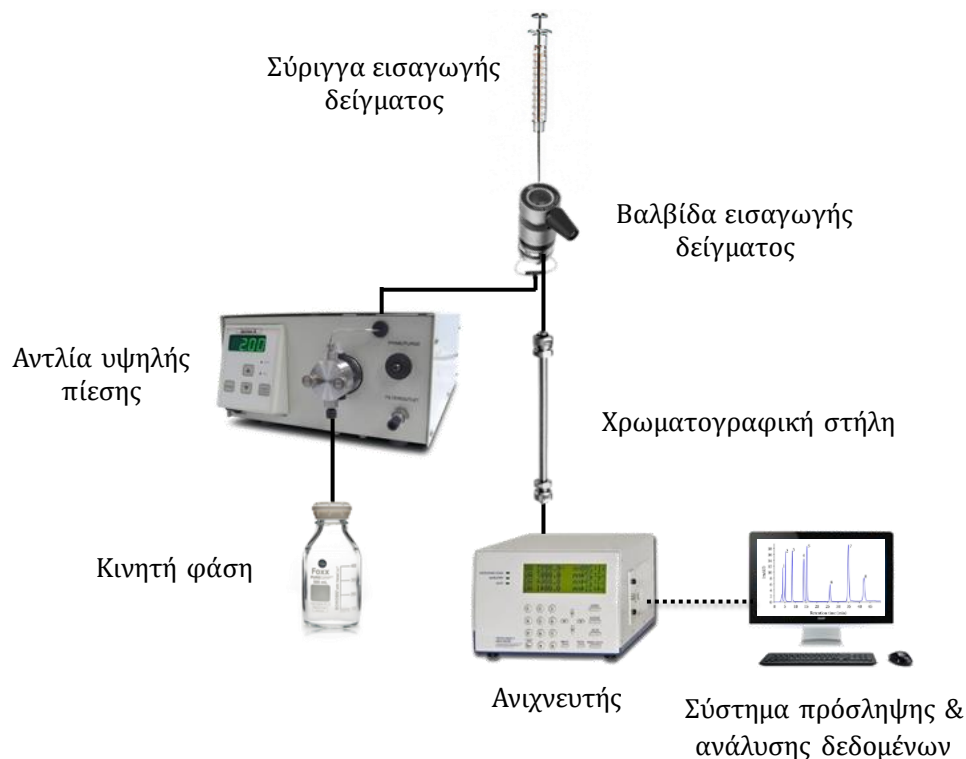
Αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης καφεΐνης

Η μέθοδος προσδιορισμού της καφεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), μια τεχνική αναλυτικής χημείας για τον διαχωρισμό, τον ποιοτικό και τον ποσοτικό

προσδιορισμό κάθε ουσίας/συστατικού ενός μείγματος (Nikolin et al., 2004). Κεντρικό ρόλο στην αναλυτική διαδικασία διαδραματίζει η αντλία η οποία διοχετεύει υπό υψηλή πίεση ένα υγρό διαλύτη (υγρή φάση) που περιέχει το μείγμα του προς προσδιορισμό δείγματος σε μια στήλη γεμάτη με στερεό προσροφητικό υλικό. Κάθε ουσία/συστατικό του δείγματος αλληλοεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με το προσροφητικό υλικό ανάλογα με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του με αποτέλεσμα προκαλώντας διαφορετικούς ρυθμούς ροής για τις διαφορετικές ουσίες και οδηγώντας, έτσι στον διαχωρισμό τους καθώς ρέουν εκτός της στήλης. Η αναγνώριση της ουσίας γίνεται με βάση τη χρονική στιγμή που απομακρύνεται από τη στήλη ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός με βάση το ύψος της κορυφής και του εμβαδού κάτω από αυτή στο χρωματογράφημα.

Η οργάνωση της HPLC περιλαμβάνει (Εικόνα 15):

- ✓ τη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, μέσω της οποίας με τη χρήση μικροσύριγγας γίνεται η εισαγωγή δειγμάτων όγκου 100-200μl
- ✓ την αντλία υψηλής πίεσης, που εξασφαλίζει πίεση έως 5000psi (340 atm)
- ✓ το δοχείο με την κινητή φάση
- ✓ την χρωματογραφική στήλη (στερεή φάση)
- ✓ τον ανιχνευτή ο οποίος παράγει ένα σήμα ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού του δείγματος που εκλύεται από τη στήλη επιτρέποντας έτσι τον ποσοτικό προσδιορισμό
- ✓ έναν ψηφιακό επεξεργαστή για την πρόσληψη και την ανάλυση δεδομένων



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ανάλυση δειγμάτων. Ανατύπωση από ΔΔ Μ. Μπουνίτση, 2020.

