



Priručnik o virtualnim pokusima iz farmakologije



Urednici
Darko Modun
Lidija Bach-Rojecky



UDŽBENICI SVEUČILIŠTA U SPLITU
MANUALIA UNIVERSITATIS STUDIORUM SPALATENSIS



Nakladnik
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Urednici
prof. dr. sc. Darko Modun
doc. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky

Autori
dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, doc., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
dr. sc. Danijela Budimir, asistent-znanstveni novak, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
dr. sc. Josip Čulig, red. prof. Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
dr. sc. Željko Debeljak, doc. Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
Petra Dolenc, dipl. ing. biol., prof. biol., asistent-znanstveni novak, Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci
dr. sc. Željko Jovanović, doc. Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
dr. sc. Suzana Mimica Matanović, doc. Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
dr. sc. Darko Modun, izv. prof. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
dr. sc. Ivana Mudnić, doc. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Jelena Rajič, dipl. ing. biol., asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
Sonja Šarčević, dr.med., asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
Ana Šešelja Perišin, mr. pharm., asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
dr. sc. Aleksandar Včev, red. prof., Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
dr. sc. Gordana Župan, red. prof., Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Recenzenti
prof. dr. sc. Zlatko Lacković
prof. dr. sc. Siniša Tomić

Grafička priprema
doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Odobrio Senat Sveučilišta u Splitu na temelju članka 12. Poslovnika o radu Povjerenstva za znanstveno-nastavnu literaturu Sveučilišta u Splitu, na 81. sjednici Senata Sveučilišta u Splitu održanoj 27. ožujka 2013. godine, Klasa 003-08/13-05/0004; Urbroj 2181-202-13-0034.

Priručnik o virtualnim pokusima iz farmakologije

Urednici
prof. dr. sc. Darko Modun
doc. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Split, 2013.

CIP - Katalogizacija u publikaciji
SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA
U SPLITU

UDK 615(035)(086)

PRIRUČNIK o virtualnim pokusima iz
farmakologije <Elektronička građa> /
urednici Darko Modun, Lidija Bach-Rojecky.
- Split : Medicinski fakultet, 2013. -
(Udžbenici Sveučilišta u Splitu = Manualia
Universitatis studiorum Spalatensis)

Pristup: World Wide Web. - Stv. nasl. s
naslovnice. - Publikacija je u formatu
PDF; sadrži 137 str.

ISBN 978-953-7524-13-5

1. Modun, Darko 2. Bach-Rojecky, Lidija
I. Farmakologija – Priručnik

150208095

ISBN 978-953-7524-13-5

Sadržaj

MODUL FARMAKODINAMIKA (ISOLATED ILEUM)	1
I. Uvod	1
II. Upoznavanje s dijelovima i sučeljima modula „Isolated ileum“	3
II. Klasifikacija i identifikacija farmakološki aktivnih tvari	5
1. Primjena jedne tvari - farmakodinamička karakterizacija agonista	5
2. Primjena dviju tvari - farmakodinamička karakterizacija kompetitivnog antagonista	5
3. Primjena dviju tvari - farmakodinamička karakterizacija nekompetitivnog antagonista	28
4. Farmakodinamička identifikacija i karakterizacija nepoznatih agonista	40
<i>Prilog I. Agonisti i antagonisti korišteni u vježbi izolirani ileum</i>	<i>51</i>
 MODUL FARMAKOKINETIKA (KINETICS)	 53
I. Uvod – osnovni pojmovi i jednadžbe iz farmakokinetike	53
II. pristupi analizi farmakokinetičkih podataka	56
III. Upoznavanje s dijelovima i sučeljima modula „Kinetics“	59
IV. Ampicilin – primjer modela s jednim odjeljkom	61
V. Propranolol – primjer modela s dva odjeljka	84
<i>Prilog I: Popis korištenih jednadžbi</i>	<i>106</i>

MODUL PSIHOFAKMAKOLOGIJA (BEHAVIOUR)	109
I. Uvod	109
II. Mouse Watch (Mouse Simulator)	109
III. Symptoms lab. animals	110
Zadatak 1: Serotoninski (5-HT) sindrom	111
Zadatak 2: Amfetamin i kokain	113
Zadatak 3: Barbiturati	115
Zadatak 4: Klorpromazin i haloperidol	117
Zadatak 5: Morfin i metoda „vruće ploče“ (engl. hot-plate method)	119
Zadatak 6: Pilocarpin i atropin	121
Zadatak 7: Nikotin i tubokurarin	123
 MODUL ANESTEZIJA (ANESTHESIA)	 125
I. Uvod	125
II. Primjena pentobarbitala	127
III. Primjena fentanila	133
IV. Primjena izoflurana	135
 LITERATURA	 137



Predgovor

“Priručnik o virtualnim pokusima iz farmakologije” je elektronska publikacija, besplatno nastavno štivo, dostupno svima putem interneta. Korisnici mogu preuzeti besplatni dokument na slijedećoj poveznici:

http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/farmakologija/nastavni_materijali/Prirucnik_o_virtualnim_pokusima.pdf

Ovakav pristup je možda neobičan, ali smatramo da je opravdan i poželjan u 21. stoljeću, kada digitalna distribucija različitog sadržaja i dostupnost interneta omogućavaju svakom zainteresiranom čitatelju pristup informacijama.

Ova knjiga je namijenjena prvenstveno studentima, za njih je stvarana, njima je prilagođena. Namijenjena je studentima Medicine, Dentalne medicine i Farmacije, te stručnim studijima iz područja Biomedicine i zdravstva. Nadamo se da će dijelovi ove knjige biti zanimljivo štivo studentima poslijediplomskih studija koji se bave farmakologijom.

Molimo sve čitatelje da svoje upite i prijedloge pošalju urednicima na mail: drmodun@gmail.com

Nadahnuće za pisanje knjige je bio besplatni kompjuterski program *Microlabs for Pharmacologist*, te njegov autor prof.dr. Henk van Wilgenburg[†]. Nažalost, Henk više nije među nama, te stoga upravo njemu, našem kolegi i prijatelju, posvećujemo ovu knjigu.

Zahvala

Zahvaljujemo se uvažanim recenzentima, prof. dr. sc. Zdravku Lackoviću i prof. dr. sc. Siniši Tomiću na uloženom vremenu i trudu.

Hrvatsko društvo farmakologa, Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) i Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije pružili su financijsku potporu u pripremi ove knjige, na čemu im se iskreno zahvaljujemo.

Medicinski fakultet u Splitu, izdavač ove knjige, pružio je podršku konceptu elektronske publikacije dostupne besplatno svima putem interneta, čineći iskorak u visokoškolskim standardima u Republici Hrvatskoj.

Konačno, zahvaljujemo se našim obiteljima koje su pokazale razumijevanje, ljubav i strpljenje te pružile nesebičnu podršku tijekom našeg rada na knjizi.

Modul Farmakodinamika (*Isolated Ileum*)

Lidija Bach-Rojecky, Darko Modun

Cilj modula:

- *upoznavanje s osnovnim načinima vezanja lijeka na receptore*
- *upoznavanje s odnosom između koncentracije lijeka i učinka*
- *upoznavanje s osnovnim farmakodinamičkim parametrima.*

Stechene vještine nakon završenog modula:

- *razumijevanje farmakoloških razlika između različitih vrsta agonista i antagonista*
- *razumijevanje ovisnosti učinka o primijenjenoj dozi samog agonista ili u kombinaciji s antagonistom*
- *razumijevanje značenja osnovnih farmakodinamičkih parametara.*

I. Uvod

Većina lijekova ostvaruje svoje djelovanje kao rezultat visoko specifičnog vezanja za receptore - proteinske makromolekule na plazmatskim membranama.

Neki lijekovi te mnogi prirodni hormoni i neurotransmitori reguliraju funkciju receptora djelujući kao **agonisti** na jedan ili više tipova receptora aktivirajući njegove signalizacijske mehanizme i uzrokujući biološki odgovor.

Agonisti mogu biti pravi, parcijalni ili inverzni.

Pravi agonist postiže maksimalan učinak kod potpune ili djelomične zauzetosti receptora.

Parcijalni agonist postiže učinak manji od maksimalnog kod potpune zauzetosti receptora, čak i kod visokih doza.

Inverzni agonist se veže za inaktivnu konformaciju receptora te smanjuje frakciju receptora u aktivnom stanju, tj. sprečava vezanje agonista i konstitutivnu aktivnost receptora.

Za svaki lijek koji djeluje kao agonist nekog određenog tipa receptora je s aspekta farmakodinamike važno poznavati njegovu potentnost i maksimalnu učinkovitost koje se procjenjuju na temelju osnovnih farmakodinamičkih parametara, poput EC_{50} (koncentracija lijeka koja postiže 50% najvećeg učinka), E_{maks} (najveći učinak koji lijek može postići) i K_d (ravnotežna konstanta disocijacije kompleksa lijek-receptor).

Drugi lijekovi djeluju kao farmakološki **antagonisti**, vežući se za receptor ometaju vezanje i aktivaciju receptora agonistom, a bez uzrokovanja njegove aktivacije.

Antagonisti mogu biti kompetitivni ili nekompetitivni te se vezati za receptor reverzibilno ili ireverzibilno.

Kompetitivni antagonisti natječu se s agonistom za vezno mjesto pa je njihov učinak ovisan o relativnoj koncentraciji agonista te o konstanti disocijacije antagonista (mjera afiniteta antagonista prema receptoru). Ovisno o primijenjenoj koncentraciji, antagonisti mogu smanjiti ili poništiti učinak agonista.

Nekompetitivni antagonisti se vežu za drugo vezno mjesto na receptoru smanjujući ili sprečavajući djelovanje agonista.

Receptori najčešće određuju kvantitativne odnose između doze, odnosno koncentracije lijeka i farmakološkog učinka. Afinitet receptora za vezanje lijeka određuje koncentraciju lijeka potrebnu za tvorbu značajnog broja kompleksa lijek-receptor, a ukupni broj receptora može ograničiti maksimalni učinak nekog lijeka.

Ispitivanja na izoliranim tkivima/organima su često korištena u farmakološko-toksikološkim analizama za:

- proučavanje učinaka tvari na specifični tip receptora
- određivanje krivulje doza-učinak za tvari s agonističkim djelovanjem te kvantifikaciju osnovnih farmakoloških parametara agonista
- istraživanja novih lijekova.

Prednost istraživanja djelovanja lijekova *in vitro* na izoliranim tkivima u odnosu na *in vivo* pokuse je u tome što omogućuje istraživanje specifičnih učinaka na izoliranom tkivu, preko specifičnog podtipa receptora, a bez neželjenih djelovanja na ostala tkiva što bi bilo nemoguće izbjeći u pokusima *in vivo*, npr. nakon sistemske primjene ispitivane tvari.

Istraživanja ovog tipa često su korištena za demonstraciju i kvantificiranje učinaka lijekova na intestinalne glatke mišiće. Ovaj glatki mišić ima minimalnu spontanu (bazalnu) aktivnost, a sadrži velik broj receptora (muskarinski, histaminski, GABA, serotonin, adrenoreceptori...) zbog čega je pogodan za demonstraciju djelovanja različitih lijekova.

Acetilholin je glavni ekscitacijski neurotransmitor za glatku muskulaturu crijeva koji uzrokuje brzu, ali kratkotrajnu kontrakciju djelujući preko muskarinskih receptora (M_3). Primarni je neurotransmitor u autonomnim ganglijima, neuromišićnoj spojnici i postganglijskim parasimpatičkim završecima s podjednakim afinitetom vezanja za muskarinske i nikotinske receptore te visokom osjetljivošću na hidrolizu acetilkolinesterazom. Izravni kolinomimetici (agonisti kolinergičnih receptora) su esteri kolina, npr. metakolin i karbahol, a razlikuju se od acetilkolina po selektivnosti prema kolinergičnim receptorima (npr. metakolin je visokoselektivan prema muskarinskim receptorima, a karbahol je selektivniji prema nikotinskim receptorima) te osjetljivosti na hidrolizu acetilkolinesterazom (karbahol je neosjetljiv na enzim zbog čega mu učinak traje duže).

Kada bismo na životinji u *in vivo* pokusu primijenili acetilholin, osim djelovanja na glatku muskulaturu crijeva, ostvarili bi se i drugi brojni neselektivni periferni, ali i središnji učinci.

Atropin je primjer visokoselektivnog kompetitivnog antagonista muskarinskih receptora, međutim bez razlike u afinitetima prema podtipovima muskarinskih receptora. Na primjer, kada bismo atropin primijenili na pokusnoj životinji, osim relaksirajućeg djelovanja na intestinalne mišiće, ispoljili bi se i sistemski neželjeni učinci na druga tkiva koje je tada teško kvantificirati (npr. mišićni sloj žlijezda slinovnica, zjenica oka).

Princip *in vitro* metode ispitivanja djelovanja različitih tvari na izolirano tkivo (npr. glatki mišić ileuma) je da se komadić ileuma uroni u Ringerovu otopinu na temperaturi od 37°C i smjesu 95% O_2 i 5% CO_2 te se dodatkom različitih tvari u rastućim koncentracijama postiže brza kontrakcija mišića. Kontrakcija se registrira preko pretvarača te bilježi kao pozitivni otklon (tzv. pik) čija je amplituda najviša

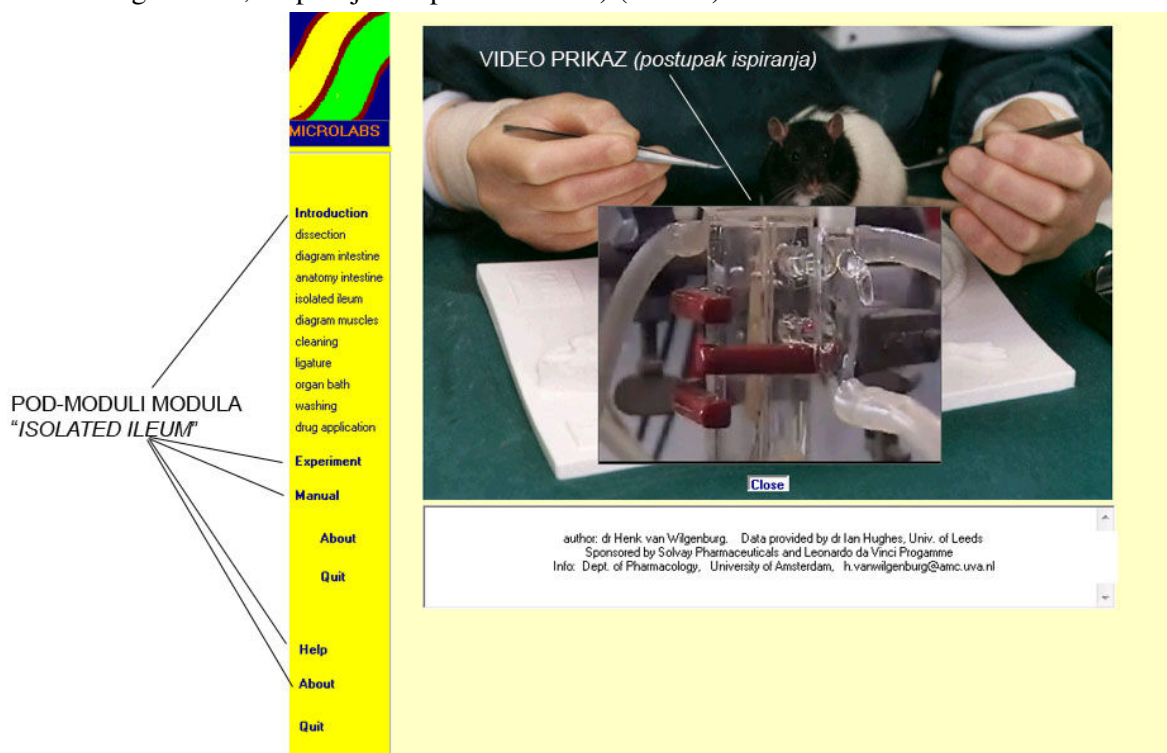
brzo nakon aplikacije tvari te potom slabi. Tvar koja postiže kontrakciju je agonist receptora. Učinak, prikazan amplitudom pika, ovisan je o primijenjenoj dozi agonista, odnosno njegovoj koncentraciji u otopini u koju je uronjeno tkivo.

Kako postupak pripreme tkiva za *in vitro* pokus zahtijeva žrtvovanje životinja, najčešće zamorčica, postavljaju se brojna etička pitanja potrebe za ovakvim tipom eksperimenta budući da postoje alternativne metode poput kompjutorske simulacije ovakvog eksperimenta.

U sklopu kompjutorskog programskog paketa „Microlabs“ modul *Isolated ileum* simulira učinak različitih tvari na izolirani ileum zamorčica.

II. Upoznavanje s dijelovima i sučeljima modula „Isolated ileum“

Nakon odabira modula *Isolated ileum* prikazuje se glavni izbornik modula. Odabirom podmodula *Introduction* nudi se serija video isječaka koji prikazuju faze pripreme *in vitro* pokusa na izoliranom ileumu (od disekcije, anatomije ileuma, postupka izoliranja ileuma, pripreme tkiva i otopine za uranjenje tkiva te namještanje čitavog sustava, do primjene ispitivanih tvari) (Slika 1).



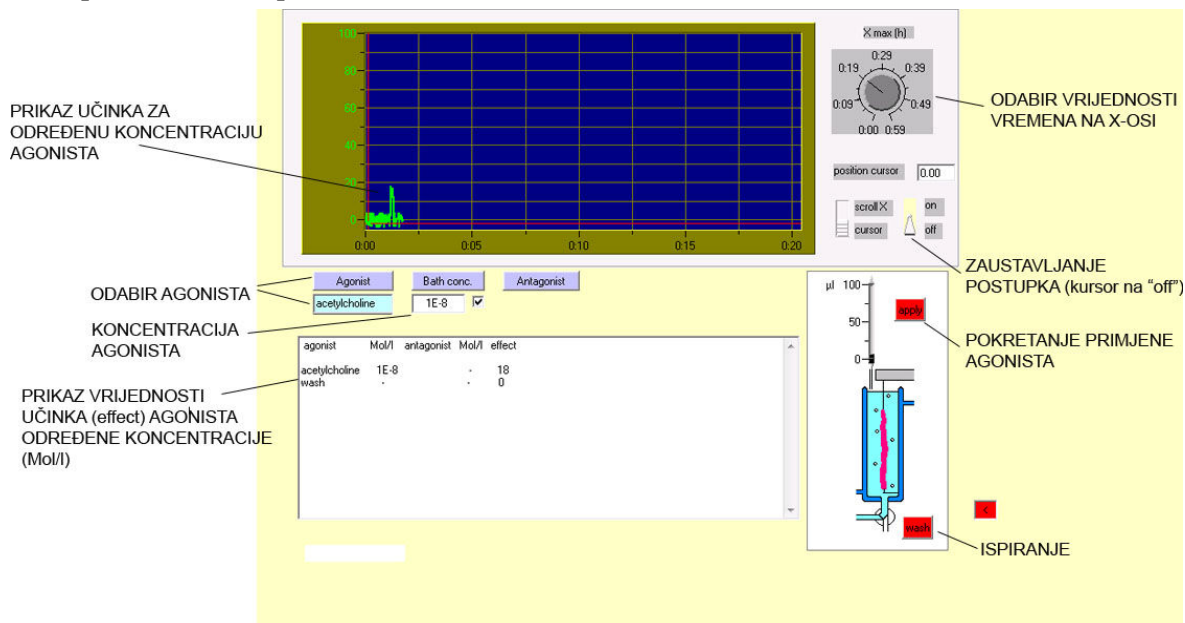
Slika 1. Modul „Isolated ileum“.

Odabirom podmodula *Experiment*, otvara se radni prostor. Eksperiment može početi odabirom agonista iz izbornika, potvrdom koncentracije agonista te pritiskom na tipku „*apply*“. Primjena agonista zaustavlja se pritiskom na tipku „*wash*“ (Slika 2). Postupak se ponavlja mijenjanjem koncentracije agonista.

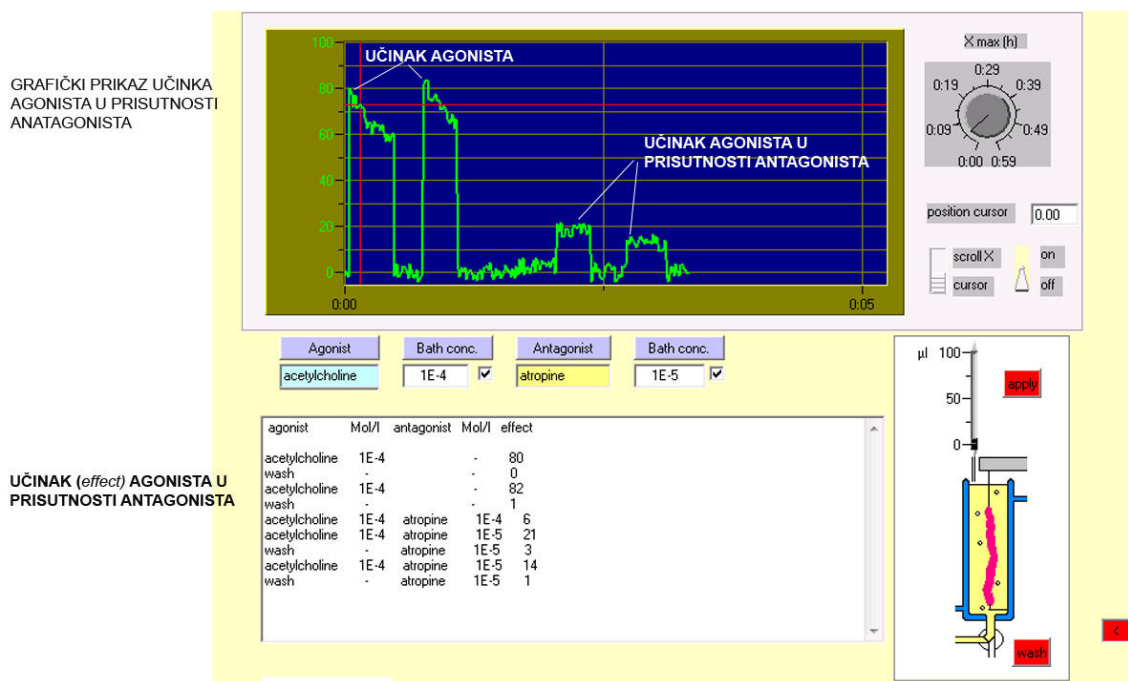
Osim različitih agonista, moguće je ispitati utjecaj odabranog antagonista (iz izbornika) na učinak agonista. Jednostavnim mijenjanjem koncentracija agonista uz

istu koncentraciju antagonista moguće je brojčano i grafički pratiti učinak agonista (Slika 3).

U oba slučaja, uz pomoć grafičkog prikaza te korištenjem dobivenih numeričkih podataka i odgovarajućih jednadžbi moguće je doći do osnovnih farmakodinamičkih parametara za ispitivane tvari.



Slika 2. Sučelje podmodula *Experiment* - Učinak određene koncentracije odabranog agonista



Slika 3. Sučelje podmodula *Experiment* - Učinak određene koncentracije odabranog agonista u prisutnosti određene koncentracije odabranog antagonista.

II. Klasifikacija i identifikacija farmakološki aktivnih tvari

1. Primjena jedne tvari - farmakodinamička karakterizacija agonista

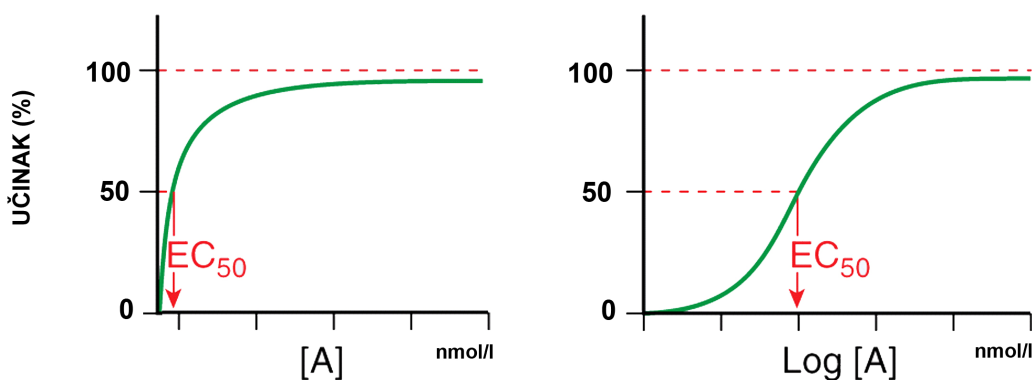
Stečena znanja i vještine nakon uspješno završene vježbe:

- razumijevanje odnosa doze (koncentracije) primijenjene tvari i učinka te znati prikazati linearnu i logaritamsku krivulju koncentracija-činak
- iz krivulja koncentracija-činak znati procijeniti EC_{50} te razumjeti značenje tog farmakodinamičkog parametra
- služeći se Lineweaver-Burkovim pravcem pronaći teorijski maksimalan učinak i EC_{50}
- uz pomoć dobivenih farmakodinamičkih parametara, moći okarakterizirati primijenjenu tvar.

Učinak agonista ovisan je o primijenjenoj dozi, odnosno koncentraciji u otopini. Grafičkim prikazom postignutih učinaka nakon primjene rastućih koncentracija agonista dobiju se krivulje odnosa doza/koncentracija (X os, apscisa) – učinak (Y os, ordinata) koje mogu biti hiperboličke (linearni prikaz) ili sigmoidalne (logaritamski prikaz). Ovakav grafički prikaz odnosa koncentracije i učinka omogućuje određivanje sljedećih parametara važnih za karakterizaciju agonista:

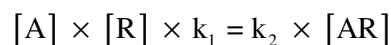
- EC_{50} – molarna koncentracija agonista koja uzrokuje 50% maksimalnog mogućeg učinka agonista (označava potentnost lijeka)
- maksimalni učinak (E_{maks} u ispitivanom tkivu pod određenim eksperimentalnim uvjetima)

Vrijednost EC_{50} može se očitati iz krivulje doza-činak (Slika 4).



Slika 4. Linearni i logaritamski prikaz ovisnosti učinka o koncentraciji agonista.

Ako pretpostavimo da je jačina učinka ovisna o udjelu ligandom zauzetih receptora u odnosu 1:1 te da je vezanje lijeka za receptor reverzibilno, tada se **vezanje lijeka za receptor** može prikazati kao:



pri čemu su $[A]$, $[R]$ i $[AR]$ kako slijedi: molarna koncentracije agonista, početna molarna koncentracija receptora te koncentracija kompleksa agonist-receptor, a k_1 i k_2 konstante stupnja vezanja, odnosno stupnja disocijacije.

Kd jednaka je omjeru k_2 i k_1 .

Učinak agonista (E) kod neke određene koncentracije [A] može se izraziti sljedećom jednačinom:

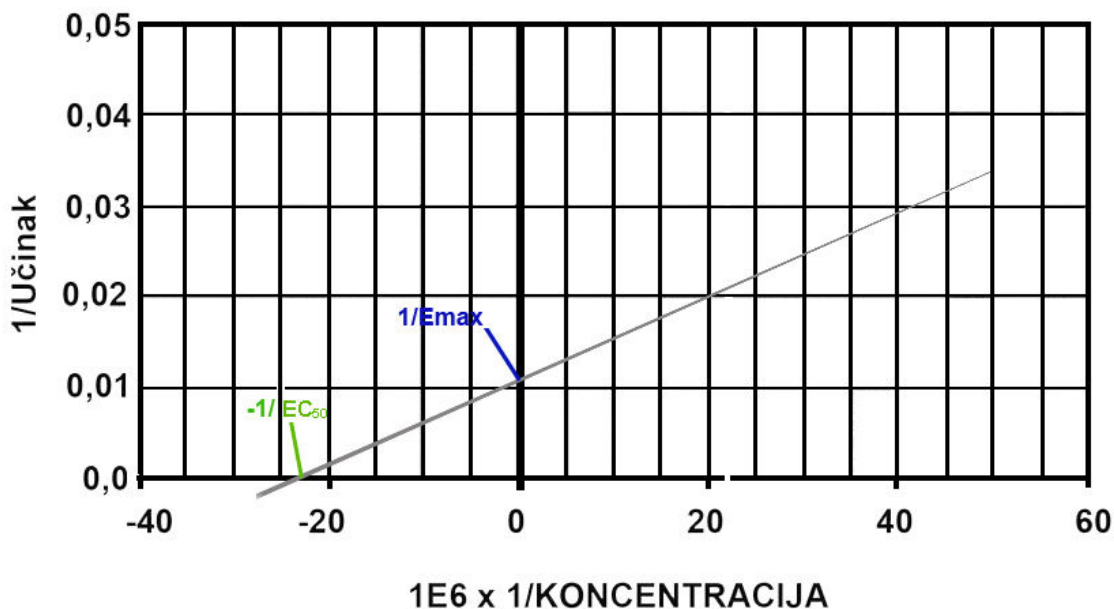
$$E = \frac{[A] \times E_{\text{maks}}}{EC_{50} + [A]} = \frac{E_{\text{maks}}}{1 + \frac{EC_{50}}{[A]}} \quad (\text{Jednadžba 1})$$

Vrijednost za E_{maks} i EC_{50} mogu se približno izračunati koristeći **Lineweaver-Burkovu** linearnu transformaciju:

$$\frac{1}{E} = \frac{EC_{50}}{E_{\text{maks}} \times [A]} + \frac{1}{E_{\text{maks}}} \quad (J.2)$$

Linearnom transformacijom smo dobili klasičnu jednačinu pravca, $Y = aX + b$, pri čemu Y je $1/E$, X je $1/[A]$, EC_{50}/E_{maks} je nagib pravca, a $1/E_{\text{maks}}$ je odsječak na Y osi.

E_{maks} i EC_{50} se mogu očitati iz dvostruko recipročnog **Lineweaver-Burkovog** grafa pri čemu se na Y osi prikazuje *recipročna vrijednost učinka* ($1/E$), a jednačinu pravca na X osi *recipročna vrijednost koncentracije agonista* ($10^{-6} \times 1/[A]$), kao što prikazuje Slika 5. Sjecište pravca i Y osi predstavlja $1/E_{\text{maks}}$, a sjecište pravca i X osi predstavlja $-1/EC_{50}$.



Slika 5. Lineweaver-Burkov graf.

Primjer 1. Farmakodinamička karakterizacija acetilkolina

Koristeći modul *Isolated ileum* programskog paketa **Microlabs** na primjeru agonista acetilkolina prikazat će se izračunavanje osnovnih farmakodinamičkih parametara: EC_{50} i E_{maks} .

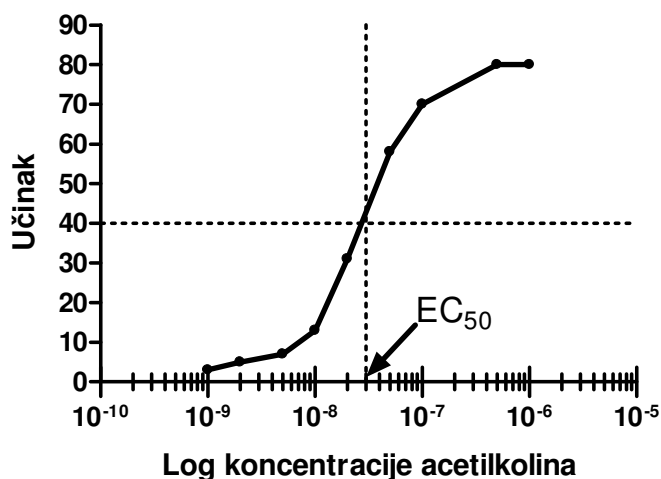
Nakon pokretanja modula, odabrat će se opcija *Experiment* i odabirom agonista u početnoj koncentraciji započeti postupak. Odabran je acetilkolin.

Postupak 1

- Početna odabrana koncentracija agonista acetilkolina je $1E-9$ (mol/l), tj. 1 nmol/l; koncentracija se upisuje u za to predviđeni prostor i potvrđuje kvačicom; pritiskom na „apply“ u virtualnu otopinu primjenjuje se agonist, a postupak se zaustavlja odabirom opcije wash (postupak se ponavlja 3 puta);
- Koncentracija acetilkolina se povećava za faktor 2 (koncentracije u tablici), a za svaku se koncentraciju postupak ponavlja 3 puta (koncentracije acetilkolina se povećavaju dok se ne postigne maksimalni učinak)
- Iz pojedinačnih vrijednosti ispisanih u donjem dijelu aplikacije, izračunaju se srednje vrijednosti učinka za svaku koncentraciju acetilkolina (Tablica 1a) i nacrtava se graf koji prikazuje ovisnost učinka (Y os) o koncentraciji agonista (logaritam koncentracije – X os) (Graf 1a).

Tablica 1a. Učinak određenih koncentracija acetilkolina.

Koncentracija (mol/L)	Učinak
$1E-9$	3
$2E-9$	5
$5E-9$	7
$1E-8$	13
$2E-8$	31
$5E-8$	58
$1E-7$	70
$5E-7$	82
$1E-6$	81



Graf 1a. Grafički prikaz ovisnosti učinka o koncentraciji (log koncentracije) acetilkolina s naznačenom EC_{50} .

Iz tablice i grafa log koncentracije-učinak moguće je očitati osnovne farmakodinamičke parametre, E_{maks} i EC_{50} . U slučaju acetilkolina EC_{50} iznosi $3 \times 10^{-8} \text{ mol/l} = 30 \text{ nmol/l}$, a E_{maks} iznosi oko 81.

Kako bi približno izračunali E_{maks} i EC_{50} za acetilkolin koristit ćemo **Lineweaver-Burkovu transformaciju** (Jednadžba 2):

$$\frac{1}{E} = \frac{EC_{50}}{E_{\text{maks}} \times [A]} + \frac{1}{E_{\text{maks}}}$$

te nacrtati Lineweaver-Burkov graf (Slika 5).

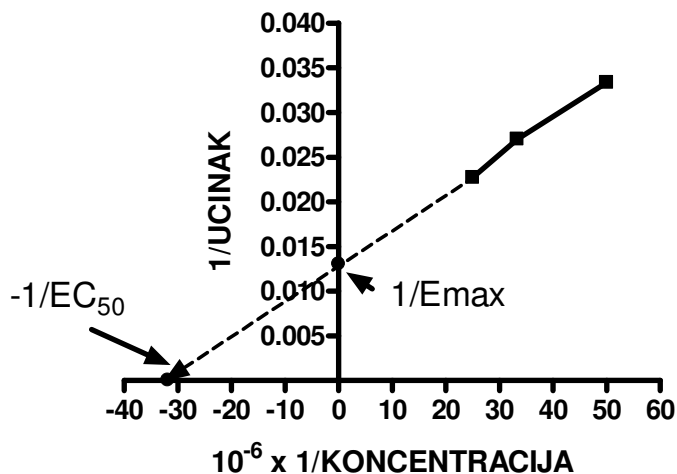
d) Za crtanje **Lineweaver-Burkovog grafa** koristit ćemo koncentracije agonista bliske EC_{50} (2E-8, 3E-8, 4E-8), iz tri dobivene srednje vrijednosti izračunati srednju vrijednost učinka (ponavljanjem postupka u aplikaciji, kako je prethodno opisano) te iz njih izračunati potrebne varijable, tj. recipročne vrijednosti koncentracije i učinka (Tablica 1b).

Tablica 1b. Dobivene vrijednosti učinka ovisno o koncentraciji acetilkolina iz aplikacije te prilagođene vrijednosti potrebne za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa.

Koncentracija	Učinak	$10^{-6} \times 1/\text{Koncentracija}$	$1/\text{Učinak}$
2E-8	30	50	0,03333
3E-8	36	33	0,02777
4E-8	44	25	0,02273

Na osnovu dobivenih vrijednosti nacrtat će se graf (Graf 1b).

e) Iz dobivenog grafa mogu se očitati sljedeće vrijednosti: sjecište pravca i Y osi označava $1/E_{\text{maks}}$, a sjecište pravca i X osi označava $-1/EC_{50}$.



Graf 1b. Lineweaver-Burkov graf s označenim točkama za $1/E_{\text{maks}}$ i $-1/EC_{50}$.

Iz Grafa 1b se može očitati da je:

- sjecište pravca i Y osi na 0,0125, iz čega proizlazi da je:
 E_{maks} za acetilkolin = $1/0,0125 = 80$
- sjecište pravca i X osi je na -32, iz čega proizlazi da je:
 EC_{50} za acetilkolin = $-1/(-32) \times 10^{-6} = 3,1 \times 10^{-8} \text{ mol/l} = 31 \text{ nmol/l}$.

Samostalna vježba za studente 1

Vježbu mogu izvoditi dva studenta u paru. Svaki par radi pokus s dva agonista: acetilkolinom i jednim agonistom (kojeg im odredi voditelj vježbi). Po završetku vježbe se svi farmakodinamički parametri za sve ispitivane agoniste upisuju u skupnu tablicu (**Skupna tablica 1**).

- Nakon pokretanja programa Microlabs, na glavnom meniju odaberite Isolated ileum
- Odaberite Introduction kako bi se upoznali s osnovnim koracima u pripremi i izvođenju in vitro eksperimenta na izoliranom ileumu (video prikazi)
- Odaberite Experiment
- Odaberite agonist s liste ponuđenih i koncentraciju (početna koncentracija agonista u otopini neka bude 1 nmol/l, tj. u prozorčić upišite 1E-9), potvrdite klikom na prazan kvadratić; pritisnite apply (primjena)
- Nakon 5-10 sekundi pritisnite wash (ispiranje)
- Cijeli postupak primjene i ispiranja (apply – wash) provedite 3 puta
- Povećajte koncentraciju agonista za faktor 2, na primjer 20, 50, 100, 200 itd. nmol/l, tj. u prozorčić upisujte redom koncentracije: 2E-9, 5E-9, 1E-8, 2E-8, 5E-8, 1E-7, 2E-7, 5E-7, 1E-6, 5E-6,...
- Očitajte dobivene vrijednosti učinka (srednja vrijednost od 3 očitavanja) i popunite tablicu (Radni list-Tablica 1); grafički prikažite ovisnost log koncentracija– učinak (Radni list – Graf 1)
- Iz nacrtanog grafa očitajte E_{maks} i EC_{50}
- Nacrtajte Lineweaver-Burkov graf: koristeći vrijednosti koncentracija bliske EC_{50} izračunajte recipročne vrijednosti učinka ($1/E$) (Y os) i pripadajućih koncentracija ($1E-6 \times 1/koncentracija$) (X os), popunite tablicu (Radni list – Tablica 2) te ih ucrtajte na graf (Radni list - Graf 2)
- Očitajte $1/E_{maks}$ (pravac siječe Y os) i $-1/EC_{50}$ (pravac siječe X os)
- Izračunajte E_{maks} i EC_{50} .

