

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny**



Kamil Kuś

**Zastosowanie techniki LC/MS/MS do badania metabolizmu nowych
związków, potencjalnych leków**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Stefan Chłopicki

Promotor pomocniczy: dr hab. Maria Walczak

**Praca wykonana w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET)
Kraków, 2015**



Badania były współfinansowane przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Regionalnego w ramach Programu Innowacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG.01.01.02-00-069/09-05 „Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym” grant koordynowany przez JCET UJ) oraz częściowo ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/11/N/NZ7/00749.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Składam serdeczne podziękowania

Panu Prof. dr hab. Stefanowi Chłopickiemu

oraz Pani Dr hab. Marii Walczak

za opiekę merytoryczną i wyrozumiałość podczas wykonywania badań, a także poświęcony czas i życzliwe uwagi przy redagowaniu niniejszej pracy.

Pragnę podziękować Ś.P. Prof. dr hab. Joannie Szymurze-Oleksiak

za wiedzę, którą mi przekazała.

Wszystkim pracownikom JECT za życzliwość i miłą atmosferę pracy.

Moim najbliższym, za wszelką pomoc i wyrozumiałość.

Spis treści

1.	Wstęp	7
1.1.	Badanie metabolizmu nowych związków	7
1.2.	Proleki – definicja i podział.....	8
1.3.	Selektywna dystrybucja proleków	9
1.3.1.	Selektywna dystrybucja proleków do ośrodkowego układu nerwowego (OUN)	10
1.3.2.	Selektywna dystrybucja proleków do nerek	11
1.3.3.	Selektywna dystrybucja proleków do jelita grubego	12
1.3.4.	Celowana terapia nowotworowa za pomocą proleków	13
1.3.5.	Selektywna dystrybucja proleków do wątroby	14
1.4.	Diolany diazoniowe – związki uwalniające NO.....	19
1.5.	V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, diolany diazoniowe uwalniające NO w wątrobie	21
2.	Cel pracy	25
3.	Materiały i metody	26
3.1.	Materiały	26
3.1.1.	Badane związki	26
3.1.2.	Substancje wzorcowe	27
3.1.3.	Odczynniki	27
3.1.4.	Aparatura	28
3.1.5.	Zwierzęta laboratoryjne	29
3.1.6.	Materiał biologiczny	29
3.1.7.	Metoda wyodrębnienia analitów z materiału biologicznego.....	30
3.2.	Metody analityczne.....	31
3.2.1.	Jednoczesne oznaczanie stężenia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w wybranych matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS.....	31
3.2.2.	Jednoczesne oznaczanie stężenia metabolitów substancji modelowych wybranych izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem systemu LC/MS/MS – metoda „koktajlu” .	31
3.2.3.	Metoda utleniania związków z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™	32
3.2.4.	Oznaczanie stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) w próbkach biologicznych .	33
3.2.5.	Walidacja metod bioanalitycznych	33
3.3.	Metodyka badań w warunkach <i>in vitro</i>	36
3.3.1.	Procedura przygotowania mieszaniny inkubacyjnej substratów z mikrosomami wątroby szczura.....	36

3.3.2.	Optymalizacja warunków inkubacji.....	36
3.3.3.	Ocena kinetyki reakcji biotransformacji.....	36
3.3.4.	Badanie hamowania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem wybranych inhibitorów	38
3.3.5.	Walidacja metody jednoczesnej oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 za pomocą związku referencyjnego	38
3.3.6.	Badanie metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach <i>in vitro</i> z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby szczura	39
3.4.	Metodyka badań w warunkach <i>in vivo</i>	40
3.4.1.	Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu badanych związków u myszy	40
3.4.2.	Wyznaczenie podstawowych parametrów eliminacji nerkowej badanych związków.	41
3.5.	Metodyka badań w warunkach <i>ex vivo</i>	41
3.5.1.	Zastosowanie modelu izolowanej perfundowanej wątroby myszy do wyznaczenia współczynnika ekstrakcji wątrobowej V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO	41
3.6.	Metodyka przewidywania metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO	42
3.6.1.	Przewidywanie metabolizmu związków w warunkach <i>in silico</i> za pomocą oprogramowania PALLAS	42
3.6.2.	Badanie procesów utleniania z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™ w połączeniu z systemem MS/MS.....	42
3.7.	Obliczenia farmakokinetyczne	43
3.8.	Obliczenia statystyczne	45
4.	Wyniki.....	46
4.1.	Część I – opracowanie i walidacja metod.....	46
4.1.1.	Opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczenia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w wybranych matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS..	46
4.1.2.	Opracowanie metody oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 – „metoda koktajlu”	52
4.1.3.	Opracowanie metody badania metabolizmu związków za pomocą systemu elektrochemicznego ROXY™	68
4.1.4.	Podsumowanie I części wyników	73
4.2.	Część II - Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO u myszy	74
4.2.1.	Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach <i>in silico</i>	74
4.2.2.	Profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach <i>in vivo</i>	75

4.2.3.	Dystrybucja V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO do wątroby w warunkach <i>in vivo</i>	77
4.2.4.	Uwalnianie NO z V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO po podaniu dożylnym w warunkach <i>in vivo</i>	77
4.2.5.	Klirens nerkowy V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach <i>in vivo</i>	78
4.2.6.	Klirens wątrobowy i stopień eliminacji wątrobowej V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach <i>ex vivo</i>	78
4.2.7.	Uwalnianie NO z V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w modelu izolowanej, perfundowanej wątroby w warunkach <i>ex vivo</i>	79
4.2.8.	Metabolizm V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach <i>in vitro</i> w mikrosomach wątroby szczura.....	80
4.2.9.	Badanie potencjału inhibicyjnego V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w stosunku do wybranych izoenzymów cytochromu P450 metodą „koktajlu”	83
4.2.10.	Badanie metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO za pomocą detektora elektrochemicznego ROXY	83
4.2.11.	Wpływ stłuszczenia wątroby na farmakokinetykę V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO	85
4.2.12.	Podsumowanie II części wyników	90
5.	Dyskusja.....	91
5.1.	Opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS	91
5.2.	Opracowanie metody badania aktywności izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem systemu LC/MS/MS	92
5.3.	Opracowanie metody elektrochemicznego utleniania związków z zastosowaniem systemu ROXY™ połączonego z tandemowym spektrometrem mas.....	99
5.4.	Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO... ..	101
5.5.	Ograniczenia V-PYRRO/NO.....	104
5.6.	Wpływ stłuszczenia wątroby na profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO	106
5.7.	Podsumowanie.....	108
6.	Wnioski.....	110
7.	Streszczenie.....	111
8.	Summary	113
9.	Literatura.....	115
10.	Spis rycin i tabel.....	141

1. Wstęp

1.1. Badanie metabolizmu nowych związków

Wprowadzenie nowego związku na rynek trwa około 10-15 lat i wymaga badań wartych około miliarda dolarów. Co więcej, wiele świetnie zapowiadających się cząsteczek nie wchodzi do etapu badań klinicznych, najczęściej z powodu nieodpowiednich właściwości farmakokinetycznych, takich jak: niewłaściwy czas działania leku, słaba rozpuszczalność w wodzie, niewystarczające wchłanianie oraz unieczynnienie związku w tzw. efekcie pierwszego przejścia¹⁻⁴.

Badania metabolizmu mają na celu identyfikację dróg biotransformacji, określenie struktury potencjalnych metabolitów oraz zaangażowanych w ten proces enzymów, a także przewidywanie *a priori* możliwych interakcji międzylekowych. Konieczność badania metabolizmu nowych związków została dokładnie opisana w licznych, oficjalnych wytycznych agencji zajmujących się dopuszczaniem leków na rynek – FDA, EMA⁵⁻⁹. Ocena metabolizmu jest szczególnie ważna w przypadkach, gdy tworzące się metabolity nowych związków są związkami aktywnymi lub toksycznymi.

Metabolizm leku jest jednym z najważniejszych procesów farmakokinetycznych decydujących o szybkości jego eliminacji oraz stężeniu we krwi. Proces ten ma szczególne znaczenie w biotransformacji proleków do ich aktywnych metabolitów. Większość reakcji I fazy biotransformacji zachodzi z udziałem izoenzymów cytochromu P450, z których najbardziej istotne to CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 oraz CYP3A4 metabolizujące ponad 90% wszystkich leków. W świetle ciągle wzrastającej liczby nowych leków oraz polipragmatyki coraz częstszą przyczyną niepowodzeń terapii, bądź działań niepożądanych stają się interakcje międzylekowe. Są one często spowodowane zahamowaniem metabolizmu jednego leku przez drugi, a w konsekwencji zwiększeniem stężenia leków w osoczu (wzrost działań niepożądanych) lub zmniejszenia aktywacji proleków (nieskuteczność terapii).

1.2. Proleki – definicja i podział

Proleki są związkami będącymi „zamaskowanymi” formami aktywnie działających leków, zaprojektowanymi tak, aby ulegały enzymatycznej bądź chemicznej aktywacji w organizmie¹⁰⁻¹³. Pojęcie „proleków” wprowadził Adrien Albert w 1958 roku i określił je jako związki pozbawione aktywności farmakologicznej (lub posiadające nieznaczną aktywność biologiczną), które ulegają biotransformacji do terapeutycznie aktywnych metabolitów¹⁴. W większości przypadków, proleki są związkami strukturalnie podobnymi do aktywnych związków, zawierającymi jedynie proste chemiczne modyfikacje, mające zwiększyć ich „właściwości leko-podobne”. Zastosowanie proleków pozwala na połączenie właściwości farmakokinetycznych proleków i farmakodynamicznych aktywnych metabolitów, co stwarza ogromne możliwości terapeutyczne¹⁵. Niestety, przez wielu naukowców, koncepcja proleków używana jest jako „ratujące podejście post-hoc”, gdy ich oryginalna struktura nie wykazuje odpowiedniego profilu farmakokinetycznego¹⁶. Bardzo dobrym wskaźnikiem sukcesu proleków jest fakt, że około 10% wszystkich leków będących na rynku, można zakwalifikować do tej grupy. W 2008 roku, 33% wszystkich dopuszczonych leków niskocząsteczkowych można było zaliczyć do grupy proleków¹⁰. Według ostatnich sondaży, w 2009 roku, około 15% z listy 100 najlepiej sprzedających się leków niskocząsteczkowych można było zakwalifikować jako proleki¹⁷.

Proleki, w zależności od typu chemicznej modyfikacji cząsteczki aktywnej, można podzielić na dwie podgrupy:

1. Proleki związane z cząsteczką nośnika chemicznego (ang. *carrier-linked prodrugs*), gdzie uwolnienie substancji aktywnej następuje na skutek działania enzymów hydrolitycznych i oksydoredukcyjnych lub nieenzymatycznej hydrolizy (chemicznie). Idealny nośnik powinien być łatwo odszczepiany podczas aktywacji *in vivo*, a jego metabolity powinny być farmakologicznie nieaktywne, nietoksyczne oraz nieimmunogenne^{16,18}. Związki te można dalej podzielić ze względu na ich budowę na:
 - a. dwuczęściowe, gdzie nośnik jest przyłączony bezpośrednio do leku;
 - b. trzyczęściowe, gdzie nośnik przyłączony jest do leku za pomocą dodatkowego łącznika. Tego typu połączenia najczęściej stosuje się, gdy dwuczęściowa cząsteczka okazuje się niestabilna¹⁹;

- c. związki dwufunkcyjne (ang. *co-drugs*), składające się z dwóch związków aktywnych, połączonych ze sobą bezpośrednio lub za pomocą łącznika²⁰.
2. Proleki niezwiązane z cząsteczką nośnika (bioprekursory), przekształcane w organizmie (przez utlenienie, redukcję lub hydrolizę) do związków aktywnych lub do związków pośrednich, które dalej metabolizowane są do aktywnych metabolitów^{21,22}.

Inna klasyfikacja zakłada podział proleków ze względu na miejsce ich biotransformacji do aktywnego leku. Według niej wyróżniamy:

1. proleki I klasy, ulegające przemianom wewnątrzkomórkowym, jak np. niektóre przeciwwirusowe analogi nukleotydów lub niektóre statyny obniżające poziom cholesterolu;
2. proleki II klasy, ulegające aktywacji w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, głównie w obrębie przewodu pokarmowego lub w krążeniu ogólnoustrojowym^{23,24}.

1.3. Selektowna dystrybucja proleków

Jednym z celów stosowania proleków, obok zwiększenia rozpuszczalności, polepszenia wchłaniania, zapobiegania szybkiemu metabolizmowi i zmniejszenia toksyczności jest zmiana profilu dystrybucji związków^{21,25,26}. Idealna sytuacja w farmakoterapii byłaby taka, że lek jest dostarczony tylko do jego docelowego miejsca działania (tkanka, komórka), co zwiększa efektywność terapii oraz zmniejsza ogólnoustrojowe działania niepożądane. Strategia ta, mająca swe początki w teorii „magicznego pocisku” Paula Ehrlicha²⁷, może być osiągnięta co najmniej na cztery różne sposoby: przez bierne zwiększenie ilości związku w tkance, selektywną aktywację proleków w miejscu docelowego działania, selektywny transport proleków do tkanki docelowej oraz wiązanie leku ze specyficznymi przeciwciałami^{12,13}. Poniżej przedstawiono przykłady rozwijających się strategii, aby osiągnąć selektywną dystrybucję do mózgu, nerek, jelita grubego, nowotworów oraz wątroby.

1.3.1. Selektywna dystrybucja proleków do ośrodkowego układu nerwowego (OUN)

Selektywne dostarczanie leków do OUN, z powodu obecności bariery krew-mózg nie jest zadaniem łatwym. Zastosowanie proleków może zwiększyć biodostępność leków w mózgu dzięki zwiększonej lipofilności proleków, zastosowaniu tzw. „systemów dostarczania leków” oraz celowanej aktywacji lub transportu przez enzymy i transportery znajdujące się w mózgu²⁸⁻³⁶. Tradycyjnym podejściem zwiększającym zdolność przenikania związków do mózgu jest zwiększenie jego lipofilności, czego przykładem mogą być pochodne opioidowe. Morfina będąc związkiem hydrofilowym słabo przenika barierę krew-mózg, podczas gdy jej acetylowa pochodna (heroina) charakteryzuje się około 100-krotnie większą przenikalnością³⁷. Stosując tego typu strategię nie osiąga się jednak selektywnej dystrybucji związków do OUN, gdyż zwiększenie lipofilności powoduje zwiększenie dystrybucji związku w całym organizmie²⁸. Innymi dostępnymi strategiami zapewniającymi selektywną terapię OUN są chemiczne systemy dostarczania leków (ang. *Chemical Drug Delivery Systems* – CDS). Zasada ich działania, poza zwiększeniem lipofilności, polega na „zamykaniu” aktywnych leków w mózgu i zapobieganiu ponownemu przejściu przez barierę krew-mózg. Najbardziej znanym systemem tego typu jest połączenie aktywnego związku z lipofilowym ugrupowaniem kwasu 1,4-dihydro-N-metylonikotynowego (dihydrotrygoneliną). Związek ten, po rozmieszczeniu w organizmie jest utleniany z utworzeniem kationowego związku pośredniego, który z powodu wysokiej hydrofilności jest szybko eliminowany z krążenia systemowego, przy równoczesnym zatrzymaniu w OUN. Ponadto, wolna hydroliza proleku skutkuje spowolnionym uwalnianiem związku aktywnego w mózgu^{28,33}.

Interesującą strategią celowanej dystrybucji związków do OUN jest wykorzystanie endogennych transporterów aktywnie przenoszących związki przez barierę krew-mózg, głównie transporterów dla aminokwasów (LAT1) oraz glukozy (GLUT1). Transportery w OUN cechują się wysoką stereospecyficznością substratową, dlatego proleki transportowane przez te transportery muszą posiadać strukturę bardzo zbliżoną do naturalnych substratów transporterów lub posiadać przyłączoną cząsteczkę aminokwasu lub cukru będącego substratem białek transportujących. W obydwu przypadkach, lek jest enzymatycznie uwalniany w OUN po przejściu przez barierę krew-mózg³². Klasycznym

przykładem modyfikacji struktury leku, aby mogła być substratem transportera LAT1, jest dopamina oraz L-DOPA. Istotnie, α -karboksylowa pochodna dopaminy, L-DOPA jest dobrym substratem dla transportera LAT1. Po przejściu bariery krew-mózg L-DOPA jest metabolizowana do dopaminy przez dekarboksylazę aromatycznych aminokwasów, co zapewnia biodostępność dopaminy w neuronach mózgu³⁸. W terapii choroby Parkinsona L-DOPA stosowana jest w połączeniu z inhibitorem obwodowej dekarboksylazy aby zmniejszyć jej metabolizm na obwodzie.

1.3.2. Selektowna dystrybucja proleków do nerek

Istnieją co najmniej 3 skuteczne strategie, za pomocą których można osiągnąć selektywną dystrybucję proleków do nerek: połączenia leków z cukrami, aminokwasami lub kwasem foliowym³⁹. W ostatnich latach badania na temat selektywnej dystrybucji pochodnych cukrowych leków wykazały, że niektóre glikozylowane związki wykazują zwiększoną i selektywną dystrybucję nie tylko do wątroby, ale również do nerek. Suzuki i wsp.⁴⁰⁻⁴² otrzymali różne glikozylowe pochodne wazopresyny przyłączone przez grupę oktametylenową. Wyniki ich badań potwierdzają, że alkiloglikozydowa struktura (Gls-S-C8-) była niezbędna do selektywnej dystrybucji związku do nerki, a jej efektywność zależała od rodzaju reszty cukrowej przyłączonej do cząsteczki leku oraz rozmiaru i ładunku całej cząsteczki. Największą aktywność farmakologiczną wykazywały te połączenia, które miały najmniejszą masę cząsteczkową i były pozbawione ładunku⁴⁰. Strategia ta, wykorzystana została również przez Lin i wsp.^{43,44} do stworzenia proleków selektywnie dostarczających prednizolon do nerek. W tym celu zsyntetyzowano połączenia bursztynianu prednizolonu z glukozaminą oraz 2-deoksy-2-aminodiglukozą. Zastosowanie tych proleków powodowało mniejszą cytotoksyczność oraz większą dystrybucję leku do nerek.

Drugą strategią selektywnego dostarczania leków do nerek jest aktywacja proleków przez występujące w nerkach enzymy, takie jak L-dekarboksylaza aminokwasów oraz γ -glutamylotranspeptydaza³⁹. Już w latach 70 XX w. Wilk i wsp.⁴⁵ otrzymali γ -glutamylodopaminę (GGDA) i zaobserwowali, że stężenie dopaminy w nerkach po podaniu proleku było wyższe, niż po podaniu samej dopaminy, co świadczy o rozkładzie GGDA przez enzymy w nerkach. Selektownie dostarczana dopamina do nerek powodowała znaczny wzrost przepływu krwi przez nerki, lecz nie wpływała na pracę serca i ciśnienie tętnicze, a jej

stężenie w osoczu było bardzo niskie^{46,47}. Podobnie Su i wsp.⁴⁸ otrzymali N-acetylo-glutamylową pochodną prednizonu w celu zwiększenia selektywności jego dystrybucji do nerek i ograniczenia jego działań niepożądanych. Wyniki badań tych autorów wykazały, że w porównaniu do prednizonu, stężenie proleku w nerkach było wyższe, a towarzyszyło temu zmniejszona ilość incydentów osteoporozy wywołanej przez sterydy.

Receptory, związane z transporterami pochodnych kwasu foliowego, poza komórkami nowotworowymi, znajdują się również w nerkach. Badania nad połączeniami radioaktywnego kontrastu DTPA z kwasem foliowym wykazały, że związek był nie tylko wyłapywany przez komórki nowotworowe, lecz także cechował się selektywną dystrybucją do nerki⁴⁹⁻⁵¹.

1.3.3. Selektywna dystrybucja proleków do jelita grubego

Górna część układu pokarmowego charakteryzuje się dużą zawartością enzymów proteolitycznych, takich jak pepsyna, trypsyna, chymotrypsyna, endopeptydaza, czy karboksypeptydaza, jednakże jedynie w jelicie grubym pod wpływem mikroflory jelitowej wydzielana jest N-acetylo amidaza. Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy wiązań N-acetylowych pochodnych aminokwasów lub aminocukrów⁵².

Wykorzystanie pochodnych amidowych, hydrolizowanych przez amidazy obecne jedynie w jelicie grubym pozwoliło na syntezę kilku proleków selektywnie aktywowanych w jelicie grubym. Przykładem takich proleków jest dostępna na rynku sulfasalazyna, będąca amidem kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA, mesalazyna) z sulfapirydyną. Po podaniu doustnym lek ten dociera do jelita grubego, gdzie pod wpływem mikroflory bakteryjnej ulega redukcji i przekształceniu do aktywnego metabolitu - 5-ASA, odpowiedzialnego za działanie lecznicze⁵³. Najnowsze badania donoszą, że przeciwzapalne działanie aminosalicylanów związane jest ze zwiększeniem aktywności oksydazy hemowej w jelicie grubym, co prowadzi do syntezy bilirubiny oraz tlenku węgla⁵⁴. Jednakże reszta sulfopirydyny, używana jako nośnik dla 5-ASA, wchłania się całkowicie w jelicie grubym i jest odpowiedzialna za część działań niepożądanych leku^{55,56}. Podobnie 5-ASA, choć uważany za związek stosunkowo bezpieczny, jest silnym środkiem immunogennym oraz odpowiedzialnym za ostre zapalenie trzustki⁵⁷.

Poszukując związków o zwiększonej skuteczności oraz zmniejszonej toksyczności zastąpiono 5-ASA jego pochodną - 4-ASA (kwas 4-aminosalicylowy) cechującą się mniejszą

toksycznością, którą połączono z różnymi aminokwasami: glicyną, L-argininą⁵⁸, D-feniloalaniną oraz L-tryptofanem⁵⁵. Jednocześnie zastosowanie L-argininy, substratu do syntezy tlenu azotu, zaowocowało synergistycznym efektem przeciwzapalnym, przeciwobrzętkowym oraz antyoksydacyjnym⁵⁸. Także feniloalanina oraz L-tryptofan posiadają właściwości przeciwzapalne oraz zwiększają szybkość gojenia się ran⁵⁵. W celu zwiększenia efektywności leczenia chorób zapalnych jelita grubego Sheng i wsp.⁵⁹ stworzyli azowe połączenia 4-ASA z różnymi fenolami posiadającymi właściwości antyoksydacyjne.

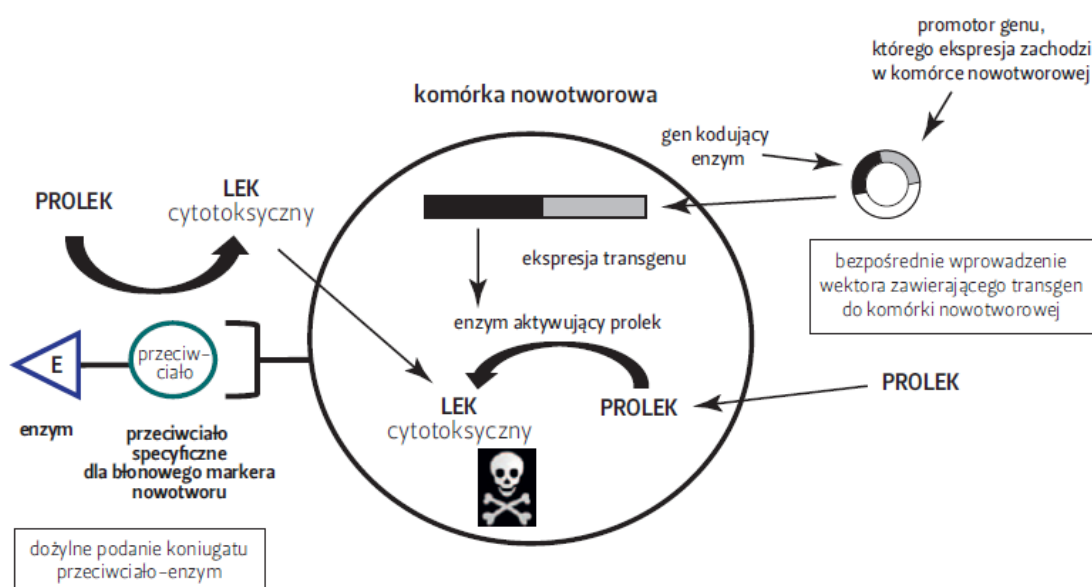
Strategia połączenia leków z aminocukrami wiązaniem amidowym została także wykorzystana przez Dhaneshwara i Gautama⁶⁰, którzy badali wpływ histaminy w patofizjologii przewlekłego wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Wykorzystując D-glukozaminę, jako nośnik, autorzy otrzymali pochodną terfenadyny, selektywnie hydrolizowaną w jelicie grubym, gdzie skutecznie zmniejszyła stan zapalny.

1.3.4. Celowana terapia nowotworowa za pomocą proleków

Spośród wszystkich strategii selektywnego dostarczania proleków do poszczególnych narządów bądź komórek, najbardziej rozwijaną i najczęściej stosowaną strategią jest selektywna dystrybucja związków do komórek nowotworowych. Komórki nowotworowe, w stosunku do otaczających ich zdrowych tkanek, charakteryzują się odmiennymi, specyficznymi receptorami i antygenami powierzchniowymi. Wykorzystanie tych różnic pozwala na zaprojektowanie proleków, selektywnie dostarczanych do komórek nowotworowych⁶¹ oraz wywierających działanie cytostatyczne tylko na komórki nowotworowe, bez szkody dla zdrowych tkanek^{13,62}. Właśnie potrzeba zmniejszenia ekspozycji zdrowych tkanek na działanie cytotoksyczne 5-fluorouracylu (5-FU) doprowadziła do powstania kapecytabiny - proleku, który jest aktywowany przez enzymy znajdujące się w komórkach nowotworowych⁶³⁻⁶⁵. Kapecytabina jest doustnym karbaminianem fluoropirymidyny, prekursorem 5-FU, którego biodostępność wynosi około 100%. Aktywacja tego proleku odbywa się w trzech etapach i ostatecznie uwalnianie aktywnego leku odbywa się głównie w komórkach nowotworowych, co ogranicza ogólnosystemową toksyczność leku^{66,67}.

Jedną ze strategii selektywnej terapii prolekami aktywowanymi przez selektywne enzymy w komórkach nowotworowych zakłada dostarczenie tych enzymów do komórek nowotworowych za pomocą przeciwciał lub genów^{68,69}. Najczęściej stosowane strategie

wykorzystują przeciwciała skierowane przeciwko specyficznym antygenom nowotworowym, sprzężone z enzymami aktywującymi proleki (ang. *antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT*)⁷⁰⁻⁷⁴ lub wektory selektywne dla komórek nowotworowych zawierające geny kodujące enzymy (ang. *gene-directed enzyme prodrug therapy, GDEPT*)⁷⁵. Jednocześnie, podawany jest nieaktywny prolek, który ulega aktywacji przez enzym selektywnie dostarczony do komórek nowotworowych⁶⁸ (**rycina 1.1**). Kilka związków wykorzystujących tego typu strategię znajduje się obecnie w badaniach klinicznych (m.in. EC0489 oraz EC0225 w I fazie badań klinicznych^{76,77} oraz Vindafolate w III fazie⁷⁸).



Rycina 1. 1. Ogólny schemat selektywnej terapii nowotworów, wykorzystujący systemy ADEPT (przeciwciała skierowane przeciwko specyficznym antygenom nowotworowym, sprzężone z enzymami aktywującymi proleki) oraz GDEPT (wektory selektywne dla komórek nowotworowych zawierające geny kodujące enzymy)²²

1.3.5. Selektywna dystrybucja proleków do wątroby

Selektywne dostarczanie proleków do wątroby, obok celowanej terapii nowotworowej, stanowi drugi najczęstszy przykład selektywnej dystrybucji proleków. Wśród stosowanych strategii trzeba wymienić między innymi wykorzystanie specyficznych receptorów znajdujących się na powierzchni komórek wątroby⁷⁹ oraz systemów enzymów metabolizujących leki, takich jak izoenzymy cytochromu P450^{80,81}. Dodatkowo, na powierzchni komórek wątrobowych znajdują się liczne białka transportujące, które mogą zostać wykorzystane do transportu proleków wybiórczo do wątroby, takie jak sodowo-zależne transportery kwasów żółciowych (NCTP), polipeptydy transportujące

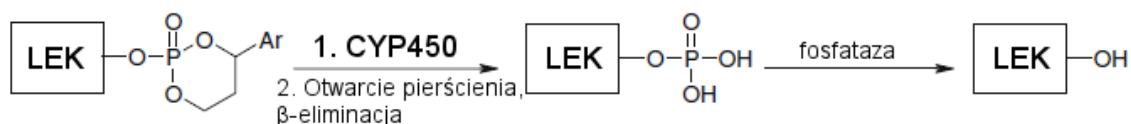
aniony organiczne (OATP), transportery kationów organicznych (OCT) oraz transportery anionów organicznych (OAT)^{82,83}.

Jedną z pierwszych strategii dostarczania związków bezpośrednio do hepatocytów zakładała połączenie leku z glikoproteinami lub glikolipidami rozpoznawalnymi przez receptory asialoglikoproteinowe obecne na hepatocytach⁸⁴⁻⁸⁷. Leki posiadające tego typu połączenia były wychwytywane przez hepatocyty na drodze endocytozy, gdzie następował rozpad połączenia leku z nośnikiem glikoproteinowym. Pomimo licznych sukcesów w badaniach przedklinicznych pochodne te nie są obecnie stosowane, głównie z powodu wysokich kosztów produkcji, a także reakcji immunologicznych na zastosowane nośniki⁸⁸. W celu pokonania tych ograniczeń zaproponowano kilka strategii wykorzystujących związki niskocząsteczkowe.