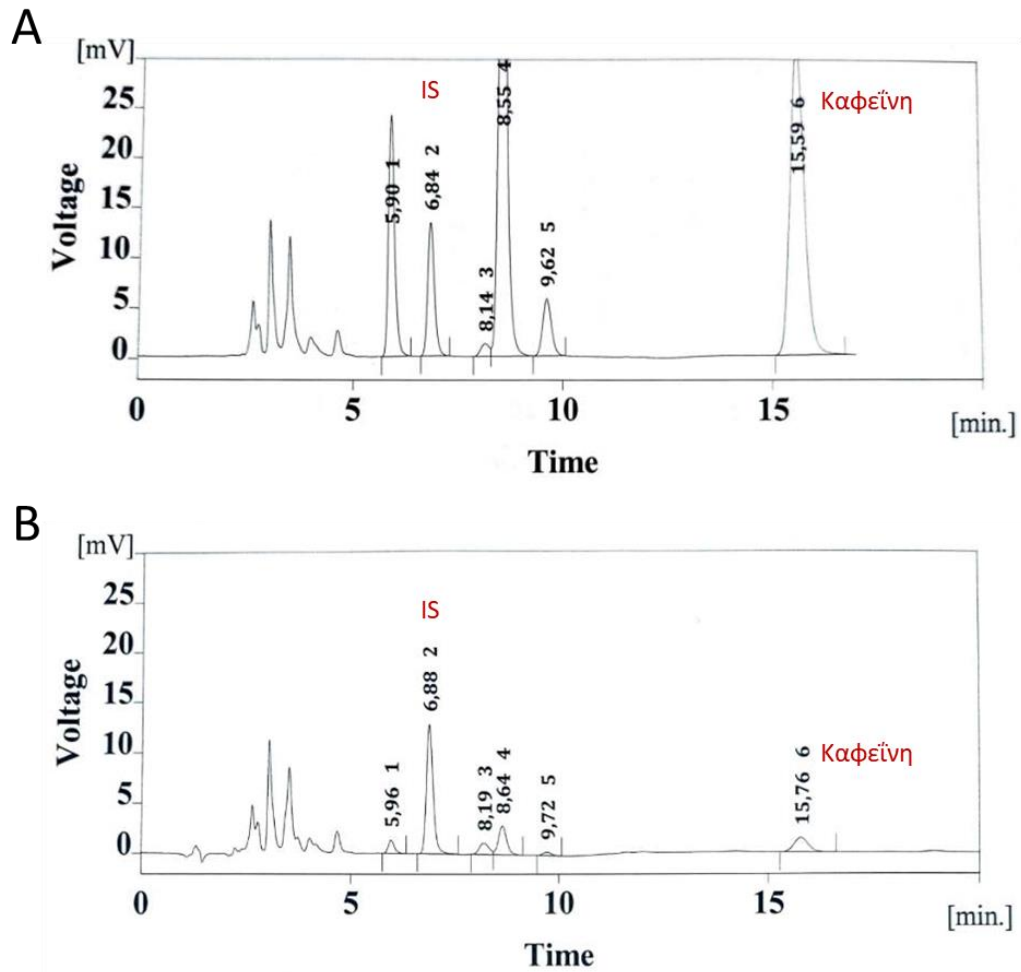
<https://freader.ekt.gr/eadd/index.php?doc=47277&lang=el>

Πριν την εισαγωγή του δείγματος προηγείται καθαρισμός της βαλβίδας με απιονισμένο νερό και μετά το τέλος της ανάλυσης υδρόλουτρο για 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπόλειμμα από την χρωματογραφική στήλη.

Αποτελέσματα αναλυτικής μεθόδου- Ανάλυση χρωματογραφήματος

Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνουμε με την ολοκλήρωση της ανάλυσης έχουν την μορφή που απεικονίζεται στη Εικόνα 16. Η κορυφή 2 αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο, με χρόνο έκλουσης τα 7 λεπτά, ενώ η κορυφή 6 αντιστοιχεί στην καφεΐνη, με χρόνο έκλουσης τα 16 λεπτά. Οι άλλες ευδιάκριτες κορυφές 1, 4 και 5 αντιστοιχούν στους τρεις βασικούς μεταβολίτες της καφεΐνης 3,7 μεθυλοξανθίνη, 1,7μεθυλοξανθίνη και 1,3μεθυλοξανθίνη. Ο ψηφιακός επεξεργαστής του αναλυτή υπολογίζει το εμβαδόν

κάτω από κάθε κορυφή καθώς και τον ακριβή χρόνο έκλουσης. Με βάση τα αποτελέσματα του ψηφιακού επεξεργαστή και την κατάλληλη επεξεργασία από τον ερευνητή παρασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης και στη συνέχεια πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός της καφεΐνης στα άγνωστα δείγματα ορού.