Cijeli postupak ponovite za drugi agonist, dobivene podatke i izračunate vrijednosti (EC_{50} , E_{maks}) upišite u Tablicu 1.

Na osnovu izračunatih parametara usporedite ispitivane agoniste - njihovu djelotvornost i potentnost.

Radni list I. – Tablica 1.**Tablica 1.** Podaci potrebni za crtanje grafa log koncentracija – učinak

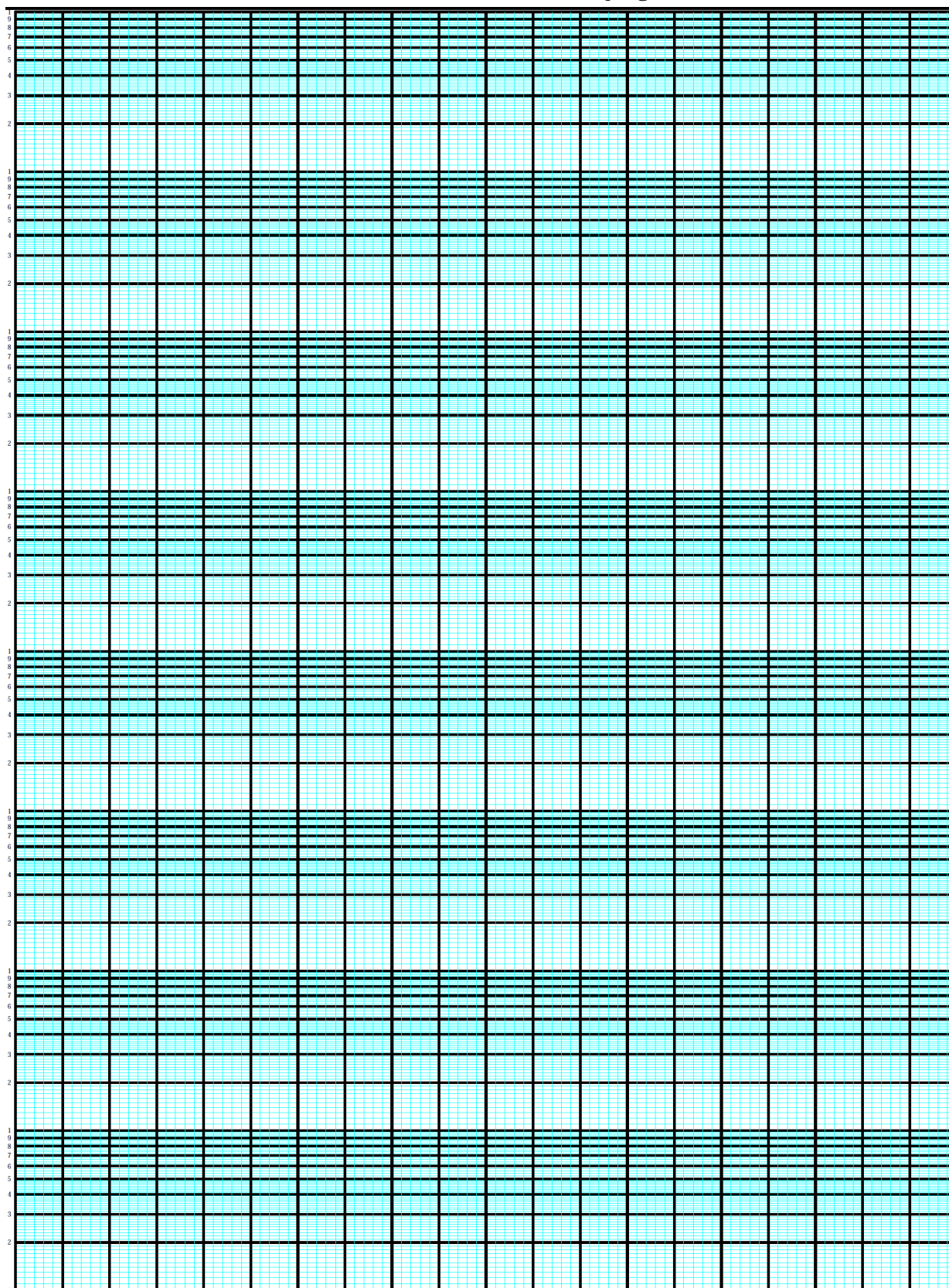
Koncentracija agonista (mol/L)	Učinak	
	<i>Acetilkolin</i>	
1E-9		
2E-9		
5E-9		
1E-8		
2E-8		
5E-8		
1E-7		
2E-7		
5E-7		
1E-6		
2E-6		
5E-6		
1E-5		
2E-5		
5E-5		
1E-4		
2E-4		
5E-4		
1E-3		
2E-3		
5E-3		
1E-2		
2E-2		
5E-2		

* U prazan prostor upišite naziv drugog ispitivanog agonista.

Napomena: Nije potrebno primijeniti sve ponuđene koncentracije. Nakon postizanja maksimalnog učinka (učinak se ne povećava ni nakon 5 puta veće koncentracije) završava se primjena agonista.

Radni prostor za računanje:

Radni list I. – Graf 1. Ovisnost učinka o koncentraciji agonista



Radni list I. – Tablica 2.

Tablica 2. Podaci potrebni za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa (koncentracija, učinak te prilagođene recipročne vrijednosti)

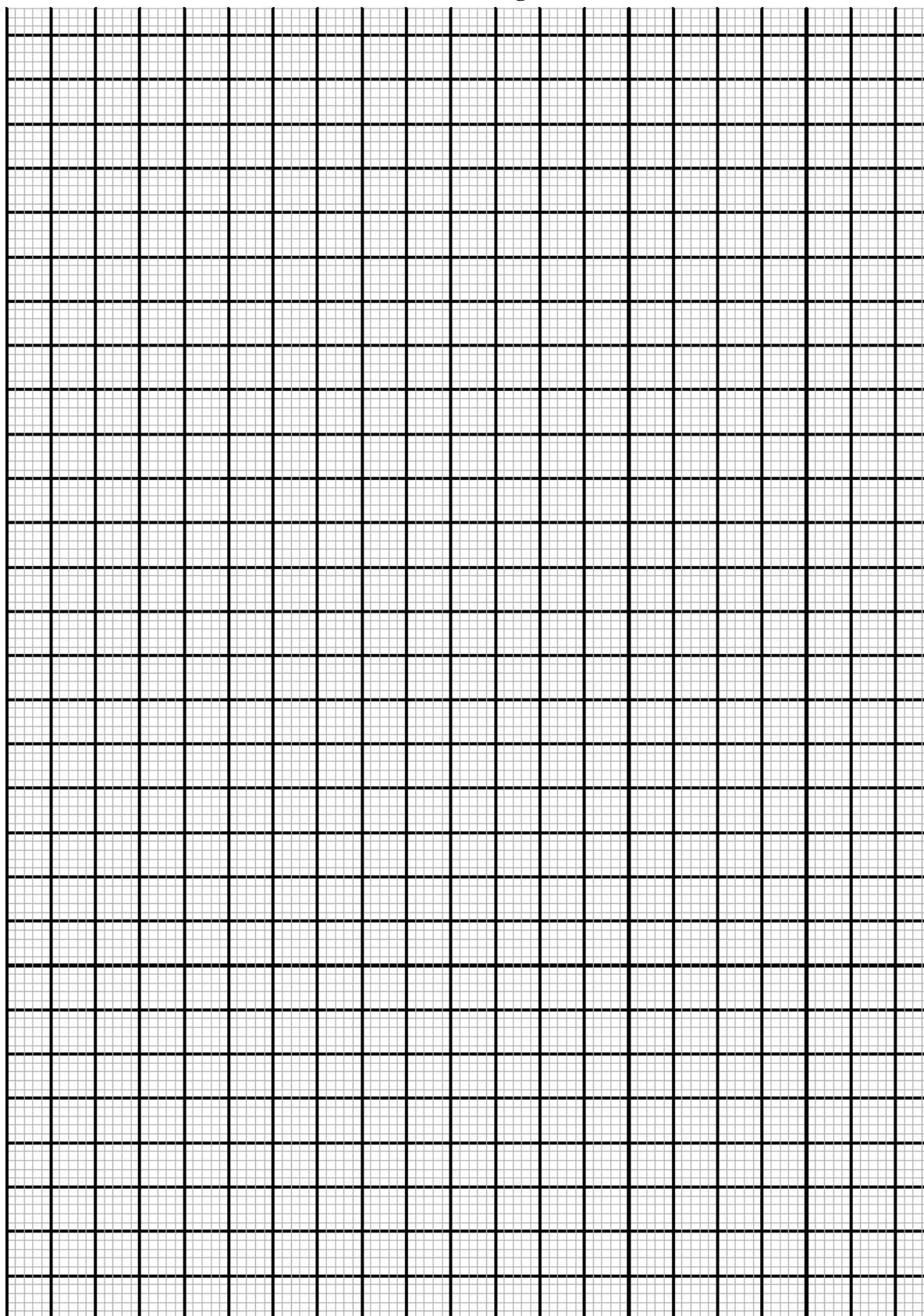
<i>a) Acetilolin</i>			
Koncentracija	Učinak	$10^{-6} \times 1/\text{Koncentracija}$	1/Učinak

<i>*b) _____</i>			
Koncentracija	Učinak	$10^{-6} \times 1/\text{Koncentracija}$	1/Učinak

**Upišite ispitivani agonist*

Radni prostor za računanje:

Radni list I. – Graf 2. Lineweaver-Burkov graf



Radni list I. – Skupna tablica 1.

Skupna tablica 1. Farmakodinamički parametri za agoniste

Agonist	E_{maks}	EC₅₀	E_{maks} (teor.)*	EC₅₀ (teor.)*
Acetilholin				
Karbahol				
Metakolin				
Angiotenzin				
Vazopresin				
Histamin				
Tetrametilamonij				
Heksiltrimetilamonij				

**Teorijske vrijednosti izračunate su pomoću Lineweaver-Burkove jednadžbe i očitane iz Lineweaver-Burkovog grafa.*

Teme za raspravu:

Koje informacije o agonistima možemo dobiti uspoređivanjem krivulje koncentracija-činak?

Koje informacije o agonistima možemo dobiti uspoređivanjem nagiba pravca Lineweaver-Burkovog grafa?

Koji je od ispitivanih agonista najpotentniji?

Koji su agonisti podjednako učinkoviti te na temelju čega to možete zaključiti?

2. Primjena dviju tvari – farmakodinamička karakterizacija kompetitivnog antagonista

Stečena znanja i vještine nakon uspješno završene vježbe:

- znati utvrditi je li primijenjena tvar kompetitivni antagonist i razumjeti značenje kompetitivnog antagonista,
- moći izračunati pA_2 kompetitivnog antagonista koristeći Schildov graf,
- procijeniti afinitet antagonista za određeni receptor na osnovu njegove pA_2 vrijednosti.

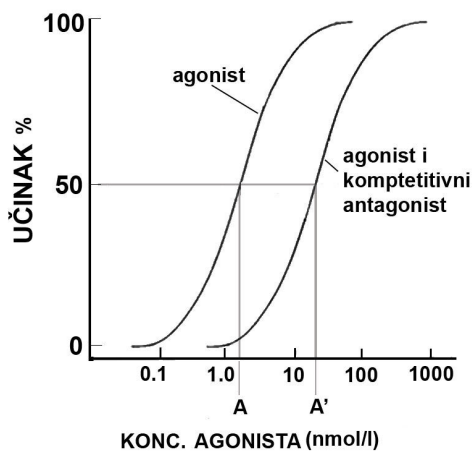
Uslijed istovremene primjene dvije tvari s afinitetom za isti receptor te reverzibilnim vezanjem za njega, doći će do međusobne kompeticije (natjecanja) za to vezno mjesto. Kako bi predvidjeli učinak tvari primijenjenih istovremeno, moramo poznavati njihove konstante disocijacije, koncentracije u otopini te maksimalne učinke koje postižu.

Ako pretpostavimo da jedna od tih tvari ima velik afinitet za receptor, ali ne postiže učinak (ili je on minimalan), govorimo o antagonistu koji ometa vezanje i učinak agonista. Usprkos kompetitivnom ponašanju, kod istovremene primjene agonista i antagonista, za svaku koncentraciju antagonista postoji koncentracija agonista koja može postići maksimalni učinak.

Učinak agonista (A) u prisustvu antagonista (B) možemo prikazati jednadžbom:

$$E = \frac{E_{\text{maks}}(A)}{1 + \left\{ 1 + \frac{[B]}{K_d(B)} \right\} \times \frac{K_d(A)}{[A]}} \quad (J. 3)$$

Na semilogaritamskom grafu krivulja log koncentracija-učinak za agonist u prisustvu antagonista je pomaknuta udesno (Slika 6).



Slika 6. Krivulja log koncentracija-učinak agonista u prisutnosti kompetitivnog antagonista.

Afinitet antagonista za receptor (tzv. potentnost antagonista) označava se kao pA_2 i iskazuje jednadžbom:

$$pA_2 = -\text{Log } K_d(B) \quad (J. 4)$$

pA_2 je negativni logaritam molarne koncentracije antagonista koja je potrebna da bi se udvostručila koncentracija agonista potrebna za postizanje osnovnog učinka, odnosno pA_2 je negativni logaritam koncentracije kompetitivnog antagonista koji će u odsutnosti agonista zauzeti 50% receptora.

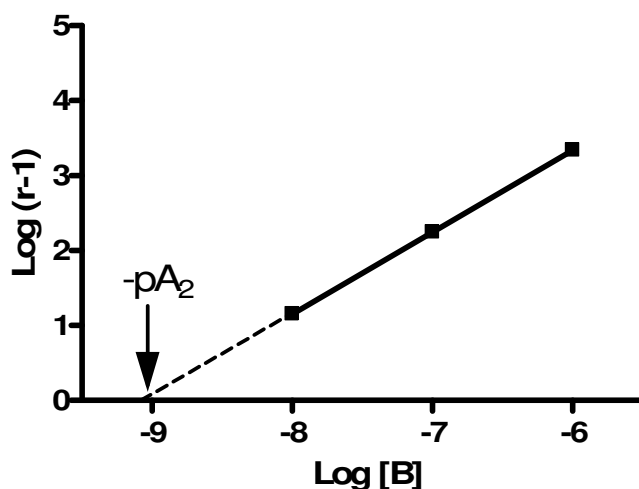
Za kompetitivne reverzibilne antagoniste važno je poznavati i **koncentracijski omjer, r** (eng. *ratio*), odnosno omjer koncentracije agonista koja postiže željeni odgovor (najčešće 50%-tni učinak – EC_{50}) u prisustvu antagonista $[A']$ i koncentracije agonista koja postiže željeni učinak u odsutnosti antagonista $[A]$.

$$r = \frac{[A']}{[A]}$$

$$r = 1 + \frac{[B]}{Kd(B)}, \text{ odnosno } r - 1 = \frac{[B]}{Kd(B)}, \text{ logaritmiranjem dobivamo :}$$

$$\text{Log } (r-1) = \text{Log } [B] - \text{Log } Kd(B) = \text{Log } [B] + pA_2 \quad (J. 5)$$

Jednadžba 5 predstavlja Schildovu jednadžbu, a grafičkim prikazom ove jednadžbe pravca, ovisnosti vrijednosti $\text{Log } (r-1)$ na Y osi o logaritmu koncentracije antagonista ($\text{Log } [B]$) na X osi, (Schildov graf) dobiva se pravac koji siječe X os u točki koja odgovara negativnoj vrijednosti pA_2 (Slika 7).



Slika 7. Schildov graf.

Iz linearnosti i nagiba Schildovog pravca može se dobiti informacija o tipu antagonizma. Ako je pravac linearan i nagib pravca je 1 (45°), radi se o reverzibilnom kompetitivnom antagonizmu. U slučaju nagiba pravca značajno većeg od 1 moglo je doći do nepostizanja potpune ravnoteže ili deplecije potentnog antagonista iz medija kao posljedica vezanja za receptore ili druge strukture. U slučaju nagiba pravca značajno manjeg od 1, razlog može biti nedostatak agonista ili njegovo vezanje za više tipova receptora.

Primjer 2. Farmakodinamička karakterizacija atropina

Učinak acetilkolina ispitivat će se u prisutnosti određene stalne koncentracije antagonista atropina. Cijeli postupak provodit će se s tri koncentracije atropina: $1\text{E-}8$, $1\text{E-}7$ i $1\text{E-}6$.

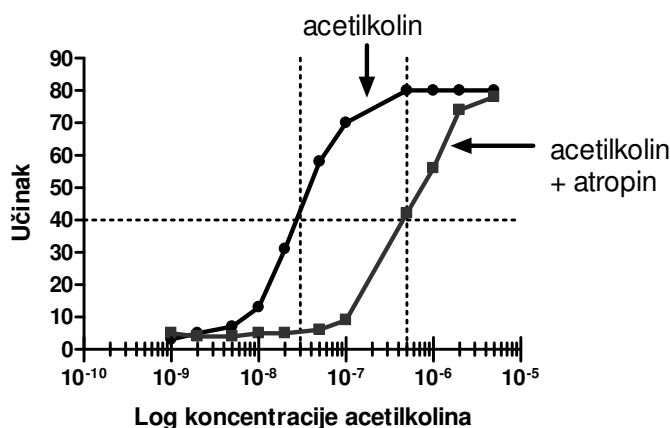
Sada će se u aplikaciji, osim koncentracije acetilkolina (promjenjiva), odrediti i stalna koncentracija antagonista atropina (nepromjenjiva). Daljnji koraci isti su kao u prethodnom primjeru i provode se kao što to opisuje Postupak 1.

Dobiveni rezultati upisuju se u Tablicu 2a te se vrijednosti ucrtaju na graf log koncentracija acetilkolin-učinak bez i u prisutnosti određene koncentracije atropina (Graf 2a).

Tablica 2a. Utjecaj atropina na učinak acetilkolina.

Koncentracija acetilkolina (mol/L)	Učinak	Učinak uz atropin $1\text{E-}8$	Učinak uz atropin $1\text{E-}7^*$	Učinak uz atropin $1\text{E-}6^*$
$1\text{E-}9$	3	5		
$2\text{E-}9$	5	4		
$5\text{E-}9$	7	4		
$1\text{E-}8$	13	5		
$2\text{E-}8$	31	5		
$5\text{E-}8$	58	6		
$1\text{E-}7$	70	9		
$5\text{E-}7$	80	44		
$1\text{E-}6$	80	56		
$2\text{E-}6$	80	76		

**Vrijednosti učinka acetilkolina u prisutnosti druge dvije koncentracije atropina studenti će izračunati sami.*



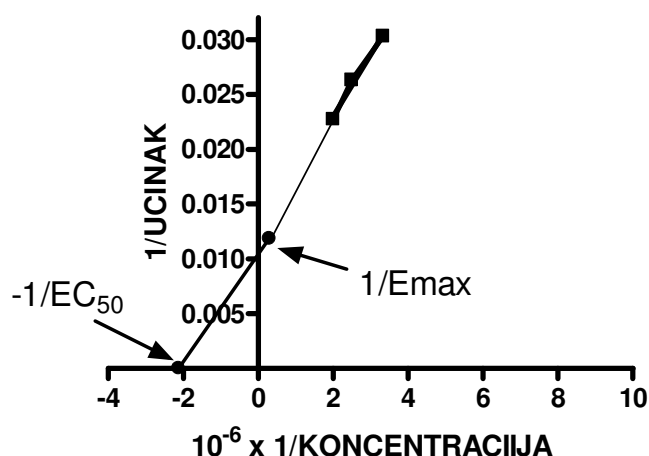
Graf 2a. Ovisnost učinka o koncentraciji acetilkolina kada je prisutan atropin.

Iz Grafa 2a mogu se očitati vrijednosti E_{maks} i EC_{50} acetilkolina bez i u prisutnosti atropina (podaci su prikazani u Tablica 2b).

Na isti način kako to opisuje Postupak 1, izračunat će se podaci te nacrtati Lineweaver-Burkov graf.

Tablica 2b. Vrijednosti učinka ovisno o koncentraciji acetilkolina u prisutnosti atropina ($1\text{E-}8$) iz aplikacije te prilagođene vrijednosti potrebne za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa.

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times 1/\text{Koncentracija}$	$1/\text{Učinak}$
$3\text{E-}7$	33	3,33	0,03
$4\text{E-}7$	38	2,5	0,0263
$5\text{E-}7$	44	2	0,0227



Graf 2b. Lineweaver-Burkov graf za acetilkolin u prisutnosti atropina.

Iz Grafa 2b proizlazi da je:

- sjecište pravca i Y osi na 0,012, iz čega proizlazi da je:
 E_{maks} za acetilkolin u prisutnosti atropina = $1/0,012 = 83$
- sjecište pravca i X osi je na -2,1, iz čega proizlazi da je:
 EC_{50} za acetilkolin u prisutnosti atropina = $-1/(-2,1) \times 10^{-6} = 4,7 \times 10^{-7} \text{ mol/l} = 470 \text{ nmol/L}$.

Usporedite s vrijednostima acetilkolina primijenjenog bez atropina.

Na isti se način, određivanjem iz Grafa 2a ili računanjem iz Grafa 2b, utvrđuju vrijednosti E_{maks} i EC_{50} acetilkolina u prisutnosti preostalih koncentracija atropina ($1\text{E-}7$ i $1\text{E-}6$) (Tablica 2c).

Tablica 2c. Vrijednosti (E_{maks} i EC_{50}) za acetilkolin u prisutnosti tri koncentracije atropina

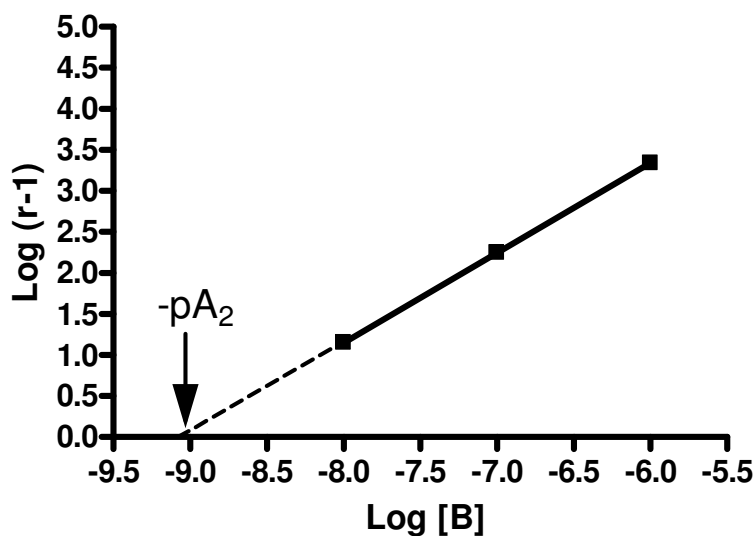
	Acetilkolin	Acetilkolin +atropin ($1\text{E-}8$)	Acetilkolin +atropin ($1\text{E-}7$)	Acetilkolin +atropin ($1\text{E-}6$)
E_{maks}	82	83	83	83
EC_{50}	$3,1 \times 10^{-8}$	$4,7 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-5}$

Farmakodinamički parametar za kompetitivne antagoniste - pA_2 izračunat će se preko Schildove jednadžbe i Schildovog grafa. Vrijednosti koje su pri tome potrebne uvrstit će se u Tablicu 2d.

Tablica 2d. Parametri potrebni za crtanje Schildovog grafa.

	A	A'	A''	A'''
EC₅₀ ACETILKOLINA	$3,1 \times 10^{-8}$	$4,7 \times 10^{-7}$	$5,5 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-5}$
LOG [B] (mol/l)	0	-8	-7	-6
LOG (r-1)	xxx	1,1	2,2	3,3

Legenda: A – acetilkolin; A' – acetilkolin uz atropin ($1E-8$); A'' - acetilkolin uz atropin ($1E-7$);
A''' - acetilkolin uz atropin ($1E-6$)

**Graf 2c.** Schildov graf i vrijednost pA₂ za atropin.

Vrijednost pri kojoj Schildov pravac siječe X os predstavlja -pA₂ za atropin.
pA₂ za atropin = 9,1 (što odgovara vrijednosti -Log 8×10^{-10} mol/l atropina).

Samostalna vježba za studente 2

Vježbu mogu izvoditi dva studenta u paru. Svaki par radi pokus s različitim kombinacijama agonista (acetilkolin, metakolin, histamin, angiotenzin, vazopresin, tetrametilamonij, heksiltrimetilamonij) i antagonista (atropin, mepiramin, heksametonij). Cilj je izračunati pA_2 za svaki ispitivani antagonist u prisutnosti svakog agonista. Na kraju vježbe se zajednički uspoređuju i raspravljaju rezultati.

Postupak 2

- Odaberite agonist te ponovite postupak iz prethodne vježbe kako bi napravili krivulju koncentracija-učinak
- Odaberite antagonist i početnu koncentraciju (npr. 10 nmol/l, tj. $1E-8$ mol/l)
- Ponovite postupak s agonistom u prisutnosti određene koncentracije antagonista
- Ponovite cijeli postupak s još dvije koncentracije antagonista (npr. $1E-7$, $1E-6$)
- U tablicu (radni list II - tablica 1) upišite dobivene vrijednosti te nacrtajte graf (radni list II - graf 1) log koncentracija-učinak za sam agonist te agonist u prisutnosti korištenih koncentracija antagonista (trebate nacrtati četiri krivulje)
- Kako je opisano u prethodnoj vježbi, načinite Lineweaver-Burkov graf (radni list II – graf 2) koristeći podatke koje upišite u tablicu (radni list II – tablica 2)
- Iz grafa 1 ili grafa 2 očitajte vrijednosti za EC_{50} agonista bez antagonista (a) te agonista u kombinaciji s različitim koncentracijama antagonista (A' , A'' i A''') i upišite ih u radni list II -tablica 3)
- Iz dobivenih vrijednosti izračunajte $\text{Log}(r - 1)$ za sve tri koncentracije antagonista
- Nacrtajte schildov graf (Slika 7) te očitajte $-pA_2$ (pravac siječe x os) (radni list II - graf 3).

Ponovite cijeli postupak koristeći različite kombinacije agonista i antagonista. Dobivene vrijednosti za sve ispitivane kombinacije agonista i antagonista upišite u Skupnu tablicu 2. Na osnovu dobivenih vrijednosti za pA_2 i Schildovog grafa raspravite i usporedite afinitete antagonista za različite tipove receptora.

Radni list II – Tablica 2

Tablica 2. Podaci potrebni za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa.

a) agonist: _____

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

*b) agonist: _____ + antagonist _____ (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

*c) agonist: _____ + antagonist _____ (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

*d) agonist: _____ + antagonist _____ (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

*Na prazne crte upišite ispitivane tvari i koncentracije

Radni prostor za računanje:

Radni list II – Tablica 3

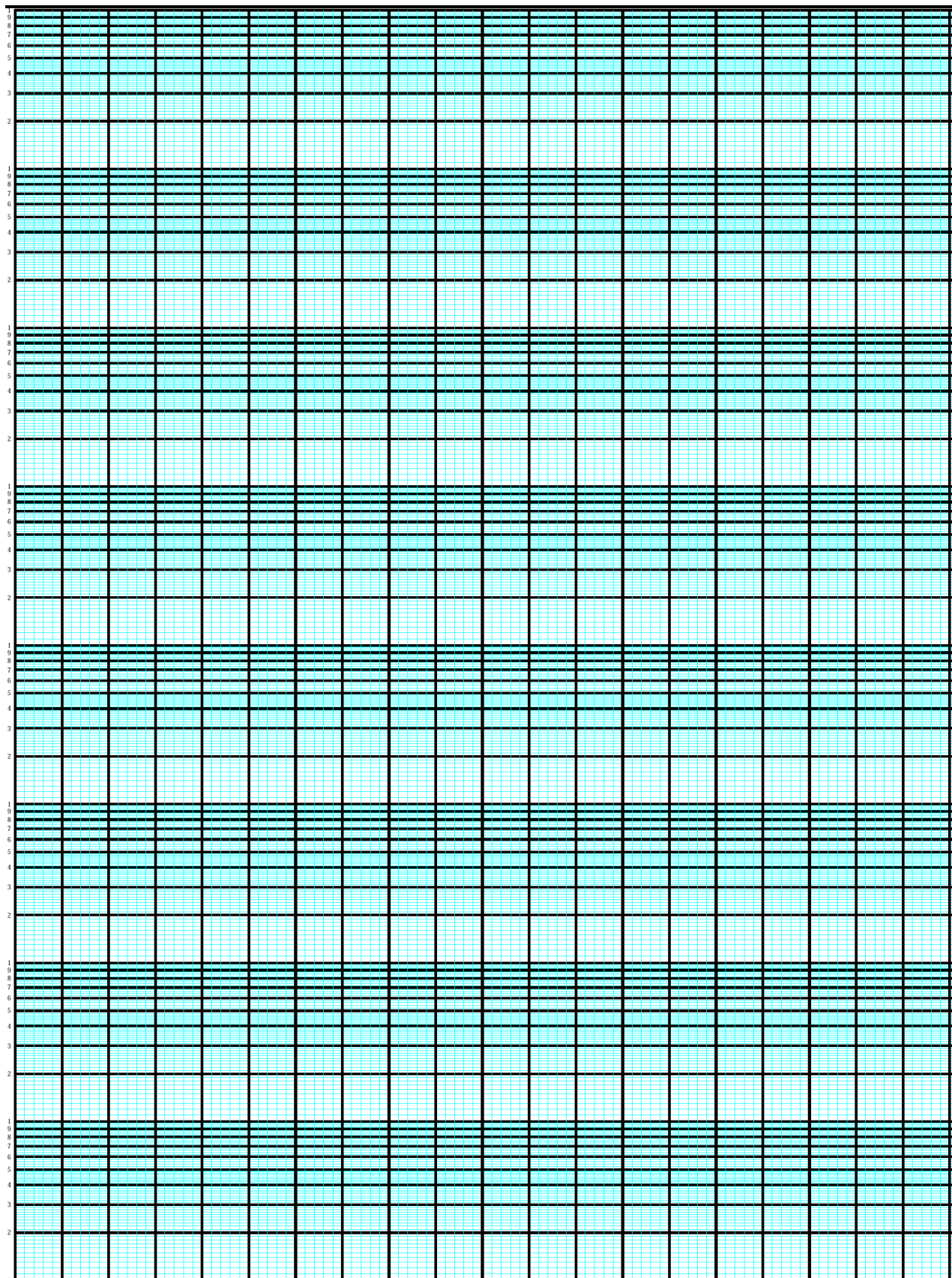
Tablica 3. Podaci potrebni za crtanje Schildovog grafa.

Log [B] ()	EC₅₀ agonista ()	Log (r-1)
-		
1.		
2.		
3.		

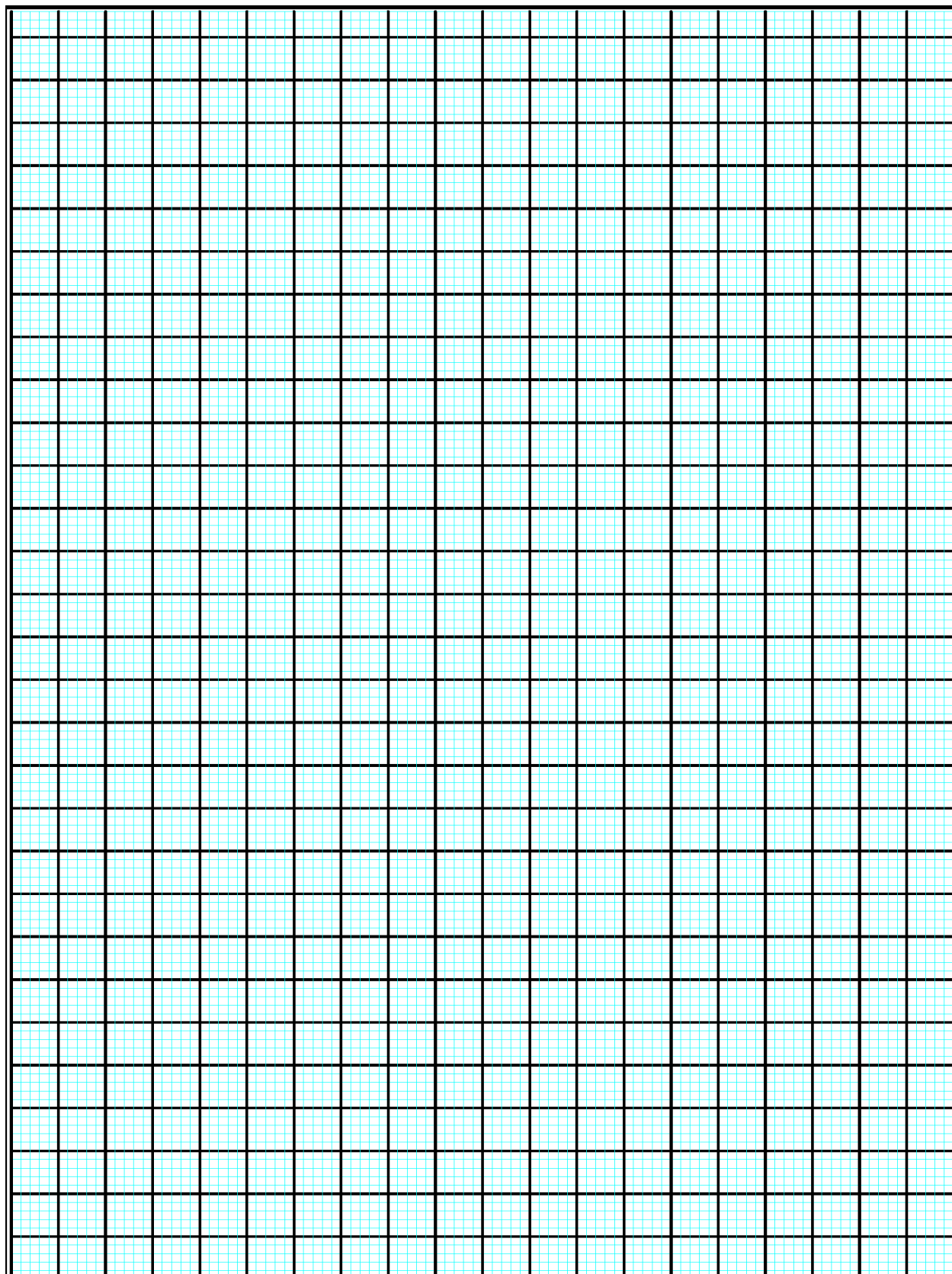
Radni prostor za računanje:

pA₂ () =

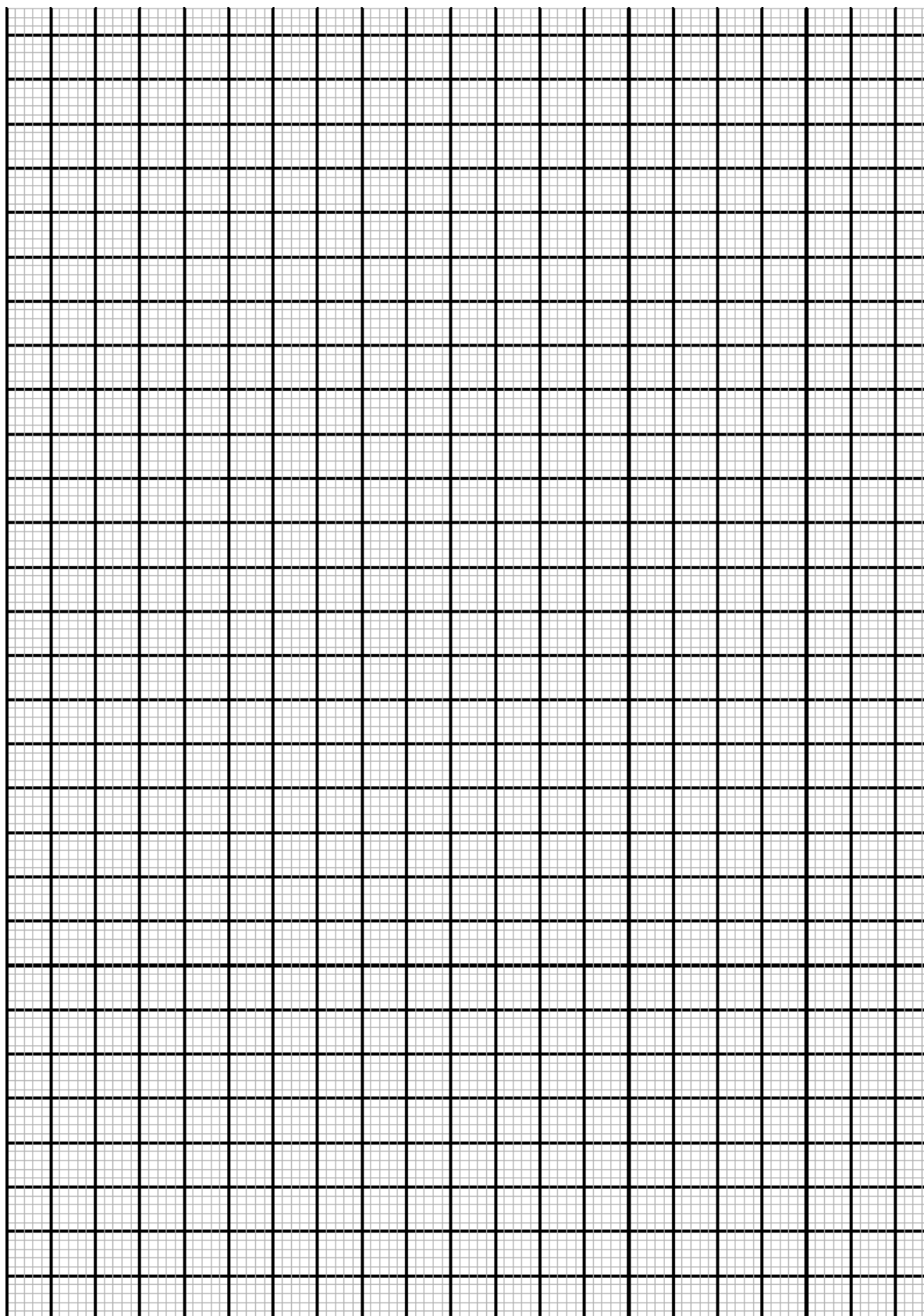
Radni list II – Graf 1. Ovisnost učinka o koncentraciji



Radni list II – Graf 2. Lineweaver-Burkov graf



Radni list II – Graf 3. Schildov graf



Radni list II. – Skupna tablica 2.

