

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Michał Romański

*Ocena parametrów kinetycznych i farmakokinetycznych
treosulfanu i jego biologicznie aktywnych
epoksypochodnych w przewidywaniu zmian ich poziomów
u chorych poddanych kondycjonowaniu przed
przeszczepem komórek hematopoetycznych*

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. Franciszek Główka

Poznań 2013

**Część pracy została wykonana w ramach projektu badawczego
finansowanego przez Miasto Poznań w 2010 r.
Numer grantu: 511-02-03306413-04982**

Słowa kluczowe: *epoksydy, związki alkilujące, dyspozycja, współczynnik podziału, HPLC w odwróconym układzie faz, model zwierzęcy*

Praca została wykonana we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie przeprowadzenia aktywacji treosulfanu z użyciem automatycznego titratora;
- Katedrą i Zakładem Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie zbiórki próbek osocza i cieczy wodnistej oka u królików po podaniu treosulfanu i jego epoksytransformerów;
- Katedrą i Zakładem Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie identyfikacji treosulfanu i jego epoksytransformerów metodą HPLC-MS.

Składam serdeczne podziękowania

Panu Prof. dr. hab. Franciszkowi Głowce

za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej,

wskazanie interesującego tematu, cenną pomoc

i życzliwość

Serdecznie dziękuję

*Pani Dr Edycie Szafek oraz Pani Dr Agnieszce
Karbownik za pomoc w wykonaniu doświadczeń
na zwierzętach i okazaną życzliwość*

*Panu Dr. Bartoszowi Urbaniakowi za pomoc
w części eksperymentalnej badań kinetycznych*

*Panu Mgr. Arturowi Teżykowi za miłą współpracę
i życzliwość*

*Oraz wszystkim pracownikom Katedry i Zakładu
Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
za wszelką pomoc i życzliwość*

Pracę dedykuję Moim Rodzicom

Część pracy została opublikowana:

F.K. Głowska, M. Romański, A. Siemiątkowska, *Determination of partition coefficients n-octanol/water for treosulfan and its epoxy-transformers: An example of a negative correlation between lipophilicity of unionized compounds and their retention in reversed-phase chromatography*. J Chromatogr B 2013, 923-924, 92-97 (IF = 2,888; MNiSW = 35);

F.K. Głowska, M. Romański, A. Teżyk, C. Żaba, *Direct high-performance liquid chromatography method with refractometric detection designed for stability studies of treosulfan and its biologically active epoxy-transformers*. J Pharm Biomed Anal 2013, 72, 145-149 (IF = 2,967; MNiSW = 35);

F.K. Głowska, M. Romański, J. Wachowiak, *High-dose treosulfan in conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation*. Expert Opin Investig Drugs 2010, 19, 1275-1295 (IF = 4,337; MNiSW = 32).

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	14
I. WSTĘP.....	18
II. CEL PRACY.....	20
III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	21
1. Charakterystyka TREO i jego epoksytransformerów	21
1.1. Wiadomości wstępne.....	21
1.2. Budowa chemiczna i nazewnictwo TREO.....	21
1.3. Właściwości fizyczne TREO	22
1.4. Mechanizm i kinetyka reakcji aktywacji TREO	22
1.5. Mechanizm i kinetyka otwierania pierścienia epoksydowego.....	27
1.6. Mechanizm działania epoksytransformerów TREO.....	29
1.7. Biologiczne skutki alkilacji DNA przez epoksytransformery TREO.....	38
1.7.1. Działanie cytotoksyczne	38
1.7.2. Działanie mutagenne.....	40
1.8. Aktywność farmakologiczna TREO	41
1.8.1. Aktywność przeciwnowotworowa.....	41
1.8.2. Aktywność mieloablacyjna	42
1.8.3. Aktywność immunosupresyjna.....	43
1.8.4. Aktywność anty angiogenna	44
1.9. Interakcje TREO	44
1.10. Toksyczność narządowa TREO.....	45
1.11. Farmakokinetyka TREO.....	49
1.12. Farmakokinetyka S,S-DEB i jego stereoizomerów	54
1.13. Charakterystyka reżimów kondycjonujących opartych na TREO.....	60
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	64
2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	64
3. Odczynniki.....	65
4. Roztwory podstawowe i wzorcowe stosowane w metodach HPLC	66
4.1. Roztwory podstawowe TREO	66
4.2. Roztwór podstawowy (±)-DEB	66

4.3. Roztwór podstawowy TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB	66
4.4. Roztwory wzorcowe TREO.....	66
4.5. Roztwory wzorcowe TREO i (±)-DEB.....	67
4.6. Roztwory wzorcowe TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB.....	67
5. Inne roztwory stosowane w metodach HPLC	67
5.1. Roztwory kwasu cytrynowego.....	67
5.2. Roztwór 1 mol/l NaOH.....	67
5.3. Roztwór odczynnika derywatyzującego 3-NBS (metoda HPLC-UV)	68
5.4. Roztwór wzorca wewnętrznego IS1 (metoda HPLC-RID).....	68
5.5. Roztwór wzorca wewnętrznego IS2 (metoda HPLC-UV).....	68
5.6. Ekstrahent zawierający IS2 (metoda HPLC-UV)	68
6. Roztwory buforowe o pH 7,4 stosowane w badaniach kinetycznych.....	68
6.1. Bufory fosforanowe.....	68
6.2. Bufor PBS	69
7. Roztwory buforowe o pH 4,4 stosowane w badaniach P_{OW}	69
7.1. Koncentrat buforu ABS	69
7.2. Bufor ABS.....	70
8. Inne roztwory stosowane w badaniach kinetycznych.....	70
8.1. Roztwór 0,15 mol/l TREO	70
8.2. Roztwór 0,15 mol/l (±)-DEB	70
8.3. Roztwór titranta.....	70
9. Metody HPLC oznaczania TREO i jego epoksytransformerów	70
9.1. Warunki pracy aparatów do HPLC.....	71
9.2. Przygotowanie próbek do krzywych wzorcowych.....	72
9.2.1. Oznaczanie TREO i epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 metodą HPLC-RID	72
9.2.2. Oznaczanie TREO i epoksytransformerów w roztworze ABS metodą HPLC-RID	72
9.2.3. Oznaczanie TREO w osoczu króliczym metodą HPLC-RID.....	73
9.2.4. Oznaczanie epoksytransformerów w osoczu króliczym metodą HPLC-UV.....	73
9.3. Walidacja metod HPLC	74
9.3.1. Selektywność	74

9.3.2. Liniowość.....	75
9.3.3. LOD i LOQ.....	76
9.3.4. Precyzja i dokładność.....	76
9.3.5. Odzysk TREO i epoksytransformerów z osocza.....	77
9.3.6. Testy stabilności.....	78
10. Metodyka badań kinetycznych.....	80
10.1. Warunki prowadzenia aktywacji TREO.....	80
10.2. Warunki prowadzenia hydrolizy (\pm)-DEB.....	81
10.3. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w buforach fosforanowych i buforze PBS.....	81
10.4. Metodyka obliczeń kinetycznych.....	82
10.4.1. Model transformacji TREO.....	82
10.4.2. Ocena poprawności modelu kinetycznego.....	83
10.4.3. Regresja liniowa $\ln C = f(t)$	84
11. Metodyka wyznaczania P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów.....	85
11.1. Wstępne oszacowanie $\log P_{OW}$, pK_a i powierzchni cząsteczki na podstawie struktury związków.....	85
11.2. Metoda wytrząsania.....	85
11.2.1. Przygotowanie układu n-oktanol/ABS.....	85
11.2.2. Ustalanie czasu osiągnięcia równowagi w układzie n-oktanol/ABS.....	86
11.2.3. Ocena trwałości związków w układzie n-oktanol/ABS.....	86
11.2.4. Warunki wyznaczania P_{OW}	86
11.3. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w buforze ABS.....	87
11.4. Metodyka obliczeń P_{OW}	87
12. Metodyka badań farmakokinetycznych.....	89
12.1. Procedura wykonania doświadczeń na zwierzętach.....	89
12.1.1. Podawanie roztworów badanych związków i pobieranie krwi.....	89
12.1.2. Pobieranie cieczy wodnistej oka.....	91
12.2. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w osoczu i cieczy wodnistej oka królików.....	92
12.3. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych.....	93
12.3.1. Farmakokinetyka TREO i jego epoksytransformerów.....	93
12.3.2. Ocena dystrybucji TREO i jego epoksytransformerów do cieczy wodnistej oka.....	93

13. Analiza statystyczna wyników	93
V. WYNIKI	95
14. Metody HPLC-RID i HPLC-UV oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych, osoczu i cieczy wodnistej oka królików	95
14.1. Potwierdzenie tożsamości analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB	95
14.2. Walidacja metod HPLC	95
14.2.1. Selektywność	95
14.2.2. Liniowość	96
14.2.3. LOD i LOQ	96
14.2.4. Precyzja i dokładność	102
14.2.5. Odzysk TREO i jego epoksytransformerów z osocza króliczego	111
14.2.6. Testy stabilności	111
15. Kinetyka aktywacji TREO w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C	113
15.1. Profile zmian stężeń TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C	113
15.2. Parametry kinetyczne aktywacji TREO w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C	122
15.3. Ocena poprawności zastosowanego modelu aktywacji TREO	129
15.4. Ocena statystyczna wpływu składu roztworów buforowych na stałe szybkości reakcji aktywacji TREO	137
16. P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów	141
16.1. Wyznaczenie logP _{OW} , pK _a i powierzchni cząsteczek TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB metodami obliczeniowymi	141
16.2. Czas ustalania się równowagi podziału TREO i jego epoksytransformerów w układzie n-oktanol/ABS	142
16.3. Trwałość TREO i jego epoksytransformerów w układzie n-oktanol/ABS	143
16.4. Doświadczalne P _{OW} TREO i jego epoksytransformerów oraz ich ocena statystyczna	144
17. Farmakokinetyka TREO i jego epoksytransformerów u królików	146
17.1. Poziomy TREO i jego epoksytransformerów w próbkach osocza	146

17.2. Poziomy TREO i jego epoksytransformerów w cieczy wodnistej oka królików	152
17.3. Parametry farmakokinetyczne TREO i jego epoksytransformerów	154
17.4. Analiza statystyczna parametrów farmakokinetycznych TREO i jego epoksytransformerów	159
17.5. Stopień przenikania TREO i jego epoksytransformerów do cieczy wodnistej oka królików	162
VI. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników.....	163
1. Metody analityczne	163
2. Badania kinetyczne	169
3. Analiza P_{OW}	176
4. Badania farmakokinetyczne.....	181
5. Podsumowanie.....	186
VII. WNIOSKI.....	190
VIII. STRESZCZENIE.....	191
IX. ABSTRACT.....	194
X. PIŚMIENNICTWO.....	197
XI. Wykaz Załączników.....	212

Wykaz stosowanych skrótów

α	stała szybkości fazy eliminacji
A	nukleoty d adeninowy
ABS	roztwór chlorków (NaCl i KCl) buforowany układem kwas octowy/octan sodu (<i>acetate buffered saline</i>)
AIC	test Akaike
ALL	ostra białaczka limfoblastyczna (<i>acute lymphoblastic leukemia</i>)
AML	ostra białaczka szpikowa (<i>acute myelogenous leukemia</i>)
AUC	pole powierzchni pod krzywą stężenie leku (związku) w osoczu – czas
β	stała szybkości fazy eliminacji
BD	buta-1,3-dien
bis-N7G-BD	diaddukt 1,4-bis(guan-7'-yl)butano-2,3-diolowy
(\pm)-bis-N7G-BD	– (\pm)-racemat
R,R-bis-N7G-BD	– enancjomer (2R,3R)
S,S-bis-N7G-BD	– enancjomer (2S,3S)
BU	busulfan
C	nukleoty d cytozynowy
CLL	przewlekła białaczka limfocytowa (<i>chronic lymphocytic leukemia</i>)
Cl_{ren}	klirens nerkowy
Cl_{tot}	klirens ogólnoustrojowy
C_{max}	maksymalne stężenie leku (związku) w osoczu lub innym płynie ustrojowym
CML	przewlekła białaczka szpikowa (<i>chronic myelogenous leukemia</i>)
COX-2	cyklooksygenaza 2
CV	współczynnik zmienności (<i>coefficient of variation</i>)
CY	cyklofosfamid
DEB	1,2:3,4-diepoksybutan
(\pm)-DEB	- (\pm)-racemat
R,R-DEB	- enancjomer (2R,3R)
S,S-DEB	- enancjomer (2S,3S)
DFS	czas przeżycia wolnego od choroby (<i>disease-free survival</i>)
2,2'-DNBP	2,2'-dinitrobifenyl
EB	1,2-epoksybut-3-en
EBD	3,4-epoksybutano-1,2-diol
EH	hydrolaza epoksydowa
EMA	Europejska Agencja Leków (<i>European Medicines Agency</i>)
ES	mięsak Ewinga (<i>Ewing's sarcoma</i>)
F	bezwzględna biodostępność leku
FLU	fludarabina
FT	test zamrażania – rozmrażania (<i>freeze-thaw stability test</i>)
FTBI	frakcjonowane napromienianie całego ciała (<i>fractionated total body irradiation</i>)
G	nukleoty d guaninowy
G₂/M	faza G ₂ interfazy/mitoza
GC	chromatografia gazowa
GC-EI-MS	– z detekcją spektrometrii mas wyposażoną w źródło jonizacji strumieniem elektronów
GC-FID	– z detekcją płomieniowo-jonizacyjną
GSH	glutation (forma zredukowana)

GST	S-transferaza glutationowa
GVHD	choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (<i>graft-versus-host disease</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-ESI-MS	– z detekcją spektrometrii mas ze źródłem jonizacji typu elektropray
HPLC-ESI-MS/MS	– z detekcją tandemowej spektrometrii mas ze źródłem jonizacji typu elektropray
HPLC-RID	– z detekcją refraktometrią
HPLC-UV	– z detekcją w świetle nadfioletowym
HSCT	przeszczepienie komórek hematopoetycznych (<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>)
IFN-β	interferon-beta
IFN-γ	interferon-gamma
IL-2	interleukina-2
IL-12	interleukina-12
IS	wzorec wewnętrzny
IS1	– stosowany w metodzie HPLC-RID (paracetamol)
IS2	– stosowany w metodzie HPLC-UV (2,2'-dinitrobifenyl)
k₁	stała szybkości reakcji TREO → S,S-EBDM
k₂	stała szybkości reakcji S,S-EBDM → S,S-DEB
k₁₀	stała szybkości eliminacji leku z kompartmentu centralnego
k₁₂	stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu centralnego do tkankowego
k₂₁	stała szybkości dystrybucji leku z kompartmentu tkankowego do centralnego
k_D	stała szybkości hydrolizy S,S-DEB lub (±)-DEB
k_M	stała szybkości hydrolizy S,S-EBDM
K_M	stała Michaelisa
logP_{ow}	logarytm współczynnika podziału n-oktanol/woda
LT	test stabilności długoterminowej (<i>long-term stability test</i>)
μ	siła jonowa
MAC	kondycjonowanie mieloablacyjne (<i>myeloablative conditioning</i>)
MDS	zespoły mielodysplastyczne (<i>myelodysplastic syndromes</i>)
MM	szpiczak mnogi (<i>multiple myeloma</i>)
N	dowolny nukleotyd
N1A-N7G-BD	addukt 1-(aden-1'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy
(±)-N1A-N7G-BD	– racemat
S,S-N1A-N7G-BD	– enancjomer (2S,3S)
N1HX-N7G-BD	1-(hypoksant-1'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy
S,S-N1HX-N7G-BD	– enancjomer (2S,3S)
N1,N⁶-α-HMHPA	monoaddukt N1,N ⁶ -(1'-hydroksymetylo-2'-hydroksyprop-1',3'-diylo)adeninowy
R,S-N1,N ⁶ -α-HMHPA	– enancjomer (1'R,2'S)
N1,N⁶-γ-HMHPA	monoaddukt N1,N ⁶ -(2'-hydroksy-3'-hydroksymetyloprop-1',3'-diylo)adeninowy
S,R-N1,N ⁶ -γ-HMHPA	– enancjomer (2'S,3'R)
N3A-N7G-BD	addukt 1-(aden-3'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy
(±)-N3A-N7G-BD	– racemat
1,N⁶-(α,γ)-HMHPA	mieszanina izomerów N1,N ⁶ -α-HMHPA i N1,N ⁶ -γ-HMHPA

	(ulegających wzajemnej interkonwersji)
N⁶A-N7G-BD	addukt 1-(aden-N ⁶ -ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy
(±)-N ⁶ A-N7G-BD	– racemat
N7A-N7G-BD	addukt 1-(aden-7'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy
(±)-N7A-N7G-BD	– racemat
N7-HEBG	monoaddukt N7-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)guaninowy
(±)-N7-HEBG	– racemat
S,S-N7-HEBG	– enancjomer (2'S,3'S)
N7-THBG	monoaddukt N7-(2',3',4'-trihydroksybut-1'-ylo)guaninowy
(±)-N7-THBG	– racemat
S,S-N7-THBG	– enancjomer (2'S,3'S)
nano-HPLC-nano-ESI-MS/MS	nano-HPLC z tandemowym detektorem spektrometrii mas wyposażonym w źródło jonizacji typu nanoelektrospray
3-NBS	kwask 3-nitrobenzenosulfonowy
NCI-CTC	skala toksyczności wg National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria
nd	nie dotyczy
NK	naturalni zabójcy (<i>natural killers</i>)
NRM	śmiertelność niezwiązana z wznową choroby (<i>non-relapse mortality</i>)
Nu	nukleofil
ODS	faza C18 chemicznie związana z krzemionką
OS	czas całkowitego przeżycia (<i>overall survival</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	roztwór chlorków (NaCl i KCl) buforowany fosforanami (KH ₂ PO ₄ i Na ₂ HPO ₄) (<i>phosphate buffered saline</i>)
P_{ow}	współczynnik podziału n-oktanol/woda
pyr- Val	addukt N,N-(2',3'-dihydroksybut-1',4'-diylo)walinowy hemoglobiny
R²	współczynnik determinacji
RIC	kondycjonowanie o zredukowanej intensywności (<i>reduced intensity conditioning</i>)
RRT	toksyczność związana z reżimem kondycjonującym (<i>regimen-related toxicity</i>)
RTC	kondycjonowanie o zredukowanej toksyczności (<i>reduced toxicity conditioning</i>)
SBC	test Schwartza
SM	stwardnienie rozsiane (<i>sclerosis multiplex</i>)
S_N1	substytucja nukleofilowa jednocząsteczkowa
S_N2	substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa
S,S-EBDM	1-metanosulfonian (2S,3S)-3,4-epoksybutano-1,2-diolu
S,S-N1-HEBA	monoaddukt (2'S,3'S)-N1-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)adeninowy
S,S-N⁶-HEBA	monoaddukt (2'S,3'S)-N ⁶ -(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)adeninowy
S,S-N7-HEBG	monoaddukt (2'S,3'S)-N7-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)guaninowy
S,S-N7-HMSG	monoaddukt (2'S,3'S)-N7-(2',3'-dihydroksy-4'-metylosulfonyloksybut-1'-ylo)guaninowy
S,S-N7-THBG	monoaddukt (2'S,3'S)-N7-(2',3',4'-trihydroksybut-1'-

	yl)guaninowy
ST	test stabilności krótkoterminowej w temperaturze pokojowej (<i>short-term temperature stability test</i>)
t_{0,5}	czas połowicznej przemiany lub biologiczny okres półtrwania
t_{0,5α}	okres półtrwania fazy dystrybucji
t_{0,5β}	okres półtrwania fazy eliminacji
T	nukleoty d tyminowy
TBI	napromienianie całego ciała (<i>total body irradiation</i>)
THB-Val	addukt N-(2',3',4'-trihydroksybut-1'-yl)walinowy hemoglobiny
t_{max}	czas wystąpienia C _{max} leku (związku) w osoczu lub innym płynie ustrojowym
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów-alfa (<i>tumor necrosis factor-alfa</i>)
TREO	treosulfan
TRM	śmiertelność związana z leczeniem (reżimem kondycjonującym) (<i>treatment-related mortality</i>)
VOD	choroba okluzyjna żył wątrobowych (<i>veno-occlusive disease</i>)
V_{max}	maksymalna szybkość reakcji enzymatycznej przebiegającej zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten
V_c	objętość kompartmentu centralnego
V_{ss}	objętość dystrybucji w stanie stacjonarym.
V_t	objętość kompartmentu tkankowego
WT_CORR	ważony współczynnik korelacji w programie WinNonlin 6.2

I. WSTĘP

Treosulfan (TREO) jest syntetycznym prolekiem reprezentującym, obok busulfanu (BU), leki alkilujące z grupy estrów kwasu sulfonowego. Działanie farmakologiczne TREO wynika z jego przemiany do aktywnych biologicznie transformerów: mono- (S,S-EBDM) i diepoksydowej pochodnej (S,S-DEB). W odróżnieniu od typowej aktywacji proleków, przemiana ta zachodzi bez udziału enzymów. TREO został zsyntetyzowany po raz pierwszy w 1961 r. przez niemieckiego chemika-farmakologa dr. Petera W. Feita. Od lat osiemdziesiątych XX wieku lek był stosowany w próbach klinicznych w terapii różnego typu nowotworów i aktualnie jest zarejestrowany w kilku krajach europejskich, m.in. Niemczech i Wielkiej Brytanii, do leczenia zaawansowanego raka jajnika. Zwrotem w klinicznym znaczeniu TREO było badanie kliniczne, przeprowadzone w 2000 roku przez Scheulena i wsp. na grupie pacjentów podlegających kondycjonowaniu przed przeszczepieniem komórek hematopoetycznych (HSCT). W badaniu tym wykazano, że podanie bardzo wysokich mieloablacyjnych dawek TREO nie powoduje istotnych niehematologicznych działań niepożądanych. W ciągu ostatniej dekady przeprowadzono wiele prób klinicznych z udziałem pacjentów pediatrycznych i dorosłych, które potwierdziły korzystne właściwości TREO jako pożądanego składnika reżimu kondycjonującego przed HSCT, łączącego skuteczną mieloablację i niską toksyczność narządową w porównaniu z BU. Ta ostatnia jest niewątpliwą zaletą TREO zwłaszcza u dzieci, u których BU jest jednym z najczęściej dotychczas stosowanych czynników mieloablacyjnych przed HSCT. Warto w tym miejscu wspomnieć, iż pierwsze udane allogeniczne przeszczepienie szpiku kostnego u dziecka wykonano w 2000 roku w poznańskiej Klinice Onkologii, Hematologii i Transplantologii pediatrycznej pod kierownictwem profesora Jacka Wachowiaka. Pomimo trzydziestoletniego stosowania TREO w warunkach klinicznych, wiedza na temat jego farmakologii jest jednak niepełna, zwłaszcza w odniesieniu do nieenzymatycznej kinetyki aktywacji proleku oraz farmakokinetyki jego epoksypochodnych. Dotychczas w literaturze istnieje zaledwie jedno doniesienie (Główka i wsp., J Pharm Biomed Anal 2012, 62, 105-113) dotyczące poziomów S,S-EBDM w osoczu pacjentów poddanych oparciu na TREO kondycjonowaniu przed HSCT, w którym nie stwierdzono jednak wykrywalnych poziomów S,S-DEB.

W niniejszej pracy podjęto się zbadania kinetyki nieenzymatycznej aktywacji TREO do S,S-EBDM i S,S-DEB w warunkach *in vitro* odpowiadających fizjologicznemu środowisku ludzkiego osocza oraz wyznaczenia ich parametrów farmakokinetycznych. Ponadto, dla wszystkich trzech badanych związków wyznaczono wartości współczynnika

podziału n-oktanol/woda (P_{ow}), który jest ważnym deskryptorem zachowania się substancji chemicznych w warunkach *in vivo*. Zaproponowane badania miały na celu głębsze poznanie czynników determinujących poziomy TREO i jego biologicznie aktywnych epoksytransformerów u pacjentów otrzymujących prolek w ramach postępowania kondycjonującego przed HSCT. Jest to szczególnie uzasadnione w świetle spodziewanej w niedalekiej przyszłości rejestracji TREO do powyższego wskazania.

II. CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie kinetyki i farmakokinetyki TREO oraz jego epoksytransformerów, służące wyjaśnieniu niskich stężeń S,S-EBDM i S,S-DEB w osoczu pacjentów otrzymujących mieloablacyjne dawki TREO w ramach kondycjonowania przed HSCT.

Zamierzony cel pracy był realizowany przez wykonanie następujących badań:

1. Opracowanie odpowiednio czułych, selektywnych, precyzyjnych i dokładnych metod wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w wodnych roztworach buforowych, osoczu oraz cieczy wodnistej oka królików.
2. Wyznaczenie stałych szybkości i odpowiadających im wartości $t_{0,5}$ dla następujących reakcji aktywacji TREO (TREO \rightarrow S,S-EBDM i S,S-EBDM \rightarrow S,S-DEB) oraz równoległych reakcji hydrolitycznego rozkładu utworzonych epoksypochodnych w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C, z uwzględnieniem wpływu siły jonowej i składu jonowego środowiska reakcji.
3. Wyznaczenie wartości P_{OW} dla TREO i jego epoksytransformerów w warunkach temperatury i siły jonowej, odpowiadających fizjologicznemu środowisku krwi.
4. Wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych TREO i produktów jego aktywacji u królików po podaniu dożylnym zarówno samego proleku, jak i roztworów zawierających jego epoksytransformery.
5. Określenie dystrybucji TREO i jego epoksypochodnych do cieczy wodnistej oka królików po podaniu dożylnym.
6. Kompleksową analizę uzyskanych wyników kinetycznych, wartości P_{OW} i parametrów farmakokinetycznych.

III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

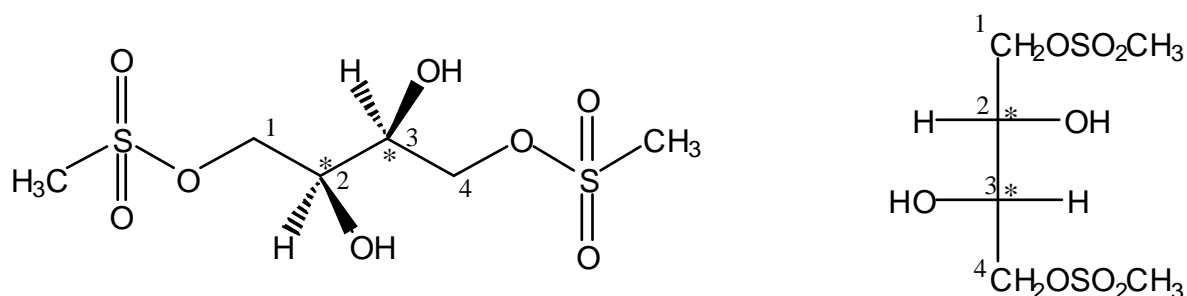
1. Charakterystyka TREO i jego epoksytransformerów

1.1. Wiadomości wstępne

TREO jest lekiem przeciwnowotworowym zarejestrowanym w kilku krajach europejskich (Niemczech, Wielkiej Brytanii, krajach skandynawskich) pod nazwą handlową Ovastat™ (medac GmbH). Wskazaniem rejestracyjnym preparatu jest leczenie platynoopornego raka jajnika w ramach terapii drugiego rzutu lub terapii paliatywnej. W obrocie dostępne są trzy formułacje Ovastatu™ – proszek w dawce 1000 i 5000 mg do sporządzenia roztworu do wstrzyknięć przez rozpuszczenie odpowiednio w 20 i 100 ml wody do iniekcji o temperaturze 25 – 30 °C oraz doustne kapsułki żelatynowe zawierające 250 mg leku. Zgodnie z zaleceniami producenta sporządzone roztwory TREO podaje się dożylnie drogą powolnego bolusa (dawka do 3 g/m²) lub wlewu bądź dootrzewnowo (dawka do 1,5 g/m²) [1-5].

1.2. Budowa chemiczna i nazewnictwo TREO

TREO jest czystym enancjomerycznie diestrem alkoholu cukrowego (2S,3S)-treitolu (L-treitolu) oraz kwasu metanosulfonowego. W cząsteczce leku występują zatem dwa węglowe centra stereogeniczne o konfiguracji absolutnej S (Ryc. 1). Analogicznie do L-treozy, dwie grupy hydroksylowe w pozycjach 2 i 3 butanowego szkieletu TREO położone są po przeciwnych stronach łańcucha węglowego przedstawionego w projekcji Fischera (tzw. konfiguracja *treo*). W konsekwencji cząsteczka leku nie posiada płaszczyzny symetrii i dlatego wykazuje czynność optyczną [1-3].

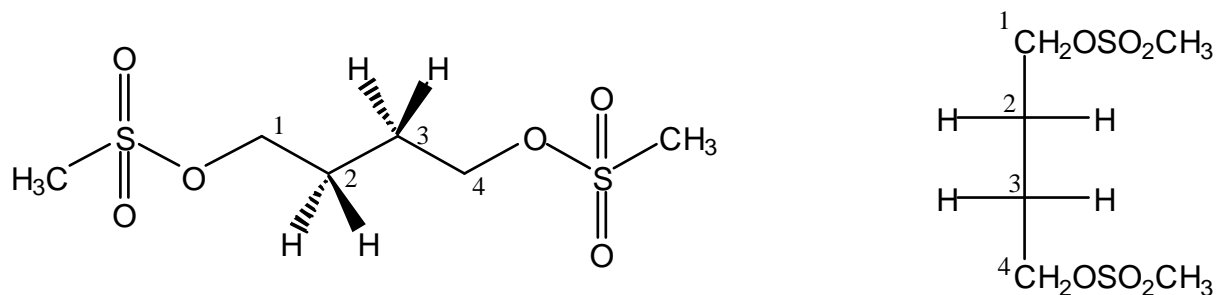


Ryc. 1. Wzór przestrzenny TREO (lewa strona) i jego projekcja Fischera (prawa strona). Dwa węglowe centra stereogeniczne oznaczono symbolem *.

Wzór sumaryczny TREO: C₆H₁₄O₈S₂

Nomenklatura TREO stosowana w literaturze: 1,4-bismetanosulfonian (2S,3S)-treitolu, 1,4-bismetanosulfonian L-treitolu, dihydroksybusulfan [1,5,6].

W chemii farmaceutycznej TREO klasyfikowany jest łącznie z BU do rodziny estrów metanosulfonowych alifatycznych dioli, stanowiących jedną z grup leków przeciwnowotworowych [4]. Pod względem budowy chemicznej TREO jest dihydroksypochodną BU, który jest związkiem o całkowicie symetrycznej cząsteczce pozbawionej czynności optycznej (Ryc. 2).



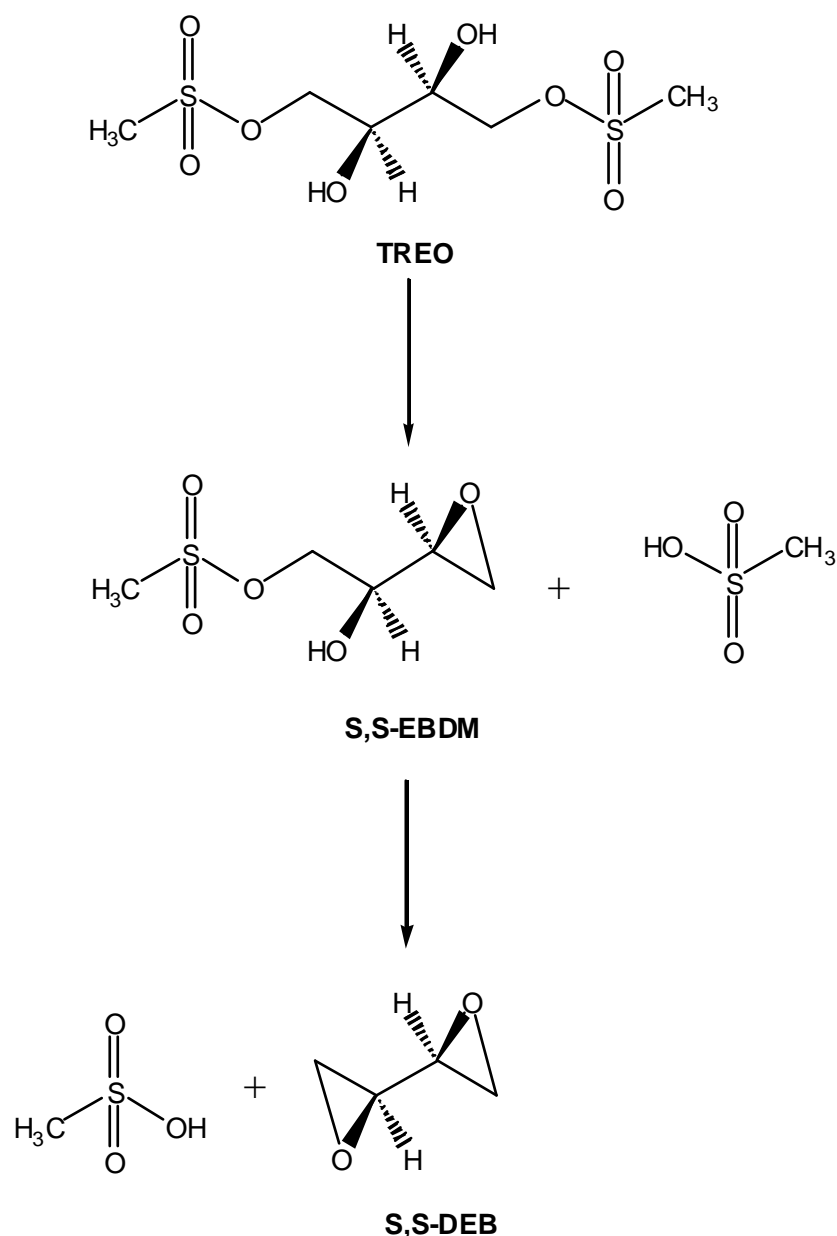
Ryc. 2. Wzór przestrzenny BU (lewa strona) i jego projekcja Fischera (prawa strona).

1.3. Właściwości fizyczne TREO

TREO jest białym, bezwonny, krystalicznym ciałem stałym o masie cząsteczkowej 278,3 g/mol i temperaturze topnienia 102,2 °C (zakres referencyjny 101 – 105 °C) [1,7]. Obecność dwóch wolnych grup hydroksylowych sprawia, iż TREO jest związkiem rozpuszczalnym w wodzie (jego rozpuszczalność w temperaturze 25 °C wynosi 70 g/l). Stąd, w przeciwieństwie do BU, lek ten może być podawany dożylnie w postaci roztworów wodnych bez użycia korozpuszczalników, takich jak N,N-dimetyloacetamid i glikol polietylenowy [7,8,9]. Rozpuszczalność TREO w polarnych rozpuszczalnikach organicznych jest zróżnicowana i dla etanolu, acetonu i chloroformu wynosi kolejno 10, 130 i 0,5 g/l (25 °C) [7].

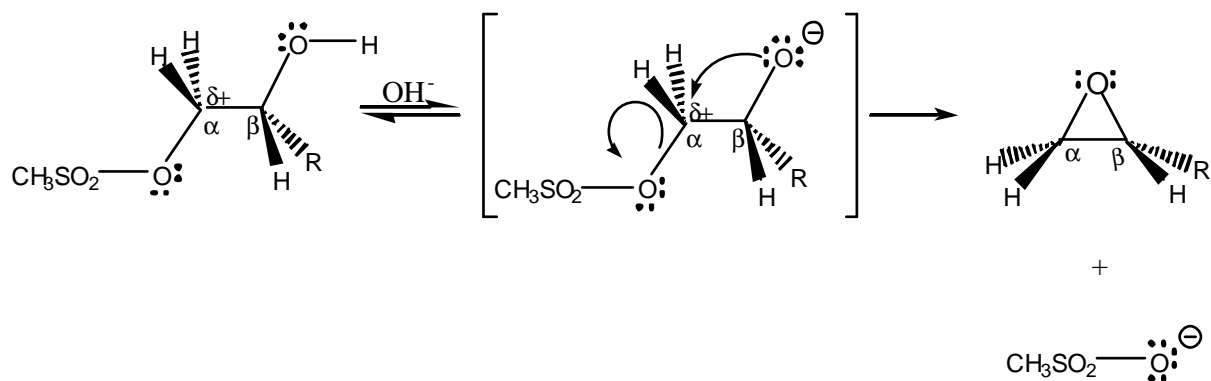
1.4. Mechanizm i kinetyka reakcji aktywacji TREO

Będąc prolekiem, TREO sam nie wykazuje działania biologicznego. Za jego aktywność w ustroju żywym odpowiedzialne są związki epoksydowe o właściwościach alkilujących, które tworzone są w wyniku złożonej dwuetapowej reakcji następczej, zależnej od pH. W pierwszej kolejności, jako produkt pośredni, powstaje 1-metanosulfonian (2S,3S)-3,4-epoksybutano-1,2-diolu (S,S-EBDM), który następnie ulega przemianie do (2S,3S)-1,2:3,4-diepoksybutanu (L-diepoksybutanu, S,S-DEB), będącego finalnym produktem aktywacji TREO. Na każdym etapie powyższej przemiany uwalniana jest jedna cząsteczka mocnego kwasu metanosulfonowego (Ryc. 3) [1,4,6,8].



Ryc. 3. Schemat dwuetapowej konwersji TREO do aktywnych biologicznie związków epoksydowych.

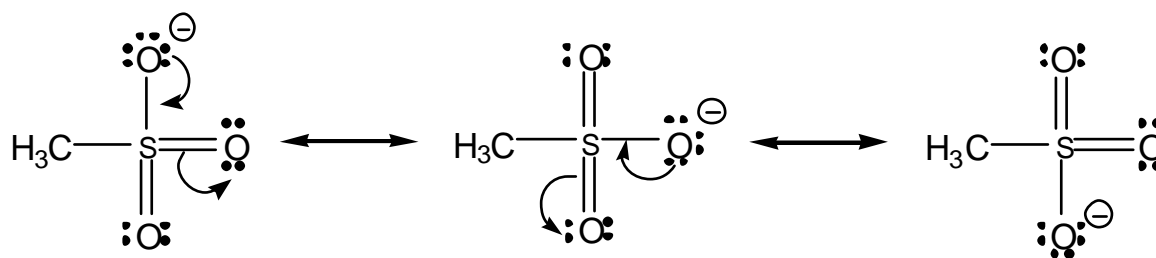
W odróżnieniu od typowych proleków, aktywacja TREO nie jest przemianą metaboliczną i zachodzi bez udziału enzymów w środowisku o $\text{pH} > 5$. Obydwa etapy powyższej aktywacji (zarówno $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-EBDM}$, jak i $\text{S,S-EBDM} \rightarrow \text{S,S-DEB}$) przebiegają na drodze wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej typu $\text{S}_{\text{N}}2$ (substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa). W takim przypadku, zamiast dwóch osobnych cząsteczek, w reakcji uczestniczą dwa ugrupowania chemiczne położone w obrębie tej samej cząsteczki związku chemicznego. Mechanizm aktywacji TREO jest identyczny do mechanizmu wewnątrzcząsteczkowej syntezy Williamsona, służącej do otrzymywania eterów



Ryc. 4. Mechanizm wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej zachodzącej w ramach aktywacji TREO. Podstawnik R = $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$ (dla reakcji TREO \rightarrow S,S-EBDM, I etap aktywacji) lub $-\text{CHCH}_2\text{O}$ (dla reakcji S,S-EBDM \rightarrow S,S-DEB, II etap aktywacji) [10,11].

cyklicznych z halogenohydryn (chlorowcoalhoholi) (Ryc. 4) [6,10,11]. Podobnie do grup halogenkowych (np. $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$), grupy metanosulfonylowe ($-\text{OSO}_2\text{CH}_3$) są silnymi nukleofilami. W konsekwencji atomy węgla w cząsteczce TREO bądź S,S-EBDM, do których przyłączone są grupy metanosulfonylowe (tzw. węgle α) obdarzone są cząstkowym ładunkiem dodatnim i wykazują charakter elektrofilowy. Przyczyną tego jest tzw. efekt indukcyjny polegający na przesunięciu elektronów w wiązaniu węgiel α – tlen w kierunku grupy metanosulfonylowej. Z kolei grupy alkoholowe, położone w pozycji β w stosunku do grup metanosulfonylowych, wykazują słaby charakter kwasowy (np. pK_a metanolu wynosi 15,5), więc w środowisku o odpowiednio wysokim pH część z nich występuje w postaci ujemnie naładowanych jonów alkoholanych. W wyniku elektrostatycznego przyciągania następuje atak jonu alkoholowego na elektrofilowy atom węgla α , prowadzący do podstawienia grupy metanosulfonylowej przez jon alkoksylowy i utworzenia pierścienia epoksydowego. Zgodnie z regiochemią reakcji $\text{S}_{\text{N}}2$, atak jonu alkoksylowego następuje od strony przeciwnej w stosunku do grupy opuszczającej, co generalnie skutkuje inwersją konfiguracji absolutnej na atomie węgla (efekt odwróconego parasola). Jednakże w konkretnym przypadku TREO czy S,S-EBDM nie obserwuje się zmiany konfiguracji, gdyż atakowany pierwszorzędowy atom węgla nie jest chiralny. Łatwość przebiegu nieenzymatycznej aktywacji TREO na drodze mechanizmu reakcji $\text{S}_{\text{N}}2$ wynika z faktu, że grupa metanosulfonylowa jest doskonałą grupą opuszczającą. Powstający z niej anion metanosulfonianowy zapewnia bowiem efektywną stabilizację własnego ładunku ujemnego, dzięki czemu reakcja substytucji nie ma tendencji do zachodzenia w przeciwną stronę.

Stabilizacja ładunku wynika z jego rozproszenia na wszystkie trzy atomy tlenu obecne w jonie $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{O}^-$ na zasadzie tzw. ujemnego efektu rezonansowego (Ryc. 5) [6,10-12].



Ryc. 5. Struktury rezonansowe anionu metanosulfonianowego odpowiedzialne za stabilizację ładunku ujemnego.

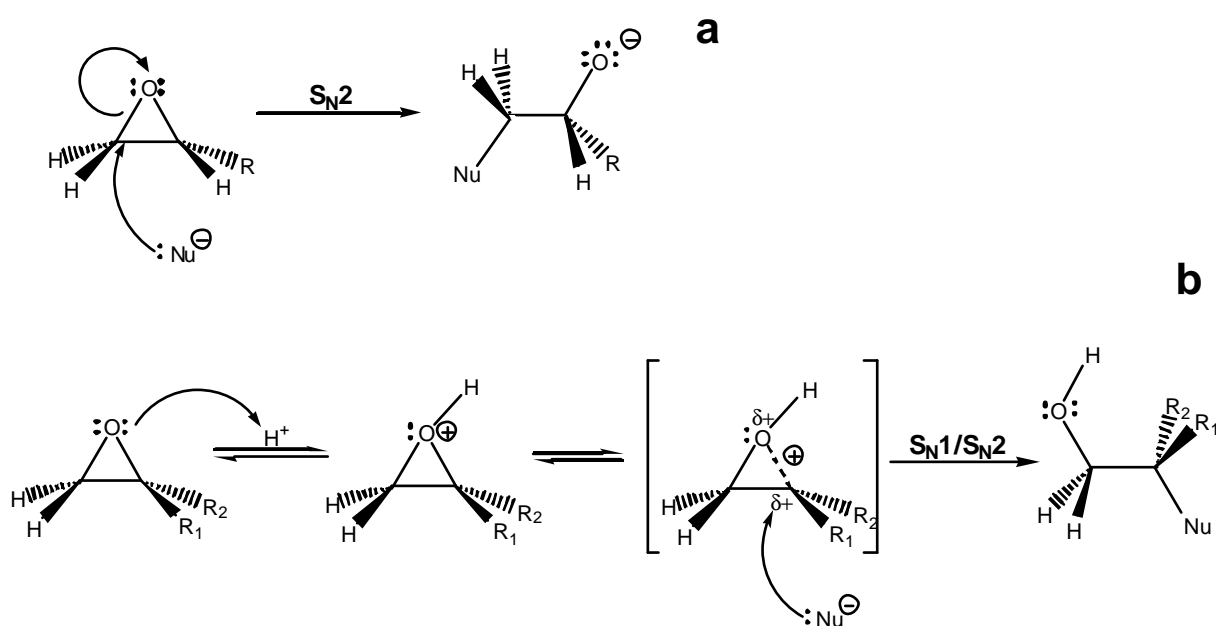
Z opisanym powyżej nieenzymatycznym mechanizmem aktywacji TREO do epoksy pochodnych wiąże się w sposób logiczny fakt, iż proces ten przebiega zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* z szybkością zależną od pH i temperatury. Wzrost zasadowości środowiska reakcji pociąga za sobą zwiększenie szybkości aktywacji TREO, ponieważ wzrasta stopień jonizacji grup alkoholowych TREO lub S,S-EBDM, co z kolei sprzyja zajęciu ataku nukleofilowego. Potwierdzeniem tej zależności są wyniki uzyskane przez Matagne [13], który badał kinetykę sumarycznej przemiany TREO do S,S-DEB w zakresie pH 7,0 – 8,5, stosując alkalimetryczne miareczkowanie kwasu metanosulfonowego, uwalniającego się w czasie tworzenia epoksytransformerów. W swoich badaniach autor przyjął, wzorując się na pracy Davisa i Rossa [14], że S,S-EBDM jest jedynie chwilowym stanem przejściowym i nie występuje w środowisku reakcji w mierzalnych stężeniach. Wyznaczone przez Matagne stałe szybkości reakcji pierwszego rzędu $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-DEB}$ w temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$ w 0,2 mol/l KCl wzrastały wyraźnie od wartości $0,014\text{ h}^{-1}$ przy pH 7,0 do $0,552\text{ h}^{-1}$ przy pH 8,5 [13]. Błędne założenia Rossa i Davisa oraz Matagne o braku kumulacji S,S-EBDM w roztworze podczas aktywacji TREO, podważyli Feit i wsp. [6]. Dokonali oni izolacji monoepoksydu z roztworu wodnego i potwierdzili jego strukturę za pomocą spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego. Ponadto zaobserwowali, iż maksymalne stężenie S,S-EBDM odpowiadało zużyciu 0,8 – 1,1 mola NaOH w przeliczeniu na 1 mol początkowej ilości TREO i na tej podstawie obliczyli, iż stała szybkości reakcji $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-EBDM}$ (k_1) była w przybliżeniu dwukrotnie większa od stałej szybkości reakcji $\text{S,S-EBDM} \rightarrow \text{S,S-DEB}$ (k_2). W konsekwencji stała szybkości sumarycznej przemiany $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-DEB}$, wyznaczona doświadczalnie przez miareczkowanie kwasu

metanosulfonowego, w rzeczywistości odpowiadała liczbowo stałej k_2 , opisującej wolniejszy etap S,S -EBDM \rightarrow S,S -DEB, natomiast stała k_1 szybszej reakcji $TREO \rightarrow S,S$ -EBDM została przez nich obliczona jako dwukrotność k_2 . Konkretnie wartości stałych k_1 i k_2 wyznaczone w roztworze wodnym $TREO$ w warunkach pH 8,5 i 25 °C wynosiły odpowiednio 0,612 i 0,306 h⁻¹. W ten sposób praca Feita i wsp. wykazała, iż na aktywację $TREO$ składają się dwie pierwszorzędowe reakcje następcze wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej. Potwierdziła ona również wcześniejsze przypuszczenia, iż podczas tworzenia pierścieni epoksydowych dwa ugrupowania β -hydroksymetanosulfonylowe $TREO$ ulegają reakcji substytucji praktycznie niezależnie od siebie [6,14]. Jednakże dopiero w pracy opublikowanej w 2013 r. [15], zastosowano bezpośredni pomiar stężeń $TREO$, S,S -EBDM i S,S -DEB metodą HPLC zamiast miareczkowania kwasu metanosulfonowego. Dzięki temu możliwe było niezależne śledzenie kinetyki aktywacji $TREO$ i jego epoksytransformerów. Wyznaczona w temperaturze 37 °C w środowisku 0,0730 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4 stała k_1 wynosiła 0,453 h⁻¹. Ponadto, mimo iż S,S -DEB jest końcowym produktem aktywacji $TREO$, obserwowano spadek jego stężenia w terminalnej fazie monitorowanej przemiany. W ten sposób dowiedziono, iż w warunkach *in vitro* odpowiadających fizjologicznemu pH, temperaturze i sile jonowej krwi, razem z tworzeniem się S,S -EBDM i S,S -DEB, zachodzi konkurencyjna reakcja ich hydrolytycznego rozkładu, wynikająca z reaktywności pierścienia epoksydowego [15].

Ponieważ aktywacja $TREO$ związana jest z uwalnianiem mocnego kwasu metanosulfonowego ($pK_a = -1,9$), a jej szybkość jest dodatnio skorelowana z wartością pH, w środowisku o niewystarczającej pojemności buforowej dochodzi do zjawiska autoinhibicji tej reakcji. Potwierdzeniem tego faktu w warunkach *in vitro* jest opisana w literaturze metoda otrzymywania roztworów wodnych zawierających mieszaninę $TREO$ i jego epoksytransformerów o określonych stężeniach, opierająca się na miareczkowaniu proleku stechiometryczną ilością NaOH [8,15]. Sugeruje się również występowanie częściowej autoinhibicji przemiany $TREO$ w warunkach *in vivo*. Wskazuje na to uzyskany w badaniach farmakokinetycznych nieliniowy wzrost pola pod krzywą stężenie leku w osoczu – czas (AUC) dla $TREO$ oraz zwiększony stosunek stężenia $TREO$ do S,S -EBDM w osoczu u pacjentów, którzy otrzymali wysokie dawki leku [5,16].

1.5. Mechanizm i kinetyka otwierania pierścienia epoksydowego

Generalną cechą związków epoksydowych jest ich wysoka reaktywność chemiczna, wynikająca z obecności naprężonego pierścienia trójczłonowego i wchodzącym w jego skład elektrofilowym atomom węgla [9-11,17,18]. Mechanizm i regiochemia otwierania pierścienia epoksydowego zależą od budowy epoksydu oraz warunków prowadzenia reakcji. W warunkach zasadowych reakcja przebiega zgodnie z mechanizmem typowej dwucząsteczkowej reakcji S_N2 , w której atak nukleofila zachodzi na atom węgla o mniejszej zawadzie przestrzennej (kolejno: pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowy) (Ryc. 6a). Bardziej skomplikowana jest reakcja otwierania pierścienia w warunkach kwasowych, w których zazwyczaj tworzy się mieszanina izomerycznych produktów. Mechanizm tej reakcji jest pośredni między typowymi przemianami S_N1 i S_N2 . Świadczy o tym fakt, iż najbardziej uprzywilejowany jest atak na najbardziej zasłonięty trzeciorzędowy atom węgla, a następnie pierwszo- lub drugorzędowy, w zależności od danego substratu i warunków prowadzenia procesu. W pierwszym etapie reakcji, poprzedzającym właściwą substytucję, następuje protonowanie tlenu pierścienia epoksydowego, co czyni go lepszą grupą opuszczającą (grupą alkoholową) (Ryc. 6b). Jeśli w obrębie pierścienia epoksydowego występuje trzeciorzędowy atom węgla, ładunek dodatni protonowanego pierścienia ulega częściowo rozmyciu na wspomniany atom węgla, gdyż w układzie trzeciorzędowym ma on dobrą zdolność stabilizacji ładunku dodatniego. W konsekwencji w dalszym etapie reakcja podstawienia przebiega przez stan przejściowy, który w dużym stopniu ma charakter karbokationowy. Choć nie zachodzi tu tworzenie pełnowartościowego karbokationu obdarzonego ładunkiem



Ryc. 6. Mechanizm otwierania pierścienia epoksydowego w środowisku zasadowym (a) i kwasowym (b). R – podstawnik alkilowy lub aryłowy [10-12].

o całkowitej wartości, to opisany mechanizm przypomina reakcję S_N1 . Gdy zaś w skład pierścienia oksiranowego wchodzi pierwszo- i drugorzędowy atom węgla, reakcja substytucji może przebiegać zarówno z utworzeniem, jak i bez utworzenia stanu przejściowego o cechach karbokationu. W pierwszym przypadku reakcja ponownie zachodzi w sposób uprzywilejowany na węglu bardziej podstawionym (jak w S_N1), natomiast w drugim – w miejscu mniej podstawionym (jak w S_N2). Niezależnie jednak od kierunku otwierania pierścienia epoksydowego, atak nukleofila na atom węgla zawsze następuje od strony przeciwnej do atomu tlenu, powodując inwersję konfiguracji absolutnej, co jest typową cechą reakcji S_N2 [10-12,17].

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, iż epoksytransformery TREO ulegają selektywnemu (w warunkach zasadowych) bądź preferencyjnemu (w warunkach kwasowych) rozszczepieniu pierścienia oksiranowego w wyniku ataku nukleofila na pierwszorzędowy, bardziej odsłonięty achiralny atom węgla. Prawidłowość ta znajduje potwierdzenie w strukturach powstających w wyniku selektywnej alkilacji DNA przez S,S-DEB (opisanych w rozdziale 1.6). Z kolei w typowych warunkach kwasowych, w których prowadzono reakcję derywatywacji S,S-EBDM i S,S-DEB za pomocą kwasu 3-nitrobenzenosulfonowego (3-NBS), otrzymano mieszaninę izomerów. Oprócz dominującego produktu, stwierdzono również produkt poboczny, który tworzył się w wyniku ataku odczynnika derywatywującego na drugorzędowy chiralny atom węgla zarówno S,S-EBDM, jak i S,S-DEB [16].

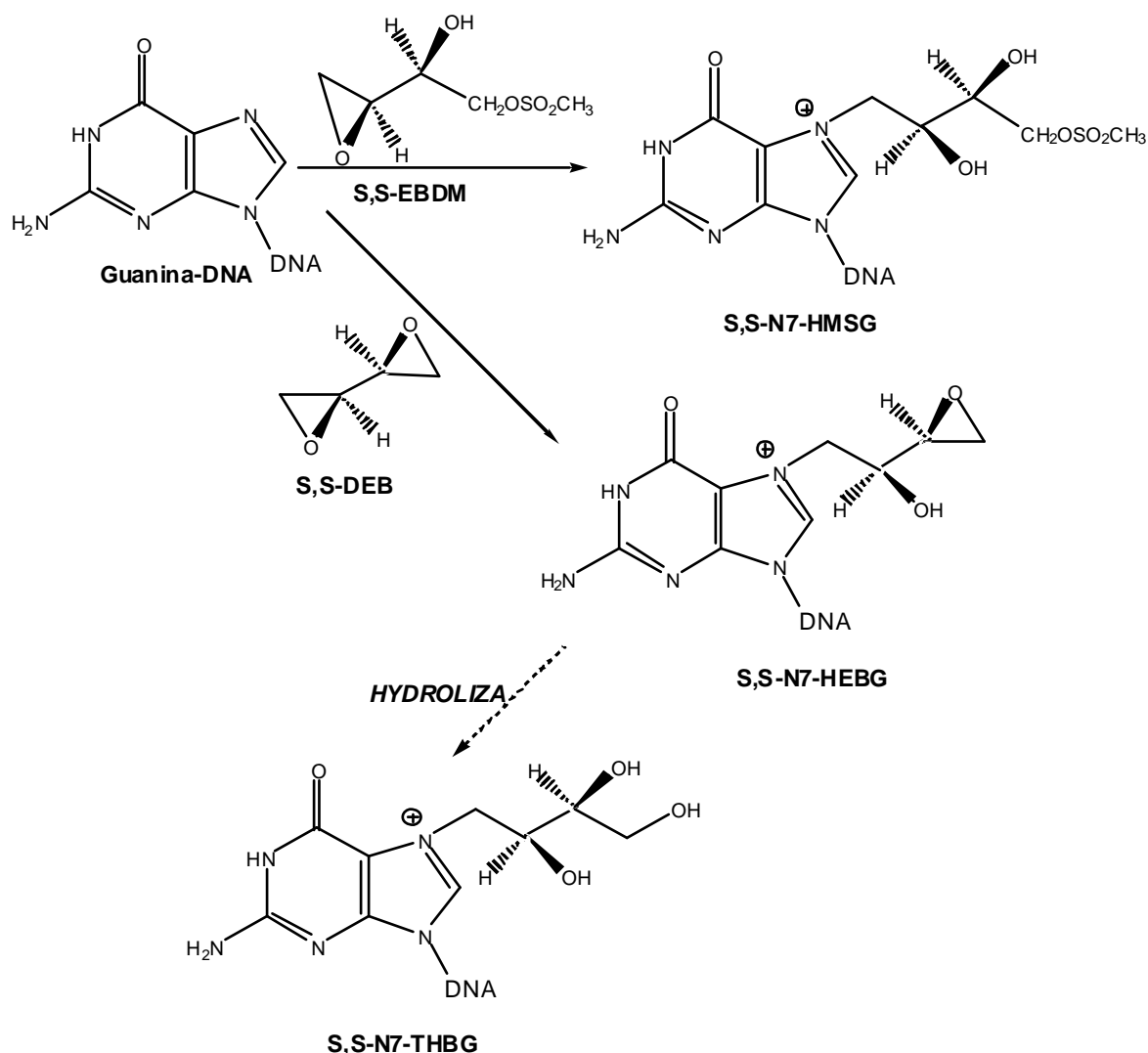
W piśmiennictwie pojawiają się nieliczne dane dotyczące hydrolizy samych stereoizomerów 1,2:3,4-diepoksybutanu (DEB) w warunkach *in vitro*. W badaniach Bogaarda i Bonda [19] hydroliza DEB w 0,1 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4 w temperaturze 37 °C przebiegała zgodnie z kinetyką pseudopierwszego rzędu ze stałą szybkości 0,032 h⁻¹. Znacznie szybszy nieenzymatyczny rozkład DEB obserwowano *in vitro* we krwi i homogenatach mysich tkanek w 37 °C, co wynikało z łączenia się epoksydu z biostrukturami. Wartości stałych szybkości wyznaczone dla krwi, tkanki tłuszczowej, wątroby i nerek wynosiły odpowiednio 0,19, 2,80, 3,15 i 4,10 h⁻¹. Co ciekawe, nieenzymatycznej hydrolizy epoksydu nie stwierdzono w homogenacie tkanki mięśniowej [20]. Należy w tym miejscu zaznaczyć, iż reakcje rozkładu pierścienia epoksydowego mogą być katalizowane przez enzymy pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego (np. mysiego, szczurzego). Wiadomo, że potencjalnymi mechanizmami detoksykacji DEB u ludzi i gryzoni są reakcje sprzęgania z glutationem (GSH) w obecności S-transferazy

glutationowej (GST) oraz hydrolizy katalizowanej przez hydrolazę epoksydową (EH) (omówione szerzej w rozdziale 1.12).

1.6. Mechanizm działania epoksytransformerów TREO

Dzięki obecności pierścieni epoksydowych produkty aktywacji TREO wykazują działanie alkilujące i reagują z DNA oraz innymi biomolekułami zgodnie z mechanizmem reakcji S_N2 [6,21]. Pierścienie epoksydowe naśladują strukturą i elektrofilowymi właściwościami trójczłonowe cykliczne jony azyrydyniowe, będące aktywną formą pochodnych iperytu azotowego (bis-chloroetyloaminy) [4,21]. Podobnie jak w przypadku tych ostatnich oraz BU, głównym miejscem alkilacji DNA pod wpływem epoksytransformerów TREO jest pozycja N-7 guaniny, która ze względu na zasobny w elektrony π pierścień imidazolowy posiada najsilniejszy charakter nukleofilowy w cząsteczce DNA. Uprzywilejowanym obszarem alkilacji helisy są fragmenty, w których sąsiadują ze sobą nukleotydy guaninowe [4,8,22]. Należy jednak zaznaczyć, iż produkty aktywacji TREO różnią się zdolnością alkilowania DNA. S,S-EBDM, posiadający jedną grupę epoksydową, jest alkilantem monofunkcyjnym, stąd w przeciwieństwie do S,S-DEB – alkilanta bifunkcyjnego, nie może tworzyć wiązań poprzecznych w obrębie helisy DNA. W konsekwencji właściwości cytotoksyczne S,S-EBDM są istotnie mniejsze niż S,S-DEB. W badaniach *in vitro* na komórkach stożka wzrostu korzenia cebuli aktywność S,S-EBDM w indukowaniu aberracji chromosomowych była około 40-krotnie mniejsza od S,S-DEB. Generalnie uważa się, iż monofunkcyjne leki alkilujące wywołują głównie efekty mutagenne, natomiast bifunkcyjne działają przede wszystkim cytotoksycznie [4,6].

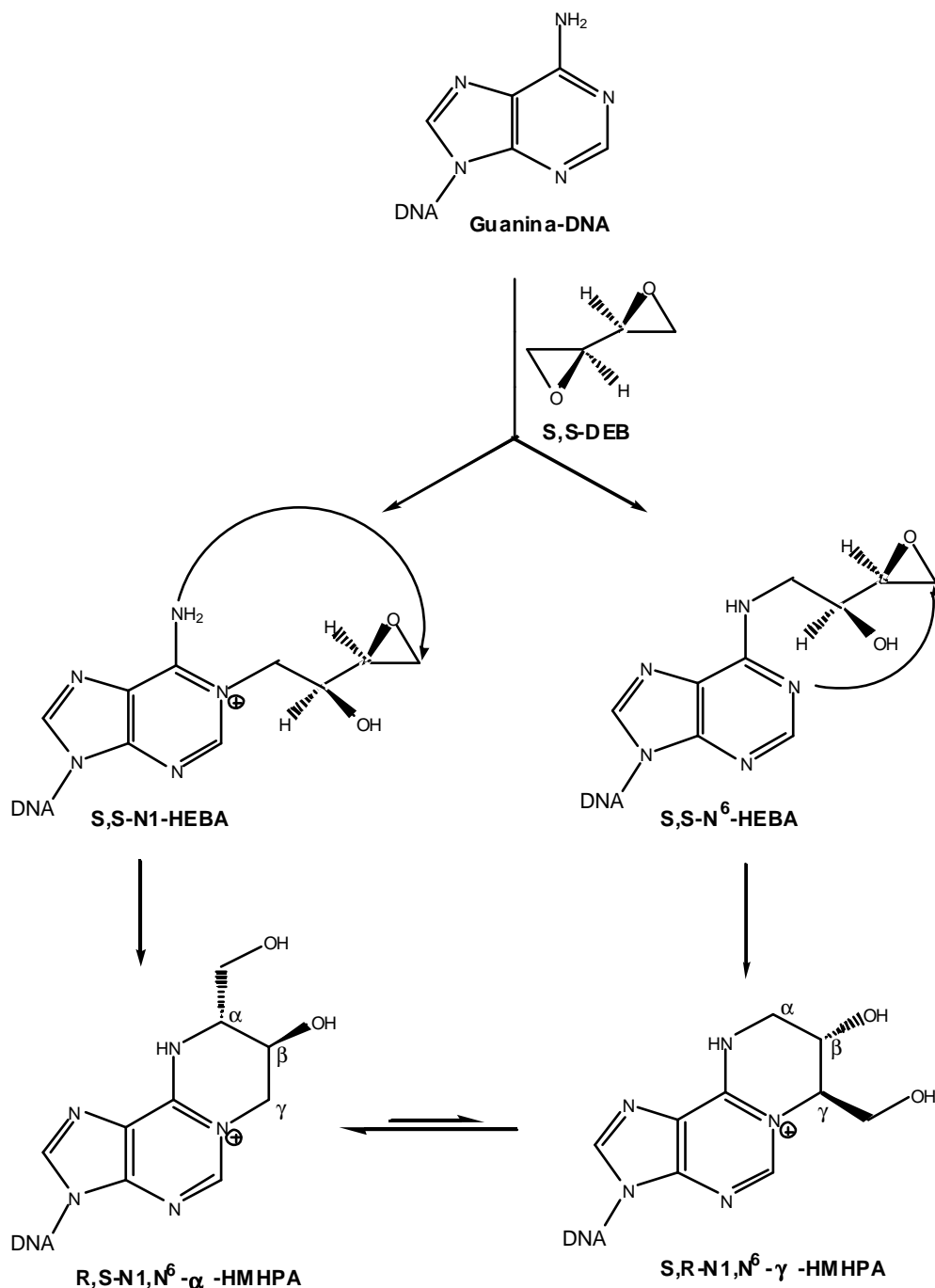
Ponieważ za działanie biologiczne TREO odpowiada głównie S,S-DEB, a dodatkowo jest on jednym z metabolitów buta-1,3-dieniu (BD), stosowanego powszechnie w produkcji gum i plastyfikatorów, większość doniesień literaturowych dotyczy właśnie tego epoksydu lub jego stereoizomerów [8,23]. Do tej pory w literaturze nie opisano struktury produktu alkilacji DNA przez S,S-EBDM, ale łatwo przewidzieć, że jest nim monoaddukt (2'S,3'S)-N7-(2',3'-dihydroksy-4'-metylosulfonyloksybut-1'-ylo)guaninowy (S,S-N7-HMSG) (Ryc. 7). Na podstawie badań *in vitro* dobrze opisano natomiast budowę produktów alkilowania DNA pod wpływem S,S-DEB, z uwzględnieniem stereochemii procesu. Początkowo następuje monoalkilacja pozycji N-7 guaniny z udziałem jednego z pierścieni oksiranowych S,S-DEB, prowadząca do monoadduktu (2'S,3'S)-N7-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)guaninowego (S,S-N7-HEBG) (Ryc. 7) [21]. Odkryte niedawno w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u myszy egzocykliczne monoaddukty adenininowe –



Ryc. 7. Monoalkilacja DNA w pozycji N7 guaniny pod wpływem epoksytransformerów TREO. W reakcji z guaniną uczestniczy wyłącznie pierwszorzędowy atom węgla pierścienia epoksydowego, wykazujący mniejszą zawadę przestrzenną. Monoaddukt S,S-N7-HEBG, utworzony przez S,S-DEB, może ulegać spontanicznej hydrolizie do monoadduktu S,S-N7-THBG (opis w tekście) [21,30,31].

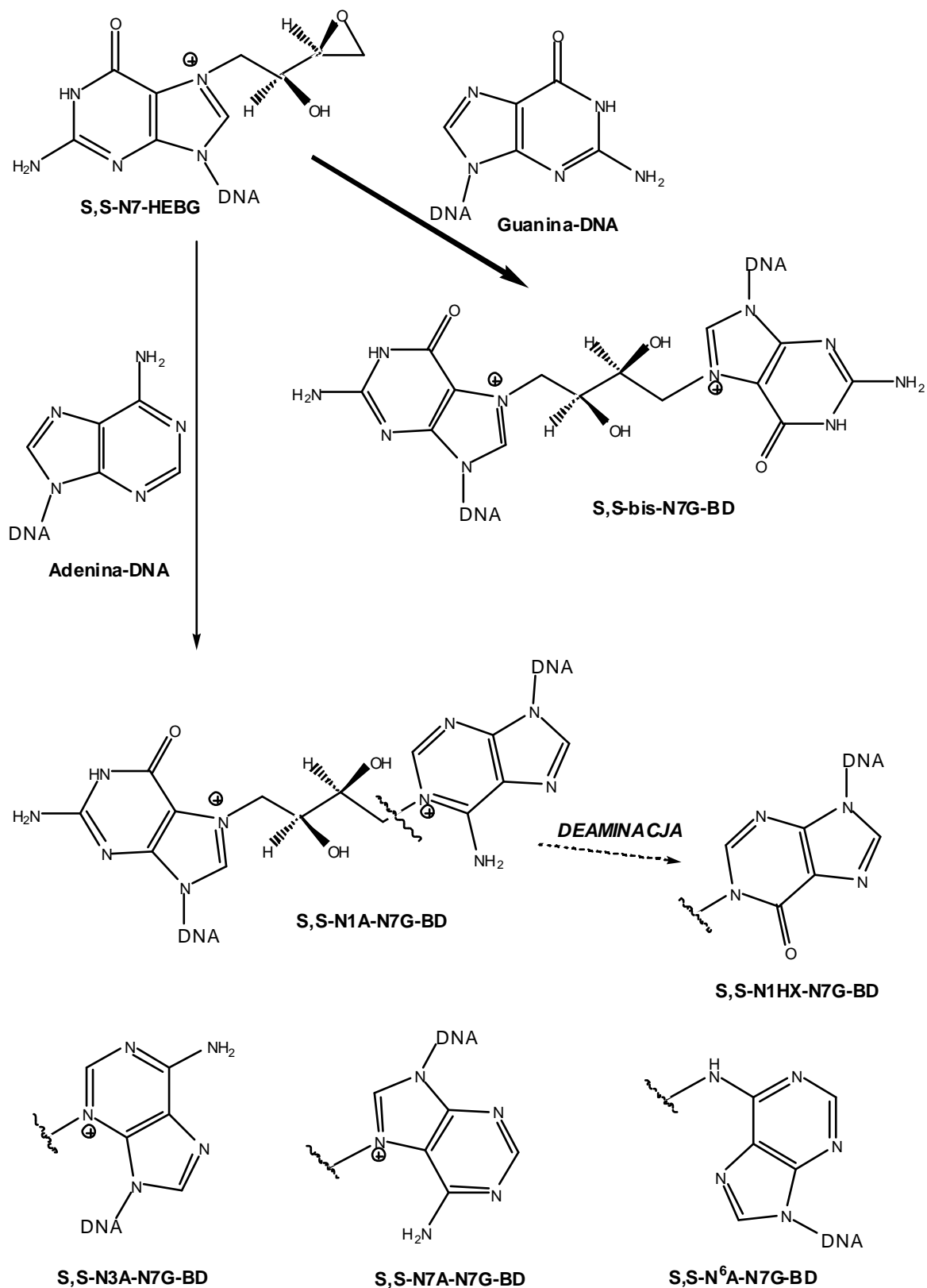
(1'R,2'S)-N1,N⁰-(1'-hydroksymetylo-2'-hydroksyprop-1',3'-diylo)adeninowy (R,S-N1,N⁰- α -HMHPA) oraz (2'S,3'R)-N1,N⁶-(2'-hydroksy-3'-hydroksymetyloprop-1',3'-diylo)adeninowy (S,R-N1,N⁶- γ -HMHPA) (Ryc. 8) wskazują, że możliwy jest również inny schemat pierwszego etapu alkilacji DNA pod wpływem S,S-DEB, choć z pewnością ma on mniejsze znaczenie w stosunku do wyżej opisanego. W tym schemacie, zamiast guaniny, S,S-DEB alkiluje pozycję N1 lub N⁶ adeniny, czego przejściowym produktem jest odpowiednio monoaddukt (2'S,3'S)-N1-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)adeninowy (S,S-N1-HEBA) i (2'S,3'S)-N⁶-(2'-hydroksy-3',4'-epoksybut-1'-ylo)adeninowy (S,S-N⁶-HEBA), obydwa o strukturze analogicznej do S,S-N7-HEBG. W warunkach fizjologicznych S,S-N1-HEBA

i S,S-N⁶-HEBA ulegają bardzo szybkiej samorzutnej reakcji wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej typu S_N2 poprzez atak azotu odpowiednio N⁶ i N1 na drugorzędowy chiralny atom węgla pierścienia epoksydowego, na którym następuje inwersja konfiguracji absolutnej. Utworzone w tej reakcji odpowiednio R,S-N1,N⁶-α-HMHPA i S,R-N1,N⁶-γ-HMHPA podlegają wzajemnej interkonwersji, której stan równowagi przesunięty jest w stronę R,S-N1,N⁶-α-HMHPA, stąd jego poziomy *in vivo* są wyższe niż S,R-N1,N⁶-γ-HMHPA (Ryc. 8) [24].



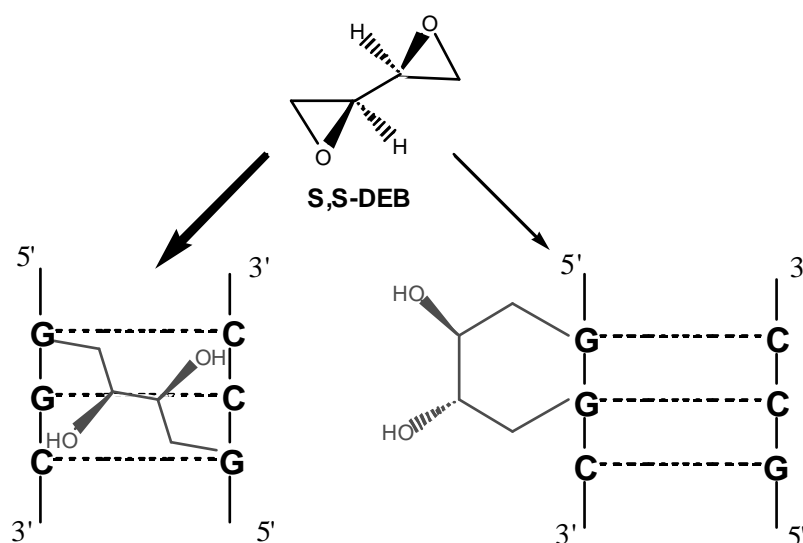
Ryc. 8. Tworzenie egzocyklicznych monoadduktów adeninowych w DNA pod wpływem S,S-DEB [24].

Monoaddukt S,S-N7-HEBG może ulegać kilku drogom reakcji z wykorzystaniem drugiej, dotąd nienaruszonej, grupy epoksydowej S,S-DEB (Ryc. 9). Najbardziej istotną z punktu widzenia farmakologicznej TREO jest alkilacja drugiej cząsteczki guaniny w pozycji N-7 prowadząca do utworzenia diadduktu S,S-1,4-bis(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowego (S,S-bis-N7G-BD), który stanowi wiązanie poprzeczne w obrębie helisy DNA. W badaniach z użyciem racematu DEB ((±)-DEB) zidentyfikowano również mostki poprzeczne będące połączeniami monoadduktu (±)-N7-HEBG (racemat) z adeniną w pozycji N1 (addukt 1-(aden-1'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy, N1A-N7G-BD), N3 (addukt 1-(aden-3'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy, N3A-N7G-BD), N7 (addukt 1-(aden-7'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy, N7A-N7G-BD) oraz egzocyklicznej pozycji N⁶ (addukt 1-(aden-N⁶-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy, N⁶A-N7G-BD). Łącznie cztery wymienione mostki adenina – guanina tworzyły się w ilości około 10-krotnie mniejszej niż główne addukty (±)-bis-N7G-BD [25]. W tym miejscu warto podkreślić, iż obecność adduktów (±)-bis-N7G-BD oraz, w mniejszej ilości, (±)-N1A-N7G-BD stwierdzono również w badaniach *in vivo* u myszy i szczurów narażonych na inhalację BD [26-28]. Dodatkowo przypuszcza się, że N1A-N7G-BD może częściowo ulegać spontanicznej deaminacji do nowego produktu, jakim jest addukt 1-(hipoksant-1'-ylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowy (N1HX-N7G-BD) (Ryc. 9) [29]. Alternatywną do opisanych drogą przemiany monoadduktu S,S-N7-HEBG jest hydroliza wolnej grupy epoksydowej, prowadząca do utworzenia monoadduktu S,S-N7-(2',3',4'-trihydroksybut-1'-ylo)guaninowego (S,S-N7-THBG) (Ryc. 7) [21,30]. W warunkach *in vitro* ilość monoadduktów (±)-N7-THBG tworzonych w helisie DNA grasicy cielęcej przez (±)-DEB w zakresie stężeń 50 – 100 μmol/l była zbliżona do ilości diadduktów (±)-bis-N7G-BD. Natomiast przy większych stężeniach epoksydu rzędu 0,5 – 50 mmol/l tworzenie (±)-N7-THBG było zdecydowanie procesem dominującym, prawdopodobnie jako następstwo szybkiego wysycenia miejsc DNA korzystnych dla podwójnej alkilacji, wymaganej przy powstawaniu wiązań poprzecznych [21]. W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem (±)-DEB wykazano, że tworzenie diadduktów (±)-bis-N7G-BD zachodzi preferencyjnie nie w obrębie jednej nici, ale między dwoma komplementarnymi nićmi DNA, zarówno wolnego, jak i nukleosomowego, w regionach o sekwencji 5'-GNC/3'-CNG (N = G lub C, znacznie rzadziej A lub T), dając wiązanie poprzeczne typu 1,3-międzyniciowego. Wiązania typu 1,2-międzyniciowego w sekwencji 5'-GC/CG-3', postulowane wcześniej jako główne połączenia, oraz wiązania 1,4-międzyniciowe w regionach 5'-GNNC/3'-CNNG tworzyły się tylko w krótkich oligomerach DNA [30-32]. Również podczas tworzenia diadduktów adeninowo-guaninowych (±)-N1A-



Ryc. 9. Tworzenie diadduktów guaninowo-guaninowych (uprzywilejowany kierunek reakcji) i adeninowo-guaninowych pod wpływem *S,S*-DEB, stanowiących wiązania poprzeczne w helisie DNA. Addukt adeninowo-guaninowy *S,S*-N1A-N7G-BD może częściowo ulegać spontanicznej deaminacji do adduktu hipoksantyno-guaninowego *S,S*-N1HX-N7G-BD [25-29].