Εικόνα 16: Χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση spiked δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης για την κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης. A: ανάλυση δείγματος με συγκέντρωση καφεΐνης 10µg/ml. B: ανάλυση δείγματος με συγκέντρωση καφεΐνης 0,5µg/ml. Παρατηρείται διαφορά στο ύψος και το εμβαδόν της κορυφής της καφεΐνης (κορυφή 6) λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης στα δύο δείγματα. Αντίθετα, για το εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS) τα αποτελέσματα είναι ίδια καθώς και στα δύο δείγματα έχει προστεθεί η ίδια ποσότητα.

Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Βασικοί παράμετροι για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου αποτελούν οι εξής (Φαναρά et al., 2013):

- **Ειδικότητα:** η ικανότητα της μεθόδου να μετρά μόνο τις προς προσδιορισμό ουσίες. Με την επιλογή της κατάλληλη κινητής και σταθερής φάσης επιτεύχθηκε υψηλή ειδικότητα προσδιορισμού της καφεΐνης και των τριών κύριων μεταβολιτών της.
- **Γραμμικότητα:** αναφέρεται στη γραμμική εξάρτηση μεταξύ της μετρούμενης ιδιότητας (ύψος της κορυφής και του εμβαδού κάτω από αυτή της καφεΐνης) και της συγκέντρωσης της ουσίας (της καφεΐνης). Ελέγχθηκε με πρότυπα διαλύματα σε 5 επίπεδα συγκέντρωσης και εκφράζεται με τον συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2) ο οποίος πρέπει να προσεγγίζει τη μονάδα. Για την πρότυπη καμπύλη που παρασκευάστηκε κατά την πειραματική διαδικασία υπολογίσθηκε το $R^2=0,9996$.
- **Ακρίβεια και επαναληψιμότητα:** προσδιορίζονται με επαναληπτική ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν γνωστές ποσότητες της αναλυόμενης ουσίας (δείγματα ελέγχου - Quality controls).
- **Σταθερότητα:** Είναι απαραίτητο να δειχθεί ότι υπάρχει σταθερότητα του δείγματος και των προτύπων διαλυμάτων.
- **Εναισθησία:** Δυνατότητα αναγνώρισης μικρών αλλαγών στην συγκέντρωση της ουσίας. Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης έχει προσδιοριστεί σε προηγούμενα πειράματα και επανελέγχθηκε για τον παρόν πείραμα

Παρασκευή εσωτερικού προτύπου

Το εσωτερικό πρότυπο (Internal Standard, IS) στην αναλυτική χημεία είναι μια χημική ουσία που προστίθεται σε σταθερή ποσότητα τόσο στα άγνωστα δείγματα όσο και στα δείγματα ορού με καθορισμένες συγκεντρώσεις των μεταβολιτών (στο εξής θα αναφέρονται ως spiked δείγματα) για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας γίνεται με βάση την αναλογία του σήματος (ύψος της κορυφής της χρωματογραφικής καμπύλης ή εμβαδόν κάτω από την καμπύλη, Area Under the Curve, AUC) που δίνει η ουσία αυτή προς το σήμα που δίνει το εσωτερικό πρότυπο. Με αυτόν τον τρόπο συνεκτιμάται οποιαδήποτε απώλεια της αναλυόμενης ουσίας κατά την προετοιμασία του δείγματος ή την εισαγωγή του στον αναλυτή. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, επειδή η ποσότητα του IS που προστίθεται στο δείγμα είναι σε κάθε πείραμα η ίδια, η τιμή του σήματος του αναλυτή (ύψος κορυφής, AUC) κατά την ανάλυση του IS θα πρέπει να παρουσιάζει διακύμανση <20% από την τιμή αναφοράς. Μεγάλη απόκλιση στις τιμές του σήματος κατά την ανάλυση του IS μαρτυρά κάποιο τεχνικό πρόβλημα κατά τη διαδικασία της ανάλυσης (Skoog et al., 1998).

Στο παρακάτω πείραμα ως πρότυπο χρησιμοποιήθηκε παρακεταμόλη 66μΜ. Παρασκευάστηκε αναμιγνύοντας 132μl παρακεταμόλης από πυκνό διάλυμα (stock solution) 10mM με 1868μl ύδατος.

Παρασκευή κινητής φάσης

Ανάμειξη σε δοχείο 160ml dH₂O, 160μl οξικού οξέος (CH₃COOH), 40ml μεθανόλης (MeOH) και 4ml ακετονιτριλίου (AcN) (80/20/2 v/v).

Παρασκευή πυκνού διαλύματος καφεΐνης (caffeine stock solution)

Αρχικά, παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα καφεΐνης 100μg/ml και μετά με τις κατάλληλες αραιώσεις 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα καφεΐνης 50μg/ml, 20μg/ml, 10μg/ml, και 5μg/ml, αντίστοιχα.

