



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας
Εργαστήριο Βιοφαρμακευτικής - Φαρμακοκινητικής

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΟΞΥΚΥΚΛΙΝΗΣ ΜΕ
ΒΟΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ:
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΜΗ ΤΥΠΙΚΗΣ ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΚΛΙΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ**

Διπλωματική Εργασία
Απόστολος Κασσελούρης

Φαρμακοποιός, μεταπτυχιακός φοιτητής

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μαρκαντώνη – Κυρούδη Σοφία

Αθήνα, Ιούλιος 2022

Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια και διευθύντρια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών Κλινικής Φαρμακευτικής κυρία Σοφία Κυρούδη, καθώς και την υπεύθυνη καθηγήτρια του εργαστηρίου Βιοφαρμακευτικής - Φαρμακοκινητικής, κυρία Γεωργία Βαλσαμή, για την αμέριστη στήριξη, για το ενδιαφέρον, την ευγένεια και τον χρόνο που αφιέρωσαν για την άρτια διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στην συμφοιτήτρια και συνεργάτιδά μου στο εργαστήριο Κωνσταντίνα Νούσιου, με την οποία είχαμε μία υποδειγματική συνεργασία. Κατά τη διάρκεια του περασμένου έτους καταφέραμε να μάθουμε ο ένας από τον άλλο και να φέρουμε εις πέρας με επιτυχία ένα απαιτητικό εργαστηριακό έργο, πάνω στο οποίο είχαμε ελάχιστη εμπειρία.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βιομηχανικής Φαρμακευτικής Κωνσταντίνα Μαντά, καθώς και τις διδακτορικές φοιτήτριες Παρασκευή Παπακυριακοπούλου και Ελμίνα Σαϊτάνη για την επιμέλεια και τον χρόνο που αφιέρωσαν στο να μου εξηγήσουν τους κανόνες του εργαστηρίου και να μου μεταδώσουν το πνεύμα της εργαστηριακής πρακτικής.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην εκφράσω εκ βάθους καρδιάς την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, η οποία μου προσέφερε την απαραίτητη ψυχική υποστήριξη και ενθάρρυνση ώστε να δώσω τον καλύτερό μου εαυτό στην παρούσα εργασία, πέρα των υπόλοιπων ακαδημαϊκών μου υποχρεώσεων.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαρκαντώνη – Κυρούδη Σοφία, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Βαλσαμή Γεωργία, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Καραλής Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
A. Θεωρητικό Μέρος.....	8
A1. Δοξυκυκλίνη	8
A1.1 Γενικά στοιχεία (Ανακάλυψη και χημική δομή).....	8
A.1.2 Σχέσεις δομής-δράσης	10
A.1.3 Μηχανισμός Δράσης	11
A.1.4 Ενδείξεις και Χρήση	12
A.1.4.1 Θεραπεία.....	13
A.1.5 Φαρμακοκινητική δοξυκυκλίνης.....	15
A.1.5.1 Απορρόφηση	15
A.1.5.1.1 Επίδραση του φαγητού στην απορρόφηση.....	15
A.1.5.1.2 Διαπερατότητα.....	16
A.1.5.2 Κατανομή	16
A.1.5.3 Βιομετατροπή και απέκκριση	18
A2. Πρωτεϊνική σύνδεση	20
A.2.1 Γενικά	20
A.2.2 Αλβουμίνη	20
A.2.3 Πρωτεϊνική σύνδεση δοξυκυκλίνης	21
A.2.4 Διαφορετικές μορφές πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	21
A.2.5 Μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση	22
A.2.5.1 Σημασία μελέτης μη τυπικής μη γραμμικής κινητικής.....	23
A.2.6 Σημασία Μελέτης Πρωτεϊνικής Σύνδεσης	24
A.2.7 Προσδιορισμός παραμέτρων πρωτεϊνικής σύνδεσης – Μοντέλο Scatchard ..	25
A.2.8 Μέθοδοι Μελέτης Πρωτεϊνικής Σύνδεσης	27
A.2.8.1 Διαχωριστικές μέθοδοι	28
A.2.8.1.1 Μέθοδοι εκτός δικτύου:	28
A.2.8.1.2 Μέθοδοι εντός ή/και εκτός δικτύου (μέθοδοι εκχύλισης):.....	29
A.2.8.1.3 Μέθοδοι εντός δικτύου	29
A.2.8.2 Μη διαχωριστικές μέθοδοι.....	30
A.2.9 Διαπίδυση σε ισορροπία.....	31
B. Πειραματικό Μέρος	35
B.1 Σκοπός της εργασίας	35
B.2 Οργανολογία	35
B.3 Υλικά	35
B.3.1 Φάρμακα και Φαρμακοτεχνικές μορφές.....	35
B.3.2 Αντιδραστήρια- Μικροόργανα.....	36
B.4 Πείραμα Πρωτεϊνικής Σύνδεσης Δοξυκυκλίνης	36

B.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων	36
B.4.1.1 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M, pH 7.4 (NaH ₂ PO ₄ -H ₃ PO ₄):	36
B.4.1.2 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης δοξυκυκλίνης (stock solution):	36
B.4.1.3 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας δοξυκυκλίνης (working solutions): ...	37
B.4.1.4 Παρασκευή διαλυμάτων ανθρώπινης και βόειας αλβουμίνης-δοξυκυκλίνης:	37
B.4.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς.....	37
B.4.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων δοξυκυκλίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 0,05M.....	37
B.4.3 Πρωτόκολλο πειράματος πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	37
B.4.3.1 Μεμβράνες.....	37
B.4.3.2 Προετοιμασία μεμβρανών.....	38
B.4.3.3 Προετοιμασία κυττάρων και συναρμολόγηση φορέα κυττάρων:.....	38
B.4.3.4 Πλήρωση κυττάρων και συλλογή δειγμάτων.	41
B.4.4 Διεξαγωγή τυφλού πειράματος και υπολογισμός του απαιτούμενου χρόνου για αποκατάσταση της ισορροπίας.....	42
B.4.4.1 Εκτίμηση κατακράτησης ουσίας από τη μεμβράνη.....	42
B.4.4.2 Υπολογισμός χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας	42
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
Γ.1 Χαρακτηριστικά Καμπύλης Αναφοράς.....	44
Γ.2 Αποτελέσματα τυφλού πειράματος και υπολογισμός του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας	45
Γ.2.1 Τυφλό πείραμα	45
Γ.2.2 Προσδιορισμός χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας της δοξυκυκλίνης στο κύτταρο.....	46
Γ.3 Αποτελέσματα Πρωτεϊνικής Σύνδεσης της Δοξυκυκλίνης	47
Γ.3.1 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 4% w/v	47
Γ.3.2 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 2% w/v	51
Γ.3.3 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v	54
Γ.4 Συζήτηση	59
Γ.4.1 Σύγκριση παραμέτρων σύνδεσης για τα διάφορα πειράματα	59
Γ.4.2 Σύγκριση ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ των πειραμάτων και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.....	60
Δ. Συμπεράσματα	63

Δ.1 Συμπεράσματα.....	63
Δ.2 Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα	63
Βιβλιογραφία	64

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται μελέτη και προσδιορισμός της κινητικής της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης με τη μέθοδο της διαπύδησης σε ισορροπία χρησιμοποιώντας α) BSA, β) HSA και γ) ανθρώπινο πλάσμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, με πρωτεύοντα στόχο την επιβεβαίωση ή όχι της ύπαρξης μη τυπικής μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης για το συγκεκριμένο φάρμακο.

Στο Θεωρητικό μέρος γίνεται παρουσίαση του θέματος της εργασίας και παρατίθενται γενικές πληροφορίες για την δοξυκυκλίνη με έμφαση στα φαρμακοκινητικά δεδομένα, την πρωτεϊνική σύνδεση και την μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση. Επιπρόσθετα γίνεται ειδική αναφορά στις διάφορες μεθόδους προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων, και κυρίως της μεθόδου διαπύδησης σε ισορροπία που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία.

Στο Πειραματικό μέρος γίνεται αναφορά στον σκοπό της εργασίας, στην οργανολογία, στα υλικά και επίσης παρατίθεται αναλυτική περιγραφή του πειράματος της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Στα Αποτελέσματα παρουσιάζονται αρχικά τα δεδομένα της καμπύλης αναφοράς και τα αποτελέσματα του τυφλού πειράματος και του πειράματος που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας. Στην συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης για τις διάφορες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, τα αποτελέσματα των διάφορων πειραμάτων συγκρίνονται μεταξύ τους και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Abstract

The purpose of the present postgraduate thesis was to study the kinetics of doxycycline protein binding using the equilibrium dialysis method with various concentrations of a) BSA, b) HSA and human plasma, in order to confirm that the drug exhibits atypical non-linear binding behavior.

The theoretical part of the study includes a review of data pertaining to doxycycline pharmacokinetics and protein binding, a brief description of atypical non-linear protein binding and the different methods used to determine drug binding to proteins, in particular the equilibrium dialysis method.

The experimental section of the thesis focuses on the purpose of the protein binding experiment, the instrumentation and the materials used, and details of the analytical procedure.

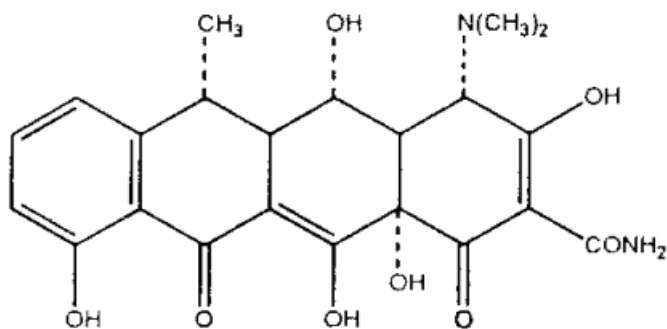
In the last section, data relating to the construction of the reference curve, the results of the blind experiment and the experiment used to determine the time needed to reach

equilibrium, are presented. Subsequently, the main outcomes for doxycycline's protein binding with the various protein preparations are shown and discussed. Finally, the results of the experiments are compared to each other and to the results of similar studies from bibliographic data.

A. Θεωρητικό Μέρος

A1. Δοξυκυκλίνη

A1.1 Γενικά στοιχεία (Ανακάλυψη και χημική δομή)

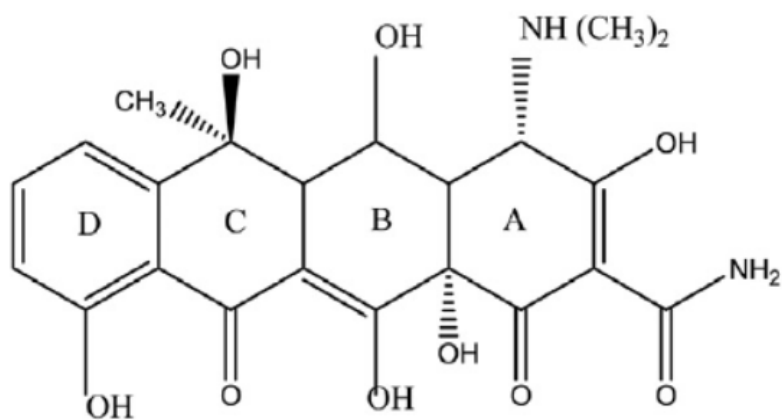


Εικόνα A-1: Χημική δομή δοξυκυκλίνης

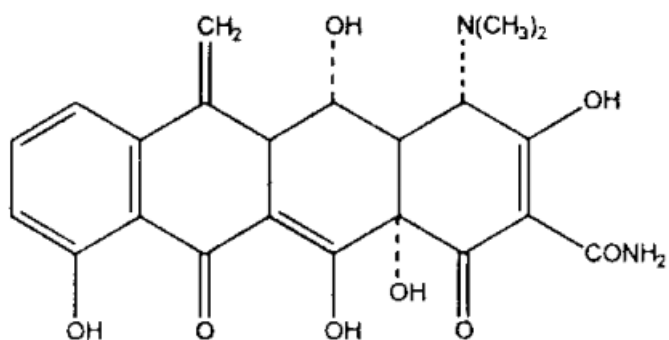
Η δοξυκυκλίνη (Εικόνα A-1), μία τετρακυκλίνη δεύτερης γενιάς, είναι ένα αντιβιοτικό φάρμακο ευρέος φάσματος που έλαβε άδεια κυκλοφορίας από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής το 1967 [1] - [2]. Οι αρχικές μελέτες που οδήγησαν στην ανακάλυψη και εισαγωγή της δοξυκυκλίνης στη θεραπευτική πράξη ανάγονται στα μέσα της δεκαετίας του 1950, οπότε ξεκίνησε και η αναζήτηση πιο ισχυρών και φαρμακολογικά δραστικών ημισυνθετικών τετρακυκλικών αντιβιοτικών με αφετηρία τις τετρακυκλίνες πρώτης γενιάς χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη (Εικόνα A-2) και τετρακυκλίνη [2]. Οι αρχικές προσπάθειες τροποποίησης της δομής αυτών των τετρακυκλινών δεν στέφθηκαν με επιτυχία, εξαιτίας της εγγενούς χημικής τους αστάθειας, η οποία οφειλόταν κατά κύριο λόγο στην 6-υδρόξυ ομάδα του μορίου τους. Η ανακάλυψη στα τέλη της δεκαετίας του 1950 ότι η 6-υδρόξυ ομάδα των τετρακυκλινών μπορούσε να αφαιρεθεί, οδήγησε στην παραγωγή του μορίου της μεθακυκλίνης (Εικόνα A-3), η οποία προέκυψε μετά από τροποποίηση του C δακτυλίου της οξυτετρακυκλίνης με αλογόνωση και αφυδάτωση στον άνθρακα 6. Η μεθακυκλίνη, μία 6-δεόξυ-τετρακυκλίνη, εμφάνιζε αυξημένη αντιβακτηριακή δραστηριότητα και μοναδικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Παρόλα αυτά δεν υποβλήθηκε ποτέ επίσημα για έγκριση από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες. Αντ' αυτού χρησιμοποιήθηκε ως πρόδρομη ουσία για την παραγωγή ενός αναλόγου με αξιοσημείωτη φαρμακολογική δραστηριότητα και υψηλή σταθερότητα: τη δοξυκυκλίνη [3], [2]. Η χημική ονομασία της δοξυκυκλίνης κατά IUPAC είναι: (4*S*,4*aR*,5*S*,5*aR*,6*R*,12*aR*)-4-(dimethylamino)-1,5,10,11,12a-pentahydroxy-6-methyl-3,12-dioxo-4a,5,5a,6-tetrahydro-4H-tetracene-2-carboxamide. Ο μοριακός της τύπος είναι C₂₂H₂₄N₂O₈ και το μοριακό της βάρος ισούται με 444,4 [4].

Η δοξυκυκλίνη είναι διαθέσιμη από του στόματος ως μονοϋδρικό άλας (doxycycline monohydrate) με μοριακό τύπο C₂₂H₂₄N₂O₈·H₂O και μοριακό βάρος 462.46, ως ημιϋδρικό υδροχλωρικό ημιαθανολικό άλας (doxycycline hyclate) με μοριακό τύπο (C₂₂H₂₄N₂O₈·HCl)₂·C₂H₆O·H₂O και μοριακό βάρος 1025.89 και ως άλας ασβεστίου

(doxycycline calcium) [5]. Η δοξυκυκλίνη είναι διαθέσιμη σε ενδοφλέβια σκευάσματα ως το doxycycline hyclate άλας της [3].



Εικόνα A-2: Οξυτετρακυκλίνη



Εικόνα A-3: Μεθακυκλίνη

A.1.2 Σχέσεις δομής-δράσης

Το μόριο των τετρακυκλινών αποτελείται από έναν γραμμικό τετρακυκλικό πυρήνα ναφθακενίου [η αρίθμηση στην εικόνα A-4], πάνω στον οποίο συνδέονται πολλών ειδών λειτουργικές ομάδες. Η πιο απλή δομικά τετρακυκλίνη η οποία παρουσιάζει μετρήσιμη αντιβακτηριακή δραστηριότητα είναι η 6-δεοξυ-6-διμεθυλοτετρακυκλίνη, και θεωρείται το ελάχιστο φαρμακοφόρο [Εικόνα A-4].

Η αντιβακτηριακή δράση των τετρακυκλινών οφείλεται σε ένα σύνολο κοινών λειτουργικών ομάδων, οι οποίες καθορίζουν επιπρόσθετα και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, καθώς και την ικανότητα δημιουργίας χηλικών συμπλόκων [Εικόνα A-5].

Αυτές οι λειτουργικές ομάδες είναι:

A) μία διμεθυλάμινο ομάδα στη θέση C4 ως 4S ισομερές. Με επιμερισμό σε 4R ισομερές μειώνεται η δράση ενάντια σε gram-αρνητικά βακτήρια.

B) Κετο-ενολικά ταυτομερή στις θέσεις C1 και C3 του δακτυλίου A.

Γ) μια εξωκυκλική ομάδα καρβονυλίου ή αμιδίου στη θέση C2.

Δ) μια ομάδα φαινόλης στη θέση C10 και μια δομή κετο-ενόλης στις θέσεις C11-C12 σε συνδυασμό με μια ομάδα 12a-υδροξυλίου.

Κατά κανόνα, η χημική τροποποίηση με προσθήκη υποκαταστατών στις θέσεις 1, 3, 4a, 10, 11, ή 12 ή η διαταραχή της ισορροπίας των ταυτομερικών μορφών είναι επιζήμια για την αντιβακτηριακή δραστηριότητα.

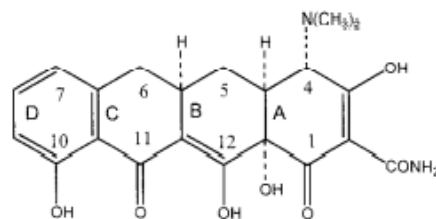
Παρόλα αυτά, η προσθήκη υποκαταστατών σε διάφορες θέσεις των δακτυλίων B, C και D είναι ανεκτή, και έχει οδηγήσει στην παρασκευή όλων των τετρακυκλινών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πρακτική.

Πιο συγκεκριμένα:

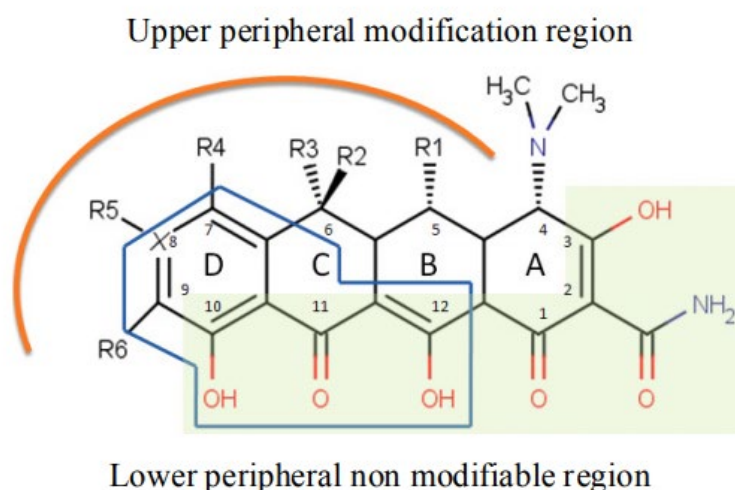
A) Υπάρχει η δυνατότητα τροποποίησης του αμιδίου στη θέση C2, με αποτέλεσμα ωστόσο την ελάττωση της ισχύος του νέου μορίου.

B) Οι θέσεις C5 και C9 μπορούν να τροποποιηθούν χημικά ώστε να προκύψουν παράγωγα με ποικίλη αντιβακτηριακή δράση.

Γ) Ο δακτύλιος D είναι ο πιο δεκτικός σε τροποποίηση. Οι ομάδες R4, R5 και R6 μπορούν να λάβουν υποκαταστάσεις που θα προσδώσουν συνολικά στο μόριο υψηλή βακτηριακή ειδικότητα και διαφορετικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες ως αποτέλεσμα της τροποποίησης του logP. [6] [7]



Εικόνα A-4: Η δομή του μορίου 6-δεοξυ-6-διμεθυλοτετρακυκλίνη, του ελαχίστου φαρμακοφόρου της κατηγορίας των τετρακυκλινών



Εικόνα A-5: Η σκιασμένη περιοχή αντιστοιχεί στην περιοχή του μορίου που συνδέεται με την 30S υπομονάδα του ριβοσωμικού RNA. Η περιοχή μέσα στο μπλε πολύγωνο αντιστοιχεί στην μη μεταβλητή περιοχή του μορίου των τετρακυκλινών

A.1.3 Μηχανισμός Δράσης

Η δοξυκυκλίνη, όπως και οι υπόλοιπες τετρακυκλίνες, είναι βακτηριοστατικό φάρμακο που ασκεί τη δράση του σταματώντας την πρωτεϊνική σύνθεση των βακτηρίων μέσω αντιστρεπτής αλλοστερικής σύνδεσης με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα του προκαρυωτικού κυττάρου [6], [8]. Για να μπορέσει το μόριο της δοξυκυκλίνης να αλληλεπιδράσει με το βακτηριακό ριβόσωμα, πρέπει να διαπεράσει ένα ή περισσότερα μεμβρανικά συστήματα ανάλογα με το αν το βακτήριο – στόχος είναι gram θετικό ή αρνητικό [6].

Στα gram αρνητικά εντερικά βακτήρια, το μόριο της δοξυκυκλίνης διασχίζει την εξωτερική μεμβράνη μέσω των καναλιών πορίνης OmpF και OmpC ως θετικά φορτισμένο σύμπλοκο με ιόν μαγνησίου. Το κατιονικό αυτό σύμπλοκο της δοξυκυκλίνης με το μεταλλικό ιόν συσσωρεύεται έπειτα στον περιπλασματικό χώρο, όπου και η δοξυκυκλίνη μετατρέπεται εκ νέου στη μη φορτισμένη της μορφή. Σε αυτή τη μορφή, το μόριο της δοξυκυκλίνης διαθέτει την κατάλληλη λιποφιλία ώστε να μπορεί να διαχυθεί μέσω της λιπιδικής διπλοστοιβάδας της εσωτερικής (κυτταροπλασματικής) μεμβράνης [6].

Κατά αντιστοιχία, στα gram θετικά βακτήρια η δοξυκυκλίνη διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη στη μη φορτισμένη λιπόφιλη μορφή της [6].

Η διαδικασία πρόσληψης του μορίου της δοξυκυκλίνης διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι μια ενεργητική διαδικασία που διεκπεραιώνεται μέσω της κινητήριας δύναμης των πρωτονίων [6].

Μόλις η δοξυκυκλίνη βρεθεί στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, όπου το pH και οι συγκεντρώσεις των δισθενών ιόντων μετάλλων είναι υψηλότερες από ότι στον εξωκυττάριο χώρο, είναι πολύ πιθανό να σχηματίσει χηλικά σύμπλοκα. Για το λόγο αυτό αναφέρεται ότι η ενεργός μορφή του φαρμάκου που προσδένεται στο ριβόσωμα είναι ένα σύμπλοκο του φαρμακομορίου με μαγνήσιο [6].

Η δοξυκυκλίνη δρα παρεμποδίζοντας τη σύνδεση του φορτισμένου αμινοακυλο-tRNA (aa-tRNA) με την θέση A του ριβοσώματος, σταματώντας με τον τρόπο αυτό τη φάση επιμήκυνσης και εμποδίζοντας την ολοκλήρωση του κύκλου της πρωτεϊνσύνθεσης. Η δοξυκυκλίνη επηρεάζει το ρυθμό δέσμευσης του τριαδικού συμπλέγματος έναρξης της πρωτεϊνσύνθεσης (αποτελείται από τον παράγοντα επιμήκυνσης Tu (EF-Tu), το GTP και το aa-tRNA) με το ριβόσωμα. Το τριαδικό αυτό σύμπλεγμα επομένως αποτυγχάνει να προκαλέσει σύζευξη του aa-tRNA με τη θέση A.

Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω, εμποδίζεται η παραγωγή πρωτεϊνών απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό και την άμυνα των βακτηρίων, γεγονός που επιτρέπει στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή να εξουδετερώσουν τα εισβάλλοντα βακτήρια. [6] [9]

A.1.4 Ενδείξεις και Χρήση

Η δοξυκυκλίνη έχει μία πληθώρα ενδείξεων λόγω του ευρέος φάσματος δράσης της ενάντια σε Gram θετικά, Gram αρνητικά, αλλά και «άτυπα» βακτήρια. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί σε ένα σύνολο μη μολυσματικών ασθενειών, κυρίως λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται ότι εμφανίζει αντι-ογκογόνο δραστηριότητα. [1], [10]

Όσον αφορά τη θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε λοιμογόνους παράγοντες, η δοξυκυκλίνη -όπως και όλοι οι αντιβακτηριακοί παράγοντες- θα πρέπει να χορηγείται αποκλειστικά για την προφύλαξη ή τη θεραπεία μολύνσεων που αποδεδειγμένα οφείλονται σε ευαίσθητα βακτήρια ή όταν υπάρχουν έντονες υποψίες περί αυτού. Η επιλογή του αντιβιοτικού ή η τροποποίηση του τρόπου χορήγησης πρέπει να στηρίζονται σε δεδομένα καλλιέργειας ή ευαισθησίας του υπαίτιου μικροοργανισμού, αν αυτά είναι διαθέσιμα. Ελλείψει αυτών των δεδομένων, η εμπειρική χρήση της δοξυκυκλίνης οφείλει να βασίζεται σε στοιχεία επιδημιολογίας και ευαισθησίας του μικροοργανισμού, ανάλογα και με την εκάστοτε γεωγραφική περιοχή.

A.1.4.1 Θεραπεία

Η δοξυκυκλίνη έχει ένδειξη στη θεραπεία των παρακάτω λοιμώξεων:

- Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος που οφείλονται στο *Mycoplasma pneumoniae*
- Στην ψυττακίωση ή ορνίθωση που οφείλεται στο *Chlamydothila psittaci*
- Στο τράχωμα που οφείλεται στο *Chlamydia trachomatis*. Ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι δεν επιτυγχάνεται πάντοτε πλήρης εκρίζωση αυτού του μικροοργανισμού
- Σε μη επιπεπλεγμένες λοιμώξεις της ουρήθρας, του ορθού ή του τραχήλου της μήτρας που οφείλονται στο *Chlamydia trachomatis*
- Σε επιπεφυκίτιδα από έγκλειστα οφειλόμενη στο *Chlamydia trachomatis*
- Σε υποτροπιάζοντα πυρετό που οφείλεται στο *Borrelia recurrentis*
- Σε αφροδίσιο λεμφοκοκκίωμα οφειλόμενο στο *Chlamydia trachomatis*
- Στη μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα οφειλόμενη στο *Ureaplasma urealyticum*
- Στον κηλιδώδη πυρετό των Βραχωδών Ορέων, τον τυφοειδή πυρετό, τον πυρετό Q και σε λοιμώξεις από ρικέτσιες

Αναφορικά με τους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς, η δοξυκυκλίνη χορηγείται:

- Στην αντιμετώπιση της χολέρας (*Vibrio cholerae*)
- Στην πανώλη (*Yersinia pestis*)
- Στο μαλακό έλκος, αφροδίσιο νόσημα που προκαλείται από το *Haemophilus ducreni*
- Στην τουλαραιμία (*Francisella tularensis*)
- Σε εμβρυικές λοιμώξεις από *Campylobacter* (*Campylobacter fetus*)
- Στη βρουκέλλωση (σε συνδυασμό με στρεπτομυκίνη)
- Στη βαρτονέλλωση (*Bartonella bacilliformis*)
- Στο βουβωνικό κοκκίωμα που προκαλείται από το βακτήριο *Klebsiella granulomatis*

Η δοξυκυκλίνη χορηγείται επιπρόσθετα για τη θεραπεία λοιμώξεων από άλλα παθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια, κάποια στελέχη των οποίων βρέθηκε ότι εμφανίζουν αντοχή στη δράση της. Για το λόγο αυτό πριν τη χορήγηση του αντιβιοτικού συστήνεται η διενέργεια καλλιέργειας και ο έλεγχος της ευαισθησίας τους. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι:

- Είδη του γένους *Shigella*
- Είδη του γένους *Acinetobacter*
- Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος οφειλόμενες στο *Haemophilus influenzae*

- Λοιμώξεις των ουροφόρων οδών και του αναπνευστικού συστήματος από είδη του γένους *Klebsiella*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter aerogenes*

Αντίστοιχα, η δοξκυκλίνη χορηγείται και στις ακόλουθες λοιμώξεις από ορισμένους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς οι οποίοι ενδέχεται να εμφανίζουν αντοχή στη δράση της. Όπως και με τους Gram-αρνητικούς ανθεκτικούς μικροοργανισμούς συστήνεται ο έλεγχος της βακτηριακής τους ευαισθησίας.

- Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος που οφείλονται στο *Streptococcus pneumoniae*
- Στον άνθρακα (*Bacillus anthracis*). Ειδικότερα η δοξκυκλίνη χορηγείται σε λοιμώξεις από εισπνεόμενα σωματίδια άνθρακα τα οποία συνιστούν μία σοβαρή απειλή βιοτρομοκρατίας, καθώς δύναται να διασχίσουν μεγάλες αποστάσεις από αέρος, διατηρώντας τη λοιμογόνο δυναμική τους. Αν αφεθεί χωρίς θεραπεία, αυτή η μορφή άνθρακα έχει θνητότητα που προσεγγίζει το 100%. [11]

Η δοξκυκλίνη είναι φάρμακο δεύτερης γραμμής -όταν η χορήγηση πενικιλίνης αντενδείκνυται- στη θεραπεία των παρακάτω λοιμώξεων:

- Στη σύφιλη (*Treponema pallidum*)
- Σε μη επιπελεγμένη γονόρροια (*Neisseria gonorrhoeae*)
- Στη λιστερίωση (*Listeria monocytogenes*)
- Στην τροπική μόρωση που προκαλείται από το υποείδος *pertenue* του *Treponema pallidum*
- Σε λοιμώξεις από είδη του γένους *Clostridium*
- Στη λοίμωξη του Vincent από το *Fusobacterium fusiforme*
- Στην ακτινομύκωση (*Actinomyces israelii*)

Εκτός από την καλώς καθορισμένη χρήση της σε βακτηριακές λοιμώξεις, η δοξκυκλίνη χρησιμοποιείται και σε μια πληθώρα μη μολυσματικών ασθενειών. Από αυτές πιο συχνά χρησιμοποιείται στη σοβαρή ακμή, αν και μέρος της δράσης της πιθανώς οφείλεται στην αντιβακτηριακή της δράση ενάντια στο *Cutibacterium acnes*. Άλλα παραδείγματα περιλαμβάνουν την περιοδοντίτιδα, τη ροδόχρου ακμή, την πομφολυγώδη δερματοπάθεια και σε αυτοάνοσες διαταραχές όπως η πολλαπλή σκλήρυνση, η σαρκοείδωση, το γαγγραινώδες πυόδερμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σκληρόδερμα. Επίσης χρησιμοποιείται στη θεραπεία αορτικών ανευρυσμάτων και στη σκληροθεραπεία για τη θεραπεία δυσπλασιών των αιμοφόρων αγγείων και του λεμφικού συστήματος.

Μια δυναμική χρήση της δοξουκυκλίνης που εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι η θεραπεία ή η πρόληψη ορισμένων καρκινικών μεταστάσεων, όπως οι οστικές μεταστάσεις από πρωτογενείς όγκους του μαστού ή του προστάτη. Αυτή η δυνατότητα εξηγείται από την ιδιότητα της δοξουκυκλίνης να αναστέλλει ορισμένα ένζυμα, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (MMPs), που εμπλέκονται στην εμφάνιση αυτής της δυσμενούς εκδήλωσης. Αντίστοιχη δράση στον καρκίνο εμφανίζουν και άλλα μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών. [1]

A.1.5 Φαρμακοκινητική δοξουκυκλίνης

A.1.5.1 Απορρόφηση

Η δοξουκυκλίνη θεωρείται ότι έχει την καλύτερη απορρόφηση από όλες τις τετρακυκλίνες. [12] Η από του στόματος χορηγούμενη δοξουκυκλίνη στις συνήθεις δόσεις των 100 και 200 mg απορροφάται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%, με το μέσο ποσοστό % απορρόφησης (Fa) ίσο με 95%, χωρίς να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών αλάτων. Για σύγκριση, η απορρόφηση των τετρακυκλινών πρώτης γενιάς είναι κατά μέσο όρο 50%. [13] Ωστόσο, ορισμένοι μελετητές, συγκρίνοντας τα από του στόματος με τα ενδοφλέβια σκευάσματα δοξουκυκλίνης, τοποθετούν την έκταση της απορρόφησης στο εύρος 73-77%. [14] Η απορρόφηση πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στο δωδεκαδάκτυλο, καθώς η δοξουκυκλίνη έχει μέγιστη λιποδιαλυτότητα σε pH ίσο με 5,5. [12] - [14]

Η δοξουκυκλίνη απορροφάται ταχέως, και γίνεται ανιχνεύσιμη στο αίμα 15 λεπτά μετά τη χορήγηση. Λόγω εντεροηπατικής κυκλοφορίας, το φάρμακο εμφανίζει δευτερογενές μέγιστο στο πλάσμα. [12] Ο χρόνος ημιζωής απορρόφησης είναι 0.85 ± 0.41 ώρες. [14]

Τα μέγιστα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα διαφέρουν ανάλογα με τη χορηγούμενη δόση. Για τη δοξουκυκλίνη έχει αποδειχθεί γραμμική φαρμακοκινητική απορρόφησης για το δοσολογικό εύρος από 100 έως 600mg, δηλαδή η απορρόφηση σχετίζεται γραμμικά με τη χορηγούμενη δόση. [12], [13] Μετά από μία από του στόματος χορήγηση δόσης φαρμάκου ίσης με 100 ή 200 mg, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα κυμαίνονται από 1,7 έως 5,7 mg/L και επιτυγχάνονται σε 2 έως 3,5 ώρες μετά τη χορήγηση. Μετά από χορήγηση μίας δόσης 600mg, η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα ήταν 15,4 mg/L, 4,4 ώρες μετά τη χορήγηση. Φαίνεται ότι η χορήγηση της ίδιας ποσότητας φαρμάκου από διαφορετικά από του στόματος σκευάσματα όπως δισκία, πόσιμα εναιωρήματα ή κάψουλες, δεν έχει σημαντική επίδραση στην απορρόφηση. [13]

A.1.5.1.1 Επίδραση του φαγητού στην απορρόφηση

Σε αντίθεση με τις τετρακυκλίνες πρώτης γενιάς -η απορρόφηση των οποίων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη συγχορήγηση τροφής και κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων- οι

μέσες συγκεντρώσεις της δοξυκυκλίνης στο πλάσμα καθώς και η περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης στο πλάσμα – χρόνου (AUC), επηρεάζονται σε πολύ μικρό βαθμό από τη λήψη τροφής. Η μέση συγκέντρωση της δοξυκυκλίνης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια ενός πολλαπλού δοσολογικού σχήματος 200mg ανά ημέρα μετά τη χορήγηση τροφής (ανεξάρτητα από το είδος τροφής) ή με άδειο στομάχι, βρέθηκε να είναι εντός θεραπευτικού εύρους (4.0 mg/mL και 4.4 mg/mL αντίστοιχα). Επομένως η επίδραση της τροφής φαίνεται ότι δεν έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία. [12] - [14]

Αντίστοιχα, και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν ελάχιστη επίδραση στον ρυθμό απορρόφησης της δοξυκυκλίνης καθώς δεν προκαλούν σημαντική διαφοροποίηση στο χρόνο που απαιτείται για να εμφανιστούν τα μέγιστα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα, ούτε μεταβάλλουν τα μέγιστα επίπεδα καθυστερημένα [12], [13]. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα σύμπλοκα της δοξυκυκλίνης με μεταλλικά ιόντα είναι ασταθή σε όξινο pH, οπότε μεγαλύτερη ποσότητα της δοξυκυκλίνης είναι διαθέσιμη για απορρόφηση στο δωδεκαδάκτυλο [14].

Η επίδραση του πλήρους ή και του άπαχου γάλακτος στην περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης/χρόνου (AUC) της δοξυκυκλίνης δεν φαίνεται να είναι πλήρως καθορισμένη, διότι ορισμένες μελέτες δείχνουν μείωση του AUC σε ποσοστό περίπου 20%, ενώ άλλες δεν εντοπίζουν σημαντική μεταβολή [13].

Σε κάθε περίπτωση ωστόσο συστήνεται η αποφυγή συγχορήγησης της δοξυκυκλίνης με φάρμακα που περιέχουν δισθενή ή τρισθενή κατιόντα, όπως είναι τα αντιόξινα, καθώς υπάρχει περίπτωση να επηρεαστεί η απορρόφηση της δοξυκυκλίνης. [12]

A.1.5.1.2 Διαπερατότητα

Ο φαινόμενος συντελεστής διαπερατότητας (Papp) της δοξυκυκλίνης, όπως έχει υπολογιστεί με τη χρήση συστήματος Caco-2 μονής στοιβάδας, βρέθηκε ότι είναι $17,5 \times 10^{-6}$ cm/sec.

Μετά από σύγκριση της διαπερατότητας του φαρμάκου μεταξύ των τεχνικών PAMPA και Caco-2, φάνηκε ότι η δοξυκυκλίνη απορροφάται κατά κύριο λόγο μέσω της διακυτταρικής και όχι μέσω της παρακυτταρικής οδού. [15]

A.1.5.2 Κατανομή

Η δοξυκυκλίνη, όντας λιπόφιλο φάρμακο, επιδεικνύει εξαιρετική κατανομή στους ιστούς και τα σωματικά υγρά [1], [3], [13]. Ο όγκος κατανομής της δοξυκυκλίνης στη σταθεροποιημένη κατάσταση είναι ίσος με 50-80L ή 0,7 L/kg [14] και ο όγκος του κεντρικού διαμερίσματος είναι 22L [13]. Αυτές οι τιμές φαίνεται ότι διαφοροποιούνται ελαφρά ανάλογα με το άλας της δοξυκυκλίνης που μελετήθηκε [16].

Τα μέγιστα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα ανιχνεύονται σε διάστημα 2-3 ωρών μετά την από του στόματος χορήγηση και εντός 30 λεπτών μετά από ενδοφλέβια χορήγηση [1].

Η κινητική της δοξυκυκλίνης στους ιστούς φαίνεται ότι εξελίσσεται παράλληλα με αυτή του κυκλοφορικού συστήματος· οι καμπύλες απομάκρυνσης του φαρμάκου είναι παρόμοιες, ενώ και η εμφάνιση των μέγιστων συγκεντρώσεων συμβαίνει ταυτόχρονα [13]. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις της δοξυκυκλίνης στους περιφερικούς ιστούς είναι μεγαλύτερες από αυτές του πλάσματος. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στα απεκκριτικά όργανα όπως τα νεφρά, το ήπαρ και ο γαστρεντερικός σωλήνας [12], [13], [14]. Εκεί, τα μέγιστα επίπεδα του φαρμάκου εμφανίζονται νωρίτερα και είναι μεγαλύτερα απ' ό,τι στο πλάσμα [13].

Επιπρόσθετα, η δοξυκυκλίνη, όπως και άλλες τετρακυκλίνες, συσσωρεύεται στα οστά και τα δόντια κατά τη διαδικασία ανάπτυξής τους και εμποδίζει τη διαδικασία ασβεστοποίησής τους. Το σταθερό σύμπλοκο δοξυκυκλίνης-ασβεστίου που προκύπτει προκαλεί αποχρωματισμό των δοντιών [12], [14].

Καθώς η δοξυκυκλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού, η κατανομή της στους ιστούς που απαρτίζουν το αναπνευστικό σύστημα έχει μελετηθεί συστηματικά. Στο ανώτερο αναπνευστικό, οι συγκεντρώσεις είναι μέγιστες σε περιπτώσεις προχωρημένης λοίμωξης ή λοίμωξης συνοδευόμενης από βλεννοπυώδεις εκκρίσεις. [13]

Το φάρμακο κατανέμεται ικανοποιητικά στους ρινικούς πολύποδες, το έσω ους και τις αμυγδαλές χωρίς σημαντικές διαφοροποιήσεις παρουσία φλεγμονής. Αντιθέτως, η συγκέντρωση του φαρμάκου στις βρογχικές εκκρίσεις είναι περίπου το 20% της αντίστοιχης συγκέντρωσης στο πλάσμα. [13]

Επιπρόσθετα, η δοξυκυκλίνη, όπως και άλλες τετρακυκλίνες, συσσωρεύεται στα οστά και τα δόντια κατά τη διαδικασία ανάπτυξής τους και εμποδίζει τη διαδικασία ασβεστοποίησής τους. Το σταθερό σύμπλοκο δοξυκυκλίνης-ασβεστίου που προκύπτει προκαλεί αποχρωματισμό των δοντιών [12] [14].

Η δοξυκυκλίνη κατανέμεται ικανοποιητικά στα γυναικεία αναπαραγωγικά όργανα, και κυρίως στο ενδομήτριο, ενώ δύναται να διέλθει από τον πλακούντα, επιτυγχάνοντας συγκέντρωση στον ομφάλιο λώρο ίση με το 54% αυτής του μητρικού πλάσματος. Όσον αφορά τα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, η συγκέντρωση του φαρμάκου στον προστατικό ιστό είναι παρόμοια με αυτή του πλάσματος. [13]

Η δοξυκυκλίνη κατανέμεται ελλιπώς στον σιέλο και τα πτύελα [1], ενώ σε ιστούς όπως τα οστά, το δέρμα, ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, η συγκέντρωση του φαρμάκου είναι χαμηλότερη από αυτή του πλάσματος [14]. Επίσης, παρότι η από του στόματος χορηγούμενη δοξυκυκλίνη μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα διάφορων επιφανειακών

οφθαλμικών παθήσεων, όπως στην περίπτωση της δυσλειτουργίας των μείβομιανών αδένων, το φάρμακο δεν ανιχνεύεται στο δακρυϊκό υγρό [1].

Η δοξυκυκλίνη, όπως και η μινοκυκλίνη είναι τα μόνα φάρμακα της κατηγορίας των τετρακυκλινών που περνούν σε κάποιο βαθμό τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ωστόσο η συγκέντρωση των φαρμάκων αυτών στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι μη επαρκής για να τα καταστήσει παράγοντες επιλογής στη θεραπεία μηνιγγικών λοιμώξεων [3].

A.1.5.3 Βιομετατροπή και απέκκριση

Η δοξυκυκλίνη φαίνεται πως δεν μεταβολίζεται στον οργανισμό, μια και δεν έχουν εντοπιστεί μεταβολίτες του φαρμάκου στο αίμα, τα ούρα ή τα κόπρανα [13]. Ωστόσο, ορισμένες πηγές υποστηρίζουν ότι υφίσταται κάποιου βαθμού μεταβολισμός, καθώς κατά τη συγχορήγηση της δοξυκυκλίνης με διάφορα φάρμακα-επαγωγείς του κυτοχρώματος P450 όπως η ριφαμπικίνη, η καρβαμαζεπίνη, η φαινοβαρβιτάλη, το αλκοόλ (σε χρόνια βάση), η φαινοτοΐνη και η πριμιδόνη, παρατηρείται μείωση στην περιοχή κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου της δοξυκυκλίνης [12].

Ο χρόνος ημιζωής του φαρμάκου κυμαίνεται από 12 έως 25 ώρες έπειτα από άπαξ χορήγηση, και από 17 έως 24 ώρες μετά από επαναλαμβανόμενη χορήγηση. [12] Αυτές οι τιμές δεν διαφέρουν στους ηλικιωμένους ασθενείς [12], ούτε στους ασθενείς με έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και σε αυτούς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση [3].

Το φάρμακο υφίσταται νεφρική κάθαρση σε ποσοστό 30 με 40%, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα αποβάλλεται μέσω του γαστρεντερικού συστήματος. Η νεφρική κάθαρση κυμαίνεται από 1,8 έως 2,1 L/h και αντιστοιχεί στο 19 με 23% του σπειραματικού διηθήματος [3], [13]. Το 70% της δοξυκυκλίνης που φιλτράρεται μέσω των νεφρών επαναρροφάται από τα νεφρικά σωληνάκια [3]. Η αλκαλοποίηση των ούρων αυξάνει τη νεφρική κάθαρση [3], [13], ενώ η οξίνιση αυξάνει τη διάχυση του φαρμάκου στον διάμεσο νεφρικό ιστό [13].

Παρά το γεγονός ότι η νεφρική κάθαρση αποτελεί σημαντική οδό αποβολής του φαρμάκου από τον οργανισμό, σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια δεν παρατηρείται συσσώρευση του φαρμάκου ούτε σημαντική αλλαγή στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους απομάκρυνσης του φαρμάκου, ακόμη και αν οι ασθενείς είναι ανουρικοί. Αυτή η παράδοξη συμπεριφορά του φαρμάκου εξηγείται από την αντιρροπιστική αύξηση της μη νεφρικής κάθαρσης (μέσω του ήπατος και του εντερικού σωλήνα) που προκαλείται από τη μείωση του κλάσματος της δοξυκυκλίνης που είναι συνδεδεμένο στις πρωτεΐνες του πλάσματος και στα ερυθροκύτταρα, που παρατηρείται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Πράγματι, σε αυτή την κατηγορία ασθενών έχει παρατηρηθεί αύξηση της αποβαλλόμενης ποσότητας του φαρμάκου στη χολή και στα κόπρανα. Επιπρόσθετα, η δοξυκυκλίνη, σε αντίθεση με τις τετρακυκλίνες πρώτης γενιάς, δεν έχει τις ίδιες αντιαναβολικές ιδιότητες και δεν επηρεάζει την κάθαρση της κρεατινίνης, της ιουλίνης ή του π-αμινοϊππουρικού οξέος. Τέλος, η

δοξυκυκλίνη δεν απομακρύνεται μέσω αιμοδιάλυσης, εξαναγκαστικής διούρησης ή περιτοναϊκής διάλυσης. [3], [12], [13]

Η ποσότητα του φαρμάκου που δεν υφίσταται νεφρική κάθαρση απομακρύνεται μέσω των κοπράνων είτε ως προϊόν σύζευξης, είτε ως σταθερό σύμπλοκο. Μόλις το φάρμακο βρεθεί στον εντερικό αυλό, ένα μέρος του σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Τα σχηματιζόμενα αυτά σύμπλοκα δεν μπορούν να απορροφηθούν, οπότε το φάρμακο σε αυτή τη μορφή χάνει μέρος της αντιβακτηριακής του δράσης (επαναλαμβανόμενη χορήγηση του φαρμάκου δεν σχετίζεται με αλλαγές στη σύνθεση της εντερικής χλωρίδας). Η ποσότητα του φαρμάκου που δεν δεσμεύεται με τη μορφή συμπλόκου υφίσταται εντεροηπατική κυκλοφορία. [3], [12], [13]

Παρότι το φάρμακο συσσωρεύεται εκτενώς στη χολή (σε συγκέντρωση 15 φορές αυτής του πλάσματος), μόνο ένα μικρό ποσοστό αποβάλλεται μέσω της χολής (<5%). [3]

A2. Πρωτεϊνική σύνδεση

A.2.1 Γενικά

Η πρωτεϊνική σύνδεση θεωρείται μία από τις σημαντικότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων καθώς επηρεάζει την κατανομή, την απομάκρυνση και τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Γι' αυτό το λόγο, η μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμακομορίων είναι εξέχουσας σημασίας στο πεδίο των επιστημών υγείας [17]. Ένα φάρμακο μπορεί να συνδέεται εκτεταμένα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ωστόσο φαρμακολογικά δραστική θεωρείται μόνο η ελεύθερη μορφή ενός φαρμάκου καθώς μόνο αυτή μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες των ιστών.