BD w syntetycznym duplekcie DNA, głównym typem wiązań krzyżowych były wiązania 1,3-międzyniciowe [25]. Praca Parka i wsp. [30] dowiodła, że pojedyncze czyste enancjomery DEB charakteryzują się podobną reaktywnością w tworzeniu mostków poprzecznych w DNA grasicy cięcej. Stosując syntetyczną helisę DNA złożoną z dwóch komplementarnych 28-nukleotydowych oligomerów i posiadającą region 5'-GGC/3'-CCG, badacze wykazali jednak, że regiochemia tworzenia wiązań poprzecznych jest odmienna dla każdego enancjomeru DEB. Dla S,S-DEB obserwowano wysoką regioselektywność procesu, gdyż aż 96% odpowiednich diadduktów S,S-bis-N7G-BD tworzyło wiązanie typu 1,3-międzyniciowego w sekwencji 5'-GGC/3'-CCG, a jedynie 4% wiązanie typu 1,2-wewnętrznicowego w obrębie sekwencji 5'-GC/3'-CG (Ryc. 10). Natomiast w przypadku R,R-DEB część wiązań poprzecznych była typu 1,3-międzyniciowego (68%), część typu 1,2-międzyniciowego, a pozostałe 19% adduktów R,R-bis-N7G-BD tworzyło wiązanie 1,2-wewnętrznicowe. Opisaną selektywność podwójnej alkilacji regionu 5'-GGC/3'-CCG DNA przez S,S-DEB tłumaczy się tworzeniem wiązania wodorowego między grupą 2'-hydroksylową przejściowego monoadduktu S,S-N7-HEBG i azotem N3 3'-sąsiadującej guaniny. Wiązanie to ustawia wolny pierścień epoksydowy wspomnianego monoadduktu w pozycji najbardziej korzystnej dla nukleofilowego ataku właśnie azotu N7 bardziej odległej guaniny komplementarnej nici kwasu nukleinowego. Co ciekawe, w ludzkim DNA o naturalnej konformacji B odległość między skrajnymi guaninami komplementarnych nici w sekwencji 5'-GGC/3'-CCG wynosi 8,9 Å i jest dużo większa niż długość czterocząłowego łańcucha węglowego (około 4 Å). Stąd utworzenie S,S-bis-N7G-BD musi



Ryc. 10. Wiązania poprzeczne tworzone przez S,S-DEB w helisie DNA w obrębie sekwencji 5'-GGC. Preferencyjnie powstają wiązania 1,3-międzyniciowe (96%) oraz mała liczba wiązań 1,2-wewnętrznicowych [30].

być poprzedzone zniekształceniem helisy DNA, w którym główną rolę odgrywa kationowy monoaddukt S,S-N7-HEBG [30]. Millard i wsp. [33] oszacowali, iż utworzenie jednego mostka 1,3-międzyniciowego w sekwencji 5'-GGC/CCG-3' pociąga za sobą wygięcie helisy kanonicznego B-DNA o około 34° w kierunku bruzdy większej.

Kinetykę tworzenia międzyniciowych wiązań krzyżowych w DNA pod wpływem TREO *in vitro* opisali Hartley i wsp. [8]. W nagim DNA plazmidowym narażonym w sposób ciągły na działanie TREO o stężeniu 10 mmol/l obserwowano powolny przyrost ilości mostków poprzecznych, która w 4 i 24 h wyniosła odpowiednio 8,9 i 62,2% w stosunku do maksymalnej możliwej ich liczby. Kiedy natomiast DNA poddany był działaniu równomolowej mieszaniny TREO i obu jego epoksytransformerów o sumarycznym stężeniu 10 mmol/l sieciowanie helisy kwasu nukleinowego przebiegało znacznie intensywniej, wynosząc 29,7 i 90,7% odpowiednio po 4 i 24 h narażenia. Podobną prawidłowość zanotowano podczas tworzenia wiązań poprzecznych w linii komórkowej K562 przewlekłej białaczki szpikowej (CML). W obu przypadkach za opóźniony efekt alkilacji obserwowany przy zastosowaniu samego TREO odpowiadała jego nieenzymatyczna dwuetapowa konwersja do S,S-DEB. Ponadto, w doświadczeniach tych potwierdzono zależność intensywności tworzenia wiązań poprzecznych od stężenia TREO oraz produktów jego aktywacji [8].

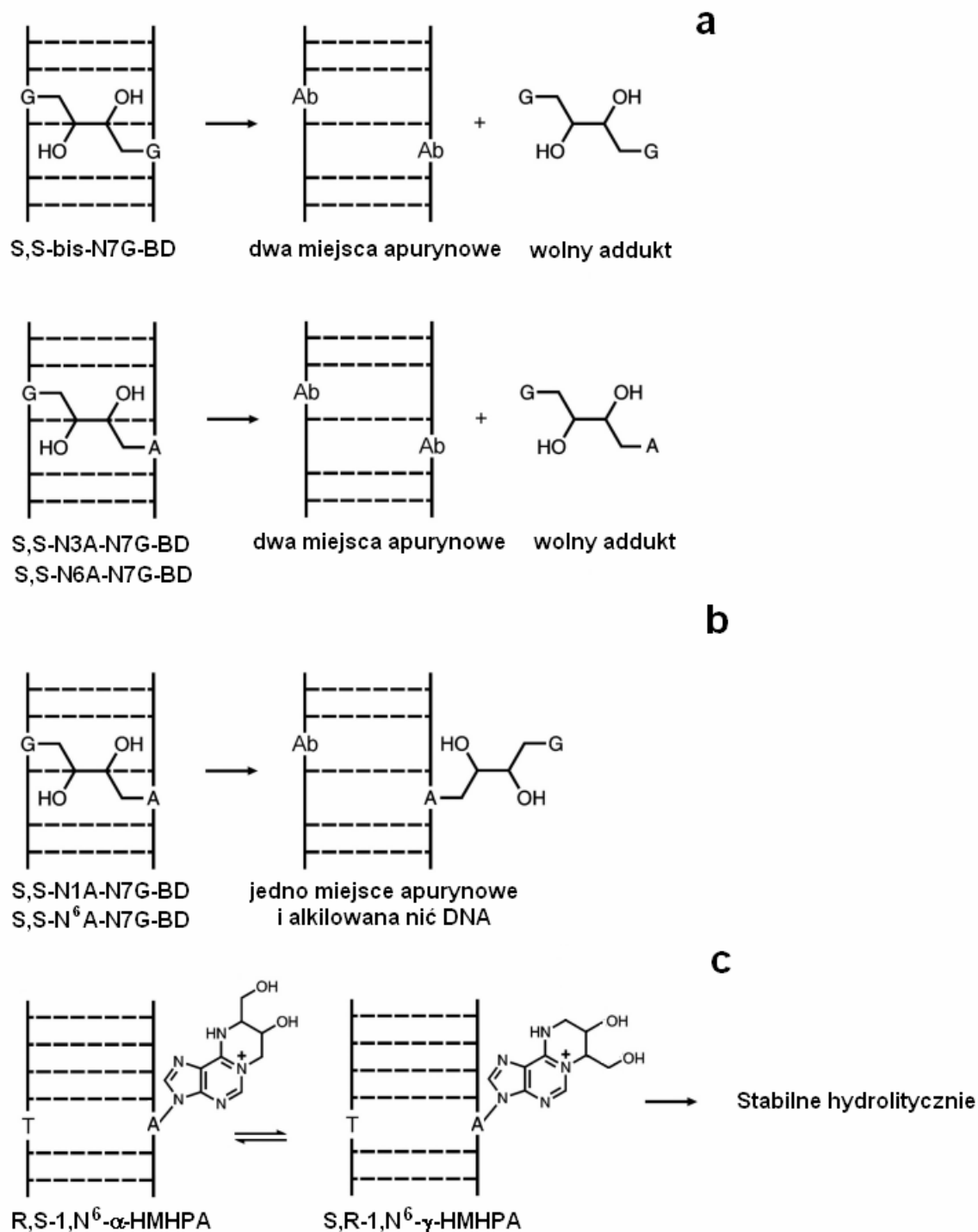
Po pojedynczej lub podwójnej alkilacji DNA często dochodzi do dalszych nieodwracalnych zmian jego struktury. Wiadomo, iż alkilacja guaniny w pozycji N-7 powoduje tzw. kwaternizację, czyli utworzenie czwartorzędowego jonu amoniowego z ładunkiem dodatnim zlokalizowanym na endocyklicznym atomie azotu (Ryc. 7 – 9). Nadaje to cząsteczce guaniny większy charakter kwasowy i powoduje jej przekształcenie z postaci ketonowej w enolową. Ponieważ zasady guaninowe w tautomerycznej formie enolowej mogą łączyć się trzema wiązaniami wodorowymi z cząsteczką tyminy, zamiast dwoma wiązaniami z cząsteczką cytozyny, w konsekwencji może dochodzić do mutacji punktowych G:C → A:T. Z tym faktem wiąże się prawidłowość, iż alkilanty monofunkcyjne, takie jak S,S-EBDM, wywołują przede wszystkim działanie mutagenne. Ponadto, skutkiem kwaternizacji guaniny jest destabilizacja wiązania β-glikozydowego między deoksyrybozą i guaniną, przez co znaczna część alkilowanych cząsteczek guaniny ulega spontanicznej hydrolizie (depuryacji) [4,30,34]. Przykładowo monoaddukt (±)-N7-THBG i diaddukt (±)-bis-N7G-BD ulegały samorzutnej depuryacji w warunkach *in vitro*. W środowisku o pH 7,3 i temperaturze 37 °C okres półtrwania ($t_{0,5}$) diadduktu był prawie dwukrotnie dłuższy niż monoadduktu (82 vs 48 h), co wiąże się logicznie z podwójnym połączeniem tego pierwszego z helisą DNA [21].

Spontanicznej obustronnej depuracji w warunkach fizjologicznych łatwo ulegały również dwa z czterech możliwych adduktów adeninowo-guaninowych, mianowicie (\pm)-N3A-N7G-BD ($t_{0,5}$ 35 h) oraz (\pm)-N7A-N7G ($t_{0,5}$ 17 h) (Ryc. 9). Pozostałe dwa addukty, tj. (\pm)-N1A-N7G-BD oraz (\pm)-N⁶A-N7G-BD charakteryzowały się natomiast wysoką opornością na tego typu reakcję, ulegając jedynie jednostronnemu odszczepieniu od nici DNA w miejscu występowania guaniny [25]. W badaniach *in vitro* autorstwa Goggin i wsp. [35] wartości $t_{0,5}$ samorzutnej hydrolizy czystych enancjomerycznie S,S-bis-N7G-BD (3,5 dnia) i S,S-N1A-N7G-BD (ponad 50 dni) były zgodne z wyżej cytowanymi doniesieniami. Dodatkowo stwierdzono również wysoką trwałość hydrolityczną mieszaniny konwertujących egzocyklicznych adduktów R,S-1,N⁶- α -HMHPA i S,R-1,N⁶- γ -HMHPA ($t_{0,5}$ ponad 50 dni) (Ryc. 11). Ciekawe wyniki ci sami badacze uzyskali w warunkach *in vivo* u myszy narażonych na 10-dniową inhalację BD, który ulega metabolicznej przemianie do trzech stereoizomerycznych form DEB. W wątrobie, płucach i nerkach zwierząt ilość adduktów (\pm)-bis-N7G-BD powstałych łącznie z S,S-DEB i R,R-DEB szybko malała ($t_{0,5}$ 2,3 – 4,9 h) w przeciwieństwie do poziomu N1A-N7G-BD ($t_{0,5}$ 36,7 – 42,4 h) i 1,N⁶-(α,γ)-HMHPA ($t_{0,5}$ 37,5 – 41,9 h). W konsekwencji po upływie 10 dni przeważającym typem połączeń w tkankach były addukty N1A-N7G-BD, które początkowo stanowiły jedynie około 7% ilości adduktów (\pm)-bis-N7G-BD [35]. Na podstawie testów z użyciem myszy z odpowiednio wyselekcjonowanym genomem, wykazano, że żadne z badanych adduktów nie ulegały w warunkach *in vivo* enzymatycznym procesom naprawczym DNA, co było zgodne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w warunkach *in vitro* na linii komórkowej nabłonkowego raka płuc [35,36].

Dalszą konsekwencją depuracji DNA jest osłabienie wiązania deoksyryboza – fosforan, co sprzyja pęknięciu nici polimeru. Interesujące wyniki, dające obraz skutków alkilacji biomolekuł ludzkich hepatocytów pod wpływem (\pm)-DEB, uzyskali Wen i wsp. [37]. Przy niskich stężeniach epoksydu, poniżej 0,2 mmol/l, główną zmianą było pęknięcie pojedynczej nici DNA (*single strand break*) lub wytworzenie jego prekursorów (tzw. miejsc zasado-wrażliwych), natomiast przy wyższych stężeniach dominowało tworzenie międzyniciowych wiązań poprzecznych. Nie zanotowano natomiast przypadków podwójnego pęknięcia helisy, tzw. *double strand break*. Powstawanie tych ostatnich na drodze genotoksycznej, tzn. przy niecytotoksycznych stężeniach (\pm)-DEB, stwierdzono jednakże w innych doświadczeniach, przeprowadzonych na komórkach nabłonkowego raka płuc [36].

Oprócz tworzenia wiązań poprzecznych w obrębie helisy DNA, bifunkcyjne związki alkilujące, takie jak S,S-DEB, mają także zdolność indukowania diadduktów DNA –

białko [37-39]. W ekstraktach białek jądrowych uzyskanych z komórek raka szyjki macicy i narażonych na działanie (\pm)-DEB zidentyfikowano 39 takich połączeń. Koniugacji z DNA ulegały białka uczestniczące w różnych procesach komórkowych, m.in. replikacji,



Ryc. 11. Trwałość hydrolytyczna adduktów S,S-DNA z DNA. Addukty guaninowo-guaninowe S,S-bis-N7G-BD oraz część adduktów adeninowo-guaninowych (S,S-N3A-N7G-BD i S,S-N7A-N7G-BD) ulegają hydrolyzie z wytworzeniem dwóch miejsc apurynowych (Ab) (a). Addukty S,S-N1A-N7G-BD i S,S-N⁶A-N7G-BD ulegają jednostronnej depurynacji (b). Addukty egzocykliczne charakteryzują się stabilnością hydrolytyczną (c) [35].

transkrypcji i translacji [38]. Podobnie zachowywała się rekombinowana forma O⁶-alkiloguaninowej alkilotransferazy DNA, enzymu uczestniczącego w procesach naprawczych DNA [39]. We wszystkich wymienionych przypadkach alkilacja białka następowała poprzez resztę cysteiny, a same wiązania poprzeczne stanowiły addukty 1-(S-cysteinylo)-4-(guan-7'-ylo)butano-2,3-diolowe [38,39]. Badania przeprowadzone na ludzkich hepatocytach wykazały jednak, że indukowane przez (\pm)-DEB addukty DNA – białko powstają w znacznie mniejszych ilościach niż mostki poprzeczne w obrębie DNA [37]. Możliwa jest również alkilacja samego białka bez uczestnictwa DNA, czego dowodem są połączenia DEB z N-terminalną walina hemoglobiny stwierdzone w warunkach *in vivo* u zwierząt laboratoryjnych i ludzi narażonych zawodowo na ekspozycję na BD [23]. Nie można też wykluczyć tworzenia połączeń S,S-DEB czy S,S-EBDM z innymi biomolekułami o charakterze nukleofilowym, takimi jak RNA, enzymy i hormony o strukturze białkowej oraz glikozaminy [40].

1.7. Biologiczne skutki alkilacji DNA przez epoksytransformery TREQ

1.7.1. Działanie cytotoksyczne

Głównym czynnikiem determinującym cytotoksyczne właściwości TREQ są międzyniciowe wiązania poprzeczne indukowane w DNA przez S,S-DEB. Połączenie komplementarnych nici helisy czterocłonowym łańcuchem butano-1,3-diolowym (Ryc. 10) uniemożliwia rozwinięcie podwójnej helisy kwasu nukleinowego, a tym samym blokuje działanie polimerazy DNA w czasie replikacji oraz polimerazy RNA w czasie transkrypcji [30]. Wiązania poprzeczne generowane przez S,S-DEB nie ulegają komórkowym procesom naprawczym na zasadzie naprawy przez wycięcie zasady (BER – *base excision repair*) oraz naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER – *nucleotide excision repair*), co potwierdziły badania na myszach [35]. Generalnie, jedynym potencjalnie możliwym sposobem usunięcia wiązań poprzecznych, których powstaniu towarzyszy naruszenie prawidłowej struktury obu komplementarnych nici DNA, jest naprawa rekombinacyjna. Podczas tego procesu aparat enzymatyczny komórki wykorzystuje drugą niezależną kopię DNA zlokalizowaną na siostrzanej chromatydzie chromosomu jako wzorzec do odbudowy fragmentu uszkodzonej dwuniciowej cząsteczki. Powstawanie podwójnych pęknięć nici DNA oraz wymianę chromatyd siostrzanych, towarzyszące takiej naprawie, obserwowano po narażeniu różnych linii komórkowych na (\pm)-DEB. Jednakże w żadnym z dotąd przeprowadzonych badań nie stwierdzono usuwania wiązań międzyniciowych indukowanych przez (\pm)-DEB, w przeciwieństwie do tych pochodzących od alkilantów bifunkcyjnych

o dłuższym łańcuchu, takich jak melfalan lub diepoksyoktan [35,36]. Może to wynikać ze znacznego zniekształcenia helisy DNA przy tworzeniu krótkiego mostka poprzecznego bis-N7G-BD, które prawdopodobnie blokuje odpowiedni dostęp enzymów odpowiedzialnych za naprawę DNA [33]. W odróżnieniu od wiązań krzyżowych 1,3-międzyniciowych, mostki 1,2-wewnątrznicowe generowane przez S,S-DEB mogą się manifestować zarówno efektem cytotoksycznym, jak i mutagennym [30]. Za cytotoksyczność S,S-DEB mogą również odpowiadać indukowane przez ten związek addukty DNA z białkami zaangażowanymi w przebieg i regulację cyklu komórkowego [38,39].

Chociaż związki alkilujące, takie jak S,S-DEB, mogą działać na wszystkie fazy cyklu komórkowego, ich najsilniejsza aktywność cytotoksyczna ujawnia się, gdy komórka wkracza w fazę S, kiedy następuje wzmożona synteza DNA, RNA oraz białek. Wówczas alkilacja DNA powoduje zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G₂ i śmierć komórki jeszcze w interfazie przed rozpoczęciem mitozy, co jest szczególnie istotne, gdyż zapobiega przekazywaniu błędnej informacji genetycznej komórkom potomnym [4,40]. Śmierć komórki indukowana przez TREO za pośrednictwem S,S-DEB może zachodzić na drodze apoptozy bądź nekrozy. W badaniach *in vitro* prowadzonych na różnych komercyjnych liniach komórkowych pochodzenia ludzkiego oraz *ex vivo* na komórkach pozyskanych od pacjentów, apoptoza była zjawiskiem dominującym przy niskich stężeniach TREO oraz (±)-DEB, natomiast po narażeniu na wyższe stężenia tych związków dochodziło głównie do nekrozy. Zależnie od typu badanych komórek (ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) i szpikowa (AML), CML, mięsak Ewinga (ES), szpiczak mnogi (MM)) i warunków inkubacji, stężenia TREO indukujące apoptozę zmieniały się w szerokim zakresie, od 1 do 1000 μmol/l. Warto zaznaczyć jest fakt, iż nawet te najwyższe wartości stężeń TREO były niższe od wartości maksymalnego stężenia leku w osoczu (C_{max}) u pacjentów poddanych kondycjonowaniu przed HSCT. Na liniach komórkowych ES zaobserwowano również, iż przy bardzo małych stężeniach TREO, niewystarczających do zainicjowania intensywnej apoptozy, następowało zahamowanie wzrostu komórek przez zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G₂/M. Z kolei w doświadczeniach, w których stosowano gotowy DEB stężenia wymagane do uruchomienia apoptotycznej śmierci komórki były rzędu 5 – 75 μmol/l. Do tej pory specyficzne mechanizmy komórkowe zaangażowane w apoptozę indukowaną przez TREO nie zostały dokładnie poznane, jednakże główne znaczenie przypisuje się tu mitochondrialnej ścieżce apoptozy, zależnej od białka p53 [41-48]. Wzrost poziomu tego ważnego białka regulatorowego w komórce jest odpowiedzią na zmiany struktury DNA lub stres oksydacyjny spowodowane działaniem S,S-DEB. Prace Yadawilli i wsp. [41] na

ludzkich limfoblastach wykazały, że wynika to przede wszystkim ze zwiększonej trwałości białka p53, a nie jego zwiększonej syntezy. W mechanizm opisanego zjawiska zaangażowane były acetylacja lizyny 383 białka p53, fosforylacja seryny 15, 20, 37, 46 i 392 oraz wyraźne zmniejszenie tworzenia kompleksu p53 z jego białkiem inhibitorowym mdm2. Pod wpływem S,S-DEB dochodziło również do nadekspresji i aktywacji białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2/Bax. Interakcja p53 z tymi białkami regulatorowymi powoduje obniżenie transbłonowego potencjału mitochondrium i uwolnienie cytochromu c z wnętrza mitochondrium do cytoplazmy. Cytochrom c z kolei razem z pro-kaspazą 9 i białkiem Apaf-1 tworzy kompleks zwany apoptosomem, którego rola sprowadza się do przekształcenia pro-kaspazy 9 w jej aktywną formę. Powstała kaspaza 9 pełni funkcję kaspazy inicjującej złożoną kaskadę kaspaz, prowadzącą do aktywacji kaspazy 3, będącej tzw. kaspazą egzekutorową. Również inne mechanizmy mogą być zaangażowane w indukcję apoptozy pod wpływem TREO. Dla przykładu Schmidmaier i wsp. [44] w komórkach AML obserwowali przemieszczenie kinazy białkowej C typu delta z cytozolu do błony komórkowej. W rezultacie wszystkich opisanych przemian dochodzi w komórce do proteolizy białek, fragmentacji jądra komórkowego i powstania ciałek apoptotycznych, które ostatecznie ulegają fagocytozie [41-48].

1.7.2. Działanie mutagenne

W przeciwieństwie do cytotoksycznych właściwości międzyniciowych wiązań poprzecznych, efekty mutagenne przypisuje się monoalkilacji DNA. Wynika to faktu, iż strukturalna zmiana DNA będąca skutkiem pojedynczej alkilacji rzadko doprowadza do śmierci komórki i jeśli nie zostanie skutecznie naprawiona przed rozpoczęciem replikacji, może generować błąd w kopii materiału genetycznego przekazywanego komórce potomnej [34,35]. W badaniach *in vitro* na nasionach jęczmienia i komórkach jajnika chomika chińskiego zaobserwowano, iż ilość mutacji, m.in. aberracji chromosomowych, wywołanych przez TREO pozytywnie korelowała z czasem narażenia komórek oraz wartością pH środowiska w zakresie 5,5 – 8,0. Charakterystyczne jest, iż efekt mutageny TREO był opóźniony (nawet do 120 h), co wynikało z jego pH-zależnej aktywacji do epoksytransformerów [13,49]. Chociaż w badaniach *in vitro* S,S-EBDM, będący monofunkcyjnym alkilantem, indukował aberracje chromosomowe w szybko dzielących się komórkach roślinnych, najnowsze doniesienia literaturowe skupiają się wyłącznie na działaniu mutagenym S,S-DEB bądź jego stereoizomerów [6]. Zainteresowanie to podyktowane jest przede wszystkim faktem tworzenia się tych związków na drodze

metabolicznej aktywacji BD, który w małych stężeniach występuje m.in. w dymie tytoniowym i spalinach samochodowych [23].

W doświadczeniach *in vitro* na liniach komórkowych (ludzkie limfoblasty, komórki jajnika chomika chińskiego, fibroblasty mysie i szczurze, *Escherichia coli*) S,S-DEB indukował powstawanie licznych mutacji [50-54]. Spektrum substytucji punktowych w genie *supF* bakterii *E. coli* obejmowało głównie tranzycje G:C → A:T i transwersje A:T → T:A, a w mniejszym stopniu transwersje G:C → C:G i tranzycje G:C → T:A [50]. Dodatkowo S,S-DEB uznawany jest za główny mediator mutageny powodowanej przez BD. U myszy i szczurów laboratoryjnych ekspozowanych inhalacyjnie na ten związek obserwowano cały zakres typów mutacji, począwszy od mutacji punktowych przez delecje punktowe i zmiany ramki odczytu do delecji eksonów oraz całych genów [55]. Efekty mutagenne S,S-DEB, a zwłaszcza mutacje punktowe, tłumaczy się zmianami struktury kwaternizowanej monoalkilowanej guaniny lub adeniny bądź ich depurynacją. Skutkują one bowiem wytworzeniem miejsc apurynowych, w których zakłócone jest właściwe parowanie nukleotydów w czasie replikacji (Ryc. 11a,b). Ponadto, do powstawania mutacji mogą przyczyniać się nieliczne 1,2-wewnątrznicinowe wiązania krzyżowe indukowane przez S,S-DEB, gdyż mogą być one omijane przez polimerazę DNA [30,34]. Pewne znaczenie przypisuje się również niedawno odkrytym trwałym hydrolytycznie egzocyklicznym monoadduktom adeninowym, R,S-1,N⁶-α-HMHPA i S,R-1,N⁶-γ-HMHPA, oraz diadduktom adeninowo-guaninowym, S,S-N1A-N7G-BD oraz S,S-N⁶A-N7G-BD [24,25,35]. Obszerniejsze strukturalnie mutacje, w tym aberracje chromosomowe (wymiana chromatyd siostrzanych i złamanie chromosomu), mogą być z kolei wynikiem pęknięć pojedynczej nici DNA lub nieudanej naprawy helisy zmostkowanej międzynicinowym wiązaniem poprzecznym [36,37,53,54]. W generowaniu mutacji zależnych od S,S-DEB nie wyklucza się również udziału koniugatów DNA – GSH, indukowanych przez ten związek [56].

1.8. Aktywność farmakologiczna TREO

1.8.1. Aktywność przeciwnowotworowa

Badania przedkliniczne na ludzkich liniach komórkowych *in vitro* lub *in vivo* na modelach zwierzęcych wykazały, iż TREO charakteryzuje się aktywnością wobec wielu guzów litych oraz nowotworów układu krwiotwórczego typowych zarówno dla wieku dojrzałego, jak i dziecięcego. Wśród tych pierwszych należy wymienić czerniaka złośliwego skóry i gałki ocznej, raka sutka, drobno- i niedrobnokomórkowego raka płuc, raka nerki, raka

prostaty i MM. Wśród chorób charakterystycznych dla dzieci były ES, neuroblastoma, osteosarkoma, ALL, AML oraz CML [42-45,57-64]. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych przez Lanvers-Kaminsky i wsp. [63] TREO prezentował podobny do BU profil działania w stosunku do wyżej wymienionych nowotworów wieku dziecięcego. Jednakże w badaniach *in vivo* Wernera i wsp. [45] lek, podany myszom w maksymalnej tolerowanej dawce, cechował się znacznie wyższą aktywnością wobec ES niż BU zastosowany w analogicznej dawce. Warto podkreślić, iż tworzenie wiązań poprzecznych odpowiedzialnych za cytotoksyczność TREO było zachowane w liniach komórkowych czerniaka złośliwego skóry i gałki ocznej o wysokiej oporności wielolekowej. Ponadto, nie obserwowano oporności krzyżowej TREO z innymi lekami alkilującymi, takimi jak cisplatyna, karmustyna i temozolamid [58,65]. Jednakże, mimo obiecujących wyników badań przedklinicznych, w próbach klinicznych monoterapia bądź terapia skojarzona oparta na TREO charakteryzowała się ograniczoną skutecznością u pacjentów z zaawansowanym rakiem jajnika, czerniakiem złośliwym skóry i gałki ocznej w fazie przerzutów, drobnokomórkowym rakiem płuc, rakiem nerki oraz glejakiem złośliwym [65-72].

1.8.2. Aktywność mieloablacyjna

Badania *in vitro* oraz *in vivo* przeprowadzone na myszach wykazały, iż TREO jest wysoce cytotoksyczny w stosunku do wszystkich linii komórek krwiotwórczych, zarówno multipotencjalnych, jak i ukierunkowanych komórek pnia szpiku kostnego [73,74]. Podobnie jak w przypadku BU, aktywność mieloablacyjna TREO jest zależna od dawki i ujawnia się najsilniej po zastosowaniu dawek podzielonych przez kilka kolejnych dni zamiast jednorazowej dawki niepodzielonej. W badaniach na modelu zwierzęcym TREO gwarantował przyjęcie przeszczepu szpiku przynajmniej tak samo skutecznie jak BU i frakcjonowane napromienianie całego ciała (FTBI), które są rutynowo stosowanymi czynnikami mieloablacyjnymi w kondycjonowaniu przed HSCT [74-76]. W doświadczeniach Sjöö i wsp. [76] TREO podany myszom w maksymalnym tolerowanym schemacie dawkowania ($3 \times 1,5$ g/kg) zapewniał silną, szybką i trwałą mieloablację, w stopniu nieco większym niż BU zastosowany również w maksymalnych tolerowanych dawkach (4×37 mg/kg). Generalnie dawki mieloablacyjne TREO są wyższe od dawek, przy których manifestuje się działanie przeciwnowotworowe leku. W kondycjonowaniu pacjentów dorosłych i pediatrycznych podawano całkowitą dawkę 30-42 g/m² w trzech równych dawkach podzielonych przez trzy kolejne dni ($3 \times 10 - 14$ g/m²). Aktualnie zgromadzone wyniki prób

klinicznych wskazują jednak, iż w przypadku allogenicznego HSCT optymalny jest najbardziej intensywny schemat mieloablacyjny $3 \times 14 \text{ g/m}^2$. Wyjątek stanowią dzieci poniżej pierwszego roku życia poddane procedurze przeszczepienia z powodu ALL oraz chorób nienowotworowych, u których rekomenduje się schemat $3 \times 12 \text{ g/m}^2$ [77].

1.8.3. Aktywność immunosupresyjna

Poza działaniem mieloablacyjnym TREO podany w dawkach wyższych od konwencjonalnych dawek przeciwnowotworowych, wykazuje również właściwości immunosupresyjne. Są one bardzo korzystne w odniesieniu do stosowania leku podczas kondycjonowania przed allogenicznym HSCT, gdyż przyczyniają się do trwałego przyjęcia przeszczepu. Dodatkowo, przypuszcza się, iż obniżają one prawdopodobieństwo wystąpienia tzw. burzy cytokin, która uczestniczy w patogenezie choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD) oraz choroby okluzyjnej żył wątrobowych (VOD) [77]. W warunkach *in vitro* TREO hamował proliferację limfocytów T indukowaną mitogenem oraz był cytotoksyczny w stosunku do monocytów i komórek dendrytycznych w stężeniach nieprzekraczających $100 \mu\text{g/ml}$, które są duże niższe od wartości C_{max} notowanych u pacjentów po podaniu dawek mieloablacyjnych leku przed HSCT [78]. W innych badaniach aktywność cytotoksyczna TREO w stosunku do limfocytów T i komórek NK była wyższa niż BU [42]. Z kolei w warunkach *in vivo* TREO, w porównaniu do BU i typowego immunosupresanta cyklofosfamidu (CY), zapewniał większą i trwalszą redukcję poziomu limfocytów T (pomocniczych i cytotoksycznych) i limfocytów B w śledzionie myszy, choć mniej skutecznie hamował wytwarzanie cytokin prozapalnych IL-2 i TFN- α przez limfocyty T [76]. Obniżenie poziomu innych cytokin (IL-12 i IFN- γ) obserwowano po podaniu TREO w węzłach chłonnych szczurów laboratoryjnych z wywołanym eksperymentalnie autoimmunologicznym zapaleniem OUN [78]. W sposób jednoznaczny właściwości immunosupresyjne TREO potwierdziło jego zastosowanie w kondycjonowaniu u myszy, w którym, mimo całkowitego niedopasowania przeszczepu do głównego układu zgodności tkankowej dawcy, uzyskano stan stabilnego mieszanego chimeryzmu komórek hematopoetycznych i trwałą tolerancję przeszczepu [75].

Co ciekawe, immunosupresyjną aktywność TREO próbuje się wykorzystać w leczeniu typowego schorzenia o podłożu autoimmunologicznym, jakim jest stwardnienie rozsiane (SM). W badaniach przedklinicznych u szczurów lek ten znacznie łagodził przebieg sztucznie wywołanego autoimmunologicznego zapalenia OUN, w którym zmiany patologiczne przypominają SM [78]. Z kolei roczna terapia oparta na TREO, podawanym co

trzy miesiące w dawce do 8 g/m², u pacjentów z wtórnym progresywnym SM opornym na leczenie IFN-β lub azatiopryną, skutkowała stabilizacją lub poprawą parametrów klinicznych i neuroanatomicznych mózgu [79]. Przypuszcza się, iż aktywność TREO w SM związana jest z hamowaniem migracji komórek prozapalnych (limfocytów T i monocytów) przez barierę krew-mózg oraz macierz zewnątrzkomórkową OUN [80].

1.8.4. Aktywność antyangiogenna

W badaniach *in vitro* TREO w stężeniach niecytotoksycznych hamował proliferację komórek endotelium żyły pępowinowej w sposób zależny do dawki. Działanie leku ulegało znacznemu nasileniu w obecności inhibitora cyklooksygenazy 2 (COX-2). Skłoniło to do przeprowadzenia próby klinicznej, w której u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem złośliwym zastosowano tzw. terapię metronomiczną, która polegała na regularnym codziennym podawaniu niskich dawek TREO (500 mg) w połączeniu z typowym inhibitorem COX-2, rofekoksybem. Mimo obiecujących wyników badań *in vitro*, u wszystkich 12 leczonych osób doszło jednak do progresji choroby albo jedynie jej przejściowej stabilizacji, a mediana czasu całkowitego przeżycia wyniosła 13 miesięcy. Ostatecznie autorzy stwierdzili, iż chociaż terapia metronomiczna nie zapewnia dużej skuteczności przeciwnowotworowej, może być obiecującą alternatywą w leczeniu paliatywnym, gdyż cechuje się niewielkimi działaniami niepożądanymi i nie pogarsza istotnie jakości życia pacjentów [81].

1.9. Interakcje TREO

Na podstawie rezultatów skojarzonej chemioterapii czerniaka złośliwego i raka jajnika zauważono synergizm działania przeciwnowotworowego TREO i innych cytostatyków z grupy leków alkilujących (cisplatyna), antymetabolitów (gemcytabina, fludarabina (FLU), cytarabina) i pochodnych taksanu (paklitaksel). W przypadku antymetabolitów, synergizm ten tłumaczy się hamowaniem naprawy alkilowanych miejsc DNA, indukowanych przez produkty aktywacji TREO [57,58,68,82,83]. Jednakże oprócz korzyści związanych z synergizmem działania przeciwnowotworowego, należy się spodziewać również nasilenia działań niepożądanych w stosunku do zdrowych tkanek, zwłaszcza działania mielosupresyjnego [2,3,83]. W badaniu przedrejestracyjnym TREO u jednego pacjenta zanotowano niekorzystną interakcję polegającą na zmniejszeniu skuteczności ibuprofenu i chlorochiny [2,3]. Interesujące wyniki skojarzonego działania cytotoksycznego TREO i FLU na komórki ALL uzyskali Munkelt i wsp. [42] w badaniach *in*

in vitro. Antagonizm działania obu leków obserwowali oni przy stężeniach TREO poniżej 1 $\mu\text{mol/l}$, natomiast synergizm był widoczny dopiero po przekroczeniu wspomnianej wartości stężenia. Z kolei Neale i wsp. [57] wykazali na przykładzie komórek czerniaka oka pobranych od pacjentów, iż synergizm działania cytotoksycznego TREO i cytarabiny bądź gemcytabiny *in vitro* istotny wpływ ma kolejność narażenia komórek na obydwa leki. Maksymalne działanie synergistyczne zanotowano, gdy TREO i antymetabolit stosowane były jednocześnie lub gdy komórki miały kontakt najpierw z TREO a następnie w ciągu 24 h z antymetabolem. Jeśli kolejność narażenia była odwrotna, obserwowano osłabienie synergizmu działania leków [57]. W badaniach *in vitro* obserwowano też synergizm działania TREO z substancjami niestosowanymi dotąd w leczeniu, ale posiadającymi potencjalną aktywność przeciwnowotworową. Sulfoksimina butioniny, będąca inhibitorem syntazy glutationowej, nasilała przeciwnowotworowe działanie TREO przeciwko komórkom glejaka złośliwego, natomiast briostatyna-1, aktywator kinazy białkowej C, przeciwko komórkom AML [44,84]. Z kolei sam TREO zwiększał cytotoksyczność aktywnego metabolitu leflunomidu, będącego inhibitorem dehydrogenazy dihydroorotanowej, w stosunku do linii komórkowych MM [85]. Ponadto, antyproliferacyjny efekt TREO w stosunku do komórek endotelium żyły pępowinowej ulegał nasileniu pod wpływem związku NS-398, inhibitora COX-2 [81].

1.10. Toksyczność narządowa TREO

Podczas stosowania TREO w konwencjonalnej chemioterapii nowotworów u osób dorosłych, najczęściej pacjentek z rakiem jajnika, dominującym działaniem niepożądanym była odwracalna supresja układu krwiotwórczego, której objawami klinicznymi były anemia, leukopenia i trombocytopenia [1-3,86-89]. Uznaje się, iż w ramach dożylnego schematu podawania leku co cztery tygodnie maksymalna tolerowana dawka wynosi 10 g/m^2 , a działanie toksyczne ograniczające dalszą eskalację dawki stanowi ciężka trombocytopenia [88]. Toksyczność niehematologiczna TREO jest niewielka i zazwyczaj ogranicza się do odwracalnych zaburzeń żołądkowo-jelitowych i dermatologicznych (Tabela 1) [2,3,89].

W klasyfikacji ustalonej przez Międzynarodową Agencję Badań nad Nowotworami (International Agency for Research on Cancer – IARC) TREO zaliczany jest do grupy leków kancerogennych dla ludzi, co wiąże się z przypadkami notowania wtórnych nowotworów złośliwych, najczęściej AML u pacjentek z rakiem jajnika. Wydaje się jednak, że w porównaniu z innymi lekami przeciwnowotworowymi właściwości kancerogenne TREO są

niewielkie [90]. Schematy dożylnej lub doustnej konwencjonalnej chemioterapii opartej na TREO generalnie są dobrze tolerowane, nawet przez starszych pacjentów obciążonych wysokim ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Potwierdziła to ostatnia analiza wykonana w ramach wielośrodkowego prospektywnego badania klinicznego III fazy u 25 starszych pacjentek (≥ 70 roku życia) z platynoopornym rakiem jajnika oraz współistniejącymi chorobami układu sercowo-naczyniowego i kostnego, które przeszły wcześniej nieskuteczne leczenie chirurgiczne i przynajmniej jedną nieskuteczną chemioterapię. Bardzo ciężka neutropenia IV stopnia wg skali National Cancer Institute – Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) wystąpiła tylko u jednej pacjentki, a najczęściej zgłaszanym niehematologicznym działaniem niepożądanym były łagodne (I stopnia) i umiarkowane (II stopnia) nudności oraz zaparcia. Jedynie w 8% z 117 przeprowadzonych cykli leczenia zaszła konieczność redukcji ustalonej dawki TREO (7 g/m^2 i.v. co 28 dni lub 600 mg/m^2 przez 28 dni w cyklu 56-dniowym), a tylko 3 pacjentki zmuszone były przerwać leczenie z powodu działań toksycznych [89].

Tabela 1. Działania niepożądane TREO w konwencjonalnej chemioterapii przeciwnowotworowej [2,3,89]

Częstość występowania	Typ działania niepożądanego
Bardzo częste ($\geq 1/10$)	HEMATOLOGICZNE: anemia, leukopenia, trombocytopenia
	ŻOŁĄDKOWO-JELITOWE: nudności, wymioty, zaparcia
	DERMATOLOGICZNE: łyśnienie (zazwyczaj łagodne), brązowe przebarwienia skóry
Rzadkie ($\geq 1/1000$ do $\leq 1/100$)	NOWOTWORY: wtórne nowotwory złośliwe: AML, chłoniak, zespoły mielodysplastyczne (MDS), zespoły mieloproliferacyjne
Nieznane	IMMUNOLOGICZNE: reakcje alergiczne
	HEMATOLOGICZNE: pancytopenia

Inne notowane działania niepożądane: choroba Addisona, hipoglikemia, parestezje, kardiomiopatia, zapalenie płuc, zwłóknienie płuc, pokrzywka, rumień, twardzina skóry, nasilenie łuszczycy, krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, objawy grypopodobne, lokalne bolesne stany zapalne skóry (w przypadku wynaczyńnienia leku).

Kiedy TREO stosowany jest w wysokich dawkach w trakcie kondycjonowania przed HSCT, zamierzone silne mielosupresyjne działanie leku niwelowane jest wprowadzeniem do ustroju dawcy nowych prawidłowych komórek hematopoetycznych. Z tej przyczyny znaczenie toksykologiczne mają jedynie niehematologiczne działania niepożądane. W badaniu klinicznym I fazy, w którym dorosłym pacjentom przed autologicznym HSCT podawano eskalowane jednorazowe dawki TREO 20 – 56 g/m², maksymalna tolerowana dawka leku wyniosła 47 g/m². Godny podkreślenia jest fakt, iż w zakresie dawek 20 – 47 g/m² praktycznie nie obserwowano narządowych działań niepożądanych III i IV stopnia NCI-CTC. Toksyczność limitująca dawkę wystąpiła dopiero na poziomie 56 g/m² w postaci intensywnego zapalenia błony śluzowej jamy ustnej (tzw. *mucositis*) oraz biegunki. Również tylko przy najwyższej badanej dawce u jednego pacjenta kilka godzin po zakończeniu wlewu TREO zanotowano ciężką kwasicę metaboliczną, związaną najprawdopodobniej z uwolnieniem we krwi znacznych ilości kwasu metanosulfonowego. Ponadto po przekroczeniu maksymalnej tolerowanej dawki zaobserwowano jeden przypadek bardzo ciężkiej nekrozy naskórka oraz kilka przypadków łagodniejszych zmian dermatologicznych w postaci odwracalnego świądu, rumienia i hiperpigmentacji skóry. Często zgłaszanym, chociaż niegroźnym, działaniem niepożądanym, występującym podczas wlewu TREO lub krótko po jego zakończeniu, był ból głowy o łagodnym nasileniu [5].

TREO był również dobrze tolerowany w typowych reżimach kondycjonujących, zarówno przed autologicznym, jak i allogenicznym HSCT, w których, w odróżnieniu od wyżej opisanego badania, podawany był przez trzy kolejne dni w dawkach podzielonych, w kombinacji z innymi lekami. Ponownie zakres narządowych działań niepożądanych obejmował najczęściej ustną lub jelitową postać *mucositis*, biegunki, nudności oraz zmiany skórne. *Mucositis* jest typowym działaniem toksycznym leków przeciwnowotworowych, związanym z uszkodzeniem wrażliwych komórek nabłonka przewodu pokarmowego. W najnowszych reżimach kondycjonujących opartych na TREO i FLU uwagę zwraca mała uciążliwość tego powszechnego schorzenia (w większości I i II stopnia w skali NCI-CTC), zarówno u pacjentów dorosłych i pediatrycznych [91-98]. Uotinen i wsp. [91] przeprowadzili analizę częstości i nasilenia ustnej postaci *mucositis* po reżimie opartym na TREO (3 × 14 g/m²) i FLU (5 × 30 mg/m²) u 39 dorosłych pacjentów w porównaniu ze standardowo stosowanymi reżimami mieloablacyjnymi opartymi na BU lub FTBI (124 pacjentów). W pierwszej z wymienionych grup pacjentów (choć statystycznie starszej) wrzodziejąca postać schorzenia (II – IV stopień w skali WHO) występowała znacznie rzadziej (33% vs 70%), miała mniejszą intensywność (III – IV stopień w skali WHO: 0 vs 38%) i trwała krócej

(średnio 3 vs 6 dni). W konsekwencji znacznie mniejsza część pacjentów w grupie TREO wymagała całkowitego żywienia pozajelitowego i stosowania opioidowych leków przeciwbólowych [91]. W badaniach Shimoniego i wsp. [98] przeprowadzonych z udziałem dorosłych pacjentów z AML lub MDS, ciężka postać *mucositis* również występowała rzadziej po kondycjonowaniu opartym na TREO ($3 \times 12 \text{ g/m}^2$ plus FLU $5 \times 30 \text{ mg/m}^2$) niż BU ($4 \times 3,2 \text{ mg/kg}$ plus FLU $4 \times 40 \text{ mg/m}^2$) (8% vs 31%). Częste, ale jednocześnie łagodne przypadki *mucositis* notowano wśród dzieci poddanych kondycjonowaniu opartemu na TREO [95,97,99]. U pacjentów pediatrycznych częstszym problemem niż u dorosłych wydają się być dermatologiczne działania niepożądane. Dotyczy to szczególnie niemowląt, u których notowano pieluszkowe zapalenie skóry, a w pojedynczych przypadkach nawet ciężkie owrzodzenia okołoodbytnicze. Autorzy spekulują, iż mogą one powstawać pod wpływem drażniącego działania epoksytransformerów TREO wydalanych z moczem. Opiswane zmiany były jednak odwracalne – ich gojenie się uzyskiwano, stosując kremy ochronne oraz częste zmiany pieluszek [95,97].

Ważną zaletą TREO w porównaniu z BU, jest dużo mniejsze ryzyko wystąpienia zagrażającej życiu VOD. Jej rozwój po kondycjonowaniu opartym na TREO obserwowano sporadycznie zarówno wśród pacjentów dorosłych, jak i pediatrycznych. Hepatotoksyczność schematów mieloablacyjnych zawierających TREO ograniczała się z reguły do podwyższonych osoczowych poziomów enzymów wątrobowych (aminotransferaz, γ -glutamylotransferazy), hiperbilirubinemii oraz hepatomegalii (u dzieci) [93-95,97-100]. Uważa się, że czynnikiem decydującym o różnicach toksyczności TREO i BU jest ich odmienna dystrybucja w ustroju. Prawdopodobnie z powodu większej lipofilowości, BU, w przeciwieństwie do TREO, w znacznym stopniu kumuluje się w wątrobie, płucach i mózgu. Tłumaczy to również fakt rzadszego w porównaniu do BU występowania po TREO śródmiąższowego zapalenia płuc oraz drgawek. Te ostatnie pojawiają się jedynie wtórnie jako skutek krwotoku lub infekcji mózgowej, stąd stosowanie TREO, w przeciwieństwie do BU, nie wymaga profilaktycznego podawania leków przeciwpadaczkowych, np. fenytoiny [77,92,95-97,99,101]. Ostatnio jednak cennych, choć kontrowersyjnych wyników w tym temacie dostarczyło kondycjonowanie przeprowadzone przed allogenicznym HSCT przez Slattera i wsp. [97] u 70 młodych dzieci, wśród których 66% stanowiły niemowlęta. W badaniu tym zarejestrowano 4 przypadki drgawek, z których wszystkie wystąpiły u dzieci poniżej 4 miesiąca życia. W świetle takich wyników, autorzy wskazują, aby u tak młodych pacjentów otrzymujących wysokie dawki TREO rozważyć w przyszłości potrzebę stosowania profilaktyki przeciwdrgawkowej, np. klonazepamu.

Podsumowując można stwierdzić, iż w zgodnej opinii wielu autorów TREO odznacza się mniejszą toksycznością narządową niż dwa aktualnie powszechnie stosowane czynniki mieloablacyjne – BU i FTBI. Z pierwszym związane jest przede wszystkim ryzyko VOD, a z drugim toksyczność płucna i neurologiczna, która wyklucza stosowanie FTBI u dzieci poniżej drugiego roku życia. Dodatkowo, na korzyść TREO przemawia fakt, iż dane o jego toksyczności pochodzą z badań klinicznych obejmujących pacjentów niekwalifikujących się do standardowych reżimów kondycjonujących z powodu zbyt wysokiego ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Z drugiej strony należy jednak być świadomym, iż obecnie nie są znane odległe działania toksyczne TREO, w tym jego wpływ na rozrodczość [77].

1.11. Farmakokinetyka TREO.

Po podaniu dożylnym, jak i doustnym zmiany stężeń TREO w osoczu oraz kumulowane poziomy leku w moczu najlepiej opisuje otwarty model dwukompartmentowy. Procesy wchłaniania, dystrybucji i eliminacji przebiegają zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu [5,86,87,94,102-105]. Stężenia TREO w obu wymienionych matrycach biologicznych oznacza się obecnie za pomocą metody HPLC z detekcją refraktometryczną (RID) [86,104]. Wcześniej stosowano metodę pośrednią, polegającą na całkowitym przekształceniu TREO do S,S-DEB w warunkach alkalicznych i oznaczeniu otrzymanego epoksydu metodą chromatografii gazowej (GC) [106]. Parametry farmakokinetyczne TREO, wyznaczone przy użyciu modelu dwukompartmentowego po jednorazowym wlewie dożylnym są zbliżone u osób dorosłych i dzieci, co obrazują dane zebrane w Tabeli 2 i 3 [104,105]. Liniowość farmakokinetyki TREO demonstruje proporcjonalna zależność C_{max} i AUC od dawki w zakresie 20 – 47 g/m², uzyskana po 2 h wlewie leku u osób dorosłych w badaniu klinicznym I fazy. Niewielkie dodatnie odchylenie od liniowego przebiegu zależności AUC – dawka obserwowano dopiero przy najwyższej podanej dawce, równej 56 g/m². Prawdopodobnie było to wynikiem uwalniania podczas aktywacji TREO znacznych ilości kwasu metanosulfonowego, które doprowadziły do kwasicy metabolicznej i zahamowania dalszej przemiany proleku do epoksytransformerów [5]. Liniowość farmakokinetyki TREO potwierdzają również podobne wartości parametrów farmakokinetycznych, takich jak okres półtrwania fazy dystrybucji ($t_{0,5\alpha}$) i eliminacji ($t_{0,5\beta}$), objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{ss}) oraz klirens ogólnoustrojowy (Cl_{tot}), uzyskane po podaniu różnych dawek leku oraz po podaniu tej samej dawki z różną szybkością wlewu [5,86,87,94,102-105]. Wymienione parametry charakteryzują się nie tylko niską zmiennością międzyosobniczą, ale

też wewnątrzosobniczą, tzn. pomiędzy różnymi podaniami u tego samego pacjenta [102,103]. Do takich wniosków doszli Beelen i wsp. [102], którzy przeprowadzili badania farmakokinetyczne, stosując standardowe trzykrotne podanie 12 lub 14 g/m² TREO w 2 h wlewie dożylnym u osób dorosłych w ciągu trzech kolejnych dni. Niska zmienność dotyczyła wartości C_{max} i AUC (przy tej samej dawce), t_{0,5β}, średniego czasu przebywania leku w ustroju, V_{ss}, klirensu nerkowego i Cl_{tot}. Na tej podstawie autorzy stwierdzili, iż przy wielokrotnym podaniu TREO nie dochodzi do akumulacji leku ani jego przyspieszonej eliminacji. Interesujący jest fakt, iż w płynie mózgowo-rdzeniowym jednego z pacjentów oznaczono stężenia TREO, a wartości C_{max}, AUC i V_{ss} dla tego rzadko badanego kompartmentu wynosiły odpowiednio 14 µg/ml, 69,1 µg×h/ml i 30 l [102,103]. Grupę pacjentów, u których zanotowano w dotychczasowych badaniach pewne odchylenia parametrów farmakokinetycznych od średnich wartości populacyjnych stanowiły osoby z obrzękami i wysiękiem płynu do przestrzeni opłucnej. Pojawienie się takich dodatkowych przestrzeni wodnych wiązało się ze zwiększeniem obliczonych wartości V_{ss} oraz Cl_{tot} leku. TREO w postaci niezmienionej ulega wydaleniu głównie drogą nerkową. Z moczem eliminowane jest około 30% całkowitej dawki leku, z tego około 90% w ciągu pierwszych 6 h od podania, co znajduje odbicie w relatywnie krótkim t_{0,5β} (1,7 – 2,2 h). Przy prawidłowej funkcji nerek, Cl_{tot} przyjmuje wartości rzędu 150 – 300 ml/min, natomiast u chorych z niskim klirensiem kreatyniny ulega on obniżeniu nawet do 60 ml/min [5,86,87,94,102,105]. Małe ilości TREO w formie niezmienionej mogą wydalac się również drogami pozanerkowymi, m.in. ze śliną i łzami. Stężenia leku zmierzone w tych dwóch płynach ustrojowych w przybliżeniu korelowały z jego poziomami w osoczu [1]. Badania nad doustnym podaniem TREO w formie kapsułek wykazały praktycznie 100% biodostępność leku, co dowodzi, iż nie podlega on tzw. efektowi pierwszego przejścia [87,106]. Po podaniu jednorazowej dawki doustnej TREO 1 g/m² wartość C_{max} została uzyskana po średnim czasie 1,5 h i wynosiła 29 µg/ml [87].

Interesujące wyniki uzyskali Müller H i Hilger R [107] w badaniach porównawczych typowego wlewu dożylnego 10 g/m² TREO z podaniem zredukowanej dawki leku (2,6 g/m²) drogą izolowanej brzusznej perfuzji. W tym drugim przypadku lek ulega dystrybucji głównie w ograniczonym obszarze jamy brzusznej, co może być korzystne na przykład u pacjentek z rakiem jajnika. Obie drogi podania zapewniały tę samą wartość AUC w brzuszny m łóżytku tętnicznym, mimo iż dawka TREO zastosowana w izolowanej perfuzji była prawie 4-krotnie niższa w porównaniu do wlewu dożylnego. Istotną korzyść nowego sposobu podania leku stanowiła również dużo mniejsza wartość C_{max} w krążeniu systemowym (300 µg/ml),

w porównaniu do C_{max} uzyskanego w lokalnym krążeniu brzuszным (1300 $\mu\text{g/ml}$), co może sprzyjać ograniczeniu ogólnoustrojowych działań niepożądanych [107].

W badaniu farmakokinetyki TREO u zwierząt laboratoryjnych (myszy) uzyskano wyniki podobne jak u ludzi. Po podaniu dootrzewnowym dawki 3 g/kg, lek ulegał szybkiemu wchłanianiu do krążenia systemowego, osiągając C_{max} rzędu 7 – 8 mg/ml po czasie 0,21 h. Stężenia leku w osoczu najlepiej opisywał model dwukompartmentowy a eliminacja przebiegała zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu ($t_{0,5\beta}$ 1,8 h) [45].

Do tej pory w literaturze pojawiło się zaledwie jedno doniesienie dotyczące farmakokinetyki epoksytransformerów TREO u ludzi [16]. Z zastosowaniem derywatywacji pierścienia epoksydowego za pomocą 3-NBS i metody HPLC z detekcją UV u dwóch pacjentów pediatrycznych otrzymujących mieloablacyjne dawki TREO przed HSCT oznaczono stężenia S,S-EBDM w osoczu. W żadnej z badanych próbek osocza pobranych w czasie 0,5 – 8 h od rozpoczęcia 2 h wlewu TREO nie stwierdzono jednak oznaczalnych poziomów S,S-DEB (granica oznaczalności (LOQ) metody wynosiła 2,5 $\mu\text{mol/l}$). Stężenia S,S-EBDM zmieniały się w sposób podobny do zmian poziomów leku macierzystego, zwłaszcza w fazie eliminacji, jednakże same wartości stężeń epoksytransformeru (~ 2 – 40 $\mu\text{mol/l}$) były znacznie mniejsze w stosunku do leku macierzystego (~ 80 – 11000 $\mu\text{mol/l}$). Prawdopodobnie wynikało to z faktu, iż w ustroju żywym tworzeniu produktów aktywacji TREO cały czas towarzyszy proces ich równie szybkiej eliminacji. Na podstawie wyników badania autorzy zasugerowali ponadto, iż stosunek stężeń TREO/S,S-EBDM może służyć jako przydatny wskaźnik stopnia aktywacji TREO *in vivo*. Wzrost tego stosunku może przykładowo towarzyszyć wystąpieniu kwasicy metabolicznej spowodowanej przez kwas metanosulfonowy, uwalniany podczas transformacji proleku [16].

Tabela 2. Parametry farmakokinetyczne TREO (średnia \pm SD) po jednorazowym 2 h wlewie dożylnym u dzieci (Główka i wsp. [105])

Liczba pacjentów	1	5	1
Wiek, mediana i zakres [lata]		14 (2 – 15)	
Dawka [g/m^2]	10	12	14
C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	271	420 ± 250	632
AUC [$\mu\text{g} \times \text{h}/\text{ml}$]	735	1309 ± 921	1960
$t_{0,5\beta}$ [h]	2,15	$1,71 \pm 0,40$	1,93
V_{ss} [l]	37	26 ± 14	7
Cl_{tot} [ml/min]	385	232 ± 119	60
Ilość niezmiennego leku wydalona drogą nerkową [% dawki leku]	27	33 ± 10	16

$\text{AUC}_{(0 \rightarrow \infty)}$, pole pod krzywą stężenie leku w osoczu – czas; Cl_{tot} , klirens ogólnoustrojowy; C_{max} , maksymalne stężenie leku w osoczu; $t_{0,5\alpha}$, okres półtrwania fazy dystrybucji; $t_{0,5\beta}$, okres półtrwania fazy eliminacji; V_{ss} , objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym.

Tabela 3. Parametry farmakokinetyczne TREO (średnia \pm SD) po jednorazowym lub wielokrotnym podaniu u osób dorosłych

Pierwszy autor (rok)	Hilger [86] (1998)				Hilger [87] (2000)		Scheulen [5] (2000)	Beelen [102] (2005)		Nemecek [94] (2011)	
Liczba pacjentów	14	7	4	3	10	10	14	8	10	4	12
Wiek, mediana	72,3	60,0	55,0	63,0	63,0	63,0	51,4	38,1	47,4	34	34
i zakres [lata]	(44 – 77)	(44 – 77)	(51 – 57)	(57 – 73)	(58 – 71)	(58 – 71)	(39 – 60)	(19 – 59)	(23 – 64)	(18 – 47)	(5 – 55) ^a
Dawka [g/m ²]	8	10	8	10	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	20-56	36 (3 \times 12)	42 (3 \times 14)	12	14
Droga podania, czas podania	i.v. 0,5 h	i.v. 0,5 h	i.v. 2 h	i.v. 2 h	p.o. (F: 97 \pm 3%)	i.v. ~ 15 min	i.v. \geq 2 h	i.v. 2 h	i.v. 2 h	i.v. 2 h	i.v. 2 h
C _{max} [μ g/ml]	465 \pm 98	597 \pm 94	181 \pm 36	306 \pm 94	29 \pm 19	67 \pm 24	562 – 1660	260 \pm 35	322 \pm 47	461 \pm 102	409 \pm 84
AUC [μ g \times h/ml]	708 \pm 168	977 \pm 182	541 \pm 107	940 \pm 293	82,1 \pm 40,5	85,4 \pm 31,1	2120 – 8040	898 \pm 104	1104 \pm 173	1365 \pm 293	1309 \pm 262
t _{0,5α} [h]	0,2	0,2	– ^b	–	0,2	0,2	–	–	–	–	–
t _{0,5β} [h]	1,94 \pm 0,99	1,87 \pm 0,79	1,75 \pm 0,06	1,99 \pm 0,61	1,93 \pm 0,59	1,69 \pm 0,42	2,02 \pm 0,46	2,1 \pm 0,5	2,0 \pm 0,6	1,73 \pm 0,10	1,83 \pm 0,30
V _{ss} [l]	26 \pm 17	22 \pm 4	30 \pm 8	26 \pm 12	–	–	19,5 \pm 3,8	34 \pm 5	31 \pm 7	16,9 \pm 4,3	22,1 \pm 3,8
Cl _{tot} [ml/min]	199 \pm 53	176 \pm 34	255 \pm 59	190 \pm 63	259 \pm 127	233 \pm 118	145,4 \pm 30,3	225 \pm 23	216 \pm 32	154 \pm 35	185 \pm 37
Cl _{ren} [ml/min]	–	–	–	–	59 \pm 30	59 \pm 30	–	–	–	–	–
Ilość niezmienionego leku wydalona drogą nerkową [% dawki leku]	26 \pm 12	24 \pm 18	14 \pm 5	17 \pm 8	15 \pm 7	16 \pm 6	27 \pm 9	39 \pm 5	39 \pm 7	31 \pm 2	27 \pm 4

^a w grupie znajdowało się 4 dzieci (5 – 17 lat); ^b – oznacza brak danych; AUC_(0 \rightarrow ∞) pole pod krzywą stężenie leku w osoczu – czas; Cl_{ren}, klirens nerkowy; Cl_{tot}, klirens ogólnoustrojowy; C_{max}, maksymalne stężenie leku w osoczu; F, bezwzględna biodostępność; i.v., wlew dożylny; p.o., podanie doustne (kapsułki); t_{0,5 α} , okres półtrwania fazy dystrybucji; t_{0,5 β} , okres półtrwania fazy eliminacji; V_{ss}, objętość dystrybucji w stanie stacjonarym.

1.12. Farmakokinetyka S,S-DEB i jego stereoizomerów

Jedynе do tej pory opisane w literaturze badanie farmakokinetyczne oparte na podaniu samego (\pm)-DEB przeprowadzili Valentine i wsp. [108]. Po podaniu szczurom dawki 523 $\mu\text{mol/kg}$ drogą dożylnego bolusa, stężenie związku we krwi szybko malało, od około 1000 do 10 $\mu\text{mol/l}$ w ciągu 1 h. Zmiany stężeń najlepiej opisywał model dwukompartментowy, chociaż modelowa krzywa zależności $\log(\text{stężenie}) - \text{czas}$ charakteryzowała się mało wyraźną zmianą przebiegu i niewiele różniła się od profilu dla modelu jednokompartментowego. Wynikało to z faktu, iż (\pm)-DEB ulegał dystrybucji do względnie małego kompartментu tkankowego o objętości 0,31 l/kg, stanowiącego 42% V_{ss} . Bezwzględna wartość V_{ss} (0,73 l/kg) mieściła się pomiędzy objętością płynu zewnątrzkomórkowego i całkowitej wody ustrojowej u szczurów. Zdaniem autorów przyczyną ograniczonej dystrybucji (\pm)-DEB z kompartментu centralnego była jego wysoka rozpuszczalność we krwi bądź wiązanie z białkami [108]. W innym badaniu S,S-DEB wiązał się jednak z białkami osocza ludzkiego tylko w około 20%, chociaż należy zaznaczyć, iż pomiary nie zostały wykonane w warunkach fizjologicznych (temperatura pokojowa, pH poniżej 5,0) [16]. Niezależnie od przyczyny powyższego zjawiska, parametry farmakokinetyczne obliczone przez Valentine i wsp. [108] (Tabela 4) potwierdziły, iż (\pm)-DEB odznaczał się bardzo szybką dystrybucją i eliminacją. Ta ostatnia wynikała z wysokiego Cl_{tot} związku (większego od wielkości przepływu krwi przez wątrobę szczurów), na który mógł się składać metabolizm wątrobowy i pozawątrobowy (tkankowy) oraz nieenzymatyczne reakcje związku ze składnikami krwi i tkanek. Podobną farmakokinetykę do (\pm)-DEB prezentował w tym samym badaniu 1,2-epoksybut-3-en (EB), posiadający jeden pierścień epoksydowy (Tabela 4).

Kilka doniesień literaturowych dotyczy poziomów DEB we krwi lub tkankach zwierząt laboratoryjnych poddanych kontaktowi z BD [109-115]. W doświadczeniu Himmelsteina i wsp. [109] stężenia DEB we krwi myszy zmierzone bezpośrednio po zakończeniu 6 h inhalacji 62,5, 625 i 1250 ppm BD były w granicach 0,6 – 2,5 $\mu\text{mol/l}$ a następnie szybko malały (przykładowo dla dawki 625 ppm BD: od ~ 2 do ~ 0,08 $\mu\text{mol/l}$ w ciągu 26 min.). U szczurów poziomy DEB były wykrywane jedynie w momencie zakończenia inhalacji BD i to na bardzo niskich poziomach (0,3 – 100 nmol/l) [110-113,115]. DEB stwierdzono również w tkankach myszy i szczurów, takich jak płuca, serce, grasica, śledziona oraz dodatkowo w wątrobie i szpiku kostnym (tylko u myszy). Podobnie jak w przypadku krwi, stężenia DEB we wszystkich badanych tkankach u myszy były dużo

wyższe niż u szczurów poddanych narażeniu na te same lub nawet wyższe dawki BD [110-113].

Tabela 4. Parametry farmakokinetyczne (\pm)-DEB i EB (średnia \pm SD, n = 3) u szczurów po jednorazowym bolusie dożylnym [108]

Parametr	Związek/dawka			
	(\pm)-DEB 523 $\mu\text{mol/kg}$	71 $\mu\text{mol/kg}$	EB 143 $\mu\text{mol/kg}$	286 $\mu\text{mol/kg}$
AUC [$\mu\text{mol} \times \text{min/l}$]	6900 \pm 580	720 \pm 160	1280 \pm 210	4400 \pm 960
$t_{0,5\alpha}$ [min]	2,7 \pm 0,1	1,4 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	1,4 \pm 1,5
$t_{0,5\beta}$ [min]	13,8 \pm 2,5	5,7 \pm 1,6	7,0 \pm 2,5	8,5 \pm 4,0
V_c [l/kg]	0,42 \pm 0,01	0,40 \pm 0,27	0,40 \pm 0,15	0,40 \pm 0,17
V_{ss} [l/kg]	0,73 \pm 0,06	0,59 \pm 0,31	0,58 \pm 0,17	0,53 \pm 0,17
Cl_{tot} [ml/(min \times kg)]	76 \pm 8	104 \pm 26	114 \pm 20	67 \pm 17

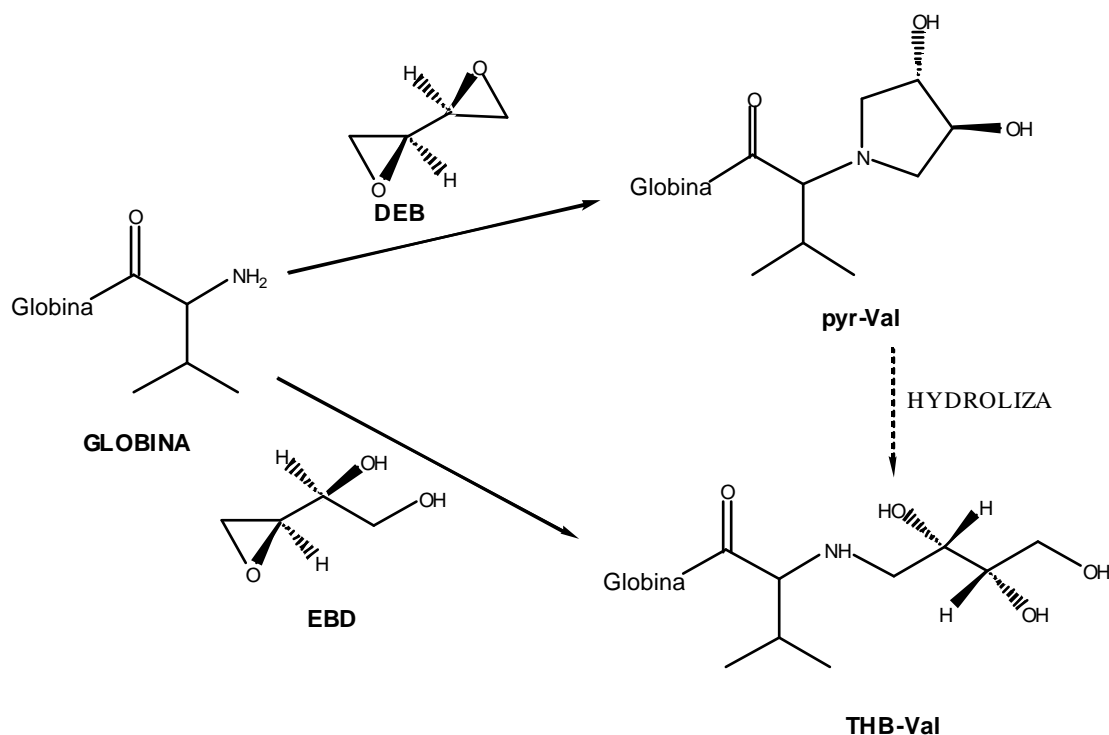
AUC_{0 \rightarrow ∞} , pole pod krzywą stężenie leku w osoczu – czas; Cl_{tot} , klirens ogólnoustrojowy; C_{max} , maksymalne stężenie leku w osoczu; $t_{0,5\alpha}$, okres półtrwania fazy dystrybucji; $t_{0,5\beta}$, okres półtrwania fazy eliminacji; V_c , objętość kompartmentu centralnego; V_{ss} , objętość dystrybucji w stanie stacjonarym.

Enzymatyczna hydroliza przebiegała w powyższym badaniu zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten i odznaczała się dużą efektywnością, o czym świadczyła wysoka wartość stosunku maksymalnej szybkości procesu (V_{\max} ; $155,8 \pm 9,8$ nmol/(mg białka \times min)) do stałej Michaelisa (K_M ; $4,80 \pm 0,41$ mmol/l). Około czterokrotnie mniejszym stosunkiem V_{\max}/K_M ($21,7/2,83$) charakteryzowała się reakcja zachodząca pod wpływem frakcji mikrosomalnej ludzkich płuc. Chociaż butano-1,2,3,4-tetraol jest końcowym produktem hydrolizy DEB, jego znaczenie w badaniach toksykokinetycznych bądź farmakokinetycznych jest znikome. Wynika to z faktu, iż w warunkach *in vivo* związek ten jest również endogennym przejściowym metabolitem cukrowym, który podlega dalszym przemianom w tzw. szlaku pentozofosforanowym do związków trójwęglowych. Jednym z nich wydaje się być 1,3-dihydroksypropanon, wykryty w moczu myszy poddanych narażeniu na znakowany izotopowo BD [19].

Drugim szlakiem detoksykacji DEB u ludzi i gryzoni jest spontaniczne lub enzymatyczne sprzężenie ze zredukowanym glutationem (GSH). W warunkach nieenzymatycznych produktem reakcji jest S-(2-hydroksy-3,4-epoksybutylo)-GSH, który powstaje w wyniku substytucji nukleofilowej na atomie węgla C-1 o mniejszej zawadzie przestrzennej (Ryc. 12b). W środowisku 0,1 mol/l buforu fosforanowego ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) o pH 7,4 i temperaturze 37°C stała szybkości drugiego rzędu dla tego procesu wynosiła 99 ± 6 l/(mol \times h) [116]. Przy dużym stężeniu obu substratów ($\text{DEB} \geq 20$ mmol/l, $\text{GSH} \geq 50$ mmol/l) obserwowano również tworzenie 1,4-bis-(S-glutationylo)butano-2,3-diolu, będącego wynikiem otwarcia obu pierścieni epoksydowych DEB w reakcji z dwoma cząsteczkami GSH, jednakże powstawanie tego podwójnego koniugatu w warunkach *in vivo* jest bardzo mało prawdopodobne. Enzymatyczna reakcja sprzężenia DEB z GSH zachodzi pod wpływem GST zlokalizowanej we frakcji cytozolowej wątroby (głównie), płuc i innych tkanek. Obecność enzymu zmienia mechanizm substytucji, prowadząc do ataku nukleofila (GSH) na drugorzędowy atom węgla C-2 i utworzenia S-(1-hydroksymetylo-2,3-epoksypropylo)-GSH. W warunkach *in vitro* w środowisku frakcji cytozolowej wątroby ludzkiej reakcja ta przebiegała zgodnie z kinetyką Michaelisa-Menten, dla której parametry V_{\max} i K_M wynosiły odpowiednio $6,4 \pm 1,9$ nmol/(mg białka \times min) i $2,1 \pm 1,4$ mmol/l. Dwoma ostatecznymi produktami procesu były jednak S-(1-hydroksymetylo-2,3-dihydroksypropylo)-GSH i S-(2,3,4-trihydroksybutylo)-GSH, które tworzyły się w wyniku następczej hydrolizy izomerycznych produktów odpowiednio enzymatycznej i nieenzymatycznej koniugacji DEB z GSH (Ryc. 12b) [116]. *In vivo* powyższe dwa związki

mogą ulegać dalszym przemianom enzymatycznym (kolejno odłączeniu kwasu glutaminowego, glicyny i acetylacji reszty cysteinylowej) do odpowiednich kwasów merkapturowych wydanych z moczem: S-(1-hydroksymetylo-2,3-dihydroksypropylo)-GSH do 3-(N-acetylo-L-cystein-S-ylo)-1,2,4-trihydroksybutanu, a S-(2,3,4-trihydroksybutylo)-GSH do 4-(N-acetylo-L-cystein-S-ylo)-1,2,3-trihydroksybutanu. Odpowiednio pierwszy, drugi i czwarty z wymienionych metabolitów wykryto w moczu gryzoni eksponowanych na znakowany izotopowo BD. Jednakże, ponieważ EBD może tworzyć się z BD również szlakiem niezależnym od DEB, autorzy nie mogli stwierdzić z całkowitą pewnością, iż wspomniane związki pochodzą z rozkładu DEB [116,117]. Ciekawych wniosków dostarcza przeniesienie wyników badań metabolizmu DEB *in vitro* na warunki *in vivo*, uwzględniające zawartość białek cytozolowych i mikrosomalnych w poszczególnych narządach ludzi i gryzoni. Podsumowując je można stwierdzić, iż u ludzi, w przeciwieństwie do szczurów a zwłaszcza myszy, enzymatyczna hydroliza ma kilkakrotnie większy udział w klirensie DEB niż jego sprzężanie z GSH [19,116].

Oprócz typowego metabolizmu, w procesie eliminacji S,S-DEB należy uwzględnić udział nieenzymatycznych reakcji tego reaktywnego związku z nukleofilowymi biomolekułami. Wiadomo, iż DEB wiąże się nieenzymatycznie z cząsteczką hemoglobiny przez N-terminalną resztę aminokwasową waliny, tworząc addukt N,N-(2',3'-dihydroksybut-1',4'-diyl)walinowy (pyr-Val) posiadający pierścień piroolidynowy. W warunkach *in vitro* stała szybkości drugiego rzędu tego procesu dla ludzkiej hemoglobiny wynosiła $5,5 \times 10^{-5} \text{ l}(\text{g} \times \text{h})$. Podobnej reakcji ulega też produkt częściowej hydrolizy DEB – EBD, dając addukt N-(2',3',4'-trihydroksybut-1'-ylo)walinowy (THB-Val) (Ryc. 13) [23,118-120]. Specyficzny tylko dla DEB addukt pyr-Val oznacza się w postaci N-alkilowanego heksapeptydu, uzyskanego po wyizolowaniu globiny z erytrocytów i jej trawieniu trypsyną [118-120]. Obecnie najczulsza dostępna technika, opracowana przez Boysena i wsp. [118], pozwala na osiągnięcie LOQ na poziomie 4 pmol heksapeptydu na kolumnie. Tak wysoką czułość osiąga się dzięki zaawansowanej metodyce oczyszczania próbki oraz zastosowaniu do oznaczenia analitu metody nano-HPLC sprzężonej z tandemowym detektorem mas wyposażonym w źródło jonizacji typu nanoelektrospray (nano-ESI-nano-MS/MS). W pierwszym etapie, z mieszaniny uzyskanej po trawieniu trypsyną izoluje się N-alkilowany heksapeptyd metodą chromatografii powinowactwa immunologicznego. Następnie kwasowy eluat zawierający analit poddaje się właściwej analizie nano-HPLC-nano-ESI-MS/MS z dodatkowym użyciem tzw. kolumny pułapkowej (ang. *trap column*).



