

416995

**UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM**

ELŻBIETA WYSKA — —

**ZNACZENIE MONITOROWANIA WOLNEJ FRAKCJI
LEKÓW PRZECIWDEPRESYJNYCH**

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR: DR HAB. JOANNA SZYMURA-OLEKSIK

Pracę wykonano w Zakładzie Farmakokinetyki
i Farmacji Fizycznej CM UJ

Kierownik: Dr hab. Joanna Szymura-Oleksiak

Bibl. Medyczna CM UJ



1816049619

KRAKÓW 1998

*Składam serdeczne podziękowania
Pani Doc. dr hab. Joannie Szymurze-Oleksiak
za podjęcie obowiązków promotora tej pracy,
poświęcony czas oraz wiele cennych dyskusji.*

*Pragnę gorąco podziękować
Panu Doktorowi med. Andrzejowi Wasieczce
za udostępnienie materiału klinicznego
oraz zaznajomienie z praktycznymi aspektami
farmakoterapii depresji endogennej.*

*Bardzo dziękuję
Panu Doktorowi Wojciechowi Jawieniowi
za pomoc w wykonaniu analizy statystycznej
wyników niniejszej pracy oraz w komputerowym
opracowaniu tekstu.*

Elżbieta Wyska

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----|
| 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA..... | 5 |
| 2. CEL PRACY | 31 |
| 3. MATERIAŁY I METODY | 33 |
| 3.1. Pacjenci..... | 33 |
| 3.2. Metodyka badań..... | 35 |
| 3.2.1. Aparatura..... | 35 |
| 3.2.2. Substancje badane i odczynniki | 37 |
| 3.2.3. Roztwory podstawowe | 38 |
| 3.2.4. Oddzielanie wolnej frakcji badanych leków | 38 |
| 3.2.5. Procedura oznaczania IMI i DMI metodą FPIA..... | 39 |
| 3.2.6. Procedura oznaczania IMI i jej metabolitów oraz LVP i PER metodą HPLC | 40 |
| 3.2.7. Procedura oznaczania CBZ i jej metabolitu | 41 |
| 3.3. Badanie wiązania IMI i jej metabolitów z białkami osocza w obecności CBZ w warunkach <i>in vitro</i> | 42 |
| 4. OBLICZENIA | 43 |
| 5. WYNIKI | 45 |
| 5.1. Parametry opracowanych metod analitycznych | 45 |
| 5.2. Stężenia IMI+DMI oznaczone metodą FPIA w grupie chorych leczonych IMI a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych..... | 53 |
| 5.3. Stężenia całkowite i wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oznaczone metodą HPLC .. | 55 |

| | |
|---|-----|
| 5.4. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie chorych leczonych IMI w monoterapii a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych..... | 58 |
| 5.5. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w surowicy chorych poddanych leczeniu skojarzonemu z LVP lub PER a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych | 68 |
| 5.6. Stężenia LVP i PER w surowicy krwi badanych chorych poddanych leczeniu skojarzonemu | 78 |
| 5.7. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w surowicy chorych poddanych leczeniu skojarzonemu z CBZ | 79 |
| 5.8. Stężenia CBZ i jej metabolitu w surowicy chorych poddanych skojarzonemu leczeniu z IMI | 83 |
| 5.9. Wpływ CBZ na wiązanie IMI i jej metabolitów z HSA i AAG w warunkach <i>in vitro</i> | 85 |
| 6. OMÓWIENIE WYNIKÓW | 92 |
| 7. WNIOSKI..... | 103 |
| 8. STRESZCZENIE..... | 104 |
| 9. PIŚMIENNICTWO | 106 |

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Zespoły depresyjne należą do najczęściej występujących zaburzeń psychicznych, których rozpowszechnienie w populacji ludzkiej wg różnych autorów waha się w granicach 10 - 25%. Znaczną część zaburzeń depresyjnych stanowi depresja w przebiegu choroby afektywnej (tzw. " duży epizod depresyjny" wg DSM IV). Częstość występowania tej postaci depresji sięga 2 - 3% wśród mężczyzn i 5 - 10% wśród kobiet, a zapadalność w ciągu roku w zależności od płci kształtuje się odpowiednio 1% i 3% [4, 105, 180].

Duże rozpowszechnienie depresji, bezpośredni jej wpływ na jakość i długość życia chorych, jej przewlekłość i skłonność do nawrotów, opóźniona odpowiedź na leczenie, czasem oporność na leczenie a także częsta uciążliwość występowania efektów niepożądanych towarzyszących leczeniu powoduje, że schorzenie to stanowi istotny problem publicznej opieki zdrowotnej i wiąże się ze znacznymi kosztami ekonomicznymi ponoszonymi przez samego chorego i społeczeństwo.

Pomimo wprowadzenia do lecznictwa w ostatnich latach dużej liczby leków przeciwdepresyjnych tzw. "drugiej generacji" np. fluoksetyny, fluwoksaminy czy mianseryny, trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TLPD) odgrywają nadal kluczową rolę w leczeniu depresji endogennych, występujących w przebiegu chorób afektywnych [68, 130, 162, 174, 180]. Leki te są również przydatne w terapii depresji objawowych, a także znajdują zastosowanie w leczeniu innych niż depresja stanów chorobowych, przykładowo takich jak: lęk napadowy (ang. panic disorder), moczenie nocne u dzieci, bulimia, jadłowstręt psychiczny

oraz jako leki wspomagające w bólach nowotworowych [160, 162]. Ze względu na ich wieloletnie stosowanie w leczeniu psychiatrycznym oraz dużą liczbę przeprowadzonych badań nad ich farmakodynamiką i farmakokinetyką i to nie tylko na zwierzętach, ale także na zdrowych ochotnikach oraz pacjentach, leki te są znacznie lepiej poznane niż tymoleptyki nowszej generacji. Czołowi przedstawiciele TLPD czyli imipramina (IMI) i amitryptylina (AMI) wykazują stosunkowo dużą skuteczność działania, szczególnie w dużych epizodach depresyjnych występujących w przebiegu chorób afektywnych (odsetek remisji lub poprawy stanu klinicznego przy ich stosowaniu sięga wówczas około 75%) i dlatego są one często punktem odniesienia przy ocenie nowych środków o potencjalnym działaniu przeciwdepresyjnym. Chociaż nowsze leki uważa się za bezpieczniejsze, szczególnie w przypadku ostrego przedawkowania [42, 75, 96, 158, 174, 176], to jak dotąd nie wykazano, aby którykolwiek z nich był skuteczniejszy od IMI czy AMI w leczeniu ciężkich stanów depresyjnych [136, 162, 174]. Nie bez znaczenia jest również fakt, że koszty terapii związane ze stosowaniem TLPD są nieporównywalnie niższe w stosunku do leków nowej generacji [97, 105, 161, 174]. Ponadto nowe leki przeciwdepresyjne (fluoksetyna, fluwoksamina czy paroksetyna) jako silne inhibitory cytochromu P450 mogą być przyczyną istotnych klinicznie niekorzystnych interakcji farmakokinetycznych, szczególnie w przypadku skojarzonego leczenia depresji [36, 37, 42, 63, 84, 176, 206].

Jednym z czynników zwiększających skuteczność leczenia TLPD jest monitorowanie ich stężenia w surowicy chorych. Wykazano, że skuteczność leczenia w przypadku monitorowania zwiększa się z około 40 - 50% do około 70 - 75% [160]. Wskazaniem do monitorowania tych leków są:

- niski współczynnik terapeutyczny oraz trudności w określaniu wczesnej toksyczności tych leków,
- duże międzyosobnicze różnice stężeń po podaniu zwyczajowych dawek,
- opóźnione występowanie efektu terapeutycznego, co utrudnia bieżącą kontrolę wyników leczenia.

Wskaźnik terapeutyczny TLPD wynosi około 3 - 4. Oznacza to, że stężenia toksyczne tych leków są zaledwie około 3 - 4 razy wyższe od stężeń terapeutycznych. Oddziaływanie TLPD na układ noradrenergiczny, serotonergiczny, cholinergiczny, dopaminergiczny i receptory histaminowe sprawia, że leki te wykazują szerokie spektrum działania przeciwdepresyjnego, lecz zarazem sprzyja to występowaniu szeregu objawów niepożądanych (tabela 1), które o różnym nasileniu obserwuje się u około 50% chorych otrzymujących lecznicze dawki TLPD [92, 162]. Szczególnie niebezpieczny jest wpływ tych leków na układ

Tabela 1. Mechanizm objawów niepożądanych występujących najczęściej w trakcie leczenia TLPD [wg 42, 162, 193].

| Wpływ hamujący na: | Możliwe objawy niepożądane |
|--|---|
| Wychwyt noradrenaliny | Drżenia mięśniowe, tachykardia, zaburzenia erekcji i ejakulacji. |
| Wychwyt serotoniny | Nudności, biegunka, bóle głowy, objawy pozapiramidowe, pobudzenie, bezsenność, osłabienie erekcji i ejakulacji, osłabienie łaknienia. |
| Receptory cholinergiczne typu M | Zaburzenia świadomości (majaczenia, przynglenia) zaburzenia akomodacji, wysychanie błon śluzowych jamy ustnej, tachykardia, napad jaskry, zaburzenia oddawania moczu, zaparcia. |
| Receptory histaminowe H ₁ | Obniżenie ciśnienia krwi, działanie sedatywne, senność, zwiększenie masy ciała. |
| Receptory α ₁ -adrenergiczne | Obniżenie ciśnienia krwi, omdlenia, senność, sedacja. |
| Receptory dopaminowe D ₂ | Pozapiramidowe zaburzenia ruchowe, podwyższony poziom prolaktyny. |
| Receptory serotoninowe 5-HT ₂ | Obniżenie ciśnienia krwi, zaburzenia ejakulacji. |

krążenia i ośrodkowy układ nerwowy. Jednym z najczęstszych objawów ze strony układu krążenia jest ortostatyczny spadek ciśnienia krwi, który występuje u około 20% leczonych i może niekiedy prowadzić do niedokrwienia mózgu i omdleń [176, 193]. W czasie podawania tych leków mogą pojawić się też objawy niedotlenienia mięśnia sercowego z typowymi zmianami w EKG: obniżenie odcinka S-T i spłaszczenie załamka T, oraz zmiany w przewodnictwie w mięśniu sercowym, będące wynikiem bezpośredniego działania tych leków na mechanizmy błonowe, a których przejawem jest wydłużenie odcinka PR, zespołu QRS lub QT. Ponadto u blisko 5% chorych mogą wystąpić zaburzenia rytmu (głównie częstoskurcz). W piśmiennictwie pojawiły się również doniesienia o przypadkach nagłych zgonów, związanych z ostrymi zaburzeniami pracy serca po podaniu TLPD [50, 176]. Powikłanie to jest jednak bardzo rzadkie i dotyczy osób, które przed leczeniem przejawiały zaburzenia ze strony układu krążenia.

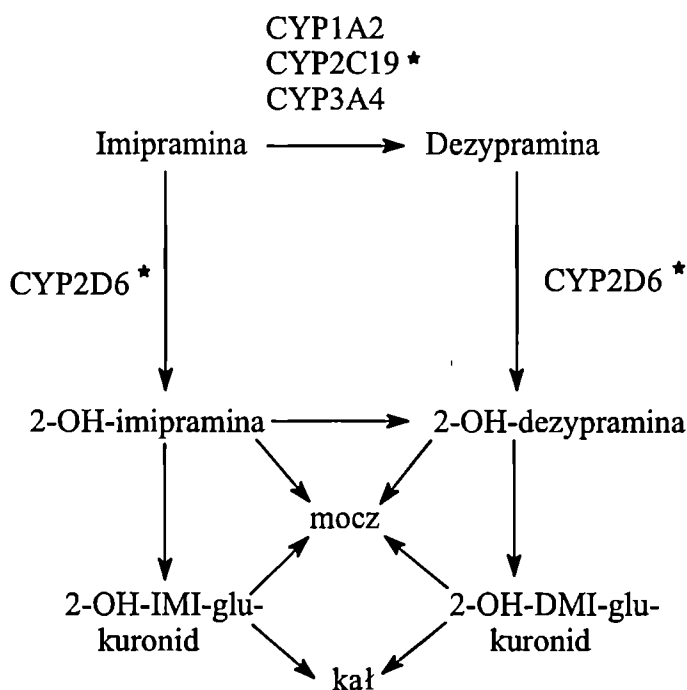
Najważniejszym objawem niepożądanym ze strony ośrodkowego układu nerwowego jest zespół majaczeniowy zwany też ośrodkowym zespołem cholinolitycznym. Występuje on u około 2% leczonych chorych [162, 197]. Stosunkowo częstym zjawiskiem u osób z chorobą afektywną dwubiegunową jest zmiana fazy z depresyjnej w maniackalną w toku terapii tymoleptykami. Możliwe są także niekorzystne zmiany obrazu klinicznego depresji endogennej tj. nasilenie lęku i niepokoju, bezsenności czy narastanie zahamowania ruchowego. Poza tym TLPD wywołują u około 1% chorych napady drgawkowe typu padaczkowego.

Oprócz wymienionych wyżej objawów ze strony OUN oraz kardi toksycznych często, bo aż u 30% chorych leczonych TLPD, występuje nadmierna potliwość oraz uczucie gorąca [197]. Opisano również przypadki zaburzeń funkcji wątroby i zmian hematologicznych oraz nadwrażliwości na te leki objawiającej się zmianami skórnymi takimi jak: rumień, pokrzywka czy świąd [162, 193].

Występowanie i stopień nasilenia wspomnianych powyżej objawów zależy w pewnym stopniu od stężenia i przy stężeniach powyżej 450-500 ng/ml zwiększa się prawdopodobieństwo ich występowania. W praktyce, efekty niepożądane są często przyczyną zaniżania dawek TLPD do poziomów subterapeutycznych lub wystąpienia braku współpracy z chorym [50, 160, 193].

TLPD wykazują bardzo duże, nierzadko nawet 30-krotne, międzyosobnicze zróżnicowanie stężeń stacjonarnych po podaniu zwyczajowych dawek [59, 79, 81, 159, 161, 205]. Stąd, przy standardowym schemacie dawkowania tych leków, zaledwie u około 40% chorych osiągnięte zostają stężenia we krwi mieszczące się w zakresie stężeń przyjętych za terapeutyczne [161]. U pozostałych mogą wystąpić stężenia subterapeutyczne, lub częściej, potencjalnie toksyczne.

Jedną z głównych przyczyn tego zróżnicowania stężeń stanowią międzyosobnicze różnice w procesach biotransformacji TLPD zachodzących głównie w wątrobie przy udziale enzymów cytochromu P450. Najważniejsze drogi metabolizmu tych leków, jak to przedstawiono na przykładzie IMI obejmują: N-demetylację, hydroksylację i sprzężanie powstałych metabolitów z kwasem glukuronowym przy udziale UDP-glukurylotransferazy, a następnie ich wydalanie z moczem lub żółcią (rycina 1). Oprócz głównych metabolitów IMI czyli:



* polimorfizm genetyczny

Rycina 1. Główne szlaki metaboliczne imipraminy.

dezypraminy (DMI), 2-hydroksyimipraminy (2-OH-IMI), 2-hydroksydezypraminy (2-OH-DMI) oraz glukuronidów obu hydroksymetabolitów, mogą powstawać również inne, mniej ważne produkty metabolizmu takie jak: N-tlenek IMI powstający w wyniku odwracalnej N-oksydacji IMI, imidodibenzyl, powstający w wyniku odszczepienia całego łańcucha bocznego od cząsteczki IMI, didemetyloimipramina, produkt dalszej demetylacji DMI oraz produkty hydroksylacji IMI i DMI w pozycji 10 pierścienia aromatycznego.

Wykazano, że za N-demetylację tych leków odpowiedzialne są izoenzymy: CYP1A2, CYP3A4 oraz prawdopodobnie także izoenzymy podrodziny 2C (głównie CYP2C19). Natomiast hydroksylacja w pierścieniu katalizowana jest przez izoenzym CYP2D6 [17, 116]. Zarówno aktywność CYP2D6, jak i izoenzymów podrodziny 2C jest uwarunkowana genetycznie i cechuje się osobniczą zmiennością [16, 17, 138]. Jak wykazano, utlenianie TLPD jest kontrolowane przez polimorfizm typu debryzochiny i sparteiny [32, 33, 69, 143]. W zależności od zdolności utleniania debryzochiny i sparteiny do hydroksymetabolitów wyróżniono w populacji ludzkiej dwie fenotypowo odmienne grupy: szybko metabolizujących (ang. extensive metabolizers - EM) oraz wolno metabolizujących (ang. poor metabolizers - PM) te związki [34, 40, 58, 82]. Częstość występowania fenotypów EM i PM zależy od rasy lub grupy etnicznej. Dla ludności krajów europejskich i Ameryki Północnej należącej do rasy kaukaskiej, odsetek wolnych metabolizerów wynosi od 5 do 10% [3, 51, 117, 175]. Tak więc u chorych z fenotypem PM leczonych standardowymi dawkami TLPD często występują stężenia toksyczne w surowicy, stąd chorzy ci są szczególnie narażeni na występowanie efektów niepożądanych. Z kolei u osobników ekstremalnie szybko metabolizujących, osiągane są zbyt niskie stężenia TLPD w surowicy, co może prowadzić do niepowodzenia farmakoterapii. Stwierdzono występowanie nawet 40-krotnych różnic w stężeniach stacjonarnych pomiędzy PM i EM, otrzymującymi te same dawki TLPD [159]. Genetycznie uwarunkowany polimorfizm utleniania typu mefenytoiny, spowodowany niedoborem izoenzymu CYP2C19, który jest częściowo odpowiedzialny za N-demetylację TLPD takich jak: IMI, AMI czy klomipramina, odgrywa znacznie mniejszą rolę. Wśród rasy kaukaskiej częstość występowania PM wynosi zaledwie od 2 do 6% [37, 51, 65, 76, 116, 117].

Inne czynniki wpływające na duże międzyosobnicze zróżnicowanie stężeń stacjonarnych TLPD odgrywające istotną rolę w praktyce klinicznej to współistniejące choroby wątroby, nerek, serca oraz wiek.

Schorzenia wątroby często prowadzą do zmniejszonego przepływu krwi przez ten narząd oraz do obniżonej aktywności enzymów wątrobowych. Jak wykazano [133], u pacjentów z marskością wątroby ma miejsce obniżenie stężenia mikrosomalnego CYP1A2 i CYP2E1. Wprawdzie podobnych zmian nie zaobserwowano dla izoenzymów podrodziny CYP3A, ale istnieją dane na temat zmian w klirensie leków, będących substratami dla tych izoenzymów, w marskości wątroby [61]. Ponieważ TLPD eliminowane są z organizmu głównie na drodze metabolizmu w wątrobie, niewydolność wątroby może powodować zmniejszenie klirensu całkowitego tych leków, a co za tym idzie prowadzi do wzrostu ich stężenia w surowicy krwi.

Pomimo, że klirens nerkowy TLPD jest niewielki, bo mniej niż 3% dawki jest wydalane w postaci nie zmienionej z moczem [114], w przypadku hydroksymetabolitów sytuacja przedstawia się nieco inaczej. Po podaniu pojedynczej dawki np. IMI [186] około 8% leku wydalą się jako 2-OH-DMI w postaci nie sprzężonej, natomiast 33% dawki stanowią metabolity wydalane w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym. W przewlekłej chorobie nerek istnieje więc możliwość kumulacji nie sprzężonej 2-OH-DMI, co może zmienić profil działania farmakologicznego leku macierzystego [106, 114]. Sprzężone metabolity IMI nie są wprawdzie aktywne farmakologicznie, ale przy znacznym ich nagromadzeniu (w anurii możliwy jest nawet 20-krotny wzrost ich stężenia) istnieje duże prawdopodobieństwo hydrolizy glukuronidów i uwolnienia aktywnego leku [48, 68].

U chorych psychiatrycznych z zastoinową niewydolnością serca stwierdza się zarówno obniżony klirens nerkowy jak i przepływ krwi przez wątrobę, mogące wpływać na wielkość stężeń stacjonarnych TLPD [71, 136].

U pacjentów w podeszłym wieku, w wyniku obniżenia aktywności enzymatycznej wątroby i zmniejszonego przepływu krwi przez ten narząd dochodzi do obniżenia klirensu TLPD [2, 53, 62, 92, 136, 173, 209]. W rezultacie ma miejsce spowolniona eliminacja tych leków oraz metabolitów, co często prowadzi do ich kumulacji [80]. Ponadto istnieją

doniesienia o nieliniowości farmakokinetyki IMI w tej populacji chorych wynikającej z wysycenia głównie procesu ich hydroksylacji [20, 31]. Równocześnie, u pacjentów geriatrycznych obserwuje się obniżenie przesączania kłębkowego, co powoduje wzrost stężenia nie sprzężonych hydroksymetabolitów TLPD we krwi [136, 175, 209].

Spośród istotnych klinicznie czynników wpływających na stężenie TLPD w stanie stacjonarnym wymienić należy także równoczesne podawanie innych leków, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu oraz dietę. Czynniki te mogą wpływać na stężenia TLPD głównie poprzez indukowanie bądź hamowanie enzymów mikrosomalnych wątroby lub poprzez oddziaływanie na szybkość przepływu krwi przez wątrobę (tabela 2).

Tabela 2. Niektóre czynniki wpływające na stężenia stacjonarne TLPD [wg 62].

| ↓ stężenia TLPD | ↑ stężenia TLPD | |
|--------------------------------|----------------------|----------------|
| Barbiturany | Chlorpromazyna | Izoniazyd |
| Wodzian chloralu | Haloperidol | Alprazolam |
| Glutetymid | Perazyna | Disulfiram |
| Trihexyphenidyl | Lewomepromazyna | β-blokery |
| Karbamazepina | Perfenazyna | Chloramfenikol |
| Doksycyklina | Tiorydazyna | Cymetydyna |
| Prymidon | Chlorprotyksen | Erytromycyna |
| Fenytoina | Metylfenidat | Fenfluramina |
| Zakwaszenie moczu | Alkalizacja moczu | Noretysteron |
| Palenie tytoniu | 1-razowe spożycie | Estrogeny |
| Chroniczne spożywanie alkoholu | dużej dawki alkoholu | |

W praktyce klinicznej TLPD najczęściej łączy się z neuroleptykami, a ostatnio także z karbamazepiną (CBZ). Skojarzone leczenie z małymi dawkami neuroleptyków ma na celu wzmożenie efektu uspokajająco-anksjolitycznego. W depresjach psychiatrycznych lub z podnieceniem ruchowym stosuje się średnie dawki niektórych neuroleptyków, głównie lewomepromazyny (LVP) lub perazyny (PER) [162, 197]. Proponuje się również włączenie do terapii jednego z neuroleptyków w leczeniu tzw. depresji opornych [197].

Jak dotychczas, nie wszystkie ścieżki metaboliczne neuroleptyków zostały przypisane konkretnym izoenzymom, ale najprawdopodobniej w ich metabolizm są zaangażowane dwa izoenzymy: 2D6 i 3A4 [17]. W wielu pracach dotyczących łącznego podawania TLPD i neuroleptyków, pochodnych fenotiazyny [9, 32, 70, 78, 127, 135] zaobserwowano wzrost stężenia leków macierzystych i ich demetylowych pochodnych, przy równoczesnym spadku stężenia hydroksymetabolitów. Interakcja ta dotyczy głównie hamowania hydroksylacji TLPD przez neuroleptyki (interakcja na poziomie izoenzymu 2D6) [70], ale jak wykazały badania na zwierzętach [46], niewykluczone jest również hamowanie izoenzymu 3A4, odpowiedzialnego za N-demetylację TLPD.

CBZ - znany lek przeciwpadaczkowy wykazuje również szerokie spektrum działania psychotropowego. Stosowana jest jako lek przeciwmaniakalny w ostrej fazie manii oraz w zapobieganiu nawrotom obu faz choroby maniakalno-depresyjnej. Skojarzone podawanie TLPD i CBZ stosowane jest w przypadku depresji opornych, w profilaktyce chorób afektywnych dwubiegunowych oraz w leczeniu depresji u pacjentów chorych na padaczkę. CBZ, podobnie jak TLPD jest prawie całkowicie metabolizowana w organizmie przez izoenzymy cytochromu P450 (mniej niż 5% dawki wydalana się z moczem w postaci nie zmienionej). Główny metabolit CBZ czyli 10,11-epoksykarbamazepina (CBZE) jest równie silnym związkiem przeciwdrgawkowym jak lek macierzysty. Ulega on z kolei hydrolizie do trans-10,11-dihydroksykarbamazepiny (tzw. trans-diolu karbamazepiny) wydalanej z moczem w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym. W epoksydację CBZ są zaangażowane dwa izoenzymy cytochromu P450: CYP3A4 i w mniejszym stopniu CYP2C8, biorące udział także w metabolizmie innych leków [17, 104]. Stąd łączne podawanie CBZ z innymi lekami może prowadzić z jednej strony do konkurowania o centra aktywne tych izoenzymów, a z drugiej strony CBZ jako znany induktor enzymatyczny może przyspieszać metabolizm tych leków. Jak wykazały badania kliniczne, łączne podawanie CBZ i TLPD prowadzi do spadku stężenia zarówno leków macierzystych jak i demetylowych pochodnych TLPD [35, 115, 184]. Stwierdzono również, że łączne podawanie CBZ i DMI powoduje wzrost wydalania całkowitej (czyli wolnej i sprzężonej) 2-OH-DMI z moczem [183]. Nasuwa się więc wniosek, że CBZ z całą pewnością indukuje izoenzym odpowiedzialny za demetylację TLPD, a więc

CYP3A4, i prawdopodobnie również inne izoenzymy związane z metabolizmem tych leków np.: CYP2D6 lub UDP-glukuroniltransferazę [35, 148].

Jednym z istotnych czynników uzasadniającym celowość monitorowania stężeń TLPD jest, jak to przedstawiono na str. 2, występowanie efektów terapeutycznych tych leków po dłuższym czasie ich stosowania (zwykle 12-14 dni). Zjawisko to wiąże się z mechanizmem działania tych leków. Jak wykazano w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych, po przewlekłym podawaniu TLPD dochodzi do zmniejszenia liczby i wrażliwości receptorów noradrenergicznych, głównie postsynaptycznych receptorów β , a także, choć w mniejszym zakresie presynaptycznych α_2 , 5-HT₂ i GABA-B, natomiast wrażliwość i liczba receptorów postsynaptycznych α_1 rośnie [208]. Podobne jak po długotrwałym stosowaniu TLPD zmiany w układach receptorów β pojawiają się u zwierząt doświadczalnych także po zastosowaniu elektrowstrząsów, które jak wiadomo są skuteczną formą leczenia niektórych ciężkich postaci depresji endogennych, zwłaszcza opornych na działanie leków [108].

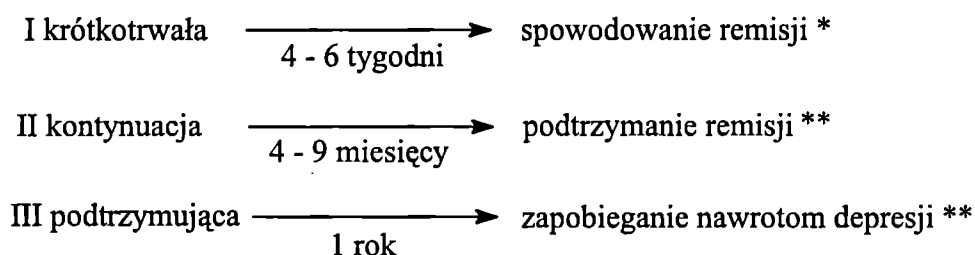
Według najnowszych teorii mechanizm działania TLPD należy rozpatrywać nie jako wpływ na określony układ neuroprzekaźnikowy, lecz w kategoriach powiązań anatomicznych i funkcjonalnych, a więc oddziaływań poszczególnych układów receptorowych w określonych strukturach. Końcowy efekt działania TLPD jest wypadkową zmian w procesach aktywacji i hamowania oraz interakcji pomiędzy poszczególnymi systemami neuroprzekaźnikowymi. Jest to zatem uporządkowany w określonym kierunku mechanizm wieloprzekaźnikowy, wynikający z modulacji funkcji wielu układów neurotransmiterów. Mechanizm ten nazwano "wieloprzekaźnikowym, modulacyjnym działaniem leków przeciwdepresyjnych" [152]. W efekcie wyżej opisanych zmian dochodzi do pobudzenia procesów aktywacyjnych w OUN w szerokim znaczeniu, w tym też nastroju i aktywności psychoruchowej.

W podsumowaniu, sytuacje kliniczne, w których monitorowanie stężenia TLPD jest pomocne w prowadzeniu leczenia obejmują: brak zadawalającego efektu klinicznego, nawrót depresji, poważne i uporczywe efekty niepożądane, kliniczne wskazania do podawania wysokich dawek TLPD, co może pociągać za sobą problemy natury medyczno-prawnej, podejrzenie braku współpracy chorego z lekarzem, występującej u około 50% pacjentów leczonych lekami psychotropowymi, możliwość wystąpienia interakcji z innymi równoległe

stosowanymi lekami, choroby serca, wątroby i nerek, zaawansowany wiek oraz przedawkowanie lub podejrzenie zatrucia lekiem.

Przebieg leczenia przeciwdepresyjnego obejmuje na ogół trzy fazy (rycina 2). Pierwsza

Fazy leczenia depresji



* indywidualizacja dawkowania
(wiek, czynniki genetyczne,
schorzenia, współpraca z chorym)

** współpraca z chorym, interakcje,
nieliniowość procesów farmako-
kinetycznych

Rycina 2. Fazy leczenia depresji oraz celowość pomiaru stężenia w poszczególnych fazach.

tzw. krótkotrwała, trwająca 4 - 6 tygodni stanowi pewne minimum do spowodowania remisji. Co najmniej w połowie trwania tej fazy celowa jest kontrola stężenia leku we krwi osiągającego po tym czasie wartości stacjonarne. Podjęcie decyzji ewentualnego indywidualizowania dawkowania leku pozwala w tej fazie uwzględnić wpływ wieku, czynników genetycznych, współistniejących schorzeń oraz współpracy z chorym w postępowaniu terapeutycznym.

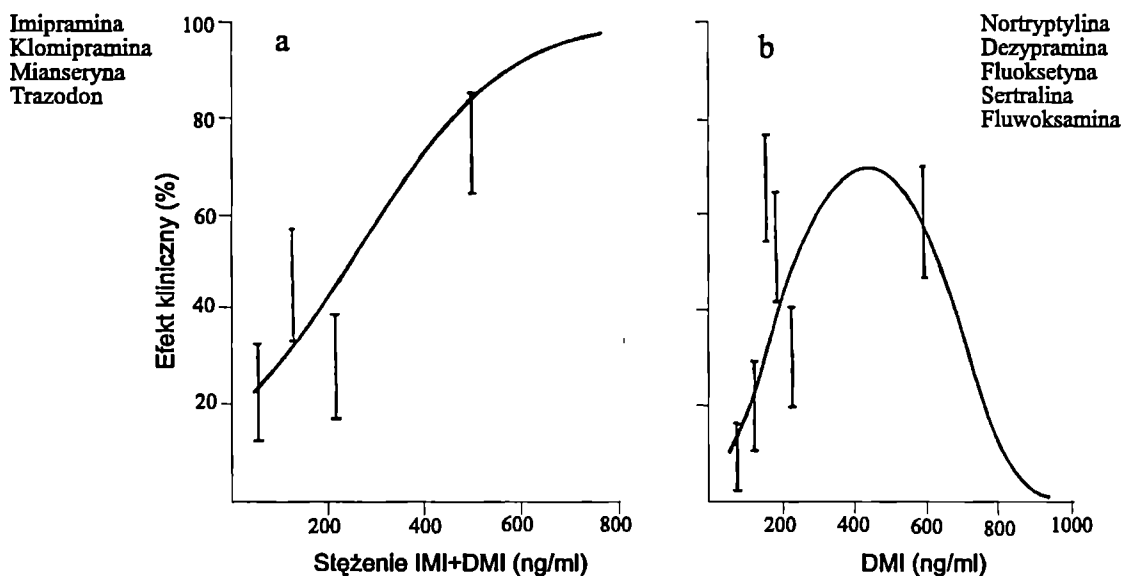
Leczenie ostrego epizodu winno być kontynuowane przy pełnej dawce (faza II) przez około 4 - 9 miesięcy. Uważa się, że okres leczenia krótszy niż 4 miesiące stwarza niebezpieczeństwo nawrotu choroby. Pacjenci po kilku dużych epizodach depresyjnych powinni być poddani długotrwałemu leczeniu podtrzymującemu, celem zapobieżenia nawrotom depresji (faza III). Czas tego leczenia wynosi około 1 roku. W tych dwóch ostatnich fazach pomiar stężenia ma

na celu m. in. ocenę współpracy z chorym oraz kontrolę ewentualnych skutków interakcji w fazie farmakokinetycznej w przypadku skojarzonego leczenia depresji.

Aby prowadzić leczenie pod kontrolą stężenia leku we krwi muszą być spełnione następujące warunki:

- istnienie zależności stężenie - efekt,
- określenie zakresu stężeń terapeutycznych,
- dysponowanie odpowiednio czułą i selektywną metodą analityczną.

Wyniki badań poszukujących korelacji pomiędzy stężeniem leku przeciwdepresyjnego a efektem terapeutycznym, mierzonym ilościowo za pomocą odpowiedniej skali np. Skali Depresji Hamiltona (HDRS - ang. Hamilton Depression Rating Scale) wskazują w przypadku IMI, klomipraminy, mianseryny i trazodonu na istnienie liniowej (rycina 3a) zależności



Rycina 3. Zależność pomiędzy skutecznością kliniczną a stężeniem stacjonarnym TLPD, przedstawiona na przykładzie IM+DMI (a) oraz DMI (b).

stężenie-efekt [50, 73, 77, 129, 141, 142, 168, 204]. Oznacza to, że wzrost całkowitego stężenia tych leków w surowicy chorych zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia efektu terapeutycznego, a górna granica stężeń tych leków jest zdefiniowana poprzez występowanie nasilających się efektów niepożądanych. W przypadku demetylowych pochodnych TLPD takich jak: DMI i nortryptylina (NT) oraz fluoksetyny, sertraliny i fluwoksaminy zależność ta ma charakter krzywoliniowy (rycina 3b) [7, 77, 89, 138, 141, 142]. Świadczy to o istnieniu tzw. okienka terapeutycznego. Stąd też, przy stężeniach stacjonarnych leżących powyżej lub poniżej określonego zakresu, należy spodziewać się zmniejszonej skuteczności działania. Inne leki z tej grupy np. AMI nie wykazują w zdecydowany sposób żadnej z opisanych wyżej zależności [27, 55]. Analiza statystyczna wyników badań nad zależnością stężenie - efekt pozwoliła na określenie zakresów stężeń terapeutycznych dla większości TLPD (tabela 3).

Tabela 3. Sugerowane zakresy stężeń terapeutycznych dla głównych przedstawicieli TLPD [wg 50, 77, 142].

| Lek | Zakres stężeń (ng/ml) |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Imipramina+dezypramina | 150-300 |
| Dezypramina | 125-300 |
| Amitryptylina+nortryptylina | 80-250 |
| Nortryptylina | 50-150 |
| Doksepina+demetylodoksepina | 150-250 |
| Klomipramina+demetyloklomipramina | 175-400 |

Zgodnie z definicją stężenia te zapewniają w populacji chorych największe prawdopodobieństwo działania terapeutycznego leku, przy najmniejszym ryzyku wystąpienia objawów niepożądanych.

Określenie w przypadku TLPD zależności stężenie - efekt nie jest łatwe i bywa często niejednoznaczne, co spowodowane jest m.in. [59, 82, 91]:

- niejednorodnymi kryteriami rozpoznawania depresji oraz ilościowej oceny nasilenia zespołu stosowanymi przez poszczególne ośrodki,
- zbyt małymi grupami badanych chorych,
- nie stosowaniem się pacjentów (szczególnie ambulatoryjnych) do zaleceń lekarza,
- błędną interpretacją stężeń oznaczonych po zbyt krótkim okresie leczenia tj. przed ustaleniem się stanu stacjonarnego,
- nieodpowiednim przechowywaniem próbek krwi,
- stosowaniem mało selektywnej i czułej metody analitycznej,
- nie uwzględnianiem obecności aktywnych metabolitów oraz roli wiązania TLPD z białkami osocza.

Aby uzyskane wyniki oznaczeń były porównywalne, pobieranie próbek krwi powinno odbywać się w stanie stacjonarnym, tj. po upływie co najmniej dwóch tygodni od chwili rozpoczęcia leczenia lub od momentu zmiany dawkowania, najlepiej rano, przed podaniem kolejnej dawki. Oznaczenia należy wykonywać w osoczu lub w surowicy krwi. Ze względu na to, że stężenie TLPD w erytrocytach jest większe niż w osoczu, zmiany temperatury oraz czas przechowywania pełnej krwi mogą wpływać na rozmieszczenie tych leków pomiędzy erytrocyty i osocze, dlatego też próbki powinny zostać odwirowane tak szybko, jak to tylko możliwe. Osocze lub surowicę nie powinno przechowywać się dłużej niż cztery tygodnie w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ lub do jednego roku w -20°C [50, 141, 142]. Nie bez znaczenia są również pojemniki, do których pobierana jest krew. Dla przykładu trój(2-butoksyetylo)fosforan (TBEP) - plastyfikator zawarty w szeroko stosowanych jeszcze do niedawna zatyczkach gumowych wypiera leki zasadowe z ich połączeń z białkami osocza, w wyniku czego leki te mogą ulegać redystrybucji do erytrocytów. Stąd, po odwirowaniu uzyskuje się niższe stężenia tych leków w osoczu lub surowicy [24, 67, 141, 146, 172, 187]. Podobny błąd może spowodować adsorpcja cząsteczek leku na niektórych tworzywach stosowanych do produkcji sprzętu laboratoryjnego.

Istotną rolę w badaniu zależności stężenie - efekt może odgrywać także stosowana metoda analityczna. Najczęściej do rutynowego oznaczania TLPD stosuje się metodę

immunofluorescencyjną ze światłem spolaryzowanym (FPIA) lub metodę wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC). Pierwsza z tych metod pozwala na analizę przede wszystkim czterech głównych przedstawicieli TLPD: IMI, DMI, AMI oraz NT. Chociaż charakteryzuje się ona stosunkowo zadawalającą czułością rzędu 20 ng/ml, jej zasadniczą wadą jest brak selektywności w stosunku do metabolitów (otrzymany wynik analizy stanowi sumę stężeń leku macierzystego i jego demetylowej pochodnej), co może mieć istotne znaczenie w ustaleniu zależności stężenie - efekt. Ponadto pomiar stężeń TLPD tą metodą może być zakłócony w wyniku tzw. reakcji krzyżowych (cross-reactivity) związanych z obecnością podawanych równocześnie innych leków np. fenotiazyn, CBZ lub innych TLPD (doksepiny, demetylodoksepiny, klomipraminy, protryptyliny). W wyniku tych interferencji można uzyskać błędne, często zawyżone, wyniki oznaczeń [85, 141, 142, 158, 166]. W przeciwieństwie do FPIA, metoda HPLC charakteryzuje się dużą swoistością, gdyż pozwala równocześnie oznaczyć nie tylko aktywne metabolity, w tym także hydroksypochodne, ale także inne stosowane równolegle leki, nawet te, o podobnej strukturze chemicznej [83, 139].

