

ZORZI ALESSANDRO

UNIVERSITA' DI PADOVA

LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E CHIRURGIA

A.A. 2005/2006

APPUNTI DI FARMACOLOGIA GENERALE

*Farmacocinetica descrittiva, farmacocinetica quantitativa,
farmacodinamica e tossicologia*



*appunti personali del corso tenuto dalla prof. Dabbeni Sala nel corso del primo semestre
dell'A.A. 2005/2006*

Ai miei compagni:

Al fine di evitare spiacevoli inconvenienti si specifica che questa dispensa contiene esclusivamente i MIEI APPUNTI, i quali non sono mai stati sottoposti all'attenzione del docente nè da lei convalidati. Per questo motivo essi non possono per nulla ritenersi privi da errori, sia di forma che di concetto. Tuttavia ho deciso comunque di rendere a tutti disponibile un lavoro che può essere utile per affiancare i propri appunti e, soprattutto, i libri e le dispense consegnate dalla professoressa (in particolare per la parte di farmacodinamica).

Resto comunque disponibile a correggere eventuali errori la cui segnalazione è anzi gradita.

La dispensa rimarrà a disposizione di tutti ma sarebbe per me motivo di grande dispiacere (e non solo...) sapere che qualcuno cerca di ricavarne dei soldi.

Alessandro Zorzi
Alessandro.zorzi@libero.it

INTRODUZIONE

Cenni storici

Il tentativo di cura delle malattie è sempre esistito ma, eccezzion'fatta per le pratiche chirurgiche, il successo di questi tentativi è molto recente.

Le principali tappe della storia della farmacologia sono:

- Egitto, 1500 a.C. : stesura del “Papiro di Ebers” che descrive l’uso di piante medicinali come l’olio di ricino, la senna, l’oppio;
 - Ippocrate (460-377 a.C) introduce la teoria dei 4 umori (sangue, flemma, bile, atrabile). I medicinali riflettevano questa teoria e consistevano essenzialmente in olii e vini contenenti estratti vegetali;
 - Galeno (131-201 d.C.), padre della medicina romana, scrive un trattato comprendente ben 473 medicinali. Il concetto alla base della sua disciplina era “curare con il contrario”: per es. un’infezione era curata col freddo. Egli inoltre introdusse il concetto dell’importanza che il medico prepari personalmente i medicinali. Tuttora i farmaci preparati artigianalmente dal farmacista sono chiamati “galenici”;
 - Medioevo: i veri innovatori in campo farmacologico furono gli Alchimisti. I seguaci di questa filosofia, nella ricerca della pietra filosofale e dell’elisir di lunga vita scoprirono molte sostanze dotate di potere farmacologico;
 - A partire dall’XI secolo le conoscenze sono state “affidate” ai monaci. Essi coltivavano e sperimentavano le piante medicinali e fondarono i primi ospedali. Tra i monaci spicca Pietro da Abano che tra le altre cose scoprì l’importanza del modo di somministrazione dei medicinali;
 - Paracelso (1493-1541): olandese, rivolse i suoi studi non più solo alle piante ma anche ai metalli e alle acque minerali. Inoltre introdusse il concetto della sperimentazione animale dei farmaci;
 - 1692: primo trattato di terapia, molto magico e poco scientifico;
 - Vallisneri (1662-1730): si rende conto che la medicina, al contrario della chirurgia, non dispone di terapie efficaci;
 - Teorie terapeutiche nei secoli XVIII e XIX:
 1. ALLOPATIA (inizio ‘800): medicina “cruenta” che cura con salassi, emetici, purghe....
 2. OMEOPATIA (inizio ‘900): si pone in contrasto con l’Allopatia e teorizza che “il simile cura il simile” (Galeno sosteneva il contrario). Inoltre sosteneva che la diluizione di una sostanza curativa ne aumenta l’efficacia;
 3. FARMACOLOGIA CLASSICA (Paul Enrich, inizio ‘900): introduce il concetto di recettore e quindi di interazione specifica farmaco-tessuto. La chemioterapia antibiotica e antiparassitaria è stata la prima applicazione di questa teoria: per esempio il Salvarsan, derivato dell’arsenico, è selettivamente tossico per il T.Pallidum.
- Nell’800 inoltre, grazie allo sviluppo della chimica, nasce la chimica farmaceutica e poi l’industria farmaceutica. Inizialmente lo scopo era quello di purificare i principi attivi ma un po’ alla volta si passò alla sintesi degli stessi. Il primo farmaco messo in commercio fu l’Aspirina (1899).
- 1932: scoperta dei Sulfamidici, il cui uso è stato introdotto da Daniel Bouvet, il più grande farmacologo del XX secolo.

Concetti introduttivi

Farmacologia: scienza che studia l’interazione tra sistemi biologici (uomo, animali, piante) e sostanze introdotte dall’esterno;

Tossicologia: scienza che studia gli effetti indesiderati delle sostanze che interagiscono con i sistemi biologici;

Farmacologia medica: scienza che studia i farmaci usati per prevenire, diagnosticare e curare le varie patologie umane;

Farmaco: sostanza che, introdotta dall'esterno nell'organismo umano, ne altera le funzioni biologiche mediante interazioni chimiche o fisiche. Tra i farmaci si distinguono:

- Farmaci naturali: sono sostanze sintetizzate da sistemi biologici. I maggiori produttori di farmaci naturali sono i funghi. I farmaci più antichi, ovviamente, appartengono a questa categoria. Una sottocategoria di farmaci naturali sono gli opoterapici derivati da organi animali. Dopo che si è scoperto che i virus resistono alla purificazione e con l'avvento delle biotecnologie gli opoterapici sono caduti in disuso;
- Xenobiotici: sono sostanze non sintetizzate da sistemi biologici. Si distinguono in:
 - Semisintetici: sono ottenuti dalla modificazione chimica di prodotti naturali (es. ampicillina);
 - Sintetici: prodotti completamente artificiali. Alcuni sono detti “progettati a tavolino” perché creati appositamente per interagire con un particolare bersaglio; altri invece sono stati scoperti per caso.

Origine e sviluppo dei farmaci

Un principio attivo può essere scoperto per caso oppure studiato a tavolino. Indipendentemente da questo però, prima che esso possa essere messo in commercio, deve essere sottoposto a degli studi.

La legge prevede che le fasi della sperimentazione di un farmaco siano essenzialmente due:

1. preclinica: comprende tutte le fasi che precedono la sperimentazione sull'uomo;
2. clinica: sperimentazione sull'uomo.

La fase preclinica comprende:

- *determinazione delle proprietà chimiche e farmaceutiche*: struttura, purezza, solubilità e stabilità a vari pH, coefficiente di ripartizione, pK...
- *test in vitro*:
 - farmacodinamici:
 - prove di attività su recettori isolati;
 - prove di selettività per il bersaglio;
 - farmacocinetici:
 - studi di metabolismo con epatociti, plasma, enzimi ricombinanti etc...
 - studi di permeabilità attraverso un monostrato di cellule dette “caco” (enterociti);
 - determinazione del legame con le proteine plasmatiche: più il legame è forte meno il farmaco è disponibile per i tessuti bersaglio.
- *Test in vivo*: studio delle proprietà farmacodinamiche su vari apparati di animali sani. Un altro studio importante è quello “dose-effetto”. Ultimamente si sono ottenuti animali geneticamente malati che sono molto utili per studiare sia le patologie umane che l'efficacia dei farmaci. Sempre in vivo, oltre agli effetti farmacodinamici, si studia anche la farmacocinetica. Il limite di questi esperimenti è rappresentato dalla diversità tra uomo e animale da esperimento. Infine nell'animale da esperimento si compiono prove di tossicità:
 - acuta: dopo singola dose (simula l'avvelenamento da farmaco);
 - subacuta: somministrazione fino a 28 giorni (sono test utili per stabilire le dosi corrette);
 - subcronica: somministrazione per 3 mesi;
 - cronica: somministrazione per 6-24 mesi;
 - prove in vivo ed in vitro di mutagenesi;
 - cancerogenesi: si compie somministrando il farmaco a topi e ratti per l'intera durata della loro vita;
 - teratogenesi.

Ci sono dei protocolli stilati dalla UE che regolano queste procedure.

Alla fine della sperimentazione preclinica si stila un rapporto che viene inviato al Ministero della Sanità il quale rilascia l'autorizzazione alla sperimentazione clinica (ASC).

La fase clinica deve conformarsi a principi etici e linee guida dettate dalla Dichiarazione di Helsinki (1964), rivisitata periodicamente dalla World Medical Association. I principi fondamentali sono:

- la sperimentazione deve perseguire il bene del paziente;

- la sperimentazione clinica deve obbligatoriamente seguire la sperimentazione preclinica;
- il paziente deve fornire il proprio consenso informato;
- la responsabilità della sperimentazione è dello sperimentatore;
- alla fine è necessario confrontare i risultati dello studio sul nuovo farmaco con quelli ottenuti con il miglior farmaco in commercio;
- dal 1998 la sperimentazione deve essere approvata dal Comitato Etico dell'ospedale. Esso è composto da due clinici, un biostatistico, un farmacologo, un farmacista, il Direttore Sanitario e da altri membri quale un esperto di bioetica (normalmente un sacerdote), infermieri, esponenti del volontariato ospedaliero etc...

Le fasi della sperimentazione clinica sono quattro:

1. sperimentazione su volontari sani: questi studi si compiono normalmente su giovani maschi a causa della minore variabilità ormonale. L'obiettivo è quello di studiare la farmacocinetica ed in particolare se le dosi estrapolate dagli studi sugli animali sono corrette. Ovviamente si compiono anche studi tossicologici e, eventualmente, è anche possibile estrapolare i primi dati sull'efficacia;
2. sperimentazione su pazienti per i quali il farmaco è indicato ma, che se non fossero colpiti da quella determinata patologia, sarebbero sani. Su essi si studia l'efficacia, la tossicologia e la posologia mediante studi comparativi, contro placebo o farmaco di riferimento, a singolo o doppio cieco
3. sperimentazione su tutti i pazienti per i quali il farmaco è indicato. Tutte le indicazioni che si ottengono in questa fase finiscono sul foglietto illustrativo del farmaco (controindicazioni, interazioni ecc...). Sono necessari dai 300 ai 5000 pazienti e circa 3 anni di lavoro.
Superata con successo la terza fase il farmaco può essere registrato (direttamente all'UE o al Ministero della Sanità) e messo in commercio. Dall'inizio della sperimentazione alla commercializzazione possono passare anche 10 anni;
4. post-marketing: studio approfondito del farmaco nella pratica clinica quotidiana. E' il vero banco di prova dei farmaci sia per effetti terapeutici che collaterali.

Quest'ultima fase si inserisce nell'ottica della "farmacovigilanza", che si definisce come l'insieme delle attività il cui obiettivo è quello di fornire, in modo continuativo, le migliori informazioni possibili sulla sicurezza dei farmaci permettendo così l'adozione delle misure opportune e in tal modo assicurare che i farmaci disponibili sul mercato presentino, nelle condizioni di utilizzo autorizzate, un rapporto rischio-beneficio favorevole alla popolazione.

In Italia il sistema nazionale di farmacovigilanza è attivo dal 1987 e fa capo al Ministero Della Sanità.

Compito dei medici e degli altri operatori sanitari è quello di segnalare effetti collaterali e reazione avverse ai farmaci.

FARMACOCINETICA DESCRITTIVA

La farmacocinetica studia tutte le tappe del “viaggio” del farmaco all’interno dell’organismo.

Il farmaco può entrare nell’organismo per varie vie (ingestione, inalazione, endovena, intraperitoneale, sottocutanea, intramuscolare, dermica) e attraverso percorsi più o meno tortuosi raggiunge il torrente circolatorio.

Da lì il sangue fa arrivare la sostanza nel luogo d’azione permettendole di legarsi al suo bersaglio.

Infine il farmaco viene eliminato per via epatica, renale o, meno spesso, attraverso secrezioni, espirazione...

Processi attraverso i quali avviene l’assorbimento

Uno degli ostacoli principali all’assorbimento di un farmaco (eccezion’fatta per quelli somministrati per endovena) è il passaggio attraverso le membrane biologiche.

I meccanismi attraverso i quali una sostanza può attraversare una membrana biologica sono essenzialmente quattro: la diffusione passiva, la filtrazione, il trasporto attivo o facilitato e la transitosi.

La diffusione passiva

Per diffusione passiva o semplice si intende il passaggio di una sostanza da una parte all’altra di una membrana biologica dovuto semplicemente ad un gradiente di concentrazione tra i due lati.

Questo meccanismo non è fisiologicamente prioritario, soprattutto a livello gastrointestinale; esso è tuttavia la principale via di assorbimento dei farmaci.

Le membrane cellulari sono lipofile. Esiste un parametro, il coefficiente di ripartizione, che indica quanto lipofila è una sostanza. Esso riflette la ripartizione di una sostanza posta all’interfaccia tra una fase liquida e una fase oleosa.

Indipendentemente dal valore del coefficiente di ripartizione del farmaco molto importante è il tipo di membrana che una sostanza deve superare: alcune infatti lasciano passare bene anche sostanze solo moderatamente idrofobe, altre no. Ciò è dovuto al fatto che le sostanze molto idrofobe tendono a formare degli aggregati mentre invece per essere assorbita una sostanza deve essere in soluzione vera, cioè dispersa a livello molecolare.

Il coefficiente di ripartizione cui corrisponde il picco di assorbimento si dice “cut off”:

- il cut off delle cellule dello stomaco è molto alto: le sostanze idrofobe passano la membrana senza difficoltà;
- il cut off della membrana degli enterociti è invece basso: le sostanze con un coefficiente di ripartizione maggiore di 10 sono assorbite molto male a causa del notevole sviluppo del glicocalice. Per l’assorbimento dei lipidi è necessario lo sviluppo di elementi anfoteri come le micelle;
- il cut off delle cellule della cute è di nuovo molto alto: il picco di assorbimento corrisponde ad un coefficiente di ripartizione di 500.

Indipendentemente dal cut off le sostanze idrofobe vengono assorbite solo se il loro peso molecolare è inferiore a 900-1000 Da (anche se il valore varia da membrana a membrana).

Le sostanze idrofile possono attraversare la membrana per diffusione semplice attraverso le acquaporine (se esse sono presenti) se il loro PM è inferiore a 150 Da (acqua, gas, ioni, urea e etanolo).

Tra le sostanze idrofile possiamo distinguere due categorie:

- elettroliti forti: sostanze sempre dotate di carica. Se il loro peso è superiore a 150 Da (o se la membrana è sprovvista di acquaporine) non possono attraversare la membrana;
- elettroliti deboli: sono acidi o basi deboli che possono attraversare la membrana solo se la loro carica netta è nulla e, naturalmente, se hanno anche un coefficiente di ripartizione adeguato e un PM sufficientemente piccolo. Ciò è funzione del loro pK (pH al quale la sostanza è ionizzata al 50%) e del pH del mezzo.

In particolare:

- o per un acido il rapporto Forma Ionizzata/Forma non ionizzata = $10^{(pH - pK_a)}$

○ per una base il rapporto Forma non ionizzata/Forma Ionizzata = $10^{(pK_a - pH)}$
 Il flusso trans membrana di molecole non cariche è descritto dalla legge di Fick:

$$\Phi = \frac{A(R \cdot T \cdot \mu \cdot Cr)\Delta C}{I}$$

Dove A = area superficie, T = temperatura assoluta, R = costante dei gas, μ = mobilità della molecola nella membrana (dipende da molti fattori ma in generale più piccola è la molecola maggiore è la mobilità), Cr = coefficiente di ripartizione olio/acqua, I = spessore della membrana, ΔC = differenza di concentrazione.

Il termine $(RT\mu Cr)/I$ è detto P, coefficiente di permeabilità.

Si ricordi che il flusso non dipende solo dalle caratteristiche della molecola ma anche dalle caratteristiche della membrana. Esso difatti aumenta in maniera lineare all'aumentare del ΔC solo se il coefficiente di ripartizione è adeguato alle caratteristiche della membrana (es. se troppo alto la sostanza è mal assorbita nell'intestino)

La diffusione passiva è un processo non saturabile.

Per un acido debole si può modificare la legge di Fick come segue:

$$\Phi = AP\Delta C_{NI} = AP\left(\frac{C_{tot\ esterna}}{1 + 10^{(pH_{esterno} - pK_a)}} - \frac{C_{tot\ interna}}{1 + 10^{(pH_{interno} - pK_a)}}\right)$$

Mentre per una base:

$$\Phi = AP\Delta C_{NI} = AP\left(\frac{C_{tot\ esterna}}{1 + 10^{(pK_a - pH_{esterno})}} - \frac{C_{tot\ interna}}{1 + 10^{(pK_a - pH_{interno})}}\right)$$

Ricordandosi che si può dimostrare che per un acido debole la concentrazione di una sostanza in forma ionizzata $C_{NI} = C_{tot}/(1 + 10^{(pH - pK_a)})$ mentre per una base è $C_{tot}/(1 + 10^{(pK_a - pH)})$

Se la differenza di concentrazione totale è diversa da zero ci può comunque essere una differenza di pH tra i due lati della membrana cellulare tale che il flusso sia comunque zero. Quello che conta in questo caso è solo la differenza di concentrazione di sostanza non ionizzata.

Per esempio, poiché il latte materno ha pH 6,4 mentre quello del plasma è 7,4, all'equilibrio ($\Phi = 0$) un farmaco acido sarà più concentrato nel plasma mentre al contrario un farmaco basico tenderà ad accumularsi nel latte.

Filtrazione

E' un meccanismo molto importante per la distribuzione e l'eliminazione dei farmaci più che per l'assorbimento.

La filtrazione è il passaggio di farmaci attraverso pori al seguito di un flusso acquoso dovuto a differenze di pressione idrostatica ed oncologica. I pori dei capillari possono avere un diametro variabile tra 4 e 30 Å.

Anche questo è un processo che ha una cinetica di ordine primo, cioè non è saturabile.

I processi farmacocinetici in cui la filtrazione è coinvolta sono:

- assorbimento: via intramuscolo o sottocutanea;
- distribuzione: dal plasma ai fluidi interstiziali;
- eliminazione: renale.

Trasporto

E' il passaggio di un farmaco, generalmente idrosolubile, attraverso la membrana cellulare con l'aiuto di una proteina trasportatrice.

Ce ne sono di due tipi:

- ATTIVO: si svolge contro gradiente, è orientato e richiede energia. All'equilibrio ha una cinetica di ordine zero, cioè è saturabile. In farmacologia è un processo solitamente stereospecifico in entrata, molto meno in uscita;
- FACILITATO: si svolge secondo gradiente, non è orientato né richiede energia. E' saturabile.

Le proteine trasportatrici possono essere canali (esclusivamente trasporto facilitato) o carriers.

Alcune sostanze agiscono inibendo selettivamente dei carriers: per esempio il piombo agisce sulla pompa del ferro mentre il litio agisce sulla Na/K ATPasi. Alcune sostanze tossiche sono dei trasportatori: per esempio esistono degli antimicotici, come l'anfoterina B, che agiscono formando dei pori sulla membrana cellulare.

I trasportatori sono particolarmente importanti a livello renale e epatico essendo essi implicati nell'eliminazione dei farmaci. Trattandosi di trasportatori che espellono sostanze dalle cellule (trasportatori OUT) sono solitamente sistemi grossolani che riconoscono la carica. Esistono tuttavia anche carriers di sostanze neutre che ultimamente hanno assunto grossa importanza in farmacologia. Il primo di questi ad essere stato identificato è la glicoproteina P170, scoperta in cellule tumorali che riuscivano ad espellere farmaci elettroneutri. Il fegato ne è ricco ma la P170 è presente anche in altri distretti come il rene, l'intestino e la barriera ematoencefalica. Questo trasportatore funziona solitamente su sostanze abbastanza grandi.

Tra i trasportatori IN, molto specializzati, riconosciamo tre grandi famiglie:

- NTCP: famiglia 10, sono implicati nel trasporto degli acidi biliari all'interno degli epatociti nell'ambito della ricircolazione entero-epatica;
- OCT: famiglia 22, sono "ATP binding cassette transporters". Trasportano cationi;
- OATP: famiglia 21, trasportano anioni organici. Sono importantissimi anche nei processi di assorbimento dei farmaci perché sono presenti nella membrana luminale degli enterociti.

Passaggio misto

Si dice "misto" il passaggio transmembrana di sostanze liposolubili fornite di un carrier specifico. L'aggettivo è dovuto al fatto che una parte delle molecole attraversa la membrana per diffusione passiva, una parte per trasporto. Questa è per esempio la modalità di assunzione intestinale delle basi di ammonio quaternarie (es. Buscopan).

Transcitosi

La transcitosi non è un meccanismo molto importante in farmacologia ma lo è in tossicologia. Essa è definita come il passaggio attraverso la barriera cellulare di molecole di peso superiore a 900 Da. Il meccanismo è operato soprattutto dalle cellule con orletto a spazzola apicale, come quelle dell'intestino o del tubulo renale.

La transcitosi è il risultato di due processi: l'internalizzazione e la esocitosi.

I processi di internalizzazione sono tre:

- fagocitosi: avviene mediante la formazione di vescicole molto grandi (1-2 μm) le quali vengono per lo più indirizzate alla digestione nei lisosomi;
- endocitosi recettore mediata: è un processo veloce che avviene mediante formazione di piccole vescicole le quali possono essere indirizzate ai lisosomi oppure esocitate;
- endocitosi aspecifica o "pinocitosi": è un processo lento che prevede la formazione di piccole vescicole mediante le quali vengono internalizzate aspecificamente grosse molecole disciolte nei liquidi extracellulari in proporzione alla loro concentrazione. Le vescicole possono essere esocitate oppure il loro contenuto può essere riversato nei lisosomi dove viene degradato. Se non avviene nessuno dei due meccanismi le sostanze pinocitate possono accumularsi nella cellula fino a livelli tossici. E' questo il caso degli amminoglicosidi che si concentrano molto nelle urine e vengono internalizzati a livello dei tubuli renali perché hanno una struttura simile a piccoli peptidi (si ricordi che le piccole proteine che sfuggono al filtro glomerulare vengono riassorbite nel tubulo). Tuttavia, poiché la cellula non possiede gli enzimi necessari per degradare gli amminoglicosidi, essi si accumulano nelle cellule provocando tossicità

Assorbimento dei farmaci

L'assorbimento di un farmaco è definito come il passaggio dal sito di somministrazione al plasma mediante una delle vie descritte sopra.