Skupna tablica 2. pA_2 za antagoniste u prisutnosti različitih agonista

Agonist	Atropin	Mepiramin	Heksametonij
Acetilkolin			
Karbahol			
Angiotenzin			
Histamin			
Vazopresin			
Metakolin			
Tetrametilamonij			

Teme za raspravu:

Što možete zaključiti iz Lineweaver-Burkovog grafa za agonist u prisutnosti kompetitivnog antagonista: usporedite pravac s Lineweaver-Burkovim grafom za sam agonist?

Usporedite pA_2 atropina za različite agoniste.

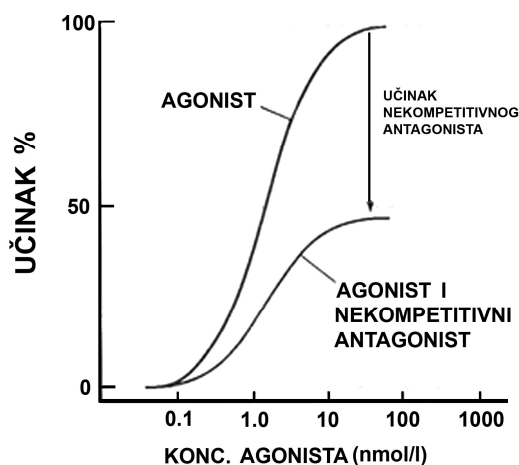
Usporedite pA_2 različitih antagonista u prisutnosti istog agonista.

3. Primjena dviju tvari – farmakodinamička karakterizacija nekompetitivnog antagonista

Stečena znanja i vještine nakon uspješno završene vježbe:

- razumjeti značenje nekompetitivnog antagonista u farmakologiji
- moći izračunati pD'_2 nekompetitivnog antagonista.

Uslijed istovremene primjene agonista i tvari koja se veže za isti receptor na nekompetitivan način, učinak agonista je manji od maksimalnog. Nekompetitivni antagonist se veže ireverzibilno za isto vezno mjesto na receptoru za koje se veže agonist ili na drugo vezno mjesto na receptoru. Nekompetitivni antagonist smanjuje maksimalni učinak agonista, iako se EC_{50} agonista ne mora mijenjati. U prisutnosti nekompetitivnog antagonista, E_{maks} ne može se postići niti pri visokim koncentracijama agonista (Slika 8).¹



Slika 8. Učinak agonista u prisutnosti nekompetitivnog antagonista.

Krivulje Log koncentracija-učinak agonista i agonista u prisustvu nekompetitivnog antagonista nisu paralelne (ne vrijedi Schildova jednadžba) zbog čega nije pouzdan parametar pA_2 .

Za nekompetitivni antagonist uvrđuje se ona koncentracija koja će smanjiti maksimalni učinak agonista za 50% (iz grafa koji prikazuje ovisnost maksimalnog učinka koji se postiže agonistom o koncentraciji nekompetitivnog antagonista). Negativni logaritam te vrijednosti označava se kao pD'_2 .

¹ Važan izuzetak od ovog pravila predstavljaju stanice/tkiva na kojima su prisutni pričuvni receptori (eng. *spare receptors*). U tom je slučaju $EC_{50} \ll K_d$ (koncentracija agonista pri kojoj je ostvareno 50% maksimalnog učinka je značajno manja od koncentracije pri kojoj se agonist vezao na 50% receptora), te male koncentracije nekompetitivnog agonista uzrokuju pomak krivulje Log koncentracije-učinak „prema desno“, uz očuvani maksimalni učinak agonista. Dakle, u ovom slučaju nekompetitivni antagonisti iskazuju svoj učinak nalik kompetitivnom antagonistu (mijenjanju EC_{50} , uz očuvani E_{maks}). Teoretski, pri krajnjem pomaku krivulje „prema desno“, a da je E_{maks} ostao nepromijenjen, nova vrijednost EC_{50} odgovara K_d .

Primjer 3. Farmakodinamička karakterizacija papaverina

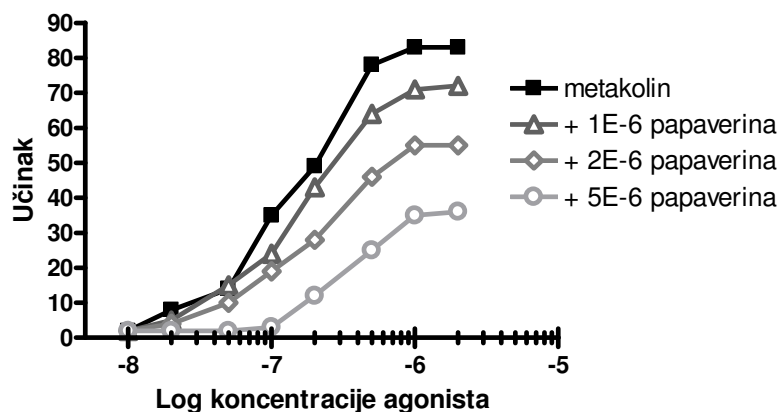
Učinak metakolina ispitivat će se u prisutnosti određene stalne koncentracije antagonista papaverina. Cijeli postupak provodit će se s tri koncentracije papaverina: 1E-6, 2E-6 i 5E-6.

Sada će se u aplikaciji, osim koncentracije metakolina (promjenjiva), odrediti i stalna koncentracija antagonista papaverina (nepromjenjiva). Daljni koraci su isti i provode se kao što to opisuje Postupak 1.

Dobiveni rezultati upisuju se u Tablicu 3a te se vrijednosti ucrtaju na graf Log koncentracija-učinak bez i u prisutnosti određene koncentracije papaverina (Graf 3a).

Tablica 3a. Utjecaj papaverina na učinak metakolina.

Koncentracija (mol/L)	Učinak bez antagonista	Učinak uz papaverin 1E-6	Učinak uz papaverin 2E-6	Učinak uz papaverin 5E-6
1E-8	2	2	2	2
2E-8	8	5	4	2
5E-8	14	15	10	2
1E-7	35	24	19	3
2E-7	49	43	28	12
5E-7	78	64	46	25
1E-6	83	71	55	35
2E-6	83	72	55	36



Graf 3a. Učinak metakolina u prisutnosti različitih koncentracija papaverina.

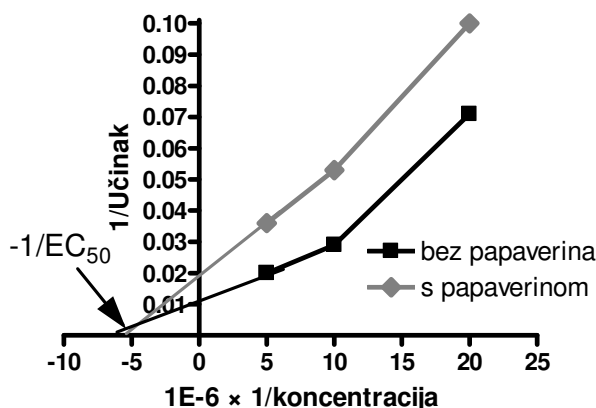
Iz Slike 3a mogu se očitati vrijednosti E_{maks} i EC_{50} metakolina bez i u prisutnosti papaverina (podaci su prikazani u Tablica 3b).

Na isti način kako to opisuje Postupak 1, izračunat će se podaci te nacrtati Lineweaver-Burkov graf.

Tablica 3b. Vrijednosti učinka ovisno o koncentraciji metakolina u prisutnosti papaverina ($2\text{E-}6$) iz aplikacije te prilagođene vrijednosti potrebne za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa.

Koncentracija (mol/L)	Učinak bez papaverina	$10^{-6} \times 1/\text{koncentracija}$	$1/\text{Učinak}$
5E-8	14	20	0,071
1E-7	35	10	0,029
2E-7	49	5	0,020

Koncentracija (mol/L)	Učinak uz papaverin	$10^{-6} \times 1/\text{koncentracija}$	$1/\text{Učinak}$
5E-8	10	20	0,100
1E-7	19	10	0,053
2E-7	28	5	0,036



Graf 3b. Lineweaver-Burkov graf za metakolin u prisutnosti papaverina.

Iz Grafa 3b proizlazi da je u slučaju metakolina:

- sjecište pravca i Y osi na 0,011, iz čega proizlazi da je:
 E_{maks} za metakolin = $1/0,0115 = 86$
- sjecište pravca i X osi je na -6, iz čega proizlazi da je:
 EC_{50} za metakolin = $-1/(-6) \times 10^{-6} = 1,7 \times 10^{-7} \text{ mol/l} = 170 \text{ nmol/l}$.

U slučaju metakolina u prisutnosti papaverina:

- sjecište pravca i Y osi na 0,018, iz čega proizlazi da je:
 E_{maks} za metakolin u prisutnosti papaverina = $1/0,018 = 56$
- sjecište pravca i X osi je na -5, iz čega proizlazi da je:
 EC_{50} za metakolin u prisutnosti papaverina = $-1/(-5) \times 10^{-6} = 2 \times 10^{-7} \text{ mol/l} = 200 \text{ nmol/L}$.

Na isti se način, određivanjem iz Grafa 3a ili računanjem iz Grafa 3b, utvrđuju vrijednosti E_{maks} i EC_{50} metakolina u prisutnosti preostalih koncentracija papaverina ($1\text{E-}6$ i $5\text{E-}6$) (Tablica 3c).

Tablica 3c. Vrijednosti E_{maks} i EC_{50} za metakolin u prisutnosti tri koncentracije papaverina.

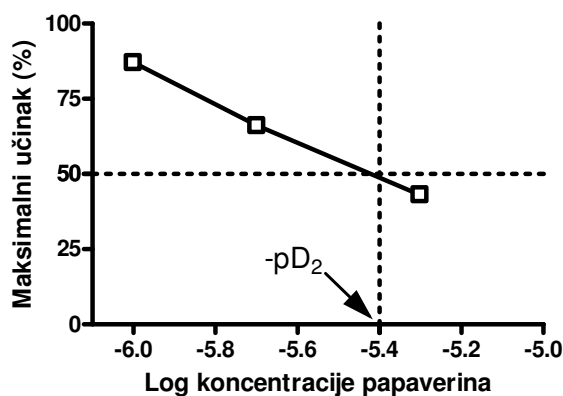
	Metakolin	+ papaverin (1E-6)	+ papaverin (2E-6)	+ papaverin (5E-6)
E_{maks}	83	72	55	36
EC_{50}	$1,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$	2×10^{-7}	3×10^{-7}

Sada je potrebno izraditi novu tablicu, u kojoj se E_{maks} transformira prema postotku (postignuti E_{maks} se podijeli sa E_{maks} ostvarenim nakon primjene samog agonista:

Tablica 3d. Vrijednosti potrebne za grafički određivanje pD'_2 .

	Metakolin	+ papaverin (1E-6)	+ papaverin (2E-6)	+ papaverin (5E-6)
E_{maks} (%)	100	87	66	43

Potrebno je nacrtati graf ovisnosti maksimalnog postignutog učinka metakolina u prisutnosti tri koncentracije papaverina (Slika 3b). pD'_2 papaverina odgovara onoj koncentraciji koja smanji maksimalni učinak metakolina za 50%.

**Graf 3c.** Ovisnost učinka metakolina o primijenjenoj koncentraciji papaverina.

Iz Grafa 3c može se očitati logaritam koncentracije antagonista koja je smanjila E_{maks} agonista za 50%. Negativna vrijednosti predstavlja pD'_2 nekompetitivnog antagonista.

Sukladno tome **pD'_2 za papaverin = 5,4** (što odgovara vrijednosti $-\text{Log } 4 \times 10^{-6}$ mol/l papaverina).

Samostalna vježba za studente 3

Vježbu mogu izvoditi dva studenta u paru. Svaki par radi pokus s različitim kombinacijama agonista (acetilkolin, metakolin, histamin) i antagonistom (papaverin). Na kraju vježbe se zajednički uspoređuju i raspravljaju rezultati.

- Odaberite agonist te ponovite postupak iz prethodne vježbe kako bi napravili krivulju Log koncentracija-učinak
- Odaberite antagonist (papaverin) i početnu koncentraciju (npr. $1 \mu\text{mol/l}$, tj. $1\text{E-}6 \text{ mol/l}$)
- Ponovite postupak s agonistom u prisutnosti početne te još dvije koncentracije antagonista ($2\text{E-}6$, $5\text{E-}6$)
- U tablicu (Radni list III-Tablica 1) upišite dobivene vrijednosti te nacrtajte graf (Radni list III - Graf 1) log koncentracija-učinak za sam agonist te agonist u prisutnosti antagonista (trebate nacrtati četiri krivulje)
- Kako je opisano u prethodnoj vježbi, nacrtajte Lineweaver-Burkov graf (Radni list III – Graf 2) koristeći podatke koje ste upisali u tablicu (Radni list III – Tablica 2)
- Iz Grafa 1 ili Grafa 2 očitajte i izračunajte vrijednosti za E_{maks} agonista bez antagonista i agonista u kombinaciji s različitim koncentracijama antagonista i upišite ih u Radni list III -Tablica 3)
- Transformirajte E_{maks} prema postotku, te nacrtajte graf ovisnosti maksimalnog postignutog učinka agonista u prisutnosti četiri koncentracije papaverina, Graf 3, i odredite pD'_2 .

Ponovite cijeli postupak koristeći različite kombinacije agonista i antagonista. Dobivene vrijednosti za sve ispitivane kombinacije agonista i antagonista upišite u Skupnu tablicu 3.

Radni list III – Tablica 1,2 i 3**Tablica 1.** Podaci potrebni za crtanje grafa Log koncentracija – učinak agonista () u prisustvu kompetitivnog antagonista papaverina.

Koncentracija agonista	Učinak uz antagonist ()	Učinak uz antagonist ()	Učinak uz antagonist ()
1E-			

Tablica 2. Podaci potrebni za crtanje Lineweaver-Burkovog grafa.

a) agonist: _____

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

**b)agonist:* _____ *+ antagonist* (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

**c)agonist:* _____ *+ antagonist* (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

**d)agonist:* _____ *+ antagonist* (_____)

Koncentracija	Učinak	$10^6 \times$ 1/Koncentracija	1/Učinak

**Na prazne crte upišite ispitivane tvari i koncentracije*

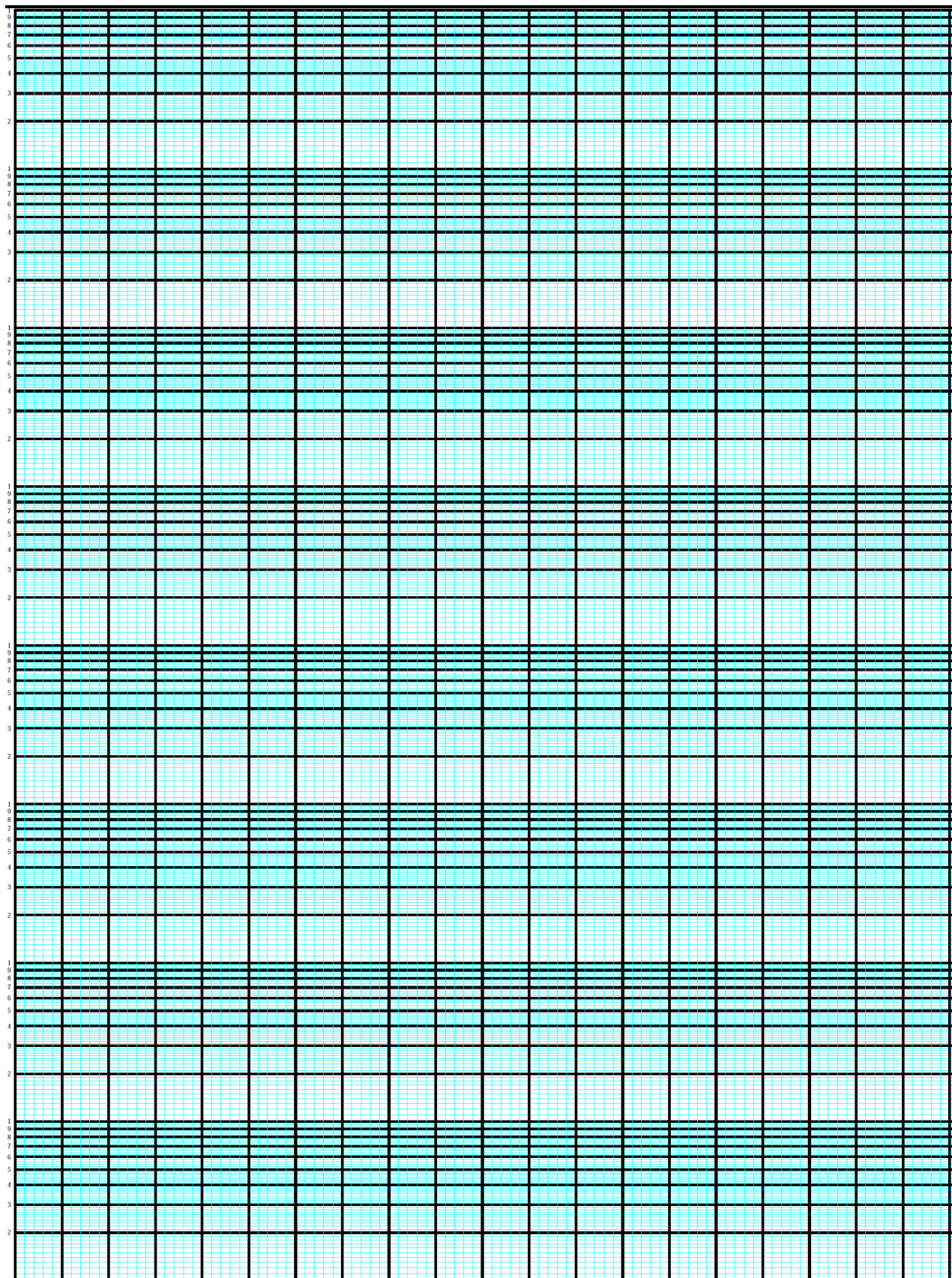
Radni prostor za računanje:

Tablica 3. Podaci potrebni za crtanje Grafa 3.

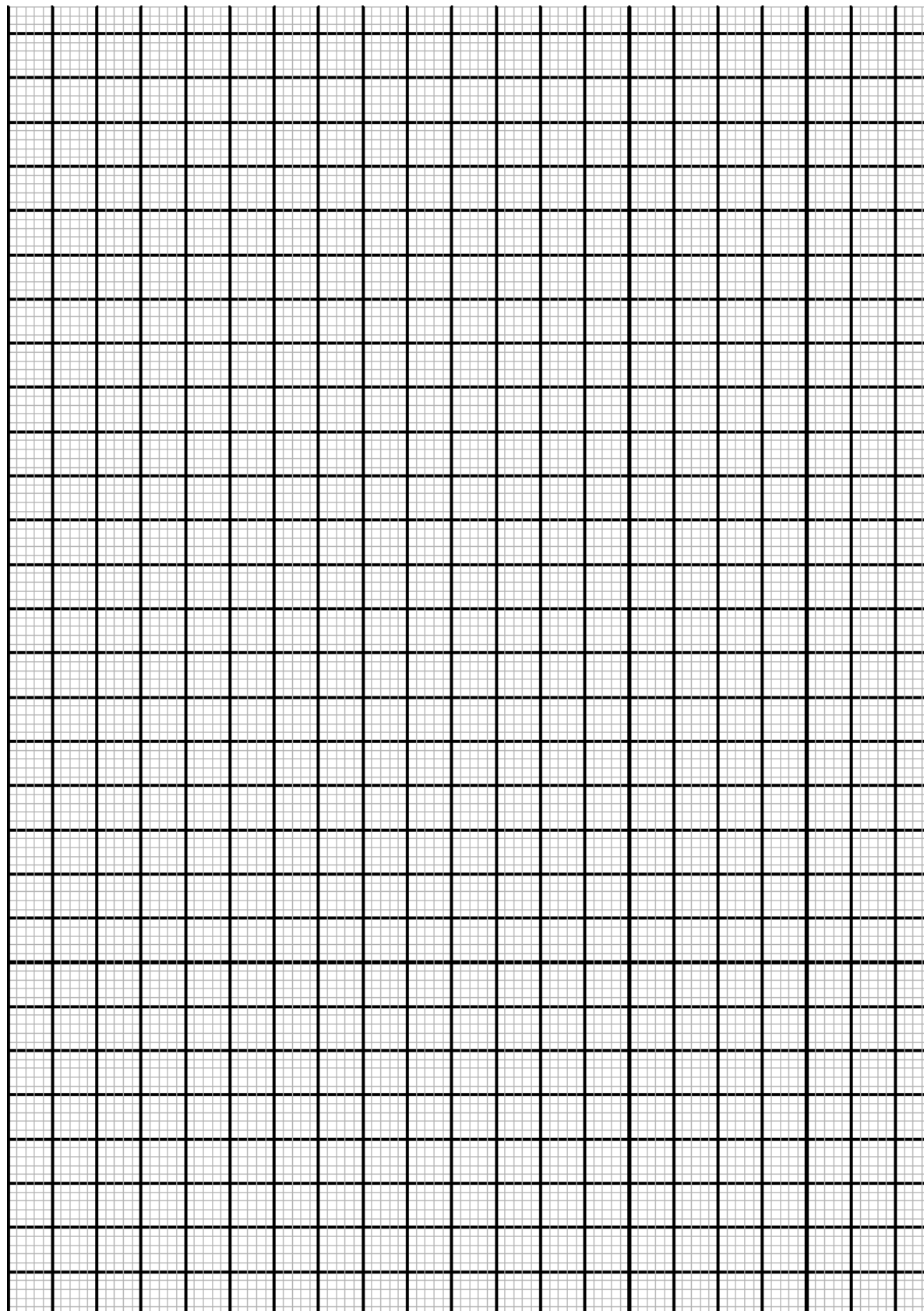
Koncentracija antagonista	E_{maks} agonista ()	E_{maks} agonista (%) ()
Bez antagonista		
1.		
2.		
3.		

Radni prostor za računanje:

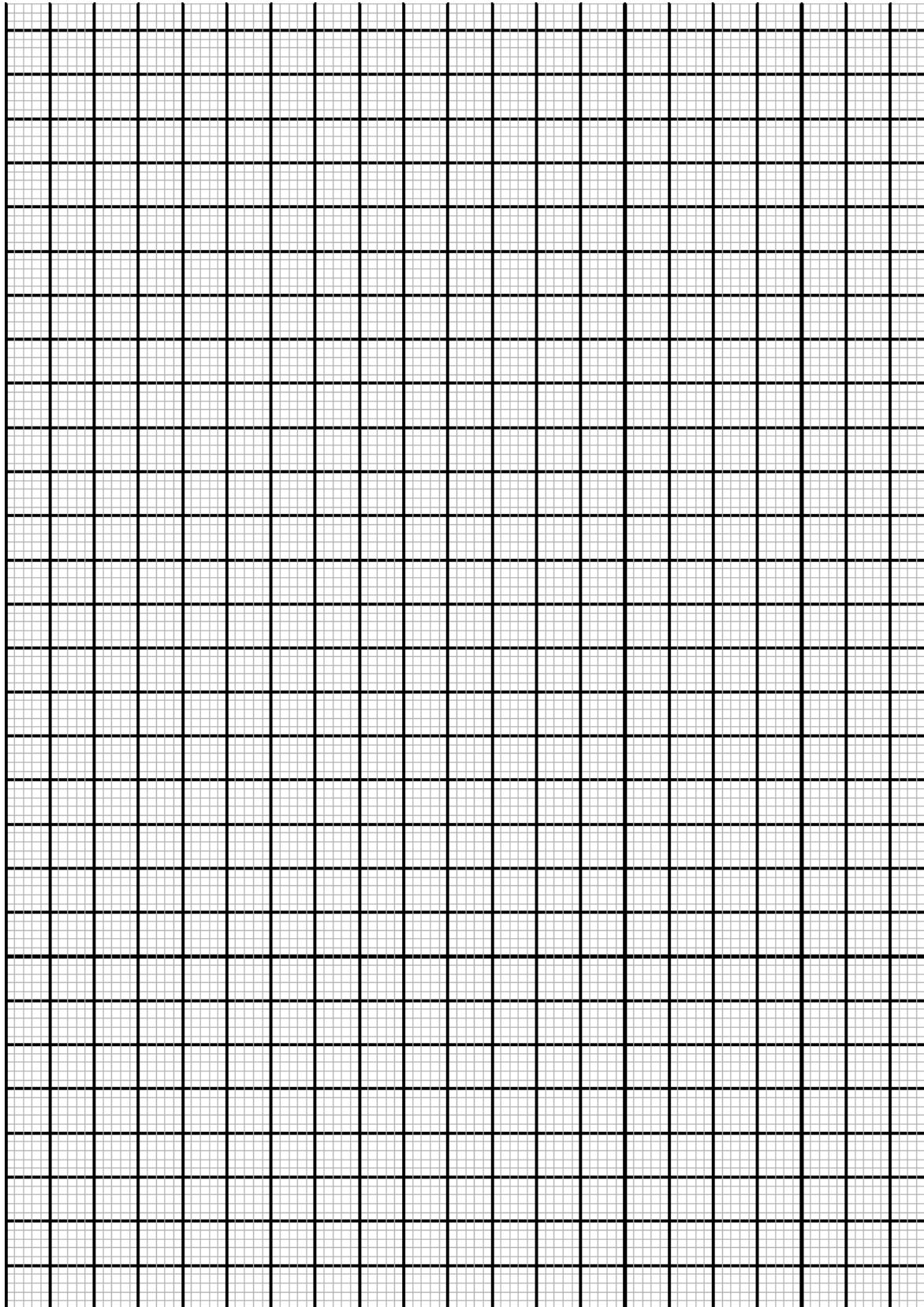
Radni list III – Graf 1. Ovisnost učinka o koncentraciji



Radni list III – Graf 2. Lineweaver-Burkov graf



Radni list III –Graf 3



pD'₂ papaverina = _____

Radni list III – Skupna tablica 3.

Skupna tablica 3. pD'_2 za papaverin u prisutnosti različitih agonista.

Agonist	Papaverin
Acetilkolin	
Karbahol	
Angiotenzin	
Histamin	
Vazopresin	
Metakolin	
Tetrametilamonij	

Teme za raspravu:

Što možete zaključiti iz Lineweaver-Burkovog grafa za agonist u prisutnosti nekompetitivnog antagonista: usporedite pravac s Lineweaver-Burkovim grafom za sam agonist?

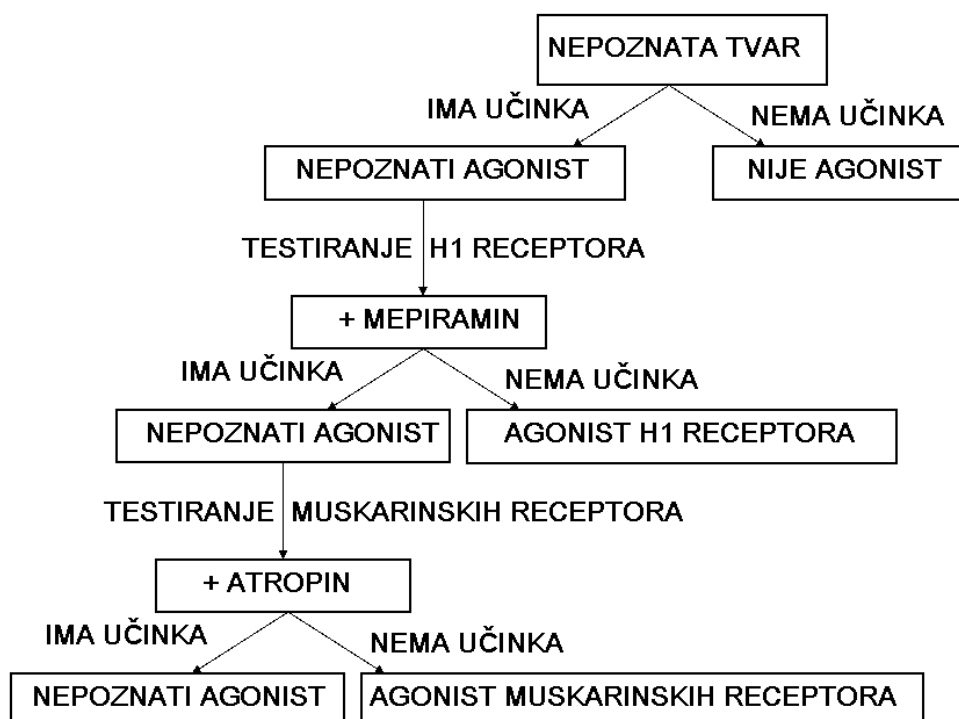
Usporedite pD'_2 papaverina za različite agoniste: što možete zaključiti?

4. Farmakodinamička identifikacija i karakterizacija nepoznatih agonista

Stečena znanja i vještine nakon uspješno završene vježbe:

- moći utvrditi je li nepoznata tvar agonist histaminskih ili kolinergičkih receptora
- znati izračunati osnovne farmakodinamičke parametare za nepoznati agonist (E_{maks} , EC_{50})
- provesti 2×2 bioesej, radi utvrđivanja relativne potentnosti nepoznatog agonista

Prilikom testiranja nepoznate tvari, potrebno je najprije utvrditi da li je u pitanju agonist, tj. da li primjena tvari izaziva određeni biološki učinak, poput kontrakcije glatkog mišićja ileuma. Nakon što se potvrdilo da je u pitanju agonist, potrebno je utvrditi preko aktivacije kojih receptora nepoznata tvar ostvaruje svoj učinak, tj. identificirati receptore za koje se veže nepoznati agonist. Klasični farmakološki pristup je primjena (kompetitivnog) antagonista za određeni receptor i promatranje da li je izostao prije opaženi učinak nepoznatog agonista. Ukoliko učinak nije izostao, primijeni se drugi antagonist, i tako redom. Kada se primjenom određenog antagonista uspije smanjiti ili spriječiti učinak agonista, onda se smatra da je dokazana vrsta receptora kojim nepoznati agonist ostvaruje svoj učinak. Shema postupka identifikacije receptora za kojeg se veže nepoznati agonist je niže prikazana, Slika 9.



Slika 9. Shema postupka identifikacije nepoznate tvari (agonista).

Nakon što se utvrdio mehanizam djelovanja nepoznate tvari, tj. tip receptora za koje se veže nepoznati agonist, potrebno je nacrtati krivulju Log koncentracija-učinak za nepoznati agonist, te je usporediti s krivuljom Log koncentracija-učinak za puni agonist tih receptora (npr. acetilkolin za kolinergičke receptore). Iz navedene krivulje je moguće odrediti vrijednosti E_{maks} i EC_{50} za nepoznati agonist te ih usporediti sa vrijednostima punog agonista. Na taj je način moguće približno odrediti učinkovitost i potentnost nepoznatog agonista, u odnosu na poznati puni agonist.

Ipak, radi utvrđivanja relativne potentnosti nepoznatog agonista, uobičajeno je provesti 2×2 bioesej. Navedeni postupak je uobičajen kada se istražuju tvari nepoznatog, ili vrlo složenog kemijskog sastava, a zasniva se na uspoređivanju farmakološkog odgovora nepoznate (testirane) tvari (primijenjen u dvije koncentracije/doze - **T1** i **T2**) sa poznatim standardom (primijenjen u dvije koncentracije/doze - **S1** i **S2**).

Postoje određena pravila kojih se treba pridržavati prilikom provođenja 2×2 bioeseja:

1. Koncentracije testirane tvari i standarda trebaju izazivati sub-maksimalni učinak (obično <80%) kako bi se zadržala linearnost između Log koncentracije i učinka,
2. Koncentracija T1 treba izazvati približno jednaki učinak kao i S1,
3. Koncentracija T2 se odabire sukladno jednadžbi: $\frac{T2}{T1} = \frac{S2}{S1}$ (često je $S2/S1=2$).

Nakon što su odabrane koncentracije S1, S2, T1 i T2, potrebno je svaku od njih primijeniti 4 puta, a za randomiziranu (nasumičnu) primjenu koristi se Latinski kvadrat:

S1	S2	T1	T2
S2	S1	T2	T1
T1	T2	S1	S2
T2	T1	S2	S1

Nadalje, određuje se aritmetička sredina za učinak nakon primjene S1, S2, T1 i T2 te se zadane vrijednosti crtaju na grafu Log koncentracija-učinak. Kako bi se utvrdila tzv. relativna potentnost i tzv. „vodoravni pomak“, **M**, nepoznatog agonista u odnosu na standard, koriste se slijedeće jednadžbe:

$$M = \frac{T1 - S1 + T2 - S2}{S2 - S1 + T2 - T1} \times \text{Log} \frac{[S2]}{[S1]}$$

$$\text{Relativna potentnost} = \frac{[S1]}{[T1]} \times 10^M$$

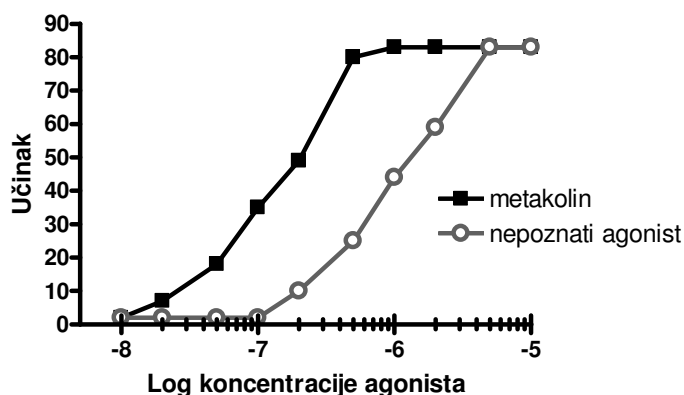
Primjer 4. Farmakodinamička identifikacija i karakterizacija nepoznate tvari

Učinak nepoznate tvari (izmišljeni agonist) će se testirati na izoliranom ileumu. Tvar se primjenjuje u nekoliko koncentracija/doza (npr. $1E-8$, $1E-7$ i $1E-6$). Ukoliko je primjena tvari izazvala učinak (kontrakciju) potrebno je identificirati receptore za koje se veže nepoznati agonist. Radi testiranja histaminskih H_1 receptora, primjenjuje se mepiramin. Nakon primjene antagonista, potrebno je testirati blokadu histaminskih receptora – primjenom histamina, a zatim primijeniti nepoznati agonist u koncentraciji koja izaziva submaksimalni učinak. Kako nije došlo do smanjenja učinka agonista, nisu uključeni histaminski receptori. Nakon ispiranja, nastavljamo pokus s novim antagonistom – atropinom, radi testiranja muskarinskih receptora. Nakon primjene antagonista, potrebno je testirati blokadu muskarinskih receptora – primjenom npr. metakolina, a **zatim** primijeniti nepoznati agonist u koncentraciji koja izaziva submaksimalni učinak. Kako je došlo do značajnog smanjenja učinka agonista, dokazano je da nepoznati agonist ostvaruje svoj učinak vezanjem za muskarinske receptore.

Sada je potrebno, kako opisuje Postupak 1, nacrtati krivulju Log koncentracija-učinak za nepoznati agonist, te je usporediti sa krivuljom Log koncentracija-učinak za puni agonist (metakolin). Dobiveni rezultati upisuju se u Tablicu 4a te se vrijednosti ucrtaju na graf Log koncentracija-učinak (Graf 4a).

Tablica 4a. Učinak nepoznatog agonista u usporedbi s učinkom metakolina.

Koncentracija (mol/L)	Učinak metakolina	Učinak nepoznatog agonista
$1E-8$	2	2
$2E-8$	7	2
$5E-8$	18	2
$1E-7$	35	2
$2E-7$	49	10
$5E-7$	80	25
$1E-6$	83	44
$2E-6$	83	59
$5E-6$	83	83
$1E-5$	83	83
$2E-5$	83	83



Graf 4a. Učinak nepoznatog agonista u usporedbi s učinkom metakolina.

Iz Grafa 4a mogu se očitati vrijednosti E_{maks} i EC_{50} metakolina i nepoznatog agonista. Također je moguće utvrditi da li su dvije krivulje Log koncentracija - učinak međusobno paralelne, što dodatno potvrđuje da nepoznati agonist djeluje preko istih receptora kao i metakolin.

Studenti trebaju sami očitati vrijednosti E_{maks} i EC_{50} metakolina i nepoznatog agonista.

Radi utvrđivanja relativne potentnosti nepoznatog agonista, provesti će se 2×2 bioesej. Potrebno je odabrati koncentracije S1, S2, T1 i T2, sukladno ranije opisanim pravilima. Nakon proučavanja Grafa 4a i vrijednosti u Tablici 4a, odabrali smo slijedeće vrijednosti:

S1 – $1E-7$ metakolina

S2 – $2E-7$ metakolina

T1 – $5E-7$ nepoznatog agonista

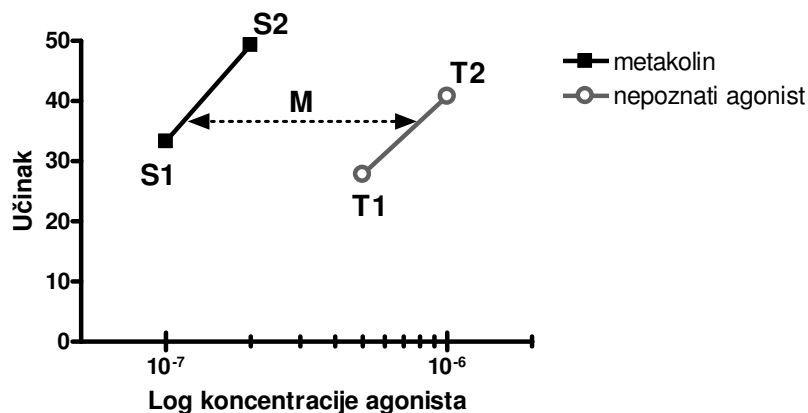
T2 – $1E-6$ nepoznatog agonista

Vrijednosti S1, S2, T1 i T2 koje su odabrane izazivaju približno sličan učinak, u linearnom dijelu grafa Log koncentracija – učinak, a $T2/T1 = S2/S1 = 2$. Sada je potrebno svaku od odabranih koncentracija nasumično primijeniti 4 puta, koristeći Latinski kvadrat, te izračunati aritmetičku vrijednost ($\bar{X}$) učinka za svaku koncentraciju (Tablica 4b).