Obecność aktywnych metabolitów może wpływać na przebieg zależności stężenie - efekt TLPD. Stanowią one przykład grupy leków działających w znacznej mierze poprzez aktywne metabolity. Leki macierzyste np. IMI czy AMI, a szczególnie klomipramina, silnie hamują wychwyt zwrotny 5-hydroksytryptaminy przez neurony, podczas gdy demetylowe pochodne TLPD np. DMI i NT silniej wpływają na wychwyt noradrenaliny [39]. W związku z tym, te pierwsze działają głównie na nastrój, natomiast pochodne demetylowe silniej od leków macierzystych pobudzają napęd. W większości prac dotyczących poszukiwania korelacji pomiędzy stężeniem TLPD we krwi a efektem terapeutycznym czy występowaniem efektów niepożądanych, uwzględnia się najczęściej sumę stężeń leku macierzystego i jego demetylowej pochodnej [50, 93]. Tymczasem, w badaniach *in vitro* wykazano, że nie sprzężone hydroksymetabolity TLPD są także aktywne farmakologicznie. Mają one zdolność hamowania wychwyty zwrotnego noradrenaliny i serotoniny w różnych tkankach, w tym i mózgowej, w stopniu porównywalnym do leków macierzystych [138], natomiast ich powinowactwo do receptorów muskarynowych *in vitro* jest znacznie mniejsze, i tak dla E-10-hydroksynortryptyliny stanowi ono tylko 1/18 powinowactwa NT do tych receptorów,

a w przypadku 2-OH-DMI zaledwie 1/32 powinowactwa DMI. Tak więc hydroksymetabolity TLPD powinny być w mniejszym stopniu odpowiedzialne za występowanie antycholinergiczných objawów niepożądanych w stosunku do leków macierzystych [138, 154].

Tymczasem jak wynika z badań przeprowadzonych na zwierzętach, 2-OH-IMI jest znacznie bardziej kardiotoxyczna niż IMI czy kломipramina [90, 153, 200], a Z-10-hydroksynortryptylina okazała się bardziej kardiotoxyczna niż NT [154]. Z kolei wysokie stężenia hydroksypochoďnej NT w surowicy krwi są związane z niekorzystnymi zmianami w elektrokardiogramie i kardiotoxycznością u ludzi starszych [210, 211]. Jak wykazano, duże stężenia hydroksymetabolitów są wykrywalne w płynie mózgowo-rdzeniowym, gdzie stosunki 2-OH-DMI/DMI i 2-OHIMI/IMI są nawet 2-krotnie większe niż w osoczu [138, 153, 157]. Obecność tych metabolitów stwierdzono w mózgu zwierząt po podaniu TLPD [49] oraz w mózgu chorego, który zmarł w wyniku przedawkowania IMI [41].

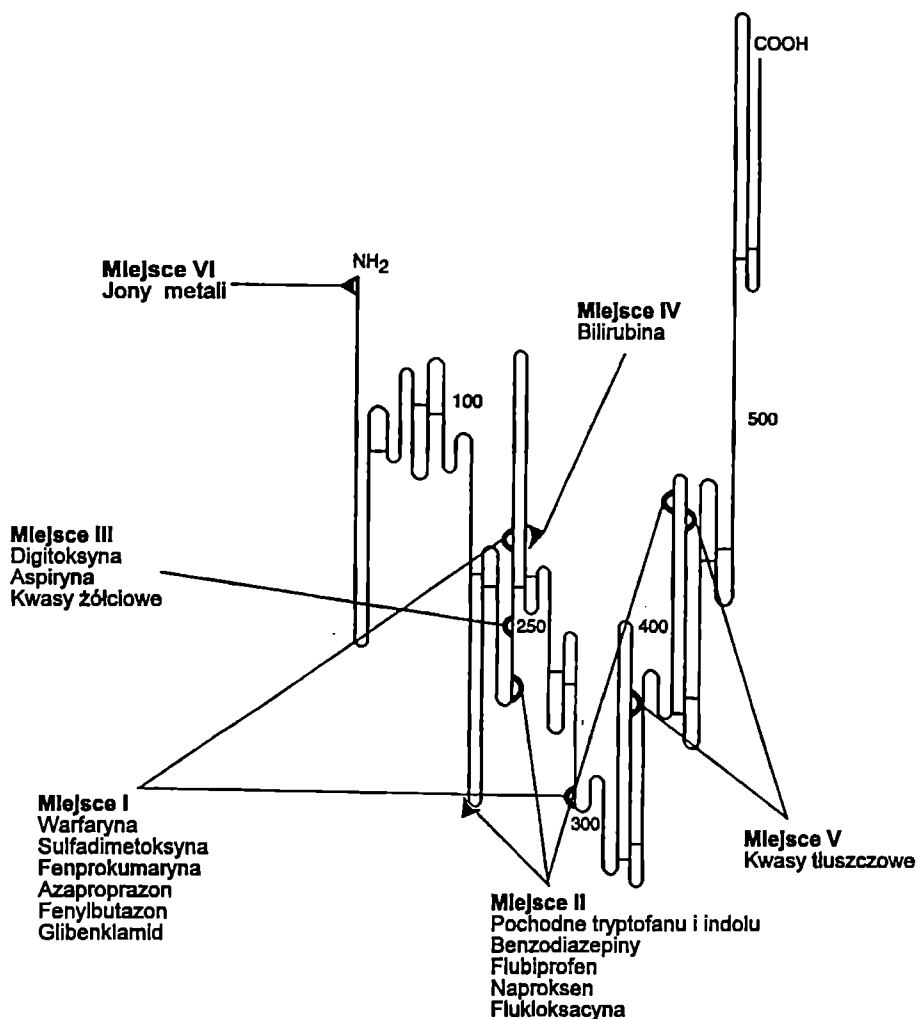
Hydroksymetabolity TLPD różnią się właściwościami farmakokinetycznymi od leków macierzystych. Są one mniej lipofilne niż leki macierzyste, stąd też charakteryzują się mniejszą objętością dystrybucji. Ponadto mają krótszy okres półtrwania i słabiej wiążą się z białkami osocza [212]. Ponieważ w wielu stanach fizjologicznych i patologicznych stosunek stężenia metabolitu do leku macierzystego może ulec zmianie, wkład hydroksymetabolitów w uzyskany efekt terapeutyczny czy występujący efekt toksyczny prawdopodobnie jest osobniczo zróżnicowany i w związku z tym pomiar stężenia tych produktów metabolizmu może przyczynić się do uściślenia korelacji stężenie-efekt.

TLPD należą do leków silnie wiążących się z białkami osocza. **Powstaje pytanie, jaką rolę odgrywa to wiązanie w ocenie kinetyki TLPD w organizmie oraz w ustaleniu zależności stężenie - efekt.**

Wykazano, że leki te wiążą się z białkami osocza w szerokim zakresie od 68 do 98% [26, 63]. Główne białka wiążące te związki o charakterze zasadowym to: albumina, kwaśna α_1 -glikoproteina oraz lipoproteiny.

Albumina (HSA) - jest to najważniejsze białko osocza o masie cząsteczkowej 69 000, stanowiące 45-66% wszystkich białek osocza, a jej prawidłowe stężenie mieści się w zakresie od 35 do 55 g/l. Jej rola w organizmie polega głównie na utrzymywaniu odpowiedniego

ciśnienia koloidoosmotycznego krwi oraz na transporcie różnorodnych związków drobnocząsteczkowych, zwłaszcza słabo rozpuszczalnych w wodzie np.: kwasów tłuszczowych, kwasu moczowego czy bilirubiny. Białko to wiąże także jony metali np.: jony wapniowe, cynkowe i miedziowe, zmniejszając stężenie ich zjonizowanych form w surowicy. Poza tym wiąże przede wszystkim leki kwaśne i w mniejszym stopniu leki o charakterze obojętnym i zasadowym (rycina 4). W stosunku do tych ostatnich wykazuje małe



Rycina 4. Lokalizacja miejsc wiążących leki i substancje endogenne na cząsteczce HSA [wg 87].

powinowactwo, a dużą pojemność wiązania, w związku z czym niewielkie zmiany w stężeniu HSA nie powodują na ogół większych zmian w wiązaniu leków zasadowych. W warunkach klinicznych stężenia tego białka mogą ulegać zmianom (tabela 4), a duże nasilenie tych zmian obserwowane np. w ciężkich chorobach wątroby czy nerek może wpływać na wiązanie niektórych leków zasadowych. Jest to zależne od udziału HSA w całkowitym wiązaniu tego typu leków z białkami osocza.

Kwaśna α_1 -glikoproteina (AAG) - jest białkiem wiążącym głównie leki o charakterze zasadowym [87, 110, 172], chociaż ma również zdolność wiązania niektórych leków obojętnych i kwaśnych [195]. Glikoproteid ten stanowi 10% α_1 -globulin i 0.5% wszystkich białek surowicy krwi. Masa cząsteczkowa tego białka szacowana jest na około 44 000, a swój kwaśny charakter i niską wartość pK_a zawdzięcza dużej zawartości w cząsteczce kwasu sjałowego. Wiązanie z lekami ma jednak charakter oddziaływań hydrofobowych, a nie jak należałoby przypuszczać elektrostatycznych, gdyż usunięcie z cząsteczki tego białka kwasu sjałowego nie zmniejsza istotnie stopnia wiązania leków [207]. AAG jest obecna w osoczu w stężeniu prawie 100-krotnie mniejszym niż HSA. U zdrowych ochotników jej stężenia wahają się w granicach od 0.5 do 1.0 g/l. Jej rola w organizmie nie jest w dalszym ciągu wyjaśniona do końca. Przypuszcza się, że może ona odgrywać pewną rolę w procesach krzepnięcia, procesach odbudowy immunologicznej i tkankowej. Należy do białek tzw. "ostrej fazy". Stężenia AAG w osoczu wzrastają nawet 5-krotnie w różnych stanach chorobowych (tabela 4), co ma istotny wpływ na ułamek wolnej frakcji leku w przypadku leków silnie wiążących się z tym białkiem. Dla przykładu wiązanie IMI z białkami osocza jest większe u pacjentów z podniesionym poziomem AAG po zawale mięśnia sercowego [66]. Podobne zjawisko zaobserwowano w grupie alkoholików [94] oraz w grupie pacjentów z depresją poddanych 3-tygodniowej kuracji AMI [13]. AAG jest więc często główną przyczyną między- i wewnątrzosobniczej zmienności w wartościach ułamka wolnej frakcji leków, głównie o właściwościach zasadowych. Białko to charakteryzuje się dużym powinowactwem i małą pojemnością wiązania, może być więc łatwo wysyczone przy wzrastających stężeniach tego

Tabela 4. Czynniki powodujące zmiany stężenia białek osocza [wg 123, 194, 196, 213].

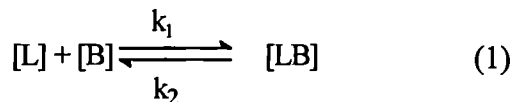
| Rodzaj białka | Spadek stężenia | Wzrost stężenia |
|---------------------------------------|---|---|
| Albumina | Wiek (ludzie starsi, noworodki) Oparzenia Nowotwory Marskość wątroby Enteropatia Ropień wątroby Niedożywienie Zespół nerczycowy Cięża Niewydolność nerek Zabieg operacyjny Uraz Stany zapalne Posocznica Niewydolność mięśnia sercowego | Łagodne guzy Nerwica Psychoza Schizofrenia |
| Kwaśna α_1 -gliko- proteina | Wiek (noworodki) Ciężka marskość wątroby Zespół nerczycowy Cięża | Wiek (ludzie starsi) Nowotwory Choroba Crohna Celiakia Zakażenia Stany zapalne Zawał mięśnia sercowego Otyłość Niewydolność nerek Reumatoidalne zapalenie stawów Stres Zabieg operacyjny Uraz |
| Lipoproteiny | Wrodzona hypolipoproteinemia Nadczynność tarczycy Niedożywienie | Wrodzona hyperlipoproteinemia Alkoholizm Niedoczynność tarczycy Choroba zaporowa wątroby Dna moczanowa Cukrzyca Dieta wysokocholesterolowa Zapalenie trzustki Cięża Niewydolność nerek Choroby wątroby Niedrożność dróg żółciowych |

typu leków, co również sprzyja zróżnicowaniu ich stopnia wiązania. Dla TLPD stwierdzono występowanie jednego tylko miejsca wiążącego na cząsteczce AAG [87, 132, 140], chociaż dla wyższych stężeń tych leków ujawnia się również druga klasa miejsc wiążących, ale o znacznie mniejszym powinowactwie [29, 64, 107, 178].

Lipoproteiny - to grupa białek zróżnicowana zarówno pod względem masy cząsteczkowej mieszczącej się w zakresie od 200 000 do 10 000 000, jak i zawartości lipidów w cząsteczce, która oscyluje w granicach 40-95%. Białka te można podzielić na cztery grupy: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), lipoproteiny o małej gęstości (LDL) oraz lipoproteiny o dużej gęstości (HDL). Chylomikrony, których głównym składnikiem są trójglicerydy, transportują lipidy egzogenne (pokarmowe) i nie mają zdolności wiązania leków. VLDL transportują lipidy endogenne pochodzące z wątroby, głównie trójglicerydy, natomiast cholesterol jest związany z frakcjami LDL i HDL. Lipoproteiny te wiążą leki zasadowe i obojętne, chociaż niektóre leki kwaśne też mogą być przez nie wiązane, ale w znacznie mniejszym stopniu. W odróżnieniu od leków takich jak: propranolol, cyklosporyna, pindolol czy digoksyna, wiążących się z tymi białkami na zasadzie rozpuszczania w części tłuszczowej lipoprotein, wiązanie TLPD może ulegać wysyceniu, dlatego też przypuszcza się, że leki te wiążą się w pewnych ściśle określonych miejscach wiążących na białku. Według niektórych autorów powinowactwo i pojemność wiązania lipoprotein w stosunku do IMI są co najmniej tak duże jak HSA [18, 150, 202].

U zdrowych ochotników wykazano, że stężenia lipoprotein są w znacznym stopniu zróżnicowane międzyosobniczo. Podniesiony poziom cholesterolu i trójglicerydów obserwuje się w wielu stanach chorobowych (tabela 4), jak również u pacjentów zażywających pewne leki np. fenytoinę czy cyklosporynę. Dla leków, które silnie wiążą się z lipoproteinami należy oczekiwać korelacji pomiędzy ułamkiem wolnej frakcji leku a stężeniem lipoprotein, cholesterolu lub trójglicerydów. Takie zależności wykazano np. dla AMI i NT [151], ponadto stwierdzono, że u pacjentów z hyperlipoproteinemią ułamek wolnej frakcji IMI był niższy niż w grupie kontrolnej [47].

Interakcja lek - białko jest procesem odwracalnym, w którym ustala się równowaga pomiędzy wolnym białkiem [B] i nie związanym lekiem [L] a kompleksem lek-białko [LB]:



gdzie k_1 i k_2 to odpowiednio stałe szybkości asocjacji i dysocjacji kompleksu [LB].

Powinowactwo leku do białka można wyrazić stosunkiem k_1/k_2 , który określa się jako stałą wiązania K_a . Im większa jest jej wartość, tym większe powinowactwo leku do białka.

Ilościowo wiązanie leku z białkami osocza określa ułamek leku związanego (f_b), lub ułamek wolnej frakcji leku (f_u), który wyraża się równaniem:

$$f_u = \frac{c_u}{c_t} \quad (2)$$

w którym: c_u - stężenie wolnej frakcji leku,

c_t - całkowite stężenie leku.

Ułamek wolnej frakcji leku zależy od stałej wiązania K_a i od stężenia wolnego białka [B] zgodnie z następującym równaniem:

$$f_u = \frac{1}{1 + K_a \cdot [B]} \quad (3)$$

Równania opisujące średnie stężenie leku wolnego (c_u^{SS}) w stanie stacjonarnym będą miały różną postać w zależności od tego, czy eliminacja leku zależy od jego wiązania z białkami osocza (restrictively-cleared drugs) czy też jest od niego niezależna (nonrestrictively-cleared drugs). Pierwsza grupa, to leki o stosunkowo niskich wartościach współczynnika ekstrakcji wątrobowej ($E_H < 0.3$) np. fenytoina, diazepam, tolbutamid, warfaryna, kwas walproinowy, dizopiramid, fenylbutazon, ibuprofen, natomiast w drugiej grupie znajdują się leki o wysokich wartościach tego współczynnika ($E_H > 0.7$) np. morfina, lidokaina, verapamil, TLPD, które

wykazują duże powinowactwo do enzymów wątrobowych, a wiązanie z białkami osocza nie ogranicza ich eliminacji.

Dla leków o eliminacji zależnej od wiązania z białkami osocza, ich klirens wątrobowy (Cl_H) wyraża równanie:

$$Cl_H \sim f_u \cdot Cl_{int} \quad (4)$$

gdzie: Cl_{int} - klirens wewnętrzny, określa aktywność enzymów metabolizujących wolny lek, a stężenie całkowite (c_t^{ss}) tych leków w stanie stacjonarnym określa zależność:

$$c_t^{ss} = \frac{F \cdot D / \tau}{f_u \cdot Cl_{int}} \quad (5)$$

gdzie: F - ułamek dawki wchłoniętej (dostępność biologiczna),

D - podana dawka,

τ - przedział dawkowania,

pozostałe symbole jak wyżej.

Natomiast stężenia wolnej frakcji tych leków opisuje równanie:

$$c_u^{ss} = \frac{F \cdot D / \tau}{Cl_{int}} \quad (6)$$

Jak wynika z równań 5 oraz 6 w przypadku leków wykazujących eliminację zależną od wiązania z białkami osocza, całkowite stężenia tych leków w stanie stacjonarnym zależą od ułamka wolnego leku we krwi. Natomiast stężenia ich wolnej frakcji nie zależą od tego parametru. Stąd, w sytuacjach klinicznych, w których zachodzi zmiana ułamka wolnej frakcji leku, korygowanie dawkowania tych leków w oparciu o stężenia całkowite nie zawsze jest słuszne, ponieważ stężenie wolnej frakcji, odpowiedzialnej za działanie farmakologiczne, może pozostać nie zmienione. Spostrzeżenie to jest słuszne przy założeniu, że klirens wewnętrzny wolnego leku nie ulega zmianie.

Dla leków o wysokich wartościach E_H problem ten jest o wiele bardziej złożony, ponieważ na opisane powyżej zależności będzie wpływać w istotny sposób również droga podania leku. Klirens całkowity (Cl_T) tych leków po podaniu dożylnym, jak przedstawiono poniżej, nie zależy od f_u , a jedynie od szybkości przepływu krwi przez wątrobę (Q_H):

$$Cl_T \sim Q_H \quad (7)$$

Dlatego też zmiany w wiązaniu tych leków z białkami osocza nie będą wpływać na całkowite stężenie w stanie stacjonarnym, które w przypadku tej grupy leków można opisać równaniem:

$$c_t^{ss} = \frac{D/\tau}{Q_H} \quad (8)$$

Natomiast stężenie wolnej frakcji tych leków opisuje równanie:

$$c_u^{ss} = f_u \frac{D/\tau}{Q_H} \quad (9)$$

Z równania 9 wynika, że zmiany w wiązaniu z białkami osocza mogą wpływać na stężenia wolnej frakcji leków o wysokich wartościach współczynnika ekstrakcji wątrobowej.

Należy jednak pamiętać, że przedstawione wyżej rozważania teoretyczne są słuszne tylko wtedy, gdy szybkość przepływu krwi przez wątrobę oraz aktywność jej enzymów metabolizujących pozostają bez zmian w trakcie stosowania leku, co w praktyce klinicznej zdarza się niezwykle rzadko ze względu na często stosowaną politerapię, współistniejące choroby czy wreszcie czynniki środowiskowe, dietę itp.

Po podaniu doustnym, w wyniku tzw. efektu pierwszego przejścia, o stężeniu w stanie stacjonarnym decydować będzie także aktywność enzymów metabolizujących te leki.

W warunkach klinicznych wiele czynników fizjologicznych lub patologicznych może zmieniać stężenia białek osocza (tabela 4), w wyniku czego następują zmiany w ułamku wolnej frakcji leku. Substancje endo- i egzogenne mogą także wpływać na stopień wiązania

leku z białkami. Do endogennych, fizjologicznych inhibitorów wiązania leków z białkami należą: kwasy tłuszczowe, bilirubina, mocznik i kwas moczowy, niektóre hormony (estrogeny, tyroksyna). Podobny efekt może wywołać obecność wysokich stężeń metabolitu danego leku lub cały szereg нефizjologicznych substancji, pojawiających się w konsekwencji procesu chorobowego [12, 113, 126, 191]. Interakcja pomiędzy lekiem a wymienionymi wyżej substancjami może polegać albo na współzawodnictwie o wspólne miejsca wiążące na białku, albo wynikać ze zdolności danej substancji do zmiany trzeciorzędowej struktury białka. Bez względu na mechanizm, tego rodzaju interakcje powodując wypieranie leku z jego połączeń z białkami i obniżenie powinowactwa leku do białka, zwiększają ułamek wolnej frakcji leku wypieranego.

Interakcję w zakresie wiązania leku z białkami może powodować także równoczesne podanie innego leku. Aby jednak zjawisko to mogło wystąpić muszą być spełnione następujące warunki [122]:

- lek wypierany powinien silnie wiązać się z białkami osocza, ponieważ tylko wówczas obniżenie frakcji leku związanego spowoduje znaczny wzrost wielkości ułamka wolnej frakcji tego leku,
- lek wypierany i wypierający muszą mieć wspólne miejsca wiążące na białku (hamowanie kompetycyjne) lub wspólne białko wiążące (hamowanie niekompetycyjne),
- liczba miejsc wiążących na białku powinna być ograniczona, a stężenie molowe leku wypierającego powinno osiągać wartości stężenia molowego białka wiążącego,
- powinowactwo do miejsca wiążącego i/lub stężenie wolnej frakcji leku wypierającego powinno być większe niż leku wypieranego.

Ocena stopnia wiązania leku z białkami osocza oparta jest na oddzieleniu wolnej, nie związanej z białkami frakcji leku. Do tego celu stosowane są najczęściej dwie metody:

- dializy równowagowej,
- ultrafiltracji.

Dializa równowagowa jest uważana za metodę odniesienia przy ocenie innych technik np. ultrafiltracji czy ultrawirowania [11, 182]. Większość badań dotyczących wiązania leku z białkami przeprowadza się z wykorzystaniem tej metody, ponieważ posiada ona tę przewagę nad innymi, że w stanie równowagi można oznaczyć zarówno wolne jak i całkowite stężenia leku. Oddzielenie leku wolnego od związanego z białkami zachodzi w naczyniu dializacyjnym składającym się z 2 komór oddzielonych od siebie błoną półprzepuszczalną, w których umieszcza się osocze zawierające lek i bufor. W stanie równowagi, stężenie leku wolnego jest takie samo po obu stronach błony, a ułamek wolnej frakcji leku oblicza się jako stosunek stężenia leku w części buforowej odpowiadającej stężeniu leku wolnego do stężenia leku w części zawierającej osocze. Metoda ta jest szeroko stosowana głównie w badaniach nad charakterystyką wiązania nowych leków z surowicą czy poszczególnymi białkami osocza np. pozwala na określenie liczby miejsc wiążących czy stałych wiązania. W odniesieniu do monitorowania leku wolnego metoda ta posiada dwa istotne ograniczenia: stosunkowo długi czas trwania procedury (nawet do 48 godzin) oraz występowanie tzw. „efektu rozcieńczenia” [12, 113]. Źródłem tego efektu jest dyfuzja leku wolnego z „kompartymentu białkowego” do buforu, przez co stężenie leku w tym kompartmentcie maleje. W wyniku tego osiągnięta jest nowa równowaga, przy której stężenie leku wolnego jest inne niż było w próbce pierwotnej, tzn. przed rozpoczęciem dializy. Efekt ten jest szczególnie wyraźny dla leków o wiązaniu zależnym od stężenia (concentration-dependent binding), np. kwasu walproinowego czy dizopiramidu. Poza tym należy pamiętać o możliwości wystąpienia takich niekorzystnych zjawisk jak: zmiana pH próbki i wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w wyniku długotrwałej inkubacji. Na wyniki pomiaru ułamka wolnej frakcji leku z wykorzystaniem dializy równowagowej może także wpływać efekt Donnana, wiązanie leku z membraną i komorą dializacyjną oraz przechodzenie buforu do komory zawierającej osocze pod wpływem ciśnienia osmotycznego wywieranego przez białka, co w efekcie końcowym prowadzi do rozcieńczenia badanej próbki osocza [12, 25, 44, 112, 113, 196, 201].

W świetle tych ograniczeń, ultrafiltracja wydaje się być obiecującą techniką, szczególnie do szybkiego, rutynowego oznaczania wolnego leku w praktyce klinicznej. Ultrafiltrację przeprowadza się w dostępnych na rynku mikroseparatorach, znajdujących się

w ofercie wielu firm np. firmy Amicon, Nihon Millipore i innych. Składają się one z 2 zbiorników oddzielonych od siebie membraną o odpowiedniej średnicy porów. Sam proces polega na filtrowaniu próbki osocza zawierającej lek, umieszczonej w górnej części mikroseparatora, pod wpływem ciśnienia wywieranego na osocze za pomocą strzykawki lub gazowego azotu albo pod wpływem siły odrodkowej czyli przy użyciu wirówki (najlepiej termostатовanej), wyposażonej w rotor kątowy, co zapobiega gromadzeniu się białek na powierzchni membrany [113]. Stężenie leku w ultrafiltracie zbieranym w dolnej części mikroseparatora stanowi bezpośrednią miarę stężenia wolnego leku w osoczu krwi. Jest to więc metoda niezwykle prosta i szybka (czas trwania całej procedury wynosi maksymalnie 1 godzinę), ponadto nie występują tutaj opisane wyżej niekorzystne zjawiska towarzyszące zazwyczaj stosowaniu dializy równowagowej. Jedynym problemem wspólnym dla obu technik jest występująca w przypadku niektórych leków niespecyficzna adsorpcja na membranie mikroseparatora. Należy więc zawsze wykonać badania wstępne w tym kierunku i ewentualnie wprowadzić odpowiednie korekty w obliczeniach [26, 112, 113]. Jak wykazano, stężenie leku wolnego pozostaje nie zmienione przez cały czas trwania procesu ultrafiltracji i nie zależy od objętości filtrowanej próbki [25, 98, 113, 199]. Zdaniem wielu autorów jest to najbardziej odpowiednia metoda do rutynowego monitorowania stężeń wolnej frakcji leku [12, 113, 118, 119, 124, 181, 187, 201].

Określenie stężenia wolnej frakcji TLPD jest możliwe także *in vivo*, poprzez pomiar stężenia tych leków w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF). Metoda ta opiera się na założeniu, że ponieważ w warunkach fizjologicznych stężenie białek w CSF jest niewielkie (<1% stężenia w surowicy) [22], dlatego też w przypadku leków lipofilnych, łatwo przechodzących przez barierę krew-mózg, ich stężenie w tym płynie teoretycznie powinno być równe stężeniu wolnej frakcji leku w osoczu [26]. Potwierdziły to prace niektórych autorów [134, 157, 177]. Pomimo tego, metoda ta jako inwazyjna nie zyskała zbyt wielu zwolenników, głównie ze względu na trudności związane z pobieraniem próbek od pacjentów.

2. CEL PRACY

W świetle przedstawionych rozważań rodzi się pytanie o znaczenie stężenia wolnej frakcji TLPD w rutynowym leczeniu psychiatrycznym. Z tego punktu widzenia zakłada się, że monitorowanie stężenia leku wolnego jest uzasadnione w przypadku leków:

- silnie wiążących się z białkami osocza ($\geq 80\%$),
- dla których ułamek wolnej frakcji zmienia się w zakresie stężeń terapeutycznych oraz w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych,
- dla których istnieje związek pomiędzy stężeniem leku nie związanego z białkami a efektem klinicznym,
- o wąskim indeksie terapeutycznym dla stężeń wolnej frakcji leku,
- dla których opracowano metodę oznaczania stężenia leku wolnego.

Wiele z tych założeń, jak przedstawiono w części teoretycznej, dotyczy także TLPD.

Jak dotychczas podejmowano próby monitorowania stężenia wolnej frakcji leku głównie w przypadku leków przeciwpadaczkowych, takich jak: fenytoina, karbamazepina, kwas walproinowy, leków przeciwartmicyjnych: lidokainy, chinidyny, dizopiramidu, propranololu oraz niektórych niesteroidowych leków przeciwzapalnych [201].

W odniesieniu do TLPD, istnieją liczne dane na temat ich wiązania z białkami osocza oraz badania ich wolnej frakcji w warunkach *in vitro*, natomiast niewiele jest danych na ten temat w warunkach *in vivo*, szczególnie u pacjentów psychiatrycznych poddanych leczeniu przewlekłemu. Pierwsze badania z tego zakresu przeprowadził Borga w roku 1969, wykorzystując metodę ultrafiltracji [23]. Wykazał on, że leki te silnie wiążą z białkami osocza osób zdrowych, lecz nie stwierdził większych międzyosobniczych różnic w wielkości ułamka wolnej frakcji TLPD. Wyniki tych badań oraz trudności metodyczne (czułość metody analitycznej, brak odpowiedniej metody oddzielania wolnej frakcji TLPD) powodowały, że długo nie przywiązywano wagi do tego zagadnienia i dopiero Glassman i współpr. [72], stosując metodę dializy równowagowej stwierdzili ponad 4-krotne (5.4-23%) zróżnicowanie w ułamku wolnej frakcji IMI w grupie 26 chorych psychiatrycznych. Wyniki te znacznie różniły się od obserwacji Borgi i dały początek dalszym badaniom [27, 28, 30, 102, 140, 147].

W ostatnich latach wielu autorów zwraca uwagę, że w przypadku TLPD, oprócz obecności aktywnych metabolitów, także międzyosobnicze różnice w wiązaniu tych leków z białkami osocza, uwarunkowane czynnikami fizjologicznymi i patofizjologicznymi mogą stanowić jeden z istotnych czynników wpływających na przebieg zależności stężenie - efekt terapeutyczny [62, 75, 123].

W świetle przedstawionych danych, celem niniejszej pracy jest określenie, na przykładzie imipraminy, roli monitorowania stężenia wolnej frakcji TLPD w ocenie kinetyki tych leków w warunkach rutynowego postępowania klinicznego. W trakcie realizacji podjętych badań oznaczano w stanie stacjonarnym stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej trzech aktywnych metabolitów w surowicy chorych psychiatrycznych leczonych IMI w monoterapii oraz w leczeniu skojarzonym z CBZ lub neuroleptykami (LVP i PER). Oznaczone stężenia odnoszono następnie do efektu terapeutycznego oraz działań niepożądanych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Pacjenci

Badania wykonano ogółem w grupie 66 chorych głównie z dużym zespołem depresyjnym (wg kryteriów DSM-III-R Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego) leczonych w Klinice Psychiatrii Dorosłych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik: prof. dr hab. Adam Szymusik, bezpośrednia opieka: dr med. Andrzej Wasieczko). Dane demograficzne badanych chorych zebrano w tabeli 5. Wszyscy chorzy byli

Tabela 5. Charakterystyka demograficzna chorych psychiatrycznych.

| | |
|---------------------------------|---|
| Liczba chorych | 66 |
| Płeć | 37 K, 29 M |
| Wiek [lata] (średnia±SD) | 22 - 71 (43.49±9.30) |
| Masa ciała [kg] (średnia±SD) | 51 - 125 (73.05±14.55) |
| Rodzaj depresji | Mała depresja - 8 chorych Duża depresja - 58 chorych |
| Dawkowanie IMI | 29 chorych 2 mg/kg/dzień 37 chorych 3 mg/kg/dzień |
| Inne najczęściej stosowane leki | LVP - 15 PER - 13 Pochodne benzodiazepiny - 11 Haloperidol - 1 Karbamazepina - 13 |

leczeni imipraminą (Polfa Starogard) w postaci drażetek \hat{a} 25 mg w dawce 2 lub 3 mg/kg/dzień, podawanej w dwóch porcjach, co 12 godzin. Ponadto badanym chorym podawano inne leki wspomagające (tabela 5). Jak wynika z tej tabeli IMI była najczęściej kojarzona z neuroleptykami pochodnymi fenotiazyny tzn. z LVP (Tisercin, Egipt) lub PER (Pernazinum, Labor) podawanymi w dwóch lub trzech porcjach dziennych, w dawce każdorazowo dobranej według wskazań klinicznych i uznania lekarza. W tym celu kierowano się głównie masą ciała chorego, nasileniem niepokoju i zaburzeń snu, ewentualnie obecnością tendencji samobójczych. Niektórzy chorzy otrzymywali dodatkowo jedną z pochodnych benzodiazepiny jako leku ułatwiającego zasypianie. Ponadto u 13 spośród badanych chorych po 2 tygodniach leczenia tylko IMI włączano CBZ (Amizepin, Polfa Starogard lub Tegretol, Ciba-Geigy), tabletki \hat{a} 200 mg lub 400 mg. Do badań włączono także jako grupę kontrolną 14 chorych z padaczką leczonych CBZ w monoterapii (próbki krwi uzyskano z Pracowni Terapii Monitorowanej CM UJ).

Próbki krwi do oznaczeń (około 6 ml) pobierano z żyły przedramienia lub z dołu łokciowego tuż przed podaniem porannej dawki leku, po co najmniej dwóch tygodniach przyjętego leczenia (stężenie minimalne w stanie stacjonarnym). Pobraną krew wirowano, a otrzymaną surowicę przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analizy.

Monitorowanie stężenia leku, zatwierdzone przez Komisję Etyczną CM UJ, było prowadzone w ramach rutynowego postępowania klinicznego obejmującego: diagnozowanie, wybór leków, dawkowanie oraz ocenę kliniczną wyników leczenia.

Wszyscy badani chorzy zostali poddani rutynowym badaniom psychiatrycznym, fizykalnym, w tym neurologicznemu oraz podstawowym badaniom laboratoryjnym, takim jak: morfologia i badania biochemiczne krwi: oznaczenie stężenia białka całkowitego, albuminy, bilirubiny, elektrolitów i glukozy oraz poziomu aminotransferazy asparaginianowej (AspAt) i aminotransferazy alaninowej (AlAt). W trakcie podawania IMI monitorowano także układ sercowo-naczyniowy tj: wykonywano badania elektrokardiograficzne (EKG) i dokonywano pomiaru ciśnienia krwi.

Głębokość depresji oraz jej nasilenie oceniano przy pomocy 21-objawowej Skali Depresji Hamiltona (HDRS). Do badań zostali włączeni jedynie chorzy z głębokim zespołem

depresyjnym tzn. mający co najmniej 25 punktów w skali HDRS. Ocenę głębokości depresji przeprowadzono przed rozpoczęciem leczenia (HDRS₁) oraz w 22-gim dniu leczenia pełną dawką IMI (HDRS₂). O pozytywnej odpowiedzi terapeutycznej świadczyło obniżenie punktów w HDRS o co najmniej 50% w stosunku do wartości wyjściowej (HDRS₁).

Nasilenie objawów niepożądanych (ADR) klasyfikowano wg następującej skali:

0 - brak jakichkolwiek ADR,

1 - łagodne, uchwytne jedynie w pierwszym tygodniu leczenia,

2 - umiarkowane, nie wymagające zmiany terapii,

3 - poważne, również zmiana fazy z depresyjnej na maniacką, wymagające zmiany leczenia.

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Aparatura

Stężenia badanych związków oznaczano metodą FPIA lub HPLC, stosując odpowiednio aparat TDx firmy Abbott lub chromatograf cieczowy firmy Thermo Separation Products (USA) złożony z następujących modułów:

- pompa izokratyczna o zakresie przepływu fazy ruchomej 0-10 ml/min. (P100 Iso Chrom, Thermo Separation Products, USA),
- dozownik z pętlą 50 µl (model 7125, Rheodyne, USA),
- detektor UV-VIS ze zmienną długością fali (Spectra 100, Thermo Separation Products, USA),
- integrator (Chrom Jet SP 4400, Thermo Separation Products, USA).

Do rozdzielania badanych związków zastosowano kolumnę Supelcosil LC PCN 25 cm x 4.6 mm (Supelco, USA) zabezpieczoną przedkolumną 2 cm x 4.6 mm o tym samym wypełnieniu.

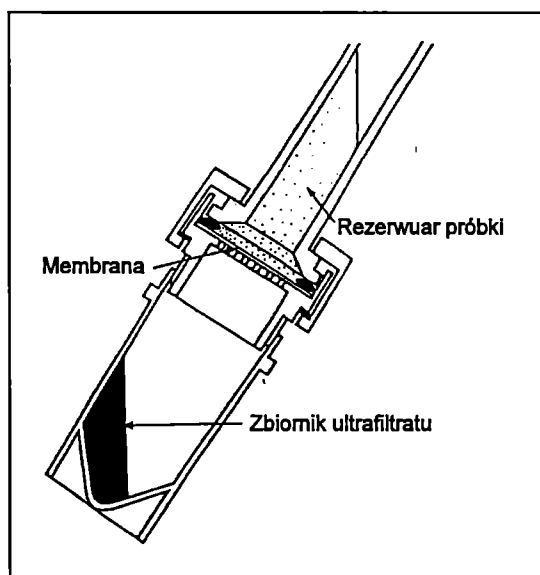
Dla IMI i jej metabolitów oraz LVP i PER ustalono następujące warunki analizy:

- faza ruchoma: 50 mM bufor fosforanowy KH_2PO_4 (pH=4.5) i acetonitryl (58:42 v/v),
- szybkość przepływu 1 ml/min.,
- analityczna długość fali $\lambda=214$ nm.

Dla CBZ i CBZE opracowano następujące warunki:

- faza ruchoma: acetonitryl i woda (25:75 v/v),
- szybkość przepływu 1.1 ml/min.,
- analityczna długość fali $\lambda=210$ nm.

Do oddzielania wolnej frakcji leku zastosowano wirówkę firmy Hettich - EBA III z wirnikiem kątowym oraz mikroseparator MPS 1 firmy Amicon (Beverly, MA, USA) wielokrotnego użycia z wymiennymi membranami hydrofilnymi YM30, nieprzepuszczalnymi dla cząstek o masie cząsteczkowej większej od 30 000 (30 000 MW cut-off). Schemat takiego mikroseparatora przedstawiono na rycinie 5 .