Najliczniejszą grupą proleków selektywnie aktywowanych w wątrobie przez izoenzymy cytochromu P450 stanowią cykliczne fosforany. Pierwsze z nich to cytostatyki z grupy oksazafosforinianów: cyklofosfamid (CPA), ifosfamid (IFA) oraz trofosfamid^{89,90}. Wiele izoenzymów (CYP4A4, CYP2C9 oraz CYP2B6 dla CPA; CYP3A4, CYP2B6 dla IFA oraz CYP3A4, CYP2A6, CYP2C9 oraz CYP2B6 dla trofosfamidu) bierze udział w hydroksylacji pierścienia oksazofosforinianowego tych proleków z utworzeniem niestabilnego produktu pośredniego, który następnie rozkłada się do aktywnych pochodnych iperytu oraz akroleiny⁹¹⁻⁹⁶. Związki te stosowane są w leczeniu różnych nowotworów, jednakże powodują liczne działania niepożądane – są nefrotoksyczne, urotoksyczne i neurotoksyczne. W poszukiwaniu bezpieczniejszych leków przeciwnowotworowych, badane ostatnio połączenia GDEPT z oksazafosforinianami: IFA/CYP2B11, CPA/CYP2B6 oraz CPA/CYP2B11 okazały się skuteczne w badaniach *in vivo*⁹⁷⁻⁹⁹. Jeden z obiecujących systemów retrowirusowych kodujący CYP2B6, MetXia, jako GDEPT aktywujący cyklofosfamid, obecnie znajduje się w II fazie badań klinicznych¹⁰⁰.

Wiedza na temat biotransformacji cyklofosfamidu oraz ifosfamidu pozwoliła na zaprojektowanie cyklicznych fosforanów oraz fosfonianów, które jako proleki aktywowane są przez izoenzymy cytochromu P450 w wątrobie z wysoką selektywnością^{88,101-105}. Pochodne te, zwane *HepDirect* są podstawionymi cyklicznymi estrami 1,3-propylofosforanów i fosfonianów, które metabolizowane są głównie w wątrobie (**rycina 1.2**). Pierwotnie, proleki typu *HepDirect* znalazły zastosowanie dla nukleozydów, które są szeroko stosowane w leczeniu infekcji wirusowych oraz białaczek. Podstawnik arylowy

w położeniu C4 uwrażliwia cząsteczkę na hydroksylację w położeniu C4 w sąsiedztwie atomu tlenu grupy fosforowej/fosfoniowej, która jest katalizowana przez izoenzym CYP3A4. Hydroksylacja skutkuje nieodwracalnym otwarciem pierścienia oraz utworzeniem negatywnie naładowanego produktu pośredniego, który zatrzymywany jest wewnątrzkomórkowo. Następnie w wyniku reakcji β -eliminacji uwolnione zostaje połączenie lek-fosforan/fosfonian wraz z produktem ubocznym, ketonem winylowo-arylowym. Wysoce elektrofilowy kation winylowo-arylowy jest silnie toksyczny, lecz jest szybko unieczynniany przez wewnątrzkomórkowy glutation¹⁰⁶. Otrzymany produkt, którym jest połączeniem fosforan/fosfonian-lek może być dalej metabolizowany przez fosfatazy obecne w hepatocytach do otrzymania alkoholowej pochodnej leku¹⁰⁷.



Rycina 1. 2. Schemat biotransformacji proleków o strukturze cyklicznych fosforanów w hepatocytach¹⁰⁷

Warto podkreślić, że jak dotąd już trzy pochodne cyklicznych proleków o strukturze typu *HepDirect* dotarły do badań klinicznych: pradefovir - prolek monofosforanu nukleozydu (NMP) adefowiru, MB07133 –prolek 5'-monofosforanu cytarabiny oraz MB07344 – agonista receptora hormonów tarczycowych.

Proleki typu *HepDirect* zastosowano podczas poszukiwania bezpiecznych leków przeciwwirusowych wykorzystujących jako substancję aktywną PMEAs (9-(2-fosfinylo-metoksyetylo)-adenina). Jednym z nich jest pradefovir - prolek monofosforanu nukleozydu (NMP) adefowiru^{104,108,109}. Jego stosowanie ograniczyło uwalnianie aktywnie działającego PMEAs w krążeniu ogólnym, co było przyczyną nefrotoksyczności adefowiru¹¹⁰ hydrolizowanego przez esterazy do PMEAs¹¹¹. Pradefovir wykazywał 12- oraz 84-krotne zwiększenie stężenia PMEAs w wątrobie w stosunku do nerek oraz jelit¹⁰¹, znacznie zmniejszając jego toksyczność¹¹². Pradefovir pomyślnie przeszedł II fazę badań klinicznych¹¹³, jednakże jego dalszy rozwój został wstrzymany z powodu niepożądanych działań zwiększających ryzyko nowotworów^{114,115}. Także przeciwnowotworowy związek będący pochodną cytarabiny MB07133 oraz hipolipidemiczny prolek MB07344, były lepiej tolerowane oraz wykazywały większą selektywność w stosunku do wątroby, niż leki macierzyste^{103,105}. Strategia proleków o budowie cyklicznych fosforanów została także

wykorzystana przy projektowaniu leków przeciwwirusowych, takich jak lamiwudyna oraz widarabina^{104,116}.

Wiele innych proleków, których docelowe miejsce działania jest pozawątrobowe, aktywowanych jest przez izoenzymy cytochromu P450 w wątrobie. Do tej grupy należą np. tienopirydyny, nabumeton, tamoksifen, flutamid, loratadyna, terfenadyna, losartan i wiele innych¹¹⁷. Także niektóre statyny, zawierające w swojej strukturze pierścień laktonowy, takie jak simwastatyna oraz lowastatyna są biopreursorami inhibitorów reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylu koenzymu A (HMG-CoA) stosowanymi w terapii hipercholesterolemii. Są one podawane jako nieaktywne, hydrofobowe pochodne, które przez izoenzymy cytochromu P450, głównie CYP3A4 przekształcane są do aktywnych pochodnych hydroksykwasów. Lipofilowe simwastatyna oraz lowastatyna są dobrze wchłanialne z przewodu pokarmowego i metabolizowane w wątrobie. Z powodu dużego efektu pierwszego przejścia, biodostępność proleków jest niewielka i wynosi jedynie 5%, podczas gdy pozostała ilość dawki jest aktywowana do aktywnych metabolitów^{118,119}.

Metabolizm wątrobowy i aktywacja proleków z udziałem izoenzymów cytochromu P450 ma swoje wady i zalety. Zaletą obok selektywnej dystrybucji proleków jest niewątpliwie zwiększenie wchłaniania oraz przedłużenie czasu działania leku. Wadą natomiast są liczne możliwe interakcje międzylekowe związane z aktywacją, lub zahamowaniem aktywności enzymów aktywujących proleki.

Obiecującą strategią obarczoną potencjalnie mniejszym ryzykiem interakcji międzylekowych jest selektywne dostarczanie proleków do wątroby przez białka transportujące. Strategię tą zastosowano dla nowej klasy związków przeciwcukrzycowych i zmniejszających stłuszczenie wątroby – inhibitorów destaurazy stearylo-CoA (SCD)¹²⁰. Ogólne stosowanie inhibitorów SCD, obok polepszenia profilu lipidowego oraz insulinowrażliwości^{121,122}, prowadziło również do efektów ubocznych – głównie łysienia plackowatego^{123–126}. W celu ograniczenia tych działań niepożądanych do cząsteczki inhibitora przyłączono kwas nikotynowy, który będąc substratem transportera OATP, znacznie zwiększył selektywną dystrybucję inhibitora SCD do wątroby.¹²⁰

Selektywną dystrybucję do wątroby wykazują również połączenia leków z kwasami żółciowymi. Kwasy żółciowe są wybiórczo wychwytywane z krążenia wrotnego oraz transportowane do hepatocytów przez specyficzne transportery dla kwasów żółciowych¹²⁷. Wysoka specyficzność systemu transportu kwasów żółciowych w wątrobie oraz jelicie

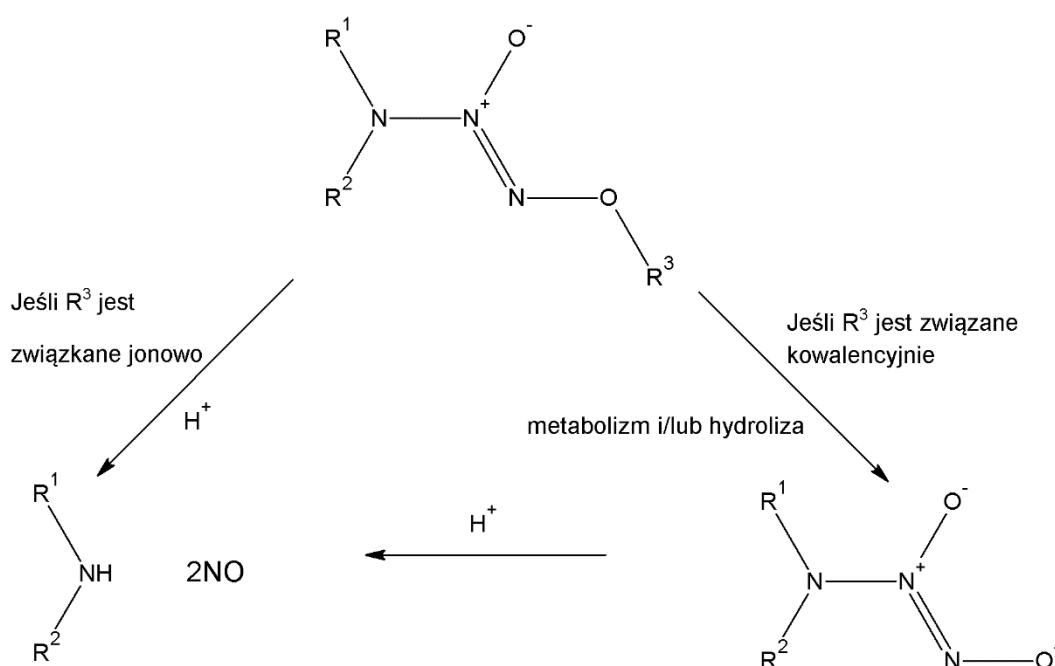
krętym zapewniła możliwość wykorzystania pochodnych kwasów żółciowych jako potencjalnych hepatoselektywnych proleków^{128–130}. Liczne przykłady połączeń leków, peptydów oraz oligonukleotydów do kwasów żółciowych w celu uzyskania selektywnego transportu do wątroby bądź jelita krętego zostały stworzone przez grupę Wernera Kramera oraz Güntera Wessa^{131–135}. Przebadano m.in. inhibitory reduktazy HMG-CoA, oksopropylpeptydy hamujące wątrobową syntezę kolagenu, leki przeciwnowotworowe – chlorambucil, krótkie, nierozgałęzione peptydy (zawierające do 10 reszt aminokwasowych) oraz oligonukleotydy. Przykładowo, związek, będący połączeniem kwasu żółciowego z chlarambucilem wchłaniał się w jelicie krętym oraz był wychwytywany przez wątrobę, zmieniając tym samym drogę eliminacji chlarambucilu z nerkowej na wątrobową¹³³. Związki będące połączeniem kwasu żółciowego oraz inhibitora reduktazy HMG-CoA wykazywały większą hepatoselektywność będąc transportowane przez transportery NTCP oraz ASBT¹³⁵. Pochodne zawierające oligopeptydy ulegały wchłanianiu z jelita cienkiego i były wydzielane przez wątrobę w postaci niezmienionej, aczkolwiek z niewielką wydajnością¹³⁴. Marin i wsp stworzyli także liczne połączenia kwasów żółciowych z cisplatyną zwane *Bamets*^{136,137} oraz gadolinem¹³⁸ stosowane jako hepatoselektywne kontrasty dla obrazowania rezonansem magnetycznym. Polli oraz wsp.¹³⁹ zaobserwowali dwukrotne zwiększenie biodostępności acyklowiru po podaniu doustnym, gdy ten był przyłączony do kwasu chenodeoksycholowego.

Ciekawym przykładem związku będącego pochodną kwasu ursodeoksycholowego z dodatkowym ugrupowaniem uwalniającym tlenek azotu (NO) jest NCX-1000. Związek ten został zaprojektowany, aby selektywnie uwalniać NO w wątrobie po metabolizmie zachodzącym w hepatocytach. Wykazano, że jest on preferencyjnie metabolizowany w wątrobie, nawet podczas jej uszkodzenia, zapewniając selektywne uwalnianie NO do mikrokrążenia wątrobowego¹⁴⁰. Liczne badania potwierdziły ochronne działanie NCX-1000 na wątrobę m.in. w modelach zwierzęcych nadciśnienia wrotnego^{140–143}, stłuszczenia wątroby¹⁴⁴ lub toksyczności wywołanej przez paracetamol¹⁴⁵. NCX-1000 okazał się jednak nieaktywny w leczeniu nadciśnienia wrotnego u ludzi, powodował zmniejszenie systemowego ciśnienia tętniczego oraz przepływu krwi przez wątrobę¹⁴⁶. Dodatkowo występowanie trzewnego odruchu wazokonstrykcyjnego w odpowiedzi na zmniejszone ciśnienie tętnicze sugerowało, że związek NCX-1000 nie wywierał działania wątrobowego, lecz raczej działanie ogólnoustrojowe¹⁴⁶. Prawdopodobną przyczyną nieskuteczności tego

związku była struktura proleku. Związek zawierał w swojej strukturze wiązania estrowe, które mogły być rozkładane przez esterazy obecne w innych tkankach, np. w jelitach¹⁴⁶.

1.4. Diolany diazoniowe – związki uwalniające NO

Diolany diazoniowe, zsyntetyzowane przez Keffera i wsp¹⁴⁷, charakteryzującą się różną kinetyką uwalniania NO dostosowaną do wielu wskazań terapeutycznych. Ogólna struktura diolanów diazoniowych, znanych jako NONOaty, przedstawiona jest na rycinie 1.3.



Rycina 1. 3. Ogólny schemat budowy diolanów diazoniowych. Na podstawie Keefer, 2003¹⁴⁸

Podstawienie grup R^1 , R^2 oraz R^3 trzema różnymi podstawnikami stwarza możliwość powstania ogromnej ilości związków o różnych właściwościach fizykochemicznych, różnej szybkości uwalniania NO oraz pochodnych o odpowiedniej strukturze zapewniającej selektywne jego uwalnianie^{147–149}.

Największe znaczenie dla właściwości związków ma grupa R^3 . Sole, których grupa R^3 przyłączona jest jonowo do atomu tlenu grupy diolanowej znalazły zastosowanie jako związki samoistnie uwalniające tlenek azotu z różną kinetyką uwalniania NO. W zależności od struktury grup R^1 oraz R^2 , ich okres półtrwania może wynosić od 2 sekund do 20 godzin¹⁴⁸. Dożylne podanie związku DEA/NO (dietyloamino-NONO), o okresie półtrwania wynoszącym 2 min powodowało znaczny, lecz krótkotrwały spadek ciśnienia

tętniczego krwi, podczas gdy 10 razy bardziej trwały analog SPER/NO (spermino-NONO) wywoływał niewielki efekt natychmiastowy, a raczej działanie odległe w czasie. Różna kinetyka uwalniania NO może znaleźć zastosowanie w różnych sytuacjach klinicznych. Podanie związku DEA/NO we wlewie do tętnicy szyjnej skutkowało natychmiastowym rozkurczem naczyń w modelu skurczu naczyń mózgowych, towarzyszącym krwotokowi podpajęczynówkowemu. Z kolei, interesującym przykładem zastosowania mieszanki polimerowej związku DETA/NO (dietylotriamino-NONO) ($t_{0.5}$ około 20 godz.) było zapobieganie skurczowi naczyń w szczurzym modelu pokrwotocznym przewlekłego skurczu tętnicy udowej. Materiały tego typu skutecznie zastosowano również w chirurgii naczyniowej. Umieszczenie ich na zewnętrznej powierzchni tętnicy szyjnej szczurów poddawanych angioplastyce balonowej znacznie polepszało gojenie się wewnętrznych powierzchni naczyń¹⁴⁷.

Spontaniczne tworzenie NO może mieć liczne korzyści terapeutyczne, jednakże konieczne jest selektywne dostarczenie NO do tkanek lub komórek docelowych, bez wpływania na naczynia krwionośne, co może skutkować działaniem hipotensyjnym. Cel ten można osiągnąć poprzez kowalencyjne przyłączenie różnych grup ochronnych do końcowego atomu tlenu w grupie $[N(O)NO^-]$. Specyficzność może zostać osiągnięta dzięki odpowiedniemu zastosowaniu grup ochronnych, które mogą zostać odłączone tylko w specyficznych warunkach pH lub aktywności enzymatycznej przeważającej w miejscach docelowych¹⁵⁰. O²-glikozylowana struktura DEA/NO okazała się odporna na hydrolizę w środowisku o neutralnym lub kwaśnym pH, podczas gdy w środowisku zasadowym szybko hydrolizowała z uwolnieniem NO¹⁴⁷. JS-K (pochodna zawierająca grupę dinitrofenolową) jest ciekawym przykładem związku o właściwościach przeciwnowotworowych, zaprojektowanym aby uwalniać NO wewnątrzkomórkowo po reakcji z glutationem^{151,152}. Zastosowanie grupy metoksymetylowej (MOM), jako grupy ochronnej wydłużyło czas spontanicznej hydrolizy diolanów diazoniowych o strukturze jonowej. Przykładem tego typu związku może być albumina wołowa, która po dołączeniu grup donorów NO, uwalniała około 40 moli NO z jednego mola białka, z okresem półtrwania równym 3 tygodnie¹⁴⁷.

1.5 V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, diolany diazoniowe uwalniające NO w wątrobie

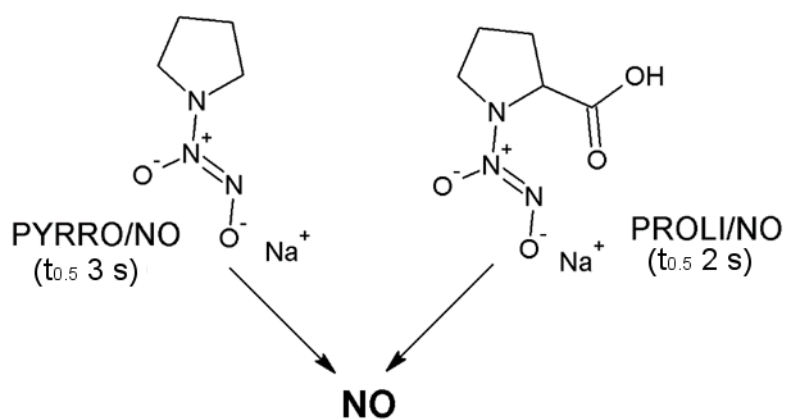
W warunkach fizjologicznych NO produkowany jest głównie przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS)¹⁵³. NO obok regulacji oporu naczyń wątrobowych¹⁵⁴ odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy wątroby. W istocie, szlaki sygnałowe zależne od NO/cGMP wywierają działanie przeciwzapalne oraz przeciwwłóknieniowe, poprzez zmniejszanie aktywacji komórek Browicza-Kupffera oraz wątrobowych komórek gwiaździstych¹⁵⁵. NO hamuje również aktywację kaspaz i związaną z nią apoptozę komórek wątrobowych¹⁵⁶. Co więcej, zdumiewająca zdolność regeneracyjna wątroby jest prawdopodobnie związana również z aktywnością NO¹⁵⁷.

NO jest ważnym czynnikiem regulującym metabolizm glukozy oraz lipidów¹⁵⁸. Zmniejsza odkładanie kwasów tłuszczowych poprzez zwiększenie ich katabolizmu oraz ograniczenie ich endogennej syntezy. Ponadto, NO reguluje metabolizm cukrów przez zwiększenie transportu oraz metabolizmu glukozy oraz hamowanie glukoneogenezy oraz odkładania glikogenu¹⁵⁸.

Zmniejszona synteza NO przez komórki śródbłonka zatok wątrobowych może prowadzić do aktywacji komórek gwiaździstych, a w następstwie rozwoju nadciśnienia wrotnego¹⁵⁹, zespołu niedrożności zatok wątrobowych¹⁶⁰, uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego¹⁶¹ oraz stłuszczenia wątroby¹⁶². W istocie, zakłócenie szlaków związanych z NO powoduje zmniejszenie poboru glukozy przez komórki, hiperglikemię przedposiłkową oraz rozwój insulinooporności^{163,164}.

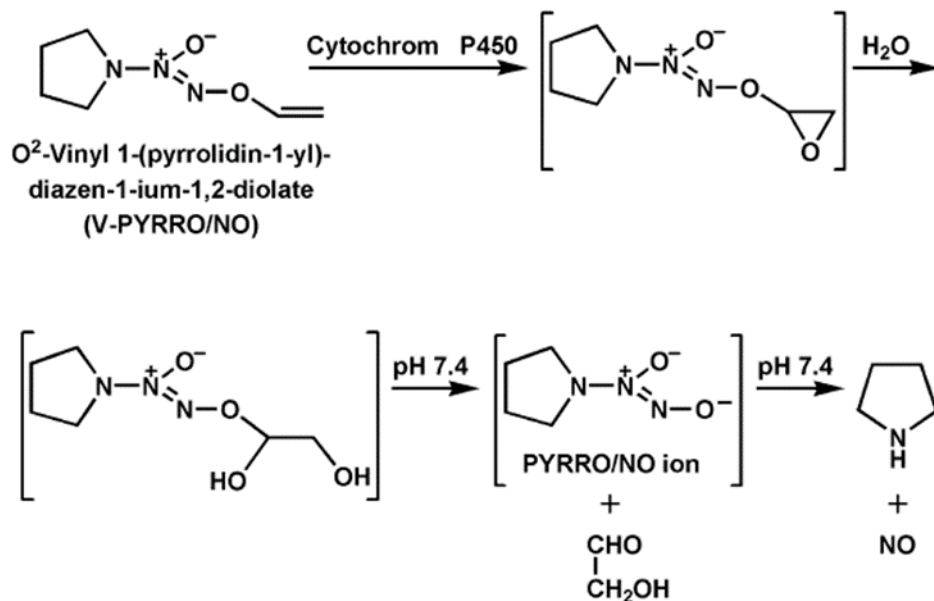
W tym kontekście, celowana terapia związkami uwalniającymi NO w wątrobie, wolnymi od ogólnoustrojowych działań niepożądanych, stanowi nowatorską strategię leczenia różnych schorzeń wątroby.

Wśród licznych przykładów diolanów diazoniowych istnieją dwa związki o podobnej strukturze, które selektywnie uwalniają NO w wątrobie pod wpływem metabolizmu z udziałem cytochromu P450. **Rycina 1.4** przedstawia struktury PYRRO/NO oraz PROLI/NO wraz z ich okresami półtrwania w roztworach wodnych.



Rycina 1. 4. Wzory strukturalne oraz okresy półtrwania ($t_{0.5}$) diastereomerów diazoniowych o budowie jonowej. Na podstawie Keffer, 2003¹⁴⁸ oraz Fitzhugh i Keefer, 2000¹⁴⁹

Istotnie, zmiana jonowo połączonej grupy R³ na kowalencyjnie połączoną grupę winylową powoduje zatrzymanie spontanicznej hydrolizy w wodzie oraz zapewnia selektywną dystrybucję związku do wątroby^{165,166}. Izoenzymy cytochromu P450 utleniają grupę winylową z utworzeniem epoksydów¹⁶⁷, które następnie hydrolizują spontanicznie lub za pośrednictwem hydrolaz epoksydowych¹⁶⁸ do spontanicznie uwalniających NO diastereomerów diazoniowych o strukturze jonowej PYRRO/NO oraz PROLI/NO,^{165,166}. Saavedra i wsp.¹⁶⁵ zaobserwowali, że metabolizm V-PYRRO/NO i uwalnianie NO ma miejsce w hepatocytach, lecz nie w komórkach Browicza-Kupffera, komórkach śródbłonna zatok wątrobowych, komórkach mięśniówki gładkiej ścian tętnic, komórkach śródbłonna naczyniowego oraz makrofagach, co potwierdza selektywność metabolizmu V-PYRRO/NO w hepatocytach. Uwalnianie NO nie było również hamowane przez inhibitor syntazy tlenu azotu, N^G-metylo-L-argininę, co wyklucza, że źródłem tlenu azotu była syntaza NO, lecz cząsteczka V-PYRRO/NO. Biotransformacja V-PYRRO/NO przez cytochrom P450 z zastosowaniem rekombinowanego izoenzymu CYP2E1 (**rycina 1.5**) została potwierdzona przez Inami i wsp.¹⁶⁹.



Rycina 1. 5. Schemat metabolizmu V-PYRRO/NO poprzez strukturę pośrednią PYRRO/NO do biologicznie aktywnego NO¹⁶⁹

W związku z selektywnym uwalnianiem NO w wątrobie, V-PYRRO/NO wykazywał działanie hepatoprotekcyjne w różnych modelach uszkodzenia wątroby, w tym w zapaleniu wątroby wywołanym przez TNF- α ¹⁶⁵, uszkodzeniach endotoksyną i galaktozaminą¹⁷⁰, a także toksycznością związaną z kadm^{171,172}, arsenem¹⁷³, paracetamolem^{174–176} i innych modelach^{156,177–181}. V-PYRRO/NO okazał się również skuteczny w zmniejszeniu zwłóknienia¹⁸², cholestazy¹⁸³ oraz poprawiał funkcje hemodynamiczne w nadciśnieniu wrotnym związanym z marskością wątroby^{159,184}, w zespole niedrożności zatok wątrobowych (SOS)¹⁸⁵ oraz w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym w wątrobie¹⁸⁶.

V-PROLI/NO jest analogiem V-PYRRO/NO mającym dodatkowe ugrupowanie karboksylowe, poprawiające rozpuszczalność proleku¹⁶⁶. Dzięki modyfikacji strukturalnej, produkty dekompozycji związku są naturalnie występującymi metabolitami¹⁸⁷, co zmniejsza potencjalną toksyczność związku. Dodatkowo, badania przeprowadzone z wykorzystaniem linii komórkowych hepG2 wykazały, że V-PROLI/NO jest substratem transporterów dla proliny oraz, w porównaniu do V-PYRRO/NO jest lepszym źródłem NO¹⁸⁸. Aktywność hepatoprotekcyjna V-PROLI/NO została jednak potwierdzona jedynie w badaniu *in vitro* w modelu toksyczności arsenu na komórki HepG2¹⁸⁹.

Podsumowując, V-PYRRO/NO stanowi prototyp związku uwalniającego NO selektywnie w wątrobie, a szereg badań wskazuje na jego skuteczność terapeutyczną.

Jednak metabolizm tego związku prowadzi do powstania toksycznego metabolitu (N-nitrozopirolidonu). Ostatnio zsyntetyzowano V-PROLI/NO, który wykazywał lepszy profil uwalniania NO w komórkach HepG2, więc był uważany za lepsze rozwiązanie, niż V-PYRRO/NO, tym bardziej, że metabolizowany jest do naturalnie występujących metabolitów proliny.

W tym kontekście zaskakujące okazały się wyniki badań przeprowadzonych w JCET, które wykazały lepszą skuteczność V-PYRRO/NO w porównaniu do V-PROLI/NO w odwracaniu stłuszczenia wątroby wywołanego dietą bogatotłuszczową u myszy. Wydawało się, że szczegółowa analiza profilu farmakokinetycznego oraz ocena metabolizmu tych związków jest jedynym sposobem, umożliwiającym wyjaśnienie różnic w działaniu farmakologicznym i dlatego ta obserwacja stała się punktem wyjścia do realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

2. Cel pracy

W toku wcześniej prowadzonych badań wykazano, że V-PYRRO/NO przeciwdziałał stłuszczeniu wątroby u myszy¹⁶², podczas gdy V-PROLI/NO, pomimo wyników wskazujących na lepszy profil uwalniania NO w badaniach *in vitro*¹⁸⁸, okazał się nieaktywny. Być może wyjaśnienie skuteczności działania V-PYRRO/NO i nieskuteczności V-PROLI/NO może leżeć w różnym profilu farmakokinetycznym tych związków.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było więc opracowanie i zwalidowanie metod, służących do badania metabolizmu dwóch związków uwalniających NO w wątrobie, V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, aby z wykorzystaniem tych metod przeprowadzić kompleksową analizę ich farmakokinetyki i metabolizmu. Zgodnie z tym zastrzeżeniem, pracę podzielono na dwie części. Część metodyczną, stanowiącą opis opracowanych metod badawczych, w szczególności tych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS oraz część aplikacyjną, w której wykorzystano opracowany zestaw metod do zbadania farmakokinetyki oraz metabolizmu dwóch proleków uwalniających NO w wątrobie.

W pierwszym etapie pracy doktorskiej opracowano i zwalidowano metody służące do badania farmakokinetyki i metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w modelach *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo*. Wśród opracowanych metod znalazły się metoda jednoczesnego oznaczania badanych związków w różnych matrycach biologicznych, metoda równoczesnego badania aktywności najważniejszych izoenzymów cytochromu P450 (metoda „koktajlu”) oraz technika pozwalająca na przewidywanie I fazy metabolizmu za pomocą elektrochemicznego utleniania, wszystkie wykorzystujące system LC/MS/MS.

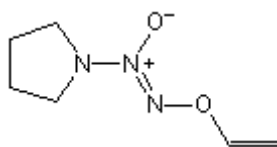
W drugiej części rozprawy doktorskiej zbadano profil farmakokinetyczny oraz metabolizm związków V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO *in vivo* po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków, *ex vivo* w modelu izolowanej perfundowanej wątroby myszy, *in vitro* wykorzystując frakcję mikrosomalną wątroby szczura oraz technikę elektrochemicznego utleniania.

Ponieważ profil farmakokinetyczny leków metabolizowanych w wątrobie zmienia się w stanach patologicznych wątroby, w przedstawionej pracy doktorskiej, zbadano również profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby wywołanym dietą bogatotłuszczową.