Le vie di somministrazione di un farmaco influenzano profondamente la modalità di assorbimento e possono essere raggruppate in due categorie:

- enterali: sublinguale, orale e rettale (quest'ultima poco utilizzata);
- parenterali:
 - naturali: transcutanea, transmucosa, inalatoria;
 - artificiali: endovena, intramuscolo, sottocute, intraperitoneale ecc...

Assorbimento enterale

I fattori determinanti l'assorbimento enterale sono essenzialmente tre:

1. proprietà chimico-fisiche del farmaco, tenendo in considerazione che la diffusione passiva è il principale meccanismo di assorbimento;
2. anatomia e fisiologia dell'apparato digerente: ricordando la legge di Fick è importante tenere in considerazione la superficie dell'organo, il pH del suo lume e la velocità con cui esso si svuota (maggiore è la velocità di svuotamento minore è la permanenza del farmaco e, a parità di altre condizioni, il suo assorbimento). Inoltre è importante l'eventuale presenza di trasportatori, il flusso sanguigno che mantiene la differenza di concentrazione, la capacità di operare la transitosi da parte delle cellule, la presenza nel lume di cibo o di feci che possono alterare l'assorbimento;
3. biofarmaceutica.

Proprietà chimico-fisiche del farmaco

Siccome il meccanismo principale di assorbimento è la diffusione passiva la molecola deve avere un peso molecolare:

- < 150 Da se idrofila;
- < 600-1000 Da se non elettrolita o elettrolita debole (acido o base debole idrofobo);
- si noti che qualsiasi sostanza per attraversare la membrana deve essere idrofoba, ma che le sostanze troppo idrofobe nell'intestino vengono assorbite molto poco.

Anatomia e fisiologia dell'apparato digerente

- Bocca:
 - Caratteristiche: epitelio multistrato liscio, superficie piccola e pH nel lume di circa 6. In questo distretto, sfruttato per la somministrazione sublinguale (transmucosa), possono essere assorbiti farmaci lipofili come la nitroglicerina. La via di somministrazione ha il vantaggio di permettere al farmaco di raggiungere il circolo sistemico evitando il metabolismo epatico: in un episodio di angina la nitroglicerina agisce dopo soli due minuti dall'assunzione;
- Stomaco:
 - Caratteristiche: epitelio semplice dotato di pieghe, superficie abbastanza ampia e pH variabile tra 1 (a digiuno) e 3-5 (dopo il pasto). Gli acidi deboli e lipofili vengono assorbiti. Un esempio è l'aspirina, che ha un pKa di 3,4. Considerando uno stomaco a digiuno con pK di 1,4:

$$[I]/[NI] = 10^{(pH-pKa)} = 10^{-2} = 1/100.$$
 Una parte dell'aspirina passa subito in circolo, una parte però staziona nelle cellule dove il pH è 7,4: il rapporto $[I]/[NI]$ diventa 10^4 : il farmaco in forma ionizzata non può più attraversare la membrana cellulare e ciò implica l'intrappolamento del farmaco nelle cellule. Si parla allora di effetto tossico dell'Aspirina dovuto ad "ions trapping". Normalmente la somministrazione di Aspirina non è tale da comportare gastro-tossicità. Tuttavia ci sono delle categorie di persone, come i cardiopatici, che assumono grandi quantità di Cardioaspirina e che possono a causa di questo meccanismo sviluppare danni alla mucosa gastrica. Allora si fa in modo che l'aspirina soggiorni il meno possibile nello stomaco (in questo senso è meglio assumerla a stomaco vuoto con un bicchiere d'acqua) oppure si associa un gastroprotettore;
 - Motilità: il tempo di svuotamento è molto variabile (da 20 minuti a 2-3 ore). Più lo stomaco è pieno e più una sostanza vi staziona e quindi maggiore è l'assorbimento (anche se poi bisogna considerare il cambiamento di pH). Quindi un farmaco gastro tossico come l'Aspirina va preso a stomaco vuoto assieme a liquidi che percorrono la via gastrica breve e non stazionano nello stomaco.

Oltre al cibo anche alcune patologie (emicrania, ulcera...), la diminuzione del tono vagale, l'aumento del tono simpatico e molti farmaci rallentano lo svuotamento dello stomaco. Pochi farmaci e la stimolazione vagale, invece, accelerano lo svuotamento dello stomaco.

La diminuzione della motilità gastrica diminuisce sia l'entità (es. lo stazionamento gastrico può attivare alcuni farmaci) che la velocità di assorbimento intestinale del farmaco.

- **Intestino:**

- Caratteristiche: è il luogo ideale per l'assorbimento perché la superficie è ampia grazie a pliche, villi e microvilli; il pH varia da 5-7 nel duodeno a 7-8 dell'ileo; lo stazionamento è lungo (in fin dei conti è l'organo fisiologicamente deputato all'assorbimento).

Nel tenue vengono assorbiti molto bene i farmaci basici e, più lentamente, i farmaci acidi. Difatti il pH determina un alto rapporto $[I]/[NI]$ ma questo è in parte compensato dalla vastità della superficie assorbente (per esempio almeno il 70% dell'Aspirina viene assorbita nell'intestino)

Le sostanze idrofile vengono poco assorbite perché solo alcune di esse possono godere di un trasportatore che le "scambia" per nutrienti, cofattori o vitamine (un esempio è L-dopa che sfrutta il trasportatore degli aminoacidi).

Sempre a proposito di trasporto, importante a livello intestinale è il trasportatore che riconosce sostanze idrofobiche dotate di un gruppo NH_4^+ come il buscopan (che gode quindi di un trasporto misto).

Infine sfruttano la transitosi le Ig (assorbite solo nelle prime fasi della vita) e la tossina botulinica.

Un'ultima considerazione importante sull'intestino è il flusso sanguigno che, essendo di grande entità, mantiene nel tempo la differenza di concentrazione. Tuttavia tutto il sangue refluo da questo distretto passa per il fegato dove alcuni farmaci sono inattivati.

- Motilità: il tempo di stazionamento nell'intestino è di 4 ore. Il tempo di transito è diminuito in caso di diarrea o di uso di purganti. Esso invece aumenta se il cibo assunto è molto. L'assorbimento è migliore se ai farmaci poco lipofili sono associati cibi grassi che favoriscono la formazione di micelle.

- **Retto:**

- Caratteristiche: è tappezzato da una mucosa priva di villi (superficie ridotta). L'assorbimento è lento, scarso e variabile (es. la presenza di feci lo ostacola). Alcuni eccipienti usati nei farmaci sono irritanti. Ha una circolazione afferente in parte al sistema portale e in parte alla vena cava: ciò permette ad una parte del farmaco assorbito di evitare il filtro epatico.

La somministrazione di farmaci per via rettale è sfruttata solo in Europa e in età pediatrica. Essi possono essere somministrati in forma liquida, con clisteri (assunzione rapida), oppure in forma solida, con supposte (assunzione lenta).

Biofarmaceutica

La biofarmaceutica è una branca della farmacologia che si occupa della somministrazione della stessa molecola in modalità diverse. Tra gli scopi della biofarmaceutica vi è:

- agevolare la somministrazione: es. produrre una pastiglia con un gusto meno sgradevole. Ciò permette di migliorare la compliance terapeutica;
- studiare la concentrazione adeguata al sito d'azione: vi sono delle formule matematiche che legano la concentrazione del farmaco nel sito d'azione con la concentrazione che esso assume nel plasma (che dev'essere almeno uguale alla C.M.E., la minima concentrazione efficace, ma inferiore alla minima concentrazione tossica);
- evitare una eliminazione troppo rapida dei farmaci.

I mezzi attraverso i quali questi obiettivi vengono raggiunti sono due:

1. modificare la forma farmaceutica (l'ambiente in cui viene somministrato il farmaco): es. non è lo stesso somministrare una pastiglia o delle gocce. Le forme farmaceutiche convenzionali sono:

- Soluzioni: il farmaco può essere diluito in acqua o in altri solventi. Sono solitamente per uso pediatrico (es. sciroppi o gocce);
- Emulsioni: il farmaco non è diluito ma è mescolato ad un'altra sostanza in una forma abbastanza stabile;
- Sospensione: farmaco e "solvente" non si uniscono in maniera stabile e quindi devono essere mescolati prima dell'uso;
- Capsule: la polvere è ricoperta da una gelatina solida che si scioglie nei succhi gastrici;
- Compresse: il farmaco viene mescolato con una sostanza inerte detta eccipiente che di solito è costituita da lattosio (al quale si può essere intolleranti) e magnesio stearato. La maggiore o minore densità della pasticca determina una maggiore o minore facilità di digestione, solubilizzazione del farmaco e quindi assorbimento. Si ricordi difatti che solo se un farmaco è in soluzione nei succhi gastroenterici è assorbito.

Le compresse possono essere:

- rivestite (confetti): il rivestimento protegge dall'odore, dalla fotosensibilità o dall'ossidabilità;
- gastroprotette: lo scopo è quello di evitare il rilascio e l'assorbimento nello stomaco (es. aspirina). Ci sono polimeri di acetato di cellulosa che sono insolubili a pH 1-3 ma che sono solubili a pH intestinale;
- compresse a cessione controllata (capsule osmotiche): le capsule contengono il farmaco ma attraggono osmoticamente l'acqua. Essendo le compresse rigide le molecole di acqua spiazzano il farmaco che viene liberato. L'entità del flusso osmotico riflette la velocità di rilascio. Si usano per farmaci con bassa emivita o per quelli che possono dare tossicità di picco.

Le prime tre sono dette "forme liquide", le altre "forme solide".

2. pro-farmaci: un pro-farmaco si ottiene dalla modificazione non permanente del farmaco la quale lo rende temporaneamente inattivo fino a quando non viene nuovamente attivato all'interno dell'organismo. Di solito i profarmaci sono meglio assorbibili del corrispondente farmaco. Per esempio esterificando un acido è possibile renderlo più idrofobo. Una volta nell'organismo le esterasi epatiche o plasmatiche ritrasformano il pro-farmaco in farmaco.

In generale si utilizzano pro-farmaci per:

- migliorare l'assorbimento di sostanze idrofile;
- rendere più idrofile sostanze troppo idrofobe;
- proteggere dall'inattivazione gastrica (es. FANS);
- proteggere dalla flora intestinale;
- far sì che i pro-farmaci vengano attivati nel sito d'azione: es. i lassativi vengono trasformati in irritanti della parete dai batteri saprofiti dell'intestino;
- migliorare il sapore e di conseguenza la compliance;
- aumentare la stabilità del composto.

In biofarmaceutica si utilizzano due concetti fondamentali:

- Biodisponibilità: è la frazione del principio attivo che dopo la somministrazione raggiunge il circolo sistemico e la rapidità con cui lo raggiunge. Per esempio un farmaco somministrato per EV ha una biodisponibilità di 1. La biodisponibilità dipende, oltre che dalla via di somministrazione, dalla degradazione prima (gastrointestinale) e dopo (epatica) l'assorbimento;
- Bioequivalenza: si dice di una forma farmaceutica che ha la stessa biodisponibilità di un'altra.

Assorbimento parenterale naturale

Via transcutanea

- Struttura:
 - epidermide: non vascolarizzata, lo strato superiore (corneo) è composto da cellule cheratinizzate che fungono da barriera. E' impermeabile a sostanze idrofile e poco permeabile alle sostanze lipofile. Il suo spessore varia, a seconda dei distretti, da 200 a 800 µm. Il pH varia tra 4,2 e 6,5.

- derma: molto vascularizzato, assorbimento rapido sia di sostanze idrofile (grazie alla presenza di pori nei capillari) che di quelle idrofobe;
 - annessi: rappresentano solo l'1% della superficie ma sono spesso vie preferenziali di assorbimento. Per esempio attraverso i follicoli piliferi vengono assorbiti i cortisonici.
- Il meccanismo di assorbimento principale è la diffusione passiva e il picco di assorbimento si ha per sostanze con Cr di 500. L'ostacolo maggiore è rappresentato dalla penetrazione dello strato corneo.

- Fattori che facilitano l'assorbimento:
 - lesioni che alterano l'integrità della cute;
 - innalzamento di temperatura e umidità favoriscono molto l'assorbimento;
 - infiammazione;
 - età: nei giovani l'assorbimento è più veloce;
 - alcuni solventi utilizzati per diluire i farmaci, come il DMSO, alterano l'integrità della cute;
 - forma farmaceutica.
- Usi della via transcutanea o cutanea (si parla di via cutanea quando le sostanze vengono somministrate con lo scopo di agire in superficie e di non essere assorbite):
 - effetto locale: i farmaci sono destinati ad agire sulla superficie della cute (via cutanea) o a livello del derma (via transcutanea). Alla prima categoria appartengono farmaci disinfettanti e antibiotici, alla seconda gli antimicotici.

Questi prodotti vanno sempre utilizzati in zone ristrette al fine di evitare che l'assorbimento possa essere tale da determinare tossicità sistemica.

I farmaci possono essere somministrati in due forme farmacologiche:

 - creme e gel: sono idrofile e idratano la pelle. Rilasciano velocemente il farmaco e ne favoriscono una rapida penetrazione fino al derma. Si usano affinché la sostanza raggiunga il derma (uso transcutaneo);
 - pomate: il solvente è estremamente idrofobico, non viene assorbito e rilascia lentamente il farmaco che agisce sulla superficie e solo in piccola parte attraversa l'epidermide. L'uso è quindi cutaneo.
 - effetti sistemici: la forma farmaceutica principale è il cerotto: un polimero che intrappola il farmaco. Il cerotto è impermeabile e crea tra esso e la cute un ambiente a temperatura e umidità alta e costante. Ciò da una parte favorisce l'assorbimento e dall'altra fa sì che il rilascio del farmaco sia costante e controllato.

Sono usati per evitare il filtro epatico, per facilitare l'assorbimento di sostanze troppo idrofobe per la somministrazione per OS, per favorire un rilascio lento.

Il cerotto si usa per somministrare nitroglicerina per la prevenzione dell'angina, estrogeni o estroprogestinici e FANS.

La via transcutanea è molto importante anche in farmacologia perché rappresenta, in virtù della grande superficie, una via di passaggio per solventi, pesticidi etc...

Via polmonare

Le sostanze vengono inalate e vengono a contatto con tutto l'albero respiratorio.

Il meccanismo di assorbimento principale è la diffusione passiva ed è particolarmente efficiente a livello alveolare (ampia superficie, alta permeabilità dell'epitelio, ricca vascularizzazione, by-pass del filtro epatico).

La via polmonare è la via principale per la somministrazione di farmaci gassosi.

Per quanto riguarda sostanze corpuscolate disperse in aria (areosol) esse vengono assorbite in diversi distretti dell'albero respiratorio in funzione delle loro dimensioni:

- Le particelle con diametro maggiore di 5 µm si fermano nel naso faringe: se sono solubili vengono assorbite (nb: tutti i farmaci vengono assorbiti solo se sono in soluzione) mentre se sono insolubili agiscono di solito come irritanti. La grande quantità di muco prodotto e l'aumento della mobilità provvede alla loro eliminazione;

- Le particelle con diametro compreso tra 1 e 5 μm si fermano nella trachea e nei bronchi ed il loro destino è identico a quello delle particelle più grandi;
- Le particelle con diametro inferiore ad 1 μm raggiungono gli alveoli. Se sono solubili vengono assorbite, altrimenti o vengono fagocitate dai macrofagi alveolari oppure lentamente risalgono l'albero respiratorio spinte dalle ciglia. Entrambi questi meccanismi sono poco efficienti ed una continua deposizione di queste particelle può danneggiare gli alveoli e causare fibrosi (es. silicosi, malattia professionale dei minatori).

Uso della somministrazione polmonare:

- sistemico: es. anestetici generali;
- locale: es. terapia dell'asma (broncodilatatori, glucocorticoidi, antistaminici).

Questa via di somministrazione ha lo svantaggio che è difficile dosare il farmaco. Per esempio una maggiore o minore broncostrizione determina variazione nella quantità di farmaco che raggiunge gli alveoli e quindi nella dose richiesta. Per questo motivo la teofillina, potente broncodilatatore ma con bassa concentrazione minima tossica, non può essere somministrato per questa via.

Via transmucosale

- Uso sistemico:
 - sottolinguale (es. nitroglicerina);
 - transuterina (es. anticoncezionali);
 - intranasale: si è usata per somministrare ormoni come l'ADH nel trattamento del diabete insipido.
- Uso locale:
 - intraoculare: la forma farmaceutica è il collirio, una soluzione isotonica, iso-osmotica e sterile.
 - intravaginale: es. antibatterici e antimicotici;
 - intranasale: es. vasocostrittori e antistaminici. Bisogna stare attenti perché se ne si abusa la vasocostrizione può diventare sistemica e scatenare una crisi ipertensiva.

Vie parenterali artificiali

Via endovasale

- Endovenosa: è l'unica via che by-passa il riassorbimento. Il farmaco iniettato è tutto bio-disponibile. Viene usata prevalentemente in ambito ospedaliero o affine perché può essere veicolo di infezione.

Il farmaco viene di solito iniettato nelle vene anticubitali del braccio, nelle vene superficiali della mano e, soprattutto nei neonati, nelle vene dello scalpo.

I metodi di somministrazione sono due: in bolo (unica iniezione) o in infusione con flebo.

I vantaggi di questa via di somministrazione sono:

- Massima biodisponibilità;
- Rapidità di somministrazione (tuttavia un bolo non dovrebbe essere iniettato in meno di 1-2 minuti per evitare picchi di concentrazioni eccessive in organi sensibili);
- Rapidità di azione.
- Il dosaggio può essere controllato in maniera precisa e ciò è utile soprattutto per quelle sostanze con basso indice terapeutico (più l'indice è basso minore è la differenza tra dose efficace e dose tossica);
- Possibilità di somministrare macromolecole;
- Possibilità di diluire un farmaco irritante in grossi volumi.

Gli svantaggi sono invece:

- La somministrazione non è reversibile, mentre se si somministra per errore un farmaco per OS si può indurre il vomito o fare la lavanda gastrica;
- Il range di veicoli utilizzabili è limitato: non si possono usare soluzioni oleose e soluzioni non isotoniche;
- Vi è pericolo di infezione;
- Il primo passaggio del farmaco è sempre a livello polmonare. Se la sostanza è volatile può essere persa con l'aria espirata (possibilità remota);

- Alcuni farmaci devono essere oggetto di attenzioni particolari:
 - La Lidocaina (antiaritmico) deve raggiungere in circolo una concentrazione compresa tra 1 e 5 µg/ml perché concentrazioni inferiori sono inefficaci mentre concentrazioni superiori sono tossiche;
 - L'infusione della Teofillina (antiasmatico) deve durare 20-30' altrimenti essa può diventare tossica;
 - Il Diazepam (anestetico generale) non è molto solubile e viene somministrato in forma di emulsione. La quantità somministrata deve essere inferiore a 5 mg/min per evitare il rischio di precipitazione, embolie e tromboflebiti.
- Intra-arteriosa: è una via utilizzata in ambito diagnostico, meno in ambito terapeutico. Un farmaco usato per la terapia antitumorale (5-fluoracile) viene iniettato direttamente nell'arteria epatica affinché la concentrazione raggiunta nel fegato possa essere alta ma si scongiuri al contempo la possibilità di tossicità sistemica.

Via intratecale

Consiste nella somministrazione di farmaci nel liquor mediante puntura lombare. Il liquor si rigenera così velocemente che nessun farmaco somministrato per questa via penetra il tessuto nervoso per più di qualche mm. Per questo motivo la via è utilizzata solamente per somministrare antibiotici, per l'anestesia epidurale e per la terapia del dolore nell'ambito di cure palliative;

Via intramuscolare

Per tempo di assorbimento e biodisponibilità è paragonabile alla via orale, non certo a quella endovenosa. Il muscolo più utilizzato è il grande gluteo, seguono il vasto laterale e il deltoide. Le donne di solito hanno uno spessore di grasso sottocutaneo maggiore per cui la biodisponibilità che si ottiene iniettando un farmaco nel gluteo può essere minore.

L'assorbimento varia a seconda del:

1. flusso sanguigno;
2. esercizio fisico (se il muscolo è in azione il drenaggio è maggiore);
3. tipo di muscolo: deltoide > vasto laterale > gluteo.

Le caratteristiche di questa via di somministrazione sono:

- Meccanismo:
 - Sostanze lipofile: assorbite per diffusione passiva;
 - Sostanze idrofile: sfruttano i pori dei capillari;
 - Macromolecole: entrano nei pori del sistema linfatico.
- Veicoli:
 - Veicolo acquoso: assorbimento in 20-30 minuti;
 - Veicolo oleoso: assorbimento molto lento (discorso analogo a quanto fatto per le pomate).
- Vantaggi:
 - Assorbimento di sostanze idrofile;
 - Possibile uso di solventi oleosi;
 - Possibilità di utilizzare "preparazioni deposito": sono sostanze somministrate in un solvente oleoso insieme ad un vasocostrittore. L'assorbimento è molto lento e si può completare anche a distanza di due o tre mesi.
- Svantaggi:
 - Assorbimento discontinuo. Alcuni farmaci come il Diazepam sono assorbiti male;
 - La sostanza iniettata può precipitare causando necrosi e ascessi sterili.

Via sottocutanea

Prevede l'iniezione del farmaco nel derma, il quale è a contatto con capillari ematici e linfatici. Non è molto usata.

- Vantaggi:
 - L'assorbimento è simile a quello della via intramuscolo ma esso può essere rallentato. Questo è il motivo per cui l'uso quasi esclusivo di questa via è quello di somministrare insulina;

- Svantaggi:
 - Dolore, precipitazione con necrosi e ascessi sterili.