Rycina 5. Schemat mikroseparatora firmy Amicon.

3.2.2. Substancje badane i odczynniki

W badaniach użyto następujące substancje:

- Imipramina chlorowodorek (ZF Polfa, Polska),
- Dezypramina chlorowodorek (Ciba-Geigy oraz USV - Pharmaceutical Corp., Tarrytown, USA),
- 2-hydroksyimipramina chlorowodorek (dar Instytutu Farmakologii PAN),
- 2-hydroksydezypramina szczawian (dar Instytutu Farmakologii PAN),
- Karbamazepina (Ciba-Geigy, Szwajcaria),
- 10,11-epoksykarbamazepina (Ciba-Geigy, Szwajcaria),
- Levomepromazyna maleinian (Egyt, Węgry),
- Perazyna chlorowodorek (ZF Polfa, Polska),
- Mianseryna chlorowodorek (Organon, Holandia),
- Butabarbital (Ciba-Geigy, Szwajcaria),
- Albumina ludzka liofilizowana wg Cohna frakcja V (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Polska),
- Kwaśna α_1 -glikoproteina ludzka (Fluka, Szwajcaria).

W metodzie FPIA stosowano firmowy zastaw odczynników składający się z:

- zestawu do oznaczeń TLPD zawierającego stabilizowany roztwór przeciwciała i antygenu znakowanego fluoresceiną,
- sześciu kalibratorów czyli roztworów IMI w surowicy ludzkiej o następujących stężeniach: 0.0, 75.0, 150.0, 300.0, 600.0, 1000.0 ng/ml,
- trzech kontroli stanowiących roztwory IMI o znanych stężeniach dla zakresu stężeń niskich (L), średnich (M) i wysokich (H).

Odczynniki stosowane w metodzie HPLC:

- acetonitryl, metanol, heksan, octan etylu, dichlorometan, alkohol izoamyłowy czystości HPLC (Merck),
- KH_2PO_4 (Fluka),
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Fluka),
- woda czystości HPLC (Merck).

3.2.3. Roztwory podstawowe

Roztwory podstawowe IMI, DMI, 2-OH-IMI, 2-OH-DMI, LVP, PER i mianseryny jako standardu wewnętrznego (IS) o stężeniu 1 mg/ml (w przeliczeniu na wolną zasadę) oraz roztwory podstawowe CBZ, CBZE i butabarbitalu (IS) również o stężeniu 1 mg/ml sporządzono przez rozpuszczenie badanych związków w metanolu.

Tak otrzymane roztwory podstawowe rozcieńczano dalej metanolem, celem otrzymania roztworów roboczych o żądanym stężeniu i przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

3.2.4. Oddzielanie wolnej frakcji badanych leków

Oddzielanie wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oraz CBZ i jej metabolitu (CBZE) przeprowadzono *in vitro* z wykorzystaniem metody ultrafiltracji. W tym celu do 2-3 ml surowicy pacjenta dodawano bufor fosforanowy o pH=6.1 w ilości 50 μl /ml surowicy. Następnie badaną surowicę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C w szczelnie zamkniętych probówkach szklanych przez 1 godzinę. W tym czasie sączi do ultrafiltracji moczo w wodzie destylowanej celem usunięcia środków konserwujących, mogących interferować z badanymi związkami. Następnie próbki surowicy przenoszono do

mikroseparatorów za pomocą pipety automatycznej i poddawano wirowaniu w temperaturze 37°C w wirówce EBA III przez 1 godzinę przy szybkości obrotów rotora 1000 x g. Otrzymany przesącz przenoszono do probówek ekstrakcyjnych i poddawano dalszej analizie.

W badaniach wstępnych określono ewentualny procent wiązania IMI i CBZ oraz ich metabolitów z membraną i innymi elementami mikroseparatora. W tym celu sporządzono roztwory IMI i jej metabolitów w buforze fosforanowym o pH=7.4 o stężeniach: 5, 10 i 50 ng/ml oraz roztwory CBZ i jej epoksydu o stężeniach: 0.5, 1 i 3 µl/ml. Roztwory te poddano analizie przed i po sączeniu. Dla każdego z tych stężeń wykonano po 4 oznaczenia.

Sprawdzono również powtarzalność procesu ultrafiltracji z zastosowaniem surowicy. W tym celu do 1 ml surowicy pobranej od zdrowego ochotnika dodawano odpowiednie objętości roztworu roboczego IMI i jej metabolitów tak, aby uzyskać stężenia tych związków równe 100 i 200 ng/ml. Surowicę wraz z lekami inkubowano w łaźni wodnej w 37°C, a następnie poddano ultrafiltracji według opisanej powyżej procedury. Dla każdego stężenia wykonano po 4 pomiary.

3.2.5. Procedura oznaczania IMI i DMI metodą FPIA

Sumaryczne stężenia IMI i jej demetylowej pochodnej oznaczano metodą FPIA zgodnie z procedurą dla TLPD opisaną w TDx System Operation Manual opracowaną przez Abbott Laboratories Diagnostics Division. W tym celu po odwirowaniu próbek krwi, 50 µl osocza odpipetowywano do naczynek reakcyjnych, które następnie wstawiono do aparatu wraz z zestawem odczynników i kontrolą.

Krzywe kalibracji czyli wykres zależności stopnia polaryzacji światła od stężenia leku sporządzano w zakresie stężeń od 0 do 1000 ng/ml. Dokładność oznaczeń sprawdzano analizując każdorazowo badaną serię próbek z jedną z surowic kontrolnych.

3.2.6. Procedura oznaczania IMI i jej metabolitów oraz LVP i PER metodą HPLC

W celu oznaczenia stężenia IMI i jej metabolitów, LVP i PER zastosowano zmodyfikowaną metodę Kenney i współpr. [103]. Modyfikacja dotyczyła składu fazy ruchomej oraz wyboru użytego standardu wewnętrznego.

Zgodnie z przyjętą metodyką do 1 ml surowicy pacjenta dodawano mianserynę jako IS, 1 ml wody czystości HPLC oraz 200 μ l 2 M roztworu NaOH. Po dodaniu odczynnika ekstrahującego, jakim była mieszanina octanu etylu, heksanu i alkoholu izoamylowego zmieszanych w stosunku 50:49:1 (v/v), próbkę wytrząsano na vorteksie przez 3 minuty, po czym odwirowywano przez 10 minut przy szybkości obrotów rotora 1000 x g. Następnie warstwę organiczną przenoszono do szklanej próbówki i odparowywano do sucha w temperaturze 37°C w atmosferze azotu. Po rozpuszczeniu suchej pozostałości (vortex, 1 minuta) w 100 μ l fazy ruchomej, 50 μ l roztworu наносono na kolumnę chromatograficzną.

W przypadku oznaczania wolnej frakcji badanych związków otrzymany ultrafiltrat dopełniano wodą do 2 ml, a następnie dodawano IS. Dalsza procedura postępowania była analogiczna jak dla surowicy.

Po stwierdzeniu liniowości odpowiedzi detektora w zakresie stężeń od 0 do 400 ng/ml, wykonano krzywe wzorcowe, badając zależność pomiędzy stosunkiem wysokości pików analizowanych związków do wysokości pików IS a stężeniem tych związków. W tym celu do 0.95 ml surowicy nie zawierającej badanych leków dodawano w 50 μ l roztworu znane ilości IMI i jej metabolitów lub LVP czy PER oraz 50 μ l roztworu IS. W tak przygotowanych próbkach stężenia IMI i DMI wynosiły: 10, 50, 100, 200 i 400 ng/ml surowicy, stężenia 2-OH-IMI i 2-OH-DMI: 5, 10, 50, 100 i 200 ng/ml, a stężenia LVP oraz PER odpowiednio: 10, 50, 100, 200 ng/ml oraz 10, 50, 100, 200 i 400 ng/ml. Stężenie IS we wszystkich próbkach było stałe i wynosiło 100 ng/ml surowicy. Dla każdego z badanych stężeń wykonano po 5 oznaczeń według opisanej wcześniej procedury.

Podobne krzywe wzorcowe sporządzano dla wolnej frakcji IMI i jej metabolitów poprzez odpowiednie rozcieńczanie roztworów podstawowych tych związków w buforze fosforanowym o pH=7.4 do uzyskania następujących stężeń: 5, 10, 20, 30 i 50 ng/ml. Stężenie IS

było równe 30 ng/ml. Otrzymane roztwory buforowe leków przesączano a następnie poddawano dalszej analizie. Wykonano po 4 oznaczenia dla każdego z badanych stężeń.

Wydajność ekstrakcji badano porównując wysokości pików znanych ilości badanych związków poddanych ekstrakcji z surowicy i buforu z wysokościami pików uzyskanych po bezpośrednim nastrzyku czystych standardów.

Precyzję metody oznaczania IMI i metabolitów w ciągu dnia i w różnych dniach oszacowano na podstawie analizy próbek surowicy i buforu zawierających badane związki w stężeniu odpowiednio: 10, 50 i 100 ng/ml oraz 5, 10 i 50 ng/ml dla oznaczeń wewnątrzseryjnych i 50 i 100 ng/ml oraz 5 i 50 ng/ml dla oznaczeń międzyseryjnych. Dla LVP i PER precyzję metody w surowicy w tym samym dniu badano dla stężeń: 10, 50 i 100 ng/ml a w różnych dniach dla stężeń: 50 i 100 ng/ml.

3.2.7. Procedura oznaczania CBZ i jej metabolitu

Ze względu na odmienne właściwości fizykochemiczne CBZ i TLPD niemożliwe było równoczesne oznaczenie tych leków w warunkach izokratycznych. Dlatego też, stosując tę samą kolumnę zmodyfikowano skład fazy ruchomej oraz zmieniono procedurę ekstrakcji i przeprowadzono odrębną analizę karbamazepiny i jej epoksydu. W tym celu do 100 µl surowicy lub ultrafiltratu dodawano IS, 1 ml dichlorometanu, a następnie analizowaną próbkę wytrząsano na vorteksie przez 3 minuty. Po odwirowaniu, warstwę organiczną przenoszono do nowej probówki i odparowywano do sucha w temperaturze 37°C w atmosferze azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 100 µl fazy ruchomej i 50 µl roztworu наносzono na kolumnę.

Po sprawdzeniu liniowości odpowiedzi detektora w zakresie badanych stężeń CBZ i CBZE oraz określeniu wydajności ekstrakcji, wykonano krzywe wzorcowe tych związków. Standardy kalibracyjne otrzymano dodając do surowicy kontrolnej i buforu fosforanowego o pH=7.4 roztwory CBZ i CBZE do uzyskania stężeń: 1, 3, 5, i 10 µg/ml dla surowicy i 0.5, 1, 3 i 5 µg/ml dla buforu. Stężenie IS w próbkach surowicy oraz buforu wynosiło odpowiednio 5 oraz 2.5 µg/ml. Dla każdego z badanych stężeń wykonano po 4 oznaczenia

według opisanej powyżej procedury, a uzyskane wyniki przedstawiono w postaci krzywych zależności pomiędzy stosunkiem wysokości pików CBZ i CBZE do wysokości pików IS a stężeniem analizowanych związków.

Precyzję metody określano, podobnie jak w przypadku IMI i jej metabolitów, badaniem powtarzalności w ciągu dnia i w różnych dniach, używając standardów kalibracyjnych o stężeniach 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ dla surowicy oraz 0.5, 1 i 3 $\mu\text{g/ml}$ dla buforu.

3.3. Badanie wiązania IMI i jej metabolitów z białkami osocza w obecności CBZ w warunkach *in vitro*

Wpływ CBZ na wiązanie IMI i jej metabolitów z białkami osocza (HSA i AAG) w warunkach *in vitro* oceniano na podstawie pomiaru stężeń wolnej frakcji IMI i metabolitów przeprowadzonych w obecności i bez dodatku CBZ. Badania wykonano przy stężeniach IMI i jej metabolitów zbliżonych do terapeutycznych oraz przy różnych stężeniach stosowanych białek.

W tym celu sporządzono roztwory HSA o stężeniach: 0.5, 1, 2, 4 i 6 g/100 ml i AAG o stężeniach: 10, 30, 50, 80, 100, 200 mg/100 ml 0.067 M buforu fosforanowego o pH=7.4. Do 1 ml określonego roztworu białka dodawano roztwory buforowe IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI w stężeniach wynoszących odpowiednio: 200, 400, 30 i 50 ng/ml. Do części próbek dodawano ponadto CBZ w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, po czym wszystkie próbki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez około 3 godziny. Następnie próbki te poddawano ultrafiltracji w temperaturze 37°C, a otrzymane przesącze analizowano według podanej wcześniej procedury.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono, w oparciu o metodę Romera [171], stałe wiązania IMI i jej metabolitów, sporządzając wykresy zależności stosunku stężenia leku związanego do stężenia białka jako funkcję stężenia leku związanego. Współczynniki kierunkowe uzyskanych prostych odpowiadały stałym wiązania (K_a) dla IMI i jej metabolitów, wyznaczonym odpowiednio w obecności i bez dodatku CBZ.

4. OBLICZENIA

Krzywe kalibracji opisano stosując równanie regresji liniowej i współczynniki korelacji. Precyzję opisanych metod oszacowano wykorzystując współczynnik zmienności CV wyrażony w procentach a opisany równaniem:

$$CV = \frac{\text{odchylenie standardowe}}{\text{średnia wartość stężenia}} \times 100$$

Ułamek wolnej frakcji leku (f_u) obliczano z równania:

$$f_u = \frac{\text{stężenie leku w ultrafiltracie}}{\text{całkowite stężenie leku w surowicy}} \times 100$$

Stężenie leku związanego z białkiem (c_b) obliczano korzystając z zależności:

$$c_b = c_t - c_u$$

gdzie: c_t - stężenie całkowite,

c_u - stężenie wolnej frakcji leku.

Stałe wiązania (K_a) z HSA i AAG dla IMI i jej metabolitów wyznaczono metodą regresji liniowej w oparciu o następujące równanie:

$$\frac{c_b}{B} = K_a c_{bmax} - K_a c_b$$

gdzie: B - całkowite stężenie białka,

c_{bmax} - stężenie leku związanego przy całkowitym wysyceniu miejsc wiążących.

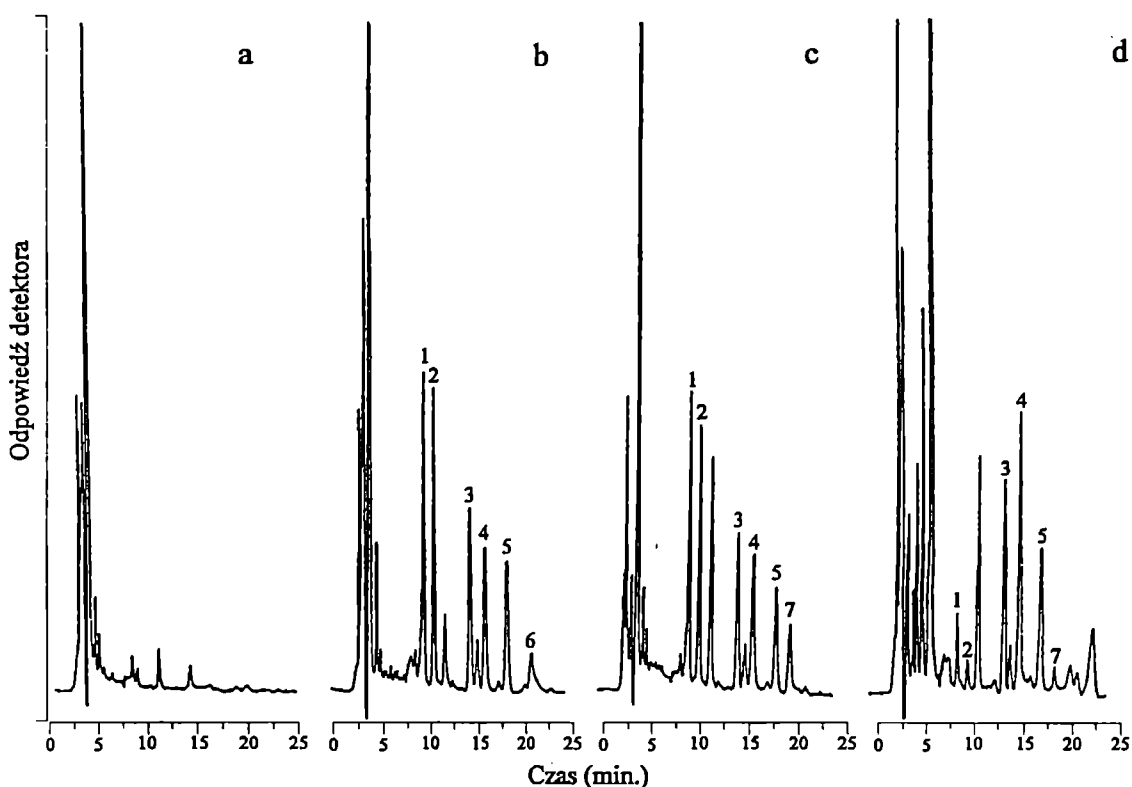
W opracowaniu statystycznym otrzymanych wyników zastosowano metodę regresji liniowej, test t-Studenta oraz analizę wariancji dla klasyfikacji pojedynczej (one-way ANOVA).

Wpływ CBZ na stałe wiązania oceniano za pomocą testu równoległości. W przeprowadzonych analizach statystycznych otrzymanych wyników przyjęto poziom istotności $p = 0.05$.

5. WYNIKI

5.1. Parametry opracowanych metod analitycznych

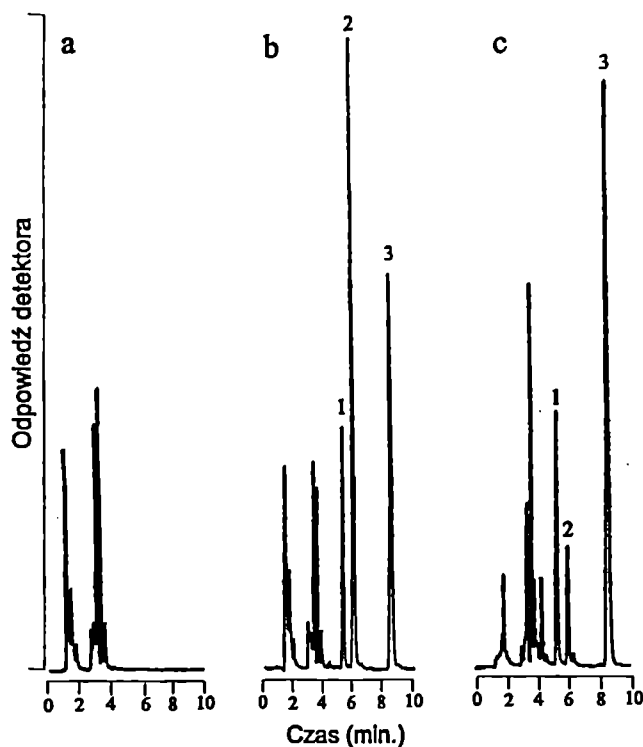
W opracowanych warunkach analizy uzyskano zadawalający rozdział badanych związków i nie stwierdzono interferencji ze składnikami tła biologicznego. Na rycinie 6 przedstawiono przykładowe chromatogramy surowicy kontrolnej, surowicy, do której dodano znane ilości IMI i jej metabolitów oraz PER lub LVP, a także przykładowy chromatogram surowicy pacjenta leczonego IMI i LVP.



Rycina 6. Chromatogramy: (a) - surowicy kontrolnej, (b) surowicy zawierającej IMI i jej metabolity oraz PER w stężeniach 100 ng/ml (c) surowicy zawierającej IMI i jej metabolity oraz LVP w stężeniach 100 ng/ml oraz (d) surowicy pacjenta leczonego IMI w dawce 150 mg/dzień i LVP w dawce 100 mg/dzień.

Piki: 1=2-OH-DMI, 2=2-OH-IMI, 3=IS, 4=DMI, 5=IMI, 6=PER i 7=LVP.

Podobne chromatogramy dla CBZ i jej metabolitu przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 7. Chromatogramy: (a) - surowicy kontrolnej, (b) surowicy zawierającej CBZ i CBZE w stężeniach 5 µg/ml oraz (c) surowicy pacjenta leczonego CBZ w dawce 400 mg/dzień. Piki: 1=IS, 2=CBZE i 3=CBZ.

Czasy retencji wszystkich badanych związków w prowadzonych warunkach analizy przedstawiono odpowiednio w tabelach 6 i 7.

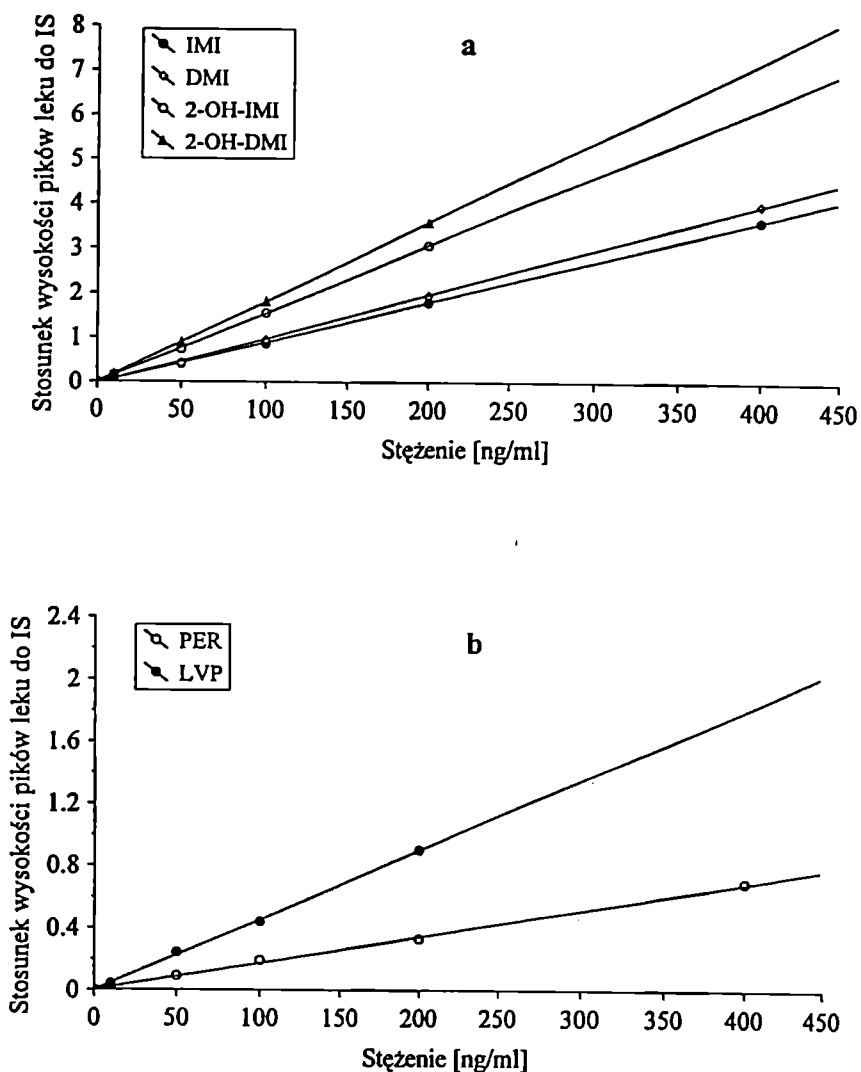
Tabela 6. Czasy retencji IMI i jej metabolitów, LVP, PER oraz standardu wewnętrznego.

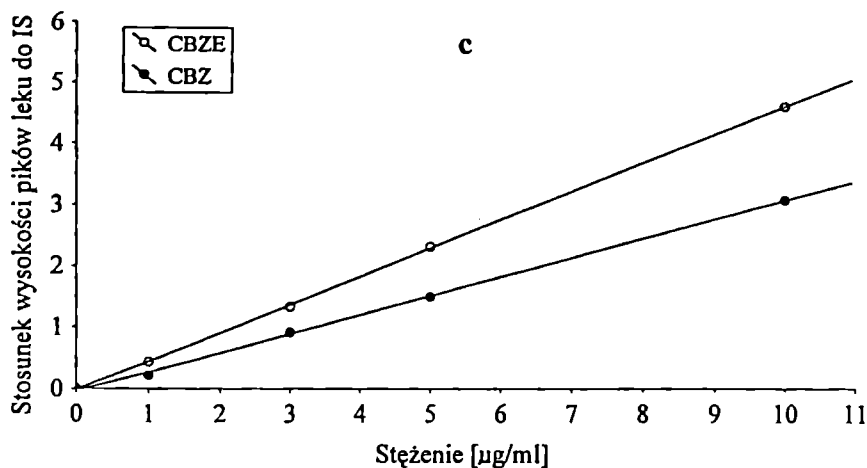
| Związek | Czas retencji |
|-----------------|---------------|
| 2-OH-DMI | 8.02 min. |
| 2-OH-IMI | 9.05 min. |
| IS (mianseryna) | 13.23 min. |
| DMI | 14.52 min. |
| IMI | 16.23 min. |
| LVP | 18.54 min. |
| PER | 19.56 min. |

Tabela 7. Czasy retencji CBZ i jej metabolitu CBZE oraz standardu wewnętrznego.

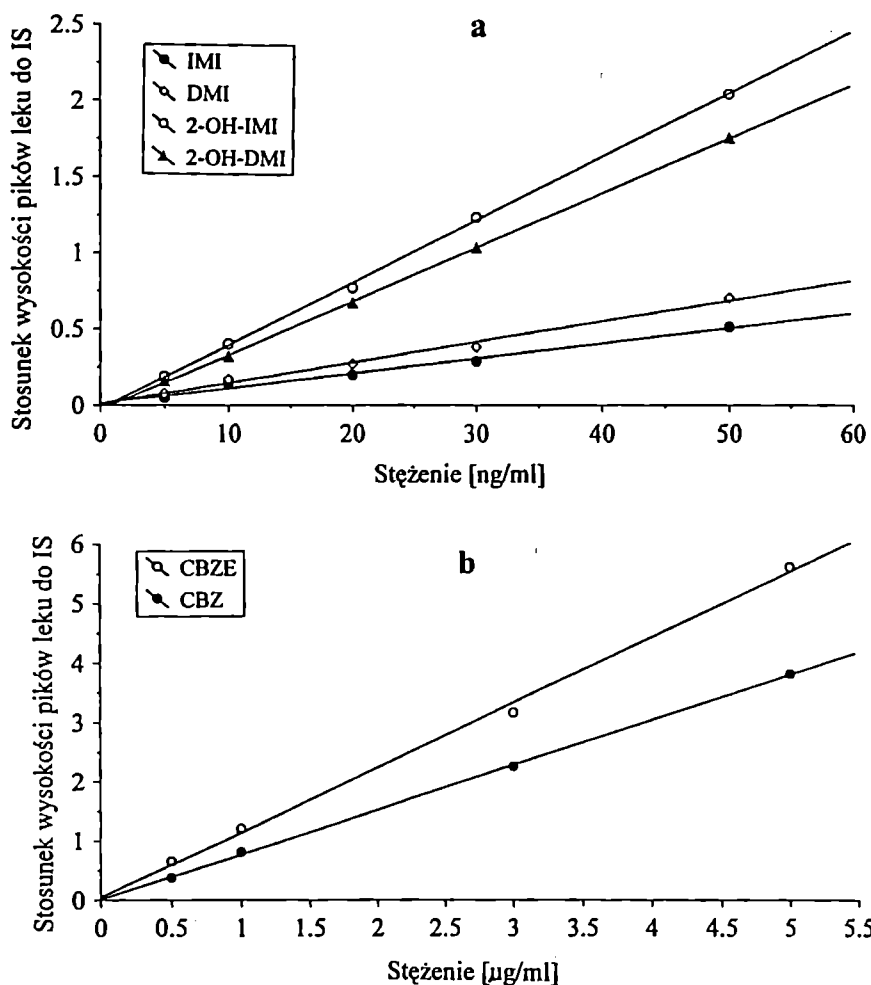
| Związek | Czas retencji |
|-------------------|---------------|
| IS (Butabarbital) | 5.63 min. |
| CBZE | 6.80 min. |
| CBZ | 9.27 min. |

Jak wynika z ryciny 8 i 9, dla wszystkich analizowanych związków oznaczonych odpowiednio w surowicy i buforze, krzywe wzorcowe były liniowe w zakresie badanych stężeń. Współczynniki korelacji (r) dla tych krzywych mieściły się w zakresie od 0.995 do 0.999.





Rycina 8. Krzywe wzorcowe IMI i jej metabolitów (a), LVP i PER (b) oraz CBZ i CBZE (c) sporządzone dla surowicy.



Rycina 9. Krzywe wzorcowe IMI i jej metabolitów (a) oraz CBZ i CBZE (b) sporządzone dla buforu.

Współczynnik zmienności (CV) w badaniach zarówno wewnątrz- jak i międzyseryjnych nie przekraczał 10% dla każdego z badanych leków, zarówno w surowicy jak i w buforze. Opracowane metody charakteryzowały się także zadawalającą wydajnością ekstrakcji i czułością: w przypadku surowicy dla IMI, DMI, LVP i PER czułość metody wynosiła 10 ng/ml, a dla hydroksymetabolitów IMI i DMI - 2 ng/ml. W przypadku ekstrakcji z buforu możliwe było oznaczenie badanych leków już w stężeniu 1 ng/ml.

Dla CBZ i jej epoksydu najmniejsze oznaczone stężenie wynosiło 50 ng/ml i było znacznie większe od limitu detekcji.

W tabelach 8, 9, 10, 11 i 12 przedstawiono wyniki badań wydajności ekstrakcji oraz wewnątrz- i międzyseryjnej precyzji opracowanej metody oznaczania IMI i jej metabolitów w surowicy i buforze, stosowanej odpowiednio do analizy stężeń całkowitych oraz wolnej frakcji tych związków. Ponadto w tabeli 8 oraz 9 zebrano parametry tej metody wyznaczone dla LVP, PER oraz mianseryny stosowanej jako IS.

Tabela 8. Wydajności ekstrakcji z surowicy dla IMI i jej metabolitów, mianseryny (IS) oraz neuroleptyków.

| Związek | Odzysk (%), n=5 | | | $\bar{x} \pm SD$ |
|-----------------|-----------------|------------|------------|------------------|
| | 10 ng/ml | 50 ng/ml | 100 ng/ml | |
| IMI | 80.13±3.65 | 79.62±2.80 | 90.04±7.32 | 83.26±5.87 |
| DMI | 76.32±2.11 | 78.18±5.24 | 90.35±9.80 | 81.62±7.62 |
| 2-OH-IMI | 70.82±3.78 | 76.30±6.20 | 88.02±7.56 | 78.38±8.79 |
| 2-OH-DMI | 68.95±2.60 | 85.17±5.49 | 86.25±8.60 | 80.12±9.69 |
| IS (mianseryna) | 85.31±4.34 | 82.38±3.44 | 87.65±5.27 | 85.11±4.45 |
| LVP | 77.56±6.43 | 80.34±4.70 | 76.87±3.83 | 78.26±4.70 |
| PER | 85.67±3.92 | 82.45±6.73 | 84.89±6.04 | 84.34±5.14 |

Tabela 9. Wewnątrz- i międzyseryjna precyzja metody oznaczania IMI i jej metabolitów oraz neuroleptyków w surowicy.

| Związek | CV (%), n=5 | | | | |
|----------|----------------------------|----------|-----------|--------------------------|-----------|
| | Oznaczenia wewnątrzseryjne | | | Oznaczenia międzyseryjne | |
| | 10 ng/ml | 50 ng/ml | 100 ng/ml | 50 ng/ml | 100 ng/ml |
| IMI | 5.08 | 6.23 | 4.80 | 6.77 | 3.32 |
| DMI | 8.70 | 5.30 | 3.70 | 5.70 | 5.60 |
| 2-OH-IMI | 7.12 | 7.65 | 6.20 | 8.22 | 4.90 |
| 2-OH-DMI | 1.87 | 3.70 | 7.49 | 4.08 | 7.99 |
| LVP | 8.21 | 4.35 | 3.87 | 7.92 | 5.29 |
| PER | 6.45 | 5.67 | 7.27 | 5.71 | 6.33 |

Tabela 10. Powtarzalność procesu ultrafiltracji surowicy zawierającej IMI i jej metabolity.

| Stężenie (ng/ml) | CV (%), n=4 | | | |
|---------------------|-------------|------|----------|---------|
| | IMI | DMI | 2-OH-IMI | 2-OHDMI |
| 100 | 9.55 | 5.70 | 4.29 | 3.81 |
| 200 | 4.58 | 3.22 | 3.64 | 2.56 |

Tabela 11. Wydajności ekstrakcji IMI i jej metabolitów z buforu.

| Związek | Odzysk (%), n=4 | | | |
|----------|-----------------|------------|------------|------------------|
| | 5 ng/ml | 10 ng/ml | 50 ng/ml | $\bar{x} \pm SD$ |
| IMI | 85.45±3.45 | 87.34±2.02 | 83.11±2.60 | 85.30±3.08 |
| DMI | 80.55±2.21 | 81.41±1.13 | 78.34±6.24 | 80.10±3.76 |
| 2-OH-IMI | 79.79±6.74 | 84.68±4.07 | 86.22±3.51 | 83.56±5.33 |
| 2-OH-DMI | 83.65±6.44 | 80.56±1.58 | 81.88±4.99 | 82.03±4.54 |

Tabela 12. Precyzja oznaczania IMI i jej metabolitów w buforze po przesączeniu.

| Związek | CV (%), n=5 | | | | |
|----------|----------------------------|----------|----------|--------------------------|----------|
| | Oznaczenia wewnątrzseryjne | | | Oznaczenia międzyseryjne | |
| | 5 ng/ml | 10 ng/ml | 50 ng/ml | 5 ng/ml | 50 ng/ml |
| IMI | 8.78 | 7.66 | 4.51 | 9.24 | 3.22 |
| DMI | 7.67 | 5.42 | 3.88 | 6.78 | 5.79 |
| 2-OH-IMI | 5.99 | 6.31 | 5.12 | 4.32 | 3.77 |
| 2-OH-DMI | 4.89 | 5.23 | 6.78 | 6.11 | 7.04 |

Podobne parametry określające wydajność i precyzję oznaczania CBZ i jej metabolitu w surowicy i buforze zebrano w tabelach 13, 14, 15 i 16.

Tabela 13. Wydajności ekstrakcji z surowicy dla CBZ i CBZE.

| Związek | Odzysk (%), n=4 | | | |
|---------|-----------------|------------|------------|------------------|
| | 1 µg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml | $\bar{x} \pm SD$ |
| CBZ | 90.28±1.21 | 93.54±6.71 | 86.80±3.42 | 90.21±3.37 |
| CBZE | 92.72±1.76 | 94.34±6.58 | 86.90±4.21 | 91.32±3.91 |

Tabela 14. Wydajności ekstrakcji z buforu dla CBZ i CBZE.

| Związek | Odzysk (%), n=4 | | | |
|---------|-----------------|------------|------------|------------------|
| | 0.5 µg/ml | 1 µg/ml | 3 µg/ml | $\bar{x} \pm SD$ |
| CBZ | 91.52±1.45 | 89.30±2.33 | 86.43±2.10 | 89.08±2.83 |
| CBZE | 90.60±2.05 | 88.42±3.03 | 87.86±3.46 | 88.96±2.90 |

Tabela 15. Wewnątrz- i międzyseryjna precyzja metody oznaczania CBZ i CBZE w surowicy.

| Związek | CV (%), n=4 | | | | | |
|---------|----------------------------|---------|----------|--------------------------|---------|----------|
| | Oznaczenia wewnątrzseryjne | | | Oznaczenia międzyseryjne | | |
| | 1 µg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml | 1 µg/ml | 5 µg/ml | 10 µg/ml |
| CBZ | 4.66 | 2.03 | 2.15 | 3.76 | 2.78 | 2.67 |
| CBZE | 4.26 | 2.67 | 1.80 | 5.32 | 3.67 | 3.11 |

Tabela 16. Wewnątrz- i międzyseryjna precyzja metody oznaczania CBZ i CBZE w buforze.

| Związek | CV (%), n=4 | | | | | |
|---------|----------------------------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| | Oznaczenia wewnątrzseryjne | | | Oznaczenia międzyseryjne | | |
| | 0.5 µg/ml | 1 µg/ml | 3 µg/ml | 0.5 µg/ml | 1 µg/ml | 3 µg/ml |
| CBZ | 3.24 | 3.51 | 2.00 | 4.56 | 4.31 | 3.07 |
| CBZE | 4.11 | 2.90 | 4.02 | 4.99 | 3.45 | 2.89 |

W badaniach dotyczących wiązania analizowanych związków z membraną i innymi elementami mikroseparatora nie stwierdzono adsorpcji CBZ i CBZE na tych elementach. Zjawisko to wystąpiło w przypadku IMI i DMI (w około 30%) oraz w znacznie mniejszym stopniu, bo w około 10% w przypadku ich hydroksymetabolitów i było niezależne od stężenia w zakresie od 5 do 50 ng/ml.

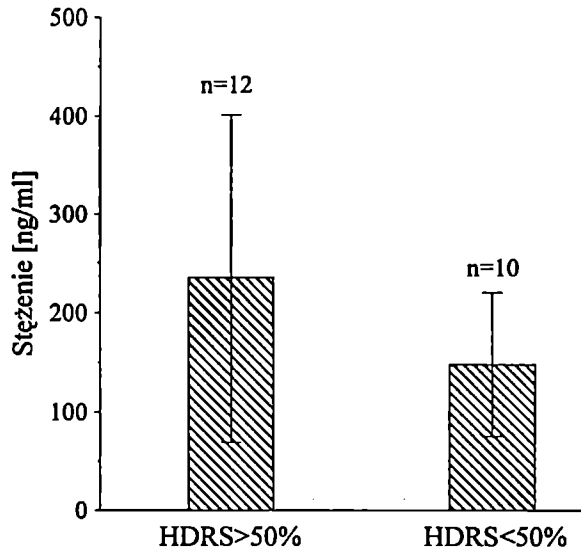
5.2. Stężenia IMI+DMI oznaczone metodą FPIA w grupie chorych leczonych IMI a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych

U 26 spośród badanych chorych leczonych IMI w dawce 3 mg/kg/dzień stężenia IMI i DMI oznaczono sumarycznie, stosując metodę FPIA. Wyniki tych oznaczeń oraz ocenę stanu klinicznego chorych zebrano w tabeli 17. U 12 chorych tej grupy po upływie pierwszych

Tabela 17. Dane demograficzne i kliniczne oraz stężenia IMI+DMI oznaczone metodą FPIA u pacjentów leczonych IMI w monoterapii.