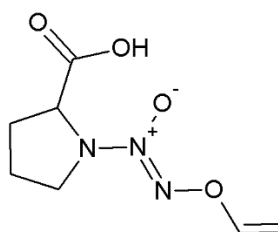
3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Badane związki



V-PYRRO/NO - $C_6H_{11}N_3O_2$ - O^2 -winylo-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolan



V-PROLI/NO - $C_7H_{11}N_3O_4$ - O^2 -winylo-[2-(karboksylato)pyrrolidin-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolan

Rycina 3. 1. Wzory strukturalne badanych związków V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO

Materiałem do badań były związki o strukturze przedstawionej na **rycinie 3.1**, otrzymane w Center for Cancer Research, National Cancer Institute przez grupę Prof. Larry'ego Keefer'a. Związki zostały zaprojektowane jako hepatoselektywne proleki uwalniające NO, po aktywacji zachodzącej przy udziale cytochromu P450.

3.1.2. Substancje wzorcowe

- Standardy wewnętrzne
 - 4'-hydroksymefenytoina (4-OH-MP) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).
 - Dekstorfan (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).
- Substraty modelowe oraz ich metabolity dla wybranych izoenzymów cytochromu P450
 - Fenacetyna (PN), acetaminofen (ACP), tolbutamid (TB), 4-hydroksytolbutamid (4-OH-TB), (RS)-mefenytoina (MP), S(+)-mefenytoina (S(+)-MP), 4-hydroksymefenytoina (4-OH-MP), bufuralol (BF), 1-hydroksybufuralol (1-OH-BF), chlorzoksazon (CH), 6-hydroksychlorzoksazon (6-OH-CH), midazolam (MZ), 1-hydroksymidazolam (1-OH-MZ), 4-hydroksymidazolam (4-OH-MZ) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).
- Inhibitory izoenzymów cytochromu P450
 - furafyllina, sulfafenazol, (+)-N-3-benzylirvanol, chinidyna, disulfiram, ketokonazol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).
- Inne substancje referencyjne
 - karwedilol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).

Wszystkie wymienione odczynniki były czystości HPLC.

3.1.3. Odczynniki

Acetonitryl czystości HPLC, kwas mrówkowy czystości LC/MS i metanol czystości HPLC zostały zakupione w Merck (Darmstadt, Niemcy). Ketamina, heparyna oraz isofluran zostały dostarczone przez PGF Cefarm (Kraków, Polska). Ksylazyna, chlorek sodu, chlorek wapnia, siarczan magnezu, wodorofosforan sodu, diwodorofosforan potasu, glukoza, kwas pirogronowy, EDTA, TRIS, chlorek potasu, sacharoza, wodorofosforan sodu, aceton, chlorek magnezu, NADPH, odczynnik Folin&Ciocalteu's, winian sodowo-potasowy czterowodny, siarczan miedzi, wodorotlenek sodu, wszystkie w czystości cz.d.a. zostały zakupione w Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Woda stosowana w badaniach została oczyszczona za pomocą systemu Milli-Q o przewodnictwie 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Millipore, Billerica, MA, USA).

3.1.4. Aparatura

Do realizacji założonego celu pracy wykorzystano następującą aparaturę:

- System składający się z ultrasprawnego chromatografu cieczowego Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) połączony z tandemowym trójkwadrupolowym spektrometrem mas TSQ Quantum Ultra (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).
- System składający się z ultrasprawnego chromatografu cieczowego Nexera (Shimadzu, Kyoto, Japonia) połączony z tandemowym trójkwadrupolowym spektrometrem mas QTrap 5500 (ABSciex, Framingham, MA, USA).
- Detektor elektrochemiczny ROXY złożony z pompy strzykawkowej potencjostatu elektrochemicznego oraz cienkowarstwowej celi elektrochemicznej ReactionCell™ z elektrodą pracującą Magic Diamond™, elektrodą odniesienia Pd/H₂, HyREF™ oraz elektrodą pomocniczą wykonaną z grafitu z dodatkiem teflonu (Antec Leyden, Zoeterwoude, Holandia).
- System do perfuzji narządów U-100 (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March Hugstetten, Niemcy).
- System do pomiaru NO_x ENO-20 (Eicom, Kyoto, Japonia).

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono stosując kolumny chromatograficzne:

- Kinetex PFP (2,6 μm 100 Å, 3 mm x 100, Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm, 3,0 x 100 mm, Waters, Milford, MA, USA)
- Kolumna separacyjna NO-PAK (4,6 x 50 mm Eicom, Kyoto, Japonia)
- Kolumna redukcyjna kadmowo-miedziowa NO-RED (Eicom, Kyoto, Japonia)

Ponadto stosowano:

- Łaźnia wodna z wytrząsaniem (Grant Instruments, Royston, UK)
- Ultrawirówka Sorval WX Ultra Series (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Homogenizator (IKA-Werke GmbH & Co. KG Staufen, Janke, Niemcy)
- Wytrząsarka próbek (Vortex, Grant Instruments, Royston, UK)
- Wirówka laboratoryjna z chłodzeniem Sigma 1-14 (Sigma Laborzentrifugen, Postfach, Niemcy)
- Analizator biochemiczny Pentra 400 (Horiba, Kyoto, Japonia).

3.1.5. Zwierzęta laboratoryjne

Mikrosomy wątroby pozyskiwano od szczurów szczepu Wistar, osobników męskich, dojrzałych w wieku 12 tygodni i o wadze 200-220 g, zakupionych w Zwierzętarni Wydziału Farmacji UJ CM (Kraków, Polska).

Badania farmakokinetyczne przeprowadzono w dwóch grupach zwierząt doświadczalnych:

- myszach zdrowych szczepu C57BL/6J, osobnikach męskich, dojrzałych, w wieku 6-8 tygodni, o masie ciała 20-25 g, zakupionych w Charles River Laboratories (Raleigh, Niemcy).
- myszach szczepu C57BL/6J z wywołanym stłuszczeniem wątroby, żywionych dietą bogatotłuszczową HFD (60 kcal% tłuszczu) przez 3 miesiące, począwszy od 6 tygodnia życia, o masie ciała około 50 g.

Zwierzęta trzymano w klatkach indywidualnie wentylowanych z zachowaniem stałych warunków temperatury (21-25°C) oraz wilgotności powietrza (40-65%) w standardowym cyklu światła i ciemności oraz dostępem do pożywienia i wody *ad libitum*. Wszystkie procedury dotyczące badań z zastosowaniem zwierząt laboratoryjnych przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej i po uzyskaniu zgody I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach działającej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.

3.1.6. Materiał biologiczny

- Mikrosomy wątroby szczura uzyskiwano stosując technikę wirowania różnicowego. Szczury uśmiercano przez dekapitację i pobierano wątroby, które umieszczano w 20 mM buforze TRIS o pH = 7,4 zawierającym 1,15% KCl (bufor TRIS/KCl) oraz dokładnie, kilkakrotnie płukano. Fragmenty wątrób umieszczano w nowej porcji buforu TRIS/KCl (1:4 w/v) oraz homogenizowano do uzyskania jednolitej postaci. Homogenat poddawano wirowaniu z szybkością 11 500 x g, w temperaturze 4°C przez 20 min, w celu oddzielenia frakcji jądrowej oraz mitochondrialnej (peleta). Supernatant (frakcja S9) przenoszono do nowych probówek oraz wirowano z szybkością 100 000 x g, w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Peletę zawieszano w 0,15 M KCl i ponownie wirowano z szybkością 100 000 x g,

w temperaturze 4°C przez 1 godzinę. Otrzymaną peletę mikrosomów rozpraszano w roztworze 0,25 M glukozy w 20 mM buforze TRIS o pH = 7,4 (1:5 w/v) i przechowywano w temperaturze - 80°C do czasu użycia w badaniach. Stężenie białka mikrosomalnego oznaczano metodą Lowry'ego¹⁹⁰, jako wzorzec stosując albuminę wołową.

- Osocze myszy otrzymywano po odwirowaniu pełnej krwi, pobieranej na heparynę, z szybkością wirowania 1000 rpm przez 10 min. Tak przygotowane osocze przechowywano w temp. - 20°C do czasu analizy.
- Wątroby myszy pobierano po dekapitacji zwierząt, przepłukiwano dokładnie buforem PBS (pH = 7,4) oraz przechowywano w temp. - 80°C do czasu analizy.
- Mocz myszy zbierano po umieszczeniu zwierząt w klatkach metabolicznych, pozwalających na rozdzielenie moczu i kału. Otrzymany materiał biologiczny wirowano z szybkością 1000 rpm w temp. pokojowej oraz przechowywano w temp. - 20°C do czasu analizy.
- Efluenty wątroby myszy zbierano podczas perfuzji narządowej oraz przechowywano w temp. - 80°C do czasu analizy.

3.1.7. Metoda wyodrębnienia analitów z materiału biologicznego

- Stężenia V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO oznaczano w osoczu, moczu, wątrobie, efluentach po perfuzji wątroby oraz próbkach po inkubacji z mikrosomami wątroby. Naważki wątroby (100 mg) dokładnie homogenizowano w buforze PBS w stosunku 1:5 (w/v) do uzyskania jednolitej postaci.

W celu precypitacji białek, do 50 µL próbki biologicznej (homogenat wątroby, osocze, mocz, mikrosomy wątroby, efluenty wątroby) dodawano 500 µL acetonitrylu (zawierającego standard wewnętrzny, 4-OH-MP o stężeniu 20 ng/mL). Próbkę umieszczano w lodówce na 20 min, po czym wirowano (15 000 x g, 15 min, 4°C). Na kolumnę chromatograficzną nanoszono 5 µL otrzymanego supernatantu.

- Jednoczesne oznaczenie metabolitów substancji modelowych wybranych izoenzymów cytochromu P450 przeprowadzano w próbkach mieszaniny po dodaniu 500 µL lodowatej mieszaniny acetonu i acetonitrylu (1:1 v/v), zawierającej standard wewnętrzny – dektorfan o stężeniu 250 ng/mL. Próbkę chłodzono na lodzie przez 20 min w celu strącenia białek i wirowano w temp. 4°C, 15 000 x g przez 15 min. Supernatant przenoszono

do naczynek chromatograficznych, po czym 20 μL nanoszono na kolumnę chromatograficzną.

- W celu jednoczesnego oznaczenia stężenia azotanów (III) i azotanów (V), próbki osocza strącano za pomocą metanolu w stosunku 1:1 (v/v). Próbki wątroby dokładnie homogenizowano z metanolem w stosunku 1:2 (w/v) do uzyskania jednolitej postaci. W kolejnym etapie próbki wirowano z szybkością 10 000 x g przez 10 min, a następnie 10 μL supernatantu nanoszono na kolumnę separacyjną.

3.2. Metody analityczne

3.2.1. Jednoczesne oznaczanie stężenia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w wybranych matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS

Stężenia badanych związków - V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w różnych matrycach biologicznych oznaczano techniką LC/MS/MS stosując system UFLC Nexera połączony z trójkwadrupolowym analizatorem mas QTrap 5500. Do rozdziału zastosowano kolumnę chromatograficzną Acquity UPLC BEH C18, stosując jako fazę ruchomą acetonitryl oraz wodę (45:55 v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego (0,1% v/v) w elucji izokratycznej. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,4 mL/min. Detekcję masową prowadzono w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji (MRM) w jonizacji dodatniej. Parametry źródła jonów były następujące: ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, napięcie przyłożone do igły 5000 V, temperatura źródła jonów 400°C, ciśnienia gazu pomocniczego 1 – 50 psi oraz gazu pomocniczego 2 – 15 psi. Jako gaz osłonowy oraz pomocniczy w systemie tym zastosowano azot.

3.2.2. Jednoczesne oznaczanie stężenia metabolitów substancji modelowych wybranych izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem systemu LC/MS/MS – metoda „koktajlu”

Zastosowano system złożony z ultrawysokosprawnego chromatografu cieczonego (UHPLC) UltiMate 3000 połączony z trójkwadrupolowym analizatorem mas TSQ Quantum Ultra. Rozdział chromatograficzny związków uzyskano na kolumnie analitycznej Kinetex PFP. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwasu

mrówkowego (faza A) oraz wody z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego (faza B) w elucji gradientowej. Przy szybkości przepływu fazy ruchomej 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, procentowa zawartość eluentu A w ciągu pierwszych 2 min wzrastała liniowo z 20% do 95%, pozostając w takim składzie przez 6 min, aby następnie wrócić do warunków początkowych w ciągu 3 min i pozostać w takim składzie przez kolejne 6 min. Całkowity czas analizy wynosił 15 min. W oznaczeniu zastosowano tryb jonizacji dodatniej dla wszystkich analitów, z wyjątkiem 6-hydroksychlorzoksanu, który oznaczano w trybie ujemnym. W pierwszym etapie poszukiwano jonów macierzystych, które następnie poddawano fragmentacji w komorze zderzeń spektrometru, poszukując najbardziej intensywnych jonów fragmentacyjnych oznaczanych substancji. Wybrane jony – macierzysty oraz potomny, wykorzystano tworząc metodę ilościową w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji. Parametry pracy spektrometru ustalono następująco: napięcie na igle 4020 V, temperatura odparowania 250°C, ciśnienia gazów osłonowego 30 psi, pomocniczego 10 psi, temperatura kapilary 370°C, ciśnienie gazu kolizyjnego (argon) w komorze zderzeń wynosiło 2 mTorr.

3.2.3. Metoda utleniania związków z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™

Utlenianie związków przeprowadzono w cienkowarstwowej celi elektrochemicznej wyposażonej w pracującą elektrodę diamentową (Magic Diamond™), elektrodę odniesienia Pd/H₂, HyREF™ oraz elektrodę pomocniczą wykonaną z grafitu z domieszką teflonu (Reactor Cell™). Potencjał elektrochemiczny wytwarzano za pomocą potencjostatu ROXY™. W celu obserwacji otrzymanych produktów utlenienia celę elektrochemiczną połączono bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru mas QTrap 5500.

W celu sprawdzenia metody, jako związek referencyjny wybrano karwedilol, z powodu znanej ścieżki dla procesów utleniania. Proces utleniania związku w celi elektrochemicznej obserwowano wykreślając woltamogramy masowe. Za pomocą pompy strzykawkowej dostarczano do celi elektrochemicznej 2,5 μM roztwór karwedilolu rozpuszczony w mieszaninie wody i acetonitrylu (1:1 v/v) z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego, ze stałą szybkością przepływu równą 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Potencjał elektrody pracującej zwiększano liniowo od 0 do 2000 mV, z szybkością 200 mV/min, dzięki czemu możliwe było rejestrowanie zmieniających się sygnałów widma masowego w zależności od wartości przyłożonego napięcia oraz uzyskanie odpowiednich woltamogramów masowych.

W celu dalszej analizy struktur produktów utlenienia karwedilolu, przeprowadzono fragmentację jonów potencjalnych metabolitów uzyskując odpowiednie widma fragmentacyjne. Proces ten wykonano po przyłożeniu stałego potencjału elektrochemicznego, równego 1500 mV. W celu potwierdzenia struktury metabolitów, otrzymane widma fragmentacyjne produktów utlenienia karwedilolu porównywano z widmem fragmentacyjnym związku macierzystego.

Wykonano również rozdział chromatograficzny otrzymanych produktów utlenienia karwedilolu na kolumnie analitycznej Kinetex PFP w elucji gradientowej stosując fazę ruchomą złożoną z metanolu oraz wody z dodatkiem 01% kwasu mrówkowego.

Dla wszystkich analiz stosujących detekcję masową parametry źródła jonów były następujące: potencjał rozgrupowujący 60 V, potencjał na wejściu 10 V, potencjał wyjścia z komory zderzeń 15 V, energia zderzeń 30 V, gaz osłonowy 30 psi, napięcie przyłożone do igły 5500 V, temperatura źródła jonów 200°C oraz gazy pomocnicze 1 – 30 psi oraz gaz pomocniczy 2 – 20 psi.

3.2.4. Oznaczanie stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) w próbkach biologicznych

Stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) oznaczano z zastosowaniem systemu ENO-20 opartego na chromatografii cieczowej wykorzystując postkolumnową derywatyzację odczynnikiem Griess'a. Rozdział chromatograficzny azotanów (III) oraz azotanów (V) zachodził na kolumnie analitycznej NO-PAK. W kolejnym etapie azotany (V) podlegały redukcji do azotanów (III) na kadmowo-miedziowej kolumnie redukcyjnej, a następnie jony NO_2^- reagowały z odczynnikiem Griess'a (kwas sulfanilowym i α -naftyloamina w kwasie octowym) tworząc barwne związki diazowe, których stężenie oznaczano spektrofotometrycznie, przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$. Przepływ fazy ruchomej (Carrier solution®, Eicom, Kyoto, Japonia) był równy 0,33 mL/min, a odczynnik Griess'a (Reagent solution®, Eicom, Kyoto, Japonia) dostarczano z szybkością 0,11 mL/min.

3.2.5. Walidacja metod bioanalitycznych

Opracowane metody bioanalityczne poddano walidacji. Proces ten oparty jest na szeregu powtórzeń, których celem jest udowodnienie wiarygodności badań poprzez sprawdzenie: selektywności, liniowości metody, odtwarzalności, powtarzalności, odzysku,

efektu matrycy oraz stabilności przygotowanych prób analitycznych. Walidację opracowanych metod przeprowadzano zgodnie z wytycznymi FDA oraz EMA¹⁹¹⁻¹⁹³.

Selektywność – określa zdolność metody do rozróżniania oraz ilościowego oznaczania badanego analitu w próbkach, w obecności innych substancji. Selektywność oznaczano przez sprawdzanie interferencji sygnałów analitów oraz sygnałów sześciu niezależnych matryc biologicznych.

Zakres metody oraz liniowość, określają odpowiedź detektora w zależności do stężenia analitu. Krzywe kalibracyjne dla oznaczanych metabolitów skonstruowano na podstawie ośmiu punktów kalibracyjnych oraz dopasowano za pomocą regresji liniowej metodą sumy najmniejszych kwadratów. W celu oceny liniowości, porównano otrzymane poprzez kalkulację zwrotną stężenia i stężenia teoretyczne. Tak policzone różnice nie powinny być większe od $\pm 15\%$, z wyjątkiem dolnej granicy oznaczalności, gdzie dopuszczalna jest różnica $\pm 20\%$.

Dokładność i precyzja opisują stopień zgodności otrzymanych wyników z nominalnymi stężeniami (dokładność) oraz powtarzalność indywidualnych oznaczeń analitu (precyzja). Dokładność metody bioanalitycznej badano oznaczając stężenie próbek kontrolnych: (LLOQ- dolna granica oznaczalności, LQC – niskie stężenie próbki kontrolnej, stężenie trzykrotnie wyższe od dolnej granicy oznaczalności, MQC – średnie stężenie próbki kontrolnej, wynoszące około 50% zakresu kalibracyjnego metody oraz HQC – wysokie stężenie próbki kontrolnej, wynoszące około 75% zakresu metody oraz porównując otrzymane wyniki z wartościami nominalnymi. Dokładność wyznaczono w obrębie jednej sekwencji analitycznej (dokładność wewnątrzseryjna) oraz pomiędzy kolejnymi sekwencjami (dokładność międzyseryjna) oraz przedstawiono jako procent wartości nominalnej, który nie powinien różnić się o więcej niż 15% od wartości nominalnych, z wyjątkiem dolnej granicy oznaczalności, gdzie dopuszczalne są różnice o $\pm 20\%$.

Precyzję metody wyznaczano, podobnie jak dokładność, dla czterech zakresów stężeń w jednej sekwencji (precyzja wewnątrzseryjna) oraz pomiędzy kolejnymi sekwencjami (precyzja międzyseryjna). Precyzję opisano jako współczynnik wariancji (CV) dla poszczególnych stężeń, które nie mogą przekraczać 15%, z wyjątkiem dolnej granicy oznaczalności, gdzie CV nie powinien przekraczać 20%.

Odzysk oraz absolutny efekt matrycy oceniono na podstawie dwóch zakresów stężeń, opowiadających niskiemu i wysokiemu stężeniu próbek kontrolnych poprzez

porównanie powierzchni otrzymanych pików dla roztworów analitów oraz próbek otrzymanych przez dodanie określonych stężeń analitów, przed i w procesie strącenia białek. Odzysk określa wydajność ekstrakcji i jest obliczany jako stosunek powierzchni otrzymanego pików (analit/standard wewnętrzny) dla powierzchni pików analitu dodanego przed i po strąceniu białek.

Podczas oceny efektu matrycy dla każdego rodzaju matrycy, dla którego przeprowadzano walidację, zastosowano próbki ślepe pochodzące od 6 różnych osobników. Bezwzględny efekt matrycy oszacowano przez porównanie powierzchni otrzymanych pików (analit/standard wewnętrzny) w próbkach, do których dodano anality po precypitacji białek oraz czystych roztworów analitów bez matrycy. Absolutny efekt matrycy określono jako:

$$\text{Bezwzględny efekt matrycy} = [1 - (P_{p.e.} / P_{n.s.}) \times 100\%], \quad (1)$$

gdzie $P_{p.e.}$ – oznacza powierzchnię pików próbki po dodaniu analitu, po precypitacji białek, $P_{n.s.}$ – oznacza powierzchnię pików dla roztworu analitu.

Oszacowano również względny efekt matrycy zgodnie z pracą Matuszewski¹⁹⁴ poprzez ocenę zmienności współczynników kierunkowych prostych, wyrażoną jako współczynnik wariacji (CV). Aby metoda mogła być uznana za wolną od względnego efektu matrycy, precyzja nie powinna być większa od 4%.

Zbadano również **stabilność analitów podczas przechowywania przygotowanych próbek** w autosamplerze, uwzględniając temperaturę autosamplera (10°C) oraz średni czas trwania analizy sekwencji próbek (24h). Badanie przeprowadzono dla dwóch zakresów stężeń (LQC oraz HQC), poprzez powtórny pomiar badanych próbek po przechowaniu ich przez 24 godziny w autosamplerze, w temp. 10°C i porównanie sygnałów analitów oraz standardu wewnętrznego z nowymi, świeżo przygotowanymi próbkami. Oznaczone anality uznawano za stabilne w przechowywanych próbkach, jeżeli, w porównaniu do stężeń próbek kontrolnych, uzyskane wyniki nie różniły się o więcej niż 20%.

3.3. Metodyka badań w warunkach *in vitro*

3.3.1. Procedura przygotowania mieszaniny inkubacyjnej substratów z mikrosomami wątroby szczura

Mieszanina inkubacyjna (500 μ L), zawierała 0,1 M bufor fosforanowy (pH=7,4), 10 mM $MgCl_2$, mikrosomy wątroby szczura (1 mg/mL) oraz mieszaninę substancji modelowych w stężeniach zbliżonych do K_m (fenacetynę 7,5 μ g/mL, tolbutamid 2,5 μ g/mL, bufuralol 12,5 μ g/mL, chlorzoksazon 2,5 μ g/mL oraz midazolam 7 μ g/mL). Reakcję zapoczątkowano po wcześniejszej 5 minutowej preinkubacji, dodając kofaktor NADPH (o końcowym stężeniu 1 mM). Po 10 min, reakcję przerywano dodając 500 μ L lodowatej mieszaniny acetonitrylu i acetonu w stosunku 1:1 v/v, zawierającej standard wewnętrzny – dektorfan, o stężeniu 250 ng/mL.

3.3.2. Optymalizacja warunków inkubacji

W celu optymalizacji warunków inkubacji substancji modelowych z mikrosomami wątroby szczura sprawdzano wpływ takich parametrów, jak czas inkubacji oraz stężenie białka enzymatycznego na metabolizm substancji modelowych. W tym celu zastosowano stałe stężenie białka mikrosomalnego (1 mg/mL), zmieniając czas inkubacji od 2 do 60 min oraz stały czas inkubacji (10 min), zmieniając stężenie białka enzymatycznego od 0,2 do 4 mg/mL.

3.3.3. Ocena kinetyki reakcji biotransformacji

Stężenia substancji modelowych wybierano na podstawie wartości stałej Michaelisa-Menten wyznaczonej podczas reakcji enzymatycznych. W tym celu przez 10 min inkubowano substancje modelowe w zakresie stężeń 0,5–60 μ g/mL, ze stałym stężeniem białka mikrosomalnego (1 mg/mL). Proces prowadzono do momentu wysycenia reakcji enzymatycznej. W celu wyznaczenia podstawowych parametrów kinetycznych sporządzono wykresy zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu i po dopasowaniu do odpowiedniego modelu kinetycznego wyznaczono wartości V_{max} oraz K_m . Reakcję prowadzono z zastosowaniem pojedynczych substratów izoenzymów

cytochromu P450 inkubowanych z frakcją mikrosomalną wątroby oraz w mieszaninie wszystkich substancji modelowych (koktajl), porównując uzyskane wartości parametrów kinetycznych. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów Michaelisa-Menten ($[S]$ - $[V]$), Lineweaver'a-Burk'a ($[1/S]$ - $[1/V]$), Eadie-Hofstee ($[V/S]$ - $[V]$) oraz Hanes'a-Woolf'a ($[S]$ - $[S/V]$).

Odpowiedni model kinetyki enzymatycznej wybrano na podstawie przebiegu profilu zależności szybkość reakcji od stężenia substratów oraz wykresów Eadie-Hofstee. Dane dopasowano do odpowiedniego modelu za pomocą oprogramowania GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA), parametry kinetyczne K_m oraz V_{max} obliczono za pomocą regresji nieliniowej korzystając z następujących równań:

a) Równania Michaelisa-Menten

$$V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (2),$$

w którym V oznacza szybkość reakcji, V_{max} – szybkość maksymalna, K_m – stała Michaelisa-Menten oraz S – stężenie substratu. Równanie to stosowane jest dla związków o hiperbolicznej kinetyce Michaelis'a-Menten.

b) Równania Hilla

$$V = \frac{V_{max} \times (S)^n}{K_m + (S)^n} \quad (3)$$

w równaniu tym n oznacza współczynnik Hilla, jako wskaźnik kooperacji (jeżeli $n > 1$ – kooperacja dodatnia, jeżeli $n < 1$ – kooperacja ujemna). Model stosowany w przypadku autoaktywacji.

c) Równania stosowanego w przypadku kinetyki dwufazowej

$$V = \frac{(V_{max(1)} \times S) + (Cl_{int(2)} \times (S)^2)}{[K_{m(1)} + S]} \quad (4)$$

Wartości K_m , V_{max} w tym równaniu dotyczą pierwszej części przebiegu profilu kinetycznego przypominającej kinetykę hiperboliczną, $Cl_{int(2)}$ oznacza klirens wewnętrzny związany z drugą częścią zależności szybkości reakcji od stężenia mającą przebieg liniowy.

d) W modelu inhibicji substratowej stosowane jest równanie:

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_i}} \quad (5)$$

gdzie K_i oznacza stałą inhibicji substratowej.

3.3.4. Badanie hamowania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem wybranych inhibitorów

W przeprowadzonych badaniach oceniono zdolność hamowania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 przez selektywne chemiczne inhibitory tych izoenzymów. W tym celu, do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej pojedyncze substancje modelowe dodawano wzrastające stężenia selektywnych inhibitorów izoenzymów (furafilina dla CYP1A2 o stężeniu 0,1–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sulfafenazol dla CYP2C9 o stężeniu 0,1–35,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (+)-N-benzylirwanol dla CYP2C19 o stężeniu 0,01–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, chinidyna dla CYP2D6 o stężeniu 0,5–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disulfiram dla CYP2E1 o stężeniu 0,5–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oraz ketokonazol dla CYP3A4 o stężeniu 0,25–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Zahamowanie aktywności izoenzymów obserwowano poprzez zmniejszenie stężenia powstających metabolitów substratów modelowych.

3.3.5. Walidacja metody jednoczesnej oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 za pomocą związku referencyjnego

Metodę jednoczesnej oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 sprawdzono poprzez badanie aktywności poszczególnych izoenzymów w obecności znanego inhibitora cytochromu P450. Jako związek referencyjny zastosowano ketokonazol, nieselektywny inhibitor izoenzymów cytochromu P450. Ketokonazol w zakresie stężeń od 0,3 do 37,5 μM dodawano do mikrosomów wątroby szczura, po uprzednim dodaniu substancji modelowych dla wybranych izoenzymów i inkubowano przez 10 min. Aktywność poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 wyrażono jako procent zmiany w stosunku do wartości początkowej, za którą przyjęto aktywność izoenzymów inkubowanych bez dodatku ketokonazolu. Dane dopasowano do sigmoidalnych krzywych hamowania, a wartości IC_{50} obliczono na podstawie równania Hilla za pomocą regresji nieliniowej, korzystając z oprogramowania GraphPad Prism 6.0. Otrzymane wyniki porównano z danymi literaturowymi.

3.3.6. Badanie metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach *in vitro* z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby szczura

3.3.6.1. Wyznaczenie podstawowych parametrów kinetycznych biotransformacji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby

W celu oceny kinetyki procesu metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO przeprowadzono inkubację badanych związków z frakcją mikrosomalną wątroby. Warunki inkubacji optymalizowano ustalając odpowiedni czas inkubacji oraz optymalną zawartość białka enzymatycznego. Wybrano takie parametry, w granicy których, reakcja biotransformacji badanych związków zachodziła liniowo. Skład mieszaniny inkubacyjnej był następujący: 0,1 M bufor fosforanowy (pH=7,4), 10 mM MgCl₂, mikrosomy wątroby szczura (1 mg/mL) oraz badane substancje V-PYRRO/NO lub V-PROLI/NO, w zakresie stężeń 0,5-50 μM. Mieszaninę preinkubowano w temperaturze 37°C w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 5 min, a następnie reakcję zapoczątkowano poprzez dodanie NADPH (kofaktor reakcji utleniania) o stężeniu 1 mM. Inkubację prowadzono przez 20 min, a następnie przerywano poprzez umieszczenie próbek w lodzie. W dalszym etapie przygotowania próbek, do 50 μL mieszaniny inkubacyjnej dodawano 500 μL lodowatego roztworu acetonitrylu, zawierającego standard wewnętrzny (4-OH-MP, o stężeniu 20 ng/mL) w celu strącenia białek.