Distribuzione

La distribuzione è un processo che coinvolge le fasi che segnano il passaggio dal sito di assorbimento all'organo bersaglio.

Gli ostacoli che il farmaco incontra durante questo processo sono:

1. proteine plasmatiche: di solito un farmaco è lipofilo. I cataboliti lipofili sono captati dall'albumina anche se il legame non è covalente. C'è un equilibrio tra forma legata e libera (disponibile al legame col sito bersaglio);
2. passaggio nei liquidi interstiziali: spesso questo passaggio è l'ultimo ostacolo che una sostanza deve superare perché molti farmaci agiscono su recettori di membrana;
3. passaggio nei liquidi intracellulari;
4. eventuale passaggio di barriere (placentare, ematoencefalica, ematoliquorale...).

La rapidità del processo dipende da:

1. rapidità del flusso sanguigno. Gli organi ben irrorati (cuore, cervello, fegato) sono raggiunti più velocemente, in quelli poco irrorati come il tessuto adiposo e il connettivo la distribuzione è più lenta;
2. affinità del farmaco per il tessuto: maggiore è l'affinità più il farmaco viene trattenuto nei tessuti.

Ridistribuzione

La ridistribuzione è un fenomeno che avviene tra organi molto irrorati e distretti poco irrorati con alta capacità di ritenzione.

Per esempio il piombo è un metallo pesante epatotossico e neurotossico perché dopo l'assunzione arriva ad alta concentrazione nel fegato e nel rene in virtù del flusso sanguigno. Tuttavia se dopo due ore il 50% del metallo si trova a livello epatico, dopo un mese tutto il piombo che non è stato eliminato si trova nelle ossa poiché esso è captato dalla pompa del calcio degli osteoclasti.

Un bolo di barbiturici raggiunge solo il cervello: tuttavia dopo 20 minuti il suo effetto sparisce ed il farmaco si accumula nel tessuto adiposo da dove è eliminato solo dopo giorni. Ciò rallenta il tempo di risveglio e la completa eliminazione.

La capacità di ridistribuzione è funzione del coefficiente di ripartizione e delle caratteristiche degli organi: è ovvio che un farmaco con Cr alto si accumulerà di preferenza in un tessuto lipofilo come l'adipe. Il tessuto adiposo è l'organo di accumulo di sostanze come i pesticidi clorati (es. DDT) ed in generale degli xenobiotici molto lipofili. Sono tutte sostanze cancerogene che possono essere causa di intossicazioni acute soprattutto nelle persone che dimagriscono molto velocemente perché in tal caso sono rilasciati assieme ai grassi.

Per alcune particolari caratteristiche un farmaco può accumularsi in altri distretti:

- i metalli pesanti come il cadmio, lo zinco e il piombo si accumulano nel rene e nel fegato a causa della presenza delle metallotionine che li legano. La differenza è che mentre il fegato è dotato di un efficiente sistema di eliminazione per queste sostanze nel rene esse si accumulano causando tossicità;
- nel fegato la presenza delle ligandine, che legano gli acidi organici, permette un aumento di concentrazione di questi elementi;
- nell'osso si accumulano sia anioni come il fluoro sia cationi come il piombo. Questi ioni sfruttano i sistemi di trasporto degli osteociti e penetrano nei cristalli di idrossiapatite scambiandosi con l' OH^- e il Ca^{++} . Questi ioni vengono poi rimossi molto lentamente nell'ambito del rimodellamento osseo.

Legame alle proteine plasmatiche

Alcune proteine plasmatiche rappresentano un ostacolo alla distribuzione dei farmaci perché li legano e non li rendono disponibili per il sito d'azione:

- l'albumina, presente nel sangue in grandi quantità, lega sostanze lipofile soprattutto se acide. Essa ha due siti di legame a bassa affinità per molecola e lega, tra gli altri, tutti i FANS. E' presente in grosse concentrazioni (4g/100ml);
- l'α1 globulina, invece, lega preferenzialmente i farmaci basici. Essa è una glicoproteina acida di fase acuta la cui concentrazione, normalmente dell'ordine di 40-100 mg/100 ml, può aumentare notevolmente in seguito ad eventi come stress, infiammazioni, traumi...;
- esistono proteine più specifiche come la transferrina, la ceruloplasmina (rame) e le transcortine (corticosteroidi, vitamina B12);
- infine altre sostanze vengono sequestrate dai globuli rossi: alcune si legano alla membrana in maniera reversibile, altre penetrano nel citoplasma e si legano in maniera irreversibile come il diuretico inibitore dell'anidasi carbonica Acetazolamide.

In generale il legame farmaco-proteina è reversibile, meno spesso irreversibile. In quest'ultimo caso il legame assume importanza tossicologica perché lo xenobiotico può comportarsi da aptene: la reazione immunitaria che si determina può causare lo sviluppo di un'allergia.

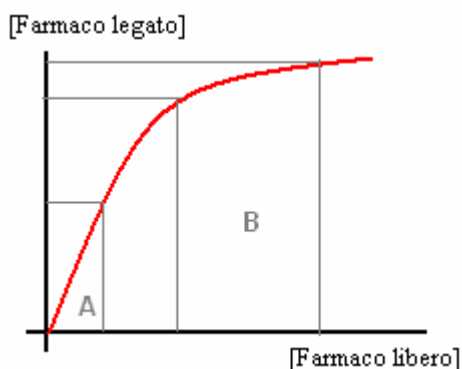
Un farmaco legato ad una proteina plasmatica non esce dal distretto vascolare (tranne in organi particolari come il fegato) e quindi non raggiunge il sito d'azione né viene filtrato dal rene. Ovviamente maggiore è la frazione di farmaco legato alle proteine, minore è la quantità disponibile. Il legame reversibile è soggetto alla legge di azione di massa:

$$K_{ass} = \frac{[FP]}{[P][F]}$$

Dove K_{ass} = costante di associazione, $[FP]$ = concentrazione di farmaco legato alla proteina, $[P]$ = concentrazione della proteina non legata e $[F]$ = concentrazione del farmaco libero.

Se $K_{ass} > 10^6$ il farmaco è virtualmente tutto legato (es. sulfamidici ed alcuni FANS).

La misura dell'affinità del farmaco per le proteine plasmatiche può essere espressa come K_{ass} oppure, in una maniera forse più pratica, con la percentuale del farmaco che alle dosi terapeutiche si lega alle proteine plasmatiche.



Quest'ultima frase necessita di un distinguo.

Nella maggioranza dei casi alle dosi terapeutiche la concentrazione di proteina legata dal farmaco è una piccola frazione della concentrazione totale della proteina (zona "A" della curva o altresì detta "fase lineare"). In questo caso al variare delle dosi di farmaco assunto $[F]$ e $[FP]$ variano in maniera lineare. La percentuale è allora un buon indice.

La stessa cosa non vale per farmaci come i FANS di vecchia generazione, ancora in uso, che vengono somministrati in quantità di g/die. In questo caso ci si trova nella zona B della curva perché la proteina è quasi saturata.

In tal caso la percentuale di legame è suscettibile di variazioni a seconda delle dosi somministrate.

Un altro problema si pone quando la concentrazione di proteina legata è più del 95% del totale del farmaco somministrato perché a piccole variazioni nella concentrazioni di farmaco legato corrispondono grosse variazioni di farmaco libero (se $[FP]$ passa dal 98 al 96% la $[F]$ raddoppia). Essendo l'affinità delle proteine plasmatica per un farmaco variabile da persona a persona (polimorfismo) è in tal caso necessaria una "personalizzazione del dosaggio" come si fa, per esempio, con la Warfarina.

Un farmaco che si lega con affinità troppo alta rappresenta un problema anche per l'eliminazione.

Inoltre si possono verificare problemi in corso di polifarmacoterapia a causa del fenomeno dello "spiazzamento". Consideriamo per esempio un paziente che assume contemporaneamente il fenilbutazone e la Warfarina, entrambi farmaci con alta K_{ass} . Il primo è somministrato ad alte dosi (g/die) mentre la Warfarina a dosi più modeste (mg/die). Se il fenilbutazone si lega all'albumina e spiazza l'altro farmaco in modo che la percentuale di Warfarina legata scenda anche solo dal 98% al

96% le dosi di Warfarina in circolo raddoppiano e ciò, unito al fatto che l'eliminazione è rallentata dalla presenza contemporanea dell'antiinfiammatorio, può portare a gravi emorragie.

Un altro esempio: i sulfamidici possono spiazzare la bilirubina dalla albumina (che ne rappresenta il fisiologico "mezzo di trasporto") causando ittero.

Questi problemi non si verificano se per esempio le concentrazioni di farmaco libero e legato si equivalgono: in tal caso lo spostamento di qualche punto percentuale non provoca grossi effetti tossici.

Passaggio nei liquidi extracellulari

I fattori che limitano questa tappa sono due:

- uscita dai capillari. Esistono fondamentalmente tre tipi di capillari:
 - capillari continui: sono caratterizzati dalla presenza di pori da 4Å che permettono l'uscita di sostanze idrofile. Il passaggio delle sostanze attraverso questi capillari avviene soprattutto per filtrazione: questo meccanismo riguarda sostanze con PM fino a 500-1000. La permeabilità aumenta notevolmente nel corso di fenomeni infiammatori;
 - capillari fenestrati: presenti per esempio nei glomeruli renali e nei plessi corioidei hanno pori da 30-60 Å. Filtrano tutte le sostanze con PM inferiore a quello dell'albumina (68 Kda);
 - capillari discontinui: presenti nei sinusoidi epatici, nella milza e nel midollo osseo permettono il passaggio dell'intero plasma comprese le proteine ed eventuali farmaci ad essi legati.
- volume di distribuzione (vedi oltre): è un parametro che spiega dove i farmaci tendono a distribuirsi. Esistono:
 - volumi corporei reali: vascolare 3 litri, liquidi extravasali 9 litri, liquidi intracellulari 28 litri;
 - volume apparente: è il volume nel quale dovrebbero essere disciolti i farmaci presenti nell'organismo per avere una concentrazione uguale a quella plasmatica. Il volume apparente è uguale a quello reale quando c'è un equilibrio tra concentrazione plasmatica e concentrazione extraplasmatica del farmaco ed in particolare quando il farmaco:
 - è tutto libero;
 - non è metabolizzato;
 - non è escreto;
 - diffonde liberamente.

Passaggio nei liquidi intracellulari

Il passaggio della membrana cellulare del farmaco segue gli stessi meccanismi esposti precedentemente (diffusione passiva o trasporto). Spesso però il farmaco non penetra la membrana perché il proprio bersaglio si trova sulla superficie cellulare

Superamento di barriere fisiologiche

- Barriera ematoencefalica: è una barriera sia strutturale che funzionale. Le principali caratteristiche sono:
 - assenza di pori (quindi non filtrano sostanze cariche);
 - membrana formata sia dall'endotelio dei capillari che dai piedi degli astrociti;
 - non esiste transitosi;
 - esistono sistemi di trasporto attivo:
 - IN: sono solo otto, tre dei quali trasportano gli aminoacidi che fungono da precursori per i neurotrasmettitori;
 - OUT: appartenenti alla famiglia delle glicoproteine, riconoscono le molecole lipofile con PM > 4000. Questo sistema ha lo scopo di proteggere l'encefalo da sostanze potenzialmente pericolose.

Le caratteristiche funzionali della barriera sono:

- assenza di filtrazione;

- spessore considerevole che rallenta la diffusione delle sostanze;
- presenza di sistemi metabolici, soprattutto negli astrociti, che modificano il farmaco;
- è immatura alla nascita per cui nei bambini molti farmaci possono essere neurotossici;
- diventa meno impermeabile in caso di infiammazione, tumori...;
- in alcuni distretti del SNC è meno efficiente: si tratta di quelle zone che devono secernere in circolo ormoni oppure che fungono da chemocettori (ipofisi, epifisi, nuclei laterali dell'ipotalamo);

In conclusione i farmaci che hanno come bersaglio il SNC devono essere lipofili e con PM inferiore a 4000 D. Pochissimi farmaci possono essere trasportati sfruttando sistemi di trasporto (è il caso dell' L-DOPA).

I farmaci lipofili con carica si distribuiscono nei vari distretti del SNC in virtù della differenza di pH (liquor 7,35; glia 7,2; neuroni 6,9);

- Barriera ematoliquorale: è una barriera puramente funzionale. Il liquor viene prodotto dalla ultrafiltrazione del plasma ad una velocità di 3-4 ml/min e viene drenato dai villi corioidei. Poiché il volume totale del liquor è di soli 200 ml esso viene ricambiato completamente circa 6 volte al giorno.

La barriera è costituita dal fatto che la velocità del ricambio impedisce l'equilibratura del farmaco tra liquor e tessuto interstiziale cerebrale. Esiste inoltre, a livello dei plessi corioidei, un sistema di trasporto OUT che trasporta specificatamente sostanze cariche come l'acido salicilico o la penicillina G. Possono passare nel liquor farmaci liposolubili per diffusione passiva.

- Barriera placentare: la placenta è un organo che compare al 4° mese di gravidanza e il cui ruolo è quello di collegare il feto all'utero materno e che permette gli scambi materno-fetali in modo che il sangue dell'uno e dell'altro non si mescoli mai. Il sangue della madre difatti arriva in cavità dette seni corioidei nei quali pescano i villi coriali. Il flusso sanguigno placentare materno è di circa 600 ml/min.

Nell'essere umano la placenta presenta una struttura "emocoriale" poiché gli strati che compongono la barriera tra sangue materno e fetale sono quattro. Non tutte le speci presentano una placenta fatta così: per esempio nel cane e nel gatto la placenta è detta "endoteliochoriale" perché vi è uno strato in più.

Funzioni della placenta:

- protezione: shock fisici e mantenimento della temperatura;
- produzione di ormoni;
- metabolismo: per es. metabolismo dei farmaci;
- respirazione e nutrizione: gli scambi avvengono per diffusione passiva (sostanze molto idrofobe con PM < 1000 Da) e per trasporto attivo. La filtrazione è scarsa e lenta perché i pori sono piccoli. I quattro strati della barriera hanno funzione di rallentamento e di filtro. Si tenga in considerazione che se i farmaci sono acidi o basi deboli si può avere il fenomeno dello ions trapping.

La placenta è anche una barriera funzionale:

- la placenta è molto attiva metabolicamente: il principale sistema metabolico è il citocromo P450 ma ci sono altri sistemi come il MAO e la colinesterasi;
- se un farmaco lipofilo riesce ad entrare nel circolo fetale viene in parte sequestrato dalle proteine plasmatiche fetali;
- circolo fetale: il fatto che gli scambi con la madre siano continui favorisce una continua diluizione. Anche per un farmaco molto lipofilo il minimo tempo di equilibrio materno-fetale è di 40 minuti (ad esempio nel parto cesareo dopo 15-20 minuti dall'anestesia il bambino è ancora sveglio e vigile).

Però il "rovescio della medaglia" è che una sostanza che fa fatica ad entrare nel circolo fetale fa anche fatica ad uscirne e per questo motivo il feto può rappresentare un sistema di accumulo soprattutto se il farmaco è poco scambiato a livello placentare (es. penicillina G ha un tempo di equilibrio di 10-18 ore).

Alcune terapie croniche sono molto pericolose per il feto perché teratogene (es. il talidomide).

Escrezione

Un buon farmaco deve agire velocemente ma altrettanto velocemente deve essere eliminato.

L'eliminazione passa attraverso due processi:

- metabolismo: passaggio facoltativo;
- escrezione: passaggio obbligatorio.

Gli organi di escrezione dei farmaci sono:

- rene;
- fegato (importante anche per il metabolismo): con la bile sono eliminati solo una piccola parte di farmaci con caratteristiche molto particolari;
- polmoni: vengono perse sostanze volatili (per es. l'alcool, da cui il test del palloncino);
- latte (soprattutto basi deboli per il fenomeno dello ions trapping), saliva, sudore, lacrime....

L'azione del rene sui farmaci

I principali processi a carico dei farmaci avvengono:

- nel glomerulo dove i capillari sono fenestrati e avviene l'ultrafiltrazione del plasma;
- nei tubuli prossimale e distale e nel dotto collettore dove avvengono i processi di secrezione e riassorbimento.

Glomerulo

A livello del glomerulo vengono filtrate bene le sostanze fino a 20 KDa, meno bene quelle con PM compreso tra 20 e 68 KDa. I farmaci hanno di solito un peso molto inferiore e se non sono legati all'albumina filtrano senza difficoltà.

L'osmolarità e il pH dell'ultrafiltrato sono uguali a quelli del plasma e perciò non si verifica il fenomeno "ions trapping".

Tubulo prossimale

In questa porzione del glomerulo vengono riassorbite sostanze xenobiotiche lipofile per diffusione passiva. Il meccanismo è favorito dal fatto che le sostanze risultano essere molto più concentrate nell'ultrafiltrato che nel plasma in virtù del riassorbimento idroelettrolitico che avviene nel tubulo prossimale.

Per pinocitosi vengono riassorbite sostanze come gli aminoglicosidi e le metallotionine (che legano metalli pesanti): queste sostanze possono perciò causare tossicità.

Sempre a questo livello avviene la secrezione di circa l'80% del quantitativo totale dei farmaci eliminati. Essa avviene in due fasi:

- trasporto IN della sostanza dal plasma all'interno della cellula tubulare;
- trasporto OUT dalla cellula al lume tubulare;

Possiamo distinguere tre categorie:

- Anioni organici:
 - trasporto IN: sono stati classificati 9 trasportatori appartenenti alla famiglia OATP. Essi trasportano acidi grassi, metaboliti, coniugati... Le quattro isoforme meglio rappresentate sono specifiche per:
 - acidi monocarbossilici piccoli;
 - acidi monocarbossilici grandi (es. PAI);
 - acidi dicarbossilici;
 - solfati;
 - trasporto OUT: i trasportatori sono molto meno selettivi e efficienti rispetto a quelli IN ed il trasporto avviene per diffusione facilitata. Esistono delle sostanze che hanno grossa affinità per il trasportatore IN ma molto meno per quello OUT: esse tendono così ad accumularsi nelle cellule tubulari causando nefrotossicità (es. alcune cefalosporine);
- Cationi organici (es. alcaloidi come la morfina):
 - trasporto IN: avviene per diffusione facilitata;
 - trasporto OUT: trasporto attivo. La situazione è in questo caso capovolta rispetto a quella dei cationi organici: il passaggio limitante è rappresentato dall'ingresso nelle

cellule. Per questo motivo i cationi organici non sono mai nefrotossici. Questi trasportatori si sviluppano completamente solo 2-3 settimane dopo la nascita;

- Sostanze neutre: i trasportatori per le sostanze neutre sono glicoproteine (MDR1 che tra l'altro elimina la digossina e MRP1). Le glicoproteine trasportano solo alcune molecole lipofile o idrofile con alto PM.

Le glicoproteine sono in grado di captare anche le sostanze legate alle proteine plasmatiche in funzione dell'affinità della molecola per la proteina plasmatica e per il trasportatore: siccome il tempo di transito del sangue in questo distretto è di 1-2 secondi e il $t/2$ del legame reversibile proteina plasmatica-farmaco è di 0,1 secondi se il trasportatore ha un'affinità maggiore nel momento in cui il farmaco si stacca dalla proteina plasmatica esso viene legato dalla glicoproteina. Le penicilline semisintetiche, per esempio, pur circolando per il 98% legate alle proteine plasmatiche vengono eliminate quasi tutte a livello renale.

Ansa

I farmaci passano "indenni" questo distretto. L'unica differenza è che alla fine essi sono diluiti in un liquido molto ipotonico e ciò, al contrario di quanto avveniva nel tubulo prossimale, è favorevole all'eliminazione dei farmaci.

Tubulo contorto e dotto collettore

- se il farmaco è idrofilo o lipofilo e più dissociato al pH del liquido tubulare rispetto al plasma esso viene eliminato: siccome le urine sono leggermente acide le basi deboli sono più ionizzate che nel plasma e perciò sono più facilmente eliminabili rispetto agli acidi. Difatti il gradiente di concentrazione della forma non ionizzata del farmaco tra tubulo e plasma favorisce il passaggio dello stesso dal plasma alla preurina;
- se il farmaco è lipofilo neutro o meno dissociato al pH del liquido tubulare rispetto al plasma esso viene riassorbito (acidi deboli): è sufficiente anche una piccola differenza perché si crei un gradiente che determina potenzialmente il riassorbimento di tutto il farmaco. Per esempio un farmaco come l'acido salicilico con pK 3:
 - a pH plasmatico il rapporto forma ionizzata/non ionizzata è 25000/1;
 - a pH 5 (tubulo collettore) il rapporto diventa 100/1.

In entrambi i casi il farmaco è comunque dissociato per più del 99% ma tra plasma e tubulo c'è un gradiente di concentrazione di ben 250 volte responsabile di un forte flusso nella direzione del lume tubulare.

E' ovvio che piccole variazioni di pH possono far variare significativamente il riassorbimento/secrezione dei farmaci debolmente acidi o basici.

Anche il flusso è molto importante: tanto più è lento tanto quantitativamente maggiori saranno i processi di riassorbimento/secrezione. Possiamo a questo proposito distinguere tre situazioni:

- farmaci flusso-dipendenti in maniera lineare: si tratta dei farmaci che tenderebbero a essere riassorbiti. All'aumentare del flusso, perciò, aumenta l'eliminazione;
- non flusso-dipendenti: si tratta delle sostanze non retrodiffusibili (idrofile) che una volta ultrafiltrate vengono sicuramente eliminate;
- sostanze intermedie: l'eliminazione non è lineare al flusso. Ciò è dovuto al fatto che l'equilibrio tra plasma e preurina non è immediato.