Tablica 4b. Rezultati 2×2 bioeseja.

	Koncentracija	1. primjena	2. primjena	3. primjena	4. primjena	$\bar{X}$
S1	$1E-7$	29	28	41	35	33,3
S2	$2E-7$	50	53	48	46	49,3
T1	$5E-7$	30	21	33	27	27,8
T2	$1E-6$	38	42	40	43	40,8

Zatim se dobivene vrijednosti $\bar{X}$ crtaju na grafu Log koncentracija-učinak (Graf 4b).



Graf 4b. Grafički prikaz rezultata 2×2 bioeseja.

Kako bi se utvrdila tzv. relativna potentnost i vodoravni pomak, **M**, nepoznatog agonista u odnosu na standard, potrebno je uvrstiti vrijednosti S1, S2, T1 i T2 u jednadžbu:

$$M = \frac{T1 - S1 + T2 - S2}{S2 - S1 + T2 - T1} \times \text{Log} \frac{[S2]}{[S1]}$$

$$M = \frac{27,8 - 33,3 + 40,8 - 49,3}{49,3 - 33,3 + 40,8 - 27,8} \times \text{Log} \frac{2E-7}{1E-7} = -0,483 \times 0,301 = -0,145$$

$$\text{Relativna potentnost} = \frac{[S1]}{[T1]} \times 10^M = 0,2 \times 0,716 = 0,143$$

Iz provedenog bioeseja možemo zaključiti da nepoznati agonist ostvaruje svoj učinak vezanjem na muskarinske receptore i da mu relativna potentnost iznosi 14,3 % u odnosu na metakolin.

Samostalna vježba za studente 4

Vježbu mogu izvoditi dva studenta u paru. Svaki par radi pokus s jednim nepoznatim agonistom (*Unknown* I ili II). Na kraju vježbe se zajednički uspoređuju i raspravljaju rezultati.

- Utvrdite mehanizam djelovanja nepoznatog agonista, tj. tip receptora za koje se veže nepoznati agonist 1 ili 2, primjenjujući antagoniste histaminskih i muskarinskih receptora
- Koristeći Radni list IV-Tablica 1 nacrtajte krivulju Log koncentracija-učinak (Radni list IV-Graf 1) za nepoznati agonist, te je usporedite sa krivuljom Log koncentracija-učinak za puni agonist tih receptora (acetilkolin za muskarinske, a histamin za histaminske receptore)
- Iz navedene krivulje odredite vrijednosti E_{maks} i EC_{50} za nepoznati agonist, te ih usporedite sa vrijednostima punog agonista
- Provedite 2×2 bioesej – odaberite koncentracije S1, S2, T1 i T2
- Primijenite svaku od odabranih koncentracija nasumično 4 puta, koristeći Latinski kvadrat, te izračunajte $\bar{X}$ učinka za svaku koncentraciju (Radni list IV-Tablica 2)
- Dobivene vrijednosti $\bar{X}$ nacrtajte na grafu Log koncentracija-učinak (Radni list IV-Graf 2)
- Uvrstite vrijednosti S1, S2, T1 i T2 u jednadžbu i utvrdite relativnu potentnost i vodoravni pomak, M, nepoznatog agonista (1 ili 2) u odnosu na standard
- Sve dobivene vrijednosti za oba nepoznata agonista upišite u Skupnu tablicu 4.

Radni list IV – Tablica 1

Tablica 1. Podaci potrebni za crtanje grafa Log koncentracija – učinak nepoznatog agonista (___) i punog agonista (_____)

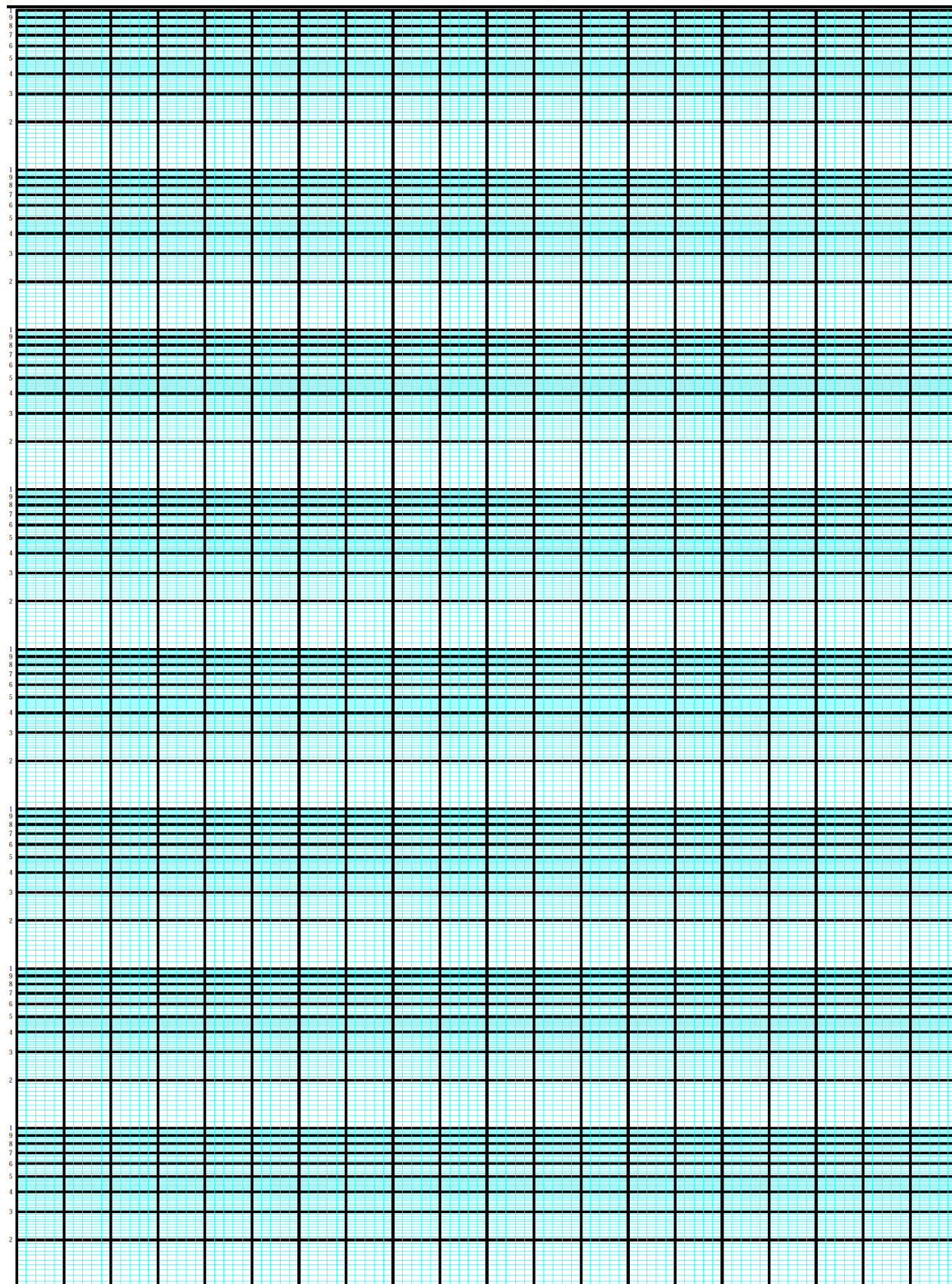
Koncentracija (mol/L)	Učinak nepoznatog agonista	Učinak agonista _____

Nepoznati agonist se veže za _____ receptore.

Puni agonist: E_{maks} _____ EC_{50} _____

Nepoznati agonist ____: E_{maks} _____ EC_{50} _____

Radni list IV – Graf 1. Ovisnost učinka o koncentraciji



Radni list IV – Tablica 2

Tablica 2. Rezultati 2×2 bioeseja nepoznatog agonista (____) i punog agonista (____)

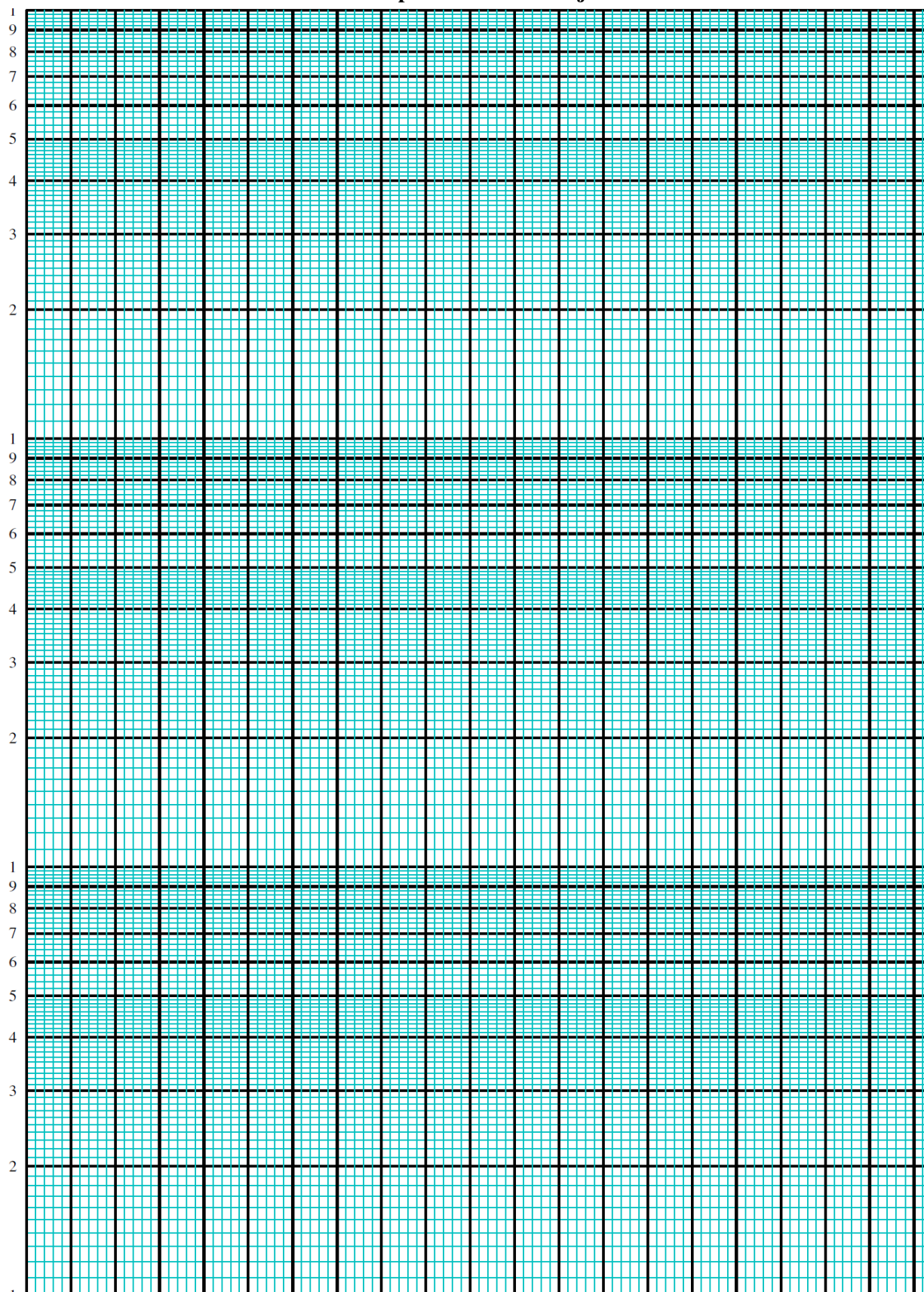
	Koncentracija	1. primjena	2. primjena	3. primjena	4. primjena	$\bar{X}$
S1						
S2						
T1						
T2						

Prostor za računanje:

M =

Relativna potentnost nepoznatog agonista (____) u odnosu na puni agonist (____) =

Radni list IV – Graf 2. Grafički prikaza 2×2 bioeseja



Radni list IV – Skupna tablica 4.

Skupna tablica 4. Informacije o nepoznatim agonistima

	Nepoznati agonist 1	Puni agonist _____receptora	Nepoznati agonist 2	Puni agonist _____receptora
Vrsta receptora		xxx		xxx
EC_{maks}				
EC₅₀				
M		xxx		xxx
Relativna potentnost		xxx		xxx

Teme za raspravu:

Što možete zaključiti iz dobivenih vrijednostima o nepoznatim agonistima?

Raspravite gdje se i zašto primjenjuju bioeseji.

Prilog 1. Agonisti i antagonisti korišteni u vježbi izolirani ileum

Agonisti	Mehanizam djelovanja i osobine
Acetilolin	Neselektivni agonist nikotinskih i muskarinskih kolinergičnih receptora osjetljiv na kolinesterazu
Karbahol	Neselektivni agonist nikotinskih i muskarinskih kolinergičnih receptora neosjetljiv na kolinesterazu
Metakolin	Selektivni agonist muskarinskih kolinergičnih receptora slabo osjetljiv na kolinesterazu
Angiotenzin	Agonist angiotenzinskih AT1 i AT2 receptora
Vazopresin	Agonist vazopresinskih V1 i V2 receptora
Histamin	Neselektivni agonist histaminskih receptora
Tetrametilamonij	Kompetitivni blokator nikotinskih receptora parasimpatičkih i simpatičkih autonomnih ganglija
Heksiltrimetilamonij	Parcijalni agonist muskarinskih receptora
Antagonisti	
atropin	Kompetitivni antagonist muskarinskih receptora
mepiramin	Antagonist histaminskih H1-receptora
heksametonij	Kompetitivni blokator nikotinskih receptora parasimpatičkih i simpatičkih autonomnih ganglija
papaverin	Nekompetitivni inhibitor djelovanja agonista (nespecifični mišićni relaksans)
eserin	Inhibitor kolinesteraze



Modul Farmakokinetika (*Kinetics*)

Darko Modun, Ivana Mudnić, Danijela Budimir, Ana Šešelja Perišin

I. Uvod – osnovni pojmovi i jednadžbe iz farmakokinetike

Klirens (C_L)

Klirens je najvažniji farmakokinetički parametar lijeka i opisuje volumen neke tjelesne tekućine (obično krvi ili plazme) iz koje se, u određenom vremenskom razdoblju, potpuno uklonio (eliminirao) neki lijek. Obično se normalizira prema tjelesnoj masi (tj. m.), npr. klirens nekog lijeka iznosi 5 ml/min po kg tj.m. što iznosi 350 ml/min za osobu tj. mase od 70 kg. Klirens zapravo opisuje sposobnost uklanjanja lijeka iz krvi (plazme) - što je ukupni klirens nekog lijeka VEĆI, on se BRŽE uklanja iz organizma.

Za lijekove koji se eliminiraju kinetikom prvog reda, a tu spada većina lijekova, vrijednost klirensa je konstanta, tj. brzina eliminacije lijeka (V_{ELIM}) se mijenja proporcionalno koncentraciji lijeka u plazmi (C).

$$C_L = \frac{V_{ELIM}}{C} \quad (Jednadžba 1)$$

Uklanjanje nekog lijeka se odvija u različitim organima, od kojih su najznačajniji bubrezi i jetra. Klirensi nekog lijeka u različitim organima se zbrajaju i zajedno predstavljaju ukupni (sistemi) klirens.

$$C_{L\text{ UKUPNI}} = C_{L\text{ BUBREŽNI}} + C_{L\text{ JETRENI}} + C_{L\text{ OSTALI}} \quad (J. 2)$$

Brzinu eliminacije određenog lijeka u nekom organu možemo prikazati kao razliku između onoga što ulazi u taj organ, (protok krvi (Q) u tom organu pomnožen s koncentracijom lijeka u arterijskoj krvi (C_A)) i onoga što izlazi iz njega, (protok krvi u tom organu pomnožen s koncentracijom lijeka u venskoj krvi (C_V)). Ukoliko dobivenu vrijednost brzine eliminacije podijelimo sa koncentracijom lijeka koji se treba eliminirati u tom organu (C_A), izračunat ćemo koliki je klirens tog organa, prema *Jednadžbi 1*. Vrijednost $[(C_A - C_V) / C_A]$ predstavlja omjer ekstrakcije (E) nekog organa, npr. jetre, za određeni lijek.

$$C_{L\text{ ORGANA}} = Q \times \frac{C_A - C_V}{C_A} \quad (J. 3)$$

Za lijek primijenjen intravenski u jednoj dozi moguće je odrediti ukupni klirens podijelivši dozu s površinom ispod krivulje (AUC) koja prikazuje mjerenu koncentraciju lijeka u krvi (plazmi) po jedinici vremena (od 0 do ∞). Prikazana se jednadžba može koristiti i kod oralne primjene lijeka, ukoliko se doza pomnoži s biodostupnosti lijeka (vidjeti niže u tekstu).

$$C_L = \frac{DOZA}{AUC_{0-\infty}} \quad (J. 4)$$

Klirens je ključni parametar u kliničkoj praksi kako bi se odredila brzina primjene lijeka (V_{PRIM}) koja bi održavala željenu koncentraciju lijeka u ravnotežnom stanju (C_{SS}) unutar terapijskog prozora. Prikazana se jednačba može koristiti kod lijeka primijenjenog intravenski ili sa 100%-tnom biodostupnosti (vidjeti niže u tekstu).

$$V_{\text{PRIM}} = C_L \times C_{\text{SS}} \quad (J. 5)$$

Volumen distribucije (V_D)

Volumen distribucije (obujam raspodjele) je drugi temeljni farmakokinetički parametar lijeka i opisuje raspodjelu (distribuciju) lijeka izvan krvi (ili plazme) unutar organizma, a računa se kao omjer doze lijeka i početne koncentracije lijeka u krvi (C_0). Volumen distribucije svojom vrijednosti predstavlja ukupni volumen krvi koji bi bio potreban da bi se cijela količina (doza) primijenjenog lijeka nalazila u krvi.

$$V_D = \frac{\text{DOZA}}{C_0} \quad (J. 6)$$

Ako je volumen distribucije 5 L, onda je potrebno imati 5 litara krvi kako bi se cijela doza lijeka nalazila u krvi, što znači da se taj lijek zadržao u krvi i nije raspodijelio u ostale tekućinske odjeljke u organizmu, poput izvanstanične i unutarstanične tekućine. S druge strane, ako je volumen distribucije nekog lijeka 150 L, onda je potrebno imati 150 litara krvi kako bi se cijela doza lijeka nalazila u krvi, što znači da se taj lijek značajno raspodijelio iz krvi po cijelom organizmu. Kako prosječan čovjek ima 50 – 60 L volumena ukupnih tjelesnih tekućina (uključujući izvanstaničnu i unutarstaničnu), očito je došlo do zadržavanja (sekvstriranja) lijeka u nekom odjeljku (npr. masnom tkivu) pa je izračunati (prividni) volumen distribucije tako velik.

Volumen distribucije je značajan parametar u kliničkoj praksi kako bi se odredila tzv. udarna doza u slučajevima kada je neophodno brzo postići željenu terapijsku koncentraciju lijeka u krvi (C_Z). Prikazana se jednačba može koristiti kod lijeka primijenjenog intravenski ili sa 100 %-tnom biodostupnosti (vidjeti niže u tekstu).

$$\text{DOZA}_{\text{UDARNA}} = V_D \times C_Z \quad (J. 7)$$

Vrijeme polueliminacije ($T_{1/2}$)

Vrijeme polueliminacije (poluvijek) je vrijeme potrebno da se ukupna količina lijeka (ili koncentracija lijeka u krvi/plazmi) smanji za polovicu. U pitanju je derivirani farmakokinetički parametar koji je potpuno ovisan o klirensu i volumenu distribucije nekog lijeka.

$$T_{1/2} = 0,693 \times \frac{V_D}{C_L} \quad (J. 8)$$

Vrijeme polueliminacije nam ukazuje koje je vrijeme potrebno da koncentracija lijeka, nakon početka primjene, dostigne 50% koncentracije ravnotežnog stanja (C_{SS}), odnosno vrijeme potrebno da se koncentracija lijeka smanji za 50% od C_{SS} . Za kliničku je praksu ovaj parametar važan jer je potrebno primjenjivati lijek u trajanju $4 \times T_{1/2}$ kako bi se dosegla njegova željena terapijska koncentracija (94% C_{SS}) te je

potrebno vrijeme od $4 \times T_{1/2}$ nakon posljednje primjene lijeka da se njegova značajna količina (94%) ukloni iz organizma.

Uz vrijeme polueliminacije je (recipročno) povezana konstanta brzine eliminacije (K_E) koja nam ukazuje koliki se postotak lijeka uklanja iz organizma (ili odjeljka) po jedinici vremena. Vrijednost K_E od $0,1 \text{ min}^{-1}$ nam ukazuje da se približno 10% preostale količine lijeka uklanja svake minute iz organizma. Kako se količina preostalog lijeka smanjuje tako se smanjuje i brzina eliminacije lijeka, sukladno *Jednadžbi 1*.

$$K_E = \frac{0,693}{T_{1/2}} = \frac{C_L}{V_D} \quad (J. 9)$$

Iz prikazane jednadžbe je jasno vidljivo da vrijednosti klirensa i volumena distribucije imaju suprotne učinke na K_E i brzinu eliminacije lijeka. Svako smanjenje klirensa će smanjiti brzinu eliminacije lijeka, dok će smanjenje volumena distribucije povećati brzinu eliminacije lijeka (za $T_{1/2}$ vrijedi upravo suprotno). U slučaju paralelne, istosmjerne i jednakovrijedne promjene vrijednosti i klirensa i volumena distribucije nekog lijeka u čovjeku (npr. zbog bolesti), neće nastati bitna promjena K_E i $T_{1/2}$ za taj lijek.

Biodostupnost (F)

Biodostupnost lijeka je postotak (frakcija) primijenjene doze lijeka koji s mjesta primjene uđe u sistemski krvotok. U slučaju intravenske primjene lijeka biodostupnost iznosi 1 (100 %). Kada se lijek drugačije primjenjuje, biodostupnost je obično smanjena, uglavnom uslijed nepotpune apsorpcije lijeka i učinka prvog prolaska kroz jetru (lijek, nakon apsorpcije u želucu i crijevu, putuje portalnim krvotokom i dolazi u jetru koja ga metabolizira te samo frakcija nepromijenjenog lijeka uspije doprijeti u sistemsku cirkulaciju). Biodostupnost lijeka (npr. nakon oralne primjene) se obično određuje pomoću površine ispod krivulje (AUC) koja prikazuje mjerenu koncentraciju lijeka u krvi (plazmi) po jedinici vremena, a uspoređuje se s AUC nakon intravenske primjene.

$$F = \frac{AUC_{\text{ORAL}}}{AUC_{\text{IV}}} \times \frac{DOZA_{\text{IV}}}{DOZA_{\text{ORAL}}} \quad (J. 10)$$

Kao što smo prije naglasili, biodostupnost nekog lijeka je produkt dva čimbenika, postotka doze lijeka koja se apsorbirala iz probavnog trakta u portalni krvotok (f) i postotka doze apsorbiranog lijeka koji dopiše u sistemski krvotok nakon prolaska kroz jetru (F^*). Drugi faktor, F^* je izravno ovisan o jetrenom omjeru ekstrakcije (E_H) nekog lijeka, koji izražava kolika se količina lijeka ukloni u jetri, vidjeti *Jednadžbu 3*.

$$F = f \times F^* = f \times (1 - E_H) \quad (J. 11)$$

Ako uzmemo za primjer lijek X, koji se 90 % apsorbira iz probavnog trakta u portalni krvotok (f) i koji ima jetreni omjer ekstrakcije (E_H) od 0,1, njegova biodostupnost iznosi 81% ($0,9 \times 0,9 = 0,81$). Drugi primjer je npr. morfin, lijek koji se praktično potpuno apsorbira iz probavnog trakta ($f = 1$), ali ima visoki E_H (približno 0,7), zbog čega je njegova biodostupnost oko 30%.

Kako se u kliničkoj praksi vrlo često oralno primjenjuje lijekovi, biodostupnost je parametar koji je neophodan za određivanje racionalnog režima doziranja lijeka,

poput doze održavanja, udarne doze lijeka ili intervala doziranja (τ), s obzirom na željenu koncentraciju lijeka u krvi/plazmi (C_z).

$$DOZA_{ODR\dot{Z}AVANJA} = \frac{C_L \times C_z}{F} \times \tau \quad (J. 12)$$

Ako podijelimo dozu održavanja s intervalom doziranja, izračunati ćemo brzinu primjene lijeka za lijek koji se primjenjuje oralno, sukladno *Jednadžbi 5*.

$$V_{PRIM} = \frac{C_L \times C_z}{F} \quad (J. 13)$$

Permutacija gornjih jednadžbi nam omogućuje računanje prosječne koncentracije lijeka u ravnotežnom stanju (C_{ss}) kada se lijek primjenjuje oralno, s intervalima između 2 primjene.

$$C_{ss} = \frac{F \times DOZA}{C_L \times \tau} \quad (J. 14)$$

Udarne doza za lijek koji se primjenjuje oralno se računa sukladno *Jednadžbi 7*.

$$DOZA_{UDARNA} = \frac{V_D \times C_z}{F} \quad (J. 15)$$

II. *Pristupi analizi farmakokinetičkih podataka*

Postoje dva temeljna pristupa analizi farmakokinetičkih podataka (koncentracije lijeka u krvi/plazmi po jedinici vremena): farmakokinetički modeli s jednim ili više odjeljaka (eng. *compartments*) te analiza bez odjeljaka (engl. *noncompartmental analysis*). Farmakokinetički modeli se koriste kako bi se matematičkim jednadžbama pojednostavljeno opisale promjene koncentracije lijeka u krvi po vremenu. Najčešće se koriste modeli s jednim ili dva odjeljaka, za intravaskularnu ili ekstravaskularnu primjenu lijeka. Za razliku od prije spomenutog, pristup analizi bez odjeljaka ne koristi matematičko modeliranje, može se primijeniti na praktično sve farmakokinetičke podatke te se upravo zbog svoje „robustnosti“ primarno koristi u analizi farmakokinetičkih podataka od strane regulatornih tijela i farmaceutske industrije.

Farmakokinetički modeli

Za detaljan opis svih farmakokinetičkih modela koji se koriste u analizi, čitatelj se upućuje na specijaliziranu stručnu literaturu, navedenu na kraju priručnika. Ovdje će se ukratko prikazati samo najčešće korišteni modeli u analizi farmakokinetičkih podataka, model za intravaskularnu primjenu lijeka s jednim i dva odjeljaka. Farmakokinetički odjeljak zapravo predstavlja kombinaciju različitih tkiva i organa unutar kojeg je postignuta ravnoteža koncentracije lijeka. Broj odjeljaka u modelu se empirijski određuje na temelju semilogaritamskog prikaza koncentracije lijeka u krvi/plazmi po jedinici vremena: ukoliko je pad koncentracije lijeka monofazičan, koristimo jedan odjeljak; ukoliko je pad bifazičan, koristimo dva odjeljaka.

Model za intravaskularnu primjenu lijeka s jednim odjeljkom pretpostavlja da je cijeli organizam homogeni prostor unutar kojeg se lijek ravnomjerno distribuira, te posljedično eliminira. Koncentracija lijeka u određenoj vremenskoj točki (C_t) se računa prema slijedećoj jednadžbi :

$$C_t = C_0 \times e^{-K_E \times t} \quad (J. 16)$$

Vidimo da je koncentracija (C_t) ovisna o vremenu uzorkovanja (t), početnoj koncentraciji lijeka (C_0) te konstanti eliminacije lijeka (K_E). Ova se jednadžba može logaritmirati prirodnim logaritmom pa se dobije slijedeća jednadžba:

$$\ln C_t = \ln C_0 - K_E \times t \quad (J. 17)$$

Ovaj je oblik jednadžbe vrlo praktičan jer predstavlja klasičnu jednadžbu pravca, $Y = aX + b$, gdje je Y (logaritmirana) koncentracija lijeka, X je vrijeme, K_E je nagib pravca (negativnog predznaka), a $\ln C_0$ je odsječak na Y osi. Gornja se jednadžba može konvertirati iz prirodnog u dekadski logaritam, pa se dobije slijedeća jednadžba:

$$\log C_t = \log C_0 - \frac{K_E}{2,303} \times t \quad (J. 18)$$

Važno je napomenuti da su gore opisani osnovni farmakokinetički pojmovi i jednadžbe odnose upravo na model s jednim odjeljkom.

Model za intravaskularnu primjenu lijeka s dva odjeljka pretpostavlja da u organizmu postoje određeni organi i tkiva u koje se lijek značajno sporije distribuira iz krvi/plazme, obično zbog slabije prokrvljenosti – periferni odjeljak, u odnosu na dobro prokrvljene organe i tkiva – centralni odjeljak. Koncentracija lijeka u određenoj vremenskoj točki (C_t) se računa prema slijedećoj jednadžbi :

$$C_t = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t} \quad (J. 19)$$

Nove varijable u gornjoj jednadžbi su A , B , α i β . α je konstanta brzine distribucije, izraz $A \times e^{-\alpha \times t}$ opisuje fazu distribucije (tzv. α fazu), dok je β konstanta brzine eliminacije (post-distribucije), te izraz $B \times e^{-\beta \times t}$ opisuje fazu eliminacije (tzv. β fazu). A i B su empirijske konstante, odsječci na Y osi, te njihov zbroj predstavlja početnu koncentraciju lijeka, C_0 . Računanje i određivanje A , B , α i β , te ostalih, osnovnih farmakokinetičkih parametara u modelu s dva odjeljka je razmjerno složeno i čitatelj se upućuje na specijaliziranu stručnu literaturu.

Analiza bez odjeljaka

Kod ovog pristupa, za određivanje osnovnih farmakokinetičkih parametara, CL , V_D , K_E , $T_{1/2}$ i AUC , potrebno je imati određeni broj pouzdanih vrijednosti koncentracije lijeka (C_1 , C_2 , ... C_x) u vremenskim točkama (t_1 , t_2 , ... t_x). Prvo se određuje K_E , koristeći jednadžbu:

$$K_E = - \frac{\ln(C_2) - \ln(C_1)}{t_2 - t_1} \quad (J. 20)$$

Vrijednost $T_{1/2}$ se može aproksimirati vizualnim pregledom grafa kako bi se utvrdio vremenski interval u kojem se koncentracija lijeka smanjila za 50%, a računski se određuje iz K_E sukladno *Jednadžbi 9* ili koristeći jednadžbu:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\frac{\ln(C_2) - \ln(C_1)}{t_2 - t_1}} \quad (J. 21)$$

Pomoću K_E ćemo izračunati i $\ln C_0$, nakon prilagodbe *Jednadžbe 20*:

$$\ln(C_0) = \ln(C_1) + K_E \times t_1 \quad (J. 22)$$

Sada se može, jednostavnim antilogaritmiranjem, izračunati i C_0 :

$$C_0 = e^{\ln(C_0)} \quad (J. 23)$$

Najvažniji korak u analizi bez odjeljka je određivanje $AUC_{0-\infty}$, za što se najčešće koristi linearna trapezoidna metoda. Ova metoda se koristi na linearnom prikazu, a zasniva se na podjeli ukupne AUC na više manjih segmenata (trapezoida). Ukupna AUC odgovara zbroju površina svih trapezoida, sukladno jednadžbi:

$$AUC_{t1-tx} = \sum \left[\frac{C_n + C_{n+1}}{2} \times (t_{n+1} - t_n) \right] \quad (J. 24)$$

Izračunata je ukupna površina ispod krivulje za vremenske točke u kojima je mjerena koncentracija lijeka, t_1 - t_x . Za izračunati $AUC_{0-\infty}$, potrebno je **AUC_{t1-tx} pridodati AUC_{0-t1} i $AUC_{tx-\infty}$** , koje su određene sukladno jednadžbama:

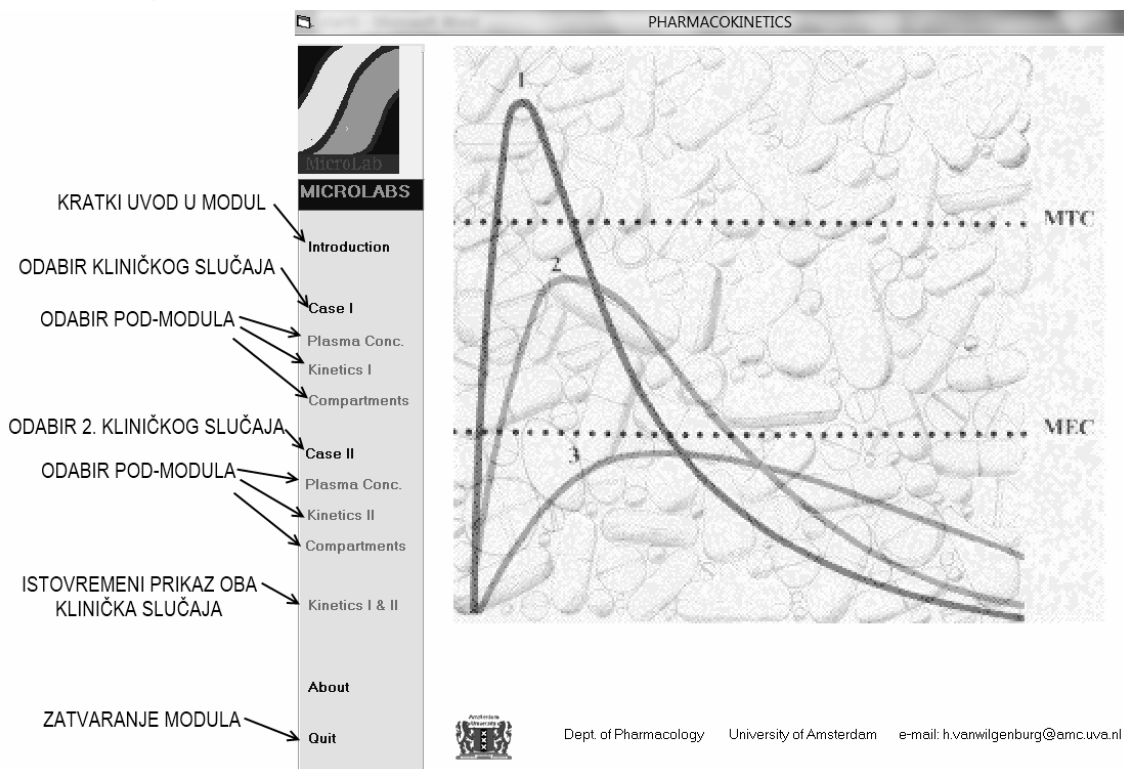
$$AUC_{0-t1} = \frac{C_0 + C_1}{2} \times t_1 \quad (J. 25)$$

$$AUC_{tx-\infty} = \frac{C_{tx}}{K_E} \quad (J. 26)$$

Nakon određivanja $AUC_{0-\infty}$, poznavajući primijenjenu dozu lijeka, moguće je izračunati C_L , koristeći *Jednadžbu 4*, te V_D , koristeći *Jednadžbu 6* ili *Jednadžbu 9*.

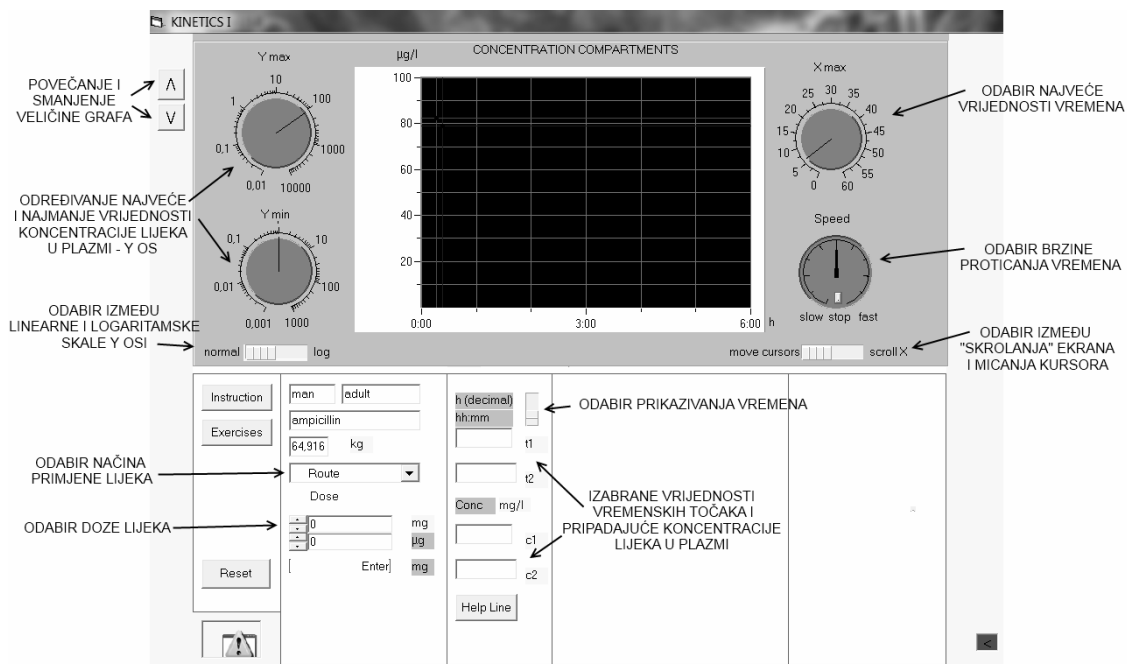
III. Upoznavanje s dijelovima i sučeljima modula „Kinetics“

Nakon odabira modula iz farmakokinetike „Kinetics“ i modela ljudskog organizma „Men“, prikazuje se glavni izbornik modula, u kojem odabiremo klinički slučaj (ili slučajeve) te slijedeće podmodule: „Plasma concentration“ (prikaz koncentracija lijeka u plazmi po vremenu), „Kinetics“ (prikaz grafova koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, s računanjem različitih farmakokinetičkih parametara) te „Compartments“ (prikaz osnovnih farmakokinetičkih parametara za odjeljke organizma koji se koriste za simulaciju grafova koncentracije lijeka u plazmi po vremenu).