3.3.6.2. Identyfikacja izoenzymów cytochromu P450 potencjalnie zaangażowanych w metabolizm V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO

W celu poznania głównych izoenzymów biorących udział w metabolizmie V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w mikrosomach wątroby szczura zastosowano inhibitory izoenzymów cytochromu P450. Do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej: 0,1 M bufor fosforanowy (pH=7,4), 10 mM MgCl₂, mikrosomy wątroby szczura (1 mg/mL) oraz badane substancje V-PYRRO/NO lub V-PROLI/NO w zakresie stężeń 0,5–50 μM, dodawano inhibitory poszczególnych izoenzymów w stężeniach zbliżonych do wartości IC₅₀, wyznaczonych w poprzednich badaniach: furafyliina (inhibitor CYP1A2) o stężeniu 1,5 μg/mL, sulfafenazol (inhibitor CYP2C9) o stężeniu 15 μg/mL, (+)-N-benzylirwanol

(inhibitor CYP2C19) o stężeniu 1 µg/mL, chinidyna (inhibitor CYP2D6) o stężeniu 15 µg/mL, disulfiram (inhibitor CYP2E1) o stężeniu 15 µg/mL oraz ketokonazol (inhibitor CYP3A4) o stężeniu 5 µg/mL.

3.3.6.3. Wyznaczenie aktywności izoenzymów cytochromu P450 w obecności V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO

W celu oceny aktywności izoenzymów cytochromu P450 w obecności V-PYRRO/NO lub V-PROLI/NO wykorzystano wcześniej przygotowaną metodę koktajlu. V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w zakresie stężeń od 0,1 µM do 1 mM inkubowano ze specyficznymi substratami poszczególnych izoenzymów cytochromu P450. Aktywność poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 oceniono na podstawie zmian stężenia metabolitów substratów cytochromu P450.

3.4. Metodyka badań w warunkach *in vivo*

3.4.1. Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu badanych związków u myszy

Badania farmakokinetyczne V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO przeprowadzono po jednorazowym dożylnym (*i.v.*) oraz dootrzewnowym (*i.p.*) podaniu analogów w dawkach 5 mg/kg m.c. (32 µmol/kg m.c.) oraz 6 mg/kg m.c. (29 µmol/kg m.c.) odpowiednio dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. Wyboru dawek dokonano na podstawie badań toksykologicznych¹⁹⁵. Zwierzęta usypiano za pomocą izofluranu o stężeniu 3-4% w 100% tlenie i dekapitowano w odpowiednich punktach czasowych: 0 (przed podaniem związku) oraz po 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120 oraz 240 min od podania badanych analogów. Krew pobierano do heparinizowanych probówek, które następnie wirowano przy szybkości obrotów 1000 rpm. Uzyskane osocze przenoszono do nowych jednorazowych probówek oraz zamrażano i przechowywano w temperaturze - 20°C do dalszej analizy. W trakcie eksperymentu pobierano również wątrobę, którą po przepłukaniu za pomocą buforu fizjologicznego PBS (pH = 7,4), zamrażano i przechowywano w temperaturze - 80°C do czasu analizy.

3.4.2. Wyznaczenie podstawowych parametrów eliminacji nerkowej badanych związków.

W celu zbadania klirensu nerkowego V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO, związki podawano myszom jednorazowo, dożylnie, w dawce 5 mg/kg m.c. dla V-PYRRO/NO oraz 6 mg/kg m.c. dla V-PROLI/NO. Następnie zwierzęta umieszczano pojedynczo w specjalnych klatkach metabolicznych, które umożliwiały oddzielenie wydalanego moczu oraz kału. Próbkę moczu zbierano w przedziałach czasowych 0-6, 6-12 oraz 12-24 godzin od podania związków oraz przechowywano w temperaturze - 20°C do czasu analizy.

3.5. Metodyka badań w warunkach *ex vivo*

3.5.1. Zastosowanie modelu izolowanej perfundowanej wątroby myszy do wyznaczenia współczynnika ekstrakcji wątrobowej V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO

Parametry eliminacji wątrobowej wyznaczano stosując model *ex vivo* izolowanej perfundowanej wątroby myszy. Zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (100 mg/kg) oraz ksylazyny (10 mg/kg). Następnie, po dootrzewnowym podaniu heparyny (0,8 mg/kg) oraz przecięciu powłok brzusznych zwierzęcia, delikatnie podwiązywano (umożliwiając przepływ krwi) żyłę wrotną (*vena portae hepatitis*) i żyłę główną dolną (*interior vena cava*) powyżej ujścia żyły nerkowej prawej (*vena renalis dextra*). Po przecięciu klatki piersiowej (bez naruszenia przepony) kaniulowano żyłę wrotną. Wątrobę przepłukiwano *in situ* natlenowanym buforem KHB (bufor Krebsa-Henseleita: 118,0 mM NaCl, 2,52 mM CaCl₂, 1,16 mM MgSO₄, 24,88 mM NaHCO₃, 1,18 mM KH₂PO₄, 4,7 mM KCl, 10,0 mM glukozy, 2,0 mM kwasu pirogronowego, 0,5 mM EDTA) o temp. 37°C przez ok. 2 min. Następnie po rozcięciu prawego przedsionka serca kaniulowano żyłę główną dolną. Kolejnym etapem była izolacja całego narządu oraz podłączenie wątroby do systemu perfuzji narządowej. Po początkowym okresie stabilizacji (ok. 15 min) dodawano do buforu perfuzyjnego badane związki, V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO o stężeniu 10 μM oraz 50 μM. Perfuzję prowadzono w trybie bez recyrkulacji przez 1 godzinę, stosując przepływ 3-4 mL/g wątroby. Próbkę efluentów zbierano w następujący sposób: próbki buforu wprowadzanego do wątroby, w odstępach 20 min; próbki efluentów po przejściu przez wątrobę: co minutę w okresie od 5-20 min perfuzji, a następnie co 10 min. Po

skończonym eksperymencie, wątrobę przepłukiwano buforem KHB, osuszano i ważono. Wątrobę oraz próbki efluentów przechowywano w temperaturze - 80°C do czasu analizy. Stopień uszkodzenia wątroby oceniano metodą makroskopową oraz przez pomiar aktywności enzymów wątrobowych: aminotransferazy alaninowej (ALT) oraz dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Aktywność enzymów wątrobowych w efluentach mierzono metodą spektrofotometryczną używając automatycznego analizatora biochemicznego Pentra 400, zgodnie z instrukcjami producenta.

Przeprowadzono również doświadczenie sprawdzające procent wiązania badanych związków (V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO) z aparaturą badawczą. W tym celu przeprowadzono eksperyment kontrolny, w którym w systemie perfuzji jednokrotnej (bez recyrkulacji) wypełniono oraz „perfundowano” system. Próbkę zbierano analogicznie, jak w eksperymentach z zastosowaniem izolowanej wątroby. W próbkach buforów przed i po przejściu przez dreny aparatury oznaczono stężenia badanych substancji.

3.6. Metodyka przewidywania metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO

3.6.1. Przewidywanie metabolizmu związków w warunkach *in silico* za pomocą oprogramowania PALLAS

Pierwszym etapem badań metabolizmu nowych związków było komputerowe przewidywanie biotransformacji badanych analogów. W tym celu przeprowadzono symulację metabolizmu za pomocą dostępnego oprogramowania PALLAS z zastosowaniem modułów ‘MetabolExpert’ oraz ‘RetroMex’. Uzyskane struktury potencjalnych metabolitów porównano z zaproponowanymi przez innych autorów^{165,169,189}.

3.6.2. Badanie procesów utleniania z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™ w połączeniu z systemem MS/MS

W celu symulacji procesu utleniania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO zastosowano detektor elektrochemiczny ROXY. Urządzenie to składa się z cienkowarstwowej celi reakcyjnej – ReactionCell™, kontrolowanej przez potencjostat ROXY™. Proces utleniania elektrochemicznego badanych związków zachodził na elektrodzie pracującej Magic Diamond™ (MD) z użyciem elektrody HyREF™ (Pd/H₂) jako elektrody odniesienia. Wszystkie

pomiary przeprowadzono z zastosowaniem trójkwadrupolowego analizatora mas QTRAP 5500.

W celu obserwacji elektrochemicznego utleniania badanych związków, roztwory V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO (50 μM) w mieszaninie acetonitrylu i wody (1:1 v/v) z dodatkiem kwasu mrówkowego dostarczano do celi ze stałą szybkością 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ za pomocą pompy strzykawkowej. Poprzez zmianę napięcia przykładanego do elektrod w zakresie od 0-3000 mV (200 mV/min), rejestrując widma masowe, otrzymano voltammogramy masowe, przedstawiające intensywność jonów analizowanych związków w zależności od przyłożonego napięcia. Parametry źródła jonów były następujące: ciśnienie gazu osłonowego 20 psi, napięcie przyłożone go igły 5500 V, temperatura źródła jonów 100°C, ciśnienia gazów pomocniczych 20 psi, napięcia rozgrupowujące 40 V oraz napięcie na wyjściu 10 V.

Celem charakterystyki struktury uzyskanych produktów utlenienia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO przeprowadzono fragmentację otrzymanych jonów. Eksperyment prowadzono przy stałej wartości napięcia wynoszącej 2000 mV. Jony otrzymanych cząsteczek poddawano fragmentacji zbierając widna MS^2 oraz MS^3 , które następnie porównywano z widmami fragmentacyjnymi cząsteczek macierzystych. Na podstawie różnic w otrzymanych sygnałach masy do ładunku (m/z) podjęto próbę identyfikacji struktury powstałych potencjalnych metabolitów V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO.

3.7. Obliczenia farmakokinetyczne

Podstawowe parametry farmakokinetyczne badanych związków wyznaczono metodą niezależną od modelu za pomocą oprogramowania Phoenix WinNonlin (Certara, USA).

Stałą eliminacji pierwszego rzędu (λ_z) obliczono metodą regresji liniowej zależności logarytmu stężenia od czasu zgodnie z równaniem:

$$\lambda_z = -2,303a \quad (6)$$

gdzie a jest współczynnikiem kierunkowym prostej.

Dla każdej substancji, pole pod krzywą stężenie – czas (zerowy moment krzywej stężenie – czas), ekstrapolowane do nieskończoności ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) obliczono metodą trapezów (równanie 7), gdzie C_n – jest ostatnim zmierzonym stężeniem.

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i + C_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) + \frac{C_n}{\lambda_z} \quad (7)$$

Pole pod pierwszym momentem krzywej ($AUMC_{0 \rightarrow \infty}$) obliczono za pomocą równania 8:

$$AUMC_{0 \rightarrow \infty} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{t_i \times C_i + t_{i+1} \times C_{i+1}}{2} \right) \times (t_{i+1} - t_i) + \frac{t_n \times C_n}{\lambda_z} + \frac{C_n}{\lambda_z^2} \quad (8)$$

Średni czas przebywania leku w organizmie (MRT) obliczono z równania 9:

$$MRT = \frac{AUMC_{0 \rightarrow \infty}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (9)$$

Klirens całkowity (Cl_T) oraz objętość dystrybucji (V_d) obliczono według równań 10 i 11:

$$Cl_T = \frac{D_{i.v.}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}} \quad (10)$$

$$V_d = \frac{D_{i.v.}}{C_0} \quad (11),$$

gdzie $D_{i.v.}$ jest podaną dożylnie dawką związku, a C_0 – stężeniem początkowym.

Biodostępność (F) V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po podaniu dootrzewnowym obliczono za pomocą równania 12:

$$F = \frac{AUC_{i.p.}}{AUC_{i.v.}} \times 100\% \quad (12)$$

Parametry eliminacji nerkowej obliczono na podstawie ułamka podanej dawki związku wydalonej w sposób niezmienny z moczem (f_R):

$$f_R = \frac{Ae^\infty}{D_{i.v.}}, \quad (13)$$

Gdzie f_R jest ułamkiem eliminowanej dawki związku, Ae^∞ - jest całkowitą ilością badanego związku oznaczoną w moczu.

Klirens nerkowy (Cl_R) V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO obliczono w następujący sposób:

$$Cl_R = f_R \times Cl_T \quad (14)$$

$$Cl_R = \frac{Ae^\infty}{AUC_0^\infty} \quad (15)$$

Współczynnik ekstrakcji wątrobowej (E) V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO obliczono na podstawie stężeń badanych związków w próbkach buforów po perfuzji narządowej:

$$E = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}}, \quad (16)$$

gdzie C_{in} – oznacza stężenie związków w buforze perfuzyjnym wprowadzanym do wątroby, C_{out} – stężenie związków w buforze perfuzyjnym po przejściu przez wątrobę, skorygowane o procent wiązania z aparaturą badawczą.

3.8. Obliczenia statystyczne

Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM. Ocenę normalności rozkładu oraz jednorodności wariancji przeprowadzono za pomocą odpowiednio testu Shapiro-Wilka oraz testu Flingera-Killeena. Do oceny istotności różnic dla $p < 0,05$ wykorzystano testy t-studenta oraz nieparametryczny test Manna-Whitney'a.

4. Wyniki

4.1. Część I – opracowanie i walidacja metod

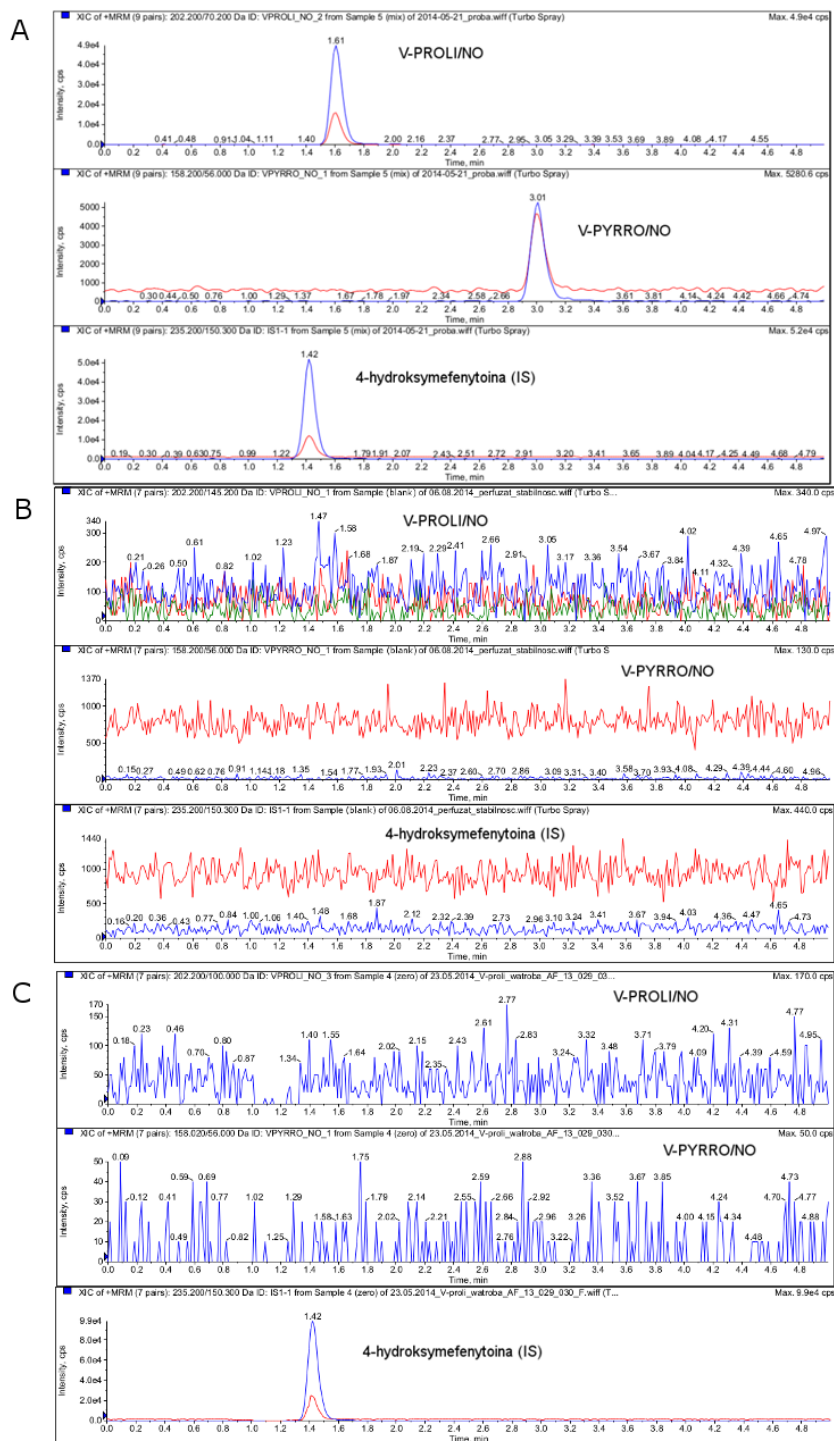
4.1.1. Opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczenia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w wybranych matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS

Opracowane warunki detekcji masowej pozwoliły na skonstruowanie metody bioanalitycznej. Monitorowane przejścia jonowe wraz z wartościami energii zderzeń oraz napięciami dla analitów zebrano w **tabeli 4.1**, natomiast na **rycinie 4.1** przedstawiono przykładowe chromatogramy wybranych jonów dla V-PYRRO/NO, V-PROLI/NO oraz 4-OH-MP, stosowanego jako wzorzec wewnętrzny, chromatogram próbki ślepej nie zawierającej analitów oraz próbki zerowej zawierającej standard wewnętrzny. Nie zauważono żadnych interferencji na chromatogramach w czasach retencji oznaczanych związków oraz wzorca wewnętrznego podczas analizy matryc pochodzących z sześciu niezależnych źródeł (stosunek sygnału do szumu < 9).

Tabela 4. 1. Monitorowane przejścia jonowe wraz z napięciami oraz energiami zderzeń dla oznaczanych analitów

Związek	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
V-PYRRO/NO	158	56	50	8	5	25
	158	70	50	8	20	25
V-PROLI/NO	202	100	50	8	5	5
	202	70	50	8	15	5
4-OH-MP (IS)	235	150	110	10	25	25
	235	133	110	10	20	25

DP – napięcie rozgrupowujące; EP - napięcie na wejściu; CE – energia zderzeń, CXP – napięcie wyjścia z komory zderzeń



Rycina 4. 1. Przykładowy chromatogram masowy dla V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO o stężeniu 1 μ M oraz 4-OH-MP o stężeniu 20 ng/mL (85,47 nM) (A), próbki ślepej nie zawierającej analitów (B) oraz próbki zerowej zawierającej IS o stężeniu 20 ng/mL (C)

Opracowana metoda równoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO była liniowa w zakresie stężeń 0,05-15 μ M (8 punktów kalibracyjnych) zarówno dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. W **tabeli 4.2** przedstawiono zakres liniowości dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w pięciu analizowanych matrycach biologicznych oraz

wartości dokładności metody dla wszystkich punktów kalibracyjnych. Najlepsze dopasowanie krzywej wzorcowej dla badanych analitów otrzymano za pomocą regresji liniowej przy zastosowaniu współczynnika ważenia $1/x$. Otrzymane współczynniki korelacji krzywych były wyższe od 0,995.

Wyznaczone wartości dokładności i precyzji metody dla każdej z matryc biologicznych przedstawiono w **tabeli 4.3**. Wartości względnego odchylenia standardowego (RSD %) dla V-PYRRO/NO wynosiły od 3,1% do 16,1% w jednym dniu oraz od 1,5% do 14,2% między dniami, natomiast dla V-PROLI/NO od 3,3% do 19,6% w jednym dniu oraz od 3,4% do 15,2% między dniami analizy. Stopień zgodności uzyskanych wyników z wartościami oczekiwanymi wynosił dla V-PYRRO/NO od 83% do 109,5% w jednym dniu i od 79,6% do 113,8% między dniami, natomiast dla V-PROLI/NO od 90,9% do 108,6% w jednym dniu oraz od 90,1% do 105,3% dla analizy wykonywanych w różnych dniach.

W **tabeli 4.4** przedstawiono wartości odzysku oraz efektu matrycy dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. Zastosowanie strącenia białek jako metody oczyszczenia próbek pozwoliło na osiągnięcie wysokiego odzysku analitów mieszczącego się w granicach 80-120%. Bezwzględny efekt matrycy dla obu analitów nie przekraczał wartości 20% dla próbek osocza, homogenatów wątroby, mieszaniny mikrosomów wątroby oraz efluentów z wątroby. Zaobserwowano wysoki efekt matrycy dla próbek moczu wynoszący -192% oraz -180%, odpowiednio dla niskich i wysokich stężeń V-PYRRO/NO oraz -264% i -174%, dla niskich i wysokich stężeń V-PROLI/NO. Wartości współczynników zmienności nachylenia krzywych kalibracyjnych, będące miarą względnego efektu matrycy nie przekraczały 4% dla obu badanych związków we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy.

Tabela 4.5 przedstawia wyniki badania trwałości oznaczanych analitów. Stężenia związków w próbkach biologicznych, przechowywanych w autosamplerze przez 24 h nie uległy zmianie o więcej niż 20% wartości nominalnej, co wskazuje, że badane próbki są stabilne podczas 24 godzinnej analizy.

Tabela 4. 2. Liniowość i dokładność metody oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy

V-PYRRO/NO					
Stężenie nominalne [μM]	Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
	Dokładność (%)				
0,05	98	87,9	80,6	95,3	88,0
0,1	97,9	100,4	110,5	70,4	109,0
0,25	95,4	104,2	97,9	115,2	78,9
0,5	99,6	107,7	107,6	102,3	99,3
1,0	85,2	99,6	103,9	99,2	104,0
5,0	106,3	104,8	98,9	91,1	103,0
10,0	103,9	91,7	101,9	91,2	94,5
15,0	93,7	103,7	98,6	97,5	102,0
V-PROLI/NO					
Stężenie nominalne [μM]	Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
	Dokładność (%)				
0,05	89,5	98,1	85,7	118,5	87,5
0,1	99,3	91,8	103,8	106,2	101,0
0,25	98,6	100,9	101,2	104,6	103,8
0,5	104,3	102,5	98,5	90,4	105,2
1,0	112,8	108,5	107,6	89,4	102,3
5,0	88,8	98,2	100,3	88,7	101,4
10,0	111,7	99,7	110,2	93,0	99,1
15,0	95,0	100,2	92,6	109,3	99,8

Tabela 4. 3. Wartości precyzji i dokładności metody wyznaczone w jednym dniu i między dniami dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy

Parametr		V-PYRRO/NO					V-PROLI/NO				
		Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby	Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
Precyzja w jednym dniu (RSD%) n=5	LLOQ	12,7	9,4	16,1	10,7	4,4	11,9	3,3	4,1	19,6	9,4
	LQC	3,1	6,8	10,5	5,4	11,7	11,1	7,5	7,8	10,6	3,6
	MQC	8,5	4,3	3,7	10,7	3,3	10,4	5,0	3,4	6,1	4,6
	HQC	6,9	5,4	10,4	4,7	4,5	7,9	4,2	8,5	3,2	5,1
Dokładność w jednym dniu (%) n=5	LLOQ	101,8	89,1	97,8	83,0	83,7	108,6	103,3	107,2	98,3	96,4
	LQC	109,5	92,9	99,0	104,1	98,7	103,3	99,6	98,3	96,2	99,9
	MQC	94,9	90,0	88,2	102,2	100,0	103,1	106,0	97,8	90,9	101,9
	HQC	89,4	87,8	92,0	93,8	101,5	102,3	107,2	96,9	97,1	105,4
Precyzja między dniami (RSD%) n=10	LLOQ	12,2	7,7	16,1	1,5	6,1	12,9	6,0	7,5	15,2	11,0
	LQC	11,2	5,2	11,3	13,6	10,4	9,7	8,6	7,4	9,5	7,6
	MQC	8,4	5,1	6,7	13,7	8,6	10,7	7,5	3,4	9,7	6,9
	HQC	14,2	6,8	8,2	6,3	8,4	5,8	8,8	8,4	7,6	8,5
Dokładność między dniami (%) n=10	LLOQ	102,7	98,0	97,9	79,6	85,3	103,1	101,7	105,3	90,1	91,3
	LQC	102,5	92,3	98,0	113,8	103,8	99,7	97,4	103,8	104,3	95,4
	MQC	99,3	94,1	92,7	107,7	95,0	98,5	101,5	97,9	103,7	95,9
	HQC	99,2	93,9	91,4	91,7	96,3	100,4	102,6	98,2	101,6	95,3

LLQC – dolna granica oznaczalności (0,1 µM); LQC – niskie stężenie kontrolne (0,3 µM), MQC – średnie stężenie kontrolne (7 µM), HQC – wysokie stężenie kontrolne (14 µM)

Tabela 4. 4. Odzysk oraz efekt matrycy dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy

		V-PYRRO/NO				
		Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
Odzysk [%] n=6	LQC	115	117	120	110	102
	HQC	100	120	116	120	97
Bezwzględny efekt matrycy [%] n=6	LQC	10	-192	12	5	1
	HQC	11	-180	8	19	-5
Względny efekt matrycy [%] n=6		2,7	2,6	3,0	1,7	3,9
		V-PROLI/NO				
		Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
Odzysk [%] n=6	LQC	87	98	91	108	104
	HQC	94	95	96	98	99
Bezwzględny efekt matrycy [%] n=6	LQC	3	-246	-9	-11	3
	HQC	-6	-174	-10	6	-5
Względny efekt matrycy [%] n=6		2,4	4,4	3,3	3,4	2,4

Tabela 4. 5. Stabilność V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w próbkach po 24 h przechowywania w autosamplerze w temp. 10°C

		V-PYRRO/NO				
		Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
Stabilność w autosamplerze [%] n=6	LQC	100	96	93	83	114
	HQC	83	84	85	80	114
		V-PROLI/NO				
		Osocze	Mocz	Homogenat wątroby	Mieszanina inkubacyjna	Efluenty wątroby
Stabilność w autosamplerze [%] n=6	LQC	101	103	98	96	99
	HQC	101	99	95	95	96

4.1.2. Opracowanie metody oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 – „metoda koktajlu”

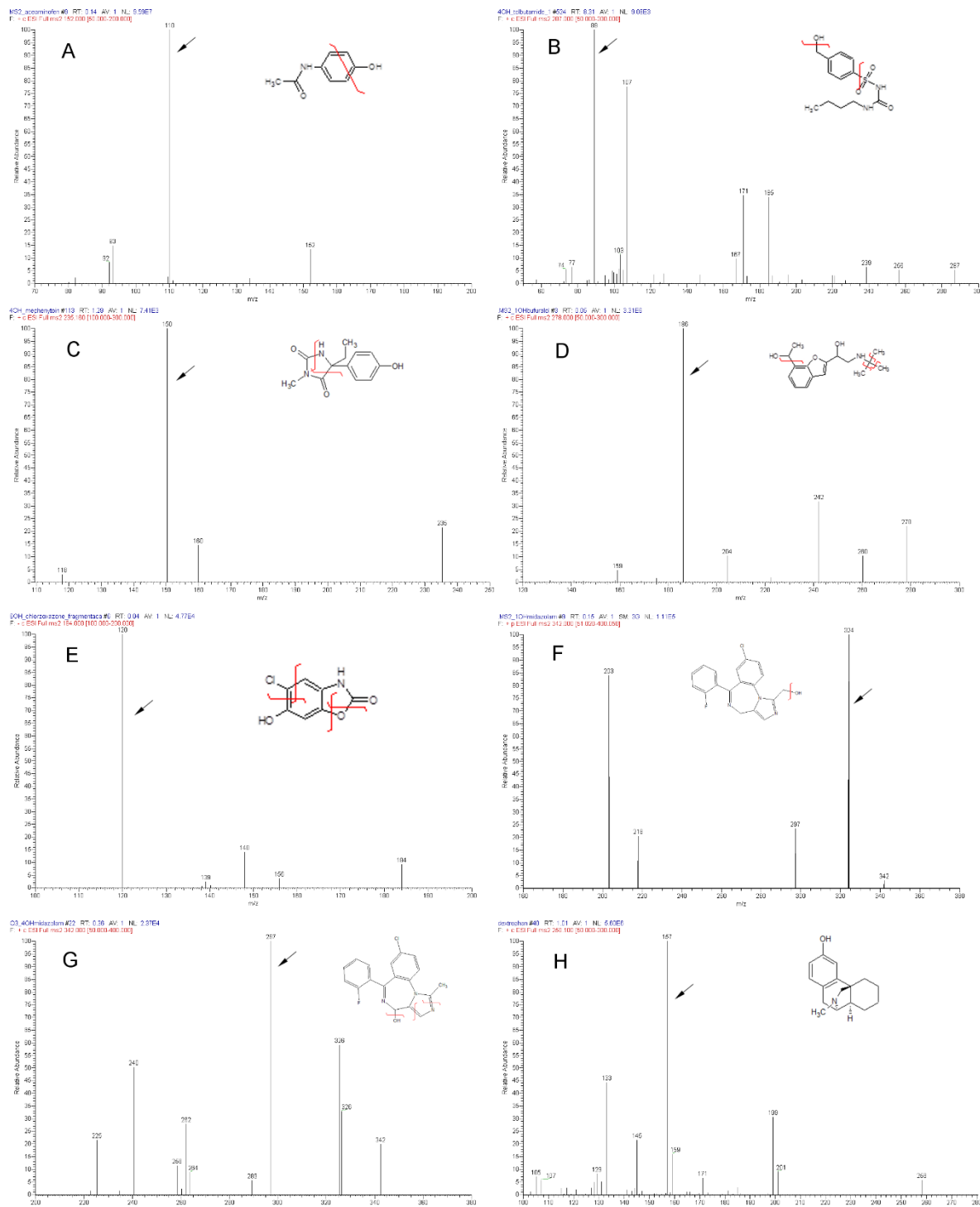
4.1.2.1. Opracowanie i validacja metody jednoczesnego oznaczania metabolitów wybranych substancji modelowych cytochromu P450 z zastosowaniem systemu LC/MS/MS

W pierwszym etapie badań wybrano odpowiednie substancje modelowe – substraty poszczególnych izoenzymów cytochromu P450. Wyboru dokonano na podstawie danych literaturowych, typując fenacetynę (substrat CYP1A2), tolbutamid (substrat CYP2C9), S(+)-mefenytoinę (substrat CYP2C19), bufuralol (substrat CYP2D6), chlorzoksazon (substrat CYP2E1) oraz midazolam (substrat CYP3A4). Substraty te przekształcane są na drodze enzymatycznej do swoich specyficznych metabolitów, których stężenia są miarą aktywności poszczególnych izoenzymów.

