Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej

Małgorzata Szafarz

OCENA PROCESÓW ADME NOWEGO ANTAGONISTY RECEPTORA HISTAMINOWEGO H_3 Z GRUPY POCHODNYCH PIPERYDYNY

PRACA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. Joanna Szymura-Oleksiak

Kraków 2012

Składam serdeczne podziękowania Pani Prof. dr hab. Joannie Szymurze-Oleksiak za cierpliwość, życzliwość i nieocenioną pomoc udzieloną mi podczas pisania niniejszej rozprawy.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP 3
Badania farmakokinetyczne nowego związku – potencjalnego leku 3
Wykorzystanie spektrometrii mas w badaniach farmakokinetycznych 7
Transport leków przez błony biologiczne 13
Wchłanianie 17
Dystrybucja 20
Dystrybucja związków do erytrocytów 27
Eliminacja: biotransformacja i wydalanie 28
Nieliniowość w farmakokinetyce 31
2. CEL PRACY 34
3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 36
3.1. Charakterystyka związku będącego przedmiotem badań 36
3.2. Odczynniki 41
3.2.1. Substancje i rozpuszczalniki 41
3.2.2. Sporządzone roztwory 41
3.3. Aparatura 42
3.4. Zwierzęta laboratoryjne 43
3.5. Metodyka badań 43
3.5.1. Analiza HPLC/MS/MS 43
3.5.2. Oznaczenia spektrofotometryczne 50
3.5.3. Badanie farmakokinetyki związku DL76 po jego jednorazowym podaniu dożylnym i dożołądkowym 52
3.5.4. Badanie potencjalnego wpływu P-glikoproteiny na dystrybucję związku DL76 53
3.5.5. Badanie dystrybucji związku DL76 do erytrocytów 53
3.5.6. Poszukiwanie wiodącego metabolitu związku DL76 55
3.5.7. Badanie rozpuszczalności DL76 w różnych warunkach pH i temperatury 55
3.5.8. Obliczenia farmakokinetyczne 56
3.5.9. Obliczanie funkcji termodynamicznych 57
3.5.10. Obliczenia statystyczne 58
4. WYNIKI 59
4.1. Walidacja stosowanej metody analitycznej LC/MS/MS 59

4.1.1. Walidacja metody oznaczania związku DL76 w surowicy krwi szczura 59
4.1.2. Walidacja metody oznaczania DL76 w wybranych tkankach szczura 64
4.2. Walidacja stosowanej metody spektrofotometrycznej 70
4.3. Ocena dyspozycji związku DL76 w surowicy krwi szczura 72
4.3.1. Podanie dożylne 72
4.3.2. Podanie dożołądkowe 76
4.4. Badanie rozpuszczalności związku DL76 metodą równowagową „stirred flask" 77
4.5. Wpływ P-glikoproteiny na dystrybucję związku DL76 79
4.6. Ocena dyspozycji DL76 w wybranych narządach szczura 82
4.6.1. Mózg 82
4.6.2. Struktury mózgu 84
4.6.3. Wątroba 85
4.6.4. Nerki 87
4.6.5. Płuca 89
4.7. Poszukiwanie wiodącego metabolitu związku DL76 91
4.8. Dyspozycja metabolitu związku DL76 95
4.9. Porównanie dyspozycji badanego związku w wybranych tkankach szczura 98
4.10. Dystrybucja związku DL76 do erytrocytów 100
5. DYSKUSJA WYNIKÓW 103
6. WNIOSKI 111
7. STRESZCZENIE 112
6. PIŚMIENNICTWO 116
9. SPIS RYCIN 134
10. SPIS TABEL 138

1. WSTĘP

Badania farmakokinetyczne nowego związku – potencjalnego leku

Każdy lek, aby wywołać odpowiedź farmakologiczną musi dotrzeć do swojego miejsca działania, czyli biofazy przechodząc przez szereg barier biologicznych. O tym jak szybko pojawia się on w biofazie, jak również o intensywności i czasie trwania efektu farmakologicznego decyduje nie tylko wielkość podanej dawki, ale także wiele innych czynników takich jak: droga podania, stopień i szybkość uwalniania się substancji czynnej z danej formulacji, jej rozpuszczalność i zdolność do przechodzenia przez błony biologiczne oraz właściwości farmakokinetyczne. Niemałe znaczenie mają również czynniki farmakogenetyczne i patofizjologiczne [1]. Na początku lat 90-tych podstawowymi czynnikami, eliminującymi związek z dalszych badań były niezadawalające właściwości farmakokinetyczne i toksykologiczne (50.4%), które najczęściej ujawniały się dopiero podczas prób klinicznych [2]. W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na znaczenie badań farmakokinetycznych we wczesnych etapach rozwoju leków, w wyniku, czego nastąpił znaczny spadek procentowego udziału przyczyn farmakokinetycznych (do około 10%) w wykluczeniu związku z dalszych etapów badań nad jego rozwojem [3].

Farmakokinetyka zajmuje się badaniem losów leku w organizmie, które określane są za pomocą akronimu ADME (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie), a w przypadku uwzględnienia również oceny toksykologicznej – ADMET. Oszacowanie profilu farmakokinetycznego umożliwia szybszą selekcję związków, kandydatów na lek, rokujących dalszy rozwój, co powoduje redukcję kosztów i oszczędność czasu przeznaczonych na dalsze badania, tym bardziej, że obserwowany w badaniach *in vivo* brak efektu farmakologicznego może również pośrednio wynikać z niekorzystnych właściwości farmakokinetycznych badanej substancji, takich jak: niska dostępność biologiczna lub szybki metabolizm oraz wydalanie [4, 5].

Do najważniejszych parametrów farmakokinetycznych ocenianych w fazie badań przedklinicznych należą: biodostępność (F), klirens (Cl), okres półtrwania ($t_{1/2}$), objętość dystrybucji (V_d) oraz stopień wiązania badanego związku z białkami osocza, a także w niektórych przypadkach współczynnik podziału pełna krew/osocze [6]. W zależności od zachowania się związku w organizmie pod względem farmakokinetycznym można odpowiednio planować dalsze etapy jego rozwoju. Substancje, które wydalane są głównie w postaci niezmienionej przez nerki wykazują niewielki metabolizm np. w wątrobie i istnieje duże prawdopodobieństwo, że będą się one charakteryzowały farmakokinetyką liniową, czyli niezależną od dawki. Dla takich związków można zminimalizować badania nad ich metabolizmem. W przypadkach, gdy związek jest eliminowany przede wszystkim w postaci metabolitów, powinien zostać oszacowany jego profil metaboliczny oraz zidentyfikowane enzymy zaangażowane w biotransformację. Dla tego typu związków ważne jest także poznanie farmako- i toksykokinetyki ich głównych metabolitów. Substancje te przeważnie wykazują wysoki efekt pierwszego przejścia, farmakokinetykę zależną od dawki i są skłonne do wchodzenia w interakcje farmakokinetyczne z innymi lekami. Związki mające współczynnik ekstrakcji wątrobowej zbliżony do jedności wykazują zazwyczaj słabą i bardzo zmienną dostępność biologiczną, przez co stwarzają liczne problemy z podaniem doustnym stanowiącym najbardziej fizjologiczny sposób podawania leku. W przypadku tego typu substancji, przy wysokich dawkach, prawdopodobne jest wysycenie metabolizujących je enzymów, co z kolei może być przyczyną wystąpienia nieliniowej farmakokinetyki. Stanowi to wskazanie do podjęcia prac nad modyfikacją ich struktury chemicznej w celu poprawienia parametrów farmakokinetycznych przy zachowanej aktywności farmakologicznej. Problematyczne z punktu widzenia farmakokinetyki mogą być także związki, które bardzo silnie wiążą się z białkami osocza. Jeżeli frakcja wolna danego związku jest poniżej 10% jego wypieranie z połączeń z białkiem przez metabolity, substancje endogenne np. bilirubinę lub inne podawane jednocześnie leki może powodować istotne zmiany w jego podstawowych parametrach farmakokinetycznych takich jak V_d, Cl i $t_{1/2}$. Najkorzystniejsze z punktu widzenia

farmakokinetyki są substancje podlegające eliminacji liniowej niezależnie od podawanej dawki. Jako kandydaci do dalszych badań preferowane są także związki z dłuższym okresem półtrwania, gdyż umożliwiają stworzenie formulacji do podania raz dziennie, co jest znacznie wygodniejsze dla pacjenta.

Lek po dostaniu się do krążenia systemowego ulega dystrybucji do tkanek i narządów, co w dużym stopniu zależy od jego właściwości fizykochemicznych przede wszystkim takich jak lipofilowość i stopień jonizacji. Zazwyczaj leki lipofilne charakteryzują się dużą objętością dystrybucji, natomiast leki hydrofilne i zjonizowane w pH fizjologicznym występują głównie w łożysku naczyniowym. Wyjątek stanowią zjonizowane leki zasadowe zawierające np. aminy czwartorzędowe, dla których V_d może być duża w związku z występowaniem interakcji pomiędzy naładowanym dodatnio atomem azotu, a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi wchodzącymi w skład błony biologicznej. Objętość dystrybucji powinna być optymalna w zależności od miejsca działania danej substancji np. dla leków, które działają wewnątrz komórki V_d powinna być duża, inaczej większość podanego preparatu nie osiągnie miejsca działania [1].

W celu otrzymania bardziej bezpiecznych i skutecznych leków jednocześnie zmniejszając koszty i czas potrzebny na ich opracowanie, należy stosować surowe kryteria selekcji dla związków przeznaczonych do pierwszej fazy badań klinicznych.

Rozwój chemii kombinatorycznej umożliwił szybką syntezę ogromnych ilości substancji mogących być potencjalnymi lekami [7]. Koniecznym było opracowanie farmakologicznych metod HTS (ang. high throughput screening) mających na celu szybkie wyselekcjonowanie związków o pożądanym powinowactwie do określonych receptorów. Konsekwencją tego stało się zapotrzebowanie na metody HTS mogące zapewnić podobną selekcję uwzględniającą parametry farmakokinetyczne. Największym wyzwaniem było opracowanie analitycznych metod ilościowych pozwalających na szybkie oznaczenie dużej ilości bardzo różnorodnych substancji w złożonych matrycach biologicznych. Osiągnięcie tego celu stało się możliwe dzięki rozwojowi detekcji masowej charakteryzującej się dużą selektywnością w stosunku do oznaczanej

substancji. Pozwoliło to, między innymi, na wprowadzenie do badań farmakokinetycznych tzw. dawkowania kasetowego polegającego na jednoczesnym podawaniu zwierzętom doświadczalnym kilku, a nawet kilkunastu związków, a następnie ich równoczesnym oznaczaniu w badanej matrycy biologicznej [8, 9, 10]. Na podstawie uzyskanych wyników opracowywany jest następnie ich profil farmakokinetyczny. W taki sposób stosunkowo szybko można stworzyć bazy danych uwzględniające zależność pomiędzy strukturą chemiczną związku, a jego właściwościami farmakokinetycznymi, co umożliwia identyfikację ugrupowań chemicznych mających największy wpływ na zmianę poszczególnych parametrów farmakokinetycznych. Niewątpliwą zaletą dawkowania kasetowego jest oszczędność czasu i zwierząt laboratoryjnych, natomiast zasadniczą wadą możliwość występowania interakcji pomiędzy podawanymi jednocześnie substancjami, co może prowadzić do błędnych wniosków. Metodę tą można zmodyfikować przez zastosowanie klasycznego sposobu dawkowania, czyli podawania zwierzęciu laboratoryjnemu jednej badanej substancji i pobieraniu próbek krwi w określonych odstępach czasowych. Jeżeli dostępne są próbki z kilku takich eksperymentów i we wszystkich były one pobierane w tych samych odstępach czasowych wówczas próbki pobrane w tym samym czasie można zmieszać ze sobą i analizować jednocześnie. W ten sposób unika się ryzyka wystąpienia interakcji, a jednocześnie nadal minimalizuje czas potrzebny na przeprowadzenie analizy większej ilości związków.

Kolejną metodą stosowaną w celu przeprowadzenia badań farmakokinetycznych w systemie HTS jest tzw. sample pooling method. Ponieważ w oszacowaniu profilu farmakokinetycznego wykorzystuje się zazwyczaj od 3 do 5 zwierząt na każdy punkt czasowy, w celu przyspieszenia analizy można zmieszać ze sobą próbki pobrane w tym samym czasie, po oznaczeniu, których otrzymuje się średnie wartości stężeń. Na podstawie tych danych można obliczyć wartości średnie poszczególnych parametrów farmakokinetycznych np. $C_{max,av}$ (średnie stężenie maksymalne), $t_{max,av}$ (średni czas potrzebny do osiągnięcia stężenia maksymalnego), czy AUC_{av} (średnie pole pod krzywą zależności stężenia od czasu). Metoda ta jednak nie jest przydatna np. w badaniach

biorównoważności, ponieważ nie da się w ten sposób oszacować zmienności osobniczej [11, 12, 13].

Badania farmakokinetyczne mogą być prowadzone na różnych poziomach od badań *in silico*, przez *in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, aż do badań *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych, które w najpełniejszy sposób odzwierciedlają warunki fizjologiczne.

Dane uzyskane na kilku różnych modelach zwierzęcych po przeprowadzeniu skalowania allometrycznego mogą następnie zostać wykorzystane w badaniach przedklinicznych do przewidywania profilu farmakokinetycznego u ludzi. Pozwala to na oszacowanie pierwszej dawki u ludzi oraz opracowanie odpowiedniego schematu dawkowania w badaniach klinicznych, co jest szczególnie ważne np. w przypadku silnie toksycznych leków onkologicznych [14, 15, 16, 17].

Wykorzystanie spektrometrii mas w badaniach farmakokinetycznych

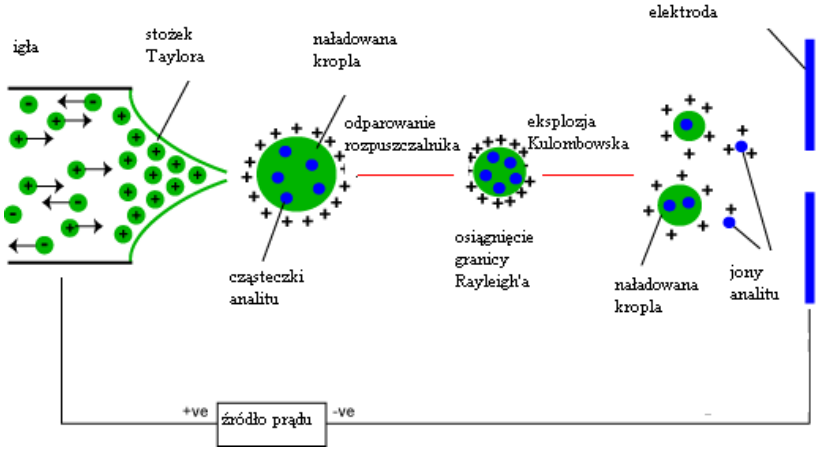
Obecnie analitycznym narzędziem z wyboru stosowanym praktycznie na wszystkich etapach badań farmakokinetycznych są różnego rodzaju spektrometry masowe. W zależności od swojej budowy wykorzystywane są przede wszystkim w badaniach ilościowych (potrójne kwadrupole) lub też w poszukiwaniu i identyfikacji metabolitów, gdzie najczęściej stosuje się systemy z pułapką jonową (krótki czas skanowania dużej ilości mas) oraz z transformacją Fouriera (bardzo dokładny pomiar masy) [18, 19, 20, 21, 22]. Dostępne są także tzw. spektrometry hybrydowe łączące w sobie dwie technologie i przykładem takiego urządzenia może być spektrometr API 5500 (połączenie pułapki jonowej z potrójnym kwadrupolem) lub LTQ Orbitrap (połączenie pułapki jonowej z transformacją Fouriera). Spektrometria mas jest również wykorzystywana do badania kinetyki enzymatycznej, wyznaczania stałych Michaelisa-Menten oraz liczby obrotów (k_{cat}), do poszukiwania i identyfikacji biomarkerów oraz w badaniach dystrybucji (MALDI MSI) [23, 24, 25, 26, 27, 28].

W badaniach farmakokinetycznych na szczególną uwagę zasługuje metoda analityczna polegająca na sprzężeniu HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) ze spektrometrem typu potrójny kwadrupol (LC/MS lub LC/MS/MS), wykorzystywana przede wszystkim do oznaczeń ilościowych.

Podstawą działania spektrometru masowego jest jonizacja cząsteczek badanej substancji, co umożliwia przyspieszenie ich w polu elektrycznym w próżni. Heterogeniczny strumień jonów (dodatnich lub ujemnych) zostaje rozdzielony na szereg składowych, zależnie od stosunku masy do ładunku (*m/z*). W przypadku jonów naładowanych dodatnio, masa próbki mierzona w spektrometrze jest powiększona o masę protonu lub protonów przyłączonych do cząsteczki analizowanej substancji. Analogicznie dla jonów naładowanych ujemnie masa próbki pomniejszona jest o masę protonu lub protonów oderwanych od cząsteczki analizowanej substancji. Jonizacja elektronami (EI) jest tu wyjątkiem i metoda ta powoduje jedynie wybicie elektronu bez przyłączania protonu. Istnieje także możliwość oznaczania *m/z* substancji niejonizujących się przez dołączenie (reakcja chemiczna lub oddziaływanie fizyczne) podstawnika obdarzonego ładunkiem lub podlegającego jonizacji (tzw. derywatyzacja) lub przez utworzenie adduktów np. z sodem lub potasem.

Istnieją różne sposoby jonizacji cząsteczek analitu, jednak najczęściej stosowaną i wykorzystaną również w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy jest jonizacji typu ESI (ang. electrospray ionisation), za odkrycie, której chemik John Benett Fenn otrzymał w roku 2002 Nagrodę Nobla. Umożliwia ona uzyskanie wysokiej czułości oznaczeń przy jednoczesnej minimalnej fragmentacji badanego związku, jest kompatybilna z technikami chromatograficznymi i elektroforetycznymi oraz dzięki możliwości powstawania cząsteczek wielokrotnie naładowanych pozwala na analizę mas znacznie większych niż nominalny zakres pomiarowy analizatora przy zachowaniu stosunkowo wysokiej rozdzielczości. W przypadku ESI związek ulega jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym przy użyciu napięcia rzędu 2-5 kV, kiedy to na końcu kapilary powstaje tzw. stożek Taylora, z którego odrywają się małe, silnie naładowane kropelki. W strumieniu azotu dochodzi do odparowania nadmiaru

rozpuszczalnika, a kropelki zyskują dużą gęstość ładunku elektrycznego, jednocześnie zmniejszając swoje rozmiary. Gdy siły kulombowskie zrównoważą siły napięcia powierzchniowego (granica Rayleigh'a), dochodzi do tzw. eksplozji kulombowskiej, czyli rozbicia kropli na dużą liczbę mikrokropelek. Ta sekwencja zdarzeń powtarza się, aż do momentu, kiedy rozmiary kropli są tak małe, że zamiast rozbicia dochodzi do desorpcji fragmentów jonowych i na tej drodze do zniwelowania nadmiaru ładunku (ryc. 1). Powstający strumień jonów wprowadzany jest do analizatora i w efekcie uzyskuje się chromatogram będący zapisem zmian całkowitego prądu jonowego TIC (ang. total ion current) w czasie [29].

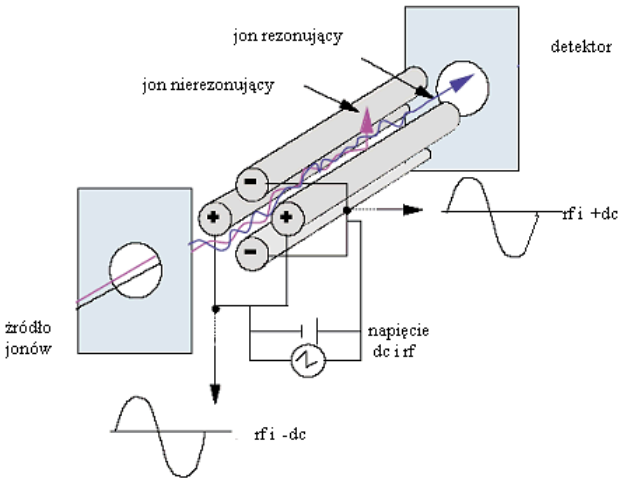


Ryc. 1. Zasada działania źródła jonów typu ESI [30].

Inną możliwą metodą jonizacji jest APCI (ang. atmospheric pressure chemical ionisation). Źródło jonów tego typu składa się z nebulizatora oraz igły dostarczającej wyładowań koronowych, natomiast pary rozpuszczalnika działają tutaj, jako gazowy reagent w procesie jonizacji chemicznej. Kolejnym możliwym do zastosowania źródłem jonów jest APPI (ang. atmospheric pressure photoionisation). Podobnie jak w APCI stosuje się tutaj nebulizator ogrzewany do temp. 300-500°C, natomiast jonizacja zachodzi pod wpływem lampy emitującej fotony o energii równej ok. 10 eV. Często w APPI stosuje się domieszkę innej substancji zwanej dopantem, przez co można zwiększyć ilość powstających jonów. Dopant ulega jonizacji bezpośrednio pod wpływem fotonów światła UV i następnie w wyniku zderzeń przekazuje proton cząsteczkom analitu lub

otrzymuje od nich elektron. Najczęściej dopantem jest toluen, którego energia jonizacji wynosi 8.83 eV. Przekazanie protonów zachodzi tylko wtedy, gdy w układzie rozpuszczalnik – dopant – analit największe powinowactwo do protonu wykazuje analit, a najmniejsze dopant [30].

Otrzymane w wyniku jonizacji jony są następnie rozdzielane w zależności od wartości *m/z*. W przypadku analizy ilościowej największe zastosowanie znalazły analizatory kwadrupolowe zbudowane z dwóch par metalowych prętów, z których jedna para jest naładowana dodatnio, a druga ujemnie. Do każdej z nich dostarczany jest jednocześnie prąd stały (ang. direct currant, dc) i zmienny (ang. radio frequency, rf). Rozdzielczość takiego układu zależy od stosunku napięcia rf/dc i jest wartością stałą. Przy zadanej amplitudzie dc i rf tylko jony o określonej wartości *m/z* ulegają rezonansowi, dzięki czemu mają stabilną trajektorię, przechodzą między prętami i docierają do detektora (ryc. 2).



Ryc. 2. Zasada rozdziału jonów z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego [30].

W technice MS/MS stosowane są dwa analizatory kwadrupolowe, pomiędzy którymi znajduje się komora kolizyjna. Taka konfiguracja nosi nazwę „tandem in space", ponieważ wprowadzany jest dodatkowy moduł w układzie szeregowym. Pierwszy kwadrupol służy do selekcji jonu prekursorowego (macierzystego), który następnie ulega fragmentacji w komorze kolizyjnej, gdzie jest on przyspieszany w obecności gazu obojętnego (argon, azot lub hel). Stopień

fragmentacji uzależniony jest od wartości energii kolizyjnej i fragmenty potomne analizowane są z wykorzystaniem drugiego kwadrupola. Analiza ilościowa MS/MS najczęściej prowadzona jest dwoma technikami: techniką SIM (ang. single ion monitoring) – podobnie jak w pojedynczym spektrometrze masowym badany jest tylko jeden jon charakterystyczny dla danego związku oraz techniką SRM (ang. single reaction monitoring), gdzie analizowany jest stosunek intensywności jonu macierzystego do potomnego. Obecność dwóch analizatorów mas znacznie zwiększa selektywność metody, dlatego możliwe jest przeprowadzanie analizy wielu substancji jednocześnie w złożonej matrycy biologicznej [28].

Do analiz jakościowych oprócz analizatorów kwadrupolowych stosuje się także analizatory czasu przelotu oraz klasyczne i liniowe pułapki jonowe. Analizatory czasu przelotu (ang. time of flight, TOF) charakteryzują się stosunkowo dużą rozdzielczością (do 100 000 Da) oraz dosyć wysoką czułością i najczęściej stosowane są ze źródłem jonow typu MALDI (ang. matrix assisted laser desorbtion ionisation), gdzie analizowaną substancję miesza się z roztworem matrycy, w której pod wpływem impulsów lasera dochodzi do wzbudzenie elektronów. Jony, utworzone przez przeniesienie protonu między wzbudzoną matrycą, a analizowaną substancją, ulegają desorpcji, a następnie są przyspieszane w analizatorze przy pomocy impulsu elektrycznego i zaczynają dryfować przez jego komorę. Na końcu analizatora znajduje się detektor połączony z urządzeniem rejestrującym czas od impulsu przyspieszającego do momentu uderzenia określonego jonu w detektor. Czas przelotu jest przeliczany na stosunek masy cząsteczkowej jonu do jego ładunku elektrycznego.

Kolejnym rodzajem analizatora jest pułapka jonowa (ang. ion trap). Manipulując parametrami prądu przyłączonego do elektrod można uwięzić w pułapce określone jony, a następnie dokonywać pomiarów przez „wyrzucanie" z pułapki kolejnych grup jonów o zdefiniowanym stosunku *m/z*. Stosunkowo nowym analizatorem w spektrometrii mas jest liniowa pułapka jonowa (ang. linear ion trap, linear trap quadrupole, LTQ) zbudowana, jak kwadrupol, z czterech równoległych prętów. Na obu końcach analizatora przykładany jest potencjał elektryczny, który uniemożliwia ucieczkę jonów, a pomiar masy odbywa

się przez „wyrzucanie" jonów o określonym *m/z* z analizatora oraz ich detekcję. Analizatory te charakteryzują się większą czułością niż zwykłe pułapki jonowe, ale stosunkowo niską rozdzielczością (kilka tysięcy). Przykładem połączenia liniowej pułapki jonowej z innym detektorem jest spektrometr LTQ Orbitrap. Analizatory typu Orbitrap charakteryzują się dużą rozdzielczością (do 200 000 Da) i dokładnością pomiaru masy, dlatego stosowane są przede wszystkim w badaniach proteomicznych i metabolomice.

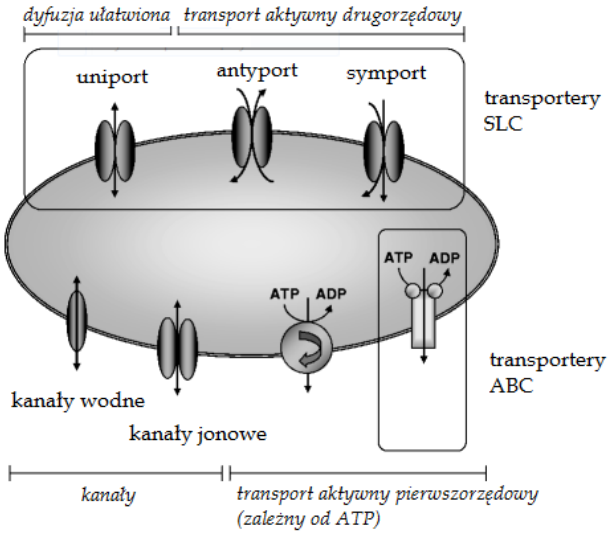
Podstawową wadą analizy ilościowej z wykorzystaniem spektrometrii mas jest występowanie tzw. efektu matrycy (supresja lub zwiększenie stopnia jonizacji oznaczanego analitu w zależności od rodzaju matrycy), który może wpływać na czułość metody. Nie tylko matryca, ale także materiał egzogenny może powodować zmniejszenie stopnia jonizacji, co zaobserwowano na przykład w przypadku niektórych polimerów wchodzących w skład plastikowych łączników stosowanych w HPLC [32].

Dokładny mechanizm powstawania efektu matrycy nie jest znany. Prawdopodobnie związany jest on ze współzawodnictwem pomiędzy analitem i innymi wspólnie wyekstrahowanymi składnikami matrycy o dostęp do powierzchni mikrokropelek, z których następnie jony mogą przejść do fazy gazowej i w konsekwencji do analizatora mas. Teoria ta wyjaśniałaby również, dlaczego efekt matrycy jest najbardziej widoczny przy stosowaniu źródła jonów typu ESI, gdzie jony powstają na powierzchni kropelki rozpuszczalnika.

W celu ograniczenia efektu matrycy i jednocześnie zwiększenia dokładności oznaczeń ilościowych proponowane są następujące metody: modyfikacja sposobu ekstrakcji, bardziej dokładne oczyszczenie próbki przez zastosowanie kilku odczynników ekstrahujących, SPE, itp.; poprawa rozdziału chromatograficznego; zastosowanie innego niż ESI sposobu jonizacji np. APCI lub APPI; oraz zastosowanie odpowiedniego wzorca wewnętrznego (najbardziej odpowiednim wzorcem jest znakowany stabilnym izotopem analog oznaczanego związku) [33, 34, 35, 36].

Transport leków przez błony biologiczne

Około 30% ludzkiego genomu koduje białka błonowe, z czego 1200 stanowią białka transportujące [37, 38]. Transport związków przez błonę biologiczną może mieć charakter bierny, który nie wymaga energii i przebiega do momentu ustalenia się równowagi (dyfuzja bierna lub ułatwiona), bądź aktywny, wymagający nakładu energii. Energię tą uzyskuje się w wyniku hydrolizy wysokoenergetycznego wiązania w ATP tzw. transport aktywny pierwszorzędowy lub w wyniku transportu przez błonę innych substancji zazwyczaj jonów sodowych lub wodorowych tzw. transport aktywny drugorzędowy (ryc. 3).



Ryc. 3. Rodzaje transportu przez błony biologiczne: dyfuzja bierna, ułatwiona, transport aktywny pierwszo- i drugorzędowy [39].

Dyfuzja bierna zachodzi zgodnie z gradientem stężeń, ma charakter nieograniczony (nie ulega wysyceniu) i wykazuje bardzo słabą selektywność w stosunku do struktury chemicznej związku przechodzącego przez błonę biologiczną. Może ona zachodzić w sposób między- lub przezkomórkowy zazwyczaj za pośrednictwem tzw. kanałów wodnych oraz jonowych. O szybkości tego procesu decydują między innymi wielkość cząsteczki, jej rozpuszczalność w tłuszczach (współczynnik dyfuzji rośnie proporcjonalnie do lipofilowości natomiast spada wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej) oraz stopień jonizacji. Za

pośrednictwem dyfuzji biernej transportowana jest jedynie frakcja niezjonizowana, z czym związany jest fenomen tzw. „ion trapping" polegający na „uwięzieniu" substancji po tej stronie błony gdzie jej jonizacja jest większa w przypadku, gdy pH środowiska po obu stronach błony biologicznej znacznie się od siebie różni [39, 40, 41].

Transportery błonowe dzielą się na dwie główne nadrodziny: SLC (ang. solute carrier transporters) i ABC (ang. ATP binding cassette).

Ponad 300 genów koduje białka transportowe należące do nadrodziny SLC, w skład której obecnie wchodzą 43 rodziny oraz szereg podrodzin i indywidualnych transporterów. Wiele z nich przenosi przez błony biologiczne tylko substancje endogenne, ale są też takie, które przede wszystkim transportują ksenobiotyki [42]. Do nadrodziny SLC należą nośniki odpowiedzialne za transport ułatwiony oraz transport aktywny drugorzędowy. W **transporcie ułatwionym** cząsteczki oddziałują z białkowym nośnikiem i dzięki jego zmianom konformacyjnym są przenoszone przez błonę lipidową [43]. Tego rodzaju nośniki wykazują pewne podobieństwa do nośników transportu aktywnego (są selektywne i wysycalne), ale przenoszą one substancje zawsze zgodnie z gradientem stężeń. **Transport aktywny drugorzędowy** polega na przenoszeniu przez błonę jednej rozpuszczonej substancji wbrew gradientowi stężenia, dzięki energii uzyskanej z transportu jonów zgodnie z różnicą stężenia. Siła napędowa tego transportu jest magazynowana w postaci potencjału elektrochemicznego i w zależności od tego, w którą stronę przenoszona jest substancja mamy do czynienia z antyportem – transport substancji w przeciwną stronę niż transport jonów (ang. exchangers) lub symportem – transport w tą samą stronę (ang. coupled transporters).

Jedną z najważniejszych podrodzin SLC jest podrodzina SLC22, do której należą między innymi OATP (ang. organic anion transporting polipeptydes) oraz OAT (ang. organic anion transporters) i OCT (ang. organic cation transporters). OATP zlokalizowane są przede wszystkim w nerkach, barierze krew/mózg i jelitach. Charakteryzują się one szeroką specyficznością substratową, dzięki czemu mogą przenosić związki o niezwykle różnorodnej strukturze. Substratami

OATP są m.in.: glukuronid 17β-estradiolu, kwasy żółciowe, prawastatyna, feksofenadyna, rifampicyna, digoxyna oraz benzylpenicillina. U ludzi najlepiej poznana jest izoforma hOATP-C (inaczej: OATP2, LST-1) ulegająca ekspresji głównie w wątrobie, gdzie transportuje bilirubinę oraz jej mono- i diglukuronidy, kwasy żółciowe, koniugaty sulfonowe i glukuronidowe, a także leki: m.in. metotreksat i statyny [44, 45, 46].

Transportery OCT to tzw. uniportery transportujące substancje w obie strony zgodnie z gradientem stężeń na zasadzie dyfuzji ułatwionej. Można je podzielić na kilka grup OCT1-4 z których najistotniejsze są dwie pierwsze. Nośniki należące do grupy OCT1 znajdują się w proksymalnych kanalikach nerek, bazolateralnej błonie enterocytów oraz przede wszystkim w wątrobie, gdzie są odpowiedzialne za transport ksenobiotyków do hepatocytów. Substratami dla nich są m.in. acyklowir, gancyklowir, metformina oraz substancje endogenne takie jak serotonina i prostaglandyna E_2. Transportery OCT2 biorą udział w eliminacji nerkowej niektórych leków np. dezypraminy. Występują one także w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i odpowiadają m.in. za transport choliny, dopaminy, histaminy, serotoniny oraz takich leków jak cymetydyna i memantyna.

Podobnie jak OCT również OAT można podzielić na kilka grup OAT1-5, z których OAT1 oraz OAT3 funkcjonują, jako tzw. anionowe antyportery. Transportują one wiele substancji endogennych np. cykliczne nukleotydy, prostaglandyny oraz leki takie jak: tetracykliny, metotreksat, niesteroidowe leki przeciwzapalne, diuretyki oraz leki przeciwwirusowe [47, 48].

Na uwagę zasługuje także podrodzina SLC15A (zależne od jonów wodorowych nośniki dla oligopeptydów), do której należą transportery PEPT1 oraz PEPT2 znalezione w jelitach, nerkach, płucach oraz barierze krew/płyn mózgowo-rdzeniowy. Ich substratami są m.in. antybiotyki beta laktamowe, inhibitory ACE, leki przeciwwirusowe oraz kwas delta aminolewulinowy [49, 50, 51, 52, 53, 54].

Transportery z nadrodziny ABC stanowią przykład **transportu aktywnego pierwszorzędowego**, gdzie energia uzyskiwana jest w wyniku hydrolizy

wysokoenergetycznego wiązania w ATP [55]. Pełnią one ważne funkcje ochronne, zabezpieczają organizm przed wchłanianiem i dystrybucją potencjalnie toksycznych ksenobiotyków, ale ponieważ wykazują zdolność do transportu wielu różnych substancji chemicznych mają ogromny wpływ na podstawowe procesy farmakokinetyczne leków. Najlepiej poznanym transporterem z tej grupy jest P-glikoproteina (P-gp) kodowana przez gen oporności wielolekowej (ang. mulitidrug resistance, MDR1), która ze względu na zdolność do aktywnego transportu ksenonobiotyków na zewnątrz komórki jest między innymi odpowiedzialna za niską dostępność biologiczną wielu leków [55, 56, 57]. Potwierdzono, że białko to ulega ekspresji m.in. w jelitach, barierze krew/mózg, nerkach, kanalikach żółciowych, łożysku oraz w komórkach nowotworowych i dzięki swoim właściwościom może wywierać wpływ na wszystkie procesy ADME. Ponadto ekspresja oraz aktywność P-gp podlegają dużej zmienności osobniczej. Do leków będących jej substratami należą m.in. substancje o działaniu przeciwpadaczkowym (lamotrygina, fenytoina, karbamazepina), immunosupresyjnym (takrolimus), przeciwwirusowym (indinavir) oraz leki przeciwnowotworowe (winkrystyna, daunarubicyna, etopozyd, metotreksat, paklitaksel) [48, 58, 59, 60]. Działanie P-gp może być również wzmacniane pod wpływem induktorów (np. ryfampicyna), lub hamowane pod wpływem inhibitorów (np. werapamil, cyklosporyna) [61, 62, 63, 64].

Interakcje leków lub nowych związków, potencjalnych leków, z transporterami mogą mieć ogromny wpływ na procesy ADME. Transportery błonowe zlokalizowane w nabłonku jelit, nerek i wątroby, mają najistotniejsze znaczenie z punktu widzenia farmakokinetyki, ponieważ biorą one udział w selektywnym wchłanianiu i eliminacji leków oraz ich metabolitów odgrywając ważną rolę w ich tkankowo-specyficznej dystrybucji [65, 66, 67]. Jeżeli lek jest substratem dla białek transportujących mogą one wpływać na jego wchłanianie, przykładem jest dobre wchłanianie cefalosporyn dzięki obecności odpowiednich transporterów w jelicie cienkim lub słabe wchłanianie taxolu, będącego substratem dla P-gp, wyrzucającej lek z komórek ponownie do światła jelita [68, 69, 70, 71]. Z drugiej strony lek może być aktywatorem lub inhibitorem

określonych białek transportowych, przez co wpływa na procesy ADME innych leków [72]. Przykładem może być dwudziestokrotny wzrost pola pod krzywą zależności stężenia od czasu dla lowastatyny stanowiącej substrat dla P-gp przy jednoczesnym podawaniu itrakonazolu, będącego inhibitorem tego transportera [73]. Trzeci wariant interakcji zakłada, że dany lek jest jednocześnie modulatorem i substratem określonego białka transportowego. Przykładem mogą być erytromycyna, która jest jednocześnie inhibitorem i substratem P-gp oraz dexametazon będący zarówno aktywatorem, jak i substratem tego transportera [74].