Η πρωτεϊνική σύνδεση επηρεάζει τη δραστικότητα ενός φαρμάκου με δύο τρόπους: είτε μεταβάλλοντας την ενεργό συγκέντρωση του φαρμάκου στο σημείο δράσης του, είτε μεταβάλλοντας τον ρυθμό απομάκρυνσης του φαρμάκου, κάτι που επηρεάζει το συνολικό χρονικό διάστημα κατά το οποίο διατηρούνται οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο πολλές φορές είναι δύσκολο να προβλέψουμε το αποτέλεσμα που μπορεί να επιφέρει στην φαρμακοκινητική ενός φαρμάκου μία αλλαγή στην πρωτεϊνική σύνδεση. Για παράδειγμα, εάν για κάποιο λόγο υπάρξει μείωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου, τότε για κάθε ολική συγκέντρωση του φαρμάκου αυτού στο πλάσμα η αντίστοιχη συγκέντρωση του ελεύθερου κλάσματος θα είναι υψηλότερη, κάτι το οποίο μπορεί να ενισχύσει τη φαρμακολογική δραστικότητα. Ωστόσο η μείωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης μπορεί να σημαίνει επίσης ότι μεγαλύτερη ποσότητα του φαρμάκου είναι διαθέσιμη για μεταβολισμό ή νεφρική απέκκριση. Επομένως σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος ημιζωής και οι συγκεντρώσεις του φαρμάκου στο πλάσμα μειώνονται. [18] [19]

A.2.2 Αλβουμίνη

Η σημαντικότερη πρωτεΐνη του πλάσματος που εμπλέκεται στην μεταφορά φαρμακομορίων είναι η αλβουμίνη, λόγω της μεγάλης ικανότητας σύνδεσής της με μία πληθώρα ενδογενών και εξωγενών ουσιών. Το μοριακό της βάρος είναι 66kD, ενώ η συγκέντρωσή της στο pH του αίματος είναι 35-50g/L, δηλαδή 3,5-5%. [20] Το μόριο της αλβουμίνης διαθέτει δύο κύριες εκλεκτικές θέσεις σύνδεσης φαρμακομορίων, τις θέσεις (I) και (II) (γνωστές και ως θέσεις του Sudlow). Η αλβουμίνη αλληλεπιδρά μόνο με ουσίες που έχουν όξινο ή αλκαλικό χαρακτήρα μέσω δυνάμεων van der Waals, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου, ιοντικών αλληλεπιδράσεων και άλλων ελκτικών δυνάμεων. [20] Η έκταση της σύνδεσης ενός φαρμάκου με την αλβουμίνη καθορίζεται αφενός από την τρισδιάστατη δομή του φαρμάκου, αφετέρου από την τρισδιάστατη δομή της ίδιας της αλβουμίνης, η οποία επηρεάζεται σημαντικά από το pH. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια ενός φαρμάκου με τις θέσεις σύνδεσης της αλβουμίνης, τόσο μεγαλύτερος θα είναι και ο ρόλος της πρωτεϊνικής σύνδεσης στην διακίνηση του φαρμάκου στον οργανισμό.

A.2.3 Πρωτεϊνική σύνδεση δοξουκυκλίνης

Όσον αφορά τη δοξουκυκλίνη, αυτή εμφανίζει εκτεταμένη σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος σε ποσοστό 80 με 90%. Επομένως θεωρείται το φάρμακο της κατηγορίας των τετρακυκλινών με την υψηλότερη πρωτεϊνική σύνδεση. [13]

Μία πρόσφατη μελέτη [17] κατέδειξε ότι η δοξουκυκλίνη παρουσιάζει μέτριου βαθμού συγγένεια προς την ανθρώπινη αλβουμίνη, με τον αριθμό των βασικών θέσεων σύνδεσης να είναι 1,9, η σταθερά σύνδεσης $1,51 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, και το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης 59,80%. Επίσης βρέθηκε ότι η αντίδραση σύνδεσης είναι μια εξώθερμη διαδικασία που οδηγείται από μεταβολές στην εντροπία και την ενθαλπία του συστήματος, με τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις να διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη σύνδεση της δοξουκυκλίνης στο μόριο της αλβουμίνης. Τέλος, στην ίδια μελέτη, βρέθηκε ότι η δοξουκυκλίνη συνδέεται στη θέση II του μορίου της αλβουμίνης.

Σε άλλη μελέτη [21] γίνεται μία προσπάθεια χαρακτηρισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης της μινουκυκλίνης και της δοξουκυκλίνης με τη μέτρηση διαφορετικών συγκεντρώσεων των φαρμάκων αυτών σε διαλύματα αλβουμίνης ανθρώπου και ποντικού με την τεχνική *in vitro* microdialysis. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η δοξουκυκλίνη, όπως ακριβώς και η μινουκυκλίνη, παρουσιάζουν μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση, δηλαδή ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης των φαρμάκων αυτών στο πλάσμα, το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου μειώνεται αντί να αυξάνεται (πληρέστερη περιγραφή στις επόμενες ενότητες).

A.2.4 Διαφορετικές μορφές πρωτεϊνικής σύνδεσης

Η πλειοψηφία των φαρμάκων εμφανίζει σταθερό ελεύθερο (μη δεσμευμένο με πρωτεΐνες) κλάσμα (f_u) για δεδομένο εύρος συγκεντρώσεων (γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση), μέχρι κάποια συγκέντρωση πάνω από την οποία οι θέσεις σύνδεσης των δεσμευτικών πρωτεϊνών υφίστανται κορεσμό, γεγονός που οδηγεί σε σταδιακή αύξηση του ελεύθερου κλάσματος του φαρμάκου όσο αυξάνεται η ολική συγκέντρωση του φαρμάκου αυτού (μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση). Ο κορεσμός των πρωτεϊνών και η επακόλουθη εξάρτηση του ελεύθερου κλάσματος του φαρμάκου από την ολική συγκέντρωσή του έχει πολλές φορές πρακτική σημασία σε ορισμένες κλινικές καταστάσεις ή ιδιαίτερους πληθυσμούς ασθενών. [22]

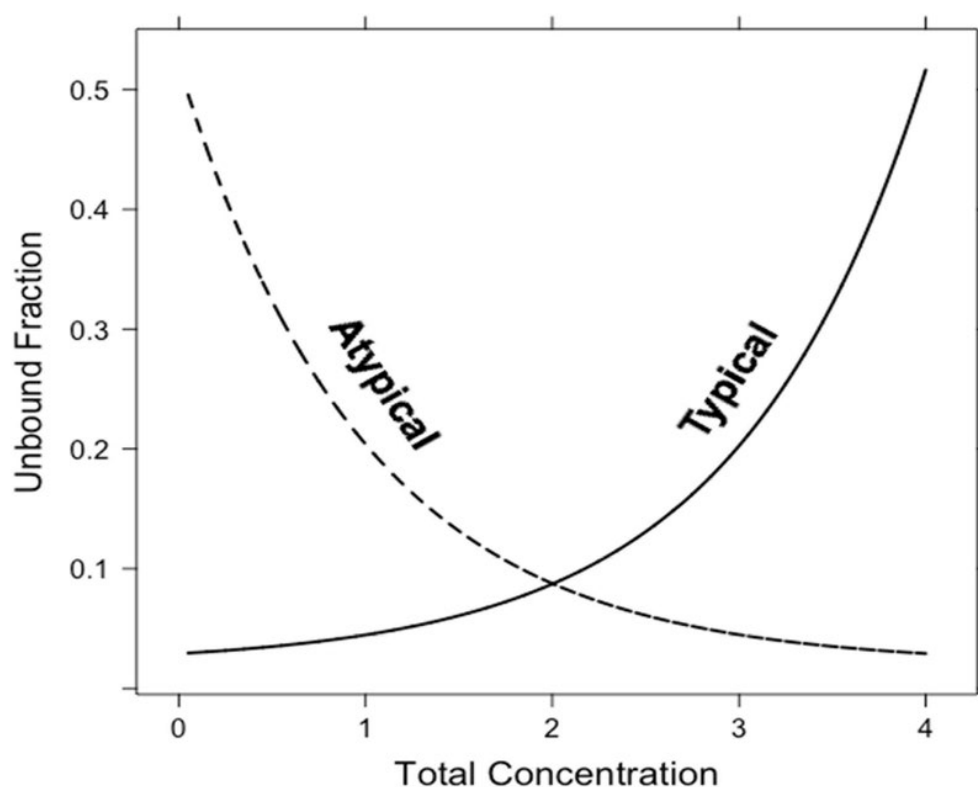
Αξίζει να σημειωθεί ότι τα περισσότερα φάρμακα στις συνήθεις χορηγούμενες συγκεντρώσεις, λόγω της χαμηλής τους συγγένειας με τις πρωτεΐνες του πλάσματος ή λόγω της μεγάλης δεσμευτικής ικανότητας των πρωτεϊνών αυτών, δεν εμφανίζουν κορεσμό, επομένως το ελεύθερο κλάσμα των φαρμάκων αυτών είναι ανεξάρτητο της ολικής τους συγκέντρωσης στο πλάσμα. Τα φάρμακα αυτά εμφανίζουν γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση σε όλο το εύρος των θεραπευτικών τους συγκεντρώσεων.

Το μοντέλο Langmuir [Εξίσωση A-1 και Σχήμα A-1] χρησιμοποιείται για να περιγράψει υπολογιστικά την ιδιότητα ορισμένων φαρμάκων να εμφανίζουν κορεσμό μέσα στο εύρος των θεραπευτικών τους συγκεντρώσεων. [22]

$$C_b = \frac{A_{\max} \times C_u}{K_d + C_u}$$

Εξίσωση A-1

[A_{\max} : η μέγιστη δεσμευτική ικανότητα του υποστρώματος, K_d : σταθερά διάστασης, C_u : η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου, C_b : η συγκέντρωση του δεσμευμένου φαρμάκου]

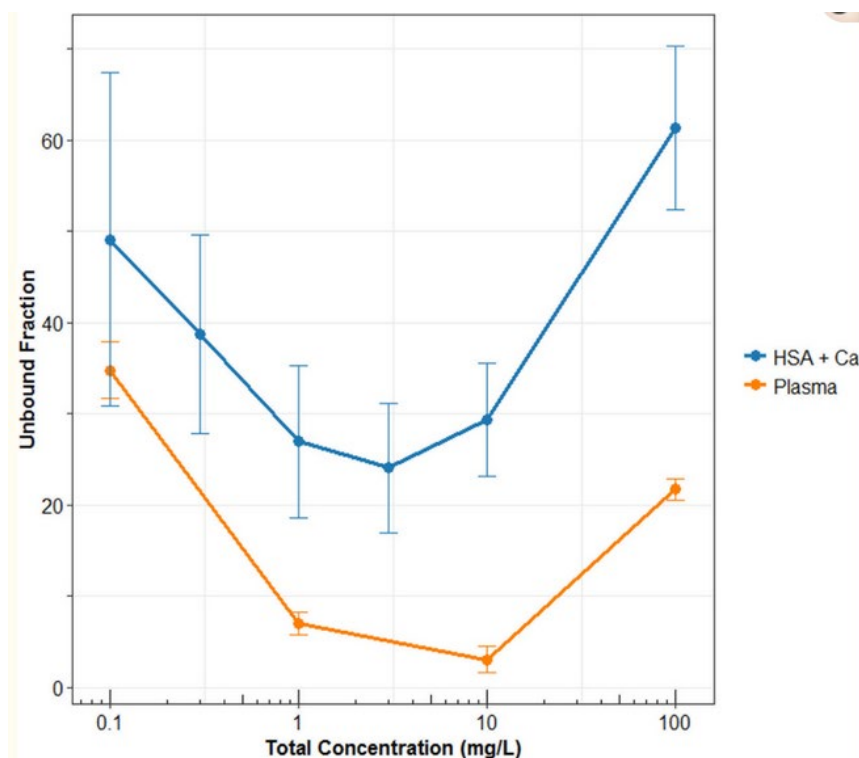


Σχήμα A-1: Απεικόνιση των διαφορετικών μορφών μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης

A.2.5 Μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση

Μέχρι πρόσφατα, η μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση αποδιδόταν μόνο σε φαινόμενα κορεσμού των πρωτεϊνών σύνδεσης. Μια ιδιαίτερη μορφή μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης που ονομάστηκε μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση περιγράφηκε για πρώτη φορά μετά την ανάπτυξη του πιο πρόσφατου μέλους της κατηγορίας των τετρακυκλινών, της τιγκεκυκλίνης. Σε αυτόν τον ιδιαίτερο τύπο πρωτεϊνικής σύνδεσης, η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (f_u) μειώνεται όσο αυξάνεται η ολική συγκέντρωση του φαρμάκου. Συγκεκριμένα για το μόριο της τιγκεκυκλίνης, η πρωτεϊνική

σύνδεση έχει χαρακτηριστεί ως “σχήματος U”, διότι η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου μειώνεται μέχρι μία ορισμένη συγκέντρωση, πάνω από την οποία το φάρμακο εμφανίζει μία πιο τυπική κινητική κορεσμού. Παρόμοια κινητική συμπεριφορά έχει περιγραφεί και για άλλα μέλη της κατηγορίας των τετρακυκλινών, όπως η εραβακυκλίνη, η μινοκυκλίνη και η δοξυκυκλίνη, και αποδίδεται σε μηχανισμό που σχετίζεται με τη δημιουργία συμπλόκων δισθενών μεταλλικών ιόντων. [22]



Σχήμα A-2: Πρωτεϊνική σύνδεση δοξυκυκλίνης

A.2.5.1 Σημασία μελέτης μη τυπικής μη γραμμικής κινητικής

Η τιγκεκυκλίνη είναι το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα φαρμάκου που εμφανίζει μη τυπική μη γραμμική κινητική. Παρόλα αυτά, η κλινική σημασία και οι δυνητικές επιπτώσεις του φαινομένου αυτού δεν έχουν διερευνηθεί.

Υπολογιστικές προσομοιώσεις της κινητικής του φαρμάκου -όπως τα πληθυσμιακά φαρμακοκινητικά μοντέλα- που δεν λαμβάνουν υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πρωτεϊνικής σύνδεσης της τιγκεκυκλίνης καθώς θεωρούν εκ των προτέρων γραμμικές διεργασίες, τείνουν να υπερεκτιμούν την ποσότητα του ελεύθερου φαρμάκου στο αίμα και τη διείσδυση του φαρμάκου στους ιστούς. Αποτέλεσμα αυτού είναι η χορήγηση υποθεραπευτικών δόσεων κάτι το οποίο μπορεί θεωρητικά να οδηγήσει σε ανεπαρκή αντιμετώπιση ενός λοιμογόνου παράγοντα με αύξηση στη διάρκεια νοσηλείας, χορήγηση περισσότερων αντιβιοτικών και δημιουργία ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών.

Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός της κινητικής των φαρμάκων με πιο σύνθετη φαρμακοκινητική συμπεριφορά, όπως η μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση, είναι ιδιαίτερης σημασίας στην επιστήμη της φαρμακομετρίας, για την ανάπτυξη και υιοθέτηση μοντέλων

προσομοιώσεων παρά την κλίνη με σκοπό τη βελτιστοποίηση των δοσολογικών σχημάτων και επομένως των κλινικών εκβάσεων. [22]

A.2.6 Σημασία Μελέτης Πρωτεϊνικής Σύνδεσης

Είναι γνωστό ότι η πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου επηρεάζει τόσο τις φαρμακοκινητικές όσο και τις φαρμακοδυναμικές του ιδιότητες και επιδρά στις διαδικασίες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη *in vitro* μεθόδων χαρακτηρισμού της φαρμακοκινητικής των υποψήφιων χημικών ενώσεων που βρίσκονται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου (ιδιότητες όπως η διαπερατότητα, η μεταβολική σταθερότητα, η δυνατότητα αλληλεπίδρασης φαρμάκου-φαρμάκου και η συγγένεια του φαρμάκου με διάφορους μεταφορείς ανάμεσα σε άλλα), με την προοπτική της αύξησης της αποτελεσματικότητας των επιλεγόμενων φαρμάκων και της μείωσης του αριθμού των υποψήφιων ενώσεων που απορρίπτονται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου. [23]

Είναι αλήθεια πως τα πειράματα *in vitro* εκτίμησης της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου στο πλάσμα διενεργούνται με χαμηλότερη συχνότητα και δεν προτιμώνται τόσο όσο άλλες μέθοδοι εκτίμησης άλλων φαρμακοκινητικών παραμέτρων ενός υποψηφίου φαρμάκου.

Υπάρχουν μελέτες [24] που θέτουν υπό αμφισβήτηση την κλινική σημασία της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος μια και οι μεταβολές της συγκέντρωσης του μη δεσμευμένου κλάσματος ενός φαρμάκου είναι αξιόλογες από κλινικής άποψης στις περιπτώσεις που το φάρμακο χορηγείται ενδοφλεβίως, έχει υψηλό ποσοστό εξαγωγής (extraction ratio) και απεκκρίνεται κατά κύριο λόγο μέσω του ήπατος, καθώς επίσης και όταν το φάρμακο χορηγείται *per os*, έχει υψηλό ποσοστό εξαγωγής και δεν υφίσταται ηπατική κάθαρση. [23] [25]

Με άλλα λόγια, σε φάρμακα μεγάλου θεραπευτικού εύρους ή σε φάρμακα στα οποία η βιολογική απόκριση είναι αργή σε σχέση με τις παρατηρούμενες αλλαγές στη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στο πλάσμα, οι συνέπειες στη φαρμακοδυναμική από τη μετατόπιση δεσμευμένου σε πρωτεΐνες φαρμάκου θα είναι αμελητέες, καθώς οι αλλαγές στη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας νέας ισορροπίας μέσω μηχανισμών κατανομής και απέκκρισης. [23]

Επομένως, στις περισσότερες περιπτώσεις, εξαιτίας της περίσσειας δεσμευτικών πρωτεϊνών στο πλάσμα, του σχετικά υψηλού θεραπευτικού εύρους των εγκεκριμένων φαρμάκων και της εξαρτώμενης από το ήπαρ κάθαρσης του μη δεσμευμένου κλάσματος των φαρμάκων, η εκτόπιση των φαρμάκων από τις πρωτεΐνες του πλάσματος έχει μικρή κλινική σημασία. Εξαίρεση ίσως αποτελεί η ιδιαίτερη περίπτωση κατά την οποία η μετατόπιση φαρμάκων με υψηλό βαθμό πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταβάλλει την κάθαρση συγχορηγούμενων φαρμάκων που μεταβολίζονται από το ίδιο ισόενζυμο του

κυτοχρώματος P450. Σε αυτή την περίπτωση η μείωση του δεσμευμένου κλάσματος του φαρμάκου μπορεί να έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία. [25]

Επομένως, με βάση τα προαναφερθέντα, που ενισχύονται από μελέτες όπως αυτή των Benet και Hoener [24] πολλοί μπορεί να θεωρήσουν ότι τα πειράματα πρωτεϊνικής σύνδεσης δεν αξίζουν τον χρόνο και την προσοχή που τους αφιερώνονται. [23]

Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια η σημασία των πειραμάτων πρωτεϊνικής σύνδεσης στο στάδιο της ανακάλυψης ενός φαρμάκου και στην προ-κλινική φάση ανάπτυξης έχει ενισχυθεί ταυτόχρονα με την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μεθόδων υψηλής απόδοσης. Μέσω των πειραμάτων αυτών διερευνάται η μεταβλητότητα στις φαρμακοκινητικές παραμέτρους διαφορετικών ειδών ζώων που χρησιμοποιούνται στις προ-κλινικές μελέτες, και επίσης γίνεται δυνατή η διεξαγωγή πειραμάτων αλλομετρικής κλιμάκωσης. Επιπρόσθετα μπορούν να διερευνηθούν ορισμένες σπάνιες σχετικά περιπτώσεις στις οποίες οι διαφορές στην πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου στον άνθρωπο και στα ζώα μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντικές αποκλίσεις στην παρατηρούμενη κάθαρση, μια ιδιαίτερα δυσμενή εξέλιξη. [23]

A.2.7 Προσδιορισμός παραμέτρων πρωτεϊνικής σύνδεσης – Μοντέλο Scatchard

Το μοντέλο Scatchard χρησιμοποιείται για την εκτίμηση των παραμέτρων σύνδεσης του φαρμάκου με την υπό μελέτη πρωτεΐνη.

Η αλβουμίνη έχει 2 ομάδες θέσεων σύνδεσης από τις οποίες η καθεμία περιλαμβάνει 3 θέσεις και άρα διαθέτει συνολικά 6 θέσεις σύνδεσης. Η τρισδιάστατη δομή της αλβουμίνης επηρεάζεται από το pH και συνεπώς από το pH επηρεάζονται και οι ιδιότητες σύνδεσης του φαρμάκου με την αλβουμίνη. Αυτές οι ιδιότητες είναι σημαντικές για τη θεώρηση του μοντέλου Scatchard. Το μοντέλο αυτό στηρίζεται στη θεμελιώδη παραδοχή ότι οι θέσεις σύνδεσης που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες σύνδεσης είναι ανεξάρτητες και δεν αλληλεπιδρούν. Αυτό σημαίνει ότι το φάρμακο συνδέεται αρχικά με τις θέσεις μίας ομάδας θέσεων με τις οποίες έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια. Αφού γίνει πλήρωση αυτών των θέσεων, το φάρμακο συνδέεται με τις θέσεις της δεύτερης ομάδας με τις οποίες έχει τη δεύτερη μεγαλύτερη συγγένεια. Για την περίπτωση όπου επικρατεί μια θέση σύνδεσης η γενικευμένη εξίσωση Scatchard παίρνει την εξής μορφή:

$$r = \frac{n K_{as} Df}{1 + K_{as} Df} \quad [1]$$

η οποία μετασχηματίζεται σε:

$$\frac{r}{Df} = nK_{as} - K_{as} r \quad [2]$$

όπου,

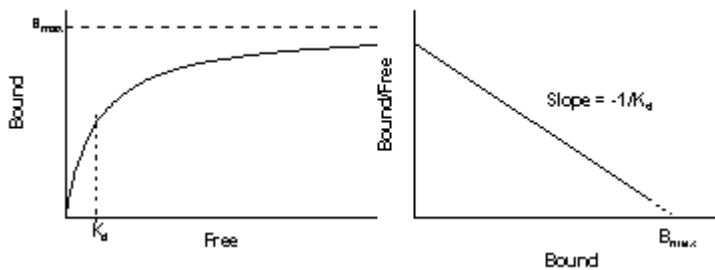
r : λόγος της συγκέντρωσης του συνδεδεμένου φαρμάκου προς τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης,

D_f : το ελεύθερο φάρμακο

n : ο αριθμός θέσεων σύνδεσης και

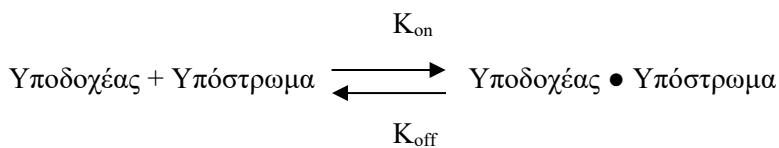
K_{as} : η σταθερά σύνδεσης.

Σε περίπτωση που υπάρχουν 2 ομάδες θέσεων σύνδεσης, η απεικόνιση συνδεδεμένου κλάσματος/ελεύθερου κλάσματος προς συνδεδεμένο κλάσμα δεν είναι γραμμική αλλά έχει χαρακτηριστικά υπερβολής, Σχ. Α.1.



Σχήμα Α.3: Διαγραμματική απεικόνιση της μη γραμμικής σχέσης συνδεδεμένου κλάσματος/ελεύθερου κλάσματος προς συνδεδεμένο κλάσμα.

Ο αμφίδρομος χαρακτήρας της σύνδεσης, ο οποίος διαμεσολαβείται από μη ομοιοπολικούς δεσμούς, βασίζεται στο νόμο δράσης μαζών,



Σχήμα Α.4: Σχηματική απεικόνιση του αμφίδρομου χαρακτήρα της σύνδεσης υποδοχέα-υποστρώματος.