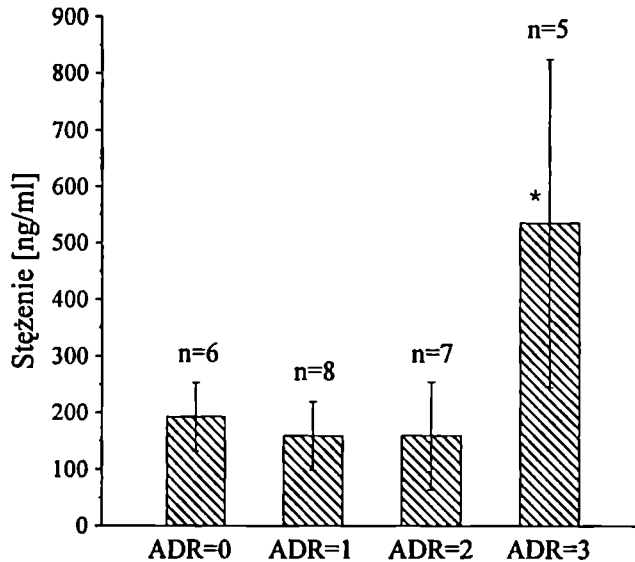
| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Masa ciała (kg) | Stężenie IMI (ng/ml) | Nasilenie ADR | HDRS ₁ | HDRS ₂ | Obniżenie HDRS (%) |
|---------|------|-------------|-----------------|----------------------|---------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| J.K. | K | 42 | 72 | 266.4 | 0 | 31 | 13 | 58.1 |
| J.A. | M | 37 | 125 | 193.3 | 0 | 36 | 19 | 47.2 |
| L.M. | K | 29 | 59 | 247.0 | 0 | 32 | 11 | 50.0 |
| A.Ś. | K | 44 | 65 | 85.3 | 0 | 25 | 8 | 68.0 |
| F.A. | K | 48 | 68 | 217.0 | 0 | 31 | 16 | 48.4 |
| M.G. | K | 34 | 61 | 185.9 | 0 | 31 | 14 | 54.8 |
| Z.W. | M | 50 | 72 | 154.0 | 1 | 30 | 17 | 43.3 |
| M.S. | K | 40 | 69 | 74.8 | 1 | 30 | 18 | 40.0 |
| J.F. | M | 35 | 73 | 261.9 | 1 | 31 | 13 | 58.1 |
| S.Ż. | M | 43 | 75 | 161.7 | 1 | 30 | 11 | 63.3 |
| A.H. | M | 37 | 82 | 110.3 | 1 | 41 | 17 | 58.5 |
| M.B. | K | 40 | 52 | 193.2 | 1 | 29 | 19 | 34.5 |
| R.B. | M | 43 | 85 | 111.2 | 1 | 43 | 16 | 62.8 |
| R.W. | M | 41 | 98 | 202.0 | 1 | 33 | 20 | 39.4 |
| H.M. | M | 61 | 72 | 284.0 | 2 | 35 | 11 | 68.6 |
| A.F. | M | 39 | 80 | 161.0 | 2 | 34 | 11 | 67.7 |
| H.S. | K | 37 | 51 | 52.8 | 2 | 32 | 20 | 37.5 |
| M.W. | K | 38 | 62 | 94.7 | 2 | 32 | 19 | 40.6 |
| M.K. | M | 43 | 66 | 51.4 | 2 | 32 | 18 | 43.8 |
| T.S. | M | 42 | 72 | 242.9 | 2 | 39 | 23 | 41.0 |
| J.P. | K | 39 | 63 | 228.5 | 2 | 31 | 5 | 83.9 |
| J.F. | K | 37 | 71 | 716.9 | 3 | 29 | 13 | 55.2 |
| J.B. | M | 45 | 76 | 211.0 | 3 | 43 | 46 | brak |
| A.K. | K | 46 | 51 | 930.0 | 3 | 33 | 36 | efektu |
| K.G. | K | 41 | 59 | 475.0 | 3 | 39 | 40 | terapeu- |
| A.M. | M | 35 | 80 | 341.0 | 3 | 33 | 40 | tycznego |

trzech tygodni leczenia poprawa w skali HDRS była większa od 50% (rycina 10). Średnie wartości stężeń IMI+DMI zmierzone u tych chorych leżały w zakresie terapeutycznym i były wyższe w stosunku do stężeń obserwowanych u 10 chorych, u których obniżenie punktów



Rycina 10. Rozkład średnich stężeń stacjonarnych IMI+DMI oznaczonych metodą FPIA w grupie chorych z depresją endogenną w odniesieniu do uzyskanego efektu terapeutycznego.

w HDRS było mniejsze od 50%, a stężenia leżały w dolnej granicy wartości terapeutycznych lub poniżej. Średnie wartości tych stężeń wynosiły odpowiednio 235.01 ± 165.99 oraz 147.58 ± 72.56 ng/ml. Z uwagi jednak na duży ich rozrzut, obserwowane różnice nie były istotne statystycznie ($p > 0.05$). Na uwagę zasługuje 4 pozostałych chorych tej grupy (J.B., A.K., K.G., A.M.), u których pomimo bardzo wysokich stężeń, znacznie przekraczających zakres terapeutyczny nie uzyskano zadawalającego efektu klinicznego, co kwalifikuje tych chorych do grupy opornych na leczenie TLPD. Jak wynika z ryciny 11, obserwowane efekty niepożądane u tych chorych miały charakter poważny (ADR=3). Natomiast u chorych, u których objawy niepożądane miały charakter łagodny (ADR=1) lub umiarkowany (ADR=2) wartości stężeń IMI+DMI były podobne jak w grupie chorych bez tych objawów.



* $p < 0.05$ (one-way ANOVA)

Rycina 11. Rozkład średnich stężeń stacjonarnych IMI+DMI oznaczonych metodą FPIA w grupie 26 chorych z depresją endogenną w zależności od nasilenia objawów niepożądanych.

5.3. Stężenia całkowite i wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oznaczone metodą HPLC

U 40 badanych chorych oznaczono stężenia całkowite i wolnej frakcji IMI i jej trzech aktywnych metabolitów stosując do tego celu metodę HPLC. Wyniki tych oznaczeń jako zbiorcze udokumentowanie badań zebrano łącznie w tabeli 18.

Tabela 18. Stężenia całkowite (c_t) i wolnej frakcji (c_u) IMI i jej metabolitów (w ng/ml) oznaczone metodą HPLC w surowicy badanych chorych.

| Pacjent | IMI _t | IMI _u | f _u (%) | DMI _t | DMI _u | f _u (%) | 2OH- IMI _t | 2OH- IMI _u | f _u (%) | 2OH- DMI _t | 2OH- DMI _u | f _u (%) |
|---------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| E.K. | 67.7 | 9.1 | 13.4 | 335.0 | 80.4 | 24.0 | 7.4 | 1.6 | 21.6 | 73.5 | 29.1 | 39.6 |
| G.R. | 99.0 | 9.1 | 9.2 | 54.8 | 9.8 | 17.9 | 28.4 | 4.0 | 14.1 | 34.2 | 14.6 | 42.7 |
| H.B. | 62.5 | 6.8 | 10.9 | 251.9 | 24.4 | 9.7 | 11.1 | 1.3 | 11.7 | 60.8 | 13.1 | 21.6 |
| L.K. | 205.7 | 18.2 | 8.9 | 173.4 | 24.4 | 14.1 | 13.6 | 1.9 | 14.0 | 39.3 | 13.5 | 34.4 |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|------|
| G.W. | 88.5 | 6.1 | 6.9 | 146.0 | 19.5 | 13.4 | 22.2 | 4.0 | 18.0 | 63.4 | 17.9 | 28.2 |
| E.Kw. | 231.8 | 17.7 | 7.6 | 209.9 | 50.8 | 24.2 | 2.5 | 1.3 | 52.0 | 3.8 | 1.4 | 36.8 |
| D.O. | 112.0 | 12.2 | 10.9 | 191.7 | 29.2 | 15.2 | 7.4 | 2.4 | 32.4 | 33.0 | 10.1 | 30.6 |
| J.K. | 167.8 | - | - | 415.0 | 45.5 | 11.0 | 5.0 | - | - | 37.2 | 5.2 | 14.0 |
| K.M. | 131.1 | 5.9 | 4.5 | 38.3 | 6.2 | 16.2 | 43.3 | 10.2 | 23.6 | 20.6 | 5.9 | 28.6 |
| M.S. | 44.4 | - | - | 100.0 | 20.0 | 20.0 | 7.2 | 2.4 | 33.3 | 43.3 | 14.7 | 34.0 |
| M.K. | 88.6 | 8.1 | 9.1 | 43.8 | 8.1 | 18.5 | 14.8 | 3.7 | 25.0 | 16.5 | 4.5 | 27.3 |
| J.Kr. | 151.0 | - | - | 386.7 | 50.8 | 13.1 | 14.4 | 1.9 | 13.2 | 83.3 | 18.3 | 22.0 |
| J.M. | 344.1 | 13.5 | 3.9 | 464.5 | 70.4 | 15.2 | 8.3 | 3.1 | 37.3 | 22.2 | 5.8 | 26.1 |
| S.P. | 124.3 | 7.9 | 6.4 | 253.1 | 52.5 | 20.7 | 13.3 | 2.2 | 16.5 | n.o. | 27.9 | n.o. |
| A.H. | 40.0 | 1.7 | 4.3 | 126.5 | 22.6 | 17.9 | 2.2 | - | - | 14.4 | 5.1 | 35.4 |
| C.T. | 97.8 | 10.6 | 10.8 | 371.3 | 32.3 | 8.7 | 4.4 | 1.2 | 27.3 | 16.7 | 3.8 | 22.8 |
| E.G. | 159.8 | 6.5 | 4.1 | 283.1 | 37.0 | 13.1 | 10.0 | 1.8 | 18.0 | 53.3 | 9.0 | 16.9 |
| Z.W. | 62.2 | 8.9 | 14.3 | 234.8 | 22.1 | 9.4 | 5.6 | 2.0 | 35.7 | 47.7 | 12.9 | 27.0 |
| T.K. | 148.8 | 6.8 | 4.6 | 293.3 | 68.6 | 23.4 | 7.2 | 1.4 | 19.4 | 37.8 | 9.0 | 23.8 |
| H.D. | 348.5 | 11.3 | 3.2 | 154.9 | 17.7 | 11.4 | 15.5 | 3.4 | 21.9 | 43.3 | 4.1 | 9.5 |
| M.W. | 124.3 | 5.0 | 4.0 | 243.2 | 18.1 | 7.4 | 6.7 | 2.3 | 34.3 | 19.4 | 5.9 | 30.4 |
| J.P. | 126.5 | 4.3 | 3.4 | 116.6 | 21.1 | 18.1 | 8.3 | 5.5 | 66.3 | 73.3 | 9.4 | 12.8 |
| B.O. | 66.6 | 8.9 | 13.4 | 89.9 | 8.1 | 9.0 | 13.3 | 2.6 | 19.6 | 48.3 | 13.2 | 27.3 |
| G.L. | 135.4 | 7.3 | 5.4 | 306.4 | 15.2 | 5.0 | 7.8 | 2.0 | 25.6 | 36.1 | 6.9 | 19.1 |
| M.Z. | 40.0 | - | - | 189.8 | 28.1 | 14.8 | 1.7 | - | - | 17.2 | 5.3 | 30.8 |
| K.Sk. | 270.8 | 5.9 | 2.2 | 306.4 | 29.2 | 9.5 | 15.0 | - | - | 6.7 | 1.2 | 17.9 |
| S.M. | 125.4 | 3.0 | 2.4 | 311.4 | 16.2 | 5.2 | 3.9 | 2.2 | 56.4 | 7.2 | 1.7 | 23.6 |
| W.S. | 377.8 | 9.7 | 2.6 | 391.7 | 51.2 | 13.1 | 28.3 | 2.3 | 8.1 | 110.0 | 13.5 | 12.3 |
| Z.B. | 73.3 | - | - | 448.3 | 59.7 | 13.3 | - | - | - | 27.2 | 4.9 | 18.0 |
| E.Ko. | 48.8 | 4.3 | 8.8 | 111.6 | 9.0 | 8.1 | 5.0 | 1.2 | 24.0 | 16.7 | 3.3 | 19.8 |
| J.N. | 268.6 | 6.9 | 2.6 | 321.4 | 24.2 | 7.5 | 4.0 | 1.0 | 25.0 | 9.0 | 1.5 | 16.7 |
| E.Kł. | 102.1 | - | - | 276.4 | 21.3 | 7.7 | 3.3 | 1.3 | 39.4 | 11.7 | 2.3 | 19.7 |
| K.S. | 321.9 | 4.5 | 1.4 | 494.5 | 54.0 | 10.9 | 18.3 | 2.8 | 15.3 | 66.1 | 13.4 | 20.3 |

| | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------|------|------|-------|-------|------|------|-----|------|------|------|------|
| U.D. | 142.1 | 4.3 | 3.0 | 218.1 | 24.4 | 11.2 | 34.4 | 2.1 | 6.1 | 3.9 | 1.0 | 25.6 |
| H.L. | 192.0 | 11.9 | 6.2 | 587.8 | 43.6 | 7.4 | 3.9 | 1.0 | 25.6 | 6.7 | 1.2 | 17.9 |
| W.Z. | 146.5 | 4.3 | 2.9 | 93.2 | 7.1 | 7.6 | 21.1 | 5.1 | 24.2 | 31.1 | 9.2 | 29.6 |
| W.K. | 187.6 | 6.8 | 3.6 | 467.9 | 68.4 | 14.6 | 7.2 | 2.2 | 30.6 | 15.5 | 5.8 | 37.3 |
| W.Sz. | 63.3 | - | - | 58.3 | 3.1 | 5.3 | 12.2 | 3.3 | 27.1 | 22.2 | 6.3 | 28.4 |
| E.B. | 86.6 | 8.9 | 10.3 | 193.1 | 16.2 | 8.4 | 3.9 | - | - | 15.5 | 3.5 | 22.6 |
| J.C. | 184.3 | 4.3 | 2.3 | 158.2 | 17.2 | 10.9 | 22.8 | 2.6 | 11.4 | 33.3 | 7.1 | 21.3 |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | |
| W.S. ^c | 136.7 | 11.6 | 8.5 | 123.3 | 27.2 | 22.1 | 19.4 | 3.1 | 16.0 | 51.7 | 10.2 | 19.7 |
| Z.B. ^c | 71.0 | - | - | 383.3 | 59.6 | 15.6 | - | - | - | 21.1 | 5.7 | 27.0 |
| E.Ko. ^c | 72.2 | 3.7 | 5.1 | 186.5 | 35.3 | 18.9 | 5.0 | 1.6 | 32.0 | 22.2 | 8.4 | 37.8 |
| J.N. ^c | 126.5 | 4.0 | 3.2 | 223.1 | 19.9 | 8.9 | 5.0 | 1.7 | 34.0 | 6.7 | 2.6 | 38.8 |
| E.Kł. ^c | 78.8 | 2.8 | 3.6 | 118.1 | 9.8 | 8.3 | 7.2 | 1.7 | 23.6 | 23.9 | 5.3 | 22.2 |
| K.S. ^c | 204.2 | 15.5 | 7.6 | 379.6 | 39.3 | 10.4 | 13.9 | 5.9 | 42.5 | 58.3 | 13.1 | 22.5 |
| U.D. ^c | 66.6 | 2.2 | 3.3 | 256.4 | 33.2 | 13.0 | 6.1 | - | - | 11.1 | 1.5 | 13.5 |
| H.L. ^c | 139.9 | 8.9 | 6.4 | 536.1 | 47.5 | 8.9 | 4.4 | 1.3 | 29.6 | 13.3 | 2.6 | 19.6 |
| W.Z. ^c | 105.5 | 8.9 | 8.4 | 83.1 | 6.4 | 7.7 | 25.0 | 7.8 | 31.2 | 55.5 | 8.3 | 15.0 |
| W.K. ^c | 92.1 | 7.4 | 8.0 | 371.3 | 31.4 | 8.5 | 7.2 | 2.2 | 30.6 | 23.9 | 5.8 | 24.3 |
| W.Sz. ^c | 40.0 | - | - | 36.6 | 3.1 | 8.5 | 15.5 | 3.3 | 21.3 | 15.5 | 5.0 | 32.3 |
| E.B. ^c | 73.3 | 8.9 | 12.1 | 86.6 | 10.23 | 11.8 | 7.8 | 1.2 | 15.4 | 14.4 | 3.5 | 24.3 |
| J.C. ^c | 68.8 | 5.9 | 8.6 | 100.0 | 10.2 | 10.2 | 10.0 | 1.3 | 13.0 | 28.9 | 7.1 | 24.6 |

^c po włączeniu CBZ

Z uwagi na różny sposób leczenia (monoterapia, leczenie skojarzone) w badanej grupie chorych wyróżniono następujące podgrupy:

- grupa chorych leczonych IMI w monoterapii,
- grupa chorych leczonych IMI+LVP,
- grupa chorych leczonych IMI+PER,
- grupa chorych leczonych IMI+CBZ.

W wymienionych podgrupach podjęto próbę analizy oznaczonych stężeń całkowitych oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w odniesieniu do obserwowanych efektów terapeutycznych oraz działań niepożądanych.

5.4. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie chorych leczonych IMI w monoterapii a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych

W tabeli 19 przedstawiono szczegółową charakterystykę 11 chorych leczonych tylko

Tabela 19. Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych leczonych IMI w monoterapii (grupa kontrolna).

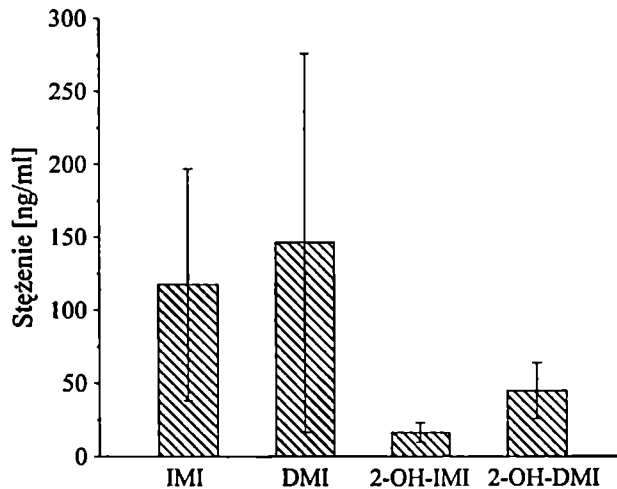
| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Masa ciała (kg) | Dawkowanie IMI (mg) | HDRS ₁ ^a | HDRS ₂ ^b | Obniżenie HDRS (%) |
|---------|------|-------------|-----------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| G.R. | K | 43 | 77.0 | 100-0-100 | 37 | 11 | 70.3 |
| H.B. | K | 48 | 65.0 | 100-0-100 | 33 | 20 | 39.4 |
| G.W. | M | 35 | 77.0 | 75-0-75 | 35 | 15 | 57.1 |
| M.S. | K | 46 | 65.0 | 100-0-100 | 46 | 32 | 30.4 |
| M.K. | M | 26 | 63.5 | 50-0-50 | 29 | 17 | 41.4 |
| W.Z. | M | 47 | 78.5 | 100-0-100 | 32 | 12 | 62.5 |
| W.Sz. | M | 51 | 85.5 | 75-0-75 | 29 | 20 | 31.0 |
| K.S. | K | 43 | 86.5 | 125-0-125 | 29 | 22 | 24.1 |
| J.P. | K | 40 | 63.0 | 100-0-100 | 31 | 12 | 61.3 |
| B.O. | K | 34 | 62.0 | 75-50-75 | 29 | 13 | 55.2 |
| J.C. | K | 46 | 60.0 | 75-0-75 | 39 | 20 | 48.7 |

^a przed rozpoczęciem terapii

^b w 22-gim dniu leczenia

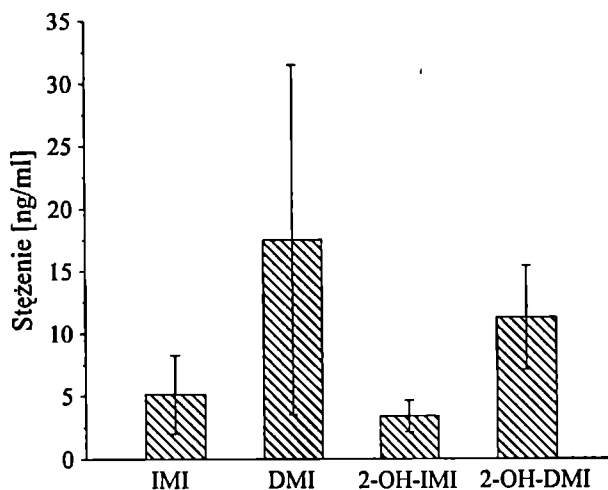
IMI oraz ocenę ich stanu klinicznego wyrażoną stopniem nasilenia depresji w skali HDRS wykonaną przed rozpoczęciem oraz w 22-gim dniu leczenia. Pacjenci ci stanowili grupę kontrolną dla pozostałych chorych poddanych leczeniu kombinowanemu (IMI+LVP lub IMI+PER). Jak wynika z tabeli 19, średni wiek w tej grupie chorych wynosił 41.73 ± 7.40 lat,

średnia masa ciała 71.18 ± 9.86 kg, natomiast średnie obniżenie punktów w skali HDRS po 22 dniach leczenia wynosiło $47.41 \pm 15.16\%$ w stosunku do wartości wyjściowych (HDRS_1). Oznaczone stężenia całkowite w tej grupie chorych wykazały 7-, 11-, 4- i 4.5-krotne różnicowanie odpowiednio dla IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI i wynosiły (rycina 12)



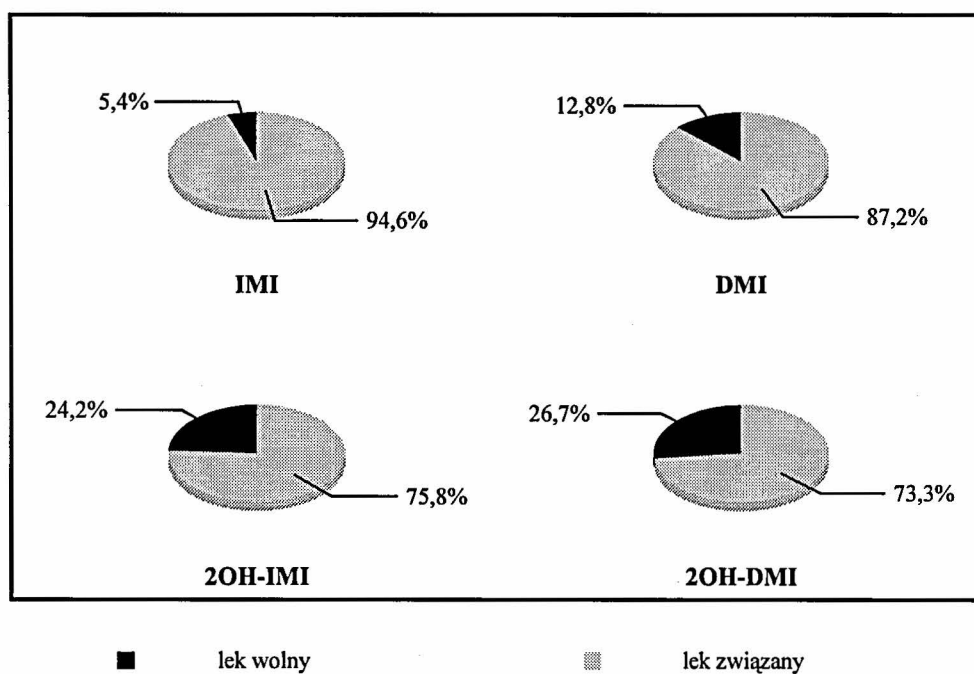
Rycina 12. Rozkład średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów w stanie stacjonarym w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii (grupa kontrolna).

odpowiednio: 117.46 ± 79.42 , 146.11 ± 129.69 , 16.34 ± 6.73 i 44.77 ± 19.04 ng/ml. Średnie stężenia wolnej frakcji w tej grupie chorych (rycina 13) także były osobniczo



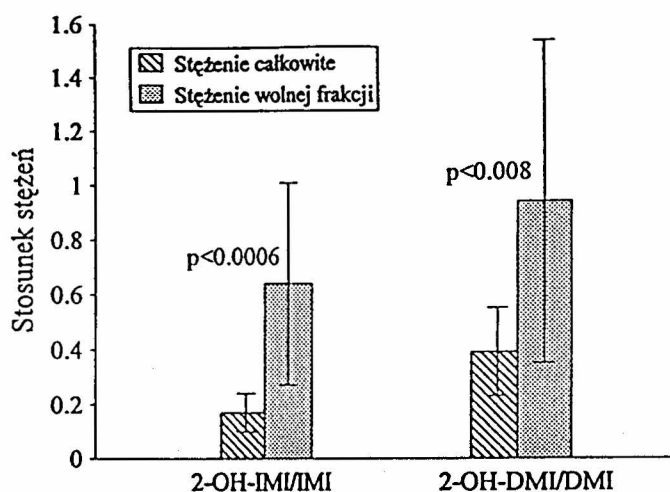
Rycina 13. Rozkład średnich stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w stanie stacjonarym, w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii (grupa kontrolna).

zróżnicowane i wynosiły: 5.13 ± 3.13 , 17.49 ± 13.98 , 3.39 ± 1.23 oraz 11.22 ± 4.17 ng/ml odpowiednio dla IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI. Jak wynika z obydwu rycin, metabolitem dominującym i to zarówno w przypadku stężeń całkowitych jak i wolnej frakcji była DMI, osiągając w obydwu przypadkach wyższe wartości niż lek macierzysty i pozostałe metabolity. Na uwagę zasługuje niższa wartość stężenia wolnej frakcji IMI w stosunku do stężenia wolnej frakcji nie tylko DMI, ale także hydroksylowej pochodnej 2-OH-DMI. Ułamek wolnej frakcji badanych związków w tej populacji chorych, jak przedstawiono na rycinie 14, zwiększał się



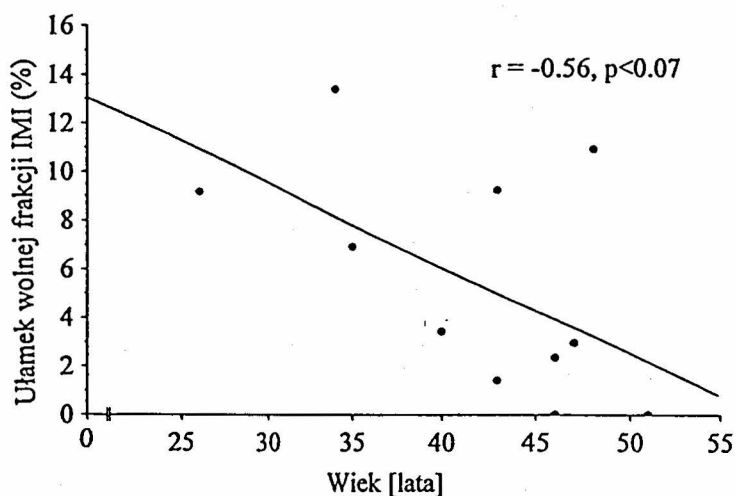
Rycina 14. Ułamek wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii.

wraz z polarnością badanych związków i był największy dla najbardziej polarnego metabolitu czyli 2-OH-DMI. W wyniku tego wartości stosunków stężeń wolnej frakcji hydroksymetabolitów do ich związków macierzystych były istotnie wyższe w porównaniu z wartościami tych stosunków wyznaczonymi dla stężeń całkowitych (rycina 15).



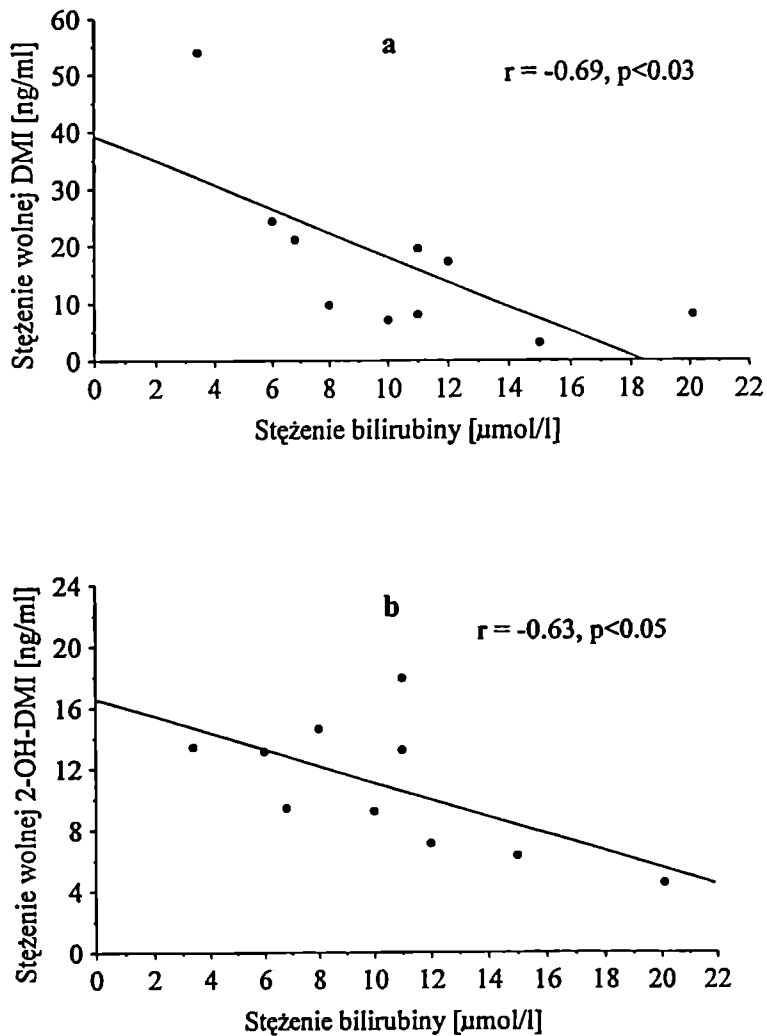
Rycina 15. Stosunki stężeń całkowitych i wolnej frakcji hydroksymetabolitów IMI i DMI do ich leków macierzystych w grupie pacjentów leczonych IMI w monoterapii.

Ułamek wolnej frakcji IMI malał wraz z wiekiem badanych chorych, ale obserwowana zależność nie była istotna statystycznie (rycina 16). Istotną statystycznie liniową zależność



Rycina 16. Zależność pomiędzy ułamkiem wolnej frakcji IMI w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii a wiekiem tych chorych.

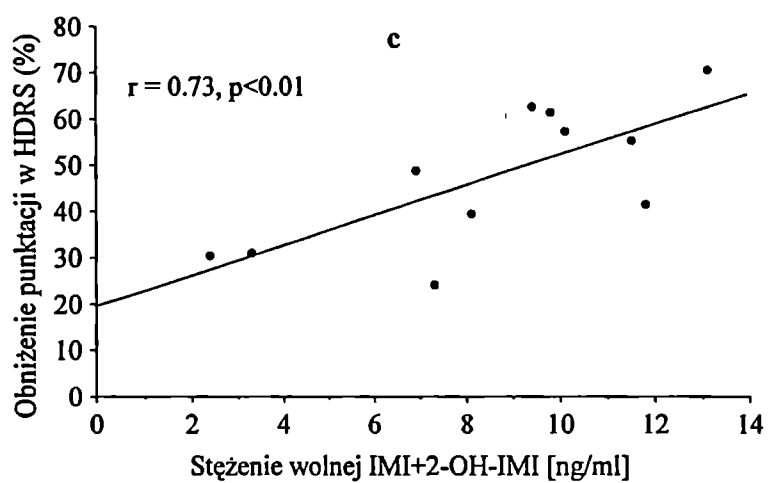
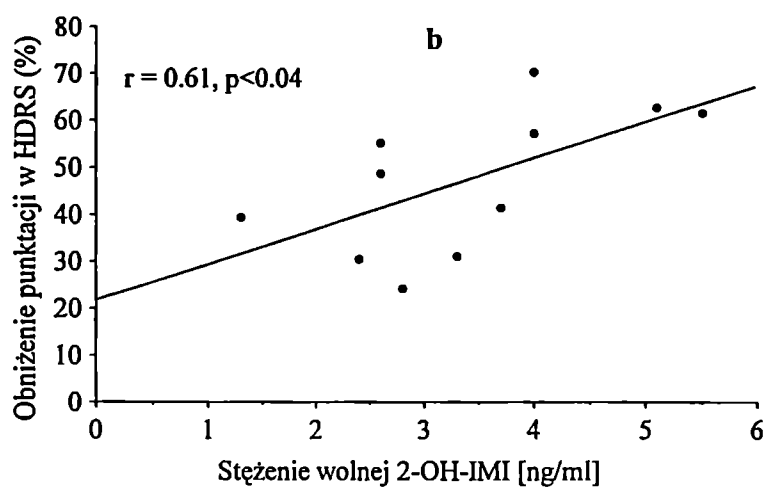
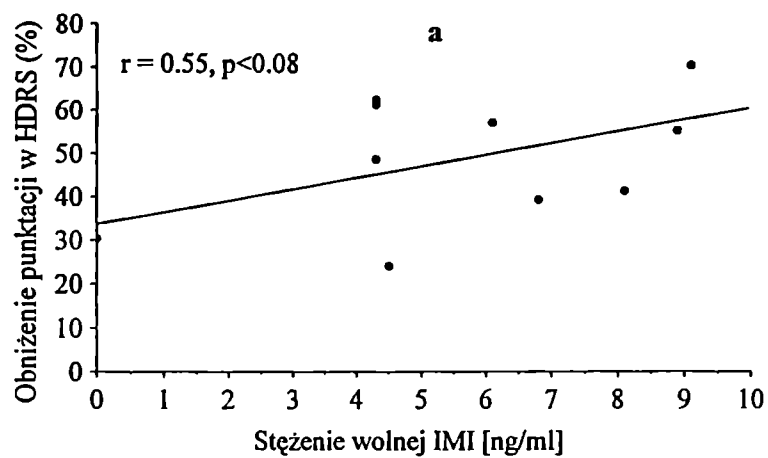
zaobserwowano natomiast pomiędzy stężeniem wolnej frakcji DMI oraz 2-OH-DMI a stężeniem bilirubiny oznaczonym w surowicy badanych chorych (rycina 17). Podobnej



Rycina 17. Zależność pomiędzy stężeniem wolnej frakcji DMI (a) i jej hydroksymetabolitu (b) a stężeniem bilirubiny oznaczonym w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii.

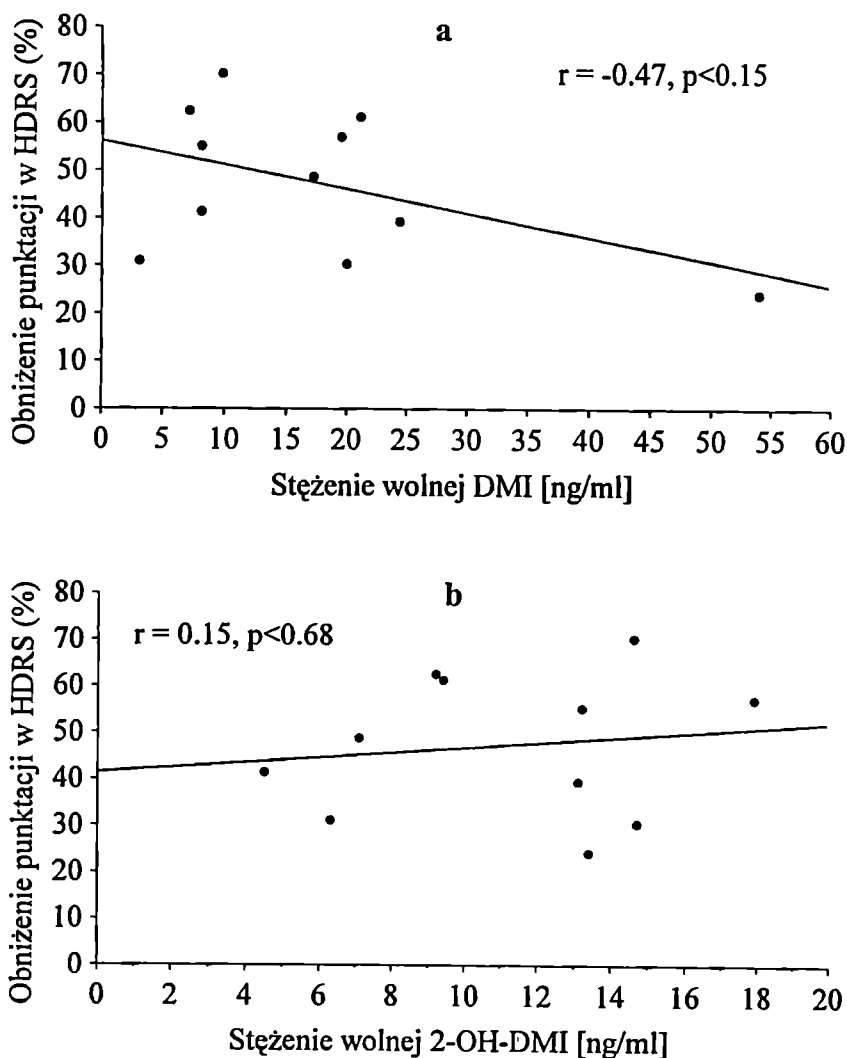
zależności nie stwierdzono zarówno dla stężenia jak i ułamka wolnej frakcji IMI i jej hydroksymetabolitu. Nie zaobserwowano również korelacji pomiędzy stężeniem któregośkolwiek z badanych związków a stężeniem HSA lub białka całkowitego.

Analiza zależności pomiędzy stężeniem wolnej frakcji IMI, 2-OH-IMI lub sumą stężeń tych związków w surowicy a poprawą stanu klinicznego wyrażoną obniżeniem liczby punktów w skali HDRS wykazała charakter liniowy tej zależności w badanej grupie chorych (rycina 18).



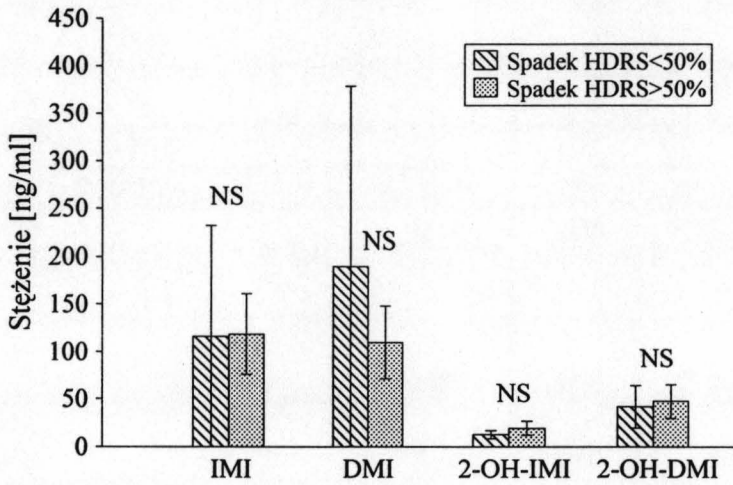
Rycina 18. Zależność pomiędzy spadkiem punktów w HDRS (w %) a stężeniem wolnej frakcji IMI (a), 2-OH-IMI (b) oraz sumą tych stężeń (c) oznaczonych w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii.