In virtù di queste considerazioni in caso di iperdosaggio:

- di sostanze basiche (es. anfetamine) è opportuno acidificare le urine con sostanze come NH_4Cl o acido ascorbico;
- di sostanze acide (es. barbiturici) bisogna al contrario alcalinizzare le urine somministrando $NaHCO_3$ o Nacitrato;
- di sostanze neutre lipofile: somministrare diuretici sia per aumentare il flusso urinario sia perché, aumentando la quantità di preurina prodotta, diminuisce la concentrazione della stessa in virtù dell'assorbimento d'acqua. Ciò fa diminuire la differenza di concentrazione del farmaco ai due lati delle cellule tubulari facendo venire meno la forza osmotica che ne favorisce il riassorbimento soprattutto a livello del tubulo prossimale.

Associando le prime due tecniche alla terza si aumenta l'efficacia.

L'azione del fegato sui farmaci

Vengono eliminati con le feci:

- farmaci somministrati per os e non assorbiti (es. purganti osmotici, disinfettanti intestinali);
- farmaci secreti dalla parete intestinale: si tratta di una scoperta recente;
- farmaci escreti per via biliare: rappresentano il grosso dell'eliminazione fecale dei farmaci.

Il fegato riceve ogni minuto 300 ml di sangue dall'arteria epatica e 1100 ml dalla vena porta.

La detossificazione epatica dei farmaci passa attraverso tre fasi:

- legame alle proteine intracellulari (altrimenti le sostanze lipofile potrebbero retrodiffondere);
- biotrasformazione;
- escrezione biliare (è relativamente poco importante).

Il fegato ha una capacità di clearance simile a quella del rene: 600-700 ml/min. Essa si può misurare solo in maniera indiretta come clearance sistemica – clearance renale (- clearance di altri organi eventualmente implicati nell'eliminazione).

La formazione della bile è invece piuttosto lenta: 0,5-0,8 ml/min.

Poiché i sinusoidi sono capillari discontinui anche i farmaci legati alle proteine possono essere metabolizzati. In più l'esistenza dello spazio di Disse e della matrice glicoproteica in esso contenuto consente un rallentamento del flusso: analogamente a quanto detto per il rene, se le proteine trasportatrici hanno maggiore affinità di quelle plasmatiche il farmaco può essere "strappato" a queste ultime.

Ingresso nell'epatocita

- Diffusione passiva: diffondono le sostanze lipofile non legate alle proteine plasmatiche;
- Trasporto: vengono trasportate le sostanze idrofile e quelle lipofile strappate alle proteine plasmatiche. E' il mezzo più efficiente. I sistemi di trasporto IN presenti sulla membrana sinusoidale dell'epatocita sono:
 - acidi biliari: trasportatori della famiglia NTCP (sono trasportatori molto specifici che non vengono utilizzati da nessun altro farmaco);
 - anioni: trasportatori della famiglia OATP. Il substrato fisiologico di questo trasportatore è la bilirubina;
 - cationi: trasportatore OCT. Ha una specificità relativamente superiore al precedente.

Destino del farmaco nell'epatocita

Le sostanze lipofile tendono a retrodiffondere. Nell'epatocita però esistono tutta una serie di proteine che legano le sostanze e le trasportano al reticolo endoplasmatico dove vengono biotrasformate. Questo processo verrà affrontato in dettaglio più avanti.

Uscita dall'epatocita

Se una sostanza originariamente lipofila è stata resa idrofila dal metabolismo epatico è ora necessario un sistema per espellerla attivamente. La gran parte delle sostanze vengono riversate nel circolo sanguigno da dove vengono eliminate con le urine; molto meno importante è l'eliminazione con la bile.

I metodi per espellere in modo veloce le sostanze nel sangue sono:

- esocitosi: riguarda sostanze come l'albumina e le lipoproteine;
- trasporto attivo: i trasportatori OUT presenti nella membrana sinusoidale dell'epatocita sono MRP1 e MRP3. Essi riconoscono sostanze coniugate col glutatone e sostanze acide;
- diffusione facilitata: sfruttano questo meccanismo diverse sostanze coniugate. E' il sistema quantitativamente più importante.

Il trasporto nei canalicoli biliari è un processo più lento e si avvale sempre di trasportatori OUT del tipo ATP-binding-cassette transporters (sono glicoproteine responsabili della farmaco resistenza delle cellule neoplastiche).

Esistono due importanti sottofamiglie:

- ABCB:
 - MDR1 (p170): riconosce cationi organici e composti neutri. E' una proteina polimorfa di cui esistono almeno due sottotipi: ciò rende conto del fatto che nella velocità di eliminazione di alcuni substrati esistono delle variazioni interindividuali;
 - MDR3 (flippasi): trasporta i fosfolipidi;
- ABCC: ne esistono sei isoforme. La più importante dal punto di vista della secrezione dei farmaci è la MRP2 che riconosce anioni organici. Essa inoltre trasporta le metallotioneine coniugate con glutatione eliminando così i metalli pesanti.

Esiste anche un trasportatore specifico per gli acidi biliari coniugati (CBAT) non riconosciuto da alcun farmaco.

In conclusione le caratteristiche dell'eliminazione per via biliare sono:

- riguarda solo sostanze ad alto peso molecolare (> 600 Da) perché i trasportatori OUT sono tutte glicoproteine;
- il meccanismo di eliminazione è sempre il trasporto attivo: ciò è testimoniato dal fatto che nella bile i farmaci sono sempre da 10 a 1000 volte più concentrati che nel plasma.

Ricircolo entero-epatico

La maggior parte delle sostanze eliminate con la bile non vengono più riassorbite. Una piccola parte dei farmaci però entra nel circolo entero-epatico: ciò ne rallenta pesantemente l'eliminazione e ne rende maggiori gli effetti tossici.

Ciò riguarda soprattutto le sostanze molto lipofile coniugate col glutatione perché le idrolasi dei batteri intestinali possono idrolizzare il legame liberando la molecola idrofila (es. il FANS indometocina che può provocare ulcerazioni intestinali).

E' possibile ovviare a questo inconveniente:

- somministrando colestiramina per os: è una resina a scambio ionico che lega tutto nell'intestino. L'uso protratto può causare malassorbimento;
- somministrando carbone attivo per os: è un carbone vegetale che funge da adsorbente aspecifico. Anche in questo caso l'uso protratto può causare malassorbimento;
- induzione enzimatica che produce un aumento del flusso biliare e con esso aumenta anche l'eliminazione dei farmaci.

Per le controindicazioni di queste tecniche esse vengono utilizzate solo in caso di intossicazione acuta (es. sovradosaggio di Warfarina o Digossina) o per motivi di studio.

Secrezione salivare

La secrezione salivare dei farmaci può assumere risvolti terapeutici oppure tossicologici.

Meccanismi di secrezione:

- il pH della saliva può variare tra 6 e 8 ma normalmente è leggermente acido. Per il fenomeno dello "ions trapping" le basi deboli possono per diffusione passiva concentrarsi nella saliva;
- trasporto: vengono trasportati per esempio il litio o la Rifampicina (antitubercolare che si usa anche per alcuni meningococchi sfruttando il fatto che esso si concentra nelle secrezioni. Un tipico segno di assunzione di questo farmaco è la lingua nigra e le lacrime arancioni);

L'antiepilettico Fenitoina si riversa nella saliva in concentrazioni tossiche tanto da poter causare ipertrofia gengivale.

Secrezione latte

Il pH è tendenzialmente leggermente acido. Una sostanza può essere secreta nel latte per diffusione passiva (ions trapping a carico delle basi deboli) ma sono anche presenti meccanismi di trasporto e molto attiva è pure la transitosi (che ha il ruolo fisiologico, per esempio, di trasportare le Ig).

Alcuni farmaci ingeriti dalla madre possono risultare tossici per il feto anche se in basse concentrazioni perché un neonato non possiede sistemi metabolici e escretivi maturi. Per questo motivo, se possibile, non bisognerebbe somministrare alcun farmaco durante l'allattamento.

I prodotti (farmaci, pesticidi) ingeriti da bovini e ovini sono concentrati nei prodotti caseari (DDT, Pb...).

Secrezione sudoripara

E' quantitativamente poco rilevante ma la secrezione di farmaci nel sudore può essere alla base della comparsa di dermatiti.

Metabolismo

Gli scopi fisiologici del metabolismo sono la detossificazione e la facilitazione dell'eliminazione.

Gli enzimi implicati nel metabolismo degli xenobiotici sono pochi, poco selettivi e presenti in grandi quantità. Le loro caratteristiche principali sono:

- hanno preferenza per le molecole lipofile;
- sono presenti specialmente nel fegato ma più in generale in tutti i distretti di accesso di sostanze estranee;
- la loro trascrizione è indotta dalla presenza di sostanze da eliminare;
- il loro ruolo fisiologico è quello di favorire l'eliminazione di substrati naturali. Essi in particolare tendono a manipolare una sostanza in modo da renderla più idrofila e di conseguenza più facilmente eliminabile per via urinaria.

Purtroppo non sempre la biotrasformazione rende un farmaco un metabolita inattivo facilmente eliminabile. Difatti essa può anche:

- trasformare un farmaco in un metabolita ancora attivo;
- trasformare un profarmaco in un farmaco (per es. il cortisone viene somministrato come tale perché più facilmente assorbibile. I processi metabolici lo riducono a cortisolo che è la forma attiva del farmaco);
- trasformare un farmaco in un metabolita tossico (per es. il paracetamolo è ossidato in un composto tossico).

Possiamo suddividere il metabolismo in due fasi:

1. è detta di "funzionalizzazione" perché ha "l'obiettivo" di esporre un gruppo funzionale. Le principali reazioni di 1^a fase:
 - I. ossidazione: è la categoria di reazioni più importante essendo noi esseri aerobi. Enzimi che catalizzano queste reazioni possono essere microsomiali (di cui i più importanti sono i citocromi P450) o non microsomiali (alcol deidrogenasi citoplasmatica o MAO mitocondriale);
 - II. riduzione: ancora una volta è catalizzata dai citocromi P450 quando vi è una bassa tensione di ossigeno (per es. all'interno dei batteri intestinali anaerobi);
 - III. idrolisi: è la reazione sfruttata per la trasformazione dei profarmaci in farmaci.
2. biosintesi (coniugazione): acetiltransferasi, metiltransferasi, glutatione transferasi... sono alcuni degli enzimi che catalizzano questa reazione.

Soprattutto le reazioni di 1^a fase possono produrre composti tossici. Queste reazioni, inoltre, a volte hanno come risultato finale una molecola più idrofoba di quella di partenza.

Organi sede del metabolismo sono:

+++ : fegato

++ : polmoni, rene e intestino (flora intestinale)

+: pelle, gonadi

Per quanto riguarda la localizzazione subcellulare degli enzimi biometabolici, i siti principali sono:

- reticolo endoplasmatico liscio (si parla di enzimi microsomiali): sede in particolare degli enzimi che compiono reazioni di 1^a fase;
- lisosomi: non sono di primaria importanza nel fegato;
- mitocondri: per es. le MAO (mono amino ossidasi) sono presenti nella membrana mitocondriale esterna;
- citoplasma: per es. l'alcol etilico è metabolizzato nel citoplasma.

Enzimi e reazioni di 1^a fase

Ossidazioni microsomiali

Citocromi P450

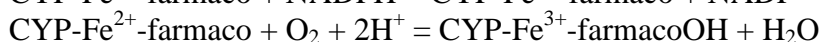
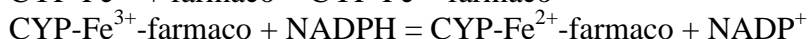
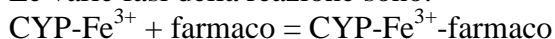
I citocromi P450 (o CYP) sono enzimi microsomiali che catalizzano reazioni di ossidazione. Sono proteine che legano un gruppo eme con una caratteristica particolare: a “riposo” lega un ferro ossidato (Fe^{3+}).

Due categorie di coenzimi sono utilizzati dai CYP:

- NADPH reduttasi (flavoproteina di membrana);
- cit b5 reduttasi: è un'altra eme-proteina che insieme alla NADPH reduttasi viene utilizzata nelle reazioni di ossidazione che si svolgono nel citoplasma.

Gli enzimi CYP sono definiti “mono ossigenasi a funzione mista”: difatti nella reazione da essi catalizzata uno dei due atomi derivati da una molecola di O_2 è fissato alla molecola del farmaco e l'altro viene invece unito a due atomi di idrogeno per formare una molecola d'acqua.

Le varie fasi della reazione sono:



A questo punto il farmaco ossidato è rilasciato e il ciclo ricomincia.

Non sempre purtroppo il prodotto finale contiene un gruppo $-\text{OH}$ perché se il composto che si forma è instabile perde l'ossigeno.

Elenco di tutte le reazioni catalizzate dai CYP:

- idrossilazione alifatica;
- idrossilazione aromatica (si formano i fenoli);
- dealchilazione: questa reazione produce un composto più idrofobo di quello di partenza;
- N o S-ossidazioni;
- deaminazione ossidativa;
- dealogenazione: questa reazione è operata dal CYP2E1, indotta dalla presenza di alcool etilico. Produce radicali che risultano epatotossici;
- epossidazione;
- sulfossidazione.

Gli enzimi CYP si classificano in

- famiglie (almeno 40% di omologia di sequenza): es. CYP1, CYP 2....
- subfamiglie (almeno 55% di omologia di sequenza): es. CYP1A, CYP1B...
- isoforme: es. CYP1A1, CYP1A2....

Il corredo di isoforme è specie-specifico. L'uomo possiede queste isoforme:

- CYP1A1: presente in tutti i tessuti, non è espresso costitutivamente. I più potenti induttori dell'espressione di quest'enzima sono gli idrocarburi policiclici come la diossina;
- CYP1A2: presente soprattutto nel fegato. E' espresso costitutivamente ma è anche fortemente inducibile;
- CYP2C9: presente nel fegato e nell'intestino. E' espresso costitutivamente e non è inducibile. E' soggetto a polimorfismo;
- CYP2C19: presente nel fegato, è espresso costitutivamente e polimorfo;
- CYP2D6: presente nel fegato e nel rene. E' espresso costitutivamente, polimorfo e inducibile;
- CYP2D19: presente nel fegato, è espresso costitutivamente ed è coinvolto nel metabolismo del Diazepam;
- CYP2E1: espresso costitutivamente nel fegato e nell'intestino, è facilmente inducibile. E' indotto dall'etanolo, dall'isoniazide e dai chetoni. La sua azione porta alla produzione di radicali;
- CYP3A4: presente nel fegato, è sia costitutivo che inducibile. Metabolizza il 60% dei farmaci.

Si noti che non sempre gli induttori e i substrati sono gli stessi.

I metaboliti che si formano a partire da un farmaco possono essere diversi a seconda dell'isoforma di CYP che ha catalizzato la loro trasformazione. Le isoforme di citocromo P450 sono specie-

specifiche quindi tutti gli uomini posseggono le stesse isoforme. Tuttavia il numero di copie espresse e la maggiore o minore inducibilità è diversa da uomo a uomo sia per fattori genetici (polimorfismo) sia per fattori ambientali: es. l'assunzione cronica di alcool determina l'espressione di grandi quantità di CYP2E1. Ciò giustifica il fatto che l'effetto tossicologico di uno xenobiotico varia da persona a persona.

Per esempio le benzodiazepine, composti con 5 anelli aromatici (più anelli aromatici ci sono più un composto è reattivo), possono essere idrossilate in posizioni diverse dando vita a composti con tossicità diversa a seconda dell'isoforma enzimatica che in quella persona ne catalizza la trasformazione.

FMO

La flavin-monossigenasi è un altro enzima ossidativi microsomiale che utilizza come coenzima il FAD. Ossida solo le amine terziarie e secondarie. Nei mammiferi ne esistono 5 forme. Nell'uomo è un enzima ubiquitario e una sua carenza di FMO provoca un caratteristico "odore di pesce" della cute.

Ossidazioni non microsomiali

Alcool deidrogenasi

Questo enzima citosolico trasforma l'alcool etilico in aldeide acetica (un composto tossico). Utilizza come coenzima il NAD.

Ne esistono 3 isoforme. La isoforma 1, tipicamente epatica, metabolizza l'alcool etilico. E' un sistema relativamente inefficiente perché viene saturato dall'alcool contenuto in circa mezzo litro di vino. A questo punto l'alcool viene metabolizzato da altri enzimi (catalasi o CYP2E1).

Aldeide deidrogenasi

E' un enzima ubiquitario e molto efficiente. E' fortemente indotto negli etilisti. Ne esistono 3 isoforme: la 1 e la 3 citosolica, la 2 mitocondriale. L'isoforma 2 è poco presente negli orientali e negli indiani americani e ciò giustifica la ridotta tolleranza all'alcool di queste popolazioni.

Nei SERT viene a volte somministrato un farmaco inibitore dell'aldeide deidrogenasi. Quando una persona beve alcolici si accumula allora aldeide acetica che provoca nel bevitore un sapore disgustoso che dovrebbe scoraggiare una successiva assunzione. Tuttavia, poiché l'aldeide acetica è molto tossica, il farmaco deve essere somministrato in maniera molto controllata.

Xantina ossidasi

Questo enzima ossida le basi puriniche e xantiniche (come la caffeina e la teofillina) in acido urico. L'allopurinolo, un farmaco che si usa nella terapia della gotta, è in grado di bloccare questo enzima. Il precursore dell'acido urico, l'alloxantina, è molto più solubile e facilmente eliminabile dell'acido urico.

Monoamino ossidasi (MAO) e diamino ossidasi (DAO)

MAO e DAO sono tra i principali metabolizzatori delle amine biogene (es. catecolamine, serotonina, istamina).

Mentre DAO è citosolico, MAO è un enzima mitocondriale, ubiquitario ma che si trova prevalentemente nel cervello. Ne esistono 2 isoforme:

- Isoforma A: metabolizza in particolare la serotonina (gli anti MAO-A sono antidepressivi);
- Isoforma B: metabolizza in particolare la dopamina (gli anti MAO-B sono farmaci anti Parkinson).

Riduzioni

Quasi tutti i processi di riduzione si risolvono in biotrasformazioni di rilevanza tossicologica.

Nitro e azoriduzioni

Queste reazioni avvengono solo in condizioni di bassissima PO_2 . Fisiologicamente avvengono solo nella flora batterica intestinale ma in particolari condizioni, per esempio nell'anestesia con gas, anche i CYP epatici possono catalizzare queste reazioni.

I nitrati e i nitriti, una volta utilizzati come conservanti alimentari, vengono convertiti nell'intestino in nitrosamine cancerogene.

Riduzione carbonili

E' tra tutte le reazioni quella con minore valenza tossicologica. Trasforma le aldeidi, i chetoni e gli alcoli secondari in alcoli primari, composti solitamente meno tossici dei reagenti. Gli enzimi che catalizzano questa reazione sono ubiquitari ma la loro espressione è caratterizzata da un'alta variabilità individuale.

Riduzione sulfossidi

Questa reazione è operata da enzimi epatici e renali che rigenerano i gruppi -SH

Riduzione chinoni

L'enzima citosolico DT diossidasi NADPH dipendente trasforma i chinoni in idrochinoni, prodotti che di solito non sono tossici. Tuttavia la via di sintesi passa attraverso reazioni come la produzione di semichinoni che comporta un aumento della produzione di radicali dell'ossigeno e quindi dello stress ossidativo.

Idrolisi

Questa reazione è sfruttata per la trasformazione dei profarmaci in farmaci.

Carbossiesterasi

Ne esistono due sottogruppi:

- Esterasi: enzimi a catalasi veloce;
- Amidasi: enzimi a catalasi lenta.

Queste proprietà vengono sfruttate nella progettazione dei profarmaci: per es. l'effetto di un anestetico è a minore o a maggiore durata a seconda che sia prodotto come estere o come amide.

Si trovano sia nel reticolo endoplasmatico che nel citosol e sono ubiquitari.

Epossido idrolasi

E' un enzima microsomiale, inducibile, di cui ne esistono 5 isoforme. E' ubiquitario ma è particolarmente espresso nei polmoni e nel fegato (dove è presente in rapporto 1:1 coi CYP).

L'enzima catalizza l'idrolisi degli epossidi: prodotti che si formano dall'ossidazione degli idrocarburi aromatici policiclici e che sono ancora più tossici degli idrocarburi stessi.

Peptidasi

Idrolizza i legami peptidici. Ne esistono 3 forme: aminopeptidasi, carbossipeptidasi e endopeptidasi. Una peptidasi è l'ACE.

Reazioni di 2^a fase

Lo scopo delle coniugazioni è aumentare l'idrofilicità degli xenobiotici.

Sono reazioni energeticamente dispendiose che possono svolgersi mediante due meccanismi:

1. esiste un agente coniugante che prima di essere "attaccato" allo xenobiotico deve essere attivato mediante formazione di un legame ad alta energia (si forma allora l' "agente attivato"). Con

l'aiuto di un enzima la reazione successiva è: agente attivato + xenobiotico = xenobiotico coniugato + prodotto residuo (es. AMP);

- meno importante quantitativamente è il secondo meccanismo che prevede l'attivazione energetica dello xenobiotico ed il successivo legame con un agente coniugante.

Gli agenti coniuganti sono tipicamente zuccheri, aminoacidi, acido acetico, acido solforico (tutte sostanze presenti piuttosto abbondantemente nelle cellule).

Coniugazione con zuccheri

Coniugazione con acido glucuronico

L'acido glucuronico è il prodotto attivo del glucosio che si forma mediante queste reazioni citosoliche:

- glucosio-P + UTP = UDP-glucosio (UDPG) + PPi. La liberazione di un gruppo pirofosfato sottintende la formazione di un legame altamente energetico;
- l'UDPG viene trasformato in acido glucuronico-UDP (UDPGA) ad opera dell'UDPG deidrogenasi.
- L'UDPGA si coniuga a livello microsomiale preferenzialmente con alcoli e fenoli prodotti dalle reazioni ossidative di prima fase. L'organo dove avvengono in maggior numero queste reazioni è il fegato.

Due enzimi operano la coniugazione:

- glicosil-transferasi tipo I: inducibile, ha come substrato fisiologico la bilirubina;
- glicosil-transferasi tipo II: ha come substrati fisiologici gli acidi biliari.