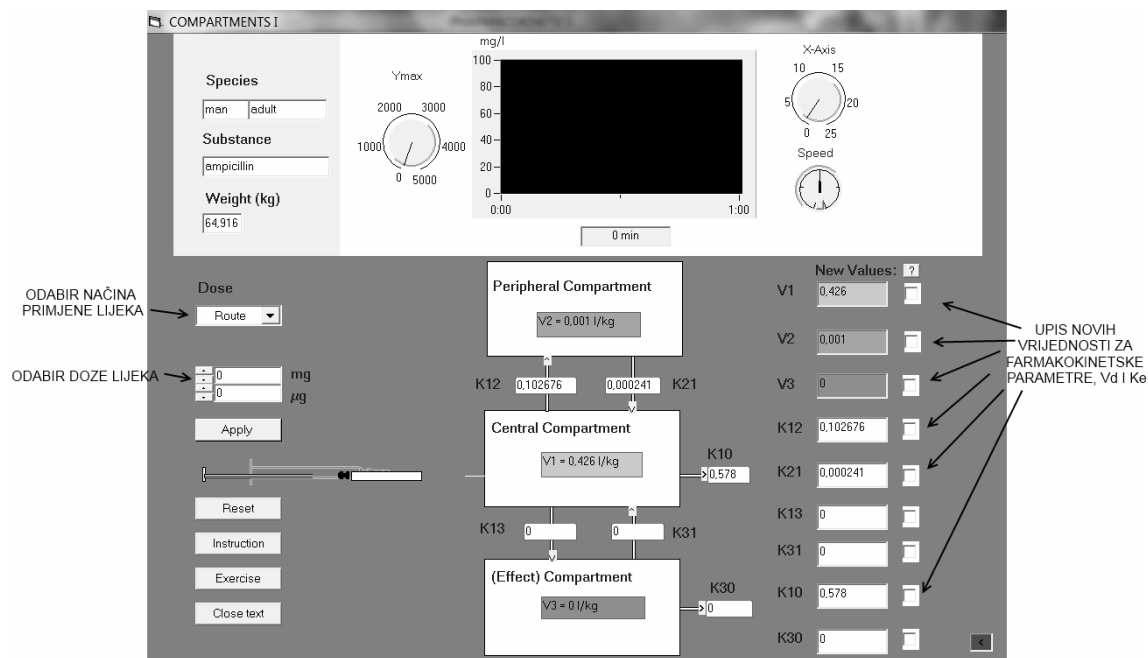


Slika 10. Prikaz glavnog izbornika modula „Kinetics“.

Slika 11. Prikaz podmodula „Plasma concentration“.



Slika 12. Prikaz podmodula „*Kinetics*“.



Slika 13. Prikaz podmodula „*Compartments*“.

IV. Ampicilin – primjer modela s jednim odjeljkom

Ampicilin primijenjen intravenski (bolus)

U glavnom izborniku modula odaberemo 1. klinički slučaj (*Case 1*) „man“ i „ampicillin – gastric pH=2“. Nakon potvrde (*Confirmation*) odabira kliničkog slučaja, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Počet ćemo odabire podmodula „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Najvažnije je ispravno odabrati način primjene lijeka, u ovom slučaju počinjemo sa intravenskom (*i.v.*) primjenom, te odrediti prikladnu dozu za taj način primjene lijeka. Premda je u slučaju ampicilina prikladna doza za *i.v.* primjenu 500 mg, u slijedećem primjeru će se primijeniti doza od 300 mg, kako bi **studenti samostalno izveli vježbu s prikladnom dozom od 500 mg.**

Nakon što smo odabrali dozu od 300 mg i potvrdili je, potrebno je odrediti vremenske točke (T) uzorkovanja krvi radi određivanja koncentracije lijeka (C), npr. 12, 24, 36, 48, 60, 90, 120, 180, 300 i 420 minuta nakon primjene lijeka.

Ako smo sve ispravno izveli, dobili smo tablicu nalik niže prikazanoj:

Ampicilin 300 mg i.v.

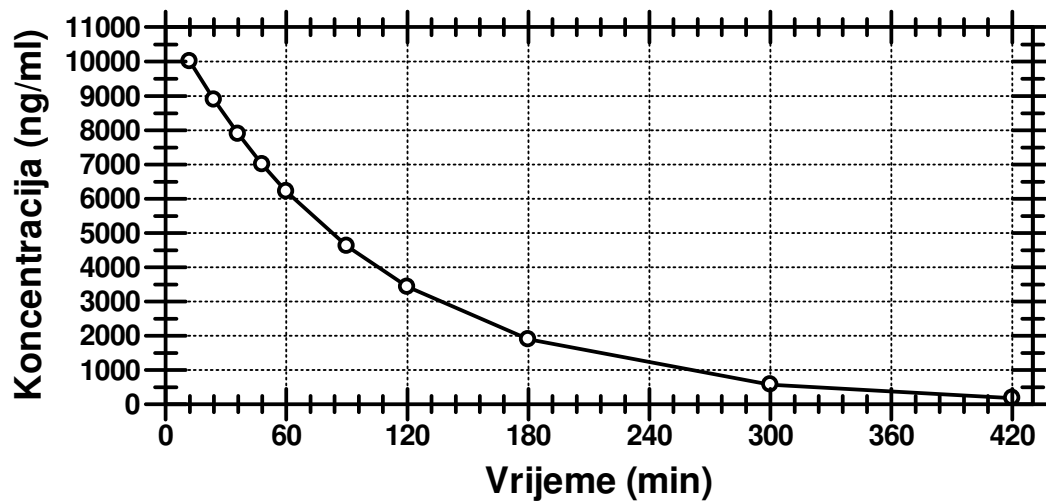
T (min)	C (ng/ml)
12	10008,513
24	8884,523
36	7886,771
48	7001,078
60	6214,858
90	4614,242
120	3425,904
180	1888,638
300	574,212
420	174,802

Ampicilin 500 mg i.v. (ispunjavaju studenti)

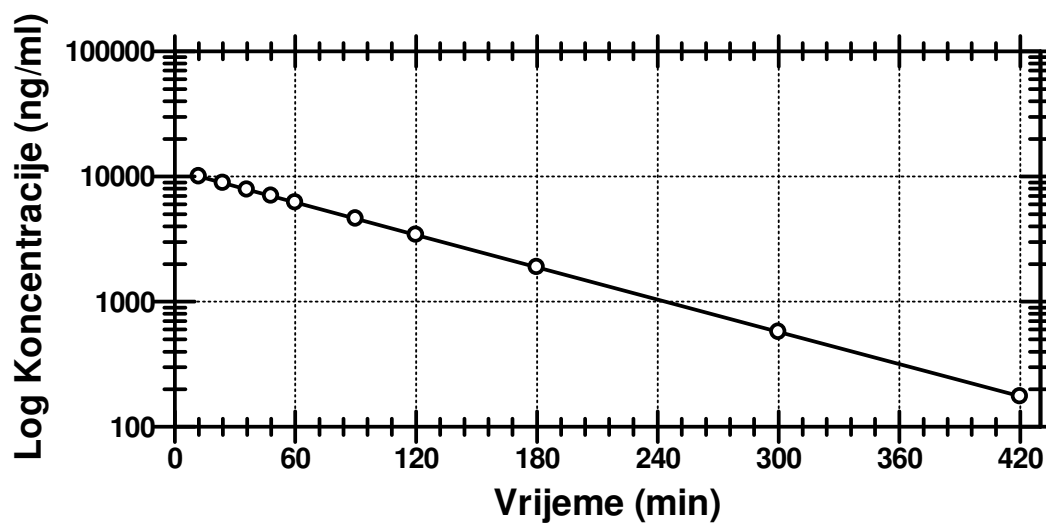
T (min)	C (ng/ml)

Koristeći brojeve iz tablice, nacrtati ćemo osnovni graf iz farmakokinetike, graf koncentracije lijeka (ampicilina) u krvi/plazmi po jedinici vremena. Kako bi utvrdili sve važne informacije iz dobivenih podataka, graf ćemo nacrtati u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Semilogaritamski prikaz (logaritmirana se koncentracija lijeka, C) je koristan kako bi se od krivulje dobio pravac. Na slijedećoj su stranici prikazani grafovi za dozu od 300 mg.

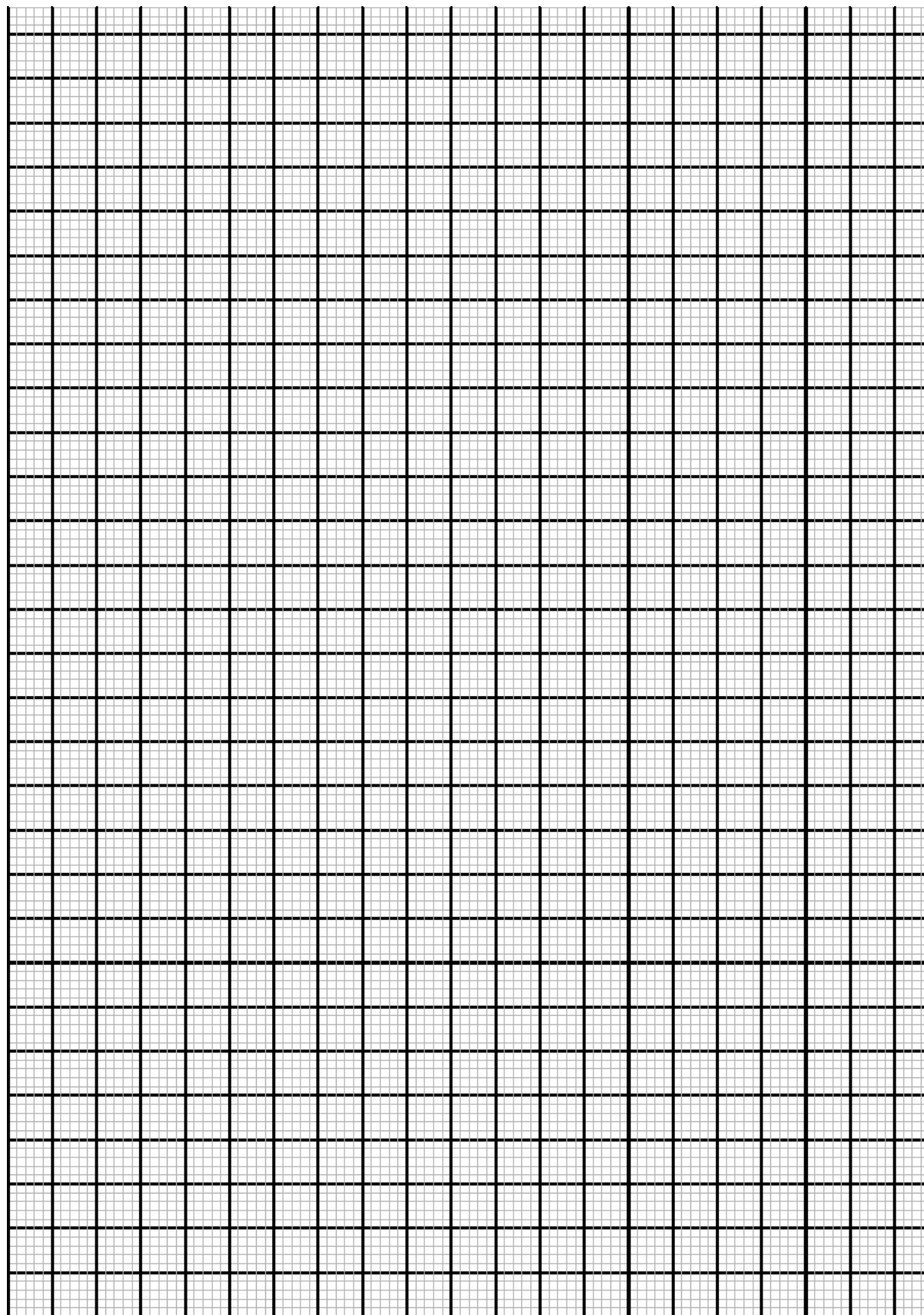
Studenti moraju sami nacrtati grafove na radnim listovima za linearni i semilogaritamski prikaz za dozu od 500 mg.



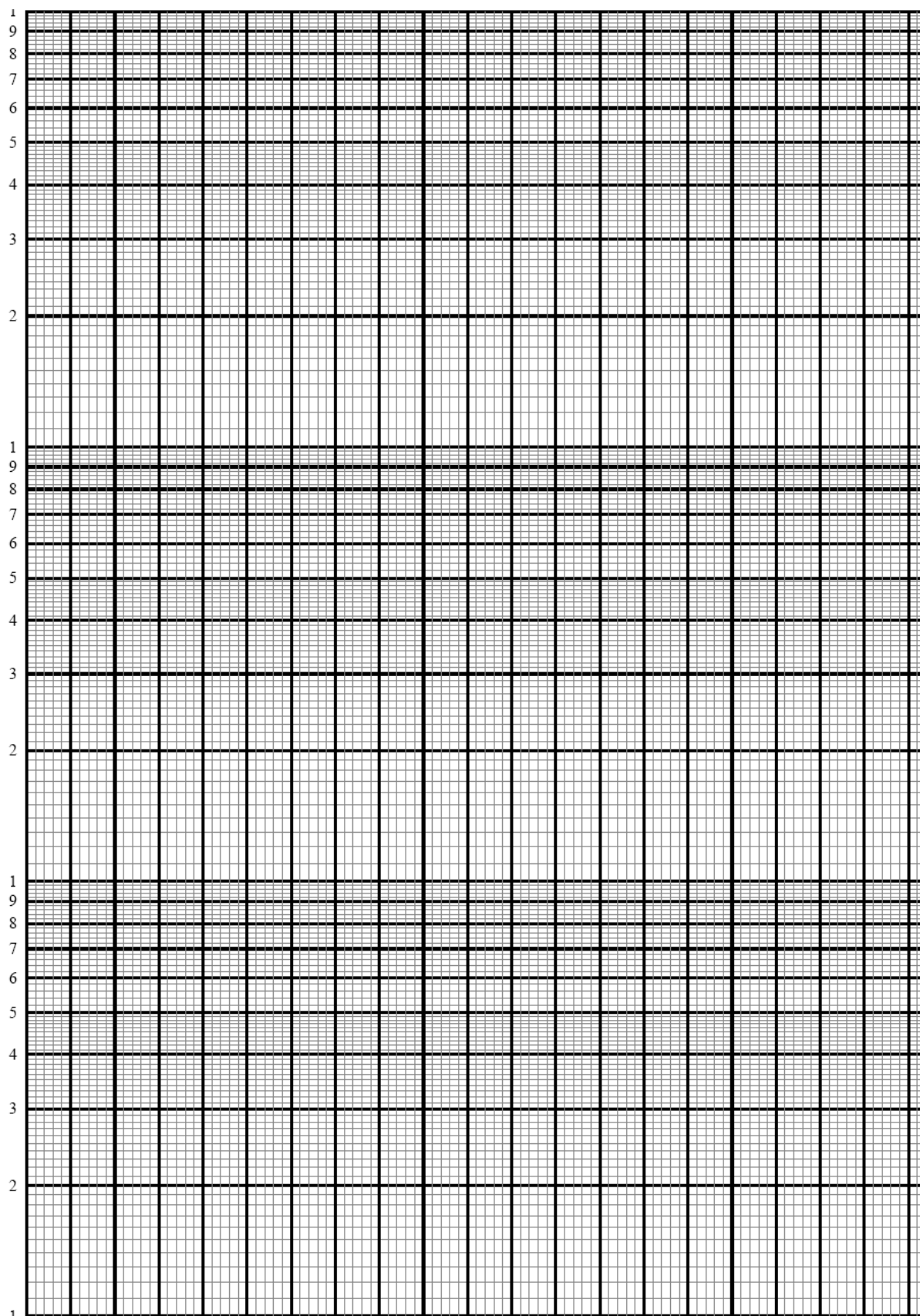
Slika 14. Graf koncentracija lijeka / vrijeme.



Slika 15. Graf logaritma koncentracije lijeka / vrijeme.



Slika 16. Radni list za (linearni) prikaz grafa koncentracija lijeka / vrijeme.

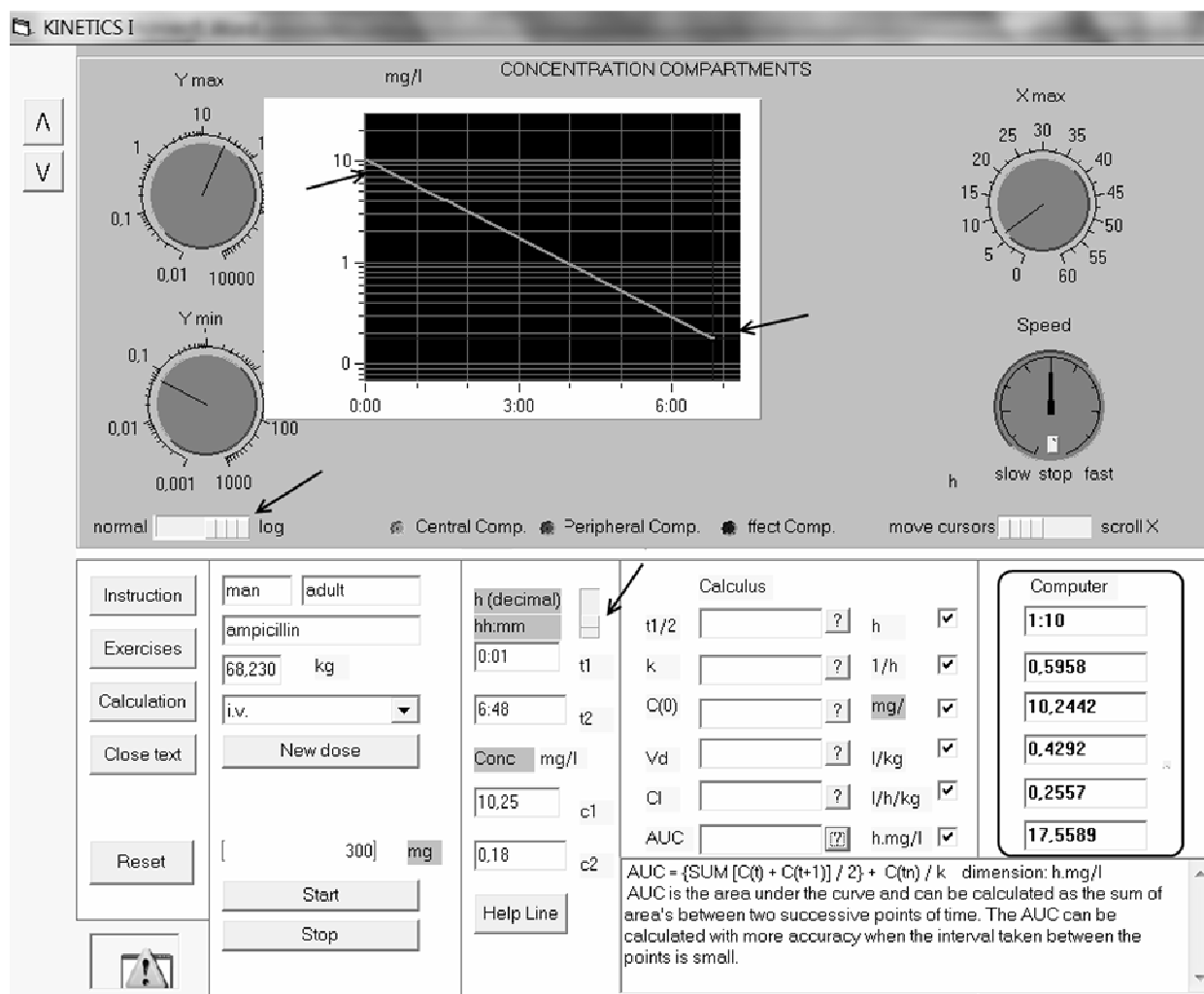


Slika 17. Radni list za (semilogaritamski) prikaz grafa log koncentracije lijeka/vrijeme.

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Analogno prethodno opisanom podmodulu, odabiremo način primjene lijeka (*i.v.*), te određujemo dozu (300 mg). **Studenti će samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom od 500 mg.**

Nakon što smo kliknuli „Start“, počinje se ispisivati zelenom bojom krivulja koncentracije lijeka u plazmi po vremenu. S donjim desnim „okretnim gumbom“ podešavamo brzinu ispisa. Nakon 6-8 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu, koristeći preostala 3 „okretna gumba“ za podešavanje raspona X i Y osi. Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.



Slika 18. Prikaz izračuna farmakokinetičkih parametara pomoću podmodula *Kinetics*.

Pomoću ovog podmodula moguće je **približno** izračunati određene farmakokinetičke parametre. Kako bi to ostvarili, potrebno je u semilogaritamskom prikazu pažljivo kursom postaviti crveni križ na **početak** krivulje i plavi križ na **kraj** krivulje te odabrati decimalni način prikaza vremena. Kada su se dvije „krajnje“ vrijednosti prikazale kao t_1 , t_2 i c_1 , c_2 , možemo pomoću „*Calculus*“ s desne strane

„izračunati“ $T_{1/2}$, K_E , C_0 , V_D , CL i AUC , te provjeriti dobivene vrijednosti s onima koje je računalo izračunao, na temelju odabranih t_1 , t_2 i c_1 , c_2 .

Studenti moraju, koristeći dozu od 500 mg, izračunati vrijednosti navedenih farmakokinetičkih parametara.

$K_E =$ $T_{1/2} =$

$C_0 =$ $V_D =$

$AUC_{0-\infty} =$ $CL =$

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice te 2 grafa koja smo nacrtali, možemo utvrditi tj. izračunati najvažnije farmakokinetičke parametre za ampicilin, primijenjen i.v., poput $T_{1/2}$, K_E , CL , V_D i AUC .

Prvo što možemo uočiti na semilogaritmskom prikazu je da smo dobili monofazični pad koncentracije, što ukazuje da farmakokinetika ampicilina odgovara tzv. modelu s jednim odjeljkom. Iz linearnog i semilogaritmskog prikaza se može aproksimirati koliki je $T_{1/2}$, a ekstrapolacijom pravca na Y os, na semilogaritmskom prikazu, može se pokušati aproksimirati koliki je C_0 .

Ipak, koristeći gore spomenute jednadžbe za analizu bez odjeljka, iz podataka navedenih u tablici, egzaktno ćemo izračunati K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL i V_D .

Sukladno *Jednadžbi 20*, $K_E = - (\ln(C_2) - \ln(C_1)) / (t_2 - t_1) = 0,00992 \text{ min}^{-1} = 0,595 \text{ h}^{-1}$

Sukladno *Jednadžbi 9*, $T_{1/2} = 0,693 / K_E = 69,86 \approx 70 \text{ min} = 1,164 \text{ h}$

Sukladno *Jednadžbi 22*, $\ln(C_0) = \ln(C_1) + K_E \times t_1 = 9,3303$, a antilogaritmiranjem utvrdjemo kako je $C_0 = 11274,5 \text{ ng/ml} = 11,275 \text{ mg/l}$.

Sukladno *Jednadžbi 24*, $AUC_{12-420} = \sum [(C_n + C_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)] = 1017795 \text{ ng/ml} \times \text{min}$.

Sukladno *Jednadžbi 25*, $AUC_{0-12} = (C_0 + C_{12})/2 \times t_1 = 127699 \text{ ng/ml} \times \text{min}$.

Sukladno *Jednadžbi 26*, $AUC_{420-\infty} = C_{420} / K_E = 17618 \text{ ng/ml} \times \text{min}$.

Zbrojivši sve tri gore prikazane AUC , utvrdjemo da je **$AUC_{0-\infty} = 1163113 \text{ ng/ml} \times \text{min}$** .

Sukladno *Jednadžbi 4*, $CL = \text{Doza} / AUC_{0-\infty} = 257,93 \text{ ml/min} = 15,48 \text{ l/h}$.

Sukladno *Jednadžbi 9*, **$V_D = CL / K_E = 26 \text{ l}$** .

Alternativno, sukladno *Jednadžbi 6*, **$V_D = \text{Doza} / C_0 = 26,6 \text{ l}$** .

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze od 500 mg ampicilina, samostalno izračunati K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL i V_D .

$K_E =$

$T_{1/2} =$

$$C_0 =$$

$$AUC_{0-\infty} =$$

$$C_L =$$

$$V_D =$$

Za utvrditi ostale, razmjerno važne farmakokinetičke parametre koristeći analizu bez odjeljka neophodno je, pored $AUC_{0-\infty}$, odrediti i površinu ispod momenta krivulje $AUMC_{0-\infty}$. Određivanje AUMC iz podataka mjerenja, prikazanih u tablici, slično je određivanju AUC, sukladno jednadžbi:

$$AUMC_{t_1-t_x} = \sum \left[\frac{C_n \times t_n + C_{n+1} \times t_{n+1}}{2} \times (t_{n+1} - t_n) \right] \quad (J. 27)$$

Izračunali smo ukupnu površinu ispod momenta krivulje za vremenske točke u kojima smo mjerili koncentraciju lijeka, t_1-t_x . Kako bismo izračunali $AUMC_{0-\infty}$, potrebno je **$AUMC_{t_1-t_x}$ pridodati $AUMC_{0-t_1}$ i $AUMC_{t_x-\infty}$** , koje su izračunate sukladno jednadžbama:

$$AUMC_{0-t_1} = \frac{C_1 \times t_1}{2} \times t_1 \quad (J. 28)$$

$$AUMC_{t_x-\infty} = \frac{C_{t_x} \times t_x}{K_E} + \frac{C_{t_x}}{K_E^2} \quad (J. 29)$$

Nakon što smo odredili $AUMC_{0-\infty}$, možemo izračunati srednje vrijeme zadržavanja, **MRT**, prosječno vrijeme koje lijek provede u organizmu prije eliminacije, koristeći jednadžbu:

$$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}_{0-\infty}}{\text{AUC}_{0-\infty}} \quad (J. 30)$$

Kod intravenske primjene lijeka, MRT je u izravnom odnosu sa dva značajna farmakokinetička parametra, K_E i V_D (u ravnotežnom stanju):

$$K_E = 1 / \text{MRT}; V_D = \text{MRT} \times \text{CL}$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze od 500 mg ampicilina, samostalno izračunati $\text{AUMC}_{0-\infty}$ i MRT, te izračunati vrijednosti K_E i V_D pomoću MRT.

$$\text{AUMC}_{0-\infty} =$$

$$\text{MRT} =$$

$$K_E =$$

$$V_D =$$

Ampicilin primijenjen *per os*

U glavnom izborniku modula odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „ampicillin – gastric pH = 2“. Nakon potvrde (*Confirmation*) odabira kliničkog slučaja, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Potrebno je odabrati oralni način primjene lijeka (*per os*) te odrediti prikladnu dozu za taj način primjene lijeka. Premda je u slučaju ampicilina prikladna doza 500 mg, u slijedećem primjeru će se primijeniti doza od 300 mg, kako bi **studenti samostalno izveli vježbu s prikladnom dozom od 500 mg.**

Nakon što smo odabrali dozu od 300 mg i potvrdili je, potrebno je odrediti vremenske točke (T) za uzorkovanja krvi radi određivanja koncentracije lijeka (C), npr. 12, 24, 36, 48, 60, 90, 120, 180, 300 i 420 minuta nakon primjene lijeka.

Ako smo sve ispravno izveli, dobili smo tablicu nalik dolje prikazanoj:

Ampicilin 300 mg *per os*

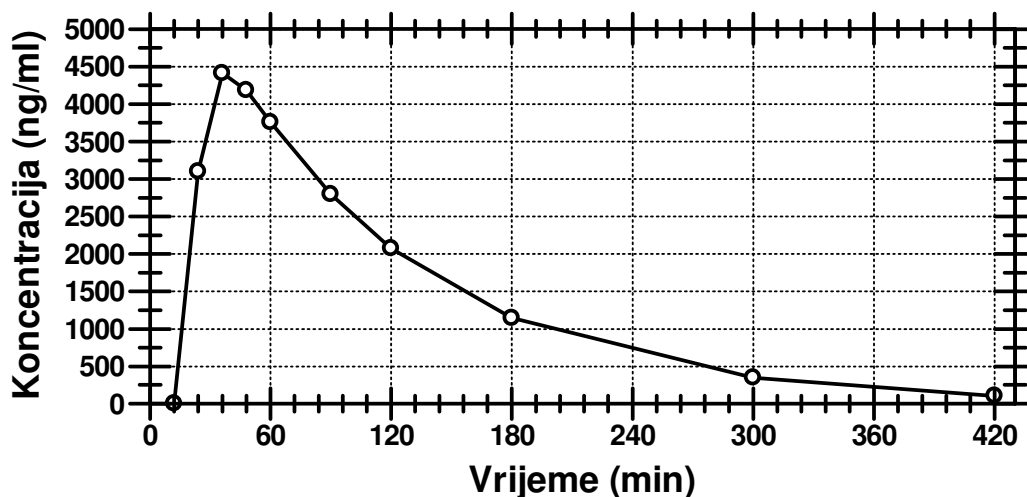
T (min)	C (ng/ml)
12	0
24	3096,403
36	4411,033
48	4181,639
60	3754,589
90	2794,436
120	2074,815
180	1143,774
300	347,703
420	105,812

Ampicilin 500 mg *per os* (ispunjavaju studenti)

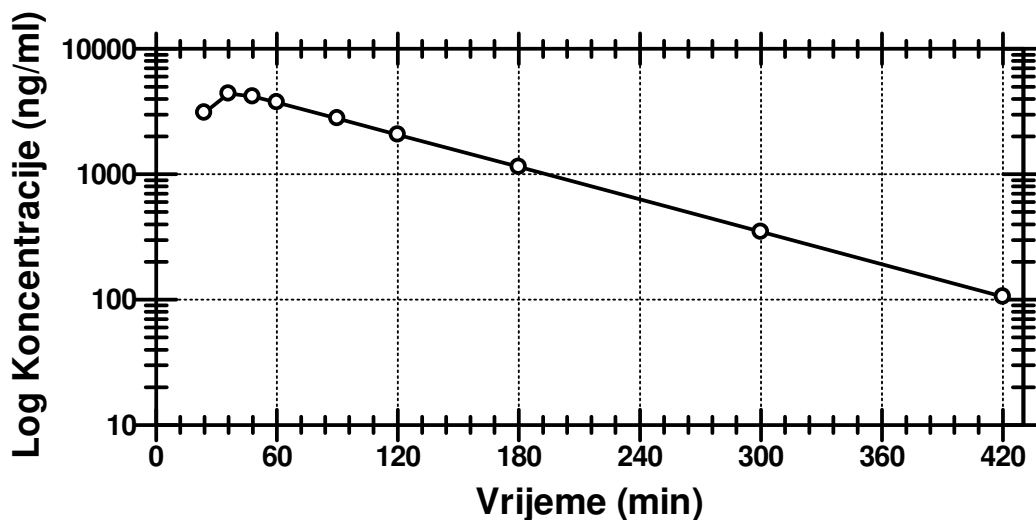
T (min)	C (ng/ml)

Koristeći brojeve iz tablice, nacrtati ćemo graf koncentracije lijeka (ampicilina) u krvi/plazmi po jedinici vremena. Kako bi utvrdili sve važne informacije iz dobivenih podataka, graf ćemo nacrtati u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Semilogaritamski prikaz (logaritmirana se koncentracija lijeka, C) je koristan kako bi se od krivulje dobio pravac. Na slijedećoj su stranici prikazani grafovi za dozu od 300 mg.

Studenti moraju sami nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 16 i Slika 17) za dozu od 500 mg.



Slika 19. Graf koncentracija lijeka / vrijeme.



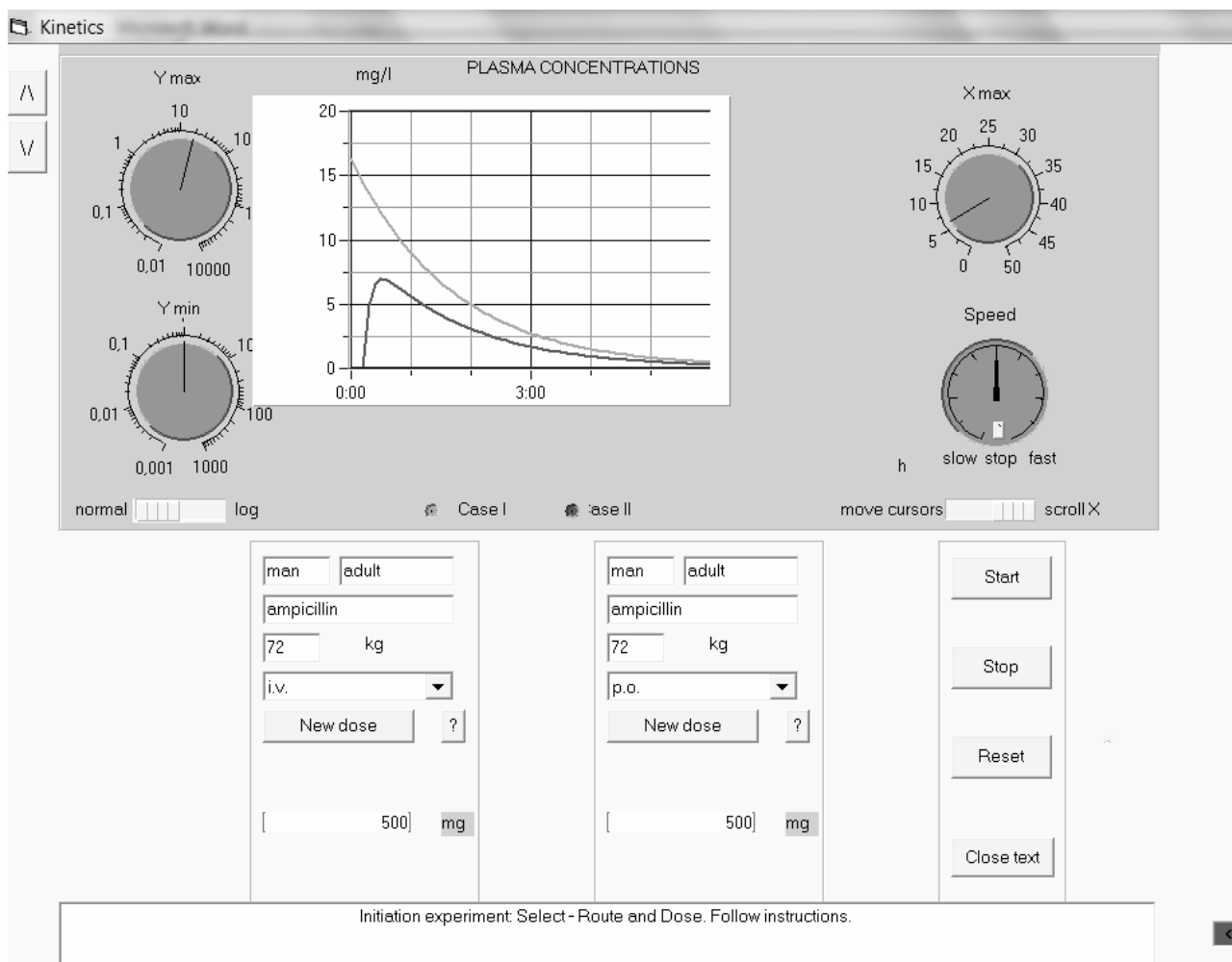
Slika 20. Graf logaritma koncentracije lijeka / vrijeme.

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Sukladno prethodno opisanim podmodulom, odabiremo način primjene lijeka (*per os*) te određujemo dozu. Nakon što smo kliknuli „Start“, počinje se ispisivati zelenom bojom krivulja koncentracije lijeka u plazmi po vremenu. S donjim desnim „okretnim gumbom“ podešavamo brzinu ispisa. Nakon 6-8 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu, koristeći preostala 3 „okretna gumba“ za podešavanje raspona X i Y osi.

Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

Kako bismo najlakše vizualno međusobno usporedili dva klinička slučaja, koristimo podmodul *Kinetics I & II*.



Slika 21. Prikaz krivulja koncentracije lijeka po vremenu za dva klinička slučaja.

U ovom podmodulu, odabiremo način primjene lijeka za dva slučaja (i.v. nasuprot *per os*) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja.

Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima za i.v. i *per os* primjenu? Zašto?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice te 2 grafa koja smo nacrtali, možemo utvrditi tj. izračunati za ampicilin, primijenjen *per os*, nama već poznate farmakokinetičke parametre, poput $T_{1/2}$, K_E i AUC , zatim klirens i volumen distribucije normalizirane prema biodostupnosti, CL/F , V_D/F te nove parametre koje nismo imali kod i.v. primjene: C_{maks} (maksimalna tj. vršna koncentracija lijeka) i T_{maks} (vrijeme kada se dosegla C_{maks}). T_{maks} odgovara vremenu kada se izjednačila brzina apsorpcije i eliminacije lijeka. Za oralnu je primjenu lijeka $C_0 = 0$.

Možemo uočiti na semilogaritmskom prikazu da smo, nakon početnog rasta, dobili monofazični pad koncentracije lijeka. Potrebno je izabrati 2 vremenske točke u tom monofazičnom padu za određivanje K_E . Iz linearnog prikaza i tablice može se utvrditi C_{maks} i T_{maks} te aproksimirati koliki je $T_{1/2}$. Za određivanje farmakokinetičkih parametara koristimo ove jednadžbe:

$$K_E = (\ln(C_2) - \ln(C_1)) / (t_2 - t_1)$$

$$T_{1/2} = 0,693 / K_E$$

$$AUC_{12-420} = \sum[(C_n + C_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)]$$

$$AUC_{0-12} = (C_0 + C_{12})/2 \times t_1$$

$$AUC_{420-\infty} = C_{420} / K_E$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{12-420} + AUC_{0-12} + AUC_{420-\infty}$$

$$CL = F \times \text{Doza} / AUC_{0-\infty} \Rightarrow CL/F = \text{Doza} / AUC_{0-\infty}$$

$$V_D/F = CL/F / K_E$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze od 500 mg ampicilina, samostalno izračunati C_{maks} , T_{maks} , K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F .