Podobnej zależności nie zaobserwowano w odniesieniu do stężeń wolnej frakcji DMI i jej hydroksymetabolitu (rycina 19).

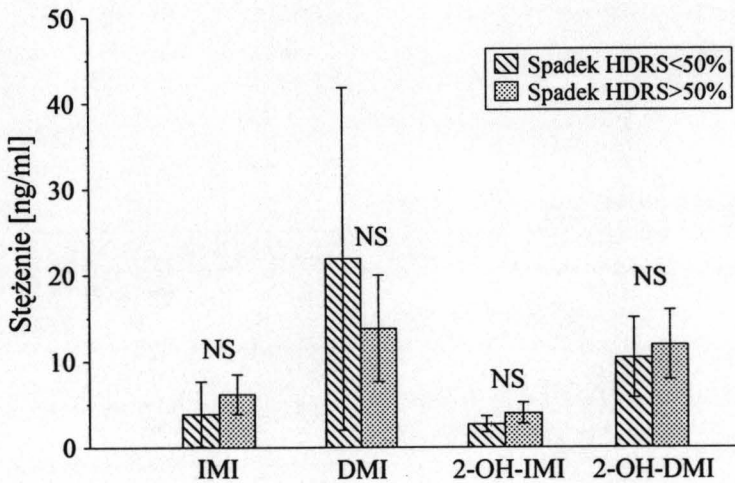


Rycina 19. Zależność pomiędzy spadkiem punktów w HDRS (w %) a stężeniami wolnej frakcji DMI (a) i 2-OH-DMI (b) oznaczonymi w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii.

Na rycinach 20 i 21 przedstawiono rozkład stężeń całkowitych i wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w zależności od uzyskanego efektu terapeutycznego. Jak wynika z tych rycin, u chorych z obniżeniem punktacji w HDRS większym niż 50% stwierdzono jedynie znacznie



Rycina 20. Rozkład średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów w grupie chorych leczonych IMI w monoterapii w zależności od uzyskanego efektu terapeutycznego.



Rycina 21. Rozkład średnich stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie chorych leczonych IMI w monoterapii w zależności od uzyskanego efektu terapeutycznego.

wyższe wartości średniego stężenia wolnej frakcji IMI i 2-OH-IMI odpowiednio o 37% i 32% w porównaniu do chorych, u których obniżenie punktów w HDRS było mniejsze niż 50%. Na uwagę zasługują zarówno całkowite stężenia DMI (rycina 20), jak i wolnej frakcji tego metabolitu (rycina 21) oznaczone u pacjentów z pozytywną odpowiedzią terapeutyczną, które

były niższe odpowiednio o 42% oraz 37% w porównaniu do chorych bez pozytywnej odpowiedzi. Ze względu na małą liczebność próby oraz duże odchylenia standardowe, obserwowane różnice nie były istotne statystycznie ($p>0.05$). Średni stosunek stężeń wolnej frakcji IMI do DMI wynosił 0.57 ± 0.38 oraz 0.27 ± 0.42 , odpowiednio u pacjentów z HDRS $>50\%$ oraz u pacjentów, u których spadek punktów w HDRS był mniejszy niż 50%. W przypadku stężeń całkowitych, wartość tego stosunku w tych dwóch grupach była zbliżona i wynosiła odpowiednio 1.16 ± 0.46 oraz 0.89 ± 0.71 .

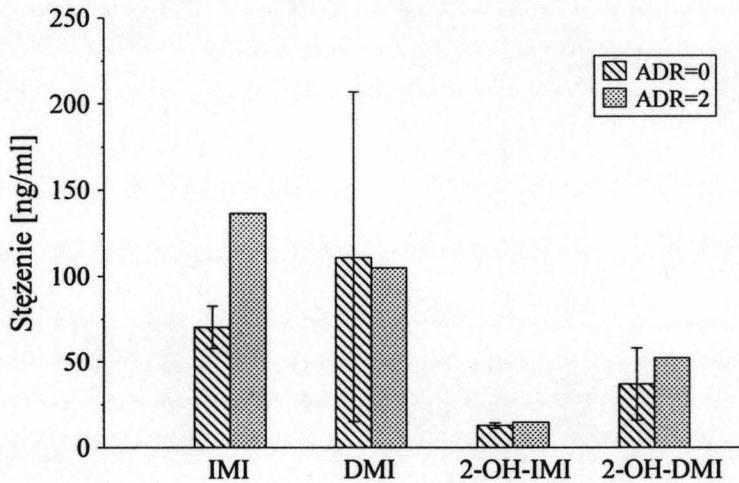
W tabeli 20 przedstawiono rodzaj obserwowanych objawów niepożądanych

Tabela 20. Nasilenie i rodzaj obserwowanych objawów niepożądanych w grupie chorych leczonych IMI w monoterapii.

| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Nasilenie ADR | Rodzaj objawów niepożądanych |
|---------|------|-------------|---------------|--|
| G.R. | K | 43 | 1 | Wysychanie śluzówek |
| H.B. | K | 48 | 0 | - |
| G.W. | M | 35 | 1 | Tachykardia, wysychanie śluzówek, |
| M.S. | K | 46 | 1 | Wysychanie śluzówek |
| M.K. | M | 26 | 0 | - |
| W.Z. | M | 47 | 2 | Hypotonia ortostatyczna |
| W.Sz. | M | 51 | 0 | - |
| K.S. | K | 43 | 1 | Hypotonia ortostatyczna, wysychanie śluzówek |
| J.P. | K | 40 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, potliwość |
| B.O. | K | 34 | 0 | - |
| J.C. | K | 46 | 1 | Wysychanie śluzówek |

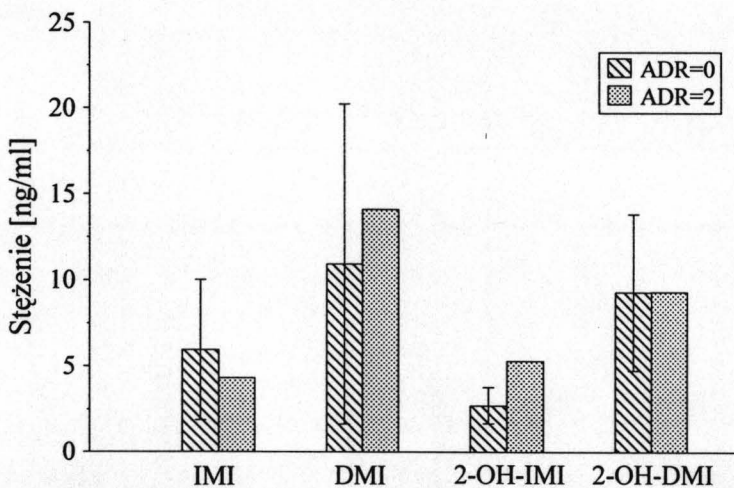
oraz ocenę ich stopnia nasilenia u poszczególnych chorych tej grupy. W oparciu o te dane można stwierdzić, że u 4 chorych (36%) leczonych IMI w monoterapii nie stwierdzono występowania jakichkolwiek objawów niepożądanych (ADR=0), natomiast tylko u 2 chorych (18%) miały one charakter umiarkowany (ADR=2). Nie stwierdzono w tej grupie chorych ani zaburzeń akomodacji, ani objawów niepożądanych ze strony ośrodkowego układu nerwowego. Objawami dominującymi było wysychanie śluzówek i hypotonia ortostatyczna.

Mała liczebność chorych z ADR=2 nie pozwoliła na ocenę statystyczną zależności pomiędzy nasileniem ADR a stężeniem badanych związków. Z rozkładu stężeń całkowitych (rycina 22)



Rycina 22. Rozkład średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów oznaczonych w surowicy chorych leczonych tylko IMI w zależności od nasilenia objawów niepożądanych.

oraz wolnej frakcji (rycina 23) IMI i jej metabolitów u pacjentów bez (ADR=0) oraz



Rycina 23. Rozkład średnich stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie chorych leczonych tylko IMI w zależności od nasilenia objawów niepożądanych.

z umiarkowanymi objawami niepożądanymi (ADR=2) wynika, że objawom niepożądanym towarzyszyły większe całkowite stężenia IMI. Nie znalazło to jednak odzwierciedlenia w stężeniach wolnej frakcji leku macierzystego, które były niższe u tych chorych (rycina 23).

5.5. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w surowicy chorych poddanych leczeniu skojarzonemu z LVP lub PER a efekt terapeutyczny i występowanie efektów niepożądanych

W tabeli 21 przedstawiono dane demograficzne 15 chorych z depresją endogenną

Tabela 21. Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych leczonych IMI i LVP.

| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Masa ciała (kg) | Dawkowanie IMI (mg) | HDRS ₁ ^a | HDRS ₂ ^b | Obniżenie HDRS (%) |
|---------|------|-------------|-----------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| E.K. | K | 45 | 57.0 | 75-0-100 | 29 | 16 | 44.8 |
| E.Kw. | K | 45 | 61.0 | 50-0-50 | 34 | 15 | 55.9 |
| D.O. | K | 37 | 53.0 | 75-0-75 | 32 | 26 | 18.8 |
| J.K. | M | 42 | 95.0 | 100-0-100 | 40 | 17 | 57.5 |
| Z.B. | K | 43 | 57.5 | 50-0-75 | 43 | 17 | 60.5 |
| K.M. | K | 50 | 70.0 | 100-0-100 | 47 | 10 | 78.7 |
| J.N. | M | 45 | 78.7 | 75-0-75 | 45 | 22 | 51.1 |
| E.Kł. | K | 59 | 85.5 | 50-0-50 | 36 | 24 | 33.3 |
| H.L. | M | 59 | 95.5 | 75-0-75 | 49 | 23 | 53.1 |
| W.K. | K | 44 | 75.0 | 75-0-75 | 27 | 13 | 51.9 |
| U.D. | K | 50 | 63.0 | 50-0-50 | 31 | 20 | 35.5 |
| C.T. | K | 46 | 75.0 | 75-0-75 | 30 | 14 | 53.3 |
| T.K. | M | 22 | b.d. | 75-0-75 | b.d. | b.d. | - |
| E.B. | K | 43 | 61.0 | 75-0-75 | 32 | 15 | 53.1 |
| K.Sk. | K | 44 | 91.0 | 100-0-100 | 29 | 22 | 24.1 |

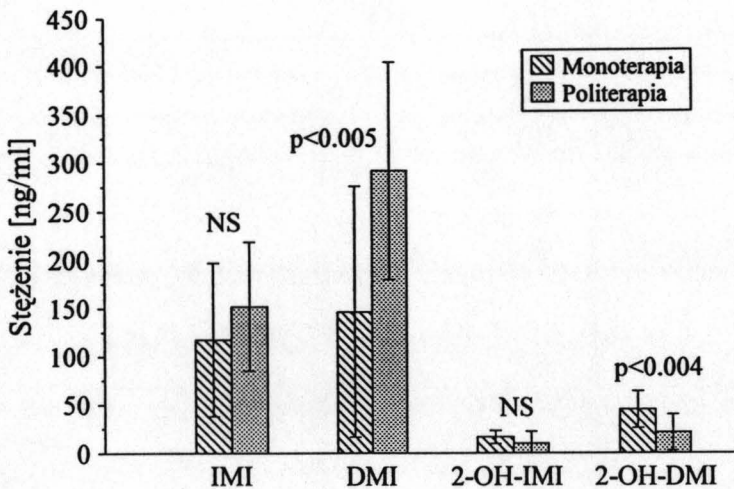
^a przed rozpoczęciem terapii

^b w 22-gim dniu leczenia

leczonych kombinacją IMI i LVP oraz ocenę ich stanu klinicznego wyrażoną w skali HDRS.

Średni wiek oraz masa ciała w tej grupie chorych wynosiły odpowiednio: 44.93±8.68 lat oraz

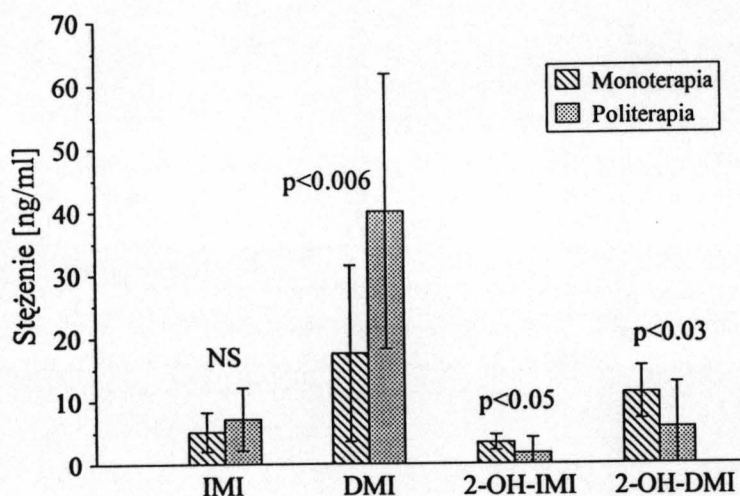
72.73±14.68 kg i były zbliżone do tych danych obserwowanych w omówionej w poprzednim rozdziale grupie kontrolnej ($p>0.05$). Średnie obniżenie punktów w skali HDRS uzyskane po upływie 22 dni leczenia w odniesieniu do stanu wyjściowego, podobnie jak w grupie kontrolnej wynosiło 47.97±15.60%. Istotne statystycznie różnice dotyczyły natomiast dawek IMI, które w grupie kontrolnej i badanej wynosiły odpowiednio: 2.56±0.55 i 2.09±0.51 mg/kg/dzień ($p<0.03$). Pomimo niższych dawek stosowanych w grupie badanej, równoczesne podanie IMI i LVP, jak wynika z ryciny 24, spowodowało podwyższenie stężeń całkowitych



Rycina 24. Rozkład średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów oznaczonych w surowicy chorych leczonych tylko IMI (grupa kontrolna) oraz w surowicy chorych poddanych skojarzonemu leczeniu IMI i LVP.

IMI i DMI w stosunku do grupy kontrolnej oraz znaczne obniżenie stężenia całkowitego hydroksymetabolitów. Średnie wartości stężeń całkowitych IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI w surowicy chorych poddanych leczeniu skojarzonemu wynosiły w stanie stacjonarnym odpowiednio: 152.01±66.73, 291.59±112.24, 9.93±12.32 i 21.25±18.50 ng/ml. Analogiczne zmiany obserwowano w przypadku stężeń wolnej frakcji IMI, DMI oraz 2-OH-IMI i 2-OH-DMI (rycina 25). Wartości tych stężeń w grupie chorych leczonych kombinacją IMI+LVP wynosiły odpowiednio: 7.13±4.95, 40.00±21.79, 1.71±2.48 i 5.73±7.06 ng/ml. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną i badaną w wartościach ułamka wolnej frakcji leku macierzystego oraz jego metabolitów. Ułamek ten dla IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI

obliczony w grupie kontrolnej oraz badanej wynosił odpowiednio: 5.41 ± 4.67 oraz $5.31 \pm 4.38\%$, 12.84 ± 5.03 oraz $13.49 \pm 6.08\%$, 24.17 ± 15.57 oraz $20.20 \pm 16.00\%$ i 26.67 ± 7.82 oraz $24.80 \pm 8.15\%$.



Rycina 25. Rozkład średnich stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oznaczonych w surowicy chorych leczonych IMI w monoterapii (grupa kontrolna) oraz w surowicy chorych poddanych skojarzonemu leczeniu IMI i LVP.

W tabeli 22 przedstawiono rodzaj obserwowanych objawów niepożądanych oraz

Tabela 22. Nasilenie i rodzaj obserwowanych objawów niepożądanych w grupie pacjentów poddanych leczeniu skojarzonemu IMI i LVP.

| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Nasilenie ADR | Rodzaj objawów niepożądanych |
|---------|------|-------------|---------------|---|
| E.K. | K | 45 | 1 | Zaburzenia akomodacji, wysychanie śluzówek |
| E.Kw. | K | 45 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, zaburzenia akomodacji, wysychanie śluzówek |
| D.O. | K | 37 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, zaburzenia równowagi, wysychanie śluzówek |
| J.K. | M | 42 | 1 | Zawroty głowy, wysychanie śluzówek |
| Z.B. | K | 43 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, zawroty głowy, wysychanie śluzówek |
| K.M. | K | 50 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, zaburzenia akomodacji, potliwość |

| | | | | |
|-------|---|----|------|---|
| J.N. | M | 45 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, zaburzenia akomodacji, senność |
| E.Kł. | K | 59 | 1 | Potliwość, wysychanie śluzówek |
| H.L. | M | 59 | 1 | Zawroty głowy, wysychanie śluzówek |
| W.K. | K | 44 | 0 | - |
| U.D. | K | 50 | 0 | - |
| C.T. | K | 46 | 0 | - |
| T.K. | M | 22 | b.d. | b.d. |
| E.B. | K | 43 | 1 | Kołatanie serca, wysychanie śluzówek |
| K.Sk. | K | 44 | 1 | Hypotonia ortostatyczna, wysychanie śluzówek, |

ocenę ich stopnia nasilenia. Jak wynika z tej tabeli, występowanie objawów niepożądanych stwierdzono u 11 chorych (79%) leczonych równocześnie IMI i LVP. Na uwagę zasługuje fakt, że dominowała tutaj hypotonia ortostatyczna oraz nie występujące w grupie kontrolnej zaburzenia akomodacji.

W tabeli 23 przedstawiono dane demograficzne 13 chorych poddanych leczeniu

Tabela 23. Dane demograficzne i kliniczne chorych leczonych IMI i PER.

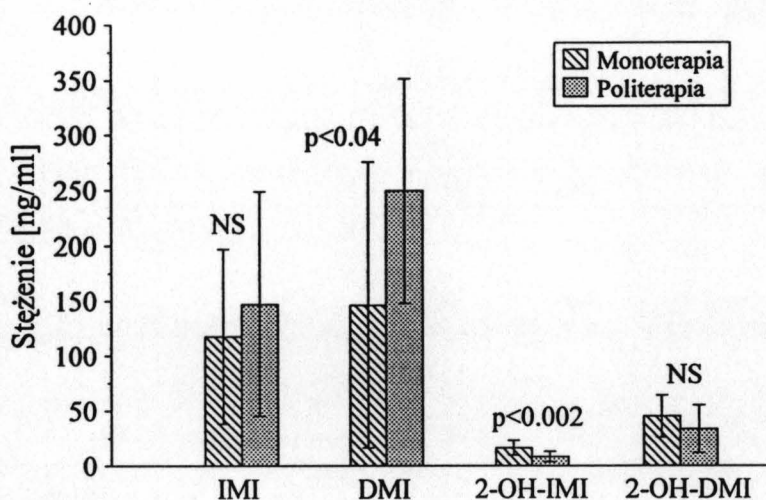
| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Masa ciała (kg) | Dawkowanie IMI (mg) | HDRS ₁ ^a | HDRS ₂ ^b | Obniżenie HDRS (%) |
|---------|------|-------------|-----------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| L.K. | M | 46 | 88.5 | 100-0-100 | 28 | 13 | 53.6 |
| E.Ko. | K | 40 | 52.5 | 50-0-50 | 28 | 8 | 71.4 |
| J.Kr. | K | 71 | 52.0 | 50-0-50 | 29 | 9 | 69.0 |
| J.M. | K | 54 | 90.0 | 75-0-75 | 40 | 25 | 37.5 |
| S.P. | M | 42 | 55.0 | 75-0-75 | 31 | 17 | 45.2 |
| A.H. | M | 40 | 84.2 | 100-0-100 | 41 | 19 | 53.7 |
| E.G. | M | 45 | 85.0 | 75-0-100 | 42 | 31 | 26.2 |
| Z.W. | M | 50 | 76.5 | 75-0-75 | 48 | 39 | 18.8 |
| H.D. | K | 70 | 91.0 | 50-50-0 | b.d. | b.d. | - |
| M.W. | K | 65 | b.d. | 50-50-0 | b.d. | b.d. | - |
| G.Ł. | M | 25 | 78.0 | 75-0-75 | 27 | 25 | 7.4 |
| M.Z. | K | 33 | 68.0 | 75-0-75 | 31 | 20 | 35.5 |
| S.M. | M | 46 | 98.0 | 100-0-100 | 36 | 13 | 63.9 |

^a przed rozpoczęciem terapii

^b w 22-gim dniu leczenia

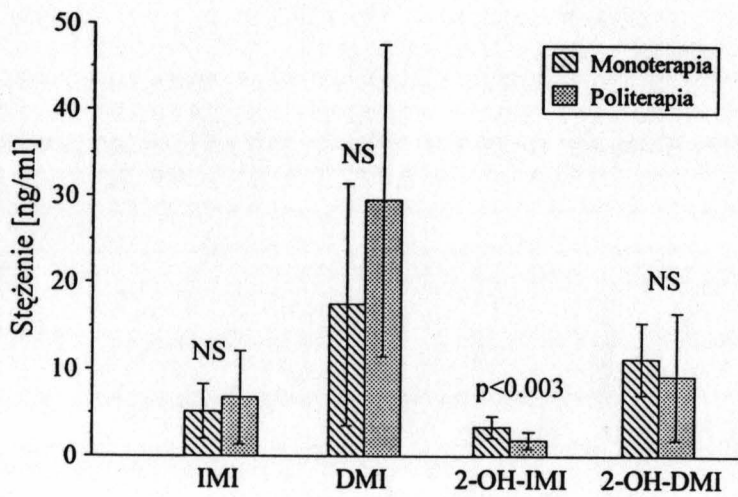
skojarzonemu IMI i PER oraz ocenę stanu klinicznego tych chorych w skali HDRS. Podobnie jak w przypadku chorych leczonych kombinacją IMI i LVP, średni wiek oraz masa ciała

chorych z tej grupy nie różniły się istotnie w stosunku do grupy kontrolnej i wynosiły odpowiednio: 48.23 ± 13.77 lat i 75.73 ± 15.90 kg, natomiast średnie procentowe obniżenie punktów w skali HDRS określone po upływie 22 dni leczenia w stosunku do stanu wyjściowego wynosiło $43.84 \pm 20.89\%$. W grupie chorych poddanych leczeniu kombinowanemu stosowano istotnie mniejsze dawki IMI w porównaniu z grupą kontrolną (2.01 ± 0.40 oraz 2.56 ± 0.55 mg/kg/dzień, ($p < 0.009$). Na rycinie 26 przedstawiono wpływ



Rycina 26. Rozkład średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów oznaczonych w surowicy chorych leczonych tylko IMI (grupa kontrolna) oraz w surowicy chorych poddanych skojarzonemu leczeniu IMI i PER.

skojarzonego leczenia z PER na stężenia całkowite IMI i jej metabolitów w surowicy badanych chorych. Jak wynika z tej ryciny, włączenie PER do terapii, podobnie jak po podaniu LVP, podwyższało całkowite stężenia IMI i DMI, odpowiednio do wartości 146.89 ± 101.83 i 249.57 ± 101.90 ng/ml, przy równoczesnym obniżeniu stężeń 2-OH-IMI i 2-OH-DMI do 8.31 ± 4.71 i 33.34 ± 21.62 ng/ml w stosunku do grupy kontrolnej. Podobne zmiany obserwowano w przypadku stężeń wolnej frakcji tych związków (rycina 27). Wartości stężeń wolnej frakcji IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI w tej grupie chorych poddanych leczeniu skojarzonemu wynosiły odpowiednio: 6.74 ± 5.35 , 29.55 ± 18.06 , 1.85 ± 0.99 oraz 9.21 ± 7.31 ng/ml. Podobnie jak w przypadku LVP, ułamek wolnej frakcji badanych związków w surowicy chorych



Rycina 27. Rozkład średnich stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie pacjentów leczonych IMI w monoterapii (grupa kontrolna) oraz w grupie pacjentów leczonych kombinacją IMI i PER.

poddanych skojarzonemu leczeniu z PER, nie różnił się w stosunku do grupy kontrolnej. Ułamek ten wynosił odpowiednio: $5.05 \pm 3.89\%$, $11.95 \pm 4.78\%$, $22.84 \pm 15.60\%$ oraz $25.46 \pm 7.95\%$.

W tabeli 24 przedstawiono objawy niepożądane jakie występowały w tej

Tabela 24. Nasilenie i rodzaj obserwowanych objawów niepożądanych w grupie pacjentów poddanych skojarzonemu leczeniu IMI i PER.

| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Nasilenie ADR | Rodzaj objawów niepożądanych |
|---------|------|-------------|---------------|--|
| L.K. | M | 46 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, potliwość |
| E.Ko. | K | 40 | 2 | Senność, wysychanie śluzówek |
| J.Kr. | K | 71 | 1 | Hypotonia ortostatyczna, wysychanie śluzówek |
| J.M. | K | 54 | 1 | Tachykardia, wysychanie śluzówek |
| S.P. | M | 42 | 0 | - |
| A.H. | M | 40 | 1 | Zawroty głowy, wysychanie śluzówek |
| E.G. | M | 45 | 0 | - |
| Z.W. | M | 50 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, wysychanie śluzówek |
| H.D. | K | 70 | b.d. | b.d. |
| M.W. | K | 65 | b.d. | b.d. |
| G.Ł. | M | 25 | 0 | - |
| M.Z. | K | 33 | 0 | - |
| S.M. | M | 46 | 2 | Hypotonia ortostatyczna, tachykardia |

grupie chorych oraz ocenę stopnia ich nasilenia. Porównując te dane z grupą kontrolną oraz grupą chorych leczonych IMI+LVP można stwierdzić, że częstość występowania objawów niepożądanych była taka sama jak w grupie kontrolnej czyli 64% chorych. Odsetek chorych z umiarkowanymi objawami niepożądanymi był zbliżony do grupy leczonej LVP, wynosił 36% i podobnie jak w tej grupie, u znacznej liczby chorych wystąpiła hypotonia ortostaticzna, natomiast u żadnego nie obserwowano zaburzeń akomodacji.

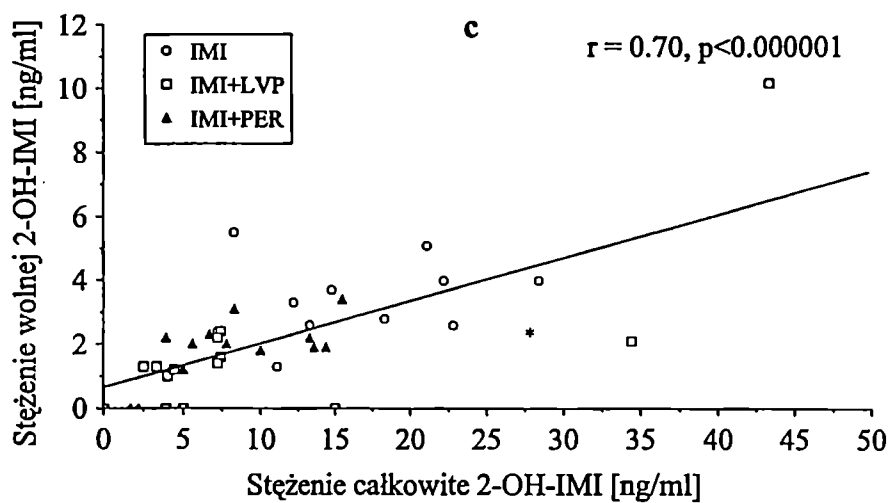
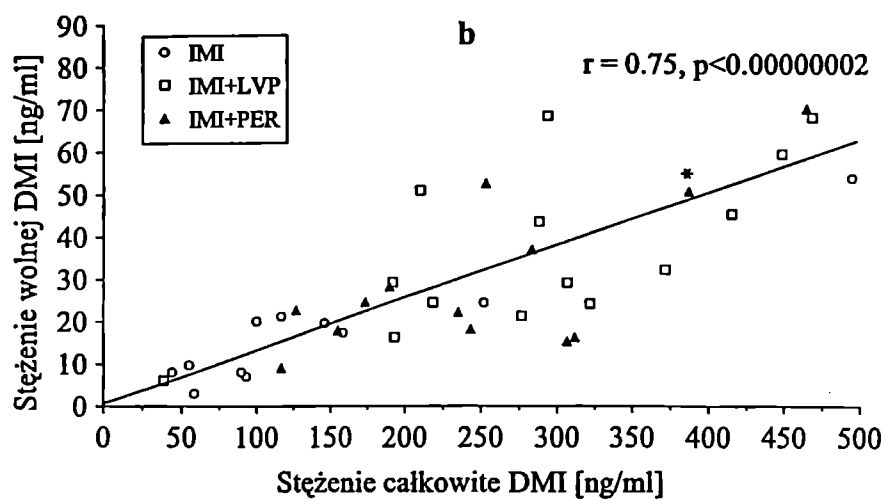
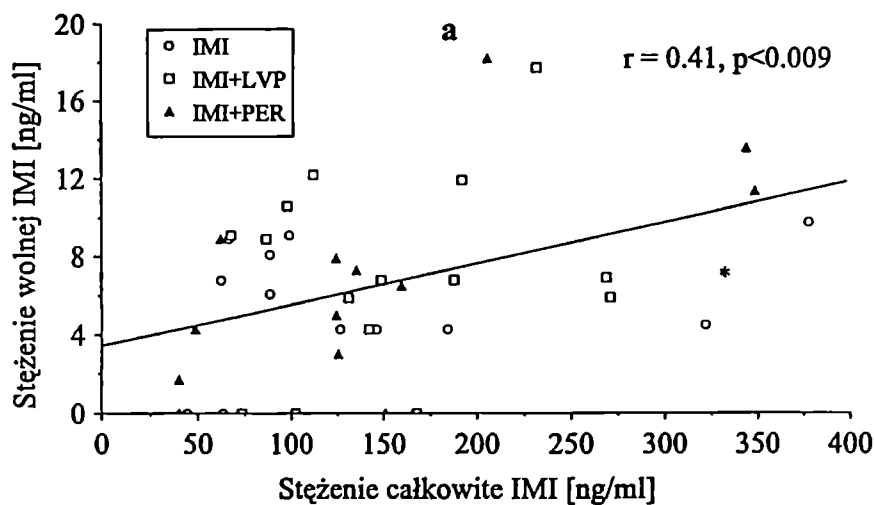
W tabeli 25 dla porównania przedstawiono łącznie wpływ LVP i PER na stężenia

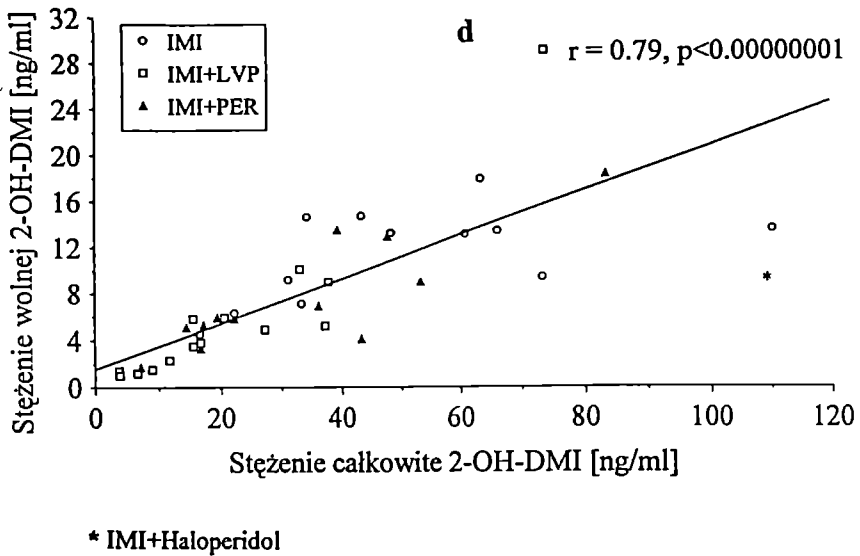
Tabela 25. Zmiany stężeń całkowitych i wolnej frakcji IMI i jej metabolitów po podaniu neuroleptyków.

| Podawane leki | Zmiany stężeń w porównaniu z grupą kontrolną (w %) | | | | | | | |
|---------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | IMI | | DMI | | 2-OH-IMI | | 2-OH-DMI | |
| | c _t | c _u | c _t | c _u | c _t | c _u | c _t | c _u |
| IMI+LVP | 29↑ | 40↑ | 100↑ | 129↑ | 39↓ | 50↓ | 53↓ | 49↓ |
| IMI+PER | 25↑ | 31↑ | 71↑ | 69↑ | 49↓ | 45↓ | 26↓ | 18↓ |

całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w odniesieniu do stężeń tych związków obserwowanych u chorych leczonych tylko IMI. Jak wynika z zamieszczonych w tej tabeli wartości, zmiany stężenia szczególnie DMI oraz 2-OH-DMI były większe po podaniu LVP niż w skojarzonym leczeniu z PER.

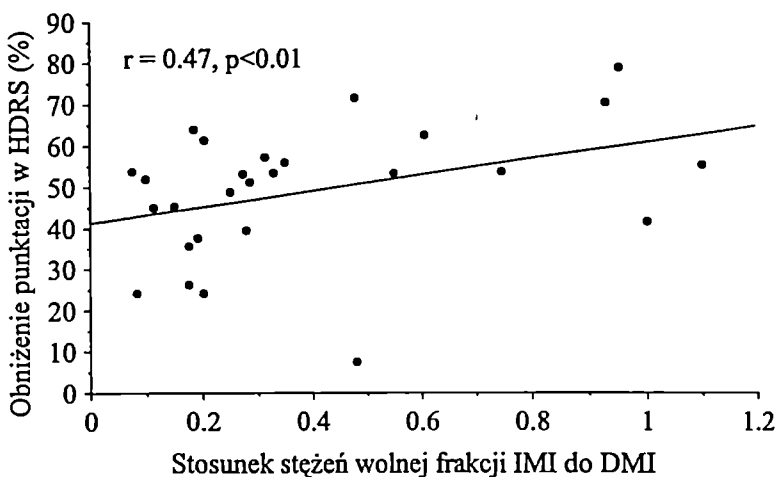
Analiza zależności stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów od całkowitych stężeń tych związków oznaczonych w surowicy wszystkich chorych, niezależnie od sposobu leczenia (monoterapia, leczenie skojarzone) wykazała liniową zależność pomiędzy tymi stężeniami (rycina 28), charakteryzującą się, szczególnie w przypadku metabolitów, wysokimi współczynnikami korelacji. Wyniki te świadczą o liniowości wiązania IMI i jej metabolitów z białkami osocza w obserwowanym zakresie stężeń.





Rycina 28. Zależność pomiędzy stężeniem wolnej frakcji a stężeniem całkowitym IMI (a), DMI (b), 2-OH-IMI (c) i 2-OH-DMI (d) w całej populacji badanych chorych z uwzględnieniem grupy kontrolnej (IMI) i badanych (IMI+LVP i IMI+PER).

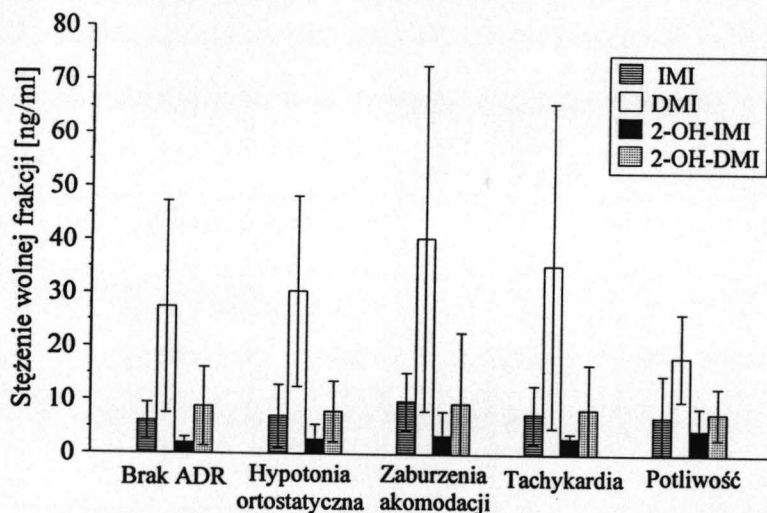
W poszukiwaniu zależności pomiędzy stężeniami wolnej frakcji badanych związków a efektem terapeutycznym obserwowanym w całej populacji chorych wykazano statystycznie istotną korelację pomiędzy obniżeniem punktów w skali HDRS a stosunkiem stężeń wolnej frakcji IMI do DMI oznaczonych w stanie stacjonarnym (rycina 29). Jak wynika z tej ryciny,



Rycina 29. Wykres zależności pomiędzy poprawą stanu klinicznego badanych chorych mierzoną spadkiem punktów w HDRS a stosunkiem stężeń wolnej frakcji IMI do DMI.

im wyższa wartość tego stosunku, tym większa poprawa w skali HDRS.

Analiza rozkładu stężeń wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w zależności od rodzaju występujących efektów niepożądanych (rycina 30) wykazała najwyższe stężenia wolnej



Rycina 30. Średnie stężenia wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w zależności od rodzaju objawów niepożądanych.

frakcji IMI oraz DMI towarzyszące zaburzeniom akomodacji oraz tachykardii.

Analiza stopnia nasilenia objawów niepożądanych w zależności od stężenia wolnej frakcji badanych związków obserwowanych w całej populacji chorych, niezależnie od sposobu leczenia (monoterapia, leczenie skojarzone z neuroleptykami) wykazała (tabela 26), że ułamek

Tabela 26. Ułamek wolnej frakcji IMI i jej metabolitów u pacjentów bez i z umiarkowanymi objawami niepożądanymi.

| Związek | Ułamek wolnej frakcji u pacjentów z ADR=0 | Ułamek wolnej frakcji u pacjentów z ADR=2 |
|----------|---|---|
| IMI | 6.06±4.49 | 6.03±4.37 |
| DMI | 11.87±5.04 | 12.63±5.69 |
| 2-OH-IMI | 18.86±9.67‡ | 35.35±17.13‡ |
| 2-OH-DMI | 25.72±5.99 | 25.27±7.70 |

‡ p<0.01

wolnej frakcji 2-OH-IMI był istotnie wyższy u chorych z objawami niepożądanymi o nasileniu umiarkowanym (ADR=2) w porównaniu do tego ułamka w grupie chorych bez ADR.