Ryc. 13. Reakcja DEB i EBD z N-terminalną waliną hemoglobiny. W warunkach fizjologicznych addukt pyr-Val może ulegać samorzutnej hydrolizie do THB-Val. Na schemacie przedstawiono stereoizomery o konfiguracji absolutnej (2S,3S) [23,118].

W pierwszej kolejności badana próbka nastrzykiwana jest na krótką kolumnę HPLC pełniącą rolę wspomnianej kolumny pułpkowej, na której analit ulega silnej retencji a zanieczyszczenia są szybko eluowane poza system analityczny. Po ustalonym czasie następuje automatyczne przekierowanie wypływu fazy ruchomej z kolumny pułpkowej na właściwą nanokolumnę HPLC (średnica rzędu 100 μm), czemu towarzyszy uruchomienie gradientu fazy ruchomej, który pozwala na efektywną elucję analitu. Dodatkowo zastosowanie szybkości przepływu fazy ruchomej rzędu 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ pozwala na zwiększenie czułości samego detektora masowego. Wykorzystując opisaną metodykę, obecność adduktów pyr-Val (0,02 – 0,86 pmol/g globiny) stwierdzono we krwi pracowników przemysłowych narażonych zawodowo na BD [118]. Oznaczenia pyr-Val przeprowadzono również u zwierząt laboratoryjnych po 10-dniowym narażeniu na inhalację BD (2 tygodnie, 5 dni/tydzień, 8 h/dzień). W zależności od stężenia węglowodoru we wdychanym powietrzu (0,1 – 625 ppm) poziomy adduktów u myszy i szczurów wynosiły odpowiednio 2,1 – 1980 i 0,6 – 125 pmol/g globiny. Ilość badanych połączeń rosła ze wzrostem stężenia węglowodoru, ale przy wyższych stężeniach następowało częściowe (myszy) bądź całkowite (szczury)

wysycenie procesu ich tworzenia [119]. Z kolei po dootrzewnowym podaniu samego (\pm)-DEB myszom w dawce 150 i 300 $\mu\text{mol/kg}$, poziomy pyr-Val we krwi były dużo wyższe i wyniosły odpowiednio 5,8 i 21,1 nmol/g łańcucha α globiny [120].

Zaawansowane prace dotyczą także oznaczeń ilości adduktów DEB z DNA w warunkach *in vivo*. W badaniach tych również korzysta się z najnowszych rozwiązań analitycznych, bazujących na stosowaniu metody nano-HPLC-nano-ESI-MS/MS z kolumną pułapkową i wstępnym oczyszczaniu próbki zhydrolizowanego DNA metodą preparatywnego HPLC lub ekstrakcji do fazy stałej [26-28]. Techniki te pozwalają na oznaczenie adduktów bis-N7G-BD i N1A-N7G-BD na poziomie 1 $\text{fmol}/100 \mu\text{g}$ DNA, co odpowiada 3 adduktom na 10^9 prawidłowych nukleotydów helisy DNA [26,27], oraz egzocyklicznych monoadduktów 1,N⁶-(α,γ)-HMHPA na poziomie 0,5 $\text{fmol}/100 \mu\text{g}$ DNA (15 adduktów/ 10^9 prawidłowych nukleotydów; w tym przypadku stosowano metodę kapilarnej HPLC, w której średnica kolumny wynosiła 0,5 mm a przepływ fazy ruchomej 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ [28]). U myszy i szczurów narażonych na różne stężenia BD największe poziomy wymienionych adduktów wykryto w wątrobie. Dominującym typem połączeń były bis-N7G-BD (do 4,0 i 0,4 adduktów/ 10^7 prawidłowych nukleotydów odpowiednio u myszy i szczurów), natomiast ilości adduktów N1A-N7G-BD a zwłaszcza 1,N⁶-(α,γ)-HMHPA były znacząco mniejsze. Poza wątrobą addukty bis-N7G-BD zidentyfikowano również w płucach, grasicy, nerkach i mózgach badanych zwierząt [26-28]. Do tej pory, mimo zaawansowanej metodyki analizy ilościowej, wiązań krzyżowych indukowanych przez DEB nie wykryto u ludzi narażonych na BD, a jedynie u myszy (tylko bis-N7G-BD) poddanych okresowemu systematycznemu kontaktowi ze stężeniami BD spotykanymi w warunkach narażenia zawodowego pracowników produkcji przemysłowej gum, plastyfikatorów i żywic [26].

1.13. Charakterystyka reżimów kondycjonujących opartych na TREO

Od końca lat 90 XX wieku zarówno u osób dorosłych, jak i dzieci przeprowadzono wiele autologicznych i allogenicznych HSCT poprzedzonych kondycjonowaniem opartym na wysokich dawkach TREO połączonych z różnymi cytostatykami, takimi jak FLU, CY, melfalan, tiotepa, karboplatyna, dakarbazyna, etopozyd. Spektrum schorzeń stanowiących wskazanie do wykonania przeszczepień allogenicznych było bardzo szerokie i obejmowało choroby układu hematologicznego, zarówno nowotworowe (m.in. AML, MDS, ALL, CML, CLL, chłoniaki ziarnicze i nieziarnicze, MM, zespoły mieloproliferacyjne), jak i nienowotworowe, obejmujące charakterystyczne dla wieku dziecięcego wrodzone i nabyte

defekty układu krwiotwórczego lub immunologicznego (m.in. adrenoleukodystrofię, beta-talazemię, ciężką nabytą anemię aplastyczną, zespół Wiskotta-Aldricha, zespół Schwachmanna-Diamonda, mielofibrozę, osteopetrozę) [77,91-101]. Rzadsze przeszczepienia autologiczne wykonano w przypadku nowotworów litych – u dzieci z ES oraz kobiet z rakiem jajnika i rakiem piersi [77]. Ponieważ TREO nie ma jeszcze wskazania rejestracyjnego do kondycjonowania przed HSCT, wszystkie wymienione przeszczepienia zostały przeprowadzone w ramach badań klinicznych z udziałem pacjentów niekwalifikujących się do standardowych reżimów kondycjonujących z powodu znacznego ryzyka pojawienia się poważnych efektów toksycznych lub prognozowanej niewielkiej skuteczności terapii. Pomimo tego faktu, uzyskane wyniki śmiertelności spowodowanej leczeniem (TRM, ang. *treatment-related mortality*), określanej też w przypadku chorób nowotworowych terminem śmiertelności niespowodowanej wznową (NRM, ang. *non-relapse mortality*), częstości i nasilenia GVHD, częstości wznowy choroby, czasu przeżycia wolnego od choroby (DFS, ang. *disease-free survival*) i czasu całkowitego przeżycia (OS, ang. *overall survival*) było lepsze lub przynajmniej porównywalne do standardowo stosowanych procedur [77,91-101,121]. Z tej racji w 2004 roku Europejska Agencja Leków (EMA) w ramach oceny przedrejestracyjnej przyznała TREO status leku sierocego w kondycjonowaniu przed HSCT [122]. Oczywistym jest fakt, iż autologiczne HSCT charakteryzowały się znacznie mniejszą TRM niż procedury allogeniczne. Wynikało to z szybkiego wszczepienia komórek hematopoetycznych, zapewniającego krótszy czas trwania neutropenii i przez to mniejsze ryzyko rozwoju poważnych infekcji, a także z braku GVHD [77]. Jednakże ostatnie badania skupiają się na stosowaniu TREO przed allogenicznym HSCT u dzieci i dorosłych, gdyż tylko ta procedura jest jedynym potencjalnym ratunkiem w wielu chorobach, wśród których statystycznie pierwsze miejsce zajmuje AML. Wiąże się to z faktem, iż wyłącznie przeszczep allogeniczny, tj. nie pochodzący od biorcy, zapewnia alloreaktywny efekt „przeszczep przeciw nowotworowi”, który razem z reżimem kondycjonującym uczestniczy w skutecznej eradykacji patologicznych komórek, zapobiegając nawrotowi choroby nowotworowej [91-96,98,99,101,121]. Z kolei w chorobach nienowotworowych allogeniczny przeszczep stanowi źródło prawidłowych komórek hematopoetycznych zdolnych do usunięcia wrodzonego lub nabytego defektu i odtworzenia systemu hematopoetycznego i immunologicznego w organizmie biorcy [95,97,100]. W dotychczas przeprowadzonych reżimach kondycjonujących przed allogenicznym HSCT TREO podawano z reguły przez trzy kolejne dni w dawce dziennej 12 lub 14 g/m² w skojarzeniu z CY lub FLU oraz, w przypadku

zgodnych tkankowo dawców niespokrewnionych, dodatkowymi immunosupresantami (globuliną antyleukocytarną bądź alemtuzumabem) w celu lepszej prewencji odrzucenia przeszczepu i GVHD [77,91-101,121]. Aktualnie uwaga transplantologów skupia się na reżimie opartym na TREO ($3 \times 12 - 14 \text{ g/m}^2$) i FLU ($5 \times 30 \text{ mg/m}^2$), w których leki podaje się odpowiednio od 6 do 4 dnia i od 6 do 2 dnia przed planowanym przeszczepieniem. W latach 2011-2012 zakończyły się wielośrodkowe prospektywne badania kliniczne II fazy, w których przed allogenicznym HSCT u dorosłych pacjentów z zaawansowanymi chorobami nowotworowymi, głównie AML i MDS, zastosowano powyższy schemat kondycjonujący [93,96,101]. Wyniki tych badań pozwalają przyznać reżimowi TREO/FLU status tzw. kondycjonowania o zredukowanej toksyczności (RTC). Łączy on bowiem cechy typowego kondycjonowania mieloablacyjnego (MAC), w którym stosuje się wysokie dawki środków mieloablacyjnych (np. BU $4 \times 4 \text{ mg/kg}$ lub FTBI $\geq 500 \text{ cGy}$), z cechami kondycjonowania o zredukowanej intensywności (RIC), opartych z reguły na FLU i mniejszych dawkach BU (np. $2 \times 3,2 \text{ mg/kg}$). Zaletą RIC w porównaniu z MAC jest mniejsze ryzyko TRM, co umożliwia objęcie procedurą allogenicznego HSCT pacjentów starszych i osłabionych chorobami współistniejącymi lub wcześniejszymi chemioterapiami. Z drugiej jednak strony RIC wiąże się z wyższym ryzykiem odrzucenia przeszczepu i wznowy choroby [77,98]. Przy stosowaniu wspomnianego kondycjonowania RTC opartego na TREO i FLU u biorców notuje się szybkie (10 – 20 dni) i trwałe wszczepienia, szybkie uzyskanie chimeryzmu hematopoetycznego całkowitego (pacjenci z nowotworami) lub przynajmniej stabilnego mieszanego (dzieci z chorobami nienowotworowymi szpiku) oraz relatywnie niski poziom wznowy, co jest charakterystyczne dla MAC. Jednocześnie jednak, dzięki małej toksyczności narządowej TREO, obserwuje się niski stopień toksyczności całego reżimu kondycjonującego (RRT, ang. *regimen-related toxicity*), a w konsekwencji obniżoną TRM (zazwyczaj 5 – 25% po 2 – 3 latach), podobną do tej uzyskiwanej w RIC. W zakresie RRT główny problem stanowią poważne infekcje (III i IV stopień NCI-CTC), które dotyczą około 50 – 80% pacjentów i są główną przyczyną TRM [91-101,121]. Shimoni i wsp. [98] twierdzą, iż tak wysoka częstość poważnych infekcji może wynikać z bardzo wczesnego wystąpienia neutropenii u pacjentów a przez to długiego czasu jej trwania. Podczas analizy porównawczej autorzy ci zauważyli, iż po kondycjonowaniu z użyciem TREO i FLU neutropenia rozpoczynała się średnio w dniu wykonania HSCT, a w przypadku BU/FLU dopiero kilka dni później. Przyczyną tej różnicy może być fakt, iż TREO działa cytotoksycznie na multipotencjalne i ukierunkowane komórki hematopoetyczne, podczas gdy

BU głównie na pierwsze z nich [98]. Ostatecznie jednak relatywnie mała częstość NRM oraz wznowy choroby sprawiają, iż RTC oparte na TREO i FLU zapewnia względnie wysoki stopień DFS i OS u pacjentów z konkretnym typem choroby. W chorobach nienowotworowych u dzieci w okresie 2 – 3 lat po HSCT wznowę notuje się bardzo rzadko, stąd DFS i OS są zbliżone i wynoszą ~ 80 – 95% [95,97,100]. Gorsze wyniki uzyskuje się w badaniach z udziałem pacjentów cierpiących z powodu chorób nowotworowych, gdyż częstsze wznowy (5 – 36%) przekładają się na niższą częstość 2 – 3-letniego DFS (47 – 67%) i OS (52 – 71%) [91-96,98,99,101,121]. Dodatkowo zarysowuje się zróżnicowanie wyników terapii w zależności od zaszeregowania chorych do grup niskiego i wysokiego ryzyka (np. osoby starsze, źle rokujący status nowotworu). Chociaż w drugiej wymienionej grupie reżim TREO/FLU często daje lepsze wyniki niż BU/FLU lub FTBI, nie są one tak satysfakcjonujące jak te uzyskiwane u pacjentów o lepszym rokowaniu [93-95,98,121]. Przykładowo wśród chorych na AML w ciągu dwóch lat po allogenicznym HSCT poprzedzonym reżimem TREO/FLU wznowa choroby nastąpiła u 25% osób poniżej 50 roku życia oraz u 50% starszych pacjentów [93]. W badaniu Nemecka i wsp. [94] w okresie dwóch lat od przeszczepienia wznowa występowała znacznie rzadziej w grupie pacjentów z MDS (15%) niż w grupie chorych na oporną lub nawrotową postać AML (63%). Z kolei u pacjentów pediatrycznych leczonych z powodu ALL i AML wyższy stopień 2-letniego DFS zanotowano, gdy HSCT wykonano w stanie pierwszej całkowitej remisji choroby (52%) niż w przypadku kolejnej całkowitej remisji bądź jej braku (13%) [95].

Podsumowując, należy zwrócić uwagę, iż we wszystkich do tej pory przeprowadzonych próbach klinicznych włączenie pacjentów do HSCT poprzedzonego kondycjonowaniem opartym na TREO nie podlegało randomizacji, lecz było podyktowane niekwalifikowaniem się chorych do standardowych procedur. W konsekwencji analiza porównawcza TREO i standardowych czynników mieloablacyjnych (BU i FTBI) bazuje w tej chwili na wynikach pochodzących z heterogennych grup pacjentów i chorób. Aktualnie jednak toczą się pierwsze wielośrodkowe międzynarodowe randomizowane badania kliniczne III fazy porównujące reżim kondycjonujący TREO/FLU z referencyjnym reżimem BU/FLU przed allogenicznym HSCT u dorosłych pacjentów z AML oraz MDS. Pozwolą one zatem bardziej jednoznacznie ocenić wartość TREO jako czynnika mieloablacyjnego stanowiącego potencjalną alternatywę dla BU [93,94,96].

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- chromatograf HP 1100 z detektorem UV (Hewlett-Packard, Waldbronn, Niemcy)
- kolumna HPLC Nucleosil 100 C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) z prekolumną Nucleosil C18 (Grace, Deerfield, USA)
- chromatograf Agilent 1200 z detektorem RID (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- kolumna HPLC Hypersil ODS (150 × 4,6 mm, 5 μm) z prekolumną Hypersil ODS (4 × 4 mm, 5 μm) (Agilent Technologies, Darmstadt, Niemcy)
- chromatograf Agilent 1200 z detektorem ESI-MS/MS 6410B Triple Quad (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- automatyczny titrator DL50 z elektrodą pH-metryczną DG101-SC (Mettler-Toledo, Zurich, Szwajcaria)
- pH-metr automatyczny CyberScan pH 510 (Eutech Instruments, Singapur)
- waga analityczna SARTORIUS BP 100 S (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- wytrząsarka laboratoryjna 380 S (Elpan, Lubawa, Polska)
- miniwytrząsarka Minishaker MS-2 (IKA-Works Inc., USA)
- wirówka Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- wirówka EBA 12R (Hettich, Tuttlingen, Niemcy)
- probówki do ultrafiltracji osocza Amicon Ultra-0,5mL (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- strzykawki do HPLC, pojemność 100 μl (Hamilton, Reno, NV, USA)
- urządzenie do odgazowywania metodą ultradźwięków UM-4 (Unitra, Olsztyn, Polska)
- urządzenie do odparowywania rozpuszczalników organicznych Techne Dri-Block DB-3 (Techne, Stone, Wielka Brytania)
- łaźnia wodna TW12 (Julabo, Seelbach, Niemcy)
- łaźnia wodna z wytrząsarką Elpan typ 357 (Elpan, Lubawa, Polska)
- łaźnia wodna z termostatem A100 (Lauda, Königshofen, Niemcy)
- mieszadło magnetyczne IKA3671000 (IKA, Warszawa, Polska)
- aparat do dejonizacji wody Simplicity UV (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- zestaw do sączenia (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- sączi o średnicy porów 0,45 μm (Sartorius, Goettingen, Niemcy)
- probówki typu easy-cap 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- probówki typu SafeSeal 2,0 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)

- probówki wirówkowe 9 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy)
- zestaw pipet automatycznych 10 – 5000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- zestaw szkła laboratoryjnego.

3. Odczynniki

- treosulfan (OvastatTM 5000) (medac GmbH, Hamburg, Niemcy)
- (\pm)-1,2:3,4-diepoksybutan (min. 97%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- 2,2'-dinitrobifenyl (2,2'-DNBP) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- paracetamol (Acetaminophen 98%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- kwas 3-nitrobenzenosulfonowy uwodniony (min. 95%) (TCI Europe NV, Boerenveldsweg, Belgia)
- kwas cytrynowy 1-hydrat cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- kwas octowy cz.d.a. (99,5 – 99,9%) (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- sodu wodorotlenek cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- sodu wodorotlenek, roztwór mianowany 0,1 mol/l (\pm 0,2%) (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- sodu chlorek cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- disodu wodorofosforan cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- sodu octan (min. 99,0%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy)
- potasu chlorek cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- potasu diwodorofosforan cz.d.a. (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- 1-oktanol EmpluraTM (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- acetonitryl do HPLC o czystości gradientowej (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- dichlorometan do HPLC (P.O.Ch., Gliwice, Polska)
- osocze królicze do diagnostyki in vitro (Biomed, Kraków, Polska), liofilizat przeznaczony do rekonstrukcji w 1,8 ml wody
- azot sprężony (Messer Polska, Chorzów, Polska)
- woda dejonizowana uzyskana z zastosowaniem aparatury Simplicity UV
- Woda do wstrzykiwań Fresenius 100 ml (Fresenius Kabi, Warszawa, Polska)
- Natrium chloratum 0,9% Kabi (Fresenius Kabi, Warszawa, Polska)
- strzykawki jałowe poj. 2, 5, 10, 20, 50 ml (Becton Dickinson, Warszawa, Polska)
- igły jałowe (Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Niemcy)
- lignina (Hartmann, Pabianice, Polska)
- Ondansetron Kabi (ondansetron 2 mg/ml) (Fresenius Kabi, Warszawa, Polska)

- Bioketan (ketamina 100 mg/ml) (Vetoquinol Biowet, Gorzów Wlkp., Polska)
- Xylavet (ksylazy na 20 mg/ml) (ScanVet, Gniezno, Polska)
- do sporządzenia roztworów używano wody dejonizowanej o przewodności właściwej 0,055 $\mu\text{S/cm}$, przesączonej przez sącdek o wielkości porów 0,45 μm .

4. Roztwory podstawowe i wzorcowe stosowane w metodach HPLC

4.1. Roztwory podstawowe TREO

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono TREO w ilości 0,0557 g (oznaczanie TREO w roztworach buforowych) lub 0,1392 g (oznaczanie TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka), rozpuszczono w wodzie i uzupełniono do kreski. Uzyskano roztwory podstawowe o stężeniu odpowiednio 20 i 50 mmol/l.

4.2. Roztwór podstawowy (\pm)-DEB

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzone 15,5 μl (\pm)-DEB (temp. pokojowa) i uzupełniono wodą do kreski. Uzyskano roztwór podstawowy o stężeniu 20 mmol/l.

4.3. Roztwór podstawowy TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB

Do kolby miarowej o pojemności 25 ml odważono 0,1392 g TREO i rozpuszczono w 15 ml wody. Następnie, przy ciągłym mieszaniu kolbą, dodawano kroplami 5 ml mianowanego roztworu NaOH o stężeniu 0,1 mol/l, po czym uzupełniono wodą do kreski. Otrzymano roztwór podstawowy TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, w którym stężenia analitów wynosiły w przybliżeniu odpowiednio 5, 10 i 5 mmol/l, zgodnie z modelem aktywacji TREO ustalonym przez Feita i wsp. [6]. Dokładne wartości rzeczywistych stężeń zostały ustalone w toku dalszej metodyki.

4.4. Roztwory wzorcowe TREO

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzone 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 2000 i 5000 μl roztworu podstawowego TREO o stężeniu 50 mmol/l i uzupełniono wodą do kreski. W ten sposób uzyskano roztwory wzorcowe o stężeniu odpowiednio 100, 200, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 i 25000 $\mu\text{mol/l}$, stosowane następnie podczas oznaczania TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka.

4.5. Roztwory wzorcowe TREO i (±)-DEB

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzono po 25, 50, 125, 250, 500, 1250, 2500 i 3000 μl roztworów podstawowych TREO i (±)-DEB o stężeniu 20 mmol/l każdy i uzupełniono wodą do kreski. W ten sposób otrzymano roztwory wzorcowe zawierające TREO i (±)-DEB o stężeniach 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 i 6000 $\mu\text{mol/l}$. Dodatkowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzono 200 i 400 μl roztworu wzorcowego TREO i (±)-DEB o stężeniu 500 $\mu\text{mol/l}$ i uzupełniono wodą do kreski. Uzyskano w ten sposób roztwory wzorcowe TREO i (±)-DEB o stężeniach 10 i 20 $\mu\text{mol/l}$.

4.6. Roztwory wzorcowe TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzono 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 2000 i 5000 μl roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB i uzupełniono wodą do kreski. W ten sposób uzyskano roztwory wzorcowe zawierające TREO i S,S-DEB o przybliżonych stężeniach odpowiednio 10, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 i 2500 $\mu\text{mol/l}$ oraz S,S-EBDM odpowiednio 20, 40, 100, 200, 500, 1000, 2000 i 5000 $\mu\text{mol/l}$. Dodatkowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzono 40 i 100 μl roztworu wzorcowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB 500;1000;500 $\mu\text{mol/l}$ i uzupełniono wodą do kreski. Uzyskano w ten sposób roztwory wzorcowe TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o przybliżonych stężeniach 2;4;2 i 5;10;5 $\mu\text{mol/l}$. Dokładne wartości stężeń zostały ustalone w toku dalszej metodyki.

5. Inne roztwory stosowane w metodach HPLC

5.1. Roztwory kwasu cytrynowego

Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odważono 2,1014 g i 3,6774 g jednowodnego kwasu cytrynowego, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono do kreski. W ten sposób otrzymano roztwory kwasu cytrynowego o stężeniu odpowiednio 1 i 1,75 mol/l. Z roztworu o stężeniu 1 mol/l przygotowywano następnie w kolbach 10 ml rozcieńczenia o stężeniach 0,05, 0,30 i 0,35 mol/l.

5.2. Roztwór 1 mol/l NaOH

Do 50 ml kolby miarowej odważono 2,00 g wodorotlenku sodu, rozpuszczono w około 40 ml wody i uzupełniono do kreski. Otrzymano roztwór NaOH o stężeniu 1 mol/l.

5.3. Roztwór odczynnika derywatyzującego 3-NBS (metoda HPLC-UV)

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 0,2000 g uwodnionego 3-NBS, rozpuszczono we wcześniej przygotowanej mieszaninie acetonitrylu i wody (95:5, v/v) i uzupełniono tą mieszaniną do kreski. W ten sposób uzyskano roztwór 3-NBS o stężeniu 20 mg/ml, w przeliczeniu na hydrat.

5.4. Roztwór wzorca wewnętrznego IS1 (metoda HPLC-RID)

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml odważono 0,0378 g paracetamolu, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono do kreski. Uzyskano roztwór IS1 o stężeniu 5 mmol/l.

5.5. Roztwór wzorca wewnętrznego IS2 (metoda HPLC-UV)

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 0,0200 g 2,2'-DNBP, rozpuszczono w acetonitrylu i uzupełniono do kreski. W ten sposób otrzymano roztwór IS2 o stężeniu 2 mg/ml (8,20 mmol/l).

5.6. Ekstrahent zawierający IS2 (metoda HPLC-UV)

Do kolby o pojemności 100 ml odmierzone 10 ml acetonitrylu, 50 μ l roztworu 2,2'-DNBP o stężeniu 2 mg/ml i uzupełniono dichlorometanem do kreski. W tak przygotowanej mieszaninie stężenie IS2 wynosiło 1 μ g/ml (4,10 μ mol/l).

6. Roztwory buforowe o pH 7,4 stosowane w badaniach kinetycznych

6.1. Bufory fosforanowe

Celem przygotowania buforów fosforanowych o określonym stężeniu i sile jonowej, w zlewce w około 95 ml wody rozpuszczono kolejno odpowiednie ilości KH_2PO_4 i Na_2HPO_4 oraz, jeśli zachodziła potrzeba, również NaCl (Tabela 5). Po upływie przynajmniej 16 h otrzymane roztwory termostatowano w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C i doprowadzono za pomocą 1 mol/l NaOH do pH 7,40. Po ostudzeniu roztworu do temperatury pokojowej zawartość zlewki przeniesiono ilościowo do 100 ml kolby miarowej i uzupełniono wodą do kreski.

Tabela 5. Skład buforów fosforanowych o pH 7,40 (37 °C) stosowanych w badaniach kinetycznych TREO i jego epoksytransformerów

Sumaryczne stężenie buforu [mol/l]	Siła jonowa [mol/l]	Ilość soli użyta do sporządzenia 100 ml roztworu [g]			Objętość 1 mol/l NaOH zużyta do uzyskania pH 7,40 [ml/100 ml buforu]
		KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	NaCl	
0,0615	0,16	0,1610	0,7052	–	0,1
0,0730	0,19	0,1910	0,8370	–	0,1
0,369	1,0	0,9662	4,2304	–	2,4
0,0615	1,0	0,1610	0,7052	4,9098	0,75

6.2. Bufor PBS

W celu przygotowania roztworu PBS (*phosphate buffered saline*) w zlewce w około 95 ml wody rozpuszczono kolejno 0,7738 g NaCl, 0,0193 g KCl, 0,0250 g KH₂PO₄ i 0,1096 g Na₂HPO₄. Po upływie przynajmniej 16 h roztwór termostatowano w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C i doprowadzono za pomocą roztworu titranta zawierającego 0,025 mol/l NaOH (pkt. 8.3) do pH 7,40, zużywając 1,5 ml tego roztworu. Po ostudzeniu roztworu do temperatury pokojowej zawartość zlewki przeniesiono ilościowo do 100 ml kolby miarowej i uzupełniono wodą do kreski. Otrzymany bufor PBS charakteryzował się siłą jonową (0,16 mol/l) i składem jonowym zbliżonymi do ludzkiego osocza i płynu zewnątrzkomórkowego.

7. Roztwory buforowe o pH 4,4 stosowane w badaniach P_{OW}

7.1. Koncentrat buforu ABS

Koncentrat roztworu ABS (*acetate buffered saline*) otrzymano przez rozpuszczenie w około 95 ml w 100 ml zlewce kolejno 0,3035 g octanu sodu, 1,6 g NaCl i 0,04 g KCl oraz dodanie 360 µl kwasu octowego. Po 24 h roztwór doprowadzono w temperaturze 37 °C do pH 4,4 za pomocą 1 mol/l NaOH (ok. 0,35 ml), po czym ostudzono do temperatury pokojowej, przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą do kreski. W ten sposób uzyskano roztwór o sile jonowej 0,32 mol/l, w którym sumaryczne stężenie kwasu octowego i octanu sodu wynosiło 0,1 mol/l.

7.2. Bufor ABS

W celu otrzymania buforu ABS, przygotowany wcześniej koncentrat (pkt. 7.1) zmieszano z wodą w stosunku objętościowym 1:1, uzyskując roztwór o sumarycznym stężeniu kwasu octowego i octanu sodu równym 0,05 mol/l. Stężenia NaCl (137 mmol/l) i KCl (2,7 mmol/l) w buforze ABS oraz jego siła jonowa (0,16 mol/l) wzorowane były na składzie buforu PBS (pkt. 6.2), aby odpowiadały wartościom charakterystycznym dla krwi lub płynu zewnątrzkomórkowego u ludzi. Wartość pH 4,4 wymagana była dla zapewnienia stabilności TREO i S,S-EBDM w trakcie analizy P_{OW} .

8. Inne roztwory stosowane w badaniach kinetycznych

8.1. Roztwór 0,15 mol/l TREO

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odważono 0,4174 g TREO, rozpuszczono w wodzie i uzupełniono do kreski.

8.2. Roztwór 0,15 mol/l (\pm)-DEB

Do kolby miarowej o pojemności 10 ml odmierzono 116,0 μ l (\pm)-DEB (temp. pokojowa) i uzupełniono wodą do kreski.

8.3. Roztwór titranta

Titrantem stosowanym w celu utrzymania stałego pH podczas badania kinetyki aktywacji TREO w roztworze PBS był 0,025 mol/l NaOH o sile jonowej 0,16 mol/l. W porównaniu do roztworu PBS, titrant charakteryzował się identyczną zawartością chlorków, lecz zamiast fosforanów zawierał NaOH, w celu neutralizacji kwasu metanosulfonowego, uwalniającego się w trakcie przemiany TREO do epoksytransformerów. Roztwór titranta przygotowano przez rozpuszczenie 7,7378 g NaCl i 0,1934 g KCl w 100 ml wody, dodanie 250 ml mianowanego 0,1 mol/l NaOH i uzupełnienie do kreski w kolbie miarowej o pojemności 1 l.

9. Metody HPLC oznaczania TREO i jego epoksytransformerów

Do oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych (badania kinetyczne i analiza P_{OW}) oraz samego TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików

(badania farmakokinetyczne) stosowano metodę HPLC-RID*. Ze względu na niewystarczającą czułość powyższej metody, do oznaczania niskich poziomów S,S-EBDM i S,S-DEB (lub (±)-DEB) we wspomnianych matrycach biologicznych uzyskanych od zwierząt wykorzystano zmodyfikowaną metodę HPLC-UV, bazującą na derywatywacji epoksydów za pomocą 3-NBS [16].

9.1. Warunki pracy aparatów do HPLC

a) w metodzie HPLC-RID

Chromatograf Agilent 1200 składał się z pompy izokratycznej, układu do manualnego nastrzyku próbki, detektora RID oraz programu ChemStation do sterowania pracą chromatografu i komputerowej analizy danych.

Warunki pracy chromatografu:

- Kolumna Hypersil ODS (150 × 4,6 mm, 5 μm)
- Faza ruchoma: 0,01 mol/l bufor octanowy o pH 4,5 : acetonitryl (95:5, v/v)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min
- Objętość nastrzyku: 100 μl
- Detekcja RID (temperatura celi pomiarowej 35 °C, polaryzacja pozytywna).

Przygotowanie fazy ruchomej:

Do zlewki odważono 0,5906 g bezwodnego octanu sodu, rozpuszczono w wodzie i przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 2 l. Następnie dodano 732 μl kwasu octowego, uzupełniono wodą do kreski i wymieszano. Po upływie 24 h przygotowany roztwór przesączono przez sącdek celulozowy o średnicy porów 0,45 μm i doprowadzono do pH 4,5 za pomocą 1 mol/l NaOH. Następnie do cylindra miarowego o pojemności 2 l odmierzone 100 ml acetonitrylu i uzupełniono przygotowanym buforem octanowym do 2 l. Otrzymaną fazę ruchomą odgazowywano za pomocą ultradźwięków przez 10 min.

b) w metodzie HPLC-UV

Chromatograf HP 1100 składał się z pompy gradientowej, systemu odgazowującego fazę ruchomą, układu automatycznego nastrzyku próbki, termostatowanego kompartementu

* Metoda została w międzyczasie opublikowana z początkiem 2013 r. w J Pharm Biomed Anal [15].

kolumny HPLC, detektora UV oraz programu ChemStation do sterowania pracą chromatografu i komputerowej analizy danych.

Warunki pracy chromatografu:

- Kolumna Nucleosil 100 C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)
- Temperatura kolumny: 25 °C
- Faza ruchoma: woda : acetonitryl (0 min – 40%, 12 min – 80%, 13 min – 80%, 15 min – 40%, 20 min – 40% acetonitrylu)
- Szybkość przepływu fazy ruchomej: 1 ml/min
- Objętość nastrzyku: 20 μl
- Detekcja UV przy $\lambda_{\max} = 264$ nm.

9.2. Przygotowanie próbek do krzywych wzorcowych

9.2.1. Oznaczanie TREO i epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 metodą HPLC-RID

Do próbek typu easy-cap odmierzone 250 μl buforu fosforanowego lub PBS o pH 7,4 i doprowadzono do pH poniżej 5,0 za pomocą 25 μl roztworu kwasu cytrynowego o odpowiednim stężeniu (0,30, 0,35 i 1,75 mol/l odpowiednio dla buforu fosforanowego o stężeniu 0,0615, 0,0730 i 0,369 mol/l oraz 0,05 mol/l dla buforu PBS), celem uniknięcia dalszej aktywacji TREO. Następnie dodano 250 μl roztworu wzorcowego TREO i (±)-DEB (pkt. 4.5) lub TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (pkt. 4.6) oraz 25 μl roztworu paracetamolu (IS1) o stężeniu 5 mmol/l. Po wymieszaniu, 100 μl otrzymanego roztworu nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Stężenia analitów przedstawione na krzywych wzorcowych odpowiadały dokładnie wartości ich stężeń w roztworach wzorcowych. Próba zerowa zawierała 250 μl buforu fosforanowego lub PBS, 25 μl roztworu kwasu cytrynowego o odpowiednim stężeniu, 250 μl wody zamiast roztworu wzorcowego oraz 25 μl roztworu IS1.

9.2.2. Oznaczanie TREO i epoksytransformerów w roztworze ABS metodą HPLC-RID

Do próbek typu easy-cap odmierzone 250 μl buforu ABS o pH 4,4, 250 μl roztworu wzorcowego TREO i (±)-DEB (pkt. 4.5) lub TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (pkt. 4.6) oraz 25 μl roztworu IS1 o stężeniu 5 mmol/l. Po wymieszaniu, 100 μl otrzymanego roztworu nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Stężenia analitów przedstawione na krzywych wzorcowych odpowiadały dokładnie wartości ich stężeń w roztworach

wzorcowych. Próba zerowa zawierała 250 μ l buforu ABS, 250 μ l wody oraz 25 μ l roztworu IS1.

9.2.3. Oznaczanie TREO w osoczu króliczym metodą HPLC-RID

Do próbek Amicon Ultra-0,5 mL odmierzone 300 μ l osocza króliczego nieobciążonego analitem i doprowadzono do pH poniżej 5,0 za pomocą 15 μ l roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l, w celu uniknięcia dalszej aktywacji TREO. Następnie dodano 30 μ l roztworu podstawowego bądź wzorcowego TREO o odpowiednim stężeniu (pkt. 4.4) oraz 30 μ l roztworu IS1 o stężeniu 5 mmol/l i wymieszano. Stężenia analitu przedstawione na krzywej wzorcowej były 10-krotnie mniejsze w stosunku do jego stężeń w roztworach wzorcowych. Próba zerowa zawierała 300 μ l osocza króliczego nieobciążonego analitem, 15 μ l 1 mol/l kwasu cytrynowego, 30 μ l wody i 30 μ l roztworu IS1. Przygotowane próbki poddano ultrafiltracji przez wirowanie z przyspieszeniem $14000 \times g$ przez 10 min w temperaturze 20 °C. Objętość 100 μ l odbiałzonego filtratu nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną.

9.2.4. Oznaczanie epoksytransformerów w osoczu króliczym metodą HPLC-UV

Do fiolek o pojemności 24 ml odmierzone 500 μ l osocza króliczego nieobciążonego analitami, doprowadzono do pH poniżej 5,0 za pomocą 25 μ l 1 mol/l kwasu cytrynowego i dodano 50 μ l roztworu podstawowego bądź wzorcowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o odpowiednich stężeniach epoksy pochodnych (pkt. 4.6). Stężenia analitów przedstawione na krzywych wzorcowych były 10-krotnie mniejsze w stosunku do ich stężeń w roztworach wzorcowych. Próba zerowa zawierała 500 μ l osocza króliczego nieobciążonego analitami, 25 μ l 1 mol/l kwasu cytrynowego i 50 μ l wody. Anality ekstrahowano za pomocą 5 ml ekstrahentu zawierającego dichlorometan, acetonitryl (90:10, v/v) i 2,2'-DNBP (IS2) (pkt. 5.6), wytrząsając próbki przez 10 min przy amplitudzie 4 cm i częstotliwości 300 cykli/min. Po wytrząsaniu próbki chłodzono przez 10 min w temperaturze 4 °C i wirowano przez 10 min z przyspieszeniem $1620 \times g$ w celu rozdzielania warstw. Uzyskaną dolną warstwę organiczną przenoszono bez jakichkolwiek śladów osocza do fiolek o pojemności 24 ml i dodawano 100 μ l roztworu 3-NBS o stężeniu 20 mg/ml. Derywatywacja epoksytransformerów przebiegała w łaźni wodnej w temperaturze 50 °C przez 4 h. Po tym czasie próbki wyjmowano i zostawiano w temperaturze pokojowej przez około 12 h. W celu oczyszczenia mieszaniny poreakcyjnej z nadmiaru odczynnika derywatyżującego, do fiolek

odmierzano 1 ml wody i wytrząsano próbki przez 10 min przy amplitudzie 4 cm i częstotliwości 300 cykli/min. Rozdział warstw uzyskiwano chłodząc próbki przez 10 min w temperaturze 4 °C, a następnie wirując przez 10 min z przyspieszeniem $1620 \times g$. Pobraną dolną warstwę organiczną odparowywano do sucha w łagodnym przepływie azotu w temperaturze 40 °C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 500 μ l acetonitrylu i nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną w objętości 20 μ l.

9.3. Walidacja metod HPLC

W celu walidacji metod analitycznych oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych oraz osoczu króliczym wyznaczono następujące parametry: selektywność, liniowość, granicę wykrywalności (LOD) i LOQ oraz precyzję i dokładność oznaczania w ciągu dnia i między dniami. Dodatkowo dla metod wymagających izolacji analitów z matrycy (oznaczanie TREO i epoksytransformerów w osoczu króliczym) wyznaczono odzysk analitów. Z powodu braku możliwości uzyskania wystarczającej ilości specyficznej matrycy biologicznej – cieczy wodnistej oka, nie przeprowadzono walidacji oznaczania TREO i epoksytransformerów w tej matrycy. Z tej przyczyny do analizy ilościowej związków w cieczy wodnistej pobranej od królików wykorzystano krzywe wzorcowe uzyskane dla osocza. W przypadku metody HPLC-RID oznaczania TREO i epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4, pełną walidację przeprowadzono z użyciem buforu fosforanowego o stężeniu 0,0730 mol/l. Dla pozostałych matryc (tj. buforu fosforanowego o stężeniu 0,0615 mol/l i sile jonowej 0,16 i 1,0 mol/l, buforu fosforanowego o stężeniu 0,369 mol/l i sile jonowej 1,0 mol/l oraz buforu PBS) wykonano walidację częściową, polegającą na potwierdzeniu dokładności i precyzji prób kontroli jakości (QCs) w odniesieniu do krzywych wzorcowych ustalonych dla buforu fosforanowego o stężeniu 0,0730 mol/l. Wykonano również badania stabilności analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oraz próbkach 0,0730 mol/l buforu fosforanowego doprowadzonego do pH poniżej 5,0.

9.3.1. Selektywność

Selektywność metod została określona na podstawie porównania chromatogramów zarejestrowanych dla matryc nieobciążonych analitami i zawierających anality o różnym stężeniu, w tym LOQ. Analizowano możliwość interferencji pików pochodzących od

składników matrycy z pikami analitów. Oceny rozdzielności sąsiadujących pików dokonano w oparciu o współczynnik R_S (*resolution*), który obliczono zgodnie ze wzorem:

$$R_S = 2(t_2 - t_1)/(1,7 \times (w_1 + w_2)),$$

gdzie: t_1, t_2 – czasy retencji 1 i 2 związku; w_1, w_2 – szerokość pików 1 i 2 mierzona w połowie jego wysokości.

Dodatkowo, w celu potwierdzenia tożsamości S,S-EBDM, którego wzorzec nie jest komercyjnie dostępny nawet w formie racematu, wykonano analizę HPLC-MS. Próbkę roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, otrzymanego przez alkalizację TREO za pomocą NaOH (pkt. 4.3), przygotowano do analizy zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.1, z tym wyjątkiem, że roztwór IS1 zastąpiono wodą. Analizę chromatograficzną próbki przeprowadzono na aparacie Agilent 1200 z detektorem ESI-MS/MS w warunkach opisanych w pkt. 9.1a, zmniejszając jednak przepływ fazy ruchomej z 1 do 0,5 ml/min, zgodnie z wymaganiami spektrometrii masowej. Zastosowano następujące parametry źródła jonizacji: napięcie kapilary 4000 V, jonizacja w trybie pozytywnym, napięcie fragmentora 70 V, ciśnienie gazu nebulizującego (azotu) 50 psi, temperatura i przepływ gazu desolwatacyjnego (azotu) – odpowiednio 350 °C i 12 l/min. Masy jonów monitorowano w trybie MS w zakresie 50 – 350. Identyfikację analitów przeprowadzono porównując chromatogramy uzyskane metodą HPLC-MS i HPLC-RID przy przepływie fazy ruchomej 0,5 ml/min.

9.3.2. Liniowość

W metodach HPLC-RID krzywe wzorcowe TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB zostały przedstawione jako zależność stosunku pola powierzchni pików analitu do pola powierzchni pików IS1 (paracetamolu) od stężenia danego analitu w matrycy (0,0730 mol/l bufor fosforanowy o pH 7,4, bufor ABS, osocze królicze). Krzywa wzorcowa dla TREO w osoczu obejmowała stężenia od 20,0 do 5000,0 $\mu\text{mol/l}$. Krzywe wzorcowe dla TREO i S,S-DEB w obu roztworach buforowych zostały przygotowane w zakresie stężeń odpowiednio 20,0 – 6000,0 $\mu\text{mol/l}$ i 50,0 – 6000,0 $\mu\text{mol/l}$ przez oznaczenie serii roztworów wzorcowych gotowych związków, tj. TREO i (\pm)-DEB (dostępnego komercyjnie racematu DEB) (pkt. 4.5). Z kolei krzywa wzorcowa dla S,S-EBDM, otrzymana w wyniku analizy roztworów wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (pkt. 4.6), obejmowała zakres stężeń $40,0 \cdot f_{S,S-EBDM} - 10000,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ $\mu\text{mol/l}$, gdzie $f_{S,S-EBDM}$ oznacza współczynnik korekcyjny S,S-EBDM, wyrażający stosunek jego stężenia rzeczywistego do teoretycznego (zgodnego

z modelem aktywacji TREO wg Feita i wsp. [6]) w serii roztworów wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB*.

W metodzie HPLC-UV krzywe wzorcowe S,S-EBDM i S,S-DEB przedstawiały zależność stosunku pola powierzchni piku głównego produktu derywatywacji S,S-EBDM i S,S-DEB pod wpływem 3-NBS do pola powierzchni piku IS2 od stężenia analitu w osoczu króliczym. Krzywe te, przygotowane z wykorzystaniem roztworów wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, obejmowały zakres stężeń $1,0 \cdot f_{S,S-EBDM} - 1000,0 \cdot f_{S,S-EBDM} \mu\text{mol/l}$ dla S,S-EBDM oraz $1,0 \cdot f_{S,S-DEB} - 500,0 \cdot f_{S,S-DEB} \mu\text{mol/l}$ dla S,S-DEB ($f_{S,S-DEB}$ – współczynnik korekcyjny S,S-DEB).

Dla wszystkich krzywych wzorcowych przeprowadzono analizę regresji liniowej, korzystając z programu Microsoft Excel 2007. Dla poziomu ufności 95% obliczono następujące parametry prostych: współczynnik kierunkowy (a), przesunięcie (b), ich błędy standardowe (odpowiednio S_a i S_b) oraz współczynnik korelacji (r). Istotność statystyczną współczynnika b oceniono za pomocą testu t-Studenta, porównując wartość statystyki t obliczoną jako iloraz $|b|/S_b$ z wartością $t_{\alpha,f}$ odczytaną w tablicy t-Studenta dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ i liczby stopni swobody $f = n-2$ (n – liczba punktów krzywej wzorcowej). Liniowość krzywych wzorcowych została dodatkowo potwierdzona przy użyciu testu Mandela (*Mandel's fitting test*), który służy do weryfikacji liniowego lub kwadratowego modelu regresji. O liniowości modelu świadczy wartość testowa $TV < F_{kryt}$.

9.3.3. LOD i LOQ

Wartość LOD oszacowano jako stężenie analitu, przy którym stosunek powierzchni piku do powierzchni szumów linii podstawowej (S/N) był równy co najmniej 3:1. LOQ wyznaczono jako najmniejsze stężenie analitu, zapewniające odpowiednią precyzję (współczynnik zmienności $CV \leq 20\%$) i dokładność (błąd $\leq 20\%$) oznaczeń.

9.3.4. Precyzja i dokładność

Precyzję oznaczeń wyrażano jako współczynnik zmienności (CV), obliczony zgodnie ze wzorem:

* Sposób wyznaczania współczynników korekcyjnych dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB przedstawiono w Załączniku 1.

$$CV = \frac{SD}{C_{\text{sr}}} \cdot 100\%$$

gdzie: CV – współczynnik zmienności [%]; SD – odchylenie standardowe oznaczonych stężeń analitu [$\mu\text{mol/l}$]; C_{sr} – średnie oznaczone stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$].

Dokładność wyrażono jako błąd względny oznaczeń, tj. względną różnicę pomiędzy średnim stężeniem oznaczonym i stężeniem nominalnym analitu:

$$\text{błąd\%} = \frac{|C_{\text{sr}} - C_{\text{nom}}|}{C_{\text{nom}}} \cdot 100\%$$

gdzie: błąd% – względny błąd oznaczeń [%]; C_{nom} – nominalne stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$]; C_{sr} – średnie oznaczone stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$].

Precyzję i dokładność w ciągu dnia (*intraday*) wyznaczono poprzez oznaczenie pięciu niezależnych próbek matrycy nastrzykniętych odpowiednim roztworem wzorcowym o znanym stężeniu analitów (LOQ, średnie, wysokie), zgodnie z procedurą opisaną dla krzywych wzorcowych (pkt. 9.2). Precyzję i dokładność między dniami (*interday*) wyznaczono natomiast dla wszystkich nominalnych stężeń analitów z zakresu krzywych wzorcowych.

9.3.5. Odzysk TREO i epoksytransformerów z osocza

Odzysk TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB z osocza króliczego wyznaczono dla przynajmniej dwóch poziomów analitów (niskie, wysokie) przez porównanie wyników oznaczeń dwóch serii składających się z pięciu próbek.

a) Odzysk TREO (metoda HPLC-RID)

Próbki I serii, przygotowywane zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.3, zawierały osocze nastrzyknięte roztworem IS1 oraz roztworem TREO, którego stężenie w matrycy wynosiło 20,0, 250,0 i 2500,0 $\mu\text{mol/l}$. Próbki II serii zawierały osocze nastrzyknięte jedynie roztworem kwasu cytrynowego i roztworem IS1. Próbki te poddano ultrafiltracji zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.3. Następnie do próbki typu easy-cap pobrano 115 μl odbiałzonego filtratu (odpowiednik 345 μl mieszaniny osocza, kwasu cytrynowego i IS1 z I serii), dodano 10 μl roztworu wzorcowego TREO (odpowiednik 30 μl roztworu TREO z I serii) i wymieszano. Tak przygotowaną próbkę nastrzyknięto na kolumnę chromatograficzną w objętości 100 μl . Odzysk obliczono z równania:

$$\text{odzysk [\%]} = P_{\text{TREO/IS1}}^{\text{I}} / P_{\text{TREO/IS1}}^{\text{II}} \cdot 100\%,$$

gdzie: $P^I_{TREO/IS1}$ i $P^{II}_{TREO/IS1}$ – stosunek pola powierzchni piku TREO do pola powierzchni piku IS1 uzyskany odpowiednio w serii I i II.

Odzysk TREO z osocza wyznaczony według powyższej procedury odpowiadał jednocześnie procentowi wolnego leku (niezwiązanego z białkami osocza).

b) Odzysk S,S-EBDM i S,S-DEB (metoda HPLC-UV)

Próbki I serii, przygotowywane zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.4, zawierały osocze nastryknięte odpowiednim roztworem wzorcowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB. Stężenia S,S-EBDM i S,S-DEB w osoczu wynosiły odpowiednio $2,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ i $1,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$ (niskie stężenie) oraz $100,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ i $50,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$ (wysokie stężenie). Próbki II serii zawierały 500 μl osocza nieobciążonego analitami, 25 μl roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l i 50 μl wody (zamiast 50 μl wodnego roztworu analitów). Próbki poddano ekstrakcji zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.4. Następnie do uzyskanej warstwy organicznej odmierzone 100 μl roztworu 3-NBS o stężeniu 20 mg/ml przygotowanego *ex tempore* w mieszaninie acetonitrylu i (zamiast wody) roztworu wzorcowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, w którym stężenia S,S-EBDM i S,S-DEB wynosiły odpowiednio $20,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ i $10,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$ oraz $1000,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ i $500,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$ (95:5, v/v). W konsekwencji do warstwy organicznej wprowadzono 5 μl roztworu analitów o stężeniu 10-krotnie wyższym niż w odpowiadających próbkach serii I, co pozwoliło uzyskać tę samą ilość analizowanych związków w próbkach obu serii. Kolejne etapy przygotowania próbek serii II przebiegały zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.4. Odzysk obliczono z równania:

$$\text{odzysk [\%]} = P^I_{S,S-EBDM(S,S-DEB)/IS2} / P^{II}_{S,S-EBDM(S,S-DEB)/IS2} \cdot 100\%,$$

gdzie: $P^I_{S,S-EBDM(S,S-DEB)/IS2}$ i $P^{II}_{S,S-EBDM(S,S-DEB)/IS2}$ – stosunek pola powierzchni piku głównego produktu derywatywacji S,S-EBDM lub S,S-DEB do pola powierzchni piku IS2 uzyskany odpowiednio w serii I i II.

9.3.6. Testy stabilności

a) Trwałość roztworu podstawowego

Trwałość roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oceniono w trakcie jego przechowywania w temperaturze 4 °C. W tym celu próbki roztworu (n = 3) poddano analizie metodą HPLC-RID natychmiast po jego przygotowaniu oraz po upływie 1, 2, 3 i 7 dni, zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.1.

b) Test stabilności krótkoterminowej w temperaturze pokojowej (*short-term temperature stability*), test zamrażania – rozmrażania (*freeze-thaw stability*) i test stabilności długoterminowej (*long-term stability*)

Trwałość TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB zbadano w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym. W tym celu 1 ml roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (nominalne stężenia analitów odpowiednio $5000,0 \cdot f_{S,S-TREO}$, $10000,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ i $5000,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$) lub roztworu wzorcowego (nominalne stężenia analitów odpowiednio $200,0 \cdot f_{S,S-TREO}$, $400,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$ i $200,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ $\mu\text{mol/l}$) zmieszano z 1 ml 0,146 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4 (przygotowanego jak bufor o stężeniu 0,0730 mol/l, z wyjątkiem użycia dwukrotnie mniejszej ilości wody) doprowadzonego do pH poniżej 5,0 za pomocą 200 μl 0,35 mol/l kwasu cytrynowego. W ten sposób w buforze fosforanowym o stężeniu 0,0730 mol/l uzyskano stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o nominalnych wartościach odpowiednio $2500,0 \cdot f_{S,S-TREO}$, $5000,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$, $2500,0 \cdot f_{S,S-DEB}$ oraz $100,0 \cdot f_{S,S-TREO}$, $200,0 \cdot f_{S,S-EBDM}$, $100,0 \cdot f_{S,S-DEB}$. Próbki obu roztworów poddano analizie HPLC-RID natychmiast po ich przygotowaniu oraz po: I) jednym cyklu zamrożenia – rozmrożenia i pozostawieniu przez 4 h w temperaturze pokojowej (*short-term temperature stability*); II) trzech cyklach zamrożenia – rozmrożenia (*freeze-thaw stability*); III) 3 i 135 dniach przechowywania w temperaturze -25 °C (*long-term stability*). W każdym teście I – III dla niskiego i wysokiego stężenia analitów w matrycy badano 3 niezależne próbki. Przygotowanie próbek do analizy HPLC przebiegało zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.1, z tym wyjątkiem, iż do 275 μl próbki dodano 25 μl wody i 25 μl roztworu IS1. Stężenia analitów obliczono, korzystając z równań odpowiednich krzywych wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB.

10. Metodyka badań kinetycznych

10.1. Warunki prowadzenia aktywacji TREO

a) w buforach fosforanowych

Do fiolek o pojemności 24 ml odmierzone odpowiednią objętość buforu (Tabela 6) i umieszczono je w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C. Następnie do fiolek dodano odpowiednią objętość 0,15 mol/l roztworu TREO, uzyskując początkowe stężenie proleku 0,5 lub 2,5 mmol/l, dostosowane do pojemności buforowej roztworu celem zapewnienia stałej wartości pH $7,40 \pm 0,05$. Próbkki roztworów o objętości 300 μ l pobierano w 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 52 i 56 h do 1,5 ml probówek typu easy-cap zawierających 30 μ l kwasu cytrynowego o odpowiednim stężeniu i poddawano natychmiast analizie HPLC-RID (pkt. 10.3).

Tabela 6. Sposób przygotowania roztworów TREO w buforach fosforanowych o pH 7,4 do badań kinetycznych i analizy HPLC-RID

Stężenie buforu (siła jonowa) [mol/l]	n	Objętość buforu odmierzona do fiolek [ml]	Objętość 0,15 mol/l TREO wprowadzona do buforu [μ l]	Uzyskane początkowe stężenie TREO w buforze [mmol/l]	Stężenie kwasu cytrynowego użytego do regulacji pH pobranej próbki buforu [mol/l]
0,0615 (0,16)	5	9,967	33,3	0,5	0,30
0,0730 (0,19)	5	9,967	33,3	0,5	0,35
0,369 (1,0)	3	9,967	33,3	0,5	1,75
0,369 (1,0)	3	9,833	166,7	2,5	1,75
0,0615 (1,0)*	3	9,967	33,3	0,5	0,30

* zwiększoną siłę jonową 0,0615 mol/l buforu fosforanowego uzyskano przez dodanie NaCl.

b) w buforze PBS

Reakcję przemiany TREO do epoksytransformerów w buforze PBS (n = 5) badano z wykorzystaniem automatycznego titratora DL50 pracującego w trybie pH-stat. W tym celu 150 ml zlewkę zawierającą 99,33 ml buforu PBS umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C. Zawartość zlewki była w sposób ciągły mieszana za pomocą mieszadła magnetycznego z szybkością 150 obr./min. Elementy robocze titratora, tj. elektroda zespolona DG101, biureta i czujnik temperatury, wprowadzone były do zlewki przez ściśle przylegającą warstwę parafilmu, aby zapobiec parowaniu roztworu na zewnątrz naczynia. W czasie t = 0, do roztworu PBS dodano 667 μ l 0,15 mol/l roztworu TREO, uzyskując początkowe stężenie

proleku równe 1 mmol/l. Utrzymanie stałej wartości pH $7,40 \pm 0,02$ i siły jonowej, mimo uwalniania się kwasu metanosulfonowego podczas aktywacji TREO, uzyskano przez titrację badanego roztworu za pomocą 0,025 mol/l roztworu NaOH o sile jonowej 0,16 mol/l (pkt. 8.3). Przebieg procesu kontrolowano przy użyciu programu LabX (Mettler-Toledo, Zurich, Szwajcaria). Próbkę roztworu PBS o objętości 300 μ l pobierano w 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 28, 32, 36, 40, 48, 52 i 56 h do 1,5 ml probówek typu easy-cap zawierających 30 μ l 0,05 mol/l kwasu cytrynowego, celem obniżenia pH próbki poniżej wartości 5,0 i uniknięcia dalszej aktywacji TREO. Zbierane próbki poddawano natychmiast analizie HPLC-RID, zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 10.3.

10.2. Warunki prowadzenia hydrolizy (\pm)-DEB

Hydrolizę samego (\pm)-DEB zbadano w buforach fosforanowych o stężeniu 0,0615 mol/l (siła jonowa 0,16 mol/l) i 0,369 mol/l (siła jonowa 1,0 mol/l) ($n = 3$) oraz w buforze PBS ($n = 5$). W tym celu fiołki o pojemności 24 ml, zawierające 9,933 ml danego buforu, termostatowano w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C. Do fiołek dodano następnie 66,7 μ l roztworu (\pm)-DEB o stężeniu 0,15 mol/l i wymieszano zawartość. Początkowe stężenie epoksydu w roztworze buforowym wynosiło 1 mmol/l. Próbkę roztworu do analizy HPLC-RID pobierano w 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32 i 40 h reakcji w sposób opisany w pkt. 10.1.

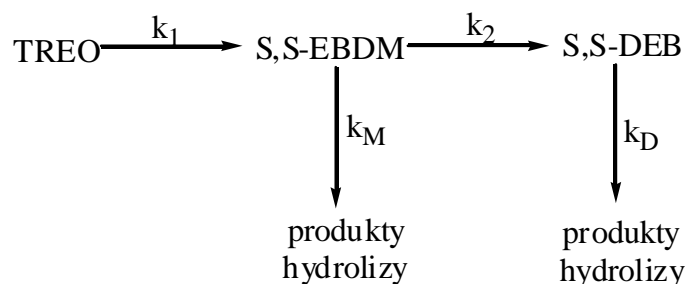
10.3. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w buforach fosforanowych i buforze PBS

Do probówek easy-cap o pojemności 1,5 ml odmierzono 275 μ l badanego roztworu (zawierającego 250 μ l roztworu buforowego z analizowanymi związkami i 25 μ l roztworu kwasu cytrynowego), dodano 250 μ l wody i 25 μ l roztworu IS1. Po wymieszaniu, 100 μ l otrzymanego roztworu nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Stężenia związków w buforach obliczono, korzystając z równań odpowiednich krzywych wzorcowych. W przypadku buforu PBS, w celu skompensowania zmian objętości badanego roztworu w czasie miareczkowania potencjometrycznego, uzyskane wartości stężeń analitów odpowiednio korygowano w oparciu o objętość zużytego NaOH oraz łączną objętość pobranych próbek roztworu PBS.

10.4. Metodyka obliczeń kinetycznych

10.4.1. Model transformacji TREO

Parametry kinetyczne transformacji TREO (stałe szybkości k oraz odpowiadające im czasy połowicznej przemiany $t_{0,5}$) obliczono zakładając model przemian przedstawiony na Ryc. 14.



Ryc. 14. Model reakcji aktywacji TREO i hydrolitycznego rozkładu jego epoksytransformerów; k_1 , k_2 , k_M , k_D – stałe szybkości odpowiednich reakcji.

Model ten uwzględnia dwie następcze reakcje następcze aktywacji TREO pierwszego rzędu, którym towarzyszą dwie równoległe reakcje hydrolitycznego rozkładu epoksytransformerów pseudopierwszego rzędu. Opierając się na opisanym modelu reakcji oraz zasadach kinetyki formalnej, wyprowadzono następujące równania różniczkowe opisujące zmiany stężeń poszczególnych związków w czasie:

$$-\frac{d[\text{TREO}]}{dt} = k_1 t$$

$$\frac{d[\text{S,S-EBDM}]}{dt} = k_1 [\text{TREO}] - (k_2 + k_M) [\text{S,S-EBDM}]$$

$$\frac{d[\text{S,S-DEB}]}{dt} = k_2 [\text{S,S-EBDM}] - k_D [\text{S,S-DEB}]$$

gdzie:

$[\text{TREO}]$, $[\text{S,S-EBDM}]$ i $[\text{S,S-DEB}]$ – stężenia molowe odpowiednio TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w czasie t ;

k_1 – stała szybkości reakcji $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-EBDM}$;

k_2 – stała szybkości reakcji $\text{S,S-EBDM} \rightarrow \text{S,S-DEB}$;

k_M – stała szybkości reakcji hydrolitycznego rozkładu S,S-EBDM;

k_D – stała szybkości reakcji hydrolitycznego rozkładu S,S-DEB.

Po rozwiązaniu powyższych równań różniczkowych, przy założeniu, że w chwili $t = 0$ w układzie reakcyjnym obecny jest tylko TREO o stężeniu początkowym $[\text{TREO}]_0$,

otrzymano następujące równania wykładnicze, opisujące stężenia analitów jako funkcję czasu:

$$[\text{TREO}] = [\text{TREO}]_0 e^{-k_1 t}$$

$$[\text{S,S-EBDM}] = \frac{k_1 [\text{TREO}]_0}{(k_2 + k_M) - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-(k_2 + k_M)t})$$

$$[\text{S,S-DEB}] = \frac{k_1 k_2 [\text{TREO}]_0}{(k_1 - k_D) [(k_2 + k_M) - k_1] [(k_2 + k_M) - k_D]} \times \\ \times \left\{ (k_1 - k_D) e^{-(k_2 + k_M)t} + [(k_2 + k_M) - k_1] e^{-k_D t} - [(k_2 + k_M) - k_D] e^{-k_1 t} \right\}$$

Wartości stałych $[\text{TREO}]_0$, k_1 , k_2 , k_M i k_D zostały obliczone przy pomocy programu Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) na podstawie stężeń TREO i jego epoksytransformerów oznaczonych w czasie aktywacji proleku (pkt. 10.1). Przebieg modelowych krzywych opisujących stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB jako funkcję czasu ustalono stosując regresję globalną, w której szukane stałe były wspólne dla wszystkich trzech badanych związków.

10.4.2. Ocena poprawności modelu kinetycznego

Ocenę dopasowania modelu kinetycznego do doświadczalnych stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB wykonano w programie Prism 6.01 przez:

- wizualną ocenę przebiegu krzywych najlepszego dopasowania oraz krzywych ufności 95% w stosunku do punktów doświadczalnych;
- wyznaczenie przedziałów ufności 95% dla stałych $[\text{TREO}]_0$, k_1 , k_2 , k_M , k_D , w celu oceny niepewności ich estymacji;
- statystyczne porównanie przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem nieuwzględniającym hydrolytycznego rozkładu S,S-EBDM ($k_M = 0$), z wykorzystaniem testu F;
- wyznaczenie współczynników determinacji R^2 , które wskazują, jaką część obserwowanej zmienności zmiennej zależnej (stężenia) wyjaśnia w przyjętym modelu zmienna niezależna (czas);
- test rozkładu normalnego wartości resztowych, tj. różnic między wartością doświadczalną (obserwowaną) i przewidywaną przez model, z wykorzystaniem testu D'Agostino-Pearson;

f) test rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (*runs test*), który wskazuje, czy krzywa najlepszego dopasowania przebiega pomiędzy punktami doświadczalnymi w sposób randomizowany bądź systematyczny.

10.4.3. Regresja liniowa $\ln C = f(t)$

Dla dodatkowego potwierdzenia prawidłowości obliczeń opartych na przyjętym modelu kinetycznym i nieliniowej regresji globalnej (pkt. 10.4.1), wykonano niezależne obliczenia wybranych stałych z użyciem liniowej regresji semilogarytmicznej w programie Microsoft Excel 2007. W tym celu logarytmy naturalne oznaczonych stężeń TREO (pkt. 10.1) oraz (\pm)-DEB (pkt. 10.2) przedstawiono jako liniową funkcję czasu, dla której wyznaczono bezwzględną wartość współczynnika kierunkowego. Uzyskane w ten sposób stałe szybkości reakcji TREO \rightarrow S,S-EBDM i hydrolizy (\pm)-DEB, odpowiednio $k_{1 \text{ lin}}$ i $k_{D \text{ lin}}$, porównano ze stałymi k_1 i k_D obliczonymi w pkt. 10.4.1.

11. Metodyka wyznaczania P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów*

11.1. Wstępne oszacowanie $\log P_{OW}$, pK_a i powierzchni cząsteczki na podstawie struktury związków

Teoretyczne wartości $\log P_{OW}$ dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB zostały obliczone z wykorzystaniem różnych algorytmów komputerowych, bazujących zarówno na addytywnych udziałach atomów i fragmentów cząsteczki, jak i analizie topologicznej całej cząsteczki. Do powyższych obliczeń wykorzystano aplikację ALOGPs 2.1, dostępną na stronie internetowej www.vcclab.org/lab/alogs. Dodatkowo oszacowano wartości pK_a i powierzchnię cząsteczek badanych związków, stosując oprogramowanie Marvin Sketch 5.10.2 (ChemAxon Ltd.), dostępne na stronie internetowej www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php.

11.2. Metoda wytrząsania

Wartości P_{OW} TREO i jego epoksy pochodnych zostały wyznaczone klasyczną metodą wytrząsania (*shake flask method*), opartą głównie na aktualnych wytycznych Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) [123]. Fazę wodną układu, w którym badano podział związków, stanowił bufor ABS o pH 4,4 (pkt. 7.2), a rolę fazy niepolarniej pełnił n-oktanol wysycony fazą wodną. Badania P_{OW} przeprowadzono w temperaturze 37 °C, aby odzwierciedlić zachowanie związków w warunkach fizjologicznych.

11.2.1. Przygotowanie układu n-oktanol/ABS

Wysycony fazą wodną n-oktanol otrzymano przez jego wytrząsanie z buforem ABS w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C przez 24 h. Fazę wodną zawierającą badane związki, przygotowano przez zmieszanie roztworu wzorcowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, roztworu wzorcowego samego TREO lub roztworu wzorcowego samego (\pm)-DEB o odpowiednim stężeniu analitów z koncentratem buforu ABS (pkt. 7.1) w stosunku objętościowym 1:1. W ten sposób uzyskano 2-krotnie rozcieńczony roztwór badanych związków w buforze ABS o pH 4,4. Następnie do szklanych fiolek o pojemności 24 ml odmierzono 20 ml n-oktanolu wysyconego buforem ABS oraz odpowiednią objętość buforu ABS zawierającego anality. Szczelnie zakręcone fioleki zanurzone całkowicie w pozycji poziomej w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C z wytrząsaniem (amplituda 9 cm,

* Opis metodyki oraz wyniki wyznaczania P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów zostały opublikowane w lutym br. w J Chromatogr B 2013, 923-924, 92-97.

100 cykli/min). Zastosowane stężenia analitów w fazie wodnej, objętość fazy wodnej oraz czas wytrząsania sprecyzowano w dalszym opisie metodyki. Po zakończeniu wytrząsania, fiolki wirowano przez 5 min z przyspieszeniem $1620 \times g$ w celu uzyskania lepszego rozdziału faz. Górną warstwę n-oktanolową usuwano za pomocą pipety, zaś fazę wodną przenoszono do 1,5 ml probówek typu easy-cap. Początkowe stężenia analitów w fazie wodnej, tj. przed zmieszaniem jej z n-oktanołem, oraz stężenia w stanie równowagi podziału oznaczano metodą HPLC-RID.

11.2.2. Ustalanie czasu osiągnięcia równowagi w układzie n-oktanol/ABS

W badaniach wstępnych określono czas niezbędny do ustalenia się równowagi podziału TREO i jego epoksytransformerów w układzie n-oktanol/ABS. Próbkę do tego badania przygotowano według procedury opisanej w punkcie 11.2.1, stosując 20 ml n-oktanolu i 1 ml ABS oraz początkowe stężenia analitów w buforze ABS wynoszące kolejno: TREO – $2500,0 \cdot f_{\text{TREO}}$, S,S-EBDM – $5000,0 \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$ i S,S-DEB – $2500,0 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}$ $\mu\text{mol/l}$. Przygotowane próbki wytrząsano w łaźni wodnej przez 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 h.

11.2.3. Ocena trwałości związków w układzie n-oktanol/ABS

W ramach badań wstępnych, oceniono również trwałość TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w stosowanym układzie faz w czasie 6 h. Próbkę do badań przygotowano jak w pkt. 11.2.2. i wytrząsano przez 2, 3, 4, 5 i 6 h ($n = 2$).

11.2.4. Warunki wyznaczania P_{OW}

P_{OW} wyznaczano w 6 seriach oznaczeń, w których zastosowano różne stosunki objętościowe n-oktanolu i buforu ABS oraz różne początkowe stężenia TREO i epoksytransformerów w fazie wodnej (Tabela 7). Celem takiego postępowania była doświadczalna weryfikacja możliwych odchyłeń od prawa podziału Nernsta, spowodowanych potencjalną dysocjacją badanych związków w fazie wodnej lub ich asocjacją w fazie n-oktanolowej. W serii I oznaczeń stosunek objętościowy faz n-oktanol : ABS wynosił 20:1. W serii II wyjściowy stosunek objętościowy został 2-krotnie zwiększony, a w serii III 2-krotnie zmniejszony. W serii IV początkowe stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w fazie wodnej były 2-krotnie mniejsze niż w serii I. Dodatkowo, celem potwierdzenia, iż współobecność innych analitów w układzie (serie I – IV) nie wpływa na wyniki badań P_{OW}

konkretnego związku, wykonano dwie serie oznaczeń, w których zamiast roztworu TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, użyto roztworu samego TREO (seria V) oraz roztworu samego (\pm)-DEB (seria VI), każdy o stężeniu 5000 $\mu\text{mol/l}$. Wszystkie badane serie składały się z pięciu prób przygotowanych zgodnie z ogólną procedurą opisaną w pkt. 11.2.1 i wytrząsanych przez optymalny czas 2 h, wystarczający do uzyskania równowagowych stężeń analitów.

Tabela 7. Skład badanych układów n-oktanol/bufor ABS

Seria (n = 5)	n-Oktaanol : bufor ABS (ml/ml)	Początkowe nominalne stężenie w buforze ABS [$\mu\text{mol/l}$]		
		TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB
I	20,0 : 1,0	$2500 \cdot f_{\text{TREO}}$	$5000 \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$	$2500 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}$
II	20,0 : 0,5	$2500 \cdot f_{\text{TREO}}$	$5000 \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$	$2500 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}$
III	20,0 : 2,0	$2500 \cdot f_{\text{TREO}}$	$5000 \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$	$2500 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}$
IV	20,0 : 1,0	$1250 \cdot f_{\text{TREO}}$	$2500 \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$	$1250 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}$
V	20,0 : 1,0	2500	–	–
VI	20,0 : 1,0	–	–	2500

11.3. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w buforze ABS

W celu oznaczenia stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB w badanych próbach fazy wodnej, wykorzystano metodę HPLC-RID. Do probówek typu easy-cap o pojemności 1,5 ml odmierzano 250 μl buforu ABS zawierającego anality, 250 μl wody i 25 μl IS1. Próby mieszano i objętość 100 μl nastrzykiwano dwukrotnie na kolumnę chromatograficzną.

11.4. Metodyka obliczeń P_{OW}

Początkowe stężenia analitów w buforze ABS przed jego zmieszaniem z n-oktanołem oraz stężenia w stanie równowagi podziału obliczono jako średnią z dwóch nastrzyków pojedynczej próby, wykorzystując odpowiednie równania krzywych wzorcowych dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB. Wartości P_{OW} dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obliczono według następującego wzoru:

$$P_{\text{OW}} = \frac{C_0 - C_w}{C_w} \cdot \frac{V_w}{V_{\text{okt}}}$$

gdzie: P_{OW} – współczynnik podziału n-oktanol/woda, C_0 – początkowe stężenie analitu w fazie wodnej [$\mu\text{mol/l}$], C_w – stężenie analitu w fazie wodnej w stanie równowagi podziału [$\mu\text{mol/l}$], V_w – objętość fazy wodnej [ml], V_{ok} – stała objętość n-oktanolu (20 ml).

Średnie i odchylenia standardowe wartości P_{OW} związków, uzyskane zarówno w poszczególnych seriach oznaczeń I – VI ($n = 5$), jak i dla wszystkich serii łącznie ($n = 25$ dla TREO i S,S-DEB oraz $n = 20$ dla S,S-EBDM), obliczono w programie Microsoft Excel 2007. Dodatkowo, dla każdego związku wyznaczono średnią wartość $\log P_{OW}$ oraz jego odchylenie standardowe, zgodnie ze wzorami:

$$\text{Średnia } \log P_{OW} = \log(\text{Średnia } P_{OW})$$

$$SD \log P_{OW} = SD P_{OW} / (\ln 10 \times \text{Średnia } P_{OW}).$$

12. Metodyka badań farmakokinetycznych

12.1. Procedura wykonania doświadczeń na zwierzętach

12.1.1. Podawanie roztworów badanych związków i pobieranie krwi

Doświadczenia na królikach wykonano po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (Załącznik 2). Do badań zakwalifikowano 15 dorosłych osobników rasy *Nowozelandzkiej Białej* obojga płci, podzielonych losowo na trzy równoliczne grupy. Masa królików w grupie I, II i III wynosiła odpowiednio $4,3 \pm 0,1$, $4,2 \pm 0,2$ i $4,3 \pm 0,7$ kg. W okresie 12 godzin poprzedzających badanie zwierzęta nie otrzymywały pokarmu. Kilka minut przed rozpoczęciem doświadczeń królikom podawano dożylnie lek przeciwwymiotny Ondansetron Kabi w ilości 1 ml (2 mg ondansetronu).

Tabela 8. Dawki TREO i jego epoksytransformerów podane królikom w formie dożylnego wlewu lub bolusa

Grupa	Nr królika	Masa królika [kg]	Dawka [mg]
I podanie TREO 340 mg/kg 15 min wlew dożylny	1	4,4	1496
	2	4,3	1462
	3	4,2	1428
	4	4,2	1428
	5	4,2	1428
II podanie (\pm)-DEB 50 mg/kg bolus dożylny	6	4,3	215
	7	4,2	210
	8	4,3	215
	9	3,8	190
III podanie S,S-EBDM 16 mg/kg [*] bolus dożylny	10	4,2	210
	11	4,1	66
	12	4,0	64
	13	3,4	54
	14	4,9	78
	15	5,2	83

^{*} S,S-EBDM podano w formie mieszaniny z TREO i S,S-DEB, uzyskanej przez alkalizację roztworu TREO za pomocą NaOH.