Gli alcoli e i fenoli coniugati possono essere idrolizzati da enzimi della flora batterica intestinale e entrare così nel ricircolo entero epatico.

Oltre a alcoli e fenoli vengono coniugati con acido glucuronico anche acidi, solfati e amine. Questi non possono entrare nel circolo entero epatico.

Coniugazione col ribosio

I farmaci coniugati col ribosio possono essere "scambiati" per basi dell'RNA, intercalati nella catena in formazione ed interferire con la sintesi proteica della cellula. Questi farmaci vengono utilizzati nella chemioterapia antitumorale.

Coniugazione con solfati

La reazione di coniugazione con solfati avviene in due tappe:

- $2 \text{ ATP} + \text{SO}_4^- = \text{PAPS} + \text{ADP} + \text{PPi}$. Il PAPS è l'agente coniugante attivato con due molecole di adenosina, una delle quali legata in maniera molto stabile in virtù della liberazione di un gruppo pirofosfato;
- trasferimento di un gruppo SO_3^- al substrato e trasformazione del PAPS in PAS.

I farmaci solfo-coniugati vengono preferenzialmente eliminati con le urine perché sono idrofili e perché a livello renale esiste un trasportatore specifico per queste sostanze.

Fisiologicamente i composti che vengono metabolizzati mediante coniugazione con acido solforico sono tra gli altri gli acidi biliari (ma se coniugati con solfati spesso rimangono troppo piccoli per essere eliminati per via biliare) e i neurotrasmettitori.

I substrati farmacologici di questa reazione sono alcoli, fenoli e amine aromatiche.

Queste reazioni sono meno quantitativamente rilevanti di quelle di coniugazione con zuccheri perché:

- la concentrazione citoplasmatica del PAPS è di 75 μM contro le 350 μM dell'UDPGA;
- gli enzimi glicosil-transferasi, a differenza delle solfo-transferasi, sono inducibili.

La solfoconiugazione può dare origine a specie elettrofile che possono causare mutazioni e neoplasie (in particolare epatiche). Infine, in certi casi (es. Minoxidil), la solforazione rappresenta la reazione di trasformazione del profarmaco in farmaco.

Coniugazione con aminoacidi

Queste reazioni sono quantitativamente poco importanti ma qualitativamente di grande interesse se non altro perché mediante tale via viene metabolizzata una grossa percentuale dell'aspirina.

Coniugazione con la glicina

Il meccanismo con cui avviene questa reazione è di secondo tipo: infatti la glicina non viene energizzata ma può legarsi ad un substrato attivato.

Utilizzano questo meccanismo di coniugazione gli xenobiotici che sono acidi aromatici (es. aspirina) e, in minor misura, acidi alifatici.

Gli organi più importanti in cui avviene questa reazione sono fegato e rene. L'eliminazione dei composti così formati è prevalentemente urinaria.

La reazione avviene in tre fasi:

- xenobiotico + ATP = xenobiotico adenilato + PPi (reazione mitocondriale);
- xenobiotico adenilato + CoA = xenobiotico-CoA + AMP (reazione mitocondriale catalizzata da una ligasi);
- xenobiotico-CoA + glicina + acido acetico = N-acetil-CoA + xenobiotico-glicina (reazione citoplasmatica catalizzata dall'enzima N-acetil transferasi).

La coniugazione con la glicina riguarda l'acido salicilico, metabolita dell'Aspirina (acido acetilsalicilico). Il prodotto finale è l'acido salicilurico ed esso rappresenta l'80% dei prodotti finali del farmaco. E' un composto difficilmente eliminabile perché è solamente secreto e la variazione di VFG e pH non influenzano la sua eliminazione.

Coniugazione con metionina

La metionina non viene fisicamente coniugata ma cede gruppi metili, i quali rappresentano gli agenti coniuganti.

L'attivazione della metionina prevede la formazione di un composto adenilato: la S-adenosilmetionina (SAM).

Il metabolismo delle catecolamine è operato mediante tale via e così anche quello di molti farmaci analoghi delle catecolamine.

Coniugazione con il glutatione

Questa reazione ha una certa valenza tossicologica perché il glutatione è lo "spazzino" dei radicali e ogni reazione che intacca il pool cellulare di glutatione può portare danno alla cellula nel senso di diminuire le sue difese contro le perossidazioni (in particolare quelle dei lipidi di membrana, che possono essere letali).

I substrati della coniugazione con il glutatione sono gli aromatici policiclici che sono molto elettrofili e reagiscono spontaneamente, sebbene lentamente, col glutatione. Esistono molte isoforme di enzimi catalizzanti, ognuno per ogni gruppo con il quale il glutatione può reagire. Le più importanti sono le ligandine.

Questi enzimi sono sottoposti a marcato polimorfismo genetico (differenze interpersonali nella quantità, inducibilità e efficienza dei vari enzimi).

Gli organi in cui avviene questa reazione sono soprattutto il fegato e il rene.

Tappe:

- Il farmaco è legato al gruppo SH della cisteina (glutatione = glutammico – cisteina – glicina) ad opera della glutatione transferasi;
- Glutammico e glicina vengono rimosse ad opera degli enzimi glutamil transpeptidasi e cistenil glicinasi. Residua il composto cisteina – S – farmaco;
- A pH leggermente acido come quello delle urine al composto viene addizionato un acetile ad opera della N-acetil transferasi. Il composto che origina si dice "mercapturato". Questo meccanismo può rappresentare un meccanismo di bioattivazione perché l'azione cancerogena di alcune sostanze si esplica solo quando esse vengano trasformate in mercapturati.

Paracetamolo: se somministrato correttamente il 95% viene coniugato con acido glucuronico ed eliminato. Una piccola parte è invece ossidata dal CYP2E1 e trasformato in chinone e successivamente coniugato con glutatione.

Se il pool di glutazione è depleto (es. nel digiuno) o se la formazione di chinone è aumentata per iperdosaggio di paracetamolo o per induzione del CYP2E1 (es. negli etilisti) il chinone non viene totalmente coniugato. Esso, essendo molto reattivo, risulta epatotossico e cancerogeno. L' N-acetilcisteina, uno sciroppo mucolitico, risulta l'antidoto dell'avvelenamento da paracetamolo perché agisce da agente coniugante.

Coniugazione con acido acetico

E' una reazione di I tipo perché l'agente coniugante è l'acetil-CoA.

I substrati di questa reazione sono le amine, preferenzialmente aromatiche. Gli enzimi catalizzatori sono le N-acetiltransferasi 1 e 2, quest'ultima soggetta a polimorfismo.

Gli organi in cui questi enzimi sono presenti sono:

- NAT 2: fegato e intestino. Il polimorfismo di questa isoforma determina l'esistenza di due fenotipi: acetilatori lenti e acetilatori veloci. L'isoniazide, un anti TBC che deve essere somministrato per mesi, è eliminato per acetilazione e deve perciò essere somministrato in dosi diverse agli acetilatori lenti rispetto ai veloci perché se non smaltito adeguatamente può causare neuriti periferiche.
- NAT1: ubiquitaria.

Tappe:

- enzima + Acetil-CoA = enzima acetilato + CoA;
- enzima acetilato + CoA + farmaco = farmaco acetilato + enzima + CoA.

Il prodotto di questa reazione è un amide, un composto abbastanza stabile. Tuttavia spesso i prodotti sono meno idrofili dei reagenti. Per esempio i sulfamidici vengono acetilati ma il prodotto finale è molto più insolubile del composto di partenza e tende perciò a precipitare nei reni

Variabilità metaboliche

Parecchi fattori influenzano la variabilità del metabolismo dei farmaci:

- Specie: ogni farmaco viene studiato su animali da esperimento il cui metabolismo presenta differenze sia qualitative che quantitative rispetto a quello dell'uomo. Per esempio il topo metabolizza via CYP molto più dell'uomo;
- Età: dal punto di vista del metabolismo le età della vita non sono tutte uguali:
 - prenatale e neonatale: nel feto i sistemi di I e II fase sono immaturi (cominciano a svilupparsi intorno al II trimestre di gravidanza) L'efficienza metabolica di un neonato è del 20-50% rispetto a quella di un adulto: mentre i sistemi CYP si sviluppano entro pochi mesi il corredo degli enzimi di II fase è pronto solo dopo un anno o più dalla nascita;
 - infantile (1-8 anni): in questa fase il metabolismo ossidativo è molto più sviluppato che nell'adulto e al limite le dosi/kg dovrebbero essere maggiori che le corrispondenti per gli adulti. In questo periodo si completano i sistemi di II fase;
 - età adulta: efficienza del 100%;
 - periodo senile: l'efficacia delle reazioni di I fase è molto variabile. La diminuzione del flusso sanguigno epatico fa diminuire l'efficienza dei sistemi ossidativi CYP dipendenti. Rimangono invariate le reazioni di II fase.
- Sesso: differenze metaboliche tra i due sessi sono state caratterizzate solo negli animali da esperimento (es. le FMO sono molto più espresse nei ratti femmina). Nel campo umano gli studi non sono ancora definitivi. Di sicuro ci sono differenze durante la gravidanza;
- Polimorfismo genetico (si parla di polimorfismo quando il carattere è presente in almeno l'1% della popolazione): esiste una grande variabilità tra individuo e individuo. Le mutazioni che casualmente possono avvenire nei geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci possono causare la mancata espressione dell'enzima, oppure avere come risultato una proteina più o meno efficiente o più o meno inducibile.

Polimorfismo dei CYP

CYP2D6

La dibesochinina, un β -bloccante, ha un effetto molto variabile. Studiando questo aspetto si è scoperto che esistono per lo meno due fenotipi riguardo al metabolismo via CYP2D6: metabolizzatori lenti e veloci.

Non solo la dibesochinina ma anche diverse decine di altri farmaci tra i quali antiaritmici, neurolettici e antidepressivi sono ossidati da questo enzima ed è ovvio che il polimorfismo che lo riguarda influenza gli effetti terapeutici e tossici dei farmaci. La codeina viene ossidata a morfina dal CYP2D6: l'effetto come antidolorifico della codeina dipende dall'efficienza dell'enzima.

Si possono distinguere 4 gruppi:

- metabolizzatori lenti;
- metabolizzatori intermedi;
- metabolizzatori normali;
- metabolizzatori ultraveloci.

CYP2C9

Questo enzima metabolizza almeno 16 dei più comuni farmaci tra cui la Warfarina. Si conoscono tre fenotipi:

- normale (CYP2C9*1);
- efficienza del 12% (CYP2C9*2);
- efficienza del 5% (CYP2C9*3).

Negli ultimi due casi altri enzimi suppliscono al deficit ma comunque la velocità di smaltimento di un farmaco risulterà inferiore al normale.

CYP2C19

Questa isoforma è per esempio coinvolta nel metabolismo dell'omeoprazolo, un inibitore di pompa. Ci sono 8 varianti e tutte portano all'espressione di una proteina non funzionante: in pratica è come se mancasse il gene.

Polimorfismo della pseudocolinesterasi plasmatica

Questi enzimi, scoperti per la loro capacità di scindere la succinilcolina (farmaco che si usa in anestesia generale), idrolizzano molti farmaci e profarmaci influenzandone l'effetto.

Normalmente la succinilcolina ha un effetto di pochi minuti ma un polimorfismo (colinesterasi plasmatica atipica) può aumentarne la durata fino ad ore. Sarebbe opportuno perciò effettuare il test detto "numero di dibucina", un inibitore della pseudocolinesterasi: l'enzima tipico è inibito all'80%, le forme atipiche fino al 20% (numeri intermedi negli eterozigoti).

Polimorfismo dell'alcool e dell'aldeide deidrogenasi

Gli effetti tossici dell'alcool sono direttamente correlati al polimorfismo di questi due enzimi.

Di alcool deidrogenasi ne esistono tre isoforme:

- ADH1: nessun polimorfismo funzionale;
- ADH2: alleli atipici nel 10% dei caucasici;
- ADH3: alleli atipici nel 40-50% dei caucasici. Gli alleli sono due: γ_1 e γ_2 :
 - $\gamma_1\gamma_1$: metabolismo rapido;
 - $\gamma_1\gamma_2$: metabolismo intermedio;
 - $\gamma_2\gamma_2$: metabolismo lento.

Per quanto riguarda invece l'aldeide deidrogenasi, l'unica soggetta a polimorfismo è l'ALDH2: essa ha 13 differenti alleli e sono tutti caratteri autosomici dominanti. Una carenza di ALDH2 causa un deficit nel metabolismo dell'acetaldeide, un composto tossico.

Polimorfismo della N-acetil transferasi

NAT1: non polimorfa

NAT2: presenza di due fenotipi:

- acetilatori lenti: sono di solito omozigoti. In essi si riscontra una maggiore incidenza di malattie iatrogene non conseguenti a sovradosaggio. Per es: isoniazide può causare neuriti periferiche, i sulfamidici anemie emolitiche, le amine aromatiche cancro alla vescica, l'idrolazina il lupus eritematoso sistemico...

- acetilatori veloci: possono essere omozigoti ma più spesso sono eterozigoti.

Per distinguere i due casi possono essere usati substrati come la caffeina o farmaci sonda come il dapsona o l'idrolazina.

Nei caucasici il 60 % della popolazione è composta da acetilatori lenti.

Esempi di fattori non genetici che possono influenzare la variabilità metabolica sono:

- i cibi cotti alla brace contengono idrocarburi aromatici policiclici che inducono la produzione del CYP1A1;
- succo di pompelmo: inibisce il CYP3A4.

Inibizione enzimatica

L'inibizione di un enzima coinvolto nel metabolismo di un farmaco può influenzare l'emivita di un farmaco o l'attività di un profarmaco nonché gli effetti tossici delle sostanze iatrogene.

Gli enzimi maggiormente coinvolti sono: CYP3A4, CYP2D6, CYP1A1, CYP1A2.

Inibizione del CYP

1. inibitori competitivi: interagiscono con il gruppo eme in maniera competitiva con lo xenobiotico indipendentemente dal fatto che siano metabolizzati dal CYP. Esempi:
 - I. la chinidina inibisce il CYP2D6;
 - II. gli antimicotici imidazolici inibiscono il CYP3A4, responsabile del metabolismo della maggior parte dei farmaci;
 - III. terfenodina o succo di pompelmo: inibiscono anch'essi il CYP3A4;
 - IV. fluoxetina (prozac): inibisce varie isoforme del CYP, in particolare il CYP2C19.
2. inibitori non competitivi: si legano al sito catalitico e non vengono rimossi dal substrato. Per esempio la Cimetidina, un antistaminico H₂, lega tutte le isoforme del CYP;
3. inibitori suicidi: il substrato del CYP, una volta terminato il processo enzimatico, si trasforma in un metabolita capace di operare un'inibizione non competitiva. Per esempio l'eritromicina è metabolizzata dal CYP3A4: i suoi metaboliti si legano irreversibilmente al CYP3A4 stesso.

Altri inibitori

Quasi tutti i farmaci che interagiscono con enzimi o recettori fungono da inibitori. Essi vengono sfruttati per ottenere degli effetti terapeutici: es anticolinesterasici, anti Mao, inibitori della xantina ossidasi nell'iperuricemia.

Induzione enzimatica

E' esattamente l'inverso del processo visto precedentemente: aumento del metabolismo degli xenobiotici conseguente all'aumento del numero degli enzimi metabolizzatori a causa di induzione operata dagli xenobiotici stessi o da cibi e inquinanti atmosferici.

Le conseguenze dell'induzione enzimatica sono:

- se il metabolita prodotto è inattivo diminuzione della durata d'azione del farmaco;
- se il metabolita prodotto è attivo perché il substrato era un profarmaco aumento della durata d'azione;
- se il metabolita è tossico aumento della tossicità.

L'induzione aromatica può essere classificata in base ai bersagli o alle sostanze campione che operano l'induzione:

Metilcolantrene: CYP1A1/CYP1A2 (oltre a glucoroniltransferasi e GSH transferasi)

Il metilcolantrene è il principale idrocarburo aromatico policiclico prodotto dal fumo di tabacco. Le diossine che si generano dalla combustione incompleta delle plastiche (TCCD) sono tuttavia mille volte più inducenti del metilcolantrene.

Un altro induttore è il β -naftoflavone, una sostanza contenuta nelle crucifere (cavolfiore e simili).

Le sostanze metabolizzate dalle isoforme CYP1A1 e CYP1A2 sono gli idrocarburi aromatici policiclici. La completa ossidazione porta alla formazione di fenoli ma la reazione può interrompersi con la produzione di epossidi (radicali).

Mentre il CYP1A1 è presente in fegato e rene solo se indotto e catalizza solo l'eventuale attivazione di sostanze cancerogene mentre non è di interesse farmacologico, il CYP1A2 metabolizza alcuni farmaci come il paracetamolo e la teofillina (nei fumatori la dose deve essere raddoppiata) o sostanze di uso comune come la caffeina.

E' l'unica induzione di cui si conoscono i dettagli molecolari. Essa è dovuta a tre fattori:

- esiste nel citosol un recettore che fa parte della famiglia dei recettori per gli ormoni steroidei ma il cui ligando fisiologico è sconosciuto (recettore orfano) che lega l'induttore e agisce da fattore di trascrizione a livello nucleare;
- attivazione trascrizione dell'mRNA;
- stabilizzazione dell'mRNA.

Induzione da fenobarbital: CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 (oltre a altri enzimi di 2^a fase)

Il fenobarbital è un anti-epilettico che ha come effetto collaterale quello di provocare epatomegalia a causa del notevole sviluppo del RER degli epatociti che induce. L'associazione del fenobarbital con altri farmaci provoca l'accorciamento dell'emivita di questi ultimi.

Meccanismo:

- induzione CYP3A4: il ligando si lega a un recettore della superfamiglia dei recettori per gli steroidi PXR o SXR. Quest'ultimo forma un eterodimero con il recettore dell'acido retinoico RXR e il dimero riconosce una presequenza nucleare che regola la sintesi dell'mRNA specifico per la famiglia CYP3A;
- induzione CYP2D6: dopo l'interazione con il ligando il recettore CAR forma un eterodimero con RXR ed esso interagisce con una presequenza nucleare che regola la sintesi dell'mRNA specifico per la famiglia CYP2D.

Induzione da corticosteroidi: CYP3A4

Gli induttori sono in grado di legare il recettore PXR ma non il CAR per cui l'induzione si limita al CYP3A4. Gli induttori inoltre favoriscono la trascrizione dell'mRNA e la stabilizzazione proteica.

Rispetto al precedente meccanismo non si verifica epatomegalia.

Comuni induttori sono: ormoni steroidei, spironolattone (diuretico risparmiatore di potassio), rifampicina, macrolidi, antimicotici azolici etc...

Il recettore PXR è diverso tra i mammiferi e quindi questo tipo di induzione è specie dipendente.

Molti farmaci, come gli estroprogestinici, sono metabolizzati dal CYP3A4. La somministrazione della pillola anticoncezionale in associazione con induttori del CYP3A4 può far diminuire l'efficacia della pillola stessa.

Induzione da etanolo: CYP2E1

Il CYP2E1 non è particolarmente efficiente nel completare il ciclo ossidativo e per questo è un generatore di radicali. Gli induttori principali sono: etanolo, isoniazide, acetone...

Le sostanze metabolizzate da questo citocromo e che possono dare origine a radicali (e quindi epatotossicità) sono: etanolo, cloruri del carbonio, benzene, paracetamolo.

Il meccanismo è incerto, probabilmente riguarda l'aumento dell'emivita dell'mRNA.

Induzione da clofibrato: CYP4A

Il clofibrato era un vecchio ipocolesterolemizzante che si utilizzava prima dell'avvento delle statine. Gli induttori, oltre a provocare l'aumento dell'espressione del CYP, causano la moltiplicazione dei perossisomi ed un aumento perciò dei livelli di H₂O₂ (sostanza tossica, nonostante la presenza nelle cellule dell'enzima catalasi).

Il meccanismo di induzione è poco conosciuto ma è probabile un coinvolgimento dell'RXR.

FARMACOCINETICA QUANTITATIVA

Obiettivo

La farmacocinetica quantitativa ha l'obiettivo di ottimizzare la terapia al fine di ottenere risposte terapeutiche prevedibili e minimizzare gli effetti tossici. Essa in pratica ci fornisce gli strumenti per stabilire quanto farmaco somministrare, quanto spesso e per quanto tempo.

Il principio fondamentale su cui si basa la farmacocinetica quantitativa è che esiste una correlazione, spesso lineare, tra livello plasmatico della sostanza e concentrazione della stessa a livello del sito d'azione: in sostanza c'è una relazione tra concentrazione plasmatica ed effetti terapeutici e tossici. Studi statistici hanno permesso di determinare i range di concentrazione al di sopra dei quali vi sono effetti tossici e al di sotto del quale gli effetti terapeutici non sono sufficienti. Concorrono a determinare le dosi terapeutiche i tre processi fondamentali:

- assorbimento: riguarda tutte le vie di somministrazione escluse l'endovenosa. La frazione di farmaco che, nell'unità di tempo, passa dal luogo di somministrazione al circolo si studia attraverso il concetto di biodisponibilità;
- distribuzione: i parametri che studiano il processo sono il volume apparente di distribuzione e la clearance d'organo (capacità di un tessuto di trattenere il farmaco e rimuoverlo dal circolo);
- eliminazione: si studia attraverso il "tempo di dimezzamento".

Cinetiche

Si parla di cinetiche quando ci si riferisce al modo col quale il farmaco si distribuisce tra due distretti (es. plasma e luogo di assorbimento o plasma e esterno nell'eliminazione).

Se si considera il passaggio di una sostanza da un compartimento A (es. plasma) ad un compartimento B (es. urina) la formula che regola il processo è:

$$V_{(C)} = KC^n$$

$V_{(C)}$ = velocità con cui aumenta la concentrazione del farmaco nell'unità di tempo nel lato B. Cambiando il segno dell'operazione $V_{(C)}$ assume il significato della velocità con cui diminuisce la concentrazione nel lato A.

K = costante di velocità di ordine n. E' importante specificare l'ordine della costante perché al variare dell'ordine variano le dimensioni della costante.