5.6. Stężenia LVP i PER w surowicy krwi badanych chorych poddanych leczeniu skojarzonemu

Ponieważ niewiele jest danych na temat stężeń neuroleptyków u chorych psychiatrycznych, szczególnie w leczeniu skojarzonym, oznaczono także stężenia stosowanych neuroleptyków w surowicy badanych chorych. W tabeli 27 przedstawiono

Tabela 27. Stężenia LVP oznaczone w surowicy chorych leczonych IMI i LVP.

| Pacjent | Dawkowanie LVP (mg) | Stężenie (ng/ml) |
|------------------|------------------------|---------------------|
| E.K. | 25 - 0 - 25 | 21.59 |
| E.Kw. | 50 - 50 - 75 | 32.84 |
| D.O. | 0 - 0 - 100 | 23.30 |
| J.K. | 50 - 0 - 50 | 30.68 |
| Z.B. | 25 - 0 - 50 | 74.53 |
| K.M. | 0 - 0 - 25 | 59.60 |
| J.N. | 25 - 25 - 100 | 49.89 |
| E.Kł. | 25 - 0 - 50 | 37.50 |
| H.L. | 25 - 25 - 50 | 63.80 |
| W.K. | 25 - 25 - 50 | 58.95 |
| U.D. | 25 - 0 - 50 | 20.03 |
| C.T. | 0 - 0 - 50 | 19.32 |
| T.K. | 0 - 0 - 50 | 23.86 |
| E.B. | 25 - 0 - 50 | 19.32 |
| K.Sk. | 25 - 0 - 50 | 53.41 |
| $\bar{x} \pm SD$ | | 39.24 ± 18.99 |

stężenia LVP oznaczone w grupie 15 chorych, którym podawano LVP w połączeniu z IMI, a w tabeli 28 - stężenia PER oznaczone w grupie 13 chorych poddanych leczeniu

Tabela 28. Stężenia PER oznaczone w surowicy chorych leczonych IMI i PER.

| Pacjent | Dawkowanie PER (mg) | Stężenie (ng/ml) |
|------------------|------------------------|---------------------|
| L.K. | 25-25-25 | n.o |
| E.Ko. | 25-25-50 | 206.56 |
| J.Kr. | b.d. | 415.81 |
| J.M. | 50-50-100 | 453.86 |
| S.P. | 25-25-100 | 561.66 |
| A.H. | 100-0-200 | 225.58 |
| E.G. | 50-50-100 | 358.74 |
| Z.W. | 50-0-100 | 257.29 |
| H.D. | 0-0-50 | n.o. |
| M.W. | 0-0-100 | 472.88 |
| G.Ł. | 25-25-100 | 60.71 |
| M.Z. | 100-100-150 | n.o. |
| S.M. | 50-0-50 | 288.99 |
| $\bar{x} \pm SD$ | | 330.21 \pm 150.27 |

skojarzonemu IMI i PER. Średnia dawka LVP u tych chorych wynosiła 93.33 \pm 40.61 mg/dzień, a PER - 160.42 \pm 90.11 mg/dzień.

5.7. Stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w surowicy chorych poddanych leczeniu skojarzonemu z CBZ

W tabeli 29 zebrano dane demograficzne oraz kliniczne 13 chorych, którym po 2 tygodniach leczenia IMI włączono CBZ w dawce 400 mg/dzień. Z analizy stanu klinicznego tych chorych wynika, że u niemal wszystkich chorych po około 4 tygodniach leczenia, w tym przez 2 tygodnie leczenia IMI+CBZ, uzyskano zadawalający efekt terapeutyczny (HDRS>50%) w porównaniu ze stanem początkowym (HDRS₁). Średnie procentowe

Tabela 29. Dane demograficzne i kliniczne badanych chorych leczonych IMI, którym po 2 tygodniach leczenia włączono CBZ.

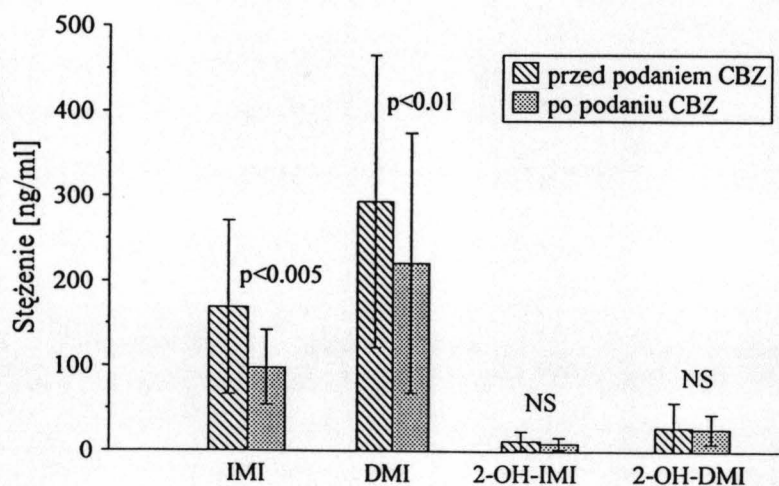
| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | Masa ciała (kg) | Dawkowanie IMI (mg) | HDRS ₁ ^a | HDRS ₂ ^b | HDRS ₃ ^c | Obniżenie HDRS (%) |
|---------|------|-------------|-----------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| W.S. | M | 57 | 94.5 | 100-0-100 | 45 | 40 | 19 | 57.8 |
| Z.B. | K | 43 | 57.5 | 50-0-75 | 43 | 17 | 6 | 86.0 |
| E.Ko. | K | 40 | 52.5 | 50-0-50 | 28 | 8 | 3 | 89.3 |
| J.N. | M | 45 | 78.7 | 75-0-75 | 45 | 22 | 18 | 60.0 |
| E.Kł. | K | 59 | 85.7 | 50-0-50 | 36 | 21 | 3 | 91.7 |
| K.S. | K | 43 | 86.5 | 125-0-125 | 29 | 22 | 20 | 31.0 |
| U.D. | K | 50 | 63.0 | 50-0-50 | 31 | 20 | 11 | 64.5 |
| H.L. | M | 59 | 95.5 | 75-0-75 | 49 | 23 | 13 | 73.5 |
| W.Z. | M | 47 | 78.5 | 100-0-100 | 32 | 12 | b.d. | b.d. |
| W.K. | K | 44 | 75.0 | 75-0-75 | 27 | 13 | 6 | 77.8 |
| W.Sz. | M | 51 | 85.5 | 75-0-75 | 29 | 20 | 16 | 44.8 |
| E.B. | K | 43 | 61.0 | 75-0-75 | 32 | 15 | 10 | 68.8 |
| J.C. | K | 43 | 60.0 | 75-0-75 | 39 | 20 | 7 | 82.1 |

a przed rozpoczęciem terapii

b po co najmniej dwóch tygodniach podawania IMI

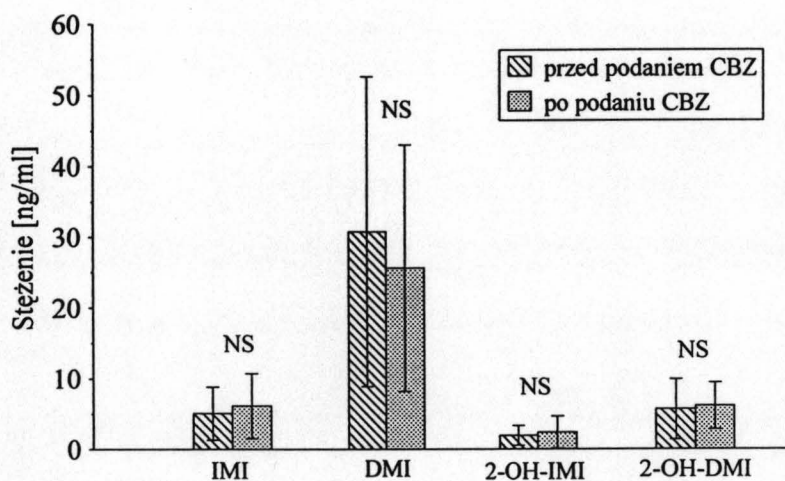
c dwa tygodnie po włączeniu CBZ

obniżenie punktów w skali HDRS wynosiło $68.94 \pm 18.44\%$ w stosunku do HDRS₁. Na rycinie 31 przedstawiono wartości średnich stężeń całkowitych IMI i jej metabolitów oznaczone



Rycina 31. Średnie stężenia całkowite IMI i jej metabolitów oznaczone w stanie stacjonarnym w surowicy chorych przed i po włączeniu CBZ do leczenia.

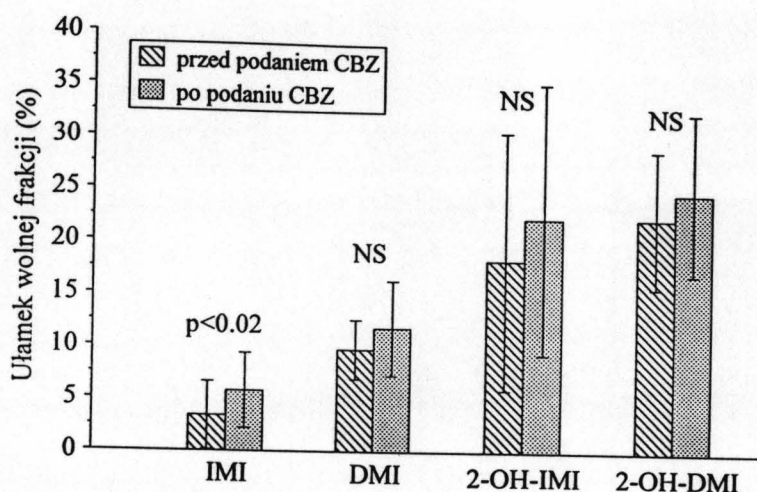
w stanie stacjonarnym w surowicy chorych przed podaniem CBZ i po dwóch tygodniach łącznego jej stosowania z IMI. Jak wynika z tej ryciny całkowite stężenia IMI i jej głównego metabolitu - DMI uległy istotnemu obniżeniu odpowiednio z 168.84 ± 102.18 do 98.12 ± 43.79 ng/ml i z 293.89 ± 171.93 do 221.85 ± 153.21 ng/ml, natomiast stężenia hydroksymetabolitów praktycznie pozostały bez zmian i wynosiły przed i po podaniu CBZ odpowiednio: 12.65 ± 11.14 oraz 9.73 ± 6.92 ng/ml dla 2-OH-IMI i 28.38 ± 29.36 oraz 26.65 ± 17.38 ng/ml dla 2-OH-DMI. Stężenia wolnej frakcji tych związków, oznaczone przed i po włączeniu CBZ (rycina 32) nie różniły się istotnie ($p > 0.05$). Dla IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI wynosiły



Rycina 32. Średnie stężenia wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oznaczone w stanie stacjonarnym w surowicy chorych przed i po włączeniu CBZ do leczenia.

odpowiednio: 5.07 ± 3.75 oraz 6.13 ± 4.61 ng/ml, 30.74 ± 21.87 oraz 25.63 ± 17.42 ng/ml, 1.92 ± 1.40 oraz 2.39 ± 2.23 ng/ml i 5.62 ± 4.26 oraz 6.08 ± 3.31 ng/ml.

Obserwowane obniżenie stężeń całkowitych IMI i DMI, przy równoczesnym podtrzymaniu nie zmienionego stężenia ich wolnej frakcji, powodowało wzrost ułamka wolnej frakcji leku macierzystego i jego głównego metabolitu po podaniu CBZ (rycina 33) odpowiednio z $3.36 \pm 3.24\%$ do $5.75 \pm 3.60\%$ i z $9.70 \pm 2.82\%$ do $11.75 \pm 4.51\%$ (dla IMI $p < 0.02$). W przypadku hydroksymetabolitów nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w wartościach tego



Rycina 33. Ułamek wolnej frakcji IMI i jej metabolitów wyznaczony w surowicy chorych przed i po włączeniu CBZ do leczenia.

parametru obserwowanych przed i po podaniu CBZ, a wynoszących odpowiednio: $18.22 \pm 12.31\%$ oraz $22.25 \pm 12.95\%$ dla 2-OH-IMI i $22.28 \pm 6.56\%$ oraz $24.74 \pm 7.72\%$ dla 2-OH-DMI).

W tabeli 30 przedstawiono nasilenie objawów niepożądanych obserwowane w tej

Tabela 30. Nasilenie objawów niepożądanych obserwowanych w grupie chorych poddanych skojarzonemu leczeniu IMI i CBZ.

| Pacjent | Płeć | Wiek (lata) | ADR ₁ | ADR ₂ |
|---------|------|-------------|------------------|------------------|
| W.S. | M | 57 | 3 | 0 |
| Z.B. | K | 43 | 2 | 0 |
| E.Ko. | K | 40 | 2 | 1 |
| J.N. | M | 45 | 2 | 1 |
| E.Kł. | K | 59 | 1 | 1 |
| K.S. | K | 43 | 1 | 1 |
| U.D. | K | 50 | 0 | 0 |
| H.L. | M | 59 | 1 | 1 |
| W.Z. | M | 47 | 2 | zm. fazy |
| W.K. | K | 44 | 0 | 0 |
| W.Sz. | M | 51 | 0 | 0 |
| E.B. | K | 43 | 1 | 0 |
| J.C. | K | 43 | 1 | 0 |

grupie chorych po 2 tygodniach leczenia IMI w monoterapii (ADR_1) oraz po 2 tygodniach łącznego podawania z CBZ (ADR_2). Jak wynika z tych danych, po włączeniu CBZ nasilenie objawów niepożądanych uległo obniżeniu i ostatecznie u 5 chorych miało charakter łagodny ($ADR=1$), u pozostałych objawy niepożądane nie występowały.

5.8. Stężenia CBZ i jej metabolitu w surowicy chorych poddanych skojarzonemu leczeniu z IMI

W tabeli 31 przedstawiono stężenia całkowite i wolnej frakcji CBZ i CBZE

Tabela 31. Stężenia całkowite i wolnej frakcji CBZ i CBZE w surowicy badanych chorych po 2 tygodniach leczenia skojarzonego.

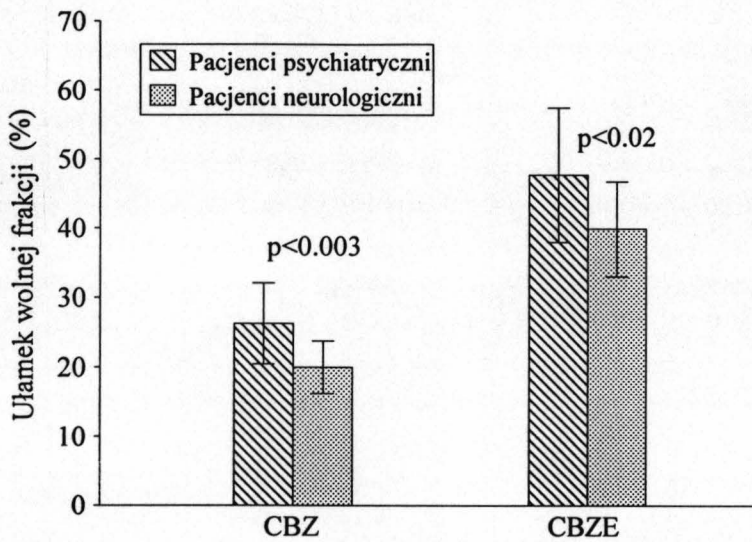
| Pacjent | Dawkowanie (mg) | Stężenie całkowite | | Stężenie wolnej frakcji | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | CBZ ($\mu\text{g/ml}$) | CBZE ($\mu\text{g/ml}$) | CBZ ($\mu\text{g/ml}$) | CBZE ($\mu\text{g/ml}$) |
| W.S. | 300-0-300 | 9.80 | 1.10 | 2.40 | 0.51 |
| Z.B. | 200-0-200 | 6.00 | 0.95 | 1.55 | 0.45 |
| J.N. | 200-0-200 | 7.00 | 0.75 | 2.50 | 0.49 |
| E.Ko. | 200-0-200 | 8.33 | 1.40 | 2.53 | 0.78 |
| E.Kł. | 200-0-200 | 7.18 | 0.95 | 2.11 | 0.50 |
| K.S. | 200-0-200 | 6.80 | 1.30 | 1.34 | 0.46 |
| U.D. | 200-0-200 | 6.95 | 1.10 | 2.33 | 0.64 |
| H.L. | 200-0-200 | 4.00 | 0.65 | 0.89 | 0.25 |
| W.Z. | 200-0-200 | 4.70 | 0.58 | 1.00 | 0.24 |
| W.K. | 200-0-200 | 6.50 | 1.00 | 2.10 | 0.53 |
| W.Sz. | 200-0-200 | 4.65 | 0.65 | 1.33 | 0.35 |
| E.B. | 200-0-200 | 5.80 | 0.79 | 1.17 | 0.30 |
| J.C. | 100-0-100 | 2.63 | 0.47 | 0.47 | 0.16 |
| $\bar{x}\pm SD$ | 400.00 ± 81.65 mg/ dzień | 6.18 ± 1.88 | 0.90 ± 0.28 | 1.67 ± 0.69 | 0.44 ± 0.17 |

zmierzone u badanych chorych po 2 tygodniach leczenia skojarzonego IMI+CBZ. Dla porównania w tabeli 32 przedstawiono stężenia całkowite oraz wolnej frakcji tych związków

Tabela 32. Stężenia całkowite i wolnej frakcji CBZ i CBZE w grupie chorych leczonych CBZ z powodu padaczki.

| Pacjent | Dawkowanie (mg) | Stężenie całkowite | | Stężenie wolnej frakcji | |
|------------------|---------------------------|--------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| | | CBZ (µg/ml) | CBZE (µg/ml) | CBZ (µg/ml) | CBZE (µg/ml) |
| B.S. | 400-0-600 | 7.91 | 0.79 | 1.94 | 0.38 |
| S.T. | 400-0-800 | 7.74 | 1.90 | 2.26 | 1.12 |
| J.K. | 300-0-300 | 2.86 | 0.32 | 0.62 | 0.13 |
| A.S. | 600-0-800 | 6.95 | 1.15 | 1.27 | 0.45 |
| A.G. | 400-0-400 | 8.42 | 1.47 | 1.29 | 0.52 |
| J.B. | 400-0-400 | 5.41 | 0.86 | 1.00 | 0.31 |
| T.O. | 200-0-200 | 4.53 | 0.50 | 0.72 | 0.16 |
| M.K. | 400-0-600 | 9.23 | 0.92 | 1.48 | 0.31 |
| D.O. | 600-0-800 | 9.40 | 1.33 | 1.91 | 0.55 |
| L.B. | 300-0-300 | 3.44 | 0.47 | 0.79 | 0.20 |
| Z.M. | 100-100-100 | 3.21 | 0.57 | 0.62 | 0.22 |
| E.K. | 600-0-800 | 5.76 | 0.72 | 1.02 | 0.26 |
| B.P. | 400-0-400 | 5.44 | 0.86 | 1.11 | 0.31 |
| M.K. | 600-0-600 | 6.83 | 0.89 | 1.37 | 0.35 |
| $\bar{x} \pm SD$ | 921.43±368.32 mg/dzień | 6.22±2.19 | 0.91±0.43 | 1.24±0.51 | 0.38±0.25 |

oznaczone w surowicy 14 chorych nie otrzymujących leków psychotropowych (chorzy neurologiczni). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że pomimo stosowania znacznie większych dawek CBZ u pacjentów neurologicznych w porównaniu z grupą chorych psychiatrycznych, stężenia całkowite zarówno leku macierzystego jak i jego metabolitu nie różniły się istotnie w obu grupach chorych, podczas gdy stężenia wolnej frakcji CBZ i CBZE były niższe w grupie chorych neurologicznych. Pociągało to za sobą istotne statystycznie różnice pomiędzy ułamkiem wolnej frakcji obu związków (rycina 34). Ułamek ten dla CBZ i CBZE w grupie chorych psychiatrycznych oraz neurologicznych wynosił odpowiednio: 26.27±5.81% oraz 20.01±3.74% i 47.67±9.73% oraz 39.86±6.84%.



Rycina 34. Ułamek wolnej frakcji CBZ i CBZE w grupie pacjentów psychiatrycznych i neurologicznych.

5.9. Wpływ CBZ na wiązanie IMI i jej metabolitów z HSA i AAG w warunkach *in vitro*

Ponieważ po podaniu CBZ obserwowano w warunkach *in vivo* zmiany ułamka wolnej frakcji IMI i DMI, podjęto badania nad wpływem CBZ na parametry wiązania IMI i jej metabolitów w warunkach *in vitro*. W tabelach 33 i 34 zebrano ułamek wolnej frakcji IMI i jej

Tabela 33. Ułamek wolnej frakcji IMI i DMI (wyrażony w %) w roztworach HSA bez i w obecności CBZ (każda wartość stanowi średnią z 4 pomiarów).

| Stężenie HSA (g/100 ml) | f_u IMI | f_u IMI (+CBZ) | f_u DMI | f_u DMI (+CBZ) |
|-------------------------|------------|------------------|------------|------------------|
| 0.5 | 76.34±5.20 | 83.28±2.94 | 81.18±0.76 | 90.86±2.09 |
| 1 | 65.24±3.93 | 71.49±5.68 | 72.31±0.57 | 83.33±3.23 |
| 2 | 40.25±2.50 | 55.00±5.90 | 53.58±0.41 | 69.62±2.66 |
| 4 | 34.20±4.64 | 46.50±2.85 | 38.44±5.50 | 57.71±3.42 |
| 6 | 25.56±4.25 | 26.32±0.53 | 32.50±1.98 | 42.57±5.52 |

Tabela 34. Ułamek wolnej frakcji 2-OH-IMI i 2-OH-DMI (wyrażony w %) w roztworach HSA bez i w obecności CBZ (każda wartość stanowi średnią z 4 pomiarów).

| Stężenie HSA (g/100 ml) | f_u 2-OH-IMI | f_u 2-OH-IMI (+CBZ) | f_u 2-OH-DMI | f_u 2-OH-DMI (+CBZ) |
|-------------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| 0.5 | 80.33±3.61 | 81.94±8.03 | 77.66±3.03 | 77.00±7.76 |
| 1 | 66.86±1.95 | 65.56±5.45 | 62.43±7.51 | 62.15±4.05 |
| 2 | 48.86±9.10 | 56.57±10.29 | 46.11±1.31 | 52.69±2.16 |
| 4 | 37.26±4.62 | 44.56±0.74 | 30.41±3.52 | 36.93±4.31 |
| 6 | 31.94±0.86 | 33.43±1.49 | 23.58±1.10 | 25.38±1.02 |

metabolitów wyznaczony przy różnych stężeniach HSA wahających się od 0.5 do 6 g/100 ml (72.5 - 870 μ M) bez i w obecności CBZ, dodawanej w ilości 10 μ g/ml. Stężenia IMI, DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI były stałe i wynosiły odpowiednio: 200, 400, 30 i 50 ng/ml (\approx 0.71, 1.50, 0.18 i 0.10 μ M). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że dodatek CBZ powodował istotny wzrost ułamka wolnej frakcji IMI i DMI, co potwierdza wyniki badań *in vivo* i może świadczyć o wypieraniu tych związków przez CBZ z ich wiązań z HSA. W przypadku hydroksymetabolitów zmiany ułamka ich wolnej frakcji po dodaniu CBZ, podobnie jak w badaniach *in vivo*, były nieistotne statystycznie. W tabelach 35 i 36

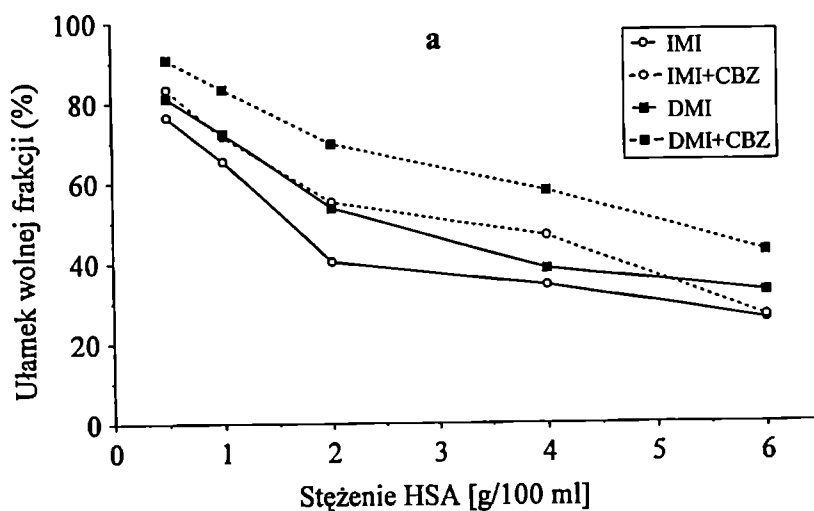
Tabela 35. Ułamek wolnej frakcji IMI i DMI (wyrażony w %) w roztworach AAG bez i w obecności CBZ (każda wartość stanowi średnią z 4 pomiarów).

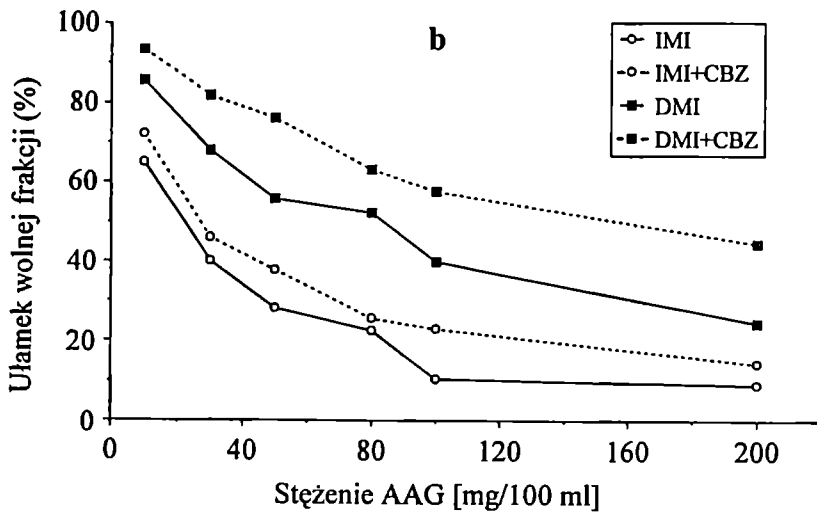
| Stężenie AAG (mg/100 ml) | f_u IMI | f_u IMI (+CBZ) | f_u DMI | f_u DMI (+CBZ) |
|--------------------------|-------------|------------------|------------|------------------|
| 10 | 65.04±2.35 | 72.14±8.41 | 85.62±2.51 | 93.44±1.39 |
| 30 | 40.04±2.39 | 45.96±1.19 | 67.93±1.08 | 81.69±7.55 |
| 50 | 28.08±10.18 | 37.78±2.93 | 55.74±3.85 | 76.01±0.93 |
| 80 | 22.56±7.40 | 25.56±10.09 | 52.32±1.61 | 63.12±2.48 |
| 100 | 10.44±1.99 | 22.93±5.92 | 40.00±4.81 | 57.66±2.94 |
| 200 | 9.02±3.19 | 14.38±0.40 | 24.46±3.86 | 44.56±1.24 |

Tabela 36. Ułamek wolnej frakcji 2-OH-IMI i 2-OH-DMI (wyrażony w %) w roztworach AAG bez i w obecności CBZ (każda wartość stanowi średnią z 4 pomiarów).

| Stężenie AAG (mg/100 ml) | f_u 2-OH-IMI | f_u 2-OH-IMI (+CBZ) | f_u 2-OH-DMI | f_u 2-OH-DMI (+CBZ) |
|--------------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------------|
| 10 | 86.54±4.03 | 87.75±2.78 | 87.26±3.78 | 89.02±9.41 |
| 30 | 65.24±2.67 | 70.32±1.20 | 70.42±7.60 | 72.00±4.94 |
| 50 | 55.37±7.08 | 60.23±4.70 | 59.42±7.76 | 65.62±7.35 |
| 80 | 43.40±0.51 | 49.25±1.84 | 47.13±1.49 | 52.36±1.47 |
| 100 | 37.08±5.16 | 45.43±5.16 | 43.98±1.98 | 49.24±3.77 |
| 200 | 24.00±5.24 | 29.24±5.24 | 32.80±1.98 | 35.42±3.72 |

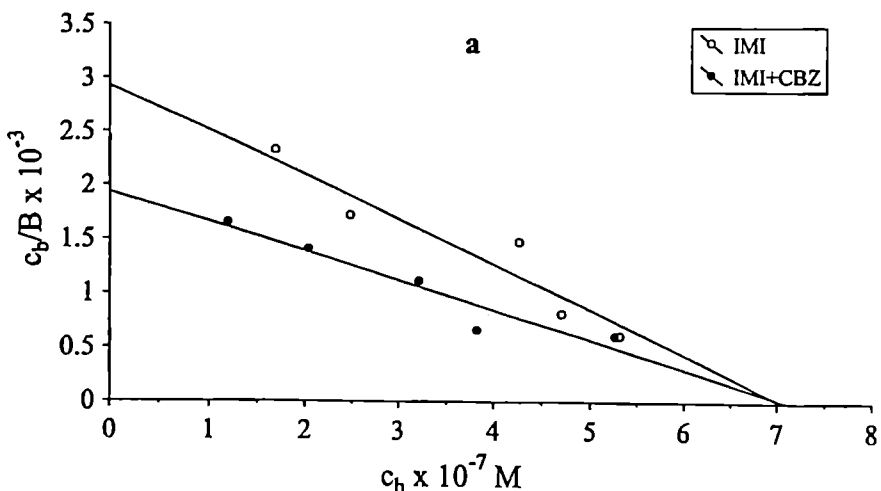
zebrano analogiczne wyniki badań wiązania IMI i jej metabolitów z AAG otrzymane przy stężeniach tego białka wahających się od 10 do 200 mg/100 ml (2.27 - 45.5 μ M). Jak wynika z danych zawartych w tych tabelach, podobnie jak w przypadku HSA ułamek wolnej frakcji IMI i DMI dla większości stężeń był istotnie większy w obecności CBZ. Zjawiska tego nie zaobserwowano w przypadku 2-OH-IMI i 2-OH-DMI. Ilustracją omówionych powyżej zależności są wykresy przedstawione na rycinie 35.

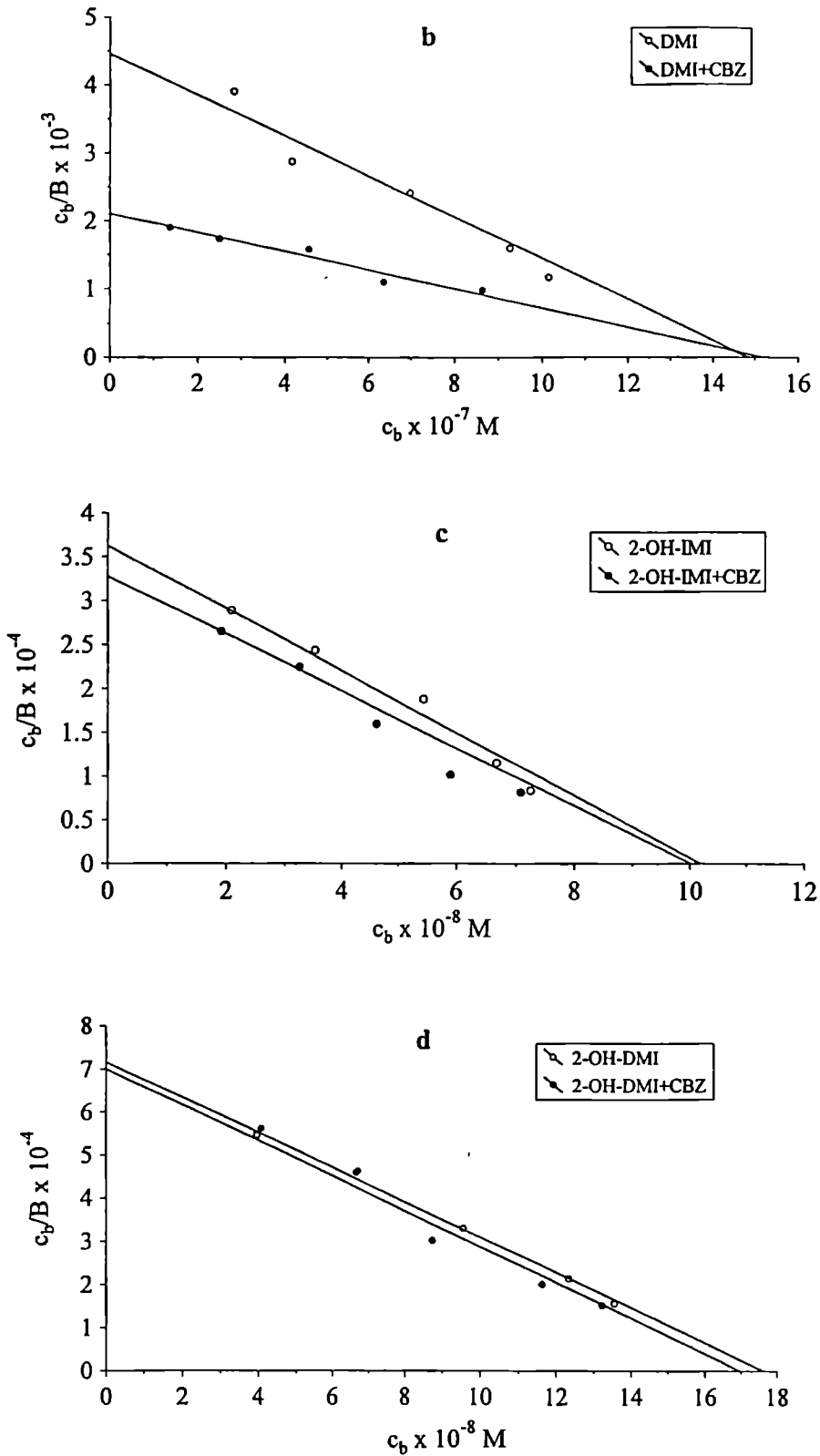




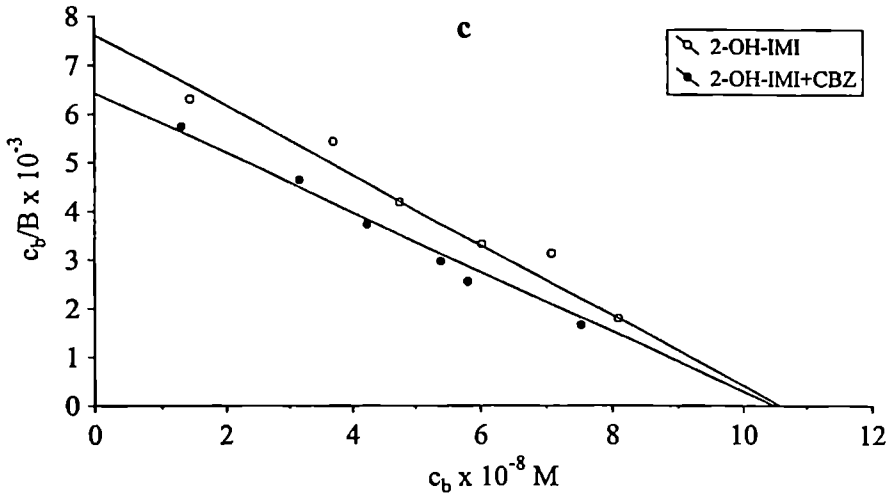
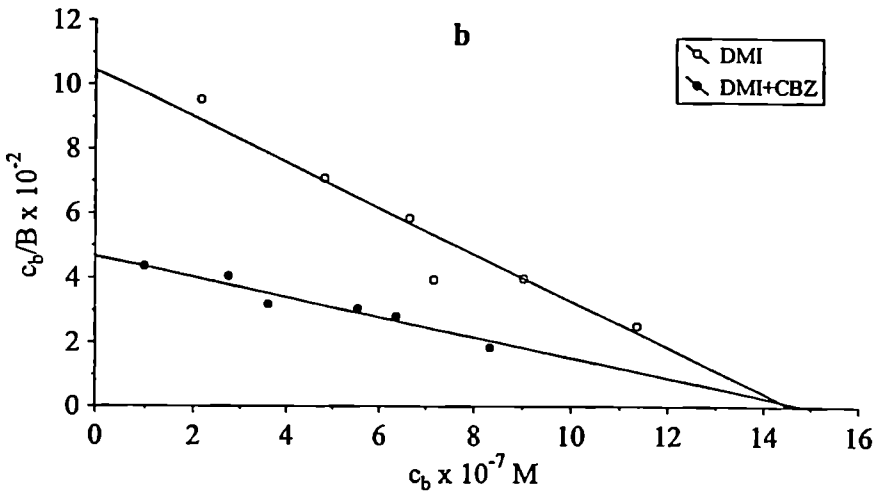
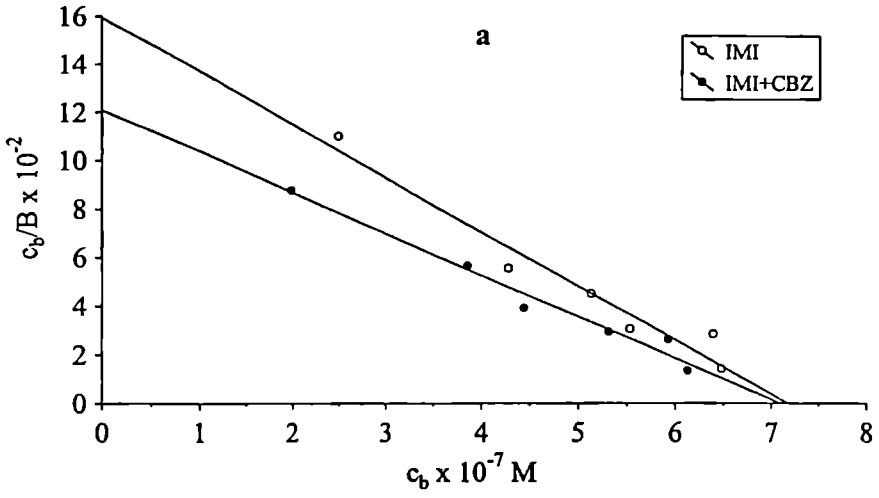
Rycina 35. Wykresy zależności ułamka wolnej frakcji IMI i DMI w roztworach o różnych stężeniach HSA (a) i AAG (b) wyznaczone bez i w obecności CBZ.