W celu optymalizacji warunków detekcji masowej, metabolity substancji modelowych poddano fragmentacji w komorze zderzeń spektrometru masowego. Na podstawie widm fragmentacyjnych, do zbudowania metody bioanalitycznej, wybrano najintensywniejsze jony potomne (**rycina 4.2**). Wybrane jony macierzyste oraz opowiadające im jony potomne wykorzystane w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji wraz z wartościami energii zderzeń zebrano w **tabeli 4.6**.

Tabela 4. 6. Analizowane przejścia jonowe dla metabolitów substancji modelowych i wzorca wewnętrznego wraz z wartościami odpowiadających im energii zderzeń

Analit	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	CE [V]
Paracetamol	152	110	14
4-Hydroksytolbutamid	287	89	38
4 – Hydroksymefenytoina	235	150	19
1- Hydroksybufuralol	278	186	14
6 – Hydroksychlorzoksazon	184	120	20
1-Hydroksymidazolam	342	324	21
4- Hydroksymidazolam	342	297	24
Dekstrorfan (IS)	258	157	38



Rycina 4. 2. Widma fragmentacyjne metabolitów substratów modelowych oraz standardu wewnętrznego: paracetamol (A), 4-hydroksytolbutamid (B), 4'-hydroksymefenytoina (C), 1'-hydroksybufuralol (D), 6-hydroksychlorzoksazon (E), 1'-hydroksymidazolam (F), 4'-hydroksymidazolam (G), dekstrorfan (IS) (H)

W czasie analizy próbek ślepych matryc pochodzących z sześciu niezależnych źródeł na chromatogramach nie zauważono interferencji w czasach retencji poszczególnych

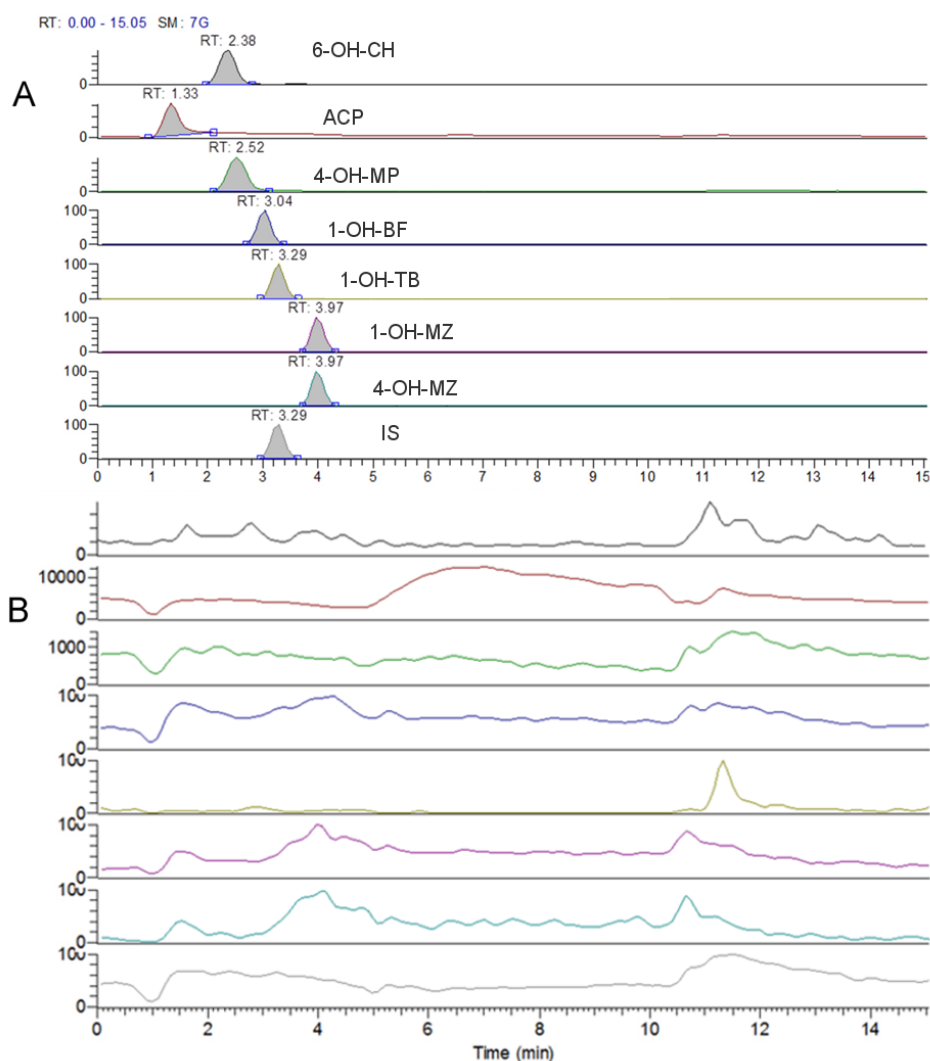
analitów oraz standardu wewnętrznego (stosunek sygnału do szumu < 9), więc metodę uznano za selektywną (**rycina 4.3**).

Metoda była liniowa w zakresie stężeń 10-2000 ng/mL dla 4'-hydroksymefenytoiny oraz 4-hydroksytolbutamidu, 50-2000 ng/mL dla 1'-hydroksybufuralolu oraz 25-2000 ng/mL dla pozostałych analitów. Zakres liniowości metody, współczynniki determinacji oraz wartości dolnej granicy oznaczalności i wykrywalności zebrano w **tabeli 4.7**. Najlepsze dopasowanie krzywej wzorcowej dla każdego analitu otrzymano za pomocą regresji liniowej przy zastosowaniu współczynnika ważenia $1/x$. Wartości dokładności oraz precyzji dolnej granicy oznaczalności spełniają wymogi wytycznych FDA oraz EMA^{192,193}, nie przekraczając dozwolonych norm (RSD<20%, oraz dokładności w granicach 80-120%).

Dla wszystkich analizowanych substancji uzyskane w jednym dniu współczynniki wariacji były mniejsze niż 11% dla niskiego, średniego oraz wysokiego stężenia kontrolnego oraz mniejsze niż 20% dla dolnej granicy oznaczalności. Metoda była powtarzalna również w różnych dniach analizy, współczynnik zmienności nie przekraczał 15% dla LQC, MQC oraz HQC i 14% dla LLOQ. Wykazano wysoką dokładność wyników: 93-114% dla niskich, średnich i wysokich stężeń oraz 80-119% dla dolnej granicy oznaczalności. Wyniki badań precyzji i dokładności zestawiono w **tabeli 4.8**.

Oznaczane metabolity były stabilne w warunkach przechowywania w autosamplerze w temperaturze 10°C przez 24 h, co odpowiada średniemu czasowi trwania analizy. Wartości obliczonych stężeń dla próbek kontrolnych po 24 h przechowywania w autosamplerze wynosiły od 94-113% wartości nominalnych (**tabela 4.9**).

Tabela 4.10 przedstawia wartości wyznaczonych parametrów odzysku oraz efektu matrycy dla wszystkich badanych analitów. Średni odzysk analitów po strąceniu białek wynosił od 69-92,6%. Bezwzględny efekt matrycy dla wszystkich analizowanych analitów z wyjątkiem paracetamolu był niewielki i wynosił od - 5% dla 1-OH-BF do 21,3% dla 4-OH-TB. Zaobserwowano znaczącą supresję jonizacji dla paracetamolu wynoszącą -62,3%. Wartości współczynników zmienności nachylenia krzywych kalibracyjnych dla wszystkich analitów nie przekraczały 4%.



Rycina 4. 3. Chromatogramy wybranych jonów dla metabolitów selektywnych substratów izoenzymów cytochromu P450 oraz wzorca wewnętrznego o stężeniu 500 ng/mL (A) oraz próby ślepej (B). 6-OH-CH – 6-hydrokyschlorzoksazon; ACP – paracetamol; 4-OH-MP – 4'-hydroksymefenytoina; 1-OH-BF – 1'-hydroksybufuralol; 4-OH-TB – 4-hydroksytolbutamid; 1-OH-MZ – 1'-hydroksymidazolam; 4-OH-MZ – 4'-hydroksymidazolam; IS – dekstorfan

Tabela 4. 7. Liniowość, współczynnik determinacji (r^2) oraz wartości dolnej granicy oznaczalności oraz wykrywalności dla każdego z metabolitów substancji modelowych

	ACP	6-OH-CH	4-OH-MP	1-OH-BF	4-OH-TB	1-OH-MZ	4-OH-MZ
Zakres metody [ng/mL]	25-2000	25-2000	10-2000	50-2000	10-2000	25-2000	25-2000
Współczynnik determinacji (r^2)	0,9994	0,9995	0,9916	0,9908	0,9965	0,9974	0,9983
LOD [ng/mL]	0,1	1	0,05	0,01	0,01	0,025	0,01
LLOQ [ng/mL]	25±2,8	25±2,8	10±1,3	50±5,9	10±0,5	25±3,0	25±3,1

Tabela 4. 8. Precyzja w jednym dniu- i między dniami oraz dokładność metody oznaczania metabolitów substancji modelowych

Parametr		Związek						
		ACP	6OH-OH	4OH-MP	1OH-BF	4OH-TB	1OH-MZ	4OH-MZ
Precyzja w jednym dniu (RSD%) n=6	LLOQ	11	10	13	19	5	13	13
	LQC	3	9	4	7	4	7	5
	MQC	11	8	3	3	2	2	1
	HQC	8	6	4	2	3	3	3
Precyzja między dniami (RSD%) n=12	LLOQ	14	10	9	7	3	8	5
	LQC	6	7	7	15	6	6	4
	MQC	12	6	11	4	8	5	3
	HQC	11	5	7	4	3	4	2
Dokładność (%) n=6	LLOQ	119	106	103	80	107	96	97
	LQC	103	95	106	114	100	98	109
	MQC	103	98	105	107	100	104	103
	HQC	103	93	100	100	98	105	98

Tabela 4. 9. Stabilność związków podczas przechowywania próbek w autosamplerze przez 24 h

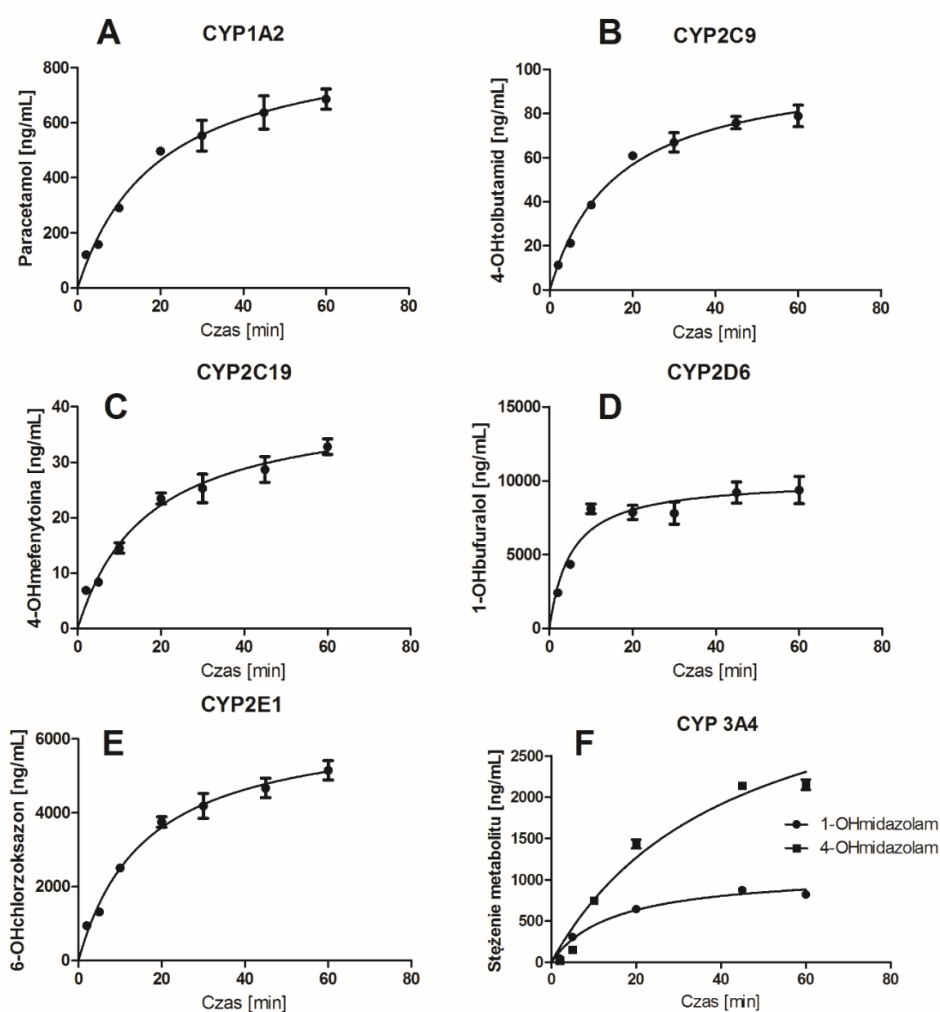
	Stężenie	Związek						
		ACP	6OH-CH	4OH-MP	1OH-BF	4OH-TB	1OH-MZ	4OH-MZ
Stabilność [%]	LQC	103	96	101	100	109	102	95
	MQC	112	106	106	106	113	105	94
	HQC	111	103	105	104	104	105	96

Tabela 4. 10. Odzysk oraz bezwzględny i względny efekt matrycy dla metabolitów substratów modelowych

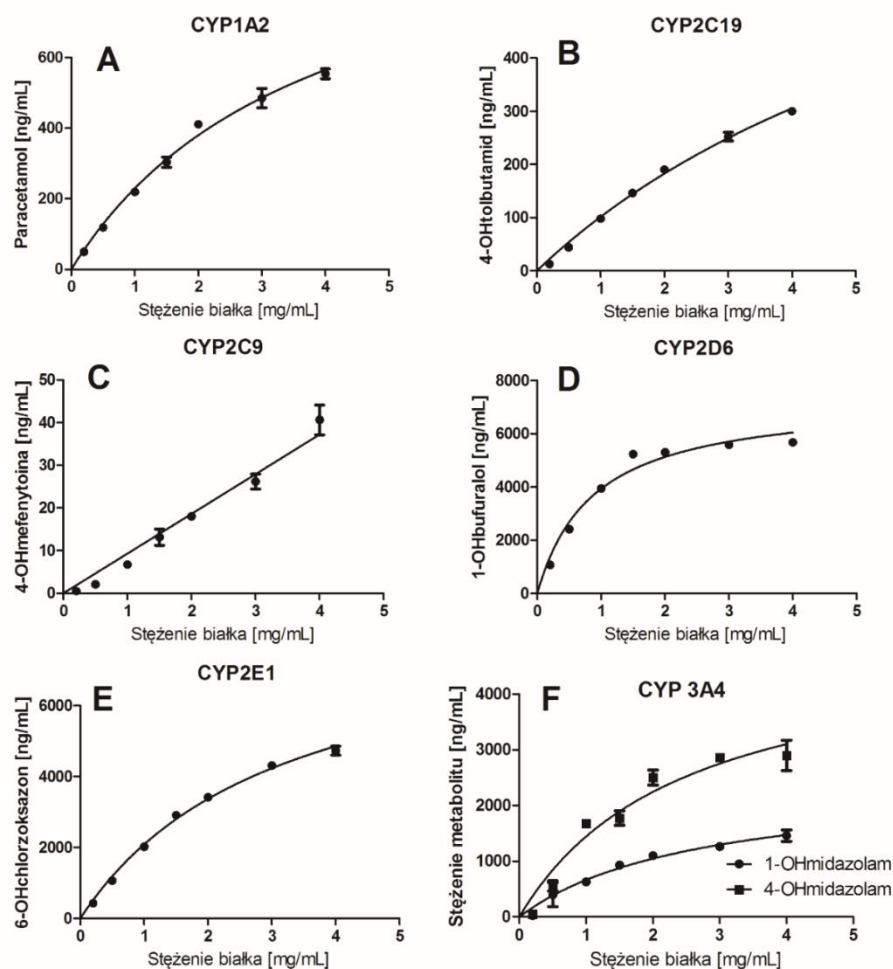
Parametr		Związek						
		ACP	6OH-CH	4OH-MP	1OH-BF	4OH-TB	1OH-MZ	4OH-MZ
Odzysk [%] n=6	LQC	85	92	68	83	74	79	82
	MQC	70	91	68	86	74	85	83
	HQC	75	95	71	89	79	91	91
	Średnia	76,6	92,6	69	86	75,6	85	85,5
Bezwzględny efekt matrycy [%] n=6	LQC	-65	17	9	-24	20	13	-15
	MQC	-62	18	14	5	23	-5	0
	HQC	-60	10	10	4	21	-7	2
	Średnia	-62,3	15	11	-5	21,3	0,3	-4,3
Względny efekt matrycy n=6	CV [%]	3,3	3,2	3,7	1,9	4,0	2,9	1,8

4.1.2.2. Optymalizacja warunków inkubacji substancji modelowych wybranych izoenzymów cytochromu P450 z mikrosomami wątroby szczura

Krzywe zależności stężeń powstających metabolitów od czasu inkubacji oraz od stężenia białka mikrosomalnego przedstawiono na **rycinach 4.4** oraz **4.5**. Do dalszych badań wybrano takie wartości parametrów, które zapewniają liniową biotransformację wszystkich badanych substancji modelowych do oznaczanych metabolitów. Ustalono, że 10 min inkubacja oraz stężenie białka mikrosomalnego równe 1 mg/mL stanowią optymalne parametry dla tego typu badania.



Rycina 4. 4. Zależność stężenia powstających metabolitów od czasu inkubacji: metabolizm fenacetyny (A); tolbutamidu (B); mefenytoiny (C); bufuralolu (D); chlorzoksazonu (E); midazolamu (F)

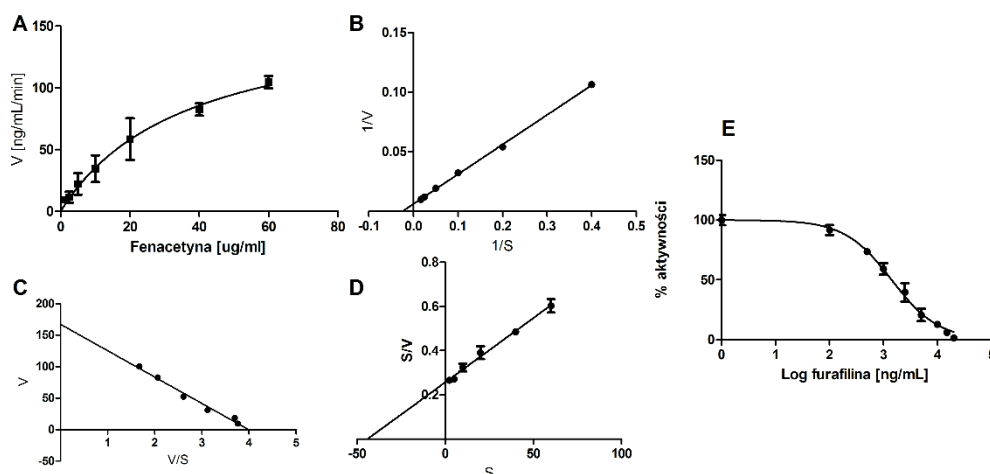


Rycina 4. 5. Zależność stężenia powstających metabolitów od stężenia białka mikrosomalnego: metabolizm fenacetyny (A); tolbutamidu (B); mefenytoliny (C); bufuralolu (D); chlorzoksazonu (E); midazolamu (F)

4.1.2.3. Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla procesów biotransformacji pojedynczych substancji modelowych

Deetylacja fenacetyny

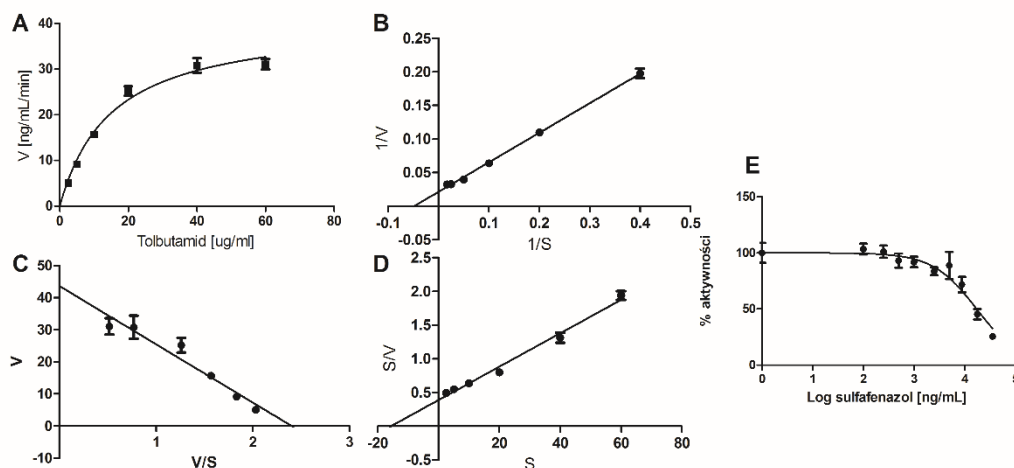
Jako substrat modelowy aktywności izoenzymu CYP1A2 wybrano fenacetynę, którą inkubowano z mikrosomami wątroby szczura w zakresie stężeń 1,25–60 $\mu\text{g/mL}$ (6,97–334,78 μM). Przy udziale izoenzymu CYP1A2 fenacetyna ulega deetylacji do paracetamolu. Jako selektywny inhibitor dla tej reakcji zastosowano furafylinę w zakresie stężeń 100 ng/mL –20 $\mu\text{g/mL}$ (0,38–77 μM). Aktywność enzymu została zahamowana przy stosunkowo wysokim stężeniu inhibitora ($\text{IC}_{50} = 5,52 \mu\text{M}$). Na **rycinie 4.6** przedstawiono wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia fenacetyny oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem furafyliny. Poniżej przedstawiono analogicznie reakcje biotransformacji dla pozostałych substancji modelowych.



Rycina 4. 6. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji fenacetyny do paracetamolu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem furafiliny (E)

4-hydroksylacja tolbutamidu

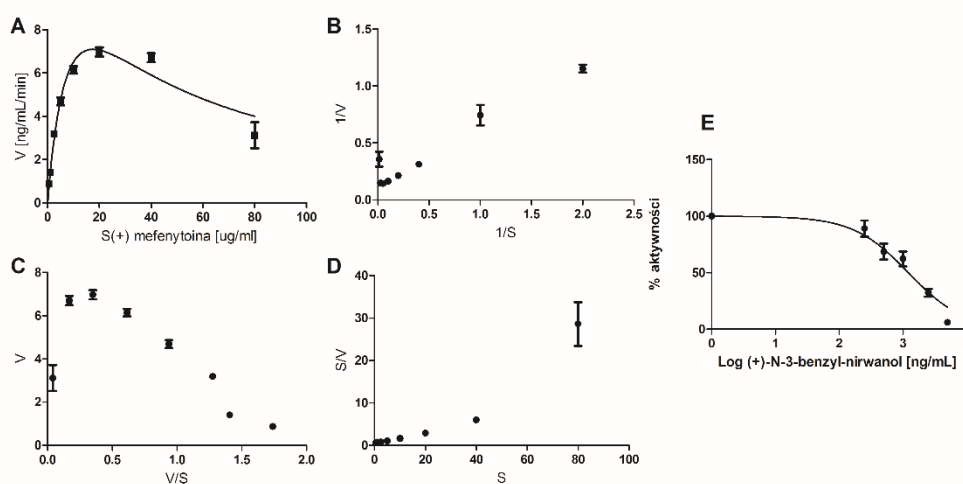
Jako substrat modelowy dla izoenzymu CYP2C9 wybrano tolbutamid (2,5–60 $\mu\text{g/mL}$; 9,26–222,22 μM), który przy udziale enzymu utleniany jest do 4-hydroksytolbutamidu. Jako selektywny inhibitor zastosowano sulfafenazol (100 ng/mL – 35,6 $\mu\text{g/mL}$; 0,32–113,38 μM), który okazał się bardzo słabym inhibitorem izoenzymu ($\text{IC}_{50} = 55 \mu\text{M}$). Na **rycinie 4.7** przedstawiono krzywe zależności szybkości reakcji od stężenia substratu oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem sulfafenazolu.



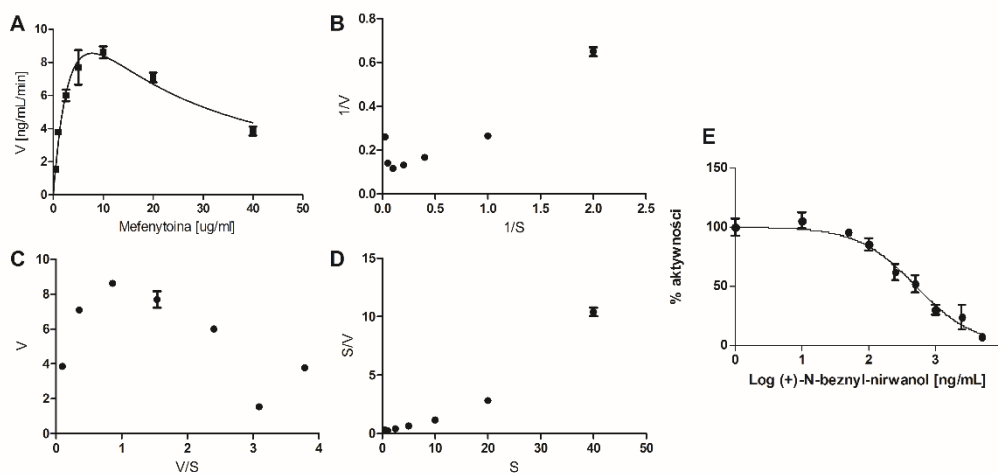
Rycina 4. 7. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji tolbutamidu do 4-hydroksytolbutamidu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem sulfafenazolu (E)

4'-hydroksylacja mefenytoiny

Jako substrat modelowy dla izoenzymu CYP2C19 wybrano mefenytoinę (0,5–80 $\mu\text{g/mL}$; 2,3–183,5 μM), która przy udziale enzymu utlenia się do 4'-hydroksymefenytoiny. Jako selektywny inhibitor zastosowano (+)-N-benzyl-nirwanol (0,01–5 $\mu\text{g/mL}$; 0,0034–15 μM), który skutecznie hamował aktywność enzymu ($\text{IC}_{50} = 1,74 \mu\text{M}$ dla związku racemicznego oraz $\text{IC}_{50} = 4,15 \mu\text{M}$ dla izomeru S(+)-mefenytoiny). Oceniono proces biotransformacji zarówno dla enancjomeru (**rycina 4.8**) oraz związku racemicznego (**rycina 4.9**). W obu przypadkach zaobserwowano zjawisko inhibicji substratowej.



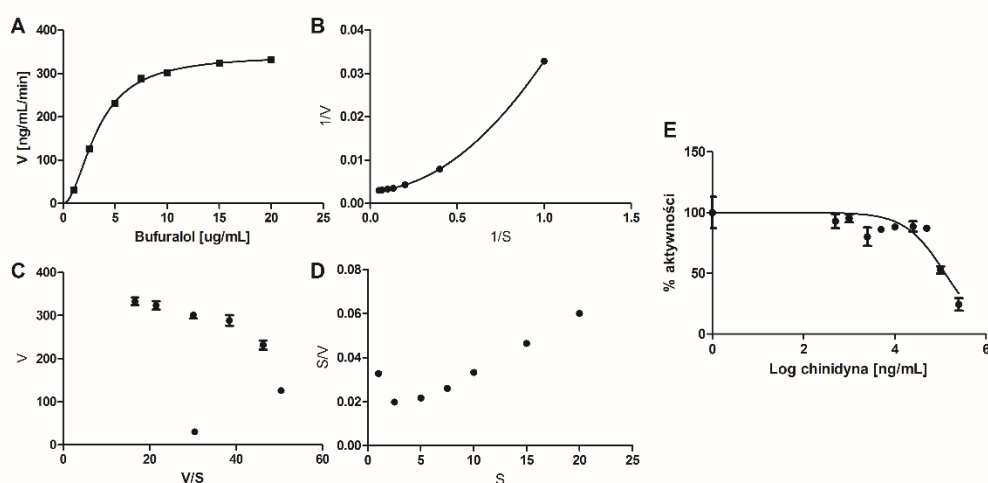
Rycina 4. 8. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji S(+)-mefenytoiny do 4-hydroksymefenytoiny (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem (+)-N-3-benzyl-nirwanolu (E)



Rycina 4. 9. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji racemicznej mefenytoiny do 4-hydroksymefenytoiny (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem (+)-N-3-benzyl-nirwanolu (E)

1-hydroksylacja bufuralolu

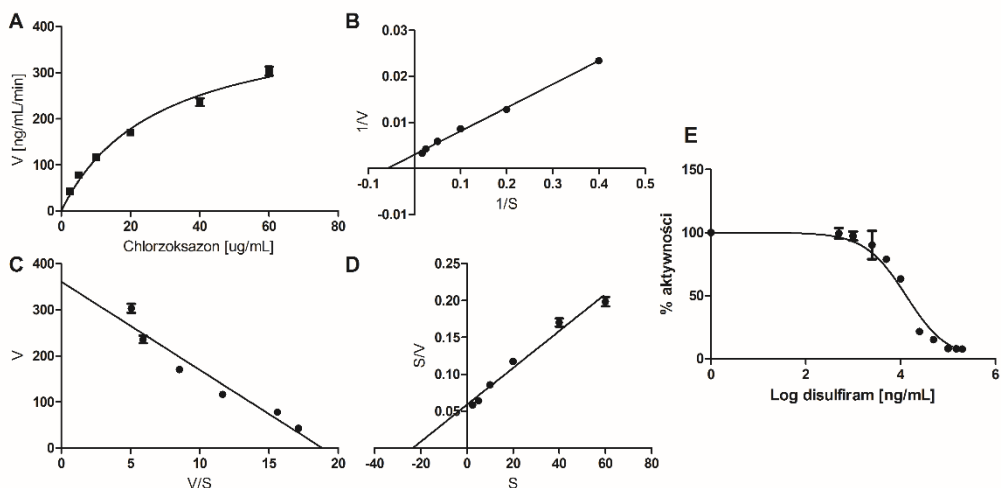
Aktywność szczurzych izoenzymów CYP2D1/2D2 (odpowiedników ludzkiego CYP2D6) badano za pomocą reakcji 1-hydroksylacji bufuralolu (1–20 $\mu\text{g/mL}$; 3,36–67,1 μM). Podczas biotransformacji bufuralolu zaobserwowano proces autoaktywacji enzymu. Jako selektywny inhibitor zastosowano chinidynę (0,5–100 $\mu\text{g/mL}$; 1,54–308,17 μM), która hamowała aktywność enzymu w bardzo wysokich stężeniach ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Na **rycynie 4.10** przedstawiono krzywe zależności szybkości reakcji od stężenia substratu oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem chinidyny.