C = concentrazione della sostanza nel lato A.

n = numero che indica l'ordine della cinetica. Quasi tutti i processi farmacocinetici sono descritti da cinetiche di ordine zero o primo.

Cinetiche di ordine primo

Sono quelle più importanti dal punto di vista farmacologico. Un processo farmacocinetico di ordine primo è la diffusione passiva o la filtrazione e più in generale tutti i processi non saturabili.

Se si prende in considerazione l'eliminazione di un farmaco dal plasma la variazione di concentrazione nel tempo è descritta dalla formula:

$$V_{(C)} = -K_e C$$

K_e è detta costante di eliminazione di primo ordine e ha le dimensioni 1/t.

Come si vede $V_{(C)}$ non è una costante ma varia in funzione della concentrazione plasmatica.

E' possibile dimostrare che la formula che predice la concentrazione plasmatica in funzione del tempo è:

$$C = C_0 * e^{-K_e t}$$

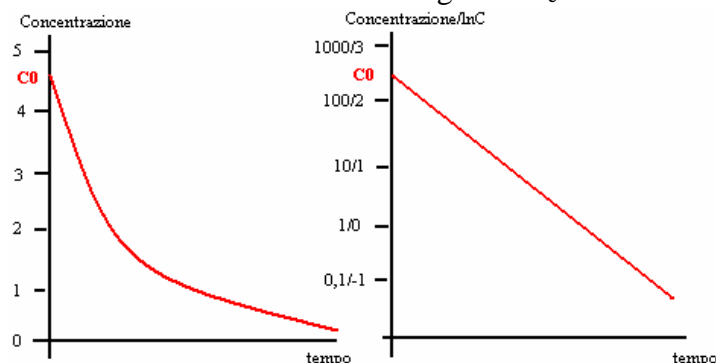
Dove C_0 è la concentrazione plasmatica iniziale.

La formula si può anche scrivere, per ottenere una funzione lineare, come:

$$\ln C = \ln C_0 - K_e t$$

Mettendo a confronto le ultime due formule risulta chiaro che mentre concentrazione e tempo variano esponenzialmente, vi è un rapporto lineare tra il $\ln C$ e il tempo. Utilizzando un'apposito

grafico, detto “semilogaritmico”, in cui l’ascissa è spaziata aritmeticamente mentre l’ordinata è in scala logaritmica si ottiene una retta con coefficiente angolare K_e .



La frazione di farmaco $(1 - C/C_0)$ eliminato nel tempo è uguale a:

$$f_e = 1 - e^{-K_e \cdot t}$$

La costante di eliminazione K_e esprimerebbe la frazione di farmaco che viene eliminata nell’unità di tempo (es. $0,5 \text{ ore}^{-1}$ vuol dire che metà del farmaco è eliminato in un’ora) se C , e di conseguenza la velocità di eliminazione, rimanessero costanti. Questo ovviamente non si verifica mai nelle cinetiche di ordine primo. Se tuttavia l’unità di misura scelta per la costante è piccola, concentrazione e velocità di eliminazione rimangono quasi costanti e la K_e diventa con buona approssimazione indice della frazione di farmaco eliminata nell’unità di tempo.

Cinetiche di ordine zero

La velocità del processo è indipendente dalla concentrazione del farmaco, cioè costante nel tempo.

$$V_{(C)} = K_0$$

Dove K_0 è la costante di eliminazione di ordine zero ed ha, come la velocità, dimensioni di C/t .

$$C = C_0 - K_0 t$$

Processi di ordine 0 sono:

- infusione endovenosa continua a velocità costante (pompa);
- preparati a cessione controllata (es. cerotti, compresse);
- assorbimento o eliminazione mediante enzimi o sistemi di trasporto a saturazione: la velocità di tali processi è espressa dalla formula:

$$V = (V_{\max} C) / (K_m + C)$$

dove K_m è la costante di Michaelis-Menten ed esprime la concentrazione a cui corrisponde una velocità uguale a $1/2 V_{\max}$. Se la concentrazione plasmatica di un farmaco è molto più piccola di K_m i processi enzimatici o di trasporto saranno di ordine primo; se invece $C > 10 K_m$ le cinetiche sono di ordine zero. Concentrazioni intermedie seguono cinetiche miste.

Per es: l’alcool etilico ha una distribuzione ubiquitaria (volume distribuzione 40 litri). 40 g di etanolo (mezzo litro di vino circa) portano ad una concentrazione plasmatica di 1g/l. La k_m per l’eliminazione dell’alcool è 0,08 g/l per cui essa è sempre un processo di ordine zero.

Le conseguenze delle eliminazioni di ordine zero sono importanti soprattutto nelle somministrazioni ripetute perché se la velocità di eliminazione è minore di quella di assorbimento si avrà un progressivo accumulo della sostanza fino a concentrazioni tossiche.

Rapporto quantità/volume

Il rapporto tra la quantità di farmaco assorbito e il volume di distribuzione è la concentrazione: $C = Q/V$.

Nelle cinetiche di ordine 1° la velocità è proporzionale alla concentrazione per cui se la velocità di eliminazione è proporzionale alla concentrazione lo sarà anche al volume. E’ allora possibile scrivere:

$$V_{(Q)} = -K_e Q \text{ con la stessa } K_e \text{ con dimensioni } t^{-1}.$$

Ciò non è vero per le cinetiche di ordine primo. Difatti

$Q = Q_0 - K_0^* t$ con K_0^* che ha dimensioni Q/t mentre la K_0 di cui si è parlato sopra ha dimensioni C/t , cioè Q/Vt .

Modelli

I modelli sono una semplificazione per spiegare con formule matematiche ciò che accade in un organismo complesso. Più essi sono semplici e più sono utili dal punto di vista pratico. Esistono tanti modelli farmacocinetici e tutti possono essere raggruppati in due grandi categorie:

- empirici: si propongono di ricavare equazioni che descrivono il sistema senza preoccuparsi di spiegare come ciò accade;
- meccanicistici: sono modelli matematici che tentano di predire ciò che si osserverà in base alla conoscenza del meccanismo che ne sta alla base.

Il modello compartimentale è uno dei più utilizzati in farmacocinetica.

I compartimenti sono sistemi cineticamente omogenei di organi in equilibrio tra loro. Costituiscono cioè un compartimento tutti i distretti che sono in ogni momento in equilibrio tra loro: ciò non vuol dire che le concentrazioni siano necessariamente uguali ma che al variare della concentrazione in un distretto varia della stessa misura anche la concentrazione negli altri distretti (in sostanza il rapporto tra le concentrazioni si mantiene costante).

Nell'uomo in realtà esistono innumerevoli compartimenti ma volendo semplificare possiamo ridurci al massimo a 2-3 compartimenti.

Il modello compartimentale permette di studiare le cinetiche di ordine primo che caratterizzano la maggior parte dei farmaci.

Modello monocompartimentale

E' applicabile il modello monocompartimentale alla cinetica di un farmaco se dopo 1-2 minuti da una monosomministrazione per bolo endovenoso tutti i distretti dell'organismo sono in equilibrio.

In questo modello non si considera la distribuzione del farmaco ma solo la sua eliminazione che avviene secondo la già citata legge:

$$\ln C = \ln C_0 - K_{et}t$$

Farmaci che seguono una cinetica monocompartimentale devono essere:

- diffusibili (liposolubili);
- non legati alle proteine plasmatiche (difficile che ciò avvenga per farmaci liposolubili).

Un esempio di un farmaco che obbedisce a questi criteri è l'Antipirina.

Modello bicompartimentale

E' un modello meno semplice ma che meglio esprime la reale cinetica di un farmaco.

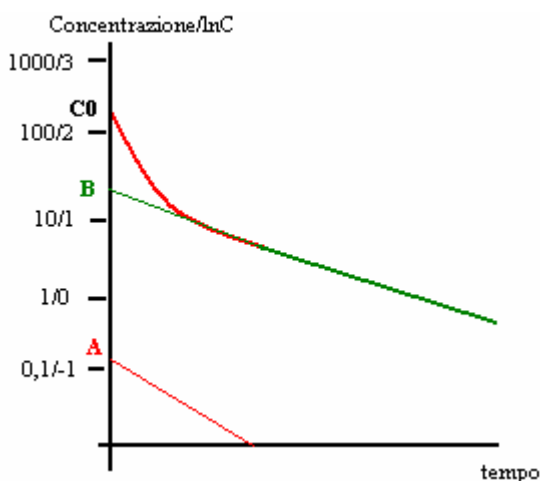
In questo modello possiamo distinguere due compartimenti:

- compartimento centrale: comprende il plasma e tutti gli organi in equilibrio virtualmente immediato (pochi minuti) con esso dopo somministrazione di bolo EV;
- compartimento periferico in comunicazione con il centrale e che raggiunge un equilibrio con esso solo dopo un certo tempo.

... e tre costanti:

- K_{12} : passaggio del farmaco dal compartimento centrale al periferico;
- K_{21} : passaggio del farmaco dal compartimento periferico al centrale;
- K_{10} : eliminazione del farmaco dal compartimento centrale.

Si può dimostrare che la C_p (concentrazione plasmatica) del farmaco nel compartimento centrale obbedisce a questa legge:



$$C_p(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

Dove la prima parte dell'equazione rappresenta la componente di diminuzione della concentrazione nel compartimento centrale dovuta alla distribuzione mentre la seconda rappresenta la parte dovuta all'eliminazione.

Possiamo distinguere due fasi: la fase A (in rosso) in cui vi è sia distribuzione che eliminazione e la concentrazione C_p diminuisce in virtù dei due processi.

Una volta che i due compartimenti sono in equilibrio si entra nella fase B (in verde) in cui in pratica si ha un modello monocompartimentale.

$\ln B$: intercetta della retta della fase di eliminazione con l'asse delle ordinate.

$-\beta$ = è il coefficiente angolare della retta della fase di eliminazione. Essa è diversa dalla K_{10} , la costante di eliminazione dal compartimento centrale poiché essa dipende anche da K_{12} e K_{21} . Se infatti K_{21} è minore di K_{12} ciò significa che il passaggio dal compartimento centrale è più agevole del processo opposto a causa dell'affinità del farmaco per i tessuti. In tal caso questo processo rappresenta la reazione limitante che fa sì che β sia minore di K_{10} .

A e α = valori estrapolati col metodo dei "residui". Durante la prima fase si sottraggono ai valori osservati $\ln C_{\text{oss}}$ i valori $\ln C_{\text{est}}$ che giacciono sul prolungamento della retta di eliminazione (e che si otterrebbero se la cinetica fosse monocompartimentale). In tal modo si considera solo la distribuzione ottenendo una retta. Infatti:

$\ln C_{\text{res}} = \ln A - \alpha t$ (e quindi $C_{\text{res}} = Ae^{-\alpha t}$).

E' sufficiente mettere a sistema due valori di $\ln C_{\text{res}}$ per ricavare sia $\ln A$ che α . L'intercetta della retta passante per i valori $\ln C_{\text{res}}$ è $\ln A$ mentre $-\alpha$ è il suo coefficiente angolare.

Infine la somma di $\ln A$ e $\ln B$ danno come risultato la concentrazione iniziale nel solo compartimento centrale:

$\ln C_0 = \ln A + \ln B$

Parametri farmacocinetici

Volume di distribuzione apparente

Per volume apparente di distribuzione V_D si intende il volume idrico in cui il farmaco dovrebbe distribuirsi per avere in tutto l'organismo la stessa concentrazione che ha nel plasma. Questo parametro dà un'idea del destino distributivo di un farmaco.

Infatti se $V_D < V$ reale dei fluidi in cui il farmaco si distribuisce ciò è un indizio che il farmaco viene trattenuto nel plasma in seguito a legame alle proteine plasmatiche; in generale ciò avviene per le sostanze acide lipofile che si legano all'albumina. Se invece $V_D > V$ reale ciò significa che il farmaco è sequestrato fuori dal distretto vascolare: per esempio il volume di distribuzione apparente della digossina, un farmaco basico, è di 700 litri.

Nelle cinetiche di ordine 1° monocompartimentali il V_D è una costante, per le cinetiche bicompartimentali il discorso è leggermente più complesso.

L'unico momento in cui si determina con precisione il V_D è il t_0 cui corrisponde una C_0 (estrapolata con calcoli matematici dalla curva di C/t). Col tempo l'eliminazione fa diminuire la concentrazione plasmatica ed altera il valore del volume apparente di distribuzione.

Cinetiche monocompartimentali

$V_D = Q_0/C_0$ dove Q_0 è la quantità di farmaco somministrata (dose).

Cinetiche di ordine 1° bicompartimentali

Se al tempo 0 si divide la dose somministrata per la concentrazione plasmatica C_0 si ottiene il volume di distribuzione limitatamente al solo compartimento centrale V_C . Durante il processo distributivo il volume di distribuzione aumenta in virtù degli scambi col compartimento periferico. Una volta raggiunto l'equilibrio (fase B) il valore finale del volume di distribuzione viene detto V_β . E' possibile ottenere una stima di V_β , detto V_{est} , riducendo la curva della cinetica bicompartimentale ad una retta: in tal caso al posto di C_0 si utilizza la concentrazione B. Essa corrisponde alla concentrazione plasmatica del farmaco che si otterrebbe a equilibrio raggiunto se non ci fosse stata l'eliminazione.

$V_{\text{est}} = Q_0/B$

Più V_{est} è maggiore di V_C tanto più C_0 è maggiore di B e tanto più quindi la cinetica ha un carattere bicompartimentale.

Una misura più precisa di V_β è data dalla formula:

$V_\beta = K_{10}V_C/\beta$

Tempo di dimezzamento

E' il tempo che richiede l'eliminazione dall'organismo di metà del farmaco in esso presente. Anche il $t_{1/2}$ è una costante indipendente dalla dose somministrata nelle cinetiche di ordine primo ma non in quelle di ordine zero.

Questo parametro serve per misurare l'eliminazione, calcolare gli intervalli di dosaggio o infine per stimare l'accumulo.

Cinetiche di ordine 1° monocompartimentali

$$C = C_0 e^{-K_e t}$$

$C/C_0 = e^{-K_e t}$ dove C/C_0 è la frazione della concentrazione iniziale rimasta al tempo stabilito.

Poiché nelle cinetiche di ordine 1° monocompartimentali $C/C_0 = Q/Q_0$ e consideriamo $Q/Q_0 = 1/2$

$$1/2 = e^{-K_e T/2}$$

$$\ln 1/2 = -K_e T/2$$

$$T^{1/2} = 0,693/K_e$$

Poiché $C = C_0 e^{-K_e t}$ è una funzione che tende a 0 per t che tende ad infinito l'eliminazione di un farmaco non avviene mai completamente. Tuttavia si considera un farmaco eliminato del tutto quando $Q/Q_0 = 0,1$ cui corrisponde un:

$$t_{0,1} = 3,3 t/2$$

Cinetiche di ordine 1° bicompartimentali.

Esiste un $t^{1/2}$ relativo alla distribuzione ed uno relativo alla eliminazione. Quest'ultimo è di solito quello che si considera essere il $t^{1/2}$ generale. Esso è:

$$t^{1/2} = 0,693/\beta$$

Cinetiche di ordine zero

$$C = C_0 - K_0 T$$

$$Q = Q_0 - K^*_0 T$$

Dove K_0 e K^*_0 sono i coefficienti che esprimono rispettivamente la variazione della concentrazione plasmatica e la quantità di farmaco eliminata in funzione del tempo.

Considerando $Q = 1/2 Q_0$

$$t^{1/2} = 0,5 Q_0 / K^*_0$$

$t^{1/2}$ in questo caso non è una costante ma varia in funzione della dose somministrata.

Clearance

La clearance è definita come il volume di plasma che un organo o tutto l'organismo (clearance sistemica) depurano da una determinata sostanza nell'unità di tempo. In base alla definizione la clearance sistemica è definita come:

$$Cl = Ve(Q)/C = Q/t / Q/V = V/t \text{ (si dimostra che la clearance ha le dimensioni di volume su tempo).}$$

Dove $Ve(Q)$ è la variazione nel tempo della quantità di sostanza presente nell'organismo.

Poiché in una cinetica di primo ordine $Ve(Q)$ e C variano in modo linearmente proporzionale la clearance Cl è una costante.

Cinetiche di ordine primo monocompartimentali

$$Ve(Q) = Cl * C$$

$$Ve(Q) = K_e * Q$$

$$Cl * C = K_e * Q$$

$$Cl = K_e * Q/C$$

$$\text{Siccome } Q/C = V_D$$

$$Cl = K_e * V_D \text{ oppure, considerando che } K_e = 0,693/T^{1/2}, Cl = 0,693/T^{1/2} * V_D$$

Esprimendo la formula precedente come $t_{1/2} = 0,693 V_D / Cl$ risulta evidente che la clearance non può essere considerata come un indice di velocità di eliminazione ma solo come un indice di efficienza della funzione emuntoria: a parità di efficienza del sistema richiede più tempo l'eliminazione di un farmaco che ha un volume di distribuzione maggiore. Il vero indice di velocità di eliminazione è perciò $t_{1/2}$. Si noti infine come tutte e tre le costanti sono collegate tra loro.

Cinetiche di ordine primo bicompartimentali

$$Cl = \beta * V_\beta (V_{est})$$

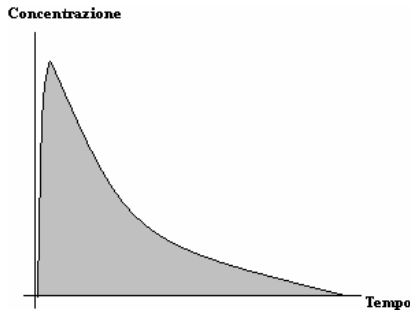
Cinetiche di ordine zero

La clearance non è una costante.

$Cl = Ve(Q)/C$ essendo $Ve(Q) = K_0^*$ che abbiamo detto essere il parametro che esprime la quantità di farmaco eliminata in funzione del tempo, si ottiene **$Cl = K_0^*/C$**

La clearance varia in sostanza in funzione della concentrazione plasmatica.

Determinazione della clearance con metodi non compartimentali



Determinare la clearance utilizzando le formule sopra descritte può non essere agevole perché bisognerebbe misurare la quantità di farmaco eliminato in un tempo abbastanza piccolo affinché la concentrazione plasmatica rimanesse costante. Al di là di questo può non essere agevole misurare l'eliminazione di un farmaco.

Tuttavia costruendo la curva concentrazione-tempo e calcolando l'area sotto la curva (AUC) è possibile dimostrare che:

$$Cl = Q_e / AUC$$

Dove Q_e è la quantità di farmaco eliminato (se si considera l'intero processo $Q_e = Q_0$).

Senza ricorrere agli integrali il "metodo dei trapezoidi" permette di ottenere una stima della clearance abbastanza precisa. La precisione, ovviamente, aumenta all'aumentare del numero delle concentrazioni misurate.

Clearance d'organo e clearance renale

In senso generale la Clearance di un organo è:

$$Cl = \Phi(C_a - C_v) / C_a$$

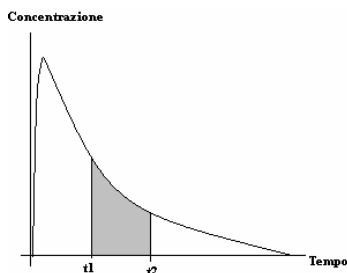
Dove Φ è il flusso sanguigno che percola l'organo e C_a e C_v rispettivamente le concentrazioni del farmaco al lato venoso e arterioso (cioè prima e dopo il passaggio attraverso l'organo).

Il rapporto $(C_a - C_v)/C_a$ è detto rapporto di estrazione e rappresenta la frazione di farmaco estratta in un singolo passaggio attraverso l'organo.

I due organi più importanti nella clearance dei farmaci sono:

- Fegato: misurare C_a e C_v richiederebbero tecniche di sampling invasivo non applicabili all'uomo. Tuttavia se non vi sono prove che altri organi contribuiscono in maniera significativa alla clearance di un farmaco si suole considerare la clearance epatica come la differenza tra la clearance sistemica e quella renale;
- Rene: la clearance renale è descritta dalla formula:

$$Cl_R = U \cdot V / P$$



dove U è la concentrazione urinaria nel farmaco, V la velocità di flusso urinario e P la concentrazione plasmatica del farmaco. La formula è tuttavia utilizzabile solo se si presuppone che P rimanga costante. Ciò è possibile per soluti fisiologici come la creatinina in cui velocità di eliminazione e produzione sono praticamente identiche oppure per farmaci la cui concentrazione plasmatica varia molto lentamente.

In caso contrario è più corretto applicare la formula:

$$Cl_R = Q_{e1-2} / AUC_{t1-t2}$$

Dove Q_{e1-2} è la quantità di farmaco eliminato con le urine e AUC_{t1-t2} è l'area sotto la curva nell'intervallo di tempo da 1 a 2.

Il contributo dell'escrezione renale all'eliminazione totale è uguale al rapporto tra la quantità di farmaco escreta dal rene e la quantità totale di farmaco eliminato.

$$f_{er} = Q_{er} / Q_e = Cl_R / Cl$$

Biodisponibilità

La biodisponibilità è un parametro che descrive la frazione di farmaco somministrato che raggiunge il circolo sistemico e la rapidità con cui esso lo raggiunge.

Anche se il termine in realtà prende in considerazione sia la quantità che il tempo nella prassi esso è utilizzato come sinonimo di frazione biodisponibile.

Poiché non è possibile misurare direttamente la quantità di farmaco che raggiunge il circolo la biodisponibilità può essere calcolata solo in riferimento ad uno standard rappresentato da una monosomministrazione endovenosa.

Considerando tutta la curva di una somministrazione endovenosa:

$$Cl = Q_0 / AUC_{ev}$$

E tutta la curva della stessa somministrazione per altre vie, posta F la frazione del farmaco che raggiunge il circolo:

$$Cl = FQ_0 / AUC_{or}$$

Dal momento che la clearance non è dipendente dalla modalità di somministrazione si ottiene:

$$F = AUC_{or} / AUC_{ev}$$

Il secondo aspetto della biodisponibilità, la rapidità di assorbimento, può essere valutato in base al valore t_{max} , il tempo trascorso dalla somministrazione al raggiungimento del picco di concentrazione. Anche in questo caso però il valore deve essere confrontato con il t_{max} di una analoga dose somministrata per endovena perché è intuitivo che maggiore è la dose maggiore è t_{max} .