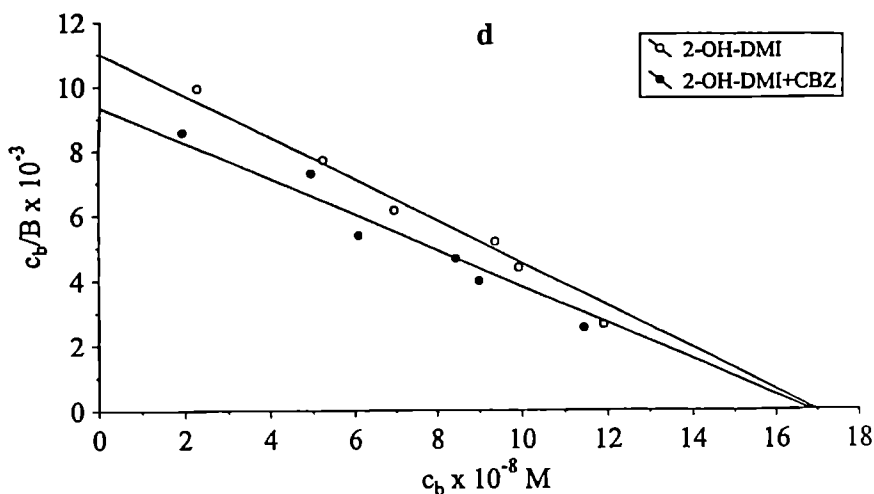
W oparciu o uzyskane w badaniach *in vitro* stężenia wolnej frakcji IMI i jej metabolitów przy różnych stężeniach HSA oraz AAG obliczono stałe wiązania tych związków z obydwoma białkami bez i w obecności CBZ, stosując do tego celu metodę zaproponowaną przez Romera [171]. Zgodnie z tą metodą przedstawiono wykresy zależności stosunku stężenia leku związanego do stężenia określonego białka (c_b/B) jako funkcję stężenia leku związanego (c_b) (ryciny 36 i 37). Stosując test równoległości prostych wykazano, że ich współczynniki kierunkowe, odpowiadające stałym wiązania przed i po dodaniu CBZ, różniły się istotnie w przypadku IMI oraz DMI i to zarówno w roztworach HSA jak i AAG ($p < 0.05$). Podobne zależności badane dla hydroksymetabolitów wykazały, że CBZ nie wpływa w sposób istotny





Rycina 36. Wykresy zależności stosunku stężenia leku związanego do stężenia HSA (c_b/B) jako funkcji stężenia leku związanego (c_b) dla IMI (a), DMI (b), 2-OH-IMI (c) i 2-OH-DMI (d) wyznaczone bez i w obecności CBZ. Każdy punkt jest medianą z 4 pomiarów.





Rycina 37. Wykresy zależności stosunku stężenia leku związanego do stężenia AAG (c_f/B) jako funkcji stężenia leku związanego (c_b) dla IMI (a), DMI (b), 2-OH-IMI (c) i 2-OH-DMI (d) wyznaczone bez i w obecności CBZ. Każdy punkt jest medianą z 4 pomiarów.

($p > 0.1$) na ich stałe wiązania z HSA oraz AAG. Stałe wiązania IMI i jej metabolitów z HSA i AAG bez i w obecności CBZ zebrano w tabeli 37.

Tabela 37. Stałe wiązania IMI i jej metabolitów z albuminą ludzką (K_{HSA}) i kwaśną α_1 -glikoproteiną (K_{AAG}) wyznaczone metodą Romera.

| Związek | $K_{HSA} (M^{-1})$ | r | $K_{HSA} (M^{-1})$ | r |
|----------|--------------------|------|--------------------|------|
| | w obecności CBZ | | | |
| IMI | 4.15×10^3 | 0.97 | 2.72×10^3 | 0.98 |
| DMI | 3.05×10^3 | 0.98 | 1.38×10^3 | 0.99 |
| 2-OH-IMI | 3.53×10^3 | 0.98 | 3.27×10^3 | 0.96 |
| 2-OH-DMI | 4.04×10^3 | 0.99 | 4.15×10^3 | 0.98 |
| | $K_{AAG} (M^{-1})$ | r | $K_{AAG} (M^{-1})$ | r |
| | w obecności CBZ | | | |
| IMI | 2.22×10^5 | 0.98 | 1.73×10^5 | 0.99 |
| DMI | 7.17×10^4 | 0.97 | 3.13×10^4 | 0.98 |
| 2-OH-IMI | 7.01×10^4 | 0.99 | 6.23×10^4 | 0.99 |
| 2-OH-DMI | 6.49×10^4 | 0.99 | 5.55×10^4 | 0.98 |

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rzetelna interpretacja wyników badań farmakokinetycznych wymaga stosowania odpowiednio precyzyjnej, swoistej i czulej metody analitycznej. Wymagania te są szczególnie duże w przypadku badań klinicznych z uwagi na możliwość występowania aktywnych metabolitów, równoczesnego stosowania innych leków, małą objętość analizowanych próbek biologicznych lub niskie stężenia leku po podaniu dawek terapeutycznych. Z praktycznego punktu widzenia istotną rolę odgrywa także pracochłonność i czas trwania analizy oraz koszty prowadzonych badań [74, 93, 99, 141, 142, 160].

Opracowana w ramach niniejszej pracy metoda analityczna z zastosowaniem HPLC umożliwiła równoczesne oznaczenie IMI i jej trzech aktywnych metabolitów: DMI, 2-OH-IMI i 2-OH-DMI oraz niektórych innych leków podawanych łącznie z TLPD np.: LVP czy PER, lub po zmodyfikowaniu warunków analizy, także na oznaczenie CBZ i jej aktywnego metabolitu CBZE. Analizy były prowadzone w warunkach izokratycznych z zastosowaniem techniki faz odwróconych. Czas trwania pojedynczego oznaczenia był stosunkowo krótki i nie przekraczał 20 min. w przypadku IMI i metabolitów oraz 10 min dla CBZ i jej epoksydu, co pozwalało na analizę nawet kilkudziesięciu próbek w ciągu dnia.

Jednoetapowe procesy ekstrakcji badanych związków z materiału biologicznego były proste i charakteryzowały się stosunkowo wysoką wydajnością rzędu 80-90%, porównywalną z wydajnością uzyskaną w pracach innych autorów [8, 57, 60, 109, 125, 170, 185].

Opracowana metoda charakteryzowała się zadawalającą precyzją wyrażoną poprzez współczynnik zmienności (CV), który dla różnych stężeń nie przekraczał 10% oraz wysoką czułością rzędu kilku ng/ml, pozwalającą z łatwością oznaczać stężenia badanych leków i ich metabolitów w surowicy chorych leczonych przewlekłe IMI lub CBZ.

Wszystko to powoduje, że metoda ta jest nie tylko porównywalna ze zautomatyzowaną metodą FPIA, ale z uwagi na większą swoistość i czułość może być bardziej przydatna w badaniach interakcji w fazie farmakokinetycznej lub badaniu stężeń wolnej frakcji leku.

Metoda ultrafiltracji, którą zastosowano do oddzielania wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oraz CBZ i jej epoksydu, charakteryzowała się dużą powtarzalnością i stosunkowo krótkim czasem trwania analizy, co czyni ją przydatną w praktyce klinicznej. Cały proces oddzielania wolnej frakcji prowadzono w warunkach fizjologicznego pH i temperatury. Zachowanie w/w warunków było istotne, gdyż jak wykazano w innych pracach, wzrost pH o 0.4 jednostki zmniejszał ułamek wolnej frakcji IMI i AMI do 75% ich wartości początkowej [28]. W podobnych badaniach stwierdzono, że wzrost pH z 7.3 do 7.5 powodował wzrost wiązania TLPD z białkami osocza z 96 do 98%, zmniejszając tym samym o połowę stężenie wolnej frakcji leku [92].

Badania dotyczące wpływu temperatury na ułamek wolnej frakcji DMI wykazały, że wraz ze wzrostem temperatury z 4 do 30°C ułamek wolnej frakcji DMI (293 ng/ml) wzrósł o 30% [23], natomiast ułamek wolnej frakcji CBZ wzrastał nawet o 50% przy zmianie temperatury z 22 do 37°C [52, 88, 167].

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza stężeń badanego leku z zastosowaniem metody FPIA pozwoliła na globalną ocenę stężeń stacjonarnych IMI+DMI. Wyniki tych oznaczeń wykazały, że podobnie jak we wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym Zakładzie [189, 190], uzyskanie stężeń IMI i jej metabolitu DMI w zakresie terapeutycznym zapewniało u większości chorych pomyślny efekt kliniczny (obniżenie punktacji w HDRS>50%). Znaczne przekroczenie zakresu terapeutycznego, jakie obserwowano u pewnej grupy tych chorych, sprzyjało występowaniu nasilonych efektów niepożądanych (ADR=3), przy równoczesnym braku działań terapeutycznych. Stanowiło to wskazanie do zmiany założonego leczenia, a pomiar stężenia w przypadku tych chorych stanowił racjonalną

podstawę do podjęcia takiej decyzji. Metoda FPIA nie pozwoliła jednak na ocenę udziału poszczególnych metabolitów, jak również wolnej frakcji leku w obserwowanych efektach terapeutycznych oraz niepożądanych. Możliwości takie dały badania stężeń całkowitych oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów przeprowadzone u chorych z zastosowaniem metody HPLC.

Wyniki przeprowadzonych badań z zastosowaniem tej metody analitycznej wykazały duże międzyosobnicze zróżnicowanie stężeń całkowitych oraz wolnej frakcji IMI i jej metabolitów oznaczonych w surowicy badanych chorych po podaniu znormalizowanych dawek tego leku. Wyniki te potwierdziły wcześniejsze obserwacje uzyskane przez innych autorów, głównie w odniesieniu do zróżnicowania stężeń całkowitych TLPD [81, 59, 159, 205]. Wykazano także, że proces wiązania IMI i jej metabolitów z białkami osocza badanych chorych leczonych IMI w monoterapii i w leczeniu skojarzonym z neuroleptykami ma charakter liniowy.

Obliczona na podstawie stężeń całkowitych oraz wolnej frakcji wartość ułamka wolnego leku wynosząca w przypadku IMI $5.4 \pm 4.7\%$ była porównywalna z wynikami innych prac, gdzie do oddzielania wolnej frakcji IMI zastosowano metodę ultrafiltracji lub filtrację na żelu, a w których wartość ta wahała się w granicach od 4.2% do 5,2% [23, 47, 102]. Podobnie była ona zbliżona do wyników badań, w których ułamek wolnej frakcji IMI określany metodą *in vivo* tj. poprzez pomiar stosunku stężeń CSF/osocze wynosił 8.3% [86]. Natomiast wartość ta różniła się znacznie w odniesieniu do prac, w których zastosowano dializę równowagową [28, 66, 72, 111, 149, 156, 198], gdzie otrzymane wartości ułamka wolnej frakcji IMI wahały się w granicach od 7.9 do 41%. Przyczynę tak znacznego zróżnicowania w wartościach tego ułamka przy zastosowaniu do oddzielania wolnej frakcji IMI dializy równowagowej należy upatrywać m. in. w długiej, trwającej niekiedy nawet 36 godzin inkubacji badanych próbek w temperaturze 37°C [156]. Mogło to prowadzić do zmian strukturalnych niektórych białek osocza, głównie labilnych lipoprotein [14, 26]. Ułamek wolnej frakcji DMI, wyznaczony dla populacji chorych badanych w niniejszej pracy był, podobnie jak dla innych demetylowych pochodnych TLPD [23, 28, 86, 87, 151], wyższy w stosunku do leku macierzystego i wynosił $12.8 \pm 5.0\%$. Wartość ta była zbliżona do uzyskanej metodą pomiaru stosunku stężeń

CSF/osocze w grupie 23 pacjentów psychiatrycznych [86], gdzie wynosiła 12.7%. Różniła się natomiast nieznacznie od wartości podanych w pracach Muscettola [134], Brinkschulte [28] i Borgi [23], w których wynosiła odpowiednio: 15%, 15.3 ± 1.6 i 9.5 ± 1.4 %. W przypadku ostatniej wartości różnice te mogły być spowodowane tym, że w badaniach stosowano krew pobraną od zdrowych ochotników. Wyznaczone w niniejszej pracy ułamki wolnej frakcji hydroksymetabolitów czyli 2-OH-IMI i 2-OH-DMI wynosiły odpowiednio 24.2 ± 15.6 % oraz 26.7 ± 7.8 % i jak dotąd nie znalazły odniesienia w piśmiennictwie, gdyż brak jest danych na ten temat, zarówno dla pacjentów psychiatrycznych jak i zdrowych ochotników. Wprawdzie Potter [157] wyznaczył ułamek wolnej frakcji 2-OH-DMI równy 16% w grupie 8 chorych metodą pomiaru stosunku stężeń CSF/osocze, ale chorzy ci otrzymywali DMI a nie IMI. Natomiast w pracach dotyczących innych TLPD [27, 154] wykazano np., że obie optycznie czynne pochodne 10-OH-NT były o około 2 do 3-razy słabiej związane z białkami osocza niż NT.

Jak wykazały wyniki niniejszej pracy w badanej populacji chorych ułamek leku wolnego był znacznie zróżnicowany, przy czym najsilniej zaznaczone różnice wystąpiły w przypadku IMI i jej hydroksylowej pochodnej. Zróżnicowanie to, zdaniem niektórych autorów, może stanowić wskazanie do monitorowania stężeń wolnego leku [12, 14, 26, 72, 201].

W poszukiwaniu czynników wpływających w warunkach klinicznych na ułamek wolnej frakcji IMI i jej metabolitów wykazano w badanej grupie chorych, podobnie jak w pracach innych autorów [30, 66, 149], brak korelacji pomiędzy tym parametrem a stężeniem HSA, głównie ze względu na małe międzyosobnicze zróżnicowanie w stężeniu tego białka. Podobnie małe zróżnicowanie stężenia bilirubiny (mieszczącego się w badanej grupie chorych w zakresie normy) powodowało stosunkowo słabą korelację pomiędzy ułamkiem wolnej frakcji IMI i jej metabolitów a stężeniem bilirubiny. Zdaniem wielu autorów [12, 56, 113, 172, 202], warunkiem wypierania leków z ich połączeń z albuminą jest występowanie odpowiednio wysokich stężeń bilirubiny. Wykazano ponadto, że ułamek wolnej frakcji IMI malał wraz z wiekiem badanych chorych, podobnie jak w pracy Burch dotyczącej AMI i NT [38].

Z analizy stężeń IMI i jej metabolitów wynika, że tak jak to wykazano w innych pracach [81, 79, 186], metabolitem dominującym była DMI, która w surowicy badanych chorych osiągała wyższe stężenia, zarówno całkowite jak i wolnej frakcji. Ponieważ o wynikach leczenia depresji decydują nie tylko stężenia leku macierzystego osiągnięte we krwi chorych, ale także aktywnych metabolitów, które jak przedstawiono w części teoretycznej, wykazują inny profil działania, stąd istotny wpływ na efekt terapeutyczny będzie miała wzajemna relacja ich stężeń. W badaniach innych autorów obserwowano, że u 85% chorych leczonych IMI, u których nastąpiła poprawa stanu klinicznego, stosunek stężeń IMI/DMI mieścił się w przedziale 0.4 - 1.0. Przyjęto, że "idealna" jego wartość wynosi około 0.7 [162]. Wyniki niniejszej pracy wykazały, że u chorych z pozytywną odpowiedzią terapeutyczną (obniżenie punktacji w HDRS > 50%) leczonych IMI w monoterapii, wartości stosunku stężeń IMI/DMI w odniesieniu do stężeń całkowitych wynosiły 1.16, natomiast wolnej frakcji 0.57. W przypadku chorych bez efektu (obniżenie punktów w HDRS < 50%), stosunki te dla stężeń całkowitych były podobne, natomiast dla wolnej frakcji były ponad dwukrotnie niższe. Otrzymane wyniki wykazały także, że wzrost stężenia wolnej frakcji DMI zmniejszał w badanej grupie chorych efektywność leczenia. Stąd można przypuszczać, że w interpretacji wyników leczenia w oparciu o kryteria farmakokinetyczne bardziej przydatne będzie oznaczanie nie tyle całkowitego stężenia, co raczej wolnej frakcji leku macierzystego i jego metabolitów.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że ocena ilościowa wzajemnych relacji pomiędzy IMI i DMI a ich hydroksylowymi pochodnymi zależna była od tego, czy odnoszono ją do stężeń całkowitych czy wolnej frakcji. Stosunki stężeń wolnej frakcji obu hydroksylowych pochodnych do odpowiadających im stężeń wolnej frakcji leków macierzystych obliczone dla badanej grupy chorych były istotnie wyższe od podobnych stosunków wyznaczonych dla stężeń całkowitych. Stężenia wolnej frakcji 2-OH-IMI i 2-OH-DMI stanowiły odpowiednio 63.6% i 93.6% stężeń wolnej frakcji IMI i DMI, podczas gdy analogiczny odsetek obliczony dla stężeń całkowitych wynosił odpowiednio 16.6% i 39.4%. Suma stężeń wolnej frakcji hydroksylowych pochodnych przewyższała stężenie wolnej frakcji leku macierzystego ($p < 0.002$). Ponieważ, jak przedstawiono w części teoretycznej, hydroksymetabolity TLPD

przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego, a stosunki ich stężeń do stężeń leków macierzystych są nawet wyższe w płynie mózgowo-rdzeniowym niż w osoczu, należy przypuszczać, że hydroksymetabolity mogą odgrywać istotną rolę w działaniu terapeutycznym i toksycznym IMI.

Poszukując zależności pomiędzy stężeniem wolnej frakcji leków a efektem terapeutycznym wykazano liniową korelację pomiędzy stężeniem wolnej frakcji IMI i 2-OH-IMI oraz sumą tych stężeń a efektem terapeutycznym mierzonym spadkiem punktów w HDRS. Istnienie takiej korelacji może wskazywać na udział hydroksymetabolitu IMI w efekcie terapeutycznym, głównie poprzez działanie na układ serotonergiczny, co potwierdzono w badaniach *in vitro* [49, 138, 156, 164].

Łączne podawanie TLPD i neuroleptyków stanowi przyczynę istotnej klinicznie interakcji farmakokinetycznej. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki badań potwierdziły wcześniejsze doniesienia [9, 32, 70, 78, 92, 93, 95] o hamującym wpływie LVP i PER na proces hydroksylacji IMI i DMI, co wyrażało statystycznie istotne zwiększenie stężenia obu związków i obniżenie stężenia ich hydroksylowych pochodnych. Obserwowane w tej grupie chorych stężenia całkowite IMI i DMI, pomimo niższej dawki IMI, przewyższały wartości terapeutyczne, osiągając stężenia bliskie toksycznym (suma stężeń IMI i DMI wynosiła 421.71 ± 150.81 ng/ml), natomiast w grupie kontrolnej stężenia te mieściły się w zakresie terapeutycznym i dla sumy IMI i DMI wynosiły 263.57 ± 197.82 ng/ml. Wzrostowi stężeń całkowitych IMI i DMI odpowiadało także znaczne zwiększenie stężenia wolnej frakcji tych związków w surowicy badanych chorych. Wysokie wartości tych stężeń sprzyjały zwiększeniu częstotliwości występowania i nasilenia efektów niepożądanych, wynikających głównie z antycholinergicznego działania tych leków. Analizując oddzielnie wpływ badanych neuroleptyków na stężenia IMI i jej metabolitów, stwierdzono, że LVP jest silniejszym inhibitorem hydroksylacji w porównaniu z PER oraz, że obserwowana interakcja farmakokinetyczna dotyczy głównie hydroksylacji DMI. Potwierdza to obserwacje innych autorów [92, 135], które wskazywały na podwyższenie całkowitych stężeń IMI i DMI w stanie stacjonarnym odpowiednio o 30 i 200% po podaniu LVP.

Pomiędzy LVP i PER a IMI i jej metabolitami nie stwierdzono występowania interakcji w fazie wiązania tych leków z białkami osocza, o czym świadczyły zbliżone wartości ułamka wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w obu grupach chorych poddanych leczeniu skojarzonemu i grupie kontrolnej. Badane neuroleptyki, jak wykazano w pracach innych autorów [29, 128, 131, 179], mają duże powinowactwo do białek osocza, przede wszystkim do AAG (K_{AAG} dla LVP = $0.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, a dla PER $K_{AAG} = 3.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) i co więcej, łączą się z tym samym miejscem wiążącym na AAG co TLPD. Ponadto w badaniach *in vitro*, przy zastosowanych bardzo wysokich stężeniach (rzędu μM), leki te wypierały TLPD z ich połączeń z białkami, a wypieranie zachodziło według kolejności przewidywanej na podstawie wartości stałej K_a [132]. Jednak po podaniu zwyczajowych dawek, jak to miało miejsce w niniejszej pracy, stężenia neuroleptyków we krwi były niewielkie (rzędu ng/ml), przez co nie osiągały stężenia molowego białka wiążącego, czyli nie spełniały podstawowego warunku, niezbędnego do wystąpienia interakcji w zakresie wiązania z białkami osocza [122, 155].

Oznaczone wartości stężeń całkowitych LVP wynoszące średnio $39.24 \pm 18.99 \text{ ng/ml}$ ($19.32 - 74.53 \text{ ng/ml}$) i PER równe $330.21 \pm 150.27 \text{ ng/ml}$ ($60.71 - 561.66 \text{ ng/ml}$) u badanych chorych z depresją endogenną były nieco wyższe od stężeń uzyskanych w pracach innych autorów, dotyczących chorych ze schizofrenią [30, 188]. Otrzymane wyniki mogą potwierdzać więc sugestię Loga [120], o możliwym hamującym wpływie TLPD na metabolizm fenotiazyn, manifestującym się wzrostem stężenia neuroleptyku.

Podobnie jak w pracach innych autorów [5, 31, 68, 96, 130, 137, 169], do najczęściej występujących efektów niepożądanych obserwowanych w badanej grupie chorych, należy zaliczyć: wysychanie śluzówek (19 chorych), hypotonię ortostatyczną (13 chorych) i zaburzenia akomodacji (4 chorych). Należy dodać, że szczególnie liczne objawy niepożądane występowały u pacjentów leczonych kombinacją IMI i LVP. Przyczynę tej nasilonej toksyczności mogły stanowić z jednej strony istotnie wyższe stężenia zarówno całkowite jak i wolnej frakcji IMI i DMI, z drugiej zaś działania niepożądane wywołane przez samą LVP. Wyniki niniejszej pracy potwierdziły obserwacje dotyczące stosowania także innych TLPD, wskazujące na brak ścisłej korelacji pomiędzy stężeniem całkowitym lub wolnej frakcji IMI

i jej metabolitów a występowaniem czy nasileniem objawów niepożądanym [6, 21, 89, 93, 147, 203]. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach wykazano istotnie wyższy ułamek wolnej frakcji 2-OH-IMI u chorych z umiarkowanymi objawami niepożądanymi. Analizując związek pomiędzy stężeniem wolnej frakcji IMI i jej metabolitów a rodzajem występujących efektów niepożądanych, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie (ANOVA) pomiędzy grupami chorych, u których dominowały poszczególne objawy. Jedynie u pacjentów z zaburzeniami akomodacji wystąpiły szczególnie wysokie stężenia wolnej frakcji IMI i DMI.

Niniejsze badania wykazały, że łączne podawanie IMI i CBZ prowadzi do interakcji farmakokinetycznej w fazie metabolizmu i wiązania z białkami. Złożony charakter interakcji jaka może zachodzić pomiędzy tymi lekami, głównie poprzez indukcję CYP 3A4 odpowiedzialnego za demetylację IMI, daje trudne do przewidzenia w warunkach klinicznych wartości stężeń leków macierzystych oraz ich aktywnych metabolitów (DMI, 2-OH-IMI, 2-OH-DMI i CBZE). W przeprowadzonych badaniach, podobnie jak w pracach innych autorów [35, 115] wykazano, że w 2 tygodnie po włączeniu CBZ do terapii nastąpiło istotne obniżenie stężeń IMI i DMI w porównaniu do stanu przed rozpoczęciem leczenia skojarzonego, a u niektórych pacjentów stężenia te osiągnęły nawet wartości uważane za subterapeutyczne. Stężenia hydroksymetabolitów, w przeciwieństwie do sugestii autorów innych prac [10] były w przeprowadzonych badaniach niższe, lecz nie różniły się istotnie w stosunku do stężeń oznaczonych przed rozpoczęciem podawania CBZ. Wyniki tych badań potwierdziły, że CBZ w pierwszych tygodniach stosowania indukuje nie tylko własny metabolizm [15, 101, 163, 165], ale także podawanych równolegle TLPD. Nie można wykluczyć, że CBZ indukuje także inne, oprócz wymienionego wyżej, izoenzymy cytochromu P450 powodujące obniżenie stężenia DMI (np. poprzez tworzenie didemetylowej pochodnej) czy enzymy przyspieszające eliminację hydroksymetabolitów (np. glukuronylotransferazę) [148].

W przypadku stężeń wolnego leku, stwierdzono wzrost stężeń wolnej frakcji IMI (o 21%), 2-OH-IMI (o 25%) i 2-OH-DMI (o 8%), zaś stężenie wolnej frakcji DMI uległo obniżeniu o 17%, lecz obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Oznacza to w praktyce, że po włączeniu CBZ do leczenia stężenia wolnej frakcji IMI i jej metabolitów,

odpowiedzialne za działanie terapeutyczne pozostały nie zmienione, pomimo istotnego spadku stężeń całkowitych. Znalazło to odzwierciedlenie w ocenie stanu klinicznego badanych chorych wyrażającej się istotną poprawą mierzoną spadkiem punktacji w HDRS. Na podstawie tych wyników, wbrew sugestiom innych autorów [35, 115, 145, 183] można przypuszczać, że nie istnieje potrzeba zwiększania dawek IMI przy równoczesnym jej podawaniu z CBZ.

Obserwowane w niniejszej pracy różnice w wartościach ułamka wolnej frakcji IMI i DMI przed i po włączeniu CBZ do leczenia mogą świadczyć o wystąpieniu w warunkach klinicznych interakcji w zakresie wiązania tych leków z białkami osocza. Potwierdzeniem tego przypuszczenia mogą być wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy.

Analizując wyniki tych badań w odniesieniu do warunków *in vivo* trzeba mieć na uwadze fakt, że w przypadku leków wiążących się z więcej niż jednym białkiem osocza, nawet znaczne wypieranie z jednego białka, może nie powodować widocznego wzrostu stężenia leku wolnego w surowicy, która zawiera wszystkie białka wiążące. Jest to szczególnie ważne dla leków wypieranych z białek o dużym powinowactwie, a małej pojemności wiązania, jakim jest np. AAG. Wówczas inne białko o dużej pojemności np. albumina może "buforować" wszelkie zmiany w ułamku leku wolnego, spowodowane wypieraniem stosunkowo małej ilości leku z białka o małej pojemności [121].

Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że zmiany stężenia HSA i AAG powodują istotne zmiany w ułamku wolnej frakcji IMI i każdego z jej aktywnych metabolitów. Przy czym mało prawdopodobnej w warunkach *in vivo* zmianie stężenia HSA z 0.5 do 6 g/100 ml towarzyszyło w niniejszej pracy zaledwie od 2.5 do 3-krotne obniżenie ułamka wolnej frakcji IMI i jej metabolitów. W przypadku możliwej u pacjentów zmiany stężenia AAG z 10 do 200 mg/100 ml zaobserwowano podobny, bo od 2.5 do 3.5-krotny spadek ułamka wolnej frakcji DMI i obu hydroksymetabolitów oraz ponad 7-krotny spadek tego ułamka dla IMI. Potwierdza to tezę o decydującym wpływie AAG na wiązanie IMI z białkami osocza [66, 107].

Porównując uzyskane wyniki badań z wartościami wyznaczonymi np. dla IMI metodą dializy równowagowej przez innych autorów, można zauważyć, że dla fizjologicznych stężeń

izolowanej AAG otrzymany ułamek związanej IMI równy 71.92% był zbliżony do wartości podanych w pracach Ferry [64] oraz Müller [132], wynoszących odpowiednio 69% i 70.7%.

Dodanie CBZ w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, czyli mieszczącym się w zakresie stężeń terapeutycznych dla tego leku [12, 19, 91], spowodowało wzrost ułamka wolnej frakcji IMI i DMI w roztworach HSA i AAG. Wypieranie DMI z jej miejsc wiążących na obu białkach było znacznie silniejsze w porównaniu z IMI, o czym świadczyły niższe wartości stałych K_{HSA} i K_{AAG} dla tego metabolitu wyznaczone w obecności CBZ.

Analizując stężenia wolnej frakcji IMI i jej metabolitów w grupie pacjentów psychiatrycznych leczonych równocześnie CBZ, u których wystąpiły stosunkowo wysokie ($>7 \mu\text{g/ml}$) stężenia tego leku (pacjenci W.S., E.Ko., E.Kł.), zaobserwowano istotnie wyższy ułamek wolnej frakcji DMI w stosunku do pozostałych chorych tej subpopulacji ($p < 0.03$).

Wielkości stałych K_{HSA} i K_{AAG} hydroksymetabolitów były zbliżone do wartości tych stałych dla DMI, ale przy zastosowanych w niniejszych badaniach niskich stężeniach tych metabolitów, nie zaobserwowano wpływu CBZ na ich powinowactwo do białek wiążących. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* wykazały ponadto, że ultrafiltracja może z powodzeniem być wykorzystana także do wyznaczania stałych wiązania leku z białkami, o czym świadczą wielkości wyznaczonych w niniejszej pracy stałych wiązania IMI i DMI z HSA i AAG zbliżone do danych z piśmiennictwa [107, 110, 131], gdzie posługiwano się najczęściej w celu ich określenia metodą dializy równowagowej. Występujące niewielkie różnice mogły być spowodowane m. in. różnymi źródłami pozyskiwania przez producenta AAG (mocz, surowica, osocze) lub różnymi metodami izolowania tego białka [54]. W żadnym z dostępnych źródeł nie podano, jak dotąd, wartości stałych wiązania dla hydroksymetabolitów IMI i DMI.

Całkowite stężenia CBZ i CBZE oznaczone w surowicy badanych chorych psychiatrycznych, pomimo stosowania niższych dawek CBZ (400.0 ± 81.65 vs 921.43 ± 368.32 mg/dzień, $p < 0.00004$), nie różniły się istotnie od stężeń tych związków w grupie pacjentów neurologicznych poddanych kuracji CBZ w monoterapii. Może to potwierdzać wcześniejsze doniesienia o hamowaniu przez TLPD metabolizmu tego leku [45, 100]. Wartości ułamków wolnej frakcji CBZ i CBZE w badanej grupie chorych psychiatrycznych, a więc w obecności

IMI, wynoszące odpowiednio $26.3 \pm 5.8\%$ i $47.7 \pm 9.7\%$, były istotnie wyższe od ułamków wolnej frakcji tych związków wyznaczonych w grupie neurologicznej. Obserwowane różnice mogą być spowodowane zwiększonym stężeniem AAG u chorych neurologicznych poddanych długotrwałemu leczeniu. Wykazano, że niektóre leki przeciwdrgawkowe, jak CBZ lub fenytoina, zwiększają stężenie AAG [192]. Efektu tego nie należy oczekiwać w badanej grupie chorych psychiatrycznych z uwagi na stosunkowo krótki, bo zaledwie 2-tygodniowy okres leczenia CBZ.

Fakt, że część chorych, którym włączono CBZ otrzymywało również neuroleptyki nie miało istotnego znaczenia w interpretacji otrzymanych wyników, ponieważ LVP i PER były podawane tym chorym przez cały czas trwania terapii. Również stosowanie benzodiazepin, głównie diazepamu u niektórych chorych, nie mogło wpływać na badane interakcje, ponieważ jak wykazano w wielu pracach [43, 92, 95], leki te nie oddziałują na metabolizm TLPD i słabo wiążą się z AAG [1]. Wpływ pochodnych benzodiazepiny na wiązanie TLPD z białkami osocza zaobserwowany w badaniach *in vitro* [107], dotyczył jedynie stężeń tych leków znacznie przekraczających wartości występujące we krwi po podaniu zwyczajowych dawek.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że kierowanie się w postępowaniu klinicznym tylko zależnością dawka - efekt jest w przypadku TLPD zawodne, co znalazło odzwierciedlenie w zróżnicowaniu stężeń oraz obserwowanych efektów po podaniu znormalizowanych dawek. Możliwość oznaczania metabolitów oraz wolnej frakcji leku pozwoliła ocenić ich udział w występujących efektach oraz wyjaśnić mechanizm zachodzących interakcji. Przyczyny niekorzystnych efektów często należy poszukiwać nie tyle w niewłaściwej dawce, ale także we wzajemnym stosunku stężeń metabolitów do leku macierzystego. Dotychczasowe wyniki badań sugerują [144], że źródłem tego mogą być m. in. czynniki genetyczne lub, jak wykazano w niniejszej pracy, skutki zachodzących interakcji.

7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Stężenia wolnej frakcji IMI i jej aktywnych metabolitów wykazały, podobnie jak ich całkowite stężenia, duże międzyosobnicze zróżnicowanie, pomimo stosowania znormalizowanych dawek IMI.
2. Otrzymane wyniki wydają się potwierdzać udział wszystkich oznaczanych metabolitów w ustalaniu zależności stężenie - efekt wyrażającej się w warunkach klinicznych działaniem terapeutycznym lub występowaniem efektów niepożądanych.
3. Wykazano, że stosunki stężeń wolnej frakcji IMI do stężeń wolnej frakcji jej metabolitów pozostają w lepszej zależności z obserwowanymi efektami terapeutycznymi niż podobne stosunki stężeń całkowitych.
4. Leczenie skojarzone depresji IMI z neuroleptykami lub IMI z CBZ jest źródłem istotnej klinicznie interakcji przede wszystkim w procesie metabolizmu tych leków.
5. Spośród leków stosowanych w skojarzonym leczeniu z IMI, tylko CBZ może powodować interakcję w procesie wiązania IMI oraz DMI z białkami osocza badanych chorych. Możliwość występowania tej interakcji potwierdziły także wyniki badań *in vitro*.
6. Monitorowanie stężenia wolnej frakcji TLPD jest pomocne w wyjaśnianiu mechanizmu zachodzącej interakcji, natomiast w rutynowym postępowaniu klinicznym wystarczające jest monitorowanie stężeń całkowitych.

8. STRESZCZENIE

Pomimo wprowadzenia do lecznictwa w ostatnich latach dużej liczby leków przeciwdepresyjnych tzw. "drugiej generacji" np. fluoksetyny, fluwoksaminy czy mianseryny, trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TLPD) odgrywają nadal kluczową rolę w leczeniu depresji endogennych, występujących w przebiegu chorób afektywnych. Jednym z czynników zwiększających skuteczność leczenia TLPD jest monitorowanie ich stężenia w surowicy chorych. Wykazano, że skuteczność leczenia w przypadku monitorowania zwiększa się z około 40 - 50% do około 70 - 75%.

W ostatnich latach wielu autorów zwraca uwagę, że w przypadku TLPD, oprócz obecności aktywnych metabolitów, także międzyosobnicze różnice w wiązaniu tych leków z białkami osocza, uwarunkowane czynnikami fizjologicznymi i patofizjologicznymi mogą stanowić jeden z istotnych czynników wpływających na przebieg zależności stężenie - efekt terapeutyczny. Ponieważ TLPD należą do leków silnie wiążących się z białkami osocza powstaje pytanie, jaką rolę odgrywa to wiązanie w ocenie kinetyki TLPD w organizmie oraz w ustaleniu zależności stężenie - efekt.

Celem niniejszej pracy było określenie, na przykładzie imipraminy (IMI), roli monitorowania stężenia wolnej frakcji TLPD w ocenie kinetyki tych leków w warunkach rutynowego postępowania klinicznego.

Badania przeprowadzono ogółem w grupie 66 chorych głównie z dużym zespołem depresyjnym (wg kryteriów DSM-III-R Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego) leczonych w Klinice Psychiatrii Dorosłych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Chorzy ci byli leczeni imipraminą w dawce 2 lub 3 mg/kg/dzień, ponadto otrzymywali

także inne leki wspomagające, najczęściej neuroleptyki pochodne fenotiazyny oraz karbamazepinę (CBZ).

W trakcie realizacji podjętych badań oznaczano w stanie stacjonarnym stężenia całkowite oraz wolnej frakcji IMI i jej trzech aktywnych metabolitów w surowicy badanych chorych leczonych IMI w monoterapii oraz w leczeniu skojarzonym z CBZ lub neuroleptykami (LVP i PER), stosując do tego celu metodę HPLC. Oddzielanie wolnej frakcji badanych związków przeprowadzono *in vitro* z wykorzystaniem metody ultrafiltracji. Oznaczone stężenia odnoszono następnie do efektu terapeutycznego oraz działań niepożądanych.

Ponieważ w wyniku podawania CBZ obserwowano w warunkach *in vivo* zmiany ułamka wolnej frakcji IMI oraz DMI, podjęto badania nad wpływem CBZ na parametry wiązania IMI i jej metabolitów z głównymi białkami wiążącymi te leki tzn. z albuminą i kwaśną α_1 -glikoproteiną w warunkach *in vitro*.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że pomimo stosowania znormalizowanych dawek IMI, stężenia wolnej frakcji tego leku i jego trzech aktywnych metabolitów, podobnie jak stężenia całkowite tych związków, wykazują duże międzyosobnicze zróżnicowanie. Otrzymane wyniki wydają się potwierdzać udział wszystkich oznaczanych metabolitów w ustalaniu zależności stężenie - efekt, wyrażającej się w warunkach klinicznych działaniem terapeutycznym lub występowaniem efektów niepożądanych. Wykazano ponadto, że stosunki stężeń wolnej frakcji IMI do stężeń wolnej frakcji jej metabolitów pozostają w lepszej zależności z obserwowanymi efektami terapeutycznymi niż podobne stosunki stężeń całkowitych. Leczenie skojarzone depresji IMI z neuroleptykami lub z CBZ jest źródłem istotnej klinicznie interakcji przede wszystkim w procesie metabolizmu tych leków, ponadto równoczesne podawanie IMI i CBZ może powodować również interakcję w procesie wiązania IMI oraz DMI z białkami osocza badanych chorych. Możliwość występowania tej interakcji potwierdziły także wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań *in vitro*. W oparciu o uzyskane wyniki należy stwierdzić, że monitorowanie stężenia wolnej frakcji TLPD może być pomocne w wyjaśnianiu mechanizmu zachodzących interakcji, natomiast w rutynowym postępowaniu klinicznym wystarczające jest monitorowanie stężeń całkowitych tych leków.