Wchłanianie

Proces wchłaniania dotyczy pozanaczyniowych podań leku, z których najbardziej optymalnym jest podanie doustne. Dominującym mechanizmem przechodzenia leków z przewodu pokarmowego do krążenia systemowego jest dyfuzja bierna [75, 76]. Szereg właściwości fizykochemicznych związku, takich jak jego charakter chemiczny (zastosowanie wolnej zasady lub soli), wartość wykładnika stałej dysocjacji (pK_a), współczynnika podziału oktanol/woda (logP), współczynnika dystrybucji (logD), rozpuszczalność i szybkość rozpuszczania oraz postać krystaliczna (polimorfizm) wpływają na proces jego wchłaniania, a tym samym dostępność biologiczną i w konsekwencji także na działanie farmakologiczne. Według „reguły pięciu" opracowanej przez Lipińskiego leki uznawane są za dobrze wchłaniające się po podaniu doustnym, jeżeli:

- ich masa cząsteczkowa jest mniejsza niż 500 Da,
- mają pięć lub mniej miejsc o donorowym charakterze wiązań wodorowych (np. grupy –OH lub –NH),
- mają dziesięć lub mniej miejsc o akceptorowym charakterze wiązań wodorowych,
- ich logP jest mniejszy niż pięć.

Ponadto leki te powinny charakteryzować się wartościami PSA (ang. polar surface area) nie wyższymi niż 140-150 $Å^2$. Optymalna wartość PSA dla leków

działających w ośrodkowym układzie nerwowym przechodzących przez barierę krew/mózg powinna wynosić ok. 90 Å^2 [77, 78, 79]. Substancje, które są substratami dla białek transporujących stanowią wyjątek od tych reguł.

Dostępność biologiczną można oszacować na podstawie badań prowadzonych *in silico, in vitro, in situ* oraz *in vivo*.

W celu wstępnej, szybkiej selekcji kandydatów do dalszych badań często stosuje się programy komputerowe, jednak dokładność ich przewidywania w dużym stopniu uzależniona jest od jakości i ilości danych wykorzystanych do ich „szkolenia" [80, 81, 82]. W metodyce HTS oprócz badań *in silico* prowadzone są także badania z wykorzystaniem systemu PAMPA (ang. parallel artificial membrane permeability assay), które są stosunkowo łatwe w wykonaniu i niezbyt kosztowne [83, 84, 85, 86, 87]. Polegają one na ilościowym oznaczaniu badanej substancji (po określonym czasie inkubacji) w dwóch komorach oddzielonych od siebie sztuczną błoną komórkową. Opisanych jest wiele rodzajów błon różniących się między sobą składem i zastosowaniem, są np. błony lecytynowe zbudowane przede wszystkim z lecytyny i cholesterolu, błony z syntetycznych fosfolipidów (2% dietylofosfatydylocholina) lub naśladujące barierę krew/mózg składające się z 2% wyciągu lipidowego mózgu świni. W badaniach z wykorzystaniem PAMPA bardzo istotną role odgrywa także skład roztworu znajdującego się po obu stronach błony. W warunkach fizjologicznych w przewodzie pokarmowym cząsteczki, które przejdą przez błonę lipidową i przedostaną się do krwioobiegu są szybko usuwane, dzięki czemu cały czas utrzymuje się wysoki gradient stężeń (tzw. sink state) ułatwiający dalszy proces wchłaniania. W celu lepszego odzwierciedlenia warunków fizjologicznych opracowany został model DS-PAMPA (ang. double sink PAMPA), w którym błona zbudowana jest z 20% mieszaniny fosfolipidów, a do komory akceptorowej dodawany jest surfaktant wiążący badaną substancję i zapewniający utrzymanie odpowiedniego gradientu wolnego leku po obu stronach. Istotnym dla wyników eksperymentu jest także pH buforu w komorze donorowej, ponieważ związki łatwiej przenikają przez błony lipidowe w formie niezjonizowanej [87]. System PAMPA umożliwia również prowadzenie badań substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie

z wykorzystaniem różnego rodzaju solubilizatorów, co umożliwia oszacowanie ich wpływu na procesy transportu badanego związku przez błonę i może być wykorzystane na etapie preformulacji [88].

Kolejną techniką stosowaną w HTS jest chromatografia w wykorzystaniem immobilizowanych sztucznych błon komórkowych (ang. immobilised artificial membranes, IAM). Błony wykonane z analogów fosfatydylocholiny stanowią fazy stacjonarne w kolumnach chromatograficznych, za pomocą, których można oszacować podział badanej substancji pomiędzy fazą wodną (faza ruchoma) oraz błoną komórkową (kolumna IAM) [89, 90, 91, 92, 93]. Współczynnik podziału liczony jest, jako $\log k'_{IAM}$, czyli logarytm ze współczynnika retencji dla wodnej fazy ruchomej. W przypadkach, gdy w celu wymycia badanej substancji z kolumny niezbędny jest dodatek rozpuszczalnika organicznego elucję prowadzi się przy różnych jego stężeniach i uzyskane współczynniki retencji ekstrapoluje do wartości 0% rozpuszczalnika organicznego [91].

Podstawowym niedostatkiem wszystkich przedstawionych powyżej metod jest fakt, że można nimi określić jedynie stopień dyfuzji biernej badanej substancji, natomiast nie uwzględniają one udziału transportu aktywnego w dostępności biologicznej.

W badaniach *in vitro* procesu wchłaniania wykorzystuje się hodowle komórkowe, które mogą być również stosowane w badaniach HTS. Komórki są łatwe w hodowli i szybko się namnażają, a otrzymane wyniki wraz z danymi pochodzącymi z testów rozpuszczalności umożliwiają zaklasyfikowanie badanej substancji do systemu BCS (ang. biopharmaceutics classification system), co wiąże się z możliwością ukierunkowania strategii opracowywania postaci technologicznej [94]. Najszersze zastosowanie mają komórki Caco-2 (ang. colon adenocarcinoma) i wykazano istnienie stosunkowo dobrej korelacji pomiędzy dostępnością biologiczną leku u ludzi, a oszacowaną za pomocą tych komórek [95, 96, 97]. Ponieważ wykazują one ekspresję specyficznych transporterów dla różnych substancji m. in. cukrów, aminokwasów, kwasów żółciowych czy też białek oraz charakteryzują się obecnością P-gp, mogą być wykorzystywane do oceny transportu aktywnego badanych związków [98, 99, 100]. Większość badań

na komórkach Caco-2 związanych z transportem aktywnym skupia się właśnie na ocenie interakcji zależnych od aktywności P-gp. W tym celu prowadzone są badania mające na celu wyizolowanie subpopulacji tych komórek wykazujących zwiększoną ekspresję białka MDR1 [101]. Istotnym niedostatkiem badań prowadzonych na komórkach Caco-2 jest brak spójności wyników pomiędzy eksperymentami przeprowadzanymi w różnych laboratoriach [102]. Na otrzymane wyniki ma wpływ szereg czynników takich jak: pochodzenie komórek, ich wiek, warunki hodowli oraz liczba pasaży, od której zależy zwłaszcza poziom ekspresji białek transportowych w tym P-gp [96]. Obecnie w HTS coraz częściej wykorzystywane są komórki MDCK (ang. Madin-Darby canine kidney) pochodzące z psiej nerki. Dostępne są również linie komórkowe MDCK wykazujące nadekspresję ludzkiego genu MDR1, co ułatwia identyfikację substancji będących substratami dla tego transportera [103, 104, 105, 106]. Wspólną wadą obu systemów, zarówno komórek Caco-2 jak i MDCK, jest brak obecności istotnych enzymów metabolizujących wiele leków jak np. Cyp3A4 dlatego, jeżeli badana substancja jest intensywnie metabolizowana jej dostępność biologiczna oszacowana z zastosowaniem w/w technik może być zawyżona [4].

Badania biodostępności *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych, najpełniej oddają warunki fizjologiczne z zachowaniem wszystkich procesów zachodzących w organizmie żywym, z uwzględnieniem wszystkich rodzajów transportu oraz efektu pierwszego przejścia zarówno jelitowego jak i wątrobowego. Badania te są mało przydatne z punktu widzenia HTS, ponieważ są one kosztowne i pracochłonne, jednakże na dalszym etapie rozwoju nowej substancji będącej potencjalnym lekiem stają się niezbędne w celu wyeliminowania ryzyka niewłaściwej oceny biodostępności systemami HTS.

Dystrybucja

Terminem dystrybucja określa się proces przechodzenia leku z krążenia systemowego do przestrzeni międzykomórkowej, ewentualnie do wnętrza komórek stanowiących jego miejsce działania. Dystrybucja uzależniona jest od

biernej dyfuzji przez błony komórkowe, transportu aktywnego za pośrednictwem nośników oraz stopnia wiązania leku z białkami krwi i tkankami [107]. Wzrost zainteresowania badaniami dystrybucji tkankowej związany jest przede wszystkim z ograniczonymi możliwościami przewidywania ilości leku w tkankach jedynie na podstawie analizy stężenia w surowicy krwi zwłaszcza, gdy miejsce działania stanowią receptory znajdujące się w słabo ukrwionych narządach lub wewnątrz komórek. Konieczność wprowadzania leków o coraz większej selektywności w stosunku do określonych narządów, tkanek oraz receptorów sprawiła, że dane dotyczące dystrybucji wykorzystywane są już na wstępnych etapach opracowywania optymalnej struktury chemicznej. W ostatnich latach nastąpił duży rozwój metod badania dystrybucji zarówno, jeżeli chodzi o badania eksperymentalne jak i techniki analizy danych. Do badań *in silico* podobnie jak w przypadku określania biodostępności można zaliczyć programy komputerowe bazujące na korelacji pomiędzy zdolnością badanej substancji do pokonywania lipofilowych barier biologicznych, a jej właściwościami fizykochemicznymi. Szczególnie dużo badań prowadzonych *in silico* dotyczy stopnia przechodzenia związków przez barierę krew/mózg [108, 109, 110, 111].

W badaniach *in vitro* wykorzystywana jest dializa równowagowa, w której homogenaty tkanek lub frakcje subkomórkowe dializowane są względem buforu zawierającego badany związek [112, 113, 114]. Dializując homogenaty mięśnia sercowego wcześniej poddane działaniu acenokumarolu względem buforu zawierającego digoksynę wykazano, na przykład, że acenokumarol zmniejsza powinowactwo digoksyny do kardiomiocytów [115].

Badania farmakokinetyczne wymagają nie tylko wiedzy na temat dystrybucji leku, ale także udziału poszczególnych narządów w tym procesie. Informacji tych mogą dostarczyć wyniki eksperymentów prowadzonych *ex vivo* z wykorzystaniem izolowanych, perfundowanych narządów [116, 117, 118, 119, 120]. Metoda perfuzji jednokrotnej (ang. single pass perfusion method) pozwala na oszacowanie stopnia wychwytu leku przez badaną tkankę oraz ocenę jego zależności od różnych czynników takich jak szybkość przepływu, czy skład buforu. Perfuzja prowadzona z recyrkulacją umożliwia, przede wszystkim, ocenę

procesów związanych z eliminacją i metabolizmem badanego związku. Prowadząc eksperyment z jednokrotną perfuzją stwierdzono, na przykład, prawie dwukrotny wzrost współczynnika dystrybucji cyprofloksacyny wyrażonego w mL/g tkanki w izolowanych perfundowanych płucach w warunkach niedodmy wywołanej niedotlenieniem perfuzatu w stosunku do płuc natlenianych prawidłowo [121].

Badania *in vivo* najwierniej oddają warunki fizjologiczne. Wykorzystuje się tutaj, oprócz technik klasycznych, jak analiza ilości badanej substancji w homogenatach narządów, także różnego rodzaju techniki obrazowania. Jedną z takich technik jest autoradiografia, gdzie wykorzystuje się zjawisko emitowania promieniowania przez tkanki, którego źródłem są badane leki znakowane izotopami takimi jak ^{3}H, ^{14}C lub ^{35}S (emitery cząstek beta). Wysyłane przez nie promieniowanie naświetla materiał światłoczuły po wywołaniu, którego można określić rozmieszczenie badanej substancji radioaktywnej w organizmie [122]. Obecnie często stosowaną odmianą radiografii jest tzw. DAR (ang. digital autoradiography), gdzie zamiast emulsji światłoczułej wykorzystywane są płytki pokryte światłoczułym pyłem fosforowym, a otrzymany obraz zostaje przekonwertowany do wersji cyfrowej. Głównymi zaletami DAR w stosunku do radiografii klasycznej są liniowa zależność pomiędzy ilością badanego leku, a otrzymaną odpowiedzią, możliwość badania szerszego zakresu stężeń oraz większa czułość, a tym samym krótszy czas ekspozycji. Jako rezultat otrzymywane są obrazy elektroniczne, które można poddawać dodatkowej obróbce [123]. Spośród badań radiograficznych na szczególną uwagę zasługuje QBWR (ang. quantitative whole body radiography), polegająca na przeprowadzeniu ilościowego badania radiograficznego całego zwierzęcia laboratoryjnego. Kluczową zaletą QWBA jest niewątpliwie to, że dostarcza ona informacji dotyczących dystrybucji leku w całym nienaruszonym organizmie. Zamrożenie całego zwierzęcia trwa stosunkowo krótko (5-15min w zależności od masy ciała), co powoduje natychmiastowe zahamowanie wszelkich procesów biologicznych i metabolicznych. Można to wykorzystać w badaniach farmakokinetycznych (jedno zwierzę/jeden punkt czasowy) w celu określenia

zmian dystrybucji w czasie. Podstawową wadą autoradiografii jest fakt, że oznaczenia ilościowe polegają na oszacowaniu radioaktywności, której źródłem może być nie tylko podany lek macierzysty, ale także jego metabolity, czy też produkty degradacji. Kolejną wadą jest to, że w procesie przygotowywania skrawków są one odwadniane, a więc utracone zostają ewentualne lotne metabolity badanego związku. Ponadto, jeżeli substancja jest znakowana izotopami o krótkim okresie półtrwania np. ^{90}Y (2.67 dnia), ^{11}C (21 min) lub ^{18}F (60 min) część radioaktywności może zostać utracona już podczas przygotowywania preparatów do analizy. Badania tego typu są także bardzo wrażliwe na wszelkie zmiany warunków eksperymentu, dlatego na wyniki może mieć wpływ czystość stosowanych związków, sposób uśmiercania zwierząt (np. uśmiercanie za pomocą dwutlenku węgla może wpłynąć na zmianę przechodzenia badanego związku przez barierę krew/mózg) oraz sposób cięcia skrawków [124]. Za pomocą tej metody badano np. dystrybucję ^{14}C-diclofenaku sodu po jednorazowym doustnym podaniu szczurom i wykazano, że lek ten preferencyjnie kumuluje się w tkance zapalnej [125]. Analizy z wykorzystaniem QWBA są również prowadzone na wstępnych etapach badań nad biologicznie aktywnymi związkami. Przy pomocy tej techniki wykazano, że substancja immunomodulująca FTY720 preferencyjnie gromadzi się w osłonkach mielinowych w OUN, co częściowo może wyjaśniać jej aktywność farmakologiczną w stwardnieniu rozsianym [126].

Ponieważ techniką QWBA nie da się zróżnicować źródła promieniowania (lek macierzysty, metabolity, produkty degredacji), ekstrakty z tkanek są zazwyczaj dodatkowo analizowane za pomocą spektrometrii mas (MS), gdzie identyfikacja substancji przeprowadzana jest na podstawie masy jonu macierzystego lub też specyficznego obrazu jego fragmentacji. Techniką łączącą w sobie zalety QWBA i MS jest MSI (ang. mass spectrometic imaging), która może dostarczyć informacji zarówno o charakterze związku jak i jego rozmieszczeniu przestrzennym. Fragmenty zwierzęcia laboratoryjnego, któremu wcześniej podano lek są umieszczane w spektrometrze masowym, który zbiera tysiące różnych widm masowych w zależności od położenia badanego wycinka. Z tak

uzyskanych danych po odpowiedniej obróbce można otrzymać informacje na temat specyficznej dystrybucji określonej masy. Przed analizą MSI próbka musi zostać odwodniona, a badany związek zjonizowany i przeprowadzony do formy lotnej. Najbardziej rozpowszechnionym obecnie sposobem jonizacji stosowanym w tego rodzaju obrazowaniu jest MALDI.

Technika MALDI-MSI została opracowana specjalnie na rzecz badań dystrybucji leków w organizmie ze względu na jej szereg zalet w stosunku do QWBA. Ponieważ masa cząsteczkowa oraz widmo fragmentacyjne wystarczająco charakteryzują określony związek nie jest konieczne jego znakowanie. Spektrometr masowy zbierając widmo całkowite (wszystkie masy) oraz wiele przejść MS/MS pozwala na identyfikację setek substancji jednocześnie. Badania dystrybucji techniką MSI mają też pewne niedostatki. Jeżeli chodzi o czułość oznaczenia MSI ustępują autoradiografii, gdzie w celu zwiększenia czułości wystarczy jedynie zwiększyć czas ekspozycji, co nie jest możliwe w MALDI-MSI, gdzie całkowita desorpcja analitu z danego punktu następuje zazwyczaj po ok. 200 uderzeniach promienia lasera. Dane uzyskane ze spektrometru masowego nie uwzględniają również specyficznej dla każdego związku supresji jonizacji wynikającej z obecności elementów matrycy, dlatego też są to w większości jedynie informacje jakościowe, a nie ilościowe. Dane ilościowe można uzyskać po wcześniejszym pokryciu badanego fragmentu stabilnym izotopem oznaczanego związku stanowiącym standard wewnętrzny (IS), a następnie obliczeniu dla każdego piksela oddzielnie stosunku wysokości piku uzyskanego dla analitu do piku uzyskanego dla IS.

Modyfikacją techniki MALDI-MSI jest SIMS-MSI (ang. secondary ion mass spectrometric imaging). W procesie SIMS promień jonów jest kierowany na powierzchnię badanej tkanki powodując desorpcję atomów i cząsteczek, których część jest następnie jonizowana i analizowana najczęściej spektrometrem typu potrójny kwadrupol lub analizy czasu przelotu. Tak uzyskane obrazy mają bardzo wysoką rozdzielczość, ponieważ promień jonów może być zogniskowany na obszar o wymiarach poniżej 50 nm. W przeciwieństwie do MALDI SIMS jest jednak techniką tzw. twardej jonizacji, w wyniku, której dochodzi do silnej

fragmentacji cząsteczek, w związku, z czym uzyskanie jonów macierzystych badanych substancji jest praktycznie niemożliwe. Obecnie wprowadzono nowe źródła jonów takie jak Au_n^+, czy SF_5^+, które powodują mniejszą fragmentację niż źródła tradycyjne wykorzystujące ciekły gal lub ind, gdzie nie uzyskiwano fragmentów o *m/z* poniżej 100. Stosując jonizację SIMS, która jest bardziej destrukcyjna niż MALDI można badać nie tylko samą powierzchnię próbki, ale także jej głębsze warstwy, dlatego może być ona stosowana do badania zmian ilości analizowanej substancji w zależności od głębokości, na której się ona znajduje [127].

W ostatnich latach niezmiernie popularne stały się techniki nieinwazyjne takie jak pozytronowa tomografia emisyjna (ang. positron emission tomography, PET), tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. single photon emission computed tomography, SPECT) oraz obrazowanie rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) lub spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance spectroscopy, MRS), które umożliwiają trójwymiarowe obrazowanie dystrybucji badanego związku w warunkach *in vivo* [128, 129, 130, 131].

PET jest techniką obrazowania, w której rejestruje się promieniowanie powstające podczas anihilacji pozytonów (anty-elektronów), których źródłem jest podana substancja promieniotwórcza, ulegająca rozpadowi beta plus. Najczęściej stosowanymi znacznikami są ^{15}O, ^{13}N, ^{11}C i ^{18}F, z których najkorzystniejszym jest fluor ze względu na stosunkowo długi okres półtrwania i dzięki temu możliwość prowadzenia badania aż do 10 godzin, ale ponieważ niewiele leków zawiera w swojej budowie atomy fluoru najczęściej stosowany jest ^{11}C (okres półtrwania 20.4 min). Technika obrazowania PET została, na przykład, wykorzystana do oceny dystrybucji tkankowej ^{18}F-cyprofloksacyny, a także do oszacowania stopnia penetracji do ośrodkowego układu nerwowego ^{11}C-werapamilu w zależności od ekspresji genu ABCB1 prawdopodobnie modulującego funkcję P-gp [131, 132].

Techniką zbliżoną do PET jest analiza SPECT polegająca na detekcji promieniowania gamma emitowanego przez związek znakowany Technetem-99m lub Talem-201. Metodą tą badano między innymi dystrybucję 99mTc-kwasu

dietylenotriaminooctowego do mózgu u zdrowych szczurów oraz u osobników ze zwiększoną przepuszczalnością bariery krew/mózg [133].

Kolejną techniką nieinwazyjnego badania dystrybucji jest obrazowanie magnetyczno-rezonansowe (MRI), które opiera się na zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego. Odmianą MRI jest spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance spectroscopy, MRS). Jest to technika związana z obrazowaniem rezonansu magnetycznego, umożliwiająca uzyskanie informacji o składzie biochemicznym w wybranych lokalizacjach organizmu, podczas gdy MRI dostarcza jedynie danych o budowie (strukturze) badanego narządu. Aparat MRS może być dostrojony do odbierania sygnałów rezonansowych określonych jąder atomów, np. ^{1}H, ^{31}P, ^{23}Na i ^{19}F. Podstawową zaletą techniki MRS jest to, że badanie może być prowadzone w sposób ciągły dając możliwość obserwacji zmian stężenia analizowanego związku, w określonej tkance, w czasie w celu oszacowania jego parametrów farmakokinetycznych. Stosując MRS badano między innymi dystrybucję znakowanego 19F-5-fluorouracylu oraz innych leków przeciwnowotworowych [134, 135]. Główną wadą metod opartych na rezonansie magnetycznym jest ich niska czułość.

Technikami szczególnie przydatnymi w ocenie wewnątrzkomórkowej dystrybucji leków wykazujących fluorescencję są mikroskopia konfokalna i laserowa konfokalna mikrospectrofluorymetria [136, 137, 138]. Podstawy obrazowania konfokalnego zostały opatentowane przez Marvina Minsky'ego w 1961. W zwykłej mikroskopii próbka jest oświetlana przez źródło światła w całości, a obiektyw zbiera sygnał nie tylko z miejsca ogniskowania, ale z całego jej przekroju, co zmniejsza kontrast. Zastosowanie przesłony z małym otworem przed detektorem (na przykład kamerą) odcina sygnał dochodzący spoza płaszczyzny ogniskowania, co znacznie powiększa kontrast i jakość uzyskanego obrazu. Technika ta pozwala również na uzyskanie obrazów trójwymiarowych.

Dystrybucja związków do erytrocytów

W ocenie dystrybucji związków, będących potencjalnymi lekami pewną rolę mogą odgrywać także erytrocyty (ang. red blood cells, RBC), których znaczenie nie zawsze jest w pełni dostrzegane. Znajomość współczynnika podziału RBC/osocze pozwala między innymi na wybór odpowiedniej matrycy do prowadzenia badań (surowica, osocze, pełna krew), przewidywanie na podstawie danych z eksperymentu *in vitro* dystrybucji badanego związku w warunkach *in vivo* oraz pośrednie oszacowanie stopnia wiązania leku z białkami krwi. Wyniki takich badań są także przydatne np. przy poszukiwaniu leków, których miejscem działania jest wnętrze erytrocytów (np. leki przeciw malarii) [139].

Całkowita objętość RBC człowieka wynosi od 25 do 30 mL/kg, z czego faza wodna to ok. 71%, a hemoglobina w nich zawarta stanowi ok. 10% całkowitego białka człowieka. Błona erytrocytarna zawiera białka pełniące funkcję receptorów, transporterów i enzymów. Erytrocyty mają umiarkowaną aktywność enzymatyczną podobną do aktywności cytochromu P450, a ich enzymy są zdolne do katalizowania reakcji metylacji, acetylacji i koniugacji z glutationem. Różnią się one od innych komórek tym, że nie posiadają jądra komórkowego, retikulum endoplazmatycznego oraz mitochondriów i są zawieszone w surowicy. Erytrocyty żyją od 100 do 120 dni w ciągu których przemierzają ok. 250 km w naczyniach krwionośnych.

Związki lipofilne przenikają do erytrocytów bezpośrednio przez błonę lipidową, natomiast hydrofilne korzystają zazwyczaj z kanałów wodnych. Wewnątrz erytrocytów leki mogą wiązać się z hemoglobiną, anhydrazą węglanową lub błoną komórkową. Współczynnik podziału erytrocyty/osocze może być określany zarówno w warunkach *in vivo,* jak i *in vitro*. W warunkach *in vivo* związek podawany jest zwierzęciu doświadczalnemu, następnie pobiera się próbki krwi po określonym czasie i oznacza stężenie badanego związku zarówno w erytrocytach jak i surowicy krwi. W badaniach *in vitro* dodaje się badany związek do wyizolowanych erytrocytów zawieszonych w buforze lub surowicy i po odpowiednim okresie inkubacji oznacza jego stężenie w obydwóch matrycach. Oprócz względów praktycznych istnieje także szereg innych

czynników, które preferują metodę *in vitro*. Pomiary powinny być prowadzone w stanie równowagi, a dla wielu leków dystrybucja zachodzi bardzo szybko i równowaga zostaje osiągnięta w przeciągu kilku do kilkudziesięciu sekund, dlatego uchwycenie odpowiedniego momentu w badaniach *in vivo* nie zawsze jest możliwe. Dla związków, które wolniej przenikają do erytrocytów, trudno jest również odseparować ten proces od innych zachodzących równocześnie w całym organizmie, takich jak dystrybucja do różnych tkanek i narządów, czy metabolizm i wydalanie.

Eksperymenty *in vitro* przeprowadzane są w kontrolowanych warunkach pH i temperatury najbardziej zbliżonych do fizjologicznych. Przeprowadzając jednocześnie eksperyment dla dwóch układów erytrocyty/bufor i erytrocyty/osocze można również pośrednio ocenić stopień wiązania badanego związku z białkami osocza, ponieważ tylko wolny lek przechodzi przez błonę erytrocytarną [140, 141].

Eliminacja: biotransformacja i wydalanie

Metabolizm leku związany jest z jego biotransformacją do produktów o charakterze bardziej hydrofilowym niż związek macierzysty, które mogą następnie zostać wydalone z organizmu przez nerki lub być ponownie reabsorbowane do krążenia systemowego. Enzymy związane z metabolizmem w większości zlokalizowane są w wątrobie, ale występują również w płucach, nerkach i jelitach [142]. Reakcje katalizowane przez te enzymy można podzielić na dwie główne grupy: reakcje fazy I (np. hydroliza, utlenianie, redukcja) i fazy II (np. koniugacja z kwasem siarkowym lub glukuronowym). Najważniejszymi enzymami biorącymi udział w reakcjach I fazy są enzymy pochodzące z rodziny cytochromu P450 [143, 144, 145, 146]. Obecnie zidentyfikowano około 25 podrodzin tego cytochromu, z czego 4 biorą udział w metabolizmie leków. Najbardziej rozpowszechnioną izoformą cytochromu P450 jest CYP3A4, który stanowi około 40% wszystkich CYP-ów występujących w wątrobie i jelicie cienkim [147]. Uważa się, że metabolizuje on około 50% wszystkich stosowanych

obecnie leków [148]. Niektóre enzymy (2C9, 2C19, 2D6), wykazują polimorfizm, co powoduje zróżnicowanie międzyosobnicze parametrów farmakokinetycznych [149, 150, 151, 152, 153, 154]. W przypadku CYP2D6 opisano ponad 100 wariantów tego enzymu charakteryzujących się różną aktywnością, na podstawie, której można podzielić całą populację na tzw. szybkich (ang. ultrarapid metabolizers, UM), średnich (ang. intermediate metabolizers, IM) i wolnych (ang. poor metabolizers, PM) metabolizerów. CYP2D6 jest odpowiedzialny za biotransformację ok. 25% leków miedzy innymi przeciwbólowych, beta adrenolityków oraz leków przeciwdepresyjnych, dlatego po zastosowaniu preparatów z tych grup u UM może występować słabszy efekt farmakologiczny, a u PM nasilone objawy niepożądane w porównaniu do IM [155, 156].

Metabolizm związku można przewidzieć stosując metody *in silico, in vitro* oraz *in vivo*. Do metod *in silico* należą programy komputerowe np. MetabolExpert lub METEOR, które opierając się na określonych zasadach przewidują potencjalnie możliwe do powstania metabolity [157, 158]. Istnieje również wiele systemów *in vitro* wykorzystywanych do wyznaczania głównych szlaków metabolicznych leku, a także jego klirensu. Bardzo dużą ich zaletą jest nie tylko to, że są szybsze i tańsze niż badania prowadzone *in vivo*, ale również fakt, że można korzystać tu z ludzkich komórek i enzymów, co sprawia, że badania takie w pełniejszy sposób odzwierciedlają warunki kliniczne. Wygenerowane podczas inkubacji badanej substancji z izolowanymi mikrosomami wątrobowymi, cytozolem lub hepatocytami metabolity można rozdzielić i zidentyfikować za pomocą systemu LC/MS/MS [159]. Dzięki wysokiej czułości oraz możliwości oznaczania wielu związków jednocześnie technika ta umożliwiła wprowadzenie badań z zastosowaniem tzw. koktajlu, będącego mieszaniną specyficznych substratów dla określonych izoenzymów. Inkubując mieszaninę substratów z badanym związkiem i np. mikrosomami wątrobowymi, można oszacować nie tylko profil metaboliczny danej substancji, ale także ocenić, które izoenzymy są zaangażowane w powstawanie głównych metabolitów [160, 161, 162]. Jeżeli we wstępnych badaniach metabolicznych zostanie wykazane, że testowana substancja jest biotransformowana przede wszystkim przy udziale izoenzymów

wykazujących istotną zmienność osobniczą kontynuacja badań nad jej rozwojem powinna być dobrze przemyślana ze względu na duże ryzyko występowania trudnych do przewidzenia indywidualnych reakcji. Szczegółowe dane dotyczące metabolizmu leków umożliwiają również przewidzenie interakcji farmakokinetycznych wynikających z jednoczesnego stosowanie np. inhibitora i substratu dla danego izoenzymu. Przykładem może być jednoczesne stosowanie tiklopidyny i losartanu, które często stanowią terapię skojarzoną chorób układu krążenia. Losartan metabolizowany jest przede wszystkim przez CYP3A4, w związku, z czym jednoczesne stosowanie tiklopidy będącej inhibitorem tego izoenzymu może powodować wzrost stężenia losartanu we krwi [163].

W poszukiwaniu metabolitów stosuje się także techniki wykorzystujące bardzo małe przepływy takie jak nano-HPLC i odpowiednio, jako źródło jonów w spektrometrii mas nano-ESI, gdzie przepływ fazy ruchomej jest rzędu nL/min, dzięki czemu można zoptymalizować transfer jonów do analizatora masowego, a tym samym znacznie zwiększyć czułość oznaczeń. Pozwala to na identyfikację nawet tych metabolitów, które powstają w bardzo niewielkich ilościach [18]. Identyfikacja metabolitów za pomocą spektrometrii mas polega przede wszystkim na poszukiwaniu takich mas, które wykazują charakterystyczną zmianę w stosunku do masy związku macierzystego np. N-demetylacja powoduje zmniejszenie masy o 14 amu, utlenienie grupy metylowej do karboksylowej przyrost o 30 amu, przyłączenie glutationu do ugrupowania aromatycznego przez epoksydację przyrost masy o 305 amu. Spektrometry typu potrójny kwadrupol posiadające dwa analizatory mas umożliwiają także skanowanie w trybie tzw. neutral loss, gdzie oba analizatory zbierają dane z całego zakresu, ale drugi analizator rejestruje tylko te jony, które różnią się od macierzystych o zdefiniowaną w trakcie analizy stałą masę atomową. Technika ta jest szczególnie przydatna do poszukiwania metabolitów II fazy powstających w wyniku koniugacji [164]. Największą wadą badań metabolizmu prowadzonych z zastosowaniem spektrometrii mas jest fakt, że mają one jedynie charakter jakościowy, ponieważ jonizacja metabolitów i związku macierzystego może być

bardzo różna, w związku z czym, oznaczenia ilościowe możliwe są tylko wówczas, gdy dostępny jest wzorzec danej substancji.

W badaniach eliminacji bardzo istotnym jest oszacowanie udziału transporterów błonowych w tym procesie. Duże znaczenie mają zwłaszcza transportery biorące udział w wychwycie substancji do hepatocytów i ich wydalaniu do żółci oraz eliminacji nerkowej [165, 166]. Przykładem może być eliminacja prowastatyny, która jest transportowana do hepatocytów za pośrednictwem transportu aktywnego, a jednocześnie transportery znajdujące się w nerkach odpowiadają za dużą ilość tego leku występującą w postaci niezmienionej w moczu [167].

Badania wpływu transporterów błonowych na eliminację leków można prowadzić *in vitro* stosując linie komórkowe wykazujące ekspresję określonych białek transportowych, lub *ex vivo* wykorzystując izolowane perfundowane nerki i wątrobę [168, 169, 170]. W tego typu eksperymencie z izolowaną perfundowaną wątrobą wykazano, na przykład, że rifampicyna zmniejsza wychwyt digoksyny do hepatocytów, wpływając przez to na jej wątrobową eliminację [169].

Badania metabolizmu oraz eliminacji w warunkach *in vivo* prowadzi się najczęściej w klatkach metabolicznych, które pozwalają na zbiór moczu i kału badanych zwierząt [171]. Zwierzętom laboratoryjnym podaje się badany związek dożylnie lub dożołądkowo i następnie w próbkach moczu i kału poszukuje, z wykorzystaniem spektrometrii mas, wydalanych metabolitów. Innym rodzajem badań prowadzonych *in vivo* są eksperymenty na zwierzętach z kaniulowanym przewodem żółciowym, w których można np. oszacować stopień transportu badanej substancji do żółci [172].

Nieliniowość w farmakokinetyce

Niezmiernie istotną charakterystyką nowego związku, potencjalnego leku jest liniowość procesów farmakokinetycznych, jakim podlega on w organizmie. W przypadku liniowej farmakokinetyki parametry farmakokinetyczne pozostają stałe, niezależnie od podanej dawki, dzięki czemu można przewidzieć stopień

ekspozycji organizmu na badany związek przy eskalacji dawek oraz po podaniu wielokrotnym w stanie stacjonarnym.

Nieliniowość w farmakokinetyce może występować na wszystkich etapach ADME. Przyczyną jej występowania w procesie wchłaniania może być wysycalny transport leku z przewodu pokarmowego do krwioobiegu z udziałem nośników białkowych lub wysycalny metabolizm badanego związku związany z efektem pierwszego przejścia. Przykładowo do substancji o nieliniowym charakterze procesu wchłaniania należą: witamina B_6, salicylamid, czy lewodopa, która jest wchłaniana w proksymalnej części dwunastnicy za pośrednictwem transportera LNAA (ang. large neutral amino acid transporter) [173, 174, 175, 176].

Głównymi przyczynami nieliniowej dystrybucji jest zależne od stężenia wiązanie ze składowymi krwi, głównie albuminą i kwaśną α-glikoproteiną. Ma to szczególne znaczenie w przypadku leków wiążących się w dużym stopniu z białkami (≥ 90%) i o małych wartościach objętości dystrybucji. Przykładami leków wykazujących nieliniową dystrybucję w zakresie stosowanych stężeń terapeutycznych jest kwas walproinowy i dizopyramid (stereoselektywne wiązanie z białkami) [177, 178]. Inną przyczyną nieliniowych zmian w dystrybucji leku może być wysycalne wiązanie leku z komórkami krwi. Przykładem takiego związku jest cyklosporyna, która wiąże się z błoną erytrocytów [179].

W procesach biotransformacji, wydzielania kanalikowego lub żółciowego, które mogą stanowić składowe procesu eliminacji danego leku, biorą udział enzymy oraz nośniki o ograniczonej pojemności wiązania. Przykładami leków o nieliniowym wysycalnym metabolizmie w zakresie dawek terapeutycznych są teofilina i fenytoina, której stężenie terapeutyczne jest od 2 do 4 razy wyższe od wartości stałej Michaelisa [180, 181]. Nieliniowość wynikająca z metabolizmu może też mieć charakter zależny od czasu trwania terapii i związane są z tym dwa zjawiska: autoindukcja oraz inhibicja metaboliczna. Autoindukcja polega na nasileniu przez dany lek własnej biotransformacji, co ma miejsce np. podczas leczenia karbamazepiną [182]. W trakcie dłuższego stosowania tego leku stwierdza się zmniejszenie jego stężenia we krwi na skutek nasilenia metabolizmu. W ciągu kilku tygodni terapii klirens karbamazepiny wzrasta

trzykrotnie, a ustabilizowanie się tego procesu następuje dopiero po ok. 1-5 tygodniach leczenia. Zjawisko inhibicji metabolicznej występuje, gdy produkt biotransformacji danego leku hamuje jego dalszy metabolizm. Mechanizm hamowania może być zależny zarówno od dawki (stężenia leku we krwi), jak i czasu trwania terapii. Do leków wykazujących inhibicję pod wpływem tworzącego się metabolitu należą np. diazepam, dikumarol i lidokaina [183, 184].

Teoretycznie również procesy czynnego wydzielania kanalikowego oraz aktywnego wchłaniania zwrotnego (reabsorbcji) zachodzące w kanalikach nerkowych mogą mieć charakter wysycalny, ale zjawisko to ma niewielkie znaczenie praktyczne.

Liniowość procesów farmakokinetycznych bada się przez wyznaczanie pola pod krzywą zależności stężenia od czasu (AUC), dla co najmniej trzech różnych dawek. Jeżeli zależność AUC od dawki jest liniowa, wówczas można uznać, że parametry farmakokinetyczne dla badanej substancji są stałe i niezależne od dawki (w badanym zakresie dawek).