Rycina 4. 10. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji bufuralolu do 1-hydroksybufuralolu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem chinidyny (E)

6-hydroksylacja chlorzoksazonu

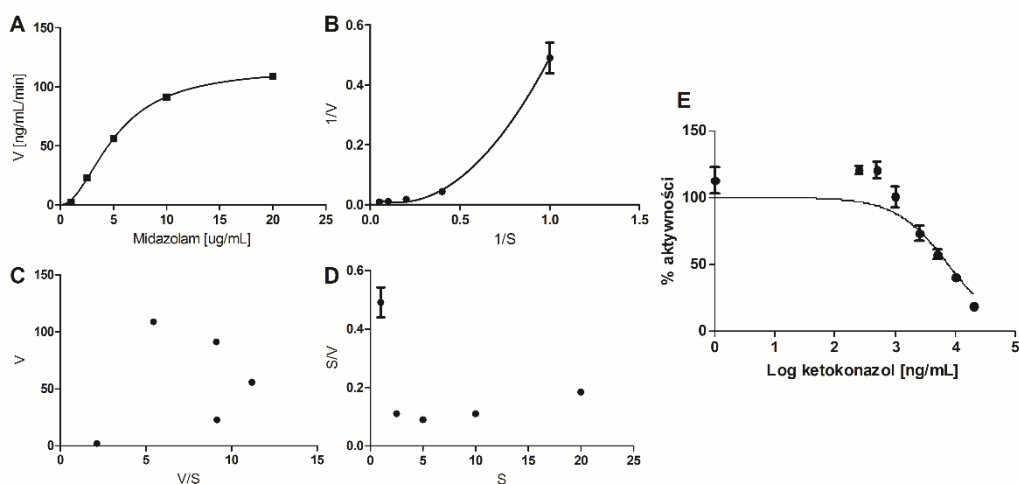
Chlorzoksazon (2,5–60 $\mu\text{g/mL}$; 14,75–353,98 μM) został wybrany jako substrat modelowy do oceny aktywności izoenzymu CYP2E1. Reakcja ta charakteryzowała się typową hiperboliczną kinetyką biotransformacji do 6-hydroksychlorzoksazonu. Jako selektywny inhibitor zastosowano disulfiram (0,5–200 $\mu\text{g/mL}$; 1,69–674,54 μM), który skutecznie hamował aktywność enzymu (IC_{50} 44,36 μM). Na **rycynie 4.11** przedstawiono krzywe zależności szybkości reakcji od stężenia substratu oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem disulfiramu.



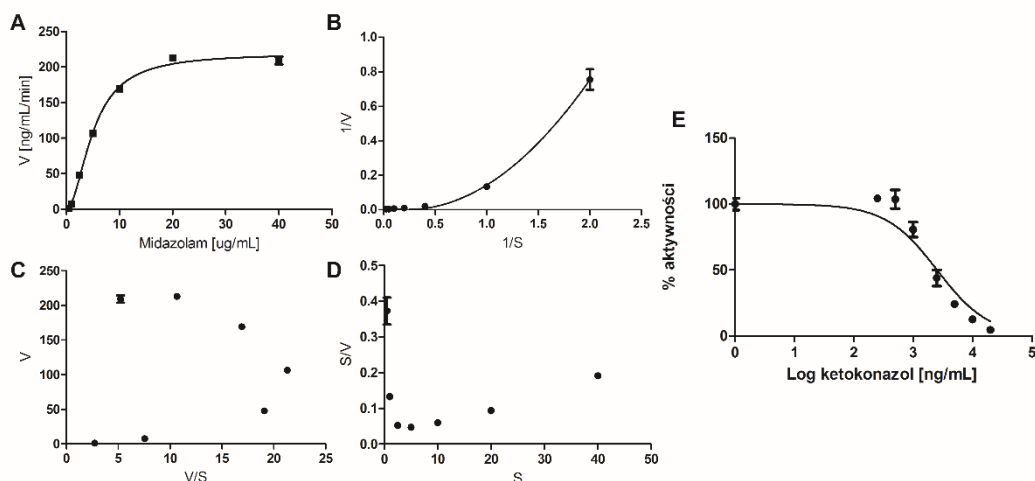
Rycina 4. 11. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji chlorzoksazonu do 6-hydroksychlorzoksazonu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem disulfiramu (E)

1- oraz 4-hydroksylacja midazolamu

Aktywność szczurzych izoenzymów podrodziny CYP3A oceniano badając utlenianie midazolamu (0,5–40 µg/mL; 0,15–12,3 µM) do 1- oraz 4-hydroksymidazolamu. W obu przypadkach zaobserwowano zjawisko autoaktywacji enzymu. Jako inhibitor zastosowano ketokonazol (0,25–20 µg/mL; 0,47–37,6 µM), który skutecznie hamował aktywność enzymu (IC₅₀ 4,8 µM). Na **rycinach 4.12** oraz **4.13** przedstawiono krzywe zależności szybkości reakcji odpowiednio 1- oraz 4- hydroksylacji midazolamu od stężenia substratu oraz krzywą hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem ketokonazolu.



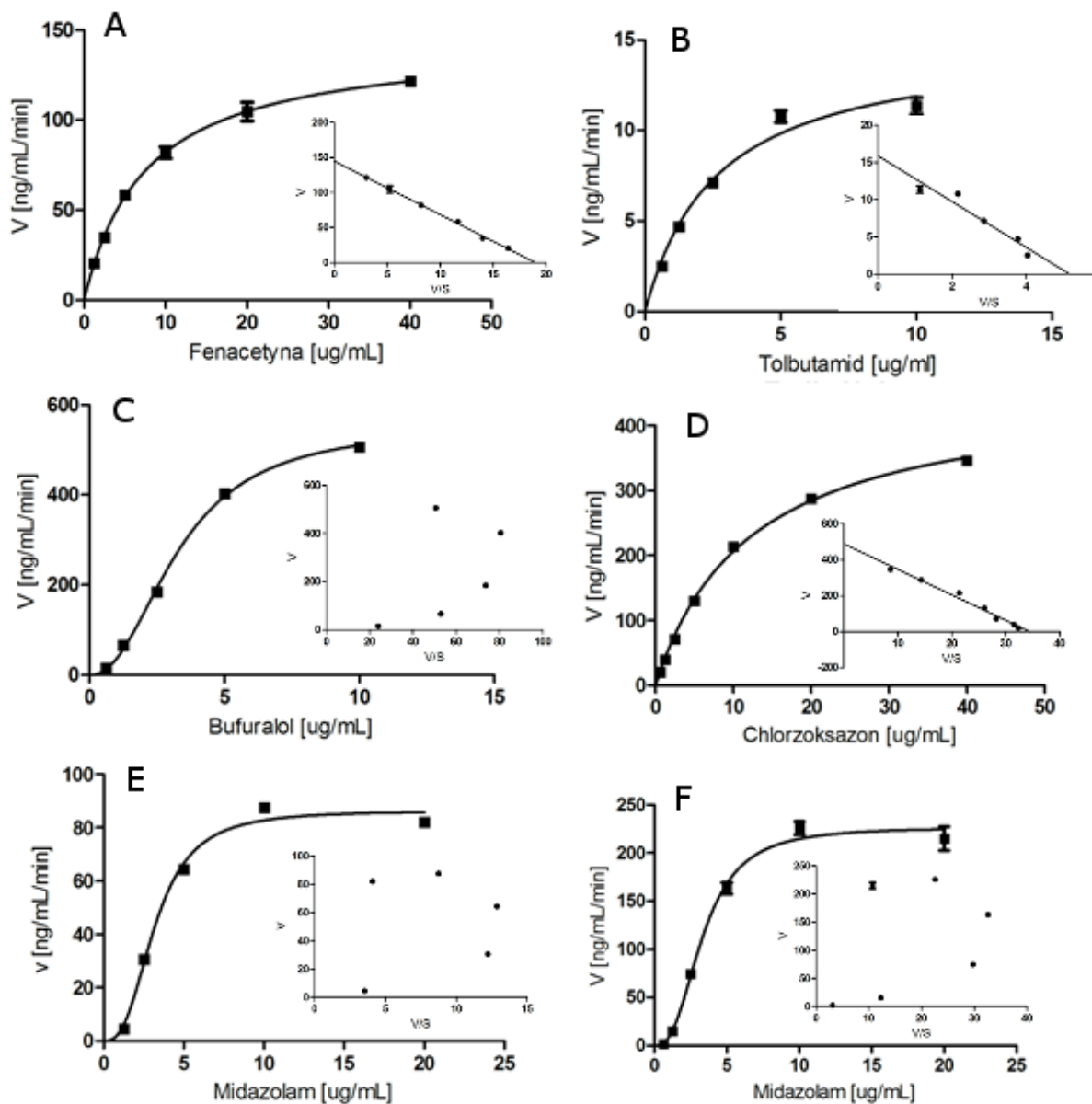
Rycina 4. 12. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji midazolamu do 1-hydroksymidazolamu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem ketokonazolu (E)



Rycina 4. 13. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji midazolamu do 4-hydroksymidazolamu (A) wraz z przekształceniami: krzywą Lineweavera-Burka (B), krzywą Eadie-Hofstee (C) i krzywą Hanesa-Woolfa (D) oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem ketokonazolu (E)

4.1.2.4. *Wyznaczanie parametrów kinetycznych dla procesów biotransformacji substancji modelowych stosowanych w formie koktajlu*

Na **rycinie 4.14** przedstawiono zależności szybkości reakcji enzymatycznych od stężenia substratów podczas jednoczesnej inkubacji wszystkich substancji modelowych podanych w postaci koktajlu z mikrosomami wątroby szczura. Z powodu niskiej wydajności procesu biotransformacji mefenytoiny i zbyt niskich stężeń jej metabolitu nie uzyskano wyników biotransformacji tego substratu do 4'-hydroksymefenytoiny.



Rycina 4. 14. Zależności szybkości reakcji od stężenia substratów inkubowanych w formie koktajlu, wraz z odpowiadającymi im krzywymi Eadie-Hofstee (w tle rycin) dla reakcji deetylacji fenacetyny (A), 4-hydroksylacji tolbutamidu (B), 1-hydroksylacji bufuralolu (C), 6-hydroksylacji chlorzoksazonu (D), 1- hydroksylacji midazolamu (E) oraz 4-hydroksylacji midazolamu (F)

W **tabeli 4.11** zebrano wartości parametrów kinetycznych obliczonych za pomocą regresji nieliniowej stosując odpowiednie modele dla reakcji enzymatycznych, a także za pomocą liniowych przekształceń krzywej Michaelisa-Menten, dla związków, które podlegają typowej hiperbolicznej kinetyce enzymatycznej.

Tabela 4. 11. Wartości Vmax oraz Km dla modelowych substratów wybranych izoenzymów cytochromu P450

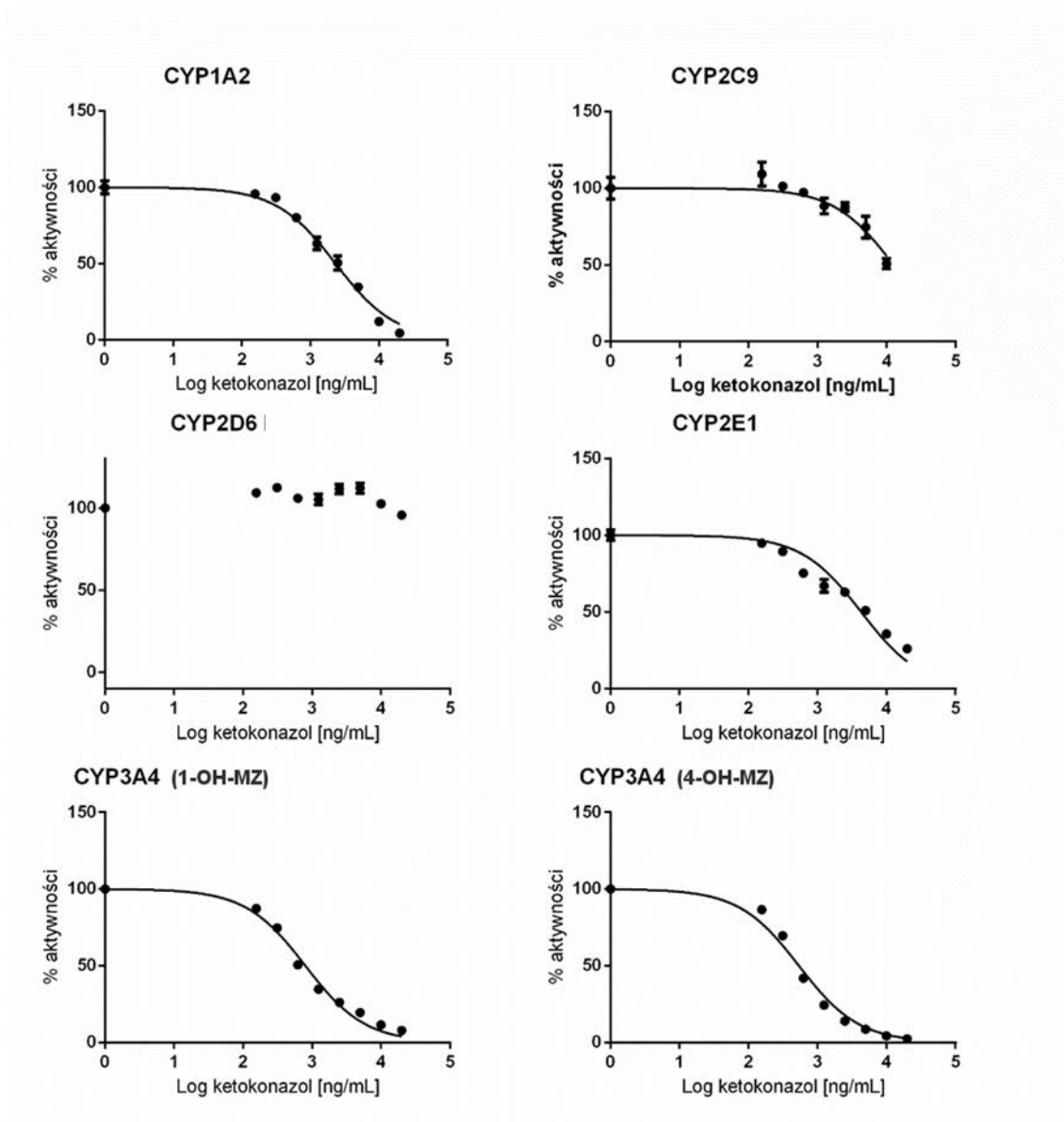
CYP	Reakcja	Typ inkubacji	Regresja nieliniowa		Równanie Lineweavera-Burka		Równanie Eadie-Hofstee		Równanie Hansa-Woolfa	
			Vmax [ng/mL/min]	Km [µg/mL]	Vmax [ng/mL/min]	Km [µg/mL]	Vmax [ng/mL/min]	Km [µg/mL]	Vmax [ng/mL/min]	Km [µg/mL]
1A2	Deetylacja fenacetyny	Substrat	179,8	47,47	159,5	39,77	167,4	41,9	171,6	44,05
		Koktajl	144,5	7,57	142,69	7,52	144,8	7,635	144,13	7,64
2C9	4-hydroksylacja tolbutamidu	Substrat	40,87	15,06	46,70	20,55	43,65	18,14	40,37	15,69
		Koktajl	15,04	2,642	17,86	3,77	15,9	3,078	14,69	2,64
2C19	4-hydroksylacja mefenytoiny**	Związek racemiczny	20,18	5,277	--	--	--	--	--	--
		S(+)-mefenytoina	16,03	11,08	--	--	--	--	--	--
2D6	1-hydroksylacja bufuralolu*	Substrat	342,4	3,334	346,3	3,16	--	--	--	--
		Koktajl	552,9	3,3	340,6	3,19	--	--	--	--
2E1	6-hydroksylacja chlorzoksazonu	Substrat	424,9	27,72	334,0	17,03	361,2	19,14	399,84	23,49
		Koktajl	457,5	12,2	529,66	15,89	488	14,18	468,38	13,37
3A4	1-hydroksylacja midazolamu*	Substrat	115,9	5,16	43,54	5,4	--	--	--	--
		Koktajl	86,35	3,2	39,97	4,76	--	--	--	--
	4-hydroksylacja midazolamu*	Substrat	219,1	5,08	68,3	4,06	--	--	--	--
		Koktajl	226,7	3,34	46,75	3,76	--	--	--	--

*Kooperacja dodatnia - autoaktywacja, współczynnik h=2, **Inhibicja substratowa (Ki = 11,41 µg/mL dla (RS)-mefenytoiny oraz 27,83 µg/mL dla S-(+)-mefenytoiny)

4.1.2.5. Walidacja metody za pomocą związku referencyjnego

Końcowym etapem optymalizacji metody było badanie potencjału inhibicyjnego związku referencyjnego wobec „koktajlu” substancji modelowych. Jako wzorzec wybrano inhibitor izoenzymu CYP3A4 – ketokonazol z powodu znanego efektu hamującego wobec izomerów cytochromu P450.

Na **rycinie 4.15** przedstawiono wyniki hamowania aktywności badanych izoenzymów cytochromu P450 w obecności ketokonazolu. W **tabeli 4.12** zebrano obliczone wartości IC₅₀ dla ketokonazolu względem analizowanych izoenzymów cytochromu P450.



Rycina 4. 15. Krzywe hamowania wybranych izoenzymów cytochromu P450 po inkubacji z ketokonazolem

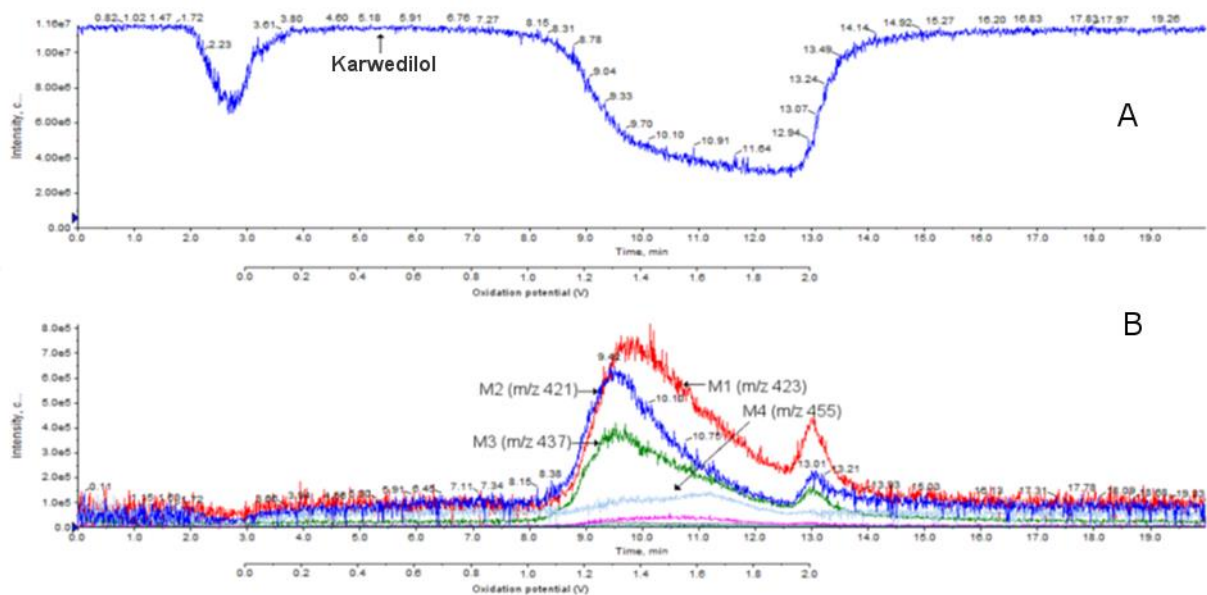
Tabela 4. 12. Otrzymane eksperymentalnie wartości IC50 dla ketokonazolu względem wybranych izoenzymów cytochromu P450

CYP	IC50 [μ M]
1A2	4,4
2C9	23,84
2D6	--
2E1	8,12
3A4 (1-OH-MZ)	1,508
3A4 (4-OH-MZ)	1,0137

4.1.3. Opracowanie metody badania metabolizmu związków za pomocą systemu elektrochemicznego ROXY™

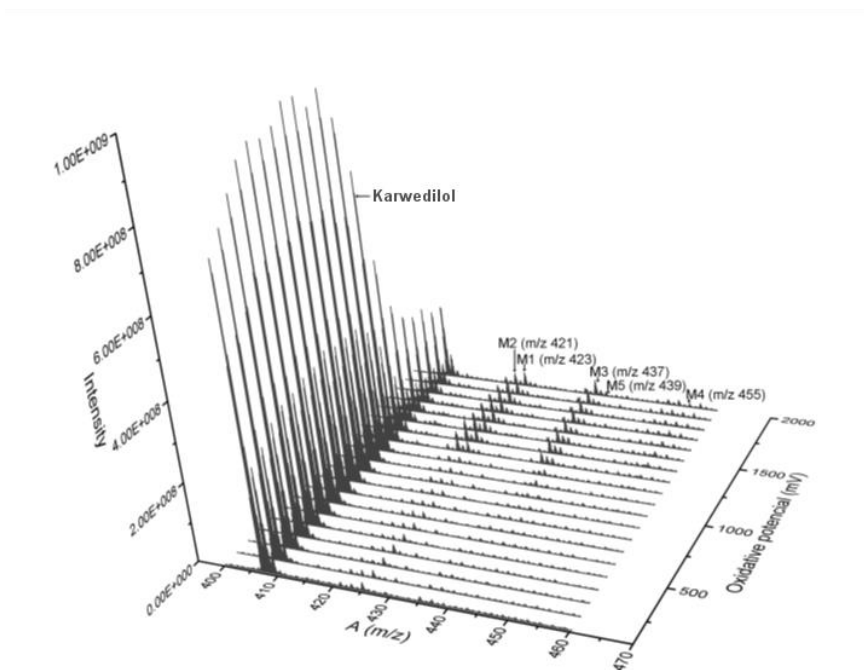
W celu opracowania metody symulacji metabolizmu nowych związków, potencjalnych leków za pomocą elektrochemicznego utleniania, przeprowadzono badanie dla związku modelowego, o znanym szlaku metabolicznym. Jako związek referencyjny wybrano karwedilol, który w wyniku I fazy metabolizmu w wątrobie, ulega utlenieniu do szeregu hydroksylowych pochodnych^{196–198}.

W wyniku reakcji utleniania karwedilolu w celi elektrochemicznej systemu ROXY™ uzyskano voltamogramy masowe przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnałów karwedilolu i jego produktów utlenienia w zależności od przyłożonego napięcia (**rycina 4.16**). W efekcie otrzymano trójwymiarowy wykres ilustrujący proces elektrochemicznego utlenienia badanej substancji (**rycina 4.17**).



Rycina 4. 16. Woltamogramy przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnału karwedilolu (A) oraz jego potencjalnych metabolitów (B) w zależności od przyłożonego napięcia

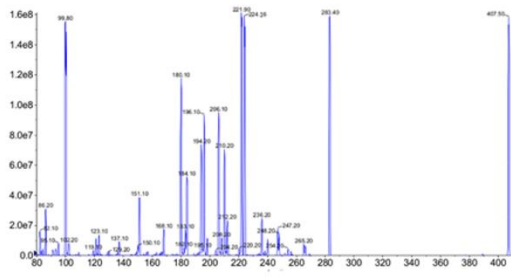
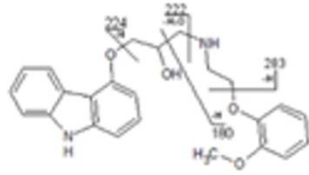
Na przedstawionych wykresach możemy zauważyć sygnały od protonowanego karwedilolu (m/z 407), którego intensywność malała wraz ze zwiększaniem potencjału oksydacyjnego. Związek osiągał najmniejszą intensywność w zakresie potencjałów od 1400 do 2000 mV, z tego względu analizy strukturalne potencjalnych metabolitów prowadzono po przyłożeniu napięcia równego 1500 mV. Wraz ze zmniejszaniem sygnału związku macierzystego pojawiały się sygnały od produktów utlenienia, potencjalnych metabolitów, kolejno M1 o m/z 423, M2 o m/z 421, M3 o m/z 437, M4 o m/z 455 oraz M5 o m/z 439. Sygnałów o mniejszej intensywności nie analizowano.



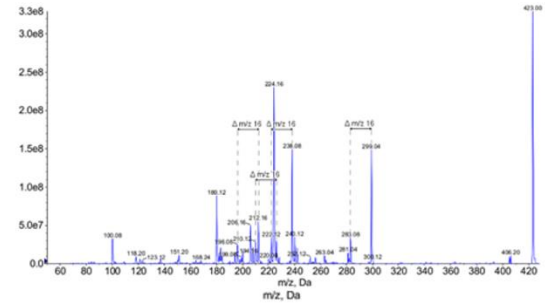
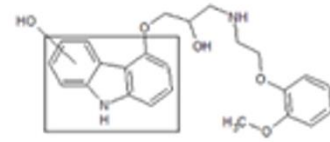
Rycina 4. 17. Woltammogram masowy dla karwedilolu uzyskany za pomocą EC-ESI/MS (elektrochemii połączonej ze spektrometrią mas). Widma masowe przedstawiono w zależności od rosnącego potencjału oksydacyjnego

W celu potwierdzenia struktury powstających produktów utlenienia karwedilolu wykonano fragmentację karwedilolu oraz jego potencjalnych metabolitów (**rycina 4.18**). Po dokładnym przeanalizowaniu widma fragmentacyjnego karwedilolu, dopasowano masy jego fragmentów do najintensywniejszych sygnałów. W następnym etapie porównano widma fragmentacyjne (MS^2) potencjalnych metabolitów z widmem MS^2 karwedilolu i na podstawie uzyskanych różnic w wartościach m/z pomiędzy fragmentami określano struktury potencjalnych metabolitów. Widmo fragmentacyjne metabolitu M1 (m/z 423) różni się od widma MS^2 karwedilolu wszystkimi sygnałami fragmentów zawierającymi w strukturze grupę karbazolu, co świadczy o możliwej hydroksylacji tego ugrupowania aromatycznego (+O, $\Delta m/z$ 16). Podobnie, widmo MS^2 cząsteczki M2 (m/z 421) jest analogiczne z widmem karwedilolu we wszystkich sygnałach fragmentów nie zawierających w strukturze ugrupowania karbazolu. Cząsteczka M2 mogła prawdopodobnie powstać w wyniku dalszego utlenienia związku M1, tworząc ugrupowanie ketonowe (+O-2H, $\Delta m/z$ 14). Kolejne produkty utlenienia to M3 (m/z 437) – związek powstający w wyniku hydroksylacji metabolitu M2 w pierścieniu karbazolu (+2O-2H, $\Delta m/z$ 30), metabolit M4 (m/z 455) – powstający w wyniku potrójnej hydroksylacji tego ugrupowania (+3O Δ , m/z 48) oraz M5 – produkt podwójnej hydroksylacji tego samego ugrupowania (+2O Δ , m/z 32).