9. PIŚMIENICTWO

1. Abel J.G., Roth E.A. Sellers E.M., Ray A.K.: Drug-plasma protein binding in Kutchin Athapaskan Indians. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1982, 32, 436-441.
2. Abernethy D.R., Greenblatt D.J., Shader R.I.: Imipramine and desipramine disposition in the elderly. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 1985, 232, 183-188.
3. Alván G., Bechtel P., Iselius L., Gundert-Remy U.: Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1990, 39, 533-537.
4. American Psychiatric Association Practice Guidelines. Practice guideline for major depressive disorder in adults. *Am. J. Psychiatry*, 1993, 150 (Suppl. 4), 1-26.
5. Amrein R., Hetzel W., Stabl M., Schmid-Burgk W.: RIMA - a new concept in the treatment of depression with moclobemide. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 1993, 7, 123-132.
6. Amsterdam J.D., Brunswick D.J., Potter L., Winokur A., Rickels K.: Desipramine and 2-hydroxydesipramine plasma levels in endogenous depressed patients. Lack of correlation with therapeutic response. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1985, 42, 361-364.
7. Asberg M., Crönholm B., Sjöqvist F., Tuck D.: Relationship between plasma level and therapeutic effect of nortriptyline. *Brit. Med. J.*, 1971, 3, 331-334.
8. Bagli M., Rao M.L., Hoflich G.: Quantification of chlorprotixene, levomepromazine and promethazine in human serum using high performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1994, 657, 141-148.
9. Balant-Gorgia A.E., Balant L.P., Genet Ch., Dayer P., Aeschlimann J.M., Garrone G.: Importance of oxidative polymorphism and levomepromazine treatment on the steady-state blood concentrations of clomipramine and its major metabolites. *Eur. J. Pharmacol.*, 1986, 31, 449-455.
10. Baldessarini R.J., Teicher M.H., Cassidy J.W.: Anticonvulsant cotreatment may increase toxic metabolites of antidepressants and other psychotropic drugs. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 1988, 8, 381-382.

11. Barre J., Chamouard J.M., Houin G., Tillement J.-P.: Equilibrium dialysis, ultrafiltration, and ultracentrifugation compared for determining the plasma-protein-binding characteristics of valproic acid. *Clin. Chem.*, 1985, 31, 60-64.
12. Barre J., Didey F., Delion F., Tillement J.-P.: Problems in therapeutic drug monitoring: free drug level monitoring. *Ther. Drug Monit.*, 1988, 10, 133-143.
13. Baumann P., Tinguely D., Schöpf J.: Increase of α_1 -acid glycoprotein after treatment with amitriptyline. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1982, 14, 102-103.
14. Bertilsson L., Braithwaite R., Tybring G., Garle M., Borga O.: Techniques for plasma protein of desmethylchlorimipramine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1979, 26, 265-271.
15. Bertilsson L., Tomson T.: Clinical pharmacokinetics and pharmacological effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide. An update. *Clin. Pharmacokinet.*, 1986, 11, 177-198.
16. Bertilsson L.: Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29, 192-209.
17. Bertz R.J., Granneman G.R.: Use of *in vitro* and *in vivo* data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.*, 1997, 32, 210-258.
18. Bickel M.H.: Binding of chlorpromazine and imipramine to red cells, albumin, lipoproteins and other blood components. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1975, 27, 733-738.
19. Bialer M., Levy R.H., Perucca E.: Does carbamazepine have a narrow therapeutic plasma concentration range? *Ther. Drug Monit.*, 1998, 20, 56-59.
20. Bjerre M., Gram L.F., Kragh-Sørensen P., Kristensen C.B., Pedersen O.L., Møller M., Thayssen P.: Dose-dependent kinetics of imipramine in elderly patients. *Psychopharmacology*, 1981, 75, 354-357.
21. Blackwell B.: Adverse effects of antidepressant drugs. Part 1: Monoamine oxidase inhibitors and tricyclics. *Drugs*, 1981, 21, 201-219.
22. Bonati M., Kanto J., Tognoni G.: Clinical pharmacokinetics of cerebrospinal fluid. *Clin. Pharmacokinet.*, 1982, 7, 312-335.
23. Borga O., Azarnoff D.L., Forshell G.P., Sjöqvist F.: Plasma protein binding of tricyclic antidepressants in man. *Biochem. Pharmacol.*, 1969, 18, 2135-2143.
24. Borga O., Piafsky K.M., Nilsen O.G.: Plasma protein binding of basic drugs. I. Selective displacement from α_1 -acid glycoprotein by tris(2-butoxyethyl) phosphate. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1977, 22, 539-544.
25. Bowers W.F., Fulton S., Thompson J.: Ultrafiltration vs equilibrium dialysis for determination of free fraction. *Clin. Pharmacokinet.*, 1984, 9 (Suppl. 1), 49-60.

26. Braithwaite R.A.: Plasma-protein binding of tricyclic antidepressants. *Postgrad. Med. J.*, 1980, 56 (Suppl. 1), 107-111.
27. Breyer-Pfaff U., Geartner H.J., Kreuter F., Scharek G., Brinkschulte M., Wiater R.: Antidepressive effect and pharmacokinetics of amitriptyline with consideration of unbound drug and 10-hydroxynortriptyline plasma levels. *Psychopharmacology*, 1982, 76, 240-244.
28. Brinkschulte M., Breyer-Pfaff U.: Binding of tricyclic antidepressants and perazine to human plasma. Methodology and findings in normals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1979, 308, 1-7.
29. Brinkschulte M., Breyer-Pfaff U.: The contribution of α_1 -acid glycoprotein, lipoproteins, and albumin to the plasma binding of perazine, amitriptyline, and nortriptyline in healthy man. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1980, 314, 61-66.
30. Brinkschulte M., Gaertner H.J., Schied H.W., Breyer-Pfaff U.: Plasma protein binding of perazine and amitriptyline in psychiatric patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1982, 22, 367-373.
31. Brøsen K., Gram L.F., Klysner R., Bech P.: Steady-state levels of imipramine and its metabolites: Significance of dose-dependent kinetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1986, 30, 43-49.
32. Brøsen K., Klysner R., Gram L.F., Otton S.V., Bech P., Bertilsson L.: Steady-state concentrations of imipramine and its metabolites in relation to the sparteine/debrisoquine polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1986, 30, 679-684.
33. Brøsen K., Gram L.F.: First-pass metabolism of imipramine and desipramine: Impact of the sparteine oxidation phenotype. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1988, 43, 400-406.
34. Brøsen K., Gram L.F.: Clinical significance of the sparteine/debrisoquine oxidation polymorphism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1989, 36, 537-547.
35. Brøsen K., Kragh-Sørensen P.: Concomitant intake of nortriptyline and carbamazepine. *Ther Drug Monit.*, 1993, 15, 258-260.
36. Brøsen K.: Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 1A2. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29 (Suppl. 1), 20-25.
37. Brøsen K.: Drug-metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Ther. Drug Monit.*, 1996, 18, 393-396.
38. Burch J.E., Roberts S.G., Raddats M.A.: Binding of amitriptyline and nortriptyline in plasma determined from their equilibrium distributions between red cells and plasma, and between red cells and buffer solution. *Psychopharmacology*, 1981, 75, 262-272.

39. Caccia S., Garattini S.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic significance of antidepressant drug metabolites. *Pharmacol. Res.*, 1992, 26, 317-329.
40. Clark D.W.J.: Genetically determined variability in acetylation and oxidation. Therapeutic implications. *Drugs*, 1985, 29, 342-375.
41. Christiansen J., Gram L.F.: Imipramine and its metabolites in human brain. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1973, 25, 604-608.
42. Cohen L.J.: Rational drug use in the treatment of depression. *Pharmacotherapy*, 1997, 17, 45-61.
43. Cresteil T., Célier C., Kremers P., Flinois J.P., Beaune Ph., Leroux J.P.: Induction of drug-metabolizing enzymes by tricyclic antidepressants in human liver: Characterization and partial resolution of cytochromes P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1983, 16, 651-657.
44. Curry S.H., Hu O.Y.-P.: Evaluation of equilibrium dialysis volume shifts: A comment. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 1984, 12, 463-465.
45. Daniel W., Netter K.J.: Metabolic interaction between imipramine and carbamazepine *in vivo* and *in vitro* in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1988, 337, 105-110.
46. Daniel W.: Pharmacokinetic interaction between imipramine and antidepressant neuroleptics in rats. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1991, 43, 197-206.
47. Danon A., Chen Z.: Binding of imipramine to plasma proteins: Effect of hyperlipoproteinemia. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1979, 25, 316-321.
48. Dawling S., Lynn K., Rosser R., Braithwaite R.: Nortriptyline metabolism in chronic renal failure: Metabolite elimination. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1982, 32, 322-329.
49. DeVane C.L., Simpkins J.W., Stout S.A.: Cerebrospinal and blood pharmacokinetics of imipramine and its active metabolites in the pregnant rats. *Psychopharmacology*, 1984, 84, 225-230.
50. DeVane C.L., Jarecke C.R.: Cyclic antidepressants. W: Evans W.E., Schentag J.J., Jusko W.J., eds.: *Applied Pharmacokinetics*, Applied Therapeutics, Inc., USA, 1992, Chapt. 33.
51. DeVane C.L.: Pharmacogenetics and drug metabolism of newer antidepressant agents. *J. Clin. Psychiatry*, 1994, 55, 12 (Suppl.), 38-47.
52. Di Salle E., Pacifici G.M., Morselli P.L.: Studies on plasma protein binding of carbamazepine. *Pharmac. Res. Comm.*, 1974, 6, 193-202.
53. Durnas C., Loi C.M., Cusack B.J.: Hepatic drug metabolism and aging. *Clin. Pharmacokinet.*, 1990, 19, 359-389.

54. Eap C.B., Cuendet C., Baumann P.: Binding of amitriptyline to alpha-1 acid glycoprotein and its variants. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 767-770.
55. Edelbroek P.M., Zitman F.G., Schreuder J.N., Rooymans H.G., Wolff F.A.: Amitriptyline metabolism in relation to antidepressive effect. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1984, 35, 467-473.
56. Ehrnebo M., Agurell S., Jalling B., Boreus L.O.: Age differences in drug binding by plasma proteins: studies on human foetuses, neonates and adults. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1971, 3, 189-193.
57. Eichelbaum M., Bertilsson L.: Determination of carbamazepine and its epoxide metabolite in plasma by high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1975, 103, 135-140.
58. Eichelbaum M., Gross A.: The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism - clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, 1990, 46, 377-386.
59. Eilers R.: Therapeutic drug monitoring for the treatment of psychiatric disorders. Clinical use and cost effectiveness. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29, 442-450.
60. El-Yazigi A., Raines D.A.: Concurrent liquid chromatographic measurement of fluoxetine, amitriptyline, imipramine, and their active metabolites norfluoxetine, nortriptyline, and desipramine in plasma. *Ther. Drug Monit.*, 1993, 15, 305-309.
61. Ene M.D., Roberts C.J.C.: Pharmacokinetics of nifedipine after oral administration in chronic liver disease. *J. Clin. Pharmacol.*, 1987, 27, 1001-1004.
62. Ereshefsky L., Tran-Johnson T., Davis C.M., LeRoy A.: Pharmacokinetic factors affecting antidepressant drug clearance and clinical effect: Evaluation of doxepin and imipramine - new data and review. *Clin. Chem.*, 1988, 34, 863-880.
63. Ereshefsky L., Riesenman C., Lam Y.W.F.: Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2D6. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29 (Suppl. 1), 10-19.
64. Ferry D.G., Caplan N.B., Cubeddu L.X.: Interaction between antidepressants and alpha₁-adrenergic receptor antagonists on the binding to alpha₁-acid glycoprotein. *J. Pharm. Sci.*, 1986, 75, 146-149.
65. Flockhart D.A.: Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29 (Suppl. 1), 45-52.
66. Freilich D.I., Giardina E.-G.V.: Imipramine binding to alpha-1-acid glycoprotein in normal subjects and cardiac patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1984, 35, 670-674.
67. Fremstad D., Bergerud K.: Plasma protein binding of drugs as influenced by blood collection methods. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 1976, 39, 570-572.

68. Furlanut M., Benetello P., Spina E.: Pharmacokinetic optimisation of tricyclic antidepressant therapy. *Clin. Pharmacokinet.*, 1993, 24, 301-318.
69. Gawrońska-Szklarz B.: Klasyfikacja enzymów mikrosomalnych cytochromu P-450. *Probl. Ter. Monit.* 1995, 6, 159-166.
70. Gex-Fabry M., Balant-Gorgia A.E., Balant L.P.: Therapeutic drug monitoring databases for postmarketing surveillance of drug-drug interactions: evaluation of a paired approach for psychotropic medication. *Therapeutic Drug Monitoring*, 1997, 19, 1-10.
71. Gibaldi M.: *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. Lea & Febiger, USA, 1977.
72. Glassman A.H., Hurwic M.J., Perel J.M.: Plasma binding of imipramine and clinical outcome. *Am. J. Psychiatry*, 1973, 130, 1367-1369.
73. Glassman A.H., Perel J.M., Shostak M., Kantor S., Fleiss J.: Clinical implications of imipramine plasma levels for depressive patients. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1977, 34, 197-204.
74. Glassman A.H., Schildkraut J.J., Orsulak P.J. et al.: Tricyclic antidepressants - blood level measurements and clinical outcome: An APA Task Force report. *Am. J. Psychiatry*, 1985, 142, 155-162.
75. Glassman A.H.: Question the experts. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 1993, 13, 296-298.
76. Gonzalez F.J., Idle J.R.: Pharmacogenetic phenotyping and genotyping. Present status and future potential. *Clin. Pharmacokinet.*, 1994, 26, 59-70.
77. Goodnick P.J.: Pharmacokinetic optimisation of therapy with newer antidepressants. *Clin. Pharmacokinet.*, 1994, 27, 307-330.
78. Gram L.F., Fredricson O.K.: Drug interaction: Inhibitory effect of neuroleptics on metabolism of tricyclic antidepressants in man. *Brit. Med. J.*, 1972, 1, 463-465.
79. Gram L.F., Reisby N., Ibsen I., Nagy A., Dencker S.J., Bech P., Petersen G.O., Christiansen J.: Plasma levels and antidepressive effect of imipramine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1976, 19, 318-324.
80. Gram L.F., Søndergaard I.B., Christiansen J., Petersen G.O., Bech P., Reisby N., Ibsen I., Ortmann J., Nagy A., Dencker S., Jacobsen O., Krautwald O.: Steady-state kinetics of imipramine in patients. *Psychopharmacology*, 1977, 54, 255-261.
81. Gram L.F., Bjerre M., Kragh-Sørensen P., Kvinesdal B., Molin J., Pedersen O.L., Reisby N.: Imipramine metabolites in blood of patients during therapy and after overdose. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1983, 33, 335-342.
82. Greenblatt D.J.: Basic pharmacokinetic principles and their application to psychotropic drugs. *J. Clin. Psychiatry*, 1993, 54 (Suppl. 9), 8-13.

83. Gupta R.N.: Drug level monitoring: antidepressants. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1992, 576, 183-211.
84. Harten J.: Overview of the pharmacokinetics of fluvoxamine. *Clin Pharmacokinet.*, 1995, 29 (Suppl. 1), 1-9.
85. Hackett L.P., Dusci L.J., Ilett K.F.: A comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay for therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants. *Ther. Drug Monit.*, 1998, 20, 30-34.
86. Hanin I., Koslow S.H., Kocsis J.H., Bowden C.L., Brunswick D., Frazer A., Carl J., Robins E.: Cerebrospinal fluid levels of amitriptyline, nortriptyline, imipramine and desmethylimipramine. Relationship to plasma levels and treatment outcome. *J. Affect. Disorders*, 1985, 9, 69-78.
87. Hervé F., Urien S., Albengres E., Duché J.-C., Tillement J.-P.: Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding. *Clin. Pharmacokinet.*, 1994, 26, 44-58.
88. Hooper W.D., Dubetz D.K., Bochner F., Cotter L.M., Smith G.A., Eadie M.J., Tyrer J.H.: Plasma protein binding of carbamazepine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975, 17, 433-440.
89. Hrdina P.D., Lapierre Y.D.: Clinical response, plasma levels and pharmacokinetics of desipramine in depressed in-patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, 1981, 4, 591-600.
90. Jandhyala B.S., Steenberg M.L., Perel J.M., Manian A.A., Buckley J.P.: Effects of several tricyclic antidepressants on the hemodynamics and myocardial contractility of the anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, 42, 403-410.
91. Janicak P.G.: The relevance of clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring: Anticonvulsant mood stabilizers and antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry*, 1993, 54 (Suppl. 4), 35-41.
92. Jarvis M.R.: Clinical pharmacokinetics of tricyclic antidepressant overdose. *Psychopharmacol. Bull.*, 1991, 27, 541-550.
93. Jatlow P.: Therapeutic monitoring of psychotherapeutic drugs: Role of the clinical laboratory. *Clin. Biochem.*, 1985, 18, 143-148.
94. Javaid J.I., Hendricks K., Coulson L.: Binding of imipramine to plasma in alcoholic patients. *Fed. Proc.*, 1982, 41, 1556.
95. Jerling M., Bertilsson L., Sjöqvist F.: The use of therapeutic drug monitoring data to document kinetic drug interactions: An example with amitriptyline and nortriptyline. *Ther. Drug Monit.*, 1994, 16, 1-12.
96. Jonghe F., Swinkels J.A.: The safety of antidepressants. *Drugs*, 1992, 43 (Suppl. 2), 40-47.

97. Jönsson B., Bebbington P.E.: What price depression? The cost of depression and the cost-effectiveness of pharmacological treatment. *Br. J. Psychiatry*, 1994, 164, 665-673.
98. Judd R.L., Pesce A.J.: Free drug concentrations are constant in serial fractions of plasma ultrafiltrate. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 1726-1727.
99. Jusko W.J.: Guidelines for collection and analysis of pharmacokinetic data. W: Evans W.E., Schentag J.J., Jusko W.J. eds: *Applied Pharmacokinetics, Applied Therapeutics, Inc., USA, 1992, Chapt. 2.*
100. Kanarkowski R., Rybakowski J.: Farmakokinetyka kliniczna karbamazepiny. *Psychiatr. Pol.*, 1989, T. XXIII, Nr 5-6, 379-386.
101. Kanarkowski R., Rybakowski J., Lehmann W., Matkowski K.: Changes in carbamazepine plasma concentrations in psychiatric patients during treatment. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1991, 43, 479-485.
102. Kehoe W.A., Kwentus J.A., Sheffel W.B., Harralson A.F.: Increased alpha-1-acid glycoprotein in depression lowers free fraction of imipramine. *Biol. Psychiatry*, 1991, 29, 489-493.
103. Kenney J.T., Orsulak R.M., Kolodner R.M., Burton M.E.: Determination of serum desipramine and 2-hydroxydesipramine for pharmacokinetic applications by HPLC with ultraviolet detection. *Clin. Chem.*, 1989, 2134-2136.
104. Kerr B.M., Thummel K.E., Wurden C.J., Klein S.M., Kroetz D.L., Gonzalez F.J., Levy R.H.: Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem. Pharmacol.*, 1994, 47, 1969-1979.
105. Kind P., Sorensen J.: The costs of depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 1993, 7, 191-195.
106. Kitanaka I., Ross R.J., Cutler N.R., Zavadil A.P., Potter W.Z.: Altered hydroxydesipramine concentrations in elderly depressed patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1982, 31, 51-55.
107. Kornguth M.L., Hutchins L.G., Eichelman B.S.: Binding of psychotropic drugs to isolated α_1 -acid glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.*, 1981, 30, 2435-2441.
108. Kostowski W.: *Leki przeciwdepresyjne*. W: *Farmakologia*, PZWL, Warszawa 1996.
109. Koyama E., Kikuchi Y., Echizen H., Chiba K., Ishizaki T.: Simultaneous high-performance liquid chromatography-electrochemical detection determination of imipramine, desipramine, their 2-hydroxylated metabolites, and imipramine N-oxide in human plasma and urine: Preliminary application to oxidation pharmacogenetics. *Ther. Drug Monit.*, 1993, 15, 224-235.

110. Kremer J.M.H., Wilting J., Janssen L.H.M.: Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.*, 1988, 40, 1-47.
111. Kristensen C.B.: Imipramine serum protein binding in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1983, 34, 689-694.
112. Kurz H., Trunk H., Weitz B.: Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.*, 1977, 27, 1373-1380.
113. Kwong T.C.: Free drug measurements: methodology and clinical relevance. *Clin. Chim. Acta*, 1985, 151, 193-216.
114. Lane E.A.: Renal function and the disposition of antidepressants and their metabolites. *Psychopharmacol. Bull.*, 1991, 27, 533-540.
115. Leinonen E., Lillsunde P., Laukkanen V., Ylitalo P.: Effects of carbamazepine on serum antidepressant concentrations in psychiatric patients. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 1991, 11, 313-318.
116. Lemoine A., Gautier J.C., Azoulay D., Kiffel L., Belloc C., Guengerich F.P., Maurel P., Beaune P., Leroux J.P.: Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol. Pharmacol.*, 1993, 43, 827-832.
117. Lennard M.S.: Genetically determined adverse drug reactions involving metabolism. *Drug Safety*, 1993, 9, 60-77.
118. Levy R.H., Friel P.N., John I., Linthicum L.M., Colin L., Koch K., Raisys V.A., Wilensky A.J., Temkin N.R.: Filtration for free drug level monitoring: Carbamazepine and valproic acid. *Ther. Drug Monit.*, 1984, 6, 67-76.
119. Levy R.H., Moreland T.A.: Rationale for monitoring free drug levels. *Clin. Pharmacokinet.*, 1984, 9 (Suppl. 1), 1-9.
120. Loga S., Curry S., Lader M.: Interaction of chlorpromazine and nortriptyline in patients with schizophrenia. *Clin. Pharmacokinet.*, 1981, 6, 454-462.
121. MacKichan J.J.: Pharmacokinetic consequences of drug displacement from blood and tissue proteins. *Clin. Pharmacokinet.*, 1984, 9 (Suppl. 1), 32-41.
122. MacKichan J.J.: Protein binding drug displacement interactions. Fact or fiction? *Clin. Pharmacokinet.*, 1989, 16, 65-73.
123. MacKichan J.J.: Influence of protein binding and use of unbound (free) drug concentrations. W: Evans W.E., Schentag J.J., Jusko W.J. eds: *Applied Pharmacokinetics, Applied Therapeutics, Inc. , USA, 1992, Chapt. 5.*

124. March C., Blanke V.: Determination of free valproic acid concentrations using the Amicon Micropartition MPS-1 ultrafiltration system. *Ther. Drug Monit.*, 1985, 7, 115-120.
125. Martens J., Banditt P.: Validation of the analysis of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite by high-performance liquid chromatography from plasma: comparison with gas chromatography and the enzyme-multiplied immunoassay technique. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1993, 620, 169-173.
126. McElnay J.C., D'Arcy P.F.: Protein binding displacement interactions and their clinical importance. *Drugs*, 1983, 25, 495-513.
127. Meyer M.C., Baldessarini R.J., Goff D.C., Centorrino F.: Clinically significant interactions of psychotropic agents with antipsychotic drugs. *Drug Safety*, 1996, 15, 333-346.
128. Miyoshi T., Sukimoto K., Otagiri M.: Investigation of the interaction mode phenothiazine neuroleptics with α_1 -acid glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 28-33.
129. Monteleone P., Gnocchi G.: Evidence for a linear relationship between plasma trazodone levels and clinical response in depression in the elderly. *Clin. Neuropharmacol.*, 1990, 13 (Suppl. 1), S84-S89.
130. Morin A., Stoukides C.A.: Use of tricyclic antidepressant concentrations to determine individual response. *Ann. Pharmacother.*, 1993, 27, 896-897.
131. Müller W.E., Stillbauer A.E.: Characterization of a common binding site for basic drugs on human α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1983, 322, 170-173.
132. Müller W.E., Stillbauer A.E., El-Gamal S.: Psychotropic drug competition for [3 H]imipramine binding further indicates the presence of only one high-affinity drug binding site on human α_1 -acid glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1983, 35, 684-686.
133. Murray M.: P450 enzymes. Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease. *Clin. Pharmacokinet.*, 1992, 23, 132-146.
134. Muscettola G., Goodwin F.K., Potter W.Z., Claeys M.M., Markey S.P.: Imipramine and desipramine in plasma and spinal fluid. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1978, 35, 621-625.
135. Nelson J.C., Jatlow P.I.: Neuroleptic effect on desipramine steady-state plasma concentrations. *Am. J. Psychiatry*, 1980, 137, 1232-1234.
136. Nelson J.C.: Current status of tricyclic antidepressants in psychiatry: Their pharmacology and clinical applications. *J. Clin. Psychiatry*, 1991, 52, 193-200.
137. Nierenberg A.A., Cole J.O.: Antidepressant adverse drug reactions. *J. Clin. Psychiatry*, 1991, 52, 40-47.

138. Nordin C., Bertilsson L.: Active hydroxymetabolites of antidepressants. Emphasis on E-10-hydroxy-nortriptyline. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 28, 26-40.
139. Norman T.R.: Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma and serum by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1985, 340, 173-197.
140. Nyberg G., Martensson E.: Determination of free fractions of tricyclic antidepressants. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1984, 327, 260-265.
141. Orsulak P.J.: Therapeutic monitoring of antidepressant drugs: Current methodology and applications. *J. Clin. Psychiatry*, 1986, 47, 10 (Suppl.), 39-50.
142. Orsulak P.J.: Therapeutic monitoring of antidepressant drugs: guidelines updated. *Ther. Drug Monit.*, 1989, 11, 497-507.
143. Orzechowska-Juzwenko K.: Kliniczne następstwa genetycznie uwarunkowanych zmian metabolizmu leków. W: *Terapia monitorowana*. Drukarnia Wydawnictw Naukowych S.A. Łódź 1994, 56-70.
144. Ostapowicz A., Horodnicki J., Gawrońska-Szklarz B., Górnik W.: Optymalizacja leczenia depresji w oparciu o badania genotypowe i farmakokinetykę TLPD. V Ogólnopolski Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej. Łódź 1997.
145. Otani K., Ishida M., Kaneko S., Mihara K., Ohkubo T., Osanai T., Sugawara K.: Effects of carbamazepine coadministration on plasma concentrations of trazodone and its active metabolite, m-chlorophenylpiperazine. *Ther. Drug Monit.*, 1996, 18, 164-167.
146. Paxton J.W.: Alpha₁-acid glycoprotein and binding of basic drugs. *Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol.*, 1983, 5, 635-648.
147. Perry P.J., Browne J.L., Alexander B., Pfohl B.M., Dunner F.J., Sherman A.D., Tsuang M.T.: Relationship of free nortriptyline levels to therapeutic response. *Acta Psychiatr. Scand.*, 1985, 72, 120-125.
148. Perucca E., Richens A., Biotransformation. W: Levy R.H. Mattson R.H., Meldrum B.S., eds: *Antiepileptic drugs*. 4th ed., N.Y., Raven Press, 1995, 31-50.
149. Pfiasky K.M., Borga O.: Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of α_1 -acid glycoprotein for interindividual variation. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1977, 22, 545-549.
150. Pfiasky K.M.: Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, 1980, 5, 246-262.
151. Pike E., Skuterud B., Kierulf P., Lunde P.K.M.: Significance of lipoproteins in serum binding variations of amitriptyline, nortriptyline, and quinidine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1982, 32, 599-606.

152. Płaźnik A., Kostowski W.: Nowa koncepcja działania leków przeciwdepresyjnych: dane z kliniki i badań przedklinicznych. *Psych. Pol.*, 1994, 1, 39-50.
153. Pollock B.G., Perel J.M., Stiller R.L., Birder R.L., Manian A.: Comparative cardiotoxicity and pharmacokinetics of imipramine and 2-hydroxyimipramine in unanesthetized swine. *Clin. Res.*, 1987, 35, 380.
154. Pollock B.G., Everett G., Perel J.M.: Comparative cardiotoxicity of nortriptyline and its isomeric 10-hydroxymetabolites. *Neuropsychopharmacology*, 1992, 6, 1-10.
155. Pond S.M.: Pharmacokinetic drug interactions. W: L.Z. Benet et al. ed.: *Pharmacokinetic Basis for Drug Treatment*, Raven Press, N.Y., 1984, 195-219.
156. Potter W.Z., Muscettola G., Goodwin F.K.: Binding of imipramine to plasma protein and brain tissue: Relationship to CSF tricyclic levels in man. *Psychopharmacology*, 1979, 63, 187-192.
157. Potter W.Z., Calil H.M., Sutfin T.A., Zavadil A.P., Jusko W.J., Rapoport J., Goodwin F.K.: Active metabolites of imipramine and desipramine in man. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 1982, 31, 393-401.
158. Power B.M., Hackett L.P., Dusci L.J., Ilett K.F.: Antidepressant toxicity and the need for identification and concentration monitoring in overdose. *Clin. Pharmacokinet.*, 1995, 29, 154-171.
159. Preskorn S.H., Irwin H.A.: Toxicity of tricyclic antidepressants - kinetics, mechanism, intervention: A review. *J. Clin. Psychiatry*, 1982, 43, 151-156.
160. Preskorn S.H.: Tricyclic antidepressants: The whys and hows of therapeutic drug monitoring. *J. Clin. Psychiatry*, 1989, 50, 34-46.
161. Preskorn S.H., Fast G.A.: Therapeutic drug monitoring for antidepressants: efficacy, safety, and cost effectiveness. *J. Clin. Psychiatry*, 1991, 52 (Suppl. 6), 23-33.
162. Pużyński S.: Leki przeciwdepresyjne. W: *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna*. PZWL, 1996, 390-476.
163. Pynnönen S., Frey H., Sillanpää M.: The auto-induction of carbamazepine during long-term therapy. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 1980, 18, 247-252.
164. Randrup A., Braestrup C.: Uptake inhibition of biogenic amines by newer antidepressant drugs: Relevance to the dopamine hypothesis of depression. *Psychopharmacology*, 1977, 53, 309-314.
165. Ramsay R.E., McManus D.Q., Guterman A., Briggle T.V., Vazquez D., Perchalski R., Yost R.A., Wong P.: Carbamazepine metabolism in humans: Effect of concurrent anticonvulsant therapy. *Ther. Drug Monit.*, 1990, 12, 235-241.

166. Rao M.L., Staberock U., Baumann P., Hiemke C., Deister A., Cuendet C., Amey M., Härtter S., Kraemer M.: Monitoring tricyclic antidepressant concentrations in serum by fluorescence polarization immunoassay compared with gas chromatography and HPLC. *Clin. Chem.*, 1994, 40, 929-933.
167. Ratnaraj N., Goldberg V.D., Hjelm M.: Temperature effects on the estimation of free levels of phenytoin, carbamazepine and phenobarbitone. *Ther. Drug Monit.*, 1990, 12, 465-472.
168. Reisby N. Gram L.F., Bech P.: Imipramine: clinical effects and pharmacokinetic variability. *Psychopharmacology*, 1977, 54, 263-272.
169. Rimón R., Jääskeläinen J., Kaartinen P., Kalli A., Kilponen E., Koskinen T., Nikkilä H., Pirttiperä V., Seppälä J.: Moclobemide versus imipramine in depressed out-patients: a double-blind multi-centre study. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 1993, 7, 141-147.
170. Romannyshyn L.A., Wichmann J.K., Kucharczyk N., Shumaker R.C., Ward D., Sofia R.D.: Simultaneous determination of felbamate, primidone, phenobarbital, carbamazepine, two carbamazepine metabolites, phenytoin, and one phenytoin metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug Monit.*, 1994, 16, 90-99.
171. Romer J., Bickel M.H.: A method to estimate binding constants at variable protein concentrations. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1979, 31, 7-11.
172. Routledge P.A.: The plasma protein binding of basic drugs. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1986, 22, 499-506.
173. Rudorfer M.V., Potter W.Z.: Pharmacokinetics of antidepressants. W: *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, Raven Press, N.Y., 1987, Chap. 142, 1353-1363.
174. Rudorfer M.V., Potter W.Z.: Antidepressants. A comparative review of the clinical pharmacology and therapeutic use of the "newer" versus the "older" drugs. *Drugs*, 1989, 37, 713-738.
175. Rudorfer M.V.: Pharmacokinetics of psychotropic drugs in special populations. *J. Clin. Psychiatry*, 1993, 54, 50-56.
176. Rudorfer M.V., Manji H.K., Potter W.Z.: Comparative tolerability profiles of the newer versus older antidepressants. *Drug Safety*, 1994, 10, 18-46.
177. Sathananthan G.L., Gershon S., Almeida M., Spector N., Spector S.: Correlation between plasma and cerebrospinal levels of imipramine. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1976, 33, 1109-1110.
178. Schley J., Müller-Oerlinghausen B.: The binding of chemically different psychotropic drugs to α_1 -acid glycoprotein. *Pharmacopsychiat.* 1983, 16, 82-85.

179. Schley J., Müller-Oerlinghausen B.: Investigation of the binding of various tricyclic neuroleptics and antidepressants to α_1 -acid glycoprotein. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1986, 38, 102-106.
180. Scott M.A., Shelton P.S., Gattis W.: Therapeutic options for treating major depression, and the role of venlafaxine. *Pharmacotherapy*, 1996, 16, 352-365.
181. Seville B.: Methods of drug protein binding determinations. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1990, 4 (Suppl. 2), 151S-161S.
182. Seville B., Zini R., Madjar C.-V., Thuaud N., Tillement J.-P.: Separation procedures used to reveal and follow drug-protein binding. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1990, 531, 51-77.
183. Spina E., Avenoso A., Campo G.M., Caputi A.P., Perucca E.: The effect of carbamazepine on the 2-hydroxylation of desipramine. *Psychopharmacology*, 1995, 117, 413-416.
184. Spina E., Pisani F., Perucca E.: Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with carbamazepine. *Clin. Pharmacokinet.*, 1996, 31, 198-214.
185. Sutfin T.A., D'Ambrosio R., Jusko W.J.: Liquid-chromatographic determination of eight tri- and tetracyclic antidepressants and their major active metabolites. *Clin. Chem.*, 1984, 30, 471-474.
186. Sutfin T.A., DeVane C.L., Jusko W.J.: The analysis and disposition of imipramine and its active metabolites in man. *Psychopharmacology*, 1984, 82, 310-317.
187. Svensson C.K., Woodruff M.N., Baxter J.G., Lalka D.: Free drug concentration monitoring in clinical practice. Rationale and current status. *Clin. Pharmacokinet.*, 1986, 11, 450-469.
188. Syvälahti E.K.G., Taiminen T., Saarijärvi S., Lehto H., Niemi H., Ahola V., Dahl M.-L., Salokangas R.K.R.: Citalopram causes no significant alternations in plasma neuroleptic levels in schizophrenic patients. *J. Int. Med. Res.*, 1997, 25, 24-32.
189. Szymura-Oleksiak J., Wasieczko A.: Clinical usefulness of imipramine serum level monitoring in patients treated for endogenous depression. W: *Recent developments in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology*. Marcel Dekker Inc., USA 1992, Chapt. 18, 105-110.
190. Szymura-Oleksiak J., Wasieczko A., Wyska E.: Adverse drug reactions and safe treatment of endogenous depression. *Proceedings of the 22nd European Symposium of Clinical Pharmacy*. Germany, Heidelberg 1993.
191. Tillement J.-P., Lhoste F., Giudicelli J.F.: Diseases and drug protein binding. *Clin. Pharmacokinet.*, 1978, 3, 144-154.

192. Tiula E., Neuvonen P.J.: Antiepileptic drugs and α_1 -acid glycoprotein. *New Engl. J. Med.*, 1982, 307, 1148.
193. Tollefson G.D.: Antidepressant treatment and side effect considerations. *J. Clin. Psychiatry*, 1991, 52, 4-13.
194. Tozer T.N.: Implications of altered plasma protein binding in disease states. W: Benet L.Z. et al., eds.: *Pharmacokinetic basis for drug treatment*. Raven Press, N. Y., 1984, Chapt. 10, 173-193.
195. Urien S., Albengres E., Zini R., Tillement J.-P.: Evidence for binding of certain acidic drugs to α_1 -acid glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 3687-3689.
196. Wandell M., Wilcox-Thole W.L.: Protein binding and free drug concentrations. W: Dennis Mungall ed.: *Applied Clinical Pharmacokinetics*, Raven Press, N.Y., 1983, 17-48.
197. Wasieczko A.: Skojarzone leczenie depresji tymoleptykiem i neuroleptykiem chorych z prostym zespołem depresyjnym w przebiegu choroby afektywnej. Praca doktorska. Kraków 1995.
198. Weder H.J., Bickel M.H.: Interactions of drugs with proteins I: Binding of tricyclic thymoleptics to human and bovine plasma proteins. *J. Pharm. Sci.*, 1970, 59, 1505-1507.
199. Whitlam J.B., Brown K.F.: Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *J. Pharm. Sci.*, 1981, 70, 146-150.
200. Wilkerson R.D.: Antiarrhythmic effects of tricyclic antidepressant drugs in ouabain-induced arrhythmias in the dog. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 1978, 205, 666-674.
201. Wright J.D., Boudinot F.D., Ujhelyi M.R.: Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin. Pharmacokinet.*, 1996, 30, 445-462.
202. Vallner J.J.: Binding of drugs by albumin and plasma protein. *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 447-462.
203. Vandel S., Vandel B., Sandoz M., Allers G., Bechtel P., Volmat R.: Clinical response and plasma concentration of amitriptyline and its metabolite nortriptyline. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1978, 14, 185-190.
204. Vandel B., Vandel S., Jounet J.M., Allers G., Volmat R.: Relationship between the plasma concentration of clomipramine and desmethylclomipramine in depressive patients and the clinical response. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1982, 22, 15-20.
205. Vandel S., Bertschy G., Nezeloff S., Bonin B., Volmat R.: Tricyclic antidepressant plasma level monitoring: intraindividual variability in everyday practice. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1990, 39, 611-612.

206. Vandel S., Bertschy G., Baumann P., Bouquet S., Bonin B., Francois T., Sechter D., Bizouard P.: Fluvoxamine and fluoxetine: interaction studies with amitriptyline, clomipramine and neuroleptics in phenotyped patients. *Pharmacol. Res.*, 1995, 31, 347-353.
207. van der Sluijs P., Meijer D.K.F.: Binding of drugs with a quaternary ammonium group to alpha-1-acid glycoprotein and asialo alpha-1-acid glycoprotein. *J. Pharm. Exptl. Ther.*, 1985, 234, 703-707.
208. Vetulani J.: The development of our understanding of the mechanism of action of antidepressant drugs. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 1991, 43, 323-338.
209. von Moltke L.L., Greenblatt D.J., Shader R.I.: Clinical pharmacokinetics of antidepressants in the elderly. Therapeutic implications. *Clin. Pharmacokinet.*, 1993, 24, 141-160.
210. Young R.C., Alexopoulos G.S., Shamonian C.A., Dhar A.K., Kutt H.: Heart failure associated with high plasma 10-hydroxynortriptyline levels. *Am. J. Psychiatry*, 1984, 141, 432-433.
211. Young R.C., Alexopoulos G.S., Shamonian C.A., Kent E., Dhar A.K., Kutt H.: Plasma 10-hydroxynortriptyline and ECG changes in elderly depressed patients. *Am. J. Psychiatry*, 1985, 142, 866-868.
212. Young R.C.: Hydroxylated metabolites of antidepressants. *Psychopharmacol. Bull.*, 1991, 27, 521-532.
213. Zini R., Riant P., Barré J., Tillement J.-P.: Disease-induced variations in plasma protein levels. Implications for drug dosage regimens (Part II). *Clin. Pharmacokinet.*, 1990, 19, 218-229.