Kako za ampicilin imamo vrijednosti farmakokinetičkih parametara za i.v. primjenu, studenti moraju izračunati i njegovu apsolutnu biodostupnost, F , prema *Jednadžbi 10*.

$$C_{maks} =$$

$$T_{maks} =$$

$$K_E =$$

$$T_{1/2} =$$

$$AUC_{0-\infty} =$$

$$C_L/F =$$

$$V_D/F =$$

$$F =$$

Za utvrditi ostale važne farmakokinetičke parametre koristeći analizu bez odjeljka, potrebno je prvo odrediti površinu ispod momenta krivulje, $AUMC_{0-\infty}$, i srednje vrijeme zadržavanja, **MRT**, za oralnu primjenu lijeka.

$$AUMC_{t1-tx} = \sum [(C_n \times t_n + C_{n+1} \times t_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)]$$

$$AUMC_{0-t1} = (C_1 \times t_1)/2 \times t_1$$

$$AUMC_{tx-\infty} = (C_{tx} \times t_x) / K_E + C_{tx} / K_E^2$$

$$MRT = AUMC_{0-\infty} / AUC_{0-\infty}$$

Ukoliko poznajemo srednje vrijeme zadržavanja lijeka za intravensku (MRT_{IV}) i oralnu primjenu (MRT_{ORAL}), moguće je izračunati srednje vrijeme apsorpcije lijeka, **MAT**, prosječno vrijeme potrebno lijeku da uđe u krv iz probavnog trakta nakon oralne primjene:

$$MAT = MRT_{ORAL} - MRT_{IV} \quad (J. 31)$$

Konstanta brzine apsorpcije, **K_A**, koja nam ukazuje koliki se postotak lijeka apsorbira iz probavnog trakta u sistemska cirkulaciju po jedinici vremena, može se izračunati pomoću MAT:

$$K_A = \frac{1}{MAT} \quad (J. 32)$$

Pomoću vrijednosti K_A i K_E moguće je izračunati i teoretsku vrijednost T_{maks} :

$$T_{maks} = \frac{\ln \frac{K_A}{K_E}}{K_A - K_E} \quad (J. 33)$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon oralne primjene doze od 500 mg ampicilina, samostalno izračunati $AUMC_{0-\infty}$ i MRT te, koristeći vrijednosti MRT za intravensku primjenu, izračunati MAT, K_A i T_{maks} .

$$AUMC_{0-\infty} =$$

$$MRT =$$

$$MAT =$$

$$K_A =$$

$$T_{maks} =$$

Ampicilin primijenjen pri smanjenoj apsorpciji

Vrijednosti farmakokinetičkih parametara za ampicilin, primijenjen i.v. i *per os*, koje su studenti izračunali u prethodnom dijelu, predstavljaju **referentne vrijednosti** s kojima će se uspoređivati parametri koje ćemo izračunati u ovom dijelu, kada je izmijenjena apsorpcija (ili eliminacija) lijeka. Za detaljan opis svih mogućih uzroka izmijenjene apsorpcije i eliminacije lijeka (npr. komedikacija, komorbiditet i sl), čitatelj se upućuje na specijaliziranu stručnu literaturu, navedenu na kraju poglavlja. Ovdje će biti prikazan primjer smanjene apsorpcije, zbog povišene pH vrijednosti u želudcu, te smanjene eliminacije lijeka, zbog reducirane bubrežne funkcije.

S obzirom da je ampicilin kiselina čiji je $pK = 2,5$, pri povišenoj pH vrijednosti u želudcu dolazi do smanjenje apsorpcije ampicilina. To se događa zbog promjene u odnosu koncentracija ioniziranog (A^-) i neioniziranog (HA) oblika lijeka, sukladno **Henderson–Hasselbalchovoj** jednažbi:

$$pH = pK + \text{Log} \frac{c(A^-)}{c(HA)} \quad (J. 34)$$

U glavnom izborniku modula odaberemo 1. klinički slučaj (*Case 1*) „man“ i „ampicillin – gastric pH = 3,5“. Nakon potvrde (*Confirmation*) odabira kliničkog slučaja, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Potrebno je odabrati oralni način primjene lijeka (*per os*) jer se poremećaj apsorpcije zbog izmijenjene pH vrijednosti u želudcu može detektirati samo u primjeni *per os*. Farmakokinetika ampicilina primijenjenog i.v ostaje nepromijenjena.

Studenti moraju samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom, ispuniti tablicu i nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 16 i Slika 17).

Ampicilin 500 mg *per os* (pH = 3,5)

T (min)	C (ng/ml)

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Odabiremo način primjene lijeka (*per os*) te određujemo dozu. Nakon 6-8 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom

prikazu. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

Kako bismo najlakše vizualno međusobno usporedili utjecaj pH vrijednosti na farmakokinetiku ampicilina, koristimo podmodul Kinetics I & II, **nakon** što odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „ampicillin – gastric pH = 2“.

U ovom podmodulu, odabiremo oralni način primjene lijeka za dva slučaja (pH = 3,5 nasuprot pH = 2) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima za pH = 3,5 i pH = 2? Zašto?

Sukladno Henderson–Hasselbalchovoj jednadžbi, koliko se izmijenio omjer koncentracije neioniziranog i ioniziranog oblika lijeka pri navedenoj promjeni pH?

Koji su mogući uzroci izmijenjenog pH želuca?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice, možemo utvrditi tj. izračunati za ampicilin, primijenjen *per os*, pri pH = 3,5, farmakokinetičke parametre: C_{maks} , T_{maks} , K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F i F .

$C_{maks} =$

$T_{maks} =$

$K_E =$

$T_{1/2} =$

$AUC_{0-\infty} =$

$CL/F =$

$V_D/F =$

$F =$

Ampicilin primijenjen pri smanjenoj bubrežnoj funkciji

Većina se lijekova izlučuje iz organizma putem bubrega, u izvornom obliku i kao metabolit(i). Stoga ne čudi da će poremećaj bubrežne funkcije (uslijed bolesti, lijekova, starije životne dobi i sl.) imati za posljedicu izmijenjenu farmakokinetiku brojnih lijekova. Poremećaj bubrežne funkcije najlakše je odrediti sukladno glomerularnoj filtraciji (**GFR**). GFR se najčešće mjeri određivanjem klirensa kreatinina ($C_{L_{KR}}$), kojeg neizravno procjenjujemo iz razine serumskog kreatinina (C_{KR}) pomoću **Cockcroft-Gaultove** jednadžbe:

$$C_{L_{KR}} \text{ (ml/min)} = \frac{(140 - \text{dob}) \times \text{masa (kg)} \times K}{C_{KR} \text{ (}\mu\text{mol/l)}} \quad (J. 35)$$

K je konstanta koja iznosi 1,23 za muškarce i 1,04 za žene.

U zdravom je organizmu $C_{L_{KR}} \geq 90$ ml/min, dok vrijednosti niže od 90, 60 odnosno 30 ml/min ukazuju na blago, umjereno odnosno teško sniženje GFR, pa je potrebno sukladno tome smanjiti dozu lijeka.

U glavnom izborniku modula odaberemo za 1. klinički slučaj (*Case 1*) „man“ i „ampicillin – kidney disease“. Nakon potvrde, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Potrebno je primijeniti lijek u dva navrata (izbrisati tablicu između 2 primjene - *RESET*), 1. put odabrati i.v. način primjene lijeka, a 2. put primjenu *per os*.

Studenti moraju samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom, ispuniti tablice za obje primjene lijeka i nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 16 i Slika 17).

Ampicilin 500 mg i.v. (↓GFR)

T (min)	C (ng/ml)

Ampicilin 500 mg *per os* (↓GFR)

T (min)	C (ng/ml)

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Odabiremo prikladan način primjene lijeka (i.v. ili *per os*) te određujemo dozu. Nakon 6-8 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i

semilogaritamskom prikazu. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

U slučaju **i.v.** primjene lijeka, pomoću ovog podmodula moguće je približno izračunati neke farmakokinetičke parametre, Slika 18.

$$K_E = \quad T_{1/2} =$$

$$C_0 = \quad V_D =$$

$$AUC_{0-\infty} = \quad CL =$$

Studenti moraju usporediti dobivene vrijednosti $T_{1/2}$, K_E , C_0 , V_D , CL i AUC , s onima koje su izračunali kod „normalne“ eliminacije „ampicillin – gastric pH=2“ pri i.v. primjeni.

Kako bismo najlakše vizualno međusobno usporedili utjecaj smanjene eliminacije lijeka putem bubrega, koristimo podmodul Kinetics I & II, **nakon** što odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „ampicillin – gastric pH = 2“.

U ovom podmodulu, odabiremo isti način primjene lijeka (i.v. ili *per os*) za dva slučaja (*kidney disease* nasuprot $pH=2$) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja. Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 16 i Slika 17.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima kod smanjene bubrežne funkcije? Zašto?

Koji su se farmakokinetički parametri promijenili pri i.v. primjeni lijeka kod smanjene bubrežne funkcije? Zašto?

Studenti moraju pokušati, smanjenjem doze, ostvariti podjednako izlaganje lijeka u pacijenta sa smanjenom eliminacijom u odnosu na zdravog.

Koji se farmakokinetički parametar prvenstveno promatra?

Koja je doza prikladna za primjenu i.v., a koja za *per os*, kod pacijenta sa smanjenom bubrežnom funkcijom?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice, možemo utvrditi tj. izračunati za ampicilin, pri smanjenoj bubrežnoj funkciji, sve važne farmakokinetičke parametre: K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL i V_D za i.v. primjenu i C_{maks} , T_{maks} , K_E , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F i F za oralnu primjenu.

Za i.v. primjenu:

$K_E =$

$T_{1/2} =$

$C_0 =$

$AUC_{0-\infty} =$

$CL =$

$V_D =$

Za primjenu *per os*:

$$C_{\text{maks}} =$$

$$T_{\text{maks}} =$$

$$K_E =$$

$$T_{1/2} =$$

$$AUC_{0-\infty} =$$

$$C_L/F =$$

$$V_D/F =$$

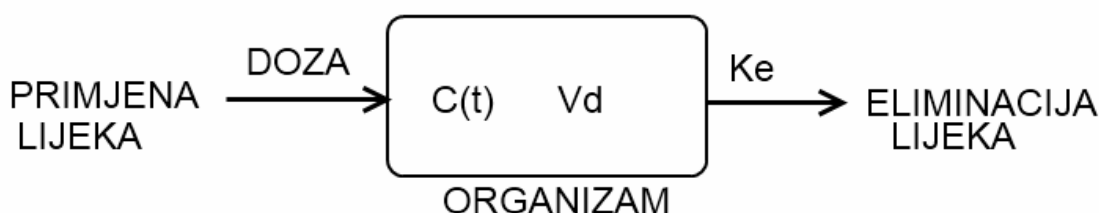
$$F =$$

Simulacija farmakokinetičkog modela s jednim odjeljkom

Za kliničke slučajeve koje smo koristili (**i.v. primjena** - ampicilin pri pH = 2 i smanjena eliminacija) moguće je izmijeniti osnovne farmakokinetičke parametre u modelu s jednim odjeljkom pomoću podmodula *Compartments*, Slika 13. Posljedicu, tj. simulaciju izmijenjenih parametara u *Compartments* modulu moguće je pomno proučiti u podmodulu *Kinetics*, u kojem se iscrtavaju grafovi koncentracije lijeka u plazmi po vremenu.

Podsjetimo da se koncentracija lijeka u određenoj vremenskoj točki (C_t), kod modela za intravensku primjenu s 1 odjeljkom, računa prema slijedećoj jednadžbi :

$$C_t = C_0 \times e^{-K_E \times t}$$



Slika 22. Shematski prikaz farmakokinetičkog modela za i.v. primjenu s 1 odjeljkom.

Studenti moraju izmijeniti osnovne parametre u farmakokinetičkom modelu s jednim odjeljkom (K_E i V_D), te nakon toga proučiti posljedično izmijenjenu farmakokinetiku ampicilina u podmodulu *Kinetics*.

V. Propranolol – primjer modela s dva odjeljka

Propranolol primijenjen intravenski (bolus)

U glavnom izborniku modula odaberemo 1. klinički slučaj (*Case 1*) „man“ i „propranolol – adult“. Nakon potvrde (*Confirmation*) odabira kliničkog slučaja, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Počet ćemo odabire podmodula „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Najvažnije je ispravno odabrati način primjene lijeka, u ovom slučaju počinjemo s intravenskom (i.v.) primjenom, te odrediti prikladnu dozu za taj način primjene lijeka. Premda je u slučaju propranolola kao prikladna doza za i.v. primjenu navedeno (najviše) 10 mg, u slijedećem primjeru će se primijeniti doza od 2 mg, kako bi **studenti samostalno izveli vježbu s većom dozom (3 ili 5 mg).**

Nakon što smo odabrali dozu od 2 mg i potvrdili je, potrebno je odrediti vremenske točke (T) za uzorkovanja krvi radi određivanja koncentracije lijeka (C), npr. 6, 12, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 360, 480 i 600 minuta nakon primjene lijeka.

Ako smo sve ispravno izveli, dobili smo tablicu nalik niže prikazanoj:

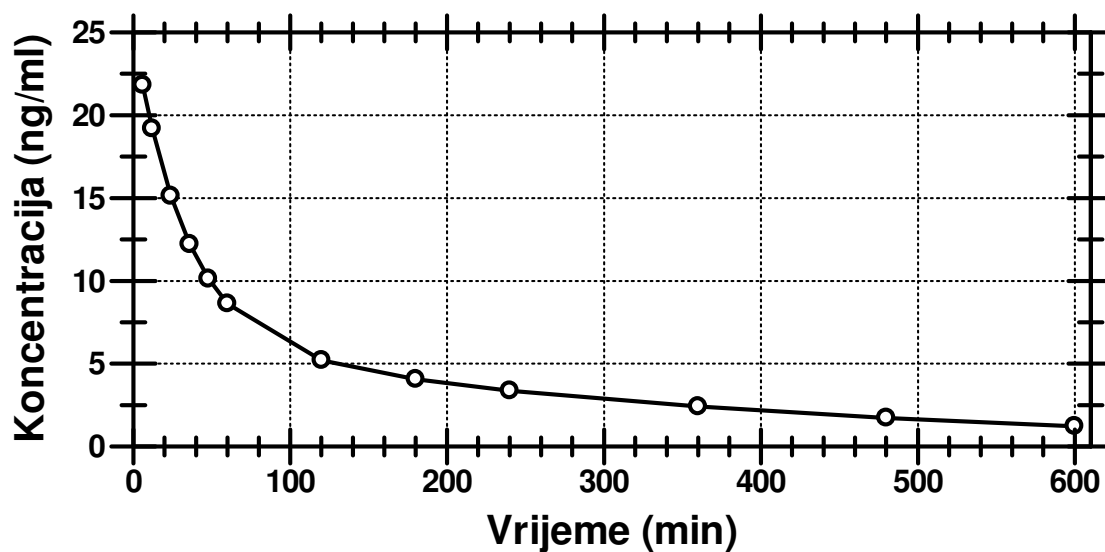
Propranolol 2 mg i.v.

T (min)	C (ng/ml)
6	21,826
12	19,202
24	15,129
36	12,225
48	10,140
60	8,630
120	5,218
180	4,068
240	3,387
360	2,418
480	1,734
600	1,243

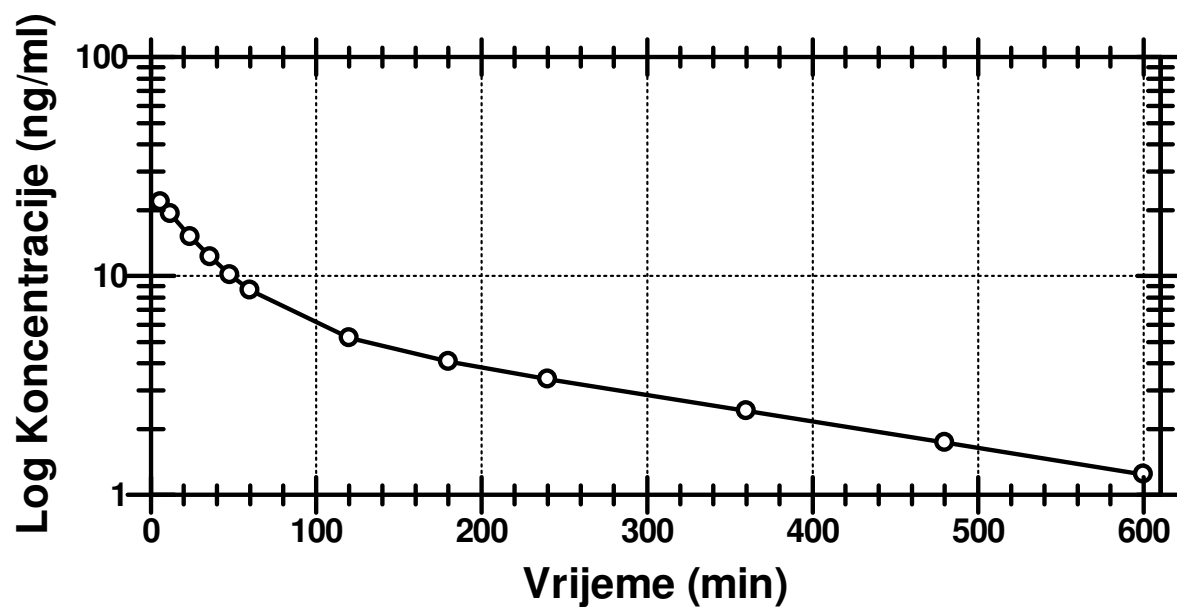
Propranolol ... mg i.v. (ispunjavaju studenti)

T (min)	C (ng/ml)

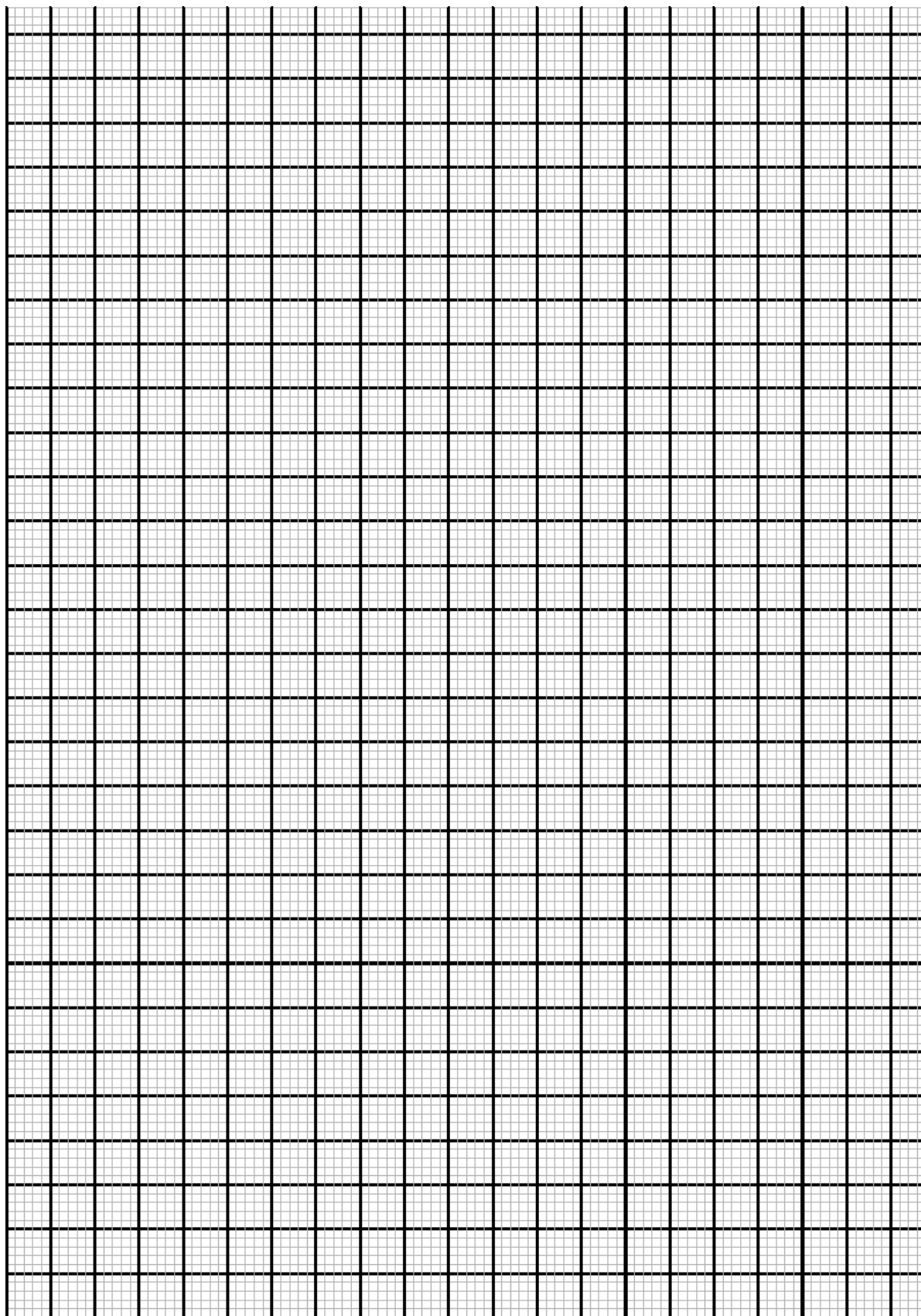
Koristeći brojeve iz tablice, nacrtati ćemo osnovni graf iz farmakokinetike, graf koncentracije lijeka (propranolola) u krvi/plazmi po jedinici vremena. Kako bi utvrdili sve važne informacije iz dobivenih podataka, graf ćemo nacrtati u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Semilogaritamski prikaz (logaritmirana se koncentracija lijeka, C) je koristan kako bi se od krivulje dobio pravac. Niže prikazani grafovi su dobiveni primjenom doze od 2 mg, a studenti moraju sami nacrtati grafove na radnim listovima za linearni i semilogaritamski prikaz, za dozu koju su izabrali.



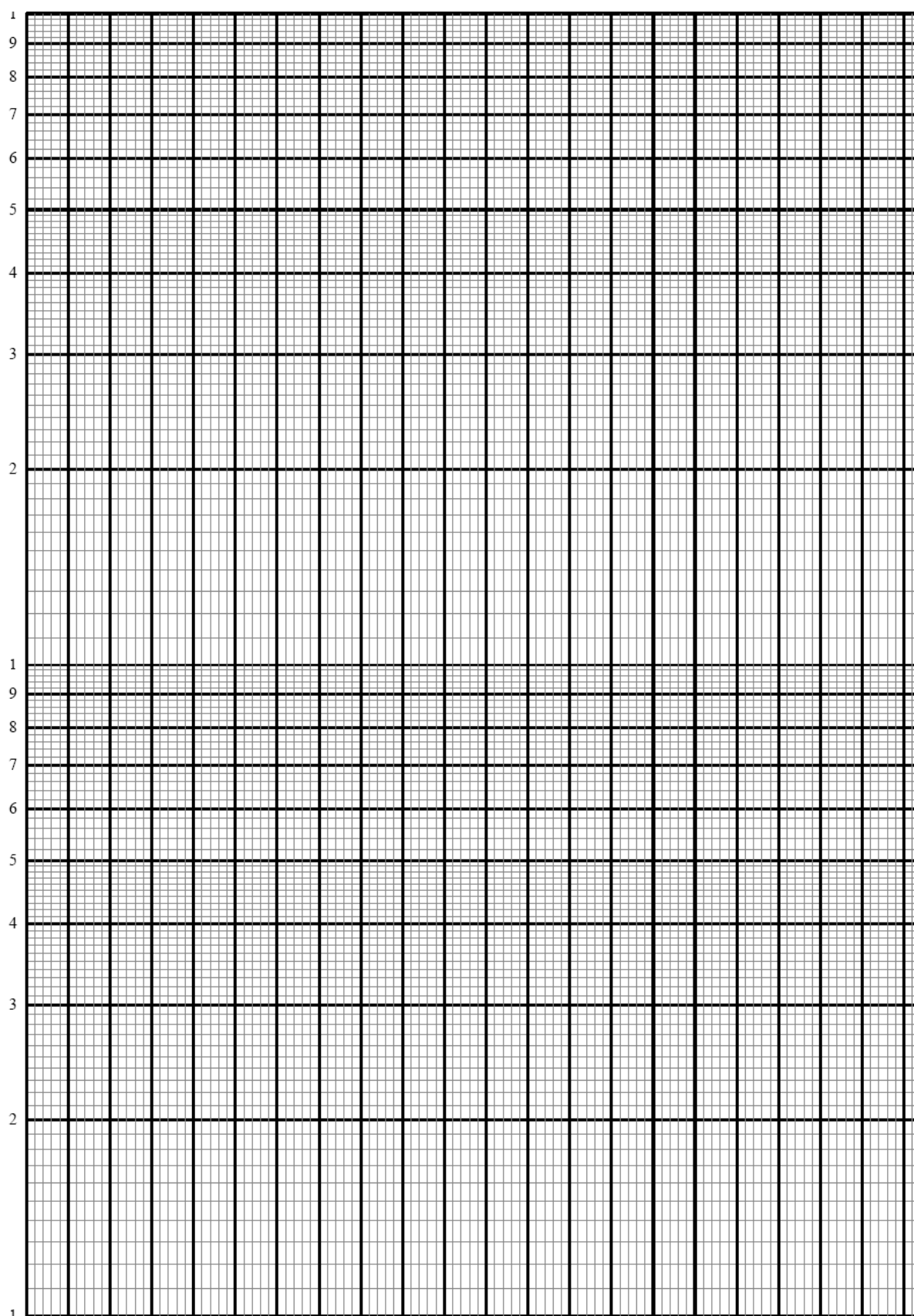
Slika 23. Graf koncentracija lijeka / vrijeme.



Slika 24. Graf logaritma koncentracije lijeka / vrijeme.



Slika 25. Radni list za (linearni) prikaz grafa koncentracija lijeka / vrijeme.



Slika 26. Radni list za (semilogaritamski) prikaz grafa log konc. lijeka/vrijeme.

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Analogno prethodno opisanom podmodulu, odabiremo način primjene lijeka (i.v.) te određujemo dozu (2 mg). Studenti će samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom.

Nakon što smo kliknuli „Start“, počinje se ispisivati zelenom bojom krivulja koncentracije lijeka u plazmi po vremenu. Sa donjim desnim „okretnim gumbom“ podešavamo brzinu ispisa. Nakon 10 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu, koristeći preostala 3 „okretna gumba“ za podešavanje raspona X i Y osi. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Pomoću ovog podmodula moguće je **približno** izračunati određene farmakokinetičke parametre. Kako je u semilogaritamskom prikazu nacrtan bifazični pravac, samo se neki parametri mogu izravno izračunati.

Za određivanje $T_{1/2}$ i K_E (zapravo λ_z) potrebno je pažljivo kursorom postaviti crveni križ na **početak 2. faze** krivulje i plavi križ na **kraj** krivulje te odabrati decimalni način prikaza vremena.

Možemo pomoću „*Calculus*“ s desne strane „izračunati“ $T_{1/2}$ i K_E te provjeriti dobivene vrijednosti s onima koje je računalo izračunalo, na temelju odabranih t_1 , t_2 i c_1 , c_2 . Prikazane vrijednosti C_0 , V_D i CL **nisu** točne, dok je izračunata vrijednost AUC približno točna ($\approx 90\%$ prave vrijednosti).

$T_{1/2} =$

$K_E =$

AUC =

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice te dva grafa koja smo nacrtali, možemo utvrditi tj. izračunati najvažnije farmakokinetičke parametre za propranolol, primijenjen i.v., poput $T_{1/2}$, K_E , CL , V_D i AUC .

Prvo što možemo uočiti na semilogaritmskom prikazu je da smo dobili **bifazični** pad koncentracije, što ukazuje da farmakokinetika propranolola odgovara tzv. modelu s dva odjeljka. Prvi dio pravca prikazuje distribuciju, a drugi eliminaciju lijeka.

Iz linearnog i semilogaritmskog prikaza se može aproksimirati koliki je $T_{1/2}$, a ekstrapolacijom pravca na Y os, na semilogaritmskom prikazu, može se pokušati aproksimirati koliki je C_0 .

Ipak, koristeći gore spomenute jednadžbe za analizu bez odjeljka, iz podataka navedenih u tablici, izravno ćemo izračunati λ_z , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL i V_D .

Budući je pravac bifazičan, potrebno je izračunati dva različita nagiba pravca. Koristeći dvije početne točke može se izračunati nagib (λ_a) kojeg koristimo za određivanje C_0 , a koristeći posljednje točke može se izračunati nagib (λ_z) koji predstavlja konstantu brzinu eliminacije lijeka. Termin λ_z je univerzalan za konstantu brzinu eliminacije lijeka određenu putem nagiba pravca te u modelu s jednim odjeljkom λ_z predstavlja K_E , dok u modelu s dva odjeljka λ_z predstavlja β (vidjeti *Jednadžbu 19*).

Sukladno *Jednadžbi 20*:

$$\lambda_a = - (\ln(C_2) - \ln(C_1)) / (t_2 - t_1) = 0,02135 \text{ min}^{-1} = 1,28 \text{ h}^{-1}$$

Sukladno *Jednadžbi 22*:

$$\ln(C_0) = \ln(C_1) + \lambda_a \times t_1 = 3,2112, \text{ a antilogaritmiranjem utvrđujemo kako je } C_0 = 24,808 \text{ ng/ml} \approx 0,025 \text{ mg/l.}$$

Sukladno *Jednadžbi 20*

$$\lambda_z = - (\ln(C_{12}) - \ln(C_{11})) / (t_{12} - t_{11}) = 0,00277 \text{ min}^{-1} = 0,166 \text{ h}^{-1}$$

Sukladno *Jednadžbi 9*:

$$T_{1/2} = 0,693 / \lambda_z = 250 \text{ min} \approx 4,2 \text{ h}$$

Sukladno *Jednadžbi 24*:

$$AUC_{6-600} = \sum [(C_n + C_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)] = 2433,714 \text{ ng/ml} \times \text{min.}$$

Sukladno *Jednadžbi 25*:

$$AUC_{0-6} = (C_0 + C_6)/2 \times t_1 = 139,902 \text{ ng/ml} \times \text{min.}$$

Sukladno *Jednadžbi 26*:

$$AUC_{600-\infty} = C_{600} / \lambda_z = 448,736 \text{ ng/ml} \times \text{min.}$$

Zbrojivši sve tri gore prikazane AUC , utvrđujemo da je:

$$AUC_{0-\infty} = 3022,352 \text{ ng/ml} \times \text{min} = 50,37 \text{ } \mu\text{g/l} \times \text{h.}$$

Sukladno Jednadžbi 4:

$$C_L = \text{Doza} / \text{AUC}_{0-\infty} = 661,74 \text{ ml/min} = 39,7 \text{ l/h.}$$

Sukladno Jednadžbi 9:

$$V_D = C_L / \lambda_z = 239 \text{ l.}$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze propranolola koje su izabrali, samostalno izračunati λ_z , $T_{1/2}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$, C_L i V_D .

$$\lambda_z =$$

$$T_{1/2} =$$

$$C_0 =$$

$$\text{AUC}_{0-\infty} =$$

$$C_L =$$

$$V_D =$$

Preostaje nam odrediti još neke farmakokinetičke parametre koristeći analizu bez odjeljka, površinu ispod momenta krivulje, **AUMC_{0-∞}**, i srednje vrijeme zadržavanja, **MRT**.

$$\text{AUMC}_{t1-tx} = \sum[(C_n \times t_n + C_{n+1} \times t_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)]$$

$$\text{AUMC}_{0-t1} = (C_1 \times t_1)/2 \times t_1$$

$$\text{AUMC}_{tx-\infty} = (C_{tx} \times t_x) / \lambda_z + C_{tx} / \lambda_z^2$$

$$\text{MRT} = \text{AUMC}_{0-\infty} / \text{AUC}_{0-\infty}$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze propranolola, samostalno izračunati **AUMC_{0-∞}** i **MRT**.

$$\text{AUMC}_{0-\infty} =$$

$$\text{MRT} =$$

Propranolol primijenjen *per os*

U glavnom izborniku modula odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „propranolol – adult“. Nakon potvrde (*Confirmation*) odabira kliničkog slučaja, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Potrebno je odabrati oralni način primjene lijeka (*per os*) te odrediti prikladnu dozu za taj način primjene lijeka. Premda je u slučaju propranolola prikladna doza 40 mg, u slijedećem primjeru će se primijeniti doza od 20 mg, kako bi **studenti samostalno izveli vježbu s prikladnom dozom od 40 mg**.

Nakon što smo odabrali dozu od 20 mg i potvrdili je, potrebno je odrediti vremenske točke (T) za uzorkovanja krvi radi određivanja koncentracije lijeka (C), npr. 6, 12, 24, 36, 48, 60, 120, 180, 240, 360, 480 i 600 minuta nakon primjene lijeka.

Ako smo sve ispravno izveli, dobili smo tablicu nalik niže prikazanoj:

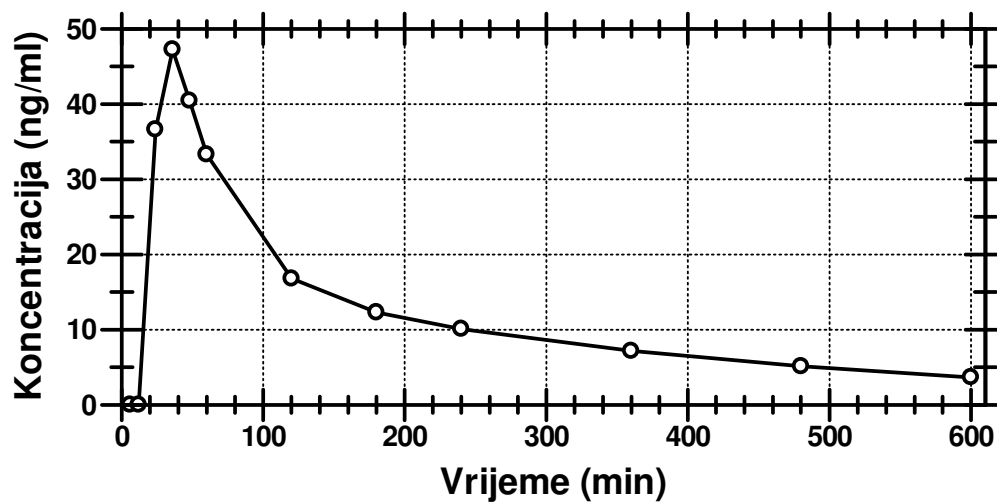
Propranolol 20 mg *per os*

T (min)	C (ng/ml)
6	0,000
12	0,000
24	36,641
36	47,284
48	40,483
60	33,317
120	16,820
180	12,319
240	10,109
360	7,194
480	5,157
600	3,698

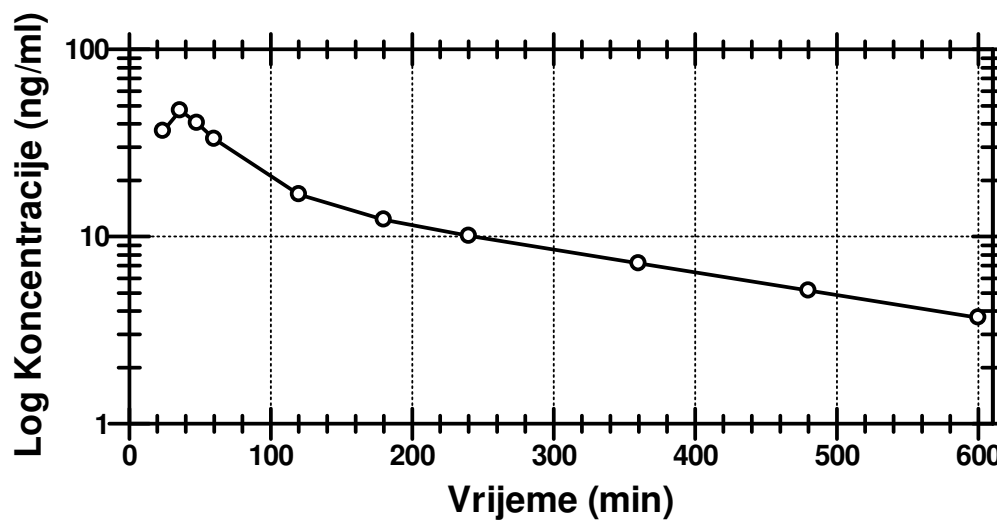
Propranolol 40 mg *per os* (ispunjavaju studenti)

T (min)	C (ng/ml)

Koristeći brojeve iz tablice, nacrtati ćemo graf koncentracije lijeka (propranolola) u krvi/plazmi po jedinici vremena. Kako bi utvrdili sve važne informacije iz dobivenih podataka, graf ćemo nacrtati u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Semilogaritamski prikaz (logaritmirana se koncentracija lijeka, C) je koristan kako bi se od krivulje dobio pravac. U nastavku su prikazani grafovi za dozu od 20 mg, a studenti moraju sami nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 25 i Slika 26) za dozu od 40 mg.



Slika 27. Graf koncentracija lijeka / vrijeme.