2. CEL PRACY

Badania nad potencjalnym lekiem mają na celu nie tylko oszacowanie jego działania farmakodynamicznego i toksycznego, ale także pełną ocenę profilu farmakokinetycznego. Rezultaty badań farmakokinetycznych mogą mieć duży wpływ na dalszy rozwój badanego związku. Na ich podstawie można zadecydować o zaprzestaniu lub kontynuowaniu badań, albo poszukiwaniu nowych związków, w badanej grupie, o lepszym profilu farmakokinetycznym. Zidentyfikowanie potencjalnych problemów farmakokinetycznych oraz ich prawdopodobnych przyczyn umożliwia również odpowiednie zaplanowanie dalszych etapów badań.

Celem niniejszej pracy była ocena właściwości farmakokinetycznych nowego, oryginalnego związku o roboczj nazwie DL76 należącego do nieimidazolowych antagonistów receptora histaminowego H_3 oraz weryfikacja dostępności biologicznej przewidzianej *in silico* na podstawie fizykochemicznej charakterystyki tego związku z badaniami ADME prowadzonymi w warunkach *in vivo*.

Realizacja założonego celu wymagała:

- opracowania i walidacji oryginalnej metody oznaczania związku DL76 (1-[3-(4-tert-butylofenoksy)propylo] piperydyna) w różnych matrycach biologicznych (surowica, osocze, homogenaty tkanek) z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC/MS/MS),
- oszacowania profilu farmakokinetycznego związku DL76 u szczurów i wyznaczenia podstawowych parametrów opisujących procesy wchłaniania, dystrybucji i eliminacji,
- określenia dystrybucji związku DL76 do tkanek i narządów zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym,
- oszacowania liniowości procesów farmakokinetycznych badanego związku u szczura,

- wstępnego określenia profilu metabolicznego DL76 oraz wyselekcjonowania wiodącego metabolitu techniką LC/MS/MS,
- wstępnej oceny dynamiki zmian ilości tego metabolitu w surowicy krwi oraz homogenatach tkanek,
- analizy w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* dystrybucji DL76 do erytrocytów, jako kompartmentu farmakokinetycznego,
- ilościowego oznaczenia DL76 w wytypowanych strukturach mózgu szczura po jednorazowym podaniu dożylnym,
- oszacowania potencjalnego wpływu P-glikoproteiny na transport DL76.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1. Charakterystyka związku będącego przedmiotem badań

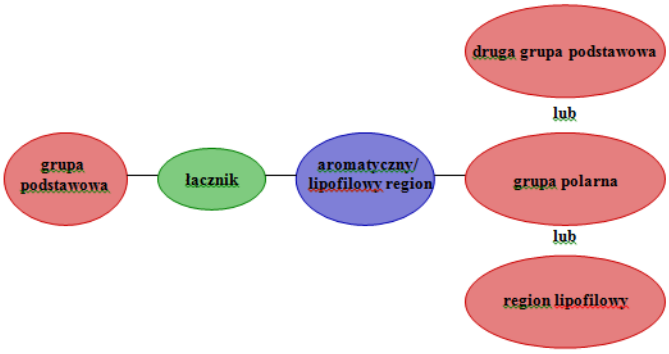
Histamina, czyli 2-(1H-imidazol-4-yl)etyloamina, należy do amin biogennych i bierze udział w wielu procesach, zarówno fizjologicznych jak i patofizjologicznych. Największe jej ilości znaleziono w skórze, płucach, błonie śluzowej przewodu pokarmowego i ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie pełni rolę neuroprzekaźnika. Dotychczas potwierdzono występowanie czterech typów receptorów histaminowych: H_1, H_2, H_3 i H_4. Wszystkie należą do receptorów błonowych sprzężonych z białkiem G. Ostatnio dużym zainteresowaniem cieszą się substancje o cechach antagonistów, bądź odwrotnych agonistów receptora H_3, o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym w różnych jednostkach chorobowych związanych z funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego [185, 186]. Receptor H_3 występuje, jako presynaptyczny autoreceptor hamujący, który reguluje poziom neuroprzekaźnika w neuronach histaminergicznych oraz jako heteroreceptor w procesie modulowania poziomu innych niż histamina przekaźników np. dopaminy, acetylocholiny, norepinefryny, serotoniny, kwasu γ-aminomasłowego, glutaminianu i substancji P. Oprócz receptora H_3 aktywowanego przyłączeniem liganda potwierdzono także występowanie jego konstytutywnie aktywnych form, które mogą być blokowane za pomocą tzw. odwrotnych agonistów [185]. Związki będące antagonistami receptora H_3 mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii zaburzeń pamięciowo-poznawczych (choroba Alzheimera, otępienie, ADHD), snu i czuwania (narkolepsja), schizofrenii, otyłości oraz bólu neuropatycznego [185, 187, 188, 189].

Obecnie badane związki wykazyjace powinowactwo do receptora H_3 można podzielić ze względu na ich budowę chemiczną na pochodne imidazolowe i nieimidazolowe.

Początkowo poszukiwano aktywnych substancji opierając się na podobieństwie strukturalnym do histaminy, która zawiera pierścień imidazolowy, ponieważ uważano, że obecność aromatycznego heterocyklu warunkuje

powinowactwo do receptora. Wyniki dalszych badań pochodnych imidazolowych okazały się jednak niezadowalające. Stwierdzono, że związki te wiążą się z żelazem hemowym cytochromu P450 (hamowanie jego funkcji), co może skutkować wystąpieniem interakcji pomiędzy lekami i w konsekwencji trudnymi do przewidzenia efektami niepożądanymi. Kolejnym problemem wydaje się też fakt, że imidazol jest zarówno silnym donorem jak i akceptorem wiązań wodorowych, co może mieć wpływ na zmniejszenie dostępności biologicznej przy podaniu doustnym, a także utrudnia penetrację leku do mózgu. Nieimidazolowe ligandy receptora H_3 mogą zwiększać ryzyko wystąpienia fosfolipidozy (patologiczne gromadzenie się fosfolipidów wewnątrz komórek), indukować funkcję P-glikoproteiny oraz blokować kanał potasowy kodowany przez gen hERG (ang. human *Ether-à-go-go*-Related Gene), co może wpływać na arytmogenne wydłużenie odstępu QT (miara repolaryzacji komór) w pomiarach EKG. Dodatkowo okazało się także, że wykazują one niewielką selektywność w stosunku do receptora H_3 oraz, że posiadają wyższe wartości pK_i w przypadku rH_3 (receptor u szczura) niż hH_3 (receptor u ludzi). Stwierdzono również rozbieżności pomiędzy wynikami badań aktywności wewnętrznej przeprowadzonymi *in vitro* i *in vivo* [185, 189, 190]. Związki takie jak tioperamid, ciproxifan i clobenprofit należące do pochodnych imidazolowych używane są obecnie jedynie, jako struktury referencyjne w badaniach powinowactwa i aktywności nowo zsyntetyzowanych substancji.

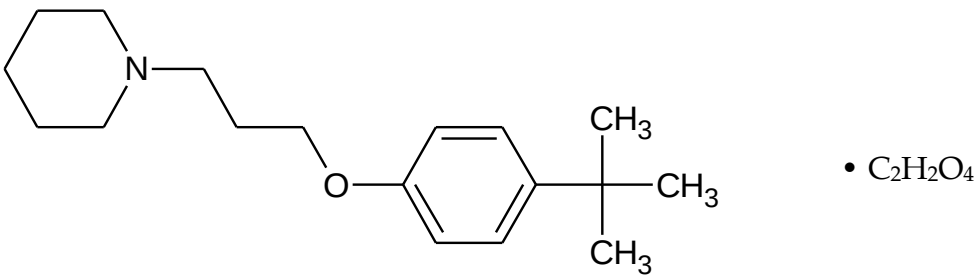
Ze względu na przedstawione powyżej wady pochodnych imidazolowych obecnie poszukiwani są antagoniści receptora H_3 nie zawierający tej struktury. Badane są głównie drugo- i trzeciorzędowe aminy zawierające alifatyczne ugrupowania heterocykliczne, m.in. związki zawierające ugrupowania piperazynowe, pirolidynowe, piperydynowe i morfolinowe. Dotychczasowe badania doprowadziły do stworzenia modelu farmakofora dla nieimidazolowych antagonistów receptora H_3 przedstawionego na ryc. 4.



Ryc. 4. Model farmakofora dla nieimidazolowych antagonistów receptora H_3 [189].

Szczególnie pożądanymi cechami nowo syntetyzowanego antagonisty byłyby dobra zdolność przenikania przez barierę krew/mózg, optymalny dla terapii danego schorzenia okres półtrwania, przy jednoczesnej selektywności względem receptora H_3 oraz brak wpływu na działanie izoenzymów P450 i kanały potasowe hERG [190, 191].

Przykładem nieimidazolowych antagonistów receptora histaminowego H_3 jest związek DL76, czyli (1–[3–(4–tert–butylofenoksy)propylo]piperydyna o wzorze strukturalnym przedstawionym na ryc. 5 [190]. Substancja ta została zsyntetyzowana w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych CM UJ. Jest to sól szczawianowa związku DL76, biały proszek o temperaturze topnienia 148 - 152°C i m.cz. czystej zasady równej 275.5.



$C_{18}H_{29}NO \bullet C_2H_2O_4$

Ryc. 5. Związek DL76 (1-[3-(4-tert-butylofenoksy)propylo]piperydyna).

Przeprowadzone w warunkach *in vitro* badania na transfekowanych liniach komórkowych wykazały, że powinowactwo związku DL76 do ludzkiego receptora H_3 wynosi 22.3 nM, co po przeliczeniu daje wartość pK_i = 4.65. Natomiast uzyskana na podstawie badań *in vivo* na myszach wartość ED_{50} wynosi 2.8 ± 0.4 mg/kg p.o. [190].

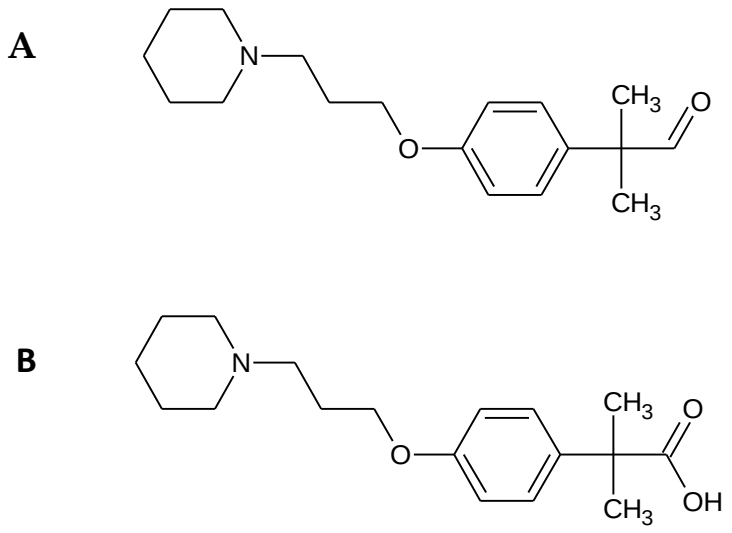
Właściwości fizykochemiczne związku DL76 przewidziane z zastosowaniem programu komputerowogo Pallas przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Właściwości fizykochemiczne związku DL76 przewidziane z zastosowaniem programu komputerowego Pallas.

parametr fizykochemiczny	wartość *in silico* dla związku DL76	przewidywane konsekwencje farmakokinetyczne
masa cząsteczkowa	275.5	zgodnie z „regułą pięciu" Lipińskiego związki o m.cz. poniżej 500 powinny dobrze się wchłaniać po podaniu doustnym
pKa - ujemny logarytm ze stałej dysocjacji	9.15	wartość ta sugeruje, że DL76 jest słabą zasadą; wchłanianie tego związku (na drodze dyfuzji biernej) prawdopodobnie ma miejsce w jelicie cienkim, gdzie w warunkach pH ok. 7 dochodzi do cofnięcia jego dysocjacji, a przez błony lipidowe zazwyczaj łatwiej przechodzą substancje w formie niezdysocjowanej
TPSA (ang. topological polar surface area) – suma udziałów, jakie do całkowitej powierzchni polarnej wnoszą poszczególne fragmenty cząsteczki	12.47 Å^2	zgodnie z „regułą pięciu" Lipińskiego związki o wartościach TPSA poniżej 140 Å^2 (optymalna wartość poniżej 60 Å^2) powinny dobrze się wchłaniać po podaniu doustnym
logP - logarytm stosunku stężeń równowagowych danej substancji w oktanolu (rozpuszczalnik organiczny) i w wodzie; jest miarą własności lipofilowych cząsteczki i koreluje z jej zdolnością do przechodzenia przez błony biologiczne, m.in. przez barierę krew/mózg, co jest szczególnie ważne w przypadku leków działających na ośrodkowy układ nerwowy	4.97	zgodnie z „regułą pięciu" Lipińskiego związki o wartościach logP poniżej 5 (optymalna wartość od 1-4) powinny się dobrze wchłaniać po podaniu doustnym
liczba miejsc o donorowym charakterze wiązań wodorowych	0	zgodnie z „regułą pięciu" Lipińskiego związki o liczbie miejsc o donorowym charakterze wiązań wodorowych poniżej 5 powinny się dobrze wchłaniać po podaniu doustnym
liczba miejsc o akceptorowym charakterze wiązań wodorowych	2	zgodnie z „regułą pięciu" Lipińskiego związki o liczbie miejsc o akceptorowym charakterze wiązań wodorowych poniżej 10 powinny się dobrze wchłaniać po podaniu doustnym

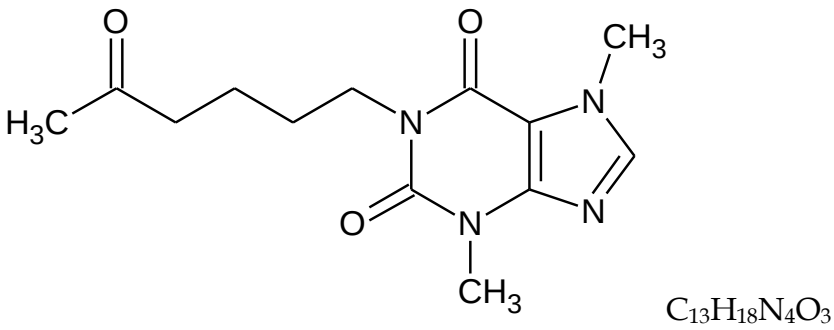
Po przeprowadzeniu symulacji komputerowej z zastosowaniem programu Pallas (RetroMEX) otrzymano jeden potencjalny metabolit związku DL76 powstający w wyniku utlenienia grupy metylowej do aldehydowej. Obecność tego metabolitu nie została jednak potwierdzona w badaniach *in vivo*

z wykorzystaniem techniki LC/MS/MS, stwierdzono natomiast obecność pochodnej karboksylowej, która może być produktem utlenienia aldehydu (ryc. 6).



Ryc. 6. Wzór strukturalny metabolitu związku DL76, A-przewidziany przez program komputerowy, B-zidentyfikowany w badaniach *in vivo*.

W przeprowadzanych badaniach analitycznych, jako wzorzec wewnętrzny (IS) zastosowano pentoksyfilinę (m. cz. 278), którą zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (ryc. 7).



$C_{13}H_{18}N_4O_3$

Ryc. 7. Pentoksyfilina (3,7-dimetylo-1-(5-oksycheksylo)-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dion).

3.2. Odczynniki

3.2.1. Substancje i rozpuszczalniki

- NaCl, cz.d.a. (Fluka, Niemcy)
- KH_2PO_4, cz.d.a. (Sigma – Aldrich, Niemcy)
- Na_2HPO_4, cz.d.a. (Sigma – Aldrich, Niemcy)
- HISTOPAQUE®1083 (Sigma – Aldrich, Niemcy)
- HCl Dilut-it 1M (Fluka, Niemcy)
- CH_3COONH_4 (Sigma – Aldrich, Niemcy)
- lodowaty kwas octowy (Fluka, Niemcy)
- acetonitryl, czysty do HPLC (J.T.Baker, Holandia)
- kwas mrówkowy, czysty do spektrometrii mas (Marck, Niemcy)
- woda podwójnie destylowana, przewodnictwo 0.1 µS
- octan etylu, czysty do HPLC (Fluka, Niemcy)

3.2.2. Sporządzone roztwory

- roztwór soli fizjologicznej (0.9% NaCl)
- roztwór podstawowy związku DL76 w wodzie o stężeniu 1 mg/mL, z którego przez rozcieńczenia sporządzono wodne roztwory robocze o stężeniach 20, 18, 10, 6, 5, 4, 2.5, 1, 0.5, 0.4, 0.1 oraz 0.01 µg/mL
- roztwór podstawowy PTX (IS) w mieszaninie acetonitryl/woda (50/50, v/v) o stężeniu 1 mg/mL, z którego przez rozcieńczenie w wodzie sporządzono roztwór roboczy o stężeniu 2.5 µg/mL
- roztwór PBS (ang. Phosphate-Buffered Saline) otrzymano przez zmieszanie roztworów NaCl (16.36 g/L), KH_2PO_4 (9.07 g/L) oraz $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (23.73 g/L) w stosunku 5:1:4 (v/v/v)
- roztwór kwasu solnego o pH 1.2 otrzymano przez rozcieńczenie roztworu kwasu solnego o stężeniu 1 M wodą redestylowaną
- bufor octanowy o pH 4.5 sporządzano w kolbie miarowej na 1000.0 mL przez rozpuszczenie 77.1 g octanu amonowego w wodzie redestylowanej,

a następnie dodanie 70.0 mL lodowatego kwasu octowego i uzupełnienie wodą do przepisanej objętości

- bufor fosforanowy o pH 6.8 sporządzono przez zmieszanie 0.2 M roztworu diwodorofosforanu potasu (27.2 g/L) oraz 0.2 M roztworu wodorofosforanu disodu (28.392 g/L) w stosunku 51:49 (v/v)

Wszystkie roztwory przechowywano w temperaturze 4°C.

3.3. Aparatura

Stężenia badanych związków w materiale biologicznym oznaczano metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC/ESI-MS/MS). Zastosowano potrójny kwadrupolowy analizator mas API 2000 firmy AB SCIEX (Concorde, Ontario, Kanada) ze źródłem jonów typu ESI połączony z systemem HPLC Agilent 1100 firmy Agilent Technologies (Waldronn, Niemcy) składającym się z następujących elementów:

- degazer typu G1322A
- binarna pompa gradientowa typu G1312A o zakresie przepływu od 0.1 do 5.0 mL/min
- autosampler typu G1329A
- termostat autosamplera typu G13308
- termostat kolumny typu G1316A
- detektor DAD typu G1315B

Ponadto podczas badań wykorzystano następującą aparaturę laboratoryjną:

- demineralizator HLP Smart 2000 (Hydrolab, Polska)
- homogenizator typ 309 (MPW, Polska)
- urządzenie do odparowywania próbek w strumieniu azotu TurboVap LV (Caliper Life Science, USA)
- wytrząsarka do probówek „vortex" (Heidolph Real Top, Niemcy)
- wytrząsarka do probówek (IKA, Niemcy)
- wirówka typ 32 Z (Hettich Zentrifugen, Niemcy)

- precyzyjna waga analityczna typ WPA/40/160/C/1 (Radwag, Polska)
- spektrofotometr Helios Beta (Unicam, Wielka Brytania)
- łaźnia wodna z wytrząsaniem Elpan typ 357 (Laboratory Instruments, Polska)
- pehametr Beckman Coulter model pHi 510 (Beckman Coulter, USA)
- klatki metaboliczne dla szczurów (Tecniplast, Polska)

3.4. Zwierzęta laboratoryjne

Do badań wykorzystano szczury niekrewniacze, osobniki męskie rasy Wistar, ze stada outbred Krf (WI): WU (Charles River, Niemcy) ważące średnio 250 g o kategorii zdrowotnej CV-1. Zwierzęta pochodziły z hodowli własnej Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, prowadzonej hanowerskim systemem rotacyjnym czteroblokowym, w warunkach bariery sanitarnej, zgodnie z wymogami zasad GMP i GLP, ze swobodnym dostępem do standaryzowanej paszy i wody, u których na 24h przed eksperymentem stosowano deprywację pokarmową, z zachowanym wolnym dostępem do wody.

3.5. Metodyka badań

3.5.1. Analiza HPLC/MS/MS

3.5.1.1. Warunki rozdziału chromatograficznego

Rozdział chromatograficzny badanych związków przeprowadzano na kolumnie XBridge™ C18 (3 x 50 mm, 5 µm, Waters, Irlandia), stosując, jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem 0.1% kwasu mrówkowego. Analizy przeprowadzano w temperaturze 30°C, a na kolumnę podawano 10 µL analitu. Termostat autosamplera zaprogramowano na 10°C. Rozdział prowadzono z zastosowaniem gradientu przedstawionego w tab. 2. Kryterium doboru odpowiedniego składu fazy ruchomej było uzyskanie wąskich i symetrycznych pików chromatograficznych dla związku DL76, jak również czasu retencji powyżej 5 min, aby w maksymalnym stopniu usunąć elementy matrycy, które

mogłyby wpływać na jego jonizację. Jednocześnie starano się ograniczyć całkowity czas analizy do ok. 20 min. W celu poprawy jonizacji oznaczanego związku do fazy ruchomej dodawano kwas mrówkowy, jako donor protonów. Najlepszy wynik analizy uzyskano przy zastosowaniu gradientu mieszaniny acetonitryl/woda i przy szybkości przepływu fazy równej 300 µL/min.

Tab. 2. Warunki gradientu stosowanego w analizie związku DL76.

Czas [min]	Acetonitryl [%]	Woda [%]	Przepływ [µL/min]
0.0	0	100	300
8.0	70	30	300
9.0	70	30	300
9.1	0	100	300
20.0	0	100	300

3.5.1.2. Optymalizacja parametrów rozpadu masowego

W celu uzyskania maksymalnej czułości zastosowano tryb dodatniej jonizacji (ESI+). Parametry drogi jonu optymalizowano przez ciągłe podanie (10 µL/min) wodnego roztworu badanego związku bezpośrednio do spektrometru masowego za pomocą pompy strzykawkowej.

Uzyskano następujące, optymalne parametry źródła jonów:

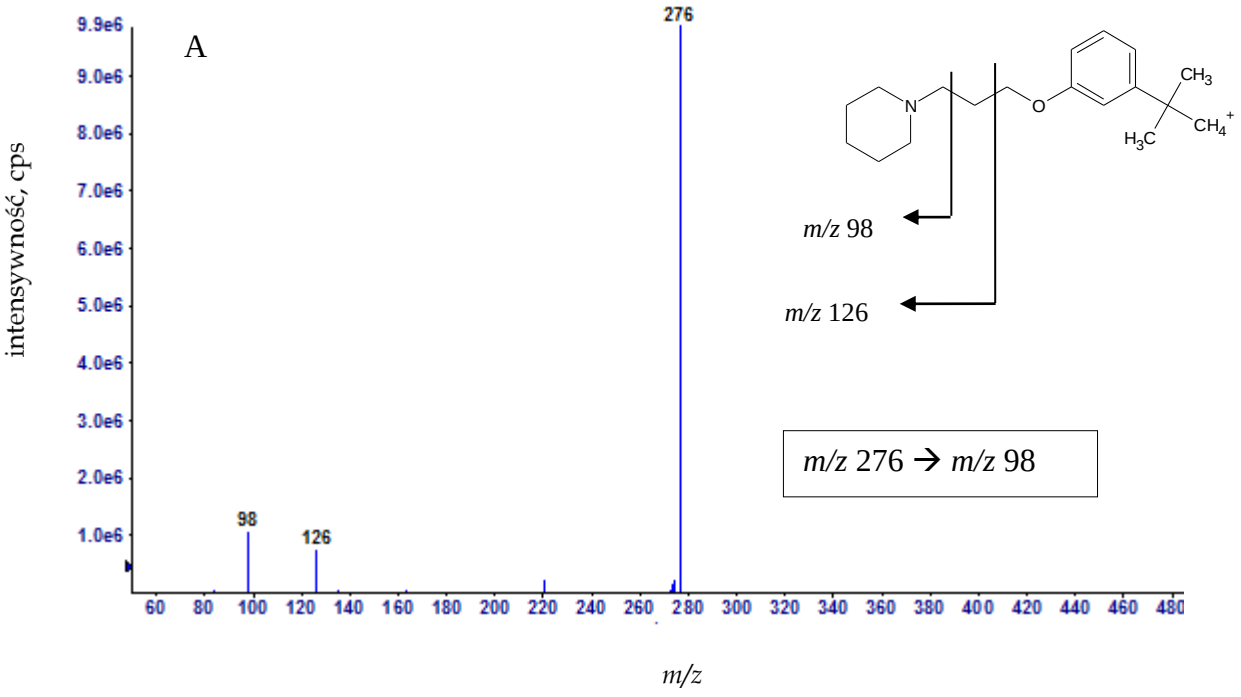
- napięcie źródła jonów (ion spray voltage) – 3500V
- pierwszy gaz źródłowy – 20
- drugi gaz źródłowy – 25
- temperatura gazu – 450°C
- gaz kurtynowy – 10
- gaz kolizyjny – 2

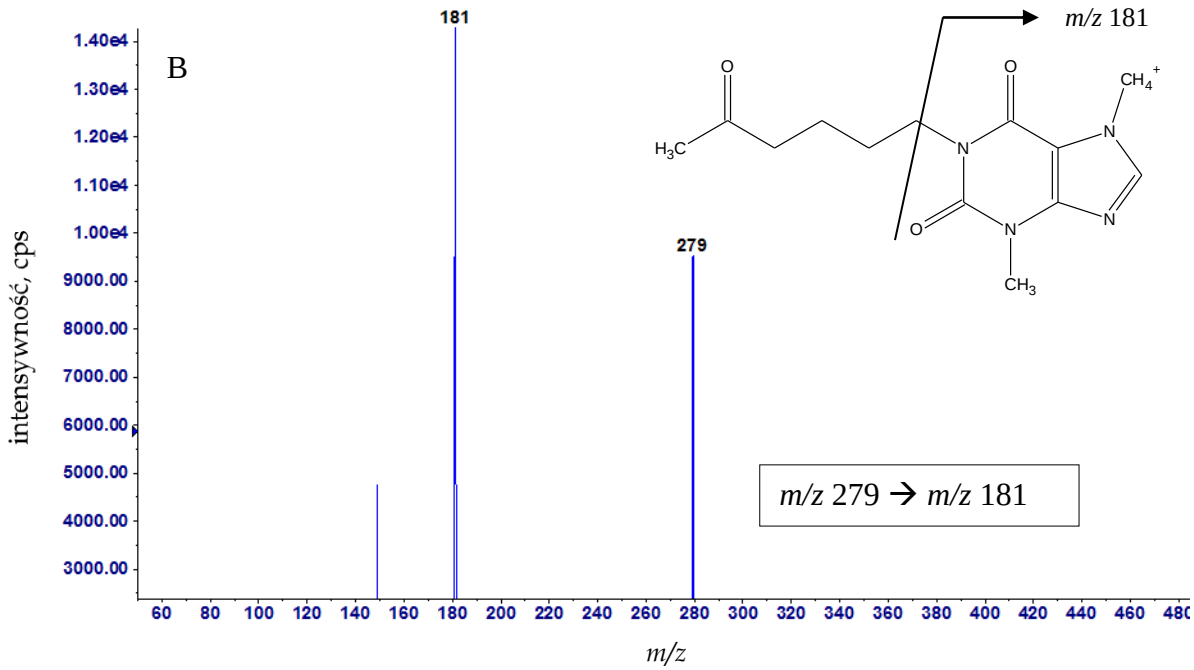
Optymalne parametry drogi jonu przedstawiono w tab. 3.

Tab. 3. Optymalne parametry drogi jonu dla związku DL76.

Parametr drogi jonu	Wartość
potencjał rozgrupowujący (declustering potential, **DP**)	45V
potencjał ogniskujący (focusing potential, **FP**)	300V
potencjał wejściowy (entrance potential, **EP**)	12V
potencjał wejścia do komory kolizyjnej (collision cell entrance potential, **CEP**)	24V
potencjał wyjścia z komory kolizyjnej (collision cell exit potential, **CXP**)	1.5V
energia kolizjii (collision energy, **CE**)	50V

W celu zwiększenia selektywności oznaczania zastosowano tryb skanowania SRM, w którym monitorowano wybrane reakcje rozpadu jonów macierzystych na jony potomne, charakterystyczne dla każdego z analizowanych związków. Na ryc. 8 przedstawiono wyniki fragmentacji związku DL76 oraz wzorca wewnętrznego, przedstawiając jednocześnie prawdopodobne struktury chemiczne uzyskanych fragmentów.





Ryc. 8. Fragmentacja MS/MS: A – DL76, B – pentoksyfilina.

W analizie ilościowej monitorowano przejścia: dla związku DL76 276 → 98 *m/z* i dla IS 279 → 181 *m/z*. Zastosowano rozdzielczość jednostkową oraz czas skanowania wynoszący 100 ms.

3.5.1.3. Parametry walidacji metody, sposób ich wyznaczania i kryteria akceptacji

Do oceny przydatności opracowanej metody oznaczania związku DL76 w materiale biologicznym stosowano kryteria walidacji metod bioanalitycznych zgodnie z wytycznymi FDA [193] tj.:

- ***specyficzność i selektywność –*** metody analityczne z zastosowaniem detekcji masowej, zwłaszcza przy stosowaniu trybu skanowania SRM uznawane są za wysoce selektywne i specyficzne.
- ***krzywa wzorcowa/liniowość –*** próbki wzorcowe powinny pokrywać cały zakres pomiarowy (min. 6 próbek o różnym stężeniu). Punkty krzywej wzorcowej powinny określać zadane stężenie z precyzją ±15% oraz dokładnością od 85 do 115% za wyjątkiem stężenia będącego dolną granicą oznaczalności metody, dla

którego precyzja powinna wynosić ±20%, a dokładność być w przedziale od 80 do 120%. Co najmniej 75% próbek powinno spełniać powyższe kryteria.

- ***dokładność*** **–** wyznaczano na podstawie czterech próbek kontrolnych przygotowanych w pięciu niezależnych powtórzeniach o stężeniach: niskim (LQC), średnim (MQC) i wysokim (HQC) oraz próbki o stężeniu odpowiadającemu dolnemu limitowi oznaczalności (LLOQ). Dokładność obliczano na podstawie wzoru:

$$dokładność\ [\%] = \frac{C_{oznaczone}}{C_{teoretyczne}} \cdot 100 \qquad (1)$$

Wartość oznaczonego stężenia powinna mieścić się z zakresie 85-115% stężenia teoretycznego za wyjątkiem próbki wyznaczającej LLOQ, gdzie oznaczane stężenie powinno mieścić się w przedziale 80-120% stężenia teoretycznego. Co najmniej 67% próbek powinno znajdować się w określonym zakresie stężeń i co najmniej 50% próbek QC z jednego stężenia powinno mieścić się w granicach w/w dokładności.

- ***precyzja powtarzalności*** **–** wyznaczano na podstawie analizy tych samych próbek, które wykorzystano do oceny dokadności. Precyzja wyznaczona, jako względne odchylenie standardowe (ang. relative standard deviation, RSD) obliczana na podstawie wzoru (2) dla każdego z badanych stężeń nie powinna przekraczać wartości 15%, a dla LLOQ 20%.

$$RSD\ [\%] = \frac{SD}{C_{śr}} \cdot 100 \qquad (2)$$

SD - odchylenie standardowe

$C_{śr}$ – średnie stężenie

- ***precyzja pośrednia*** – wyznaczano analogicznie jak precyzję powtarzalności, tylko dla próbek QC analizowanych w ciągu dwóch dni.
- ***znormalizowany względny efekt matrycy*** – wyznaczano na podstawie 5 próbek (każda z wykorzystaniem surowicy pochodzącej od innego szczura) dla czterech poziomów stężeń. Wartość RSD dla poszczególnych stężeń nie powinna przekraczać 15%.
- ***granica wykrywalności (LLOD)*** – jako kryterium przyjęto takie stężenie analitu, dla którego stosunek sygnału do szumów aparatu (S:N ratio) wynosi 3:1.

- ***granica oznaczalności (LLOQ)*** **–** stężenie przy którym odpowiedź analitu jest, co najmniej 5 razy wyższa od odpowiedzi czystej matrycy (S:N ≥ 5:1) oraz pik jest identyfikowalny i powtarzalny z precyzją 20% i dokładnością w granicach ±20% wartości rzeczywistej.
- ***stabilność*** - do badań wykorzystywano próbki o czterech różnych stężeniach w trzech powtórzeniach, badano następujące typy stabilności:
  - stabilność próbki podczas zamrażania i rozmrażania (ang. freeze and thaw stability) - próbki przechowywano w temperaturze -30°C przez 24h, a następnie przenoszono do temperatury pokojowej, po rozmrożeniu ponownie zamrażano (przez 24 godziny), po trzech cyklach zamrażanie/rozmrażanie przeprowadzano analizę;
  - stabilność krótkoterminowa (ang. short term stability) - próbki rozmrażano i pozostawiano na 2h w temperaturze pokojowej (czas potrzebny na przygotowanie próbek do analizy), następnie próbki analizowano;
  - stabilność długoterminowa (ang. long term stability) – próbki przechowywano przez 2 miesiące w temperaturze -30°C, a następnie rozmrażano i analizowano;
  - stabilność w autosamplerze (ang. postpreparative stability) – badano stabilność próbek analitycznych po ich przebywaniu przez 24h w autosamplerze w temperaturze 10°C.

Związek zostaje uznany za stabilny, jeżeli stężenia oznaczone w badanych próbkach stanowią ±15% stężenia teoretycznego.

Ponadto wyznaczano także odzysk, będący procentowym porównaniem odpowiedzi detektora pochodzącej od badanego związku (czysty roztwór, próbka o 100% stężeniu) z odpowiedzią uzyskaną od tego samego związku poddanego wcześniej ekstrakcji z matrycy biologicznej. Ze względu na możliwość występowania w analizie z zastosowaniem spektrometrii mas efektu matrycy, za próbkę o 100% stężeniu uznano nie czysty roztwór badanej substancji, ale wyekstrahowaną matrycę, do której dodano znaną ilość analitu. Analizowano próbki o 3 stężeniach (niskim, średnim i wysokim). Do walidacji metody nie jest wymagany odzysk w określonym zakresie, natomiast wyniki powinny być precyzyjne i powtarzalne.

3.5.1.4. Przygotowanie krzywych wzorcowych

Krzywą wzorcową przygotowano z próbek surowicy krwi szczura i homogenatów tkanek. W tym celu do 90 µL matrycy dodawano 10 µL roztworu roboczego badanego związku o stężeniu 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 lub 0.01 µg/mL. Stężenia efektywne wynosiły odpowiednio 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 10 i 1 ng/mL. Do każdej próbki dodawano również po 10 µL roboczego roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 2.5 µg/mL.

3.5.1.5. Przygotowanie próbek QC

Próbki QC (ang. quality control) przygotowano z próbek surowicy krwi i homogenatów tkanek. W celu objęcia całego zakresu badanych stężeń przygotowano próbki o 4 różnych rozcieńczeniach. Do 90 µL matrycy dodawano 10 µL roboczego roztworu badanego związku o stężeniu 18, 4, 0.4 lub 0.01 µg/mL. Stężenia efektywne wynosiły odpowiednio 1800 (HQC), 400 (MQC), 40 (LQC) i 1 ng/mL (LLOQ). Do każdej próbki dodawano również po 10 µL roboczego roztworu wzorca wewnętrznego. Dla każdego stężenia wykonano 5 powtórzeń. Oznaczenia wykonano w jednym dniu oraz w różnych dniach.

3.5.1.6. Przygotowanie materiału biologicznego (narządów i surowicy krwi) do analizy

Narządy, za wyjątkiem mózgu, homogenizowano z roztworem PBS w stosunku 200 mg narządu na 1 mL buforu. Mózg, po jego wcześniejszym zważeniu, homogenizowano w całości stosując proporcję 200 mg narządu na 1 mL roztworu PBS. W celu ustalenia najlepszego odczynnika ekstrahującego przeprowadzono badanie wydajności ekstrakcji dla kilku odczynników organicznych, jednocześnie modyfikując ich pH celem cofnięcia dysocjacji badanego związku. Wyniki zebrano w tab. 4.

Tab. 4. Powierzchnie pików DL76 otrzymane po ekstrakcji tego związku z surowicy krwi szczura z zastosowaniem różnych odczynników organicznych.

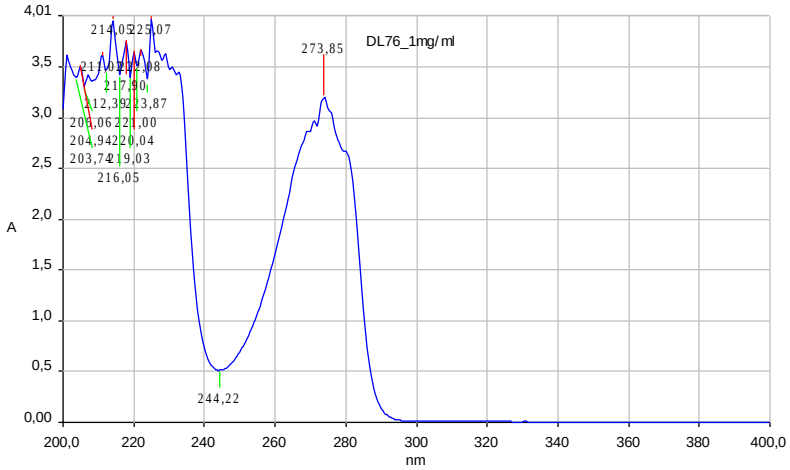
Odczynnik ekstrahujący	Powierzchnia piku DL76
octan etylu	7.21e+005
octan etylu + NaOH	6.64e+005
dichlorometan	6.59e+005
dichlorometan + NaOH	6.15e+005
chloroform	6.17e+005
chloroform + NaOH	5.54e+005
eter dietylowy	5.99e+005
eter dietylowy + NaOH	8.27e+005

Jako odczynnik ekstrahujący wybrano octan etylu, gdyż wykazywał porównywalny z eterem dietylowym, zalkalizowanym roztworem NaOH, potencjał ekstrakcyjny, a jest łatwiejszy i bezpieczniejszy w stosowaniu.