Κατασκευή Καμπύλης Βαθμονόμησης

Η κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (πρότυπη καμπύλη) είναι απαραίτητη για τον ποσοτικό προσδιορισμό της καφεΐνης στα δείγματα ορού. Η καμπύλη

βαθμονόμησης κατασκευάσθηκε χρησιμοποιώντας πέντε συγκεντρώσεις καφεΐνης με σκοπό να ελεγχθεί η γραμμική συσχέτιση μεταξύ των λόγων [εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής της καφεΐνης]/[εμβαδόν χρωματογραφικής κορυφής του IS] και των αντιστοίχων συγκεντρώσεων της καφεΐνης. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 0,50-10,00μg/mL παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη δειγμάτων ορού με πυκνά διαλύματα των ουσιών και προσθήκη του εσωτερικού προτύπου. Τα δείγματα βαθμονόμησης εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης σύμφωνα με την εξίσωση $y=ax+b$. Η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης πιστοποιήθηκε από την τιμή του συντελεστή (r^2) της παλινδρόμησης και μέσω του εκ νέου υπολογισμού (backcalculation) των συγκεντρώσεων των δειγμάτων βαθμονόμησης βάσει της ήδη υπολογισθείσας εξίσωσης.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

1. Παρασκευή spiked δειγμάτων: αναμειγνύονται 10μl από κάθε πυκνό διάλυμα καφεΐνης με 90μl ορό αρουραίου σε φιαλίδια erpendorf για την παρασκευή δειγμάτων spiked 10μg/ml, 5μg/ml, 2μg/ml, 1μg/ml, και 0,5μg/ml, αντίστοιχα
2. Προσθήκη 50μl εσωτερικού προτύπου (IS) σε κάθε spiked δείγμα
3. Ανάδευση με vortex
4. Μεταφορά σε δοκιμαστικούς σωλήνες
5. Προσθήκη 4ml οργανικού διαλύτη
6. Ανάμιξη σε vortex για 1 λεπτό
7. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά
8. Απομόνωση υπερκειμένου και μεταφορά σε δοχεία για εξάτμιση
9. Εξάτμιση με θέρμανση υπό ρεύμα αζώτου
10. Επαναδιαλυτοποίηση/ανασύσταση με 100μl κινητής φάσης
11. Μεταφορά σε φιαλίδια erpendorf
12. Εισαγωγή στη βαλβίδα εισαγωγής του χρωματαγράφου με σύριγγα

Προκατεργασία Δειγμάτων

Η προκατεργασία των δειγμάτων ούρων έγινε σύμφωνα με μέθοδο που είχε ήδη αναπτυχθεί στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας (Begas et al., 2007). Συγκεκριμένα:

1. Μεταφορά 100μl ορού σε φιαλίδια erpendorf
2. Προσθήκη 50μl IS
3. Ανάδευση με vortex
4. Μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα
5. Προσθήκη 4ml οργανικού διαλύτη
6. Ανάμειξη σε vortex για 1 λεπτό
7. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά
8. Απομόνωση υπερκειμένου και μεταφορά σε δοχεία για εξάτμιση
9. Εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου
10. Επαναδιαλυτοποίηση/ανασύσταση με 100μl κινητής φάσης
11. Μεταφορά σε φιαλίδια erpendorf
12. Εισαγωγή στη βαλβίδα εισαγωγής του χρωματαγράφου με σύριγγα

Η ποσότητα του ορού που απομονώθηκε από κάποια δείγματα αίματος ήταν μικρότερη των 100μl λόγω δυσκολιών κατά την αιμοληψία. Σε αυτές τις περιπτώσεις έγινε συμπλήρωση του όγκου του δείγματος με ύδωρ μέχρι τα 100μl. Μετά το πέρας της ανάλυσης, έγινε αναγωγή της ευρεθείσας συγκέντρωσης καφεΐνης στον αρχικό όγκο του δείγματος.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τον υπολογισμό των φαρμακοκινητικών παραμέτρων slope ημιαλγοριθμικής παράστασης, k_{el} , AUC, $T_{1/2}$, T_{max} , C_{max} , όγκος κατανομής (V_d) και κάθαρση (Cl) χρησιμοποιήθηκε το Excel.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καμπύλη βαθμονόμησης

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Αποτελέσματα ανάλυσης spiked δειγμάτων που προκύπτουν από αραιώση stock solutions και υπολογισμού του λόγου E_{CAF}/E_{IS} .