W celu oceny farmakokinetyki TREO i jego epoksytransformerów, zwierzętom podawano dożylnie roztwory zawierające TREO i/lub jego epoksypochodne (Tabela 8):

I grupa – wlew dożylny TREO

Przygotowano 40 mg/ml roztwór TREO w jałowym 0,45% roztworze NaCl (woda do wstrzyknięć : 0,9% NaCl 1:1, v/v), co pozwoliło osiągnąć osmotyczność roztworu porównywalną do osocza (~ 300 mOsmol/kg). W ciągu jednej godziny od przygotowania, roztwór TREO podawano królikom w objętości 8,5 ml/kg m.c. w postaci 15 minutowego wlewu do żyły brzeżnej prawego ucha. Dawka leku wynosiła 340 mg/kg m.c. (1,22 mmol/kg m.c.). Próbki krwi o objętości 3 ml pobierano strzykawką z kaniuli wprowadzonej do tętnicy usznej lewego ucha, do probówek zawierających 150 μ l roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l, w celu doprowadzenia krwi do pH poniżej 5,0 i uniknięcia dalszej aktywacji TREO oraz zahamowania procesu krzepnięcia. Pobraną ilość krwi uzupełniano 3 ml jałowego 0,9% roztworu NaCl. Próbki pobierano po zakończeniu wlewu w punktach czasowych 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 4, 5 i 6 h. Zebrane próbki wirowano przez 10 min z przyspieszeniem $4500 \times g$ w celu uzyskania osocza, które zamrażano w temperaturze $-25^{\circ}C$ i po upływie maksymalnie 7 godzin poddawano analizie HPLC.

II grupa – bolus dożylny (\pm)-DEB

Przygotowano 50 mg/ml roztwór (\pm)-DEB w jałowym 0,9% NaCl. W ciągu jednej godziny od przygotowania roztwór ten podawano królikom w objętości 1 ml/kg m.c. w postaci dożylnego bolusa do żyły brzeżnej prawego ucha. Dawka (\pm)-DEB wynosiła 50 mg/kg m.c. (0,58 mmol/kg m.c.). Próbki krwi pobierano w następujących punktach czasowych: 0, 2, 4, 8, 12, 16 i 20 min.

III grupa – bolus dożylny mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB

S,S-EBDM nie jest związkiem komercyjnie dostępnym, stąd został on podany królikom w postaci mieszaniny otrzymanej przez alkalizację TREO. W tym celu do 10 ml kolby miarowej odważono 0,4174 g TREO (1,5 mmol), rozpuszczono w 8 ml wody do wstrzyknięć, a następnie stopniowo dodawano 1,5 ml roztworu NaOH o stężeniu 1 mol/l (1,5 mmol) i uzupełniono wodą do wstrzyknięć do kreski. W 20 μ l próbce przygotowanego roztworu (po jej 20-krotnym rozcieńczeniu wodą) oznaczano każdorazowo stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB metodą HPLC-RID, zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 9.2.1 i końcowy wynik obliczano jako średnią z trzech nstrzyków. Na tej podstawie obliczano

dokładną dawkę S,S-EBDM podaną królikom (Tabela 8). Stężenia analitów w pięciu przygotowanych roztworach wynosiły: TREO $50,3 \pm 2,6$ mmol/l, S,S-EBDM $43,8 \pm 2,0$ mmol/l, S,S-DEB $47,8 \pm 2,0$ mmol/l. Otrzymane roztwory posiadały pH ~ 5 i ciśnienie osmotyczne ~ 400 mOsmol/kg. W ciągu 1 godziny od przygotowania roztwory podawano królikom w objętości 2 ml/kg m.c. w postaci dożylnego bolusa do żyły brzeżnej prawego ucha. Dawka S,S-EBDM wynosiła $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c. ($0,088 \pm 0,004$ mmol/kg m.c.). Próbkę krwi pobierano w następujących punktach czasowych: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 30, 60 i 90 min.

Po podaniu królikom grupy III mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, na ilość S,S-EBDM w ustroju składała się dawka tego epoksydu wprowadzona w bolusie oraz pula powstała *in vivo* w wyniku aktywacji TREO. Aby obliczyć stężenia S,S-EBDM w osoczu królików grupy III odpowiadające wyłącznie dawkom związku przedstawionym w Tabeli 8, należało więc określić, jakie stężenia S,S-EBDM w osoczu generuje współobecność TREO w podanej mieszaninie. W tym celu dodatkowemu królikowi (królik nr 16) podano 50 mmol/l roztwór TREO w jałowym 0,9% NaCl drogą dożylnego bolusa w ilości 2 ml/kg. W konsekwencji wprowadzona dawka TREO była identyczna jak w przypadku podania mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB królikom z grupy III. Próbkę krwi pobierano w następujących punktach czasowych: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 30, 60 i 90 min.

12.1.2. Pobieranie cieczy wodnistej oka

Ciecz wodnistą oka pobierano od każdego królika z grupy I i III w dwóch wybranych punktach czasowych, odpowiadających zbiorce próbek krwi. Około 10 min przed planowanym pobraniem, królika wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego, poprzez domięśniowe podanie ketaminy w dawce 50 mg/kg m.c. oraz ksylazyny w dawce 10 mg/kg m.c. Ciecz wodnistą pobierano w objętości ok. 0,3 ml z komory przedniej oka przy użyciu strzykawek insulinowych, przenoszono do 1,5 ml probówek easy-cap i natychmiast doprowadzano do pH poniżej 5,0 za pomocą 1 mol/l roztworu kwasu cytrynowego (50 μ l/1 ml cieczy wodnistej). Próbkę następnie zamrażano w temperaturze -25 °C i po upływie maksymalnie 7 godzin poddawano analizie HPLC.

12.2. Analiza ilościowa TREO i jego epoksytransformerów w osoczu i cieczy wodnistej oka królików

Stężenia TREO w osoczu i cieczy wodnistej oznaczano za pomocą metody HPLC-RID. Do probówek Amicon Ultra-0,5 mL odmierzono 315 μ l analizowanego osocza (zawierającego 300 μ l czystego osocza króliczego i 15 μ l roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l), dodano 30 μ l wody i 30 μ l roztworu IS1. Następnie próbki przygotowano według procedury opisanej w pkt. 9.2.3. Stężenia TREO w osoczu obliczono korzystając z równania krzywej wzorcowej TREO. W celu oznaczenia leku w cieczy wodnistej, do 1,5 ml probówek easy-cap odmierzono 105 μ l cieczy zawierającej kwas cytrynowy, 20 μ l wody i 20 μ l roztworu IS1. Po wymieszaniu otrzymany roztwór nastrzykiwano na kolumnę HPLC w objętości 100 μ l. Stężenia TREO obliczono korzystając z równania krzywej wzorcowej uzyskanej dla osocza, stosując następującą korektę: stężenie TREO w cieczy wodnistej = $2 \times$ stężenie obliczone z krzywej wzorcowej TREO w osoczu.

Do oznaczania S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB w próbkach biologicznych uzyskanych od królików stosowano metodę HPLC-UV. Do fiolek o pojemności 24 ml odmierzono 525 μ l analizowanego osocza (zawierającego 500 μ l czystego osocza króliczego i 25 μ l roztworu kwasu cytrynowego o stężeniu 1 mol/l) i dodano 50 μ l wody. Następnie próbki przygotowano według procedury opisanej w pkt. 9.2.4. Stężenia epoksydów w osoczu obliczono z równań odpowiednich krzywych wzorcowych dla S,S-EBDM i S,S-DEB. W przypadku analizy S,S-EBDM w osoczu królików z grupy III korygowane stężenie analitu obliczono ze wzoru:

$$C_k^{11-15} = C_{ozn}^{11-15} - C_{ozn}^{16}$$

gdzie: C_k^{11-15} – korygowane stężenie S,S-EBDM w osoczu królika nr 11-15, C_{ozn}^{11-15} i C_{ozn}^{16} – oznaczone stężenie S,S-EBDM w osoczu odpowiednio królika nr 11-15 i królika nr 16. W celu oznaczenia epoksytransformerów TREO w cieczy wodnistej, do fiolek odmierzono 157,5 μ l cieczy zawierającej kwas cytrynowy oraz 50 μ l wody i postępowano dalej jak w przypadku osocza. Stężenia S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB w cieczy wodnistej obliczono korzystając z równań odpowiednich krzywych wzorcowych uzyskanych dla osocza, stosując następującą korektę: stężenie epoksytransformerów w cieczy wodnistej = $3,333 \times$ stężenie obliczone z krzywych wzorcowych epoksytransformerów w osoczu.

12.3. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych

12.3.1. Farmakokinetyka TREO i jego epoksytransformerów

Parametry farmakokinetyczne TREO i jego epoksytransformerów obliczono na podstawie uzyskanych profili zmian stężeń analitów w osoczu króliczym, korzystając z programu komputerowego WinNonlin 6.2 (Phoenix, Pharsight Ltd). Stosując metodę ważenia $1/y^2$, przeprowadzono dopasowanie doświadczalnych stężeń analitów do stężeń teoretycznych, przewidywanych zgodnie z modelem jedno- i dwukompartментowym. Wyboru optymalnego modelu dokonano w oparciu o wartość ważonego współczynnika korelacji i wyniki testów statystycznych (test Akaike i test Schwartz).

12.3.2. Ocena dystrybucji TREO i jego epoksytransformerów do cieczy wodnistej oka

Dla oceny dystrybucji TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB do cieczy wodnistej oka u królików z grup I i III wyznaczono wartości C_{max} i t_{max} . Wartości C_{max} i t_{max} odczytano bezpośrednio z wykresów przedstawiających stężenia analitów w cieczy wodnistej jako funkcję czasu. Dla oceny stopnia przenikania związków przez barierę krew – oko obliczono stosunek wartości C_{max} danego związku obserwowane w cieczy wodnistej oka i osoczu.

13. Analiza statystyczna wyników

Wyniki uzyskane w badaniach kinetycznych, farmakokinetycznych i analizie P_{ow} poddano ocenie statystycznej za pomocą programu Statistica 10 (StatSoft Inc., USA). Zgodność rozkładu wartości badanych zmiennych (stałe szybkości reakcji składających się na transformację TREO w różnych roztworach buforowych, wartości P_{ow} otrzymane w seriach oznaczeń I – VI, wybrane parametry farmakokinetyczne TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB u królików z grup I – III) z rozkładem normalnym oceniono testem Shapiro – Wilka. Jednorodność wariancji analizowanej zmiennej w porównywanych grupach zbadano testem Levene'a, a w przypadku grup o różnej liczebności testem Browna – Forsythe'a. Test Shapiro – Wilka wykazał rozkład normalny zmiennych we wszystkich badanych grupach z wyjątkiem jednej. Dodatkowo w większości porównywanych ze sobą grup zmiennych o rozkładzie normalnym stwierdzono istnienie jednorodności wariancji cechy. Z tej przyczyny do statystycznej oceny różnic między grupami zmiennych o rozkładzie normalnym zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Jest ona testem parametrycznym, służącym do porównania średnich uzyskanych w dwóch lub większej ilości grup, stosunkowo odpornym na brak homogeniczności wariancji badanej cechy. W wypadku stwierdzenia istotnych różnic zmiennej analizowanej w trzech lub większej liczbie grup, przeprowadzono analizę post-hoc

za pomocą testu wielokrotnych porównań parami – testu Tukey’a, celem stwierdzenia, które konkretne grupy różnią się istotnie od siebie. W pojedynczym wspomnianym przypadku, gdy w jednej z dwóch porównywanych grup nie uzyskano rozkładu normalnego, porównanie wartości zmiennych przeprowadzono nieparametrycznym testem U Manna-Whitney’a. Wszystkie testy statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Istnienie znamienych statystycznie różnic pomiędzy wartościami badanych zmiennych stwierdzono, gdy $p < 0,05$.

V. WYNIKI

14. Metody HPLC-RID i HPLC-UV oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych, osoczu i cieczy wodnistej oka królików

14.1. Potwierdzenie tożsamości analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB

Chromatogramy HPLC-RID i HPLC-MS uzyskane podczas analizy roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, otrzymanego przez alkalizację wodnego roztworu TREO stechiometryczną ilością NaOH, przedstawiono odpowiednio na Ryc. 15a i b. Widma masowe na Ryc. 15c i d, zarejestrowane w czasach retencji S,S-EBDM i TREO, potwierdzają obecność intensywnych sygnałów adduktów sodowych powyższych dwóch związków.

14.2. Walidacja metod HPLC

14.2.1. Selektywność

a) metody HPLC-RID

Opracowane metody HPLC-RID oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych (bufory fosforanowe, bufor PBS i ABS) oraz oznaczania TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików zapewniły całkowity rozdział wszystkich analitów i wzorca wewnętrznego IS1 (paracetamolu) na kolumnie chromatograficznej (Ryc. 16 i 17). Obliczony współczynnik R_s każdorazowo przyjmował wartości $\geq 2,5$. Oprócz pików analitów i IS1 na uzyskanych chromatogramach obecny był intensywny negatywny pik pochodzący od samego nastrzyku (2,2 – 3,0 min), typowy dla detekcji RID, oraz piki generowane przez składniki matrycy (1,4 – 2,2 min oraz dodatkowo 3,0 – 5,0 min w przypadku osocza). Dodatkowe piki nie interferowały jednak z pikami TREO, S,S-EBDM, S,S-DEB i IS1, co pozwalało na selektywne oznaczanie badanych związków.

b) metoda HPLC-UV

Na chromatogramach uzyskanych podczas oznaczania epoksytransformerów TREO w osoczu i cieczy wodnistej (Ryc. 18) obecne były piki produktów derywatywacji S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB za pomocą 3-NBS oraz piki wzorca wewnętrznego IS2 (2,2'-DNBP) i odczynnika derywatyzującego (3-NBS). Nie obserwowano natomiast żadnych pików pochodzących od składników matrycy. Stosowana metoda HPLC-UV zapewniała prawie całkowity rozdział głównego produktu derywatywacji S,S-DEB/(\pm)-DEB od pobocznych

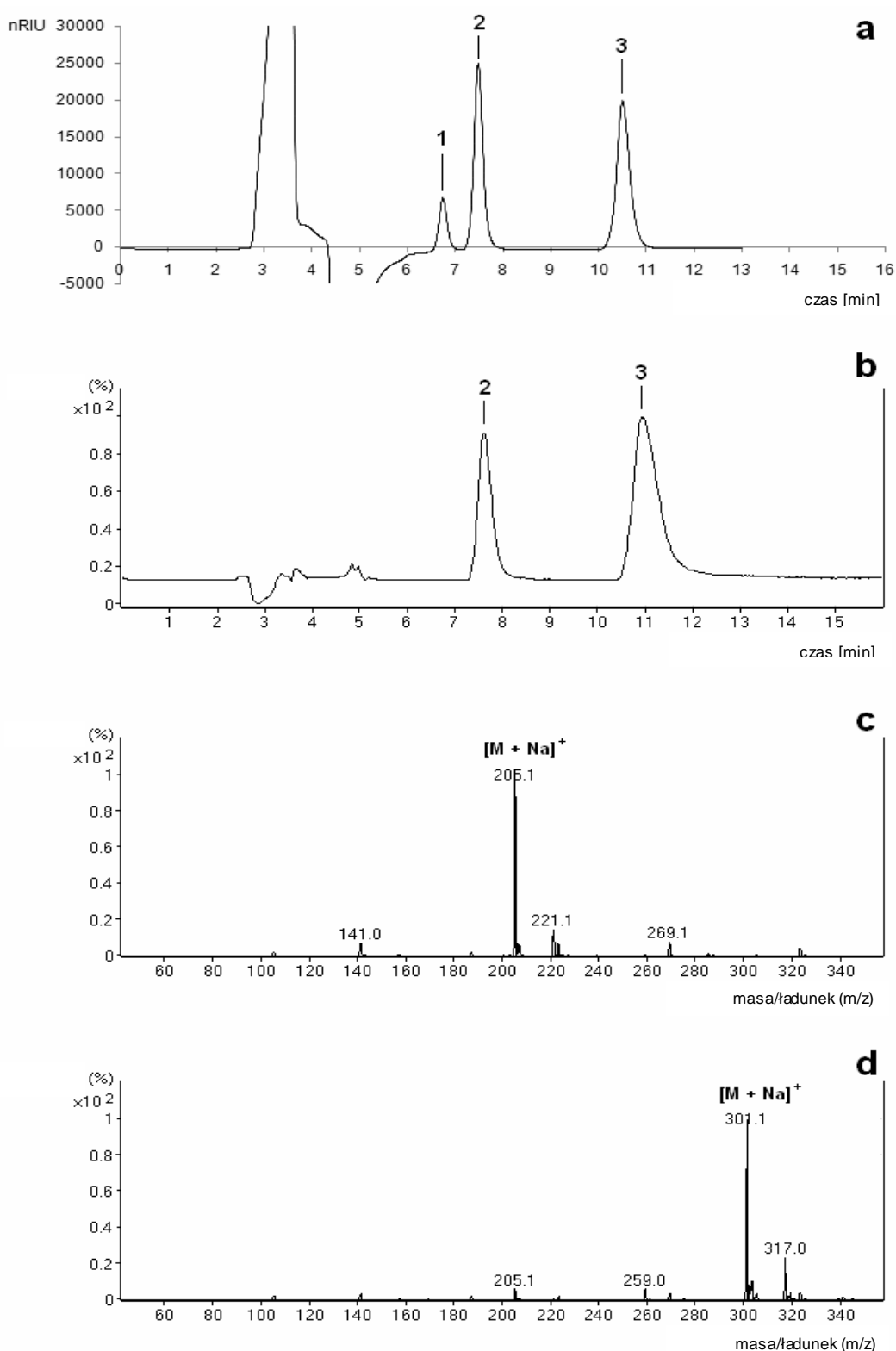
produktów reakcji (R_s 1,8 – 1,9). Rozdział głównego i pobocznego produktu derywatywacji S,S-EBDM był częściowy (R_s 1,4 – 1,5).

14.2.2. Liniowość

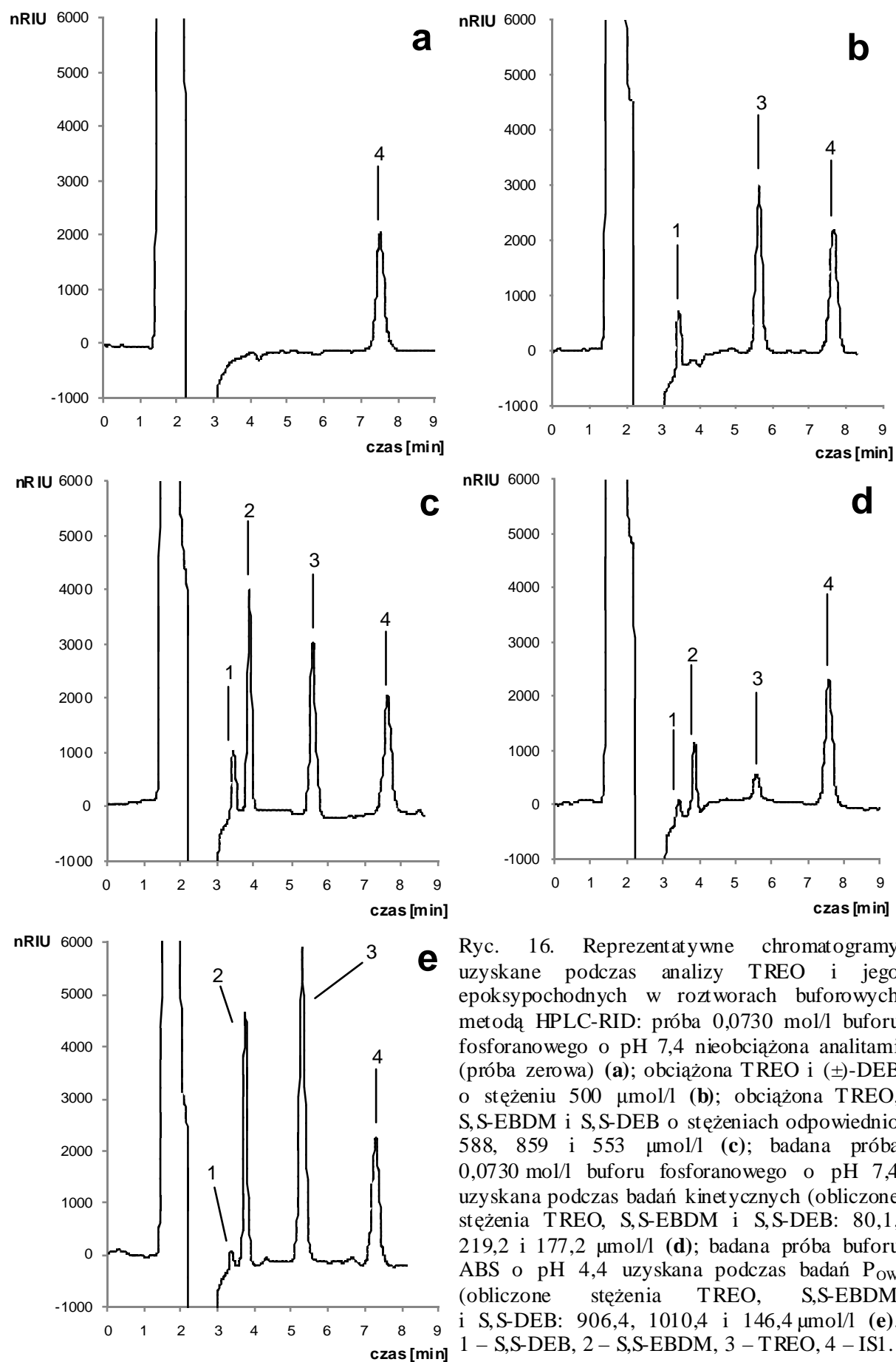
Zakresy stężeń i równania krzywych wzorcowych dla oznaczania TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w różnych matrycach za pomocą metod HPLC-RID i HPLC-UV przedstawiono w Tabeli 9. Przy pomocy testu t-Studenta stwierdzono, iż wartości współczynników regresji b uzyskanych prostych nie różniły się istotnie od zera, stąd wszystkie krzywe wzorcowe przyjęły postać $y = ax$ i przechodziły przez początek układu współrzędnych. Liniowość krzywych wzorcowych potwierdzono przy użyciu testu Mandela, w którym o liniowości świadczyła wartość testowa $TV < F_{kryt}$. Obliczono także współczynniki korelacji r , które każdorazowo wynosiły 0,9999. Wyznaczone równania krzywych wzorcowych wykorzystano do obliczenia stężeń TREO i jego epoksypochodnych w analizowanych próbkach roztworów buforowych, osoczu i cieczy wodnistej oka królików.

14.2.3. LOD i LOQ

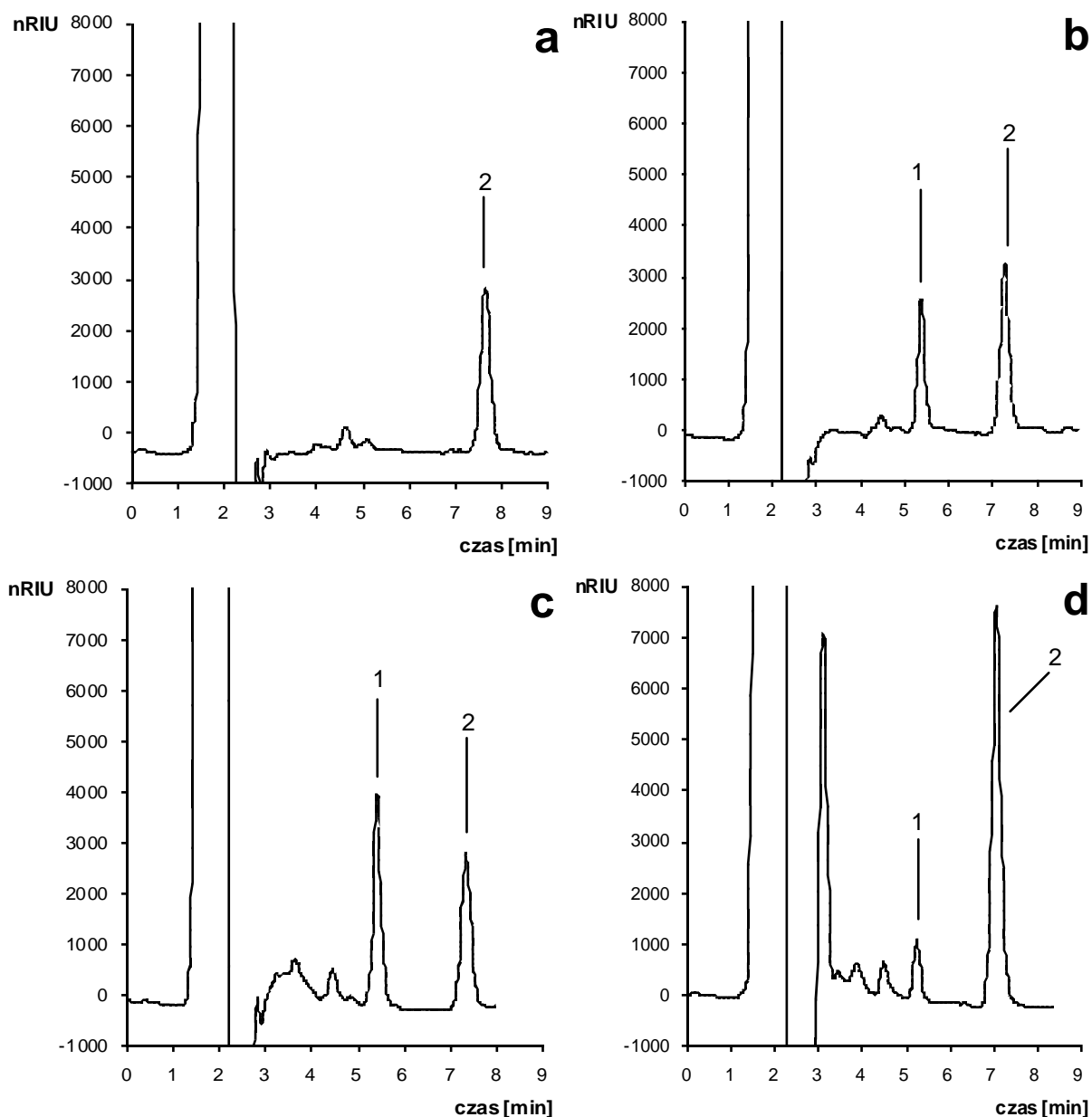
W opracowanych metodach HPLC-RID wartość LOD, wyznaczona przy stosunku sygnału do szumu linii podstawowej S/N równego przynajmniej 3:1, wynosiła 10,0 $\mu\text{mol/l}$ dla TREO, 17,2 lub 18,4 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-EBDM i 20,0 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-DEB (Tabela 10). Wartości LOQ były równe odpowiednio 20,0, 34,4 lub 36,8 i 50 $\mu\text{mol/l}$. W metodzie HPLC-UV oznaczania epoksytransformerów TREO w osoczu króliczym uzyskane LOD i LOQ były niższe i wynosiły odpowiednio 0,3 i 0,8 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-EBDM oraz 0,2 i 1,1 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-DEB (Tabela 10).



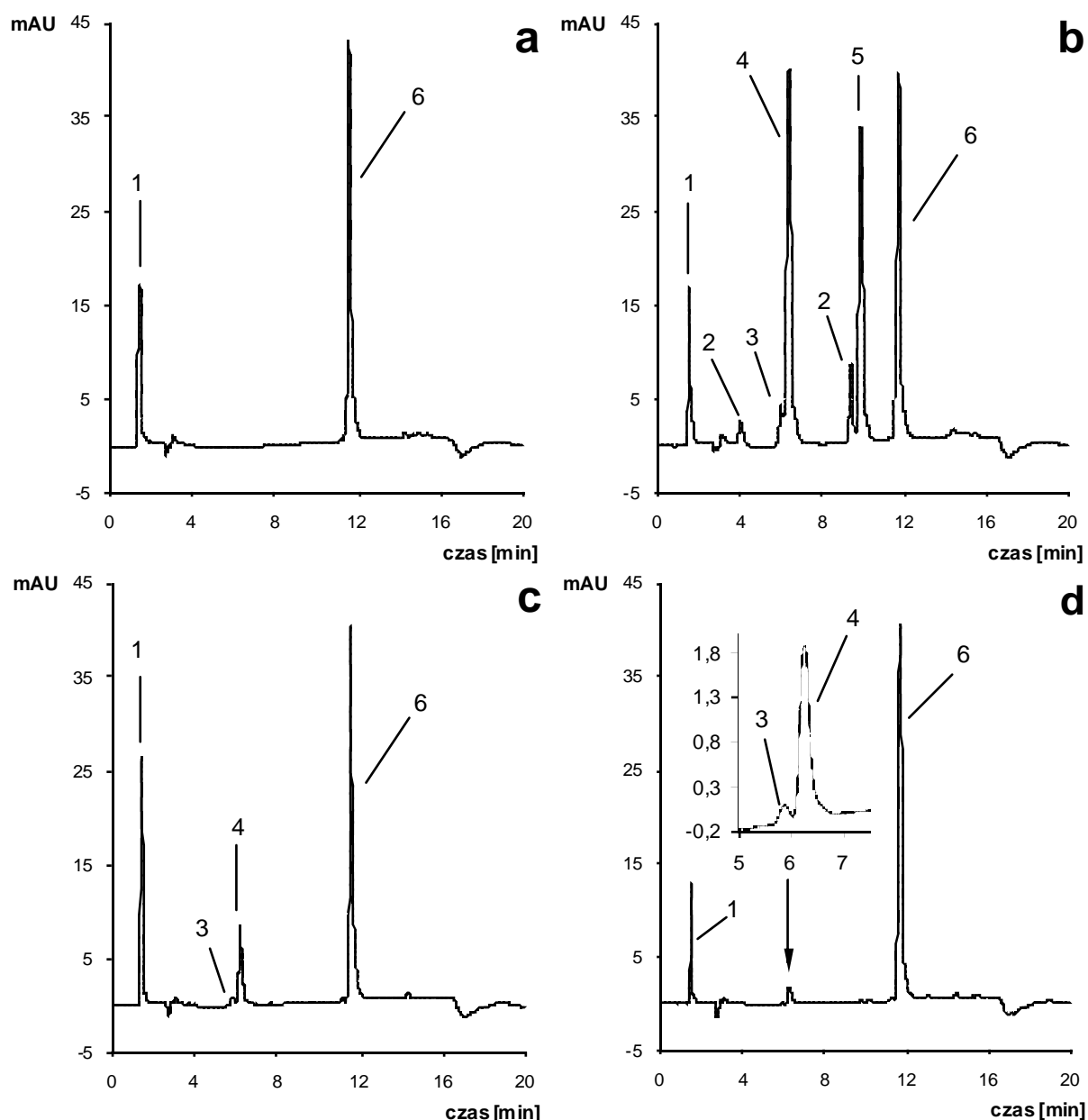
Ryc. 15. Chromatogramy i widma masowe uzyskane podczas analizy roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB metodą HPLC-RID i HPLC-MS przy przepływie fazy ruchomej 0,5 ml/min: **a** – chromatogram HPLC-RID; **b** – chromatogram HPLC-MS; **c** – widmo masowe S,S-EBDM ($[M + Na]^+$ – addukty sodowe S,S-EBDM, $m/z = 205,1$); **d** – widmo masowe TREO ($[M + Na]^+$ – addukty sodowe TREO, $m/z = 301,1$). W warunkach jonizacji typu elektrospray S,S-DEB nie był wykrywalny. 1 – S,S-DEB, 2 – S,S-EBDM, 3 – TREO.



Ryc. 16. Reprezentatywne chromatogramy uzyskane podczas analizy TREO i jego epoksy pochodnych w roztworach buforowych metodą HPLC-RID: próba 0,0730 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4 nieobciążona analitami (próba zerowa) (a); obciążona TREO i (\pm)-DEB o stężeniu 500 $\mu\text{mol/l}$ (b); obciążona TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o stężeniach odpowiednio 588, 859 i 553 $\mu\text{mol/l}$ (c); badana próba 0,0730 mol/l buforu fosforanowego o pH 7,4 uzyskana podczas badań kinetycznych (obliczone stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB: 80,1, 219,2 i 177,2 $\mu\text{mol/l}$) (d); badana próba buforu ABS o pH 4,4 uzyskana podczas badań P_{ow} (obliczone stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB: 906,4, 1010,4 i 146,4 $\mu\text{mol/l}$) (e). 1 – S,S-DEB, 2 – S,S-EBDM, 3 – TREO, 4 – ISI.



Ryc. 17. Chromatogramy uzyskane podczas analizy TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików metodą HPLC-RID: **a** – osocze nieobciążone analitem (próba zerowa); **b** – osocze obciążone TREO o stężeniu $250 \mu\text{mol/l}$; **c** – osocze badane uzyskane od królika w 2 h po zakończeniu wlewu TREO w dawce 340 mg/kg (stężenie oznaczone $435,7 \mu\text{mol/l}$); **d** – ciecz wodnista uzyskana od królika w 2 h po zakończeniu wlewu TREO w dawce 340 mg/kg (stężenie oznaczone $102,0 \mu\text{mol/l}$). 1 – TREO, 2 – IS1.



Ryc. 18. Chromatogramy uzyskane podczas analizy epoksytransformerów TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików metodą HPLC-UV: **a** – osocze nieobciążone analitami (próba zerowa); **b** – osocze obciążone S,S-EBDM o stężeniu 171,8 $\mu\text{mol/l}$ i S,S-DEB o stężeniu 110,5 $\mu\text{mol/l}$; **c** – osocze badane uzyskane od królika w 0,25 h po zakończeniu wlewu TREO w dawce 340 mg/kg (oznaczone stężenie S,S-EBDM 37,0 $\mu\text{mol/l}$, stężenie S,S-DEB < 1,1 $\mu\text{mol/l}$); **d** – ciecz wodnista uzyskana od królika w 1 h po zakończeniu wlewu TREO w dawce 340 mg/kg (oznaczone stężenie S,S-EBDM 47,0 $\mu\text{mol/l}$, stężenie S,S-DEB < 1,1 $\mu\text{mol/l}$). 1 – 3-NBS, 2 – poboczne produkty derywatywacji S,S-DEB i (\pm)-DEB, 3 – poboczny produkt derywatywacji S,S-EBDM, 4 – główny produkt derywatywacji S,S-EBDM, 5 – główny produkt derywatywacji S,S-DEB i (\pm)-DEB, 6 – IS2.

Tabela 9. Parametry krzywych wzorcowych dla TREO i jego epoksytransformerów

Analit	Zakres stężeń [μmol/l]	Równanie krzywej wzorcowej $y = (a \pm S_a) \cdot x$ (n = 5)	Współczynnik korelacji (r)	Test Mandela	
				TV	F _{kryt}
Oznaczenie TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 (metoda HPLC-RID)					
TREO	20,0 – 6000,0	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS1}} = (2,00411 \pm 0,00447) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{TREO}}$	0,9999	1,41	13,74
S,S-EBDM	34,4 – 8588,7	$P_{\text{S,S-EBDM}}/P_{\text{IS1}} = (1,20321 \pm 0,00092) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{S,S-EBDM}}$	0,9999	0,49	16,26
S,S-DEB	50,0 – 6000,0	$P_{\text{S,S-DEB}}/P_{\text{IS1}} = (4,90181 \pm 0,01529) \cdot 10^{-4} \cdot C_{\text{S,S-DEB}}$	0,9999	0,62	16,26
Oznaczenie TREO i jego epoksytransformerów w roztworze ABS o pH 4,4 (metoda HPLC-RID)					
TREO	20,0 – 6000,0	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS1}} = (2,08997 \pm 0,00152) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{TREO}}$	0,9999	1,83	13,74
S,S-EBDM	36,8 – 9203,5	$P_{\text{S,S-EBDM}}/P_{\text{IS1}} = (1,11020 \pm 0,00383) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{S,S-EBDM}}$	0,9999	12,74	16,26
S,S-DEB	50,0 – 6000,0	$P_{\text{S,S-DEB}}/P_{\text{IS1}} = (5,20938 \pm 0,00893) \cdot 10^{-4} \cdot C_{\text{S,S-DEB}}$	0,9999	4,32	16,26
Oznaczenie TREO w osoczu króliczym (metoda HPLC-RID)					
TREO	20,0 – 5000,0	$P_{\text{TREO}}/P_{\text{IS1}} = (2,40448 \pm 0,00770) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{TREO}}$	0,9999	0,98	16,26
Oznaczenie epoksytransformerów TREO w osoczu króliczym (metoda HPLC-UV)					
S,S-EBDM	0,8 – 858,9	$P_{\text{S,S-EBDM}}/P_{\text{IS2}} = (6,53105 \pm 0,01422) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{S,S-EBDM}}$	0,9999	1,90	12,25
S,S-DEB	1,1 – 552,7	$P_{\text{S,S-DEB}}/P_{\text{IS2}} = (7,78980 \pm 0,01140) \cdot 10^{-3} \cdot C_{\text{S,S-DEB}}$	0,9999	3,61	13,74

Tabela 10. Wartości LOD i LOQ dla oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych i osoczu króliczym

Analit	LOD	LOQ
Oznaczenie TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 (metoda HPLC-RID)		
TREO	10,0	20,0
S,S-EBDM	17,2	34,4
S,S-DEB	20,0	50,0
Oznaczenie TREO i jego epoksytransformerów w roztworze ABS o pH 4,4 (metoda HPLC-RID)		
TREO	10,0	20,0
S,S-EBDM	18,4	36,8
S,S-DEB	20,0	50,0
Oznaczenie TREO w osoczu króliczym (metoda HPLC-RID)		
TREO	10,0	20,0
Oznaczenie epoksytransformerów TREO w osoczu króliczym (metoda HPLC-UV)		
S,S-EBDM	0,3	0,8
S,S-DEB	0,2	1,1

14.2.4. Precyzja i dokładność

Wartości CV, opisujące precyzję oznaczeń TREO i produktów jego aktywacji w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, buforze ABS o pH 4,4 i osoczu króliczym mieściły się w zakresie 0,8 – 18,8%. Z kolei uzyskane wartości względnego błędu oznaczeń, charakteryzujące dokładność metod HPLC-RID i HPLC-UV, znajdowały się w zakresie 0,0 – 18,1%. Szczegółowe dane przedstawiono w Tabelach 11 – 13. Wyniki dokładności i precyzji oznaczeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w buforach fosforanowych o stężeniu 0,0615 i 0,369 mol/l oraz buforze PBS z wykorzystaniem krzywych wzorcowych zwalidowanych dla buforu fosforanowego o stężeniu 0,0730 mol/l zamieszczono w Tabelach 14 i 15.

Tabela 11. Precyzja i dokładność oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4 metodą HPLC-RID

Precyzja i dokładność	Stężenie nominalne [$\mu\text{mol/l}$]	Średnie stężenie oznaczone [$\mu\text{mol/l}$]	Precyzja (CV [%])	Dokładność (błąd [%])
TREO				
w ciągu dnia	2500,0	2554,0	2,5	2,2
	250,0	246,2	9,7	1,5
	20,0	17,1	11,8	14,7
między dniami	6000,0	5992,3	2,6	0,1
	5000,0	5028,9	3,1	0,6
	2500,0	2468,3	3,4	1,3
	1000,0	973,9	2,8	2,6
	500,0	511,4	1,7	2,3
	250,0	253,2	8,1	1,3
	100,0	102,3	4,2	2,3
	50,0	51,2	5,3	2,4
20,0	20,5	8,9	2,7	
S,S-EBDM				
w ciągu dnia	4294,3	4308,4	3,8	0,3
	429,4	407,0	3,2	5,2
	34,4	34,1	7,9	0,6
między dniami	8588,7	8586,5	3,8	0,0
	4294,3	4297,9	4,4	0,1
	1717,7	1714,0	2,0	0,2
	858,9	874,4	5,3	1,8
	429,4	419,1	5,7	2,4
	171,8	175,0	8,2	1,9
	85,9	86,5	5,6	0,7
34,4	36,2	12,6	5,3	

Tabela 11 (ciąg dalszy)

		S,S-DEB			
		2500,0	2542,4	4,2	1,7
w ciągu dnia		250,0	231,0	5,2	7,6
		50,0	47,8	8,9	4,3
		6000,0	6020,3	3,7	0,3
		5000,0	4954,2	3,7	0,9
		2500,0	2526,0	0,9	1,0
między dniami		1000,0	1034,0	5,7	3,4
		500,0	509,3	2,1	1,9
		250,0	262,7	3,0	5,1
		100,0	108,6	1,7	8,6
		50,0	47,5	10,6	5,0

n = 5

Tabela 12. Precyzja i dokładność oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w buforze ABS o pH 4,4 metodą HPLC-RID

Precyzja i dokładność	Stężenie nominalne [$\mu\text{mol/l}$]	Średnie stężenie oznaczone [$\mu\text{mol/l}$]	Precyzja (CV [%])	Dokładność (błąd [%])
TREO				
w ciągu dnia	2500,0	2382,3	1,7	4,7
	500,0	504,5	1,0	0,9
	50,0	52,4	2,2	4,8
	20,0	17,0	16,3	14,8
między dniami	6000,0	6000,2	2,4	0,0
	5000,0	4997,5	1,8	0,0
	2500,0	2507,9	3,5	0,3
	1000,0	994,0	1,7	0,6
	500,0	501,2	2,0	0,2
	250,0	239,1	4,5	4,4
	100,0	92,6	3,9	7,4
	50,0	47,5	8,3	5,1
	20,0	17,6	6,2	12,2
S,S-EBDM				
w ciągu dnia	4601,7	4573,2	0,8	0,6
	920,3	970,7	2,0	5,5
	92,0	86,0	10,9	6,6
	36,8	39,5	8,2	7,3
między dniami	9203,5	9161,2	5,7	0,5
	4601,8	4674,4	3,7	1,6
	1840,7	1844,9	3,8	0,2
	920,4	963,3	2,8	4,7
	460,2	472,3	1,4	2,6
	184,1	193,6	6,9	5,2
	92,0	95,3	7,7	3,5
	36,8	37,9	11,0	3,1

Tabela 12 (ciąg dalszy)

		S,S-DEB		
w ciągu dnia	2500,0	2370,1	1,1	5,2
	500,0	498,3	2,5	0,3
	100,0	105,7	9,3	5,7
	50,0	45,8	14,8	8,4
między dniami	6000,0	5975,0	3,9	0,4
	5000,0	5022,8	1,7	0,5
	2500,0	2510,3	4,8	0,4
	1000,0	1004,0	1,2	0,4
	500,0	511,8	2,7	2,4
	250,0	251,1	4,3	0,5
	100,0	98,7	3,9	1,3
	50,0	50,5	6,7	1,1

n = 5

Tabela 13. Precyzja i dokładność oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w osoczu króliczym

Precyzja i dokładność	Stężenie nominalne [μmol/l]	Średnie stężenie oznaczone [μmol/l]	Precyzja (CV [%])	Dokładność (błąd [%])
TREO (metoda HPLC-RID)				
w ciągu dnia	2500,0	2499,4	3,2	0,0
	250,0	239,0	2,5	4,4
	20,0	16,8	15,3	16,0
między dniami	5000,0	4990,6	1,4	0,2
	2500,0	2531,8	4,2	1,3
	1000,0	982,6	3,1	1,7
	500,0	469,9	3,9	6,0
	250,0	252,4	3,9	1,0
	100,0	96,8	1,8	3,1
	50,0	46,8	8,2	6,3
	20,0	18,3	18,8	8,5
S,S-EBDM (metoda HPLC-UV)				
w ciągu dnia	429,4	420,8	1,4	2,0
	42,9	44,8	1,3	4,3
	0,8	0,9	14,9	7,6
między dniami	858,9	857,9	4,9	0,1
	429,4	428,9	4,3	0,1
	171,8	177,2	2,4	3,1
	85,9	88,7	3,1	3,3
	42,9	44,5	2,9	3,5
	17,2	17,3	6,5	0,7
	8,6	8,8	5,0	2,5
	3,4	3,5	9,6	2,2
	1,7	1,9	8,4	9,3
	0,8	0,9	9,5	3,0

Tabela 13 (ciąg dalszy)

S,S-DEB (metoda HPLC-UV)				
	276,3	278,2	1,9	0,7
w ciągu dnia	27,6	28,5	1,7	3,2
	1,1	0,9	4,6	18,1
	552,7	551,9	2,4	0,1
	276,3	276,4	3,6	0,1
	110,5	112,9	4,3	2,2
	55,3	56,0	5,5	1,3
między dniami	27,6	28,0	6,6	1,4
	11,0	10,8	4,4	2,0
	5,5	5,4	5,3	1,4
	2,2	2,1	11,5	3,5
	1,1	1,1	11,1	0,6

n = 5

Tabela 14. Dokładność oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w buforach fosforanowych o pH 7,4 i stężeniu 0,0615 mol/l i 0,369 mol/l metodą HPLC-RID

Stężenie nominalne analitu [$\mu\text{mol/l}$]	0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l		0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l		0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l	
	Oznaczone stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$]	Błąd oznaczania [%]	Oznaczone stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$]	Błąd oznaczania [%]	Oznaczone stężenie analitu [$\mu\text{mol/l}$]	Błąd oznaczania [%]
TREO						
2500	2500,5	0,0	2449,3	2,0	2304,3	7,8
500,0	509,9	2,0	487,8	2,4	452,4	9,5
100,0	99,4	0,6	93,9	6,1	99,5	0,5
20,0	22,9	14,7	17,9	10,6	21,3	6,6
S,S-EBDM						
4294,5	4308,9	0,3	4104,5	4,4	4202,9	2,1
858,9	868,1	1,1	802,2	6,6	829,2	3,5
171,8	173,6	1,0	151,9	11,6	173,7	1,1
34,4	29,6	13,8	37,8	10,1	30,1	12,3
S,S-DEB						
2500,0	2529,4	1,2	2415,8	3,4	2503,5	0,1
500,0	516,0	3,2	504,7	0,9	498,2	0,4
100,0	104,3	4,3	98,4	1,6	89,7	10,3
50,0	54,1	8,1	48,2	3,5	56,6	13,2

Tabela 15. Precyzja i dokładność oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w buforze PBS metodą HPLC-RID

Stężenie nominalne analitu [μmol/l]	Średnie oznaczone stężenie analitu [μmol/l]	Precyzja (CV [%])	Dokładność (błąd [%])
TREO			
2500,0	2577,5	1,7	3,1
500,0	501,9	5,1	0,4
100,0	99,5	7,8	0,5
20,0	19,9	15,3	0,7
S,S-EBDM			
4294,5	4196,1	2,2	2,3
858,9	823,6	1,5	4,1
171,8	168,7	5,6	1,8
34,4	35,4	9,9	2,9
S,S-DEB			
2500,0	2545,9	2,2	1,8
500,0	502,1	3,5	0,4
100,0	104,6	8,2	4,6
50,0	52,2	11,9	4,3

n = 5

14.2.5. Odzysk TREO i jego epoksytransformerów z osocza króliczego

Odzysk TREO z osocza króliczego wynosił 92,2 – 102,5%, natomiast odzysk jego epoksytransformerów mieścił się w zakresach 72,2 – 74,8% i 79,0 – 89,9% odpowiednio dla S,S-EBDM i S,S-DEB (Tabela 16).

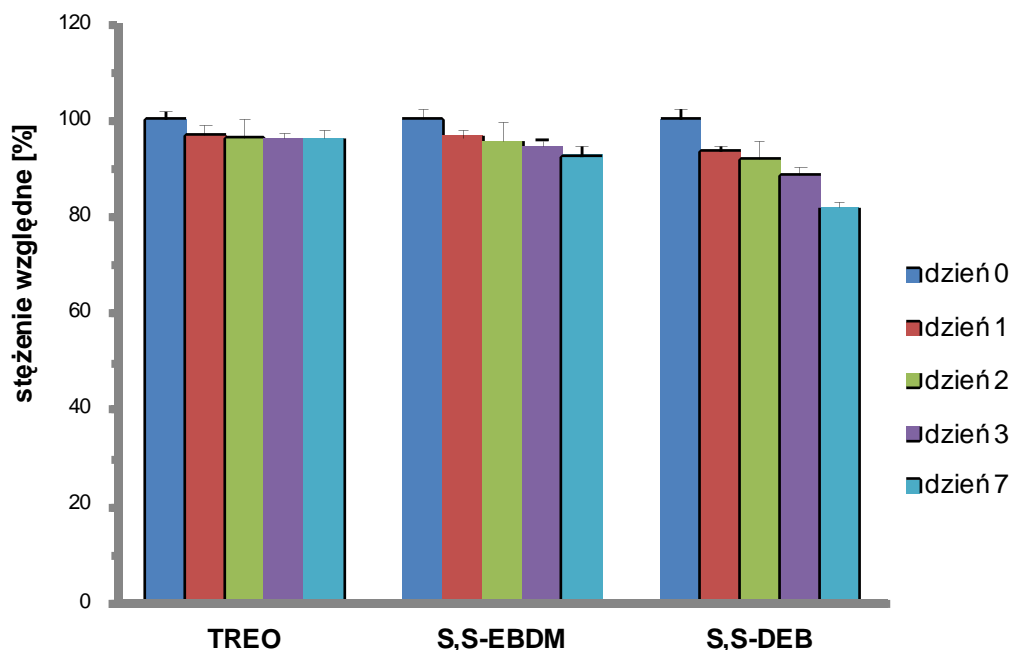
Tabela 16. Odzysk TREO oraz S,S-EBDM i S,S-DEB z osocza króliczego

Stężenie analitu [μmol/l]	Odzysk (średnia ± SD) [μmol/l]	CV [%]
TREO (metoda HPLC-RID)		
2500,0	99,2 ± 4,3	4,3
250,0	92,2 ± 4,2	4,5
20,0	102,5 ± 16,6	16,2
S,S-EBDM (metoda HPLC-UV)		
85,9	72,2 ± 1,6	2,2
1,7	74,8 ± 13,6	18,2
S,S-DEB (metoda HPLC-UV)		
55,3	89,9 ± 1,7	1,9
1,1	79,0 ± 6,1	7,7

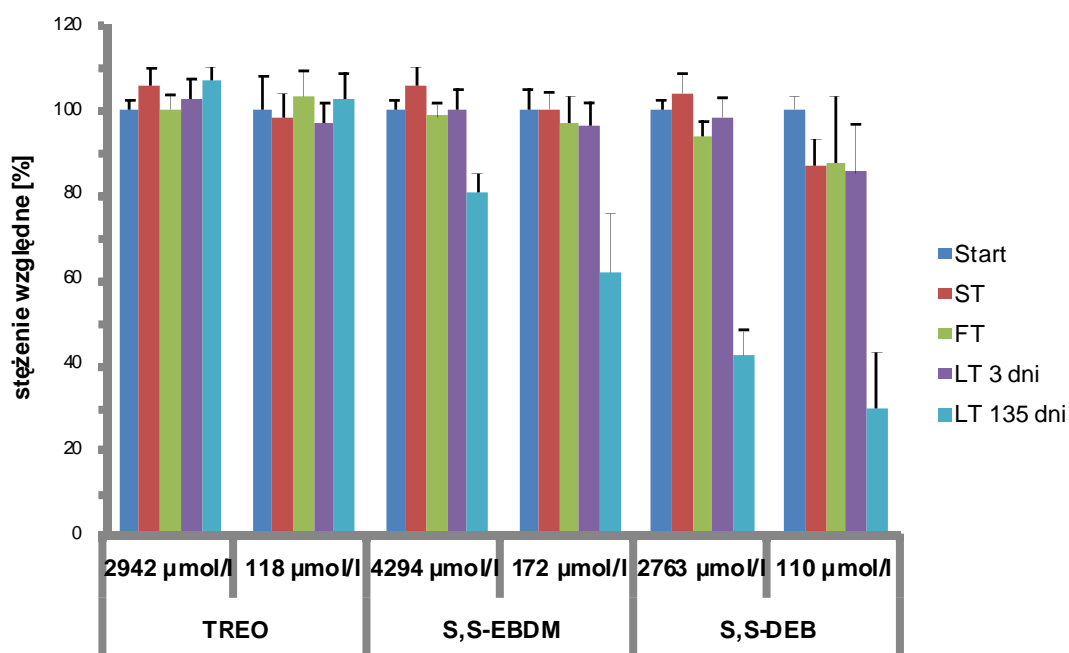
n = 5

14.2.6. Testy stabilności

Zmiany stężeń TREO i jego epoksytransformerów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB przechowywanym przez 7 dni w temperaturze 4 °C przedstawiono na Ryc. 19. Wyniki trwałości analitów w próbach 0,0730 mol/l buforu fosforanowego doprowadzonego do pH poniżej 5,0 za pomocą kwasu cytrynowego, podczas ich przechowywania w temperaturze –25 °C oraz rozmrażania, zamieszczono na Ryc. 20.



Ryc. 19. Wyniki trwałości analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 3$) w temperaturze 4 °C. Początkowe stężenie każdego związku (dzień 0) przyjęto za 100% i w stosunku do niego przedstawiono pozostałe wartości.

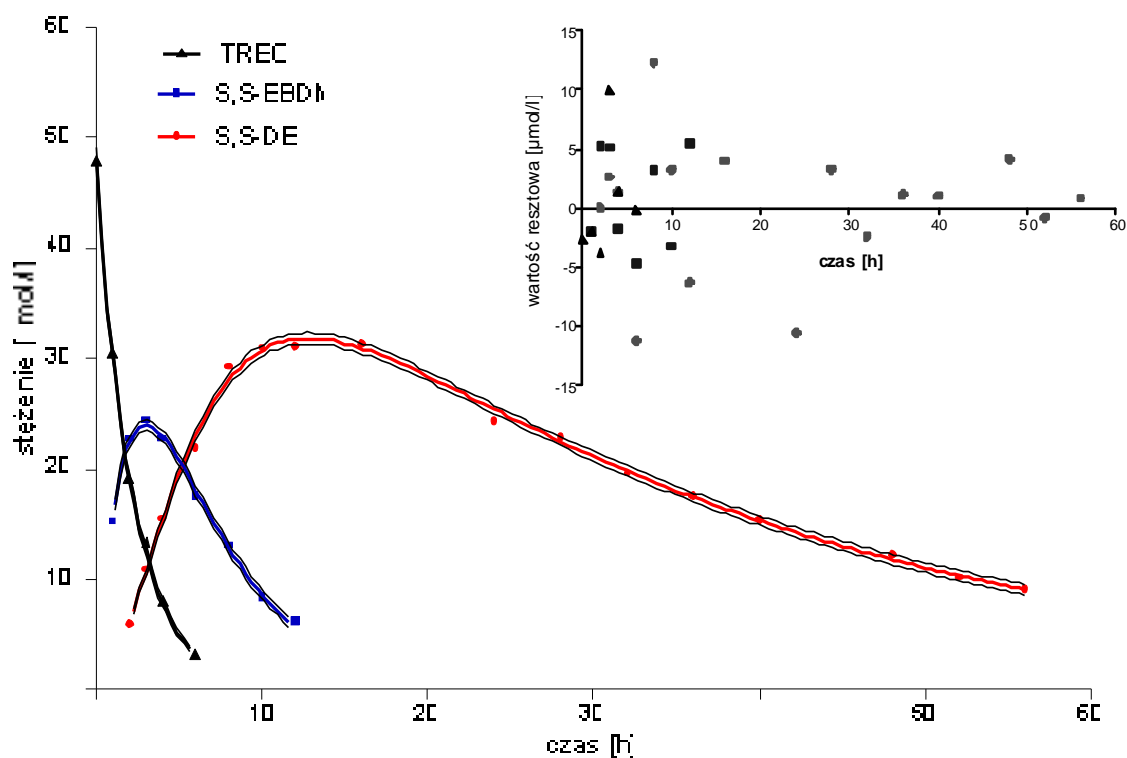


Ryc. 20. Wyniki trwałości TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o wysokim i niskim stężeniu (średnia \pm SD, $n = 3$) w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym: test stabilności krótkoterminowej w temperaturze pokojowej (ST), test zamrażania – rozmrażania (FT) i test stabilności długoterminowej (LT). Początkowe stężenie każdego związku (Start) przyjęto za 100% i w stosunku do niego przedstawiono pozostałe wartości.

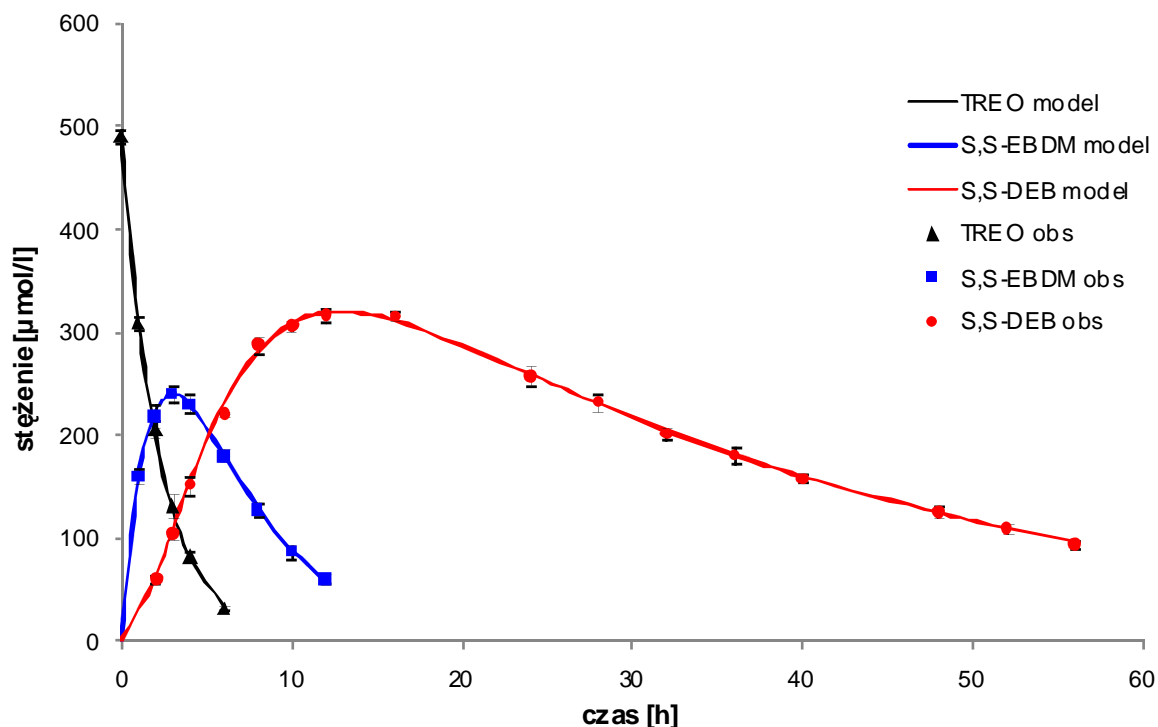
15. Kinetyka aktywacji TREO w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C

15.1. Profile zmian stężeń TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C

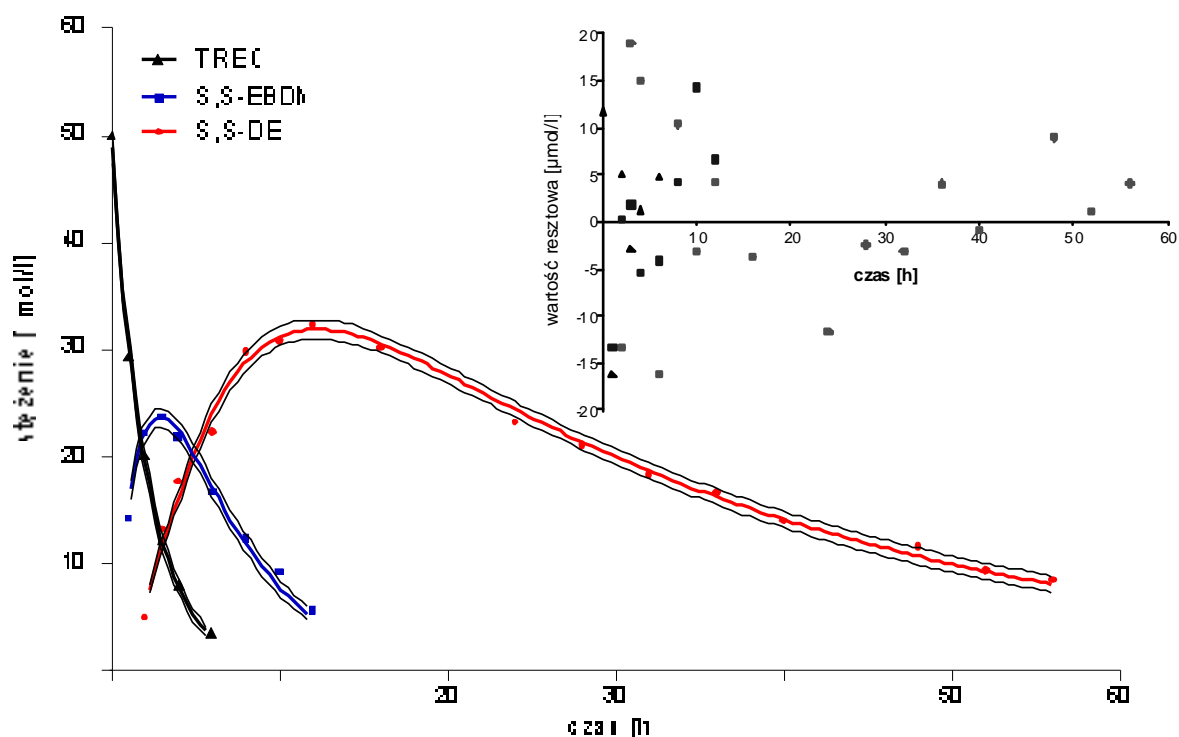
Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji TREO o różnym stężeniu początkowym (0,5, 1,0 i 2,5 mmol/l) w buforach fosforanowych o różnym stężeniu (0,0615, 0,0730, 0,369 mol/l) i sile jonowej (0,16, 0,19, 1,0 mol/l) oraz w buforze PBS o sile jonowej 0,16 mol/l przedstawiono na Ryc. 21 – 35. Reprezentatywne wykresy wygenerowane w programie Prism 6.01 przedstawiają wyniki uzyskane dla prób nr 1 w każdej badanej serii roztworów buforowych. Wyniki dla pozostałych prób zamieszczono w Załączniku 3 na Ryc. Z-1 – Z-18. Zmiany stężeń (\pm)-DEB obserwowane podczas hydrolizy epoksydu w 0,0615 i 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej odpowiednio 0,16 i 1,0 mol/l oraz buforze PBS o sile jonowej 0,16 mol/l przedstawiono na Ryc. 36.



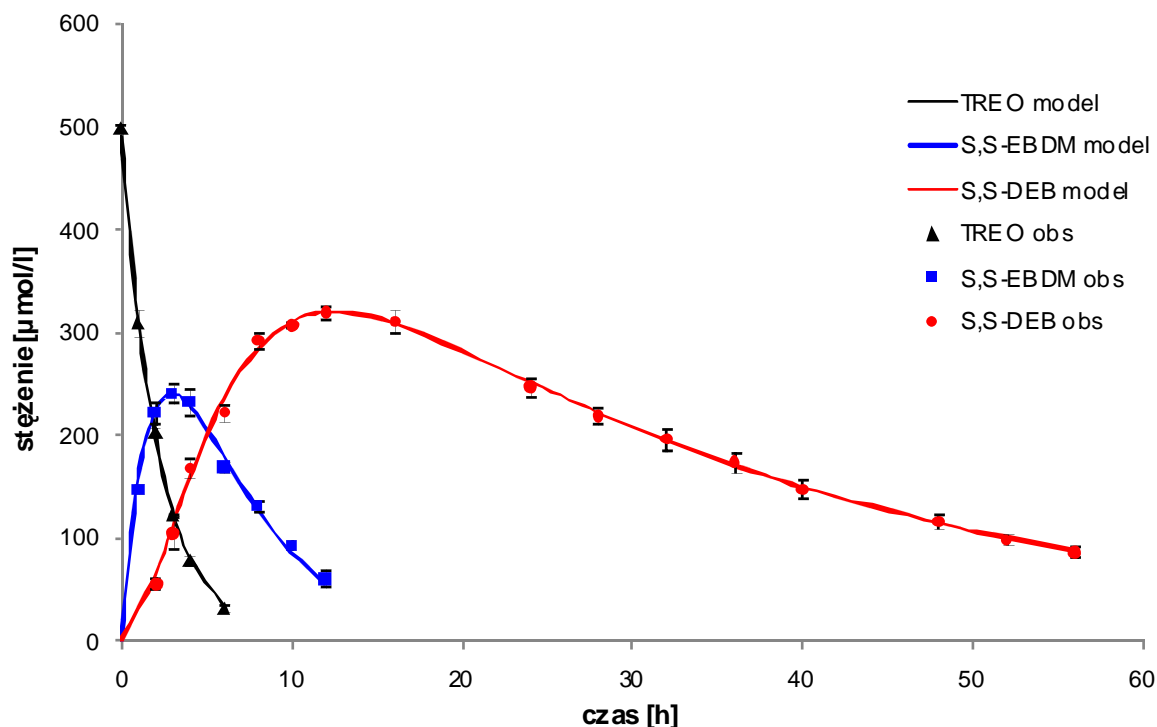
Ryc. 21. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0615 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **0,16 mol/l** oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analitów.



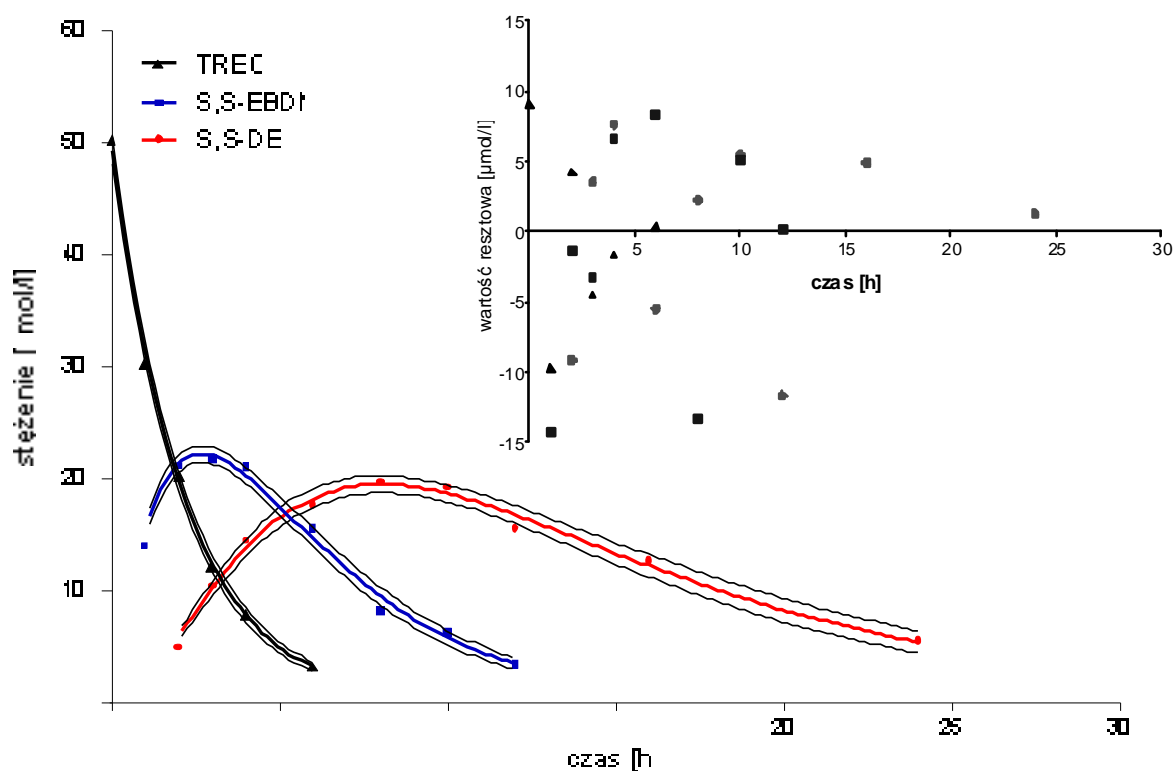
Ryc. 22. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 5$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0615 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **0,16 mol/l**.



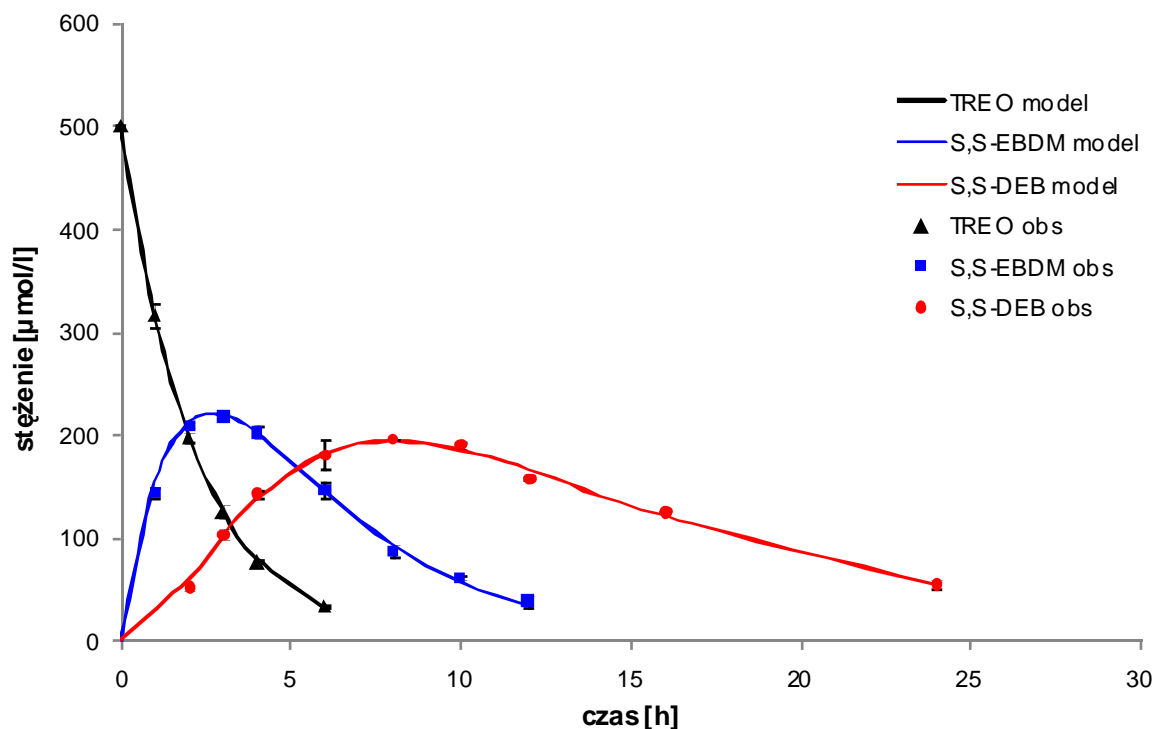
Ryc. 23. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0730 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **0,19 mol/l** oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analizów.



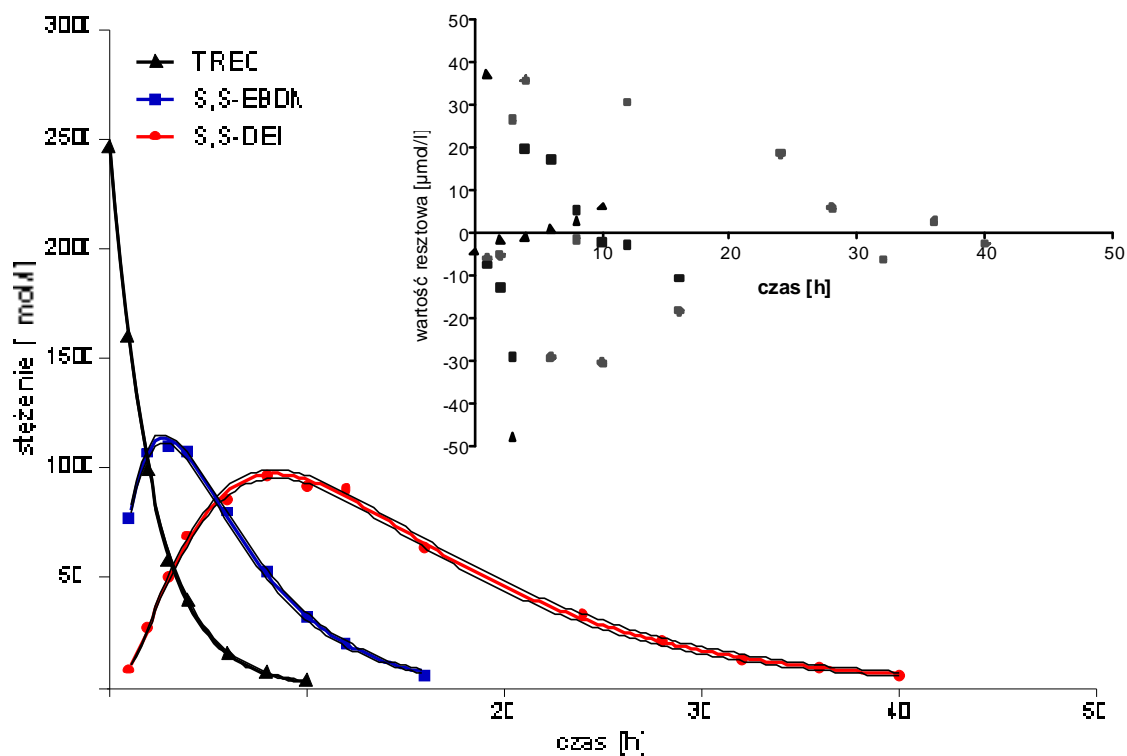
Ryc. 24. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 5$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0730 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **0,19 mol/l**.



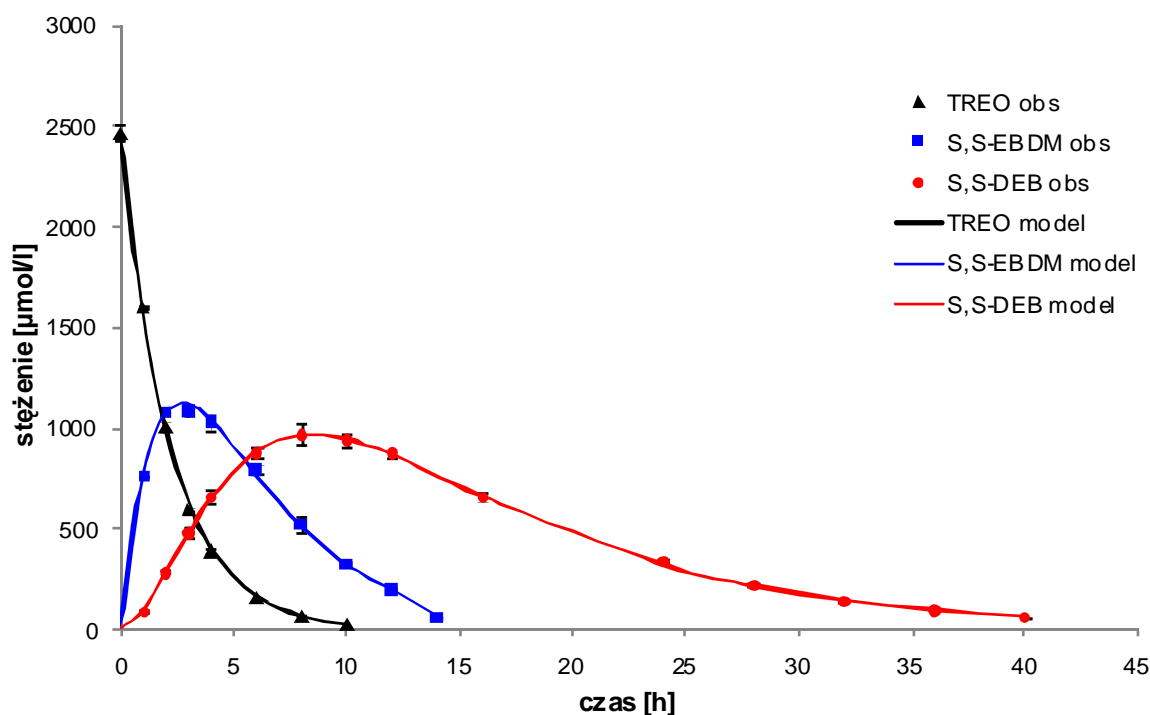
Ryc. 25. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu $0,5 \text{ mmol/l}$ w $0,369 \text{ mol/l}$ buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i sile jonowej $1,0 \text{ mol/l}$ oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analizów.