Η αλβουμίνη αποτελεί τον υποδοχέα και η δοξυκυκλίνη το υπόστρωμα. Η σύνδεση λαμβάνει χώρα όταν πρωτεΐνη και φάρμακο συγκρούονται υπό τον κατάλληλο προσανατολισμό στο χώρο αλλά και υπό αρκετή ενέργεια. Ο ρυθμός σύνδεσης εκφράζεται από τη σχέση [3]:

$$[\text{Υπόστρωμα}] [\text{Υποδοχέας}] K_{\text{on}} \quad [3]$$

Αφού έχει γίνει η σύνδεση, το σύμπλοκο πρωτεΐνης φαρμάκου παραμένει σταθερό για τυχαίο χρονικό διάστημα. Η πιθανότητα αποσύνδεσης είναι σε κάθε χρονική στιγμή η ίδια καθώς ο υποδοχέας δε γνωρίζει χρονικά πόσο ήταν συνδεδεμένος με το φάρμακο. Αντίστοιχα ο ρυθμός διάστασης του συμπλόκου εκφράζεται από τη σχέση [4]:

$$[\text{Υπόστρωμα} * \text{Υποδοχέας}] K_{\text{off}} \quad [4]$$

Μετά την αποσύνδεση, πρωτεΐνη και φάρμακο έχουν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ίδια με αυτά που είχαν και πριν την σύνδεση, αλλιώς δεν ισχύει ο νόμος δράσης των μαζών. Ισορροπία έχει επιτευχθεί όταν ο ρυθμός σύνδεσης ισούται με τον ρυθμό αποσύνδεσης:

$$[\text{Υπόστρωμα}] [\text{Υποδοχέας}] K_{\text{on}} = [\text{Υπόστρωμα} * \text{Υποδοχέας}] K_{\text{off}} \quad [5]$$

A.2.8 Μέθοδοι Μελέτης Πρωτεϊνικής Σύνδεσης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-πρωτεϊνών, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- 1) Μελέτη της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με την καθαρή μορφή μίας μεμονωμένης πρωτεΐνης του πλάσματος (συνήθως αλβουμίνη ή α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη) η οποία είναι ακινητοποιημένη σε μία επιφάνεια ή χρωματογραφική στήλη. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται διαλύματα της καθαρής πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.
- 2) Μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός φαρμάκου με αληθινό πλάσμα. Σε αυτή την περίπτωση μόνο η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου μπορεί να μετρηθεί στο δείγμα του πλάσματος, και το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης προκύπτει μετά από αναγωγή στην ολική συγκέντρωση του φαρμάκου στο δείγμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το «ελεύθερο κλάσμα» του φαρμάκου, δηλαδή αυτό που μπορεί θεωρητικά να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, είναι η ποσότητα του φαρμάκου που δεν είναι συνδεδεμένο με κανένα από τα συστατικά του πλάσματος, οπότε και μπορεί να απομονωθεί και να ποσοτικοποιηθεί με κλασικές αναλυτικές μεθόδους. Αντίθετα, το «δεσμευμένο κλάσμα» του φαρμάκου, δηλαδή αυτό που είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες ή άλλα συστατικά του πλάσματος, δεν μπορεί να απομονωθεί και να ποσοτικοποιηθεί με τις κλασικές μεθόδους ανάλυσης.

Σε γενικές γραμμές, η πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου μελετάται *in vitro* αναμειγνύοντας γνωστή ποσότητα φαρμάκου σε δείγμα πλάσματος. Εναλλακτικά η μελέτη

αυτή μπορεί να γίνει in vivo σε πλάσμα εθελοντών που έχουν λάβει γνωστή ποσότητα του φαρμάκου. Ακόμη, η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου μπορεί να υπολογιστεί κατευθείαν σε ολικό αίμα (και όχι σε πλάσμα), ωστόσο αυτή η μέθοδος είναι περίπλοκη και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στις συχνά χρησιμοποιούμενες πειραματικές διατάξεις.

Μια άλλη προσέγγιση πέρα από την ποσοτικοποίηση του ελεύθερου κλάσματος ενός φαρμάκου είναι η μελέτη της μεταβολής των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του φαρμάκου ή/και της πρωτεΐνης για την εκτίμηση του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου. Με αυτό τον τρόπο, δεν είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός της ελεύθερης και της δεσμευμένης μορφής ενός φαρμάκου.

Επομένως οι μέθοδοι μελέτης του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου διακρίνονται σε διαχωριστικές και μη διαχωριστικές μεθόδους. [26]

A.2.8.1 Διαχωριστικές μέθοδοι

Σε αυτές τις μεθόδους, η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου μετράται αφού πρώτα απομονωθεί από την χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη και το σύμπλοκο πρωτεΐνης-φαρμάκου. Οι διαχωριστικές μέθοδοι διακρίνονται περαιτέρω στις μεθόδους εντός δικτύου (on-line methods) και στις μεθόδους εκτός δικτύου (off-line methods). Στις off-line μεθόδους, μετά το διαχωρισμό του ελεύθερου φαρμάκου, αυτό ποσοτικοποιείται αφού πρώτα το διάλυμα στο οποίο περιέχεται μεταφερθεί στο μηχάνημα ανάλυσης. Αντιθέτως, στις on-line μεθόδους, δεν απαιτούνται δύο βήματα, δηλαδή διαχωρισμός και μέτρηση, καθώς αυτά εκτελούνται ταυτόχρονα, δηλαδή το ελεύθερο φάρμακο διαχωρίζεται σε μία χρωματογραφική στήλη ή στήλη τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης και ταυτόχρονα ποσοτικοποιείται μέσω της ίδιας της αναλυτικής τεχνικής.

A.2.8.1.1 Μέθοδοι εκτός δικτύου:

- 1) Μέθοδοι που βασίζονται στη χρήση μεμβρανών: Σε αυτές τις μεθόδους, το ελεύθερο φάρμακο χωρίζεται από το δεσμευμένο μέσω μεμβράνης. Τέτοιες μέθοδοι είναι η διαπίδυση σε ισορροπία (equilibrium dialysis) και η υπερδιήθηση (ultrafiltration).
- 2) Μέθοδοι όπως η υπερφυγοκέντρωση (ultracentrifugation) που δεν απαιτούν τη χρήση μεμβρανών, οπότε και δεν παρουσιάζουν τα μειονεκτήματα αυτής της κατηγορίας πειραμάτων.

Οι off-line διαχωριστικές μέθοδοι που αναφέρθηκαν θεωρούνται ως οι «παραδοσιακές τεχνικές» μελέτης της πρωτεϊνικής σύνδεσης, λόγω της δημοφιλίας τους και της μακροχρόνιας εμπειρίας στη χρήση τους κατά τη μετάβαση μίας ουσίας από τις προκλινικές στις κλινικές μελέτες. [23] Ειδικότερα η διαπίδυση σε ισορροπία είναι η πειραματική μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία για τη μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξουκλίνης, και θα συζητηθεί εκτενέστερα παρακάτω.

A.2.8.1.2 Μέθοδοι εντός ή/και εκτός δικτύου (μέθοδοι εκχύλισης):

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών των μεθόδων είναι η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid-phase microextraction (LPME)), η εκχύλιση ηλεκτρομεμβράνης (electromembrane extraction (EME)) και η μικροδιάλυση (microdialysis). Σε αυτές τις μεθόδους ένας διαλύτης μη μιγνυόμενος με το νερό ή μία στερεή φάση χρησιμοποιούνται ως προσροφητικό υλικό. Τα μόρια του ελεύθερου φαρμάκου μετακινούνται από το διάλυμα του πλάσματος στη φάση προσρόφησης. Στη συνέχεια η φάση που περιέχει το προσροφητικό υλικό απομακρύνεται από το διάλυμα που περιέχει τις πρωτεΐνες του πλάσματος και σε αυτή μετράται η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου. Η ποσότητα της φάσης προσρόφησης που χρησιμοποιείται γενικά είναι της τάξης μg ή μL, επομένως αυτές οι μέθοδοι αναφέρονται και ως μέθοδοι μικροεκχύλισης. Λόγω της υδρόφοβης φύσης της φάσης προσρόφησης, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούνται κυρίως στη μελέτη υδρόφοβων φαρμάκων. Αυτές οι μέθοδοι επίσης είναι κατάλληλες για τη μελέτη φαρμάκων των οποίων η συγκέντρωση στο πλάσμα είναι ιδιαίτερα χαμηλή, καθώς όταν η εκχύλιση του φαρμάκου πραγματοποιείται με μεγάλο όγκο δείγματος σε μικρή ποσότητα προσροφητικού υλικού, γίνεται αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη φάση προσρόφησης, κάτι που αυξάνει εν τέλει το αναλυτικό σήμα και βοηθά στον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων χαμηλής συγκέντρωσης. Οι μέθοδοι εκχύλισης μπορούν να διενεργηθούν είτε εντός είτε εκτός δικτύου.

A.2.8.1.3 Μέθοδοι εντός δικτύου

Χρωματογραφικές μέθοδοι: Οι κυριότερες χρωματογραφικές μέθοδοι μελέτης της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography (SEC)) και η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography). Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι η υψηλή ακρίβεια, ταχύτητα και αποδοτικότητα, το χαμηλό όριο ανίχνευσης και η δυνατότητα αυτοματοποίησης.

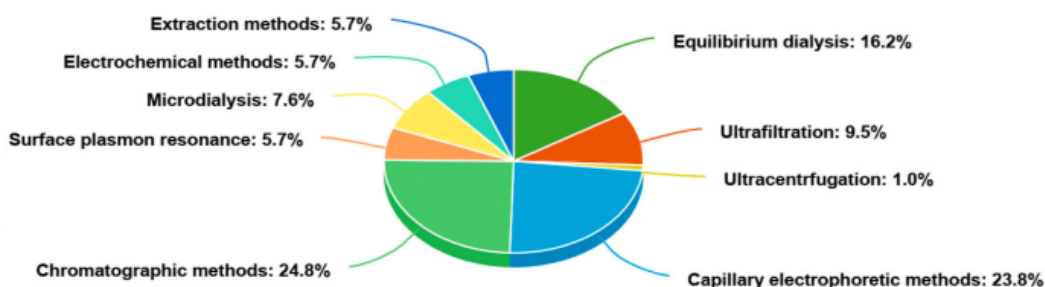
Τεχνικές τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoretic techniques)

Πρόκειται για νεότερες τεχνικές που χαίρουν ιδιαίτερης δημοφιλίας λόγω του ότι έχουν μικρή κατανάλωση δείγματος, απλότητα στη χρήση και υψηλή ευκρίνεια, μικρό χρόνο ανάλυσης και δυνατότητα αυτοματοποίησης. Ενδεικτικά αναφέρονται η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση συγγένειας (affinity capillary electrophoresis – ACE), η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση – μετωπική ανάλυση (CE with frontal analysis – CE/FA) και οι μέθοδοι Hummel Dreyer (HD). Από αυτές τις μεθόδους, η μέθοδος CE/FA φαίνεται να είναι η απλούστερη και ακριβέστερη μέθοδος μελέτης των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-φαρμάκου. Επίσης η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τη μελέτη μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων σε σχεδόν φυσιολογικές συνθήκες. [26]

A.2.8.2 Μη διαχωριστικές μέθοδοι

Σε αυτές, ο διαχωρισμός του δεσμευμένου από το ελεύθερο κλάσμα του φαρμάκου δεν είναι απαραίτητος, και οι υπολογισμοί πραγματοποιούνται απευθείας σε διάλυμα που περιέχει τόσο το ελεύθερο φάρμακο, όσο και την/τις πρωτεΐνες και το σύμπλοκο φαρμάκου/πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μη διαχωριστικών μεθόδων είναι οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, οι οποίες επιτρέπουν τον άμεσο υπολογισμό των σταθερών σύζευξης και της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο διάλυμα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη μεταβολή των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών κατά τη σύζευξή τους με κάποιο μόριο-συνδέτη. Άλλες μέθοδοι που υπάγονται σε αυτή την κατηγορία είναι οι ηλεκτροχημικές και οι θερμοδομετρικές μέθοδοι.

Στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας A-1] απεικονίζονται οι διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων με βάση τη σχετική συχνότητα χρήσης τους την τελευταία δεκαετία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι λεγόμενες «παραδοσιακές τεχνικές» προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης καταλαμβάνουν περίπου το ¼ των πλέον πρόσφατων πειραμάτων πρωτεϊνικής σύνδεσης.



Πίνακας A-1: Το επί τοις εκατό ποσοστό χρήσης των διαφορετικών μεθόδων μελέτης της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων μετά το 2010

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση για προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μη δεσμευμένου φαρμάκου όχι σε πλάσμα, αλλά σε δείγμα ολικού αίματος, ώστε οι *in vitro* πειραματικές διατάξεις να προσομοιάζουν όσο γίνεται πληρέστερα τα *in vivo* δεδομένα. Τεχνικές όπως η διαπύδηση σε ισορροπία και η υπερδιήθηση δεν είναι συμβατές με τη χρήση ολικού αίματος, καθώς σε αυτές μπορεί να συμβούν αιμόλυση και απόφραξη των φίλτρων αντίστοιχα.

Η επιλογή της επιθυμητής μεθόδου εξαρτάται από το τι πληροφορίες θέλουμε να εξάγουμε από το πείραμα πρωτεϊνικής σύνδεσης καθώς και από το σκοπό διενέργειάς του. Για παράδειγμα, σε εφαρμογές εξατομικευμένης ιατρικής ή TDM, είναι προτιμότερη η επιλογή μεθόδων που βασίζονται στη μέτρηση του ελεύθερου φαρμάκου σε δείγμα πλάσματος. Ωστόσο, αν είναι γνωστό ότι ένα φάρμακο συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά σε μία ενδογενή πρωτεΐνη (όπως η αλβουμίνη), τότε χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση τεχνικές που βασίζονται στη μέτρηση της σύνδεσης ενός φαρμάκου με μία ορισμένη πρωτεΐνη. [26]

A.2.9 Διαπίδυση σε ισορροπία

Η διαπίδυση σε ισορροπία θεωρείται ο «χρυσός κανόνας» των μεθόδων προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων και συχνά χρησιμοποιείται ως η μέθοδος αναφοράς σε σύγκριση με άλλες αντίστοιχες μεθόδους.

Στη μέθοδο διαπίδυσης σε ισορροπία χρησιμοποιείται μία συσκευή με δύο θαλάμους-διαμερίσματα, τα οποία διαχωρίζονται από μία ημιπερατή μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση εκατέρωθεν των ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους όπως τα μόρια του ελεύθερου φαρμάκου, ενώ τα μεγαλομοριακά σύμπλοκα πρωτεϊνών-φαρμάκων και οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να κινηθούν ελεύθερα μεταξύ των διαμερισμάτων. Οι χρησιμοποιούμενες μεμβράνες έχουν κατώφλι αποκοπής μοριακού βάρους 5-12kDa.

Στο ένα διαμέρισμα τοποθετείται ορισμένος όγκος διαλύματος που περιέχει το υπό μελέτη φάρμακο σε ορισμένη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ενώ στο άλλο διαμέρισμα τοποθετείται ίσος όγκος ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Στη συνέχεια η συσκευή επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C σε ατμόσφαιρα CO₂ για επαρκές χρονικό διάστημα έως ότου αποκατασταθεί η ισορροπία στα δύο διαμερίσματα. Η ισορροπία θα έχει επέλθει όταν το μη δεσμευμένο φάρμακο θα βρίσκεται στην ίδια συγκέντρωση εκατέρωθεν της μεμβράνης, ενώ το δεσμευμένο φάρμακο θα βρίσκεται μονάχα στο διαμέρισμα με το διάλυμα πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, ίδιος όγκος διαλύματος λαμβάνεται από τα δύο διαμερίσματα και αναλύεται ποσοτικά είτε με ραδιομετρικές μεθόδους, είτε με μέθοδο LC-MS/MS. Τέλος, η πρωτεϊνική σύνδεση υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψιν τόσο το ελεύθερο κλάσμα, όσο και την ολική συγκέντρωση του φαρμάκου. [23] [25] [26]

Ο χρόνος που απαιτείται για την αποκατάσταση ισορροπίας υπολογίζεται πειραματικά, όταν η μετρούμενη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου παραμένει σταθερή σε δύο διαδοχικές χρονικά μετρήσεις. Σε γενικές γραμμές για πρακτικούς λόγους, ως χρόνος εξισορρόπησης τίθενται οι 24 ώρες. Ωστόσο ο χρόνος αυτός μπορεί να οριστεί κατά την κρίση των ερευνητών στις 4, 6 ή 8 ώρες. Ουσίες μεγάλου μοριακού βάρους και ουσίες που εμφανίζουν εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να βρεθούν σε κατάσταση ισορροπίας. Για την ταχύτερη αποκατάσταση της ισορροπίας, το όλο σύστημα τίθεται υπό ανακίνηση και το φάρμακο τοποθετείται και στο διαμέρισμα με το

διάλυμα

πρωτεΐνης.

Πολύ αυξημένοι χρόνοι αποκατάστασης ισορροπίας θα πρέπει να αποφεύγονται διότι μπορεί να οδηγήσουν σε σφάλματα εξαιτίας βακτηριακής επιμόλυνσης, μεταβολών στο pH του πλάσματος και μη ισόποσης μετακίνησης υγρού μεταξύ των δύο διαμερισμάτων. [23] [25]

Τα τελευταία χρόνια, ο χρόνος που απαιτείται για την εκτέλεση ενός πειράματος διαπύδησης σε ισορροπία έχει μειωθεί, με την ανάπτυξη μεθόδων υψηλής αποδοτικότητας, όπως οι συσκευές που συγκροτούνται από 48 ή 96 κυψέλες με κατακόρυφα ανοιχτούς κυλινδρικούς θαλάμους που επιτρέπουν την ευκολότερη χρήση, τον αυτοματισμό και την αύξηση του αριθμού των ουσιών που μπορούν να αναλυθούν κατά τη διάρκεια ενός πειράματος. [23] [25] [26]

Όσον αφορά τους μαθηματικούς υπολογισμούς, το μη δεσμευμένο κλάσμα του φαρμάκου (f_u) υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$f_u = \frac{C_{\text{buffer}}}{C_{\text{plasma}}}$$

Όπου C_{buffer} είναι η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου φαρμάκου στο διαμέρισμα που περιέχει μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα μετά την αποκατάσταση ισορροπίας και C_{plasma} είναι η ολική συγκέντρωση του φαρμάκου στο διαμέρισμα που περιέχει το πλάσμα. [23]

Το επί τοις εκατό ποσοστό του ελεύθερου φαρμάκου (% Free) και του φαρμάκου που είναι συνδεδεμένο σε πρωτεΐνη (% Bound) υπολογίζεται ως ακολούθως:

$$\begin{aligned} \% \text{ Free} &= f_u \times 100 \\ \% \text{ Bound} &= (1 - f_u) \times 100 \end{aligned}$$

Παρά την εκτεταμένη χρήση και τη δημοφιλία της, η μέθοδος της διαπύδησης σε ισορροπία παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα: α) ο αυξημένος χρόνος εξισορρόπησης, β) ο μειωμένος αυτοματισμός, γ) η διαρροή πρωτεϊνών μεταξύ των δύο διαμερισμάτων λόγω μείωσης της ακεραιότητας της μεμβράνης, δ) η δέσμευση του φαρμάκου στα υλικά μέρη της πειραματικής διάταξης, όπως η μεμβράνη ή τα διάφορα πλαστικά εξαρτήματα, ε) η μετατόπιση όγκου διαλύτη μεταξύ των διαμερισμάτων εξαιτίας της επίδρασης ωσμωτικών φαινομένων, στ) η αποικοδόμηση της ουσίας, ζ) το φαινόμενο Donnan. [23] [25] [26]

Ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή ορισμένων από αυτά τα μειονεκτήματα:

Φαινόμενο Donnan:

Στην περίπτωση των πειραμάτων διαπύδησης σε ισορροπία, αυξημένες συγκεντρώσεις μεγαλομοριακών, μη ευκίνητων ιόντων (όπως οι πρωτεΐνες) στη μία πλευρά ενός συστήματος δύο διαλυμάτων που χωρίζονται με ημιπερατή μεμβράνη, προκαλούν

ανισοκατανομή μικρών ευκίνητων ιόντων εκατέρωθεν της μεμβράνης, καθώς τα αντισταθμιστικά ιόντα αντίθετου φορτίου τείνουν να συγκεντρώνονται στο διαμέρισμα που περιέχει το διάλυμα πρωτεϊνών, ενώ τα ιόντα ίδιου φορτίου τείνουν αντίστοιχα να απομακρύνονται από το διαμέρισμα αυτό.

Το σφάλμα που προκύπτει εξαιτίας αυτού του φαινομένου αφορά ιδιαίτερα φαρμακευτικές ουσίες με υψηλό βαθμό ιονισμού και χαμηλή έως μέτριου βαθμού πρωτεϊνική σύνδεση και μπορεί να αποφευχθεί είτε με μαθηματικούς υπολογισμούς, είτε με την αυξημένη προσθήκη ηλεκτρολυτών στο ρυθμιστικό διάλυμα. [25] [26]

Έκτοπη δέσμευση του φαρμάκου στη μεμβράνη ή τα υλικά μέρη της πειραματικής διάταξης:

Αφορά κυρίως λιπόφιλα φάρμακα τα οποία έλκονται σε μεγάλο βαθμό είτε από την ίδια τη μεμβράνη, είτε από τα πλαστικά μέρη της συσκευής. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του μη δεσμευμένου κλάσματος του φαρμάκου και επομένως σε θετικό σφάλμα όσον αφορά την πρωτεϊνική σύνδεση του φαρμάκου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού, όπως η χρησιμοποίηση υλικών όπως το Teflon στις πειραματικές διατάξεις και ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων του φαρμάκου και στα δύο διαμερίσματα της συσκευής. Εναλλακτικά, όταν το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο, η χρήση κάποιας εναλλακτικής μεθόδου υπολογισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης (όπως η υπερφυγοκέντρωση) ίσως είναι απαραίτητη. Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει προσπάθειες τροποποίησης της μεθόδου διαπίδωσης σε ισορροπία ώστε να ελαχιστοποιηθεί το φαινόμενο της έκτοπης σύνδεσης, όπως για παράδειγμα με την ανάπτυξη της μεθόδου επαναλαμβανόμενης κλιμακωτής διαπίδωσης σε ισορροπία σε αμφίδρομη διάταξη.

Μεταβολές όγκου μεταξύ των διαμερισμάτων:

Έχουν πρακτική σημασία όταν ο όγκος καθενός από τα διαμερίσματα μεταβάλλεται σε ποσοστό άνω του 10% εξαιτίας της μετακίνησης υγρού από το ρυθμιστικό διάλυμα στο πρωτεϊνικό διάλυμα λόγω κολλοειδωσμοτικής πίεσης. Το φαινόμενο αυτό προκαλεί αραίωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο αντίστοιχο διαμέρισμα και επομένως μεταβάλλει τη σταθερά σύνδεσης κυρίως των φαρμάκων που εμφανίζουν μικρή πρωτεϊνική σύνδεση. Το σφάλμα που προκαλείται μπορεί να αντιμετωπιστεί είτε με την προσθήκη δεξτράνης στο ρυθμιστικό διάλυμα για τη ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης, είτε με τους κατάλληλους μαθηματικούς χειρισμούς. [25]

Διαρροή πρωτεΐνης μεταξύ των δύο διαμερισμάτων:

Είναι συχνό πρόβλημα το οποίο προκαλεί μεταβλητότητα των μετρούμενων αποτελεσμάτων. Η χρήση των κατάλληλων μεμβρανών με κατώφλι αποκοπής μοριακού βάρους 10kDa κατ' ελάχιστον μπορεί να ελαχιστοποιήσει τον κίνδυνο διαρροής. Ένας εύκολος τρόπος να ελεγχθεί η διαρροή πρωτεϊνών είναι με την προσθήκη μικρής ποσότητας

ακετονιτριλίου στο δείγμα και ο έλεγχος για τη δημιουργία ιζήματος ή αιωρούμενων σωματιδίων στο διάλυμα. [23]

B. Πειραματικό Μέρος

B.1 Σκοπός της εργασίας

Η δοξυκυκλίνη είναι ένα φάρμακο με πολλαπλές ιδιότητες, καθώς, εκτός από την ευρέως φάσματος αντιμικροβιακή της δράση, χρησιμοποιείται και για τη θεραπεία αρκετών μη μολυσματικών ασθενειών λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της, ενώ τα τελευταία χρόνια μελετάται το είδος, η έκταση και ο μηχανισμός της αντι-ογκογόνου δράσης της.

Η πρωτεϊνική σύνδεση είναι μία φαρμακοκινητική παράμετρος που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των αντιμικροβιακών παραγόντων. Η δοξυκυκλίνη είναι το φάρμακο της κατηγορίας των τετρακυκλινών με το υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης στο ανθρώπινο πλάσμα, και σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, φαίνεται ότι εμφανίζει μη τυπική μη γραμμική πρωτεϊνική σύνδεση, όπως και άλλα μέλη της ίδιας φαρμακολογικής κατηγορίας. Ωστόσο φαίνεται ότι τα ευρήματα αυτά θεωρούνται πρώιμα και χρήζουν επιβεβαίωσης μέσω μελετών που θα χρησιμοποιήσουν διαφορετικές πειραματικές διατάξεις.

Επομένως, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη και ο χαρακτηρισμός της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε βόεια και ανθρώπινη αλβουμίνη, καθώς και σε ανθρώπινο πλάσμα με τη μέθοδο της διαπύδησης σε ισορροπία, που θεωρείται ο χρυσός κανόνας για αυτού του είδους τις μελέτες.