Πυκνό διάλυμα (stock) (μg/ml)	Spiked δείγμα (10μl stock+ 90μl ορός) (μg/ml)	E_{CAF} (εμβαδόν καφεΐνης)	E_{IS} (εμβαδόν εσωτερικού προτύπου)	E_{CAF}/E_{IS}
100	10	721,909	148,434	4,85
50	5	298,675	119,609	2,50
20	2	166,803	167,326	1,00
10	1	59,596	135,135	0,44
5	0,5	34,080	144,726	0,24

Από τα παραπάνω αποτελέσματα κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης με σκοπό τον έλεγχο της γραμμικότητας της συσχέτισης μεταξύ του λόγου του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής της καφεΐνης προς το εμβαδόν της κορυφής του εσωτερικού προτύπου (E_{CAF}/E_{IS}), έναντι των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων της καφεΐνης σε δείγματα ορού ελεύθερου καφεΐνης (blank spiked samples).

Η καμπύλη βαθμονόμησης για την καφεΐνη ήταν γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων 0,50-10,00 μg/mL και περιγραφόταν από την εξίσωση $y=0,489x-0,0041$ (Εικόνα 17). Η εξίσωση της βέλτιστης ευθείας της γραφικής παράστασης χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της καφεΐνης των δειγμάτων ορού μετά από χορήγηση της ουσίας IP και IV.

Εικόνα 17: Καμπύλη βαθμονόμησης της καφεΐνης.

Έλεγχος γραμμικότητας

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας της καμπύλης βαθμονόμησης και κατά συνέπεια της αξιοπιστίας και ακρίβειας του ποσοτικού προσδιορισμού της καφεΐνης με βάση την καμπύλη χρησιμοποιούμε την μέθοδο «back calculation» για τα spiked δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Σύμφωνα με αυτή τη προσέγγιση, αντικαθιστούμε στην εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης τις τιμές του y (E_{caf}/E_{is}) που προέκυψαν από την ανάλυση κάθε spiked δείγματος και υπολογίζουμε εκ νέου τη συγκέντρωση. Όσο μικρότερη είναι η απόκλιση της υπολογισθείσας τιμής (RECAL) από τη συγκέντρωση του spiked δείγματος τόσο ακριβέστερη είναι η ανάλυση (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα των «back calculated» spiked δειγμάτων που επιβεβαιώνουν την γραμμικότητα και την αξιοπιστία την καμπύλης βαθμονόμησης από τη σύγκριση των τιμών των στηλών «spiked δείγματα» και «RECAL».

Πυκνό διάλυμα (stock) (μg/ml)	Spiked δείγμα (10μl stock+ 90μl ορός) (μg/ml)	E_{CAF} (εμβαδόν καφεΐνης)	E_{IS} (εμβαδόν εσωτερικού προτύπου)	E_{CAF}/E_{IS}	RECAL
100	10	721,909	148,434	4,85	9,95
50	5	298,675	119,609	2,50	5,11
20	2	166,803	167,326	1,00	2,05
10	1	59,596	135,135	0,44	0,91
5	0,5	34,080	144,726	0,24	0,49

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χορήγησης IP

Μετά από χορήγηση καφεΐνης IP πραγματοποιήθηκε αιμοληψία στα 15', στη 1, στις 2, 4, 8, 12 και 24 ώρες. Από την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων προέκυψαν οι τιμές εμβαδού της καφεΐνης, E_{CAF} , και του IS, E_{IS} , από τις οποίες υπολογίστηκε ο λόγος των εμβαδών E_{CAF}/E_{IS} . Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καφεΐνης με την εφαρμογή της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης $y = 0,489x - 0,0041$ (όπου $y = E_{CAF}/E_{IS}$) (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χορήγησης IP, υπολογισμού λόγου E_{CAF}/E_{IS} και ποσοτικού προσδιορισμού συγκέντρωσης καφεΐνης.

Χρόνος αιμοληψίας	E_{CAF} (mV x sec)	E_{IS} (mV x sec)	E_{CAF}/E_{IS}	Συγκέντρωση καφεΐνης (μg/mL)
15min	136,046	126,317	1,08	2,210
1h	167,292	110,488	1,51	3,100
4h	37,549	133,172	0,28	0,580
8h	5,186	113,647	0,05	0,100
12h	1,713	100,862	0,02	0,043
24h	2,674	165,115	0,02	0,040

Όπως αναφέρθηκε, λόγω πρακτικών προβλημάτων κατά την αιμοληψία, ο όγκος του δείγματος του ορού σε κάποια από τα προς ανάλυση δείγματα ήταν μικρότερος από 100μL με αποτέλεσμα να χρειασθεί συμπλήρωση του όγκου με H₂O. Στις περιπτώσεις αυτές χρειάστηκε να υπολογισθεί η πραγματική συγκέντρωση καφεΐνης ανάγοντας την ευρεθείσα συγκέντρωση καφεΐνης του αραιωμένου δείγματος (Πίνακας 3) στον αρχικό όγκο ορού που είχε ληφθεί (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα υπολογισμού τελικής συγκέντρωσης καφεΐνης ανάγοντας την ευρεθείσα συγκέντρωση καφεΐνης του αραιωμένου δείγματος στον αρχικό όγκο ορού που είχε ληφθεί.