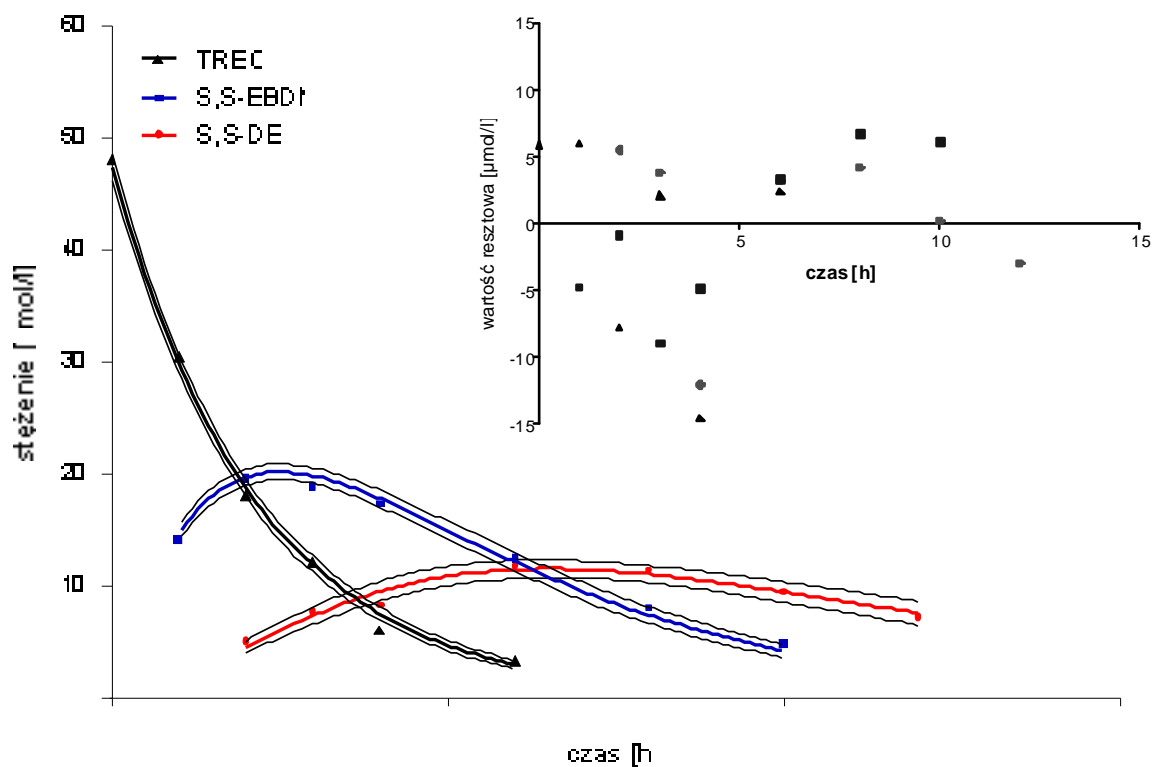
Ryc. 26. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 3$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu $0,5 \text{ mmol/l}$ w $0,369 \text{ mol/l}$ buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i sile jonowej $1,0 \text{ mol/l}$.



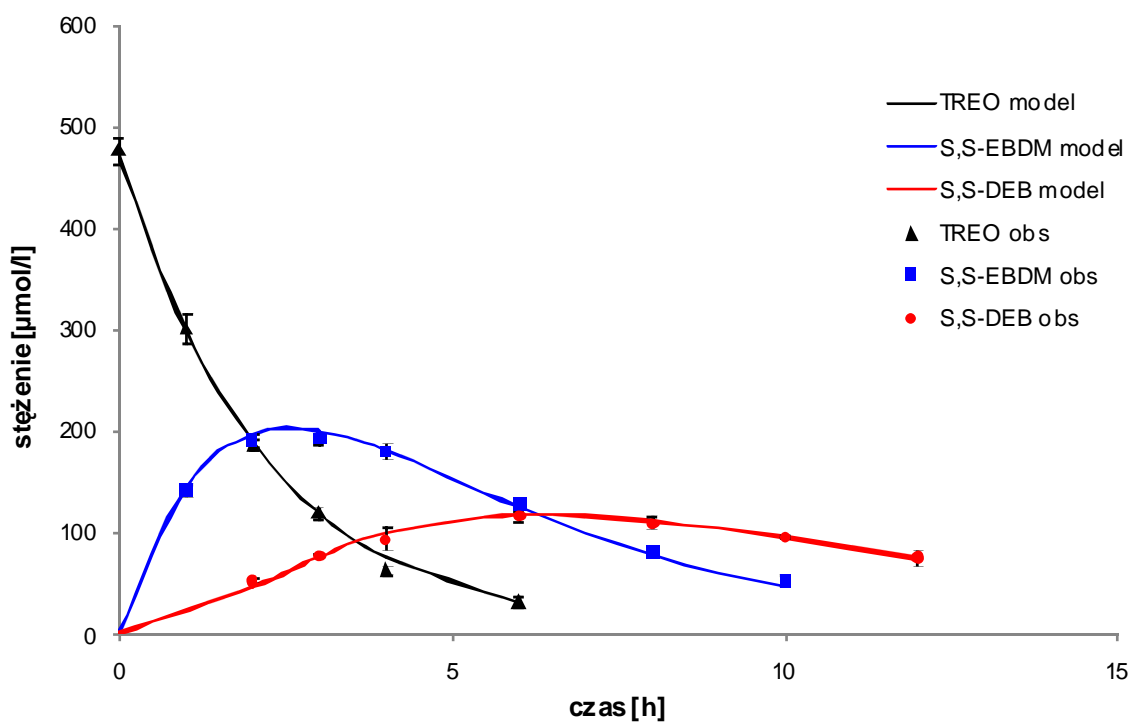
Ryc. 27. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu 2,5 mmol/l w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 1,0 mol/l oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analizitów.



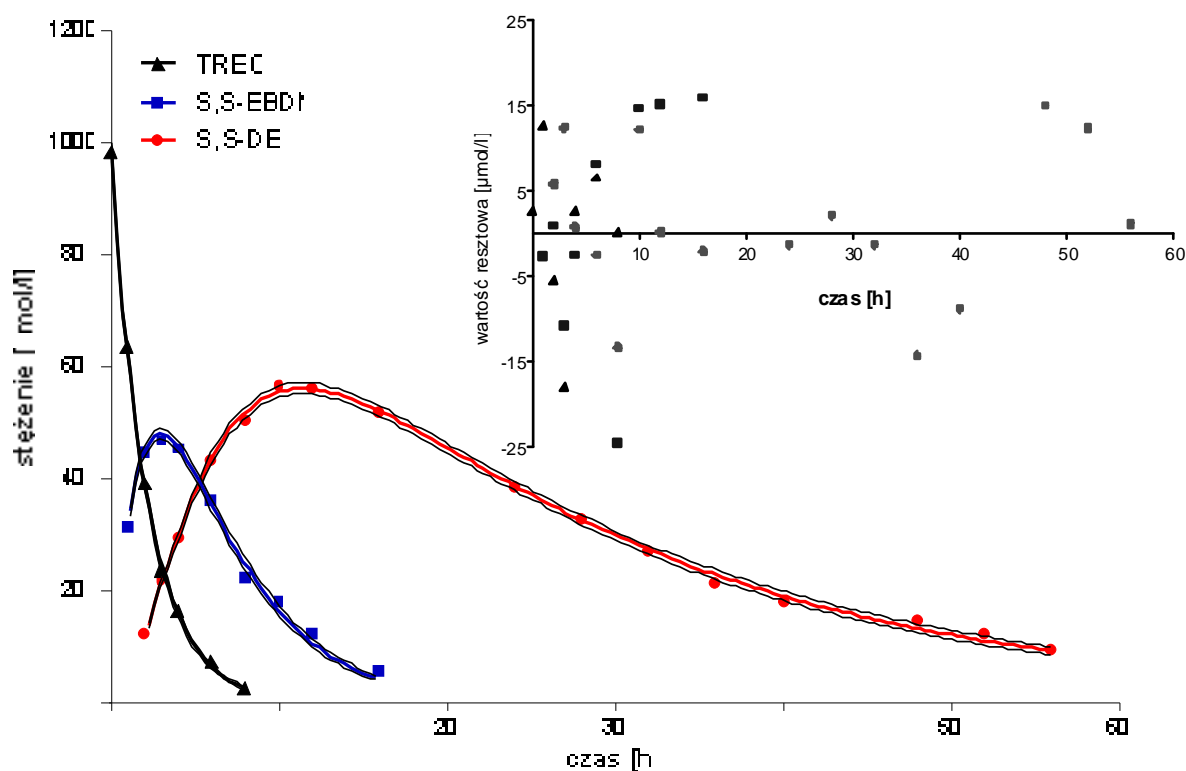
Ryc. 28. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 3$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu 2,5 mmol/l w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 1,0 mol/l.



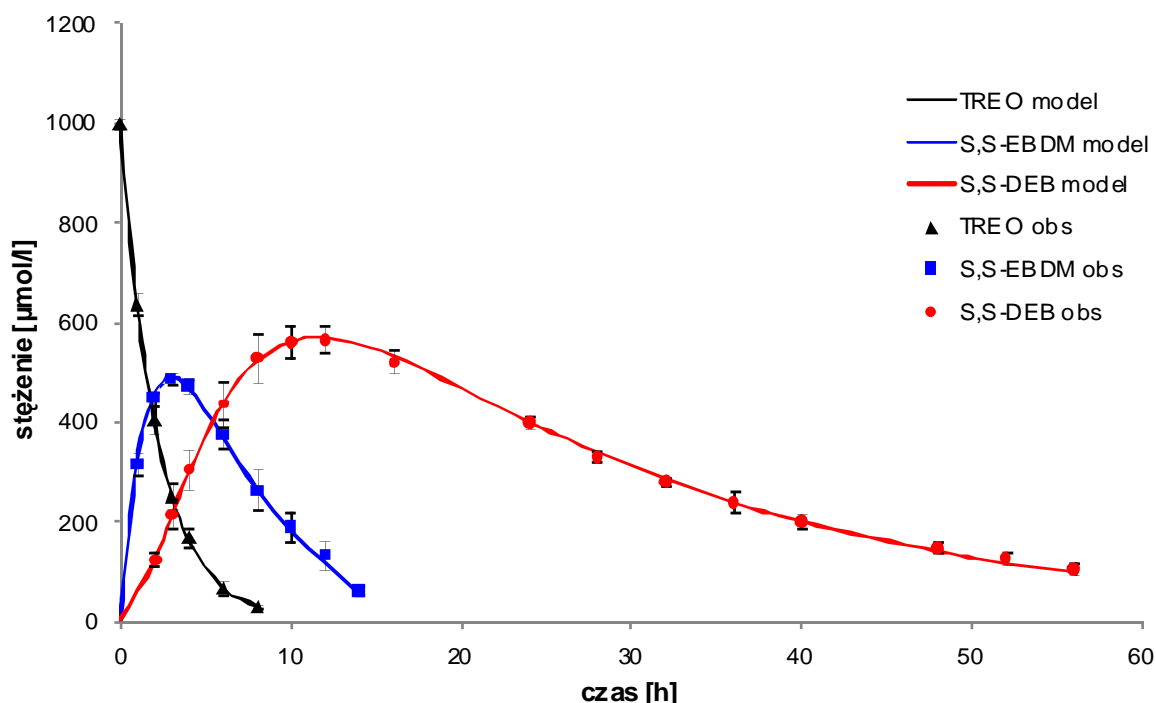
Ryc. 29. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0615 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **1,0 mol/l** oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analizów.



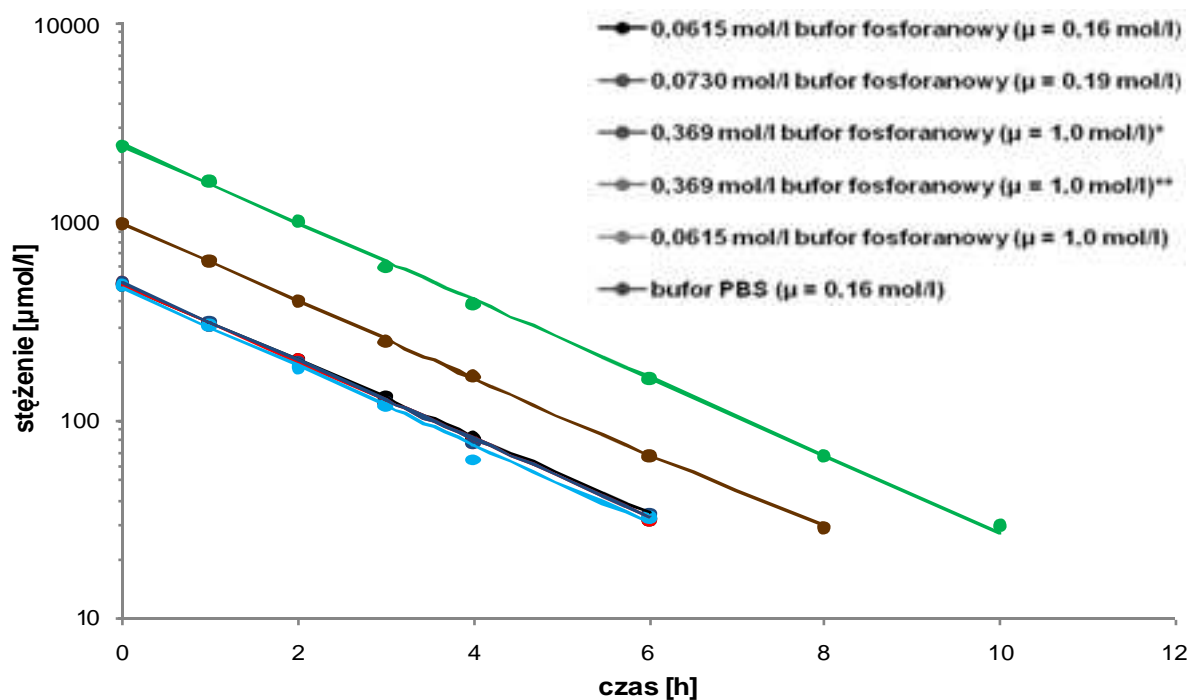
Ryc. 30. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 3$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu **0,5 mmol/l** w **0,0615 mol/l** buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze **37 °C** i sile jonowej **1,0 mol/l**.



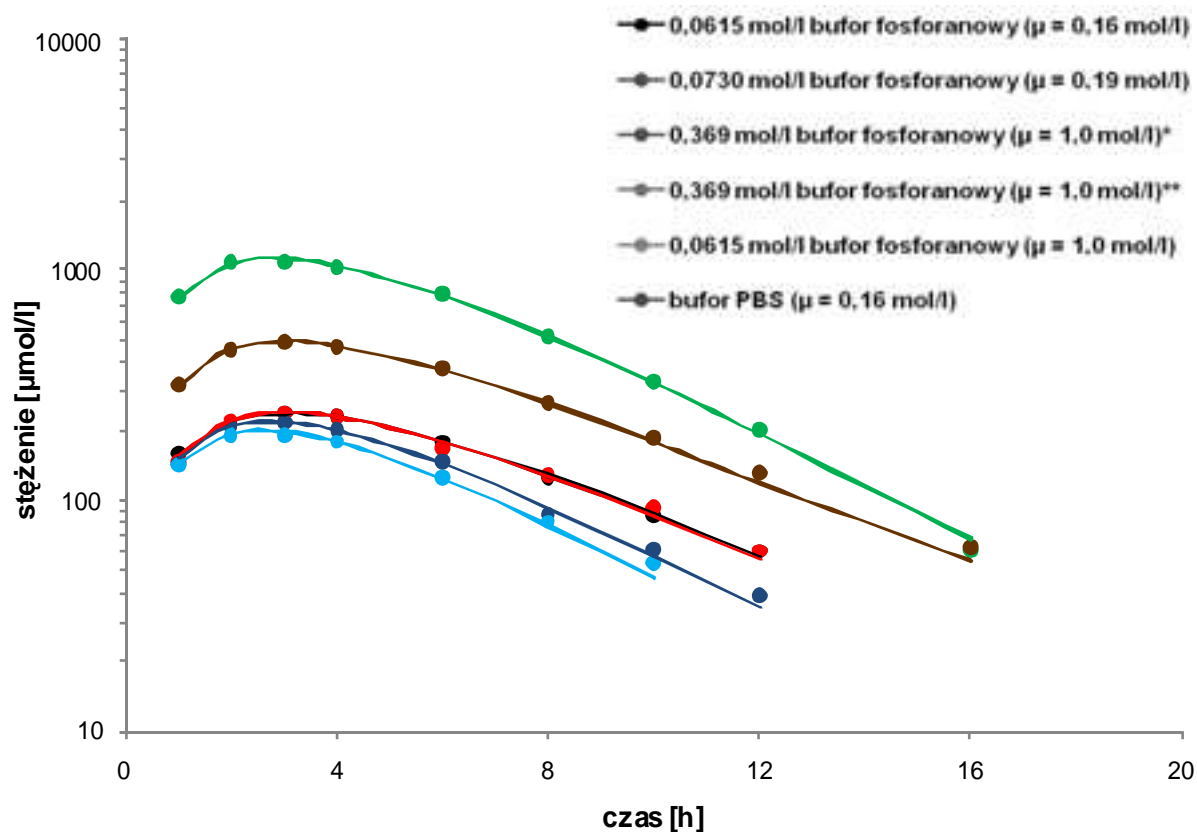
Ryc. 31. Przykładowy wykres przedstawiający zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu 1,0 mmol/l w buforze PBS o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 0,16 mol/l oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności, uzyskany w programie Prism 6.01. Wykres wewnętrzny przedstawia rozkład wartości resztowych stężeń analityków.



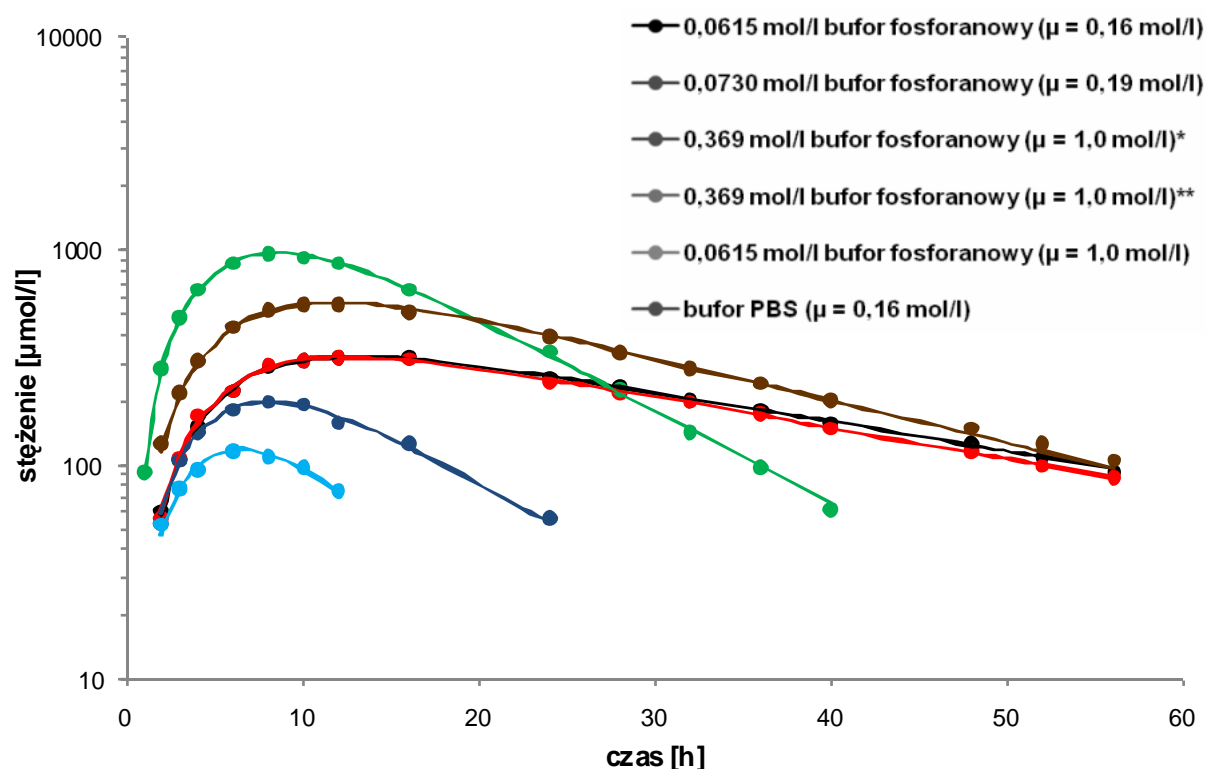
Ryc. 32. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (średnia \pm SD, $n = 5$) obserwowane podczas aktywacji proleku o początkowym stężeniu 1,0 mmol/l w buforze PBS o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 0,16 mol/l.



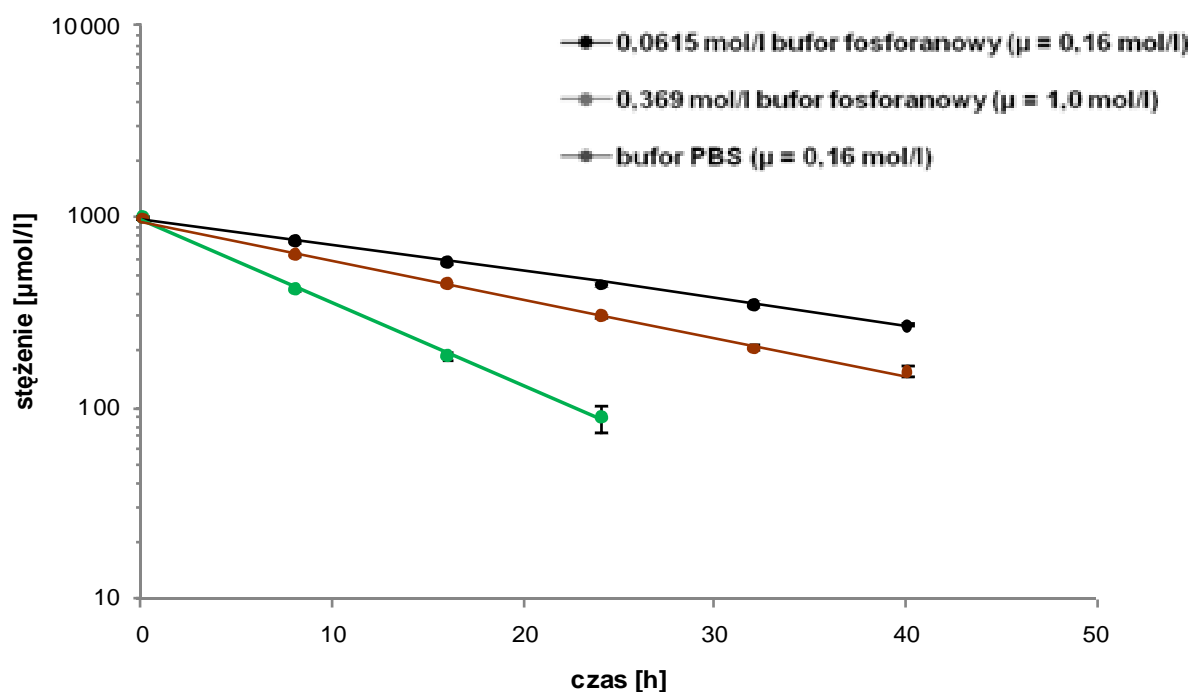
Ryc. 33. Zestawienie zmian średnich stężeń TREO obserwowanych podczas aktywacji proleku w badanych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C. * początkowe stężenie TREO w roztworze 0,5 mmol/l, ** początkowe stężenie TREO w roztworze 2,5 mmol/l.



Ryc. 34. Zestawienie zmian średnich stężeń S,S-EBDM obserwowanych podczas aktywacji TREO w badanych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C. * początkowe stężenie TREO w roztworze 0,5 mmol/l, ** początkowe stężenie TREO w roztworze 2,5 mmol/l.



Ryc. 35. Zestawienie zmian średnich stężeń S,S-DEB obserwowanych podczas aktywacji TREO w badanych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C. * początkowe stężenie TREO w roztworze 0,5 mmol/l, ** początkowe stężenie TREO w roztworze 2,5 mmol/l.



Ryc. 36. Zmiany stężeń (±)-DEB (średnia \pm SD) obserwowane podczas hydrolizy epoksydu o początkowym stężeniu 1,0 mmol/l w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,16 mol/l ($n = 3$), 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l ($n = 3$) oraz buforze PBS o sile jonowej 0,16 mol/l ($n = 5$) w stałych warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C.

15.2. Parametry kinetyczne aktywacji TREO w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C

Stałe szybkości opisujące następujące reakcje aktywacji TREO pierwszego rzędu (k_1 i k_2) oraz reakcje hydrolizy utworzonych epoksytransformerów pseudopierwszego rzędu (k_M i k_D), wyznaczone dla poszczególnych prób roztworów buforowych w programie Prism 6.01, zestawiono w Tabelach 17 – 22.

Tabela 17. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0615** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **0,16** mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	482,6	3,8	474,7 – 490,5
	2	483,2	4,2	474,6 – 491,8
	3	487,7	4,7	478,0 – 497,4
	4	500,3	3,1	494,0 – 506,6
	5	489,8	5,3	479,0 – 500,7
k_1 [h^{-1}]	1	0,4532	0,0062	0,4404 – 0,4660
	2	0,4375	0,0065	0,4241 – 0,4508
	3	0,4345	0,0072	0,4197 – 0,4493
	4	0,4491	0,0047	0,4394 – 0,4588
	5	0,4393	0,0081	0,4226 – 0,4560
k_2 [h^{-1}]	1	0,2160	0,0031	0,2096 – 0,2225
	2	0,2235	0,0036	0,2162 – 0,2308
	3	0,2189	0,0039	0,2109 – 0,2268
	4	0,2051	0,0023	0,2004 – 0,2098
	5	0,2063	0,0041	0,1978 – 0,2148
k_M [h^{-1}]	1	0,01530	0,00389	0,00729 – 0,02332
	2	0,02025	0,00435	0,01129 – 0,02921
	3	0,01525	0,00476	0,00544 – 0,02506
	4	0,02269	0,00294	0,01664 – 0,02874
	5	0,02502	0,00527	0,01416 – 0,03588
k_D [h^{-1}]	1	0,03262	0,00072	0,03115 – 0,03410
	2	0,03061	0,00074	0,02909 – 0,03212
	3	0,03187	0,00085	0,03011 – 0,03363
	4	0,03025	0,00053	0,02915 – 0,03135
	5	0,03121	0,00097	0,02922 – 0,03320

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 18. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0730** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **0,19** mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	488,6	6,9	474,4 – 502,8
	2	491,4	4,2	482,9 – 500,0
	3	486,5	6,1	473,9 – 499,1
	4	493,5	5,8	481,6 – 505,3
	5	492,6	6,2	479,8 – 505,3
k_1 [h^{-1}]	1	0,4561	0,0110	0,4334 – 0,4787
	2	0,4574	0,0067	0,4437 – 0,4712
	3	0,4330	0,0093	0,4137 – 0,4522
	4	0,4461	0,0090	0,4276 – 0,4645
	5	0,4524	0,0098	0,4322 – 0,4725
k_2 [h^{-1}]	1	0,2297	0,0059	0,2175 – 0,2419
	2	0,2229	0,0034	0,2159 – 0,2300
	3	0,2135	0,0050	0,2032 – 0,2237
	4	0,2101	0,0045	0,2007 – 0,2194
	5	0,2174	0,0049	0,2072 – 0,2275
k_M [h^{-1}]	1	0,01784	0,00726	0,002880 – 0,03280
	2	0,01358	0,00425	0,004814 – 0,02234
	3	0,02036	0,00626	0,007456 – 0,03326
	4	0,02130	0,00578	0,009399 – 0,03320
	5	0,01555	0,00614	0,002898 – 0,02821
k_D [h^{-1}]	1	0,03480	0,00131	0,03210 – 0,03749
	2	0,03519	0,00080	0,03354 – 0,03685
	3	0,03276	0,00116	0,03037 – 0,03515
	4	0,03358	0,00110	0,03131 – 0,03585
	5	0,03179	0,00110	0,02952 – 0,03406

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 19. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,369** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **1,0** mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	493,0	5,9	480,6 – 505,5
	2	498,3	4,4	489,1 – 507,5
	3	497,8	4,7	488,0 – 507,7
k_1 [h^{-1}]	1	0,4566	0,0095	0,4367 – 0,4766
	2	0,4578	0,0069	0,4432 – 0,4724
	3	0,4427	0,0072	0,4275 – 0,4580
k_2 [h^{-1}]	1	0,2321	0,0090	0,2131 – 0,2510
	2	0,2386	0,0066	0,2247 – 0,2524
	3	0,2316	0,0073	0,2163 – 0,2468
k_M [h^{-1}]	1	0,06303	0,01224	0,03731 – 0,08874
	2	0,07116	0,00918	0,05179 – 0,09054
	3	0,06852	0,00986	0,04781 – 0,08923
k_D [h^{-1}]	1	0,1127	0,0078	0,09620 – 0,1291
	2	0,1090	0,0055	0,09741 – 0,1205
	3	0,1138	0,0063	0,1004 – 0,1271

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 20. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji **2,5** mmol/l TREO w **0,369** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **1,0** mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	2471	15	2440 – 2502
	2	2481	16	2449 – 2514
	3	2433	17	2398 – 2468
k_1 [h^{-1}]	1	0,4522	0,0048	0,4424 – 0,4620
	2	0,4511	0,0049	0,4411 – 0,4612
	3	0,4443	0,0054	0,4333 – 0,4554
k_2 [h^{-1}]	1	0,2150	0,0038	0,2071 – 0,2228
	2	0,2077	0,0038	0,1999 – 0,2154
	3	0,2208	0,0044	0,2117 – 0,2300
k_M [h^{-1}]	1	0,06258	0,00523	0,05183 – 0,07333
	2	0,08575	0,00530	0,07485 – 0,09665
	3	0,05370	0,00602	0,04131 – 0,06608
k_D [h^{-1}]	1	0,1047	0,0030	0,09861 – 0,1108
	2	0,0940	0,0027	0,08839 – 0,09958
	3	0,1056	0,0034	0,09859 – 0,1125

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 21. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0615** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **1,0** mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	474,7	5,6	462,7 – 486,8
	2	458,3	4,6	448,6 – 468,0
	3	479,4	6,0	466,6 – 492,2
k_1 [h^{-1}]	1	0,4607	0,0096	0,4404 – 0,4811
	2	0,4626	0,0080	0,4455 – 0,4797
	3	0,4413	0,0097	0,4207 – 0,4619
k_2 [h^{-1}]	1	0,1978	0,0143	0,1674 – 0,2281
	2	0,2135	0,0130	0,1858 – 0,2412
	3	0,2201	0,0165	0,1849 – 0,2552
k_M [h^{-1}]	1	0,1420	0,0182	0,1032 – 0,1808
	2	0,1061	0,0160	0,07209 – 0,1401
	3	0,1046	0,0204	0,06121 – 0,1481
k_D [h^{-1}]	1	0,1856	0,0219	0,1389 – 0,2322
	2	0,2223	0,0204	0,1788 – 0,2658
	3	0,2129	0,0246	0,1605 – 0,2652

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 22. Parametry kinetyczne obliczone w programie Prism 6.01 dla aktywacji 1,0 mmol/l TREO w buforze PBS o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 0,16 mol/l

Parametr	Nr próby	Wartość	Błąd standardowy	95% Przedział ufności
C_0 [$\mu\text{mol/l}$]	1	982,9	7,8	966,9 – 998,8
	2	1015	7,0	1001 – 1030
	3	1002	6,9	987,8 – 1016
	4	997,0	6,9	982,9 – 1011
	5	978,0	8,0	961,5 – 994,4
k_1 [h^{-1}]	1	0,4537	0,0061	0,4411 – 0,4662
	2	0,5100	0,0061	0,4976 – 0,5225
	3	0,4200	0,0049	0,4099 – 0,4301
	4	0,4261	0,0050	0,4157 – 0,4364
	5	0,4447	0,0063	0,4319 – 0,4575
k_2 [h^{-1}]	1	0,2107	0,0033	0,2040 – 0,2174
	2	0,2416	0,0031	0,2353 – 0,2480
	3	0,1966	0,0027	0,1911 – 0,2021
	4	0,1855	0,0026	0,1802 – 0,1908
	5	0,1940	0,0031	0,1876 – 0,2004
k_M [h^{-1}]	1	0,03073	0,00429	0,02193 – 0,03953
	2	0,02581	0,00385	0,01789 – 0,03374
	3	0,03081	0,00360	0,02341 – 0,03820
	4	0,02507	0,00350	0,01788 – 0,03226
	5	0,02212	0,00421	0,01348 – 0,03077
k_D [h^{-1}]	1	0,04540	0,00102	0,04330 – 0,04750
	2	0,04322	0,00077	0,04163 – 0,04481
	3	0,04316	0,00088	0,04136 – 0,04497
	4	0,04686	0,00098	0,04484 – 0,04887
	5	0,04778	0,00116	0,04541 – 0,05015

C_0 – obliczone początkowe stężenie TREO w roztworze.

15.3. Ocena poprawności zastosowanego modelu aktywacji TREO

Współczynniki determinacji R^2 oraz wartości p dla testów oceniających dopasowanie zastosowanego modelu aktywacji TREO (Ryc. 14) do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji proleku w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C, przedstawiono w Tabelach 23 – 28. Porównanie stałych szybkości reakcji TREO → S,S-EBDM (k_1) oraz hydrolizy S,S-DEB (k_D) uzyskanych w zastosowanym modelu kinetycznym metodą regresji nieliniowej z analogicznymi stałymi wyznaczonymi za pomocą semilogarytmicznej regresji liniowej przedstawiono w Tabelach 29 i 30. We wszystkich analizowanych grupach z wyjątkiem jednej (stałej $k_{1\text{ lin}}$ dla buforu PBS) rozkład wartości był zgodny z normalnym, a porównywane pary grup cechowały się jednorodnością wariancji ($p > 0,05$ w teście Levene'a dla grup równolicznych lub w teście Browna-Forsythe'a dla grup o różnej liczebności danych). Do porównania średnich stałych szybkości zastosowano test ANOVA, z wyjątkiem porównania stałych k_1 i $k_{1\text{ lin}}$ dla buforu PBS, gdzie użyto nieparametryczny test U Manna-Whitneya. W każdym przypadku testy te wykazały brak statystycznie istotnych różnic stałych szybkości wyznaczonych metodą regresji nieliniowej w modelu kinetycznym i metodą semilogarytmicznej regresji liniowej.

Tabela 23. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0615** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **0,16** mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9991	0,9959	0,9954	0,9973
	2	0,9987	0,9993	0,9938	0,9970
	3	0,9977	0,9878	0,9961	0,9961
	4	0,9991	0,9972	0,9975	0,9984
	5	0,9974	0,9789	0,9963	0,9950
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	–	0,13	0,39	nd
	2	–	0,91	0,67	nd
	3	–	0,55	0,51	nd
	4	–	0,65	0,49	nd
	5	–	0,85	0,70	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	0,40	0,89	1,00	0,97
	2	0,70	0,71	0,85	0,92
	3	0,70	0,71	0,81	0,92
	4	1,00	0,11	0,71	0,79
	5	1,00	0,63	0,81	0,98
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		0,0005		
	2		< 0,0001		
	3		0,0036		
	4		< 0,0001		
	5		< 0,0001		

nd – nie dotyczy.

Tabela 24. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0730** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **0,19** mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9969	0,9838	0,9871	0,9919
	2	0,9993	0,9909	0,9961	0,9972
	3	0,9976	0,9712	0,9927	0,9934
	4	0,9992	0,9617	0,9961	0,9943
	5	0,9973	0,9888	0,9897	0,9935
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	–	0,90	0,99	nd
	2	–	0,42	0,14	nd
	3	–	0,46	0,71	nd
	4	–	0,83	0,20	nd
	5	–	0,26	0,18	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	1,00	0,43	0,79	0,92
	2	0,80	0,71	0,60	0,85
	3	0,10	0,37	0,90	0,71
	4	0,13	1,00	0,99	1,00
	5	1,00	0,37	0,79	0,91
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		0,0210		
	2		0,0038		
	3		0,0033		
	4		0,0011		
	5		0,0176		

nd – nie dotyczy.

Tabela 25. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,369** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **1,0** mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9985	0,9854	0,9840	0,9951
	2	0,9995	0,9959	0,9841	0,9974
	3	0,9987	0,9938	0,9860	0,9969
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	–	0,60	0,44	nd
	2	–	–	0,79	nd
	3	–	0,60	0,89	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	0,90	0,37	0,88	0,92
	2	0,80	0,71	0,79	0,90
	3	1,00	0,43	0,93	0,96
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		0,0001		
	2		< 0,0001		
	3		< 0,0001		

nd – nie dotyczy.

Tabela 26. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji 2,5 mmol/l TREO w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 1,0 mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9993	0,9985	0,9965	0,9987
	2	0,9995	0,9958	0,9971	0,9986
	3	0,9989	0,9959	0,9975	0,9983
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	0,10	0,98	0,85	nd
	2	0,91	0,61	0,89	nd
	3	0,85	0,70	0,41	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	0,37	0,11	0,82	0,56
	2	0,11	0,64	0,21	0,25
	3	0,29	0,26	0,29	0,14
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		< 0,0001		
	2		< 0,0001		
	3		< 0,0001		

nd – nie dotyczy.

Tabela 27. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji **0,5** mmol/l TREO w **0,0615** mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej **1,0** mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9975	0,9882	0,9337	0,9961
	2	0,9985	0,9905	0,9315	0,9972
	3	0,9975	0,9754	0,9596	0,9955
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	–	–	–	nd
	2	–	–	–	nd
	3	–	–	–	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	1,00	0,06	0,71	0,66
	2	0,80	1,00	0,54	0,87
	3	0,30	0,06	0,80	0,41
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		< 0,0001		
	2		< 0,0001		
	3		0,0005		

nd – nie dotyczy.

Tabela 28. Ocena dopasowania zastosowanego modelu kinetycznego do zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowanych w czasie aktywacji 1,0 mmol/l TREO w buforze PBS o pH 7,4, temperaturze 37 °C i sile jonowej 0,16 mol/l

Parametr	Nr próby	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB	Cały model
R^2	1	0,9992	0,9920	0,9971	0,9975
	2	0,9999	0,9976	0,9963	0,9982
	3	0,9995	0,9960	0,9960	0,9980
	4	0,9992	0,9950	0,9969	0,9980
	5	0,9994	0,9936	0,9945	0,9972
Wartość p dla testu D'Agostino-Pearson rozkładu normalnego wartości resztowych (hipoteza zerowa: istnienie rozkładu normalnego)	1	–	0,53	0,92	nd
	2	–	0,89	0,55	nd
	3	–	0,36	0,37	nd
	4	–	0,59	0,28	nd
	5	–	0,66	0,67	nd
Wartość p dla testu rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych (<i>Runs test</i>) (hipoteza zerowa: istnienie randomizacji rozkładu)	1	0,33	0,79	0,23	0,51
	2	0,90	1,00	0,10	0,36
	3	1,00	0,26	0,29	0,44
	4	0,97	0,07	0,15	0,24
	5	0,80	0,26	0,64	0,57
Wartość p dla testu F weryfikacji przewagi przyjętego modelu kinetycznego nad prostszym modelem, w którym $k_M = 0$ (hipoteza zerowa: prostszy model jest preferowany)	1		< 0,0001		
	2		< 0,0001		
	3		< 0,0001		
	4		< 0,0001		
	5		< 0,0001		

nd – nie dotyczy.

Tabela 29. Porównanie wartości stałych szybkości reakcji TREO \rightarrow S,S-EBDM przebiegającej w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C, wyznaczonych za pomocą zastosowanego modelu kinetycznego (k_1) i semilogarytmicznej regresji liniowej ($k_{1 \text{ lin}}$)

Bufor	Nr próby	k_1 [h^{-1}]	$k_{1 \text{ lin}}$ [h^{-1}]	Różnica [%]
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	1	0,4532	0,4503	0,6
	2	0,4375	0,4607	5,0
	3	0,4345	0,4448	2,3
	4	0,4491	0,4672	3,9
	5	0,4393	0,4410	0,4
0,0730 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,19 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	1	0,4561	0,4347	4,9
	2	0,4574	0,4918	7,0
	3	0,4330	0,4710	8,1
	4	0,4461	0,4530	1,5
	5	0,4524	0,4409	2,6
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	1	0,4566	0,4573	0,2
	2	0,4578	0,4538	0,9
	3	0,4427	0,4430	0,1
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 2,5$ mmol/l	1	0,4522	0,4352	3,9
	2	0,4511	0,4452	1,3
	3	0,4443	0,4591	3,2
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l* ; $C_0 = 0,5$ mmol/l	1	0,4607	0,4633	0,6
	2	0,4626	0,4770	3,0
	3	0,4413	0,4413	0,0
bufor PBS o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 1,0$ mmol/l	1	0,4537	0,4475	1,4
	2	0,5100	0,5179	1,5
	3	0,4200	0,4361	3,7
	4	0,4261	0,4496	5,2
	5	0,4447	0,4298	3,5

* zwiększoną siłę jonową roztworu buforowego uzyskano przez dodanie NaCl; C_0 – nominalne początkowe stężenie TREO w roztworze.

Tabela 30. Porównanie wartości stałych szybkości reakcji hydrolizy S,S-DEB i (±)-DEB w wybranych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C, wyznaczonych za pomocą zastosowanego modelu kinetycznego (k_D) i semilogarytmicznej regresji liniowej ($k_{D \text{ lin}}$)

Bufor	k_D [h^{-1}]	$k_{D \text{ lin}}$ [h^{-1}]	Różnica [%]
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l	$0,03131 \pm 0,00096$ (n = 5)	$0,03214 \pm 0,00030$ (n = 3)	2,6
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l	$0,1118 \pm 0,0025^*$ (n = 3)	$0,1012 \pm 0,0067$ (n = 3)	10,5
	$0,1014 \pm 0,0064^{**}$ (n = 3)		0,2
bufor PBS o sile jonowej 0,16 mol/l	$0,04528 \pm 0,00209$ (n = 5)	$0,04637 \pm 0,00144$ (n = 5)	2,4

* początkowe stężenie TREO w roztworze wynosiło 0,5 mmol/l; ** początkowe stężenie TREO w roztworze wynosiło 2,5 mmol/l.

15.4. Ocena statystyczna wpływu składu roztworów buforowych na stałe szybkości reakcji aktywacji TREO

Wyznaczone w programie Prism 6.01 wartości stałych szybkości reakcji składających się na aktywację TREO (k_1 i k_2) oraz hydrolityczny rozkład utworzonych epoksytransformerów (k_M i k_D) w różnych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C podlegały rozkładowi normalnemu ($p > 0,05$ w teście Shapiro-Wilka) oraz cechowały się jednorodnością wariancji ($p > 0,05$ w teście Browna-Forsythe'a). Wartości tych stałych zestawiono w Tabeli 31. Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała brak statystycznie istotnych różnic wartości stałych k_1 i k_2 uzyskanych dla wszystkich badanych roztworów buforowych oraz istnienie statystycznych różnic stałych k_M i k_D (Tabela 31). Celem określenia istotności różnic średnich k_M i k_D między poszczególnymi parami badanych buforów, przeprowadzono test post-hoc Tukey'a, którego wyniki zamieszczono w Tabeli 32 i 33.

Tabela 31. Porównanie stałych szybkości (średnia \pm SD) reakcji transformacji TREO w roztworach buforowych o różnej sile jonowej, składzie jonowym i przy różnym początkowym stężeniu TREO w stałych warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C (jednoczynnikowa ANOVA)

Bufor	Stała szybkości [h^{-1}]			
	k_1	k_2	k_M	k_D
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	0,4427 \pm 0,0080 (n = 5)	0,2140 \pm 0,0080 (n = 5)	0,01970 \pm 0,00438 (n = 5)	0,03131 \pm 0,00096 (n = 5)
0,0730 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,19 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	0,4490 \pm 0,0100 (n = 5)	0,2187 \pm 0,0078 (n = 5)	0,01773 \pm 0,00323 (n = 5)	0,03362 \pm 0,00141 (n = 5)
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	0,4524 \pm 0,0084 (n = 3)	0,2341 \pm 0,0039 (n = 3)	0,06757 \pm 0,00415 (n = 3)	0,1118 \pm 0,0025 (n = 3)
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 2,5$ mmol/l	0,4492 \pm 0,0043 (n = 3)	0,2145 \pm 0,0066 (n = 3)	0,06734 \pm 0,01655 (n = 3)	0,1014 \pm 0,0065 (n = 3)
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l	0,4549 \pm 0,0118 (n = 3)	0,2105 \pm 0,0115 (n = 3)	0,1176 \pm 0,0212 (n = 3)	0,2069 \pm 0,0191 (n = 3)
bufor PBS o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 1,0$ mmol/l	0,4509 \pm 0,0357 (n = 5)	0,2057 \pm 0,0220 (n = 5)	0,02691 \pm 0,00379 (n = 5)	0,04528 \pm 0,00209 (n = 5)
test ANOVA ($\alpha = 0,05$)	NS	NS	p < 0,0001	p < 0,0001

* zwiększoną siłę jonową buforu uzyskano za pomocą NaCl; C_0 – nominalne początkowe stężenie TREO w roztworze; NS – brak istotnych statystycznie różnic (p > 0,05).

Tabela 32. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości stałej k_M uzyskanych dla aktywacji TREO w roztworach buforowych o różnej sile jonowej, składzie jonowym i przy różnym początkowym stężeniu TREO w stałych warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C

Bufor	A	B	C	D	E	F
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (A)	nd	NS	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	NS
0,0730 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,19 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (B)	NS	nd	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	NS
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (C)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	nd	NS	$p = 0,0002$	$p = 0,0008$
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 2,5$ mmol/l (D)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	NS	nd	$p = 0,0002$	$p = 0,0009$
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l*; $C_0 = 0,5$ mmol/l (E)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	nd	$p = 0,0002$
bufor PBS o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 1,0$ mmol/l (F)	NS	NS	$p = 0,0008$	$p = 0,0009$	$p = 0,0002$	nd

* zwiększoną siłę jonową buforu uzyskano za pomocą NaCl; C_0 – nominalne początkowe stężenie TREO w roztworze; nd – nie dotyczy; NS – brak istotnej statystycznie różnicy ($p > 0,05$).

Tabela 33. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości stałej k_D uzyskanych dla aktywacji TREO w roztworach buforowych o różnej sile jonowej, składzie jonowym i przy różnym początkowym stężeniu TREO w stałych warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C

Bufor	A	B	C	D	E	F
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (A)	nd	NS	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0469$
0,0730 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 0,19 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (B)	NS	nd	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	NS
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 0,5$ mmol/l (C)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	nd	NS	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$
0,369 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l; $C_0 = 2,5$ mmol/l (D)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	NS	nd	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$
0,0615 mol/l bufor fosforanowy o sile jonowej 1,0 mol/l*; $C_0 = 0,5$ mmol/l (E)	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	nd	$p = 0,0002$
bufor PBS o sile jonowej 0,16 mol/l; $C_0 = 1,0$ mmol/l (F)	$p = 0,0469$	NS	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	$p = 0,0002$	nd

* zwiększoną siłę jonową buforu uzyskano za pomocą NaCl; C_0 – nominalne początkowe stężenie TREO w roztworze; nd – nie dotyczy; NS – brak istotnej statystycznie różnicy ($p > 0,05$).

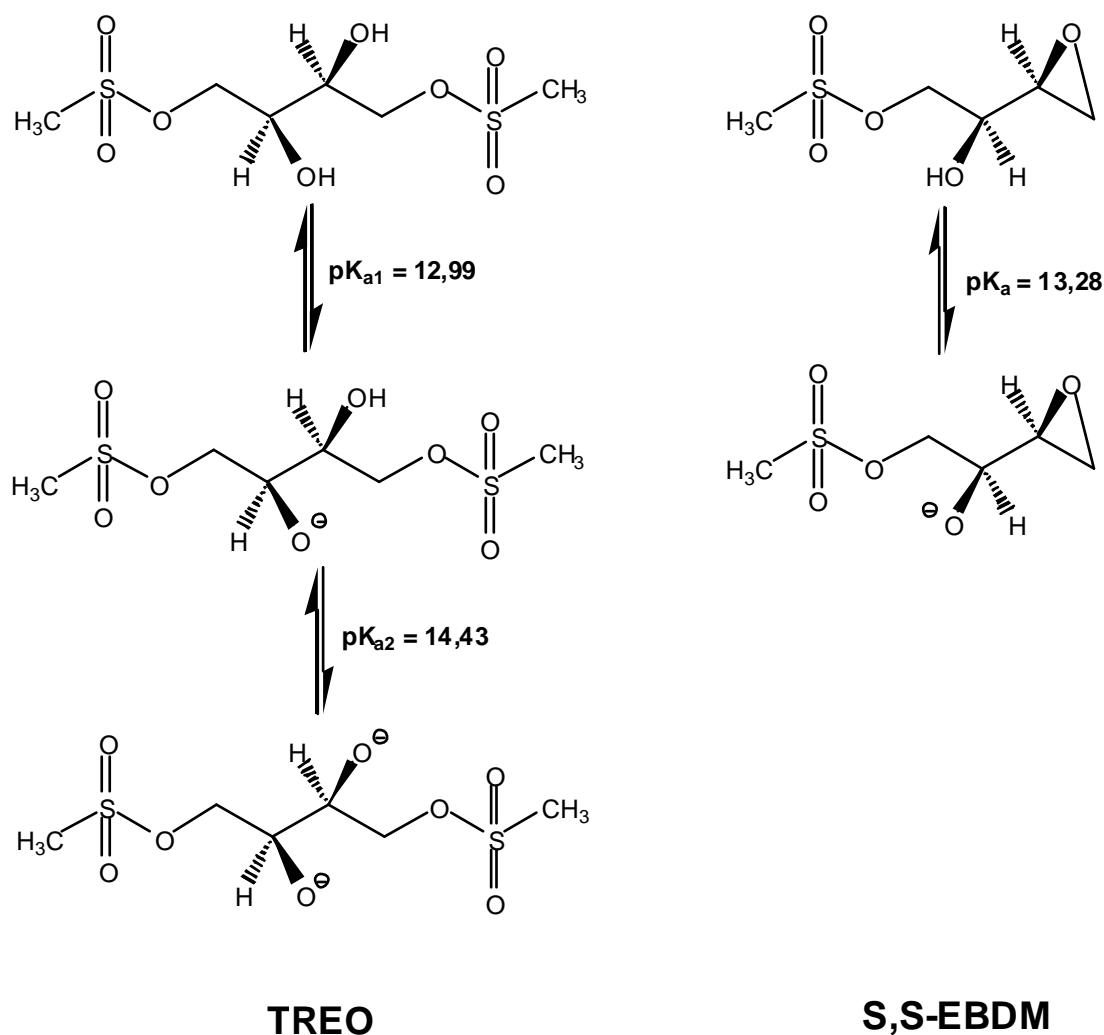
16. P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów

16.1. Wyznaczenie logP_{OW}, pK_a i powierzchni cząsteczek TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB metodami obliczeniowymi

Wartości logP_{OW} TREO i jego epoksytransformerów oszacowane za pomocą różnych metod obliczeniowych zamieszczono w Tabeli 34. Struktury zdysocjowanych form TREO i S,S-EBDM oraz odpowiednie wartości pK_a przedstawiono na Ryc. 37. Przeprowadzona analiza wykazała, iż S,S-DEB w ogóle nie ulega jonizacji w środowisku wodnym w zakresie pH od 0 do 14. Obliczona powierzchnia cząsteczek TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB wynosiła odpowiednio 523, 383 i 246 Å².

Tabela 34. Teoretyczne wartości logP_{OW} TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oszacowane na podstawie różnych metod obliczeniowych

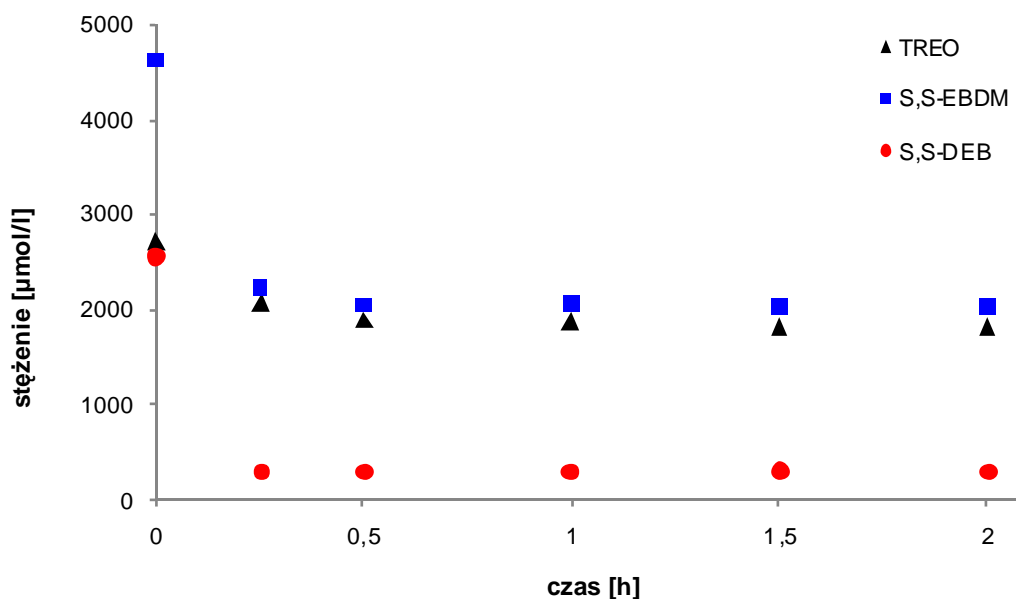
Metoda	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB
<i>Metody oparte na udziałach atomów</i>			
ALOGP	-1,95	-1,17	-0,39
XLOGP2	-2,33	-1,42	–
XLOGP3	-2,16	-1,28	-0,52
<i>Metody oparte na udziałach fragmentów cząsteczki</i>			
KOWWIN	-3,35	- 1.32	- 0.58
AB/LogP	-2,00	- 1.93	- 0.38
miLogP	-2,26	- 1.14	- 0.02
<i>Metody oparte na topologii całej cząsteczki</i>			
ALOGPs	-1,53	-0,91	-0,36
AC logP	-2,35	-1,34	-0,32
MLOGP	-2,01	-1,53	-0,47



Ryc. 37. Dysocjacja kwasowa TREO i S,S-EBDM oraz odpowiednie wartości pK_a obliczone w programie Marvin Sketch.

16.2. Czas ustalania się równowagi podziału TREO i jego epoksytransformerów w układzie n-oktanol/ABS

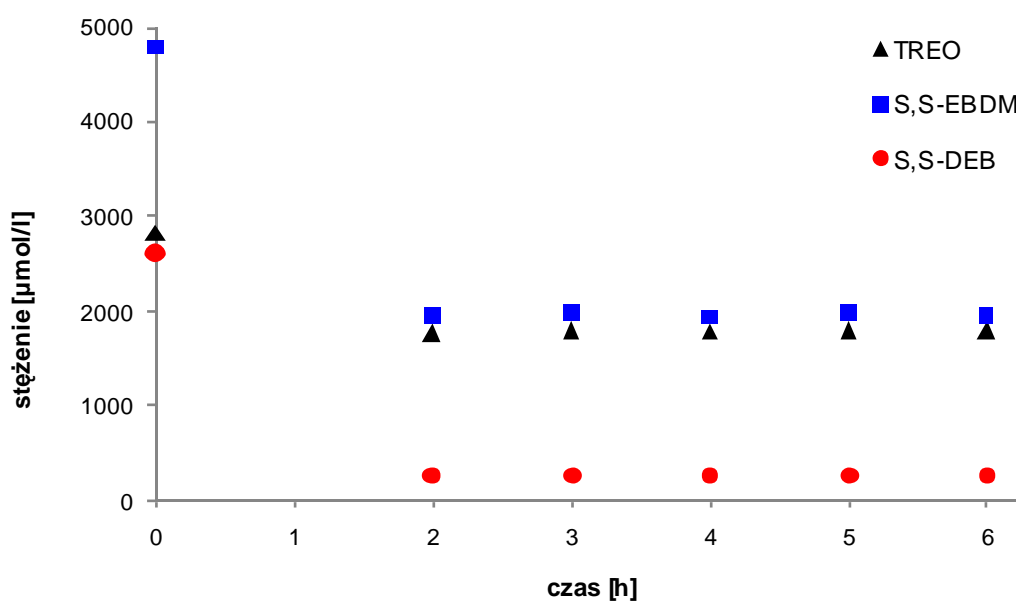
Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowane w buforze ABS przed oraz po 0,25 – 2,0 h wytrząsania układu złożonego z 20 ml n-oktanolu i 1 ml buforu ABS zawierającego anality o nominalnych stężeniach początkowych równych odpowiednio 2828, 4602 i 2570 $\mu\text{mol/l}$, przedstawia Ryc. 38.



Ryc. 38. Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w buforze ABS w czasie 2 h wytrząsania układu n-oktanol/ABS 20 : 1 (v/v).

16.3. Trwałość TREO i jego epoksytransformerów w układzie n-oktanol/ABS

Zmiany stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB obserwowane w buforze ABS przed oraz po 2 – 6 h wytrząsania układu złożonego z 20 ml n-oktanolu i 1 ml buforu ABS zawierającego anality o nominalnych stężeniach początkowych równych odpowiednio 2828, 4602 i 2570 µmol/l, przedstawia Ryc. 39.



Ryc. 39. Zmiany średnich stężeń ($n = 2$) TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w buforze ABS w czasie 6 h wytrząsania układu n-oktanol/ABS 20 : 1 (v/v).

16.4. Doświadczalne P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów oraz ich ocena statystyczna

Stężenia TREO i jego epoksytransformerów w buforze ABS oznaczone przed oraz po 2 h wytrząsaniu układów składających się z faz n-oktanolu i buforu ABS przedstawiono w Tabeli 35, natomiast wyznaczone doświadczalnie wartości P_{OW} i $\log P_{OW}$ zamieszczono w Tabeli 36. Wartości P_{OW} uzyskane dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB we wszystkich badanych seriach układów n-oktanol/ABS (I – VI) podlegały rozkładowi normalnemu ($p > 0,05$ w teście Shapiro-Wilka). Wariancje P_{OW} TREO i S,S-EBDM w badanych seriach były statystycznie równe ($p > 0,05$ w teście Levene'a), natomiast w przypadku S,S-DEB były różne ($p = 0,0442$ w teście Levene'a). Test ANOVA wykazał brak statystycznie istotnych różnic między średnimi wartościami P_{OW} poszczególnych związków, uzyskanymi dla badanych układów n-oktanol/ABS ($p > 0,05$).

Tabela 35. Stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB oznaczone w buforze ABS po 2 h wytrząsania układów n-oktanol/ABS o różnej objętości faz i różnym początkowym stężeniu analitów w buforze ABS w stałej temperaturze 37 °C

Seria (n = 5)	n-Oktanol : ABS (ml/ml)	Stężenie analitu w buforze ABS [$\mu\text{mol/l}$]		
		Nominalne początkowe	Oznaczone początkowe	Oznaczone równowagowe (średnia \pm SD)
TREO				
I	20,0 : 1,0	2828,4	2896,0	1908,8 \pm 78,5
II	20,0 : 0,5	2828,4	2881,8	1368,5 \pm 79,2
III	20,0 : 2,0	2828,4	2928,8	2343,6 \pm 60,4
IV	20,0 : 1,0	1414,2	1446,2	942,7 \pm 11,9
V	20,0 : 1,0	2500,0	2447,7	1603,2 \pm 27,1
S,S-EBDM				
I	20,0 : 1,0	4601,8	4762,2	2052,6 \pm 78,4
II	20,0 : 0,5	4601,8	4589,1	1268,3 \pm 56,8
III	20,0 : 2,0	4601,8	4631,6	2792,9 \pm 67,0
IV	20,0 : 1,0	2300,9	2385,6	1042,1 \pm 13,4
S,S-DEB				
I	20,0 : 1,0	2569,9	2727,1	316,7 \pm 9,4
II	20,0 : 0,5	2569,9	2679,7	157,8 \pm 10,1
III	20,0 : 2,0	2569,9	2588,6	523,0 \pm 14,9
IV	20,0 : 1,0	1284,9	1309,1	144,6 \pm 12,8
VI	20,0 : 1,0	2500,0	2344,2	247,8 \pm 12,8

Tabela 36. Wartości P_{OW} oraz odpowiadające im wartości $\log P_{OW}$ (średnia \pm SD, $n = 5$) TREO i jego epoksytransformerów wyznaczone w układzie n-oktanol/ABS w temperaturze 37 °C

Seria	TREO		S,S-EBDM		S,S-DEB	
	P_{OW}	$\log P_{OW}$	P_{OW}	$\log P_{OW}$	P_{OW}	$\log P_{OW}$
I	$0,0260 \pm 0,0032$	$-1,58 \pm 0,05$	$0,0661 \pm 0,0046$	$-1,18 \pm 0,03$	$0,381 \pm 0,012$	$-0,42 \pm 0,01$
II	$0,0278 \pm 0,0033$	$-1,56 \pm 0,05$	$0,0656 \pm 0,0042$	$-1,18 \pm 0,03$	$0,401 \pm 0,026$	$-0,40 \pm 0,03$
III	$0,0250 \pm 0,0032$	$-1,60 \pm 0,06$	$0,0659 \pm 0,0040$	$-1,18 \pm 0,03$	$0,395 \pm 0,014$	$-0,40 \pm 0,02$
IV	$0,0267 \pm 0,0010$	$-1,57 \pm 0,02$	$0,0645 \pm 0,0015$	$-1,19 \pm 0,01$	$0,405 \pm 0,040$	$-0,39 \pm 0,04$
V	$0,0264 \pm 0,0013$	$-1,58 \pm 0,02$	nd	nd	nd	nd
VI	nd	nd	nd	nd	$0,424 \pm 0,024$	$-0,37 \pm 0,02$
Razem	$0,0264 \pm 0,0026$	$-1,58 \pm 0,04$	$0,0655 \pm 0,0035$	$-1,18 \pm 0,02$	$0,401 \pm 0,027$	$-0,40 \pm 0,03$

nd – nie dotyczy.

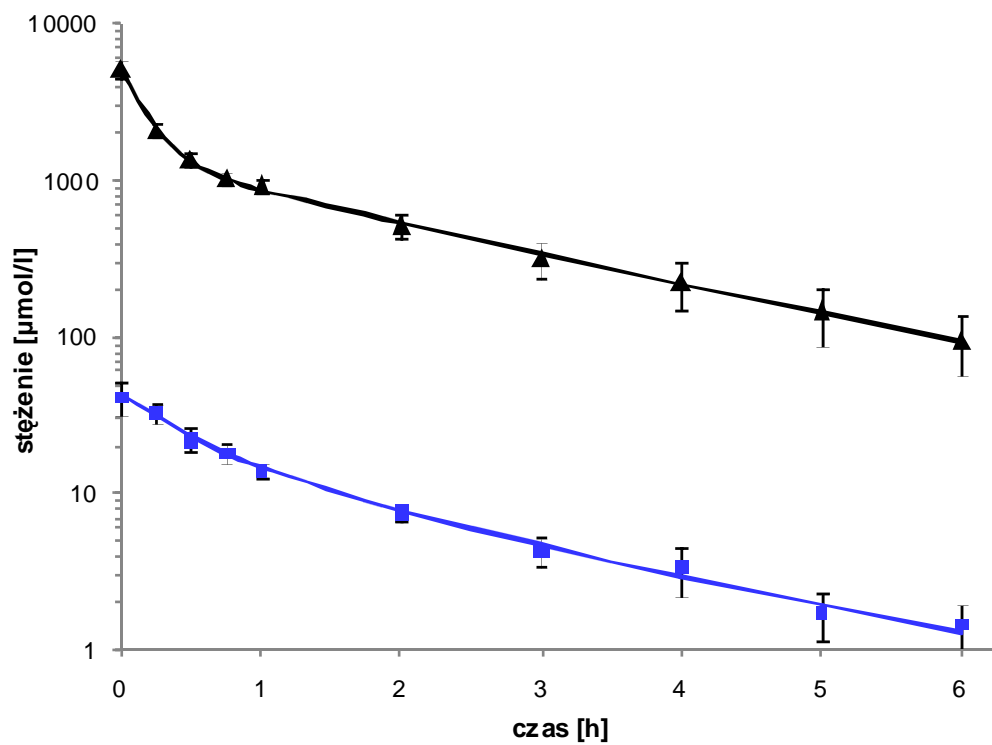
17. Farmakokinetyka TREO i jego epoksytransformerów u królików

17.1. Poziomy TREO i jego epoksytransformerów w próbkach osocza

W Tabeli 37 podano wartości stężeń TREO i S,S-EBDM oznaczone w osoczu królików, którym podano TREO w dawce odpowiadającej 14 g/m^2 u ludzi w przeliczeniu na standardową masę ciała dorosłego mężczyzny (70 kg). W żadnej z badanych próbek osocza pochodzących od królików z grupy I nie stwierdzono stężeń S,S-DEB powyżej LOQ ($1,1 \text{ } \mu\text{mol/l}$). Wartości stężeń (\pm)-DEB obserwowane w osoczu królików grupy II, które otrzymały sam czysty diepoksyd, przedstawiono w Tabeli 38. Wartości stężeń TREO i jego epoksytransformerów oznaczone u królików grupy III, którym podano mieszaninę TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w formie dożylnego bolusa, oraz u dodatkowego królika nr 16, któremu podano sam TREO w dawce identycznej jak w powyższej mieszaninie, zamieszczono w Tabeli 39. Tabela 40 zawiera skorygowane stężenia S,S-EBDM, obliczone jako różnica między stężeniem oznaczonym u królików z grupy III i u królika nr 16. Tak pomniejszone stężenia S,S-EBDM niewieleją wpływ konwersji TREO \rightarrow S,S-EBDM na poziomy epoksytransformer obserwowane u królików po podaniu mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB. Średnie wartości stężeń TREO i jego epoksytransformerów w osoczu królików z grup I – III przedstawiono również na Ryc. 40 – 42.

Tabela 37. Stężenia TREO i S,S-EBDM w osoczu królików grupy I po zakończeniu 15 min wlewu dożylnego TREO w dawce 340 mg/kg m.c.

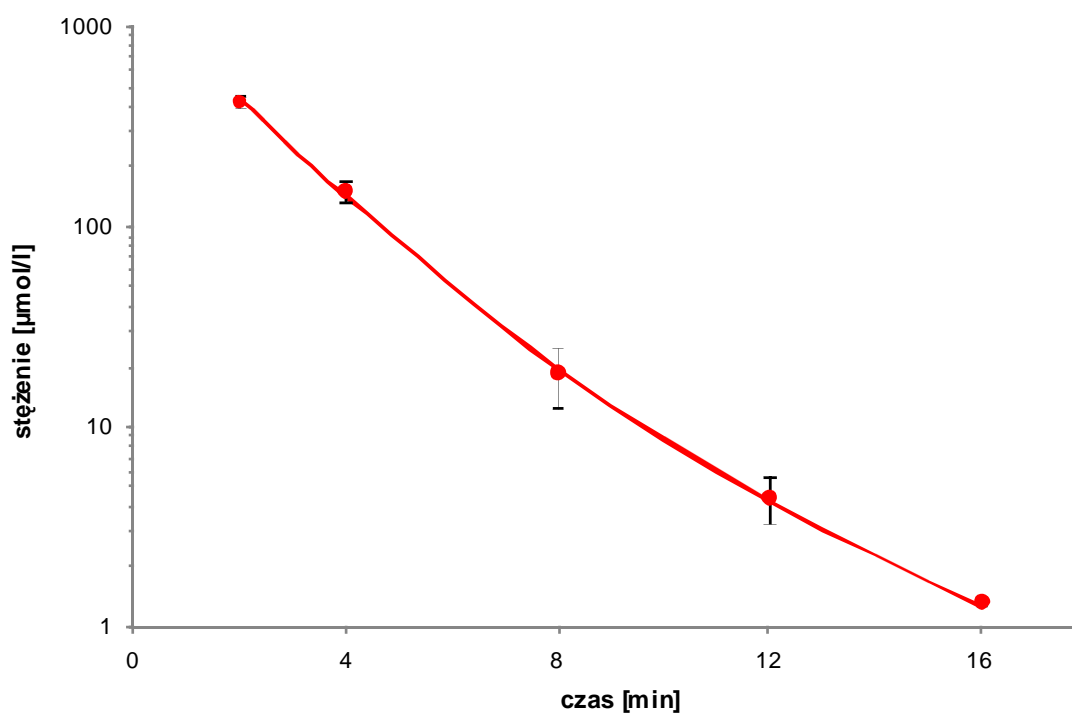
Czas [h]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]					średnia \pm SD
	1	2	Nr królika 3	4	5	
TREO						
0	6228,7	4670,7	4680,7	5686,8	4737,7	5200,9 \pm 717,4
0,25	2444,7	2071,9	2163,7	1985,2	1899,0	2112,9 \pm 210,0
0,5	1533,6	1510,4	1217,9	1328,2	1271,2	1372,3 \pm 142,4
0,75	1190,9	1038,2	985,5	1034,3	976,2	1045,0 \pm 86,2
1	1111,6	912,2	838,5	933,0	884,7	936,0 \pm 104,3
2	669,4	494,1	515,0	435,7	480,3	518,9 \pm 89,0
3	441,8	378,0	263,1	271,5	258,9	322,7 \pm 82,9
4	306,7	261,3	279,4	149,4	132,8	225,9 \pm 79,3
5	216,9	164,9	181,7	102,5	70,3	147,3 \pm 59,7
6	138,9	95,4	128,8	76,4	39,6	95,8 \pm 40,3
S,S-EBDM						
0	34,0	44,1	57,0	39,3	31,1	41,1 \pm 10,2
0,25	26,9	32,1	38,4	37,0	29,9	32,9 \pm 4,8
0,5	21,3	17,0	27,3	23,9	21,0	22,1 \pm 3,8
0,75	17,4	14,7	20,3	20,7	17,2	18,1 \pm 2,5
1	16,3	13,4	13,9	12,6	13,8	14,0 \pm 1,4
2	9,3	7,3	8,1	6,8	6,9	7,7 \pm 1,0
3	4,4	4,3	5,7	3,2	3,7	4,3 \pm 0,9
4	2,9	4,5	4,8	2,1	2,5	3,4 \pm 1,2
5	1,6	2,3	2,3	1,5	0,9	1,7 \pm 0,6
6	1,0	2,0	1,7	1,1	< 0,8	1,5 \pm 0,5



Ryc. 40. Półlogarytmiczny wykres zmian stężeń TREO (▲) i S,S-EBDM (■) (średnia \pm SD, $n = 5$) w osoczu królików z grupy I, uzyskanych po zakończeniu 15 min wlewu dożylnego TREO w dawce 340 mg/kg m.c., jako funkcja czasu w modelu dwukompartamentowym.

Tabela 38. Stężenia (\pm)-DEB w osoczu królików grupy II oznaczone po dożylnym bolusie związku w dawce 50 mg/kg m.c.

Czas [min]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]					średnia \pm SD
	Nr królika					
	6	7	8	9	10	
2	408,9	388,9	454,9	422,1	440,0	423,0 \pm 25,8
4	167,0	146,2	141,8	128,5	173,9	151,5 \pm 18,7
8	25,6	13,5	16,9	12,0	25,0	18,6 \pm 6,4
12	5,7	4,4	4,4	2,6	5,1	4,4 \pm 1,2
16	1,4	1,4	1,3	< 1,1	1,3	1,4 \pm 0,1



Ryc. 41. Półlogarytmiczny wykres zmian stężeń (\pm)-DEB (średnia \pm SD, n = 5) w osoczu królików z grupy II, uzyskanych po podaniu (\pm)-DEB w dawce 50 mg/kg m.c. w formie dożylnego bolusa, jako funkcja czasu w modelu dwukompartmentowym.

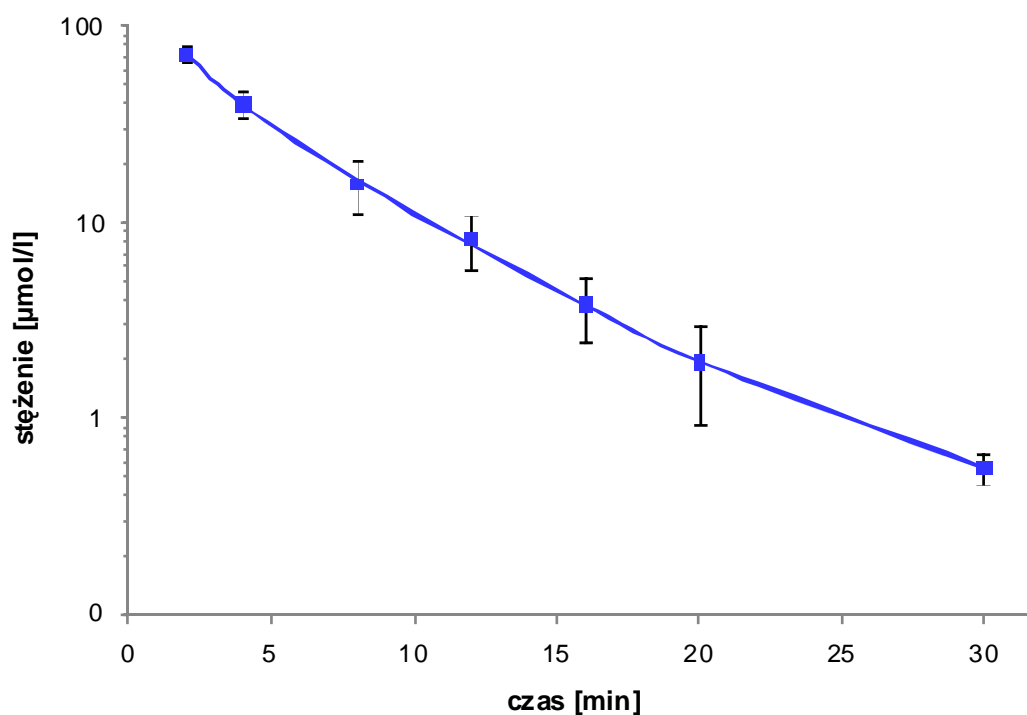
Tabela 39. Stężenia TREO i jego epoksytransformerów w osoczu królików grupy III po dożylnym bolusie mieszanki TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (dawka TREO: $28,0 \pm 1,4$ mg/kg m.c; dawka S,S-EBDM: $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c.; dawka S,S-DEB: $8,2 \pm 0,4$ mg/kg m.c.) oraz w osoczu królika nr 16 po dożylnym bolusie TREO w dawce $27,8$ mg/kg m.c.