Analizowane próbki oczyszczano metodą ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz. W tym celu do 100 µL matrycy dodawano 10 µL roboczego roztworu wzorca wewnętrznego (IS). Następnie dodawano 1 mL octanu etylu i wytrząsano przy ilości wytrząsań 1000 na minutę, przez 20 min. Później próbki wirowano przy 3000 obr/min przez 15 min. Po odwirowaniu, przenoszono 500 µL supernatantu do probówki stożkowej i odparowywano w atmosferze azotu, w temperaturze 37°C. Suchą pozostałość rozprowadzano w 100 µL mieszaniny acetonitryl/woda (50/50, v/v). Na kolumnę chromatograficzną podawano 10 µL roztworu.

3.5.2. Oznaczenia spektrofotometryczne

Do badania rozpuszczalności soli związku DL76 zastosowano roztwory buforowe o pH równym: 1.2; 4.6 oraz 6.8, których wartości odpowiadały warunkom fizjologicznym panującym w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego. Eksperyment prowadzono w dwóch różnych temperaturach: 25 oraz 37°C. Na podstawie analizy widma absorpcyjnego szczawianu związku DL76, wybrano analityczną długość fali, wynoszącą 274 nm (ryc. 9).



Ryc. 9. Wykres zależności absorbancji od długości fali otrzymany dla próbki szczawianu DL76 o stężeniu 20 µg/mL.

3.5.2.1. Przygotowanie krzywych wzorcowych

Przygotowano serie roztworów wzorcowych soli DL76 o stężeniu: 250, 200, 150, 125, 100, 75, 50 oraz 20 µg/mL, rozpuszczając odpowiednią ilość substancji w buforze o pH wynoszącym odpowiednio 1.2; 4.6 lub 6.8. Absorbancję roztworów wzorcowych mierzono w temperaturach 25 oraz 37°C. Przed każdą analizą kuwety kwarcowe dokładnie płukano roztworem odgazowanej wody redestylowanej oraz metanolem, po czym suszono.

3.5.2.2. Badanie trwałości

Przed rozpoczęciem realizacji podstawowego etapu badań – określenia rozpuszczalności szczawianu DL76, zbadano trwałość tego związku w roztworach buforowych o założonym pH. W tym celu przygotowano serie próbek soli związku DL76, rozpuszczając odpowiednią ilość substancji w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8 tak, aby otrzymać roztwór badanego związku o stężeniu 2000, 1000 lub 500 µg/mL. Próbki umieszczano następnie w termostatowanej łaźni wodnej w temperaturze 25 lub 37°C. Bezpośrednio po przygotowaniu roztworów oraz po czasie: 1, 2, 4 oraz 6h mierzono absorbancję próbek, przygotowanych przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wyjściowego wodą redestylowaną, w stosunku 1:10, w celu otrzymania roztworu DL76 o stężeniu 200, 100 lub 50 µg/mL.

3.5.3. Badanie farmakokinetyki związku DL76 po jego jednorazowym podaniu dożylnym i dożołądkowym

Eksperyment 1

Zwierzętom będącym w narkozie ogólnej wywołanej tiopentalem (w dawce 70 mg/kg m.c.) podawano do żyły ogonowej związek DL76 rozpuszczony w wodzie do injekcji w dawce 3, 6, 9 lub 15 mg/kg m.c. Po 5, 10, 30, 60, 120 i 240 minutach od podania badanego związku szczury dekapitowano i pobierano krew, nerki, wątrobę, płuca i mózg.

Eksperyment 2

Zwierzętom podawano związek DL76 rozpuszczony w wodzie do injekcji przez sondę dożołądkową w dawce 3, 6 lub 9 mg/kg m.c. Po 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 oraz 480 minutach od podania szczury dekapitowano po wcześniejszym podaniu tiopentalu w dawce 70 mg/kg m.c. i pobierano krew, a w wybranych punktach czasowych (po 10, 20, 30, 60, 120 oraz 240) także narządy (nerki, wątroba, płuca, mózg).

Eksperyment 3

W celu oszacowania dystrybucji badanego związku do struktur mózgu przeprowadzono osobny eksperyment, w którym zwierzętom podawano związek DL76 do żyły ogonowej w jednorazowej dawce 3 mg/kg m.c., a po czasie 5, 10, 30, 60, 120 i 240 min od podania szczury dekapitowano i pobierano mózg, z którego następnie izolowano takie struktury jak kora, prążkowie i hippokamp.

We wszystkich eksperymentach pobraną do probówek krew wirowano przez 10 min w temperaturze 20°C i przy 1800 obr/min. Otrzymaną surowicę przechowywano w temp. –30°C. Wyizolowane narządy płukano roztworem PBS, a następnie przechowywano w temp. –30°C.

W celu uzyskania próbek kontrolnych i wzorcowych krew i narządy pobierano w analogiczny sposób.

3.5.4. Badanie potencjalnego wpływu P-glikoproteiny na dystrybucję związku DL76

W celu oszacowania potencjalnego wpływu P-glikoproteiny (P-gp) na dystrybucję związku DL76 szczurom, na 2 godziny przed podaniem badanego związku w jednorazowej dawce dożylnej (6 mg/kg), podawano dożołądkowo werapamil (inhibitor P-gp oraz Cyp3A4) w dawce 25 mg/kg [194]. Po 5, 30 i 120 minutach szczury dekapitowano i pobierano krew, nerki, wątrobę, płuca i mózg. Krew wirowano przez 10 min w temperaturze 20°C i przy 1800 obr/min. Otrzymaną surowicę przechowywano w temp. –30°C. Wyizolowane narządy płukano roztworem PBS, a następnie przechowywano w temp. –30°C.

Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla podania dożołądkowego związku DL76 w dawce 6 mg/kg, przy czym próbki krwi i narządy pobierano po 10, 30 i 120 min od podania badanego związku.

3.5.5. Badanie dystrybucji związku DL76 do erytrocytów

Dystrybucję związku DL76 do erytrocytów badano zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Krew do badania pobierano od szczurów bezpośrednio przed eksperymentem do probówek S-Monovette® Sarstedt z heparyną litową.

W warunkach *in vitro* wyznaczano zarówno współczynnik podziału erytrocyty/osocze ($K_{e/o}$) jak i erytrocyty/bufor ($K_{e/b}$). W celu wyznaczenia współczynnika podziału $K_{e/o}$ do 450 µL pełnej krwi dodawano 50 µL związku DL76 o stężeniu 6 lub 18 µg/mL. Końcowe stężenie badanego związku w próbce wynosiło odpowiednio 600 lub 1800 ng/mL. W celu wyznaczenia współczynnika podziału $K_{e/b}$ oddzielano erytrocyty od innych elementów morfotycznych krwi z zastosowaniem wirowania gradientowego na HISTOPAQUE® 1083. W probówce wirówkowej na 1mL HISTOPAQUE® 1083 nawarstwiano 450 µL pełnej krwi, następnie wirowano przez 30 min przy 1500 obr/min. Wyizolowane erytrocyty płukano dwukrotnie roztworem PBS, po każdym płukaniu wirowano przez 10 min przy 1000 obr/min. Do masy erytrocytarnej dodawano odpowiednią ilość PBS, tak aby objętość próbki wynosiła 450 µL oraz 50 µL związku DL76

o stężeniu 6 lub 18 µg/mL. Końcowe stężenie badanego związku w próbce wynosiło 600 lub 1800 ng/mL.

Próbki inkubowano w temperaturze 37°C i po czasie 5, 10, 30, 60 i 120 min wirowano przez 10 min przy 1000 obr/min, a następnie pobierano osocze lub bufor. Erytrocyty mrożono w celu wywołania hemolizy, następnie rozmrażano, wytrząsano przez 30 s na vortexie i wirowano przez 10 min przy 10 tys obr/min.

Współczynnik podziału erytrocyty/osocze obliczano z równania:

$$K_{e/o} = \frac{C_e}{C_o} \qquad (3)$$

C_e - stężenie związku DL76 w erytrocytach

C_o - stężenie związku DL76 w osoczu

Współczynnik podziału erytrocyty/bufor obliczano z równania:

$$K_{e/b} = \frac{C_e}{C_b} \qquad (4)$$

C_b - stężenie związku DL76 w buforze.

Współczynniki podziału $K_{e/b}$ oraz $K_{e/o}$ obliczano także ze wzoru (5) na podstawie kwasowo-zasadowej teorii podziału.

$$\frac{C_{komórka}}{C_{medium}} = \frac{1+10^{(pKa-pH_{komórka})}}{1+10^{(pKa-pH_{medium})}} \qquad (5)$$

pK_a – wykładnik stałej dysocjacji badanego związku

$C_{komórka}$ – stężenie badanego związku w komórce (erytrocytach)

C_{medium} – stężenie badanego związku w buforze lub osoczu krwi

Z zależności między $K_{e/o}$ i $K_{e/b}$ wyrażonej równaniem:

$$K_{e/o} = K_{e/b} \cdot f_u \qquad (6)$$

obliczano frakcję leku wolnego w osoczu (f_u).

Wszystkie przeprowadzane na zwierzętach badania uzyskały zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds Doświadczeń na Zwierzętach, działającej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.

3.5.6. Poszukiwanie wiodącego metabolitu związku DL76

Głównego metabolitu związku DL76 poszukiwano z wykorzystaniem spektrometrii mas. W celu uzyskania próbek analitycznych szczura zamykano w klatce metabolicznej na okres ok. 3 godzin i pobierano próbki czystego moczu, a następnie zwierzęciu podawano za pomocą sondy dożołądkowej związek DL76 w dawce 6 mg/kg. Próbki moczu pobierano po ok. 5 godzinach od podania badanego związku. Mocz analizowano zarówno z wykorzystaniem detektora diodowego jak i detekcji masowej skanując masy w zakresie od 50 do 500 amu. Następnie porównywano widma uzyskane dla próbek kontrolnych i po podaniu badanego związku.

3.5.7. Badanie rozpuszczalności DL76 w różnych warunkach pH i temperatury

Do badania rozpuszczalności szczawianu związku DL76 zastosowano metodę równowagową (ang. stirred flask). W tym celu do trzech kolbek Erlenmayera ze szlifem o objętości 10 mL każda, odważano po 50 mg soli DL76, a następnie dodawano po 2 mL buforu o pH równym 1.2. Tak przygotowane roztwory badanej substancji umieszczano w termostatowanej łaźni wodnej z wytrząsaniem w temperaturze 37°C i delikatnie wytrząsano przez 6 godzin. W tym czasie obserwowano zawartość kolbek. Jeśli cała ilość związku rozpuściła się w rozpuszczalniku, do kolbki dodawano uprzednio odważone, kolejne 50 mg soli DL76. Czynność tę powtarzano do czasu, aż w kolbce zaobserwowano osad uzyskując roztwór nasycony. Następnie pozostawiano kolbki w termostatowanej łaźni wodnej w temperaturze 37°C na okres 18 godzin. Po upływie ustalonego czasu, zawartość kolbek przenoszono do probówek i wirowano przez 15 minut przy 3000 obr/min. Stężenia oznaczano metodą spektrofotometryczną i celem zachowania liniowości wynikającej z prawa Lamberta-Beera roztwór nasycony odpowiednio rozcieńczano.

Analogiczne badania przeprowadzono dla buforów o pH równym 4.6 i 6.8 oraz dla temperatury 25°C.

3.5.8. Obliczenia farmakokinetyczne

Obliczenia farmakokinetyczne wykonano korzystając z programu komputerowego Phoenix WinNonlin (Pharsight, USA) stosując metodę modelowania kompartmentowego (surowica) lub technikę bezmodelową. Na podstawie średnich stężeń obliczano parametry farmakokinetyczne badanego związku.

Pole pod krzywą zależności stężenia od czasu ekstrapolowane do nieskończoności ($AUC_{0\rightarrow\infty}$) obliczano stosując liniowo-logarytmiczną metodę trapezów z uwzględnieniem pól resztkowych. Analogiczną metodę zastosowano do obliczenia pierwszego momentu statystycznego krzywej zależności stężenie-czas ($AUMC_{0\rightarrow\infty}$).

Stężenie początkowe ($C_0=C_{max}$) badanego związku w surowicy po podaniu dożylnym estymowano przez ekstrapolację początkowych wartości stężeń do czasu t_0 metodą regresji log-liniowej. W pozostałych przypadkach C_{max} odczytywano z krzywej zależności stężenie-czas.

Stałą szybkości znikania (λ_z) z badanych tkanek obliczano, jako współczynnik kierunkowy końcowej części krzywej zależności log C=f(t).

Średni czas przebywania leku w organizmie (MRT) obliczano na podstawie wzoru:

$$MRT = \frac{AUMC_{0\rightarrow\infty}}{AUC_{0\rightarrow\infty}} \qquad (7)$$

Klirens leku (Cl) obliczano, jako stosunek:

$$Cl = \frac{D}{AUC_{0\rightarrow\infty}} \qquad (8)$$

Objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym (Vd_{ss}) obliczano z równania:

$$Vd_{ss} = Cl \cdot MRT \qquad (9)$$

Biologiczny okres półtrwania liczono zgodnie ze wzorem:

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k} \qquad (10)$$

Stałą szybkości wchłaniania (k_a) obliczano metodą Wagnera-Nelsona korzystając z równania:

$$\frac{A_t}{V} = C_t + k\int_0^t Cdt \qquad (11)$$

$\frac{A_t}{V}$ - ilość leku znajdująca się w określonej objętości w czasie t

C_t - stężenie leku w czasie t

k – stała szybkości eliminacji po podaniu pozanaczyniowym

dla t dążącego do nieskończoności stężenie leku dąży do zera i równanie (11) przybiera postać:

$$\frac{A_\infty}{V} = k\int_0^\infty Cdt \qquad (12)$$

wartość $\frac{A_\infty}{V}$ obliczano z równania:

$$\frac{A_\infty}{V} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(C_{t_i} + k\int_0^{t_i} Cdt) \qquad (13)$$

n – liczba punktów wykorzystanych do wyznaczenia stałej szybkości eliminacji po podaniu pozanaczyniowym

Wartość k_a odczytano z wykresu, jako współczynnik kierunkowy prostej zależności $log\left(\frac{A_\infty}{V} - \frac{A_t}{V}\right) = f(t)$ [192].

3.5.9. Obliczanie funkcji termodynamicznych

Podstawowe funkcje termodynamiczne procesu rozpuszczania zostały obliczone na podstawie równania Gibbsa:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (14)$$

ΔG – zmiana entalpii swobodnej

ΔH – ciepło rozpuszczania w stanie nasycenia roztworu

ΔS – zmiana entropii

T – temperatura

$$\Delta H = R\frac{T_2 \cdot T_1}{T_2 - T_1} \cdot \ln\frac{S_2}{S_1} \qquad (15)$$

R – stała gazowa

S_2 i S_1 – rozpuszczalność ciała stałego odpowiednio w temperaturach T_2 i T_1

$$\Delta S = \frac{S_0 - \Delta G}{T} \quad (16)$$

S_0 – rozpuszczalność formy niezdysocjowanej

$$S_0 = \frac{S_{pH}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (17)$$

S_{pH} – rozpuszczalność przy danym pH

pK_a – stała dysocjacji kwasu

3.5.10. Obliczenia statystyczne

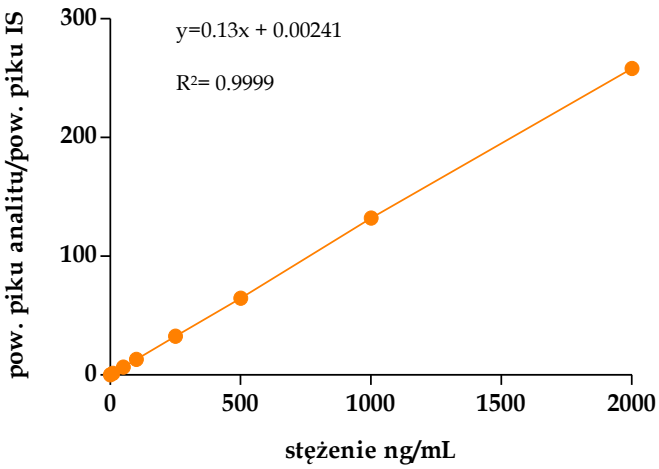
Analizę statystyczną wykonano z zastosowaniem programu Excel 2010 (Microsoft) oraz Statistica 10 (StatSoft). Wyniki wyrażono w postaci średnich arytmetycznych i średnich błędów standardowych (SD). Dla porównania dwóch grup użyto niesparowanego testu t-Studenta (rozkład normalny) lub testu nieparametrycznego Mann-Whitney'a, natomiast dla porównania trzech lub więcej grup testu post-hoc Tukey'a. Różnice przy $p<0.05$ uznano za statystycznie istotne.

4. WYNIKI

4.1. Walidacja stosowanej metody analitycznej LC/MS/MS

4.1.1. Walidacja metody oznaczania związku DL76 w surowicy krwi szczura

Walidację metody oznaczania związku DL76 w surowicy krwi szczura przeprowadzono zgodnie z wytycznymi FDA [193]. Przyjęty w badaniu tryb skanowania SRM zapewnia wysoką selektywność opracowanej metody w stosunku do badanego związku. Otrzymano liniową (ważenie 1/x) zależność pomiędzy odpowiedzią detektora (powierzchnia piku analitu/powierzchnia IS), a stężeniem związku nanoszonym na kolumnę chromatograficzną w zakresie od 1 do 2000 ng/mL. Granica oznaczalności (LLOQ) wynosiła 1 ng/mL Na ryc. 10 przedstawiono przykładowy wykres krzywej wzorcowej dla DL76 oznaczanego w surowicy krwi szczura, dla której współczynnik determinacji (R^2) wynosił 0.9999.



Ryc. 10. Przykładowy wykres krzywej wzorcowej dla związku DL76.

Dla każdego punktu krzywej wzorcowej obliczano stężenia na podstawie otrzymanego równania regresji i wyznaczano RSD (%). Wyniki przedstawiono w tab. 5. Wszystkie wartości wyliczonych odchyleń standardowych mieszczą się

w granicach norm zawartych w wytycznych FDA dla walidacji metod bioanalitycznych.

Tab. 5. Stężenia związku DL76 obliczone na podstawie krzywej wzorcowej (ang. back calculation).

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Stężenie obliczone z równania krzywej wzorcowej (średnia ± SD, n=5)	RSD (%)
1	1.00±0.15	14.81
10	9.92±1.06	10.66
50	50.58±1.59	3.15
100	102.11±7.30	7.15
250	250.46±10.82	4.32
500	499.36±14.72	2.95
1000	1018.52±39.34	3.86
2000	1992.28±23.40	1.17

W tab. 6 i tab. 7 zebrano wyniki precyzji i dokładności opracowanej metody dla oznaczeń badanego związku wykonanych w surowicy krwi szczura w jednym dniu oraz w różnych dniach. Obliczenia wykonano zarówno dla próbek wzorcowych, jak i dla próbek QC.

Tab. 6. Precyzja i dokładność metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura (próbki QC, n=5).

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Precyzja (RSD, %)	Dokładność (%)	Precyzja (RSD, %)	Dokładność (%)
	w jednym dniu (n=5)		w różnych dniach	
1	15.09	112.53	12.8	113.43
40	5.95	88.75	9.75	91.27
400	4.99	95.74	7.81	92.56
1800	1.65	88.74	2.14	89.79

Tab. 7. Precyzja i dokładność metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura (próbki wzorcowe).

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Precyzja (RSD, %)	Dokładność (%)	Precyzja (RSD, %)	Dokładność (%)
	w jednym dniu (n=5)		w różnych dniach	
1	18.35	101.08	14.81	100.00
10	12.93	98.51	10.66	99.23
50	3.43	99.90	3.15	101.16
100	7.18	104.42	7.15	102.11
250	3.81	97.74	4.32	100.19
500	1.68	100.82	2.95	99.87
1000	3.65	99.79	3.86	101.85
2000	1.02	99.92	1.17	99.61

Z wartości przedstawionych w tab. 6 i tab. 7 wynika, że opracowana metoda charakteryzuje się wymaganą dla metod bioanalitycznych precyzją i dokładnością.

Z danych zebranych w tab. 8 wynika, że wydajność ekstrakcji DL76 z surowicy krwi szczura jest zadawalająca w całym zakresie krzywej wzorcowej. Wydajność ekstrakcji dla IS (2.5 µg/mL) wynosiła 89.6±12.47, przy współczynniku RSD równym 13.92%.

Tab. 8. Wydajność procesu ekstrakcji związku DL76.

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	DL76	
	Odzysk (średnia ± SD, n=5)	RSD (%)
1	73.26 ± 5.08	6.94
40	56.92 ± 1.53	2.68
400	59.73 ± 8.60	14.4
1800	56.92 ± 5.99	10.52

Przeprowadzono również badania stabilności związku DL76 w surowicy krwi szczura. Wyniki przedstawiono w tab. 9 i tab. 10.

Tab. 9. Stabilność związku DL76 w surowicy krwi szczura (n=5).

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Stabilność po 2h w 20°C			Stabilność po 24h w 10°C		
	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD(%)	odchylenie (%)	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD(%)	odchylenie (%)
1	0.91	91.4	3.0	1.09	85.71	9.52
40	43.62	109.1	6.7	38.57	102.68	6.67
400	395.52	98.9	11.2	382.4	85.49	3.09
1800	1800.91	100.1	14.8	1843.02	106.93	2.43

Tab. 10. Stabilność związku DL76 w surowicy krwi szczura (n=5).

Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Stabilność podczas trzykrotnego rozmrażania i zamrażania			Stabilność w - 30°C (2 miesiące)		
	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD (%)	odchylenie (%)	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD(%)	odchylenie (%)
1	0.98	98.4	5.5	0.88	87.7	13.3
40	42.63	106.6	4.5	44.79	112.0	6.5
400	374.98	93.7	3.8	401.95	100.5	1.9
1800	1822.41	101.2	0.8	1794.94	99.7	1.3

We wszystkich rodzajach stabilności zmiany w stężeniu badanego związku mieściły się w granicach ±15%. Związek DL76 został uznany za stabilny.

Badanie wpływu matrycy na stopień jonizacji oznaczanego związku

Oceniano znormalizowany względny efekt matrycy (ang. relative matrix effect) obliczany dla takiej samej matrycy pochodzącej od różnych osobników. Wyznaczano precyzję (RSD, %) dla pomiarów czterech stężeń DL76 dodawanych do surowicy krwi szczura. W pierwszym przypadku zastosowano surowicę zmieszaną od kilku zwierząt, natomiast w drugim wykorzystano surowicę pochodzącą od pięciu różnych osobników. Z dany zawartych w tab. 11 wynika, że w obu przypadkach współczynniki RSD mieściły się w granicach norm wyznaczonych dla walidacji metod bioanalitycznych, co świadczy o braku

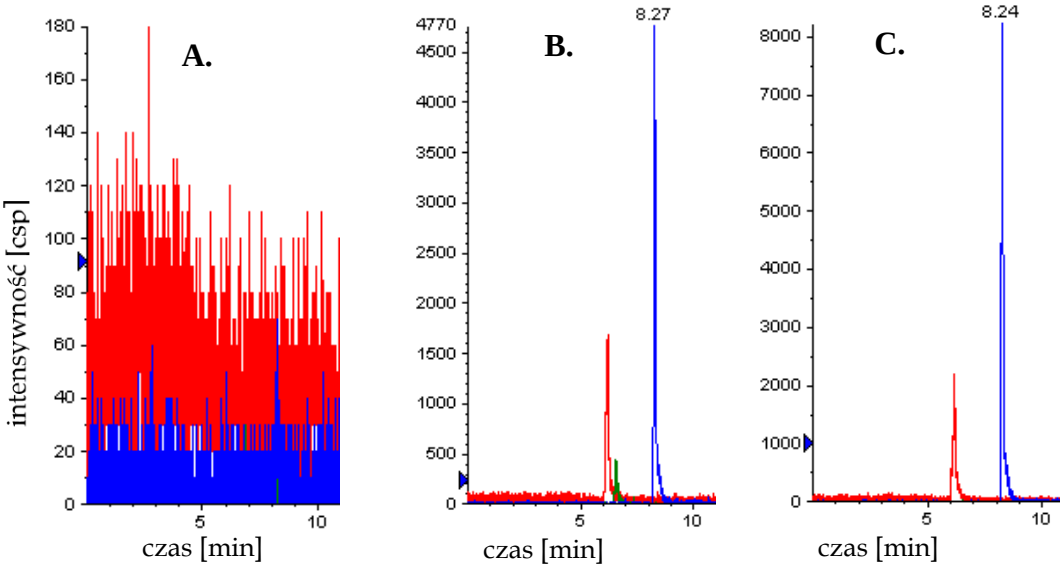
„relative matrix effect" w stopniu mogącym mieć wpływ na dokładność oznaczenia.

Tab. 11. Precyzja metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura.

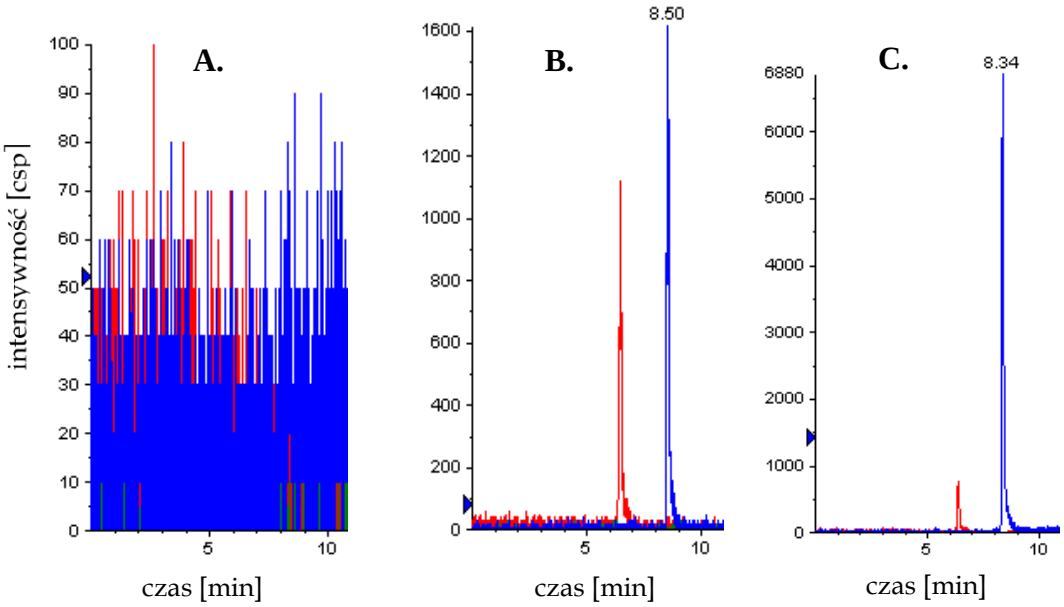
Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Precyzja (RSD, %)	
	jedna matryca	różne matryce (n=5)
1	10.91	4.99
40	3.66	2.07
400	5.25	9.26
1800	4.98	4.41

4.1.2. Walidacja metody oznaczania DL76 w wybranych tkankach szczura

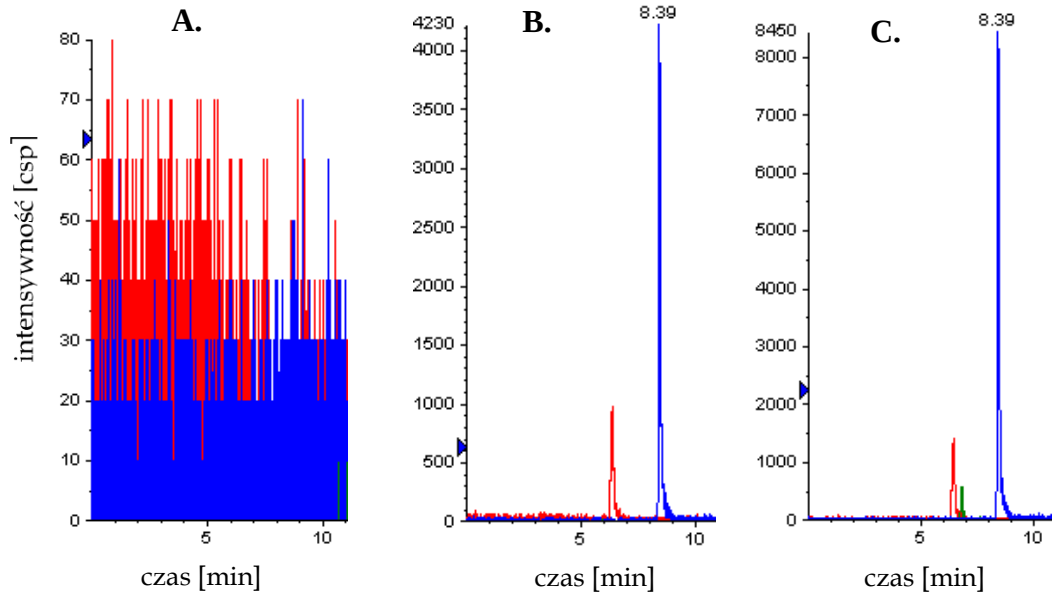
Przykładowe chromatogramy próbek kontrolnych, wzorcowych i homogenatów wątroby, mózgu, nerek i płuc szczura, któremu podawano związek DL76, przedstawiono odpowiednio na ryc. 11, ryc. 12, ryc. 13 i ryc. 14.



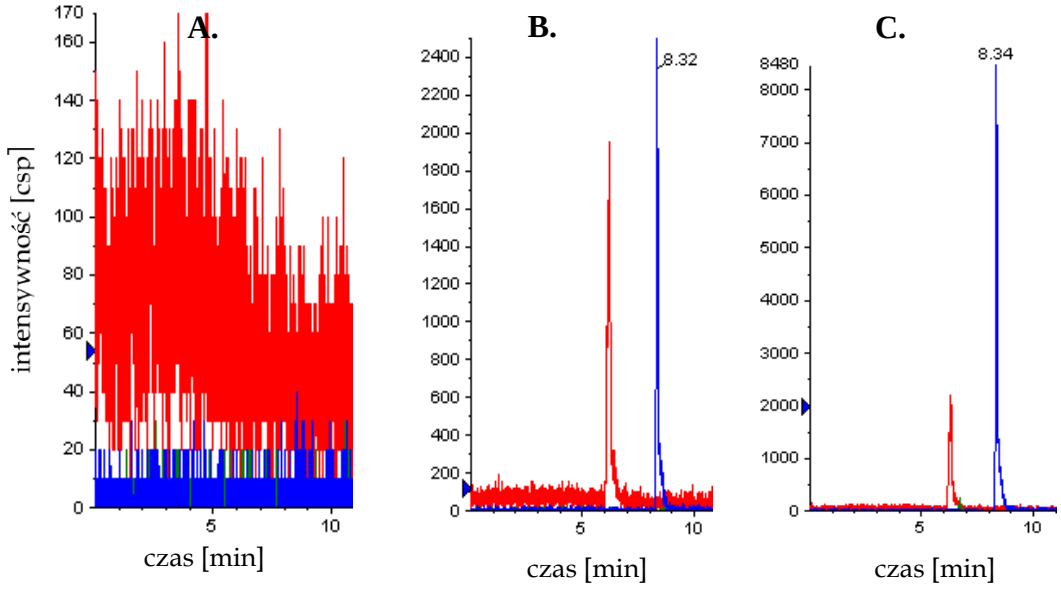
Ryc. 11. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat wątroby bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 250 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu wątroby szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C).



Ryc. 12. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat mózgu bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 100 ng/mL i IS o stężeniu 250 g/mL (B), próbka homogenatu mózgu szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C).



Ryc. 13. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat nerki bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 100 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu nerki szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C).



Ryc. 14. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat płuc bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 250 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu płuc szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C).

Dla wszystkich badanych tkanek uzyskano liniową odpowiedź detektora w zakresie stężeń od 1 do 2000 ng/mL (5-10 000 ng/g tkanki). Przykładowe równania regresji wyznaczone z zastosowaniem ważenia 1/x dla wszystkich badanych matryc wraz z opisującymi je współczynnikami determinacji zebrano w tab. 12. Jak wynika z przedstawionych danych wyznaczone krzywe wzorcowe zostały dopasowane do równań liniowych i charakteryzowały się dobrą korelacją.

Tab. 12. Równania regresji opisujące krzywe wzorcowe związku DL76 w homogenatach badanych narządów.

Matryca	Równanie regresji	Współczynnik determinacji (R^2)
mózg	y =0.0108x+0.116	0.9960
wątroba	y=0.0269+0.138	0.9972
nerki	y=0.0308+0.348	0.9948
płuca	y=0.0122x+0.452	0.9955

Obliczone wartości parametrów walidacji takich jak precyzja i dokładność zarówno w jednym jak i w różnych dniach przestawiono w tab. 13. Z otrzymanych danych wynika, że opracowana metoda bioanalityczna zapewniała pomiar stężeń analizowanego związku w badanych matrycach z zadawalającą precyzją i dokładnością.

Tab. 13. Parametry walidacji metody oznaczania związku DL76 w badanych matrycach – homogenatach narządów.

Narząd	Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Dokładność (%)		Precyzja (RSD, %)	
		w jednym dniu (n=5)	w różnych dniach	w jednym dniu (n=5)	w różnych dniach
mózg	1	92.7	92.8	6.2	15.8
	40	102.3	100.6	3.7	5.0
	400	107.5	105.7	10.9	9.0
	1800	97.3	95.1	8.8	8.5
wątroba	1	89.7	92.8	7.6	9.2
	40	103.2	103.6	8.6	8.9
	400	105.7	106.1	10.6	12.8
	1800	96.6	99.3	0.1	7.4
nerki	1	90.8	90.3	2.1	14.4
	40	112.3	112.7	2.1	8.4
	400	96.4	96.5	8.3	8.4
	1800	100.5	100.5	2.5	11.1
płuca	1	106.8	104.9	13.2	11.3
	40	88.0	91.1	2.6	2.6
	400	109.1	103.5	2.2	11.2
	1800	98.4	103.8	10.1	8.9

Dla związku DL76 przeprowadzono także badania stabilności w homogenatach mózgu, wątroby, nerek oraz płuc. Wyniki przedstawiono w tab. 14 i tab. 15.

Tab. 14. Stabilność związku DL76 w homogenatach mózgu, wątroby, nerek oraz płuc.

Narząd	Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Stabilność po 2h w 20°C			Stabilność po 24h w 10°C		
		średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja (RSD,%)	odchylenie (%)	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja (RSD,%)	odchylenie (%)
mózg	1	1.0	14.8	0	0.92	14.14	- 7.41
	40	40.24	13.5	0.6	39.58	6.0	- 1.1
	400	395.87	3.3	- 1.3	414.59	7.2	3.65
	1800	1804.73	2.2	0.3	1652.84	7.65	- 8.18
wątroba	1	1.08	9.4	8.1	0.95	9.8	- 4.6
	40	38.04	13.1	- 4.9	42.08	10.0	5.2
	400	383.03	4.8	- 4.2	444.68	10.96	11.1
	1800	1818.85	3.3	1.0	1703.67	0.12	- 5.4
nerki	1	0.91	13.9	- 9.3	0.97	15.28	- 2.6
	40	44.36	5.5	10.9	43.08	11.15	7.7
	400	392.90	6.1	- 1.8	366.95	5.98	- 8.3
	1800	1802.84	4.8	0.2	1827.45	9.83	1.5
płuca	1	0.94	14.5	6.0	1.02	8.33	1.7
	40	42.25	8.0	5.62	35.76	0.34	- 10.59
	400	419.45	9.8	4.86	387.40	7.95	- 3.2
	1800	1783.38	4.6	-0.92	1796.44	13.68	- 0.2

Tab. 15. Stabilność związku DL76 w homogenatach mózgu, wątroby, nerek oraz płuc.

Narząd	Dodane stężenie DL76 [ng/mL]	Stabilność podczas trzykrotnego rozmrażania i zamrażania			Stabilność w - 30°C (2 miesiące)		
		średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD (%)	odchylenie (%)	średnie oznaczone stężenie [ng/mL]	precyzja RSD (%)	odchylenie (%)
mózg	1	1.15	5.2	15.0	1.06	9.2	6.0
	40	39.2	11.6	- 2.0	37.94	5.7	-5.15
	400	366.21	1.6	- 8.4	402.02	2.9	0.5
	1800	1826.06	5.1	1.4	1729.8	5.9	-3.9
wątroba	1	0.98	12.4	- 1.7	0.9	12.7	-10.0
	40	42.52	5.4	6.3	44.25	11.4	10.62
	400	381.65	5.8	- 4.6	395.65	0.1	-1.09
	1800	1820.43	9.5	1.1	1798.46	4.1	-0.08
nerki	1	1.11	0.46	11.3	0.86	15.9	-14.0
	40	38.59	14.2	- 3.5	45.8	4.1	14.5
	400	359.57	8.0	- 10.1	399.64	1.7	-0.09
	1800	1841.73	8.9	2.3	1794.88	0.8	-0.28
płuca	1	0.96	4.0	- 4.0	1.04	17.0	4.0
	40	44.31	8.7	10.8	36.17	7.3	-9.57
	400	369.12	8.3	- 7.7	409.01	6.9	2.25
	1800	1845.76	5.4	2.5	1792.20	2.5	-0.43

Związek DL76 został uznany za stabilny we wszystkich badanych matrycach. W żadnej z badanych matryc nie stwierdzono także występowania znormalizowanego efektu matrycy.

4.2. Walidacja stosowanej metody spektrofotometrycznej

Wyniki badania liniowości zależności odpowiedzi detektora UV od stężenia związku DL76 w roztworach buforowych o pH = 1.2, 4.6 oraz 6.8 i w temperaturach 25 oraz 37°C, jak również precyzji i dokładności pomiarów przedstawiono w tab. 16, tab. 17 i tab. 18.

Tab. 16. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 1.2 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5).