Χρόνος αιμοληψίας	Ευρεθείσα συγκέντρωση καφεΐνης (μg/mL)	Όγκος ορού (μL)	Τελική συγκέντρωση καφεΐνης (μg/mL)
15min	2,210	60	3,680
1h	3,100	80	3,875
4h	0,580	80	0,725
8h	0,100	100	0,100
12h	0,043	80	0,054
24h	0,040	100	0,040

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα κατασκευάστηκε η παρακάτω φαρμακοκινητική καμπύλη της καφεΐνης μετά από χορήγηση IP (Εικόνα 18):

Εικόνα 18 : Φαρμακοκινητική καμπύλη καφεΐνης για χορήγηση IP.

Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων χορήγησης IV

Ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία και για τα δείγματα που λήφθηκαν μετά από ενδοφλέβια χορήγηση και αιμοληψία μετά από 15', 45', 1, 2, 4 και 8 ωρών, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της καφεΐνης (Πίνακας 5).

Πίνακας 5: Αποτελέσματα τελικών συγκεντρώσεων καφεΐνης δειγμάτων χορήγησης IV.

Χρόνος	Τελική συγκέντρωση καφεΐνης ($\mu\text{g/mL}$)
15min	7,83
45min	4,78
1h	2,05
2h	1,48
4h	0,78
8h	0,77

Αντίστοιχα, κατασκευάστηκε η φαρμακοκινητική καμπύλη της καφεΐνης για την χορήγηση IV (Εικόνα 19):

Εικόνα 19: Φαρμακοκινητική καμπύλη καφεΐνης για χορήγηση IV.

Υπολογισμός AUC

Για τον υπολογισμό της AUC χρησιμοποιήθηκε ο κανόνας των τραπεζοειδών. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτόν, υπολογίστηκε ξεχωριστά το εμβαδόν μεταξύ των χρονικών στιγμών δύο διαδοχικών αιμοληψιών χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\Delta AUC^{1-2} = \frac{(Cp_2 + Cp_1)}{2} \cdot (t_2 - t_1)$$
$$\Delta AUC^{2-3} = \frac{(Cp_3 + Cp_2)}{2} \cdot (t_3 - t_2)$$

κ.ο.κ.

Για τον υπολογισμό του τμήματος από την τελευταία αιμοληψία μέχρι τη στιγμή που η συγκέντρωση της καφεΐνης έφθασε να είναι μηδενική χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\Delta AUC^{t_{last} - \infty} = \frac{Cp_{last}}{k}$$

όπου k: elimination rate constant (συμβολίζεται και ως K_{el}), και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$k_{el} = - \text{slope} \times 2,303$$

Το slope αναφέρεται στην κλίση της καμπύλης που προκύπτει από την γραφική παράσταση των λογαριθμισμένων τιμών της συγκέντρωσης καφεΐνης έναντι του χρόνου (ημιλογαριθμική παράσταση).

Το άθροισμα όλων των τμημάτων κάτω από την καμπύλη δίνει το συνολικό AUC της φαρμακοκινητικής καμπύλης.

Υπολογισμός όγκου κατανομής (Vd)

Ο όγκος κατανομής υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$Vd (L) = \text{Dose (mg/kg)} / [k_{el} (\mu\text{g/mL}) \times \text{AUC (mg} \times \text{h/L)}]$$

Υπολογισμός κάθαρσης (Cl)

Η κάθαρση υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$Cl (L/kg/h) = \text{Dose (mg/kg)} / \text{AUC (mg} \times \text{h/L)}$$

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υπολογισμού των φαρμακοκινητικών παραμέτρων AUC, Vd, και Cl για τις περιπτώσεις ενδοφλέβιας και ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης.

Χορήγηση IP

Υπολογίσθηκαν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι AUC, Vd, και Cl για την περίπτωση ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης. Για τον σκοπό αυτό έγινε αρχικά λογαρίθμηση των τιμών συγκεντρώσεων της καφεΐνης (που εμφανίζονται στον πίνακα 4) ώστε να υπολογισθεί η κλίση (slope) της καμπύλης Log[καφεΐνη] έναντι του χρόνου (πίνακας 6) με στόχο τον υπολογισμό της σταθεράς kel_{iv} .

Πίνακας 6: Αποτελέσματα υπολογισμού AUC μεταξύ δύο διαδοχικών αιμοληψιών και λογαριθμισμένης συγκέντρωσης καφεΐνης μετά από χορήγηση IP.