B.2 Οργανολογία

- Ανακινούμενο και θερμοστατούμενο υδατόλουτρο Unitronic (JP Selecta).
- Αναλυτικός ζυγός Kern 770, Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Germany)
- Πεχάμετρο Schott, Lab 860 (MAINZ, GERMANY)
- Μαγνητική πλάκα IKAMAG RH, Janke & Kunkel (IKA- Labortechnik))
- Συσκευή διαπύδησης σε ισορροπία Dianorm dialysis
- UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER UV-1700, Pharmaspec (SHIMADZU)
- Ιοντοανταλλακτική συσκευή αποστάξεως ύδατος

B.3 Υλικά

B.3.1 Φάρμακα και Φαρμακοτεχνικές μορφές

- Αμπούλες δοξυκυκλίνης Doxycyclinum TZF (Doxycyclinum Hyclas 20mg/mL) 10 αμπούλες των 5mL. Polfa Tarchomin S.A.
- Βόεια αλβουμίνη (Bovine Serum Albumin) A-6918 50g, SIGMA-ALDRICH LOT 38H1393
- Albumine LFB 200g/L Διάλυμα για έγχυση 100mL Ανθρώπινη λευκωματίνη LOT 21L06454

B.3.2 Αντιδραστήρια- Μικροόργανα

- Μεμβράνες Dialysis diachema και Harvard Apparatus, mw. cutoff 5000, diameter, 63 mm, quantity 200 pcs
- Υλικά για buffer

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, λόγω εξάντλησης των μεμβρανών Dialysis diachema, έγινε παραγγελία νέων μεμβρανών Harvard Apparatus. Στα πειράματα κατά τα οποία μελετήθηκε η πρωτεϊνική σύνδεση με αλβουμίνη 4% w/v (βόεια) χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες Dialysis diachema, ενώ στα πειράματα με αλβουμίνη 2% w/v (βόεια, ανθρώπινη, πλάσμα) χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες Harvard Apparatus.

- Χλωριούχο Νάτριο (NaCl), MB=58.44, 131659.1211, Panreac (Barcelona, Spain)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), MB=117,99, 142507.1211, Panreac (Barcelona, Spain)
- Χλωριούχο Κάλιο (KCl), MB=74.55, 1.04936.1000, E. Merck (Darmstadt, Germany)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), MB=136.09, 1.04873.1000, E. Merck (Darmstadt, Germany)

B.4 Πείραμα Πρωτεϊνικής Σύνδεσης Δοξυκυκλίνης

B.4.1 Παρασκευή διαλυμάτων

B.4.1.1 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M, pH 7.4 (NaH_2PO_4 - H_3PO_4):

1. 800mL απιονισμένου νερού προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως 1000mL, το οποίο τοποθετείται πάνω σε κινούμενη μαγνητική πλάκα
2. Ζυγίζονται 8g NaCl και μεταφέρονται ποσοτικά στο ποτήρι ζέσεως
3. Ζυγίζονται 200mg KCl και μεταφέρονται ποσοτικά στο ποτήρι ζέσεως
4. Ζυγίζονται 1.44g Na_2PO_4 και μεταφέρονται ποσοτικά στο ποτήρι ζέσεως
5. Ζυγίζονται 245mg KH_2PO_4 και μεταφέρονται ποσοτικά στο ποτήρι ζέσεως
6. Μετράται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται στην επιθυμητή τιμή pH (7.4)
7. Το βαθμονομημένο διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε ογκομετρική φιάλη 1L και αραιώνεται μέχρι την χαραγή με απιονισμένο νερό

B.4.1.2 Παρασκευή διαλύματος παρακαταθήκης δοξυκυκλίνης (stock solution):

Κάθε αμπούλα δοξυκυκλίνης έχει συγκέντρωση 20mg/mL. 100μL (0,1mL) από το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL, και αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Τελική συγκέντρωση διαλύματος παρακαταθήκης δοξυκυκλίνης 0,2mg/mL).

B.4.1.3 Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας δοξουκλίνης (working solutions):

100, 250, 350, 500, 750, 1000, 1500 και 2500 μL διαλύματος παρακαταθήκης δοξουκλίνης μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλύπτοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων 1-25 $\mu\text{g/mL}$.

B.4.1.4 Παρασκευή διαλυμάτων ανθρώπινης και βόειας αλβουμίνης-δοξουκλίνης:

400 mg και 800 mg βόειας αλβουμίνης διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL προς παρασκευή διαλυμάτων 2% και 4% w/v αντίστοιχα. Στη συνέχεια 100, 250, 350, 500, 750, 1000, 1500 και 2500 μL διαλύματος παρακαταθήκης δοξουκλίνης μεταφέρθηκαν στις ογκομετρικές φιάλες των 20 mL καλύπτοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων 1-25 $\mu\text{g/mL}$ και τα διαλύματα αλβουμίνης-δοξουκλίνης αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

Για την παρασκευή διαλυμάτων ανθρώπινης αλβουμίνης συγκέντρωσης 2%, 2mL διαλύματος αλβουμίνης συγκέντρωσης 200g/L μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες των 20mL όπου, αφού προσθέσουμε και τον προκαθορισμένο όγκο διαλύματος παρακαταθήκης δοξουκλίνης, αραιώνουμε μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

B.4.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

B.4.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων δοξουκλίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 0,05M

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς μεταφέρθηκαν 100, 150, 300, 500, 750, 1000, 1250 και 1500 μL διαλύματος παρακαταθήκης δοξουκλίνης 200 $\mu\text{g/mL}$ σε ογκομετρικές φιάλες των 20 mL και αραιώθηκαν μέχρι τη χαραγή με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05M, pH 7,4 καλύπτοντας ένα εύρος συγκεντρώσεων 1-15 $\mu\text{g/mL}$. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού σε εύρος μήκους κύματος 180-400nm. Η απορρόφηση καταγράφηκε σε μήκος κύματος 350 nm.

B.4.3 Πρωτόκολλο πειράματος πρωτεϊνικής σύνδεσης

B.4.3.1 Μεμβράνες

Η επιλογή των μεμβρανών αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία ενός πειράματος πρωτεϊνικής σύνδεσης. Προκειμένου να επιλεγεί η κατάλληλη μεμβράνη ελέγχεται η χημική της δομή, το πάχος και οι φυσικοχημικές της ιδιότητες, όπως το μέγεθος, η φύση των πόρων και το φορτίο που αποκτούν στο πειραματικό διάλυμα, το οποίο μπορεί να τροποποιηθεί από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Το πάχος της μεμβράνης επιλέγεται να μην είναι μεγάλο καθώς επηρεάζει α) τον χρόνο εξισορρόπησης και β) την μη ειδική σύνδεση του φαρμάκου στην μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός αποκατάστασης της ισορροπίας είναι σχεδόν αντιστρόφως ανάλογος του πάχους της μεμβράνης καθώς αυξανόμενου του μήκους της διαδρομής που πρέπει να διανύσει το φάρμακο, αυξάνεται και ο απαιτούμενος χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας. Για τους προαναφερθέντες λόγους, οι εμπορικά διαθέσιμες μεμβράνες νιτροκυτταρίνης δεν είναι

κατάλληλες λόγω του μεγάλου πάχους τους. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες Dialysis diachema, mw. cutoff 5000 και μεμβράνες Harvard Apparatus, Regenerated Cellulose Membrane, mw. Cutoff 10000.

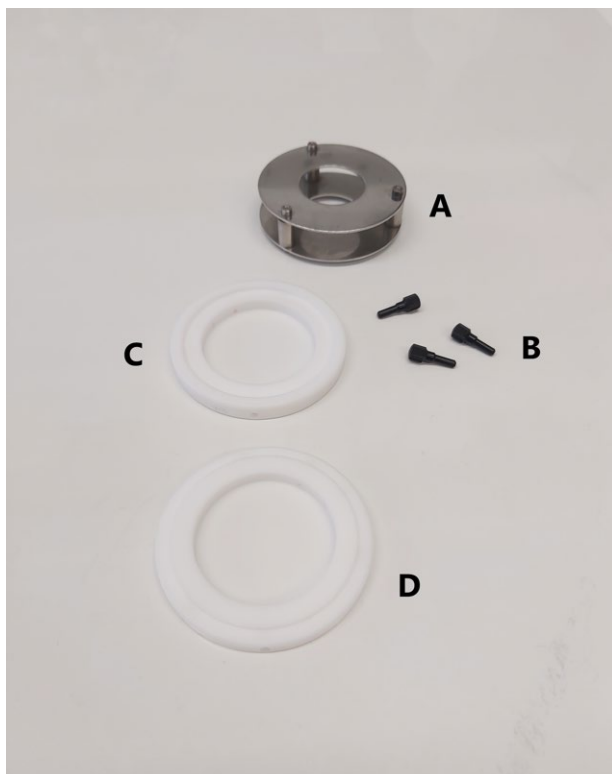
B.4.3.2 Προετοιμασία μεμβρανών

Για την προετοιμασία των μεμβρανών έγινε εμποτισμός τους σε απιονισμένο νερό για 15 λεπτά. Στην συνέχεια η πρώτη ποσότητα απιονισμένου νερού απορρίπτεται, και οι μεμβράνες εμποτίζονται σε νέο όγκο απιονισμένου νερού για 30 λεπτά. Τέλος, οι μεμβράνες μεταφέρονται σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος και παραμένουν σ' αυτό για 15 λεπτά.

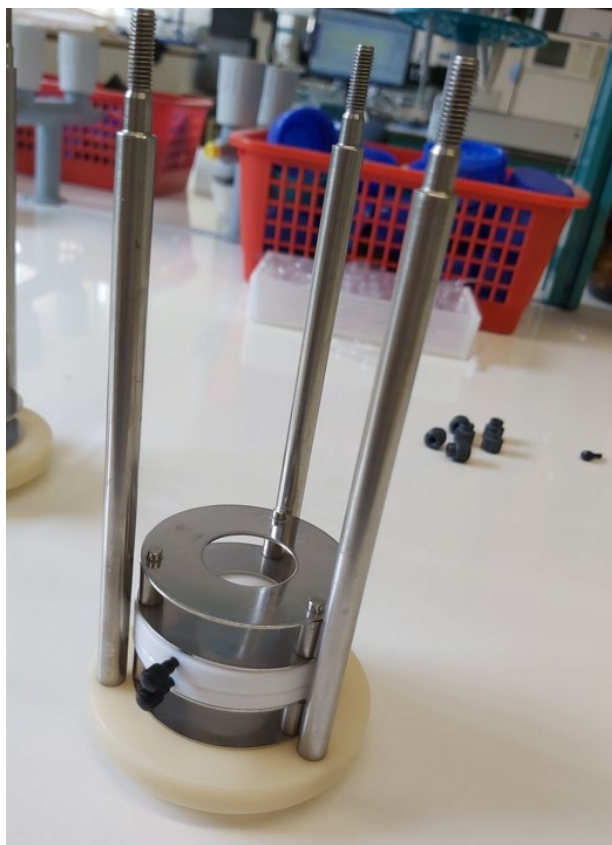
B.4.3.3 Προετοιμασία κυττάρων και συναρμολόγηση φορέα κυττάρων:

Το κύτταρο αποτελεί το βασικό κομμάτι της συσκευής, στο οποίο μελετάται η μέθοδος της διαπίδωσης σε ισορροπία. Το κάθε κύτταρο αποτελείται από δυο τμήματα: α) το λεπτό τμήμα ή «αρσενικό» στοιχείο του κυττάρου ή καπάκι (lid) και β) το παχύ τμήμα ή «θηλυκό» στοιχείο του κυττάρου ή βάση (base). Το κάθε ήμισυ του κυττάρου έχει τρεις μικρές οπές στις οποίες εφαρμόζονται τα κατάλληλα πόματα. Οι δύο κοντινές μεταξύ τους οπές εξυπηρετούν την πλήρωση του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα η μια υποδέχεται την απόληξη της πιπέτας ενώ η άλλη χρησιμεύει για την εκτόνωση του αέρα κατά την εισαγωγή του δείγματος. Η τρίτη οπή εξυπηρετεί το άδειασμα του περιεχομένου του

κυττάρων. Παρακάτω απεικονίζονται τα διάφορα εξαρτήματα της πειραματικής διάταξης [Εικόνες B-1, B-2 και B-3].



Εικόνα B-1: A: μεταλλικό έλασμα, B: πόμα που καλύπτει τις οπές, C: βάση (base), D: καπάκι (lid)



Εικόνα Β-2: Τοποθέτηση του πρώτου συναρμολογημένου κυττάρου μέσα στον φορέα κυττάρων, μεταξύ δύο μεταλλικών ελασμάτων



Εικόνα Β-3: Πλήρως συναρμολογημένος φορέας κυττάρων

Για την συναρμολόγηση χρησιμοποιήθηκε η εξής μέθοδος:

1. Τοποθέτηση των πωμάτων στις μονές οπές των κυττάρων, ενώ οι δύο κοντινές οπές πλήρωσης και εκτόνωσης παραμένουν ανοιχτές
2. Εφαρμογή της εμποτισμένης μεμβράνης στο καπάκι (αρσενικό στοιχείο) του κυττάρου
3. Ήπιο τέντωμα της μεμβράνης (ώστε να εξαφανιστούν οι τσαλακωμένες περιοχές)
4. Εφαρμογή της βάσης του κυττάρου πάνω στο καπάκι
5. Ευθυγράμμιση των πωμάτων ώστε να επιτευχθεί απόλυτη συμμετρία στο κύτταρο
6. Τοποθέτηση του συναρμολογημένου κυττάρου μέσα στον φορέα κυττάρων και συγκεκριμένα επάνω στο πρώτο μεταλλικό έλασμα που έχει ήδη μεταφερθεί εντός του φορέα. Το κύτταρο τοποθετείται με τέτοιο προσανατολισμό ώστε η βάση του να κοιτάει προς τα κάτω.
7. Τοποθέτηση του επόμενου μεταλλικού ελάσματος
8. Επανάληψη των παραπάνω βημάτων μέχρι την πλήρωση του φορέα με εναλλάξ κύτταρα και ελάσματα.

Ο συνολικός αριθμός κυττάρων και ελασμάτων που χρησιμοποιούνται για τη συναρμολόγηση ενός φορέα είναι 5 και 6, αντίστοιχα. Η συσκευή περιλαμβάνει δυο φορείς. Συνεπώς είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανάλυση 10 δειγμάτων. Σε κάθε βήμα τα κύτταρα στοιβάχτηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε α) τα πώματα να είναι ευθυγραμμισμένα και β) η βάση

και το καπάκι να είναι προσανατολισμένα με τον ίδιο τρόπο σε κάθε κύτταρο. Τα ειδικά ελάσματα επιτρέπουν την κυκλοφορία του υγρού ανάμεσα στα κύτταρα όταν αυτά βρίσκονται εντός του θερμοστατούμενου και ανακινούμενου υδατόλουτρου.

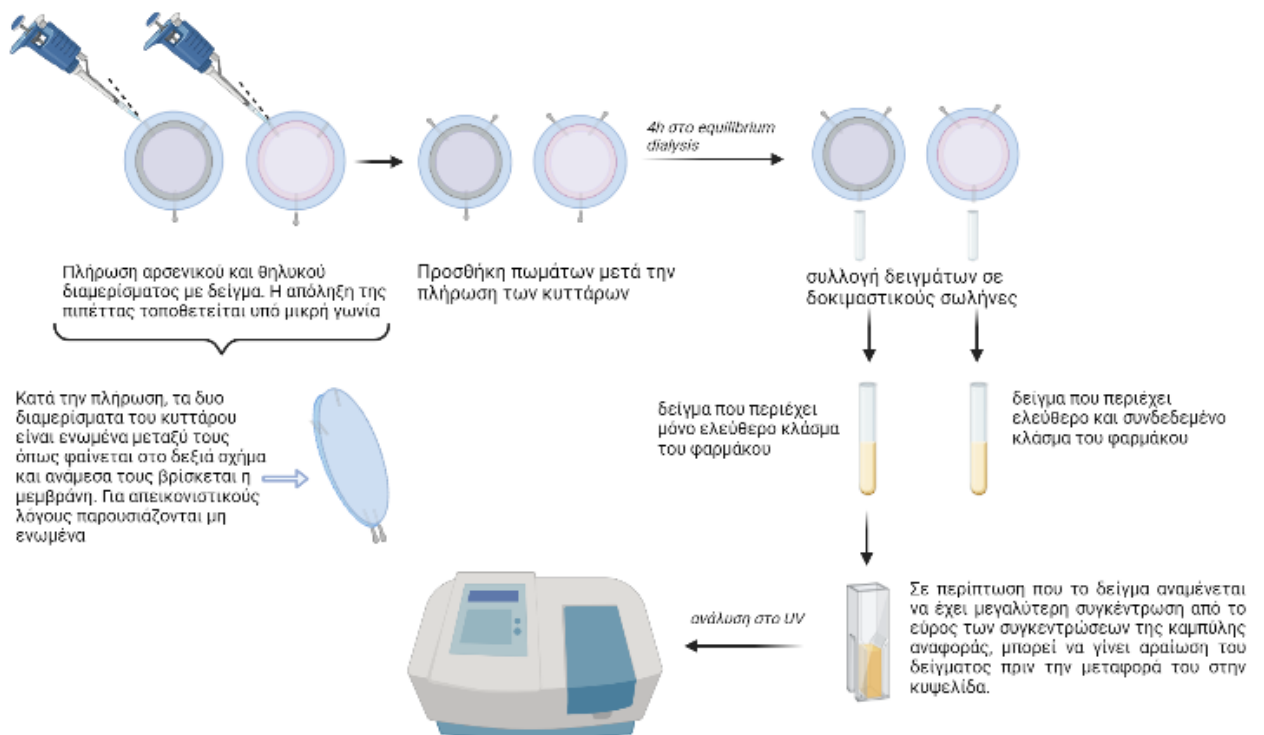
9. Όταν γίνει η τοποθέτηση του τελευταίου ελάσματος, ο φορέας κλειδώνεται με το φέρον εξάρτημα και το σύστημα ασφαλιζεται με τρεις πλαστικές βίδες. Με τον τρόπο αυτό ασκείται πίεση το εσωτερικό του φορέα ώστε μην υπάρχει διαρροή διαλύματος από τα κύτταρα
10. Ο φορέας τοποθετείται στη συσκευή διαπίδσης (Dianorm, Diachema, Switzerland)

B.4.3.4 Πλήρωση κυττάρων και συλλογή δειγμάτων.

Το κάθε τμήμα του κυττάρου που διαχωρίζεται από την μεμβράνη (κοιλότητα στην οποία πληρώνεται το υγρό) έχει μέγιστη χωρητικότητα 5ml. Για την πλήρωση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε πιπέττα με όγκο πλήρωσης 1-5mL. Στην βάση, η οποία λειτουργεί ως διαμέρισμα δότης, εισάγονται 4mL μικτού διαλύματος αλβουμίνης (4 και 2% w/v)-δοξυκυκλίνης, ενώ στο καπάκι που λειτουργεί ως διαμέρισμα δέκτης, εισάγονται 4mL διαλύματος δοξυκυκλίνης. Προκειμένου να γίνει σωστά η πλήρωση των κυττάρων και να μην υπάρχει απώλεια διαλύματος, α) η απόληξη της πιπέττας εισήχθη υπό μικρή γωνία στις κοιλότητες, ως προς τον άξονα του φορέα και β) η πλήρωση έγινε με γρήγορο ρυθμό. Μετά την πλήρωση του κάθε διαμερίσματος τοποθετήθηκαν τα πώματα.

Μετά την πλήρωση των κυττάρων, η συσκευή τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο με τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκεται μόλις βυθισμένη στον όγκο του απιονισμένου νερού που περιέχει το υδατόλουτρο. Η θερμοκρασία του υδατόλουτρου ρυθμίστηκε στους 37° C ενώ η συσκευή ρυθμίστηκε ώστε να περιστρέφεται με 12 κύκλους ανά λεπτό (rpm) για 6 ώρες.

Μετά το πέρας των έξι ωρών η συσκευή απομακρύνθηκε από το υδατόλουτρο και οι φορείς των κυττάρων αφαιρέθηκαν από τη συσκευή. Στη συνέχεια κάθε φορέας αποσυναρμολογήθηκε ώστε τα κύτταρα να ελευθερωθούν και να γίνει η συλλογή του διαλύματος από το διαμέρισμα-δέκτη του κυττάρου (αυτό που δεν περιέχει αλβουμίνη). Αρχικά, αφαιρέθηκε το μονό πώμα του διαμερίσματος δέκτη (καπάκι), τοποθετήθηκε κάτω από αυτό δοκιμαστικό σωλήνα και στη συνέχεια αφαιρέθηκαν και τα δύο άλλα πώματα δημιουργώντας έτσι ικανή διαφορά πίεσης που επέτρεψε τη συλλογή του διαλύματος που υπήρχε στο διαμέρισμα δέκτη. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από όλα τα διαμερίσματα-δέκτες στη συνέχεια μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού και σε μήκος κύματος 350 nm. Όλα τα πειράματα διενεργήθηκαν εις τριπλούν (n=3).



Created in **BioRender.com** **bio**

Εικόνα Β-4: Διαδικασία πλήρωσης κυττάρων, συλλογή δειγμάτων και μέτρηση δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

B.4.4 Διεξαγωγή τυφλού πειράματος και υπολογισμός του απαιτούμενου χρόνου για αποκατάσταση της ισορροπίας

B.4.4.1 Εκτίμηση κατακράτησης ουσίας από τη μεμβράνη

Το τυφλό πείραμα διεξήχθη σε συγκεντρώσεις υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν και στα πειράματα πρωτεϊνικής σύνδεσης. Σε περίπτωση κατακράτησης ουσίας από τη μεμβράνη, υπολογίζεται η $C_L(m)$ για τη διόρθωση της τιμής της ελεύθερης συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στο διαμέρισμα δέκτη του κυττάρου προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ στο διαμέρισμα δότη προστέθηκε διάλυμα δοξυκυκλίνης (100 $\mu\text{g/mL}$) διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα. Δείγματα ελήφθησαν στις 3, 4, 5 και 6 ώρες και από τα δύο διαμερίσματα. Με αφαίρεση από την αρχική γνωστή συγκέντρωση υπολογίστηκε ο βαθμός κατακράτησης της ουσίας από την μεμβράνη. Από τις συγκεντρώσεις της δοξυκυκλίνης, που παραλάβαμε προκύπτει ότι το φάρμακο δεν κατακρατείται στην μεμβράνη.

B.4.4.2 Υπολογισμός χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας

Για την εύρεση του χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας μεταξύ δοξυκυκλίνης και αλβουμίνης, πραγματοποιήθηκε πείραμα κατά το οποίο παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα: i) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.05 M pH 7.4, περιεκτικότητας 4% β/ο σε βόεια αλβουμίνη και συγκέντρωση δοξυκυκλίνης 100 $\mu\text{g/mL}$ και ii) Διάλυμα δοξυκυκλίνης συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$ στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το πρώτο διάλυμα

(αλβουμίνης-δοξυκυκλίνης) τοποθετήθηκε στο διαμέρισμα-δότη του κυττάρου, ενώ το δεύτερο διάλυμα (δοξυκυκλίνης) τοποθετήθηκε στο διαμέρισμα-δέκτη του κυττάρου. Δείγματα ελήφθησαν στις 4, 6 και 24 ώρες και υπολογίστηκε ο χρόνος ισορροπίας.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1 Χαρακτηριστικά Καμπύλης Αναφοράς

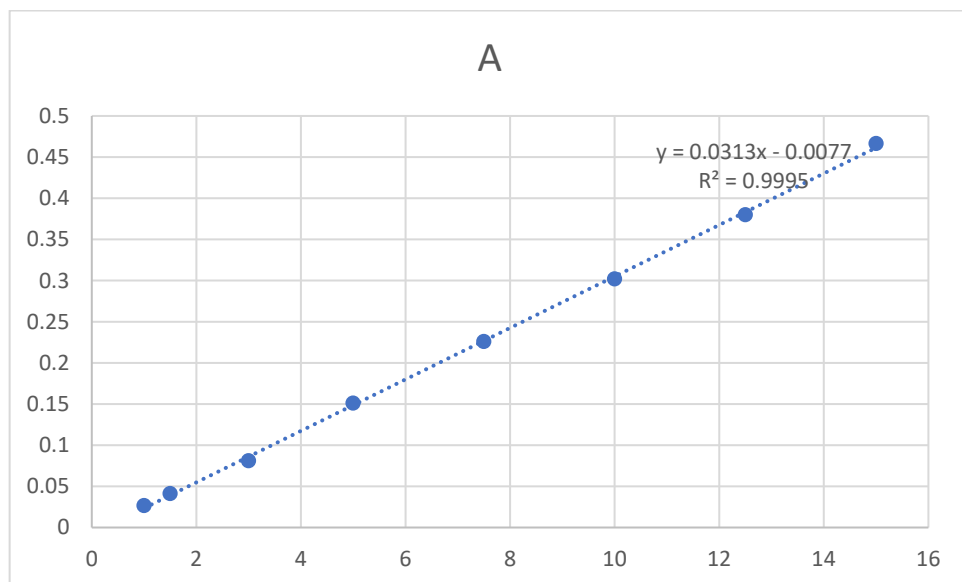
Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε για το εύρος συγκεντρώσεων 1-15 $\mu\text{g/mL}$. Η εξίσωση της ευθείας που βρέθηκε είναι η εξής: $y = 0.0313x - 0.0077$ ($r^2=0.9995$). Στον Πίνακα Γ.1-1 που ακολουθεί, παρατίθενται τα δεδομένα των καμπυλών αναφοράς που κατασκευάστηκαν πριν από το πείραμα πρωτεϊνικής σύνδεσης και στη συνέχεια, στον Πίνακα Γ.1-2 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς που προέκυψε. Στο Σχήμα Γ-1.1, φαίνεται η καμπύλη αναφοράς που προέκυψε.