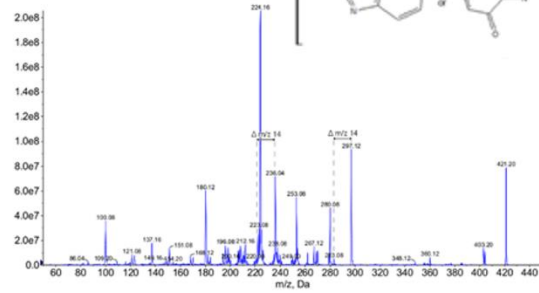
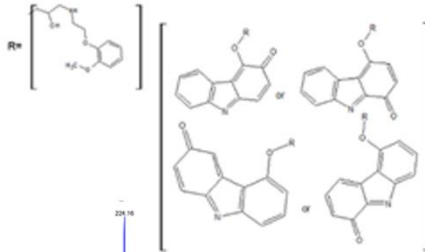
Karwedilol (m/z 407)



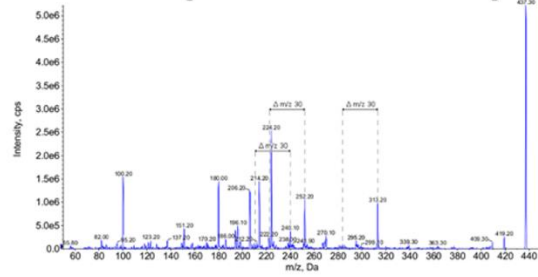
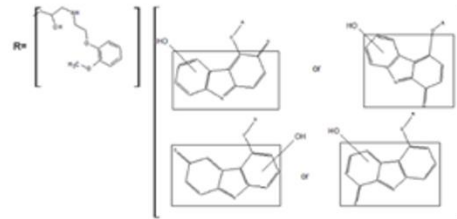
M1 (m/z 423)



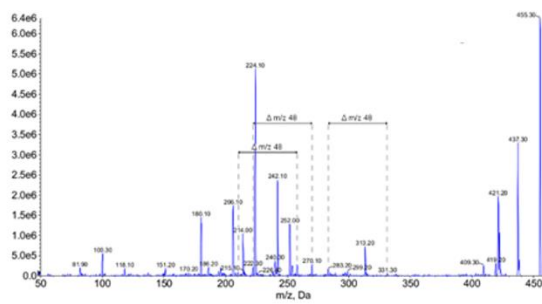
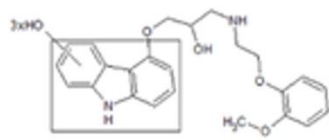
M2 (m/z 421)



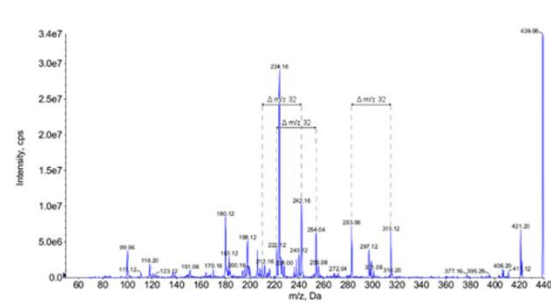
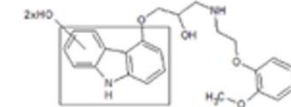
M3 (m/z 437)



M4 (m/z 455)



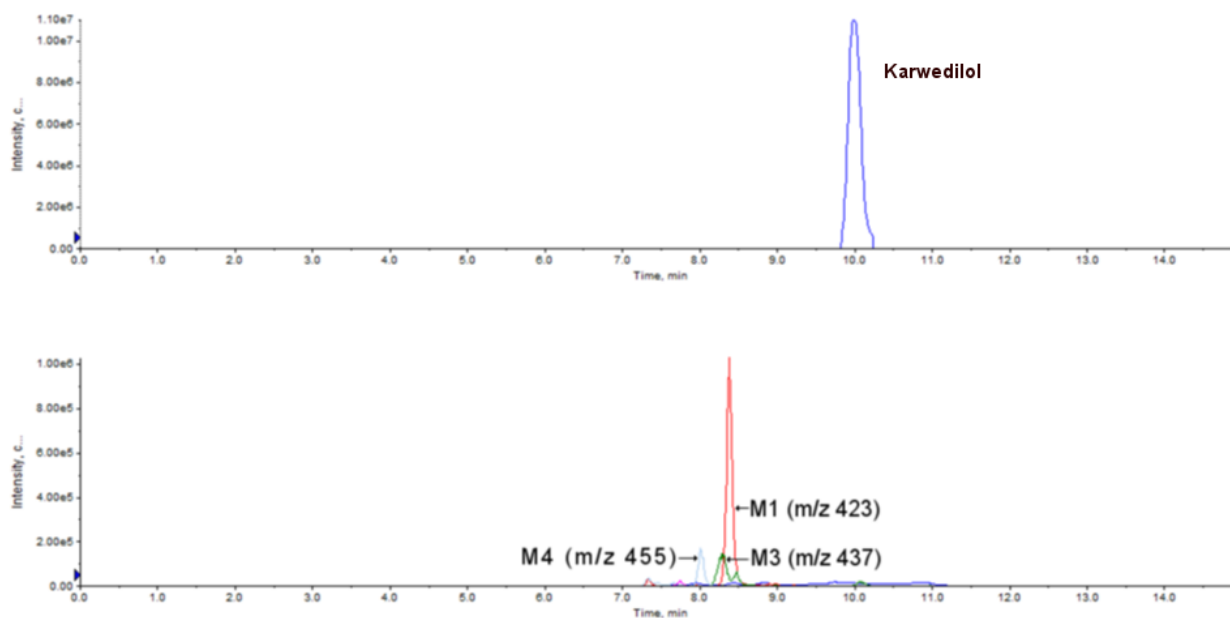
M5 (m/z 439)



Rycina 4. 18. Widma fragmentacyjne karwedilolu oraz jego potencjalnych metabolitów

Obecność produktów utlenienia grupy karbazolowej świadczy o łatwości elektrochemicznego utlenienia tego ugrupowania. Niestety z powodu niewystarczającej rozdzielczości widm fragmentacyjnych oraz konieczności stosowania bardzo wysokich wartości energii zderzeń nie udało się ustalić dokładnych pozycji atomów węgla grupy karbazolowej, w których prawdopodobnie mogła mieć miejsce hydroksylacja.

Ostatnim etapem opracowania metody był rozdział chromatograficzny uzyskanych produktów utlenienia. **Rycina 4.19** przedstawia rozdział chromatograficzny karwedilolu i jego produktów utlenienia. Najwyższą intensywnością charakteryzował się sygnał pochodzący od metabolitu M1, a następnie M3 oraz M5. Pozostałe produkty utlenienia cechowały się niską intensywnością, co świadczy o niskiej wydajności pozostałych procesów elektrochemicznego utlenienia.



Rycina 4. 19. Chromatogram wybranych jonów dla karwedilolu i jego metabolitów

4.1.4. Podsumowanie I części wyników

1. Opracowano i zwalidowano metodę jednoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w pięciu matrycach biologicznych (osocze, homogenaty wątroby, mocz, efuenty wątroby oraz mikrosomamy wątroby szczura) z zastosowaniem systemu LC/MS/MS.
2. Opracowano i zwalidowano metodę badania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątroby szczura. Przeprowadzono optymalizację warunków inkubacji oraz oceniono kinetykę metabolizmu substancji modelowych izoenzymów cytochromu P450. Aktywność poszczególnych izoenzymów zahamowano po dodaniu selektywnych inhibitorów izoenzymów. Metodę zwalidowano poprzez inkubację mieszaniny substancji modelowych z ketokonazolem. Badania wykazały, że ketokonazol jest silnym inhibitorem izoenzymu CYP3A4, lecz hamuje również aktywność CYP1A2, CYP2E1 oraz CYP2C9. Wyniki te znalazły potwierdzenie w danych literaturowych.
3. Opracowano metodę elektrochemicznego przewidywania I fazy metabolizmu za pomocą systemu elektrochemicznego ROXY™. W celu sprawdzenia poprawności metody przeprowadzono elektrochemiczne utlenianie karwedilolu, w wyniku którego powstały liczne metabolity hydroksylowe oraz pochodne ketonowe. Badania strukturalne wykazały, że utlenieniu ulegała głównie grupa karbazolowa. Nie znaleziono pochodnych hydroksylowych grupy fenylovej, których obecność zaobserwowano w warunkach *in vivo*. Opracowana metoda pozwala na przewidywanie I fazy metabolizmu, lecz jest to metoda czysto instrumentalna i nie zawsze jej wyniki są zgodne z danymi uzyskiwanymi w warunkach *in vivo*.

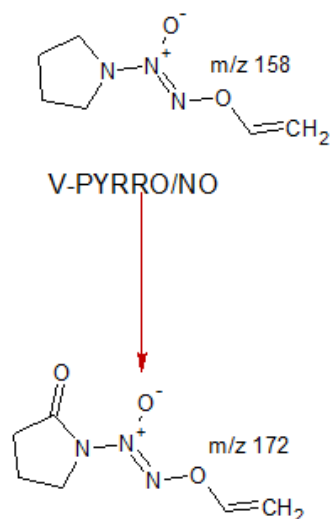
Opracowany warsztat metodyczny, w szczególności metoda oparta na systemie LC/MS/MS pozwalająca na jednoczesne oznaczanie V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO oraz metoda równoczesnej oceny aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 umożliwiły ocenę profilu farmakokinetycznego i metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, które tworzą drugą część pracy. Z kolei zastosowanie nowoczesnej metody badania metabolizmu, wykorzystującej system ROXY™, pozwoliło stwierdzić że przewidywane tą metodą metabolity nie odpowiadają metabolitom uzyskanym w warunkach *in vivo*.

4.2. Część II - Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO u myszy

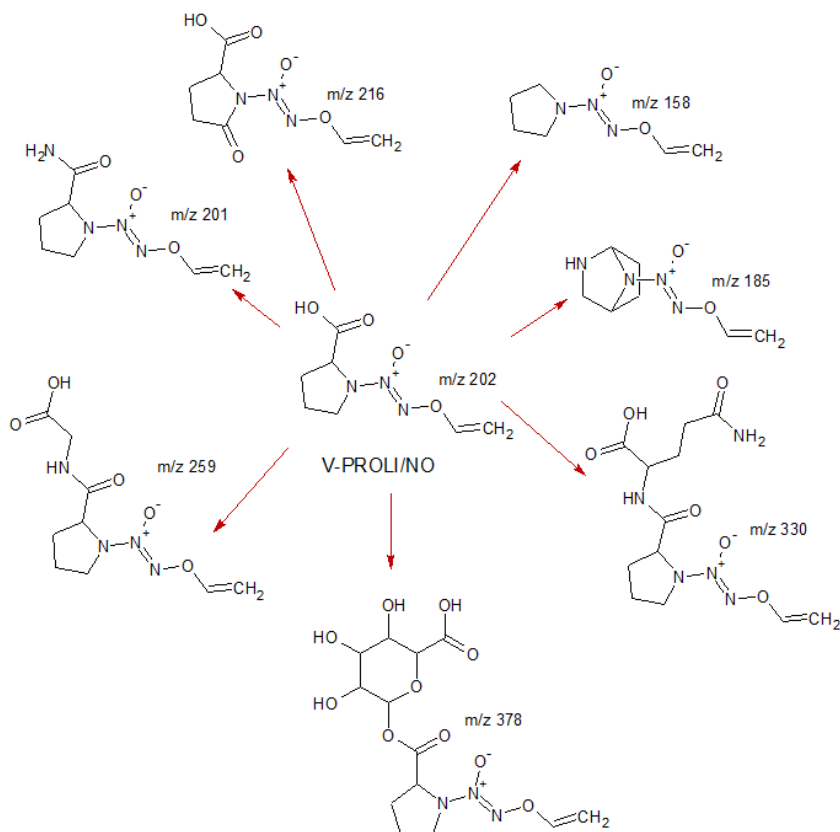
4.2.1. Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach *in silico*

W celu określenia struktury potencjalnych metabolitów badanych związków przeprowadzono symulację ich metabolizmu za pomocą oprogramowania PALLAS (CompuDrug, Bal Harbor, FL, USA). W przypadku związku V-PYRRO/NO wygenerowano strukturę jednego metabolitu z dodatkowym ugrupowaniem karbonylowym w pierścieniu pirolidynowym (**rycina 4.20**).

Prawdopodobny metabolizm V-PROLI/NO był bardziej złożony. Poza wygenerowaną karbonylacją pierścienia pirolidynowego, wygenerowano pochodną dekarboksylową, czyli V-PYRRO/NO. Program założył również dołączenie grupy aminowej do reszty karboksylowej z utworzeniem amidu wraz z kolejną cyklizacją tego metabolitu połączoną z dekarbonylacją. Symulacja komputerowa pozwoliła na przewidywanie również reakcji II fazy metabolizmu, a więc sprzęgania z kwasem glukuronowym oraz aminokwasami: glicyną i glutaminą (**rycina 4.21**). Program nie wygenerował produktów epoksydacji badanych pochodnych.



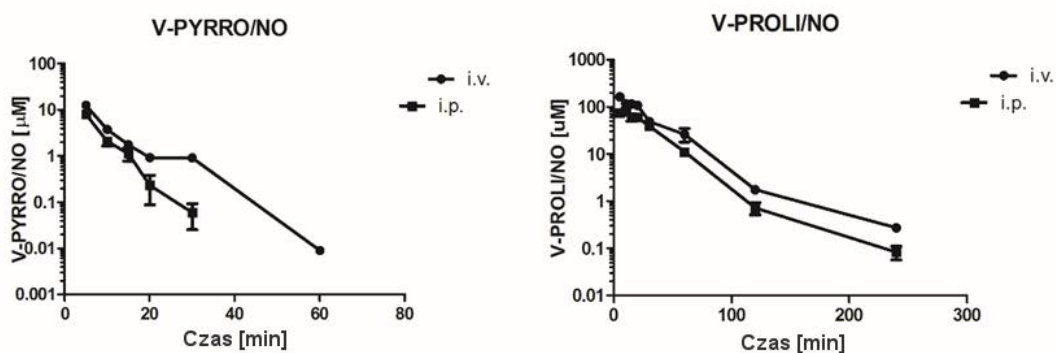
Rycina 4. 20. Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PYRRO/NO przy pomocy oprogramowania PALLAS



Rycina 4. 21. Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PROLI/NO przy pomocy oprogramowania PALLAS

4.2.2. Profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach *in vivo*

Na rycinie 4.22 przedstawiono profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO (32 $\mu\text{mol/kg}$) oraz V-PROLI/NO (29 $\mu\text{mol/kg}$) u myszy po jednorazowym dożylnym i dootrzewnowym podaniu badanych NO-donorów, a podstawowe parametry farmakokinetyczne dla badanych analogów obliczone metodą niezależną od modelu zebrano w tabeli 4.13.



Rycina 4. 22. Profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu związków u myszy. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM, $n=3$ dla podania *i.p.* oraz $n=4$ dla podania *i.v.*

Tabela 4. 13. Wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po jednorazowym dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków

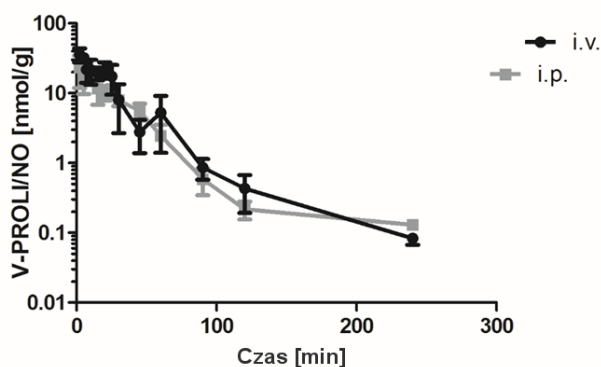
Parametr	V-PYRRO/NO		V-PROLI/NO	
	Podanie <i>i.v.</i>	Podanie <i>i.p.</i>	Podanie <i>i.v.</i>	Podanie <i>i.p.</i>
C ₀ [μM]	41,5	-	222,48	-
AUC _{0→∞} [μM·min]	218,62	60,9	5669,26	2895,27
MRT [min]	6	7,7	27,87	28,57
C _{max} [μM]	-	7,93	-	79,57
t _{max} [min]	-	5	-	10
V _{ss} [L/kg]	0,88	-	0,149	-
Cl [L/min/kg]	0,146	-	0,0053	-
F [%]	-	27,85	-	51,07

Wyniki wskazują, że V-PYRRO/NO był intensywnie eliminowany z organizmu ze średnim czasem przebywania w organizmie wynoszącym odpowiednio około 6 min po podaniu dożylnym oraz 7,7 min po podaniu dootrzewnowym. Niskie wartości MRT wiązały się z wysokim klirensiem całkowitym związku (0,146 L/min/kg). V-PYRRO/NO ulegał dystrybucji w całkowitej wodzie organizmu, a jego objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym wynosiła 0,88 L/kg. Po podaniu dootrzewnowym V-PYRRO/NO szybko wchłaniał się do krążenia ogólnego osiągając stężenie maksymalne po około 5 min. Biodostępność V-PYRRO/NO po podaniu dootrzewnowym była niska i wynosiła jedynie 27,9%.

Po dożylnym podaniu V-PROLI/NO, jego stężenie w osoczu myszy było wyższe (C₀ = 222,5 μM) w porównaniu do V-PYRRO/NO (C₀ = 41,5 μM). Związek ulegał szybkiej eliminacji z organizmu, z klirensiem całkowitym wynoszącym 0,0053 L/min/kg, lecz wolniej niż V-PYRRO/NO. W efekcie końcowym MRT było wyższe i wynosiło odpowiednio 27,9 min po podaniu dożylnym oraz 28,5 min po podaniu dootrzewnowym. Związek ulegał dystrybucji w mniejszym stopniu w porównaniu do V-PYRRO/NO, z objętością dystrybucji w stanie stacjonarnym wynoszącą 0,15 L/kg, co może świadczyć o rozmieszczeniu związku w płynie zewnątrzkomórkowym. V-PROLI/NO szybko wchłaniał się do krążenia ogólnego po podaniu dootrzewnowym osiągając stężenie maksymalne po 10 min. Całkowita biodostępność V-PROLI/NO po podaniu dootrzewnowym była równa 51%.

4.2.3. Dystrybucja V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO do wątroby w warunkach *in vivo*

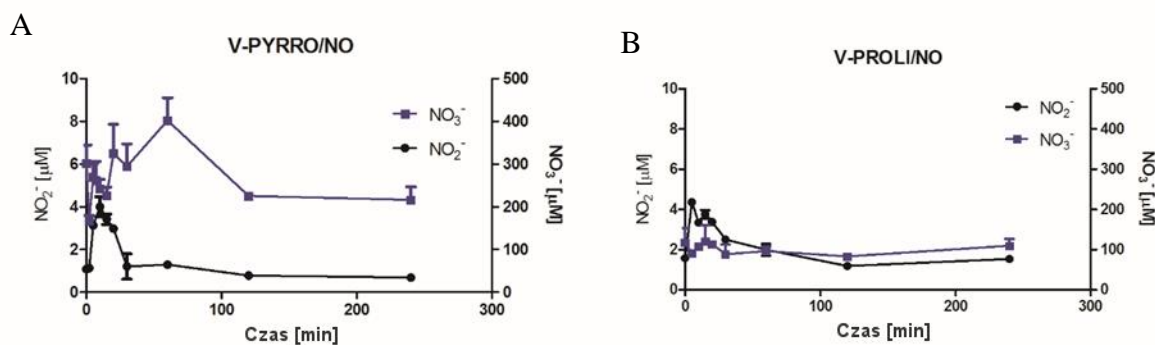
W celu określenia dyspozycji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w wątrobie zmierzono stężenia obu badanych analogów w wątrobie myszy. Zaskakująco, oznaczono stężenia tylko dla związku V-PROLI/NO (**rycina 4.23**), podczas gdy stężenia V-PYRRO/NO w wątrobie były poniżej dolnej granicy oznaczalności tego związku (LLOQ = 0,05 μM).



Rycina 4. 23. Zależność stężenia od czasu dla V-PROLI/NO w wątrobie po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanego związku u myszy w dawce 29 $\mu\text{mol/kg}$. Wartości przedstawiono jako średnia \pm SEM, n = 4 dla podania *i.v.* oraz n = 3 dla podania *i.p.*

4.2.4. Uwalnianie NO z V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO po podaniu dożylnym w warunkach *in vivo*

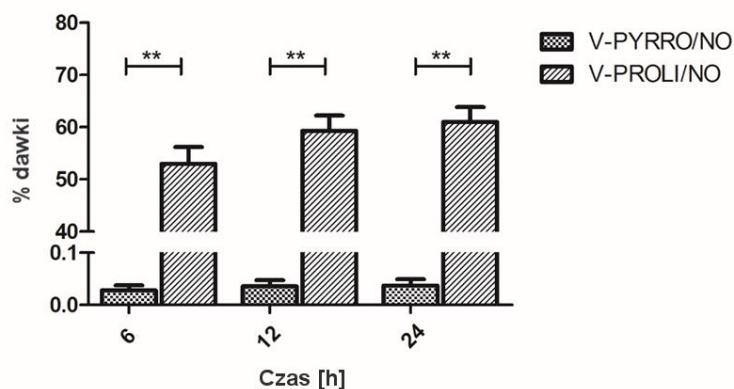
Stężenie azotanów (III) oraz azotanów (V) wzrastało po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO osiągając wartość maksymalną po 10 min dla azotanów (III) oraz 60 min, dla azotanów (V). W przypadku V-PROLI/NO zaobserwowano nieznaczne zwiększenie stężenia azotanów (III) oraz niezmienną się stężenie azotanów (V) (**rycina 4.24**).



Rycina 4. 24. Stężenia azotanów (III) i azotanów (V) w osoczu myszy po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO (A) oraz V-PROLI/NO (B)

4.2.5. Klirens nerkowy V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w warunkach *in vivo*

Pomimo podobnej struktury, związki różniły się stopniem eliminacji nerkowej. W ciągu pierwszych 24 godzin od dożylnego podania związków u myszy V-PYRRO/NO był wydalany z moczem w postaci niezmienionej w znikomym stopniu (<0,1%), podczas gdy V-PROLI/NO w około 61% (rycyna 4.25). Obliczony klirens nerkowy dla V-PROLI/NO wynosił 0,0032 L/min/kg, podczas gdy dla V-PYRRO/NO był bardzo niski i równy (0,000054 L/min/kg).



Rycina 4. 25. Procent dawki V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO wydalonej z moczem w postaci niezmienionej po 24 godzinach od podania związków

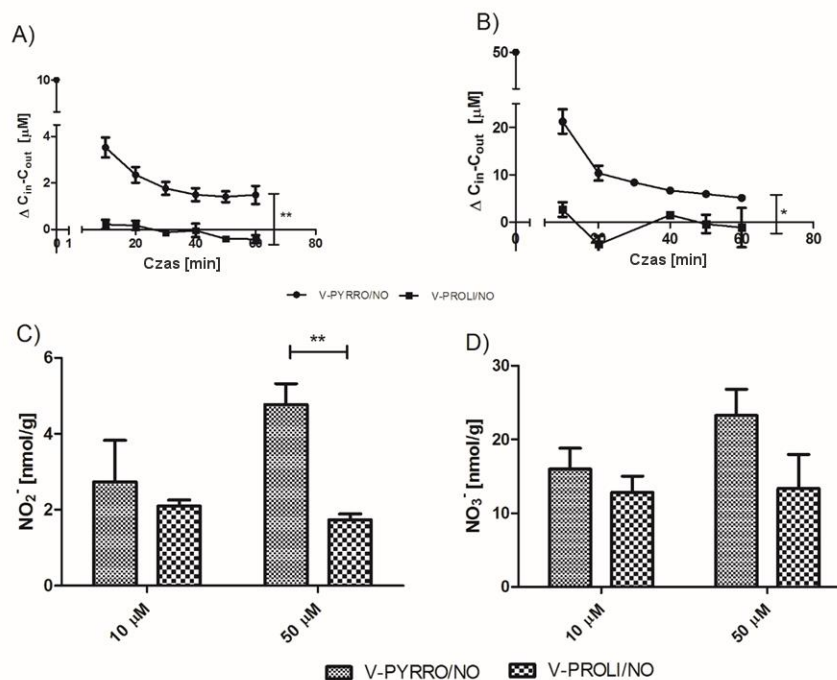
4.2.6. Klirens wątrobowy i stopień eliminacji wątrobowej V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach *ex vivo*

Stopień eliminacji wątrobowej oraz metabolizm wątrobowy badanych NO-donorów, V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO wyznaczono w modelu *ex vivo* izolowanej

perfundowanej wątroby myszy. Na podstawie różnic stężeń V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w próbkach buforu przed i po perfuzji wątroby obliczono współczynnik ekstrakcji wątrobowej. W obliczeniach uwzględniono wiązanie V-PYRRO/NO z drenami układu perfuzji (związek wiązał się w około 25%). W przypadku V-PROLI/NO nie zaobserwowano wiązania z urządzeniem. Na **rycinie 4.26 A i B** przedstawiono obliczone różnice stężeń w próbkach efluentów przed i po perfuzji wątroby. Stężenie V-PYRRO/NO w próbkach efluentów po perfuzji wynosiło około 70% stężenia początkowego, a więc współczynnik ekstrakcji wątrobowej był równy 0,3, natomiast klirens wątrobowy wynosił 0,058 L/min/kg. W przypadku V-PROLI/NO, metabolizm związku w wątrobie zachodził w znikomym stopniu, a stężenia związku w efluentach wątroby były zbliżone do stężenia początkowego. Współczynnik ekstrakcji wątrobowej V-PROLI/NO oraz jego klirens wątrobowy był bardzo niski i wynosił odpowiednio 0,05 i 0,0005 L/min/kg.

4.2.7. Uwalnianie NO z V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w modelu izolowanej, perfundowanej wątroby w warunkach *ex vivo*

W celu zbadania uwalniania NO w wątrobie myszy, zmierzono stężenie azotanów (III) oraz azotanów (V) w próbkach homogenatów wątroby po godzinnej perfuzji wątroby badanymi analogami. Stwierdzono wyższe stężenia obu produktów utlenienia NO w przypadku perfuzji przez wątrobę V-PYRRO/NO w porównaniu do V-PROLI/NO (**rycina 4.26 C, D**).



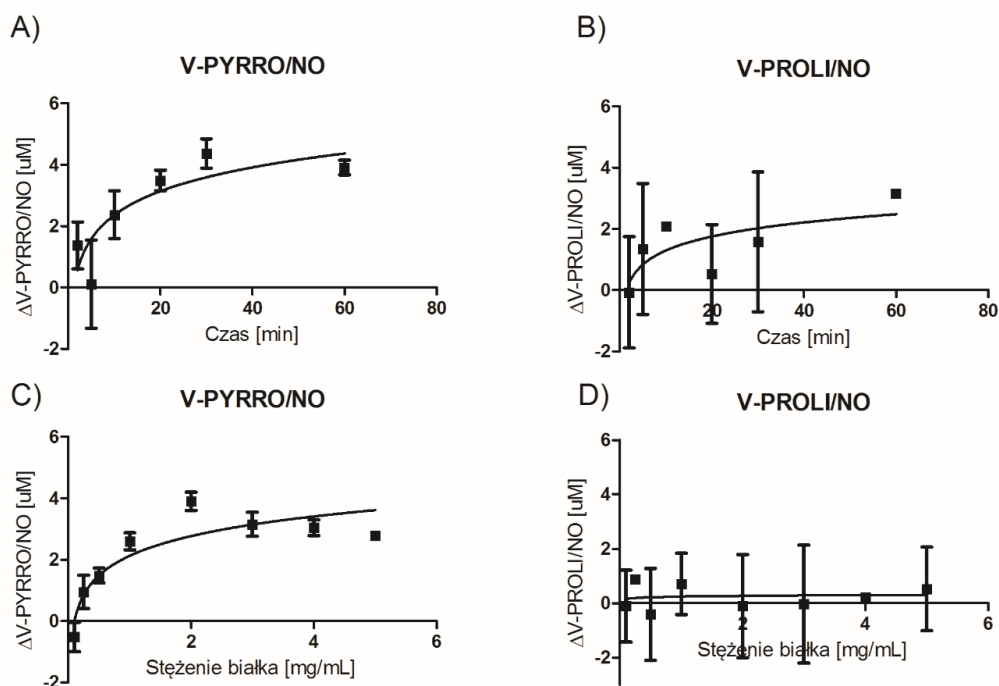
Rycina 4. 26. Różnice stężeń V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w próbkach buforu przed i po perfuzji narządowej przy stężeniach związków 10 μM (A) oraz 50 μM (B). Stężenie azotanów (III) (C) oraz azotanów (V) (D) w homogenatach wątroby po godzinnej perfuzji wątroby badanymi związkami. Wartości przedstawiono jako średnia \pm SEM, $n = 4$

4.2.8. Metabolizm V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w warunkach *in vitro* w mikrosomach wątroby szczura

Ocenę metabolizmu związków podzielono na następujące etapy:

- optymalizacja parametrów inkubacji, takich jak czas inkubacji oraz stężenie białka enzymatycznego;
- wyznaczenie podstawowych parametrów kinetyki enzymatycznej dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO;
- identyfikacja izoenzymów cytochromu P450 potencjalnie zaangażowanych w metabolizm badanych analogów.

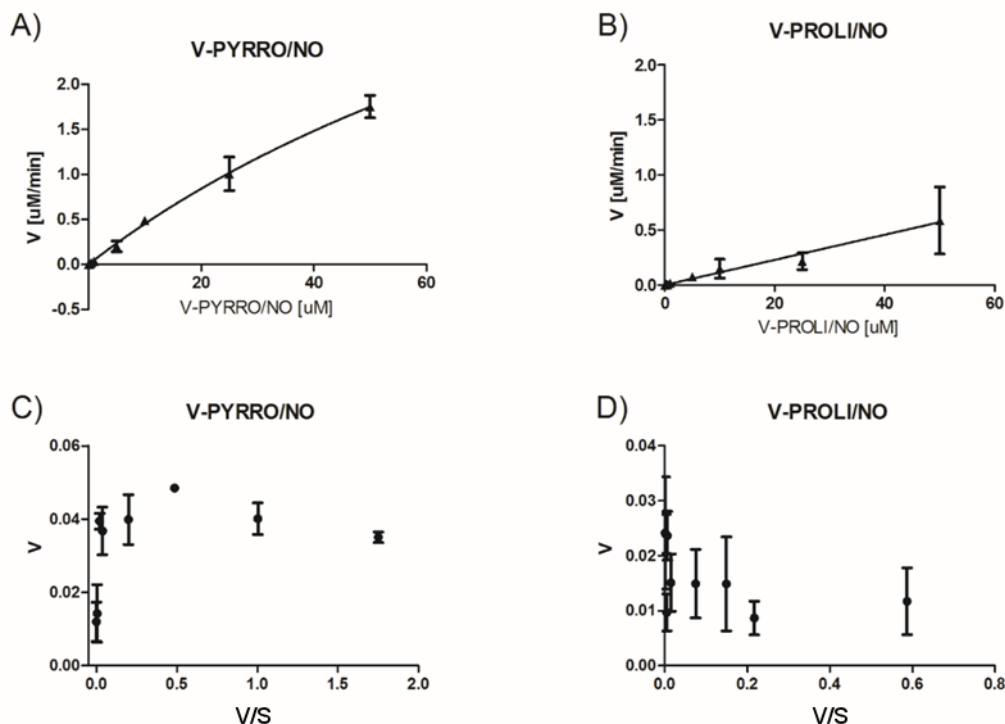
Jako optymalne warunki inkubacji wybrano takie parametry, przy których szybkość biotransformacji zależna od stężenia substratów była liniowa. Z powodu niewielkiej wydajności procesu biotransformacji V-PROLI/NO, wybrano parametry odpowiednie dla metabolizmu V-PYRRO/NO, tj. czas inkubacji 20 min oraz stężenie białka mikrosomalnego w mieszaninie inkubacyjnej równe 1 mg/mL (rycina 4.27).