Χρόνος	[καφεΐνη] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Log[καφεΐνη]	Επιμέρους εμβαδόν (Area)($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)
15min	3,680	0,5659	
1h	3,875	0,5883	2,833
4h	0,725	-0,1400	6,900
8h	0,100	-1,0000	1,650
12h	0,054	-1,2676	0,308
24h	0,040	-1,3980	0,564

Με βάση τα παραπάνω βρέθηκε ότι:

$$\text{Slope} = -0,08778$$

$$Kel_{ip} = -(-0,08778 \times 2,303) = 0,202148$$

$$\text{Area of last part} = 0,1979 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$$

Επομένως, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι υπολογίζονται ως κάτωθι:

$$\text{AUC}_{ip} = 12,453 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$$

$$\text{Vd} = 1,986 \text{ ml}$$

$$\text{Cl} = 0,402 \text{ L}/\text{kg}/\text{h}$$

Χορήγηση IV:

Υπολογίσθηκαν οι φαρμακοκινητικές παράμετροι AUC, Vd, και Cl για την περίπτωση ενδοφλέβιας χορήγησης. Για τον σκοπό αυτό έγινε αρχικά λογαρίθμηση των τιμών συγκεντρώσεων της καφεΐνης (που εμφανίζονται στον πίνακα 5) ώστε να υπολογισθεί η κλίση (slope) της καμπύλης Log[καφεΐνη] έναντι του χρόνου (πίνακας 7) με στόχο τον υπολογισμό της σταθεράς $k_{el_{iv}}$.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα υπολογισμού AUC μεταξύ δύο διαδοχικών αιμοληψιών και λογαριθμισμένης συγκέντρωσης καφεΐνης μετά από χορήγηση IV.

Χρόνος	[καφεΐνη] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Log[καφεΐνη]	Επιμέρους εμβαδόν (Area)($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)
15min	7,83	0,8938	
45min	4,78	0,6794	3,153
1h	2,05	0,3118	0,854
2h	1,48	0,1703	1,765
4h	0,78	-0,1079	2,260
8h	0,77	-0,1135	3,100

Με βάση τα παραπάνω βρέθηκε ότι:

$$\text{Slope} = -0,11277$$

$$k_{el_{iv}} = -(-0,11277 \times 2,303) = 0,259$$

$$\text{Area of last part} = 11,93617 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$$

Επομένως, οι φαρμακοκινητικές παράμετροι υπολογίζονται ως κάτωθι:

$$\text{AUC}_{iv} = 23,067 \mu\text{g} \times \text{h}/\text{mL}$$

$$\text{Vd} = 0,334 \text{ mL}$$

$$\text{Cl} = 0,087 \text{ L}/\text{kg}/\text{h}$$

Υπολογισμός $T_{1/2}$, T_{max} , C_{max}

$$T_{1/2_{iv}} = 0,693/k_{el_{iv}} = 0,693/0,259 = 2,6h$$

$$T_{1/2_{ip}} = 0,693/k_{el_{ip}} = 0,693/0,202 = 3,4h$$

Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση, η υψηλότερη συγκέντρωση την καφεΐνης παρατηρείται τη στιγμή της έγχυσης καθώς η ουσία εισάγεται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος ($C_{max}=7,83 \mu\text{g/mL}$). Κατά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση η μέγιστη συγκέντρωση ($C_{max}=3,10 \mu\text{g/mL}$) παρατηρείται κατά την πρώτη ώρα ($T_{max_{ip}}=1h$) μετά την έγχυση. Αυτό οφείλεται στο χρόνο που απαιτείται για τη μεταφορά της ουσίας από το περιτόναιο στην κυκλοφορία του αίματος.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα αποτελέσματα υπολογισμού των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της καφεΐνης χορηγούμενης μέσω ενδοπεριτοναϊκής και ενδοφλέβιας οδού.

Πίνακας 8: Φαρμακοκινητικές παράμετροι καφεΐνης χορηγούμενης μέσω διαφορετικών οδών.

	<i>Ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση</i>	<i>Ενδοφλέβια χορήγηση</i>
k_{el}	0,202	0,258
AUC ($\mu\text{g} \times \text{h/mL}$)	12,453	23,067
Vd (mL)	1,986	0,334
Cl (L/kg/h)	0,402	0,087
$T_{1/2}$ (h)	3,4	2,6
T_{max} (h)	1,0	t_0
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	3,10	7,83

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με την ολοκλήρωση του πειράματος στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν βασικές φαρμακοκινητικές παράμετροι της καφεΐνης με χορήγηση από δύο διαφορετικές οδούς, ενδοφλέβια και ενδοπεριτοναϊκά. Η χρήση αρουραίων ως πειραματόζωα, οργανισμοί μοντέλα για τον άνθρωπο με παρόμοιους ή/και κοινούς μηχανισμούς και μεταβολικά μονοπάτια, βοηθά στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για την φαρμακοκινητική της καφεΐνης. Με την ολοκλήρωση της παραπάνω πειραματικής εργασίας επετεύχθη η πλήρης κατανόηση της έννοιας της φαρμακοκινητικής και ο αποτελεσματικός σχεδιασμός και υλοποίηση μιας φαρμακοκινητικής μελέτης.