Πίνακας Γ.1-1: Δεδομένα των καμπυλών αναφοράς: συγκεντρώσεις, απορροφήσεις στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις, κλίση, τεταγμένη, R^2 καθώς και ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για απορροφήσεις, κλίση, τεταγμένη και R^2 .

	1	2	3	4	5	6	ΜΟ	SD
C($\mu\text{g/ml}$)	A	A	A	A	A	A	A	
1	0.031	0.030	0.025	0.025	0.022	0.026	0.027	0.003391
1.5	0.042	0.043	0.041	0.042	0.034	0.045	0.041	0.003764
3	0.081	0.086	0.079	0.080	0.077	0.083	0.081	0.003162
5	0.151	0.154	0.150	0.146	0.152	0.153	0.151	0.002828
7.5	0.222	0.228	0.226	0.222	0.226	0.231	0.226	0.003488
10	0.305	0.302	0.305	0.297	0.300	0.303	0.302	0.003098
12.5	0.377	0.382	0.382	0.382	0.378	0.379	0.380	0.002280
15	0.465	0.475	0.469	0.452	0.468	0.470	0.467	0.007817
Κλίση	0.031	0.0314	0.0316	0.0307	0.0317	0.0313	0.0313	0.0003760
Τεταγμένη	-0.0058	-0.0054	-0.0096	-0.0074	-0.0126	-0.0057	-0.0077	0.002849
R^2	0.9991	0.9990	0.9995	0.9996	0.9992	0.9992	0.9993	0.002340

Πίνακας Γ.1-1: Συγκεντρωτικός πίνακας καμπύλης αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα: κλίση, τεταγμένη, εύρος συγκεντρώσεων και R^2 .

Καμπύλη Αναφοράς	Κλίση (b \pm s)	Τεταγμένη (a \pm s)	Εύρος συγκεντρώσεων ($\mu\text{g/mL}$)	R^2 (n)
$y = 0.0313x - 0.0077$	0.0313 \pm 0.000376	-0.0077 \pm 0.00285	1-15	0.9995 (6)



Σχήμα Γ.1-1: Καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα προσδιορισμού της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξουκυκλίνης.

Από τα πειράματα για την μελέτη της ακρίβειας της μεθόδου, προέκυψε ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας (Relative standard deviation, RSD) για την χαμηλή συγκέντρωση δοξουκυκλίνης ήταν μικρότερος από 10%, τόσο στις μετρήσεις εντός της ίδιας μέρας όσο και στις μετρήσεις μεταξύ διαφορετικών ημερών. Για την μεσαία και υψηλή συγκέντρωση δοξουκυκλίνης, ο συντελεστής μεταβλητότητας ήταν μικρότερος από 5%.

Γ.2 Αποτελέσματα τυφλού πειράματος και υπολογισμός του χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας

Γ.2.1 Τυφλό πείραμα

Το τυφλό πείραμα διεξήχθη για δυο συγκεντρώσεις δοξουκυκλίνης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10 και 100μg/ml. Ελήφθησαν δείγματα στις 5 ώρες και από τα δύο διαμερίσματα. Στον Πίνακα Γ.2-1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της δοξουκυκλίνης που μετρήθηκαν ύστερα από το τυφλό πείραμα.

Πίνακας Γ.2-1: Συγκεντρώσεις δοξουκυκλίνης που μετρήθηκαν ύστερα από την διεξαγωγή του τυφλού πειράματος.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Διαμέρισμα κυτάρου	Δοξουκυκλίνη (μg/mL)	±SD
10	A ¹ /Ρυθμιστικό διάλυμα ²	5.024	0.023
	B ³ /Ρυθμιστικό διάλυμα-Δοξουκυκλίνη	4.981	0.045
100	A/Ρυθμιστικό διάλυμα	51.342	0.958
	B/Ρυθμιστικό διάλυμα-Δοξουκυκλίνη	49.957	0.488

1. Διαμέρισμα δέκτη
2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.05M pH 7.4
3. Διαμέρισμα δότη

Ο βαθμός κατακράτησης της ουσίας στη μεμβράνη υπολογίστηκε με αφαίρεση από την αρχική γνωστή συγκέντρωση (10 και 100 µg/mL αντίστοιχα). Στον Πίνακα Γ.2-2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τυφλού πειράματος, από το οποίο προκύπτει ότι το φάρμακο δεν κατακρατείται στην μεμβράνη. (να πω ότι είναι το άθροισμα)

Πίνακας Γ.2-2: Αποτελέσματα τυφλού πειράματος για εκτίμηση κατακράτησης δοξουκυκλίνης από τις μεμβράνες Dialysis Diachema (mw. cutoff 5000).

Συγκέντρωση (µg/ml)	Δοξουκυκλίνη (µg/mL) που ανακτήθηκε συνολικά*	Ποσοστό κατακράτησης	±SD
10	10.005	-0.005	0.068
100	101.299	-1.299	1.441

*προκύπτει από το άθροισμα των συγκεντρώσεων δοξουκυκλίνης που μετρήθηκαν σε κάθε ένα από τα δύο διαμερίσματα του κυττάρου, όπως αναγράφονται στον πίνακα Γ.2-1.

Γ.2.2 Προσδιορισμός χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας της δοξουκυκλίνης στο κύτταρο

Όπως προαναφέρθηκε και στην παράγραφο «Υπολογισμός χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας», δείγματα ελήφθησαν στις 4, 6 και 24 ώρες. Ο χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας της δοξουκυκλίνης στο κύτταρο προσδιορίστηκε στις 4h. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε Μονοπαραγοντική Ανάλυση Διασποράς (One way (single-factor) analysis of variance (ANOVA)) συγκρίνοντας το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης (PPB%) μεταξύ των 4, 6 και 24 ωρών. Από την μονοπαραγοντική ανάλυση διασποράς προέκυψε ότι τα δείγματα ανήκουν στον ίδιο πληθυσμό και συνεπώς η ισορροπία έχει επέλθει από τις 4 ώρες (το p-value είναι μεγαλύτερο από 0,05, επομένως μπορούμε να απορρίψουμε τη μηδενική υπόθεση ότι τα δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους). Τα αποτελέσματα παρατίθενται αναλυτικά στους Πίνακες Γ.2-3 και Γ.2-4.

Πίνακας Γ.2-3: Συνολικά αποτελέσματα υπολογισμού χρόνου αποκατάστασης ισορροπίας

Χρόνος Δειγματοληψίας (h)	Count (n)	Sum	Average PPB%	Variance	SD
4	3	36.764	12.255	0.779	1.046
6	3	42.034	14.011	1.368	0.395
24	3	41.504	13.835	0.157	0.604

Πίνακας Γ.2-4: Αποτελέσματα Μονοπαραγοντικής Ανάλυσης Διασποράς για το Ποσοστό Πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ 4, 6 και 24 ωρών

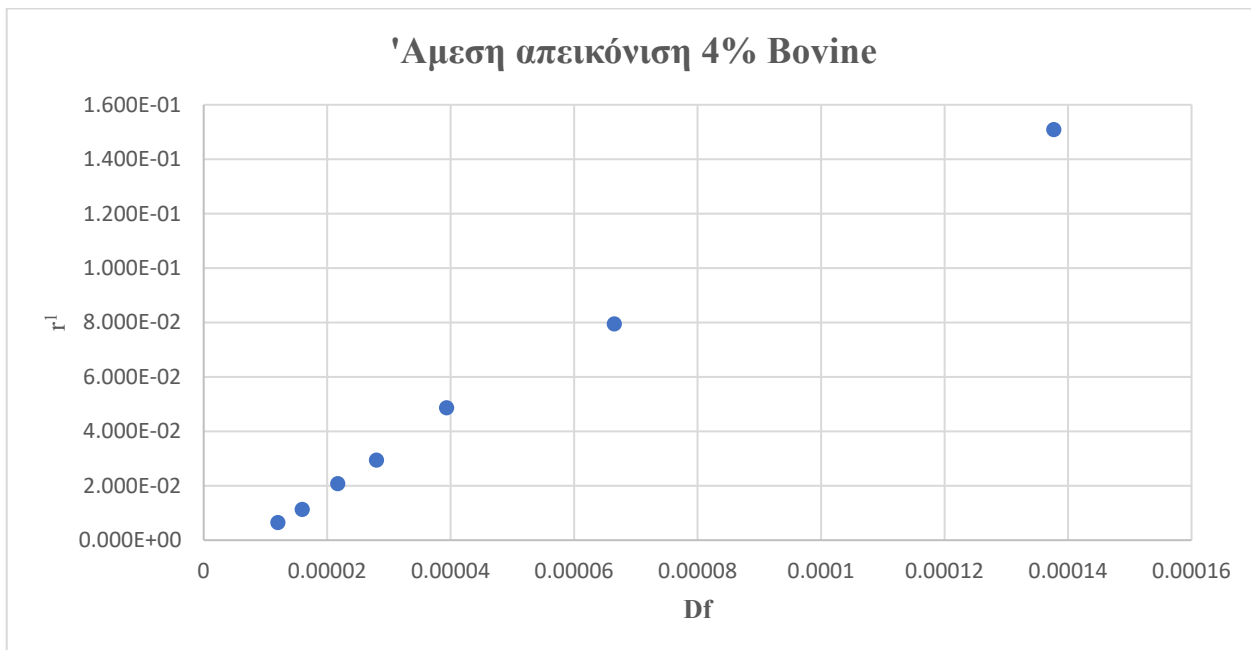
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	5.614513	2	2.807257	3.654028	0.091645	5.143253
Within Groups	4.609581	6	0.768264			
Total	10.22409	8				

Γ.3 Αποτελέσματα Πρωτεϊνικής Σύνδεσης της Δοξυκυκλίνης

Γ.3.1 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 4% w/v

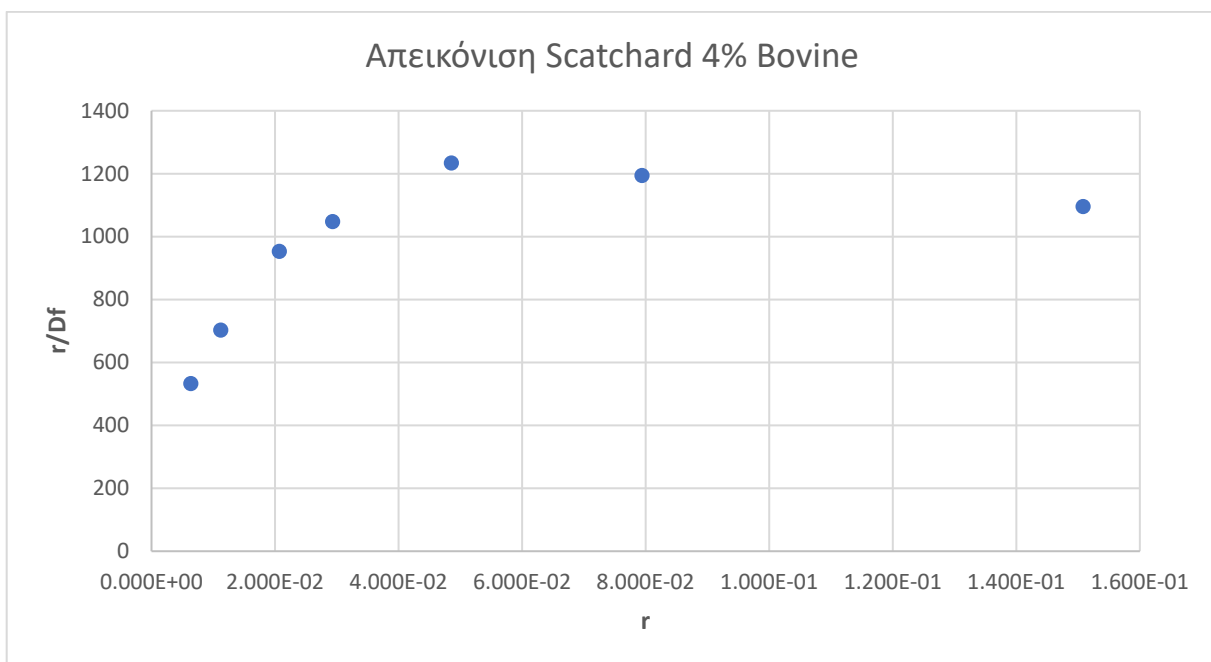
Πίνακας Γ.3-1: Συγκέντρωση ολικής (μg/mL), ελεύθερης και συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης (M) και % ποσοστό σύνδεσης δοξυκυκλίνης, παρουσία 4% βόειας αλβουμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M pH 7.4.

4% Βόεια Αλβουμίνη			
Συνολική Συγκέντρωση Δοξυκυκλίνης (μg/mL)	Ελεύθερη Δοξυκυκλίνη, Df (\pm SD) 10^{-6} M	Συνδεδεμένη Δοξυκυκλίνη, Db 10^{-6} M	% Σύνδεσης Δοξυκυκλίνης
7	5.348	1.652	23.597
10	7.105	2.895	28.946
15	9.661	5.339	35.591
20	12.441	7.559	37.796
30	17.489	12.511	41.704
50	29.544	20.456	40.912
100	61.150	38.850	38.850

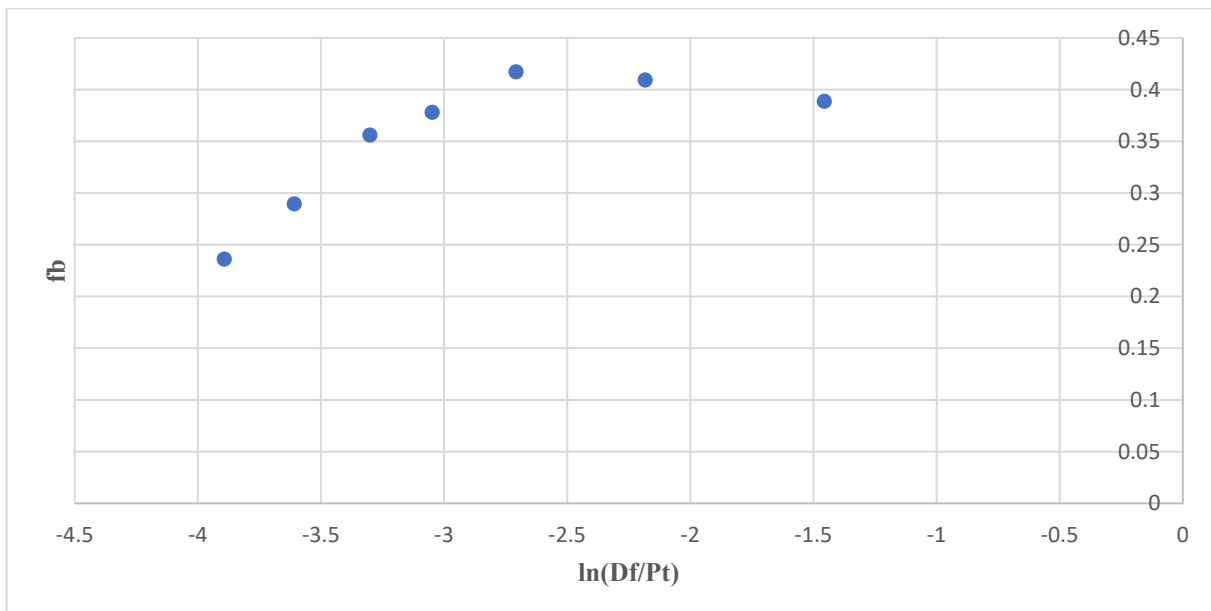


Σχήμα Γ.3-1: Άμεση απεικόνιση της σύνδεσης δοξυκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 4% w/v.

1. $r = Db/Pt$. Ως Pt ορίζεται η μοριακή συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης και για την βόεια αλβουμίνη 4% w/v ισούται με 0.00059M.



Σχήμα Γ.3-2: Απεικόνιση Scatchard για τη σύνδεση της δοξυκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 4% w/v.



Σχήμα Γ.3-3: Εξάρτηση του κλάσματος του συνδεδεμένου φαρμάκου (f_b) από τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (D_f) για ολική συγκέντρωση βόειας αλβουμίνης 4% w/v.

1. Το κλάσμα του συνδεδεμένου φαρμάκου f_b ισούται με: $f_b = [\% \text{ ποσοστό σύνδεσης Δοξυκυκλίνης}]/100$.

Από το Σχήμα Γ.3-1 προκύπτει ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του λόγου D_b/P_t (r) και της συγκέντρωσης της ελεύθερης δοξυκυκλίνης (D_f) με αύξηση του r αυξανομένης της συγκέντρωσης της ελεύθερης δοξυκυκλίνης χωρίς την επίτευξη πλατώ, γεγονός που υποδεικνύει απουσία επίτευξης κορεσμού της πρωτεΐνης από το φάρμακο.

Στο Σχήμα Γ.3-2, στις αρχικές συγκεντρώσεις φαρμάκου που μελετήθηκαν, παρατηρείται αύξηση του λόγου r/D_f και συνεπώς η απεικόνιση Scatchard έχει αντίστροφη μορφή από αυτήν που θα αναμέναμε για την κλασική πρωτεϊνική σύνδεση. Στην συνέχεια, ο λόγος r/D_f παραμένει σταθερός, γεγονός το οποίο υποδηλώνει την επίτευξη plateau γεγονός που υποδεικνύει την πιθανότητα μη τυπικής μη ειδικής σύνδεσης. Αντίστοιχα, από το Σχήμα Γ.3-3, στο οποίο φαίνεται η μεταβολή που προκαλείται στο κλάσμα του συνδεδεμένου φαρμάκου όταν μεταβάλλεται η ολική συγκέντρωση του φαρμάκου (όπως εκφράζεται μέσω της μεταβολής στην συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου), προκύπτει η ίδια εικόνα, δηλαδή ότι το κλάσμα του συνδεδεμένου φαρμάκου αρχικά αυξάνεται, μέχρι την επίτευξη μιας σταθερής τιμής.

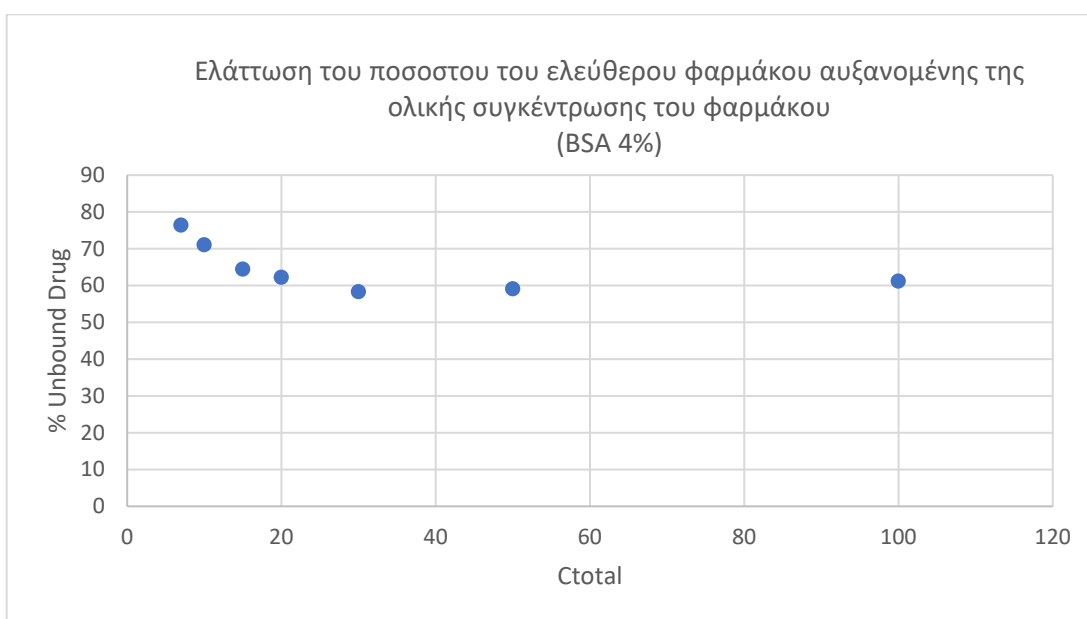
Για τον προσδιορισμό των τιμών του αριθμού θέσεων σύνδεσης (n) και της σταθεράς σύνδεσης (K_a) χρησιμοποιήθηκε η εξ. Γ.3-1, γνωστή ως Hill-Langmuir [27]. Η επιλογή της συγκεκριμένης εξίσωσης και όχι των κλασικών εξισώσεων προσδιορισμού των παραμέτρων σύνδεσης έγινε καθώς έχουμε μη ειδική σύνδεση, και οι κλασικές αυτές εξισώσεις αδυνατούν να περιγράψουν τα δεδομένα μας.

$$r = \frac{D_f^n}{D_f^n + k_d}, \quad (\Gamma.3-1)$$

Στην εξίσωση Hill-Langmuir, το n ορίζεται ως Hill coefficient, όπου στην περίπτωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης εκφράζει τον αριθμό θέσεων σύνδεσης. Αντίστοιχα, το K_d εκφράζει την σταθερά αποσύνδεσης και ισούται με $K_d = 1/K_a$.