Dodane stężenie DL76 [µg/mL]	Temperatura 25°C			Temperatura 37°C		
	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)
50	0.210	0.81	97.90	0.210	0.62	99.23
75	0.315	1.20	100.67	0.295	1.09	95.21
100	0.411	0.87	100.68	0.412	0.64	101.75
125	0.495	0.63	97.81	0.488	0.35	96.85
150	0.620	0.97	103.32	0.604	0.96	100.37
200	0.798	1.38	100.19	0.795	0.47	99.89
250	0.982	0.23	98.96	0.973	0.10	98.14

Tab. 17. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 4.6 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5).

Dodane stężenie DL76 [µg/mL]	Temperatura 25°C			Temperatura 37°C		
	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)
50	0.206	0.28	99.95	0.187	0.31	97.09
75	0.313	0.74	101.54	0.307	0.27	103.66
100	0.402	2.31	97.90	0.390	0.25	97.88
125	0.503	0.57	98.28	0.507	0.19	101.02
150	0.605	1.28	98.53	0.608	0.08	100.58
200	0.840	0.15	102.99	0.820	0.16	100.99
250	1.008	0.70	98.87	1.002	0.08	98.56

Tab. 18. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 6.8 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5).

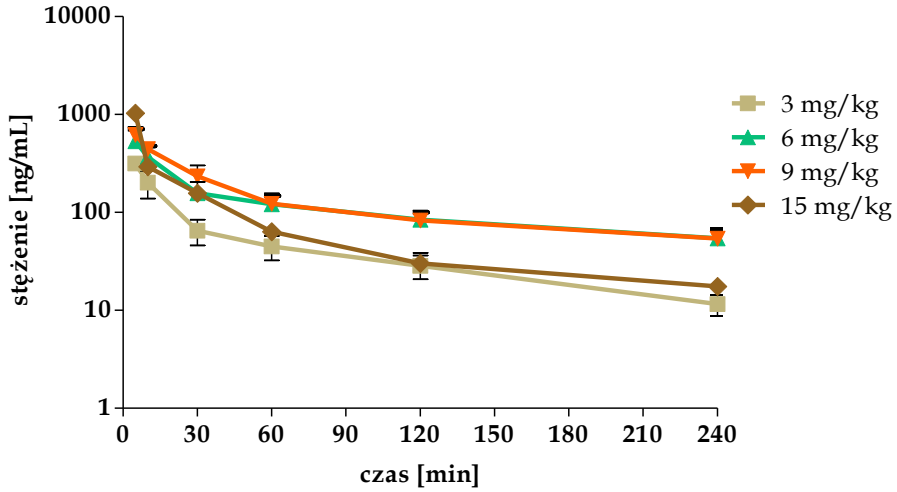
Dodane stężenie DL76 [µg/mL]	Temperatura 25°C			Temperatura 37°C		
	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)	absorbancja	precyzja (RSD, %)	dokładność (%)
20	0.065	1.25	96.25	0.071	2.89	97.53
50	0.181	0.45	100.01	0.179	0.32	97.62
75	0.274	0.18	99.43	0.273	0.30	99.76
100	0.370	0.35	100.02	0.368	0.14	100.82
125	0.462	0.85	99.74	0.456	0.58	100.22
150	0.564	0.37	100.97	0.558	0.39	102.08
200	0.748	0.08	100.12	0.743	0.17	101.92
250	0.931	0.27	99.46	0.886	0.07	97.25

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 16, tab. 17 i tab. 18 opracowana metoda analityczna jest liniowa w zakresie od 50 do 250 µg/mL dla roztworów buforowych o pH 1.2 oraz 4.6 i w zakresie od 20 do 250 µg/mL dla roztworu o pH równym 6.8. Metoda charakteryzuje się również zadawalającymi parametrami precyzji i dokładności.

4.3. Ocena dyspozycji związku DL76 w surowicy krwi szczura

4.3.1. Podanie dożylne

Wykresy zależności zmian stężenia związku DL76 od czasu w surowicy krwi, po jednorazowym dożylnym podaniu czterech różnych dawek przedstawiono na ryc. 15.



Ryc. 15. Zmiany stężeń związku DL76 w zależności od czasu przedstawione w skali półlogarytmicznej po jego jednorazowym dożylnym podaniu w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5).

Na podstawie średnich wartości stężeń DL76 oznaczonych w surowicy krwi po podaniu dożylnym różnych dawek tego związku, wyznaczono parametry farmakokinetyczne z zastosowaniem techniki bezmodelowej. Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 19 średni czas przebywania leku w organizmie (MRT) wahał się w granicach od 1 do 3 godzin w zależności od podawanej dawki. Duża objętość dystrybucji (średnio w granicach 20 litrów/kg) świadczy o wewnątrzkomórkowej dystrybucji badanego związku. Wysoka wartość klirensu całkowitego, znacznie przewyższająca szybkość przepływu krwi przez wątrobę (3.48 L/h/kg) może być wynikiem pozawątrobowego procesu metabolizmu związku DL76.

Tab. 19. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w surowicy krwi szczura po podaniu dożylnym, wyznaczone z wykorzystaniem techniki bezmodelowej.

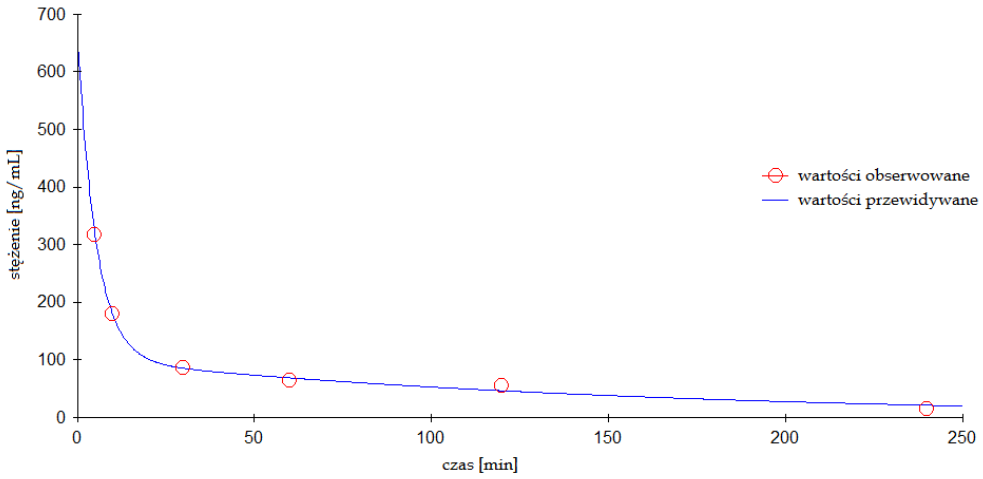
D_{DL76} [mg/kg]	$AUC_{0\to\infty}$ [ng · h/mL]	$AUMC_{0\to\infty}$ [ng · h²/mL]	MRT [h]	Vd_{ss} [L/kg]	Cl_t [L/h/kg]
3	297.65	477.83	1.60	16.1	10.08
6	707.67	2096.06	2.96	25.1	8.47
9	800.25	2548.31	3.18	35.8	11.24
15	527.03	554.78	1.05	29.9	28.46

Niezależnie od techniki bezmodelowej przeprowadzono przy pomocy programu Phoenix WinNonlin dopasowanie zależności stężenie-czas do modeli kompartmentowych. Dla niższych dawek (3 i 6 mg/kg) najlepsze dopasowanie uzyskano dla otwartego modelu dwukompartmentowego, natomiast dla dawek wyższych (9 i 15 mg/kg) dla otwartego modelu trójkompartmentowego (ryc. 16 i ryc. 17). Przykładowo dla dawki 3 mg/kg podawanej drogą dożylną współczynniki dopasowania do otwartego modelu dwukompartmentowego wynosiły odpowiednio:

AIC (Akaike Information Criterion) = 37.74

SBC (Schwartz Bayesian Criterion) = 36.91

Współczynnik determinacji = 0.9989



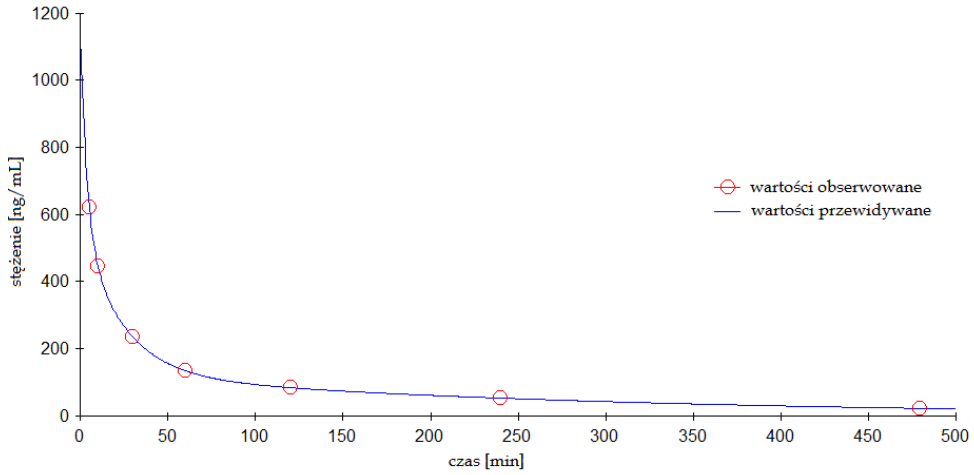
Ryc. 16. Dopasowanie do otwartego modelu 2-kompartmentowego obserwowanych średnich wartości stężeń w czasie, oznaczonych w surowicy krwi szczura po jednorazowym podaniu dożylnym związku DL76 w dawce 3 mg/kg.

Natomiast dla dawki 9 mg/kg podawanej drogą dożylną współczynniki dopasowania do otwartego modelu trójkompartmentowego wynosiły odpowiednio:

AIC (Akaike Information Criterion) = 21.00

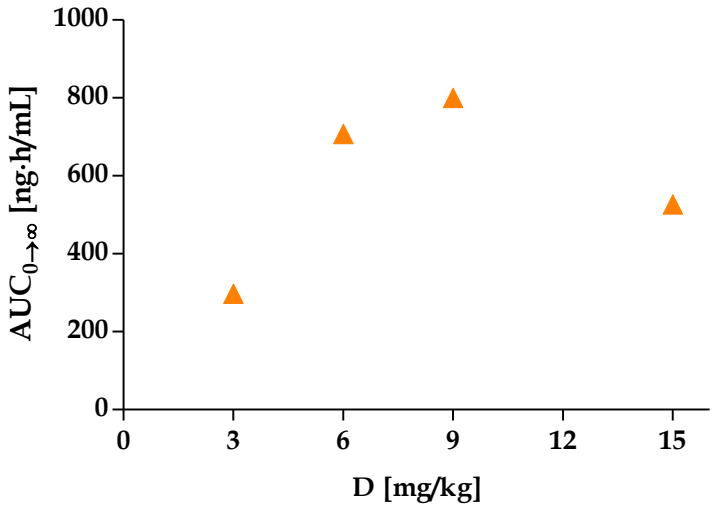
SBC (Schwartz Bayesian Criterion) = 20.68

Współczynnik determinacji = 1



Ryc. 17. Dopasowanie do otwartego modelu 3-kompartmentowego obserwowanych średnich wartości stężeń w czasie, oznaczonych w surowicy krwi szczura po jednorazowym podaniu dożylnym DL76 w dawce 9 mg/kg.

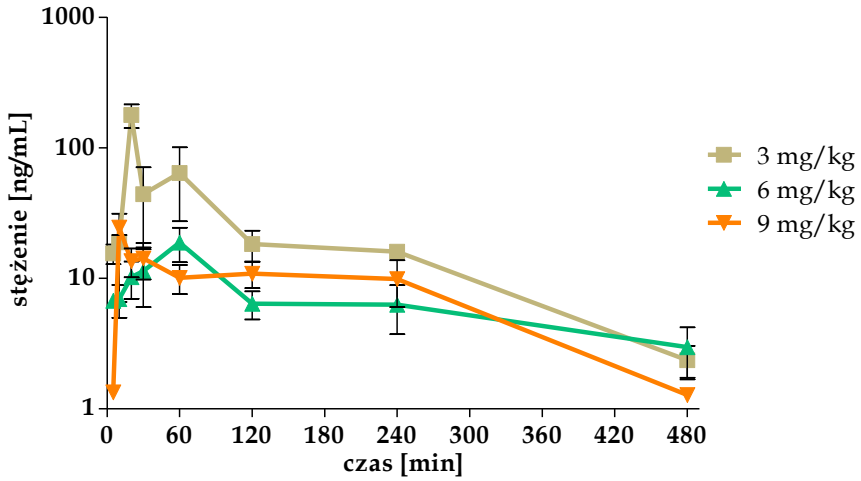
Celem zbadania liniowości farmakokinetyki procesów dystrybucji i eliminacji DL76 analizowano pola pod krzywą stężenie-czas w zależności od wielkości podanej dożylnie dawki. Jak wynika z ryc. 18 zwiększenie dawki DL76 nie prowadziło do proporcjonalnego wzrostu wartości AUC, co może wskazywać na nieliniowość procesów farmakokinetycznych w badanym zakresie dawek.



Ryc. 18. Wykres zależności wartości pola pod krzywą stężenie-czas (AUC) dla związku DL76 od wielkości podanej dożylnie dawki.

4.3.2. Podanie dożołądkowe

Zmiany stężeń związku DL76 w surowicy krwi szczura po podaniu dożołądkowym w jednorazowych dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg przedstawiono na ryc. 19.



Ryc. 19. Zmiany stężeń związku DL76 w zależności od czasu przedstawione w skali półlogarytmicznej po jego jednorazowym dożołądkowym podaniu w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5).

Na podstawie zależności stężeń od czasu oznaczonych w surowicy krwi po podaniu dożołądkowym DL76, obliczono parametry farmakokinetyczne, które zawarto w tab. 20.

Tab. 20. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku.

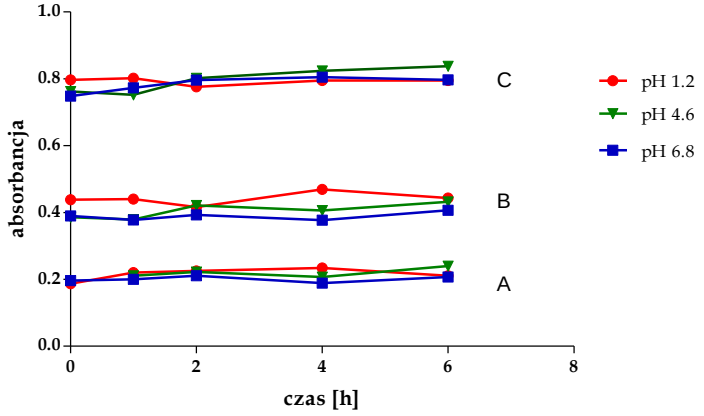
D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/mL]	$AUC_{0\rightarrow\infty}$ [ng·h/mL]	λ_z [h^{-1}]	k_a [h^{-1}]	F* [%]
3	178.2	181.39	0.42	1.52	60.9
6	18.83	69.12	0.16	1.72	9.77
9	24.50	69.61	0.38	0.97	8.70

* Bezwzględna dostępność biologiczna liczona względem tych samych dawek podanych dożylnie.

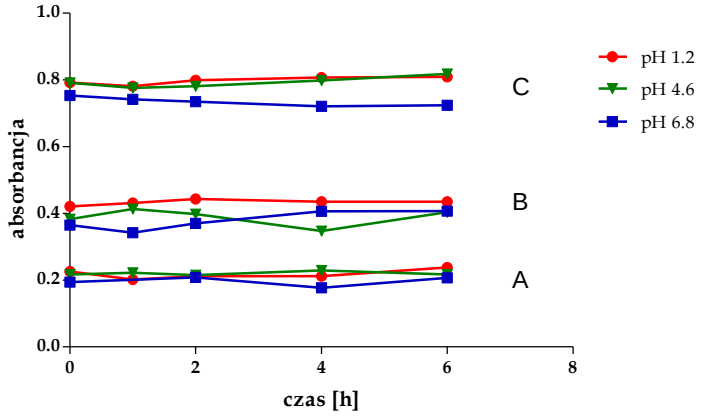
Z przedstawionych powyżej danych wynika, że wraz ze wzrostem dawki wartość AUC ulegała obniżeniu, co jest tożsame ze zmniejszeniem dostępności biologicznej badanego związku.

4.4. Badanie rozpuszczalności związku DL76 metodą równowagową „stirred flask"

Przed rozpoczęciem realizacji podstawowego etapu badań zbadano trwałość związku DL76 w roztworach buforowych o założonym pH. Na ryc. 20 i ryc. 21 przedstawiono wyniki pomiarów absorbancji dla serii próbek związku DL76 o stężeniach 50, 100 i 200 µg/mL, w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8. Próbki termostatowano w temperaturze 25 lub 37°C i pobierano roztwory do analizy po czasie 0, 2, 4 i 6h.



Ryc. 20. Średnie (n=5) zmiany absorbancji badanych próbek DL76 o stężeniu 50 (A), 100 (B) i 200 (C) µg/mL w czasie, w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8, w temperaturze 25°C.



Ryc. 21. Średnie (n=5) zmiany absorbancji badanych próbek DL76 o stężeniu 50 (A), 100 (B) i 200 (C) µg/mL w czasie, w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8, w temperaturze 37°C.

We wszystkich badanych pH i temperaturach związek DL76 został uznany za stabilny. Współczynnik zmienności wyrażony, jako względne odchylenie

standardowe (RSD) dla pomiarów każdego stężenia przeprowadzanych w tych samych warunkach pH i temperatury nie przekroczył 10%.

Rozpuszczalność soli DL76 określano w oparciu o analizę spektrofotometryczną stężenia związku w badanej próbce. Wartości rozpuszczalności związku DL76 w badanych warunkach pH i temperatury przedstawiono w tab. 21.

Tab. 21. Rozpuszczalność DL76 w temperaturze 25°C oraz 37°C w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 i 6.8.

Wartość pH	Rozpuszczalność DL76 [mg/mL]			
	Temperatura 25°C		Temperatura 37°C	
	wartość średnia (n=5)	precyzja (RSD, %)	wartość średnia (n=5)	precyzja (RSD, %)
1.2	12.73	0.46	17.16	0.63
4.6	85.06	4.05	178.9	1.74
6.8	23.11	0.29	24.04	0.62

Na podstawie uzyskanych danych obliczono zmiany entalpii (ΔH), entalpii swobodnej (ΔG), entropii (ΔS) oraz wartości S_0 dla procesu rozpuszczania DL76 w badanych warunkach pH i temperatury. Wyniki przedstawiono w tab. 22.

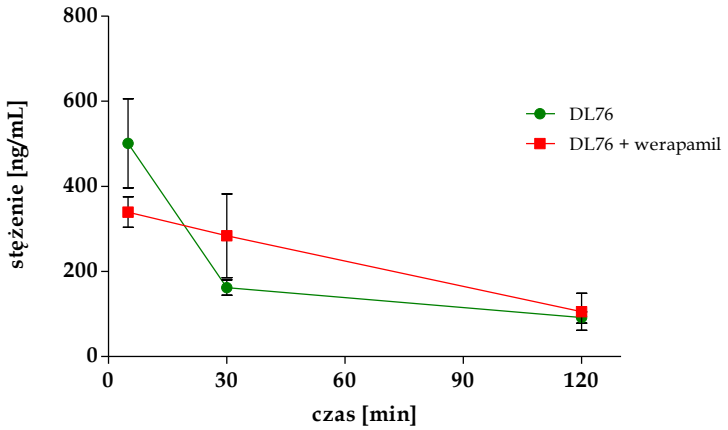
Tab. 22. Wartości podstawowych funkcji termodynamicznych procesu rozpuszczania DL76.

Funkcje termodynamiczne	pH=1.2		pH=4.6		pH=6.8	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
ΔG	-6.3	-7.323	-11.003	-13.362	-7.776	-8.191
ΔH	19.10		47.56		2.52	
ΔS	0.043	0.038	0.123	0.110	-0.018	-0.018
S_0	12.73	17.16	85.06	178.89	23.007	23.933

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 21 związek DL76 wykazuje największą rozpuszczalność w pH równym 4.6 i również dla tego pH zaobserwowano największą zależność rozpuszczalności od temperatury. Proces rozpuszczania ma charakter samorzutny (ΔG<0) i endotermiczny (ΔH>0).

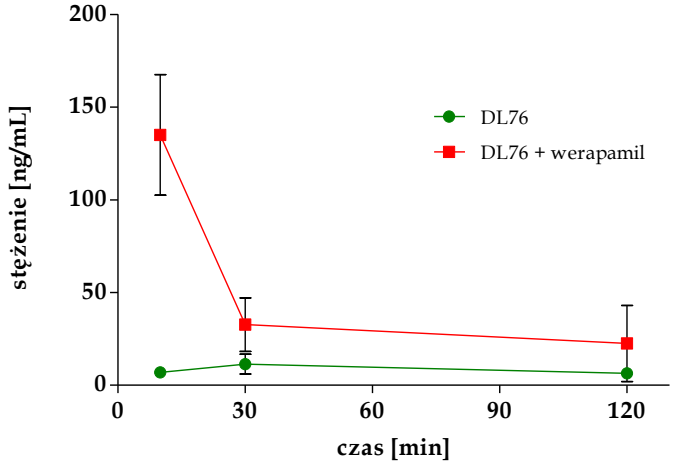
4.5. Wpływ P-glikoproteiny na dystrybucję związku DL76

Na ryc. 22 przedstawiono zależność stężenia od czasu dla podania dożylnego DL76 w dawce 6 mg/kg bez i po wcześniejszym dożołądkowym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg.



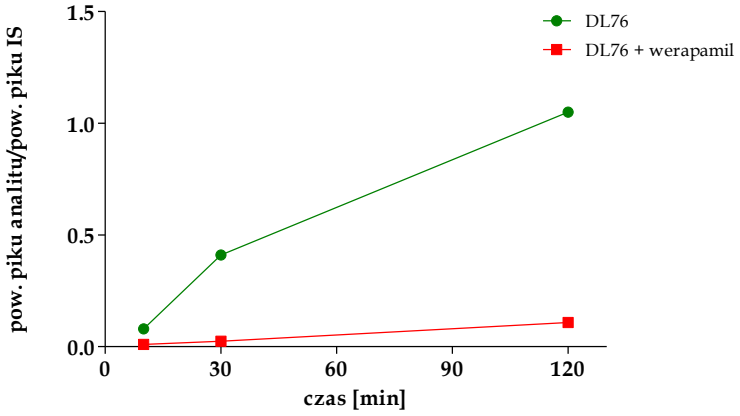
Ryc. 22. Zależność stężenia (wartości średnie±SD, n=3) od czasu dla związku DL76 podawanego dożylnie w jednorazowej dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu doustnym werapamilu (25 mg/kg).

Pole pod krzywą zależności stężenia związku DL76 od czasu po wcześniejszym podaniu werapamilu wzrosło o ok. 20%.



Ryc. 23. Zależność stężenia (wartości średnie±SD, n=3) od czasu dla związku DL76 podawanego dożołądkowo w jednorazowej dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu doustnym werapamilu (25 mg/kg).

W przypadku podania dożołądkowego pole pod krzywą zależności stężenia związku DL76 od czasu wzrosło, po podaniu werapamilu, ponad 4 razy (81.74 vs 346.83 ng · h/g) i jednocześnie drastycznie spadła ilość obserwowanego w surowicy krwi metabolitu (ryc. 23 i ryc. 24).



Ryc. 24. Zależność ilości obserwowanego w surowicy krwi metabolitu związku DL76 od czasu po jednorazowym podaniu dożołądkowym związku macierzystego w dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu dożołądkowym werapamilu (25 mg/kg).

Tab. 23. Wartości pola pod krzywą stężenie-czas w tkankach dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożylnej 6 mg/kg oraz po wcześniejszym dożołądkowym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg.

Tkanka	DL76 $AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]		
	bez werapamilu	po wcześniejszym podaniu werapamilu	
Wątroba	904.25	7523.6	+832%
Płuca	11584.35	13917.0	+120%
Mózg	8938.8	46111.8	+516%
Nerki	8457.5	36647.6	+433%

Jak widać z danych przedstawionych w tab. 23 AUC związku DL76 podawanego dożylnie wzrosło po wcześniejszym podaniu werapamilu we wszystkich badanych tkankach. Największy wzrost (ponad ośmiokrotny) zaobserwowano w wątrobie natomiast najmniejszy w płucach.

W tab. 24 przedstawiono wartości AUC DL76 w tkankach po podaniu dożołądkowym jednorazowej dawki 6 mg/kg tego związku oraz po

wcześniejszym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg. Największy wzrost AUC w obecności werapamilu zaobserwowano w wątrobie, co może być m. in. rezultatem zahamowania metabolizmu badanego związku (werapamil jest inhibitorem nie tylko P-gp, ale również Cyp3A4), natomiast w nerkach ilość związku znacznie zmalała.

Tab. 24. Wartości pola pod krzywą stężenie-czas w tkankach dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożołądkowej 6 mg/kg oraz po wcześniejszym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg.

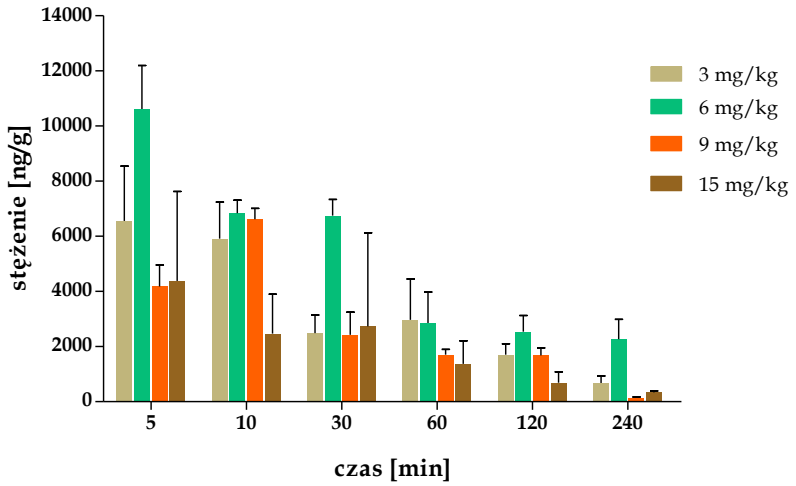
Tkanka	DL76 $AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]		
	bez werapamilu	po wcześniejszym podaniu werapamilu	
Wątroba	319.25	14167.4	+4437%
Płuca	1022.5	2555.0	+250%
Mózg	362.6	1721.7	+477%
Nerki	625.3	24.55	-2547%

Podobnie jak w surowicy również we wszystkich badanych narządach w obecności werapamilu zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym zaobserwowano znaczny spadek ilości metabolitu, średnio o 94% (od 98% w nerkach do 90.34% w płucach).

4.6. Ocena dyspozycji DL76 w wybranych narządach szczura

4.6.1. Mózg

Zależności stężenia badanego związku od czasu w homogenacie tkanki mózgowej szczura po jego jednorazowym podaniu dożylnym w czterech różnych dawkach przedstawiono na ryc. 25.

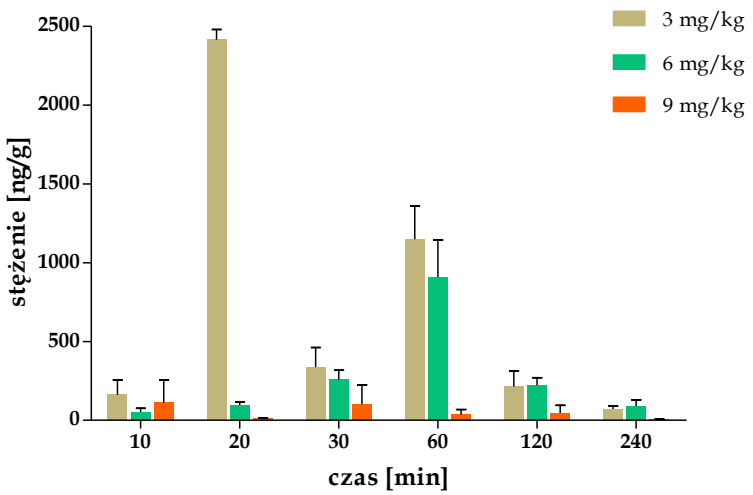


Ryc. 25. Zmiany stężeń DL76 w mózgu szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

Na podstawie oznaczonych stężeń obliczono parametry farmakokinetyczne takie jak pole pod krzywą zależności stężenie-czas i stała szybkości znikania z mózgu (tab. 25).

Tab. 25. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w mózgu szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	7275.00	8591.26	0.49
6	16490.00	14025.51	0.55
9	6620.00	6846.01	1.25
15	7775.00	4736.5	0.36



Ryc. 26. Zmiany stężeń DL76 w mózgu szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

Na ryc. 26 przedstawiono zmiany stężenia DL76 w czasie w mózgu szczura po podaniu dożołądkowym. Z porównania wykresów przedstawionych na ryc. 25 i ryc. 26 wynika, że zgodnie z oczekiwaniami, stężenia maksymalne DL76 w mózgu szczura osiągały znacznie wyższe wartości po podaniu dożylnym w porównaniu z podaniem dożołądkowym tej samej dawki.

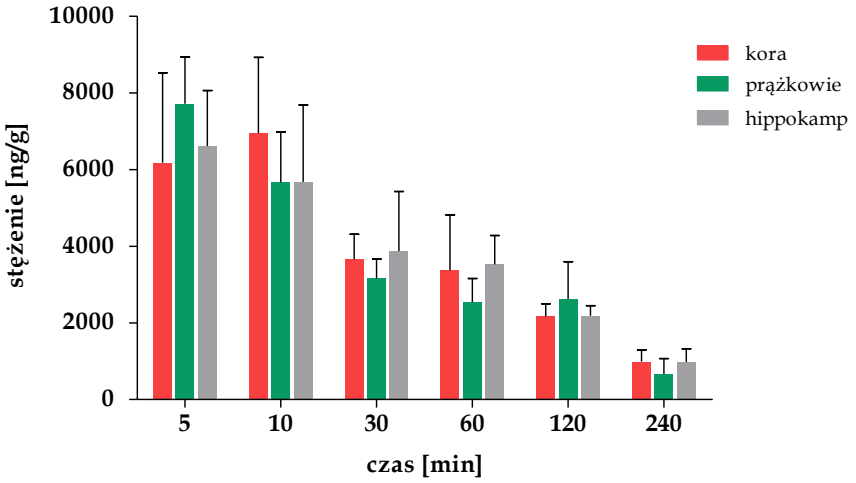
Na podstawie oznaczonych stężeń związku DL76 w mózgu szczura po jednorazowym podaniu dożołądkowym obliczono parametry farmakokinetyczne, które zawarto w tab. 26. Jak wynika z przedstawionych danych wraz ze wzrostem dawki wartości C_{max}, $AUC_{0\rightarrow t}$ oraz λ_z ulegały obniżeniu.

Tab. 26. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w mózgu szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	2415.8	1796.88	0.87
6	908.2	1314.47	0.72
9	112.65	147.5	0.61

4.6.2. Struktury mózgu

Badano również dyspozycję związku DL76 po jednorazowym podaniu dożylnym w dawce 3 mg/kg w strukturach mózgu, takich jak hippokamp, kora i prążkowie, w których występuje największe zagęszczenie receptorów histaminowych H_3 (ryc. 27).

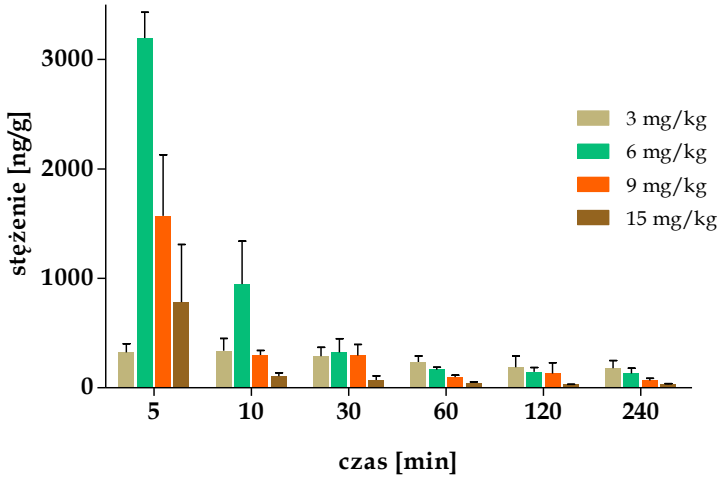


Ryc. 27. Zależność stężenia od czasu w strukturach mózgu szczura związku DL76 po jego jednorazowym podaniu dożylnym w dawce 3 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=3).

Różnice pomiędzy ilością związku DL76 w badanych strukturach mózgu w danym czasie nie były istotne statystycznie ($p<0.05$).

4.6.3. Wątroba

Stężenia związku DL76 w wątrobie szczura po jednorazowym podaniu dożylnym DL76 w czterech różnych dawkach przedstawiono na ryc. 28.



Ryc. 28. Zmiany stężeń DL76 w wątrobie szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

W tab. 27 przedstawiono podstawowe parametry farmakokinetyczne charakteryzujące dyspozycję związku DL76 w wątrobie szczura obliczone po jego podaniu dożylnym.

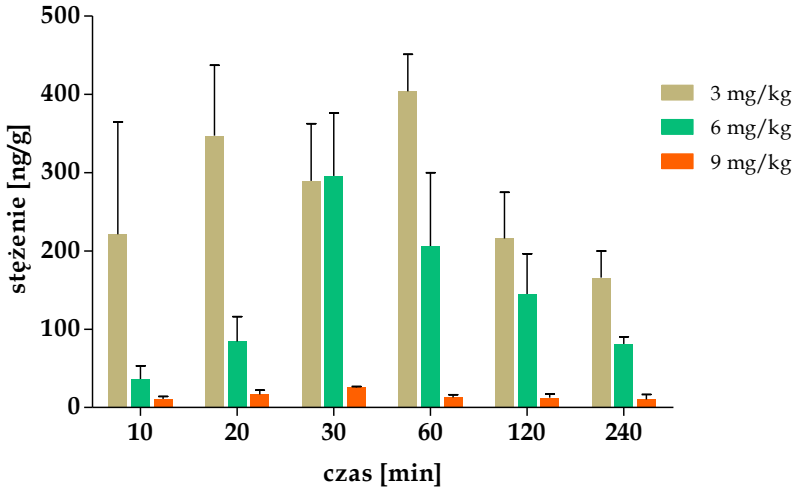
Tab. 27. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w wątrobie szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	3235.00	867.84	0.08
6	10780.00	1523.80	0.07
9	8215.00	993.10	0.16
15	5785.00	468.85	0.28

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 27 dla dawki 6 mg/kg zarówno wartość C_{max} jak i $AUC_{0\rightarrow t}$ były największe. Stała szybkości znikania

związku DL76 z tkanki wątrobowej wzrastała wraz ze wzrostem podawanej dawki.

Na kolejnym wykresie (ryc. 29) przedstawiono zależność stężenia od czasu w wątrobie po podaniu dożołądkowym związku DL76. Obliczone na podstawie uzyskanych danych parametry farmakokinetyczne zebrano w tab. 28.



Ryc. 29. Zmiany stężeń DL76 w wątrobie szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

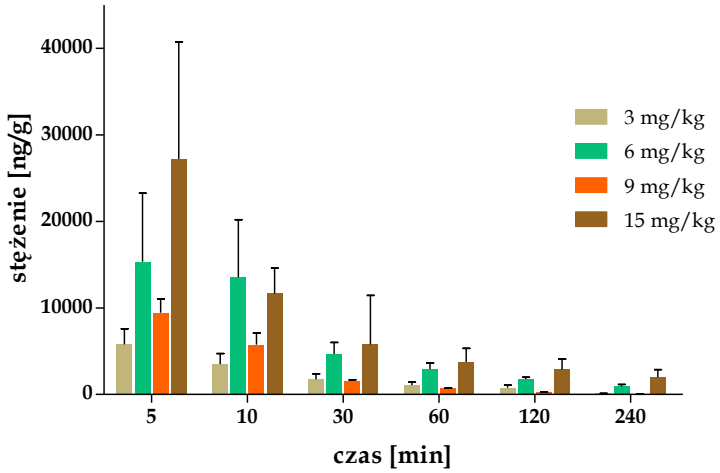
Tab. 28. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w wątrobie szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	403.95	984.33	0.27
6	296.05	572.30	0.31
9	126.45	51.96	0.08

Jak wynika z powyższych danych wraz ze wzrostem podawanej dożołądkowo dawki, wartości C_{max} oraz AUC badanego związku ulegały obniżeniu.

4.6.4. Nerki

Wartości stężeń związku DL76 oznaczone w homogenatach nerek szczura po podaniu dożylnym przedstawiono na ryc. 30, a obliczone na ich podstawie parametry farmakokinetyczne zebrano w tab. 29.

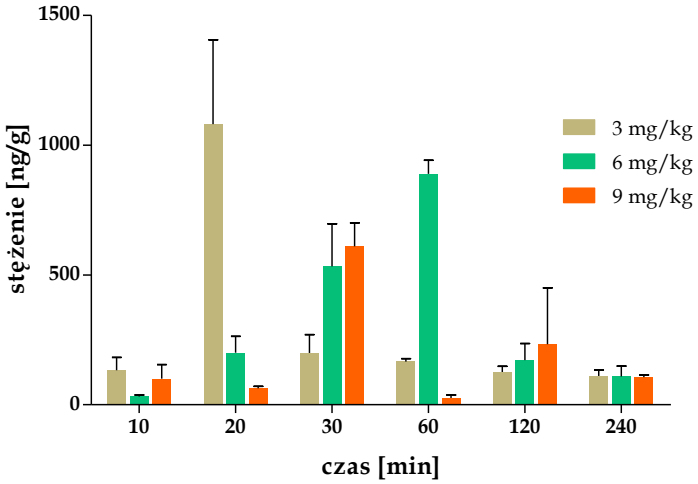


Ryc. 30. Zmiany stężeń DL76 w nerkach szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

Tab. 29. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w nerkach szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	9525	4431.05	1.01
6	17350	12569.63	0.33
9	15510	4230.10	0.85
15	63550	18893.43	0.19

Jak wynika z tab. 29 wraz ze wzrostem podawanej dożylnie dawki wzrastały wartości C_{max}, natomiast AUC przyjmowała największe wartości dla dawki 15 mg/kg i odpowiednio dla tej dawki stała szybkości znikania była najmniejsza. Na ryc. 31 przedstawiono zależność stężenia od czasu po podaniu dożołądkowym związku DL76. Obliczone parametry farmakokinetyczne zebrano w tab. 30.