Βιβλιογραφικά, είναι γνωστό ότι οι τιμές του K_e μιας ουσίας δεν επηρεάζεται από την οδό χορήγησης (Lau et al., 1995). Η μικρή διαφορά τιμών K_e που παρατηρήθηκε μεταξύ της ενδοφλέβιας και της ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης πιθανώς να οφείλεται στο μικρό αριθμό δείγματος ($n=2$). Σε μεγαλύτερο δείγμα η διαφορά αυτή θα ήταν στατιστικά μη σημαντική.

Άλλη μια διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο οδών χορήγησης είναι ο χρόνος ημίσειας ζωής. Και οι δύο τιμές είναι εντός των προβλεπόμενων ορίων και η διαφορά τους πιθανώς να οφείλεται στις διαφορετικές τιμές V_d και Cl που υπολογίστηκαν για κάθε οδό (Lau et al., 1995). Επιπλέον, κατά την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα ώστε η καφεΐνη να εισαχθεί στην συστηματική κυκλοφορία σε αντίθεση με την ενδοφλέβια χορήγηση κατά την οποία ουσία εισάγεται απευθείας στη συστηματική κυκλοφορία. Όσον αφορά στην βιοδιαθεσιμότητα, υψηλό ποσοστό της αρχικής δόσης εισάγεται στην συστηματική κυκλοφορία, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η καφεΐνη μεταβολίζεται σε μη αξιοσημείωτο βαθμό από το ήπαρ κατά την πρώτη διέλευσή της από αυτό.

Γενικά, η περιτοναϊκή οδός χορήγησης αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση που μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματική και ασφαλής. Ωστόσο, μέχρι και σήμερα βρίσκει εφαρμογή μόνο σε πειραματικές μελέτες και, σε περιορισμένες περιπτώσεις για την χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων σε πάσχουσες από καρκίνων των ωοθηκών (Swart et al., 2018).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaron Z. Garza; Sharon B. Park; Remek Kocz (2022). *Drug Elimination* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Begas E, Kouvaras E., Tsakalof A., Papakosta S.and E. K. Asprodini(2007). *In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthineoxidase activities in a Greek population sample by theRP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios*. Biomed. Chromatogr. 21: 190–200.
- Harvey R., Whalen K., Finken R., T. A. Panavelil (2015) *Φαρμακολογία, Lippincott*. Επιστημονικές εκδόσεις ΠαρισιανούΑ.Ε.
- Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research (2001) *Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations* Washington (DC): National Academies Press (US).
- Kalra A, Wehrle C. J. (2022). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Peritoneum*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Lau C.E. , Ma F.,Falk J.L. (1995) *Oral and IP caffeine pharmacokinetics under a chronic food-limitation condition* Pharmacology Biochemistry and Behavior, Volume 50, Issue 2,Pages 245-252.
- Nikolin B., Imamović B., Medanhodžić-Vuk S., Sober M. (2004) *High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses* Bosn J Basic Med Sci(2):5-9 doi: 10.17305.
- Pannu H. K., Oliphant M. (2015). *The subperitoneal space and peritoneal cavity: basic concepts*. Abdominal Imaging40(7): 2710–2722.
- Shewood L. (2016) *Εισαγωγή στην φυσιολογία του ανθρώπου*, Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
- Shoyaib A. A., Archie S.A., Karamyan V. T. (2019) *Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?* Pharmaceutical Researchvolume37,Articlenumber:12.
- Skoog, Douglas A. (1998). *Principles of Instrumental Analysis: Introduction*, pp. 18. Harcourt Brace. ISBN 0-03-002078-6

- Swart AM, Burdett S, Ledermann J, Mook P, Parmar MK (2008). *Why i.p. therapy cannot yet be considered as a standard of care for the first-line treatment of ovarian cancer: a systematic review* Ann. Oncol. **19** (4): 688–95 doi:10.1093/annonc/mdm518. PMID 18006894
- Μπουνίτση Μ. (2020) *Ανάλυση φυτικών προϊόντων με προηγμένες μεθόδους και διερεύνηση της επίδρασης τους στην in vivo δραστικότητα του μεταβολικού ενζύμου CYP1A2*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/47277>
- Φαναρά Ε. (2013) *Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού κλιοκινόλης και προσμίξεων της σε σκευάσματα αλοιφής*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.