Χρησιμοποιώντας την επέκταση Solver στο Excel προσδιορίστηκαν οι παράμετροι σύνδεσης n και K_d της μη γραμμικής εξίσωσης Γ.3-1 που στην προκειμένη περίπτωση είναι ίσες με 0,991 και 0.00086 M αντίστοιχα. Συνεπώς η σταθερά σύνδεσης K_a ισούται με 1157,316 M.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση επομένως, παρατηρείται το φαινόμενο της μη τυπικής μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης, καθώς το κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου φαίνεται πως μειώνεται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ολικού φαρμάκου που μελετήθηκε [Σχήμα Γ.3-4]

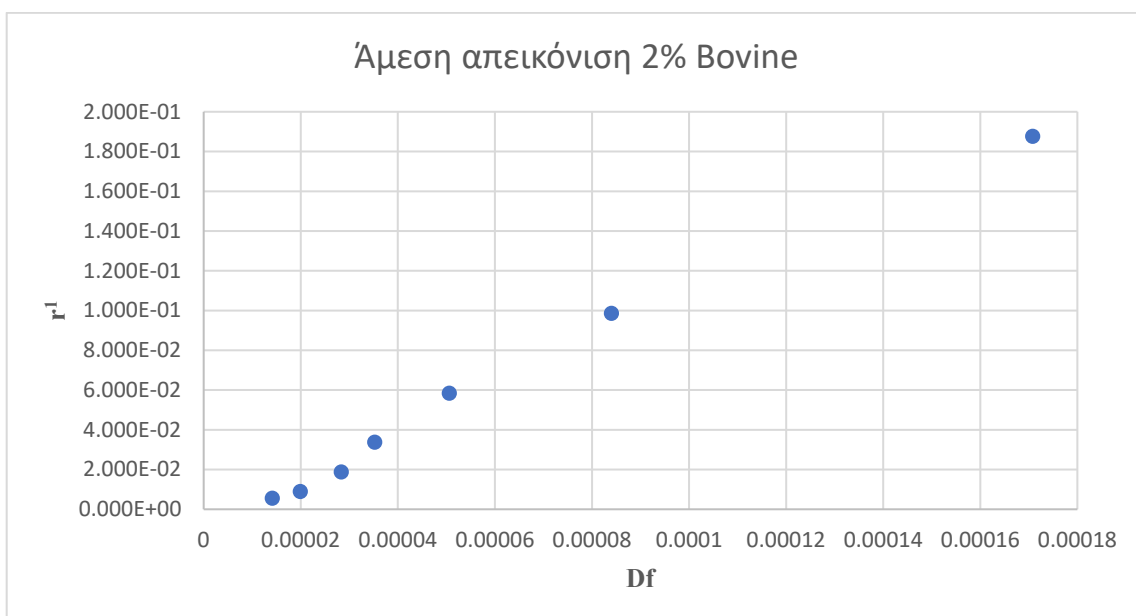


Σχήμα Γ.3-4 Ελάττωση του ποσοστού του ελεύθερου φαρμάκου αυξανόμενης της ολικής συγκέντρωσης του φαρμάκου (BSA 4%)

Γ.3.2 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 2% w/v

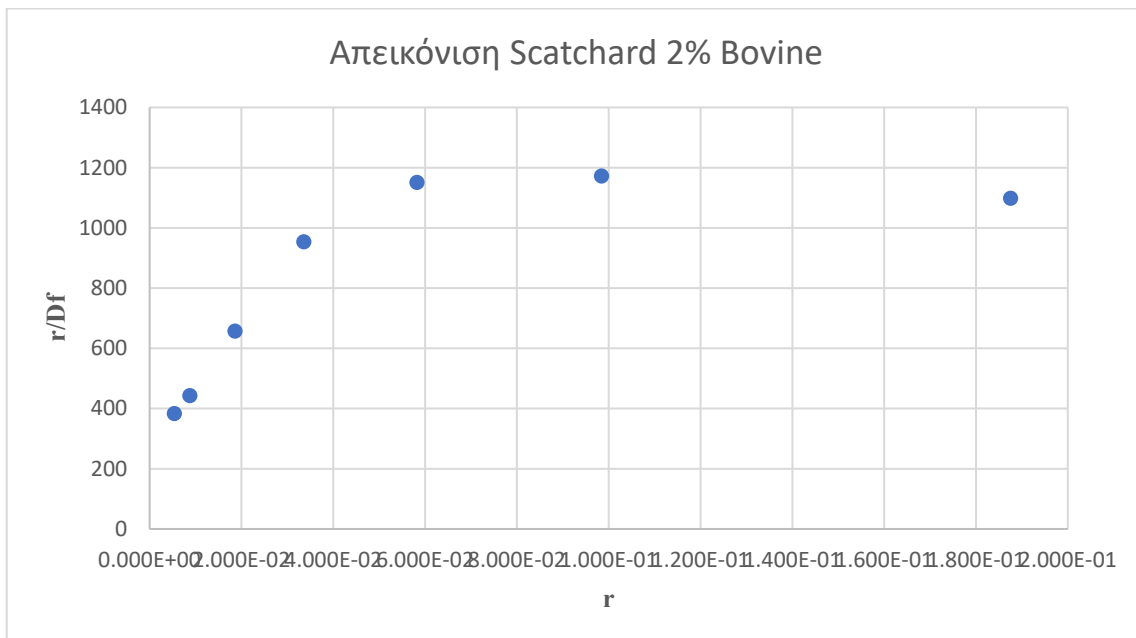
Πίνακας Γ.3-2: Συγκέντρωση ολικής (μg/mL), ελεύθερης και συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης (M) και % ποσοστό σύνδεσης δοξυκυκλίνης, παρουσία 2% βόειας αλβουμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M pH 7.4.

2% Βόεια Αλβουμίνη			
Συνολική Συγκέντρωση δοξυκυκλίνης (μg/mL)	Ελεύθερη δοξυκυκλίνη, Df (± SD) 10 ⁻⁶ M	Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη, Db 10 ⁻⁶ M	% Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη
7	6.307	0.693	9.904
10	8.863	1.137	11.374
15	12.601	2.399	21.321
20	15.668	4.332	21.661
30	22.494	7.506	25.020
50	37.318	12.682	25.363
100	75.847	24.153	24.153

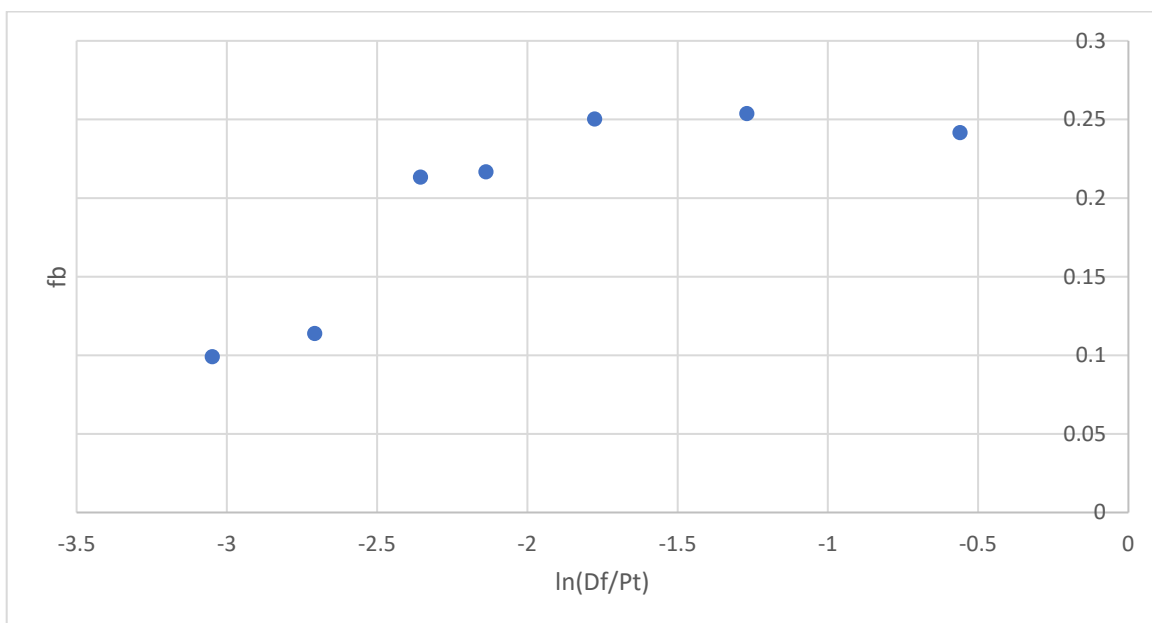


Σχήμα Γ.3-5: Άμεση απεικόνιση της σύνδεσης δοξυκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 2% w/v.

1. $r = Db/Pt$. Ως Pt ορίζεται η μοριακή συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης και για την βόεια αλβουμίνη 2% w/v ισούται με 0.000299M



Σχήμα Γ.3-6: Απεικόνιση Scatchard για τη σύνδεση της δοξουκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 2% w/v.



Σχήμα Γ.3-7: Εξάρτηση του κλάσματος του συνδεδεμένου φαρμάκου (fb) από τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (Df) για ολική συγκέντρωση βόειας αλβουμίνης 2% w/v.

Στο Σχήμα Γ.3-4 ο λόγος D_b/P_t (r) έχει γραμμική σχέση με την μοριακή συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου D_f γεγονός που υποδεικνύει απουσία επίτευξης κορεσμού της πρωτεΐνης από το φάρμακο.

Στο σχήμα Γ.3-5 ο λόγος r/D_f αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης του φαρμάκου μέχρι που προσεγγίζει ένα plateau, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στην αντίστοιχη απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της δοξουκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 4%.

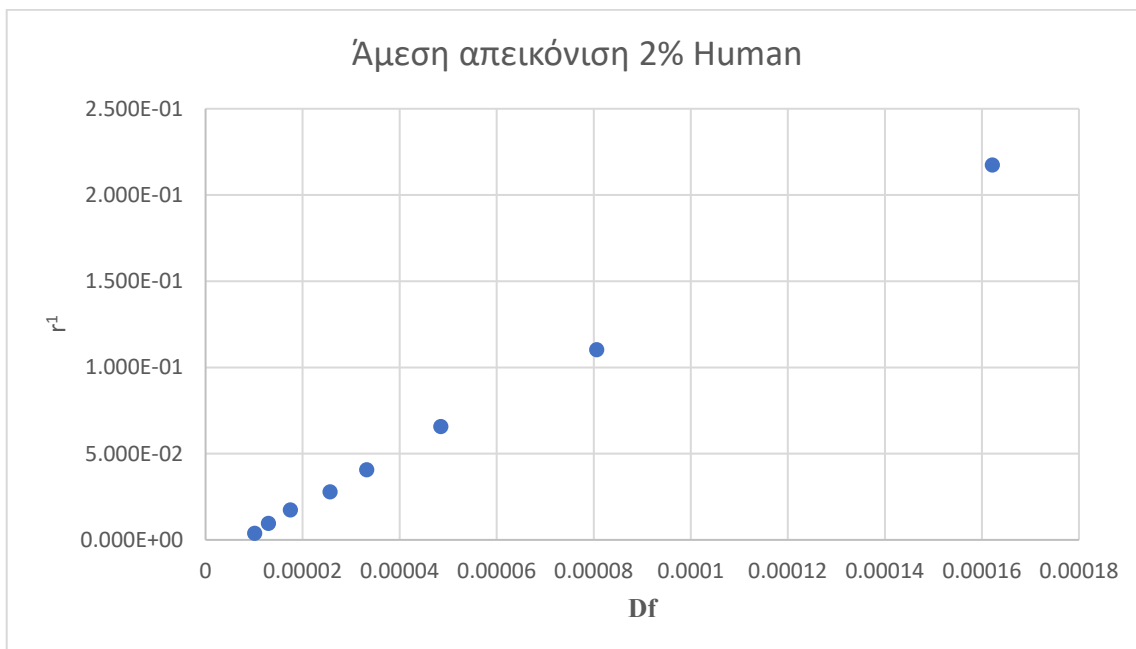
Οι τιμές των παραμέτρων n και K_d , όπως αυτές υπολογίζονται από την εξίσωση Γ.3-1 και την επέκταση Solver του Excel, είναι 0,922 και 0.0016 M. Η σταθερά σύνδεσης K_a ισούται με 612,123 M και είναι περίπου το ήμισυ της τιμής που υπολογίστηκε κατά την πρωτεϊνική σύνδεση με την βόεια αλβουμίνη σε συγκέντρωση 4% (1157,316 M). Αυτό είναι ένα στοιχείο το οποίο συνηγορεί στο ότι το φάρμακο εμφανίζει μη τυπική μη γραμμική κινητική πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Στη συνέχεια, εφόσον μελετήθηκαν τα βασικά χαρακτηριστικά πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξκυκλίνης με τη βόεια αλβουμίνη, ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων σε ανθρώπινη αλβουμίνη και πιο συγκεκριμένα σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% και σε ανθρώπινο πλάσμα αραιωμένο 1:2.

Γ.3.3 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 περιεκτικότητας σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v

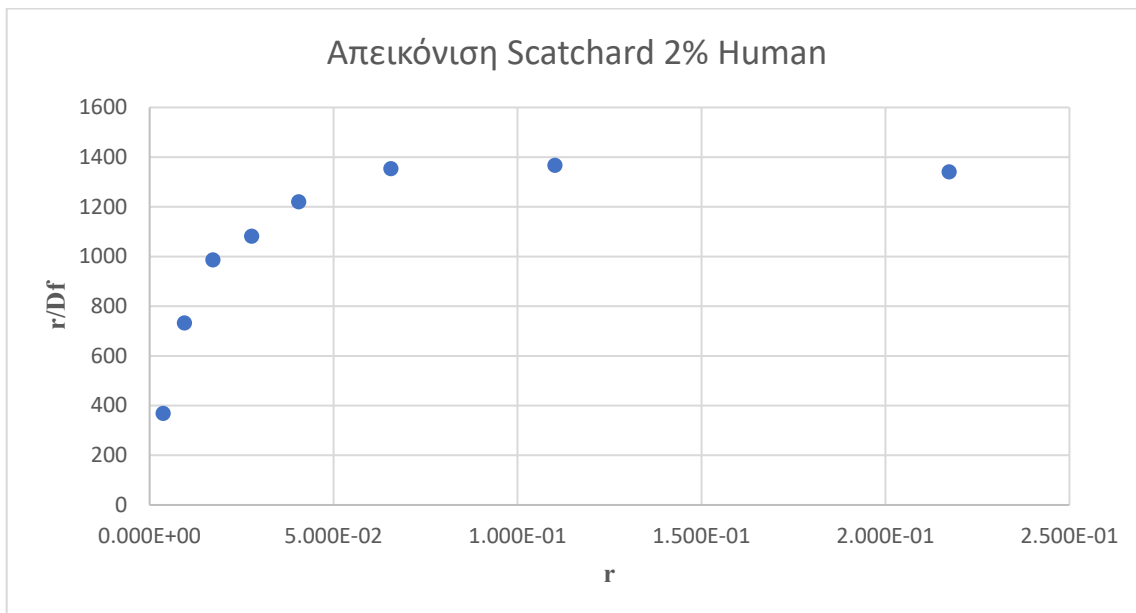
Πίνακας Γ.3-3: Συγκέντρωση ολικής (μg/mL), ελεύθερης και συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης (M) και % ποσοστό σύνδεσης δοξυκυκλίνης, παρουσία 2% ανθρώπινης αλβουμίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M pH 7.4.

2% Ανθρώπινη Αλβουμίνη			
Συνολική Συγκέντρωση δοξυκυκλίνης (μg/mL)	Ελεύθερη δοξυκυκλίνη, Df (\pm SD) 10^{-6} M	Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη, Db 10^{-6} M	% Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη
5	4.518	0.482	9.649
7	5.774	1.226	17.511
10	7.776	2.224	22.236
15	11.419	3.581	23.876
20	14.773	5.227	26.134
30	21.546	8.454	28.179
50	35.806	14.194	28.388
100	72.013	27.987	27.987

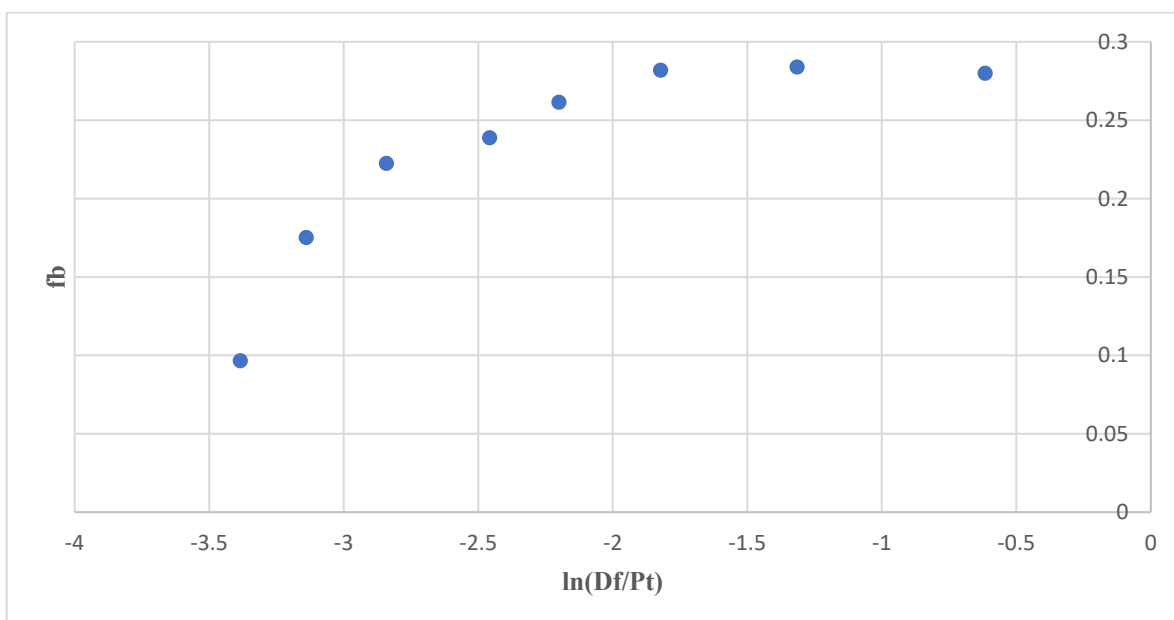


Σχήμα Γ.3-8: Άμεση απεικόνιση της σύνδεσης δοξυκυκλίνης με την ανθρώπινη αλβουμίνη σε συγκέντρωση 2% w/v.

1. $r = Db/Pt$. Ως Pt ορίζεται η μοριακή συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης και για την βόεια αλβουμίνη 2% w/v ισούται με 0.00030M



Σχήμα Γ.3-9: Απεικόνιση Scatchard για τη σύνδεση της δοξυκυκλίνης με την ανθρώπινη αλβουμίνη σε συγκέντρωση 2% w/v.



Σχήμα Γ.3-10: Εξάρτηση του κλάσματος του συνδεδεμένου φαρμάκου (fb) από τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (Df) για ολική συγκέντρωση ανθρώπινης αλβουμίνης 2% w/v.

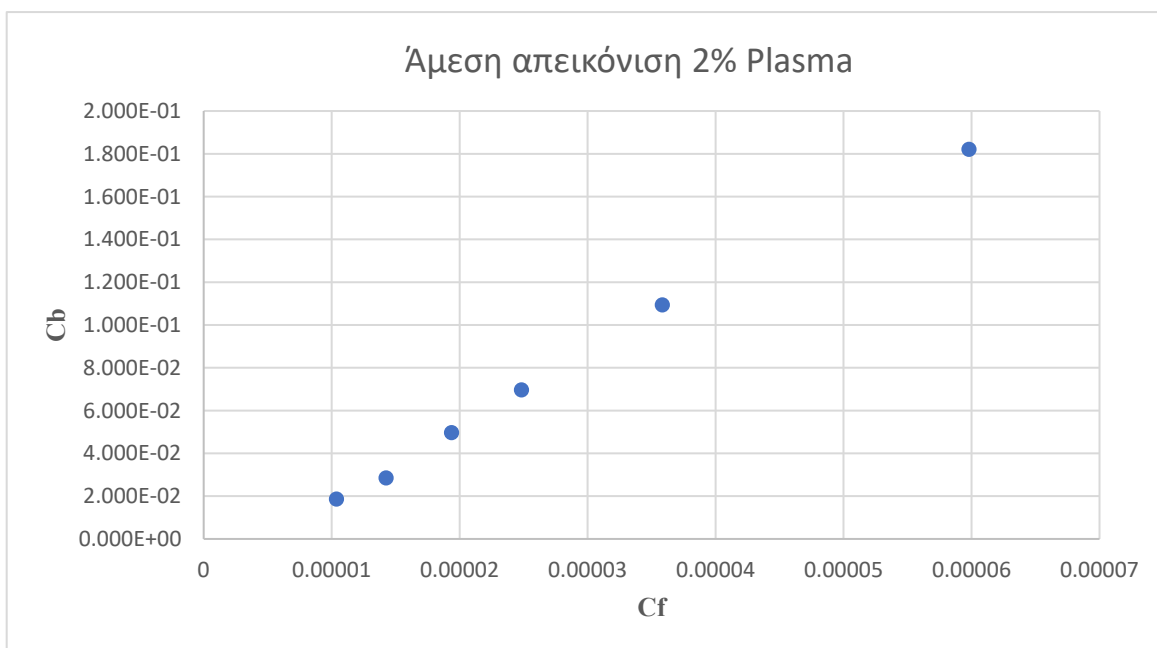
Ομοίως με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, στο Σχήμα Γ.3-7 ο λόγος D_b/P_t (r) έχει γραμμική σχέση με την μοριακή συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου D_f και στο Σχήμα Γ.3-8 παρατηρείται, όπως και στα πειράματα με βόεια αλβουμίνη, αύξηση του λόγου r/D_f μέχρι την επίτευξη μίας σταθερής τιμής.

Οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων σύνδεσης n και K_d της HSA σε συγκέντρωση 2% w/v για την δοξυκυκλίνη, με βάση την εξίσωση Γ.3-1 και την επέκταση Solver του Excel είναι 0,989 και 0.00071 M. Η σταθερά σύνδεσης K_a ισούται με 1417,716 M και είναι αρκετά μεγαλύτερη από την K_a που υπολογίστηκε κατά την πρωτεϊνική σύνδεση με την BSA σε συγκέντρωση 2% w/v (612,123 M).

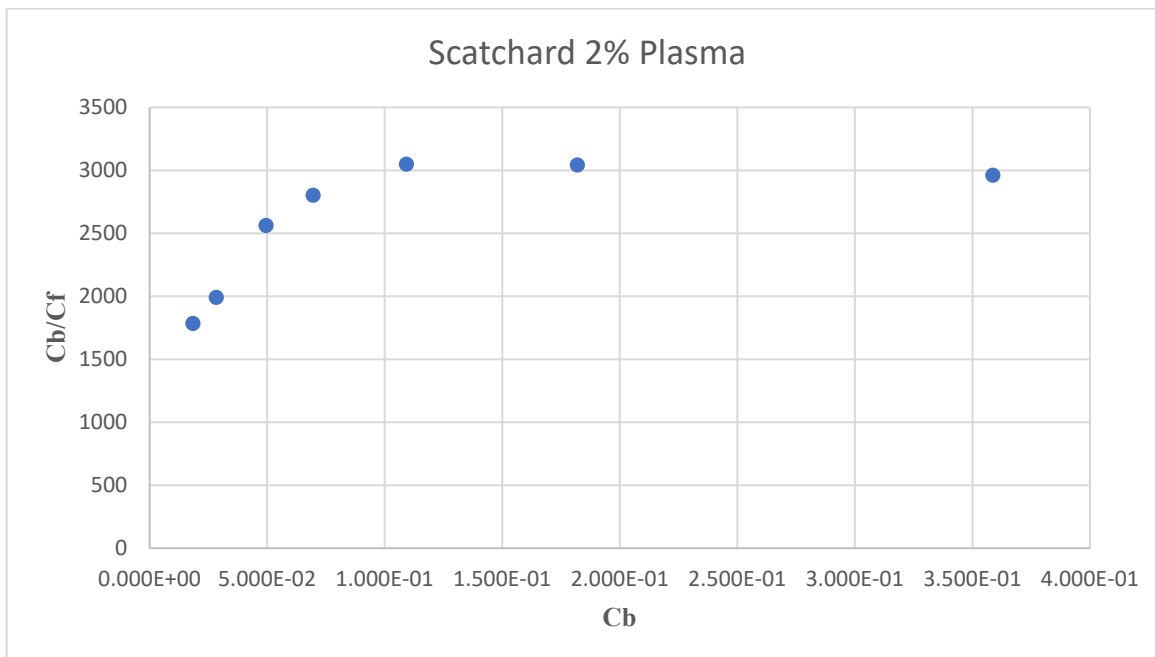
Γ.3.4 Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος με αραιώση σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.05M pH 7.4 σε αναλογία 1:2 (αναμενόμενη περιεκτικότητα σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v)

Πίνακας Γ.3-4: Συγκέντρωση ολικής (μg/mL), ελεύθερης και συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης (M) και % ποσοστό σύνδεσης δοξυκυκλίνης, σε ανθρώπινο πλάσμα αραιωμένο 1:2 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.05M pH 7.4.