Somministrazione continua endovenosa

La somministrazione per singolo bolo endovenoso permette di raggiungere immediatamente una determinata concentrazione che poi diminuisce nel tempo in virtù dell'eliminazione.

Se invece si desidera che una concentrazione venga mantenuta nel tempo è necessario somministrare dosi ripetute. In particolare l'infusione endovenosa continua rappresenta l'unico metodo che consenta un controllo sufficientemente preciso della concentrazione plasmatica.

Se il farmaco segue una cinetica di ordine primo all'inizio la concentrazione cresce perché a bassi valori di concentrazione la velocità di infusione risulta superiore a quella di eliminazione. Poi, a mano a mano che la concentrazione cresce, aumenta anche la velocità di eliminazione finché si raggiunge un valore di concentrazione (detta concentrazione di stato stazionario) in cui velocità di eliminazione e di infusione rimangono costanti.

Cinetiche monocompartimentali

La velocità con cui, ad un dato momento, varia la quantità di farmaco presente nell'organismo è uguale a:

$$V(Q) = K^a$$

Dove K^a è la costante di infusione (di ordine zero) espressa come quantità di farmaco che arriva in circolo per unità di tempo.

E' possibile ottenere un'equazione che predice la concentrazione plasmatica del farmaco in funzione del tempo:

$$C = (K^a / K_e V_d) * (1 - e^{-K_e * t})$$

Come si può vedere dal grafico la concentrazione tende asintoticamente alla concentrazione di stato stazionario. Si può quindi dire che essa viene raggiunta ad un tempo infinito. In questo caso il secondo termine dell'equazione risulta uguale a 0 e:

$$C_{ss} = K^a / K_e V_d \text{ oppure } C_{ss} = K^a / Cl$$

Per convenzione si considera lo stato stazionario raggiunto quando $C/C_{ss} = 0,9$. E' possibile calcolare in quanto tempo (t_{ss}) tale concentrazione viene raggiunta:

$$t_{ss} = 3,3 t_{1/2}$$

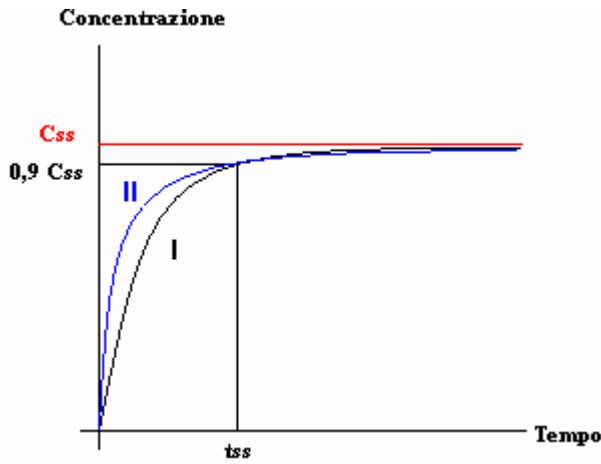
Questa equazione è analoga a quella che permetteva di calcolare la completa eliminazione di un farmaco per una singola somministrazione.

In generale il tempo t_f per raggiungere una qualsiasi frazione $f = C/C_{ss}$ è:

$$t_f = -\ln(1-f) / K_e \text{ oppure } t_f = -\ln(1-f) / 0,693 * t_{1/2}$$

Farmaci con uguale clearance, che vengono somministrati ad uguale velocità, raggiungono uguali concentrazioni di stato stazionario anche se hanno diverso volume di distribuzione. Cambia tuttavia il tempo con cui si raggiunge lo stato stazionario perché a parità di clearance il farmaco con maggiore volume di distribuzione ha un tempo di dimezzamento più lungo.

Cinetiche bicompartimentali



Considerando due farmaci con la stessa clearance, uno che si distribuisce con una cinetica bicompartmentale e l'altro con cinetica monocompartmentale, la curva di concentrazione di quello con cinetica bicompartmentale (II) è inizialmente leggermente più alta di quello con cinetica monocompartmentale (I) perché il farmaco non si distribuisce immediatamente in tutto l'organismo. Alla fine C_{ss} è lo stesso perché la clearance dei due farmaci è la stessa.

La formula che esprime la concentrazione di stato stazionario è:

$$C_{ss} = K^a / \beta V_D$$

Non è possibile ricavare un'espressione per

calcolare il tempo necessario per raggiungere una data frazione della concentrazione stato stazionario. Data la somiglianza delle due curve si può però ai fini pratici considerare il t_{ss} indipendente dal tipo di cinetica che il farmaco segue.

Somministrazione ripetuta a intervalli costanti

Quando si somministra un farmaco ad intervalli costanti le concentrazioni plasmatiche oscillano in virtù dell'eliminazione che si verifica negli intervalli tra una dose e l'altra. Tuttavia se gli intervalli sono sufficientemente brevi affinché tutto il farmaco non sia stato eliminato la quantità di farmaco somministrata si va a sommare a quella ancora presente in virtù della dose precedente. Quando la concentrazione plasmatica è tale che l'eliminazione tra una dose e l'altra è esattamente uguale alla quantità somministrata con una singola dose la concentrazione continua a fluttuare tra due concentrazioni fisse: la C_{ss}^{MAX} e la C_{ss}^{MIN} .

La concentrazione massima dopo N dosi, posto τ l'intervallo tra due dosi, è:

$$C_{ss}^{MAX} = D/V_D (1 - e^{-Nk\tau} / 1 - e^{-k\tau})$$

C_{ss}^{MIN} è uguale a C_{ss}^{MAX} meno la variazione di concentrazione dovuta all'eliminazione durante il tempo τ :

$$C_{ss}^{MIN} = C_{ss}^{MAX} e^{-k\tau}$$

Le C_{ss}^{MAX} e C_{ss}^{MIN} si ottengono ponendo N uguale a infinito.

$$C_{ss}^{MAX} = D/V_D (1 / 1 - e^{-k\tau})$$

$$C_{ss}^{MIN} = C_{ss}^{MAX} e^{-k\tau}$$

Le formule sono applicabili solo per le cinetiche di ordine primo: in quelle di ordine zero si ottiene una concentrazione stazionaria solamente se la dose somministrata è sempre esattamente uguale alla quantità di farmaco eliminato nell'intervallo di tempo tra una somministrazione e l'altra.

FARMACODINAMICA

Meccanismi d'azione dei farmaci

La farmacodinamica studia il meccanismo d'azione di un farmaco e il suo effetto tossico o terapeutico.

Il meccanismo d'azione di un farmaco può essere:

- **Aspecifico:** il farmaco non ha un preciso sito d'azione. Le caratteristiche di questi farmaci sono:
 - Agiscono a concentrazioni molto alte ($10^{-2} - 10^{-3}$ M);
 - Il loro effetto non è dovuto al legame con uno specifico sito recettoriale ma a loro proprietà chimico-fisiche.

Es. purganti, antiacidi, disinfettanti esterni.

- **Specifico:** Le caratteristiche di questi farmaci sono:
 - Agiscono a concentrazioni basse ($10^{-6} - 10^{-8}$ M);
 - Specificità biologica: il luogo d'azione dei farmaci è stabilito. I bersagli dei farmaci sono detti "siti recettoriali" di membrana o citoplasmatici che possono essere veri e propri recettori oppure altre strutture, detti effettori;

Parlando di siti recettoriali distinguiamo appunto:

- **Effettore:** struttura legandosi alla quale il farmaco produce un effetto diretto (es. enzimi, carrier, canali ionici...);
- **Recettore:** l'effetto farmacologico non è dovuto al legame recettore-farmaco ma alla catena di eventi mediata da un secondo messaggero che si scatena in seguito al legame. In particolare i farmaci che legandosi al recettore evocano la stessa risposta del ligando fisiologico sono detti "agonisti", in caso contrario sono detti "antagonisti".

I farmaci in generale si legano reversibilmente al sito recettoriale. In caso contrario il legame assume rilevanza tossicologica.

I principali metodi di studio del legame farmaco-sito recettoriale sono:

- curva dose-risposta: usata soprattutto nei farmaci con bersaglio recettoriale;
- studi di binding farmaco-recettore;
- isolamento, purificazione, clonazione dei recettori per studiarne la struttura.
- Specificità chimica: la struttura chimica del farmaco deve essere adatta al legame a livello del sito recettoriale.

Il rapporto "struttura-azione" è studiato a livello informatico mediante la comparazione della struttura di un potenziale farmaco con quella dei siti recettoriali più comuni.

Si è capito che al di là della struttura bruta di un farmaco è molto importante la stereospecificità: isomeri ottici e geometrici hanno proprietà farmacologiche diverse.

- Gli isomeri ottici (enantiomeri) sono farmaci che posseggono un carbonio chirale, cioè a cui sono legati quattro sostituenti diversi. A seconda della disposizione spaziale dei sostituenti questi composti deviano la luce polarizzata in maniera diversa (si parla di destrorotatori e levorotatori).

Gli enantiomeri hanno identiche proprietà chimiche e fisiche ma proprietà biologiche diverse: in particolare solo un tipo di enantiomero potrà legarsi con tre sostituenti ad un sito recettoriale composto da tre siti di legame asimmetrici.

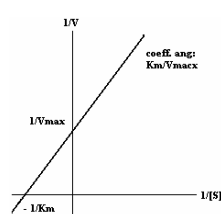
Se gli enantiomeri hanno identiche proprietà biologiche usare una miscela (racemo) piuttosto che un enantiomero puro non cambia, in caso contrario (se i due isomeri hanno effetto di diversa entità o se solo un isomero è attivo) gli effetti terapeutici e farmacologici sono diversi.

Mentre i sistemi biologici discriminano molto bene gli enantiomeri è difficile purificare isomeri ottici di sintesi. Per rendere questo compito più agevole è possibile sintetizzare "diastereoisomeri". Essi si ottengono aggiungendo a livello di uno dei 4 siti di legame un'altra molecola formando, per es., un'amide piuttosto che un'estere. In questa maniera le molecole diventano isomeri geometrici con proprietà chimiche e fisiche diverse e che possono essere purificati agevolmente.

- Gli isomeri geometrici sono molecole con la stessa struttura bruta ma con struttura spaziale diversa. Per esempio la presenza di un doppio legame prevede l'esistenza di due isomeri geometrici: cis e trans. Gli isomeri geometrici hanno non solo proprietà farmacologiche ma anche chimico-fisiche diverse.

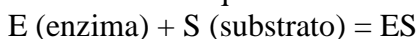
Enantiomeri, diastereoisomeri e isomeri geometrici sono tre categorie di farmaci stereoscopici.

Interazione farmaco-effettore



Farmaco come substrato di un enzima

La valutazione quantitativa del legame farmaco-effettore, cioè della reazione:



$$\text{con } K_m = [E][S]/[ES]$$

si effettua mediante la equazione di Michaelis che calcola la velocità della reazione enzimatica in funzione della concentrazione del substrato:

$$V = (V_{MAX} * [S]) / (K_m + [S])$$

Per ottenere una equazione lineare è possibile esprimere la formula precedente ponendo $1/V$ anziché V e $1/[S]$ anziché $[S]$. Si ottiene allora:

$$1/V = K_m/V_{MAX} * 1/[S] + 1/V_{MAX}$$

La relazione lineare è resa più esplicita ponendo $Y = 1/V$ e $X = 1/[S]$:

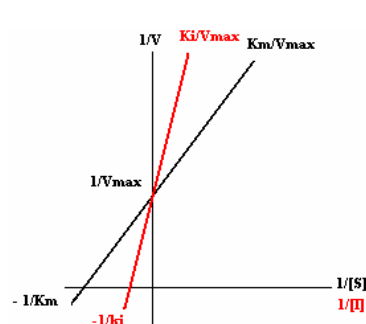
$$Y = K_m/V_{MAX} * X + 1/V_{MAX}$$

Si noti che quando $1/V = 0$ si ha che $1/[S] = -1/K_m$ mentre per $1/[S] = 0$ si ha che $1/V = 1/V_{MAX}$

Farmaco come inibitore di un enzima

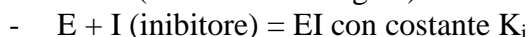
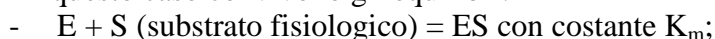
Il legame, e quindi l'inibizione, può essere:

- Irreversibile: si tratta di legami covalenti con valenza tossicologica. Il legame non raggiunge mai l'equilibrio ma aumenta nel tempo;
- Reversibile: Si possono distinguere due tipi di inibitori reversibili:
 - Competitivi: si legano al sito catalitico ma non sono metabolizzati;
 - Non competitivi: le sostanze non si legano al sito catalitico ma sono comunque in grado di alterare l'attività dell'enzima.



Inibitori competitivi

In questo caso convivono gli equilibri:

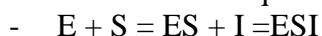


Si noti dal grafico che in questo caso la V_{MAX} è la stessa. Cambia tuttavia la K in virtù della diversa affinità che i due composti hanno per l'enzima.

Un esempio di questo tipo di inibitore è rappresentato dagli antibiotici sulfamidici come inibitori dell'acido folico sintetasi batterica.

Inibitori non competitivi

Non esistono due equazioni ben

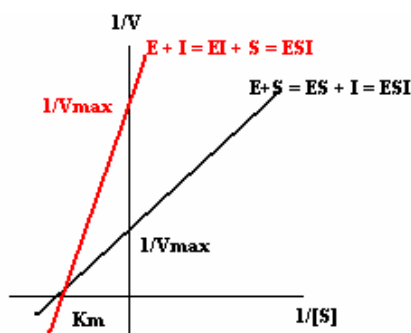


Oppure



Il legame EI non altera il legame funzione catalitica. In sostanza varia la V_{MAX} .

Un esempio di questo tipo di metotrexate, un inibitore non competitivo della diidrofolato reduttasi, che trasforma l'acido folico nel suo metabolita attivo diidrofolato.



distinte ma abbiamo:

con il substrato ma altera la K_m rimane costante ma

inibitori è rappresentato dal metotrexate che trasforma l'acido folico

Interazione farmaco-recettore

I recettori sono entità molto complesse definiti come macromolecole con siti di riconoscimento specifici per sostanze dette ligandi. La specificità per i ligandi e la risposta che origina dal legame sono geneticamente determinate. Ci sono varie teorie che spiegano il legame recettore-ligando ed in particolare l'effetto agonista o antagonista dei farmaci che si legano allo stesso modo. Nessuna teoria, tuttavia, è completamente esaustiva.

Teoria occupazionale

Postulati:

1. il legame recettore-ligando è reversibile: per questo motivo è lecito utilizzare la legge di azione di massa;
2. l'occupazione del recettore da parte del ligando non influenza l'occupazione di altri siti;
3. l'effetto massimo si ottiene quando tutti i recettori sono occupati;
4. la concentrazione del farmaco legato è trascurabile rispetto alla concentrazione totale del farmaco;
5. i recettori sono omogenei.

Posto che:

$$[R] = [RT] - [FR]$$

dove $[R]$ è la concentrazione di recettori liberi, $[RT]$ è la concentrazione totale di recettori e $[FR]$ è la concentrazione di recettori legati al farmaco.

Poiché la reazione è:



$$K_f = [F][R] / [FR]$$

oppure

$$K_f = ([F][RT] - [F][FR]) / [FR]$$

Dove K_f si dice costante di dissociazione ed è correlata inversamente all'affinità del ligando per il recettore.

Riarrangiando l'equazione si ottiene l'equazione isoterma di Langmiur:

$$[FR] = ([RT] * [F]) / (K_f + [F])$$

Anche in questo caso è possibile ottenere una equazione lineare applicando la trasformazione di Scotchard:

$$[FR]/[F] = -1/K_f * [FR] + [RT]/K_f$$

Poiché la teoria prevede che l'effetto sia direttamente proporzionale alla frazione di recettori legati sul totale dei recettori, cioè al rapporto $[FR]/[RT]$ possiamo affermare che l'effetto è massimo quando $[FR] = [RT]$

In generale il rapporto tra l'effetto e l'effetto massimo:

$$E/E_{MAX} = [F]/(K_f + [F]) = [FR]/[RT]$$

Quindi:

$$E = (E_{MAX} * [F]) / (K_f + [F])$$

Si può facilmente vedere come l'equazione precedente sia formalmente uguale a quella di Michaelis con la differenza che quest'ultima mette in relazione V con $[S]$ considerando che il rapporto V/V_{MAX} sia uguale a $[ES]/[E_{totale}]$.

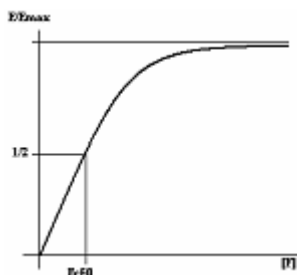
Si noti che per $E/E_{MAX} = 0,5$ $[F] = K_f$

Un problema di questa equazione è che non considera il fatto che ci sono farmaci che, a parità di legame, evocano un effetto biologico diverso. Ariens nel 1950 introduce un fattore di correzione α che è la capacità di un farmaco di evocare un effetto biologico:

- $\alpha = 1$, il farmaco è un agonista;
- $\alpha = 0$, il farmaco è un antagonista;
- α tra 0 e 1, il farmaco è un agonista parziale.

L'equazione quindi diventa:

$$E = \alpha(E_{MAX} * [F]) / (K_f + [F])$$



A questo punto è possibile costruire la curva concentrazione-effetto graduale oppure, su studi in vivo, la curva dose-effetto graduale.

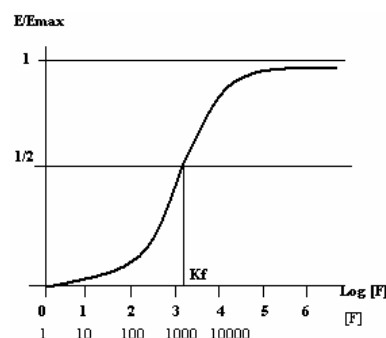
DE_{50} = dose efficace 50 = dose che provoca una [F] tale da occupare il 50% dei recettori. Il rapporto tra [F] e dose è studiato dalle leggi della farmacocinetica.

Queste curve permettono di confrontare due farmaci che agiscono a

livello dello stesso sito recettoriale ma che provocano un diverso effetto biologico.

Tre importanti parametri farmacodinamici sono:

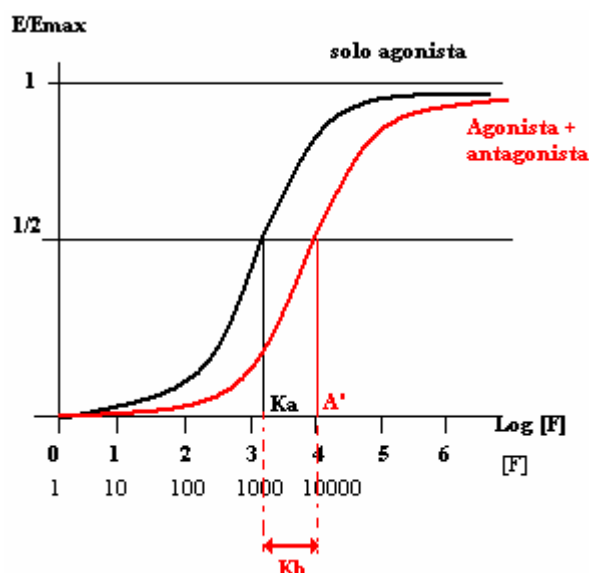
- Potenza: è la dose necessaria per produrre un effetto prestabilito (es. 50% dell' E_{MAX});
- Efficacia: capacità di due farmaci di evocare lo stesso effetto massimo indipendentemente dalla loro potenza
- Affinità (K_f): è l'espressione della capacità di un farmaco di legarsi al suo recettore ed è espressa come la concentrazione di farmaco necessaria a legare il 50% dei siti di legame presenti.



Antagonisti

Esistono tre tipi di farmaci antagonisti:

1. Antagonisti recettoriali: il farmaco si lega al recettore e blocca l'azione del ligando. Il legame, come al solito, può essere:
 - Reversibile: risponde alle leggi di azione di massa. Può essere competitivo o non competitivo;
 - Irreversibile: si dice irreversibile l'inibitore che modifica permanentemente il recettore stesso. In questo caso non si raggiunge un equilibrio ma all'aumentare della concentrazione dell'antagonista diminuisce RT, la quantità di recettori disponibili al legame;
2. Antagonisti farmaceutici: riducono la quantità di agonista che raggiunge il sito recettoriale;
3. Antagonisti fisiologici: si legano a recettori che evocano un effetto biologico opposto a quello evocato dall'agonista (es. adrenergici vs istaminergici).



Antagonisti recettoriali competitivi

Nel caso di antagonista recettoriale competitivo per studiare il suo effetto è possibile ricorrere ad una curva dose-effetto. Se si somministra solamente l'antagonista l'effetto è 0. Per questo è necessario prima somministrare l'agonista e poi somministrare l'antagonista: la curva si sposta a destra in virtù del fatto che, essendo presente un competitore, per evocare lo stesso effetto è necessaria una [A] superiore.

In termini matematici considerando due ligandi, un agonista A e un antagonista B, entrambi si legano al recettore R con un equilibrio dettato dalle rispettive costanti di dissociazione.

$$[RT] = [R] + [AR] + [BR]$$

$$K_a = [AR]/[A][R]$$

$$K_b = [BR]/[B][R]$$

Si può dimostrare che:

$$[AR]/[RT] = E/E_{MAX} = [A]/([A] + K_a(1 + [B]/K_b))$$

In sostanza in presenza di B, a parità di A l'effetto E diminuisce. Aumentando però [A] ad [A'] si ottiene una concentrazione di agonista tale da ottenere un effetto uguale a quello che si sarebbe ottenuto con [A] senza l'intervento dell'antagonista B.