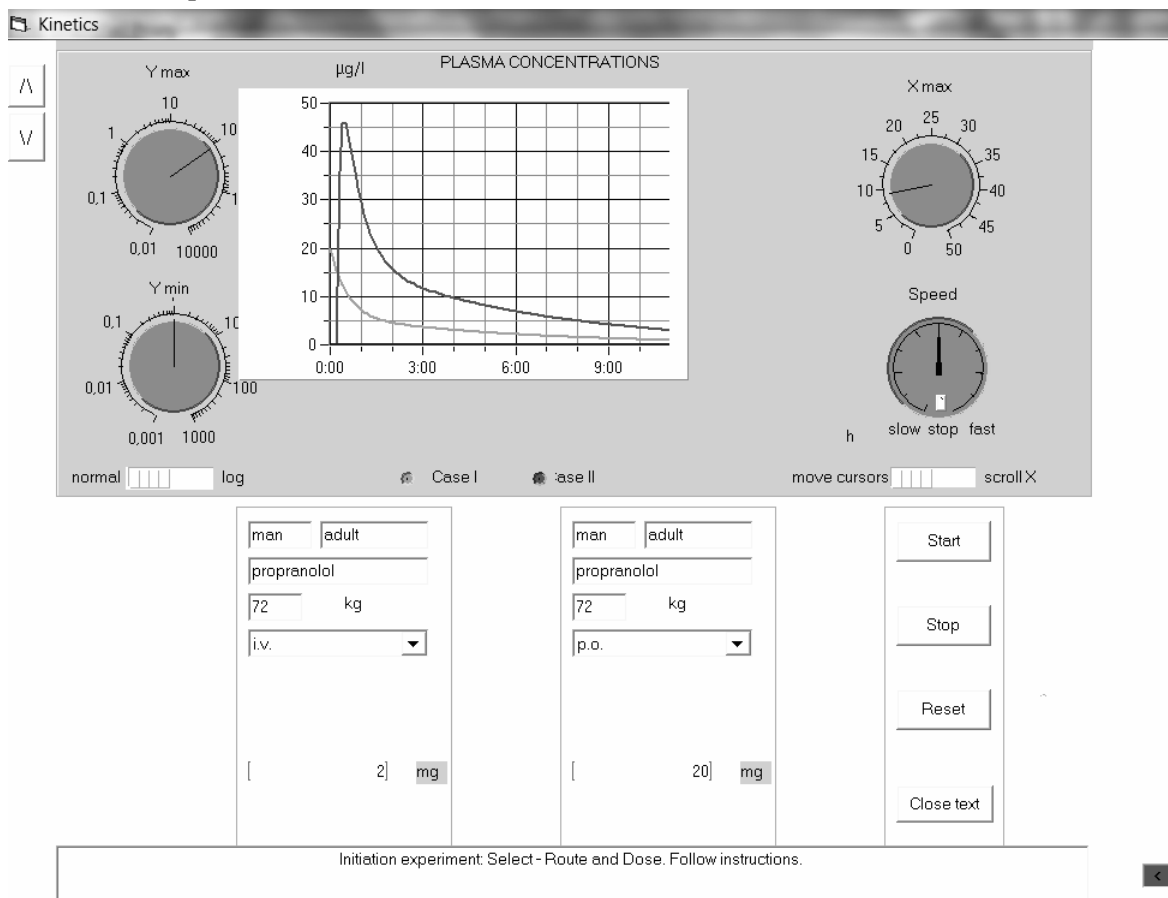


Slika 28. Graf logaritma koncentracije lijeka / vrijeme.

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, vidi Slika 12.

Sukladno prethodno opisanim podmodulom, odabiremo način primjene lijeka (*per os*), te određujemo dozu. Nakon što smo kliknuli „Start“, počinje se ispisivati zelenom bojom krivulja koncentracije lijeka u plazmi po vremenu. Sa donjim desnim „okretnim gumbom“ podešavamo brzinu ispisa. Nakon 10 sati zaustavljamo ispis, te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu, koristeći preostala 3 „okretna gumba“ za podešavanje raspona X i Y osi. Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Kako bismo najlakše vizualno međusobno usporedili dva klinička slučaja, koristimo podmodul *Kinetics I & II*.



Slika 29. Prikaz krivulja koncentracije lijeka po vremenu za dva klinička slučaja.

U ovom podmodulu, odabiremo način primjene lijeka za dva slučaja (i.v. nasuprot *per os*) i dozu (NIJE ista). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja. Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima za i.v. i *per os* primjenu? Zašto?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice te dva grafa koja smo nacrtali, možemo utvrditi tj. izračunati za propranolol, primijenjen *per os*, nama već poznate farmakokinetičke parametre, poput $T_{1/2}$, λ_z i AUC , zatim klirens i volumen distribucije normalizirane prema biodostupnosti, CL/F , V_D/F te nove parametre koje nismo imali kod i.v. primjene: C_{maks} (maksimalna tj. vršna koncentracija lijeka) i T_{maks} (vrijeme kada se dosegla C_{maks}). T_{maks} odgovara vremenu kada se izjednačila brzina apsorpcije i eliminacije lijeka. Za oralnu je primjenu lijeka $C_0 = 0$.

Na semilogaritmskom prikazu možemo uočiti da smo, nakon početnog rasta, dobili bifazični pad koncentracije lijeka. Koristeći posljednje točke može se izračunati nagib (λ_z) koji predstavlja konstantu brzinu eliminacije lijeka. Termin λ_z je univerzalan za konstantu brzinu eliminacije lijeka određenu putem nagiba pravca te u modelu s jednim odjeljkom λ_z predstavlja K_E , dok u modelu s dva odjeljka λ_z predstavlja β (vidjeti *Jednadžbu 19*). Iz linearnog prikaza i tablice može se utvrditi C_{maks} i T_{maks} te aproksimirati koliki je $T_{1/2}$. Za određivanje farmakokinetičkih parametara koristimo ove jednadžbe:

$$\lambda_z = - (\ln(C_{12}) - \ln(C_{11})) / (t_{12} - t_{11})$$

$$T_{1/2} = 0,693 / \lambda_z$$

$$AUC_{6-600} = \sum [(C_n + C_{n+1}) / 2 \times (t_{n+1} - t_n)]$$

$$AUC_{0-6} = (C_0 + C_6) / 2 \times t_1$$

$$AUC_{600-\infty} = C_{600} / \lambda_z$$

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{6-600} + AUC_{0-6} + AUC_{600-\infty}$$

$$CL = F \times \text{Doza} / AUC_{0-\infty} \Rightarrow CL/F = \text{Doza} / AUC_{0-\infty}$$

$$V_D/F = CL/F / \lambda_z$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon primjene doze od 40 mg propranolola, samostalno izračunati C_{maks} , T_{maks} , λ_z , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F .

Kako za propranolol imamo vrijednosti farmakokinetičkih parametara za i.v. primjenu, studenti moraju izračunati i njegovu apsolutnu biodostupnost, F , prema *Jednadžbi 10*. Uočiti da doza NIJE ista za dva načina primjene lijeka.

$$C_{maks} =$$

$$T_{maks} =$$

$$\lambda_z =$$

$$T_{1/2} =$$

$$AUC_{0-\infty} =$$

$$C_L/F =$$

$$V_D/F =$$

$$F =$$

Preostaje nam odrediti još neke farmakokinetičke parametre koristeći analizu bez odjeljka, površinu ispod momenta krivulje, **AUMC**_{0-∞} i srednje vrijeme zadržavanja, **MRT**.

$$AUMC_{t1-tx} = \sum [(C_n \times t_n + C_{n+1} \times t_{n+1})/2 \times (t_{n+1} - t_n)]$$

$$\text{AUMC}_{0-t_1} = (C_1 \times t_1)/2 \times t_1$$

$$\text{AUMC}_{t_x-\infty} = (C_{t_x} \times t_x) / \lambda_z + C_{t_x} / \lambda_z^2$$

$$\text{MRT} = \text{AUMC}_{0-\infty} / \text{AUC}_{0-\infty}$$

Studenti moraju, koristeći tablicu koju su dobili nakon oralne primjene doze od 40 mg propranolola, samostalno izračunati $\text{AUMC}_{0-\infty}$ i MRT.

$$\text{AUMC}_{0-\infty} =$$

$$\text{MRT} =$$

Propranolol primijenjen pri smanjenoj bubrežnoj funkciji

U glavnom izborniku modula odaberemo za 1. klinički slučaj (*Case I*) „man“ i „propranolol – kidney disease“. Nakon potvrde, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, Slika 11.

Potrebno je primijeniti lijek u dva navrata (izbrisati tablicu između dvije primjene - *RESET*), 1. put odabrati i.v. način primjene lijeka, a 2. put primjenu *per os*.

Studenti moraju samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom, ispuniti tablice za obje primjene lijeka i nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 25 i Slika 26).

Propranolol mg i.v. (↓GFR)

T (min)	C (ng/ml)

Propranolol..... mg *per os* (↓GFR)

T (min)	C (ng/ml)

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Odabiremo prikladni način primjene lijeka (i.v. ili *per os*) te određujemo dozu. Nakon 10-12 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Nastavljamo koristeći podmodul *Kinetics I & II*, **nakon** što odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „propranolol – adult“.

U ovom podmodulu, odabiremo isti način primjene lijeka (i.v. ili *per os*) za dva slučaja (*kidney disease* nasuprot *adult*) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima kod smanjene bubrežne funkcije? Zašto?

Da li su se neki farmakokinetički parametri promijenili pri i.v. primjeni lijeka kod smanjene bubrežne funkcije? Zašto?

Propranolol primijenjen pri smanjenoj jetrenoj funkciji

Iz prethodnog zadatka se može uočiti da se propranolol zanemarivo malo izlučuje putem bubrega te stoga smanjena bubrežna funkcija ne mijenja značajno njegovu farmakokinetiku. S druge strane, propranolol ima visoki omjer jetrene ekstrakcije, E_H , tj. značajno se metabolizira tijekom „prvog prolaska kroz jetru“, vidjeti *Jednadžbu 11*.

U slučaju takvih lijekova, poremećaj jetrene funkcije, poput ciroze ili uznapredovanog hepatitisa, imati će za posljedicu izmijenjenu farmakokinetiku. Za procjenu jetrene funkcije, u svrhu prikladnog doziranja lijeka, ne postoji neka standardizirana jednadžba, analogno Cockcroft-Gaultovoj jednadžbi. Ipak, često se procjena jetrene funkcije određuje pomoću **Child-Pughova** sustava bodovanja, sukladno niže prikazanoj tablici.

Tablica 1. Child-Pughov sustav bodovanja za procjenu jetrene funkcije.

Parametar	1 bod	2 boda	3 boda
Ukupni bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	<34	34-50	>50
Serumski albumin (g/l)	>35	28-35	<28
PT INR	<1,7	1,71-2,30	>2,30
Ascites	Nema	Blagi	Umjereni do teški
Hepatička encefalopatija	Nema	Stupnja 1-2 ili odgovara na liječenje	Stupnja 3-4 ili refraktorna

Zbrajanjem bodova pomoću tablice utvrđuje se Child-Pughov stadij oštećenja jetrene funkcije: **stadij A** (5-6 bodova) – blago; **stadij B** (7-9 bodova) – umjereno i **stadij C** (10-15 bodova) – teško oštećenje. Kod pacijenata kojima je utvrđen stadij B ili C, često je potrebno promijeniti dozu lijeka.

U glavnom izborniku modula odaberemo za 1. klinički slučaj (*Case 1*) „*man*“ i „*propranolol – cirrhosis*“. Nakon potvrde, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „*Plasma concentration*“, i primjena lijeka *per os*.

Studenti moraju samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom, ispuniti tablicu i nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 25 i Slika 26).

Propranolol..... mg *per os* (↓jetrene funkcije)

T (min)	C (ng/ml)

Nastavljamo zadatak odabirom podmodula „*Kinetics*“, Slika 12.

Odabiremo primjenu lijeka *per os* te određujemo dozu. Nakon 10-12 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Nastavljamo koristeći podmodul *Kinetics I & II*, **nakon** što odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „*man*“ i „*propranolol – adult*“.

U ovom podmodulu, odabiremo primjenu lijeka *per os* za dva slučaja (*cirrhosis* nasuprot *adult*) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja. Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima kod smanjene jetrene funkcije? Zašto?

Studenti moraju pokušati, smanjenjem doze, ostvariti podjednako izlaganje lijeka u pacijenta sa smanjenom eliminacijom, u odnosu na zdravog.

Koja je doza prikladna za primjenu kod pacijenta sa smanjenom jetrenom funkcijom?

Koji su mogući razlozi smanjene jetrene funkcije?

Može li istovremeno uzimanje više lijekova izazvati sličnu promjenu u farmakokinetici određenog lijeka?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice, možemo utvrditi tj. izračunati za propranolol kod oralne primjene pri smanjenoj jetrenoj funkciji, sve važne farmakokinetičke parametre: C_{maks} , T_{maks} , λ_z , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F .

$$C_{maks} =$$

$$T_{maks} =$$

$$\lambda_z =$$

$$T_{1/2} =$$

$$AUC_{0-\infty} =$$

$$CL/F =$$

$$V_D/F =$$

Propranolol primijenjen u osoba starije životne dobi

U osoba se starenjem događaju različite promjene koje mogu utjecati na farmakokinetiku lijekova, što predstavlja značajan medicinski problem s obzirom na globalno i nacionalno „starenje“ prosječne populacije koja uzima lijekove. Smanjena funkcija bubrega i jetre, pad srčanog indeksa i prokrvljenosti jetre te smanjena količina vode i povećani udio masti u tijelu, predstavljaju neke od najvažnijih promjena u starosti koje izazivaju promjene u farmakokinetici lijekova koje je razmjerno teško predvidjeti.

U glavnom izborniku modula odaberemo za 1. klinički slučaj (*Case I*) „man“ i „propranolol – elderly“. Nakon potvrde, postaju nam raspoloživa tri gore opisana podmodula.

Odabiremo podmodul „Plasma concentration“, i primijeniti lijek *per os*.

Studenti moraju samostalno izvesti vježbu s prikladnom dozom, ispuniti tablicu i nacrtati grafove na radnim listovima (Slika 25 i Slika 26).

Propranolol..... mg *per os* (starija osoba)

T (min)	C (ng/ml)

Nastavljamo zadatak odabirem podmodula „Kinetics“, Slika 12.

Odabiremo primjenu lijeka *per os* te određujemo dozu. Nakon 10-12 sati zaustavljamo ispis te promatramo dobiveni graf u linearnom i semilogaritamskom prikazu.

Studenti moraju usporediti prikazane grafove s onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Nastavljamo koristeći podmodul *Kinetics I & II*, **nakon** što odaberemo 2. klinički slučaj (*Case II*) „man“ i „propranolol – adult“.

U ovom podmodulu, odabiremo primjenu lijeka *per os* za dva slučaja (*elderly* nasuprot *adult*) i dozu (obavezno istu). Nakon što smo kliknuli „Start“, počinju se ispisivati zelenom i crvenom bojom krivulje koncentracije lijeka u plazmi po vremenu, za dva slučaja.

Studenti moraju usporediti prikazane grafove sa onima koje su nacrtali u radnim listovima, Slika 25 i Slika 26.

Za raspravu:

Koje su razlike u grafovima kod osobe starije životne dobi?

Koji su mogući razlozi izmijenjene farmakokinetike lijekova kod osoba starije životne dobi?

Studenti moraju pokušati, smanjenjem doze, ostvariti podjednako izlaganje lijeka u pacijenta starije životne dobi u odnosu na zdravog.

Koja je doza prikladna za primjenu kod pacijenta starije životne dobi?

DODATAK ZA STUDENTE KOJI ŽELE ZNATI VIŠE O FARMAKOKINETICI

Koristeći podatke iz tablice, možemo utvrditi tj. izračunati za propranolol kod oralne primjene u pacijenta starije životne dobi, sve važne farmakokinetičke parametre: C_{maks} , T_{maks} , λ_z , $T_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, CL/F i V_D/F .

$$C_{maks} =$$

$$T_{maks} =$$

$$\lambda_z =$$

$$T_{1/2} =$$

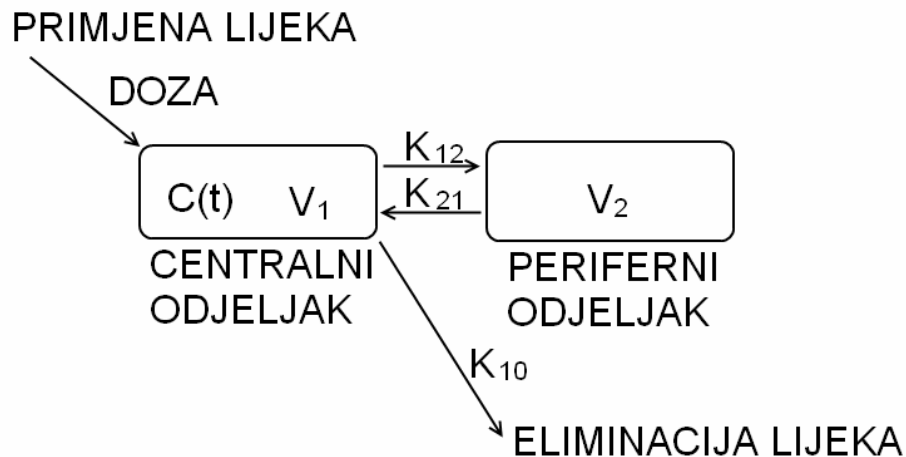
$$AUC_{0-\infty} =$$

$$CL/F =$$

$$V_D/F =$$

Simulacija farmakokinetičkog modela s dva odjeljka

Za kliničke slučajeve koje smo koristili moguće je izmijeniti osnovne farmakokinetičke parametre u modelu s dva odjeljka pomoću podmodula *Compartments*, Slika 13. Posljedicu, tj. simulaciju izmijenjenih parametara u *Compartments* modulu moguće je pomno proučiti u podmodulu *Kinetics*, u kojem se iscrtavaju grafovi koncentracije lijeka u plazmi po vremenu.



Slika 30. Shematski prikaz farmakokinetičkog modela za i.v. primjenu s 2 odjeljka.

Studenti moraju izmijeniti osnovne parametre u farmakokinetičkom modelu s dva odjeljka (K_{10} , K_{12} , K_{21} , V_1 i V_2) te nakon toga proučiti posljedično izmijenjenu farmakokinetiku propranolola u podmodulu *Kinetics*.

Prilog 1: Popis korištenih jednažbi

$C_L = \frac{V_{ELIM}}{C}$	(JEDNADŽBA 1).....	53
$C_{L\text{ UKUPNI}} = C_{L\text{ BUBREŽNI}} + C_{L\text{ JETRENI}} + C_{L\text{ OSTALI}}$	(J. 2)	53
$C_{L\text{ ORGANA}} = Q \times \frac{C_A - C_V}{C_A}$	(J. 3).....	53
$C_L = \frac{DOZA}{AUC_{0-\infty}}$	(J. 4)	53
$V_{PRIM} = C_L \times C_{SS}$	(J. 5)	54
$V_D = \frac{DOZA}{C_0}$	(J. 6)	54
$DOZA_{UDARNA} = V_D \times C_Z$	(J. 7)	54
$T_{1/2} = 0,693 \times \frac{V_D}{C_L}$	(J. 8).....	54
$K_E = \frac{0,693}{T_{1/2}} = \frac{C_L}{V_D}$	(J. 9).....	55
$F = \frac{AUC_{ORAL}}{AUC_{IV}} \times \frac{DOZA_{IV}}{DOZA_{ORAL}}$	(J. 10).....	55
$F = f \times F^* = f \times (1 - E_H)$	(J. 11)	55
$DOZA_{ODRŽAVANJA} = \frac{C_L \times C_Z}{F} \times \tau$	(J. 12)	56
$V_{PRIM} = \frac{C_L \times C_Z}{F}$	(J. 13)	56
$C_{SS} = \frac{F \times DOZA}{C_L \times \tau}$	(J. 14).....	56
$DOZA_{UDARNA} = \frac{V_D \times C_Z}{F}$	(J. 15)	56
$C_t = C_0 \times e^{-K_E \times t}$	(J. 16)	57

$\text{Ln } C_t = \text{Ln } C_0 - K_E \times t$	(J. 17).....	57
$\text{Log } C_t = \text{Log } C_0 - \frac{K_E}{2,303} \times t$	(J. 18).....	57
$C_t = A \times e^{-\alpha \times t} + B \times e^{-\beta \times t}$	(J. 19).....	57
$K_E = -\frac{\text{Ln } (C_2) - \text{Ln } (C_1)}{t_2 - t_1}$	(J. 20)	57
$T_{1/2} = \frac{0,693}{-\frac{\text{Ln } (C_2) - \text{Ln } (C_1)}{t_2 - t_1}}$	(J. 21)	58
$\text{Ln } (C_0) = \text{Ln } (C_1) + K_E \times t_1$	(J. 22).....	58
$C_0 = e^{\text{Ln}(C_0)}$	(J. 23)	58
$\text{AUC}_{t_1-t_x} = \sum \left[\frac{C_n + C_{n+1}}{2} \times (t_{n+1} - t_n) \right]$	(J. 24).....	58
$\text{AUC}_{0-t_1} = \frac{C_0 + C_1}{2} \times t_1$	(J. 25).....	58
$\text{AUC}_{t_x-\infty} = \frac{C_{t_x}}{K_E}$	(J. 26)	58
$\text{AUMC}_{t_1-t_x} = \sum \left[\frac{C_n \times t_n + C_{n+1} \times t_{n+1}}{2} \times (t_{n+1} - t_n) \right]$	(J. 27).....	68
$\text{AUMC}_{0-t_1} = \frac{C_1}{2} \times t_1$	(J. 28).....	68
$\text{AUMC}_{t_x-\infty} = \frac{C_{t_x} \times t_x}{K_E} + \frac{C_{t_x}}{K_E^2}$	(J. 29).....	68
$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}_{0-\infty}}{\text{AUC}_{0-\infty}}$	(J. 30).....	69
$\text{MAT} = \text{MRT}_{\text{ORAL}} - \text{MRT}_{\text{IV}}$	(J. 31).....	75
$K_A = \frac{1}{\text{MAT}}$	(J. 32)	75

$$T_{\text{maks}} = \frac{\text{Ln} \frac{K_A}{K_E}}{K_A - K_E} \quad (J. 33) \dots\dots\dots 75$$

$$\text{pH} = \text{pK} + \text{Log} \frac{c(A^-)}{c(HA)} \quad (J. 34) \dots\dots\dots 76$$

$$C_{L_{KR}} (\text{ml/min}) = \frac{(140 - \text{dob}) \times \text{masa} (\text{kg}) \times K}{C_{KR} (\mu\text{mol/l})} \quad (J. 35) \dots\dots\dots 79$$



Modul Psihofarmakologija (Behaviour)

Petra Dolenec, Jelena Rajič, Gordana Župan

I. Uvod

Behaviour kao modul programskog paketa „*Microlabs*“ uključuje dva podmodula. Podmodul *Symptoms lab. animals* sadrži kratke filmove koji prikazuju ponašanje zdravih, netretiranih (kontrolnih) životinja te učinke/simptome koji se javljaju prilikom primjene različitih tvari u životinja i ljudi. U podmodulu *Mouse Watch (Mouse Simulator)* studenti se mogu upoznati s osnovnim ponašanjima laboratorijskih životinja kroz kompjutersku simulaciju na primjeru miša. Kako bi studenti uspješno pratili podmodul *Symptoms lab. animals* potrebno je da dobro prouče *Mouse Watch (Mouse Simulator)*.

II. Mouse Watch (Mouse Simulator)

U podmodulu *Mouse Watch (Mouse Simulator)* studentima je ponuđena mogućnost odabira aplikacija *Single Behaviours* ili *Sequenced Behaviours*.

Odabirom *Single Behaviours* u glavnom izborniku moguće je pogledati oblike ponašanja laboratorijskog miša u kontrolnim uvjetima (primjerice mirovanje, hodanje, lizanje i dr.) te neke od simptoma koji se bilježe nakon primjene pojedinih tvari (primjerice piloerekcija, katalepsija i dr.).

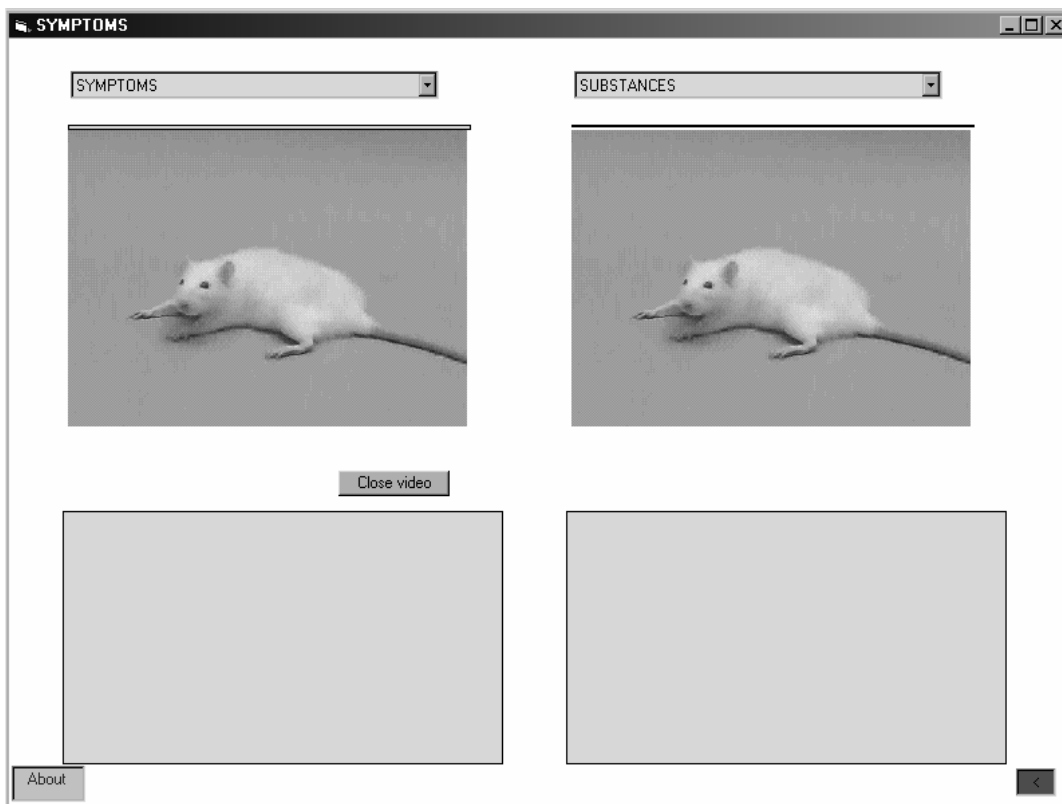
Kako bi provjerili svoju sposobnost prepoznavanja određenih oblika ponašanja u miša, studenti mogu pokrenuti aplikaciju *Sequenced Behaviours*. Otvaranjem prozora pruža im se mogućnost da naredbom ON pokrenu testiranje te odaberu vrijeme njegova trajanja (1-5 minuta). Pokretanjem aplikacije, pojavljuje se izbornik u kojem su ponuđeni različiti oblici ponašanja (primjerice *still*, *rear*, *stretch*, *scratch*, *groom*). Studenti u izborniku odabiru ponašanja koja će morati prepoznavati u testu. Zatim počinje test u kojem studenti promatraju miša. U izborniku ispod animacije klikom moraju odabirati ponašanja za koja misle da su prisutna u životinje. Nakon isteka vremena testiranja studenti će izbrojati svoje točne odgovore na dijagramu. To će učiniti na način da zbroje poklapanja svojih odgovora (zabilježenih kao žute vertikalne linije) i točnih odgovora (zabilježenih kao crveno obojena područja) kroz slijed vremenskih odsječaka. Za ponavljanje aplikacije koriste se naredbe *Repeat* ili *Reorder and repeat*, a za odabir drukčijeg vremena testiranja i/ili oblika ponašanja naredba *New sequence*.

Primjer zadatka za studente

Studenti rade u parovima te koriste gore navedene upute za upotrebu aplikacije *Sequenced Behaviours*. Jedan od studenata pogađa ponašanja te mu se nakon isteka vremena na dijagramu zbroje točni i netočni odgovori. Potom slijedi testiranje drugog studenta. Po završetku testa, studenti mogu usporediti svoje rezultate i proglasiti pobjednika.

III. *Symptoms lab. animals*

U ovom dijelu podmodula studenti imaju mogućnost promatranja i izučavanja različitih oblika ponašanja životinja/ljudi koristeći izbornike *Symptoms* ili *Substances*, nakon čega se najčešće pokreću odgovarajući filmovi. Objašnjenja i dodatne informacije nalaze se u okvirima ispod filmova. Naredbom *Close video* student se vraća na izbornik *Symptoms* ili *Substances*.



Slika 31. Prikaz podmodula *Symptoms lab. animals*.

Primjer zadatka za studente

Na početku zadatka svi studenti pogledaju ponašanje zdravog, netretiranog (kontrolnog) miša odabirom *control mouse* i *control mouse (reflexes)* iz izbornika *Symptoms* odnosno *5-HT syndrome (mouse) control* iz izbornika *Substances*. Studenti se potom podijele u parove ili u skupine od po 3 ili 4 studenta. Svakom paru, odnosno svakoj skupini, zada se zaseban zadatak. Zadatci se uglavnom sastoje od promatranja simptoma koje uzrokuje jedna ili nekoliko zadanih tvari. Svaki od zadataka ima svoj protokol kojeg studenti ispunjavaju tijekom vježbe. Na početku protokola studenti moraju ukratko napisati nekoliko podataka o tvarima koje su im zadane, pri čemu mogu koristiti predloženu literaturu i Internet. Kad svi studenti završe svoje zadatke (unutar vremenskog razdoblja od primjerice 30 minuta), jedni drugima redom izlažu znanja koja su usvojili vježbom. Dodatno, nakon izlaganja moguća je rasprava o predloženim temama.

Također, u svrhu još kvalitetnijeg savladavanja gradiva, moguće je koristiti izbornik *Symptoms*. U izborniku se odabere određeni simptom te se nakon prikaza filma studenti moraju prisjetiti koje tvari mogu uzrokovati njegovu pojavu.

Zadatak 1: Serotoninski (5-HT) sindrom

Opišite serotoninski sindrom u čovjeka. Navedite lijekove koji ga mogu uzrokovati.

Opišite simptome serotoninskog sindroma nakon primjene tri različite farmakološke tvari u miša.

a) 1. sekvenca (5-MeO-DMT)

b) 2. sekvenca (Kvipazin)

c) 3. sekvenca (8-OH-DPAT)

Opišite simptome serotoniniskog sindroma u štakora.

Tema za raspravu:

Uloge serotonina u organizmu te lijekovi koji utječu na serotoninisku neurotransmisiju.

Zadatak 2: Amfetamin i kokain

Kojoj skupini tvari pripada amfetamin? Opišite mehanizam djelovanja i učinke amfetamina u čovjeka.

Opišite učinke intraperitonealne (i.p.) primjene amfetamina u dozi od 40 mg/kg u miša.

Opišite učinke i.p. primjene amfetamina u dozi od 25 mg/kg u štakora koji se očituju:

a) ubrzo nakon injekcije:

b) nakon približno 10 - 15 minuta:

c) nakon približno 25 – 30 minuta:

d) nakon približno 35 minuta:

Opišite ovisnost o kokainu i mehanizam njegova djelovanja kao sredstva ovisnosti u čovjeka.

Opišite učinke i.p. primjene 15 mg/kg kokaina u miša.

Tema za raspravu:

Sredstva i tipovi ovisnosti.

Zadatak 3: Barbiturati

Što su barbiturati? Opišite mehanizam djelovanja te učinke barbiturata u čovjeka.

Navedite simptome koji se javljaju kod ustezanja od barbiturata.

Opišite simptome i liječenje predoziranja (akutnog trovanja) barbituratima.

Opišite učinke i.p. primjene 80 mg/kg heksobarbitala u štakora koji se očituju:

a) neposredno nakon injekcije:

b) nakon približno 2 minute:

c) nakon približno 3 - 4 minute:

b) nakon približno 5 minuta:

Opišite učinke primjene manje i veće (80 mg/kg i.p.) doze pentobarbitona u miša.

Tema za raspravu:

Barbiturati u kliničkoj medicini i nekliničkim istraživanjima.

Zadatak 4: Klorpromazin i haloperidol

Opišite mehanizam djelovanja i učinke klorpromazina i haloperidola u čovjeka. Navedite razlike između klorpromazina i haloperidola.

Opišite učinke primjene različitih doza klorpromazina u miša.

a) Doza: 8 mg/kg i.p.

b) Doza: 20 mg/kg i.p.

Opišite učinke i.p. primjene 20 mg/kg klorpromazina u kunića koji se očituju:

a) ubrzo nakon injekcije:

b) nakon približno 2 minute:

c) nakon približno 15 minuta:

d) nakon približno 20 minuta:

Opišite učinke i.p. primjene 20 mg/kg klorpromazina u štakora koji se očituju:

a) ubrzo nakon injekcije:

b) nakon približno 2 - 3 minute:

c) nakon približno 6 - 10 minuta:

Uporedite učinke i.p. primjene 5 mg/kg i 15 mg/kg haloperidola u miša.

Tema za raspravu:

Antipsihotici u kliničkoj medicini i nekliničkim istraživanjima.

Zadatak 5: Morfin i metoda „vruće ploče“ (engl. hot-plate method)

Što je morfin? Opišite mehanizam djelovanja i učinke morfina na organske sustave u čovjeka.

Opišite učinke primjene različitih doza morfin-sulfata u miša.

a) Doza: 40 mg/kg i.p.:

b) Doza: 60 mg/kg potkožno:

c) Doza: 100 mg/kg i.p.:

FAZA 1:

FAZA 2:

FAZA 3:

Opišite učinke i.p. primjene 30 mg/kg morfina u kunića koji se očituju nakon:

a) približno 2 minute:

b) približno 10 - 15 minuta:

c) približno 20 – 27 minuta:

Opišite metodu „vruće ploče“ (engl. *hot-plate method*).

Opišite ponašanje miša u testu „vruće ploče“ pod utjecajem morfina, NaCl i fenilbutazona.

Tema za raspravu:

Opijati u kliničkoj medicini i nekliničkim istraživanjima.

Zadatak 6: Pilocarpin i atropin

Kojim skupinama lijekova pripadaju pilokarpin i atropin?

Opišite mehanizme djelovanja i učinke pilokarpina i atropina u čovjeka?

Opišite učinke intravenske (i.v.) primjene 20 mg/kg pilokarpina u kunića koji se očituju:

a) ubrzo nakon injekcije:

b) nakon približno 1 minute:

c) nakon približno 2 minute:

d) nakon i.v. aplikacije 1 mg/kg atropina:

Opišite učinke i.p. primjene:

- a) 100 mg/kg pilokarpina u štakora koji se očituju ubrzo nakon injekcije:

- b) 100 mg/kg pilokarpina u štakora koji se očituju nakon približno 3 - 5 minuta:

- c) 100 mg/kg pilokarpina u štakora koji se očituju nakon približno 5 - 8 minuta:

- d) 10 mg/kg pilokarpina u štakora koji se očituju nakon i.v. aplikacije 20 mg/kg atropina
 - 1) neposredno nakon injekcije:

 - 2) nakon približno 5 minuta:

Tema za raspravu:

Antikolinergici u kliničkoj medicini i nekliničkim istraživanjima.

Zadatak 7: Nikotin i tubokurarin

Navedite lokalizacije nikotinskih receptora i učinke koji nastaju kao posljedica njihove stimulacije u čovjeka?

Opišite učinke sublingvalne primjene 8 mg/kg nikotina u štakora koji se očituju:

a) nakon aplikacije:

b) nakon približno 3 - 5 minuta:

Što je tubokurarin? Opišite mehanizam djelovanja i učinke tubokurarina?

Opišite učinke i.v. primjene 0,15 mg/kg tubokurarina u kunića koji se očituju neposredno nakon injekcije.

Tema za raspravu:

Nikotinski kolinergički receptori: fiziologija i farmakologija.



Modul Anestezija (*Anesthesia*)

Suzana Mimica Matanović, Josip Čulig, Željko Jovanović,
Željko Debeljak, Aleksandar Včev, Sonja Šarčević,

I. Uvod

Opća anestezija je lijekovima uzrokovan gubitak svijesti, uz analgeziju, amneziju, inhibiciju senzoričkih i autonomnih refleksa te relaksaciju skeletnih mišića. Opći se anestetici dijele na one koji se primjenjuju intravenski i na one koji se primjenjuju inhalacijski.



Slika 32. Glavni izbornik programa Microlabs.

Intravenski anestetici se primjenjuju samostalno ili u kombinaciji s drugim anestheticima ili analgeticima. U ovu se skupinu anestetika ubrajaju: barbiturati (npr. tiopental), benzodiazepini (npr. midazolam), opioidni analgetici (npr. fentanil, alfentanil), ketamin, propofol, te ostali sedativi-hipnotici (npr. etomidat).

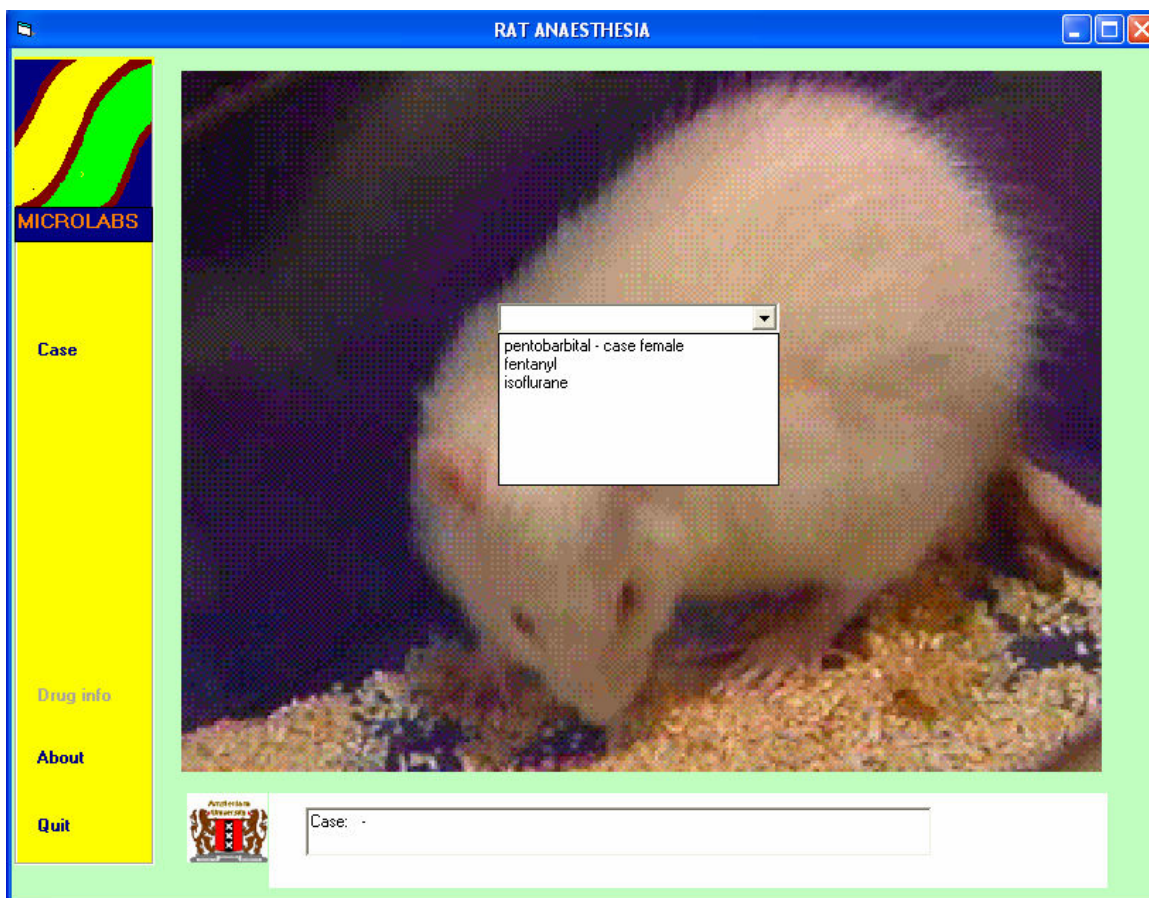
Inhalacijski anestetici se dijele na one koji su hlapive tekućine (npr. halotan, izofluran, sevofluran) te na plinove (npr. dušični oksidul, N_2O). Hlapive tekućine se primjenjuju kao aerosoli, putem uređaja za isparivanje. Dušični oksidul je pri sobnoj

temperaturi inertni plin, koji se koristi uglavnom kao pomoćno sredstvo, tj. kao prijenosnik za druge anestetike.