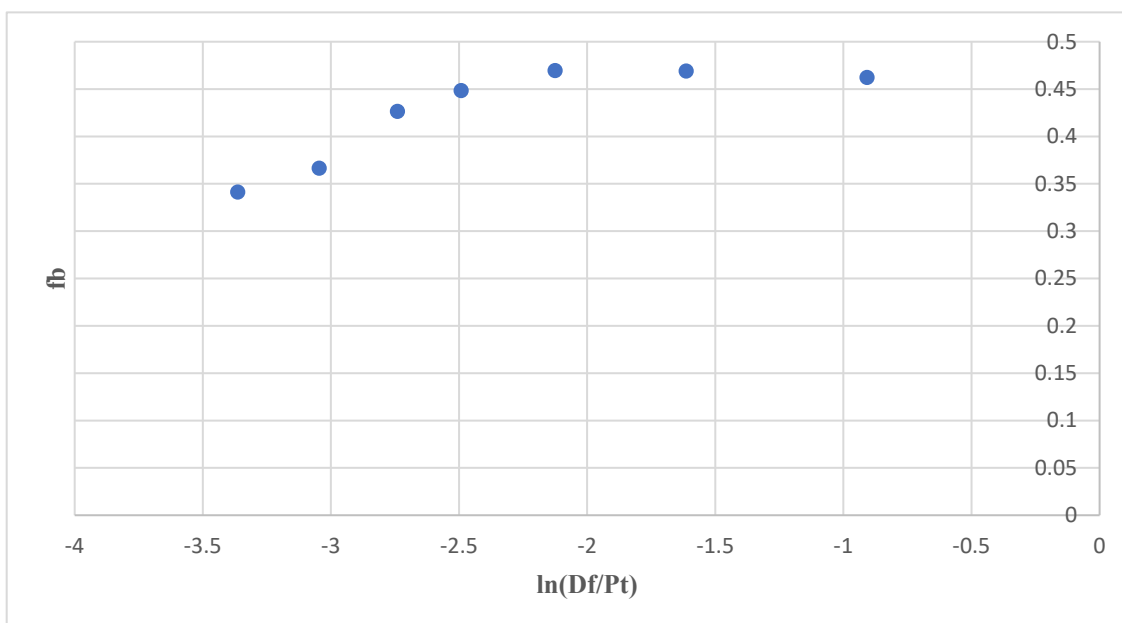
Ανθρώπινο πλάσμα αραιωμένο 1:2			
Συνολική Συγκέντρωση δοξυκυκλίνης (μg/mL)	Ελεύθερη δοξυκυκλίνη, Cf (± SD) μg/mL	Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη, Cb μg/mL	% Συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη
7	4.613	2.387	34.094
10	6.339	3.661	36.613
15	8.607	6.393	42.620
20	11.035	8.965	44.824
30	15.923	14.077	46.922
50	26.562	23.438	46.875
100	53.802	46.198	46.198



Σχήμα Γ.3-11: Άμεση απεικόνιση της σύνδεσης δοξυκυκλίνης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος μετά από αραιώση 1:2 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M, pH 7.4 (HSA περίπου 2% w/v)



Σχήμα Γ.3-12: Απεικόνιση Scatchard για τη σύνδεση της δοξυκυκλίνης σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος μετά από αραιώση 1:2 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M, pH 7.4 (HSA περίπου 2% w/v).



Σχήμα Γ.3-13: Εξάρτηση του κλάσματος του συνδεδεμένου φαρμάκου (fb) από τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (Df) για ολική συγκέντρωση ανθρώπινης αλβουμίνης 2% w/v. Εξάρτηση του κλάσματος του συνδεδεμένου φαρμάκου (fb) από την ολική συγκέντρωση της δοξυκυκλίνης (CTotal) (πλάσμα αίματος αραιωμένο 1:2 με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05M, pH 7.4, HSA περίπου 2% β/ο).

Ομοίως με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, στο Σχήμα Γ.3-10 η συνδεδεμένη δοξυκυκλίνη Cb έχει γραμμική σχέση με την συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου Cf.

Από τη μορφή της απεικόνισης Scatchard [Σχήμα Γ.3-11], προκύπτει ότι η μεταβολή στις τιμές του C_b (άξονας x) επηρεάζει με μη κλασικό τρόπο την τιμή του λόγου C_b/C_f (άξονας y). Πιο συγκεκριμένα, αυξανομένης της τιμής του C_b, δεν προκύπτει μείωση του λόγου C_b/C_f όπως προβλέπεται από το μοντέλο Scatchard για την κλασική πρωτεϊνική σύνδεση. Αντιθέτως, παρατηρείται αύξηση η οποία προσεγγίζει μία σταθερή τιμή, όπως ακριβώς προκύπτει σε όλες τις προηγούμενες απεικονίσεις (δοξυκυκλίνη με BSA 4%, BSA 2% και HSA 2%).

Για τον προσδιορισμό των τιμών της Συνδετικής χωρητικότητας (N) και της σταθεράς σύνδεσης (K_a) χρησιμοποιήθηκε η εξ. [Γ.3-2], όπου είναι η τροποποιημένη εξίσωση Hill-Langmuir για τον προσδιορισμό των παραμέτρων σύνδεσης σε πειράματα με δείγματα αίματος.

$$C_b = 1000MW * N * C_{pt} \frac{C_f^m}{C_f^m + 1000MW * k_d} \quad [\Gamma.3-2]$$

Στην παραπάνω εξίσωση, το N ορίζεται ως συνδετική χωρητικότητα και περιλαμβάνει το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης πλάσματος, το οποίο δεν είναι γνωστό. Επομένως, το N δεν μπορεί να είναι ταυτόσημο με τον Hill coefficient. Ως Hill coefficient ορίζεται το m.

Ομοίως με την εξίσωση Γ.3-1, το K_d εκφράζει την σταθερά αποσύνδεσης και ισούται με K_d= 1/K_a.

Χρησιμοποιώντας την επέκταση Solver στο Excel προσδιορίστηκαν οι παράμετροι σύνδεσης N και K_d της μη γραμμικής εξίσωσης [Γ.3-2] που στην προκειμένη περίπτωση είναι ίσες με 6,31E-06 και 0.000587 M αντίστοιχα. Συνεπώς η σταθερά σύνδεσης K_a ισούται με 1701,978M. Ο Hill coefficient βρέθηκε ίσος με 1,36.

Όπως προκύπτει, η τιμή της σταθεράς σύνδεσης στο πλάσμα είναι μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίστηκε για τη σύνδεση δοξυκυκλίνης – ανθρώπινης αλβουμίνης συγκέντρωσης 2% (1417,716 M). Μια και το πλάσμα ανθρώπινου αίματος ήταν αραιωμένο 1:2 και είχε εκτιμώμενη περιεκτικότητα σε αλβουμίνη 2% w/v, η μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς σύνδεσης είναι πιθανό ότι αντικατοπτρίζει τη σύνδεση της δοξυκυκλίνης με πρωτεΐνες του πλάσματος πέρα από την αλβουμίνη, όπως για παράδειγμα η α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

Γ.4 Συζήτηση

Γ.4.1 Σύγκριση παραμέτρων σύνδεσης για τα διάφορα πειράματα

Στον Πίνακα Γ.4-1 παρατίθενται συγκριτικά οι τιμές των παραμέτρων σύνδεσης που προέκυψαν από την επίλυση των εξισώσεων Γ.3-1 και Γ.3-2 για τα διαφορετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας Γ.4-1: Σύνοψη των αποτελεσμάτων των παραμέτρων σύνδεσης.

Πείραμα	n (N για το πλάσμα)	K _a (M ⁻¹)
Δοξυκυκλίνη - ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.01M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 4% w/v	0,991	1157,316
Δοξυκυκλίνη - ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.01M pH 7.4 περιεκτικότητας σε βόεια αλβουμίνη 2% w/v	0,922	612,123
Δοξυκυκλίνη - ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.01M pH 7.4 περιεκτικότητας σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v	0,989	1417,716
Δοξυκυκλίνη - ανθρώπινο πλάσμα αίματος με αραίωση σε διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 0.01M pH 7.4 σε αναλογία 1:2 (αναμενόμενη περιεκτικότητα σε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v)	6,31E-06	1701,978

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα, οι τιμές της σταθεράς σύνδεσης K_a της BSA για την δοξυκυκλίνη σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 4% w/v είναι σχεδόν διπλάσια από αυτή που υπολογίστηκε σε συγκέντρωση BSA 2% w/v. Το γεγονός αυτό, δεδομένου ότι η σταθερά n παραμένει σταθερή υποδεικνύει ότι η ισχύς της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και επομένως η σύνδεση φαρμάκου-πρωτεΐνης είναι ειδικού χαρακτήρα. Συγκρίνοντας τις τιμές της σταθεράς σύνδεσης K_a της BSA και της HSA για την δοξυκυκλίνη στην ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης (2% w/v), παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της ανθρώπινης αλβουμίνης έχουμε μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης, άρα το φάρμακο συνδέεται ευχερέστερα στην ανθρώπινη απ' ότι στη βόεια αλβουμίνη.

Όσον αφορά στον αριθμό θέσεων σύνδεσης, αυτός παραμένει σχετικά σταθερός για τις διάφορες πρωτεΐνες και τις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.

Τέλος, όπως αναμέναμε, η σταθερά σύνδεσης K_a βρέθηκε μεγαλύτερη στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε πλάσμα σε σύγκριση με αυτά που χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη αλβουμίνη καθώς το πλάσμα περιλαμβάνει και άλλες πρωτεΐνες, όπως η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι λόγω της αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε (φασματοφωτόμετρο UV- ορατού), υπήρχε σχετικά

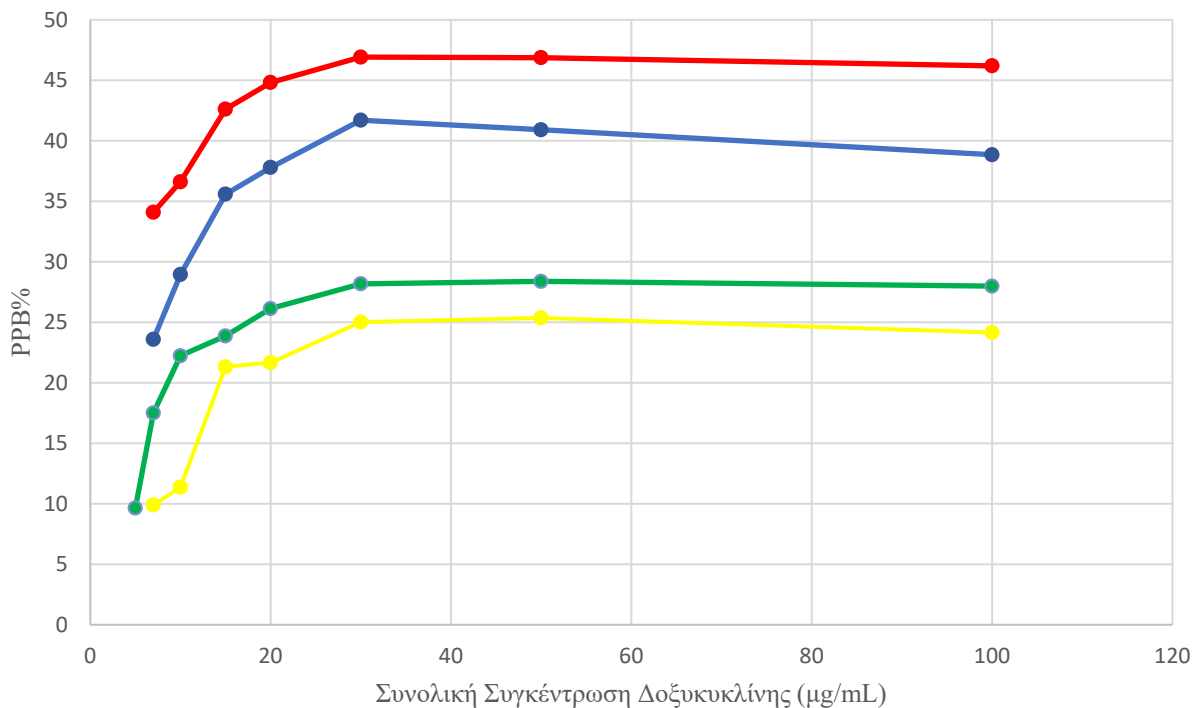
υψηλό όριο ανίχνευσης. Αυτό καθόρισε και το εύρος των συγκεντρώσεων του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Παρά το γεγονός ότι η παρούσα εργασία φαίνεται να επιβεβαιώνει το γεγονός της μη τυπικής μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης, εντούτοις θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί η κινητική πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, που ομοιάζουν περισσότερο τις συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στο πλάσμα των ασθενών μετά τη χορήγηση των συνήθων θεραπευτικών δόσεων του φαρμάκου.

Γ.4.2 Σύγκριση ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ των πειραμάτων και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα Γ.4-2 και από το Σχήμα Γ.4-1, τα υψηλότερα ποσοστά % συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης προέκυψαν από τα πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο πλάσμα σε αραιώση 1:2. Τα αμέσως επόμενα υψηλότερα ποσοστά βρέθηκαν για τα πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε BSA 4%. Τέλος, τα χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε HSA 2% w/v και BSA 2%w/v. Συγκρίνοντας τις διαφορετικές πρωτεΐνες (BSA, HSA, πλάσμα) στην ίδια συγκέντρωση (2%), παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό % συνδεδεμένης δοξυκυκλίνης βρέθηκε για το πλάσμα.

Πίνακας Γ.4-2: Σύνοψη του ποσοστού % Συνδεδεμένης Δοξυκυκλίνης για τα διάφορα πειράματα.

Συνολική Συγκέντρωση Δοξυκυκλίνης (μg/mL)	% Συνδεδεμένη Δοξυκυκλίνη			
	4% BSA	2% BSA	2% HSA	πλάσμα 1:2
5			9,649	
7	23,597	9,904	17,511	34,094
10	28,946	11,374	22,236	36,613
15	35,591	21,321	23,876	42,620
20	37,796	21,661	26,134	44,824
30	41,704	25,020	28,179	46,922
50	40,912	25,363	28,388	46,875
100	38,850	24,153	27,987	46,198



Σχήμα Γ.4-1: Ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης για τα διάφορα πειράματα. Με **μπλε** απεικονίζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε **BSA 4% w/v**, με **κίτρινο** αυτά κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε **BSA 2 % w/v**, με **πράσινο** απεικονίζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε **HSA 2% w/v** και τέλος με **κόκκινο** αυτά κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε **ανθρώπινο πλάσμα 1:2**.

Σύμφωνα με τα μέχρι πρότινος δεδομένα, το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης στο ανθρώπινο πλάσμα είναι της τάξης του 80 με 90% [13]. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρότι δεν χρησιμοποιήθηκε μη αραιωμένο πλάσμα αίματος, φαίνεται να συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς στο αραιωμένο πλάσμα 1:2 το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης κυμαίνεται από περίπου 34 έως και 47% σε υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης, και από τα δεδομένα της πρωτεϊνικής σύνδεσης σε βόεια αλβουμίνη σε συγκεντρώσεις 2% και 4% φαίνεται ότι η πρωτεϊνική σύνδεση του φαρμάκου αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Επομένως, μια και οι διαφορές της κινητικής του φαρμάκου μεταξύ βόειας και ανθρώπινης αλβουμίνης δεν φαίνεται να είναι σημαντικές, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης σε μη αραιωμένο ανθρώπινο πλάσμα αναμένεται να είναι αρκετά υψηλό, πολύ πιθανά και εντός του εύρους που περιγράφεται στη βιβλιογραφία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, βρέθηκαν χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης τα οποία αποδόθηκαν στους εξής παράγοντες:

- Αρχικά, αν και η BSA χρησιμοποιείται συχνά αντί της HSA, έχουν κάποιες δομικές διαφορές και συνεπώς είναι λογικό να περιμένουμε ελαφρώς διαφορετικά ποσοστά

πρωτεϊνικής σύνδεσης με την HSA. Σε άλλες μελέτες πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων, έχουν αναφερθεί μέχρι και διπλάσιες διαφορές μεταξύ της σύνδεσης στην HSA και την BSA [28].

- Επίσης, όπως είναι γνωστό, το πλάσμα περιέχει και άλλες πρωτεΐνες, όπως είναι η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AAG) η οποία μπορεί να συμμετέχει στην πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου. Πράγματι, συγκρίνοντας τα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ των πειραμάτων κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη αλβουμίνη 2% w/v και αυτών στα οποία χρησιμοποιήθηκε πλάσμα ύστερα από αραιώση 1:2, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του πλάσματος έχουμε υψηλότερα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στην συνεισφορά και άλλων ενδογενών πρωτεϊνών του πλάσματος εκτός από την αλβουμίνη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μίας πρόσφατης μελέτης της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξουκυκλίνης σε ανθρώπινη αλβουμίνη [17], βρέθηκε ότι η δοξουκυκλίνη έχει μέτριου βαθμού συγγένεια με την ανθρώπινη αλβουμίνη και ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης κοντά στο 60% (χρησιμοποιήθηκε μη αραιωμένη αλβουμίνη). Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση της συνεισφοράς περισσότερων ενδογενών πρωτεϊνών πέρα από την αλβουμίνη για την αιτιολόγηση του υψηλότερου ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης που παρατηρείται στο πλάσμα σε σχέση με την σκέτη ανθρώπινη αλβουμίνη.

- Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας ο οποίος ευθύνεται για την ανεύρεση χαμηλότερων ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι ότι χρησιμοποιήθηκαν μικρότερες συγκεντρώσεις αλβουμίνης από αυτές που υπάρχουν φυσιολογικά στο πλάσμα καθώς και αραιωμένα διαλύματα πλάσματος, διότι κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας δεν ήταν η ακριβής εκτίμηση του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξουκυκλίνης σε ανθρώπινο πλάσμα υπό φυσιολογικές συνθήκες -κάτι το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία- αλλά η διερεύνηση της ύπαρξης μη τυπικής μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου.

Δ. Συμπεράσματα

Δ.1 Συμπεράσματα

Η μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου είναι ιδιαίτερης σημασίας για την κατανόηση τόσο των φαρμακοκινητικών όσο και των φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων του. Συνεπώς μπορεί να επηρεάσει το δοσολογικό σχήμα του φαρμάκου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πρωτεϊνική σύνδεση της δοξυκυκλίνης με βόεια και ανθρώπινη αλβουμίνη και με ανθρώπινο πλάσμα και βρέθηκαν τα εξής βασικότερα συμπεράσματα:

- Όπως φαίνεται από τις τιμές των σταθερών σύνδεσης K_a μεταξύ βόειας και ανθρώπινης αλβουμίνης, η δοξυκυκλίνη συνδέεται ισχυρότερα με την ανθρώπινη παρά με τη βόεια αλβουμίνη.
- Η δοξυκυκλίνη επιδεικνύει μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης όσο αυξάνεται το ποσοστό της υπό μελέτη πρωτεΐνης, γεγονός που επιβεβαιώνει την μη τυπική σύνδεση του φαρμάκου αυτού στο μόριο της αλβουμίνης.
- Ο αριθμός θέσεων σύνδεσης της δοξυκυκλίνης με το μόριο της αλβουμίνης, όπως υπολογίστηκε από τη σταθερά Hill (n) είναι ίσος με 1 τόσο στη βόεια όσο και στην ανθρώπινη αλβουμίνη.
- Η δοξυκυκλίνη συνδέεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο ανθρώπινο πλάσμα σε σχέση με την σκέτη ανθρώπινη αλβουμίνη, γεγονός που ενδεχομένως εξηγείται από τη συνεισφορά και άλλων ενδογενών πρωτεϊνών στην ολική πρωτεϊνική σύνδεση που παρατηρείται στο πλάσμα.
- Από τα ανωτέρω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η κινητική της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης μπορεί να περιγραφεί ως μη τυπική μη γραμμική για το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Δ.2 Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνηγορούν στην ύπαρξη μη τυπικής μη γραμμικής πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης. Η συγκεκριμένη εργασία μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τη διεξαγωγή περισσότερων πειραμάτων. Σε επόμενο στάδιο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου *in vivo* σε ανθρώπινο πλάσμα με υπολογισμό τόσο του ελεύθερου, όσο και του δεσμευμένου κλάσματος του φαρμάκου. Επίσης θα ήταν σκόπιμο οι μετρήσεις να πραγματοποιηθούν σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων δοξυκυκλίνης, με ιδιαίτερη έμφαση στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που είναι και οι συχνότερα απαντώμενες στο πλάσμα ασθενών κατά τη θεραπευτική χορήγηση του φαρμάκου.

Πιο συγκεκριμένα, μια αναλυτική μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πειράματα προσδιορισμού της κινητικής της πρωτεϊνικής σύνδεσης της δοξυκυκλίνης είναι η Υγρή Χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) η οποία έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

Τέλος, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η μελέτη της συνεισφοράς των άλλων δεσμευτικών παραγόντων του πλάσματος στην πρωτεϊνική σύνδεση της δοξυκυκλίνης. Ειδικότερα, προτείνεται να διεκρινιστεί ποιες πρωτεΐνες και ενδογενείς ουσίες συμμετέχουν στην πρωτεϊνική σύνδεση και σε τι ποσοστό.

Βιβλιογραφία

1. Holmes N and Charles P, Safety and Efficacy Review of Doxycycline. *Clinical Medicine: Therapeutics*. 2009, pp. 471-482.
2. Doxycycline - FDA prescribing information, side effects and uses. [Online] [Cited: 09 25, 2021] <https://www.drugs.com/pro/doxycycline.html#s-34089-3>.
3. Cunha B, Sibley C and Ristuccia A, Doxycycline Review. *Therapeutic Drug Monitoring*. 1982, Vol. 4, pp. 115-135.
4. Nelson M and Levy S, The history of the Tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences. Antimicrobial Therapeutics Reviews*. 2011, pp. 17-32.
5. Doxycycline - PubChem. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] [Cited: 09 25, 2021] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxycycline>.
6. VIBRAMYCIN® Description. *Pfizer Medical Information*. [Online] [Cited: 09 25, 2021] <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/vibramycin/description>.
7. Chopra I and Roberts M, Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, Vol. 65, 2, pp. 232-260.
8. Fuoco D, Classification Framework and Chemical Biology of Tetracycline-Structure-Based Drugs. *Antibiotics*. 2012, pp. 1-13.
9. Patel R and Parmar M, Doxycycline Hyclate. [Online] Jan 2021, [Cited: 09 26, 2021] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555888/>.
10. Loree J, Lappin S, Bacteriostatic Antibiotics. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613458/>, [Online] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, Jan 2021.
11. Henahan M, Montuno M and De Benedetto A, Doxycycline as an anti-inflammatory agent: updates in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017, Vol. 31, pp. 1800 - 1808.
12. Ingelsby T, Anthrax as a biological weapon. *Journal of the American Medical Association*. 2002, Vol. 288, 17, pp. 2236 - 2252.

13. Jantratid et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Doxycycline Hyclate. *Journal of Pharmaceutical Studies*. 2010, Vol. 99, 4.
14. Saivin S and Houin G, Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*. 1988, Vol. 15, pp. 355 - 366.
15. Kenneth A and MacGowan A, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, Vol. 58, pp. 256 - 265.
16. Saitoh R et al. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharm Res*. 2004, Vol. 21, pp. 749–755.
17. Saux M et al. Pharmacokinetics of doxycycline polyphosphate (PPD), hydrochloride (CHD) and base (DB). *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1981, Vol. 6, pp. 3 - 10.
18. Sun H and He P, Characterization of interaction between doxycycline and human serum albumin by capillary electrophoresis-frontal analyses. *Electrophoresis*. 2009, Vol. 30, pp. 1991 - 1997.
19. Keen P, Effect of Binding to Plasma Proteins on the Distribution, Activity and Elimination of Drugs. [ed.] B.B. Brodie, J.R. Gillette and H.S. Ackerman, *Concepts in Biochemical Pharmacology. Handbuch der experimentellen Pharmakologie/Handbook of Experimental Pharmacology* s.l. : Springer, 1971.
20. Cervelli M and Graeme R, Principles of Drug Therapy, Dosing, and Prescribing in Chronic Kidney Disease and Renal Replacement Therapy. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Vol. 74, pp. 870-879.
21. Tesseromatis C and Alevizou A, The role of the protein-binding on the mode of drug action as well the interactions with other drugs. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2008, Vol. 4, 33, pp. 225–230.
22. Zhou J, Tran B and Tam V, The complexity of minocycline serum protein binding. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017.
23. Deitchman A, Singh R and Derendorf H, Nonlinear Protein Binding: Not What You Think. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, Vol. 7, 107, pp. 1754-1760.
24. Cohen L and Nicoll-Griffith D, Plasma Protein Binding Methods in Drug Discovery and Development: Bioanalysis. [ed.] Alexander V. Lyubimov. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, 2012.
25. Benet L and Hoener B, Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2002, 71, pp. 115–121.
26. Howard M, et al. Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2010, Vol. 13, 2, pp. 170-187.
27. Seyfinejad B, Ozkan S and Jouyban A, Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: Analytical methods. *Talanta*. 2021, 225.
28. Gesztelyi R et al. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. *Archive for history of exact sciences*. 2012, 66, pp. 427-438.

29. Schmidt S et al. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. November 2008, Vol. 52, 11, pp. 3994-4000.