L'equazione di Schild esprime il rapporto:

$$[A']/[A] = [B]/K_b + 1$$

Si noti che gli antagonisti competitivi non influenzano il massimo effetto raggiungibile ma solamente le dosi di agonista necessarie affinché questo effetto venga raggiunto.

E' possibile esprimere l'equazione di Schild in forma lineare come segue:

$$\lg([A']/[A] - 1) = \lg[B] - \lg K_b$$

Questa trasformazione si chiama "regressione di Schild".

La retta diventa più esplicita se si pone $\lg([A']/[A] - 1) = y$ e $\lg[B] = x$:

$$Y = X - \lg K_b$$

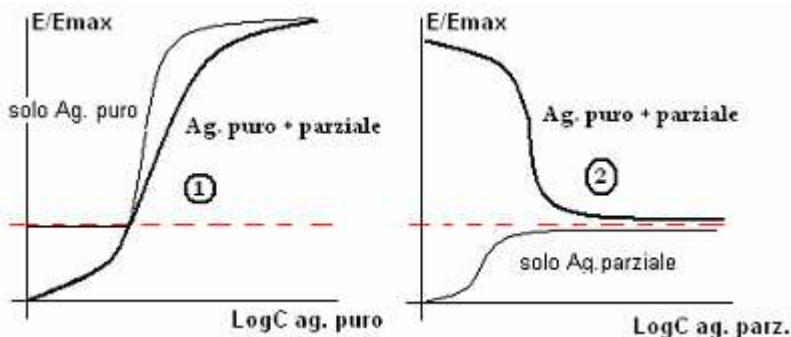
- i veri antagonisti competitori hanno un coefficiente angolare uguale a 1. A prescindere dal tipo di antagonista più il coefficiente angolare di questa relazione si avvicina a 1 più esso si avvicina ad un competitore;
- $-\lg K_b$ è l'intercetta della retta sull'asse delle ordinate ed è un indice dell'affinità dell'antagonista per il recettore;
- $\lg K_b$ è detto pA_x ed indica quante volte la curva semilogaritmica dell'agonista si sposta lungo l'asse delle ascisse in virtù della presenza dell'antagonista.

Agonista parziale

Gli agonisti parziali possono essere considerati sia agonisti che antagonisti. Essi sono farmaci che, anche se somministrati a dosi massive, non riescono mai ad evocare l'effetto massimo.

Per studiare il loro comportamento mediante le curva dose/risposta è possibile:

- somministrare un agonista parziale a concentrazione fissa e variare la concentrazione di un agonista puro;
- somministrare un agonista puro ad una concentrazione fissa e variare la concentrazione di un agonista parziale.



Nel primo caso viene somministrato un agonista parziale a concentrazioni tali da evocare il suo effetto massimo (che comunque è una frazione di E_{MAX}). Poi si aggiunge un agonista puro. Finchè la concentrazione dell'agonista è tale che da sola produrrebbe un effetto inferiore a quello che produce l'agonista

parziale a dosaggi massimi esso si comporta da agonista.

Quando però la concentrazione dell'agonista supera questo livello la curva sale rimanendo però spostata a destra rispetto a quella dell'agonista puro come se in effetti ci si trovasse di fronte ad una combinazione agonista + antagonista.

Nel secondo caso si somministra un agonista a concentrazioni tali da ottenere un effetto massimo. Poi si somministra un agonista parziale e si vede l'effetto diminuire fino a stabilizzarsi al livello dell'effetto massimo raggiungibile dal solo agonista parziale (se l'antagonista fosse puro la curva tenderebbe a zero).

Se si studia l'effetto dell'agonista parziale da solo esso può a ragione essere considerato un agonista parziale; se al contrario lo si somministra insieme ad un agonista puro esso funge in realtà da parziale antagonista.

Antagonisti recettoriali non competitivi

In questo caso l'agonista A e l'antagonista B si legano a due siti strettamente correlati ma non identici. Poiché il legame di B preclude l'effetto di A all'aumentare della concentrazione di B l'effetto massimo raggiungibile da A diminuisce.

Altre teorie

La teoria dell'occupazione non è l'unica che tenta di spiegare il legame farmaco-recettore. Alcune spiegano meglio certi fenomeni, mentre altre ne descrivono meglio altri. L'ultima nata è la teoria dei due stati secondo la quale non è vero che i recettori sono attivi solo quando si lega il farmaco ma esiste un'attività di base che può essere modulata dai ligandi.

In sostanza il recettore può esistere in due stati: inattivo e attivo. Anche in assenza di ligandi esiste un equilibrio tra i due stati. Si definiscono:

- agonisti: sostanze che avendo maggiore affinità per i recettori in stato attivo spostano l'equilibrio verso l'attivazione;
- agonisti inversi: sostanze che, legandosi con maggiore affinità ai recettori in stato inattivo, spostano l'equilibrio verso l'inattivazione (sono gli antagonisti della teoria occupazionale);
- antagonisti: sostanze che non influenzano il tono basale ma che, legandosi competitivamente ai recettori, inibiscono l'effetto degli agonisti e degli agonisti inversi.

Secondo questa teoria efficacia e affinità sono parametri interdipendenti.

La teoria è stata dimostrata con mutazioni recettoriali e animali transgenici: per esempio super-esprimendo i recettori anche in assenza di ligando si osserva una variazione dell'effetto.

Un ulteriore problema è che è stato dimostrato che non vi è una relazione lineare tra occupazione ed effetto. Infatti a parità di concentrazione di un farmaco l'effetto può cambiare a seconda dell'organo o del tessuto bersaglio.

Ciò si spiega considerando che tra lo stimolo e la risposta c'è un fenomeno di amplificazione o di deamplificazione variabile da tessuto a tessuto.

L'amplificazione può essere dovuta a:

- variazione del numero di recettori espressi;
- variazione del tipo di recettori espressi;
- presenza di recettori di riserva: si tratta di una frazione di recettori espressi sulla cellula ma non necessari ad evocare una risposta massimale. In sostanza non è necessario che il 100% dei recettori siano occupati perché si ottenga un effetto massimo. Altresì non è vero che EC_{50} (dose efficace 50%) = K_f .

Dimostrazione: se si somministra un agonista a dosi fisse e un antagonista irreversibile a dosi variabili si osserva che in un primo momento la curva si sposta a destra ma l'altezza rimane la stessa (in sostanza è necessaria una maggior [A] per evocare E_{max}). Quando l'antagonista ha saturato tutti i recettori di riserva allora la curva comincia a scendere.

Farmaci simili che agiscono sullo stesso recettore possono avere una riserva diversa.

In virtù di queste osservazioni la teoria occupazionale viene ulteriormente modificata tenendo conto della capacità del farmaco di dare inizio a eventi e della capacità amplificante del tessuto:

$$E/E_{max} = f * \epsilon * [RT]/(1 + K_f/[F])$$

dove f è la capacità amplificante del tessuto e ϵ è l' "efficacia intrinseca".

Funzionamento dei recettori

I fattori che incidono sulla risposta che i recettori sono in grado di evocare sono:

- intensità dello stimolo: dipende dalla densità dei recettori e dalla frazione di essi attivata. E' un primo tipo di amplificazione che si modifica con l'età o in seguito ad altre patologie;
- trasduzione dello stimolo in risposta: dipende dai 2¹ messaggeri.

Classificazione

I recettori possono essere classificati in base a:

- tipo di trasduzione del segnale:

- recettori veloci accoppiati ad un canale ionico (es. recettori per neurotrasmettitori). Questi recettori sono costituiti da tre porzioni: esterna, interna al canale ionico e intracitoplasmatica con siti di fosforilazione;
- recettori lenti accoppiati a proteine G. I ligandi possono essere di nuovo neurotrasmettitori oppure ormoni idrosolubili etc... Questi recettori sono a sette domini transmembrana e sono detti lenti perché il tempo che intercorre tra l'attivazione e l'effetto è più lungo di quello necessario per l'apertura di un canale.
I principali secondi messaggeri associati a recettori con proteine G sono: cAMP, cGMP, calcio, fosfoinositoli. Il cAMP è il messaggero più studiato: esso esplica la sua azione regolando l'attività della PKA.
L'inattivazione di questi recettori passa attraverso:
 - inattivazione proteine G;
 - attivazione fosfodiesterasi;
 - attivazione fosforilasi per defosforilare i substrati delle PKA e PKG.
- recettori lenti accoppiati a tirosin chinasi (es. recettori per l'insulina o per fattori di crescita). Il ligando si lega al dominio extracitoplasmatico. Il legame favorisce la dimerizzazione di due recettori i quali si fosforilano a vicenda. I gruppi fosforici poi vengono facilmente trasferiti ad altri substrati.
- recettori intracellulari per ligandi lipofili.
- localizzazione e ruolo fisiologico:
 - recettori di membrana (il cui effetto è solitamente quello di modulare l'attività di specifici enzimi);
 - recettori intracellulari che interagiscono con tratti specifici del genoma modificando l'espressione genica;
 - recettori con attività guanilato ciclasica intrinseca;
 - recettori per l'adesione cellulare;
 - recettori per le citochine:
 - recettori toll-like espressi nelle cellule coinvolte nell'infiammazione o nell'immunità;
 - recettori per il TNF coinvolti nell'apoptosi;
 - recettori per lipoproteine;

Modulazione delle risposte recettoriali

I recettori possono diminuire o aumentare la propria sensibilità al farmaco. Tra i due la desensibilizzazione è il fenomeno più importante in farmacologia.

Se si somministra ripetutamente un farmaco l'effetto generalmente diminuisce: si parla in tal caso di "tolleranza". Quando si verifica un fenomeno di tolleranza si rischia un effetto "rebound": non bisogna mai smettere improvvisamente la somministrazione di un farmaco perché spesso la tolleranza si basa su un aumento dell'espressione di recettori e togliendo il legando l'effetto finale sarà inferiore a quello basale prima dell'inizio della terapia.

Quando la tolleranza si manifesta molto velocemente si parla di "tachifilassi". Ciò è di solito dovuto a deplezione del mediatore.

Con il termine di "desensitizzazione" (o refrattarietà) si intende un particolare effetto di tolleranza che si manifesta in tempi brevi in seguito a somministrazione protratta di agonisti: si tratta di un fenomeno reversibile dovuto a modificazioni del recettore le quali inducono in pratica una maggior tolleranza al farmaco.

Per esempio i curarici depolarizzano le placche neuromuscolari. Tuttavia, se si somministrano per un certo tempo l'effetto viene meno.

Riconosciamo due tipi di desensitizzazione:

- desensitizzazione omologa: applicando determinati agonisti si ha desensitizzazione a carico solamente dei recettori per quegli agonisti;

- desensitizzazione eterologa: l'agonista provoca desensitizzazione a carico non solo dei propri recettori ma anche di altri. Ciò si verifica tipicamente quando più recettori sono accoppiati allo stesso secondo messaggero.

Desensitizzazione omologa di recettori accoppiati a G protein mediante fosforilazione

Il fenomeno dipende dalla fosforilazione a vari livelli della molecola del recettore. Ciò causa perdita di affinità del recettore per il ligando, diminuzione dell'accoppiamento del recettore con la proteina G e a volte riduzione del numero dei recettori espressi (down regulation).

Se prendiamo l'esempio dei recettori β adrenergici la desensitizzazione avviene quando l'agonista è legato. In questa conformazione infatti il recettore può essere fosforilato a livello di domini intracitoplasmatici o da PKA o da β ARK. La fosforilazione da parte di PKA diminuisce semplicemente l'affinità del recettore per la proteina G, β ARK invece causa l'internalizzazione del recettore che viene poi defosforilato e riciclato sulla membrana.

La desensitizzazione eterologa prevede che β ARK possa fosforilare non solo il recettore responsabile della sua attivazione ma anche altri recettori (es. α_2 adrenergici).

Desensitizzazione di recettori canale

Fa parte della fisiologia dei recettori canale la proprietà di essere facilmente desensitizzati dopo un certo periodo di legame col proprio ligando. Ciò si esplica nella incapacità progressiva da parte del canale di cambiare conformazione e di fare passare gli ioni. Si tratta di un fenomeno rapidamente reversibile.

Per es. il recettore muscarinico dell'acetilcolina esiste in conformazione inattivo o attivo ma anche desensitizzato in fase lenta (legato alla durata del legame recettore-ligando) e veloce (se il fenomeno è accelerato da fosforilazioni).

Gli inibitori delle acetilcolinesterasi rendono più lungo il legame acetilcolina-recettori con conseguente desensitizzazione.

Down/Up regulation

Con il termine di down regulation si intende la diminuzione della popolazione dei recettori espressi dalla cellula. La down-regulation provocata dall'azione di β ARK si dice "rapida" perché comporta semplicemente un riciclo dei recettori. Una permanenza a lungo dell'agonista provoca una down-regulation lenta: in questo caso non si verifica un riciclo dei recettori dopo l'internalizzazione ma una loro degradazione lisosomiale.

Per up regulation si intende invece un aumento del numero dei recettori espressi: non è un meccanismo di regolazione molto diffuso. Ancora una volta ne esiste una forma rapida (es. aumento dei recettori nicotinici dopo denervazione del muscolo scheletrico) e lenta dovuta all'accelerata espressione di molecole recettoriali presenti nel pool di riserva.

Posologia dei farmaci

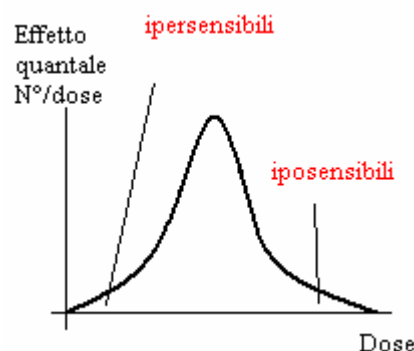
Grazie all'analisi statistica le informazioni sulla farmacocinetica e farmacodinamica di un farmaco vengono utilizzate per stabilire la posologia dei farmaci. In particolare si utilizzano delle curve simili a quelle dose-effetto graduali che si chiamano "curve dose-effetto quantali". In questo caso non ci riferisce alle osservazioni fatte su'unica entità biologica ma su una popolazione statistica (normalmente popolazioni omogenee di animali da esperimento).

Per effetto quantale si intende la comparsa o la scomparsa di un effetto prestabilito, indipendentemente dalla intensità dello stesso.

La curva che si ottiene è solitamente una gaussiana perché in una popolazione omogenea la variabilità individuale fa sì che la concentrazione del farmaco necessaria perché si osservi un certo effetto si distribuisca normalmente.

Un esempio di curva quantale:

- effetto: morte del topo per insufficienza respiratoria;
- ascisse: dose di alcool etilico somministrata per evocare l'effetto;
- ordinate: numero di morti.



Ovviamente trasferendo i dati all'uomo è necessario tenere conto sia dell'esistenza di persone ipersensibili che di persone iposensibili.

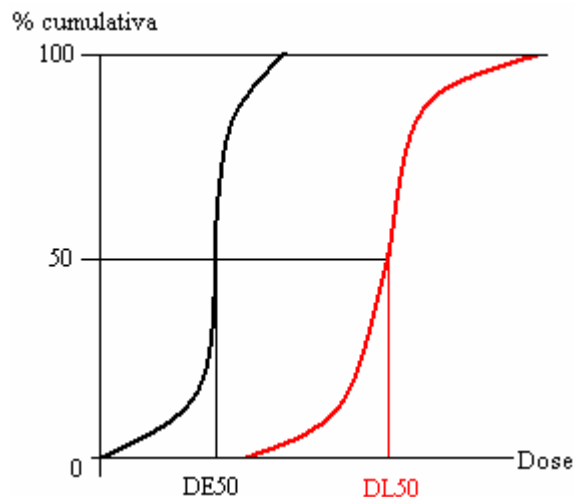
Un'altra curva che si utilizza è la curva dose-effetto quantale cumulativa. In questo caso in ordinata vi è la percentuale cumulativa di animali che presentano l'effetto a quella dose. Questa curva ha la forma di una S italiana anche per concentrazioni lineari e non logaritmiche.

Indice terapeutico: DL_{50}/DE_{50} dove DL è la dose letale nell'animale da esperimento.

Più distanti sono le curve maggiore è l'indice terapeutico e maggiore è la sicurezza.

Se l'indice è inferiore a 10 bisogna studiare anche altri parametri come il margine di sicurezza: DL_{1}/DE_{99}

- $MS > 1$: le due curve sono vicine ma non si toccano;



- $MS < 1$: le due curve si toccano.

Il fatto che le due curve siano più o meno “sdraiate” fa sì che a parità di indice terapeutico il margine di sicurezza possa essere diverso.

Da queste osservazioni si estrapolano poi gli intervalli terapeutici da applicare all'uomo. In generale si sceglie come minima concentrazione efficace la DE_5 estrapolata da studi clinici e come minima concentrazione tossica la dose tossica DT_5 (cioè la dose che provoca la comparsa di effetti tossici nel 5% dei pazienti). Ciò può essere fatto con una buona sicurezza se l'indice terapeutico è maggiore di 10; altrimenti è necessario ricorrere al monitoraggio persona per persona.

TOSSICOLOGIA

La tossicologia è la scienza che studia gli effetti nocivi di sostanze naturali o sintetiche (non solo farmaci) sugli organismi viventi.

Le aree della tossicologia sono essenzialmente tre:

- tossicologia descrittiva: studi sperimentali su animali o culture per ottenere dati da estrapolare all'uomo in modo da valutare parametri limite di rischio tossicologico;
- tossicologia dei meccanismi: studio del meccanismo d'azione di un tossico in maniera da cercare un antidoto oppure per capire se la sostanza è utilizzabile come tossico selettivo (antibiotici);
- tossicologia delle leggi: servendosi degli studi delle altre due aree stabilisce le soglie legali.

Parametri di esposizione ad un tossico

L'esposizione ad una sostanza tossica può essere:

- acuta: singola e abbondante esposizione per incidente o tentativo di suicidio;
- cronica: bassa esposizione ripetuta per lungo tempo.

I farmacologi tradizionali si basano sul concetto che esiste un limite tra una dose tossica e una dose non tossica. Ciò è in contrasto con l'approccio degli oncologi secondo i quali a qualsiasi dose è associata una probabilità che si origini un tumore.

Alcuni parametri importanti utilizzati in tossicologia sono:

- Dose soglia: al di là della tossicità in senso assoluto di una sostanza è ciò che si decide per Legge essere il miglior compromesso rischio-beneficio. Per quanto detto prima il concetto di dose soglia non è valido per studi di cancerogenesi;
- NOEL: nella tossicità a lungo termine è il parametro più utilizzato ed è la dose sotto la quale non è misurabile un effetto tossico. Il limite di questo parametro è che le soglie vengono estrapolate da esperimenti su animali;
- TLV: valore soglia per quanto riguarda l'inquinamento industriale;
- ADI: dose giornaliera tollerata senza rischi (riguarda, per esempio, gli additivi alimentari);

Il rischio tossicologico di una sostanza si studia con approcci:

- Epidemiologici: utilizzando studi raccolti in banche dati;
- Clinici: se la sostanza è un farmaco si fanno esposizioni cliniche controllate nell'ambito della sperimentazione clinica;
- Laboratoristici: il grosso degli esperimenti si compiono sugli animali.

La quantificazione del rischio tossicologico si basa sull'utilizzo di parametri che variano a seconda del tipo di esposizione:

- Tossicità acuta: DL50, DE50, margine di sicurezza....;
- Tossicità subcronica (a 3 mesi): indici legislativi quali il NOEL, accettando ancora il concetto di soglia;
- Tossicità cronica (a 1 anno): massima dose tollerata (MTD). In realtà spesso in questi casi si predilige l'approccio probabilistico a quello soglia.

In generale è sufficiente dividere per dieci la dose tossica negli animali da esperimento per ottenere la dose sicura per l'uomo. Se si divide addirittura per cento si ottiene la ragionevole certezza che anche le persone particolarmente sensibili possano tollerare la sostanza.

Questo discorso non si applica ai farmaci dove invece si considera il rapporto rischio-beneficio: per esempio gli anti tumorali sono molto tossici ma si somministrano comunque.

Effetti tossici dei farmaci

Un farmaco possiede:

- Effetti terapeutici desiderati;
- Effetti collaterali indesiderati. Tra questi distinguiamo:
 - Effetti indesiderati secondari, tollerabili, non gravi e reversibili una volta interrotta la somministrazione. Es. irritazione gastrica indotta da FANS;

- Effetti tossici: sono gravi, pericolosi, spesso irreversibili e causa delle cosiddette “malattie iatrogene”. Dopo l’interruzione della somministrazione l’eventuale guarigione dipende dalle capacità rigenerative del tessuto.

Gli effetti possono essere:

- Farmacologi: correlati al meccanismo d’azione, sono spesso dovuti ad un soggetto iperdosaggio. Es. emorragia in seguito a somministrazione di anticoagulanti orali, infezioni da immunosoppressori;
- Patologici: effetti non correlati all’azione del farmaco. Es. allergie o tossicità da accumulo;
- Genotossici: interagiscono col materiale genetico potendo causare cancerogenesi o teratogenesi.

Gli effetti tossici possono essere causati dal farmaco, da metaboliti dello stesso o da radicali dell’ossigeno che si generano nel corso del loro metabolismo.

Gli effetti tossici possono altresì essere classificati in:

- Tipo A: rappresentano circa l’80% del totale. Sono prevedibili, dose dipendenti e dovuti ad un’amplificazione dell’effetto farmacologico (spesso causati da sovradosaggio). Di solito sono ad alta incidenza ma a bassa mortalità e si evitano monitorando i farmaci con basso indice terapeutico e, quando possibile, evitando associazioni;
- Tipo B. imprevedibili, non correlati alla dose (probabilistici). Tra questi sono incluse le reazioni idiosincrasiche (scatenamento da parte di farmaci di patologie o difetti genetici latenti come l’ipertermia maligna o le crisi emolitiche da deficit di glucosio 6-P deidrogenasi) o immunologici (es. allergie o farmaco come aptene). Sono poco comuni ma a più alta mortalità.