Microlabs virtualna vježba prikazat će djelovanje tri vrste anestetika (pentobarbitala, fentanila i izoflurana) na životinju. Pri tome je moguće izravno pratiti promjene u ponašanju životinje, promjene vitalnih znakova (rad srca i disanje) te gubitak pojedinih refleksa. U samom računalnom programu bit će prikazano i kojim putem se pojedini anestetik primjenjuje te koja je preporučena doza za pojedini put primjene. Primjenom različitih doza, prati se učinak ovisan o dozi. Na ovaj se način slikovito može razumjeti učinak općih anestetika na čovjeka, kao i stupnjevi te dubina anestezije.

Na početku vježbe, klikom na riječ „*Anesthesia*“ (anestezija) u glavnom izborniku s lijeve strane izabire se poglavlje Microlabsa iz područja primjene općih anestetika (Slika 32). Pojavljuje se prozor „*Rat anaesthesia*“ (anestezija u štakora), a s lijeve strane potrebno je izabrati riječ „*Case*“ (slučaj).

Nakon toga se pojavljuje riječ „*RAT*“ (štakor), a klikom na strelicu pored te riječi može se izabrati između slučajeva s primjenom pentobarbitala, fentanila i izoflurana (Slika 33).

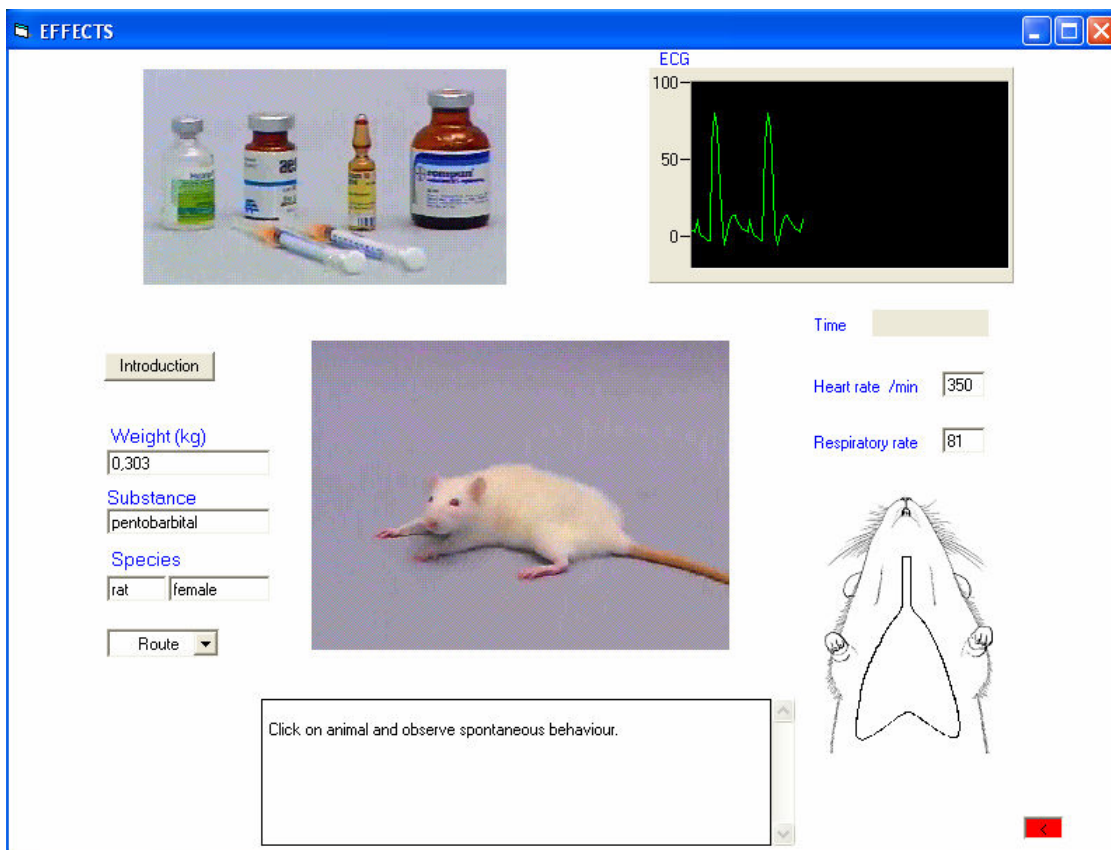


Slika 33. Odabir anestetika.

II. Primjena pentobarbitala

Pentobarbital je kratkodjelujući oksibarbiturat. Može se primijeniti sam ili u kombinaciji s analgetikom. Ako se primjenjuje intravenski, potrebno je dati približno 50-75 % izračunate doze. Životinja će izgubiti svijest unutar nekoliko minuta, a tome može prethoditi kratko razdoblje ekscitacije. Kada se opuste mišići vilice, životinju je potrebno intubirati. Ako se lijek primjenjuje intraperitonealno, obično se daje cjelokupna planirana doza, a kirurški se zahvat može započeti ako životinja izgubi pedalni refleks (životinju uštignemo za kožu između prstiju). Anestezija pentobarbitalom traje 45-120 minuta, ovisno o primijenjenoj dozi.

Kada se izabere anestezija pentobarbitalom, s lijeve strane pojavljuje se crveno obojani tekst „*Start anesthesia*“ (započni anesteziju), ispod koje je crvena strelica na koju je potrebno kliknuti. Nakon toga otvara se sljedeći prozor, Slika 34.



Slika 34. Prikaz sučelja modula Anesthesia.

U desnom gornjem kutu može se vidjeti EKG koji prikazuje prosječnu srčanu frekvenciju u štakora. Desno dolje nalazi se shematski prikaz rada srca štakora te brojčani prikaz prosječne frekvencije disanja i rada srca u štakora (srčana frekvencija u štakora varira između 320 i 480 otkucaja u minuti, a brzina disanja između 85 i 110 udisaja u minuti).

Ispod fotografije štakora nalazi se uputa „*Click on animal and observe spontaneous behaviour*“ (klikni na sliku životinje i promatraj spontano ponašanje životinje). Ako se mišem dođe do slike životinje, umjesto uobičajene strelice miša na određenim se mjestima pojavljuje znak u obliku ruke i klikom se otvara video prikaz životinje u kavezu koja se ponaša uobičajeno, hoda i povremeno uspinje na stražnje noge.

S lijeve strane može se kliknuti na kvadratić „*Introduction*“ (uvod); otvara se video zapis u kojem je prikazan postupak anestezije uz primjenu pentobarbitala:

1. korak: utvrđivanje težine štakora vaganjem;
2. korak: intraperitonealna primjena anestetika, 30 mg/kg za plitku anesteziju i 40-50 mg/kg za duboku kiruršku anesteziju;
3. korak: odsutnost refleksa (uključujući i pedalni i kornealni refleks), što upućuje na anesteziju;
4. korak: kontrola tjelesne temperature i stavljanje zaštita na oči.

Ispod kvadratića „*Introduction*“ (engl. uvod) može se unijeti težina štakora i put primjene. Naziv lijeka (pentobarbital) i vrstu životinje (ženka štakora) nije potrebno mijenjati. Kod izbora puta primjene (intravenski (i.v.), intramuskularni (i.m.), peroralni (p.o.), supkutani (s.c.), intraperitonealni (i.p.) ili u obliku infuzije), ispod fotografije životinje pojavit će se pravokutnik koji sadrži podatak o preporučenoj dozi za taj način primjene, u mg/kg. Tako je, primjerice, kod i.v. primjene potrebno primijeniti 25 mg/kg, kod p.o. primjene 50 mg/kg, a kod i.p. primjene 40-50 mg/kg.

Primjena anestetika

Ako se izabere i.v., i.p., s.c. ili i.m. način primjene, pored će se pojaviti kvadratić „*show*“ (prikaži), klikom na koji se pojavljuje kratki video prikaz o toj vrsti primjene u štakora:

Ako izaberemo intravenski put primjene, klikom na „*show*“ (prikaži) pojavljuje se video prikaz koji opisuje primjenu lijeka u repnu venu štakora. U video prikazu se navodi kako je intravenska injekcija u repnu venu najčešći način intravenske primjene lijeka u štakora. Prije intravenske injekcije u repnu venu potrebna je priprema, odnosno rep se uroni u toplu vodu pri temperaturi od 41°C, kako bi došlo do vazodilatacije. Nakon što se stekne iskustvo s ovakvom primjenom, prethodna priprema nije potrebna.

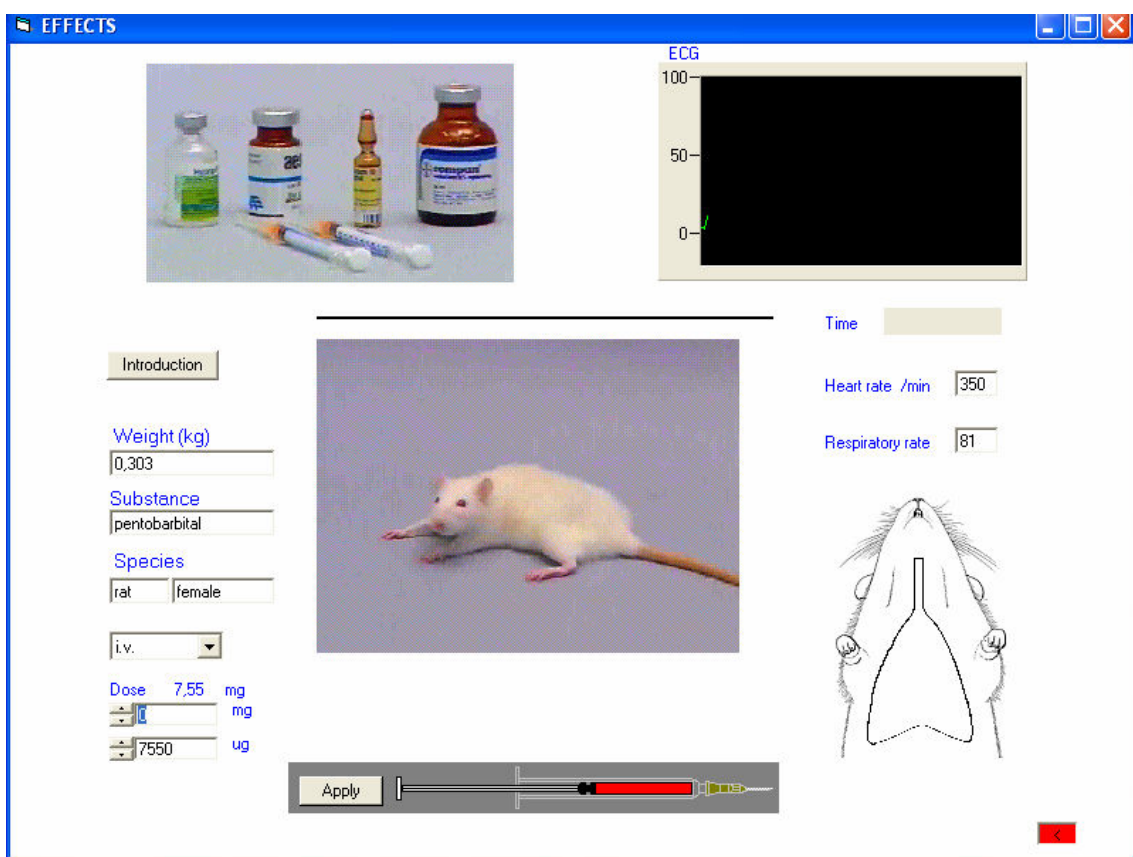
Nakon što se izabere intraperitonealni put primjene, pojavljuje se video u kojem je prikazano kako je životinju potrebno držati s glavom prema dolje tijekom aplikacije. Prikazan je i shematski prikaz ventralnog donjeg dijela životinje, uz uputu kako se injekcija primjenjuje u lijevi donji kvadrant abdomena.

Kod supkutane primjene, navodi se kako optimalna mjesta za primjenu stražnja strana vrata i područje bokova. Kod primjene se koža uhvati prstima tako da se stvori trokut kože, u koji se potom injicira lijek.

Kod intramuskularne primjene lijek se primjenjuje u mišić biceps femoris. Nožica štakora se pridržava lijevom rukom, a četvrtim ili petim prstom desne ruke se prije aplikacije pronađu konture mišića. Prije injiciranja lijeka potrebno je izvršiti aspiraciju, kako bismo se uvjerali da igla nije u krvnoj žili.

U program je već unesena tjelesna težina štakora (npr. 0,302 kg), koju ćemo koristiti pri izračunavanju doze lijeka. Tjelesna težina je parametar koji možemo mijenjati, vodeći računa o tome kako je prosječna težina ženke štakora od 250 do 300 grama.

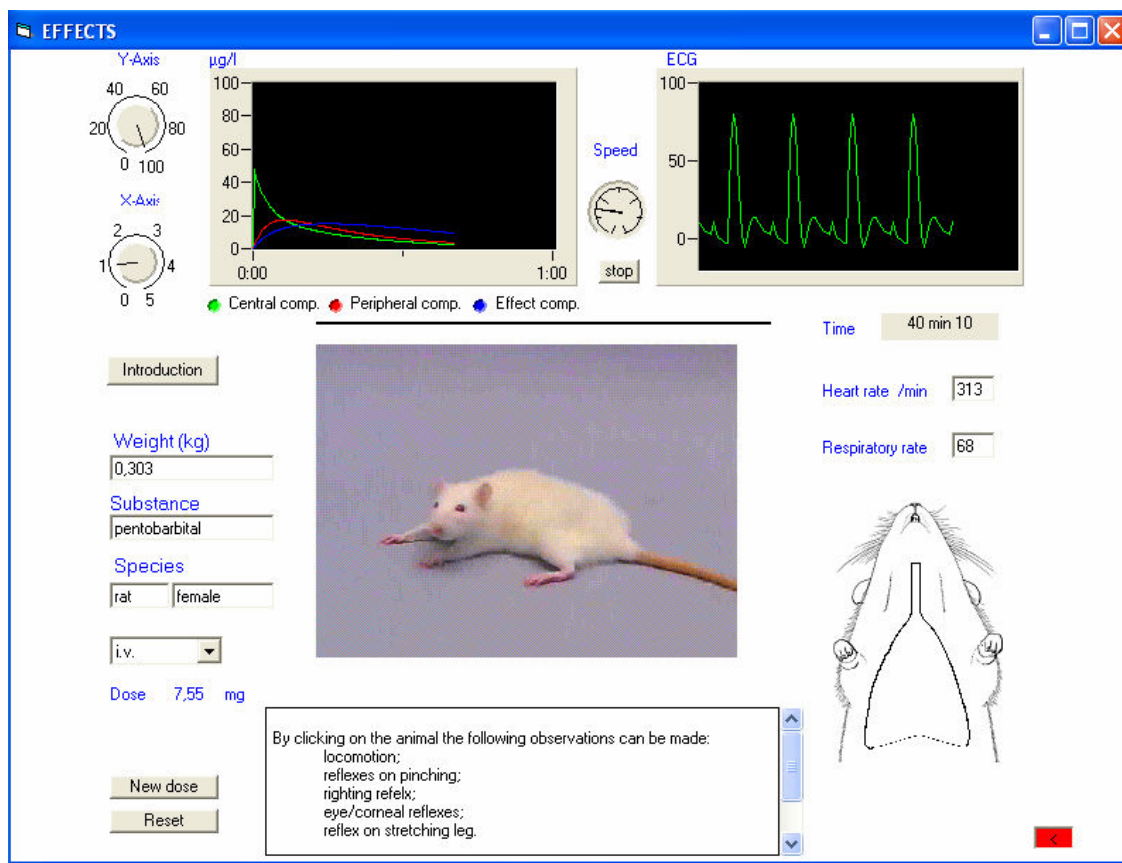
Ako izaberemo intravenski put primjene, to znači da ćemo primijeniti 7,55 mg (0,302 kg $\times$ 25 mg/kg). Unijet ćemo 7550 mikrograma u dio gdje se upisuju mikrogrami (moraju se upisivati cijeli brojevi, pa u gornji dio gdje se upisuju miligrami ne možemo unijeti broj koji sadrži decimale) (Slika 35).



Slika 35. Odabir doze anestetika.

Potom ćemo na injekciju ispod video prikaza kliknuti „*apply*“ (primijeni). U gornjem lijevom dijelu ekrana pojavljuje se grafički prikaz koncentracije lijeka u određenom vremenu u tri odjeljka : središnjem odjeljku - krvotoku (zelena crta), perifernom odjeljku – perifernim tkivima (crvena crta) i efektivnom odjeljku – središnjem živčanom sustavu (plava crta). Lijevo od grafičkog prikaza nalaze se dva kruga pokretom kojih se može mijenjati veličina X i Y osi.

Također, moguće je pratiti i vrijeme koje je proteklo od početka primjene, kao i promjene frekvencije rada srca i frekvencije disanja životinje u ovisnosti o koncentraciji lijeka (Slika 36).



Slika 36. Praćenje učinka primijenjenog anestetika.

Odmah po intravenskoj primjeni u središnjem se odjeljku nalazi maksimalna koncentracija lijeka (50 µg/l). Istodobno s padom koncentracije u središnjem odjeljku, povećava se koncentracija lijeka u perifernom i efektivnom odjeljku. Nakon približno 15 minuta postignuta je maksimalna koncentracija u efektivnom odjeljku, brzina rada srca iznosi 295/min, a frekvencija disanja 62/min. Između prikaza EKG-a i prikaza koncentracije lijeka u vremenu nalazi se kružić ispod kojega piše „speed“ (brzina), a ukoliko ga okrenemo u smjeru kazaljke na satu, ubrzavamo proces učinka lijeka na životinju.

Ispod fotografije životinje, u pravokutniku, nalazi se uputa da se klikom na životinju može pratiti djelovanje anestetika i dubina anestezije, tj. utjecaj lijeka na kretanje, refleks štipanja, refleks uspravljanja, refleks zatvaranja oka, kornealni refleks te refleks istežanja noge. (Napomena: nakon što se na video snimci pogleda određena promjena, potrebno je video zatvoriti prije nego se pogleda druga promjena).

Tijekom praćenja učinka lijeka potrebno je u pravilnim razmacima kliknuti mišem na sliku životinje kako bi se učinci trajno pratili.

U početku, dok se nakon intravenske aplikacije na mjestu djelovanja nalazi mala koncentracija lijeka, klikom na životinju (pojavljuje se riječ „locomotion“, kretanje)

može se vidjeti kako je životinja mirna i kako trza stražnjim nogama, zbog ekscitacijskog učinka anestetika. Približno 4 minute nakon primjene može se vidjeti da je životinja smirena, ali još uvijek ima očuvan refleks ustajanja (životinja postavljena na leđa okreće se natrag na noge), refleks istežanja noge (kod istežanja stražnje noge se životinja izmakne), refleks štipanja (kod štipanja kože pincetom dolazi do fleksije ekstremiteta i životinja izmakne nogu), pedalni refleks (kod štipanja kože između prstiju dolazi do fleksije ekstremiteta i životinja izmakne nogu) te kornealni refleks i refleks zatvaranja oka (zatvaranje oka nakon podražaja rožnice ili kuta oka). Nakon što koncentracija lijeka u efektivnom odjeljku dostigne vrijednost od približno 20 µg/l, životinja je anestetizirana, gubi refleks ustajanja, refleks štipanja, refleks istežanja noge, refleks zatvaranja oka, ali je još uvijek očuvan kornealni refleks. Ovo je stadij kirurške anestezije, u kojemu se obavljaju kirurški zahvati.

Druga doza lijeka

I u našoj vježbi možemo primijeniti dodatnu dozu lijeka. U donjem lijevom kutu možemo kliknuti na pravokutnik „*new dose*“ (nova doza) i primjerice, nakon 5 minuta od prvobitne intravenske injekcije dati još jednu dozu od 5 mg. Na zelenoj krivulji koja pokazuje koncentraciju u središnjem odjeljku, vidjet ćemo još jedan nagli „skok“ koncentracije. Koncentracija u središnjem odjeljku imat će više vršne vrijednosti (preko 20 µg/l) u usporedbi s prethodnim primjerom, kada je životinja jednokratno dobila 7,55 mg.

Ukoliko odmah na početku damo dvostruku intravensku dozu lijeka u odnosu na preporučenu, životinji ćemo dati potencijalno letalnu dozu. U donjem lijevom kutu kliknemo na pravokutnik „*reset*“ (vрати na prvobitno stanje) i možemo ponovno izabrati dozu i put primjene. Izaberemo dozu od 15 mg odnosno 15000 µg i apliciramo. Za razliku od prethodnog primjera, životinja puno prije, već nakon 2 minute polako počinje gubiti reflekse, koji se već nakon približno 4 minuta potpuno gube, uključujući i kornealni refleks. Frekvencija srca i disanja u stalnom je padu. Približno 15 minuta nakon primjene, kod koncentracije u efektivnom odjeljku iznad 30 µg /l, na ekranu se pojavljuje informacija da je životinja uginula zbog predoziranja.

Kod obrnutog primjera, odnosno subdoziranja, npr. s 2 mg pentobarbitala intravenski (približno 6,6 mg/kg), koncentracija na mjestu djelovanja je preniska (efektivni odjeljak) i iznosi manje od 5 µg /l. Ako promatramo kretanje životinje na video prikazu, ono ne odstupa previše od uobičajenog: životinja se kreće po kavezu i uspinje na stražnje noge. U jednom kratkom razdoblju, nakon 15 minuta, životinja trza stražnjim nogama, što znači da anestetik počinje blago djelovati, ali nakon toga se ponovno prikazuje spontano kretanje po kavezu.

Općenito, kod plitke anestezije životinja će biti relaksirana, ali će reagirati na bolne podražaje pokretom, porastom frekvencije srca i disanja te porastom krvnog tlaka. Refleksi štipanja i istežanja bit će prisutni, kao kornealni refleks i refleks zatvaranja oka.

Kod odgovarajuće dubine anestezije, tj. kod stadija kirurške anestezije, mišići će biti relaksirani, a životinja bez svijesti. Refleksi istežanja i štipanja neće biti prisutni, kao ni refleks zatvaranja oka. Kornealni refleks i dalje će biti prisutan (ovaj se refleks

obično, iako ne uvijek, gubi kod preduboke anestezije!). U ovom stadiju su obično frekvencija rada srca i disanja te krvni tlak unutar normalnog raspona ili blago sniženi. Porast bilo kojeg od ova tri pokazatelja znak je kako životinja nije dovoljno anestezirana, odnosno, kako mora primiti dodatnu dozu lijeka.

Kod preduboke anestezije frekvencija rada srca i disanja će biti značajno usporene i značajno ispod uobičajenog raspona; krvni tlak će također značajno biti snižen. Ukoliko se ne prekine primjena anestetika i ne primijene odgovarajuće potporne mjere, može doći do smrtnog ishoda.

Navedena opažanja se mogu ekstrapolirati i na podjelu opće anestezije na 4 glavna stadija u čovjeka, koja se temelje na mogućnosti pokreta, brzini i ritmu disanja, okulomotornim refleksima i tonusu mišića:

Prvi stadij: pacijent je pri svijesti, osjet boli je smanjen; traje do trenutka dok pacijent ne izgubi svijest i obično se naziva i stadijem analgezije;

Drugi stadij: pacijent gubi svijest, disanje je nepravilno, zjenice proširene, tijelo pojačano odgovara na stimulaciju; ovaj se stadij naziva i stadijem ekscitacije ili delirija, a traje sve dok se ponovno ne uspostavi normalan ritam disanja;

Treći stadij nazivamo i stadijem kirurške anestezije; dolazi do relaksacije mišića; ovaj je stadij cilj primjene općih anestetika i potreban je oprez kako dubina anestezije ne bi napredovala do četvrtog stadija;

Kod četvrtog stadija, koji nazivamo i stadijem depresije produžene moždine, dolazi do depresije respiracijskog i kardiovaskularnog centra u produženoj moždini. Kao posljedica se javlja kardiovaskularni i respiracijski kolaps s mogućim smrtnim ishodom.

Drugi način primjene lijeka

Nakon intravenske primjene, možemo životinji lijek primijeniti intraperitonealno. Kada izaberemo intraperitonealni način primjene, u prostoru ispod video zapisa životinje dobivamo podatak kako preporučena doza iznosi 40-50 mg/kg i stoga ćemo aplicirati 15 mg lijeka. Koncentracija u središnjem (liječ se mora apsorbirati!) i u efektivnom odjeljku nešto sporije raste, tako da se tek nakon 2 minute primjećuje usporenje motorike i trzanje stražnjim nogama, nakon 4 minute životinja je sedirana, ali uz još uvijek prisutne reflekse ustajanja, istezanja i štipanja. Nakon približno 5 i pol minuta usporava se frekvencija rada srca i disanja, životinja gubi refleks zatvaranja oka i kornealni refleks te reflekse ustajanja, istezanja i štipanja, a vidljivo je kako se u tom trenutku koncentracija na mjestu djelovanja, u efektivnom odjeljku, približava vrijednosti od oko 20 mikrogama/l.

Zadatak za studente:

U vježbi je potrebno osigurati da životinja barem 20 minuta bude u stadiju kirurške anestezije. Svi se parametri moraju redovito pratiti, a ukoliko se primijeti da se životinja budi iz anestezije tijekom kirurškog zahvata i da anestezija postaje plića, potrebno je primijeniti novu dozu pentobarbitala.

III. Primjena fentanila

Nakon što zatvorimo program u prethodnom primjeru, vraćamo se ponovno na početak, na mjesto gdje ćemo ovaj put izabrati primjenu fentanila. Fentanil je opioidni analgetik s visokim afinitetom za μ -opioidne receptore. Može se koristiti kao samostalan anestetik ili kao dodatak drugim anestheticima. Nastup učinka je brz. Međutim, maksimalni učinak na smanjenje boli te na depresiju disanja ponekad se primjećuje tek nakon nekoliko minuta. Dubina analgezije je ovisna o dozi i može se prilagoditi intenzitetu boli tijekom zahvata. Fentanil ima puno veći terapijski indeks u odnosu na morfin (tj. odnos LD_{50}/ED_{50})

S lijeve strane ekrana ponovno će se pojaviti crveno obojani tekst „*Start anesthesia*“ (započni) ispod koje je crvena strijelica na koju je potrebno kliknuti. Nakon toga otvara se prozor jednak kao kod prethodnog primjera s pentobarbitalom (Slika 34).

S lijeve strane može se ponovno kliknuti na kvadratić „Introduction“ (engl. uvod): otvara se video zapis u kojem je prikazan nastup anestezije nakon primjene opijatnog anestetika fentanila, u kombinaciji s fluanisonom, tipičnim antipsihotikom iz skupine butirofenona, te intravenskim benzodiazepinom midazolamom (tzv. FFM kombinacija: primjenjuje u općoj anesteziji životinja, a ima određene prednosti pred drugim vrstama anestezije, kao što je bolja prokrvljenost perifernih tkiva). Kombinacija fentanila s tipičnim antipsihoticima (npr. droperidol) naziva se neuroleptanalgezija, a dovodi do sedacije i analgezije uz očuvanu svijest.

Na video prikazu možemo vidjeti:

1. korak: utvrđivanje težine štakora vaganjem;
2. korak: intravenska primjena fentanila (dovodi do analgezije) te fluanisona i midazolama (dovode do sedacije);
3. korak: odsutnost refleksa (uključujući i pedalni te kornealni refleks), što upućuje na anesteziju;
4. korak: kontrola tjelesne temperature i postavljanje zaštite na oči.

Slično kao i kod prethodnog primjera s pentobarbitalom može se kliknuti na životinju i promatrati njezino uobičajeno ponašanje, hodanje po kavezu i uspinjanje na stražnje noge.

Fentanil se primjenjuje samo intravenskim putem, a odabirom ovog načina primjene na ekranu se pojavljuje podatak da je preporučena doza ovog lijeka 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U slučaju kada je težina životinje npr. 0,287 kg preporučena je doza 14,35 μg intravenski ($0,287 \text{ kg} \times 50 \mu\text{g}/\text{kg}$). Unijet ćemo približnu veću vrijednost 15 μg jer možemo upisati samo cijeli broj, bez decimala. Ponovno ćemo pokrenuti video prikaz koji pokazuje intravensku primjenu u repnu venu štakora. Nakon što zatvorimo video prikaz, kliknut ćemo na injekciju (na „*apply*“, primijeni).

Ponovno ćemo pratiti kretanje životinje, reflekse te rad srca i disanje. Neposredno nakon intravenske primjene, možemo primijetiti kako životinja postaje mirnija i trza stražnjim nogama, a već minutu nakon primjene životinja gubi reflekse i ulazi u stadij kirurške anestezije, uz usporenje frekvencije rada srca i disanja. Pri tome je koncentracija lijeka u efektivnom odjeljku značajno niža nego kod primjene fenobarbitala, iz čega zaključujemo kako je riječ o vrlo potentnom lijeku.

Ukoliko primijenimo previsoku dozu lijeka (npr. 14,35 mg, tj. 14350 µg) pojavit će se informacija: „*Your animal died by overdose*“ (Vaša je životinja uginula zbog predoziranja). Klikom na „*reset*“ (ponovno pokreni) program se vraća na početak te možemo upisati novu dozu koju ćemo primijeniti.

Zadatak za studente:

U vježbi je potrebno osigurati da životinja barem 20 minuta bude u stadiju kirurške anestezije. Svi se parametri moraju redovito pratiti, a ukoliko se primijeti da se životinja budi iz anestezije tijekom kirurškog zahvata i da anestezija postaje plića, potrebno je primijeniti novu dozu fentanila.

IV. Primjena izoflurana

Treći primjer odnosi se na primjenu inhalacijskog anestetika izoflurana. Vraćamo se na dio programa gdje je navedeno „*Start anesthesia*“ (započni anesteziju), kliknemo na crvenu strelicu i izaberemo izofluran („*isoflurane*“). Nakon toga otvara se prozor identičan kao kod prethodna dva primjera (Slika 34).

Ponovno ćemo kliknuti na „*Introduction*“ (uvod): otvara se video u kojem je prikazan nastup anestezije nakon primjene izoflurana u kombinaciji s dušičnim oksidulom (N_2O) i kisikom (O_2). N_2O je slabi anestetik, često se koristi kao prijenosnik za druge inhalacijske anestetike). Video prikazuje sljedeće korake:

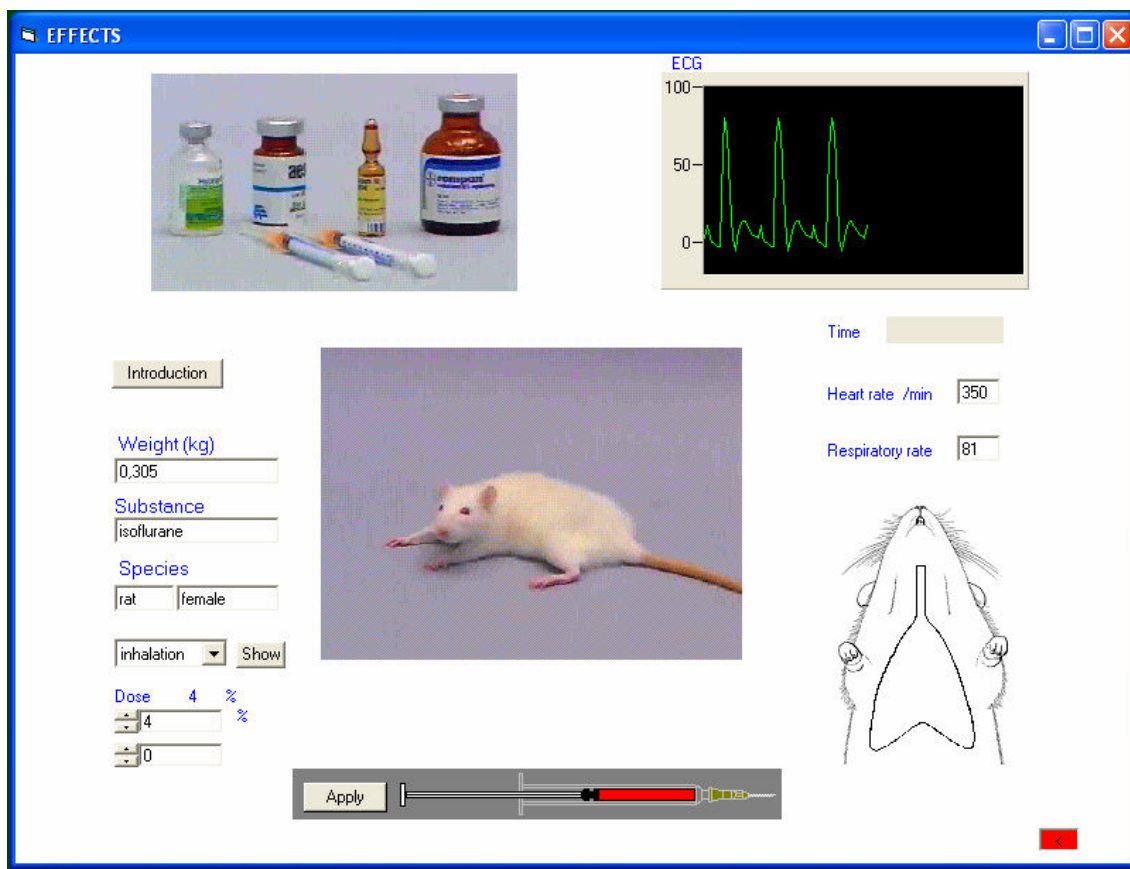
1. korak: utvrđivanje težine štakora vaganjem;
2. korak: ulazak izoflurana u zrak u kavezu: mogu se pratiti faze od ataksije do anestezije;
3. korak: praćenje refleksa, čija odsutnost upućuje na anesteziju;
4. korak: kontrola tjelesne temperature i postavljanje zaštite na oči.

Izofluran je lako hlapiva tekućina, a pripada skupini općih anestetika koji se primjenjuju putem inhalacije. Indukcija anestezije i oporavak su vrlo brzi. Preporučena doza se određuje na drugačiji način: izražava se u postotcima alveolarne koncentracije. Za indukciju anestezije potrebna je alveolarna koncentracija od 4 %, a za održavanje anestezije 1-2 %.

Klikom na „*show*“ (prikaži) prikazuje se video prikaz koji opisuje uređaje koji su potrebni za primjenu inhalacijskih anestetika. Opisuje se primjena kisika, N_2O i inhalacijskog anestetika halotana, ali se isto načelo primjenjuje i ako se umjesto halotana primjeni izofluran: boce koje sadrže kisik i dušični oksidul, uređaj za mjerenje protoka ovih plinova, uređaj za vlaženje zraka, komora za anestetik, trosmjerni zalistak, maska i uređaj za isparavanje.

Nakon što zatvorimo ovaj video prikaz, unijet ćemo postotak anestetika od 4 % (Slika 37). Životinja će već nakon jedne minute izgubiti reflekse i ući u stadij kirurške anestezije. Ako ne smanjimo postotak anestetika, životinja će ubrzo ući u preduboku anesteziju i uginuti zbog predoziranja. Stoga moramo odmah nakon što je životinja izgubila reflekse kliknuti na „*new dose*“ (nova doza) i primijeniti 1 % ili 2 % anestetika, kako bi se i dalje održao stadij kirurške anestezije.

S obzirom da su koncentracije lijeka u pojedinim odjeljcima vrlo niske, potrebno je podesiti Y os okretom odgovarajućeg kruga obrnuto od kazaljke na satu (Slika 36).



Slika 37. Primjena inhalacijskog anestetika.

Zadatak za studente:

U vježbi je potrebno osigurati da životinja barem 20 minuta bude u stadiju kirurške anestezije. Svi se parametri moraju redovito pratiti. Potrebno je pažljivo mijenjati vrijednosti alveolarne koncentracije anestetika te promatrati postignuti učinak na životinji.



LITERATURA

- Basic and Clinical Pharmacology; Bertram G. Katzung; McGraw-Hill Medical; 11th edition, 2009.
- Pharmacology; Humphrey P. Rang, Maureen M. Dale, James M. Ritter, Phillip K. Moore; Churchill Livingstone; 5th edition, 2003.
- Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Bjorn Christian Knollmann; McGraw-Hill Professional; 12th edition, 2010.
- A Pharmacology Primer; Terry Kenakin; Academic Press; 3rd edition, 2009.
- Principles of Clinical Pharmacology; Arthur J. Atkinson Jr, Darrell R. Abernethy, Charles E. Daniels, Robert Dedrick, Sanford P. Markey; Academic Press; 2nd edition, 2006.
- Pharmacology: Principles and Practice; Miles Hacker, William S. Messer II, Kenneth A. Bachmann; Academic Press; 1st edition, 2009.
- Basic Pharmacokinetics; Sunil S. Jambhekar, Philip J. Breen; Pharmaceutical Press; 1st edition, 2009.
- Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists; Younggil Kwon; Springer; 1st edition, 2001.
- Pharmacokinetics Made Easy, Revised; Donald J. Birkett; McGraw-Hill Book Company Australia; 1st edition, 2002.