

Autor: Anna Gonciarz-Dytman

Tytuł pracy: Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej do oceny wiązania leków z białkami krwi

Promotor pracy: Dr hab. Maria Walczak

Streszczenie

Wiązanie leków z białkami krwi jest istotnym procesem wpływającym na profil farmakokinetyczny oraz przewidywanie działania w organizmie. Zgodnie z hipotezą „wolnego leku” tylko frakcja wolna, niezwiązana z białkami krwi może dyfundować przez błony biologiczne i docierać do miejsca działania wywierając efekt farmakologiczny.

W ostatnich latach do oceny właściwości fizykochemicznych oraz badania profilu ADME nowych związków o udowodnionej aktywności biologicznej, wprowadzono nowe wysokowydajne techniki, w przypadku których zasadnicze znaczenie odgrywa czas oraz koszt analizy, przy jednoczesnym zapewnieniu wiarygodności uzyskanych wyników. W wymogi te wpisuje się elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej (CE/FA).

Celem podjętych badań było opracowanie i walidacja metod rozdzielania i oznaczania wolnej frakcji deksametazonu (DXM) oraz prawastatyny (PRA) z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz dializy równowagowej (ED) w połączeniu ze strefową elektroforezą kapilarną (CZE). Wyniki oznaczeń posłużyły do oceny wiązania tych leków z albuminą wołową (BSA), albuminą ludzką (HSA) oraz kwaśną α_1 -glikoproteiną (AGP) oraz porównania CE/FA z ED, jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono termodynamikę procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z albuminą wołową i ludzką.

CE/FA zastosowano do oceny wiązania z albuminą i kwaśną α_1 -glikoproteiną związków o aktywności śródbłonkowej, takich jak 1-metylopirydyna, 1,4-dimetylopirydyna, kwas nikotynowy, nikotynamid, N-metylonikotynamid, związków o akronimach C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590, V-Pyrro/NO i V-Proli/NO. Ponadto oceniono zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi badanych związków, a stopniem ich wiązania z białkami krwi.

Stopień wiązania badanych leków z białkami krwi znalazł potwierdzenie w dostępnych danych literaturowych. Wiązanie DXM z albuminą było równe 70-90%, a stała wiązania klasyfikuje DXM do leków o średnim powinowactwie do tego białka. Wiązanie

PRA z albuminą wynosiło 40-50%, a stała wiązania pozwala na zaliczenie PRA do leków o niskim powinowactwie do albuminy.

Elektroforezę kapilarną i dializę równowagową można uznać za techniki równocenne. Nie stwierdzono istotnych różnic w procesie wiązania obu leków z albuminą ludzką i wołową, wskazując, że albumina wołowa może być z powodzeniem stosowana, jako zamiennik albuminy ludzkiej w badaniach wiązania substancji z białkami krwi.

CE/FA z uwagi na możliwość wykonywania oznaczeń w różnych temperaturach może być z powodzeniem stosowana do wyznaczania podstawowych funkcji termodynamicznych i oceny termodynamiki interakcji pomiędzy związkiem a białkiem. Ujemne wartości entalpii swobodnej dla wiązania DXM i PRA z albuminą ludzką i wołową wskazują na samorzutność tych procesów. Dodatkowo zmiany entropii i entalpii wskazują, iż zachodzące reakcje mają charakter endotermiczny, a wiązanie tych leków białkami krwi ma charakter hydrofobowy.

Spośród badanych związków o aktywności śródbłonkowej z albuminą wołową wiązał się kwas nikotynowy (od $48.69 \pm 2.46\%$ do $83.72 \pm 6.95\%$), związek C-2551 (od $11.59 \pm 1.62\%$ do $31.20 \pm 3.76\%$), związek C-2590 (od $16.59 \pm 0.24\%$ do $33.12 \pm 3.34\%$) oraz V-Proli/NO (od $43.26 \pm 2.65\%$ do $60.63 \pm 0.75\%$) i V-Pyrro/NO (od $21.28 \pm 1.02\%$ do $29.70 \pm 4.29\%$). Żaden z badanych związków nie wiązał się z AGP w stopniu większym od 10% w zakresie użytych stężeń.

Badane związki różniły się siłą wiązania z BSA zależnie od ich charakteru chemicznego. Związki C-2551 i C-2590 cechowało niskie powinowactwo do BSA (stałe wiązania rzędu 10^2 M^{-1}), natomiast kwas nikotynowy, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO cechowało średnie powinowactwo (stałe wiązania rzędu $10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1}$) do tego białka. Związki będące przedmiotem badań charakteryzowały się odmienną stechiometrią wiązania z albuminą wołową. Związki C-2551, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO wiązały się z jedną klasą miejsc wiążących, przy liczbie miejsc wiązania równej odpowiednio 2.30 ± 0.95 , 0.92 ± 0.54 oraz 0.73 ± 0.42 , związek C-2590 wiązał się z jedną klasą miejsc wiążących przy współlistnieniu wiązania niespecyficznego ($n=2.30 \pm 0.95$), natomiast kwas nikotynowy wiązał się z dwoma klasami miejsc wiążących ($n_1=1.12 \pm 0.13$, $n_2=0.30 \pm 0.15$).

Związki będące przedmiotem badań cechowały się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi. Charakter hydrofilowy wykazywały 1-MP, 1.4-DMP, MNA, C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 oraz C-2590, natomiast właściwości lipofilowe posiadały V-Pyrro/NO, V-Proli/NO, PRA, DXM, kwas nikotynowy i nikotynamid. Wraz ze wzrastającą lipofilowością i kwasowością związków zwiększało się ich wiązanie z albuminą wołową.

Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej jest przydatnym narzędziem do przesiewowej oceny wiązania substancji z białkami krwi. Zaletą CE/FA nad ED jest możliwość bezpośredniego pomiaru stężenia wolnej frakcji związków bez konieczności wcześniejszej separacji z użyciem odpowiednich błon dializacyjnych. Takie podejście z uwagi na niewielkie zużycie odczynników, automatyzację pomiarów oraz dużą przepustowość aparatury znacznie skraca czas i obniża koszt oznaczenia próbki, pozwalając na oznaczanie związków o różnorodnych właściwościach fizykochemicznych.