Czas [min]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]						średnia \pm SD	16
	Nr królika							
	11	12	13	14	15			
TREO								
2	502,2	495,8	505,1	507,9	557,3	$513,7 \pm 24,8$	535,4	
4	404,7	376,5	359,5	418,5	506,1	$413,1 \pm 56,9$	413,1	
8	309,6	266,4	253,8	315,1	376,3	$304,2 \pm 48,3$	322,7	
12	220,6	211,4	188,5	243,3	261,5	$225,1 \pm 28,3$	233,5	
16	215,9	165,6	160,8	213,5	236,2	$198,4 \pm 33,4$	196,8	
20	183,1	156,7	145,3	183,3	194,7	$172,6 \pm 20,7$	173,9	
30	157,0	120,6	112,4	140,1	160,7	$138,2 \pm 21,4$	152,7	
60	91,4	55,6	68,9	102,9	101,0	$84,0 \pm 20,8$	113,6	
90	69,3	43,7	43,4	79,1	59,7	$59,0 \pm 15,7$	85,0	
S,S-EBDM								
2	73,3	68,2	82,4	81,0	82,1	$77,4 \pm 6,4$	4,1	
4	50,0	42,5	48,9	36,4	50,2	$45,6 \pm 6,0$	4,4	
8	26,5	17,8	21,9	13,6	19,2	$19,8 \pm 4,8$	3,9	
12	14,4	10,8	11,6	7,6	12,9	$11,5 \pm 2,6$	3,1	
16	7,9	5,7	7,3	4,8	8,0	$6,7 \pm 1,4$	2,9	
20	6,4	4,0	5,0	3,7	5,7	$5,0 \pm 1,1$	2,9	
30	3,1	2,3	3,2	2,3	3,4	$2,9 \pm 0,5$	2,7	
60	1,7	1,3	2,0	1,3	2,1	$1,7 \pm 0,4$	2,0	
90	1,2	0,9	1,2	1,0	1,9	$1,2 \pm 0,4$	1,5	
S,S-DEB*								
2	15,5	6,0	11,0	14,8	8,4	$11,2 \pm 4,1$	< 1,1	
4	3,3	2,5	3,0	3,0	0,4	$2,5 \pm 1,2$	< 1,1	

*Stężenia S,S-DEB w próbkach osocza królików grupy III (nr 11 – 15) oraz królika nr 16, uzyskanych w czasie 8 – 90 min były poniżej wartości LOQ (1,1 $\mu\text{mol/l}$).

Tabela 40. Skorygowane stężenia S,S-EBDM w osoczu królików grupy III po dożylnym bolusie mieszanki TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (dawka S,S-EBDM: $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c.)

Czas [min]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]					średnia \pm SD
	Nr królika					
	11	12	13	14	15	
2	69,2	64,1	78,3	76,9	78,0	$73,3 \pm 6,3$
4	46,1	38,6	45,0	32,5	46,3	$41,7 \pm 6,0$
8	22,9	14,1	18,3	9,9	15,6	$16,2 \pm 4,8$
12	11,5	8,0	8,7	4,7	10,1	$8,6 \pm 2,6$
16	5,3	3,0	4,7	2,2	5,3	$4,1 \pm 1,4$
20	3,7	1,3	2,3	1,0	3,0	$2,3 \pm 1,1$
30	1,0	< 0,8	0,9	< 0,8	1,0	$1,0 \pm 0,1$



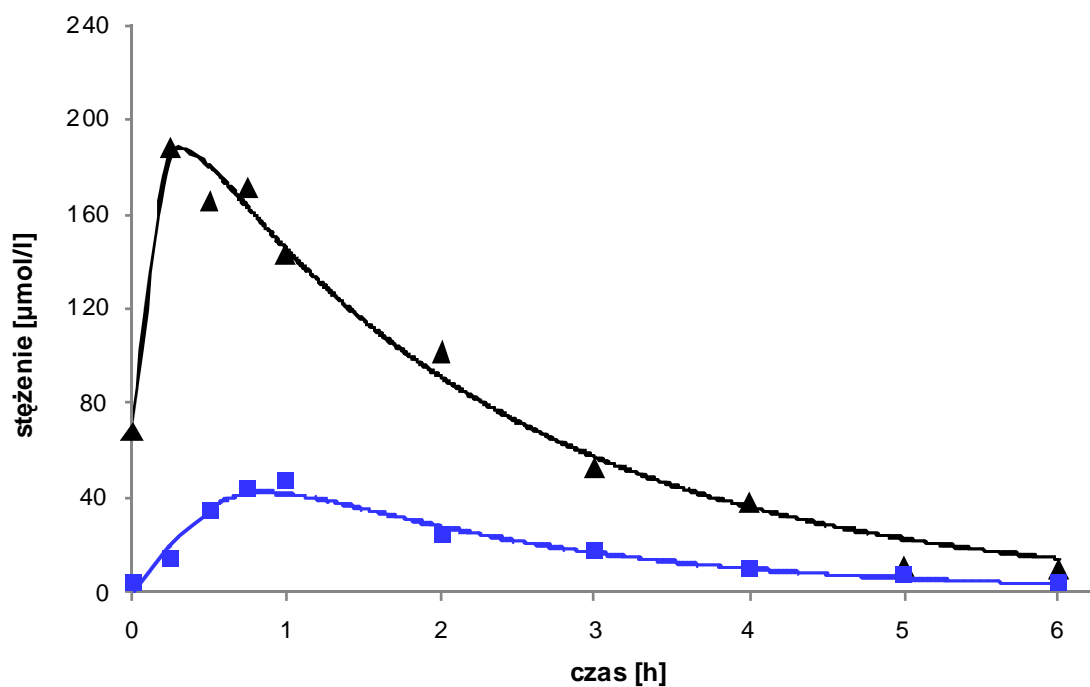
Ryc. 42. Półlogarytmiczny wykres zmian skorygowanych stężeń S,S-EBDM (średnia \pm SD, $n = 5$) w osoczu królików z grupy III, uzyskanych po dożylnym bolusie mieszanki TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (dawka TREO: $28,0 \pm 1,4$ mg/kg m.c.; dawka S,S-EBDM: $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c.; dawka S,S-DEB: $8,2 \pm 0,4$ mg/kg m.c.), jako funkcja czasu w modelu dwukompartmowym.

17.2. Poziomy TREO i jego epoksytransformerów w cieczy wodnistej oka królików

Wartości stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oznaczone w cieczy wodnistej oka królików z grupy I oraz III przedstawiono odpowiednio w Tabeli 41 i na Ryc. 43 oraz w Tabeli 42 i na Ryc. 44.

Tabela 41. Stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w cieczy wodnistej oka królików grupy I po zakończeniu 15 min wlewu dożylnego TREO w dawce 340 mg/kg m.c.

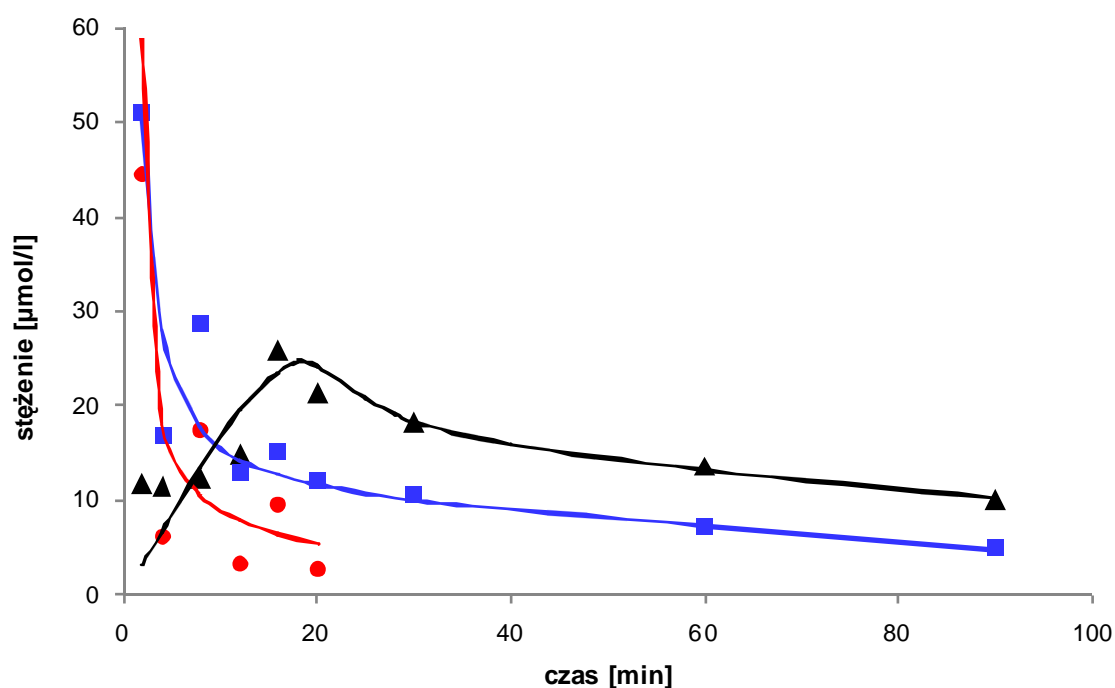
Czas [h]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]		
	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB
0	68,4	4,8	< 1,1
0,25	187,9	13,7	< 1,1
0,5	166,1	34,8	< 1,1
0,75	171,1	43,8	< 1,1
1	143,1	47,0	< 1,1
2	102,0	23,8	< 1,1
3	53,3	17,4	< 1,1
4	38,3	10,0	< 1,1
5	11,5	7,8	< 1,1
6	9,6	4,9	< 1,1



Ryc. 43. Zmiany stężeń TREO (\blacktriangle) i S,S-EBDM (\blacksquare) w cieczy wodnistej oka królików grupy I (2 punkty czasowe/1 królik) po zakończeniu 15-min dożylnego wlewu TREO w dawce 340 mg/kg. Stężenia S,S-DEB były poniżej wartości LOQ (1,1 $\mu\text{mol/l}$).

Tabela 42. Stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w cieczy wodnistej oka królików grupy III po dożylnym bolusie mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (dawka TREO: $28,0 \pm 1,4$ mg/kg m.c.; dawka S,S-EBDM: $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c.; dawka S,S-DEB: $8,2 \pm 0,4$ mg/kg m.c.)

Czas [min]	Stężenie [$\mu\text{mol/l}$]		
	TREO	S,S-EBDM	S,S-DEB
2	11,6	51,1	44,5
4	11,5	17,0	6,3
8	12,5	28,6	17,4
12	14,9	13,0	3,3
16	25,8	15,0	9,7
20	21,4	11,9	2,8
30	18,4	10,7	< 1,1
60	13,7	7,2	< 1,1
90	10,0	4,9	< 1,1



Ryc. 44. Zmiany stężeń TREO (\blacktriangle) i S,S-EBDM (\blacksquare) i S,S-DEB (\bullet) w cieczy wodnistej oka królików grupy III (2 punkty czasowe/1 królik) po dożylnym bolusie mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (dawka TREO: $28,0 \pm 1,4$ mg/kg m.c.; dawka S,S-EBDM: $16,0 \pm 0,7$ mg/kg m.c.; dawka S,S-DEB: $8,2 \pm 0,4$ mg/kg m.c.).

17.3. Parametry farmakokinetyczne TREO i jego epoksytransformerów

Ocenę dopasowania oznaczonych stężeń TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB w osoczu królików z grup I – III do modelu jedno- i dwukompartmentowego przedstawiono w Tabelach 43 – 45. U wszystkich królików z grupy I i II uzyskano lepsze dopasowanie doświadczalnych stężeń odpowiednio TREO i (\pm)-DEB do modelu dwukompartmentowego. Analogiczny wynik uzyskano w przypadku analizy stężeń S,S-EBDM u 8 z 10 królików. U dwóch pozostałych królików (nr 5 i 12) otrzymano niejednoznaczne rozwiązanie, gdyż współczynnik korelacji wskazywał na przewagę modelu dwukompartmentowego, natomiast testy statystyczne Akaike i Schwartz – modelu jednokompartmentowego. Finalnie zatem parametry farmakokinetyczne badanych związków u wszystkich królików obliczono w programie WinNonlin 6.2 z wykorzystaniem modelu dwukompartmentowego i zestawiono w Tabelach 46 – 48.

Tabela 43. Współczynnik korelacji i testy statystyczne oceny dopasowania oznaczonych stężeń TREO i S,S-EBDM w osoczu królików grupy I do modelu jedno- i dwukompartimentowego

Parametr/test	Liczba kompartamentów	Królik 1	Królik 2	Królik 3	Królik 4	Królik 5
TREO						
WT_CORR	1	0,9322	0,9394	0,8910	0,9340	0,9657
	2	0,9991	0,9957	0,9849	0,9911	0,9995
AIC	1	115,6	109,0	116,5	104,1	88,8
	2	77,0	86,7	100,8	88,5	50,1
SBS	1	116,2	109,7	117,1	104,7	89,4
	2	78,2	87,9	102,1	89,7	51,3
S,S-EBDM						
WT_CORR	1	0,9946	0,9262	0,9409	0,9509	0,9909
	2	0,9976	0,9844	0,9928	0,9937	0,9925
AIC	1	-4,26	28,54	26,91	17,62	-0,09
	2	-9,14	16,79	9,78	-0,68	2,29
SBS	1	-3,66	29,15	27,51	18,22	0,30
	2	-7,93	18,00	10,99	0,53	3,08

WT_CORR – ważony współczynnik korelacji; AIC – test Akaike (mniejsza wartość testu wskazuje na lepsze dopasowanie modelu); SBC – test Schwartz (mniejsza wartość testu wskazuje na lepsze dopasowanie modelu).

Tabela 44. Współczynnik korelacji i testy statystyczne oceny dopasowania oznaczonych stężeń (\pm)-DEB w osoczu królików grupy II do modelu jedno- i dwukompartmentowego

Parametr/test	Liczba kompartmentów	Królik 6	Królik 7	Królik 8	Królik 9	Królik 10
WT_CORR	1	0,9904	0,9167	0,9528	0,9465	0,9886
	2	0,9993	0,9895	0,9988	0,9990	0,9995
AIC	1	3,03	13,13	9,65	7,11	3,61
	2	-7,57	5,29	-6,23	-11,43	-10,61
SBS	1	2,25	12,35	8,87	6,33	2,83
	2	-9,13	3,73	-7,80	-12,99	-12,17

Tabela 45. Współczynnik korelacji i testy statystyczne oceny dopasowania oznaczonych stężeń S,S-EBDM w osoczu królików grupy III do modelu jedno- i dwukompartmentowego

Parametr/test	Liczba kompartmentów	Królik 11	Królik 12	Królik 13	Królik 14	Królik 15
WT_CORR	1	0,9966	0,9935	0,9868	0,9729	0,9785
	2	0,9986	0,9948	0,9983	0,9990	0,9968
AIC	1	-12,27	-3,34	-4,43	1,59	-0,32
	2	-15,47	-0,49	-17,20	-14,28	-9,86
SBS	1	-12,38	-3,76	-4,54	1,17	-0,43
	2	-15,69	-1,32	-17,42	-15,12	-10,08

Tabela 46. Parametry farmakokinetyczne TREO i S,S-EBDM wyznaczone w modelu dwukompartmentowym na podstawie stężeń analitów w osoczu królików grupy I po podaniu TREO w dawce 340 mg/kg m.c.

Czas [h]	Królik 1	Królik 2	Królik 3	Królik 4	Królik 5	średnia ± SD
TREO						
AUC _{0→∞} [μmol × h/l]	5557	4425	4333	4128	3741	4437 ± 679
C _{max} [μmol/l]	6200	4552	4487	5517	4746	5100 ± 739
V _{ss} [l/kg]	0,409	0,493	0,595	0,405	0,407	0,462 ± 0,083
V _c [l/kg]	0,116	0,179	0,190	0,131	0,143	0,152 ± 0,032
V _t [l/kg]	0,293	0,312	0,405	0,274	0,262	0,309 ± 0,057
Cl _{tot} [l/(h × kg)]	0,220	0,277	0,281	0,295	0,326	0,280 ± 0,038
t _{0,5α} [h]	0,12	0,15	0,19	0,12	0,10	0,14 ± 0,04
t _{0,5β} [h]	1,73	1,64	2,13	1,36	1,12	1,60 ± 0,38
S,S-EBDM						
AUC _{0→∞} [μmol × h/l]	54,0	58,2	78,1	54,8	47,5	58,5 ± 11,6
C _{max} [μmol/l]	33,4	44,6	60,6	41,9	32,8	42,6 ± 11,3
t _{0,5α} [h]	0,38	0,26	0,27	0,55	0,31	0,35 ± 0,12
t _{0,5β} [h]	1,31	2,13	1,77	2,54	1,06	1,76 ± 0,60

AUC_{0→∞}, pole pod krzywą stężenie leku w osoczu – czas; Cl_{tot}, klirens ogólnoustrojowy; C_{max}, maksymalne stężenie leku w osoczu; t_{0,5α}, okres półtrwania fazy dystrybucji; t_{0,5β}, okres półtrwania fazy eliminacji; V_c, objętość kompartmentu centralnego; V_{ss}, objętość dystrybucji w stanie stacjonarym; V_t, objętość kompartmentu tkankowego.

Tabela 47. Parametry farmakokinetyczne (\pm)-DEB wyznaczone w modelu dwukompartmentowym na podstawie stężeń analitu w osoczu królików grupy II po podaniu (\pm)-DEB w dawce 50 mg/kg m.c.

Czas [h]	Królik 6	Królik 7	Królik 8	Królik 9	Królik 10	średnia \pm SD
AUC _{0→∞} [$\mu\text{mol} \times \text{h/l}$]	38,8	40,5	45,5	41,7	41,3	41,5 \pm 2,5
C _{max} [$\mu\text{mol/l}$]	1132	1537	1748	1616	1231	1453 \pm 261
V _{ss} [l/kg]	0,542	0,421	0,370	0,383	0,493	0,442 \pm 0,074
V _c [l/kg]	0,513	0,378	0,332	0,359	0,472	0,411 \pm 0,077
V _t [l/kg]	0,0293	0,0431	0,0375	0,0238	0,0215	0,0310 \pm 0,0091
Cl _{tot} [l/(h \times kg)]	15,0	14,4	12,8	13,9	14,0	14,0 \pm 0,8
t _{0,5α} [h]	0,0217	0,0171	0,0165	0,0173	0,0222	0,0190 \pm 0,0028
t _{0,5β} [h]	0,0399	0,0523	0,0415	0,0511	0,0471	0,0464 \pm 0,0056

Tabela 48. Parametry farmakokinetyczne S,S-EBDM wyznaczone w modelu dwukompartmentowym na podstawie stężeń analitu w osoczu królików grupy III po podaniu związku w dawce 16,0 \pm 0,7 mg/kg m.c. w postaci mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB

Czas [h]	Królik 11	Królik 12	Królik 13	Królik 14	Królik 15	średnia \pm SD
AUC _{0→∞} [$\mu\text{mol} \times \text{h/l}$]	9,06	7,65	8,99	8,54	9,72	8,79 \pm 0,76
C _{max} [$\mu\text{mol/l}$]	102,4	144,6	129,6	257,9	187,3	164,4 \pm 60,6
V _{ss} [l/kg]	0,913	0,741	0,807	0,509	0,762	0,746 \pm 0,148
V _c [l/kg]	0,855	0,565	0,688	0,337	0,497	0,588 \pm 0,196
V _t [l/kg]	0,058	0,176	0,118	0,172	0,266	0,158 \pm 0,077
Cl _{tot} [l/(h \times kg)]	9,66	10,67	9,92	10,18	9,56	10,00 \pm 0,44
t _{0,5α} [h]	0,0457	0,0120	0,0362	0,0149	0,0194	0,0256 \pm 0,0146
t _{0,5β} [h]	0,1189	0,0568	0,1572	0,0620	0,0977	0,0694 \pm 0,0132

17.4. Analiza statystyczna parametrów farmakokinetycznych TREO i jego epoksytransformerów

Wartości parametrów farmakokinetycznych V_{ss} , V_c , V_t , Cl_{tot} , $t_{0,5\alpha}$ i $t_{0,5\beta}$ TREO i jego epoksytransformerów wyznaczone w modelu dwukompartmentowym na podstawie stężeń analitów w osoczu królików z grup I – III charakteryzowały się rozkładem normalnym ($p > 0,05$ w teście Shapiro-Wilka). Dodatkowo wartości V_{ss} , V_t i Cl_{tot} cechowały się jednorodnością wariancji w analizowanych grupach ($p > 0,05$ w teście Levene'a), natomiast wariancje V_c , $t_{0,5\alpha}$ i $t_{0,5\beta}$ były statystycznie różne (odpowiednio $p = 0,0325$, $p = 0,0047$ i $p = 0,0029$ w teście Levene'a). Test ANOVA wykazał, iż między średnimi wartościami wszystkich wymienionych parametrów farmakokinetycznych TREO i jego epoksytransformerów występują statystycznie istotne różnice (Tabela 49). Istotność różnic między wszystkimi możliwymi parami średnich poszczególnych parametrów farmakokinetycznych określono w analizie post-hoc za pomocą testu Tukey'a, którego wyniki zamieszczono w Tabelach 50 – 55.

Tabela 49. Ocena statystyczna różnic między wartościami parametrów farmakokinetycznych (średnia \pm SD, n = 5) TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Parametr	TREO grupa I	S,S-EBDM grupa I	S,S-EBDM grupa III	(\pm)-DEB grupa II	ANOVA ($\alpha = 0,05$)
V_{ss} [l/kg]	0,462 \pm 0,083	nd	0,746 \pm 0,148	0,442 \pm 0,074	p = 0,0011
V_c [l/kg]	0,152 \pm 0,032	nd	0,588 \pm 0,196	0,411 \pm 0,077	p = 0,0004
V_t [l/kg]	0,309 \pm 0,057	nd	0,158 \pm 0,077	0,031 \pm 0,009	p < 0,0001
Cl_{tot} [l/(h \times kg)]	0,28 \pm 0,04	nd	10,00 \pm 0,44	14,0 \pm 0,8	p < 0,0001
$t_{0,5\alpha}$ [h]	0,14 \pm 0,04	0,35 \pm 0,12	0,026 \pm 0,015	0,019 \pm 0,003	p < 0,0001
$t_{0,5\beta}$ [h]	1,60 \pm 0,38	1,76 \pm 0,60	0,069 \pm 0,013	0,046 \pm 0,006	p < 0,0001

nd – nie dotyczy.

Tabela 50. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości V_{ss} TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0034	NS
S,S-EBDM (grupa III)	p = 0,0034	nd	p = 0,0021
(\pm)-DEB (grupa II)	NS	p = 0,0021	nd

nd – nie dotyczy; NS – brak istotnie statystycznej różnicy

Tabela 51. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości V_c TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0005	p = 0,0154
S,S-EBDM (grupa III)	p = 0,0005	nd	NS
(\pm)-DEB (grupa II)	p = 0,0154	NS	nd

nd – nie dotyczy; NS – brak istotnie statystycznej różnicy.

Tabela 52. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości V_t TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0028	p = 0,0002
S,S-EBDM (grupa III)	p = 0,0028	nd	p = 0,0093
(\pm)-DEB (grupa II)	p = 0,0002	p = 0,0093	nd

nd – nie dotyczy.

Tabela 53. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości Cl_{tot} TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0002	p = 0,0002
S,S-EBDM (grupa III)	p = 0,0002	nd	p = 0,0002
(\pm)-DEB (grupa II)	p = 0,0002	p = 0,0002	nd

nd – nie dotyczy.

Tabela 54. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości $t_{0,5\alpha}$ TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0004	NS	p = 0,0418
S,S-EBDM (grupa I)	p = 0,0004	nd	p = 0,0002	p = 0,0002
S,S-EBDM (grupa III)	NS	p = 0,0002	nd	NS
(\pm)-DEB (grupa II)	p = 0,0418	p = 0,0002	NS	nd

nd – nie dotyczy; NS – brak istotnie statystycznej różnicy

Tabela 55. Wyniki testu Tukey'a porównań wielokrotnych średnich wartości $t_{0,5\beta}$ TREO, S,S-EBDM i (\pm)-DEB u królików z grup I – III

Związek (nr grupy królików)	TREO (grupa I)	S,S-EBDM (grupa I)	S,S-EBDM (grupa III)	(\pm)-DEB (grupa II)
TREO (grupa I)	nd	p = 0,0002	NS	p = 0,0002
S,S-EBDM (grupa I)	NS	nd	p = 0,0002	p = 0,0002
S,S-EBDM (grupa III)	p = 0,0002	p = 0,0002	nd	NS
(\pm)-DEB (grupa II)	p = 0,0002	p = 0,0002	NS	nd

nd – nie dotyczy; NS – brak istotnie statystycznej różnicy

17.5. Stopień przenikania TREO i jego epoksytransformerów do cieczy wodnistej oka królików

Wartości C_{\max} TREO i jego epoksytransformerów obserwowane w cieczy wodnistej i osoczu królików z grupy I i III oraz ich odpowiednie stosunki przedstawiono w Tabeli 56.

Tabela 56. Wartości C_{\max} dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w cieczy wodnistej i osoczu królików grupy I (po wlewie dożylnym TREO) i grupy III (po dożylnym bolusie mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB)

Związek	Matryca	Grupa I		Grupa III	
		t_{\max} [min]*	C_{\max} [$\mu\text{mol/l}$]	t_{\max} [min]	C_{\max} [$\mu\text{mol/l}$]
TREO	ciecz wodnista (a)	15	187,9	16	25,8
	osocze (b)	0	5200,9	2	513,7
	stosunek (a/b)	nd	0,036	nd	0,050
S,S-EBDM	ciecz wodnista (a)	60	47,0	2	51,1
	osocze (b)	0	41,1	2	73,3
	stosunek (a/b)	nd	1,141	nd	0,697
S,S-DEB	ciecz wodnista (a)	nd	< 1,1	2	44,5
	osocze (b)	nd	< 1,1	2	11,2
	stosunek (a/b)	nd	nd	nd	3,946

* czas liczony od zakończenia 15 min wlewu TREO; nd – nie dotyczy.

VI. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

TREO jest specyficznym prolekiem, którego aktywacja do epoksydów o właściwościach alkilujących zachodzi w warunkach fizjologicznego pH i temperatury krwi ludzkiej bez udziału enzymów. Został on wprowadzony do leczenia onkologicznego 30 lat temu. Aktualnie istnieje realna możliwość jego zarejestrowania również do kondycjonowania przed HSCT u dzieci, jak i osób dorosłych. Pomimo powyższych faktów, do tej pory przeprowadzono badania farmakokinetyczne jedynie samego leku macierzystego, natomiast brak jest danych o farmakokinetyce jego epoksytransformerów odpowiedzialnych za działanie biologiczne. Nie zbadano również kinetyki reakcji aktywacji TREO do S,S-EBDM i S,S-DEB w warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C, ani nie wyznaczono doświadczalnie wartości P_{OW} trzech powyższych związków. Realizacji tych zadań podjęto się więc w niniejszej pracy.

1. Metody analityczne

W pierwszej kolejności opracowano odpowiednie metody analityczne oznaczania TREO i jego epoksypochodnych. Zarówno badania kinetyczne, jak i farmakokinetyczne wymagają analizy ilościowej wielu próbek pobranych w ustalonych punktach czasowych. Z tej przyczyny optymalna technika analityczna powinna umożliwiać szybkie, najlepiej bezpośrednie i równoczesne, oznaczenie wszystkich analitów. W przypadku TREO i jego epoksytransformerów, zagadnienie to wydaje się jednak problematyczne. Zarówno lek macierzysty, jak i jego epoksypochodne są związkami o prostej budowie, nieposiadającymi układu chromoforowego, stąd nie mogą być bezpośrednio oznaczone powszechnie stosowaną i względnie taną metodą HPLC z detekcją UV. Opisane w literaturze metody GC z detekcją spektrometrii mas wyposażoną w źródło jonizacji strumieniem elektronów (GC-EI-MS) lub z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) są powszechnie stosowane w analizie stereoizomerów DEB, jednak nie mogą być wykorzystane do bezpośredniego oznaczania TREO i S,S-EBDM z powodu małej lotności tych dwóch związków [19,108-113,124]. Z kolei nowoczesna metoda HPLC-ESI-MS/MS, uważana obecnie za jedną z najczulszych technik analitycznych, nie pozwala na bezpośrednie oznaczanie S,S-DEB, gdyż jego cząsteczka nie ulega w ogóle jonizacji w źródle niskoenergetycznym, takim jak ESI [125]. Dodatkowo metodyka oznaczania TREO i produktów jego aktywacji musi uwzględniać odpowiednie przygotowanie zebranych próbek, zapewniające efektywne zahamowanie aktywacji TREO i S,S-EBDM zależnej od pH, a przez to trwałość analitów [16]. Do niedawna w literaturze opisana była tylko metoda HPLC-RID oznaczania samego TREO

w osoczu i moczu u ludzi [86,104]. Ostatnio została również opublikowana pośrednia metoda HPLC-UV dla jednoczesnego oznaczania S,S-EBDM i S-DEB w osoczu ludzkim, po uprzedniej derywatywacji analitów za pomocą 3-NBS. Nie umożliwia ona jednak oznaczenia TREO, a dodatkowo wymaga ponad 30 min analizy chromatograficznej pojedynczej próbki [16]. Wspomniane metody zostały opracowane w Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Na ich bazie opracowano nowe metody, które wykorzystano w badaniach będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej. W celu jednoczesnego oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych zmodyfikowano metodę HPLC-RID [104] oznaczania samego TREO w osoczu i moczu ludzkim. Główna modyfikacja polegała na zmianie składu fazy ruchomej z mieszaniny buforu fosforanowego o pH 5,0 i acetonitrylu (85:15, v/v) na mieszaninę buforu octanowego o pH 4,5 i acetonitrylu (95:5, v/v). Pozwoliła ona uniknąć wymywania S,S-EBDM i S,S-DEB z kolumny chromatograficznej z czołem fazy ruchomej, przez co umożliwiła ich oznaczenie w jednym cyklu analitycznym razem z lekiem macierzystym. W związku ze zmniejszeniem ilości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej, dla skrócenia czasu analizy zmieniono również IS z barbitalu na bardziej hydrofilowy paracetamol (IS1), który w nowych warunkach ulegał znacznie szybszej elucji z kolumny chromatograficznej o odwróconym układzie faz. Tak zmodyfikowaną metodę wykorzystano nie tylko do oznaczania TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w roztworach buforowych podczas badań kinetycznych i wyznaczania P_{ow} , ale również do analizy ilościowej samego TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików podczas badań farmakokinetycznych. Metoda ta była jednak niewystarczająco czuła do oznaczenia niskich poziomów epoksy pochodnych TREO w obu badanych matrycach biologicznych. W tym celu opracowano metodę HPLC z bardziej czułą detekcją UV, zamiast RID, która stanowiła modyfikację wcześniej opublikowanej procedury analitycznej [16]. Dzięki wprowadzeniu elucji gradientowej analitów, zamiast elucji izokratycznej, uzyskano skrócenie czasu analizy chromatograficznej z ponad 30 do 20 min.

Spośród TREO i jego epoksytransformerów komercyjnie dostępną substancją jest jedynie lek macierzysty, dlatego należało rozwiązać problem pozyskania odpowiednich wzorców referencyjnych dla S,S-EBDM i S,S-DEB. Zamiast czystego enancjomerycznie S,S-DEB użyto łatwo dostępnego racematu (\pm)-DEB. Natomiast S,S-EBDM uzyskiwano *in statu nascendi* w roztworze wodnym przez alkalizację TREO równomolową ilością NaOH, która skutkowała otrzymaniem roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB.

Podobną metodologię uzyskania S,S-EBDM stosowano we wcześniejszych badaniach, a stosunek molowy początkowej ilości TREO do NaOH wynosił również 1:1 albo 1:1,33 [8,16]. Aby potwierdzić tożsamość uzyskanego wzorca S,S-EBDM przeprowadzono analizę otrzymanego roztworu metodą HPLC-ESI-MS. Na uzyskanym chromatogramie HPLC-MS (Ryc. 15b) obecne były piki dwóch z trzech związków zarejestrowanych na chromatogramie HPLC-RID (Ryc. 15a) w identycznych warunkach chromatograficznych. Jeden z nich pochodził od TREO, którego czas retencji był wcześniej znany dzięki użyciu czystego wzorca substancji, natomiast drugi pik, niebędący pikiem S,S-DEB, sugerował obecność S,S-EBDM. Na chromatografie HPLC-MS nie obserwowano sygnału pochodzącego od S,S-DEB, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, iż związek ten nie ulega jonizacji w warunkach ESI [125]. Tożsamość S,S-EBDM jednoznacznie potwierdziła analiza zarejestrowanych widm masowych (Ryc. 15c,d), w których jony o masach 205,1 i 301,1, odpowiadające dokładnie masom adduktów sodowych kolejno S,S-EBDM i TREO, były najbardziej intensywne. Warto podkreślić, iż opisane wyniki są pierwszymi danymi dotyczącymi analizy masowej TREO i S,S-EBDM. Wcześniej metodą HPLC-ESI-MS analizowano jedynie strukturę estrowych pochodnych S,S-EBDM i S,S-DEB po derywatywacji z 3-NBS [16]. Zgodnie z modelem aktywacji TREO według Feita i wsp. [6], zakładającym, iż stała k_1 jest dokładnie dwukrotnie większa od stałej k_2 , stężenia związków w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB otrzymanym w niniejszej pracy przez alkalizację TREO równomolową ilością NaOH powinny wynosić odpowiednio 5, 10 i 5 mmol/l. Jednakże w celu uzyskania wiarygodnych wyników, na każdym etapie badań doświadczalnie ustalano dokładny skład powyższego roztworu oraz jego rozcieńczeń (Załącznik 1), stosowanych jako roztwory wzorcowe S,S-EBDM w badaniach kinetycznych i analizie P_{ow} lub jako roztwory wzorcowe zarówno S,S-EBDM, jak i S,S-DEB w badaniach farmakokinetycznych. Przeprowadzone analizy wykazały, iż rzeczywiste stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w omawianym roztworze podstawowym o sumarycznym stężeniu związków 20 mmol/l były równe odpowiednio 5,88, 8,59 i 5,53 mmol/l lub 5,66, 9,20 i 5,14 mmol/l, więc nieznacznie odbiegały od wartości teoretycznych, w granicach 3 – 18%. Mniejsze różnice wartości doświadczalnych i teoretycznych, wynoszące dla wszystkich związków około 2%, uzyskano w innej pracy podczas otrzymywania roztworu TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o sumarycznym stężeniu związków 1 mmol/l [16]. Było to prawdopodobnie spowodowane mniejszym stężeniem roztworu, przy którym reakcje zachodziły w sposób bardziej zbliżony do modelu teoretycznego ($k_1 = 2 k_2$). Za taką

przyczyną przemawia również fakt, iż w roztworze TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB o całkowitym stężeniu analitów 150 mmol/l, przygotowanym w niniejszej pracy do podania królikom z grupy III, stężenia poszczególnych związków wynosiły odpowiednio $50,3 \pm 2,6$, $43,8 \pm 2,0$ i $47,8 \pm 2,0$ mmol/l, zamiast teoretycznie oczekiwanych wartości 37,5, 75,0 i 37,5 mmol/l. Z tej przyczyny rzeczywiste stężenia TREO i jego epoksytransformerów były oznaczane w powyższym roztworze każdorazowo po jego przygotowaniu.

Przed rozpoczęciem badań kinetycznych, farmakokinetycznych i analizą P_{ow} przeprowadzono walidację opracowanych metod HPLC-RID i HPLC-UV oznaczania TREO i jego epoksy pochodnych w roztworach buforowych o pH 7,4, roztworze ABS o pH 4,4 oraz osoczu króliczym. W przypadku analizy badanych związków w roztworach buforowych o pH 7,4 metodą HPLC-RID, pełną walidację przeprowadzono dla 0,0730 mol/l buforu fosforanowego o sile jonowej 0,19 mol/l, a dla pozostałych buforów potwierdzono dokładność metody przez oznaczenie stężenia analitów w QCs. Z przyczyn praktycznych, związanych z brakiem możliwości uzyskania wystarczającej ilości specyficznej matrycy biologicznej, nie walidowano metod HPLC-RID i HPLC-UV oznaczania odpowiednio TREO i jego epoksy pochodnych w cieczy wodnistej oka królików. Analizę związków w powyższej matrycy oparto o krzywe wzorcowe uzyskane dla osocza.

Metody HPLC-RID oznaczania TREO i jego epoksy pochodnych w roztworach buforowych o pH 7,4 i buforze ABS oraz oznaczania samego TREO w osoczu i cieczy wodnistej oka królików zapewniały całkowity rozdział analitów i IS1 (paracetamolu) (Ryc. 16 i 17). Dla każdej pary pików współczynnik R_s przyjmował wartości powyżej 2,5. Dodatkowo o selektywności metody świadczył brak interferencji analizowanych związków ze składnikami matrycy, w tym osocza i cieczy wodnistej oka królików, którym oprócz badanych związków podawano heparynę, ksylazynę i ketaminę. W porównaniu z wcześniej opublikowaną metodą HPLC-RID przeznaczoną do analizy TREO w osoczu i moczu ludzi [104], zastosowanie krótszej kolumny HPLC (150 mm zamiast 250 mm) oraz paracetamolu zamiast barbitalu jako IS1 pozwoliło skrócić czas analizy z 13 do 9 min, pomimo użycia fazy ruchomej o mniejszej zawartości acetonitrylu (5% zamiast 15%), a więc mniejszej sile elucji. Liniowość krzywych wzorcowych ($n = 5$) poszczególnych związków w analizowanych matrycach obejmowała podobne zakresy stężeń: 20,0 – 6000,0 $\mu\text{mol/l}$ i 20,0 – 5000,0 $\mu\text{mol/l}$ dla oznaczania TREO odpowiednio w roztworach buforowych i osoczu króliczym; 34,4 – 8588,7 $\mu\text{mol/l}$ i 36,8 – 9203,5 $\mu\text{mol/l}$ dla oznaczania S,S-EBDM odpowiednio w roztworach buforowych o pH 7,4 i buforze ABS oraz 50,0 – 6000,0 $\mu\text{mol/l}$

dla oznaczania S,S-DEB w roztworach buforowych o pH 7,4 i buforze ABS o pH 4,4 (Tabela 9). Równania wszystkich prostych przyjęły postać $y = ax$, gdyż wartość przesunięcia b , oceniona testem t-Studenta, nie różniła się statystycznie istotnie od zera. O wysokim stopniu dopasowania uzyskanych danych do linii regresji świadczyły bliskie jedności współczynniki korelacji. Liniowy model regresji potwierdził dodatkowo test Mandela, w którym obliczona wartość testowa TV była każdorazowo mniejsza od wartości krytycznej F_{kryt} (Tabela 9). Wartości LOQ, wyznaczone z precyzją $\geq 81,2\%$ i dokładnością $\geq 81,9\%$, wynosiły od 20,0 do 50,0 $\mu\text{mol/l}$ i pozwoliły uzyskać pełne profile zmian stężeń badanych związków w badaniach kinetycznych i farmakokinetycznych. Z kolei wartości LOD, oszacowane dla stosunku sygnału analitu do szumu linii podstawowej $S/N = 3:1$, były równe od 10 do 20 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 10). Dla porównania, w dotychczas opublikowanych metodach HPLC-RID oznaczania TREO w ludzkim osoczu i moczu uzyskiwano LOQ w zakresie 3,6 – 179,7 $\mu\text{mol/l}$ [86,104]. Stosowana w niniejszej pracy metoda HPLC-RID cechowała się wysoką precyzją i dokładnością oznaczeń, zarówno w ciągu dnia, jak i między dniami (Tabele 11 – 13). Krzywe wzorcowe ustalone dla TREO i jego epoksytransformerów w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4 zapewniały wysoką dokładność analizy ilościowej związków również w pozostałych roztworach buforowych o pH 7,4, o czym świadczył błąd oznaczeń $\leq 13,2\%$ na poziomie LOQ oraz $\leq 10,3\%$ dla wyższych stężeń analitów (Tabela 14 i 15). Odzysk TREO z osocza był praktycznie całkowity i powtarzalny (Tabela 16). Ponieważ do izolacji leku z osocza stosowano próbki ultrafiltracyjne o punkcie odcięcia 30 kDa, uzyskana wartość odzysku 92 – 102% dowodzi, iż TREO praktycznie nie ulega wiązaniu z białkami osocza króliczego. W opublikowanych doniesieniach wartości odzysku leku z osocza ludzkiego były bardzo zróżnicowane i wynosiły 40 – 48% [104] oraz 94% [86]. W ramach walidacji metody HPLC-RID oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o pH 7,4 przeprowadzono również badania stabilności analitów. Podczas przechowywania roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w temperaturze 4 °C lek macierzysty był stabilny przez cały okres objęty testem (7 dni), natomiast trwałość jego epoksytransformerów, zwłaszcza S,S-DEB, była mniejsza (Ryc. 19). Podobne wyniki uzyskano w testach trwałości analitów w próbach 0,0730 mol/l buforu fosforanowego doprowadzonego do pH poniżej 5,0 za pomocą kwasu cytrynowego w celu zahamowania aktywacji TREO. Lek macierzysty był stabilny zarówno w czasie długotrwałego zamrożenia w temperaturze -25 °C, jak i po rozmrożeniu prób (Ryc. 20). Wyniki te są zgodne z danymi

dotyczącymi trwałości TREO w osoczu i moczu ludzkim [86,104]. W testach obejmujących 1 – 3 dni, trwałością cechował się również S,S-EBDM. Wyraźny rozkład związku zaobserwowano dopiero po 135 dniach przechowywania prób w stanie zamrożenia. W zestawieniu z TREO i S,S-EBDM, najmniejszą stabilnością odznaczał się S,S-DEB, gdyż w próbach poddanych długotrwałemu zamrożeniu stopień jego rozkładu wyniósł aż 70%. Uzyskane wyniki uzasadniały potrzebę przygotowywania każdorazowo świeżych roztworów podstawowych i wzorcowych epoksy pochodnych TREO, zwłaszcza S,S-DEB, oraz oznaczania próbek pozyskanych we wszystkich badaniach w krótkim czasie po ich zebraniu.

Przeprowadzono także walidację metody HPLC-UV oznaczania S,S-EBDM i S,S-DEB w osoczu króliczym. O jej selektywności świadczył fakt, iż na chromatogramach nie obserwowano pików pochodzących od składników matrycy, a jedynie od zderywatyzowanych epoksytransformerów TREO, IS2 (2,2'-DNBP) oraz odczynnika derywatyzującego 3-NBS (Ryc. 18). Uzyskano częściowy (R_s 1,4 – 1,5) lub prawie całkowity (R_s 1,8 – 1,9) rozdział głównych produktów derywatyzacji odpowiednio S,S-EBDM i S,S-DEB od pobocznych izomerycznych produktów ich reakcji z 3-NBS. Liniowy przebieg krzywych wzorcowych ($n = 5$) obejmował zakres stężeń analitów w osoczu 0,8 – 858,9 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-EBDM i 1,1 – 552,7 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-DEB (Tabela 9). Obie proste opisane były równaniem typu $y = ax$ (wartość testowa $|b|/S_b < t_{\alpha,n-2}$), a liniowy model regresji potwierdzały wysokie wartości współczynników korelacji oraz wynik testu Mandela (Tabela 9). Wartości LOD wyznaczone dla sygnału analitu do szumu linii bazowej S/N równego przynajmniej 3:1 wynosiły 0,3 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-EBDM oraz 0,2 $\mu\text{mol/l}$ dla S,S-DEB, a wartości LOQ były równe odpowiednio 0,8 i 1,1 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 9). Podobne wartości LOD (0,13; 0,3 $\mu\text{mol/l}$) notowano w bezpośrednich metodach GC-EI-MS oznaczania DEB w osoczu, w których również stosowano ekstrakcję analitów metodą ciec-z-ciecz [108,109], natomiast większą wartość 1,3 $\mu\text{mol/l}$ uzyskano w metodzie GC-FID oznaczania DEB w wodnej zawiesinie mikrosomów ludzkich [124]. Większą czułością charakteryzowały się za to pośrednie metody HPLC-ESI-MS/MS, pozwalające osiągnąć LOD dla DEB na poziomie 0,3 – 5 nmol/l. Jednakże wykorzystuje się w nich derywatyzację pierścienia epoksydowego za pomocą N,N-dietyloditiokarbaminianu sodu lub 4-benzylopiperydyny w środowisku zasadowym, co wyklucza możliwość analizy S,S-DEB w obecności TREO lub S,S-EBDM [115,126]. Stosowana w niniejszej pracy metoda HPLC-UV oznaczania S,S-EBDM i S,S-DEB lub (\pm)-DEB w osoczu króliczym była odpowiednio precyzyjna (CV 1,3 – 14,9%) i dokładna (błąd oznaczeń 0,1 – 18,1%) (Tabela 13). Ponadto zapewniała ona wysoki odzysk

analitów z osocza, wynoszący 72,2 – 74,8% i 79,0 – 89,9% odpowiednio dla S,S-EBDM oraz S,S-DEB (Tabela 16). Podsumowując, można stwierdzić, iż opracowane metody HPLC-RID i HPLC-UV oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych i osoczu króliczym były odpowiednio selektywne, dokładne i precyzyjne oraz zapewniały trwałość analitów w trakcie ich oznaczeń.

2. Badania kinetyczne

Badania kinetyczne transformacji TREO przeprowadzono w temperaturze 37 °C w roztworach buforowych o stałym pH 7,4, lecz o różnej sile jonowej i składzie jonowym, celem weryfikacji wpływu elektrolitów na przebieg reakcji. Początkowe stężenie TREO w roztworach, równe 0,5, 1,0 i 2,5 mmol/l, odpowiadało stężeniom C_{max} obserwowanym u pacjentów po 2 h wlewie dożylnym leku w dawce odpowiednio 8, 10 – 14 i 20 – 26 g/m² [5,86,102]. W badaniach wykorzystano opracowaną i zwalidowaną bezpośrednią metodę HPLC-RID, która pozwalała na śledzenie zmian stężeń indywidualnych analitów, tj. TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, w sposób niezależny od siebie. Nie było to możliwe we wcześniejszych pracach dotyczących kinetyki aktywacji TREO, w których zamiast bezpośredniego oznaczania związków, stosowano pomiar objętości NaOH potrzebnej do zmiareczkowania kwasu metanosulfonowego, uwalniającego się podczas aktywacji leku macierzystego [6,13,14]. Ilość tego kwasu odzwierciedla bowiem jedynie sumaryczną ilość S,S-EBDM i S,S-DEB, tworzącą się podczas przemiany ugrupowania β -hydroksymetanosulfonowego do pierścienia epoksydowego na drodze wewnątrzcząsteczkowej S_N2 . Śledzenie przyrostu stężenia kwasu metanosulfonowego w czasie umożliwiało wyznaczenie stałej szybkości sumarycznej przemiany TREO \rightarrow S,S-DEB, która *de facto* odpowiada liczbowo stałej k_2 , opisującej wolniejszy etap tej złożonej reakcji, mianowicie S,S-EBDM \rightarrow S,S-DEB. Wartość tej stałej obliczano z nachylenia prostoliniowego wykresu logarytmu $C_\infty/(C_\infty - C_t)$, będącego malejącą funkcją czasu, gdzie C_t i C_∞ oznacza stężenie kwasu metanosulfonowego odpowiednio po czasie t i na końcu reakcji [6,13,14]. Jak zauważyli Feit i wsp. [6], uzyskanie dla złożonej reakcji aktywacji TREO wspomnianej zależności liniowej, specyficznej dla reakcji pierwszego rzędu, wynikało z faktu, iż stała k_1 jest dwukrotnie większa od stałej k_2 . Ustalenie takiej zależności umożliwiało więc ostatecznie obliczenie również pierwszej z wymienionych stałych, tj. k_1 . Jednakże już Davis i Ross [14], którzy pierwsi opisali powyższą metodologię, zwracali uwagę, iż w praktyce półlogarytmiczna zależność $C_\infty/(C_\infty - C_t)$ od czasu była liniowa tylko

przez połowę czasu trwania reakcji, a wyznaczone stężenie C_{∞} nie osiągało spodziewanej teoretycznie wartości. Takie niedoskonałości metodologii badań mogą budzić wątpliwości, co do dokładności uzyskanych wyników. Wydaje się to potwierdzać duża rozbieżność wartości stałej k_2 wyznaczonych w tych samych warunkach pH 8,5 i temperatury 25 °C w dwóch różnych pracach, mianowicie 0,306 h⁻¹ [6] i 0,552 h⁻¹ [14]. Dodatkowo istotną wadą metodologii pośredniego monitorowania aktywacji TREO poprzez miareczkowanie kwasu metanosulfonowego jest fakt, iż nie dostarcza ona żadnych informacji o ubytku epoksydów na drodze innych reakcji, np. hydrolytycznego rozkładu pierścienia oksiranowego. Stosowana w niniejszej pracy doktorskiej metoda HPLC-RID pozwalała wyeliminować opisane wyżej uchybienia. Umożliwiała ona również śledzenie kinetyki aktywacji TREO w roztworach buforowych o odpowiednio dobranej pojemności buforowej, bez konieczności miareczkowania kwasu metanosulfonowego.

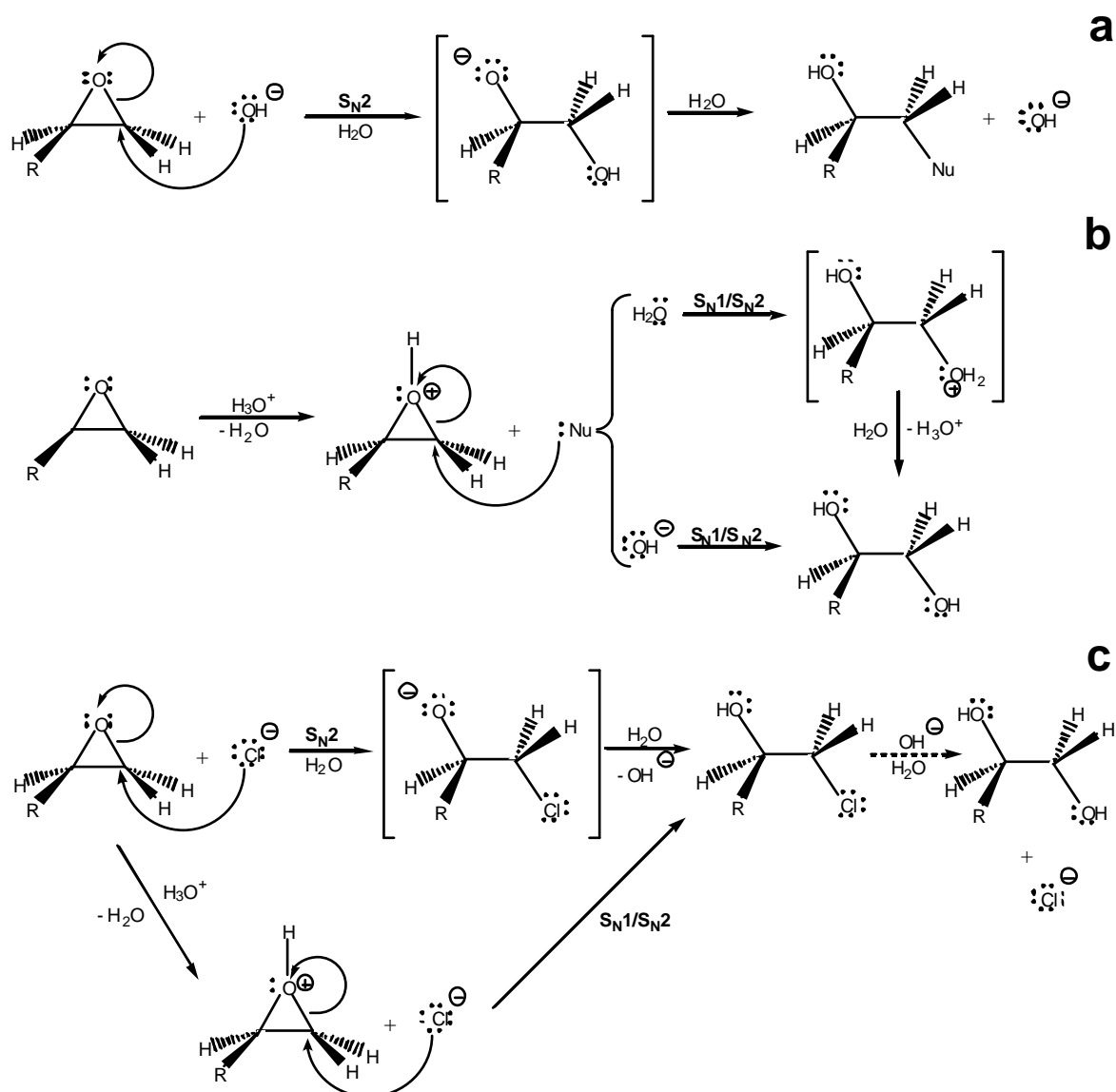
Badania kinetyczne oparto o zaproponowany model kinetyczny, który oprócz dwóch następujących reakcji właściwej aktywacji TREO pierwszego rzędu, obejmował również dwie równoległe reakcje hydrolyzy S,S-EBDM i S,S-DEB pseudopierwszego rzędu (Ryc. 14). Uwzględnienie tych ostatnich było podyktowane powszechnie znaną reaktywnością chemiczną pierścienia oksiranowego [10-12,17,18]. Mimo iż nie przeprowadzono badań identyfikacji produktów tego rozkładu, należy przypuszczać, że prowadził on do powstania odpowiednich wycylnych dioli [10,14,19]. Obliczenia kinetyczne przeprowadzono w specjalistycznym programie Prism (wersja 6.01), wykorzystując nieliniową regresję globalną, tzn. wyznaczone stałe $[TREO]_0$ oraz k_1 , k_2 , k_M i k_D miały jednakową wartość w odniesieniu do równań opisujących zmiany stężeń wszystkich trzech badanych związków. Poprawność przyjętego modelu kinetycznego potwierdziła jego ocena dokonana zgodnie z zaleceniami dla modeli regresji nieliniowej [127]. We wszystkich pojedynczych eksperymentach uzyskano dopasowanie teoretycznych krzywych do danych doświadczalnych (Ryc. 21 – 32, Z1 – Z18). Wysokie wartości współczynników determinacji R^2 (Tabele 23 – 28), świadczą, iż zastosowany model przedstawiał dopasowanie do obserwowanych zmian stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB odpowiednio w 99,7 – 100,0, 96,2 – 99,9 i 93,2 – 99,8%. Położenie krzywych ufności 95% blisko siebie wskazuje z kolei, iż dane eksperymentalne precyzyjnie determinowały przebieg krzywych najlepszego dopasowania (Ryc. 21, 23, 25, 27, 29, 31, Z1 – Z18). Wielkość uzyskanych błędów standardowych oraz 95% przedziałów ufności wyznaczanych stałych $[TREO]_0$ oraz k_1 , k_2 , k_M i k_D (Tabele 17 – 22) świadczy o dużej precyzji estymacji powyższych parametrów w modelu kinetycznym,

z wyjątkiem stałej k_M . Wyjaśnieniem mniejszej precyzji wyznaczania k_M jest fakt, iż w równaniach opisujących stężenia S,S-EBDM i S,S-DEB (str. 83) stała ta występuje jedynie jako składnik sumy łącznie ze stałą k_2 , która przyjmuje 2 – 8 krotnie większe wartości niż k_M (Tabele 17 – 22). W konsekwencji nawet względnie duża zmiana stałej k_M powoduje małą zmianę przewidywanej wartości stężenia analitu, a przez to również sumy kwadratów wartości resztowych, na podstawie której wyznaczane są optymalne wartości parametrów [127]. Ostatecznie skutkuje to więc mniejszą precyzją wyznaczania stałej k_M . Z tej przyczyny sprawdzono, czy reakcja hydrolitycznego rozkładu S,S-EBDM, opisana właśnie stałą k_M , może być pominięta w modelu kinetycznym transformacji TREO. Wyniki testu F (Tabele 23 – 28) pokazują jednak, iż w każdym przypadku pierwotny model był statystycznie preferowany w porównaniu do prostszego modelu nieuwzględniającego hydrolizy S,S-EBDM. Ponadto, zgodnie z wymogami stawianymi modelom regresji nieliniowej, zastosowany model kinetyczny zapewniał uzyskanie randomizowanego rozkładu dodatnich i ujemnych wartości resztowych stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB względem poziomu zerowego ($p > 0,05$ w *Run test*, Tabele 23 – 28; Ryc. 21, 23, 25, 27, 29, 31, Z1 – Z18) oraz normalnego rozkładu bezwzględnych wartości resztowych ($p > 0,05$ w teście D'Agostino-Pearson, Tabele 23 – 28). Dodatkowo o poprawności modelu świadczył brak istotnych statystycznie różnic między wartościami stałych k_1 i k_D obliczonymi przy jego pomocy w porównaniu do wartości wyznaczonych metodą zwykłej liniowej regresji semilogarytmicznej (Tabele 29 i 30).

Zgodność przyjętego modelu kinetycznego z doświadczalnymi stężeniami TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB dowodzi, iż we wszystkich badanych roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C reakcje aktywacji TREO oraz hydrolizy jego epoksy pochodnych przebiegały zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu (Ryc. 33 – 36). Potwierdza to również brak statystycznie istotnych różnic stałych k_1 , k_2 , k_M i k_D uzyskanych dla 0,369 mol/l buforu fosforanowego o sile jonowej 1,0 mol/l przy pięciokrotnej różnicy początkowego stężenia TREO (Tabela 31 i 32). Wynik ten jest też zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi aktywacji TREO w warunkach pH 8,5 i temperatury 25 °C [6,13] oraz hydrolizy samego (\pm)-DEB przy pH 7,4 i temperaturze 37 °C [19]. Brak znamienych statystycznie różnic stałych k_1 , jak i k_2 uzyskanych we wszystkich badanych roztworach buforowych (Tabela 31) dowodzi, iż reakcje następcze właściwej aktywacji TREO nie zależały od siły jonowej ani składu jonowego zastosowanych roztworów (Ryc. 33). Wiąże się to z mechanizmem tworzenia pierścieni epoksydowych w cząsteczce TREO i S,S-EBDM, który polega na

wewnątrzcząsteczkowym ataku anionu alkoksylowego na atom węgla (Ryc. 4). Ponieważ tylko jedno z reagujących ugrupowań obdarzone jest ładunkiem, nie ma możliwości istnienia tzw. kinetycznego efektu solnego, który polega na wpływie siły jonowej na oddziaływanie między dwoma naładowanymi cząsteczkami. Ponadto ulokowanie czynnika atakującego w bliskim sąsiedztwie grupy atakowanej w obrębie jednej cząsteczki sprawia, iż rozpatrywana reakcja była odporna na ingerencję jonów obecnych w roztworze, takich jak Na^+ , K^+ , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} i Cl^- . Obliczone wartości stałych k_1 i k_2 (odpowiednio około 0,45 i 0,22 h^{-1} , Tabela 31) były znacząco niższe od tych wyznaczonych w badaniach aktywacji TREO przeprowadzonych w warunkach pH 8,5 i temperatury 25 °C przez Matagne [13] (1,10 i 0,55 h^{-1}) i Feita [6] (0,62 i 0,31 h^{-1}). Różnica ta spowodowana jest najprawdopodobniej wyższym pH środowiska zastosowanym w cytowanych pracach. Z kolei w warunkach pH 7,5 i temperatury 25 °C stała szybkości całkowitej przemiany $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-DEB}$, odpowiadająca liczbowo stałej k_2 , była znacznie mniejsza niż 0,22 h^{-1} i wynosiła 0,094 h^{-1} , co może wynikać z niższej temperatury reakcji [13]. Warto zauważyć, iż w każdym roztworze buforowym stosowanym w niniejszej pracy, stała k_1 była w przybliżeniu 2-krotnie większa od stałej k_2 . Wskazuje to na podobną reaktywność ugrupowania β -hydroksymetanosulfonowego znajdującego się w cząsteczce TREO i S,S-EBDM, mimo różnic jego sąsiedztwa chemicznego. W przeciwieństwie do reakcji $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-EBDM}$ i $\text{S,S-EBDM} \rightarrow \text{S,S-DEB}$, reakcje hydrolytycznego rozkładu epoksytransformerów TREO w warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C podlegały wpływowi współobecnych elektrolitów (Ryc. 34 – 36). Przy zmianie siły jonowej buforu fosforanowego od jej wartości średniej do górnej spotykanej w warunkach fizjologicznych, tj. 0,16 mol/l do 0,19 mol/l, nie obserwowano jeszcze istotnych statystycznie różnic w szybkości hydrolyzy S,S-EBDM i S,S-DEB (Tabela 32 i 33). Wartości stałych k_D opisujące hydrolyzę S,S-DEB w powyższych buforach o stężeniu 0,0615 i 0,0730 mol/l wynosiły odpowiednio $0,0313 \pm 0,0010$ i $0,0336 \pm 0,0014 \text{ h}^{-1}$, i były podobne do wartości $0,0317 \pm 0,0007 \text{ h}^{-1}$ wyznaczonej dla hydrolyzy (\pm)-DEB w 0,1 mol/l buforze fosforanowym w tych samych warunkach pH i temperatury [19]. Różnice w wartościach stałych k_M i k_D , w większości istotne statystycznie, uzyskane w badaniach przeprowadzonych w dwóch seriach buforów fosforanowych o tej samej sile jonowej 0,16 mol/l oraz 1,0 mol/l, lecz różnym składzie (odpowiednio bufor A i F oraz C i E w Tabelach 32 i 33) wskazują, iż wpływ elektrolitów na hydrolyzę epoksydów nie był *stricte* kinetycznym efektem solnym. Nie zależał on bowiem od samej wartości siły jonowej, lecz od typu elektrolitów i ich stężenia w roztworze. Aniony pochodzące z dysocjacji soli użytych do

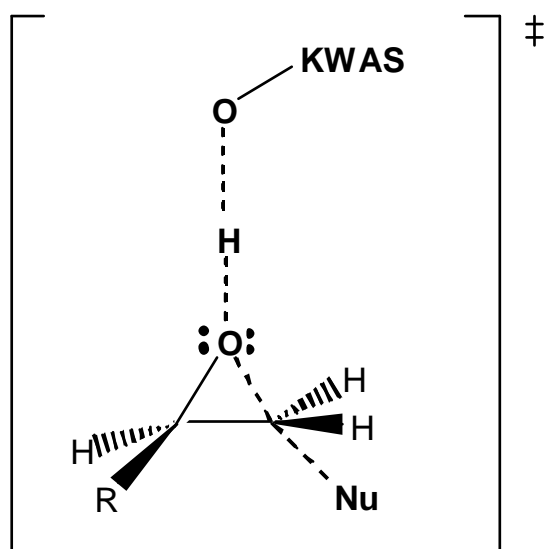
sporządzenia buforów musiały więc ingerować w mechanizm hydrolizy pierścienia epoksydowego, będącej *de facto* specyficznym przypadkiem substytucji nukleofilowej. W czystej wodzie hydroliza epoksydów jest bardzo powolna, ponieważ obojętna cząsteczka H_2O jest słabym nukleofilem, a dodatkowo sam tlen pierścienia epoksydowego nie jest dobrą grupą opuszczającą. Przebieg tej reakcji katalizują jony hydroksylowe oraz kwasy. Katalityczny wpływ jonu OH^- wynika z faktu, iż posiada on znacznie silniejszy charakter nukleofilowy niż woda. W konsekwencji, z większą łatwością atakuje elektrofilowy atom węgla epoksydu, zgodnie z mechanizmem reakcji S_N2 , prowadząc do otwarcia pierścienia epoksydowego, a następnie ulega odnowieniu pod wpływem cząsteczki wody (Ryc. 42a).



Ryc. 42. Mechanizm zasadowej (a) i kwasowej (b) hydrolizy S,S-EBDM i S,S-DEB w środowisku wodnym oraz proponowany mechanizm ingerencji anionu Cl^- (c). Podstawnik $R = -CH(OH)CH_2OSO_2CH_3$ (hydroliza S,S-EBDM), $-CHCH_2O$ (hydroliza pierwszego pierścienia S,S-DEB) lub $-CH_2CH_2OH$ (hydroliza drugiego pierścienia S,S-DEB) [10,17].

Z kolei obecność jonów H_3O^+ prowadzi do protonacji atomu tlenu w pierścieniu oksiranowym, czyniąc go bardziej reaktywną grupą opuszczającą (alkoholową). Ułatwia to nukleofilowy atak cząsteczki wody (słaby nukleofil, ale duże stężenie) lub jonu hydroksylowego (małe stężenie w środowisku kwaśnym, ale silny nukleofil), który w środowisku kwaśnym ma mechanizm pośredni między $\text{S}_{\text{N}}1$ i $\text{S}_{\text{N}}2$ (Ryc. 42b). Co istotne, rolę czynnika atakującego atom węgla mogą spełniać również aniony Cl^- , gdyż posiadają one właściwości nukleofilowe pośrednie między OH^- i H_2O [10,11,17,128]. Z tej przyczyny mogły one uczestniczyć w reakcjach zasadowej i kwasowej hydrolizy S,S-EBDM i S,S-DEB, pełniąc zarówno rolę katalizatora, jak i substratu w reakcji pseudopierwszego rzędu z pierścieniem epoksydowym o znacznie mniejszym stężeniu (Ryc. 42c) [17]. Stanowi to wyjaśnienie dla stopniowego wzrostu stałych k_{M} i k_{D} w 0,0615 mol/l lub 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej odpowiednio 0,16 mol/l i 0,19 mol, buforze PBS i 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (Tabele 31 – 33), zawierających wzrastające ilości anionów Cl^- (kolejno: 0, 0,14, 0,84 mol/l). Opisany efekt jonu chlorkowego jest specyficzny dla hydrolizy wielu związków epoksydowych i przyczynia się do skomplikowanego przebiegu ich profili $\log(\text{stała szybkości hydrolizy}) - \text{pH}$ w środowisku zawierającym sole chlorkowe [17].

W przeciwieństwie do jonu Cl^- , aniony H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} praktycznie nie wykazują charakteru nukleofilowego, co wynika z rezonansowej stabilizacji ich ujemnego ładunku, analogicznej do jonu metanosulfonianowego (Ryc. 5). Mało prawdopodobne jest więc, aby pełniły one rolę czynnika atakującego atomy węgla pierścieni epoksydowych, w tym S,S-EBDM i S,S-DEB. Należy zaznaczyć, iż dotychczas nie opisano takiej reakcji w literaturze. Obserwowany w przeprowadzonych badaniach wpływ stężenia buforu fosforanowego na szybkość rozkładu epoksytransformerów TREO tłumaczy jednak tzw. ogólna kataliza kwasowo-zasadowa. Zjawisko to jest często spotykane w badaniach kinetycznych solwolizy leków i polega na katalitycznym działaniu cząsteczek lub jonów tworzących dany układ buforujący, a nie jonów H_3O^+ i OH^- , powstałych w reakcji tych pierwszych z cząsteczką wody. W odniesieniu do hydrolizy epoksydów opisano do tej pory ogólną katalizę kwasową pod wpływem anionów słabych kwasów. Mechanizm tej reakcji zakłada, iż protonacja pierścienia epoksydowego niekoniecznie zachodzi pod wpływem jonu H_3O^+ (Ryc. 42b), lecz może być również efektem bezpośredniego przekazania protonu od kwasu Brönsteda-Lowry'ego do tlenu pierścienia epoksydowego (Ryc. 43). Proces ten zachodzi jednocześnie z rozpadem wiązania C–O pierścienia epoksydowego i tworzeniem



Ryc. 43. Struktura stanu przejściowego podczas ataku nukleofila (Nu) na atom węgla pierścienia oksiranowego w obecności kwasu, tłumacząca ogólną katalizę kwasową hydrolizy epoksydu pod wpływem składników buforu [17]. Dla S,S-EBDM i S,S-DEB odpowiednio $R = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$ i CHCH_2O .

nowego wiązania C–nukleofil w obrębie jednego stanu przejściowego. Konsekwencją takiego mechanizmu jest wzrost szybkości reakcji w obecności wyższych stężeń kwasowej formy układu buforowego [17]. W roztworach buforowych stosowanych w badaniach kinetycznych w niniejszej rozprawie rolę kwasu Brönsteda-Lowry’ego spełniały aniony H_2PO_4^- , co wskazuje, iż właśnie one przekazywały proton atomowi tlenu układu oksiranowego S,S-EBDM i S,S-DEB w stanie przejściowym reakcji. Wprawdzie jon HPO_4^{2-} jest również zdolny do odłączenia protonu, jednak jego dużo mniejsza kwasowość od H_2PO_4^- (tabelaryczna wartość pK_a 12,4 vs 7,2)

praktycznie wyklucza udział w powyższym procesie. Ogólna kataliza kwasowa hydrolizy S,S-EBDM i S,S-DEB pod wpływem H_2PO_4^- bardzo dobrze tłumaczy fakt uzyskania 3,4-krotnie wyższych ($p < 0,05$) stałych k_M i k_D w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l w stosunku do 0,0615 mol/l buforu fosforanowego o sile jonowej 0,16 mol/l (Tabele 31 – 33), zawierającego 4,3-krotnie mniejszą ilość H_2PO_4^- (końcowe stężenie H_2PO_4^- w buforach odpowiednio 0,047 i 0,011 mol/l). Podobny efekt towarzyszył hydrolizie dwóch izomerycznych epoksy pochodnych benzo[a]pirenu w środowisku buforu fosforanowego o pH 6,9. Funkcję katalityczną spełniały tylko jony H_2PO_4^- , a 5-krotny wzrost ich stężenia skutkował 4-krotnym lub 2-krotnym wzrostem stałej szybkości reakcji [17].

Niezależnie od rodzaju roztworu buforowego, w którym badano transformację TREO, stała k_D była w przybliżeniu dwukrotnie większa od k_M (Tabela 31). Relacja ta wiąże się w sposób logiczny z obecnością jednego reaktywnego pierścienia epoksydowego w cząsteczce S,S-EBDM oraz dwóch takich ugrupowań w cząsteczce S,S-DEB [20].

W świetle ustalonego wpływu elektrolitów na hydrolizę S,S-EBDM i S,S-DEB, optymalnym roztworem do badania transformacji TREO w warunkach *in vitro* okazał się bufor PBS, który posiada skład jonowy zbliżony do osocza krwi ludzkiej. W roztworze tym

następnie reakcje aktywacji TREO (k_1 0,451 h⁻¹, k_2 0,206 h⁻¹) zachodziły 5 – 15 razy szybciej od towarzyszących im reakcji hydrolitycznego rozkładu S,S-EBDM (k_M 0,027 h⁻¹) i S,S-DEB (k_D 0,045 h⁻¹). Użytkane wyniki samych badań kinetycznych nie tłumaczyły więc niskich stężeń epoksytransformerów TREO obserwowanych w osoczu pacjentów poddanych HSCT.

3. Analiza P_{OW}

W celu dokonania możliwie pełnej oceny czynników decydujących o zachowaniu się TREO i jego epoksytransformerów w ustroju żywym, oprócz omówionych wyżej badań kinetycznych, przeprowadzono w warunkach *in vitro* również analizę P_{OW} wszystkich trzech badanych związków. Wiadomo bowiem, że parametr ten jest istotnym wykładnikiem lipofilowości substancji leczniczych, warunkującej łatwość ich dyfuzji przez błony biologiczne, wiązanie się z białkami pełniącymi m.in. funkcje transportowe (białka krwi), czy podatność na metabolizm [129-131]. Ponieważ nie istnieją żadne doniesienia literaturowe odnośnie P_{OW} TREO i S,S-EBDM, zgodnie z zaleceniami OECD [123] dotyczącymi wyznaczania P_{OW}, dokonano wstępnego oszacowania wartości tego parametru metodami obliczeniowymi. Wyznaczone wartości logP_{OW} TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB mieściły się w zakresie od -3,35 do -0,02 (Tabela 34), wskazując zgodnie na hydrofilowy charakter badanych substancji. Uzyskane wyniki sugerowały ponadto, iż właściwą metodą do doświadczalnego wyznaczenia P_{OW} jest metoda wytrząsania (*shake-flask method*), a nie metoda HPLC. Według rekomendacji OECD pierwsza z tych metod nadaje się do analizy logP_{OW} od -2 do 4, natomiast druga może być stosowana, gdy parametr ten mieści się w zakresie od 0 do 6 [123,132].

Zgodnie z prawem podziału Nernsta, badania P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów przeprowadzono w warunkach stałej temperatury. W celu odniesienia uzyskanych wyników do warunków fizjologicznych zastosowano temperaturę 37 °C, zamiast 20 – 25 °C, rekomendowanej przez OECD [123]. Z podobnych przyczyn, rolę fazy wodnej, tworzącej dwufazowy układ z n-oktanołem, pełnił bufor ABS. Podobnie jak bufor PBS stosowany w badaniach kinetycznych, posiadał on w swoim składzie NaCl i KCl, jednak nie zawierał fosforanów. Zamiana układu buforującego z fosforanowego na octanowy podyktowana była koniecznością uzyskania pH poniżej 5,0, celem zahamowania aktywacji TREO do epoksy pochodnych w trakcie wytrząsania układu n-oktanol/faza wodna [16]. Ponieważ jednym z warunków spełnienia prawa podziału Nernsta jest również brak dysocjacji substancji w fazie wodnej, przeprowadzono ocenę możliwości dysocjacji TREO i jego epoksytransformerów przy pomocy programu Marvin Sketch. Struktury TREO i S,S-EBDM

wygenerowane dla zakresu pH 0 – 14 (Ryc. 37) wskazują, iż obydwie związki są zdolne do jonizacji w wyniku deprotonacji grupy alkoholowej. Wartości pK_a odpowiadające dwóm kolejnym etapom dysocjacji TREO (13,0 i 14,4) oraz jednoetapowej dysocjacji S,S-EBDM (13,3), dowodzą, że związki te są jednak bardzo słabymi kwasami. Wyniki te są zbieżne z małą kwasowością nasyconych alkoholi, takich jak np. metanol, którego pK_a wynosi 15,5 [133]. Przeprowadzona analiza wykazała również, iż w przeciwieństwie do TREO i S,S-EBDM, S,S-DEB wcale nie posiada zdolności do dysocjacji, co wiąże się z brakiem kwasowego atomu wodoru w jego cząsteczce. Uzyskane wyniki świadczą więc, iż w środowisku buforu ABS o pH 4,4 wszystkie trzy badane związki powinny występować, zgodnie z prawem podziału Nernsta, tylko w postaci cząsteczek niezdisocjowanych. Co istotne, w podobny sposób związki te powinny zachowywać się w warunkach fizjologicznych, co praktycznie wyklucza możliwość ich oddziaływania z białkami osocza i składnikami tkanek na zasadzie tworzenia par jonowych [130,131].

Przed przystąpieniem do wyznaczania P_{ow} TREO i jego transformerów metodą wytrząsania ustalono czas uzyskania równowagi międzyfazowej w układzie n-oktanol/ABS oraz potwierdzono doświadczalnie trwałość analitów w tym układzie. Zmiany stężeń poszczególnych związków w buforze ABS, stanowiącym fazę wodną układu, obserwowane w czasie 0 – 2 h od rozpoczęcia wytrząsania (Ryc. 38), dowodzą, iż w badanym układzie faz równowaga podziału najszybciej osiągnięta była dla S,S-DEB (po 0,25 h), najwolniej zaś dla TREO (1,5 h). Podobny wynik jak dla S,S-DEB, mianowicie 0,5 h, uzyskali inni autorzy w badaniach podziału DEB (stereochemia nieokreślona) w układzie krew/heksan [20]. W trakcie dłuższego wytrząsania układu n-oktanol/ABS (2 – 6 h), przekraczającego czas potrzebny do ustalenia się równowagi międzyfazowej, stężenia związków w fazie wodnej były praktycznie niezmiennie (Ryc. 39), co potwierdziło ich trwałość w badanym przedziale czasowym. Uzyskany wynik jest zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi badania podziału epoksydu EB, który podobnie jak S,S-DEB jest metabolitem węglowodoru BD. W trakcie 3 h wytrząsania w temperaturze 37 °C epoksyd ten był trwały w roztworze soli fizjologicznej oraz w oleju, natomiast ulegał rozkładowi w homogenatach niektórych tkanek zwierzęcych [134].