Ryc. 31. Zmiany stężeń DL76 w nerkach szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

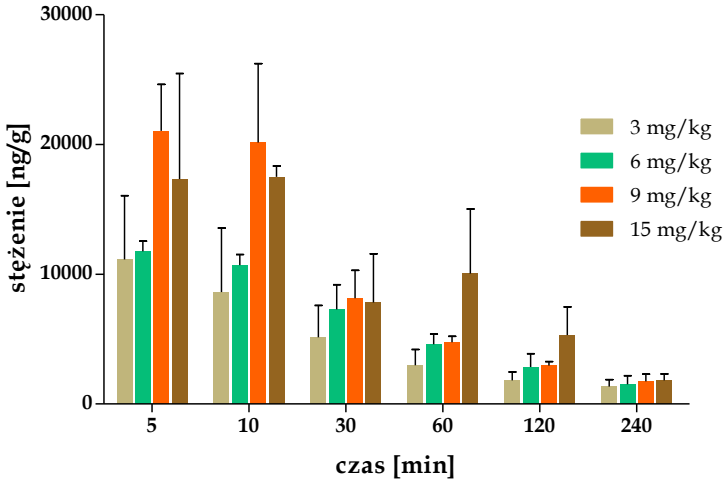
Tab. 30. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w nerkach szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	1081.5	694.41	0.12
6	889.50	1250.64	0.63
9	610.50	707.18	0.40

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 30 wraz ze wzrostem podawanej dożołądkowo dawki wartość C_{max} ulegała obniżeniu, natomiast wartość AUC była największe dla dawki 6 mg/kg.

4.6.5. Płuca

Zależności stężenia DL76 w funkcji czasu w tkance płucnej po podaniu dożylnym badanego związku w czterech różnych dawkach przedstawiono na ryc. 32.



Ryc. 32. Zmiany stężeń związku DL76 w płucach szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5)

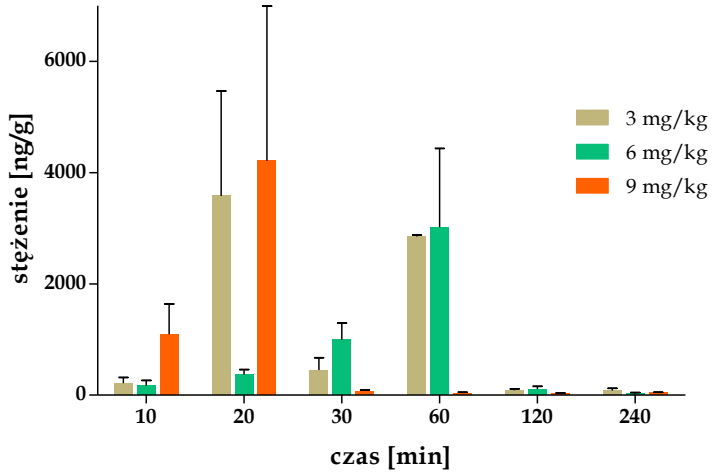
Na podstawie uzyskanych stężeń oznaczonych w płucach obliczono parametry farmakokinetyczne związku DL76 po jego podaniu dożylnym (tab. 31).

Tab. 31. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w płucach szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	14380	11771.26	0.25
6	12945	16038.67	0.36
9	21975	20021.67	0.32
15	17500	26401.27	0.56

Jak wynika z tab. 31 wraz ze wzrostem podawanej dożylnie dawki wzrastały wartości AUC, natomiast stała szybkości znikania utrzymywała się w granicach 0.3 h^{-1}. W płucach zaobserwowano też liniową zależność między AUC, a podawana dawką związku DL76.

Na ryc. 34 przedstawiono zależność stężenia związku DL76 od czasu w płucach po podaniu dożołądkowym tego związku, a w tab. 32 zebrano obliczone na podstawie uzyskanych danych odpowiednie parametry farmakokinetyczne.



Ryc. 33. Zmiany stężeń DL76 w płucach szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5).

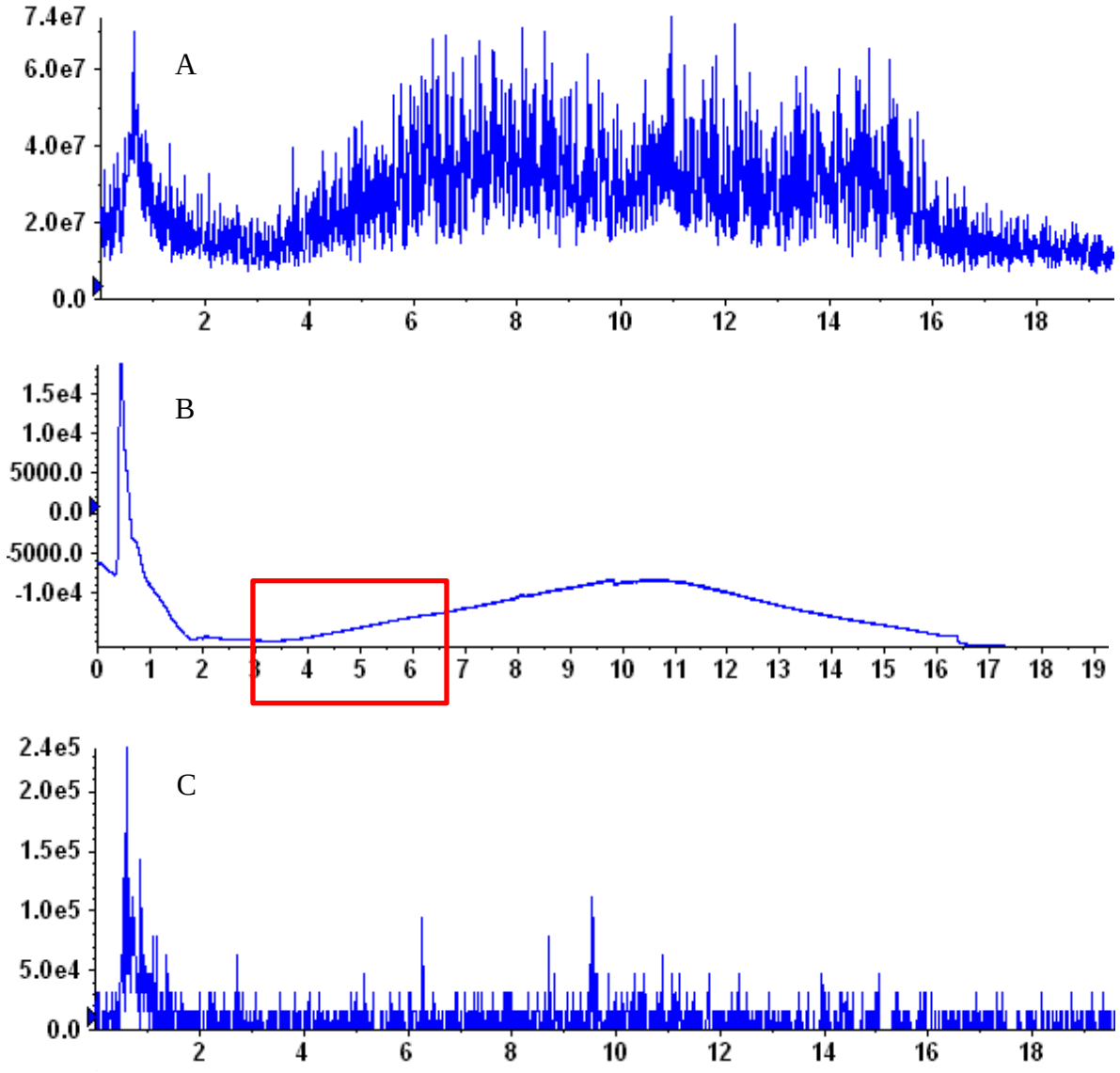
Tab. 32. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w płucach szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach.

D_{DL76} [mg/kg]	C_{max} [ng/g]	$AUC_{0\rightarrow t}$ [ng · h/g]	λ_z [h^{-1}]
3	3581.00	3132.00	1.03
6	3017.50	2878.52	1.40
9	4214.5	1019.43	0.67

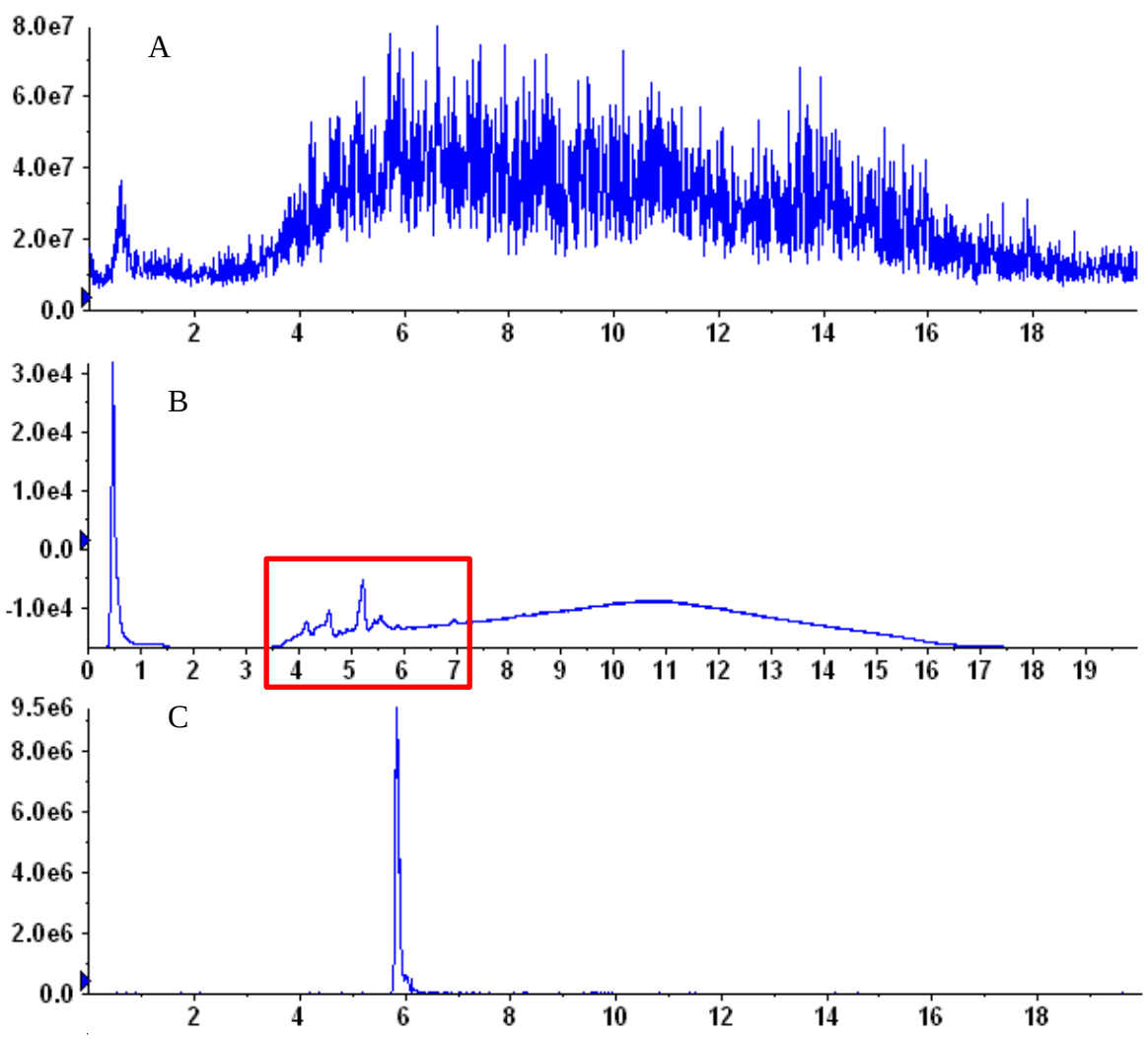
Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 32 wraz ze wzrostem podawanej dożołądkowo dawki wartość AUC malała.

4.7. Poszukiwanie wiodącego metabolitu związku DL76

Na ryc. 34 przedstawiono całkowity prąd jonowy (A), chromatogram DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów (C) dla próbki czystego moczu szczura, natomiast na ryc. 35 przedstawiono całkowity prąd jonowy (A), chromatogram DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów (C) dla próbki moczu szczura po jednorazowym, dożołądkowym podaniu związku DL76 w dawce 6 mg/kg.

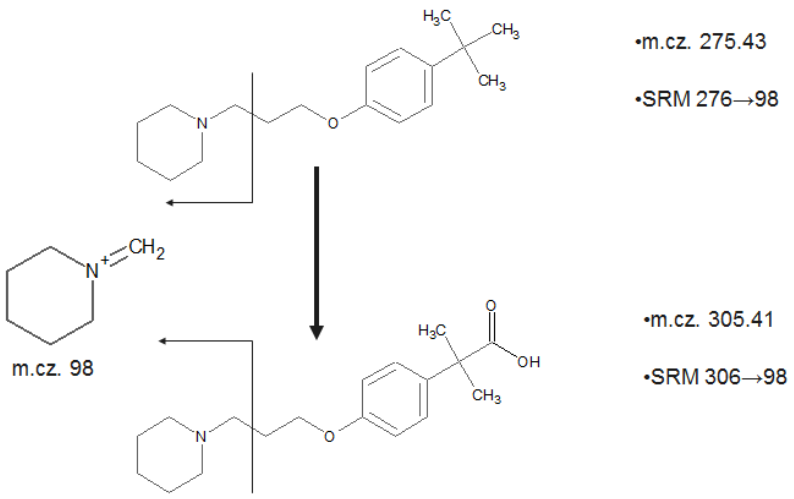


Ryc. 34. Całkowity prąd jonowy (A), spektrum DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów o masie 306 amu (C) dla próbki czystego moczu.



Ryc. 35. Całkowity prąd jonowy (A), spektrum DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów o masie 306 amu (C) dla próbki moczu szczura pobranej po 5h od jednorazowego dożołądkowego podania związku DL76 w dawce 6 mg/kg.

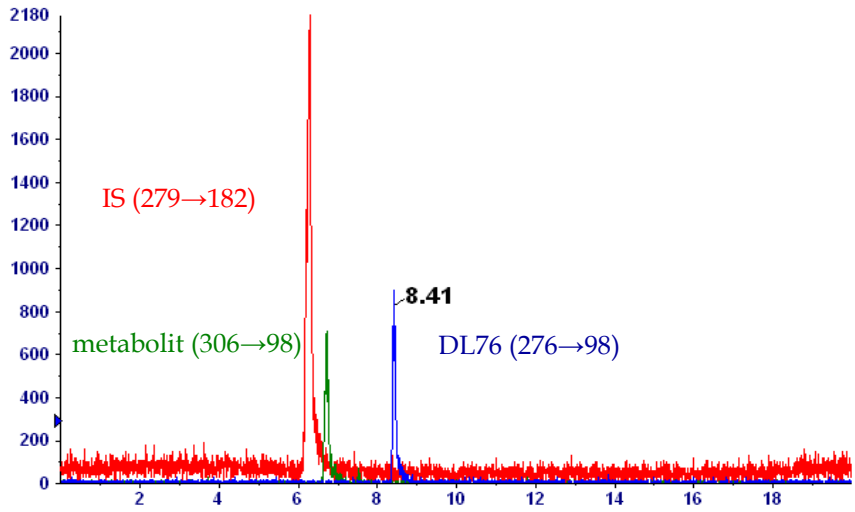
Czerwonym kwadratem zaznaczono przypuszczalny czas retencji potencjalnych metabolitów związku DL76. Jak widać na ryc. 35 w przewidywanym czasie pojawiły się piki chromatograficzne, których nie ma w próbce kontrolnej (ryc. 34). Zidentyfikowano, że za najwyższy pik odpowiedzialny jest związek o masie cząsteczkowej 305 amu, co potwierdził chromatogram wybranych jonów (ryc. 35 C). Masę tą poddano fragmentacji w komorze kolizyjnej spektrometru masowego uzyskując fragment o masie 98 amu, identyczny jak dla związku DL76.



Ryc. 36. Struktura chemiczna związku DL76 (m.cz. 275), jego potencjalnego metabolitu (m.cz. 305) oraz wspólnego jonu fragmentacyjnego o m. cz. 98.

Na ryc. 36 przedstawiono strukturę chemiczną związku DL76 (m.cz. 275), jego potencjalnego metabolitu (m.cz. 305) oraz wspólnego jonu fragmentacyjnego o m. cz. 98.

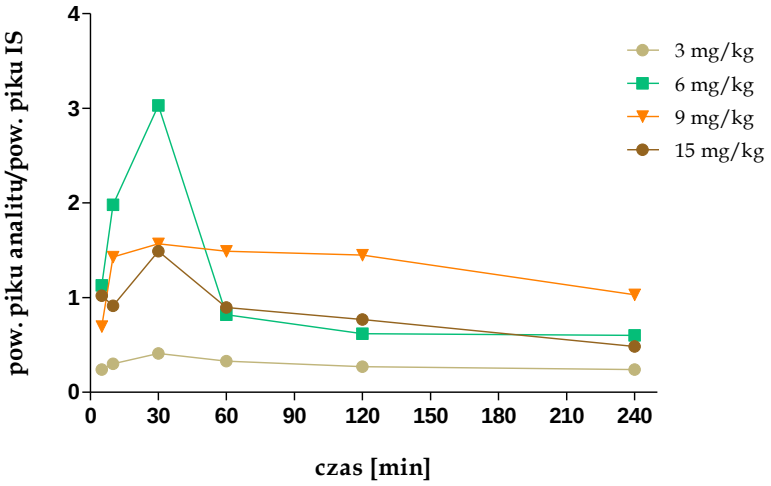
Opracowana w celu ilościowego oznaczania związku DL76 metoda analityczna, dzięki zastosowaniu detekcji masowej umożliwiła także zobrazowanie na tym samym chromatogramie pików pochodzących od metabolitu (ryc. 37). W spektrometrii mas stopień jonizacji związku zależy jednakże od szeregu czynników, dlatego też do przeprowadzenia oznaczeń ilościowych niezbędny jest wzorzec badanej substancji. Ponieważ w przypadku zidentyfikowanego metabolitu związku DL76 wzorzec nie jest dostępny możliwe było jedynie oszacowanie względnej dynamiki jego zmian w czasie we wszystkich analizowanych matrycach.



Ryc. 37. Chromatogram wybranych jonów dla próbki homogenatu wątroby pobranej godzinę po podaniu dożylnym związku DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. Kolorem zielonym zaznaczono pik pochodzący od metabolitu związku DL76.

4.8. Dyspozycja metabolitu związku DL76

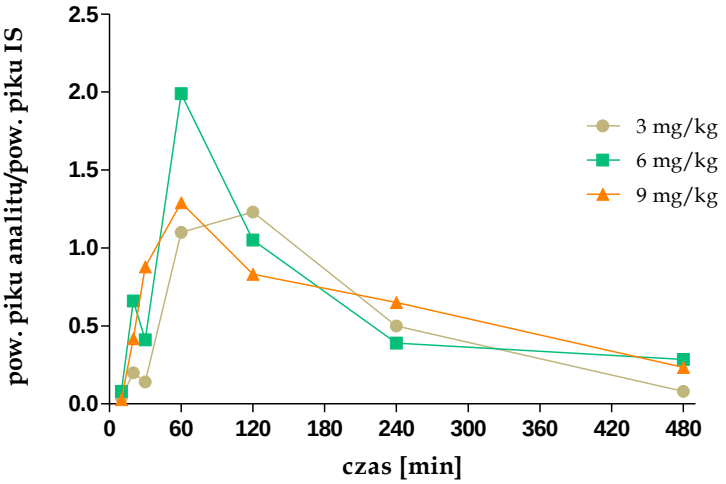
W ninejszej pracy oszacowano również dynamikę zmian w surowicy krwi szczura karboksylowej pochodnej DL76 będącej prawdopodobnie podstawowym metabolitem tego związku po jednorazowym dożylnym podaniu związku macierzystego w dawkach 3, 6, 9 i 15 mg/kg. Ze względu na brak wzorca analizowanej substancji ilość metabolitu wyrażona jest w postaci stosunku pola piku pochodzącego od analitu do pola piku IS. Wyniki przedstawiono na ryc. 38.



Ryc. 38. Dynamika zmian metabolitu związku DL76 w surowicy krwi szczura od czasu dla jednorazowego podania dożylnego związku macierzystego w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie, n=5).

Jak wynika z danych przedstawionych powyżej najwyższy poziom metabolitu, po podaniu dożylnym związku macierzystego, obserwowano po upływie 30 min od podania dawki 6 mg/kg. Z przebiegu otrzymanych wykresów wynika również brak wyraźnej zależności pomiędzy poziomem metabolitu, a dawką.

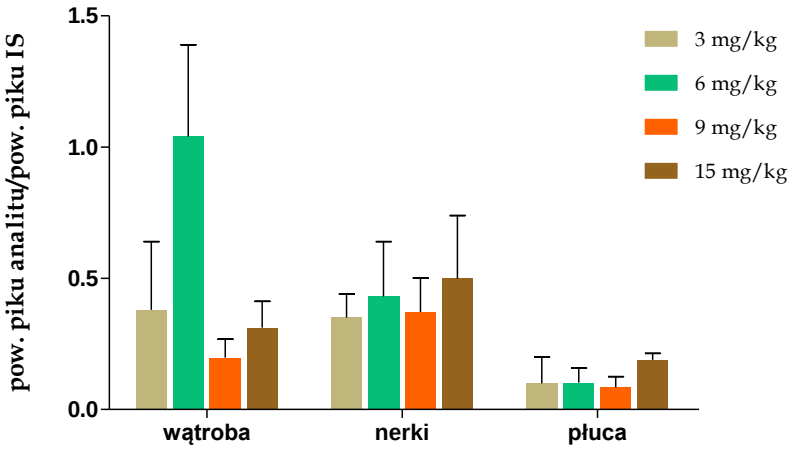
Analogiczną analizę przeprowadzono po jednorazowym dożołądkowym podaniu związku DL76 w dawkach 3, 6 i 9 mg/kg. Wyniki przedstawiono na ryc. 39.



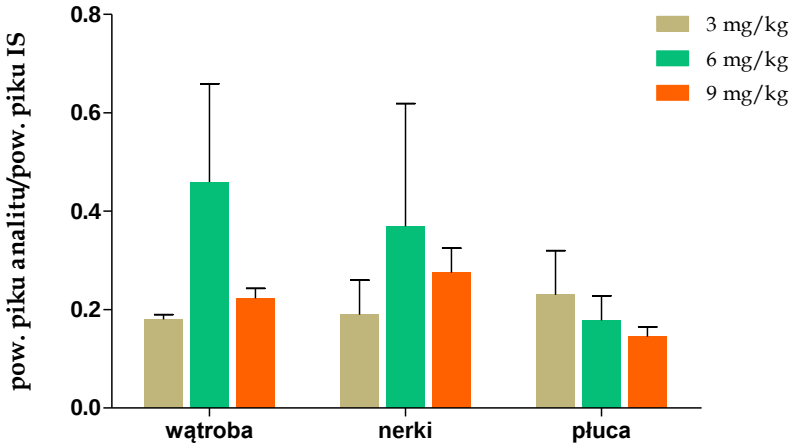
Ryc. 39. Dynamika zmian metabolitu związku DL76 w surowicy krwi szczura od czasu dla jednorazowego podania dożołądkowego związku macierzystego w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie, n=5).

W tym przypadku podobnie jak po podaniu dożylnym najwyższe poziomy metabolitu obserwowano dla dawki związku macierzystego wynoszącej 6 mg/kg.

Oszacowano także dynamikę zmian metabolitu związku DL76 w narządach takich jak wątroba, nerki i płuca. Na ryc. 40 przedstawiono zależność ilości metabolitu w wątrobie, nerkach oraz płucach po upływie 60 min od podania związku DL76 dożylnie, natomiast na ryc. 41 analogiczną zależność po podaniu dożołądkowym.



Ryc. 40. Metabolit związku DL76 obserwowany w wątrobie, nerkach oraz płucach szczura po czasie 60 min od jednorazowego podania dożylnego związku macierzystego w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5).



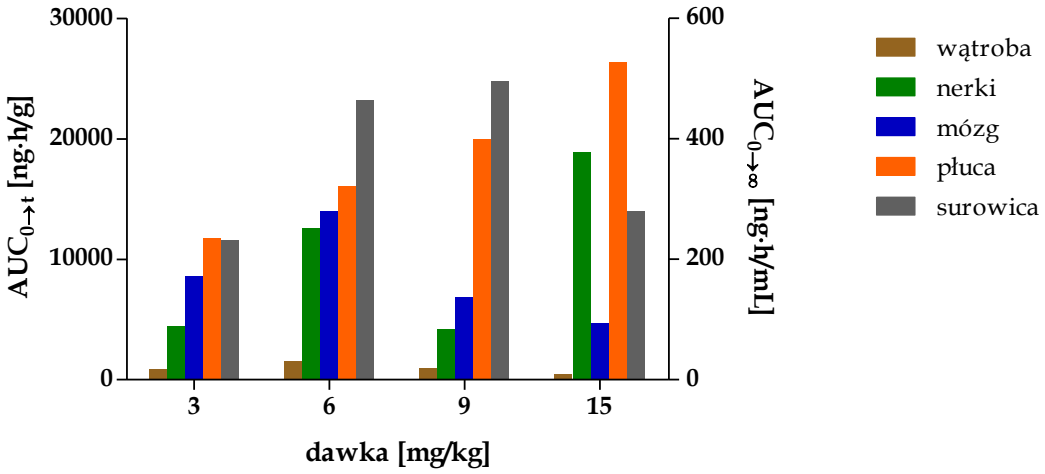
Ryc. 41. Metabolit związku DL76 obserwowany w wątrobie, nerkach oraz płucach szczura po czasie 60 min od jednorazowego podania dożołądkowego związku macierzystego w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5).

Zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym największe ilości metabolitu obserwowano w wątrobie po podaniu dawki 6 mg/kg. Ilości metabolitu zaobserwowane w wątrobie po podaniu tej dawki różniły się istotne statystycznie ($p<0.05$) od ilości zaobserwowanych po podaniu pozostałych dawek (3 lub 9 mg/kg). W nerkach i płucach obserwowana ilość metabolitu była niezależna od dawki i zarówno po podaniu dożylnym jak i dożołądkowym różnice nie były statystycznie istotne.

Nie stwierdzono obecności badanego metabolitu w mózgu, prawdopodobnie ze względu na jego kwasowy charakter i fakt, że w fizjologicznym pH występuje on w postaci zjonizowanej i nie jest w stanie pokonać bariery krew/mózg.

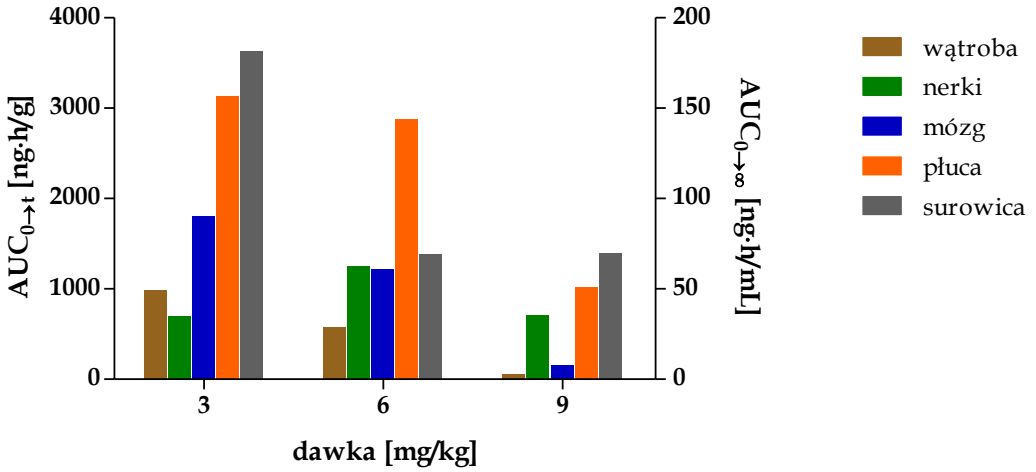
4.9. Porównanie dyspozycji badanego związku w wybranych tkankach szczura

Celem porównania procesu dyspozycji badanego związku w wybranych tkankach związanych z jego dystrybucją, eliminacją i miejscem działania na kolejnych rycinach przedstawiono zależności pola pod krzywą stężenie-czas od podanej dawki związku DL76.



Ryc. 42. Zależności pola pod krzywą stężenie-czas od dawki w surowicy (ng · h/mL) i badanych tkankach (ng · h/g tkanki) szczura dla DL76 po jego podaniu dożylnym.

Jak wynika z ryc. 42 do największej kumulacji związku DL76 po podaniu dożylnym dochodziło w płucach, gdzie w przeciwieństwie do innych badanych tkanek jego ilość rosła wraz ze wzrostem podawanej dawki i była to zależność liniowa (współczynnik determinacji wynosi 0.9944). W mózgu maksymalną ekspozycję na DL76 zaobserwowano po podaniu dawki 6 mg/kg, natomiast w nerkach po podaniu dawki 15 mg/kg. Ilości badanego związku w wątrobie były zbliżone niezależnie od podawanej dawki. Niewielka ilość DL76 w wątrobie w porównaniu z innymi tkankami może świadczyć o jego intensywnym metabolizmie w tym narządzie.



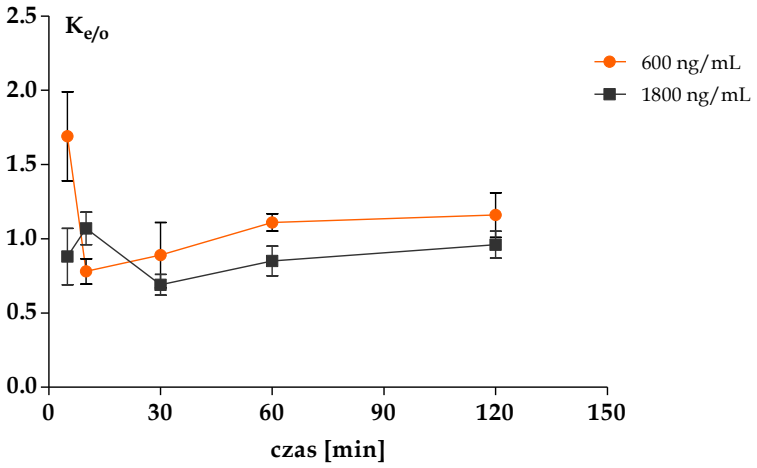
Ryc. 43. Zależności pola pod krzywą stężenie-czas od dawki w surowicy (ng · h/mL) i badanych tkankach (ng · h/g tkanki) szczura dla DL76 po jego podaniu dożołądkowym.

Dla podania dożołądkowego (ryc. 42), podobnie jak dla dożylnego, do największej kumulacji badanego związku dochodziło w płucach, jednakże ilość związku spadała wraz ze wzrostem dawki, co koresponduje ze spadkiem jego dostępności biologicznej. Podobnie dla mózgu i wątroby ilość badanego związku malała wraz ze wzrostem dawki. W przypadku nerek maksymalną ekspozycje na DL76 obserwowano dla dawki 6 mg/kg.

Z analizy stosunków $AUC_{tkanka}/AUC_{surowica}$ wynika, że po dożylnym podaniu związku DL76 najniższe wartości występowały w wątrobie, natomiast najwyższe w płucach niezależnie od podawanej dawki. Dla podania dożołądkowego dawką, dla której wartości w/w stosunków były największe we wszystkich badanych tkankach okazała się dawka 6 mg/kg.

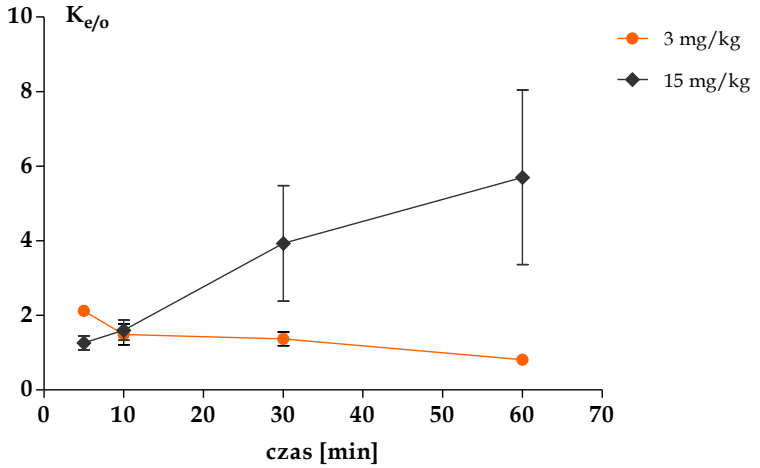
4.10. Dystrybucja związku DL76 do erytrocytów

Na ryc. 44 przedstawiono zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze ($K_{e/o}$) od czasu związku DL7. Badanie przeprowadzono dla dwóch stężeń 600 i 1800 ng/mL. Otrzymane wyniki wykazały, że współczynnik ten nie zależy od stężenia (różnice nieistotne statystycznie, $p<0.05$).



Ryc. 44. Zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze od czasu dla dwóch stężeń związku DL76 (wartości średnie ± SD, n=3).

Na ryc. 45 przedstawiono zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze od czasu badanego związku po jego dożylnym podaniu w dawkach 3 i 15 mg/kg m.c. W przeciwieństwie do badań *in vitro* w eksperymencie *in vivo* zaobserwowano wprost proporcjonalną zależność pomiędzy współczynnikiem podziału, a podawaną dawką.



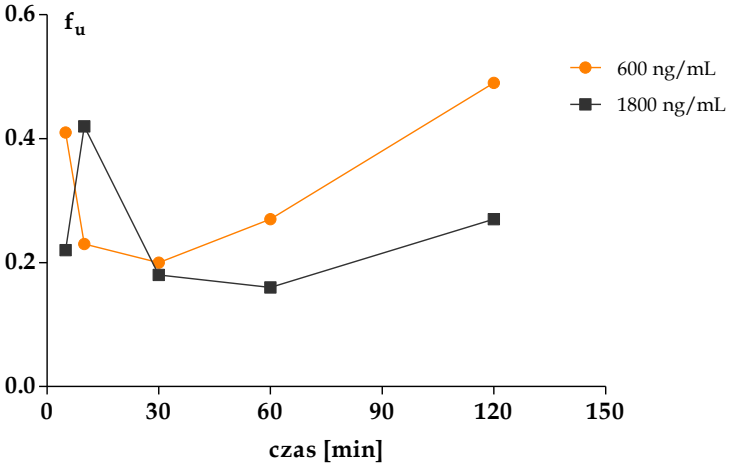
Ryc. 45. Zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze od czasu dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożylnej 3 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=3).

W tab. 33 zebrano średnie wartości współczynników podziału $K_{e/o}$ oraz $K_{e/b}$ wyznaczone eksperymentalnie w badaniach *in vivo* oraz obliczone z równania (5) zgodnie z teorią Hendelsona-Hasselbacha. W obliczeniach wykorzystano wartości wewnątrzkomórkowego pH przedstawione w publikacji, natomiast dane na temat pK_a badanego związku wyznaczono teoretycznie przy pomocy programu komputerowego Pallas [141].

Tab. 33. Przewidywane na podstawie kwasowo – zasadowej teorii podziału oraz otrzymane eksperymentalnie w badaniu *in vitro* średnie wartości współczynników podziału $K_{e/o}$ oraz $K_{e/b}$.

	$K_{e/b}$	$K_{e/o}$
przewidywane	1.40	2.01
otrzymane w badaniu *in vitro*	3.54	1.11

Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 33 wartości obliczone różniły się od tych otrzymanych ekperymentalnie. Różnice te wynikają prawdopodobnie z faktu, że kwasowo-zasadowa teoria podziału nie uwzględnia wiązania związku DL76 z białkami krwi lub erytrocytami, co może mieć wpływ na wartości współczynników podziału $K_{e/b}$ i $K_{e/o}$ wyznaczonych metodą *in vitro*.



Ryc. 46. Zależność wolnej frakcji (f_u) od czasu wyznaczona *in vitro* dla dwóch stężeń związku DL76 (wartości średnie, n=3).

Wyznaczono także na podstawie równania (6), w sposób pośredni, stopień wiązania badanego związku z białkami krwi. Jak wynika z danych przedstawionych w tab. 34 przy trzykrotnym wzroście stężenia zaobserwowano wzrost stopnia wiązania związku DL76 z białkami krwi (różnica istotna statystycznie, $p<0.05$).

Tab. 34. Średni procent wiązania związku DL76 z białkami krwi w zależności od stężenia obliczony na podstawie danych uzyskanych w eksperymencie *in vitro*.

Stężenie DL76 [ng/mL]	Średni procent wiązania z białkami
600	69
1800	82

5. DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania farmakokinetyczne są niezbędnym elementem badań przedklinicznych nowych związków, potencjalnych leków i w zależności od zachowania się związku w organizmie pod względem farmakokinetycznym można odpowiednio planować dalsze etapy jego rozwoju. Podstawowym warunkiem oceny farmakokinetyki nowego związku jest dostęp do odpowiedniej metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie jego stężeń w materiale biologicznym. Metody takie powinny być opracowywane zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych FDA (ang. Food and Drug Administration) lub EMEA (ang. European Medicines Agency), ponieważ odgrywają istotną rolę w zapewnieniu jakości badań farmakokinetycznych.

Badany w niniejszej pracy, związek DL76, jest nową substancją chemiczną, o stwierdzonym powinowactwie do receptorów histaminowych H_3, dlatego też w pierwszym etapie badań należało opracować metodę analityczną umożliwiającą jego ilościowe oznaczanie w złożonej matrycy biologicznej.

W opracowanej i zwalidowanej, w ramach niniejszej pracy, oryginalnej metodzie oznaczania w materiale biologicznym związku DL76 (1-[3-(4-tert-butylofenoksy) propylo]piperydyna) zastosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (LC/ESI-MS/MS). Technika ta stała się obecnie wiodącą w badaniach farmakokinetycznych ze względu na swoją selektywność w stosunku do oznaczanych związków oraz wysoką czułość [22, 28]. Należy ona do unikalnych metod analitycznych umożliwiających nie tylko oznaczenia ilościowe, ale stała się także podstawowym narzędziem stosowanym w poszukiwaniu nieznanych metabolitów [21, 22].

W związku z tym, że ostateczne wytyczne EMEA (agencja europejska) dotyczące walidacji metod analitycznych weszły w życie dopiero w lutym 2012 opracowaną metodę oznaczania DL76 poddano procesowi walidacji zgodnie z wytycznymi FDA (agencja amerykańska) przyjmując sposób postępowania oraz kryteria zawarte w opracowaniu „Guidance for industry, bioanalitical methods

validation"[193, 195]. Proces ten obejmował takie parametry jak: krzywa kalibracyjna/liniowość, precyzja powtarzalności (w jednym dniu) i precyzja pośrednia (w różnych dniach) oraz dokładność. Zbadano także różne typy stabilności (długoterminowa, krótkoterminowa, postpreparatywna w autosamplerze i podczas trzykrotnego zamrażania i rozmrażania) oraz wydajność ekstrakcji. Wymienione parametry zostały oszacowane dla wszystkich analizowanych matryc. Technika LC/MS/MS, dzięki możliwości skanowania jonów macierzystych i potomnych oraz stosowaniu trybu zbierania danych SRM, pozwala na uzyskanie wysokiej selektywności w stosunku do oznaczanego związku. W niniejszej pracy z zastosowaniem tej techniki oraz korzystając z danych tabelarycznych zawartych w dostępnych publikacjach charakteryzujących zmianę masy metabolitu w stosunku do masy związku macierzystego, jaka zachodzi w wyniku procesów biotransformacji zarówno I jak i II fazy, zidentyfikowano także główny metabolit związku DL76, jakim prawdopodobnie jest jego karboksylowa pochodna [164]. Dzięki unikatowym zaletom techniki LC/MS/MS takim jak możliwość identyfikacji związków, dla których brak jest dostępu do wzorca, lecz znana jest ich masa molowa, możliwe stało się monitorowanie dynamiki zmian (stosunek pola piku chromatograficznego pochodzącego od badanego związku do pola IS) metabolitu DL76 w czasie. W związku z brakiem wzorca metabolitu związku DL76 koniecznego do sporządzenia krzywych wzorcowych nie było możliwe oznaczenie jego bezwzględnych stężeń w badanych matrycach.

W opracowanej metodzie analitycznej zastosowano technikę ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz do octanu etylu. Dzięki wysokiej czułości zastosowanego sposobu detekcji możliwe było wykorzystanie niewielkiej ilości matrycy (100 µL). Badany związek rozdzielano na kolumnie chromatograficznej, a następnie oznaczano ilościowo po wcześniejszej jonizacji w źródle jonów. Rozdział prowadzono w warunkach gradientu fazy (acetonitryl/woda), przy szybkości przepływu 300 µL/min, a jako rodzaj jonizacji zastosowano elektrorozpylanie (ESI). W celu zwiększenia jonizacji oznaczanego związku do fazy ruchomej dodawano kwas mrówkowy. Opracowana metoda cechowała się zadawalającą

precyzją i dokładnością we wszystkich badanych matrycach. Wykazano liniowość krzywych wzorcowych dla badanego związku w zakresie od 1 do 2000 ng/mL, a LLOQ we wszystkich matrycach wynosił 1 ng/mL. Wydajność ekstrakcji związku DL76 z surowicy krwi szczura wynosiła 66.6 ±9.5 %.

Badanie stabilności krótkoterminowej oznaczanego związku w analizowanych matrycach wykonywano w warunkach charakterystycznych dla przygotowywania próbek do analizy (25°C, 2h). Otrzymane wyniki wykazały zadowalającą trwałość (zmiany nie przekraczały 15%). Również na podstawie wyników badań pozostałych rodzajów stabilności związek został uznany za stabilny we wszystkich badanych matrycach. Podczas przechowywania związku DL76 w matrycy w czasie 2 miesięcy w temperaturze -30°C także nie zaobserwowano znaczących zmian stężenia.

Parametrem charakterystycznym dla walidacji metod z zastosowaniem detekcji masowej jest znormalizowany względny efekt matrycy. W opracowanej w niniejszej pracy metodzie nie stwierdzono jego występowania w żadnej z badanych matryc w stopniu mogącym mieć wpływ na dokładność oznaczeń.

Ocenę farmakokinetyki badanego związku przeprowadzono na podstawie analizy stężeń w surowicy krwi i wybranych tkankach szczurów po jednorazowym podaniu dożylnym w czterech różnych dawkach 3, 6, 9 i 15 mg/kg oraz podaniu dożołądkowym w trzech różnych dawkach 3, 6 i 9 mg/kg. Równolegle do analizy stężenia badanego związku monitorowano także dynamikę zmian jego karboksylowej pochodnej zidentyfikowanej techniką LC/MS/MS, jako potencjalny metabolit. Wielkość stosowanych dawek korespondowała z wynikami badań farmakodynamicznych. Dawkę początkową ustalono na podstawie ED_{50} wyznaczonej dla badanego związku, która wynosi 2.8±0.4 mg/kg p.o., natomiast dawki kolejne stanowiły jej wielokrotność [190].

Ponieważ w zależności od podawanej dawki najlepszy stopień dopasowanie (na podstawie Akaike Infirmation Criterion, AIC) uzyskano, albo dla otwartego modelu dwukompartmentowego (dawki niższe 3 i 6 mg/kg), albo dla otwartego modelu trójkompartmentowego (dawki wyższe 9 i 15 mg/kg) w celu ujednolicenia wyników badań i umożliwienia ich kompleksowej

interpretacji obliczenia podstawowych parametrów farmakokinetycznych prowadzono techniką bezmodelową. Zależny od dawki charakter eliminacji związku, dwufazowy dla dawek niższych i trójfazowy dla wyższych, podobny jak w przypadku DL76, jest charakterystyczny dla niektórych antybiotyków antracyklinowych np. doksorubicyny i może być rezultatem występowania pozytywnej kooperacji w procesie wiązania tego leku z kardiomiocytami [196, 197, 198]. Wynikiem występowania dwóch miejsc wiążących, jednego o dużym powinowactwie i małej pojemności oraz drugiego o większym powinowactwie (efekt pozytywnej kooperacji) i dużej pojemności, jest dwufazowy proces uwalniania się doksorubcyny z kardiomiocytów [198].

Wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań wykazały, że związek DL76 charakteryzuje się nieliniową farmakokinetyką w zakresie zastosowanych dawek. Duża wartość objętości dystrybucji ok. 30 L/kg przy dawkach 6-15 mg/kg, może świadczyć o intensywnej dystrybucji badanego związku i jego wiązaniu ze strukturami tkankowymi. Wzrost objętości dystrybucji z 16 L/kg dla dawki 3 mg/kg do 35 L/kg dla dawki 9 mg/kg może sugerować, że wiązanie to jest zależne od dawki. Wysoka wartość klirensu całkowitego (średnio 10 L/h/kg dla dawek 3-9 mg/kg), znacznie przewyższająca szybkość przepływu krwi przez wątrobę (ok. 3.48 L/h/kg) może być natomiast wynikiem pozawątrobowego procesu metabolizmu związku DL76 oraz potwierdzonego w niniejszych badaniach znacznego wychwytu tego związku do erytrocytów. Potwierdza to także fakt szybkiego pojawienia się metabolitu DL76 w surowicy krwi po podaniu dożylnym.

Znanych jest wiele przyczyn występowania nieliniowości w farmakokinetyce na różnym etapie procesów ADME. Nieliniowość może dotyczyć zarówno wchłaniania, jak i dystrybucji lub eliminacji. Jedną z możliwych przyczyn występowania tego zjawiska jest wpływ transporterów błonowych na farmakokinetykę danego związku. Największe znaczenie spośród znanych białek transportowych ma P-glikoproteina. Zbliżona strukturalnie do związku DL76 terfenadyna jest substratem tego transportera, w związku z czym w niniejszej pracy podjęto próbę zbadania wpływu P-glikoproteiny na farmakokinetykę

związku DL76 [199, 200]. Badania przeprowadzono dla dawki 6 mg/kg podawanej dożylnie lub dożołądkowo po wcześniejszym podaniu werapamilu, będącego inhibitorem P-gp. W przypadku podania dożylnego AUC wzrosło o ok. 20%, natomiast dla podania dożołądkowego wzrost był prawie czterokrotny (81.74 vs 346.83 ng· h/g). Zaobserwowano również znaczny spadek (średnio o 90%) ilości metabolitu w surowicy krwi, a ponieważ werapamil jest inhibitorem nie tylko P-gp, ale również CYP3A4 może to świadczyć o tym, że biotransformacja związku DL76 do jego karboksylowej pochodnej zachodzi właśnie za pośrednictwem tego izoenzymu [201]. Wzrost AUC po podaniu dożołądkowym w obecności werapamilu może sugerować, że wchłanianie DL76 jest zależne od P-gp, jednakże interpretację wyników komplikuje fakt, że werapamil hamuje także metabolizm badanego związku. Wzrost AUC zarówno po podaniu dożołądkowym, jak i dożylnym może natomiast świadczyć o tym, że P-gp ma wpływ nie tylko na proces wchłaniania, ale także na dyspozycję związku DL76. Biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku, zbliżonej strykturalnie do związku DL76, terfenadyny zarówno ona sama jak i jej karboksylowa pochodna (analogiczny metabolit zaobserwowano dla DL76) są substratami P-gp zależność pomiędzy aktywnością P-gp i CYP3A4 oraz ich wpływ na farmakokinetykę związku DL76 może być bardzo złożony [199, 202].

Przypuszczalną przyczyną nieliniowości farmakokinetyki badanego związku może być zmiana szybkości eliminacji wraz ze wzrostem podawanej dawki [203]. Jedną z możliwych przyczyn występowania tego zjawiska może być nieliniowy charakter procesu wiązania z białkami lub elementami morfotycznymi krwi [177, 178, 179]. Ma to szczególne znaczenie dla leków charakteryzujących się niskim współczynnikiem ekstrakcji, dla których klirens jest wprost proporcjonalny do stężenia wolnej frakcji [204]. W niniejszej pracy zbadano zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze w zależności od dawki badanego związku. W badaniach *in vivo* zaobserwowano, że po ustaleniu się równowagi dystrybucyjnej współczynnik ten jest prawie trzykrotnie wyższy dla wyższej dawki, czyli wraz z jej wzrostem nieproporcjonalnie więcej związku przechodzi do erytrocytów i wiąże z ich strukturami takimi jak błona erytrocytarna,

hemoglobina lub anhydraza węglanowa. Ponieważ parametry farmakokinetyczne były liczone na podstawie stężeń oznaczanych w surowicy, a nie w pełnej krwi zjawisko to potencjalnie mogło mieć wpływ na wystąpienie nieliniowości. O wiązaniu się związku DL76 z erytrocytami świadczą także wyniki badania przeprowadzonego *in vitro*. Współczynnik podziału erytrocyty/bufor wyznaczony w tym eksperymencie był ponad dwa razy wyższy (1.4 vs 3.54) niż obliczony teoretycznie na podstawie kwasowo-zasadowej teorii podziału. Wyznaczony w eksperymencie *in vitro* współczynnik podziału erytrocyty/osocze wynosił natomiast ok. 1 niezależnie od ilości dodawanego związku DL76. Różnice pomiędzy wynikami eksperymentów *in vivo* i *in vitro* mogą wynikać z faktu, że o ostatecznym stopniu wiązania badanej substancji z erytrocytami decyduje szereg czynników fizjologicznych np. obecność kofaktorów, których występowania nie odzwierciedlają w pełni warunki *in vitro*. Podobnie jak wiązanie z białkami, wiązanie z erytrocytami oraz innymi elementami morfotycznymi krwi (płytki krwi, leukocyty), może mieć charakter nieliniowy, co będzie miało wpływ na dystrybucję badanego związku w organizmie [179, 205]. W przypadku związku DL76 wyznaczony w sposób pośredni metodą *in vitro* procent wiązania związku DL76 z białkami krwi okazał się być zależnym od stężenia.

Dostępność biologiczna związku zależy od szeregu czynników, a jednym z nich są właściwości fizykochemiczne substancji. Dla związku DL76 korzystając z programu komputerowego wyznaczono wartości pK_a, TPSA i logD, a także obliczono liczbę miejsc zarówno o donorowym jak i akceptorowym charakterze wiązań wodorowych. Na podstawie tych danych oraz masy cząsteczkowej badanej substancji korzystając z „reguły pięciu„ Lipińskiego można *in silico* przewidzieć czy substancja będzie się dobrze wchłaniać po podaniu doustnym. Zgodnie z przeprowadzonymi obliczeniami związek DL76 powinien wykazywać dostępność biologiczną w granicach 80-90% [102]. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano jednak znaczną zależność dostępności biologicznej badanego związku od podawanej dawki, która dla 3 mg/kg wynosiła ok. 61%, natomiast dla dawek wyższych 6 i 9 mg/kg spadała do ok. 9%. Niezgodność

między wynikami *in silico* i rezultatem eksperymentu *in vitro* można objaśnić między innymi tym, że reguła Lipińskiego jest prawdziwa jedynie dla związków, które przechodzą przez błony biologiczne wyłącznie na drodze dyfuzji biernej. Drugą przyczyną rozbieżności może być fakt, że związek podawany jest w postaci soli szczawianowej, natomiast obliczenia *in silico* prowadzone były dla wolnej zasady. Zależną od dawki biodostępność można zaobserwować np. dla niektórych leków przeciwpadaczkowych takich jak gabapentyna (wysycenie mechanizmu transportu), czy karbamazepina (słaba rozpuszczalność) [206, 207]. W niniejszej pracy zbadano rozpuszczalność szczawianu związku DL76 w różnych warunkach pH i temperatury. Najwyższą rozpuszczalność zaobserwowano dla pH wynoszącego 4.6, natomiast najniższą dla pH 1.2. Zgodnie z oczekiwaniami wraz ze wzrostem temperatury rozpuszczalność soli rosła, przy czym wpływ temperatury na rozpuszczalność był największy dla pH 4.6. Najniższa rozpuszczalność badanego związku w pH charakterystycznym dla soku żołądkowego może przypuszczalnie mieć wpływ na zmniejszenie się dostępności biologicznej DL76 wraz ze wzrostem dawki podawanej dożołądkowo. Związek podawany był, jako roztwór w wodzie do injekcji o neutralnym pH, przy zmianie środowiska na kwaśne mogło następować jego wytrącanie się w postaci osadu.

W niniejszej pracy badano także dystrybucję związku DL76 do narządów związanych z eliminacją takich jak wątroba i nerki, dystrybucją – płuca oraz do miejsca jego działania, czyli mózgu. Analiza stężeń DL76 w wybranych tkankach szczura wykazała zgodnie z oczekiwaniami na podstawie dużej objętości dystrybucji tego związku znaczącą dystrybucję. Największą ekspozycję na DL76 obserwowano w płucach, natomiast najmniejszą w wątrobie. Taki typ dystrybucji może być uwarunkowany z jednej strony zróżnicowanym przepływem krwi przez tkanki, a z drugiej udziałem różnych mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces. W przypadku leków o charakterze zasadowym istotną rolę w dystrybucji może odgrywać ich niespecyficzne wiązanie z fosfolipidami błon komórkowych oraz lizosomotropizm. Tkanki bogate w lizosomy tworzą wewnątrzkomórkowy subkompartment o charakterze kwaśnym. Ich kwaśne środowisko stanowi pułapkę dla leków zasadowych sprzyjając wskutek dysoscjacji ich

wewnątrzkomórkowej kumulacji [208]. W badaniach szczególną uwagę poświęcono ocenie dyspozycji badanego związku do poszczególnych struktur mózgu. Oznaczano stężenia związku DL76 w strukturach szczególnie bogatych w receptory histaminowe H_3 takich jak kora mózgowa, hipokamp oraz prążkowie. Różnice w ilości DL76 w w/w strukturach okazały się nieistotne statystycznie.

Korzystając z unikalnych możliwości, jakie zapewnia spektrometria mas wytypowano także, w niniejszej pracy, główny metabolit DL76, jakim prawdopodobnie jest jego karboksylowa pochodna. Podobny charakter ma feksofenadyna, metabolit zbliżonej strukturalnie do związku DL76 terfenadyny [202]. Dzięki zastosowaniu odpowiedniej metody analitycznej możliwa była nie tylko analiza ilościowa badanego związku, ale także monitorowanie dynamiki zmian głównego metabolitu związku DL76. Otrzymane wyniki wskazują na występowanie pozawątrobowego metabolizmu DL76, o czym świadczy szybkie i w znacznej ilości pojawienie się metabolitu po podaniu dożylnym leku macierzystego oraz wysoka wartość klirensu całkowitego, kilkakrotnie przewyższająca szybkość przepływu krwi przez wątrobę. Największe ilości metabolitu obserwowano zarówno w surowicy, jak i wątrobie po podaniu dawki 6 mg/kg niezależnie od drogi podania, natomiast w najmniejszej ilości metabolit występował w płucach i jedynie w tej tkance ilość związku macierzystego rosła proporcjonalnie do podawanej dożylnie dawki. Zależność pomiędzy aktywnością białka transportowego P-gp, a ilością powstającego metabolitu może być bardzo złożona, jedni autorzy uważają, że wzrost aktywności P-gp powoduje jednocześnie wzrost metabolizmu danego związku, natomiast inni sugerują, że zachodzi zjawisko odwrotne ze względu na występowanie konkurencji o substrat, chyba, że metabolizm ma charakter nieliniowy [209].

Na podstwie wykonanych dotychczas badań można stwierdzić, że farmakokinetyka związku DL76 jest nieliniowa w zakresie podawanych w przeprowadzanych eksperymentach dawek. Jedną z możliwych przyczyn nieliniowości może być zależny od dawki charakter wiązania badanego związku z białkami krwi, erytrocytami lub tkankami. Wyjaśnienie tego procesu wymaga jednakże dodatkowych badań.

6. WNIOSKI

- Opracowana i zwalidowana oryginalna metoda oznaczania związku DL76 z zastosowaniem techniki LC/MS/MS spełnia kryteria walidacji dotyczące oznaczania substancji w złożonej matrycy biologicznej, oraz umożliwia monitorowanie dynamiki zmian poziomu metabolitu tego związku.
- Parametry farmakokinetyczne związku DL76 zmieniają się wraz z dawką, co świadczy o nieliniowości jego farmakokinetyki u szczurów w zakresie badanych dawek.
- W dyspozycji związku DL76, szczególnie w procesie wchłaniania i dystrybucji, istotna rolę może odgrywać P-glikoproteina.
- Głównym izoenzymem zaangażowanym w metabolizm badanego związku i odpowiedzialnym za powstawanie jego karboksylowej pochodnej prawdopodobnie jest CYP3A4.
- Ocena procesu dystrybucji związku DL76 wymaga uwzględnienia erytrocytów, które mogą stanowić odrębny kompartment.
- Związek DL76 wykazuje zmienną dostępność biologiczną, która drastycznie spada wraz ze wzrostem podawanej dawki.
- Przewidywane *in silico* wartości dostępności biologicznej znalazły potwierdzenie *in viv*o jedynie dla niskiej dawki (3 mg/kg).

7. STRESZCZENIE

Badania farmakokinetyczne stanowią integralną część badań przedklinicznych nowych związków, potencjalnych leków. Oszacowanie profilu farmakokinetycznego umożliwia szybszą selekcję związków, kandydatów na lek, rokujących dalszy rozwój, co z kolei powoduje redukcję kosztów i oszczędność czasu przeznaczonych na dalsze badania. W zależności od zachowania się związku w organizmie pod względem farmakokinetycznym można odpowiednio planować dalsze etapy jego rozwoju.

Związek DL76 jest przykładem nieimidazolowych antagonistów receptora histaminowego H_3. Związki będące antagonistami tego receptora mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii zaburzeń pamięciowo-poznawczych (choroba Alzheimera, otępienie, ADHD), snu i czuwania (narkolepsja), schizofrenii, otyłości oraz bólu neuropatycznego.

Celem przeprowadzonych i opisanych w niniejszej pracy badań była ocena właściwości farmakokinetycznych DL76 oraz weryfikacja jego dostępności biologicznej przewidzianej *in silico*, na podstawie fizykochemicznej charakterystyki tego związku, z wynikami badania ADME prowadzonego w warunkach *in vivo*.

W pierwszym etapie badań opracowano i zwalidowano oryginalną metodę analityczną, pozwalającą nie tylko na analizę stężeń badanego związku w różnych matrycach biologicznych takich jak surowica krwi i homogenaty tkanek (wątroba, płuca, nerki, mózg), ale także na ocenę dynamiki zmian ilości metabolitu związku DL76 w czasie. Badania analityczne wykonano korzystając z chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas (LC/MS/MS – Agilent Technologies, AB SCIEX).

W kolejnym etapie przeprowadzono analizę stężeń związku DL76 w organizmie szczura po jego jednorazowym podaniu dożylnym (3, 6, 9 lub 15 mg/kg) lub dożołądkowym (3, 6 lub 9 mg/kg). Na podstawie uzyskanych danych przeprowadzono ocenę liniowości farmakokinetyki związku DL76. Następnie korzystając z techniki bezmodelowej wyznaczono podstawowe

parametry farmakokinetyczne badanego związku w poszczególnych matrycach biologicznych. Przeprowadzono także badania mające na celu oszacowanie potencjalnego wpływu białka transportowego, P-glikoproteiny, na dystrybucję związku DL76, ocenę dynamiki zmian ilości metabolitu tego związku w surowicy i homogenatach tkanek, a także analizę w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* dystrybucji DL76 do erytrocytów, jako kompartmentu farmakokinetycznego.

W badaniach wykazano, że parametry farmakokinetyczne związku DL76 zmieniają się wraz z dawką, co świadczy o nieliniowości jego farmakokinetyki u szczurów w zakresie badanych dawek. Dystrybucja badanego związku w tkankach była znaczna i nierównomierna, największą ekspozycję na DL76 obserwowano w płucach, natomiast najmniejszą w wątrobie, co może świadczyć o jego intensywnym metabolizmie w tym narządzie. Ponadto ocena procesu dystrybucji związku DL76 wymaga również uwzględnienia erytrocytów, które mogą stanowić odrębny kompartment. Na podstawie przeprowadzonych badań można również przypuszczać, że w dyspozycji związku DL76, szczególnie w procesie wchłaniania i dystrybucji, znaczącą rolę odgrywa P-glikoproteina. W przeprowadzonych badaniach wykazano także, że głównym izoenzymem zaangażowanym w metabolizm badanego związku i odpowiedzialnym za powstawanie jego karboksylowej pochodnej prawdopodobnie jest CYP3A4.

Związek DL76 wykazuje zmienną dostępność biologiczną, która drastycznie spada wraz ze wzrostem podawanej dawki, a przewidywane *in silico* wartości dostępności biologicznej znalazły potwierdzenie *in viv*o jedynie dla dawki 3 mg/kg.

Pharmacokinetic studies constitute an integral part of preclinical evaluation of new compounds, potential drugs. Determination of pharmacokinetic profile enables faster selection of compounds, drug candidates, for further development which considerably reduces time and money necessary for this kind of research. Depending on the pharmacokinetic behavior of the compound its future development can be planned.

Compound DL76 is an example of nonimidazole H_3 receptor antagonists. Selective antagonists of this receptor may be potentially useful in the treatment of some neuropsychiatric diseases such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), Alzheimer disease, dementia, schizophrenia and also sleeping disorders (narcolepsy), obesity and neuropathic pain.

The aim of the presented study was to determine the pharmacokinetic properties of DL76 and also to compare the values of bioavailability of this compound predicted *in silico,* based on its physicochemical characteristics, with the ones calculated from the *in vivo* experiment.

In order to achieve this aim the original analytical method was developed and validated using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS – Agilent Technologies, AB SCIEX). This method enabled not only to quantify DL76 in complex biological matrices, such as blood serum and tissue homogenates (liver, lungs, kidneys, brain), but also to determine the changes of its main metabolite.

In the next step the concentrations of DL76 in rat's serum and tissues homogenates were determined after its intravenous administration in the doses of 3, 6, 9 and 15 mg/kg or intragastric administration in the doses of 3, 6 and 9 mg/kg. Based on these data the linearity of pharmacokinetic processes was evaluated. Than using a non-compartmental analysis the pharmacokinetic parameters were calculated in all investigated matrices. There were also studies conducted estimating the potential influence of the transporting protein, P-glycoprotein, on the disposition of DL76 and the relationship between the presence of the main metabolite of investigated compound in different tissues and

administered dose of the parent substance. The distribution of the DL76 to erythrocytes, as a potential pharmacokinetic compartment was also evaluated.

The results showed that pharmacokinetics of DL76 has a non-linear character in rats, and pharmacokinetic parameters change with the administered dose. The distribution of DL76 was significant and uneven, the highest exposition on the investigated compound could be observed in lungs and the lowest in liver, what may indicate its intensive metabolism in this organ. In evaluation of total distribution of DL76 erythrocytes should be taken into account since they may constitute a separate pharmacokinetic compartment. Based on the conducted studies it can also be assumed that the P-glycoprotein plays an important role in the disposition, mainly in adsorption and distribution, of DL76. The obtained results may also indicate that the main isoenzyme responsible for metabolism and production of carboxylic derivative of DL76 is CYP3A4. The investigated compound shows variable bioavailability, which was descending with the increasing dose, and the predicted *in silico* values were in agreement with the ones calculated based on the *in vivo* experiment only for the dose of 3 mg/kg.

6. PIŚMIENNICTWO

1. Panchagnula R, Thomas NS.: *Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research.* International Journal of Pharmaceutics, 2000; 201:131-150

2. Cheng A, Diller DJ, Dixon SL, Egan WJ, Lauri G, Merz KM.: *Computation of the physio-chemical properties and data mining of large molecular collections*. Journal of Computational Chemistry, 2002; 23(1):172-183

3. Frank R, Hargreaves R.: *Clinical biomarkers in drug discovery and development.* Nature Reviews Drug Discovery, 2003; 2(7):566-80

4. Lin J, Sahakian D. C, de Morais SMF, Xu JJ, Polzer RJ, Winter SM..: *The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery.* Current Topics in Medical Chemistry, 2003; 3:1125-1154

5. Grass GM, Sinko PJ: *Physiologically-Based Pharmacokinetic Simulation Modeling.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2002; 54:433-451

6. Mehvar R.: *Role of protein binding in pharmacokinetics.* American Journal of Pharmaceutical Education, 2005; 69 (5): Artykuł 103

7. Messeguer A, Cortés N.: *Combinatorial chemistry in cancer research.* Clinical and Translational Oncology, 2007; 9(2):83 - 92

8. Watanabe T, Schulz D, Morisseau C, Hammock BD.: *High-throughput pharmacokinetic method: Cassette dosing in mice associated with minuscule serial bleedings and LC/MS/MS analysis.* Analytica Chimica Acta, 2006; 559(1): 37–44

9. Bueters T, Dahlström J, Kvalvågnaes K, Betnér I, Briem S.*: High-throughput analysis of standardized pharmacokinetic studies in the rat using sample pooling and UPLC-MS/MS.* Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011; 55(5):1120-6

10. Rakesh N, Nord M, Mcatee JJ, Jolivette LJ.: *Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: Comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011; 100(9):3862–3874

11. Cox KA, Dunn-Meynell K, Korfmacher WA, Broske L, Nomeir AA, Lin C, Cayen MN, Barr WH.: *Novel in vivo procedure for rapid pharmacokinetic screening of discovery compounds in rats*. Drug Discovery Today, 1999; 4:232-237

12. Mathew BS, Fleming DH, Prasanna S, Basu G, Chandy SJ, John GT.: *Mycophenolic acid estimation by pooled sampling: a novel strategy*. Therapeutic Drug Monitoring, 2010; 32(2):141-4

13. Singh RP, Sabarinath S, Singh SK, Gupta RC.: *A sensitive and selective liquid chromatographic tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantification of novel trioxane antimalarials in different biomatrices using sample-pooling approach for high throughput pharmacokinetic studies.* Journal of Chromatography B Analytical Technology and Biomedical Life Science, 2008; 864(1-2):52-60

14. Ward KW, Smith BR.: *A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog and monkey to humans.* Drug Metabolism and Disposition, 2004; 32 (6):603-611

15. Caldwell GW, Masucci JA, Yan Z, Hageman W.: *Allometric scaling of pharmacokinetic parameters in drug discovery: Can human CL, V_{ss} and $t_{1/2}$ be predicted from in-vivo rat data?* European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2004; 29(2):133 - 143

16. Mahmood I.: *Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2007; 59(11):1177-1192

17. Gilibili RR, Mullangi R, Srinivas NR.: *Intravenous prediction of human pharmacokinetic parameters for ketorolac, a non-steroidal anti-inflammatory agent, using allometry approach.* European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2011; 36(2):87 - 93

18. Hop CE.: *Use of nano-electrospray for metabolite identification and quantitative absorption, distribution, metabolism and excretion studies.* Current Drug Metabolism, 2006; 7(5):557-63

19. King R, Fernandez-Metzler C.: *The use of Qtrap technology in drug metabolism.* Current Drug Metabolism, 2006; 7:541-545

20. Sanders M, Shipkova PA, Zhang H, Warrack BM.: *Utility of the hybrid LTQ-FTMS for drug metabolism application.* Current Drug Metabolism, 2006; 7:547-555

21. Tolonen A, Turpeinen M, Pelkonen O.: *Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening.* Drug Discovery Today, 2009, 14(3/4):120-133

22. Hsieh Y, Korfmacher W.: *Increasing speed and throughput when using HPLC-MS/MS systems for drug metabolism and pharmacokinetic screening.* Current Drug Metabolism, 2006; 7:479-489

23. Pi N, Armstrong JI, Bertozzi CR, Leary JA.: *Kinetic analysis of NodST sulfotransferase using an electrospray ionization mass spectrometry assay.* Biochemistry, 2002; 41(44):13283-8

24. Ge X, Sirich TL, Beyer MK, Desaire H, Leary JA.: *A strategy for the determination of enzyme kinetics using electrospray ionization with an ion trap mass spectrometer.* Analytical Chemistry, 2001; 73(21):5078-82

25. Norris AJ, Whitelegge JP, Faull KF, Toyokuni T.: *Kinetic characterization of enzyme inhibitors using electrospray-ionization mass spectrometry coupled with multiple reaction monitoring.* Analytical Chemistry, 2001; 73(24):6024-9

26. Ackermann B, Hale JE, Duffin KL.: *The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement.* Current Drug Metabolism, 2006; 7:525-539

27. Caldwell RL, Capriolo RM.: *Tissue profiling by mass spectrometry.* Molecular & Cellular Proteomics, 2005; 4(4):394-401

28. Chu I.: *Utility of Mass Spectrometry for In-Vitro ADME Assays.* Current Drug Metabolism, 2006; 7:467-477.

29. Bokman F.: *Analytical aspects of Atmospheric Pressure Ionisation in Mass Spectrometry.* Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology. Uppsala, 2002

30. http://www.chm.bris.ac.uk/ms/mshome.html

31. Chen J, Korfmacher WA, Hsieh Y.: *Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoizomeric pharmaceutical determinations.* Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005; 820:1-8

32. Mei H, Hsieh Y, Nardo C, Xu X, Wang S, Ng K, Korfmacher WA.: *Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003: 17(1):97-103

33. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR.: *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses.* Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007; 852(1-2):22-34

34. Kloepfer A, Quintana JB, Reemtsma T.: *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples.* Journal of Chromatography A, 2005; 1067(1-2):153-60

35. Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM.: *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid.* Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2003; 14(11):1290-4

36. Taylor PJ.: *Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.* Clinical Biochemistry, 2005; 38(4):328-34

37. Yeh AP, McMillan A, Stowell MH.: *Rapid and simple protein-stability screens: application to membrane proteins. Acta Crystallographica.* Section *D*. Biological Crystallography, 2006; 62:451-457

38. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K.: *Pharmacogenetics of drug transporters and its impast on pharmacotherapy.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2004; 4:1385-1398

39. Petzinger E, Geyer J.: *Drug transporters in pharmacokinetics.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2006; 372:465-475

40. *Preclinical Development Handbook ADME and Biopharmaceutical properties*, edited by Shayne Cox Gad, Wiley-Intersciencs, A John Wiley&Sons, Inc., 2008

41. Augustijns PF.: *Uptake and transport characteristics of chloroquine in an in-vitro cell culture system of the intestinal mucosa, Caco-2*. Journal of Pharmaceutics and Pharmacology, 1996; 48(3):277-80

42. Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA.: *The ABCs of solute carriers: physiological, pathological, and therapeutic implications of human membrane transporter proteins.* Pfluegers Arch European Journal of Physiology, 2004; 447:465-468

43. Alonso GL, González DA.: *In Silico Kinetic Study of the Glucose Transporter* Journal of Biological Physics, 2007; 33(5-6):485 - 498

44. Hagenbuch B, Meier PJ.: *The superfamily of organic anion transporting polypeptides.* Biochymical and Biophysical Acta, 2003; 1609:1-18

45. Yarim M, Moro S, Huber R, Meier PJ, Kaseda C, Kashima T, Hagenbuch B, Folkers G.: *Application of QSAR analysis to organic anion polypeptide 1a5 (Oatp 1a5) substrates.* Bioorganisc and Medicinal Chemistry, 2005: 13:463-471

46. Chandra P, Brouwer KL.: *The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts.* Pharmacological Research, 2004; 21:719-735

47. Koepsell H, Endou H.: *The SLC22 drug transporter family.* European Journal of Physiology, 2004; 447:666-676

48. Sai Y, Tsuji A.: *Transport-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches.* Drug Discovery Today, 2004; 9(16):712-720

49. Groneberg DA, Nickolaus M, Springer J, Doring F, Daniel F, Fischer A.: *Localisation of the peptide transporter PepT2 in the lung: implications for*

pulmonary oligopeptide uptake. American Journal of Pathology, 2001; 158:707-714

50. Teuscher NS, Novotny A, Keep RF, Smith DE.: *Functional evidence for presence of PepT2 in rat choroid plexus: studies with glycylsarcoside.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000; 294:494-499

51. Ganapathy ME, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V, Leibach FH.: *Differential recognition of beta -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2.* Journal of Biological Chemistry, 1995; 270(43):25672-7

52. Zhu T, Chen XZ, Steel A, Hediger MA, Smith DE.: *Differential recognition of ACE inhibitors in Xenopus laevis oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2.* Pharmaceutical Research, 2000; 17(5):526-32

53. Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH.: *Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998; 246(2):470-5

54. Döring F, Walter J, Will J, Föcking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H.: *Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications.* The Journal of Clinical Investigation, 1998; 101(12):2761-7

55. Chan LM, Lowes S, Hirst BH.: *The ABCs of drug transport in intestine and liver: Efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004; 21:25-51

56. Juliano RL, Ling V.: *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.* Biochimical and Biophysical Acta, 1976; 455:152-162

57. Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RPJ.: *ABC or oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. Gut, 2003; 52:1788-1795

58. Moerman L, Wyffels L, Slaets D, Raedt R, Boon P, De Vos F.: *Antiepileptic drugs modulate P-glycoproteins in the brain: A mice study with ^{11}C-desmethylloperamide.* Epilepsy Research, 2011; 94(1-2):18-25

59. Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W.: *Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein*. Neuropharmacology, 2008; 55(8):1364-1375

60. Lagas JS, Fan L, Wagenaar E, Vlaming ML, van Tellingen O, Beijnen JH, Schinkel AH.: *P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide.* Clinical Cancer Research, 2010; 16(1):130-40

61. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, et al. *The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin.* Journal of Clinical Investigations, 1999; 104:147—153

62. Lin JH, Yamazaki M.: *Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications.* Clinical Pharmacokinetics, 2003; 42(1):59-98

63. Piao YJ, Li X, Choi JS.: *Effects of werapamil on etoposide pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats.* European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2008; 33(3):159 - 164

64. Perloff M, Störmer E, von Moltke LL, Greenblatt DJ.: *Rapid Assessment of P-Glycoprotein Inhibition and Induction in Vitro.* Pharmaceutical Research, 2003; 20(8):1177 - 1183

65. Masereew R, Russel F.: *Screening for the role of transporters in hepatic and renal drug handling.* Drug Discovery Today: Technologies, 2004; 1(4):357-364

66. Kusuhara H, Sugiyama Y.: *Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney.* Journal of Controlled Release, 2002; 78:43-54

67. Mizuno N, Niwa T, Yoshihisa Yotsumoto Y, Sugiyama Y.: *Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development*. Pharmacological Reviews, 2003; 55:425-461

68. Ganapathy ME, Prasad PD, Mackenzie B, Ganapathy V, Leibach FH.: *Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT 1 and PEPT 2.* Biochimica et Biophysica Acta, 1997; 1324(2):296-308

69. Malingré MM, Beijnen JH, Schellens JH.: *Oral delivery of taxanes.* Investigational New Drugs, 2001; 19(2):155-62

70. Malingré MM, Ten Bokkel Huinink WW, Mackay M, Schellens JH, Beijnen JH.: *Pharmacokinetics of oral cyclosporin A when co-administered to enhance the absorption of orally administered docetaxel.* European Journal of Clinical Pharmacology, 2001; 57(4):305-7

71. Chiou WL, Wu TC, Ma C, Jeong HY.: *Enhanced oral bioavailability of docetaxel by coadministration of cyclosporine: quantitation and role of P-glycoprotein.* Journal of Clinical Oncology, 2002; 20(7):1951-2

72. Holtzman CW, Wiggins BS, Spinler SA.: *Role of P-glycoprotein in statin drug interactions*. Pharmacotherapy, 2006; 26(11):1601-7

73. Neuvonen PJ, Jalava KM.: *Itraconazole drastically increases plasma concentrations of lovastatin and lovastatin acid.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1996; 60(1):54-61

74. Kim RB.: *Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers.* Drug Metabolism Reviews, 2002; 34(1-2):47-54

75. Pelkonen O, Boobis AR, Gundert-Remy U.: *In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report.* European Journal of Clinical Pharmacology, 2001; 57:621-629

76. Obata K, Sugano K, Saitoh R, Higashida A, Nabuchi Y, Machida M, Aso Y.: *Prediction of oral drug absorption in humans by theoretical passive absorption model.* International Journal of Pharmacology, 2005; 293(1-2):183-92

77. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ.: *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* Advances in Drug Delivery Reviews, 2001; 46(1-3):3-26.

78. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P.: *Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans.* Pharmaceutical Research, 1997; 14(5):568-71.

79. Palm K, Luthman K, Ungell AL, Strandlund G, Artursson P.: *Correlation of drug absorption with molecular surface properties.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996; 85(1):32-9

80. Butina D, Segall MD, Frankcombe K.: *Predicting ADME properties in silico: methods and models.* Drug Discovery Today, 2002; 7(11):S83-S88

81. Johnson SR, Zheng W.: *Recent progress in the computational prediction of aqueous solubility and absorption.* The AAPS Journal, 2006; 8(1):E27 - E40

82. Nakao K, Fujikawa M, Shimizu R, Akamatsu M.: *QSAR application for the prediction of compound permeability with in silico descriptors in practical use*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2009; 23(5):309 - 319

83. Kansy M, Senner F, Gubernator K.: *Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes.* Journal of Medicinal Chemistry, 1998; 41(7):1007-10

84. Zhu C, Jiang L, Chen TM, Hwang KK.: *A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential.* European Journal of Medicinal Chemistry, 2002; 37(5):399 - 407

85. Verma R, Hansch C, Selassie CD.: *Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2007; 21(1-3):3 - 22

86. Velický M, Bradley DF, Tam KY, Dryfe RAW.: *In Situ Artificial Membrane Permeation Assay under Hydrodynamic Control: Permeability-pH Profiles of Warfarin and Werapamil*. Pharmaceutical Research, 2010; 27(8):1644 - 1658

87. Kansy M, Avdeef A, Fischer H.: *Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists*. Drug Discovery Today: Technologies, 2004; 1(4):349-355

88. Liu H, Sabus C, Carter GT, Du C, Avdeef A, Tischler M.: *In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection.* Pharmaceutical Research, 2003; 20(11):1820-6

89. Luo H, Cheng YK.: *A comparative study of void volume markers in immobilized-artificial-membrane and reversed-phase liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 2006; 1103(2):356-361

90. Vrakas D, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A.: *Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol–water partitioning.* Journal of Chromatography A, 2006; 1116(1-2):158-164

91. Genty M, González G, Clere C, Desangle-Gouty V.: *Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001; 12(3):223-229

92. Chan ECY, Tan WL, Ho PC, Fang LJ.: *Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors*. Journal of Chromatography A, 2005; 1072(2):159-168

93. Yoon CH, Shin BS, Chang HS, Kwon LS, Kim HY, Yoo SE, Yoo SD.: *Rapid Screening of Drug Absorption Potential Using the Immobilized Artificial Membrane Phosphatidylcholine Column and Molar Volume.* Chromatographia, 2004; 60(7-8):399 - 404

94. Sun D, Yu L, Hussain MA, Wall DA, Smith RL, Amidon GL.: *In vitro testing of drug absorption for drug "developability" assessment: forming an interface between in vitro preclinical data and clinical outcome.* Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2004; 7(1):75-85

95. Marino AM, Yarde M, Patel H, Chong S, Balimane PV.: *Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds.* International Journal of Pharmaceutics, 2005; 297(1-2)235-241

96. Li C, Liu T, Broske L, Brisson JM, Uss AS, Njoroge FG.: *Permeability evaluation of peptidic HCV protease inhibitors in Caco-2 cells-correlation with in vivo*

absorption predicted in humans. Biochemical Pharmacology, 2008; 76(12):1757-1764

97. Shimizu R, Sukegawa T, Tsuda Y, Itoh T.: *Quantitative prediction of oral absorption of PEPT1 substrates based on in vitro uptake into Caco-2 cells.* International Journal of Pharmaceutics, 2008; 354(1-2):104-110

98. Li Q, Sai Y, Kato Y, Tamai I, Tsuji A.: *Influence of Drugs and Nutrients on Transporter Gene Expression Levels in Caco-2 and LS180 Intestinal Epithelial Cell Lines.* Pharmaceutical Research, 2003; 20(8):1119 - 1124

99. Bourdet DL, Pollack GM, Thakker DR.: *Intestinal Absorptive Transport of the Hydrophilic Cation Ranitidine: A Kinetic Modeling Approach to Elucidate the Role of Uptake and Efflux Transporters and Paracellular vs. Transcellular Transport in Caco-2 Cells.* Pharmaceutical Research, 2006; 23(6):1178 - 1187

100. Kimura O, Tukagoshi K, Endo T.: *Transport of MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) across Caco-2 Cell monolayer by monocarboxylic acid transporters.* Toxicology Letters, 2008; 180(Supplement):S233-S234

101. Horie K, Tang F, Borchardt RT.: *Isolation and Characterization of Caco-2 Subclones Expressing High Levels of Multidrug Resistance Protein Efflux Transporter*. Pharmaceutical Research, 2003; 20(2):161 – 168

102. Chaturvedi PR, Decker CJ, Odinecs A.: *Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery.* Current Opinions in Chemistry and Biology, 2001; 5(4):452-463

103. Pabla D, Akhlaghi F, Zia H.: *Intestinal permeability enhancement of levothyroxine sodium by straight chain fatty acids studied in MDCK epithelial cell line.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010; 40(5):466-72

104. de Souza J, Benet LZ, Huang Y, Storpirtis S.: *Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK-MDR1, and Caco-2 cell monolayers.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009 98(11):4413-9

105. Luo S, Wang Z, Kansara V, Pal D, Mitra AK.: *Activity of a sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) in MDCK-MDR1 cells and mechanism of ascorbate uptake.* International Journal of Pharmacology, 2008; 358(1-2):168-76

106. Luo FR, Paranjpe PV, Guo A, Rubin E, Sinko P.: *Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1.* Drug Metabolism and Disposition, 2002; 30(7):763-70

107. Lanao JM, Fraile MA.: *Drug tissue distribution: study methods and therapeutic implications.* Current Pharmaceutical Design, 2005; 11:3829-3845

108. Van de Waterbeemd H, Gifford E.: *ADMET in silico modeling:towards prediction paradise?* Nature Reviews Drug Discovery, 2003; 2:192-204

109. Crivori P, Cruciani G, Carrupt PA, Testa B.: *Predicting blood-brain berrier permeation from three-dimentional molecular structure.* Journal of Medicinal Chemistry, 2000; 43:2204-16

110. Kaznessis YN, Snow ME, Blankley CJ.: *Prediction of blood-brain partitioning using Monte Carlo simulation of molecules in water.* Journal of Computer Aided Molecular Design, 2001 15:697-708

111. Feher M, Sourial E, Schmidt JM.: *A simple model for the prediction of blood-brain partitioning*. International Journal of Pharmaceutics, 2000; 201:239-47

112. Pacifici GM, Viani A.: *Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences.* Clinical Pharmacokinetics, 1992; 23:449-68

113. Di L, Umland JP, Chang G, Huang Y, Lin Z, Scott DO, Troutman MD, Liston TE.: *Species independence in brain tissue binding using brain homogenates.* Drug Metabolism and Disposition, 2011; 39(7):1270-7

114. Hard ML, Iqbal U, Brien JF, Koren G.: *Binding of acetaldehyde to human and Guinea pig placentae in vitro.* Placenta, 2003; 24(2-3):149-54

115. Martin-Suarez A, Atencio DR, Lopez FG, Santos M, Zarzuelo A, Mendez ME, Alberca I, Lanao JM.: *Pharmacokinetic study of the digoxin-acenocoumarol interaction in rabbits*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003; 26(6):813-7

116. Zarzuelo A, Sanchez-Navarro A, Lopez FG, Lanao JM.: *A review of the isolated kidney as an experimental model for pharmacokinetic studies.* Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology, 2000; 22:757-763

117. Foster KA, Weiss M, Roberts MS.: *Distribution kinetics of solutes in the isolated in-situ perfuser head using the multiple indicator dilution technique and a physiological two-barrier model.* Journal of Pharmaceutics and Pharmacology, 2002; 54:373-382

118. Huang JL, Morgan DJ.: *Influence of perfusion flow rate on uptake and pharmacodynamics of quinidine in isolated perfused rat heart.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994; 83:119-23

119. Maier-Salamon A, Hagenauer B, Reznicek G, Szekeres T, Thalhammer T, Jäger W.: *Metabolism and disposition of resveratrol in the isolated perfused rat liver: role of Mrp2 in the biliary excretion of glucuronides.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008; 97(4):1615-28

120. Toxopeus C, Frazier JM.: *Simulation of trichloroacetic acid kinetics in the isolated perfused rat liver using a biologically based kinetic model*. Toxicological Sciences, 2002; 70(1):27-39

121. Reinoso RF, Sanchez-Navarro A, Lanao JM: *Distribution of ciprofloxacin in the isolated rat lung in the presence and absence of tissue oedema.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, 8:203-209

122. Wang L, He K, Maxwell B, Grossman SJ, Tremaine LM, Griffith W.: *Tissue distribution and elimination of C-14 apixaban in rats.* Drug Metabolism and Disposition, 2011; 39(2):256-64

123. Zhang M, Chen Q, Li XF, O'Donoghue J, Ruan S, Zanzonico P, Ling CC, Humm JL.: *Image deconvolution in digital autoradiography: a preliminary study.* Medical Physics, 2008; 35(2):522-30

124. Solon EG, Schweitzer A, Stoeckli M, Prideaux B.: *Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development.* AAPS Journal, 2010; 12(1):11-26

125. Schweitzer A, Hasler-Nguyen N, Zijlstra J.: *Preferential uptake of the non steroid anti-inflammatory drug diclofenac into inflamed tissues after a single oral dose in rats.* BMC Pharmacology, 2009; 9:5

126. Foster CA, Howard LM, Schweitzer A, Persohn E, Hiestand PC, Balatoni B, Reuschel R, Beerli C, Schwartz M, Billich A.: *Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2007; 323(2):469-75

127. Todd PJ, Schaaff TG, Chaurand P, Caprioli RM.: *Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization.* Journal of Mass Spectrometry, 2001; 36(4):355-69

128. Klimas MT.: *Positron emission tomography and drug discovery: contribution to the understanding of pharmacokinetics, mechanism of action and disease state characterisation.* Molecular Imaging Biology, 2002; 45:311-37

129. Fischman AJ, Alpert NM, Rubin RH.: *Pharmacokinetic imaging: a noninvasive method for determining drug distribution and action.* Clinical Pharmacokinetics, 2002; 41:581-602

130. Singh M, Waluch V.: *Physics and instrumantation for imaging "in vivo" drug distribution.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2000; 41:7-20

131. Brunner M, Langer O, Sunder-Plassmann R, Dobrozemsky G, Müller U, Wadsak W, Krcal A, Karch R, Mannhalter C, Dudczak R, Kletter K, Steiner I, Baumgartner C, Müller M.: *Influence of functional haplotypes in the drug transporter gene ABCB1 on central nervous system drug distribution in humans.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2005; 78(2):182-90

132. Brunner M, Langer O, Dobrozemsky G, Müller U, Zeitlinger M, Mitterhauser M, Wadsak W, Dudczak R, Kletter K, Müller M.: *[18F]Ciprofloxacin, a new positron emission tomography tracer for noninvasive assessment of the tissue distribution and pharmacokinetics of ciprofloxacin in humans.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48(10):3850-7

133. Yang FY, Wang HE, Lin GL, Teng MC, Lin HH, Wong TT, Liu RS.: *Micro-SPECT/CT-based pharmacokinetic analysis of 99mTc-diethylenetriaminepentaacetic acid in rats with blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound.* Journal of Nuclear Medicine, 2011; 52(3):478-84

134. Wolf W, Presant CA, Waluch V.: *19F-MRS studies of fluorinated drugs in humans.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2000; 41(1):55-74

135. Griffiths JR, Glickson JD.: *Monitoring pharmacokinetics of anticancer drugs: non-invasive investigation using magnetic resonance spectroscopy.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2000; 41(1):75-89

136. Burrow SM, Phoenix DA, Wainwright M, Tobin MJ.: *Intracellular localisation studies of doxorubicin and Victoria Blue BO in EMT6-S and EMT6-R cells using confocal microscopy*. Cytotechnology, 2002; 39(1):15 – 25

137. Beyer U, Rothen-Rutishauser B, Unger C, Wunderli-Allenspach H, Kratz F.: *Differences in the Intracellular Distribution of Acid-Sensitive Doxorubicin-Protein Conjugates in Comparison to Free and Liposomal Formulated Doxorubicin as Shown by Confocal Microscopy.* Pharmaceutical Research, 2001; 18(1):29 – 38

138. Praus P, Kocisová E, Mojzes P, Stepánek J, Turpin PY, Sureau F.: *Cellular uptake of modified oligonucleotides enhanced by porphyrins studied by time-resolved microspectrofluorimetry and fluorescence imaging techniques.* Journal of Molecular Structure, 2011; 993(1-3):316-318

139. Haas SE, Bettoni CC, de Oliveira LK, Guterres SS, Dalla Costa T.: *Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against Plasmodium berghei in vivo.* Internatinal Journal of Antimicrobial Agents, 2009; 34(2):156-61

140. Hinderling PH.: *Red blood cells: a neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics.* Pharmacological Reviews, 1997; 49(3):279-95

141. Rudy AC, Poynor WJ.: *Binding of pyrimethamine to human plasma proteins and erythrocytes.* Pharmaceutical Research, 1990; 7(10):1055-60

142. Kumar GN, Surapaneni S.: *Role of drug metabolism in drug discovery and development.* Medicinal Research Reviews, 2001; 21(5):397-411

143. Guengerich FP.: *Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity.* The AAPS Journal, 2006; 8(1):E101 - E111

144. Kumar G, Lau H, Laskin O.: *Lenalidomide: in vitro evaluation of the metabolism and assessment of cytochrome P450 inhibition and induction.* Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2009; 63(6):1171 – 1175

145. Roos PH, Jakubowski N.: *Cytochrome P450.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008; 392(6):1015 – 1017

146. Hengstler JG, Bolt HM.: *Failure in drug development: the role of inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. Archives of Toxicology, 2008; 82(10):665 – 666

147. de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN.: *Cytochrome P450 3A: Ontogeny and drug disposition.* Clinical Pharmacology, 1999; 37(6):485-505

148. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA.: *Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001; 299(3):825-31

149. Bomsien S, Aderjan R, Mattern R, Skopp G.: *Effect of psychotropic medication on the in vitro metabolism of buprenorphine in human cDNA-expressed cytochrome P450 enzymes*. European Journal of Clinical Pharmacology, 2006; 62(8):639 – 643

150. Grasmäder K, Verwohlt PL, Rietschel M, Dragicevic A.: *Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting.* European Journal of Clinical Pharmacology, 2004; 60(5):329 – 336

151. Lee AY, Kim MJ, Chey WY, Choi , Kim BG.: *Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions*. European Journal of Clinical Pharmacology, 2004; 60(3):155 – 159

152. Tabrizi AR, Zehnbauer BA, Borecki IB, McGrath SD, Buchman TG.: *The frequency and effects of cytochrome P450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin*. Journal of the American College of Surgeons, 2002; 194(3):267-273

153. Jin B, Ni HC, Shen W, Li J, Shi HM, Li Y.: *Cytochrome P450 2C19 polymorphism is associated with poor clinical outcomes in coronary artery disease patients treated with clopidogrel.* Molecular Biology Reports, 2011; 38(3):1697 – 1702

154. Matsumoto C, Shinkai T, Luca V, Hori H, Hwang R, Ohmori O.: *Association study between functional polymorphisms in the cytochrome P450 1A2 and 2D6 genes and polydipsia in schizophrenia.* NeuroMolecular Medicine, 2006; 8(3): 381 – 387

155. Higgins MJ, Stearns V.: *CYP2D6 Polymorphisms and Tamoxifen Metabolism: Clinical Relevance*. Current Oncology Reports, 2010; 12(1):7 – 15

156. Jornil J, Linnet K.: *Roles of polymorphic enzymes CYP2D6 and CYP2C19 for in vitro metabolism of amitriptyline at therapeutic and toxic levels.* Forensic Toxicology, 2009; 27(1):12 – 20

157. Tarcsay Á, Kiss R, Keserű GM.: *Site of metabolism prediction on cytochrome P450 2C9: a knowledge-based docking approach*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2010; 24(5):399 – 408

158. Testa B, Balmat AL, Long A.: *Predicting drug metabolism: concepts and challenges.* Pure and Applied Chemistry, 2004; 76(5):907-914

159. Bhoopathy S, Xin B, Unger SE, Karnes HT.*: A novel incubation direct injection LC/MS/MS technique for in vitro drug metabolism screening studies involving the CYP 2D6 and the CYP 3A4 isozymes.* Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2005; (4):739-49

160. Otten JN, Hingorani GP, Hartley DP, Kragerud SD, Franklin RB.: *An in vitro, high throughput, seven CYP cocktail inhibition assay for the evaluation of new chemical entities using LC-MS/MS.* Drug Metabolism Letters, 2011; 5(1):17-24

161. Lahoz A, Donato MT, Picazo L, Castell JV, Gómez-Lechón MJ.: *Assessment of cytochrome P450 induction in human hepatocytes using the cocktail strategy plus liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Drug Metabolism Letters, 2008; 2(3):205-9

162. Lahoz A, Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ.: *Strategies to in vitro assessment of major human CYP enzyme activities by using liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Current Drug Metabolism, 2008; 9(1):12-9

163. Yang SH, Cho YA, Choi JS.: *Effects of ticlopidine on pharmacokinetics of losartan and its main metabolite EXP-3174 in rats.* Acta Pharmacologica Sinica, 2011; 32(7):967-72

164. Holcapek M, Kolárová L, Nobilis M.: *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008; 391(1):59-78

165. Hu Y, Sampson KE, Heyde BR, Mandrell KM, Li N, Zutshi A, Lai Y.: *Saturation of Multidrug-Resistant Protein 2 (Mrp2/Abcc2)-Mediated Hepatobiliary Secretion: Nonlinear Pharmacokinetics of a Heterocyclic Compound in Rats after Intravenous Bolus Administration.* Drug Metabolism and Disposition, 2009; 37(4): 841-846

166. Liu L, Pang KS.: *The role of transporters and enzymes in hepatic drug processing.* Drug Metabolism and Disposition, 2005; 33:1-9

167. Hatanaka T.: *Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events.* Clinical Pharmacokinetics, 2000; 39(6):397-412

168. Mannermaa E, Vellonen KS, Ryhänen T, Kokkonen K, Ranta VP.: *Efflux Protein Expression in Human Retinal Pigment Epithelium Cell Lines* Pharmaceutical Research, 2009; 26(7):1785 – 1791

169. Weiss M, Hung DY, Poenicke K, Roberts MS.: *Kinetic analysis of saturable hepatic uptake of digoxin and its inhibition by rifampicin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008; 34(4-5):345-350

170. Ajavon AD, Bonate PL, Taft DR.: *Renal excretion of clofarabine: Assessment of dose-linearity and role of renal transport systems on drug excretion.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010; 40(3):209-216

171. Novakovic J, Tesoro A, Thiessen JJ, Spino M.: *Metabolic and pharmacokinetic evaluation of a Novel 3-hydroxypyridinone iron chelator, CP502, in the rat*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2004; 29(4):221 – 224

172. Haak H, Larsen G, Bergman A, Orn U.: *Metabolism, excretion and distribution of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in conventional and bile-duct cannulated rats.* Xenobiotica, 2000; 30:881-890

173. Axelson JE, Gibaldi MJ.: *Absorption and excretion of riboflavin in the rat: an unusual example of nonlinear pharmacokinetics.* Pharmaceutical Sciences, 1972; 61(3):404-7

174. Pond SM, Waschek JA, Mahacha V, Fielding RM, Effeney DJ, Tozer TN.: *Nonlinear intestinal first-pass metabolism of salicylamide in dogs after portacaval transposition.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1988; 245(1):291-3

175. Kim TK, Kang W, Chun IK, Oh SY, Lee YH, Gwak HS.: *Pharmacokinetic evaluation and modeling of formulated levodopa intranasal delivery systems*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009; 38(5):525-532

176. Ludden T.: *Nonlinear pharmacokinetics. Clinical implications.* Clinical Pharmacokinetics, 1991; 20 (6): 429-446.

177. DeVane CL.: *Pharmacokinetics, drug interactions, and tolerability of valproate.* Psychopharmacol Bulletin, 2003; 37(Suppl 2):25-42

178. Aso R, Ohashi K, Katoh T, Ogata H.: *Population pharmacokinetics, protein binding and antiarrhythmic effects of disopyramide enantiomers in arrhythmic patients.* International Journal of Clinical & Pharmacological Research, 2001; 21(3-4):137-46

179. Legg B, Rowland M.: *Saturable binding of cyclosporin A to erythrocytes: estimation of binding parameters in renal transplant patients and implications for bioavailability assessment.* Pharmacological Research, 1988; 5(2):80-5

180. Richens A.: *Clinical pharmacokinetics of phenytoin.* Clinical Pharmacokinetics, 1979; 4(3):153-69

181. Dadashzadeh S, Tajerzaden H.: *Dose dependent pharmacokinetics of theophylline: Michaelis-Menten parameters for its major metabolic pathways.* European Journal of Drug Metabolism & Pharmacokinetics, 2001; 26(1-2):77-83

182. Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ.: *Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans.* Epilepsy Research, 1996; 24(3):163-72

183. Zomorodi K, Carlile DJ, Houston JB.: *Kinetics of diazepam metabolism in rat hepatic microsomes and hepatocytes and their use in predicting in vivo hepatic clearance.* Xenobiotica, 1995; 25(9):907-16

184. Tam YK, Yau M, Berzins R, Montgomery PR, Gray M.: *Mechanisms of lidocaine kinetics in the isolated perfused rat liver. I. Effects of continuous infusion.* Drug Metabolism and Disposition, 1987; 15(1):12-6

185. Sander K, Kottke T, Stark H.: *Histamine h3 receptors go to clinics*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2008; 31(12): 2163-2181

186. Bongers G, Bakker RA, Leurs R: *Molecular aspects of the histamine H_3 receptor*. Biochemical Pharmacology, 2007; 73:1195-1204

187. Esbenshade TA, Browman KE, Bitner RS, Strakhova M, Cowart MD, Brioni JD.: *The histamine h3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders.* British Journal of Pharmacology, 2008; 154:1166-1181.

188. Repka-Ramirez MS: *New concept of histamine receptors and actions*. Current Allergy and Asthma Reports, 2003; 3:227-231

189. Gemkow MJ, Davenport AJ, Harich S, Ellenbroek BA, Cesura A, Hallett D.: *The histamine h3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders.* Drug Discovery Today, 2009; 14 (9/10):509-515

190. Łazewska D, Ligneau X, Schwartz JC, Schunack W, Stark H, Kieć-Kononowicz K.: *Ether derivatives of 3-piperidinopropan-1-ol as non-imidazole histamine H3 receptor antagonists.* Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2006; 14(10):3522-9

191. Berlin M, Lee YJ, Boyce CW, Wang Y, Aslanian R, McCormick KD, Sorota S, Williams SM, West RE Jr, Korfmacher W.: *Reduction of hERG inhibitory activity in the 4-piperidinyl urea series of H3 antagonists.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010; 20(7):2359-64

192. Wagner JG, Nelson E.: *Percent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 1963; 52:610-611

193. Food and Drug Administration (FDA), Guidence for Industry, Bioanalytical Method Validaton, May 2001

194. Bansal T, Mishra G, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S.: *Effect of P-glycoprotein inhibitor, verapamil, on oral bioavailability and pharmacokinetics of irinotecan in rats.* European Journal of Pharmaceutical Scienses, 2009; 36(4-5):580-90

195. Guideline on Bioanalytical Methods Validation, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMEA), 21 July 2011, coming into effect on 1 February 2012.

196. Boston RC, Phillips DR.: *Evidence of possible dose-dependent doxorubicin plasma kinetics in man.* Cancer Treatment Reports, 1983; 67(1):63-9

197. Erttmann R, Erb N, Steinhoff A, Landbeck G.: *Pharmacokinetics of doxorubicin in man: dose and schedule dependence.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1988; 114(5):509-13

198. Wassermann K, Steiness E.: *Doxorubicin binds in a cooperative manner to myocardial cells. Two binding sites.* Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1986; 17(3):241-6

199. Raeissi SD, Hodalgo IJ, Segura-Aguilar J, Artursson P.: *Interplay between CYP3A-mediated metabolism and polarized efflux of terfenadine and its metabolites in intestinal epithelial Caco-2 (TC7) cell monolayers.* Pharmaceutical Research, 1999; 16(5):625-632

200. Crowe A, Wright C.: *The impact of P-glycoprotein mediated efflux on absorption of 11 sedating and less-sedating antihistamines using Caco-2 monolayers.* Xenobiotica, 2012; 42(6):538-49

201. Achira M, Suzuki H, Ito K, Sugiyama Y.: *Comparative studies to determine the selective inhibitors for P-glycoprotein and cytochrome P4503A4.* AAPS PharmSci, 1999; 1(4):E18

202. Zhao R, Kalvass JC, Yanni SB, Bridges AS, Pollack GM.: *Fexofenadine brain exposure and the influence of blood-brain barrier P-glycoprotein after fexofenadine and terfenadine administration.* Drug Metabolism and Disposition, 2009; 37(3):529-35

203. Lin HJ.: *Dose-dependent pharmacokinetics: experimental observations and theoretical considerations.* Biopharmaceutics & Drug Disposition, 1994; 15:1-31

204. Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H.: *Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics.* Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010; 99(3):1107-22

205. Prueksaritanont T, Gorham LM, Naue JA, Hamill TG, Askew BC, Vyas KP.: *Disposition of L-738,167, a potent and long-acting fibrinogen receptor antagonist, in*

dogs. Dose-dependent pharmacokinetics. Drug Metabolism and Disposidion, 1997; 25(3):355-61

206. McLean MJ.: *Clinical pharmacokinetics of gabapentin.* Neurology, 1994; 44(6 Suppl 5):S17-22

207. Patel VR, Agrawal YK.: *Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs.* Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 2011; 2(2):81-7

208. Yokogawa K, Ishizaki J, Ohkuma S, Miyamoto K.*: Influence of lipophilicity and lysosomal accumulation on tissue distribution kinetics of basic drugs: a physiologically based pharmacokinetic model.* Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 2002; 24(2):81-93

209. Pang KS, Maeng HJ, Fan J.: *Interplay of transporters and enzymes in drug and metabolite processing.* Molecular Pharmaceutics, 2009; 6(6):1734-55

9. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Zasada działania źródła jonów typu ESI [30]. 9

Ryc. 2. Zasada rozdziału jonów z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego [30]. 10

Ryc. 3. Rodzaje transportu przez błony biologiczne: dyfuzja bierna, ułatwiona, transport aktywny pierwszo- i drugorzędowy [39]..... 13

Ryc. 4. Związek DL76 (1-[3-(4-tert-butylofenoksy)propylo]piperydyna). 38

Ryc. 5. Model farmakofora dla nieimidazolowych antagonistów receptora H_3 [189]. 38

Ryc. 6. Wzór strukturalny metabolitu związku DL76, A-przewidziany przez program komputerowy, B-zidentyfikowany w badaniach *in vivo*. 40

Ryc. 7. Pentoksyfilina (3,7-dimetylo-1-(5-oksycheksylo)-3,7-dihydro-1H-puryno-2,6-dion).. 40

Ryc. 8. Fragmentacja MS/MS: A – DL76, B – pentoksyfilina. 46

Ryc. 9. Wykres zależności absorbancji od długości fali otrzymany dla próbki szczawianu DL76 o stężeniu 20 µg/mL. 51

Ryc. 10. Przykładowy wykres krzywej wzorcowej dla związku DL76. 59

Ryc. 11. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat wątroby bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 250 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu wątroby szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C). 64

Ryc. 12. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat mózgu bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 100 ng/mL i IS o stężeniu 250 g/mL (B), próbka homogenatu mózgu szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C). ... 64

Ryc. 13. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat nerki bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu 100 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu nerki szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C). ... 65

Ryc. 14. Przykładowe chromatogramy wybranych jonów: homogenat płuc bez badanego związku (A), próbka wzorcowa zawierająca DL76 o stężeniu

250 ng/mL i IS o stężeniu 250 ng/mL (B), próbka homogenatu płuc szczura, któremu podano dożylnie DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. (C). ... 65

Ryc. 15. Zmiany stężeń związku DL76 w zależności od czasu przedstawione w skali półlogarytmicznej po jego jednorazowym dożylnym podaniu w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5). 72

Ryc. 16. Dopasowanie do otwartego modelu 2-kompartmentowego obserwowanych średnich wartości stężeń w czasie, oznaczonych w surowicy krwi szczura po jednorazowym podaniu dożylnym związku DL76 w dawce 3 mg/kg. 73

Ryc. 17. Dopasowanie do otwartego modelu 3-kompartmentowego obserwowanych średnich wartości stężeń w czasie, oznaczonych w surowicy krwi szczura po jednorazowym podaniu dożylnym DL76 w dawce 9 mg/kg. 74

Ryc. 18. Wykres zależności wartości pola pod krzywą stężenie-czas (AUC) dla związku DL76 od wielkości podanej dożylnie dawki. 75

Ryc. 19. Zmiany stężeń związku DL76 w zależności od czasu przedstawione w skali półlogarytmicznej po jego jednorazowym dożołądkowym podaniu w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5). 76

Ryc. 20. Średnie (n=5) zmiany absorbancji badanych próbek DL76 o stężeniu 50 (A), 100 (B) i 200 (C) µg/mL w czasie, w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8, w temperaturze 25°C. 77

Ryc. 21. Średnie (n=5) zmiany absorbancji badanych próbek DL76 o stężeniu 50 (A), 100 (B) i 200 (C) µg/mL w czasie, w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 lub 6.8, w temperaturze 37°C. 77

Ryc. 22. Zależność stężenia (wartości średnie±SD, n=3) od czasu dla związku DL76 podawanego dożylnie w jednorazowej dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu doustnym werapamilu (25 mg/kg). 79

Ryc. 23. Zależność stężenia (wartości średnie±SD, n=3) od czasu dla związku DL76 podawanego dożołądkowo w jednorazowej dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu doustnym werapamilu (25 mg/kg). 79

Ryc. 24. Zależność ilości obserwowanego w surowicy krwi metabolitu związku DL76 od czasu po jednorazowym podaniu dożołądkowym związku macierzystego w dawce 6 mg/kg lub po wcześniejszym podaniu dożołądkowym werapamilu (25 mg/kg). 80

Ryc. 25. Zmiany stężeń DL76 w mózgu szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 82

Ryc. 26. Zmiany stężeń DL76 w mózgu szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 83

Ryc. 27. Zależność stężenia od czasu w strukturach mózgu szczura związku DL76 po jego jednorazowym podaniu dożylnym w dawce 3 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=3). 84

Ryc. 28. Zmiany stężeń DL76 w wątrobie szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 85

Ryc. 29. Zmiany stężeń DL76 w wątrobie szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 86

Ryc. 30. Zmiany stężeń DL76 w nerkach szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 87

Ryc. 31. Zmiany stężeń DL76 w nerkach szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 88

Ryc. 32. Zmiany stężeń związku DL76 w płucach szczura po jednorazowym dożylnym podaniu tego związku w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5) 89

Ryc. 33. Zmiany stężeń DL76 w płucach szczura po jednorazowym dożołądkowym podaniu tego związku w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=5). 90

Ryc. 34. Całkowity prąd jonowy (A), spektrum DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów o masie 306 amu (C) dla próbki czystego moczu. 91

Ryc. 35. Całkowity prąd jonowy (A), spektrum DAD (B) oraz chromatogram wybranych jonów o masie 306 amu (C) dla próbki moczu szczura pobranej po 5h od jednorazowego dożołądkowego podania związku DL76 w dawce 6 mg/kg. 92

Ryc. 36. Struktura chemiczna związku DL76 (m.cz. 275), jego potencjalnego metabolitu (m.cz. 305) oraz wspólnego jonu fragmentacyjnego o m. cz. 98. 93

Ryc. 37. Chromatogram wybranych jonów dla próbki homogenatu wątroby pobranej godzinę po podaniu dożylnym związku DL76 w dawce 9 mg/kg m.c. Kolorem zielonym zaznaczono pik pochodzący od metabolitu związku DL76. 94

Ryc. 38. Dynamika zmian metabolitu związku DL76 w surowicy krwi szczura od czasu dla jednorazowego podania dożylnego związku macierzystego w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie, n=5). 95

Ryc. 39. Dynamika zmian metabolitu związku DL76 w surowicy krwi szczura od czasu dla jednorazowego podania dożołądkowego związku macierzystego w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie, n=5)..... 96

Ryc. 40. Metabolit związku DL76 obserwowany w wątrobie, nerkach oraz płucach szczura po czasie 60 min od jednorazowego podania dożylnego związku macierzystego w dawkach 3, 6, 9 lub 15 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5). 96

Ryc. 41. Metabolit związku DL76 obserwowany w wątrobie, nerkach oraz płucach szczura po czasie 60 min od jednorazowego podania dożołądkowego związku macierzystego w dawkach 3, 6 lub 9 mg/kg (wartości średnie ±SD, n=5). 97

Ryc. 42. Zależności pola pod krzywą stężenie-czas od dawki w surowicy (ng · h/mL) i badanych tkankach (ng · h/g tkanki) szczura dla DL76 po jego podaniu dożylnym. 98

Ryc. 43. Zależności pola pod krzywą stężenie-czas od dawki w surowicy (ng · h/mL) i badanych tkankach (ng · h/g tkanki) szczura dla DL76 po jego podaniu dożołądkowym. 99

Ryc. 44. Zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze od czasu dla dwóch stężeń związku DL76 (wartości średnie ± SD, n=3). 100

Ryc. 45. Zależność współczynnika podziału erytrocyty/osocze od czasu dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożylnej 3 lub 15 mg/kg (wartości średnie ± SD, n=3). 101

Ryc. 46. Zależność wolnej frakcji (f_u) od czasu wyznaczona in vitro dla dwóch stężeń związku DL76 (wartości średnie, n=3). 102

10. SPIS TABEL

Tab. 1. Właściwości fizykochemiczne związku DL76 przewidziane z zastosowaniem programu komputerowego Pallas. 39

Tab. 2. Warunki gradientu stosowanego w analizie związku DL76. 44

Tab. 3. Optymalne parametry drogi jonu dla związku DL76. 45

Tab. 4. Powierzchnie pików DL76 otrzymane po ekstrakcji tego związku z surowicy krwi szczura z zastosowaniem różnych odczynników organicznych. 50

Tab. 5. Stężenia związku DL76 obliczone na podstawie krzywej wzorcowej (ang. back calculation). 60

Tab. 6. Precyzja i dokładność metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura (próbki QC, n=5). 60

Tab. 7. Precyzja i dokładność metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura (próbki wzorcowe). 61

Tab. 8. Wydajność procesu ekstrakcji związku DL76 61

Tab. 9. Stabilność związku DL76 w surowicy krwi szczura (n=5). 62

Tab. 10. Stabilność związku DL76 w surowicy krwi szczura (n=5). 62

Tab. 11. Precyzja metody oznaczania DL76 w surowicy krwi szczura. 63

Tab. 12. Równania regresji opisujące krzywe wzorcowe związku DL76 w homogenatach badanych narządów. 66

Tab. 13. Parametry walidacji metody oznaczania związku DL76 w badanych matrycach – homogenatach narządów. 67

Tab. 14. Stabilność związku DL76 w homogenatach mózgu, wątroby, nerek oraz płuc. 68

Tab. 15. Stabilność związku DL76 w homogenatach mózgu, wątroby, nerek oraz płuc. 69

Tab. 16. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 1.2 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5). 70

Tab. 17. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 4.6 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5). 70

Tab. 18. Zależność absorbancji od stężenia związku DL76 w roztworze buforowym o pH 6.8 w temperaturze 25°C i 37°C (n=5). 71

Tab. 19. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w surowicy krwi szczura po podaniu dożylnym, wyznaczone z wykorzystaniem techniki bezmodelowej. 73

Tab. 20. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku. 76

Tab. 21. Rozpuszczalność DL76 w temperaturze 25°C oraz 37°C w roztworach buforowych o pH równym 1.2; 4.6 i 6.8. 78

Tab. 22. Wartości podstawowych funkcji termodynamicznych procesu rozpuszczania DL76. 78

Tab. 23. Wartości pola pod krzywą stężenie-czas w tkankach dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożylnej 6mg/kg oraz po wcześniejszym dożołądkowym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg. 80

Tab. 24. Wartości pola pod krzywą stężenie-czas w tkankach dla DL76 podawanego w jednorazowej dawce dożołądkowej 6mg/kg oraz po wcześniejszym podaniu werapamilu w dawce 25 mg/kg. 81

Tab. 25. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w mózgu szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach. 82

Tab. 26. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w mózgu szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach. 83

Tab. 27. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w wątrobie szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach. 85

Tab. 28. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w wątrobie szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach. 86

Tab. 29. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w nerkach szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach. 87

Tab. 30. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w nerkach szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach. 88

Tab. 31. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w płucach szczura wyznaczone po podaniu dożylnym tego związku w różnych dawkach. 89

Tab. 32. Wartości parametrów farmakokinetycznych DL76 w płucach szczura wyznaczone po podaniu dożołądkowym tego związku w różnych dawkach. 90

Tab. 33. Przewidywane na podstawie kwasowo – zasadowej teorii podziału oraz otrzymane eksperymentalnie w badaniu in vitro średnie wartości współczynników podziału $K_{e/o}$ oraz $K_{e/b}$. 101

Tab. 34. Średni procent wiązania związku DL76 z białkami krwi w zależności od stężenia obliczony na podstawie danych uzyskanych w eksperymencie *in vitro*. 102