Na podstawie wyżej opisanych wyników badań wstępnych, P_{ow} TREO i jego epoksytransformerów wyznaczono po 2 h wytrząsaniu w sześciu układach n-oktanol/ABS (I – VI, Tabela 35), różniących się stosunkiem objętościowym obu faz oraz początkowymi stężeniami analitów. Wartości $\log P_{ow}$ poszczególnych związków, uzyskane we wszystkich

próbach, różniły się między sobą maksymalnie o 0,22 jednostki, spełniając tym samym kryterium akceptacji dla precyzji metody wytrząsania, ustalone przez OECD ($\pm 0,3$) [123]. Analiza statystyczna przeprowadzona testem ANOVA wykazała brak znamiennych różnic między średnimi P_{OW} wyznaczonymi indywidualnie dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB we wszystkich sześciu seriach układów faz n-oktanol/ABS (Tabela 36). Uzyskanie porównywalnych wartości P_{OW} związków przy różnych stosunkach objętościowych faz (serie I – III) oraz różnej początkowej ilości testowanych substancji (serie I i IV) potwierdziły, iż nie zachodziła ani asocjacja cząsteczek w n-oktanolu, ani ich dysocjacja w buforze ABS. Ponadto brak istotnych różnic P_{OW} między układami, w których znajdowała się mieszanina TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (serie I – IV), a układami zawierającymi tylko sam TREO (seria V) lub (\pm)-DEB (seria VI), wykazał, że obecność innych związków nie wpływała na wynik P_{OW} danego analitu. Wartości P_{OW} obliczono ostatecznie jako średnią ze wszystkich badanych serii układów n-oktanol/ABS (Tabela 36). Uzyskane wartości $\log P_{OW}$ TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB wynosiły odpowiednio $-1,58 \pm 0,04$, $-1,18 \pm 0,02$ i $-0,40 \pm 0,03$. W pracach Hanscha i wsp. [135] oraz Deneer i wsp. [136] wartości $\log P_{OW}$ DEB wyznaczone doświadczalnie w układzie n-oktanol/woda w niższej temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ wynosiły odpowiednio $-0,52$ i $-0,29 \pm 0,19$, były więc zbliżone do wartości uzyskanej dla S,S-DEB w niniejszej rozprawie. Do tej pory nie było doniesień na temat P_{OW} TREO i S,S-EBDM, jednakże istnieją dane literaturowe dotyczące wyznaczonego doświadczalnie $\log P_{OW}$ BU ($-0,58$), którego strukturalnym analogiem jest TREO [73]. Porównanie $\log P_{OW}$ tych dwóch pokrewnych związków dowodzi, iż TREO jest związkiem o większej hydrofilowości, co wiąże się z obecnością dwóch dodatkowych grup hydroksylowych w jego cząsteczce (Ryc. 1 i 2).

Wyznaczone doświadczalnie wartości $\log P_{OW}$ badanych związków (Tabela 36) porównano z ich wartościami teoretycznymi, oszacowanymi na podstawie struktury cząsteczki (Tabela 34). Wśród dziewięciu stosowanych metod, przynajmniej jeden algorytm przewidywał $\log P_{OW}$ indywidualnego związku z dużą dokładnością w stosunku do wartości wyznaczonej eksperymentalnie. W przypadku S,S-EBDM i S,S-DEB był to algorytm ALOGP (odpowiednio $-1,18$ vs $-1,17$ i $-0,40$ vs $-0,39$), natomiast dla TREO najdokładniejszy wynik generował ALOGPs ($-1,58$ vs $-1,53$). Ponadto, jedynie ten ostatni algorytm, oparty na analizie topologii całej cząsteczki, zapewniał akceptowalną dokładność wyznaczania $\log P_{OW}$ ($\pm 0,3$) dla wszystkich badanych związków. Pozostałe algorytmy dawały dokładny wynik tylko dla obu epoksytransformerów (ALOGP, XLOGP3 i KOWWIN) lub jednego z nich, co wynika

prawdopodobnie z reguły, iż dokładność teoretycznych obliczeń $\log P_{OW}$ maleje ze wzrostem liczby atomów w cząsteczce [137]. Podobne wyniki otrzymali Mannhold i wsp. [138], analizując dokładność różnych algorytmów stosowanych do przewidywania $\log P_{OW}$ w grupie ponad 96000 związków chemicznych. W szczególności ALOGPs, a w mniejszym stopniu również ALOGP i XLOGP3, należały do metod zapewniających najlepszą korelację obliczonych $\log P_{OW}$ z wartościami eksperymentalnymi. Podobnie satysfakcjonujące wyniki generował również algorytm miLogP, jednakże nie znalazło to potwierdzenia w wynikach prezentowanych w niniejszej rozprawie.

Porównanie uzyskanych wartości P_{OW} TREO i jego epoksypochodnych pozwala stwierdzić, iż największą hydrofilowością spośród tych trzech związków charakteryzuje się lek macierzysty, a najmniejszą S,S-DEB. Warto w tym miejscu przypomnieć, że w metodzie HPLC-RID równoczesnego oznaczania powyższych związków, w której stosowano kolumnę wypełnioną fazą C18 chemicznie związaną z krzemionką (ODS) i hydrofilową fazę ruchomą zawierającą jedynie 5% (v/v) modyfikatora organicznego (acetonitrylu), najdłuższy czas retencji prezentował TREO, a najkrótszy S,S-DEB (Ryc. 16). Obserwowana kolejność elucji analitów była więc całkowicie odwrotna w stosunku do oczekiwanej na podstawie wyznaczonych wartości P_{OW} . Korelowała ona za to zarówno z powierzchnią molekularną TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB (odpowiednio 523, 383 and 246 Å²), jak i liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce tych związków (odpowiednio 2, 1 i 0). Może to sugerować, iż cząsteczki TREO były najwolniej eluowane z kolumny HPLC, gdyż ze względu na największą powierzchnię najsilniej oddziaływały z fazą ODS, bądź utworzyły wiązania wodorowe z reszkowymi grupami silanowymi Si-OH. Regułą jest, iż dobrą korelację między czasem retencji na kolumnie HPLC ODS i P_{OW} (najczęściej w formie liniowej zależności $\log P_{OW}$ od logarytmu retencji względnej) uzyskuje się dla strukturalnie pokrewnych związków (*congeneric effect*). Najpowszechniejszym tego przykładem jest seria homologiczna n-alkanów, w której dodanie grupy metylenowej skutkuje wzrostem lipofilowości i P_{OW} , zwiększeniem powierzchni cząsteczki i dłuższym czasem retencji związku na kolumnie ODS [132,139]. Wydaje się zatem, iż TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB nie tworzą tak rozumianej serii związków strukturalnie pokrewnych, chociaż stanowią grupę leku macierzystego i jego pochodnych. Prawdopodobnie wiąże się to z faktem, że są to związki o małej cząsteczce i odłączenie kwasu metanosulfonowego generuje znaczącą zmianę ich struktury, polegającą głównie na pojawieniu się pierścienia oksiranowego zamiast bardziej hydrofilowej grupy hydroksylowej.

Wysoka hydrofilowość TREO ($\log P_{OW} -1.58 \pm 0.04$) znajduje odbicie w jego aktualnie znanych parametrach farmakokinetycznych u ludzi, m.in. względnie małej V_{ss} . Jej wartość wynosi 20 – 34 l u osób dorosłych [5,86,102] i 7 – 37 l u dzieci [105], mieszcząc się generalnie między objętością płynu zewnątrzkomórkowego i całkowitej wody organizmu. Wiadomo, że istotnymi czynnikami, które oprócz lipofilowości związku, decydują o jego powinowactwie do krwi i tkanek, a przez to również V_{ss} , są ładunek i wiązanie z białkami osocza [130,131]. Jak ustalono wyżej, TREO praktycznie nie ulega jonizacji w środowisku o pH spotykanym w warunkach fizjologicznych i nie może tworzyć par jonowych. Literaturowa wartość odzysku TREO (pK_a 13,0) z osocza ludzkiego podczas stosowania ultrafiltracji, równa $96 \pm 4\%$ [86], oraz podobna wartość odzysku leku z osocza króliczego wyznaczona w niniejszej pracy (Tabela 16), wskazują ponadto, że nie wiąże się on z białkami osocza. Właściwie takie zachowanie TREO w sposób logiczny wynika z jego małej lipofilowości i braku ładunku, które uniemożliwiają istnienie odpowiednio oddziaływań hydrofobowych i jonowych, będących dwoma głównymi siłami w interakcji lek – białko [130,131]. Przedstawione powyżej fakty przemawiają za tym, iż TREO ulega dystrybucji z łożyska naczyniowego do wodnych kompartmentów ustroju, ale nie kumuluje się w tkankach na zasadzie wiązania z ich białkami, jak czynią to leki o dużej lipofilowości. Hydrofilowy charakter TREO znajduje również odzwierciedlenie w preferencyjnym wydalaniu niezmienionego leku drogą nerkową [5,86,87,102,105,130,131]. Podobnie jak w przypadku TREO, mała lipofilowość S,S-EBDM i S,S-DEB znajduje potwierdzenie w ich niewielkim wiązaniu z białkami osocza ludzkiego (około 20%), które jednak może być w tym przypadku związane z tworzeniem wiązań kowalencyjnych, dzięki obecności reaktywnego pierścienia oksiranowego [16]. Dodatkowo, względnie małą objętość dystrybucji (\pm)-DEB u szczurów (0,73 l/kg) również tłumaczy się hydrofilowością i wysoką rozpuszczalnością związku w wodzie [108].

W oparciu o wyznaczone doświadczalnie wartości $\log P_{OW}$ (Tabela 36) oraz budowę chemiczną TREO i jego epoksytransformerów (Ryc. 3) można stwierdzić, że związki te spełniają wszystkie kryteria reguły Lipinskiego (tzw. reguły pięciu, *rule of five*): $\log P_{OW} < 5$, masa cząsteczkowa < 500 , liczba donorów dla wiązań wodorowych (suma grup OH i NH) < 5 , i liczba akceptorów dla wiązań wodorowych (suma atomów O i N) < 10 . W konsekwencji związki te powinny wykazywać dobrą absorpcję ze szlaku żołądkowo-jelitowego oraz przenikanie przez błony biologiczne [129]. Przypuszczenia te potwierdzają dostępne dane literaturowe, takie jak praktycznie 100% dostępność biologiczna TREO po

podaniu doustnym u ludzi, jego szybka dystrybucja w ustroju ($t_{0,5\alpha}$ 12 min), jak również bardzo szybka dystrybucja (\pm)-DEB u szczurów ($t_{0,5\alpha}$ 2,7 min) [86,87,108].

4. Badania farmakokinetyczne

Badania farmakokinetyczne TREO i jego epoksytransformerów przeprowadzono u 15 królików rasy Nowozelandzkiej Białej, podzielonych w sposób randomizowany na trzy równoliczne grupy ($n = 5$). Zwierzętom z grupy I podano TREO drogą 15 min wlewu dożylnego, a osobniki zaklasyfikowane do grupy II otrzymały bolus dożylny samego (\pm)-DEB, będącego racematem końcowego produktu aktywacji TREO. Królikom z grupy III podano natomiast dożylny bolus w przybliżeniu równomolowej mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, otrzymanej przez alkalizację wodnego roztworu leku macierzystego za pomocą NaOH. Jednakże dzięki zastosowaniu odpowiedniej korekty stężeń S,S-EBDM oznaczonych w osoczu królików, uwzględniającej tworzenie się epoksydu z TREO, uzyskano stężenia odpowiadające podaniu czystego S,S-EBDM (Tabele 39 i 40). Osobne podanie roztworów zawierających epoksytransformery TREO służyło zweryfikowaniu istnienia dyspozycji S,S-EBDM i S,S-DEB limitowanej tworzeniem. Występuje ona, gdy stała szybkości tworzenia metabolitu jest mniejsza niż stała szybkości jego eliminacji z ustroju. *De facto* jest to zjawisko często spotykane wśród metabolitów, które charakteryzują się krótszym $t_{0,5}$ od leków macierzystych. Zostało ono szczególnie dobrze opisane w przypadku takich znanych par leków i ich metabolitów, jak kodeina – morfina, karbamazepina – 10,11-epoksyd karbamazepiny i N-acetyloprokainamid – prokainamid, gdyż wszystkie powyższe substancje są stosowane u ludzi jako samodzielne leki. Objawem występowania dyspozycji metabolitu limitowanej tworzeniem jest sytuacja, w której po podaniu leku stężenia jego metabolitu w osoczu w końcowym odcinku, odpowiadającym fazie eliminacji, przebiegają równolegle do stężeń związku macierzystego. W konsekwencji, $t_{0,5}$ metabolitu ustalony na podstawie takich stężeń jest pozornie równy wartości tego parametru dla leku macierzystego, podczas gdy jego rzeczywista wartość jest mniejsza. Opisane zjawisko przypomina więc tzw. efekt flip-flop, spotykany w przypadku leków o przedłużonym działaniu podawanych pozanacyniowo, kiedy szybkość eliminacji substancji leczniczej limitowana jest szybkością jej uwalniania z postaci leku i wchłaniania [140,141]. Hipoteza, iż S,S-EBDM i S,S-DEB mogą wykazywać dyspozycję limitowaną tworzeniem, była uzasadniona znacznie mniejszymi wartościami stałych k_1 i k_2 (odpowiednio 0,44 – 0,45 i 0,20 – 0,23 h^{-1}) uzyskanymi w badaniach kinetycznych dla roztworów o pH 7,4 i temperaturze 37 °C w porównaniu do literaturowych wartości $t_{0,5\beta}$ związków epoksydowych – (\pm)-DEB i EB u szczurów (Tabela 4) [108].

Zaletą królików w porównaniu do gryzoni była możliwość podania TREO w postaci wlewu dożylnego, który jest typową drogą podania stosowaną u pacjentów, zwłaszcza tych poddanych kondycjonowaniu przed HSCT. W celu dalszego dopasowania warunków badań do warunków klinicznych, króliki z grupy I otrzymały dawkę TREO równą 340 mg/kg m.c., która odpowiada 14 g/m² podawanej osobie dorosłej o standardowej masie 70 kg i powierzchni ciała 1,7 m² (14 g/m² × 1,7 m² : 70 kg = 340 mg/kg). Powyższa dawka podawana przez 3 kolejne dni stanowi aktualnie optymalny schemat dawkowania TREO jako czynnika mieloablacyjnego przed HSCT u dzieci i osób dorosłych [77]. Testy statystyczne Akaike oraz Schwartz potwierdziły, że zmiany stężeń TREO w osoczu wszystkich królików grupy I najlepiej opisywał model dwukompartментowy (Ryc. 40, Tabela 43), zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi ludzi, jak i myszy [5,45,86,87,94,102,105]. Wartości C_{max} leku u królików, uzyskane w momencie zakończenia wlewu, były znacząco wyższe niż u dorosłych pacjentów, którzy otrzymali ekwiwalentną dawkę w odniesieniu do masy ciała (Tabela 57), co łatwo wytłumaczyć 8-krotnie krótszym czasem trwania wlewu [102]. Wyznaczone w obu badaniach wartości AUC_{0→∞} były już jednak porównywalne, co potwierdza możliwość bezpośredniego przeniesienia dawki leku, wyrażonej na 1 kg masy ciała, z ludzi na króliki, chociaż doniesienia literaturowe wskazują na potrzebę zastosowania u tych zwierząt dawki trzykrotnie większej [142]. Również odniesiona do masy ciała V_{ss} TREO u królików była bardzo podobna jak u dorosłych pacjentów (Tabela 57). Średnia wartość V_c u królików, równa 0,152 l/kg, była ponad 2-krotnie większa od objętości krwi u tych zwierząt (0,056 l/kg [143]), wskazując, iż kompartмент centralny leku mógł obejmować, oprócz łożyska naczyniowego, także narządy dobrze ukrwione, takie jak wątroba, serce, nerki, śledziona, płuca. Dystrybucja TREO z kompartментu centralnego zachodziła szybko (t_{0,5α} ok. 8 min) do ponad 2-krotnie większego kompartментu tkankowego, stanowiącego prawie 70% V_{ss}. Koreluje to z wyraźnym dwuwykładniczym przebiegiem profilu stężeń leku w osoczu badanych zwierząt (Ryc. 40) i świadczy o poprawności zastosowania modelu dwukompartментowego. W porównaniu do ludzi, króliki wykazywały większą zdolność eliminacji TREO, wyrażoną wyższą wartością Cl_{tot}, co przy zbliżonej wartości V_{ss}, skutkowało ostatecznie krótszym t_{0,5β} (Tabela 57).

Oprócz TREO w osoczu królików z grupy I oznaczono także poziomy S,S-EBDM, natomiast nie stwierdzono obecności S,S-DEB w stężeniach przekraczających LOQ, równą 1,1 μmol/l (Ryc. 40). Warto zwrócić uwagę na fakt, iż zmiany stężeń S,S-EBDM przebiegały w końcowym odcinku równoległe do stężeń leku macierzystego, chociaż ich wartości były

Tabela 57. Porównanie parametrów farmakokinetycznych TREO uzyskanych u królików i osób dorosłych (dawka leku 14 g/m²) po podaniu ekwiwalentnej dawki leku 340 mg/kg *

Parametr	Króliki (n = 5)	Pacjenci (n = 10) [102]
C _{max} [μmol/l]	52001 ± 717	1157 ± 169
AUC _{0→∞} [μmol×h/l]	4437 ± 679	3967 ± 622
V _{ss} [l/kg]	0,46 ± 0,08	0,44 ± 0,10
Cl _{tot} [l/(h × kg)]	0,28 ± 0,04	0,18 ± 0,03
t _{0,5β} [h]	1,6 ± 0,4	2,0 ± 0,6

* dla średniej standardowej m.c. pacjentów 70 kg.

o dwa rzędy wielkości niższe. Wynik ten jest więc analogiczny do uzyskanego w jedynym do tej pory przeprowadzonym badaniu poziomów epoksytransformerów TREO u dwóch pacjentów poddanych HSCT [16]. Wartość t_{0,5β} S,S-EBDM obliczona u królików grupy I (Tabela 46) nie różniła się istotnie od wartości tego parametru uzyskanego dla TREO (Tabela 55). Podobieństwo to było jednak pozorne, gdyż dalsze badania przeprowadzone u królików z grupy II i III, potwierdziły hipotezę, iż farmakokinetyka zarówno S,S-EBDM, jak i S,S-DEB jest limitowana ich tworzeniem z TREO. Jednoznacznie świadczą o tym wartości t_{0,5β} S,S-EBDM i S,S-DEB (w formie (±)-DEB), wyznaczone u królików z grup III i II (odpowiednio 0,069 ± 0,013 i 0,046 ± 0,006 h) po podaniu roztworów zawierających gotowe epoksydy. Są one wyraźnie niższe od t_{0,5} reakcji tworzenia epoksytransformerów w warunkach pH 7,4 i temperatury 37 °C, np. w buforze PBS (odpowiednio 1,5 ± 0,1 i 3,4 ± 0,3 h), oraz istotnie statystycznie niższe od t_{0,5β} TREO (1,6 ± 0,4 h) (Tabela 55). Rzeczywistą dyspozycję epoksytransformerów w ustroju królików obrazują wykresy przedstawiające zmiany ich stężeń w osoczu po podaniu związków w postaci bolusa dożylnego (Ryc. 41 i 42). Poziomy S,S-EBDM i (±)-DEB szybko malały od wartości odpowiednio około 70 i 420 μmol/l (2 min) do poniżej 1 μmol/l odpowiednio w 30 i 20 min od momentu podania. Obserwowane zmiany stężeń najlepiej opisywał model dwukompartamentowy (Tabela 44 i 45), co odpowiada danym literaturowym uzyskanym u szczurów dla (±)-DEB oraz EB – związku posiadającego jeden pierścień epoksydowy [108]. Obliczenia parametrów farmakokinetycznych w programie WinNonlin potwierdziły, iż S,S-DEB ulegał szybszej dystrybucji (t_{0,5α} 0,019 ± 0,003 h) i eliminacji (t_{0,5β} 0,046 ± 0,006 h) niż S,S-EBDM (t_{0,5α} 0,026 ± 0,015, t_{0,5β} 0,069 ± 0,013), jednakże różnice te nie były istotne statystycznie (Tabele 54 i 55). Ponadto dystrybucja obu epoksydów u królików z grup II i III zachodziła szybciej niż TREO i S,S-EBDM po podaniu leku macierzystego (grupa I), choć różnica t_{0,5α} (Tabela 49) nie osiągnęła poziomu istotności α = 0,05 w przypadku porównania TREO

(grupa I) i S,S-EBDM (grupa III) ($p = 0,058$, Tabela 54). Obliczona V_{ss} S,S-DEB ($0,442 \pm 0,074$ l/kg) była statystycznie równa tej uzyskanej dla TREO ($0,462 \pm 0,083$ l/kg), natomiast S,S-EBDM cechował się znamienne wyższą wartością tego parametru ($0,746 \pm 0,148$ l/kg), zarówno w porównaniu do leku macierzystego, jak i S,S-DEB (Tabela 50). Uzyskane wartości wskazują, iż V_{ss} TREO i S,S-DEB osiąga wartość pośrednią między objętością płynu zewnątrzkomórkowego ($0,17$ l/kg) a objętością całej wody w ustroju królików ($0,74$ l/kg), natomiast S,S-EBDM ulega dystrybucji praktycznie we wszystkich przestrzeniach wodnych organizmu [144,145]. Należy jednak zaznaczyć, iż sposób rozmieszczenia obydwu epoksytransformerów jest odmienny od leku macierzystego. Dystrybucja S,S-EBDM a zwłaszcza S,S-DEB zachodzi bowiem z relatywnie obszernego kompartmentu centralnego (V_c $0,588 \pm 0,196$ i $0,411 \pm 0,077$ l/kg), stanowiącego odpowiednio 79 i 93% V_{ss} , do mniejszego kompartmentu tkankowego o V_t wynoszącej odpowiednio $0,158 \pm 0,077$ l/kg (21% V_{ss}) i $0,031 \pm 0,009$ (7% V_{ss}). Pomimo znaczących różnic V_{ss} , wielkości V_c S,S-EBDM i S,S-DEB są statystycznie porównywalne i zarazem znamienne większe od V_c TREO (Tabela 51). Z kolei wielkości kompartmentu tkankowego wszystkich trzech związków różnią się istotnie od siebie, rosnąc w kolejności S,S-DEB, S,S-EBDM i TREO (Tabela 52). Mała wartość V_t epoksy pochodnych TREO koresponduje ze słabo zaznaczonym dwuwykładniczym przebiegiem ich stężeń w osoczu królików (Ryc. 40 – 42) oraz niewielką przewagą modelu dwukompartamentowego w stosunku do jednokompartamentowego (Tabele 43 – 45). Podobne wyniki uzyskali Valentine i wsp. [108], analizując przebieg krzywych stężeń (\pm)-DEB i EB w osoczu u szczurów oraz objętości poszczególnych kompartmentów tych związków epoksydowych. W niniejszej rozprawie u dwóch pojedynczych królików z grupy I i III (nr 5 i 12) testy Akaike i Schwartza wykazały nawet lepsze dopasowanie prostszego z tych modeli. Uzyskane wartości Cl_{tot} (Tabela 49 i 53) wskazują z kolei, iż zdolność królików do ogólnoustrojowej eliminacji badanych związków różniła się istotnie statystycznie i rosła w kolejności TREO ($0,28 \pm 0,04$ l/(h \times kg)), S,S-EBDM ($10,00 \pm 0,44$ l/(h \times kg)) i S,S-DEB ($14,0 \pm 0,8$ l/(h \times kg)). Otrzymane różnice wartości Cl_{tot} tłumaczą wcześniej omawianą szybszą eliminację S,S-DEB niż S,S-EBDM oraz znacznie wolniejszą eliminację TREO w porównaniu do obu epoksydów. Porównując generalnie farmakokinetykę S,S-EBDM i S,S-DEB, można stwierdzić, iż końcowy produkt aktywacji TREO, posiadający w swej budowie dwa reaktywne pierścienie epoksydowe, ulegał szybszej dystrybucji i eliminacji z ustroju oraz wykazywał mniejszą V_{ss} . Odwrotne relacje obserwowano dla związków epoksydowych w cytowanym już badaniu Valentine i wsp. przeprowadzonym na szczurach

[108]. W stosunku do (\pm)-DEB, monoepoksyd EB wykazywał krótszy $t_{0,5\alpha}$ i $t_{0,5\beta}$, niższą V_{ss} i wyższy Cl_{tot} (Tabela 4). Należy jednak uwzględnić fakt, iż w przeciwieństwie do S,S-EBDM, cząsteczka EB posiada oprócz pierścienia epoksydowego również reaktywne wiązanie podwójne C=C, które prawdopodobnie sprzyjało reakcjom ze składnikami tkanek [18,108].

Dodatkowym empirycznym aspektem niniejszej rozprawy była ocena przenikania TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB do cieczy wodnistej przedniej komory oka królików. Do tej pory tematyka ta nie była poruszana w żadnych wcześniejszych badaniach. Po podaniu królikom z grupy III mieszaniny w przybliżeniu równomolowych ilości trzech badanych związków (około 0,1 mmol/kg) C_{max} epoksytransformerów w cieczy wodnistej obserwowano już w pierwszym analizowanym punkcie czasowym, tj. 2 min (Ryc. 44). Świadczy to o niezmiernie szybkim przenikaniu S,S-EBDM i S,S-DEB przez błony biologiczne i łatwym rozmieszczaniu się ich w przestrzeniach wodnych organizmu. Dużą szybkością tych procesów można tłumaczyć międzyosobnicze różnice poziomów epoksydów w cieczy wodnistej oka królików, przejawiające się wahaniem wykresu ich stężeń w tym kompartmencie jako funkcji czasu (Ryc. 44). W porównaniu do S,S-EBDM i S,S-DEB, stężenie TREO w cieczy wodnistej królików z grupy III narastało wolniej, osiągając C_{max} w 16 min od podania. Na podstawie uzyskanych zmian stężeń badanych związków w osoczu i cieczy wodnistej oka królików (Ryc. 40 – 44) oraz omawianych wcześniej proporcji V_c/V_t można przypuszczać, iż ciecz wodnista współtworzy kompartment centralny S,S-EBDM i S,S-DEB oraz kompartment tkankowy TREO. Przemawia za tym również wysoki stosunek wartości C_{max} epoksydów w cieczy wodnistej i osoczu (0,7 i 3,9 kolejno dla S,S-EBDM i S,S-DEB) oraz znacząco mniejsza wartość tego parametru dla TREO, równa 0,05 (Tabela 56). Inny profil zmian stężeń TREO i S,S-EBDM (S,S-DEB < LOQ) obserwowano w cieczy wodnistej oka królików z grupy I, którym podano sam lek macierzysty we wlewie dożylnym. Liczony od momentu zakończenia wlewu czas t_{max} TREO (15 min) był zbliżony do obserwowanego po podaniu bolusa mieszaniny TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB u królików z grupy III. Stosunek wartości C_{max} cieczy wodnista/osocze TREO był ponownie niski (0,04), co potwierdza relatywnie słabą penetrację leku do cieczy wodnistej. Dla przykładu, podobne wyniki uzyskano u królików Nowozelandzkich Białych dla antybiotyku doripenemu, którego C_{max} w cieczy wodnistej, zanotowane w momencie zakończenia 1 h wlewu, było również około 20 razy mniejsze niż w osoczu [146]. Z kolei lepszą penetrację do cieczy wodnistej oka od TREO wykazywały inne leki z grupy cytostatyków, takie jak karboplatyna i ifosfamid, dla których stosunek

wartości C_{max} cieczy wodnista/osocze wynosił odpowiednio 0,2 u małp i 0,1 – 0,7 u ludzi [147,148]. Uzyskanie C_{max} S,S-EBDM dopiero w 1 h po zakończeniu wlewu TREO sugeruje natomiast, iż obecność tego epoksytransformeru w cieczy wodnistej wynikała głównie z jego tworzenia się w tym kompartmentcie z leku macierzystego, a nie przenikania z krwi. Warto zwrócić uwagę, iż C_{max} tego epoksydu w płynnym kompartmentcie oka było wyższe niż w osoczu (stosunek 1,14) i jednocześnie zaledwie 4-krotnie niższe od C_{max} leku macierzystego (Tabela 56). Chociaż po podaniu samego TREO, w cieczy wodnistej oka królików nie stwierdzono oznaczalnych poziomów S,S-DEB, uzyskane wyniki sugerują, iż bardzo prawdopodobna jest obecność TREO, jak również mniejszych ilości jego epoksy pochodnych we wszystkich płynach ustrojowych, np. ślinie i łzach, u pacjentów otrzymujących prolek przed HSCT.

5. Podsumowanie

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy badania wykazały po raz pierwszy, iż obydwie epoksytransformery TREO cechuje bardzo szybka dyspozycja w ustroju. Podobnie do leku macierzystego, V_{ss} tych związków przekracza objętość płynu zewnątrzkomórkowego, a w przypadku S,S-EBDM jest praktycznie równa objętości całej wody ustrojowej. Powinowactwo do środowiska wodnego oraz łatwa dystrybucja obu epoksytransformerów, m.in. do cieczy wodnistej oka, koreluje z ich właściwościami hydrofilowymi, wyrażonymi ujemnymi wartościami $\log P_{OW}$ oraz niewielkimi rozmiarami ich cząsteczek. Wyjątkowo szybką eliminację S,S-EBDM i S,S-DEB, wyrażoną wysokimi wartościami Cl_{tot} , nie może z pewnością uzasadniać powolny nieenzymatyczny rozkład tych związków pod wpływem wody lub elektrolitów osocza i płynu zewnątrzkomórkowego. Opierając się na fizjologicznym modelu farmakokinetycznym zaproponowanym przez Sweeney i wsp. [20] dla epoksydowych metabolitów BD, w tym DEB, można zakładać, iż za wysoki Cl_{tot} S,S-EBDM i S,S-DEB odpowiada ich metabolizm wątrobowy i płucny oraz ściśle niesprecyzowane nieenzymatyczne i enzymatyczne reakcje rozkładu tych związków w tkankach.

Odmianą farmakokinetykę S,S-EBDM i S,S-DEB obserwuje się po podaniu samego TREO, gdyż wówczas dyspozycja tych epoksydów jest limitowana relatywnie wolnym przebiegiem nieenzymatycznej aktywacji leku macierzystego. Konsekwencją tego jest spowolnienie eliminacji epoksytransformerów z organizmu do poziomu charakterystycznego dla TREO, co objawia się równoległym przebiegiem terminalnych odcinków półlogarytmicznych wykresów ilości wszystkich trzech związków w ustroju. Tworzenie

S,S-EBDM ($t_{0,5}$ 1,5 h) i S,S-DEB ($t_{0,5}$ 3,3 h) z TREO jest przynajmniej 20-krotnie wolniejsze od ich potencjalnie możliwej eliminacji ($t_{0,5\beta}$ odpowiednio 0,069 i 0,046 h), stąd cząsteczki tych związków usuwane są niemalże natychmiast po wytworzeniu, przez co molowe ilości S,S-EBDM a zwłaszcza S,S-DEB w ustroju muszą być w każdym czasie dużo niższe od TREO. Ponieważ wartości V_{ss} wszystkich trzech analizowanych związków nie różnią się od siebie więcej niż dwukrotnie, wzajemne relacje stężeń TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB w osoczu są podobne do stosunków ilości tych związków w ustroju. Wyniki badań z udziałem królików przeprowadzone w ramach niniejszej pracy (Ryc. 40), jak i wcześniejsze doniesienia kliniczne [16] zgodnie demonstrowają, że wartości stężeń S,S-EBDM w osoczu są około dwa rzędy wielkości mniejsze w porównaniu do leku macierzystego. Ponieważ drugi etap aktywacji TREO, tj. S,S-EBDM \rightarrow S,S-DEB, przebiega około dwukrotnie wolniej od pierwszego, a dodatkowo eliminacja S,S-DEB jest szybsza od S,S-EBDM, stężenia S,S-DEB w osoczu powinny być przynajmniej dwa rzędy niższe w stosunku do S,S-EBDM. Należy się więc spodziewać, iż w osoczu królików z grupy I oraz pacjentów poddanych kondycjonowaniu przed HSCT za pomocą TREO, maksymalne stężenia diepoksydu wynosiły poniżej 0,4 $\mu\text{mol/l}$. Uzasadnia to zatem brak możliwości oznaczenia S,S-DEB u królików i ludzi stosowanymi metodami HPLC, w których LOQ wynosiło 1,1 lub 2,5 $\mu\text{mol/l}$ [16]. Jak dotychczas nie opracowano jednak bardziej czułej metody analitycznej, która pozwalałaby oznaczać S,S-DEB w obecności TREO. W oparciu o wyniki badań przenikania związków przez barierę krew – oko, podobnych wartości stężeń S,S-EBDM i S,S-DEB jak w osoczu, (odpowiednio $< 40 \mu\text{mol/l}$ i $< 0,4 \mu\text{mol/l}$) można spodziewać się w cieczy wodnistej oka pacjentów oraz innych płynach ustrojowych, np. ślinie, jednak wymaga to eksperymentalnego potwierdzenia.

Do interesujących wniosków prowadzi dokładniejsza interpretacja wartości stałych szybkości opisujących nieenzymatyczną aktywację TREO oraz jego eliminację z ustroju. Wyznaczona dla reakcji TREO \rightarrow S,S-EBDM stała k_1 ($0,45 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, dla buforu PBS) jest porównywalna do stałej szybkości fazy eliminacji (β) u królików ($0,43 \text{ h}^{-1}$), lecz większa niż stała β u ludzi ($0,30 - 0,38 \text{ h}^{-1}$) [5,86,94,102,105], co pozornie może się wydawać zaskakujące. Należy jednak pamiętać, iż stała β jest wtórnym parametrem farmakokinetycznym – hybrydą pierwotnych stałych szybkości k_{10} , k_{12} i k_{21} , opisujących odpowiednio eliminację TREO z kompartmentu centralnego, jego dystrybucję z kompartmentu centralnego do tkankowego i dystrybucję z kompartmentu tkankowego do centralnego. W efekcie stała ta wyraża szybkość finalnego usuwania leku z ustroju, zależnego

również od jego dystrybucji między kompartmentami ($\beta = k_{10} \times k_{21}/\alpha$, gdzie α – stała szybkości fazy dystrybucji) [149]. Z tego powodu bardziej poprawne jest porównywanie stałej k_1 ze stałą k_{10} , której wartość wyznaczona dla TREO u królików wynosiła $1,89 \pm 0,38 \text{ h}^{-1}$ ($n = 5$). Ze stosunku k_1/k_{10} wynika iż, nieenzymatyczna przemiana TREO do S,S-EBDM ma jedynie około 25% udział w eliminacji proleku z kompartmentu centralnego. Tymczasem, według danych literaturowych, u pacjentów otrzymujących dawki TREO $8 - 56 \text{ g/m}^2$, zaledwie 15 – 40% dawki leku wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej [5,86,94,102,105]. Zestawienie obydwu faktów wskazuje, iż znaczna część TREO ulega aktywacji dopiero po przeniknięciu do relatywnie obszernego kompartmentu tkankowego. Zdaje się to potwierdzać omawiany wyżej przyrost stężenia S,S-EBDM w cieczy wodnistej królików grupy I, opóźniony w czasie w stosunku do przyrostu stężenia TREO (Ryc. 43). Warto zwrócić uwagę, że klirens tworzenia S,S-EBDM, obliczony na podstawie iloczynu V_{ss} TREO i stałej k_1 , przyjmuje wartość $0,208 \text{ l/h}$, która stanowi 74% Cl_{tot} proleku u królików. Uzyskany wynik procentowy odpowiada więc tej części dawki TREO u ludzi (60 – 85%), która nie jest eliminowana drogą nerkową w postaci niezmienionej, co sugeruje, iż za eliminację pozostałej ilości leku odpowiada praktycznie wyłącznie jego nieenzymatyczna aktywacja do S,S-EBDM. Przeprowadzenie podobnego rozumowania w odniesieniu do pary S,S-EBDM i S,S-DEB wskazuje natomiast na bardzo znikomy udział klirensu tworzenia S,S-DEB ($V_{ss} \text{ S,S-EBDM} \times k_2 \approx 0,15 \text{ l/(h} \times \text{kg)}$) w ogólnoustrojowej eliminacji monoepoksydu ($Cl_{tot} \text{ S,S-EBDM} 10,0 \text{ l/(h} \times \text{kg)}$).

W związku z dyspozycją S,S-EBDM i S,S-DEB limitowaną ich tworzeniem, niepotrzebne wydaje się oznaczanie epoksydów po podaniu TREO celem wyznaczenia ich $t_{0,5\beta}$, gdyż parametr ten będzie miał wartość charakterystyczną dla leku macierzystego we krwi. Oznacza to również, iż po podaniu samego TREO czas przebywania S,S-EBDM i S,S-DEB w ustroju będzie praktycznie równy leкови macierzystemu. Wskazuje to na brak zagrożenia obecnością tych związków w organizmie pacjentów po zakończeniu eliminacji leku macierzystego, która mogłaby niekorzystnie wpływać na proces wszczepienia nowych komórek hematopoetycznych. W przyszłości analiza poziomów TREO i produktów jego aktywacji we krwi u ludzi oraz tkankach zwierząt laboratoryjnych może być jednak cenna z punktu widzenia oceny siły działania mieloablacyjnego, czy toksyczności narządowej. W świetle uzyskanych w niniejszej rozprawie wyników, uprawniona jest hipoteza, że podanie gotowych epoksytransformerów TREO pacjentom nie zapewniłoby oczekiwanego efektu mieloablacyjnego obserwowanego po TREO, z powodu zbyt szybkiej eliminacji tych

związków z ustroju. Można zatem sądzić, iż TREO stanowi swego rodzaju *depot* S,S-EBDM, a finalnie także S,S-DEB posiadającego znacznie większe właściwości cytotoksyczne niż S,S-EBDM [4,6,8]. W oparciu o V_{ss} TREO, pośrednią między objętością płynu zewnątrzkomórkowego i całkowitej wody ustroju, należy sądzić, iż za główne działanie biologiczne proleku odpowiada tylko frakcja S,S-DEB, która tworzy się z TREO dopiero po jego dystrybucji do płynu zewnątrzkomórkowego tkanek i wnętrza komórek. Przemawiają za tym również wyniki wcześniejszych badań *in vitro*, w których obserwowano powolny przyrost wiązań krzyżowych indukowanych przez S,S-DEB w DNA komórek narażonych na działanie TREO [8].

VII. WNIOSKI

1. Opracowane metody HPLC-RID oraz HPLC-UV spełniają wymogi walidacyjne stawiane metodom analitycznym i mogą być stosowane do oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych, osoczu i cieczy wodnistej oka.
2. Zaproponowany model kinetyczny obejmujący reakcje następcze pierwszego rzędu aktywacji TREO i dwie reakcje pseudopierwszego rzędu hydrolizy jego epoksytransformerów w przekonujący sposób opisuje rzeczywiste stężenia związków w roztworach buforowych o pH 7,4 i temperaturze 37 °C oraz spełnia wymogi stawiane modelom regresji nieliniowej.
3. W odróżnieniu od dwuetapowej aktywacji TREO do S,S-EBDM i S,S-DEB, kinetyka hydrolitycznego rozkładu utworzonych epoksytransformerów podlega katalitycznemu wpływowi elektrolitów. W buforze PBS o składzie jonowym zbliżonym do osocza hydroliza S,S-EBDM i S,S-DEB przebiega znacznie wolniej od ich tworzenia z leku macierzystego.
4. TREO oraz S,S-EBDM i S,S-DEB posiadają charakter hydrofilowy, o czym świadczą ujemne wartości $\log P_{OW}$ wyznaczone metodą *shake-flask*, przy czym hydrofilowość związków wzrasta od S,S-DEB do TREO.
5. Farmakokinetykę TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB najlepiej opisuje model dwukompartментowy. W porównaniu do leku macierzystego epoksy pochodne cechuje szybsza dystrybucja i większa zdolność przenikania do cieczy wodnistej oka, a V_{ss} tych związków przekracza objętość płynu zewnątrzkomórkowego.
6. Bardzo szybka eliminacja S,S-EBDM i S,S-DEB z ustroju stanowi wyjaśnienie niskich stężeń S,S-EBDM a zwłaszcza S,S-DEB w osoczu pacjentów otrzymujących TREO przed HSCT.
7. Po podaniu samego TREO dyspozycja epoksytransformerów limitowana jest ich tworzeniem się z leku macierzystego, co wskazuje, iż czas przebywania S,S-EBDM i S,S-DEB w ustroju jest praktycznie równy TREO.

VIII. STRESZCZENIE

Treosulfan (TREO) jest prolekiem należącym do związków alkilujących, stosowanym od lat 80 XX wieku w leczeniu platynoopornego raka jajnika. Jego biologicznie aktywne epoksy pochodne (S,S-EBDM i S,S-DEB) powstają kolejno w wyniku dwuetapowej reakcji nieenzymatycznej, która zachodzi *in vivo* lub *in vitro* w środowisku o $\text{pH} > 5$. W ciągu ostatniej dekady przeprowadzono szereg badań klinicznych z udziałem pacjentów przygotowywanych do przeszczepienia komórek hematopoetycznych (HSCT), które udowodniły silne działanie mieloablacyjne wysokich dawek TREO przy ich relatywnie niskiej toksyczności narządowej. Aktualnie toczą się randomizowane badania kliniczne III fazy, po których spodziewane jest oficjalne zarejestrowanie leku do kondycjonowania osób dorosłych i dzieci przed HSCT. Do tej pory jednak nieznaną jest dokładna kinetyka nieenzymatycznej aktywacji TREO w warunkach $\text{pH} 7,4$ i temperatury $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ani farmakokinetyka jego epoksytransformerów. W literaturze naukowej istnieje zaledwie jedno doniesienie dotyczące bardzo niskich, w porównaniu do leku macierzystego, stężeń S,S-EBDM w osoczu dwóch pacjentów poddanych HSCT, u których nie stwierdzono jednocześnie oznaczalnych poziomów S,S-DEB.

Celem pracy było wyjaśnienie przyczyn niskich stężeń S,S-EBDM a zwłaszcza S,S-DEB w osoczu pacjentów otrzymujących TREO w ramach reżimu kondycjonującego przed HSCT. Służyły temu badania kinetyki aktywacji proleku w roztworach wodnych o $\text{pH} 7,4$ i temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, wyznaczenie współczynników podziału n-oktanol/woda (P_{OW}) wszystkich trzech związków i badania ich farmakokinetyki u królików.

Do jednoczesnego oznaczania TREO i jego epoksytransformerów w roztworach buforowych oraz samego TREO w osoczu królików opracowano i zwalidowano bezpośrednio metody HPLC z detekcją refraktometryczną, w których granica oznaczalności (LOQ) związków wynosiła $20 - 50\text{ }\mu\text{mol/l}$. Analizę ilościową epoksydów w osoczu królików prowadzono po ich derywatywacji za pomocą kwasu 3-nitrobenzenosulfonowego bardziej czułą metodą HPLC-UV, zapewniającą LOQ $0,8$ i $1,1\text{ }\mu\text{mol/l}$ odpowiednio dla S,S-EBDM i S,S-DEB. Stosowane metody analityczne były dokładne i precyzyjne. Odzysk analitów z osocza mieścił się w zakresie $92 - 102$ oraz $72 - 90\%$ odpowiednio dla TREO i jego epoksy pochodnych.

Badania kinetyczne transformacji TREO przeprowadzono w stałych warunkach $\text{pH} 7,4$ i temperatury $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ w roztworach buforowych o różnej sile jonowej ($0,16$, $0,19$, $1,0\text{ mol/l}$) i składzie jonowym (bufor fosforanowy, bufor fosforanowy + NaCl, bufor PBS).

Przebieg transformacji TREO obserwowany we wszystkich roztworach bardzo dobrze opisywał zaproponowany model kinetyczny, obejmujący dwie reakcje aktywacji TREO pierwszego rzędu, tj. $TREO \rightarrow S,S\text{-EBDM} \rightarrow S,S\text{-DEB}$ (opisane kolejno stałymi szybkości k_1 i k_2), oraz dwie reakcje hydrolitycznego rozkładu $S,S\text{-EBDM}$ (k_M) i $S,S\text{-DEB}$ (k_D) pseudopierwszego rzędu. Analiza statystyczna stałych szybkości, wyznaczonych w programie Prism 6.01, wykazała, iż w przeciwieństwie do aktywacji TREO, hydrolityczny rozkład utworzonych epoksy pochodnych podlegał katalitycznemu wpływowi elektrolitów. Wynika to z nukleofilowego ataku jonów Cl^- na pierścień oksiranowy oraz zjawiska ogólnej katalizy kwasowej pod wpływem jonu $H_2PO_4^-$. W buforze PBS o składzie jonowym zbliżonym do osocza krwi ludzkiej hydroliza $S,S\text{-EBDM}$ i $S,S\text{-DEB}$ przebiegała znacznie wolniej (k_M $0,027 \pm 0,004$ h⁻¹, k_D $0,045 \pm 0,002$ h⁻¹) od ich tworzenia się z leku macierzystego (k_1 $0,45 \pm 0,04$ h⁻¹, k_2 $0,20 \pm 0,02$ h⁻¹).

P_{OW} TREO i jego epoksytransformerów wyznaczono doświadczalnie metodą wytrząsania oraz *in silico* za pomocą różnych algorytmów komputerowych. W warunkach *in vitro* podział związków badano w 37 °C w układzie złożonym z n-oktanolu i 0,05 mol/l buforu octanowego o pH 4,4, doprowadzonego do siły jonowej 0,16 mol/l za pomocą NaCl i KCl (bufor ABS). W zastosowanym układzie faz nie zachodziła dysocjacja ani asocjacja analizowanych związków, o czym świadczył brak statystycznie istotnych różnic między P_{OW} uzyskanymi przy różnym stosunku objętościowym n-oktanolu i ABS. Obliczone $\log P_{OW}$ TREO ($-1,58 \pm 0,04$), $S,S\text{-EBDM}$ ($-1,18 \pm 0,02$) i $S,S\text{-DEB}$ ($-0,40 \pm 0,03$) wskazują na hydrofilowy charakter wszystkich badanych substancji. W porównaniu do powyższych wyników doświadczalnych, najdokładniej wartości $\log P_{OW}$ przewidywał algorytm ALOGPs.

Badania farmakokinetyczne przeprowadzono na 15 królikach rasy Nowozelandzkiej Białej, podzielonych na trzy równoliczne grupy, które otrzymały dożylny wlew TREO (grupa I), bolus (\pm)-DEB (grupa II) i bolus $S,S\text{-EBDM}$ w mieszaninie z TREO i $S,S\text{-DEB}$ (grupa III). Obliczenia farmakokinetyczne wykonano za pomocą programu WinNonlin 6.2. Zmiany stężeń TREO oraz jego epoksytransformerów w osoczu najlepiej opisywał model dwukompartamentowy. Objętość dystrybucji TREO, $S,S\text{-EBDM}$ i $S,S\text{-DEB}$ w stanie stacjonarnym (kolejno $0,46 \pm 0,08$, $0,75 \pm 0,15$ i $0,44 \pm 0,07$ l/kg) zawierała się między objętością płynu zewnątrzkomórkowego i całkowitej wody w ustroju zwierząt, co koreluje z hydrofilowym charakterem tych związków. Po podaniu królikom epoksydów w gotowej formie (grupa II i III) obserwowano ich bardzo szybką dyspozycję w ustroju. W porównaniu do TREO, epoksytransformery ulegały szybszej dystrybucji ($t_{0,5\alpha}$ TREO, $S,S\text{-EBDM}$

i S,S-DEB odpowiednio $0,14 \pm 0,04$, $0,026 \pm 0,015$ i $0,019 \pm 0,003$ h) oraz w większym stopniu przenikały do cieczy wodnistej oka (stosunki C_{\max} ciecz/osocze wynosiły kolejno 0,05, 0,70 i 3,9). W odróżnieniu od leku macierzystego, S,S-EBDM i S,S-DEB były bardzo szybko eliminowane z ustroju, co wynikało z wysokich wartości klirensu ogólnoustrojowego (Cl_{tot} odpowiednio $10,0 \pm 0,4$ i $14,0 \pm 0,8$ l/(h \times kg)). Porównując szybkość tworzenia S,S-EBDM ($t_{0,5}$ 1,5 h) i S,S-DEB ($t_{0,5}$ 3,3 h), eliminacji TREO ($t_{0,5\beta}$ 1,6) oraz eliminacji S,S-EBDM ($t_{0,5\beta}$ 0,069 h) i S,S-DEB ($t_{0,5\beta}$ 0,046 h), stwierdzono jednoznacznie, iż po podaniu samego proleku obydwa produkty jego aktywacji wykazują dyspozycję limitowaną tworzeniem. Eliminacja epoksydów przebiega wówczas identycznie jak TREO, jednak ich ilości w ustroju oraz stężenia w osoczu są znacznie niższe od leku macierzystego. Stanowi to wyjaśnienie niskich poziomów S,S-EBDM i S,S-DEB w osoczu pacjentów otrzymujących TREO przed HSCT. W oparciu o uzyskane wyniki, stwierdzono, iż po podaniu TREO czas przebywania epoksydów w ustroju pacjentów powinien być równy czasowi przebywania proleku. Ustalano również, iż klirens tworzenia S,S-EBDM stanowi około 75% Cl_{tot} TREO, co zgadza się z faktem, iż ilość niezmienionego TREO wydalona drogą nerkową stanowi u pacjentów zaledwie około 25% podanej dawki proleku.

IX. ABSTRACT

Assessment of kinetic and pharmacokinetic parameters of treosulfan and its biologically active epoxy-derivatives for prediction of their levels in patients undergoing conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation

Treosulfan (TREO) is a pro-drug belonging to alkylating agents, which has been applied in treatment of platin-resistant ovarian carcinoma since 1980's. Its biologically active epoxy-derivatives (S,S-EBDM and S,S-DEB) are formed sequentially in two-step nonenzymatic reaction, which proceeds *in vivo* or *in vitro* above pH 5. For the last decade many clinical studies have been conducted in patients being prepared for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), which demonstrated strong myeloablative action of high-dose TREO alongside with its relatively low organ toxicity. Currently a phase III randomized trial is ongoing, after which marketing authorization of TREO application to conditioning prior to HSCT in adults and children is expected. However, till now neither kinetics of nonenzymatic activation of TREO at pH 7.4 and temperature 37 °C, nor pharmacokinetics of its epoxy-transformers is exactly known. In professional literature there is only one report describing very low, in comparison to the parent drug, plasma concentrations of S,S-EBDM in patients undergoing HSCT, in whom no quantifiable levels of S,S-DEB was stated.

The aim of the study was to explain the causes of low concentrations of S,S-EBDM and especially S,S-DEB in plasma of patients receiving TREO as a part of conditioning regimen prior to HSCT. It was achieved by kinetic studies of the pro-drug activation in aqueous solutions at pH 7.4 and temperature 37 °C, determination of n-octanol/water partition coefficient (P_{ow}) of all the three compounds and studies of their pharmacokinetics in rabbits.

For the simultaneous determination of TREO and its epoxy-transformers in buffers and the sole TREO in rabbit plasma direct HPLC methods with refractometric detection were developed and validated, in which the limit of quantification (LOQ) of the compounds was 20 – 50 $\mu\text{mol/l}$. Quantitative analysis of the epoxides in rabbit plasma was performed, after their derivatization with 3-nitrobenzenesulfonic acid, by the more sensitive HPLC-UV method, which provided LOQ 0,8 and 1,1 $\mu\text{mol/l}$ for S,S-EBDM and S,S-DEB, respectively. The developed analytical methods were accurate and precise. Recovery of the analytes from plasma spanned 92 – 102% and 72 – 90% for TREO and its epoxy-transformers, respectively.

Kinetic studies of TREO transformation were carried out at constant pH 7.4 and temperature 37 °C in buffers differing in ionic strength (0.16, 0.19, 1.0 mol/l) and the ionic

composition (phosphate buffer, phosphate buffer + NaCl, phosphate buffered saline (PBS)). Transformation of TREO in all the solutions was very well described by the proposed kinetic model, which included two first-order reactions of TREO activation, *i.e.* $\text{TREO} \rightarrow \text{S,S-EBDM} \rightarrow \text{S,S-DEB}$ (described by the rate constants k_1 and k_2), and two pseudo-first-order reactions of hydrolytic decomposition of S,S-EBDM (k_M) and S,S-DEB (k_D). Statistical analysis of the rate constants, determined in Prism 6.01, showed that in contrast to activation of TREO, hydrolytic decomposition of the formed epoxides was catalyzed by the electrolytes. This was due to the nucleophilic attack of Cl^- onto the oxirane ring and a phenomenon of a general acid catalysis by H_2PO_4^- in the epoxy-transformers hydrolysis. In PBS, which possesses ionic composition similar to human plasma, hydrolysis of S,S-EBDM and S,S-DEB proceeded much slower (k_M $0.027 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$, k_D $0.045 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$) than their formation from the parent drug (k_1 $0.45 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$, k_2 $0.20 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$).

P_{OW} of TREO and its epoxy-transformers was determined experimentally by the shake-flask method and *in silico* using different computer algorithms. *In vitro*, the partition of the compounds was studied at 37 °C in the system consisting of n-octanol and 0.05 mol/l acetate buffer pH 4.4, adjusted to ionic strength of 0.16 mol/l with NaCl and KCl (acetate buffered saline, ABS). In the applied phases neither dissociation nor association of the analyzed compounds occurred, as proved by a lack of statistically significant differences between the P_{OW} obtained with different volume ratios of n-octanol and ABS. Calculated $\log P_{\text{OW}}$ of TREO (-1.58 ± 0.04), S,S-EBDM (-1.18 ± 0.02) and S,S-DEB (-0.40 ± 0.03) indicate the hydrophilic nature of all the tested entities. In comparison to the above experimental results, the most accurate values of $\log P_{\text{OW}}$ were predicted by algorithm ALOGPs.

Pharmacokinetic studies were carried out in 15 New Zealand White rabbits, divided into three equal groups, which received the intravenous infusion of TREO (group I), the bolus of (\pm)-S,S-DEB (group II), and the bolus of S,S-EBDM as a mixture with TREO and S,S-DEB (group III). Pharmacokinetic calculations were performed in WinNonlin 6.2. Changes in plasma concentrations of TREO and its epoxy-transformers were best described by a two-compartment model. The volume of distribution of TREO, S,S-EBDM and S,S-DEB at steady state (0.46 ± 0.08 , 0.75 ± 0.15 and $0.44 \pm 0.07 \text{ l/kg}$) ranged between volume of extracellular fluid and total body water of the animals, which corresponded to hydrophilic character of these compounds. When the pre-formed epoxides were administered to the rabbits (group II and III), they underwent a very rapid disposition in the body. In comparison

to TREO, the epoxy-transformers demonstrated faster distribution ($t_{0.5\alpha}$ of TREO, S,S-EBDM and S,S-DEB was 0.14 ± 0.04 , 0.026 ± 0.015 and 0.019 ± 0.003 h, respectively), and better penetration to the aqueous humor of the eye (aqueous humor/plasma C_{\max} ratio was 0.05, 0.70 and 3.9, respectively). In contrast to the parent drug, S,S-EBDM and S,S-DEB were rapidly eliminated from the body, due to the high systemic clearance (Cl_{tot} 10.0 ± 0.4 and 14.0 ± 0.8 l/(h \times kg), respectively). Comparing the rate of formation of S,S-EBDM ($t_{0.5}$ 1.5 h) and S,S-DEB ($t_{0.5}$ 3.3 h), elimination of TREO ($t_{0.5\beta}$ 1.6) and elimination of S,S-EBDM ($t_{0.5\beta}$ 0.069 h) as well as S,S-DEB ($t_{0.5\beta}$ 0.046 h), clearly proved that after administration of the sole pro-drug, both products of its activation demonstrate a formation-limited disposition. Then elimination of S,S-EBDM and S,S-DEB proceeds at the same rate as TREO, but the amounts of the epoxides in the system as well as their plasma concentrations are much lower compared to the parent drug. It explains the low levels of S,S-EBDM and S,S-DEB in plasma of patients receiving TREO prior to HSCT. Based on the obtained results, it was stated that after TREO administration the residence time of its epoxy-transformers in the patients' body should be equal to the residence time of the pro-drug. Moreover, the clearance of S,S-EBDM formation was determined to be $\sim 75\%$ of Cl_{tot} TREO, which is consistent with the clinical data that the amount of unchanged TREO excreted by the renal route accounts for only $\sim 25\%$ of the total administered dose of the pro-drug.

X. PIŚMIENNICTWO

1. Treosulfan. In: Therapeutic drugs, 2nd edition. Red. Dollery C. Vol. 2. Churchill Livingstone, Edinburgh 1999, T161-T162.
2. Treosulfan Injection (Medac UK)-Summary of Product Characteristics (SPC)-electronic Medicines Compendium (eMC),
[http://emc.medicines.org.uk/medicine/6431/SPC/Treosulfan+Injection++\(medac+UK\)](http://emc.medicines.org.uk/medicine/6431/SPC/Treosulfan+Injection++(medac+UK)).
Data ostatniego wejścia: 03.12.2012.
3. Treosulfan Capsules 250 mg (Medac UK)-Summary of Product Characteristics (SPC)-electronic Medicines Compendium (eMC);
<http://emc.medicines.org.uk/medicine/6426/SPC/Treosulfan+Capsules+250+mg+++Medac+UK>. Data ostatniego wejścia: 03.12.2012.
4. Leki alkilujące. W: Zając M, Pawełczyk E, Jelińska A, Chemia leków, wydanie II popr. i uzupełn. Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2006, 556-559.
5. Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, Casper J, Freund M, Josten KM, Bornhäuser M, Ehninger G, Berdel WE, Baumgart J, Harstrick A, Bojko P, Wolf HH, Schindler AE, Seeber S, Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 4209-4216.
6. Feit PW, Rastrup-Andersen N, Matagne R, Studies on epoxide formation from (2S,3S)-threitol 1,4-bismethanesulfonate. The preparation and biological activity of (2S,3S)-1,2-epoxy-3,4-butanediol 4-methanesulfonate. *J Med Chem* 1970, 13, 1173-1175.
7. EC safety data sheet – medac GmbH,
http://www.medac.de/medac_international/data/SDS/treosulfan_E.pdf. Data ostatniego wejścia: 03.12.2012.
8. Hartley JA, O'Hare CC, Baumgart J, DNA alkylation and interstrand cross-linking by treosulfan. *Br J Cancer* 1999, 79, 264-266.
9. Nath CE, Shaw PJ, Busulphan in blood and marrow transplantation: Dose, route, frequency and role of therapeutic drug monitoring. *Curr Clin Pharmacol* 2007, 2, 75-91.
10. Ethers and epoxides, thiols and sulfides. In: McMurry J, Organic chemistry, 8th edition. Brooks/Cole Cengage Learning, Singapore 2012, 676-711.
11. Ethers, epoxides, and sulfides. In: Brown WH, Foote CS, Iverson BL, Anslyn EV, Organic chemistry, 6th edition. Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont 2012, 436-473.

12. Etery i epoksydy. W: Morrison RT, Boyd RN, *Chemia organiczna*, wydanie IV. Red. Modrzewska D, Galusowa M. Tom 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, 648-657.
13. Matagne R, Activity of L-threitol 1,4-bismethanesulfonate on barley chromosomes in relation to chemical transformation during treatment. *Mutat Res* 1967, 4, 621-630.
14. Davis W, Ross WCJ, The formation of epoxides from cytotoxic polyol methanesulphonates under physiological conditions. *Biochemistry and Pharmacology* 1963, 12, 915-917.
15. Główka FK, Romański M, Teżyk A, Żaba C, Direct high-performance liquid chromatography method with refractometric detection designed for stability studies of treosulfan and its biologically active epoxy-transformers. *J Pharm Biomed Anal* 2013, 72, 145-149.
16. Główka FK, Romański M, Teżyk A, Żaba C, Wróbel T, HPLC method for determination of biologically active epoxy-transformers of treosulfan in human plasma: Pharmacokinetic application. *J Pharm Biomed Anal* 2012, 62, 105-113.
17. Whalen DL, Mechanisms of hydrolysis and rearrangements of epoxides. In: *Advances in Physical Organic Chemistry*, 1st edition. Ed. Richard JP. Vol. 40. Elsevier Ltd., San Diego 2005, 248-291.
18. The hydration of epoxides. In: Testa B, Mayer JM, *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich 2003, 591-662.
19. Boogaard PJ, Bond JA, The role of hydrolysis in the detoxification of 1,2:3,4-diepoxybutane by human, rat, and mouse liver and lung in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, 141, 617-627.
20. Sweeney LM, Schlosser PM, Medinsky MA, Bond JA, Physiologically based pharmacokinetic modeling of 1,3-butadiene, 1,2-epoxy-3-butene, and 1,2:3,4-diepoxybutane toxicokinetics in mice and rats. *Carcinogenesis* 1997, 18, 611-625.
21. Park S, Tretyakova N, Structural characterization of the major DNA-DNA cross-link of 1,2,3,4-diepoxybutane. *Chem Res Toxicol* 2004, 17, 129-136.
22. Millard JT, Hanly TC, Murphy K, Tretyakova N, The 5'-GNC sites for DNA interstrand cross-linking is conserved for diepoxybutane stereoisomers. *Chem Res Toxicol* 2006, 19, 16-19.
23. Swenberg JA, Bordeerat NK, Boysen G, Carro S, Georgieva NI, Nakamura J, Troutman JM, Upton PB, Albertini RJ, Vacek PM, Walker VE, Sram RJ, Goggin M, Tretyakova

- N, 1,3-Butadiene: Biomarkers and application to risk assessment. *Chem Biol Interact* 2011, 192, 150-154.
24. Seneviratne U, Antsyrovich S, Goggin M, Dorr DQ, Guza R, Moser A, Thompson C, York DM, Tretyakova N, Exocyclic deoxyadenosine adducts of 1,2,3,4-diepoxybutane: synthesis, structural elucidation, and mechanistic studies. *Chem Res Toxicol* 2010, 23, 118-133.
25. Park S, Hodge J, Anderson C, Tretyakova N, Guanine-adenine DNA cross-linking by 1,2,3,4-diepoxybutane: Potential basis for biological activity. *Chem Res Toxicol* 2004, 17, 1638-1651.
26. Sangaraju D, Goggin M, Walker V, Swenberg J, Tretyakova N, NanoHPLC-nanoESI(+)-MS/MS quantitation of bis-N7-guanine DNA-DNA cross-links in tissues of B6C3F1 mice exposed to subppm levels of 1,3-butadiene. *Anal Chem* 2012, 84, 1732-1739.
27. Goggin M, Swenberg JA, Walker VE, Tretyakova N, Molecular dosimetry of 1,2,3,4-diepoxybutane-induced DNA-DNA cross-links in B6C3F1 mice and F344 rats exposed to 1,3-butadiene by inhalation. *Cancer Res* 2009, 69, 2479-2486.
28. Goggin M, Seneviratne U, Swenberg JA, Walker VE, Tretyakova N, Column switching HPLC-ESI⁺-MS/MS methods for quantitative analysis of exocyclic dA adducts in DNA of laboratory animals exposed to 1,3-butadiene. *Chem Res Toxicol* 2010, 23, 808-812.
29. Tretyakova N, Livshits A, Park S, Bisht B, Goggin M, Structural elucidation of a novel DNA-DNA cross-link of 1,2,3,4-diepoxybutane. *Chem Res Toxicol* 2007, 20, 284-289.
30. Park S, Anderson C, Loeber R, Seetharaman M, Jones R, Tretyakova N, Interstrand and intrastrand DNA-DNA cross-linking by 1,2,3,4-diepoxybutane: Role of stereochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 14355-14365.
31. Millard JT, Wilkes EE, Diepoxybutane and diepoxyoctane interstrand cross-linking of the 5S DNA nucleosomal core particle. *Biochemistry* 2001, 40, 10677-10685.
32. Sawyer GA, Frederick ED, Millard JT, Flanking sequences modulate diepoxide and mustard cross-linking efficiencies at the 5'-GNC site. *Chem Res Toxicol* 2004, 17, 1057-1063.
33. Millard JT, McGowan EE, Bradley SQ, Diepoxybutane interstrand cross-links induce DNA bending. *Biochemie* 2012, 94, 574-577.
34. DNA-interactive agents. In: Silverman RB, *The organic chemistry of drug design and drug action*, 2nd edition. Elsevier Academic Press, San Diego 2004, 323-406.

35. Goggin M, Sangaraju D, Walker VE, Wickliffe J, Swenberg JA, Tretyakova N, Persistence and repair of bifunctional DNA adducts in tissues of laboratory animals exposed to 1,3-butadiene by inhalation. *Chem Res Toxicol* 2011, 24, 809-817.
36. Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, Vamvakas S, Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutat Res* 1999, 441, 85-93.
37. Wen Y, Zhang PP, An J, Yu YX, Wu MH, Sheng GY, Fu JM, Zhang XY, Diepoxybutane induces the formation of DNA-DNA rather than DNA-protein cross-links, and single strand breaks and alkali-labile sites in human hepatocyte L02 cells. *Mutat Res* 2011, 716, 84-91.
38. Michaelson-Richie ED, Loeber RL, Codreanu SG, Ming X, Liebler DC, Campbell C, Tretyakova NY, DNA-protein cross-linking by 1,2,3,4-diepoxybutane. *J Proteome Res* 2010, 9, 4356-4367.
39. Loeber R, Rajesh M, Fang Q, Pegg AE, Tretyakova N, Cross-linking of the human DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in presence of 1,2,3,4-diepoxybutane. *Chem Res Toxicol* 2006, 19, 645-654.
40. Farmakodynamika leków stosowanych w leczeniu nowotworów. W: Farmakodynamika, wydanie 5 unowocześn. Red. Janiec W, Krupińska J. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005, 838-839.
41. Yadavilli S, Chen Z, Albrecht T, Muganda PM, Mechanism of diepoxybutane-induced p53 regulation in human cells. *J Biochem Molecular Toxicology*, 23, 373-386.
42. Munkelt D, Koehl U, Kloess S, Zimmermann SY, Kalaïoui RE, Wehner S, Schwabe D, Lehrnbecher T, Schubert R, Kreuter J, Klingebiel T, Esser R, Cytotoxic effects of treosulfan and busulfan against leukemic cells of pediatric patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008, 62, 821-830.
43. Meinhardt G, Dayyani F, Jahrsdörfer B, Baumgart J, Emmerich B, Schmidmaier R, Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients. *Br J Haematol* 2003, 122, 892-899.
44. Schmidmaier R, Oellerich M, Baumgart J, Emmerich B, Meinhardt G, Treosulfan-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells is accompanied by translocation of protein kinase C delta and enhanced by bryostatin-1. *Exp Hematol* 2004, 32, 76-86.

45. Werner S, Mendoza A, Hilger RA, Erlacher M, Reichardt W, Lissat A, Konanz C, Uhl M, Niemeier CM, Khanna C, Kontny U, Preclinical studies of treosulfan demonstrate potent activity in Ewing's sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008, 62, 19-31.
46. Brockmann WG, Kostotyz EL, Eick JD, Correlation of apoptotic potential of simple oxiranes with cytotoxicity. *Toxicology in Vitro* 2006, 20, 729-735.
47. Yadavilli S, Martinez-Ceballos E, Snowden-Aikens J, Hurst A, Joseph T, Albrecht T, Muganda PM, Diepoxybutane activates the mitochondrial apoptotic pathway and mediates apoptosis in human lymphoblasts through oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 2007, 21, 1429-1441.
48. Yadavilli S, Muganda PM, Diepoxybutane induces p53-mediated apoptosis in human lymphoblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004, 195, 154-165.
49. Zhu S, Zeiger E, Mutagenicity of the human carcinogen treosulphan, and its hydrolysis product, dl-1,2:3,4-diepoxybutane in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen* 1993, 21, 95-99.
50. Kim MY, Tretyakova N, Wogan GN, Mutagenesis of the supFGene by stereoisomers of 1,2,3,4-diepoxybutane. *Chem Res Toxicol* 2007, 20, 790-797.
51. Kim MY, Genotoxicity of stereoisomers of 1,2,3,4-diepoxybutane in the gpt gene of Chinese hamster ovary AS52 cells. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011, 86, 587-590.
52. Meng Q, Redetzke DL, Hackfeld LC, Hodge RP, Walker DM, Walker VE, Mutagenicity of stereochemical configurations of 1,2-epoxybutene and 1,2:3,4-diepoxybutane in human lymphoblastoid cells. *Chem Biol Interact* 2007, 166, 207-218.
53. Schlade-Bartusiak K, Rozik K, Laczmańska I, Ramsey D, Sasiadek M, Influence of GSTT1, mEH, CYP2E1 and RAD51 polymorphism on diepoxybutane-induced SCE frequency in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 2004, 558, 121-130.
54. Erexson GL, Tindall KR, Reduction of diepoxybutane-induced sister chromatid exchanges by glutathione peroxidase and erythrocytes in transgenic Big Blue w mouse and rat fibroblasts. *Mutat Res* 2000, 447, 267-274.
55. Meng Q, Walker DM, Scott BR, Seilkop SK, Aden JK, Walker VE, Characterization of Hprt mutations in cDNA and genomic DNA of T-cell mutants from control and 1,3-butadiene-exposed male B6C3F1 mice and F344 rats. *Environ Mol Mutagen* 2004, 43, 75-92.

56. Cho SH, Guengerich FP, Mutation spectra of S-(2-hydroxy-3,4-epoxybutyl)glutathione: comparison with 1,3-butadiene and its metabolites in the Escherichia coli rpoB gene. *Chem Res Toxicol* 2012, 16, 1522-1530.
57. Neale MH, Myatt N, Cree IA, Kurbacher CM, Foss AJ, Hungerford JL, Plowman PN, Combination chemotherapy for choroidal melanoma: ex vivo sensitivity to treosulfan with gemcitabine or cytosine arabinoside. *Br J Cancer* 1999, 79, 1487-1493.
58. Neale MH, Myatt NE, Khoury GG, Weaver P, Lamont A, Hungerford JL, Kurbacher CM, Hall P, Corrie PG, Cree IA, Comparison of the ex vivo chemosensitivity of uveal and cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2001, 11, 601-609.
59. Köpf-Maier P, Sass G, Antitumor activity of treosulfan against human breast carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992, 31, 103-110.
60. Köpf-Maier P, Sass G, Antitumor activity of treosulfan in human lung carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996, 37, 211-221.
61. Köpf-Maier P, The alkylator treosulfan shows activity towards human renal-cell carcinoma in vivo and in vitro. *In vivo* 1998, 12, 275-288.
62. Feyerabend S, Feil G, Krug J, Kassen A, Stenzl A, Cytotoxic effects of treosulfan on prostate cancer cell lines. *Anticancer Res* 2007, 27, 2403-2408.
63. Lanvers-Kaminsky C, Bremer A, Dirksen U, Jürgens H, Boos J, Cytotoxicity of treosulfan and busulfan on pediatric tumor cell lines. *Anticancer Drugs* 2006, 17, 657-662.
64. Fichtner I, Becker M, Baumgart J, Antileukaemic activity of treosulfan in xenografted human acute lymphoblastic leukaemias (ALL). *Eur J Cancer* 2003, 39, 801-807.
65. Neuber K, torn Dieck A, Blodorn-Schlicht N, Itschert G, Karnbach C, Treosulfan is an effective alkylating cytostatic for malignant melanoma in vitro and in vivo. *Melanoma Res* 1999, 9, 125-132.
66. Keilholz U, Schuster R, Schmittel A, Bechrakis N, Siehl J, Foerster MH, Thiel E, A clinical phase I trial of gemcitabine and treosulfan in uveal melanoma and other solid tumors. *Eur J Cancer* 2004, 40, 2047-2052.
67. Neuber K, Reinhold U, Deutschmann A, Pföhler C, Mohr P, Pichlmeier U, Baumgart J, Hauschild A, Second-line chemotherapy of metastatic malignant melanoma with intravenous treosulfan: a phase II multicentre trial. *Melanoma Res* 2003, 13, 81-85

68. Atzpodien J, Terfloth K, Fluck M, Reitz M, Cisplatin, gemcitabine and treosulfan is effective in chemotherapy-pretreated relapsed stage IV uveal melanoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008, 62, 685-688.
69. Schmittel A, Schmidt-Hieber M, Martus P, Bechrakis NE, Schuster R, Siehl JM, Foerster MH, Thiel E, Keilholz U, A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma. *Ann Oncol* 2006, 17, 1826-1829.
70. Guschall WR, Dittrich I, Gatzemeier U, Serke M, Riedel U, Mehl B, Baumgart J, Drings P, Clinical phase II trial of intravenous treosulfan in patients with non-pretreated metastatic small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 1999, 25, S34.
71. Rigos D, Wechsel HW, Bichler KH, Treosulfan in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 1999, 19, 1549-1552.
72. Schmidt F, Wick W, Herrlinger U, Dichgans J, Weller M, Treosulfan chemotherapy for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2000, 49, 231-234.
73. Westerhof GR, Ploemacher RE, Boudewijn A, Blokland I, Dillingh JH, McGown AT, Hadfield JA, Dawson MJ, Down JD, Comparison of different busulfan analogues of hematopoietic stem cell and promotion of donor type chimerism in murine bone marrow transplant recipients. *Cancer Res* 2000, 60, 5470-5478.
74. Ploemacher RE, Johnson KW, Rombouts EJC, Etienne K, Westerhof GR, Baumgart J, White-Scharf ME, Down JD, Addition of treosulfan to a nonmyeloablative conditioning regimen results in enhanced chimerism and immunologic tolerance in an experimental allogeneic bone marrow transplant model. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004, 10, 236-245.
75. van Pel M, van Bruegel DWJG, Vos W, Ploemacher RE, Boog CJ, Towards a myeloablative regimen with clinical potential I: Treosulfan conditioning and bone marrow transplantation allow induction of donor-specific tolerance for skin grafts across full MHC barriers. *Bone Marrow Transplant* 2003, 32, 15-22.
76. Sjö F, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M, Griskevicius L, Nilsson C, Remberger M, Aschan J, Concha H, Gaughan U, Hassan M, Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *Exp Hematol* 2006, 34, 115-121.
77. Główka FK, Romański M, Wachowiak J, High-dose treosulfan in conditioning prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Opin Invest Drugs* 2010, 19, 1275-1295.

78. Weissert R, Wiendl H, Pfrommer H, Storch MK, Schreiner B, Barth S, Seifert T, Melms A, Dichgans J, Weller M, Action of treosulfan in myelin-oligodendrocyte-glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis and human lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2003, 144, 28-37.
79. Wiendl H, Kieseier BC, Weissert R, Mylius HA, Pichlmeier U, Hartung HP, Melms A, Kuker W, Weller M, Treatment of active secondary progressive multiple sclerosis with treosulfan. *J Neurol* 2007, 254, 884-889.
80. Kopadze T, Dehmel T, Mylius HA, Hartung HP, Wiendl H, Kieseier BC, Treosulfan impedes the migration of immunocompetent cells. *J Neurol* 2007, 254, 1457-1458.
81. Spieth K, Kaufmann R, Gille J, Metronomic oral low-dose treosulfan chemotherapy combined with cyclooxygenase-2 inhibitor in pretreated advanced melanoma: a pilot study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003, 52, 377-382.
82. Cree IA, Neale MH, Reinhold U, Kurbacher CM, Treosulfan and gemcitabine. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005, 131, 329-330.
83. Breidenbach M, Rein D, Schöndorf T, Schmidt T, König E, Valter M, Kurbacher CM, Hematological side-effect profiles of individualized chemotherapy regimen for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 2003, 14, 341-346.
84. Wick W, Stock J, Seyfried J, Baumgart J, Wüllner U, Weller M, CD95/CD95 ligand-independent potentiation of treosulfan cytotoxicity by BSO in malignant glioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2002, 21, 213-220.
85. Baumann P, Mandl-Weber S, Völkl A, Adam C, Bumeder I, Oduncu F, Schmidmaier R, Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor A771726 (leflunomide) induces apoptosis and diminishes proliferation of multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Ther* 2009, 8, 366-375.
86. Hilger RA, Harstrick A, Eberhardt W, Oberhoff C, Skorzec M, Baumgart J, Seeber S, Scheulen ME, Clinical pharmacokinetics of intravenous treosulfan in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998, 42, 99-104.
87. Hilger RA, Gabriele J, Oberhoff C, Kredtke S, Baumgart J, Seeber S, Scheulen ME, Investigation of bioavailability and pharmacokinetics of treosulfan capsules in patients with relapsed ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000, 45, 483-488.
88. Harstrick A, Wilke H, Eberhardt W, Klaassen U, Strumberg D, Korn M, Scheulen ME, Baumgart J, Seeber S, A phase I dose escalation trial of intravenous treosulfan in refractory cancer. *Onkologie* 1996, 19, 153-156.

89. Mahner S, Öskay-Ozcelik G, Heidrich-Lorsbach E, Fuxius S, Sommer H, Klare P, Belau A, Ruhmland B, Heuser T, Kölbl H, Markmann S, Sehouli J, A prospective multicenter study of treosulfan in elderly patients with recurrent ovarian cancer: results of a planned safety analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012, 138, 1413-1419.
90. Turci R, Sottani C, Ronchi A, Minoia C, Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicol Lett* 2002, 134, 57-64.
91. Uotinen H, Juvonen J, Nihtinen A, Ruutu T, Volin L, Low incidence and severity of oral mucositis in allogeneic stem cell transplantation after conditioning with treosulfan and fludarabine. *Eur J Haematol* 2012, 88, 87-88.
92. Casper J, Wolff D, Knauf W, Blau IW, Ruutu T, Volin L, Wandt H, Schäfer-Eckart K, Holowiecki J, Giebel S, Aschan J, Zander AR, Kröger N, Hilgendorf I, Baumgart J, Mylius HA, Pichlmeier U, Freund M, Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies after dose-escalated treosulfan/fludarabine conditioning. *J Clin Oncol* 2010, 28, 3344-3351.
93. Casper J, Hołowiecki R, Trenchel R, Wandt H, Schaefer-Eckart K, Ruutu T, Volin L, Einsele H, Stuhler G, Uharek L, Blau I, Bornhaeuser M, Zander AR, Larsson K, Markiewicz M, Giebel S, Kruzel T, Mylius HA, Baumgart J, Pichlmeier U, Freund M, Beelen DW, Allogeneic hematopoietic SCT in patients with AML following treosulfan/fludarabine conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2012, 47, 1171-1177.
94. Nemecek ER, Guthrie KA, Sorrow ML, Wood BL, Doney KC, Hilger RA, Scott BL, Kovacovics TJ, Maziarz RT, Woolfrey AE, Bedalov A, Sanders JE, Pagel JM, Sickle EJ, Witherspoon R, Flowers ME, Appelbaum FR, Deeg HJ, Conditioning with treosulfan and fludarabine followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation for high-risk hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011, 17, 341-350.
95. Beier R, Schulz A, Hönig M, Eyrich M, Schlegel PG, Holter W, Stachel KD, Ehlert K, Greil J, Nürnberger W, Wößmann W, Bader P, Urban C, Müller I, Suttrop M, Sauer M, Gruhn B, Meisel R, Zimmermann M, Sykora KW, Long-term follow-up of children conditioned with treosulfan: German and Austrian experience. *Bone Marrow Transplant* 2012, 1-11.
96. Ruutu T, Volin L, Beelen DW, Trenchel R, Finke J, Schnitzler M, Holowiecki J, Giebel S, Markiewicz M, Uharek L, Blau IW, Kienast J, Stelljes M, Larsson K, Zander AR, Gramatzki M, Repp R, Einsele H, Stuhler G, Baumgart J, Mylius HA, Pichlmeier U, Freund M, Casper J, Reduced-toxicity conditioning with treosulfan and fludarabine in

- allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes: final results of an international prospective phase II trial. *Hematologica* 2011, 96, 1344-1350.
97. Slatter MA, Rao K, Amrolia P, Flood T, Abinun M, Hambleton S, Nademi Z, Goulden N, Davies G, Qasim W, Gaspar HB, Cant A, Gennery AR, Veys P, Treosulfan-based conditioning regimens for hematopoietic stem cell transplantation in children with primary immunodeficiency: United Kingdom experience. *Blood* 2012, 117, 4367-4375.
98. Shimoni A, Shem-Tov N, Volchek Y, Danylesko I, Yerushalmi R, Nagler A, Allo-SCT for AML and MDS with treosulfan compared with BU-based regimens: reduced toxicity vs reduced intensity. *Bone Marrow Transplant* 2012, 47, 1274-1282.
99. Wachowiak J, Sykora KW, Cornish J, Chybicka A, Kowalczyk JR, Gorczyńska E, Choma M, Grund G, Peters C, Treosulfan-based preparative regimens for allo-HSCT in childhood hematological malignancies: a retrospective study on behalf of the EBMT pediatric diseases working party. *Bone Marrow Transplant* 2011, 46, 1510-1518.
100. Bernardo ME, Piras E, Vacca A, Giorgiani G, Zecca M, Bertaina A, Pagliara D, Contoli B, Pinto RM, Caocci G, Mastronuzzi A, La Nasa G, Locatelli F, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major: results of a reduced-toxicity conditioning regimen based on the use of treosulfan. *Blood* 2012, 120, 473-476.
101. Michallet M, Sobh M, Milpied N, Bay JO, Fürst S, Harousseau JL, Mohty M, Nicolini FE, Labussière H, Tedone N, Morisset S, Vigouroux S, Baumgart J, Tabrizi R, Blaise D, Phase II prospective study of treosulfan-based reduced-intensity conditioning in allogeneic HSCT for hematological malignancies from 10/10 HLA-identical unrelated donor. *Ann Hematol* 2012, 91, 1289-1297.
102. Beelen DW, Trenchel R, Casper J, Freund M, Hilger RA, Scheulen ME, Basara N, Fauser AA, Hertenstein B, Mylius HA, Baumgart J, Pichlmeier U, Hahn JR, Holler E, Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications. *Bone Marrow Transplant* 2005, 35, 233-241.
103. Hilger RA, Baumgart J, Scheulen ME, Trenchel R, Strumberg D, Seeber S, Beelen DW, Pharmacokinetics of treosulfan in a myeloablative combination with cyclophosphamide prior to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004, 42, 654-655.

104. Główna FK, Karaźniewicz-Łada M, Grund G, Wachowiak J, Determination of treosulfan in plasma and urine by HPLC with refractometric detection; pharmacokinetics studies in children undergoing myeloablative treatment prior to haematopoietic stem cell transplantation. *J Chromatogr B* 2007, 850, 569-574.
105. Główna FK, Karaźniewicz-Łada M, Grund G, Wróbel T, Wachowiak J, Pharmacokinetics of high-dose i.v. treosulfan in children undergoing treosulfan-based preparative regimen for allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008, 42, S67-S70.
106. Welsh J, Stuart JFB, Soukop M, Cunningham D, Blackie R, Sangster G, Calman KC, The pharmacokinetics of oral and iv treosulfan. *Br J Cancer* 1982, 46, 467.
107. Müller H, Hilger R, Curative and palliative aspects of regional chemotherapy in combination with surgery. *Support Care Cancer* 2003, 11, 1-11.
108. Valentine JL, Boogaard PJ, Sweeney LM, Turner MJ, Bond JA, Medinsky MA, Disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats. *Chem Biol Interact* 1997, 104, 103-115.
109. Himmelstein MW, Turner MJ, Asgharian B, Bond JA, Comparison of blood concentrations of 1,3-butadiene and butadiene epoxides in mice and rats exposed to 1,3-butadiene by inhalation. *Carcinogenesis* 1994, 15, 1479-1486.
110. Thornton-Manning JR, Dahl AR, Bechtold WE, Griffith WC Jr, Henderson RF, Disposition of butadiene monoepoxide and butadiene diepoxide in various tissues of rats and mice following a low-level inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis* 16, 1995, 1723-1731.
111. Thornton-Manning JR, Dahl AR, Bechtold WE, Griffith WC Jr, Pei L, Henderson RF, Gender differences in the metabolism of 1,3-butadiene in Sprague-Dawley rats following a low level inhalation exposure. *Carcinogenesis* 16, 1995, 2875-2878.
112. Thornton-Manning JR, Dahl AR, Bechtold WE, Griffith WC Jr, Henderson RF, Comparison of the disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats and B6C3F1 mice following a single and repeated exposures to 1,3-butadiene via inhalation, *Toxicology* 1997, 123, 125-134.
113. Thornton-Manning JR, Dahl AR, Allen ML, Bechtold WE, Griffith WC Jr, Henderson RF, Disposition of butadiene epoxides in Sprague-Dawley rats following exposures to 8000 ppm 1,3-butadiene: comparisons with tissue epoxide concentrations following low-level exposures. *Toxicol Sci* 1998, 41, 167-173.

114. Filser JG, Hutzler C, Meischner V, Veereshwarayya V, Csanady GA, Metabolism of 1,3-butadiene to toxicologically relevant metabolites in single-exposed mice and rats. *Chem Biol Interact* 2007, 166, 93-103.
115. Csanady GA, Steinhoff R, Riester MB, Semder B, Pütz C, Li Q, Richter N, Kessler W, Klein D, Filser JG, 1,2:3,4-Diepoxybutane in blood of male B6C3F1 mice and male Sprague-Dawley rats exposed to 1,3-butadiene. *Toxicol Lett* 2011, 207, 286-290.
116. Boogaard PJ, Sumner SCJ, Bond JA, Glutathione conjugation of 1,2:3,4-diepoxybutane in human liver and rat and mouse liver and lung in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, 136, 307-316.
117. Richardson KA, Peters MMCG, Wong BA, Megens RH, van Elburg PA, Booth ED, Boogaard PJ, Bond JA, Medinsky MA, Watson WP, van Sittert NJ, Quantitative and qualitative differences in metabolism of ¹⁴C-1,3-butadiene in rats and mice: Relevance to cancer susceptibility. *Toxicol Sci* 1999, 49, 186-201.
118. Boysen G, Georgieva NI, Bordeerat NK, Sram RJ, Vacek P, Albertini RJ, Swenberg JA, Formation of 1,2:3,4-diepoxybutane-specific hemoglobin adducts in 1,3-butadiene exposed workers. *Toxicol Sci* 2012, 125, 30-40.
119. Georgieva NI, Boysen G, Bordeerat N, Walker VE, Swenberg JA, Exposure-response of 1,2:3,4-diepoxybutane-specific N-terminal valine adducts in mice and rats after inhalation exposure to 1,3-butadiene. *Toxicol Sci* 2010, 115, 322-329.
120. Kautiainen A, Fred C, Rydberg P, Törnqvist M, A liquid chromatography tandem mass spectrometric method for in vivo dose monitoring of diepoxybutane, a metabolite of butadiene. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000, 14, 1848-1853.
121. Hilgendorf I, Wolff D, Gromke T, Trenchel R, Elmaagacli AH, Pichlmeier U, Junghanss C, Freund M, Beelen DW, Casper J, Retrospective analysis of treosulfan-based conditioning in comparison with standard conditioning in patients with myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplant* 2011, 46, 502-509.
122. European Medicines Agency - Human medicines - EU/3/04/186;
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/orphans/2009/11/human_orphan_000528.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b. Data ostatniego wejścia: 03.12.2012.
123. Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method - Books - OECD iLibrary; <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-107-partition->

- coefficient-n-octanol-water-shake-flask-method_9789264069626-en. Data ostatniego wejścia: 03.10.2012.
124. Krause RJ, Elfarra AA, Oxidation of butadiene monoxide to meso- and (±)-diepoxybutane by cDNA-expressed human cytochrome P450s and by mouse, rat and human liver microsomes: evidence for preferential hydration of meso-diepoxybutane in rat and human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997, 337, 176-184.
 125. Cech NB, Krone JR, Enke CG, Electrospray ionization detection of inherently nonresponsive epoxides by peptide binding. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001, 15, 1040-1044.
 126. Filser JG, Bhowmik S, Faller TH, Hutzler C, Kessler W, Midpanon S, Pütz C, Schuster A, Semder B, Veereshwarayya V, Csanady GA, Quantitative investigation of the metabolism of 1,3-butadiene and of its oxidized metabolites in once-through perfused livers of mice and rats. *Toxicol Sci* 2010, 114, 25-37.
 127. Fitting data with nonlinear regression. In: Motulsky HJ, Christopoulos A, Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego 2003, 13-46.
 128. Reactions of alkyl halides: nucleophilic substitutions and eliminations. In: McMurry J, Organic chemistry, 8th edition. Brooks/Cole Cengage Learning, Singapore 2012, 372-396.
 129. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 1997, 23, 3- 26.
 130. Smith DA, Jones BC, Walker DK, Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics. *Med Res Rev* 1996, 16, 243-266.
 131. Testa B, Crivori P, Reist M, Carrupt PA, The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. *Perspect Drug Discov Des* 2010, 19, 179-.211.
 132. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method - Books - OECD iLibrary; http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partitioncoefficient-n-octanol-water-hplc-method_9789264069824-en. Data ostatniego wejścia: 03.10.2012.
 133. Properties of alcohols and phenols. In: McMurry J, Organic chemistry, 8th edition. Brooks/Cole Cengage Learning, Singapore 2012, 623-627.

134. Medinsky MA, Leavens TL, Csanady GA, Gargas ML, Bond JA, In vivo metabolism of butadiene by mice and rats: a comparison of physiological model predictions and experimental data. *Carcinogenesis* 1994, 15, 1329-1340.
135. Hansch C, Leo A, Hoekman D, Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants, American Chemical Society, Washington 1995.
136. Deneer JW, Sinnige TL, Seinen W, Hermens JLM, A quantitative structure-activity relationship for the acute toxicity of some epoxy compounds to the guppy. *Aquatic Toxicology* 1988, 13, 195-204.
137. Tetko IV, Tanchuk VY, Villa AE, Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 1407-1421.
138. Mannhold R, Poda GI, Ostermann C, Tetko IV, Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *J Pharm Sci* 2009, 98, 861-893.
139. Berthod A, Carda-Broch S, Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J Chromatogr A* 2004, 1037, 3-14.
140. Kinetics of metabolism and excretion. In: Curry SH, Whelpton R, Drug disposition and pharmacokinetics: from principles to applications. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester 2011, 121-136.
141. Yang Z, In vivo metabolite kinetics. In: Drug metabolism handbook: Concepts and applications. Ed. Nassar AF, Hollenberg PF, Scatina J. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken 2009, 41-64.
142. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N; Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* 2007, 22, 659-661.
143. Laboratory animal medicine and science – series II. Rabbits: Biology. Linn JM. University of Pennsylvania, Philadelphia, 2000; ehs.uc.edu/lams/data/pdfs/9003.pdf. Data ostatniego wejścia: 28.11.2012.
144. Gengo FM, Schentag JJ, Jusko WJ, Pharmacokinetics of capacity-limited tissue distribution of methicillin in rabbits. *J Pharm Sci* 1984, 73, 867-873.
145. Kumar G, Smith QR, Hokari M, Parepally J, Duncan MW, Brain uptake, pharmacokinetics, and tissue distribution in the rat of neurotoxic N-butylbenzenesulfonamide. *Toxicol Sci* 2007, 97, 253-264.

146. Semoun O, Marchand S, Gregoire N, Lamarche I, Adier C, Laroche L, Goldschmidt P, Couet W, Modeling approach to characterize intraocular doripenem pharmacokinetics after intravenous administration to rabbits, with tentative extrapolation to humans. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56, 3531-3534.
147. Mendelsohn ME, Abramson DH, Madden T, Tong W, Tran HT, Dunkel IJ, Intraocular concentrations of chemotherapeutic agents after systemic or local administration. *Arch Ophthalmol* 1998, 116, 1209-1212.
148. Jahnke K, Wagner T, Bechrakis NE, Willerding G, Coupland SE, Fischer L, Thiel E, Korfel A, Pharmacokinetics and efficacy of ifosfamide or trofosfamide in patients with intraocular lymphoma. *Ann Oncol* 2005, 16, 1974-1978.
149. Otwarty model dwukompartmentowy w stacjonarnych procesach liniowych. W: Hermann TW, *Farmakokinetyka, teoria i praktyka*, wydanie I. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002, 75-91.

XI. WYKAZ ZAŁĄCZNIKÓW

1. Metodyka wyznaczania współczynników korekcyjnych dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB.
2. Zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu na przeprowadzenie badań farmakokinetycznych na królikach.
3. Uzyskane w programie Prism 6.01 wykresy przedstawiające stężenia TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oznaczone podczas aktywacji proleku w roztworach buforowych o pH 7,4, temperaturze 37 °C i różnej sile jonowej oraz przebieg krzywych najlepszego dopasowania i 95% krzywych ufności. Wykresy wewnętrzne przedstawiają rozkład wartości resztowych stężeń analitów.

ZAŁĄCZNIK 1

Współczynnik korekcyjny f danego analitu wyrażał stosunek jego stężenia rzeczywistego do teoretycznego w serii roztworów wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB. Stężenia teoretyczne wynikały z modelu aktywacji TREO, przedstawionego przez Feita i wsp. [6], zgodnie z którym stężenia molowe związków w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB oraz roztworach wzorcowych powinny spełniać dokładnie stosunek 1:2:1.

W celu ustalenia wartości współczynników f_{TREO} , $f_{\text{S,S-EBDM}}$ i $f_{\text{S,S-DEB}}$ wyznaczono równania 5 krzywych wzorcowych. Dwie tzw. „rzeczywiste” krzywe wzorcowe przedstawiały zależność stosunku pola powierzchni piku TREO i S,S-DEB do powierzchni piku IS1 od stężenia danego analitu w serii roztworów wzorcowych przygotowanych z gotowych (dostępnych komercyjnie) związków, tj. TREO i (\pm)-DEB. Z kolei trzy tzw. „teoretyczne” krzywe wzorcowe przedstawiały zależność stosunku pola powierzchni piku TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB do powierzchni piku IS1 od teoretycznego stężenia danego analitu w serii roztworów wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, tj. stężenia zgodnego z modelem aktywacji zaproponowanym przez Feita [6]. Korzystając z programu Microsoft Excel 2007, wykonano analizę regresji dla wszystkich 5 uzyskanych prostych (2 prostych „rzeczywistych” dla TREO i S,S-DEB oraz 3 prostych „teoretycznych” dla TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB). Na podstawie współczynników kierunkowych „rzeczywistych” ($a_{\text{r TREO}}$ i $a_{\text{r S,S-DEB}}$) i „teoretycznych” krzywych wzorcowych ($a_{\text{t TREO}}$ i $a_{\text{t S,S-DEB}}$) dla TREO i S,S-DEB, wyznaczono współczynniki korekcyjne dla tych dwóch związków (współczynnik b prostych statystycznie równy zero):

$$f_{\text{TREO}} = \frac{a_{\text{t TREO}}}{a_{\text{r TREO}}} \quad f_{\text{S,S-DEB}} = \frac{a_{\text{t S,S-DEB}}}{a_{\text{r S,S-DEB}}}$$

Wartość współczynnika korekcyjnego dla S,S-EBDM ($f_{\text{S,S-EBDM}}$) obliczono na podstawie składu roztworu podstawowego TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB, zgodnie ze wzorem:

$$f_{\text{S,S-EBDM}} = \frac{C_{\text{r S,S-EBDM}}}{C_{\text{t S,S-EBDM}}} = \frac{C_{0 \text{ TREO}} - C_{\text{r TREO}} - C_{\text{r S,S-DEB}}}{C_{\text{t S,S-EBDM}}} = \frac{C_{0 \text{ TREO}} - C_{\text{t TREO}} \cdot f_{\text{TREO}} - C_{\text{t S,S-DEB}} \cdot f_{\text{S,S-DEB}}}{C_{\text{t S,S-EBDM}}} =$$

$$= \frac{20000 - 5000 \cdot f_{\text{TREO}} - 5000 \cdot f_{\text{S,S-DEB}}}{10000}$$

gdzie:

$C_{0 \text{ TREO}}$ – stężenie początkowe TREO w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM, S,S-DEB, tj. przed alkalizacją za pomocą NaOH ($C_{0 \text{ TREO}} = 20000 \mu\text{mol/l}$);

$C_{\text{r TREO}}$, $C_{\text{r S,S-EBDM}}$, $C_{\text{r S,S-DEB}}$ – stężenia rzeczywiste odpowiednich analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM, S,S-DEB;

$C_{\text{t TREO}}$, $C_{\text{t S,S-EBDM}}$, $C_{\text{t S,S-DEB}}$ – stężenia teoretyczne odpowiednich analitów w roztworze podstawowym TREO, S,S-EBDM, S,S-DEB ($C_{\text{t TREO}} = C_{\text{t DEB}} = 5000 \mu\text{mol/l}$, $C_{\text{t S,S-EBDM}} = 10000 \mu\text{mol/l}$).

Znajomość $f_{\text{S,S-EBDM}}$ pozwoliła obliczyć rzeczywiste stężenia S,S-EBDM w roztworach wzorcowych TREO, S,S-EBDM i S,S-DEB ($C_{\text{r S,S-EBDM}} = C_{\text{t S,S-EBDM}} \cdot f_{\text{S,S-EBDM}}$), a tym samym współczynnik kierunkowy „rzeczywistej” krzywej wzorcowej dla S,S-EBDM.

ZAŁĄCZNIK 2

UCHWAŁA NR 77/2010

z dnia 19.11.2010r.

Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu

§ 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku o wydanie dodatkowej liczby zwierząt, pt.:

"OCENA PARAMETRÓW FARMAKOKINETYCZNYCH TREOSULFANU I JEGO BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH EPOKSYPOCHODNYCH" z dnia 22.10.2010 r., złożonego przez Pana dr hab. n. med. Franciszka Główkę z Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,

lokalna komisja etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości **3**

3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt): **Królik Nowozelandzki biały – 24 osobniki.**

4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczałnej):
dr hab. n. med. Franciszek Główka, Kat. i Z-d Farm. Fizycznej i Farmakokinetyki, UM Poznań ;
prof. UM dr hab. Edmund Grześkowiak, Kat. i Z-d Farm. Klin. i Biofarmacji, UM Poznań;
mgr farm. Michał Romański, Kat. i Z-d Farm. Fizycznej i Farmakokinetyki, UM Poznań;
mgr farm. Agnieszka Kamińska, Kat. i Z-d Farm. Klin. i Biofarmacji, UM Poznań;
dr n. farm. Edyta Szalek, Kat. i Z-d Farm. Klin. i Biofarmacji, UM Poznań

5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

§ 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1. 

[Pieczęć lokalnej komisji etycznej]

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej biorących udział w głosowaniu:

1. Prof. dr hab. Paweł Maćkowiak, Przewodniczący LKE.....

2. Prof. dr hab. Leszek Rychlik, Wiceprzewodniczący LKE.....

3. Dr Czesław Sadowski.....

4. Prof. dr hab. Teresa Bobkiewicz-Kozłowska.....

5. Dr Anna Kasprzyk.....

6. Dr Paweł Antosik.....

7. Prof. dr hab. Piotr Krutki.....

8. Mgr inż. Przemysław Wylegała.....

9. Dr Aleksandra Ziątek-Berdychowska.....

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35
tel. 061 8487198; fax 061 8487197

Otrzymują:

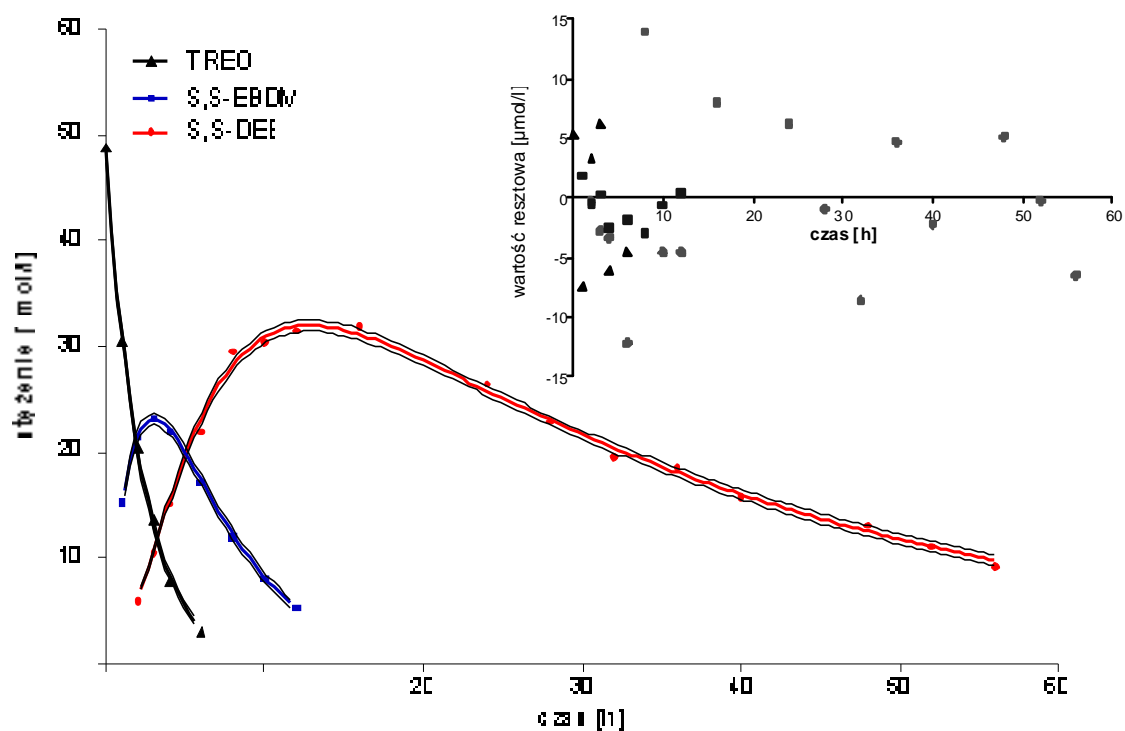
1. Wnioskodawca,
2. a/a

Pouczenie

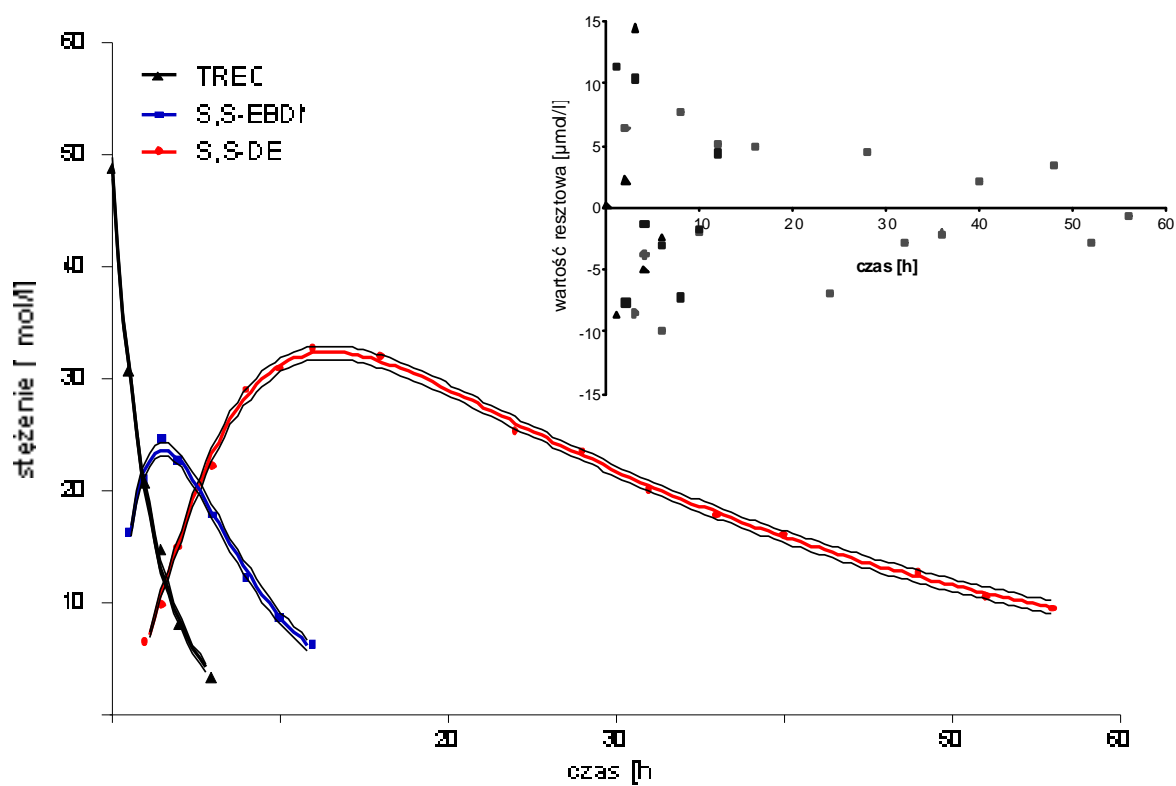
Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 30 dni od dnia otrzymania uchwały.

Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275).

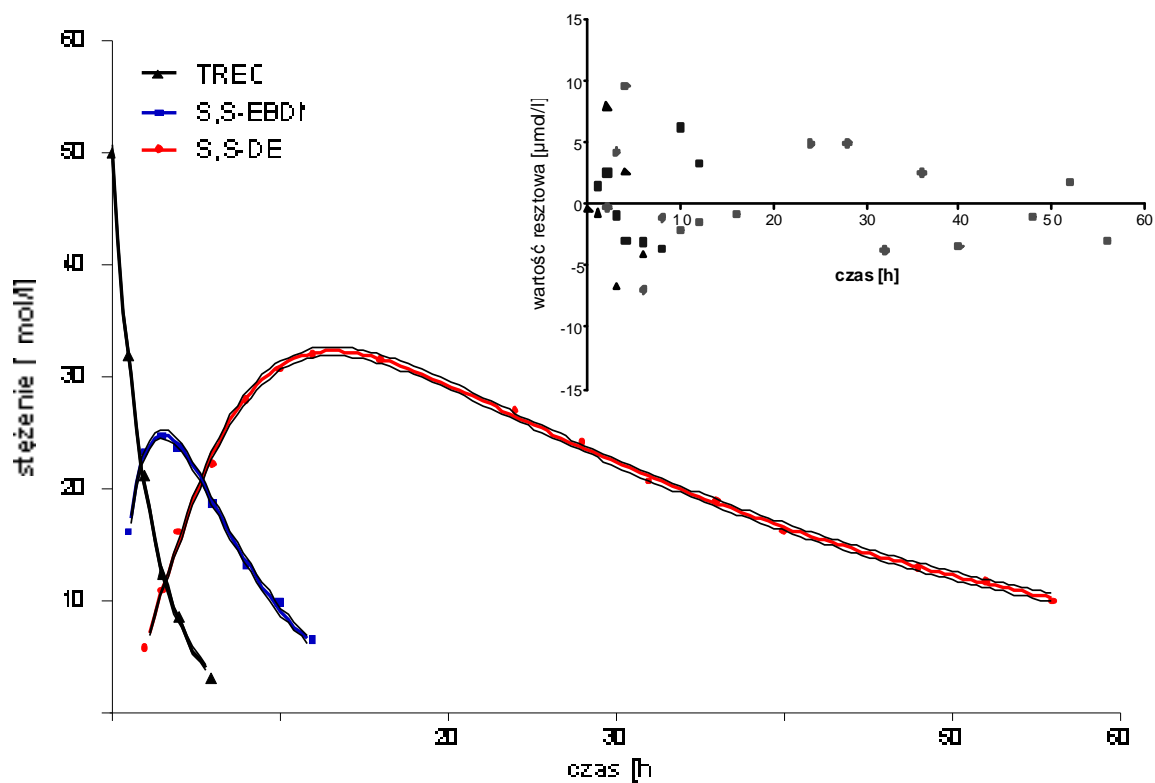
ZAŁĄCZNIK 3



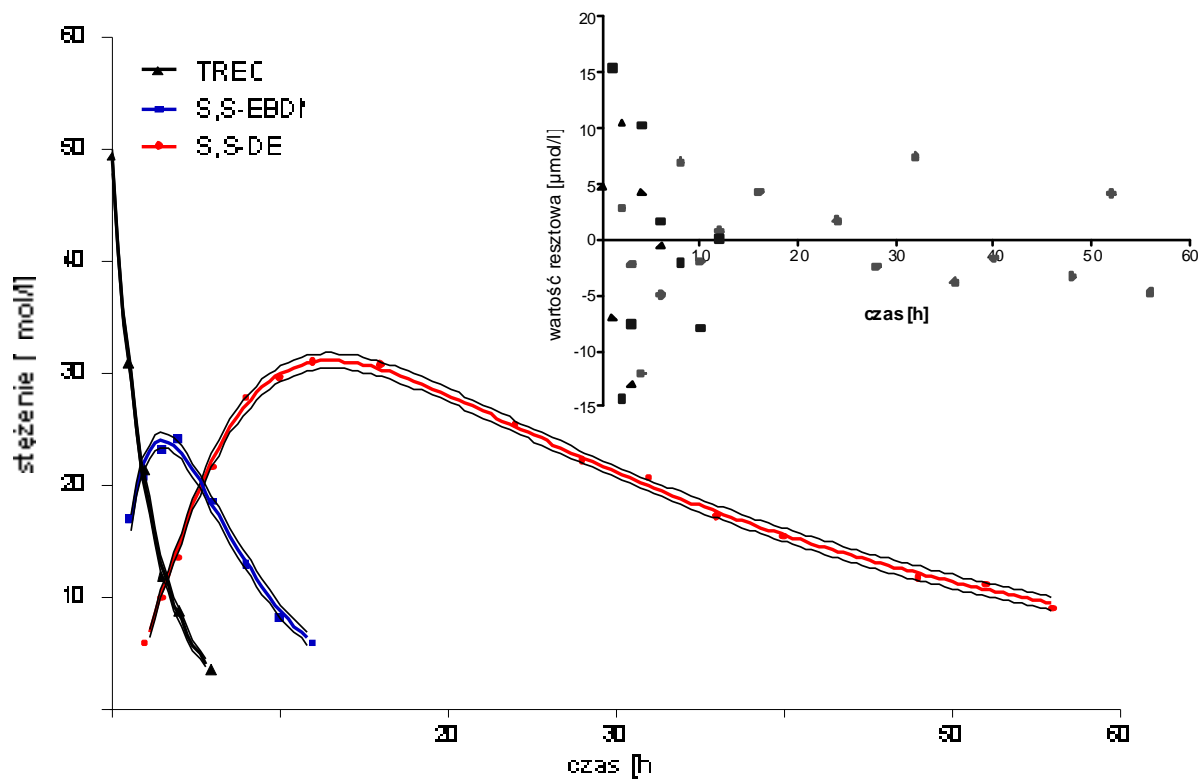
Ryc. Z-1. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,16 mol/l (próba 2).



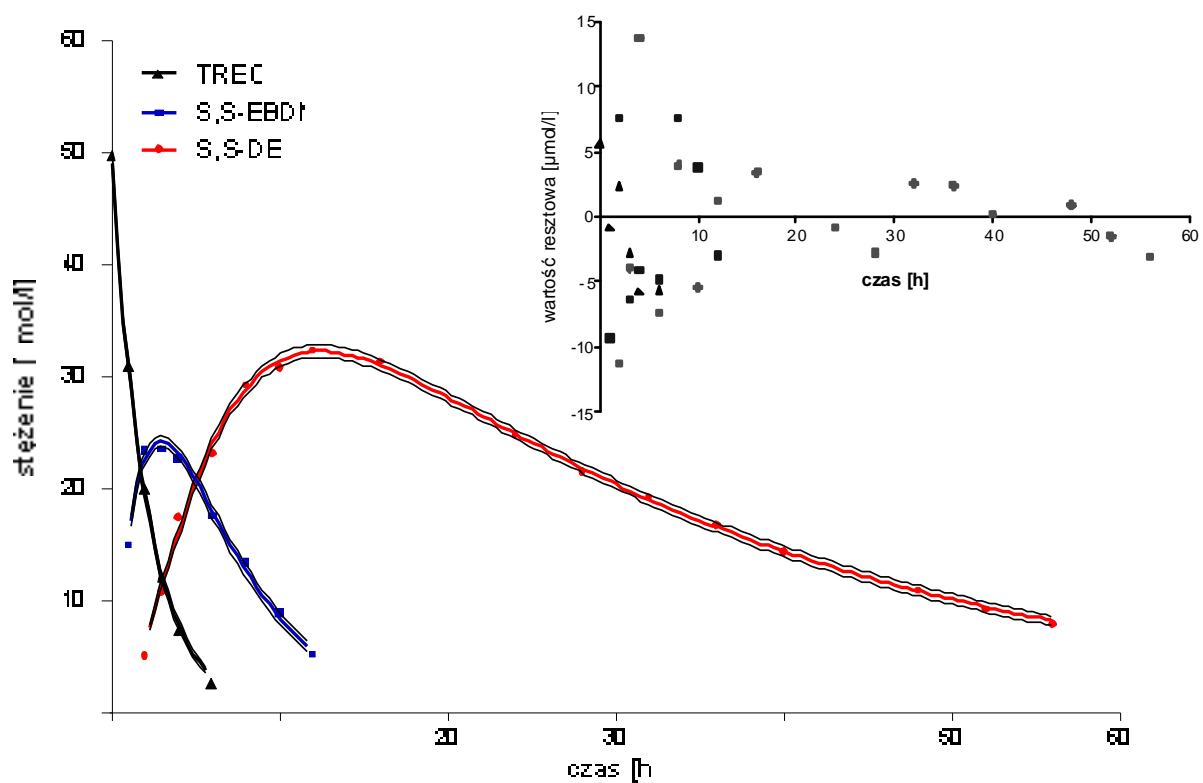
Ryc. Z-2. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,16 mol/l (próba 3).



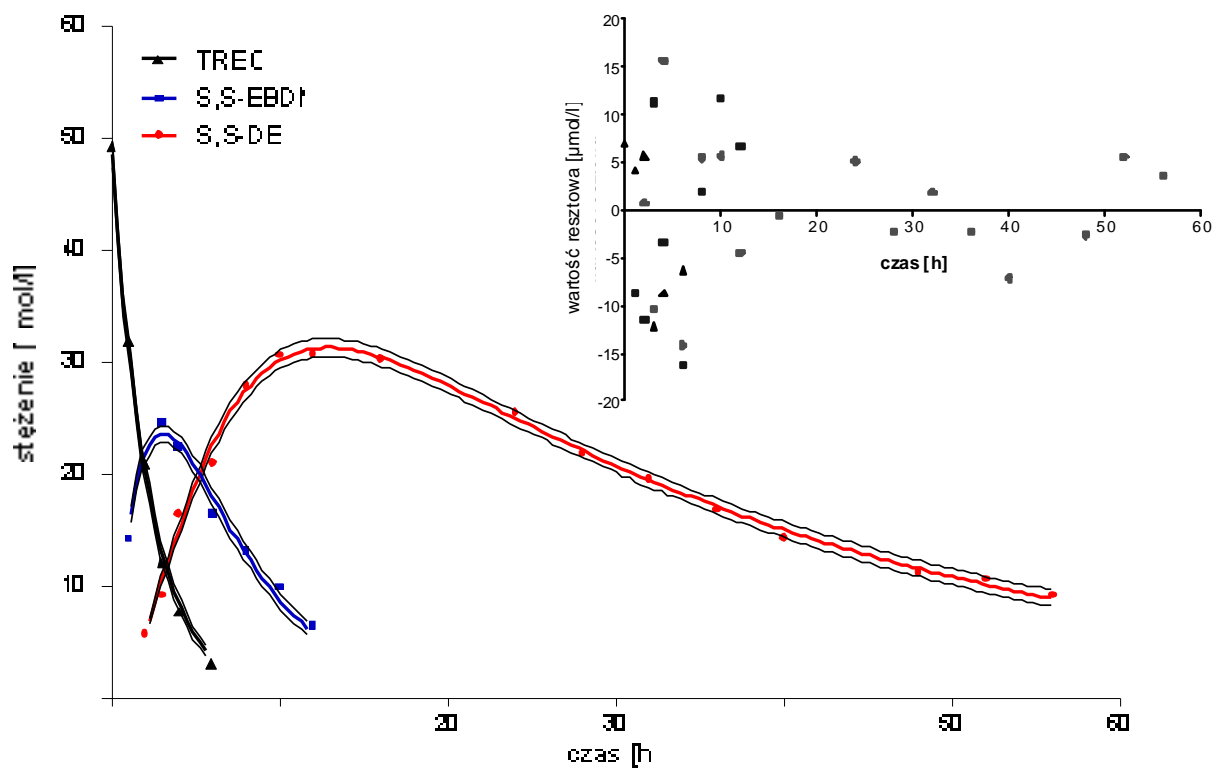
Ryc. Z-3. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,16 mol/l (próba 4).



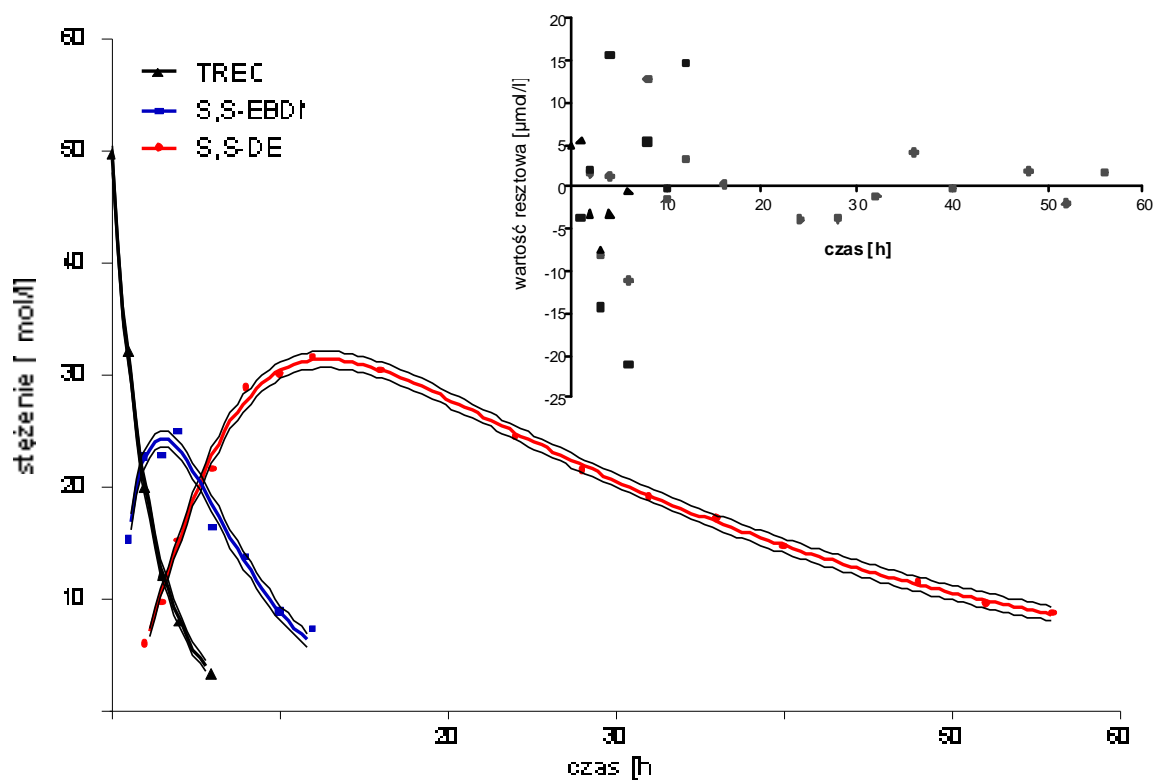
Ryc. Z-4. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,16 mol/l (próba 5).



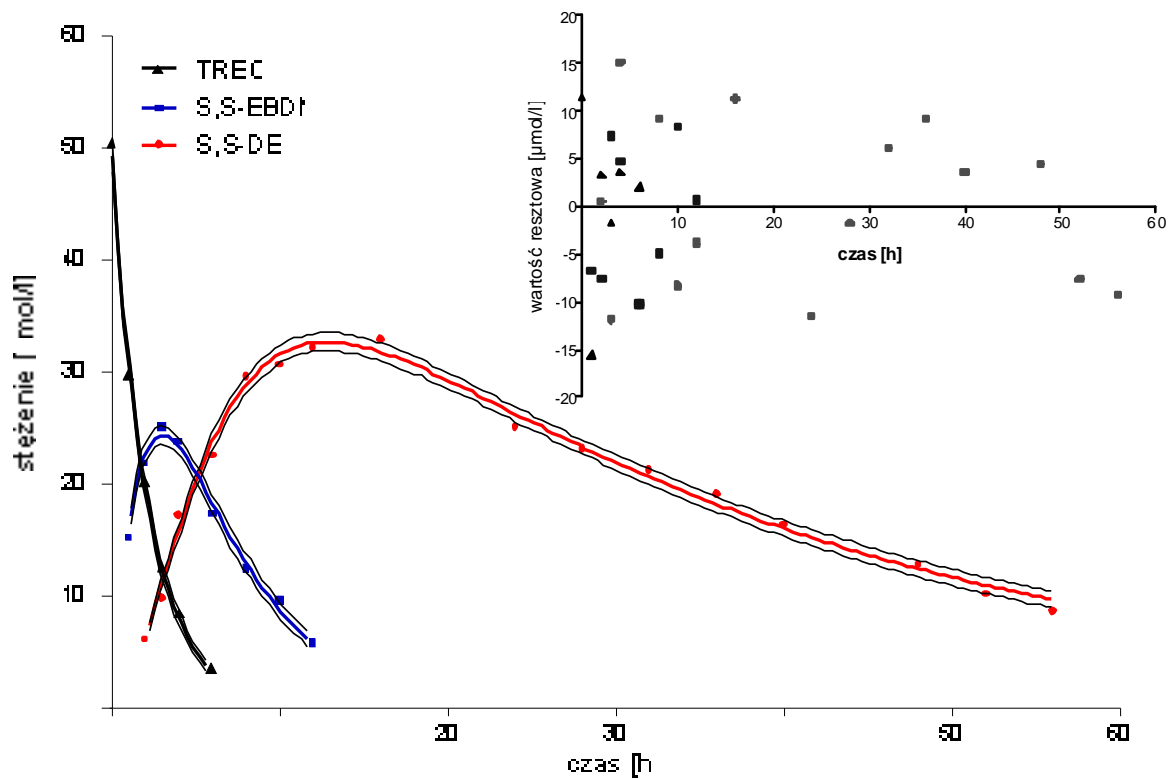
Ryc. Z-5. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,19 mol/l (próbna 2).



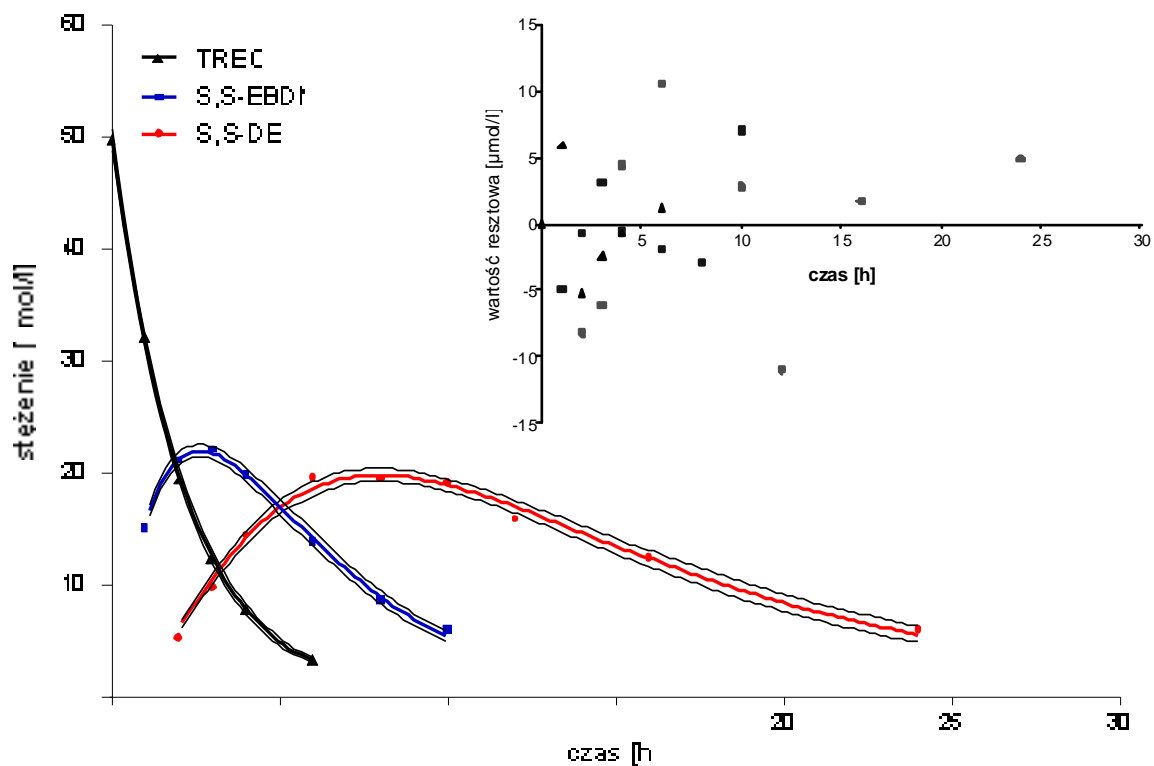
Ryc. Z-6. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,19 mol/l (próbna 3).



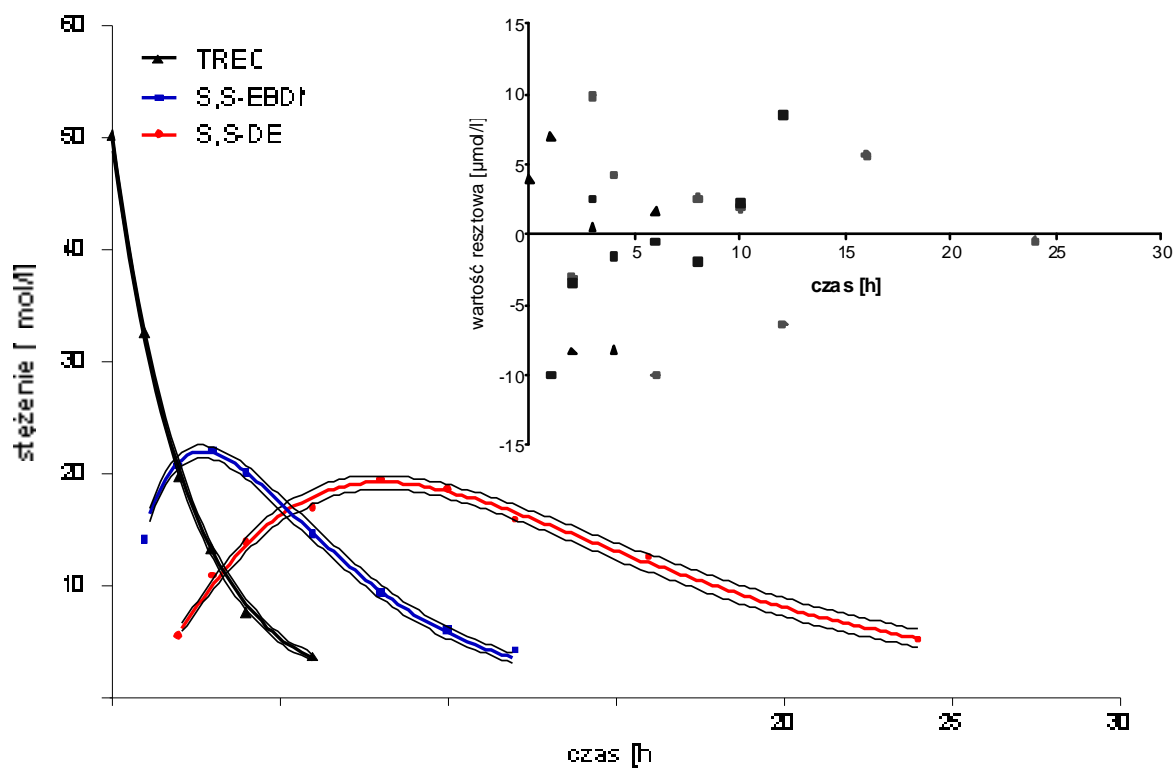
Ryc. Z-7. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,19 mol/l (próba 4).



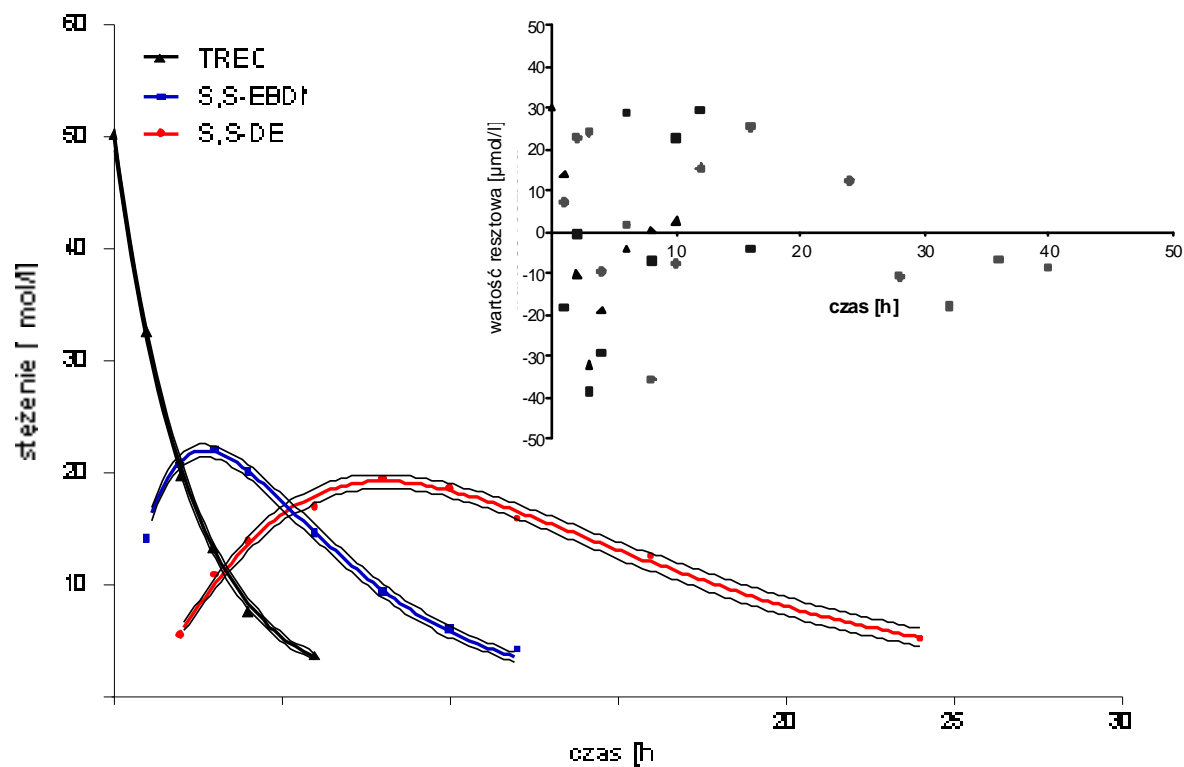
Ryc. Z-8. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0730 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 0,19 mol/l (próba 5).



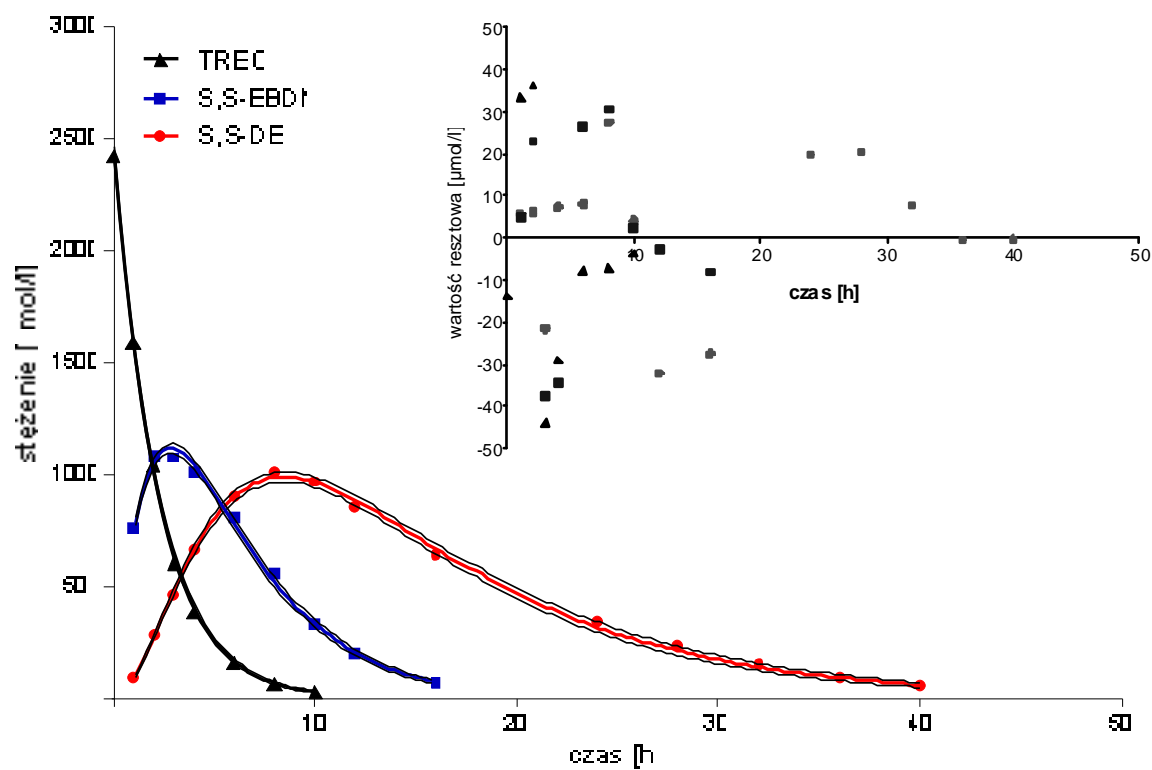
Ryc. Z-9. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 2).



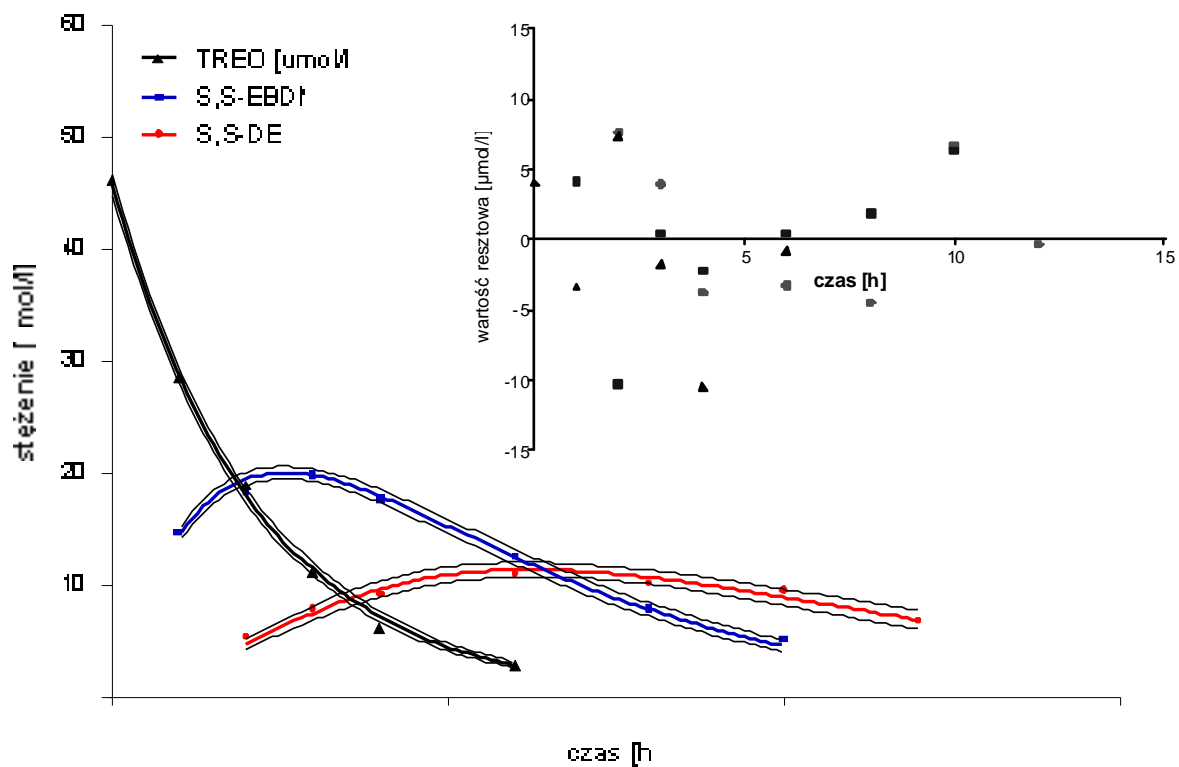
Ryc. Z-10. Aktywacja 0,5 mmol/l TREC w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 3).



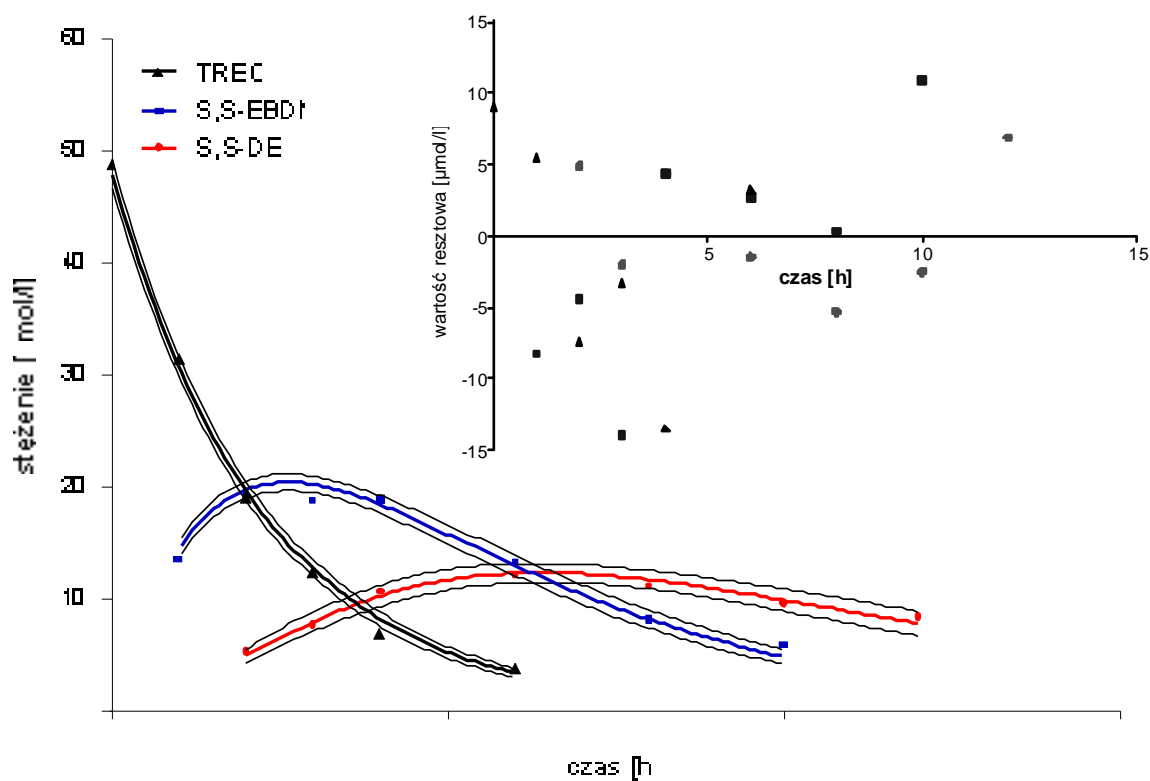
Ryc. Z-11. Aktywacja 2,5 mmol/l TREC w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 2).



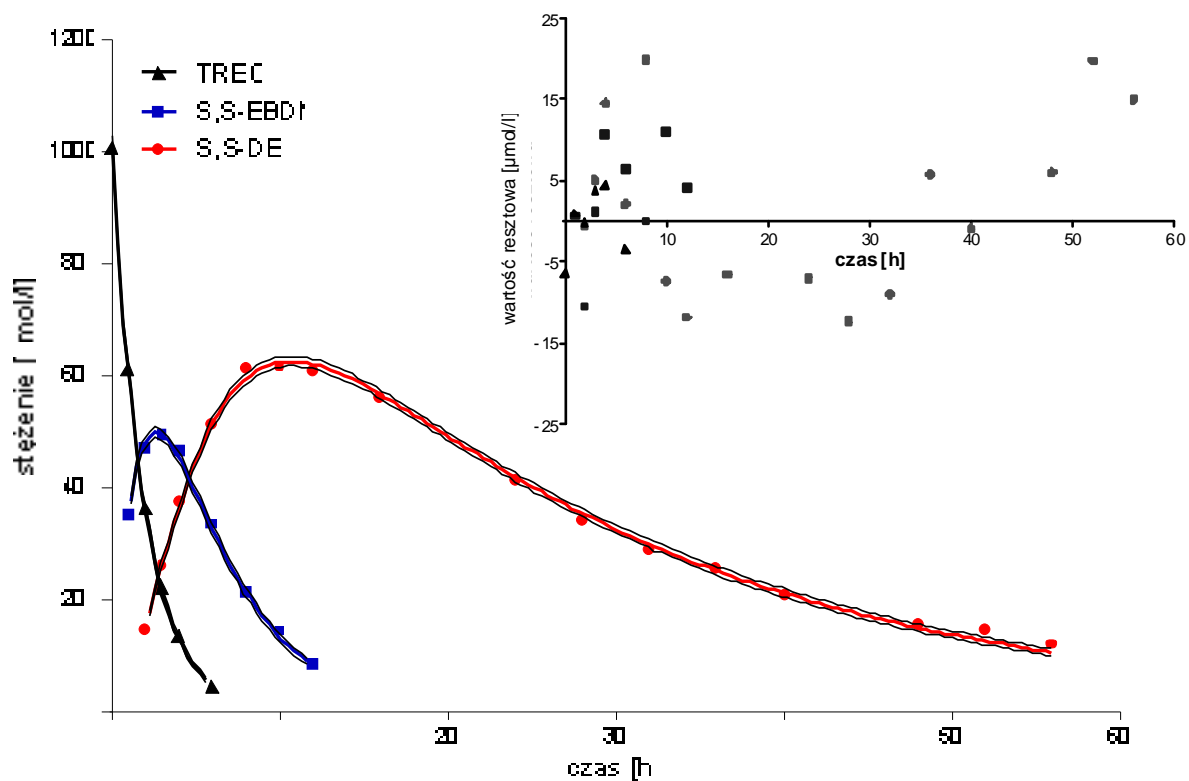
Ryc. Z-12. Aktywacja 2,5 mmol/l TREC w 0,369 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 3).



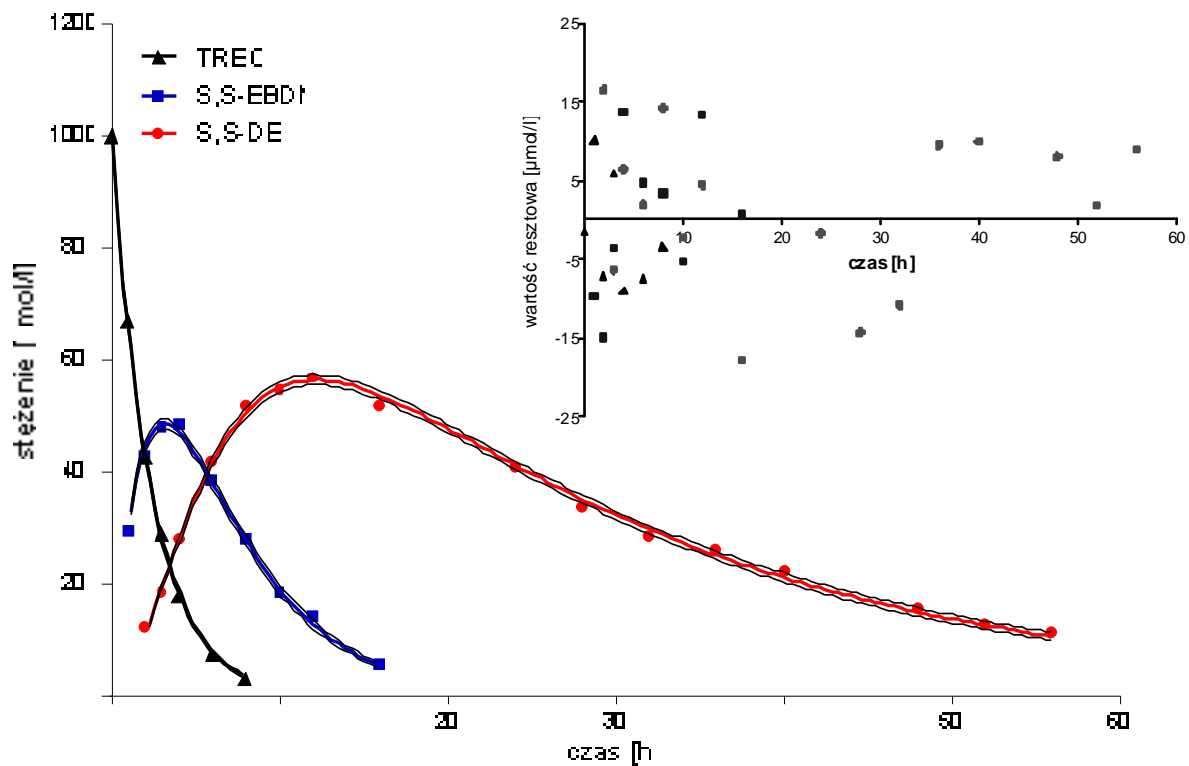
Ryc. Z-13. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 2).



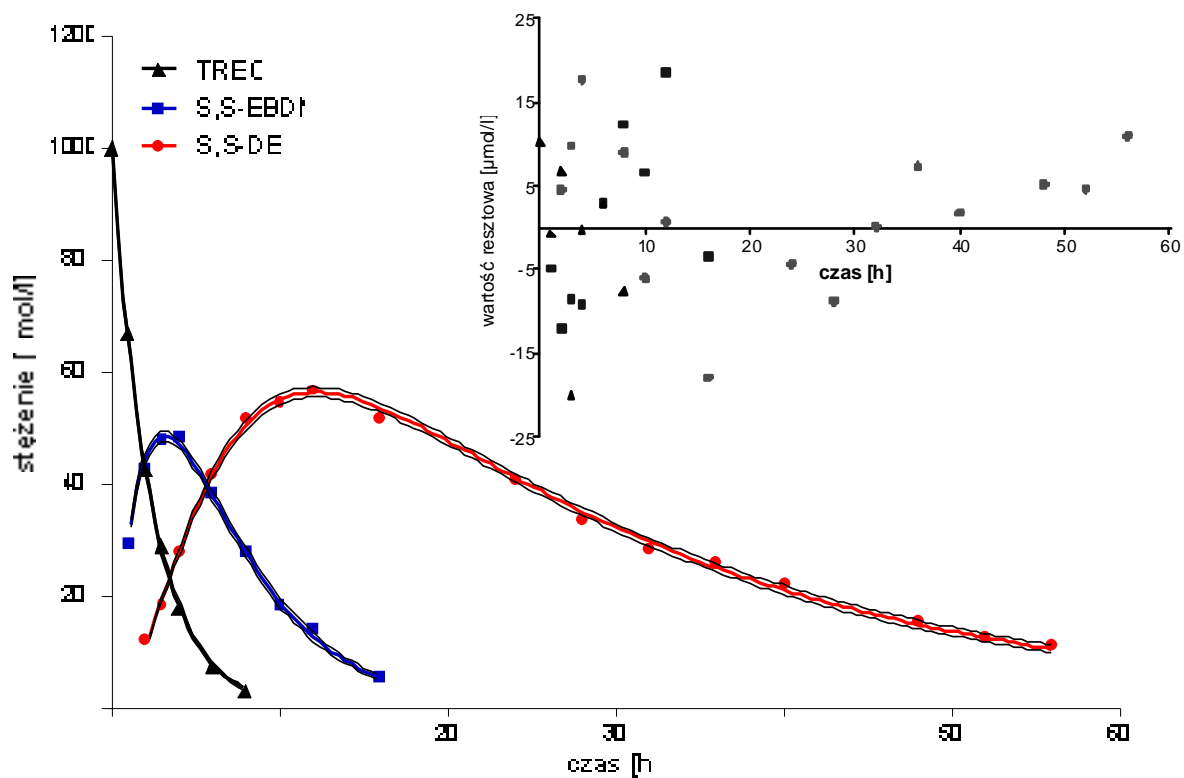
Ryc. Z-14. Aktywacja 0,5 mmol/l TREO w 0,0615 mol/l buforze fosforanowym o sile jonowej 1,0 mol/l (próba 3).



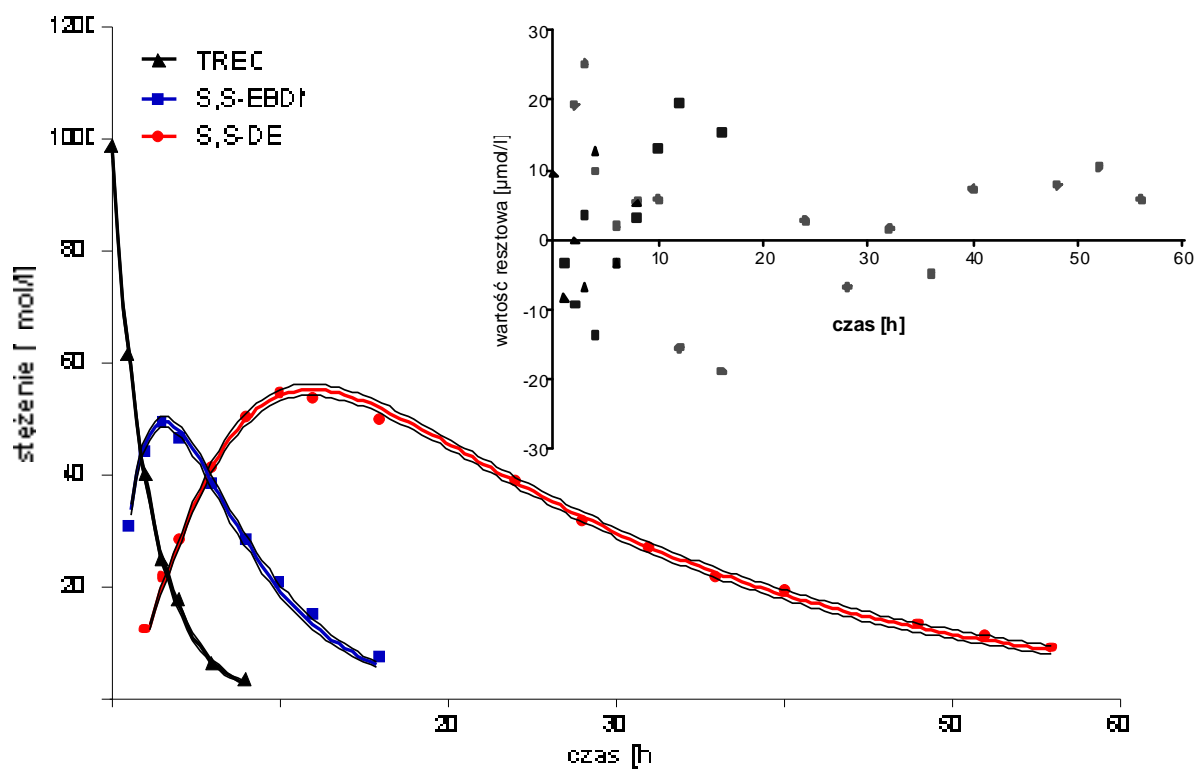
Ryc. Z-15. Aktywacja 1,0 mmol/l TREO w buforze PBS (próba 2).



Ryc. Z-16. Aktywacja 1,0 mmol/l TREO w buforze PBS (próba 3).



Ryc. Z-17. Aktywacja 1,0 mmol/l TREC w buforze PBS (próbna 4).



Ryc. Z-18. Aktywacja 1,0 mmol/l TREC w buforze PBS (próbna 5).