Rycina 4. 27. Zależność ubytku stężenia V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO od czasu inkubacji (A i B) oraz stężenia białka mikrosomalnego w mieszaninie inkubacyjnej mikrosomów wątroby szczura (C i D). Wartości przedstawiono jako średnia \pm SEM, $n = 3$

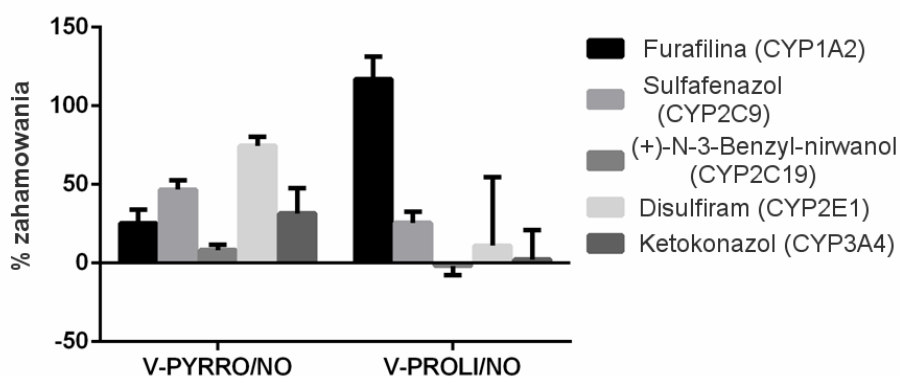
Podstawowe parametry kinetyczne dla reakcji metabolizmu badanych związków wyznaczono z zależności Michaelisa – Menten (**rycina 4.28 A, B**). W przypadku V-PYRRO/NO stała Michaelisa-Menten była równa $131,6 \pm 38,15 \mu\text{M}$ oraz szybkość maksymalna wynosiła $6,35 \pm 1,41 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ białka.

W przypadku V-PROLI/NO nie udało się wyznaczyć parametrów kinetycznych, a kształt zależności szybkości reakcji od czasu wskazywał na niskie powinowactwo związku do enzymów cytochromu P450. Krzywe Eadie-Hofstee dla obu związków były nieliniowe (**rycina 4.28 C, D**), co może świadczyć o katalizie wielo-enzymatycznej.



Rycina 4. 28. Kinetyka biotransformacji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w mikrosomach wątroby szczura. Wykresy przedstawiają krzywe Michaelisa-Menten odpowiednio dla V-PYRRO/NO (A), V-PROLI/NO (B) oraz zależności Eadie-Hofstee odpowiednio dla V-PYRRO/NO (C) i V-PROLI/NO (D). Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SEM, $n = 3$

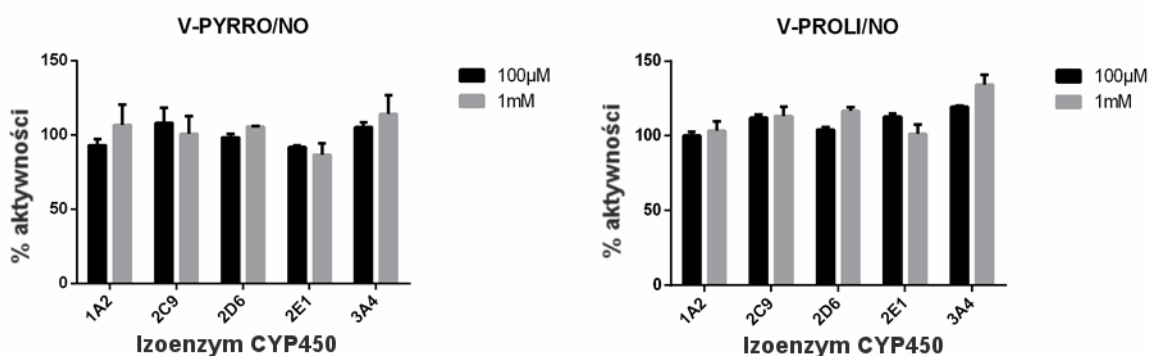
W celu identyfikacji izoenzymów biorących udział w metabolizmie V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO zastosowano selektywne chemiczne inhibitory cytochromu P450. Wyniki wskazują, że za metabolizm V-PYRRO/NO odpowiedzialne są izoenzymy: CYP2E1, CYP2C9, CYP1A2 oraz CYP3A4. W przypadku V-PROLI/NO, związek ten metabolizowany jest przede wszystkim przez CYP1A2 oraz w mniejszym stopniu przez CYP2C9 (**rycina 4.29**).



Rycina 4. 29. Wpływ selektywnych inhibitorów cytochromu P450 na metabolizm V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO (50 μ M). Dane przedstawiono jako średnia \pm SEM ($n=3$ dla furafyliny, sulfafenazolu, (+)-N-3-benzyl-nirwanolu oraz ketokonazolu, $n=6$ dla disulfiramu)

4.2.9. Badanie potencjału inhibycyjnego V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w stosunku do wybranych izoenzymów cytochromu P450 metodą „koktajlu”

Zastosowana metoda koktajlu substancji modelowych pozwoliła na zbadanie potencjału inhibycyjnego V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w stosunku do najważniejszych izoenzymów cytochromu P450. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że badane związki w stężeniu 1 mM nie powodowały hamowania aktywności O-deetylacji fenacetyny (substrat izoenzymu CYP1A2), 4-hydroksylacji tolbutamidu (substrat CYP2C9), 1-hydroksylacji bufuralolu (substrat CYP2D6), 6-hydroksylacji chlorzoksazonu (substrat CYP2E1) oraz 1- i 4-hydroksylacji midazolamu (substrat CYP3A4) (rycina 4.30).

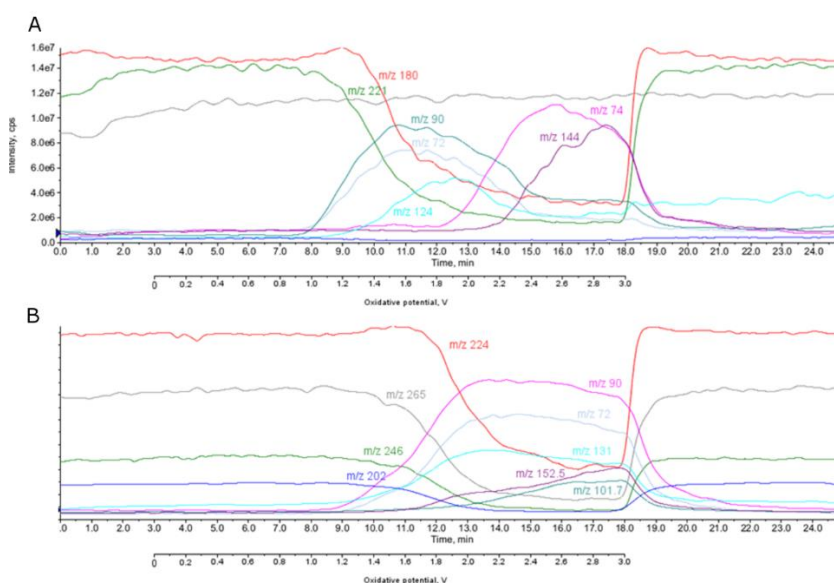


Rycina 4. 30. Procent aktywności poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 po inkubacji mikrosomów wątroby z badanymi związkami, V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO o stężeniu odpowiednio 100 µM oraz 1 mM. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SEM, n=3

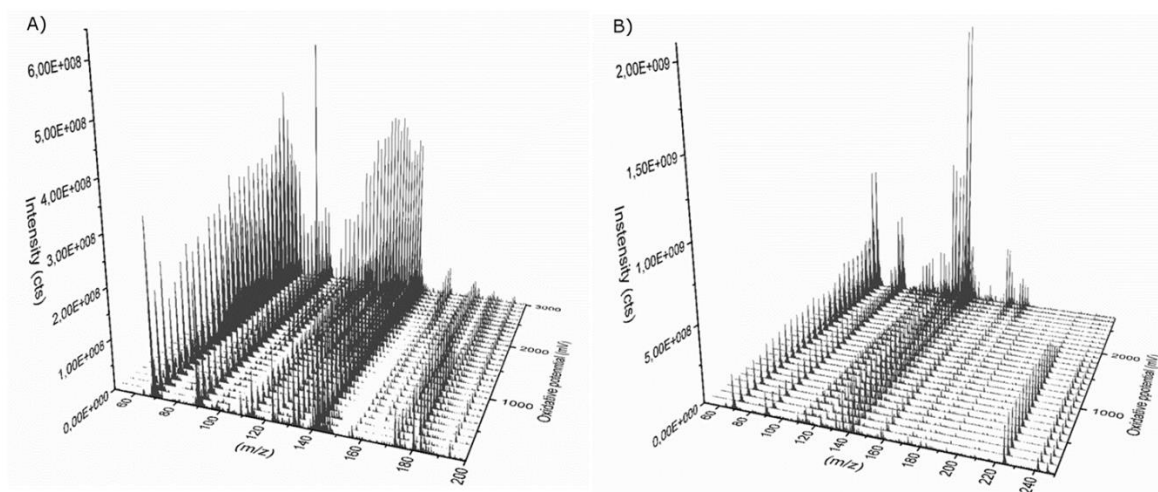
4.2.10. Badanie metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO za pomocą detektora elektrochemicznego ROXY

W celu przewidywania metabolizmu badanych analogów V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO przeprowadzono proces utleniania elektrochemicznego badanych NO-donorów. Na rycinach 4.31 i 4.32 przedstawiono odpowiednio zmiany intensywności wybranych sygnałów badanych związków i produktów ich elektrochemicznego utlenienia oraz widma masowe V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w zależności od przyłożonego napięcia. Najintensywniejsze sygnały zaobserwowano od adduktów badanych związków z sodem $[M+Na^+]^+$ m/z 180 dla V-PYRRO/NO oraz m/z 224 w przypadku V-PROLI/NO. W badaniu zaobserwowano również powstawanie adduktów badanych związków z NO_3^-

$[M+NO_3^-+2H^+]^+$ o masach m/z 221 dla V-PYRRO/NO oraz m/z 265 dla V-PROLI/NO. Intensywność tych sygnałów zmniejszała się wraz ze wzrostem napięcia przyłożonego do powierzchni elektrody pracującej. Cząsteczka V-PYRRO/NO ulegała elektrochemicznemu utlenieniu od wartości napięcia około 1 V, natomiast V-PROLI/NO utleniał się od wartości napięcia 1,5 V, gdzie wraz ze zmniejszeniem sygnału pochodzącego od związków macierzystych, jednocześnie pojawiały się sygnały od produktów elektrochemicznego utlenienia badanych NO-donorów. Przypuszcza się, że związki te są najprawdopodobniej produktami rozpadu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO pod wpływem przyłożonego napięcia.



Rycina 4. 31. Voltamogramy masowe 2D, przedstawiające zmiany intensywności sygnałów dla jonów badanych substancji oraz produktów ich utlenienia w zależności od wartości przyłożonego napięcia dla V-PYRRO/NO (A) oraz V-PROLI/NO (B)



Rycina 4. 32. Voltamogramy masowe 3D, przedstawiające zmieniającą się intensywność widma masowego badanych substancji V-PYRRO/NO (A) oraz V-PROLI/NO (B) w zależności od wartości przyłożonego napięcia

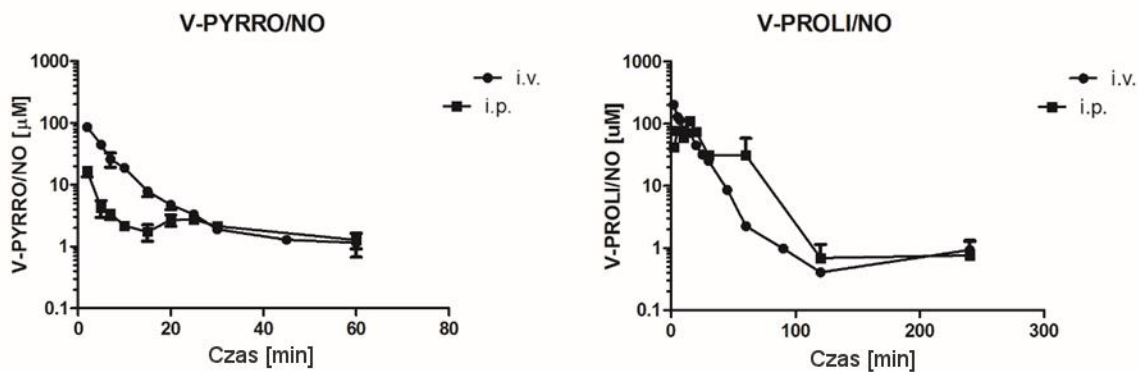
4.2.11. Wpływ stłuszczenia wątroby na farmakokinetykę V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO

4.2.11.1. Profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby

W przypadku badanych analogów zaobserwowano odmienny profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby wywołanym dietą bogatotłuszczową w porównaniu do myszy zdrowych (rycina 4.33). Ekspozycja V-PYRRO/NO w osoczu, po podaniu tej samej dawki myszom ze stłuszczeniem wątroby była wyższa ($C_0 = 130,96 \mu\text{M}$, $\text{AUC} = 722,17$) w porównaniu do myszy zdrowych ($C_0 = 41,5 \mu\text{M}$, $\text{AUC} = 218,62$). W tabeli 4.14 zebrano podstawowe parametry farmakokinetyczne związków u myszy ze stłuszczeniem wątroby. V-PYRRO/NO, w porównaniu do myszy zdrowych, ulegał wolniejszej eliminacji z organizmu w konsekwencji zmniejszenia klirensu całkowitego związku, a wydłużeniu uległ średni czas przebywania związku w organizmie. Stłuszczenie wątroby i związana z nim otyłość przyczyniła się także do znacznego zmniejszenia objętości dystrybucji tego NO-donora (z 0,88 L/kg do 0,38 L/kg). Zaskakująco, w przypadku związku V-PROLI/NO zaobserwowano zwiększenie szybkości eliminacji, dwukrotne zwiększenie klirensu całkowitego oraz skrócenie średniego czasu przebywania związku w organizmie. Zwiększeniu uległa również objętość dystrybucji V-PROLI/NO (z 0,15 L/kg u myszy zdrowych do 0,22 L/kg u myszy z eksperymentalnym stłuszczeniem wątroby).

Tabela 4. 14. Wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych wyznaczonych dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po jednorazowym dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków u myszy ze stłuszczeniem wątroby

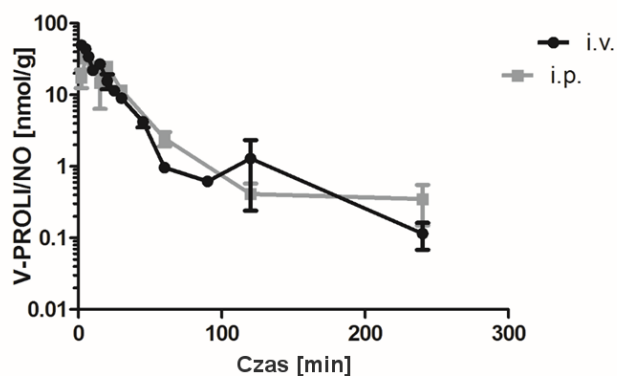
Parametr	V-PYRRO/NO		V-PROLI/NO	
	Podanie <i>i.v.</i>	Podanie <i>i.p.</i>	Podanie <i>i.v.</i>	Podanie <i>i.p.</i>
C_0 [μM]	130,96	-	271,86	-
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ [$\mu\text{M} \cdot \text{min}$]	722,17	228,18	3013,346	2636,65
MRT [min]	8,76	46,8	19,42	21,17
C_{max} [μM]	-	32,57	-	110,33
t_{max} [min]	-	2	-	15
V_{ss} [L/kg]	0,38	-	0,2195	-
Cl [L/min/kg]	0,04	-	0,0101	-
F [%]	-	31,6	-	99,1



Rycina 4. 33. Profil farmakokinetyczny związków V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po podaniu badanych analogów dożylnie oraz dootrzewnowo w dawkach 32 µmol/kg oraz 29 µmol/kg odpowiednio dla V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, u myszy ze stłuszczeniem wątroby

4.2.11.2. *Dystrybucja V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO w wątrobie u myszy ze stłuszczeniem wątroby*

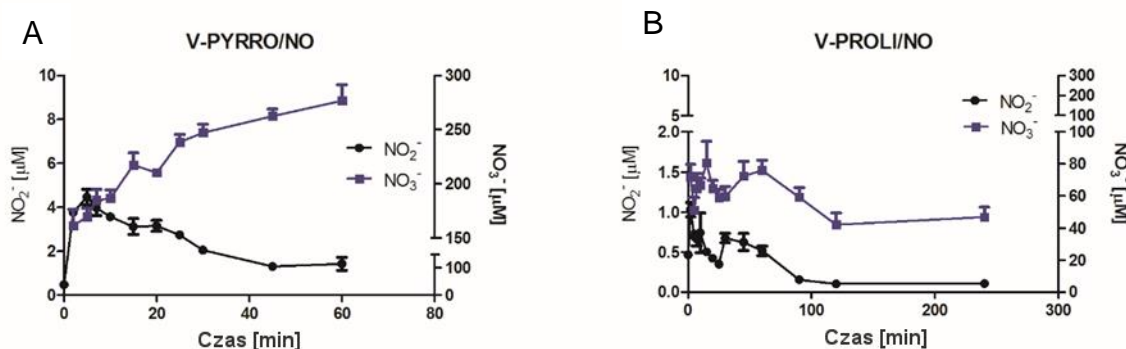
Podobnie jak w przypadku myszy zdrowych, również w grupie myszy z eksperymentalnym stłuszczeniem wątroby, jedynie stężenie V-PROLI/NO było oznaczalne w homogenatach próbek wątroby po jednorazowym dożylnym podaniu zwierzętom badanych związków (**rycina 4.34**).



Rycina 4. 34. Zależność stężenia od czasu dla V-PROLI/NO w wątrobie po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanego związku w dawce 29 µmol/kg u myszy ze stłuszczeniem wątroby

4.2.11.3. Uwalnianie NO z V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO po podaniu dożylnym u myszy ze stłuszczeniem wątroby

Ogólnoustrojowe uwalnianie tlenku azotu u myszy ze stłuszczeniem wątroby oceniono po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO poprzez analizę stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) w osoczu. W efekcie podania V-PYRRO/NO zaobserwowano istotnie zwiększenie stężenia azotanów (III) przy C_{max} równym 5 min oraz zwiększenie stężenia azotanów (V) do 60 min od podania V-PYRRO/NO. Po dożylnym podaniu V-PROLI/NO myszom ze stłuszczeniem wątroby nie zaobserwowano zwiększenia stężenia azotanów (III) oraz azotanów (V) przekraczających stężenia endogenne ($0,6 \mu\text{M}$ dla NO_2^- oraz $50 \mu\text{M}$ dla NO_3^-) (rycina 4.35).

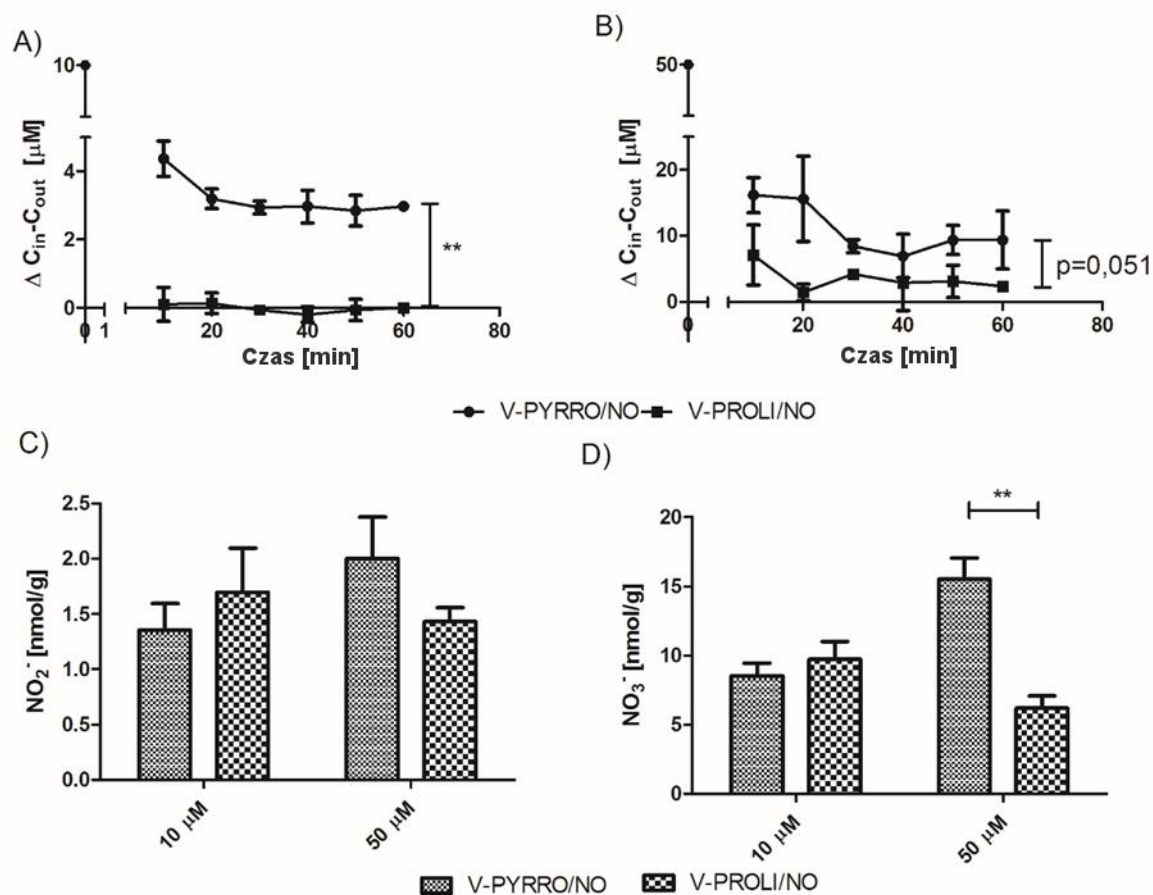


Rycina 4. 35. Wartości stężeń azotanów (III) oraz azotanów (V) w osoczu po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO (A) oraz V-PROLI/NO (B) u myszy ze stłuszczeniem wątroby

4.2.11.4. Klirens wątrobowy V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby

Metabolizm wątrobowy badanych NO-donorów oceniono również u myszy ze stłuszczeniem wątroby w modelu *ex vivo* izolowanej, perfundowanej wątroby myszy. Choroba miała wpływ na współczynnik ekstrakcji wątrobowej V-PYRRO/NO, który wzrósł istotnie z 0,3 u myszy zdrowych do 0,48 w grupie myszy chorych. Pomimo tego wzrostu, wartość klirensu wątrobowego po znormalizowaniu na masę ciała myszy ($0,034 \text{ L/min/kg}$) była niższa w porównaniu do myszy zdrowych ($0,058 \text{ L/min/kg}$). Zaobserwowano również zwiększenie stężenia azotanów (V) w wątrobie w wyniku godzinnej perfuzji wątroby myszy

chorych, buforem zawierającym V-PYRRO/NO w dawce 50 μM . Choroba nie wpływała na metabolizm wątrobowy V-PROLI/NO, który podobnie jak w przypadku myszy zdrowych odgrywał bardzo małą rolę w całkowitym procesie eliminacji tego związku z organizmu (rycina 4.36).

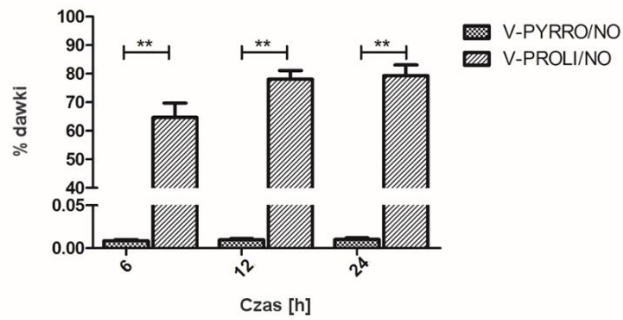


Rycina 4. 36. Obliczone różnice stężeń V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO pomiędzy próbkami buforu przed i po perfuzji narządowej myszy ze stłuszczeniem wątroby przy stężeniach związków 10 μM (A) oraz 50 μM (B). Stężenie azotanów (III) (C) oraz azotanów (V) (D) w homogenatach wątroby po godzinnej perfuzji narządu. Wartości przedstawiono jako średnia \pm SEM, $n = 3$

4.2.11.5. Klirens nerkowy V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby

U myszy ze stłuszczeniem wątroby oraz towarzyszącą mu otyłością, stopień eliminacji V-PROLI/NO przez nerki był wyższy w porównaniu do myszy zdrowych. Związek był eliminowany z moczem w około 81% w postaci niezmienionej, a jego klirens nerkowy

wynosił około 0,008 mL/min/kg. V-PYRRO/NO, podobnie jak w przypadku myszy zdrowych, wydalany był z moczem w znikomym stopniu (<0,05%) (**rycina 4.37**).



Rycina 4. 37. Ułamek dawki V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO eliminowany przez nerki w postaci niezmienionej po dożylnym podaniu badanych analogów u myszy ze stłuszczeniem wątroby

4.2.12. Podsumowanie II części wyników

1. V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO cechowały się szybkim oraz niecałkowitym wchłanianiem po podaniu dootrzewnowym, szybką eliminacją oraz zróżnicowaną dystrybucją w organizmie. V-PYRRO/NO rozmieszczał się w przestrzeni zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej, podczas gdy V-PROLI/NO jedynie w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.
2. Wychwył i metabolizm V-PYRRO/NO zachodził w wątrobie (współczynnik ekstrakcji wątrobowej $E = 0,3$) z uwolnieniem NO (wzrost stężenia azotanów (III) i azotanów (V) w wątrobie), podczas gdy V-PROLI/NO był eliminowany w głównej mierze przez nerki (około 61% związku było wydalone z moczem w postaci niezmienionej).
3. Metabolizm V-PYRRO/NO zachodził przez izoenzymy cytochromu P450, przede wszystkim przez izoenzym CYP2E1, lecz także CYP2C9, CYP1A2 oraz CYP3A4. W przypadku V-PROLI/NO wykazano niskie powinowactwo tego związku do izoenzymów cytochromu P450. V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO nie hamowały aktywności izoenzymów cytochromu P450.
4. Zastosowanie systemu do elektrochemicznego utleniania ROXY™ pozwoliło na uzyskanie prawdopodobnych produktów elektrochemicznego rozpadu obu związków, powstałych pod wpływem przyłożonego napięcia. Nie uzyskano metabolitów wygenerowanych *in silico*, ani cytowanych w literaturze.
5. Stłuszczenie wątroby znacznie modyfikowało profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO, zmniejszając szybkość eliminacji oraz objętość dystrybucji tego związku. W przypadku V-PROLI/NO zaobserwowano zwiększenie szybkości eliminacji, zwiększenie klirensu nerkowego oraz zwiększenie objętość dystrybucji u myszy ze stłuszczeniem wątroby w porównaniu do myszy zdrowych.

5. Dyskusja

Celem badań prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej było z jednej strony opracowanie panelu metod, służących badaniu farmakokinetyki i metabolizmu nowych związków, potencjalnych leków, a z drugiej strony zastosowanie opracowanych technik do oceny profilu farmakokinetycznego i metabolizmu dwóch związków opisywanych w piśmiennictwie jako hepatoselektywne NO-donory.

W ciągu kilku ostatnich lat, wiele leków zostało wycofanych z rynku z powodu niebezpiecznych interakcji związanych z hamowaniem aktywności cytochromu P450^{199,200}. Ponadto, nieodpowiedni profil farmakokinetyczny i metaboliczny nowych związków jest jednym z najczęstszych przyczyn niepowodzeń w badaniach nad nowym lekiem²⁰¹. Z tego względu badania farmakokinetyki oraz metabolizmu stanowią istotną część badań przedklinicznych nowych związków i powinny być przeprowadzane we wczesnych fazach procesu badania i rozwoju leku^{6,8,9,202}. Wśród modeli wykorzystywanych do badania metabolizmu nowych związków możemy wyróżnić metody bazujące na różnych układach – począwszy od najprostszych, jak pojedyncze rekombinowane enzymy, aż do bardzo złożonych, odzwierciedlających warunki fizjologiczne, takich jak układ *ex vivo* izolowanej wątroby^{202–206} na układzie *in vivo* skończywszy. W niniejszej pracy doktorskiej opracowano i zastosowano szeroki panel metod *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* oraz wykorzystano je do oceny farmakokinetyki i metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO.

5.1. Opracowanie i walidacja metody jednoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w matrycach biologicznych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS

Podstawą rzetelnej oceny farmakokinetyki badanych związków jest opracowanie odpowiedniej metody bioanalitycznej, spełniającej kryteria walidacji metod bioanalitycznych zgodnie z wytycznymi FDA i EMA. Dodatkowo, metoda taka powinna pozwalać na analizę stężenia badanych związków w próbkach o niewielkiej objętości. Bardzo ważnymi czynnikami, decydującymi o przydatności danej metody są również czas trwania samej analizy oraz jej koszty.

Opracowane warunki analizy pozwoliły na selektywne i specyficzne oznaczanie badanych związków we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych. Wykazano, że metoda cechowała się wysoką oznaczalnością równą 50 nM, w zakresie liniowym stężeń 0,05–15 μ M we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych. Wewnątrz- oraz międzyseryjna dokładność i precyzja metody spełniała kryteria walidacji metod bioanalitycznych. Analizowane próbki biologiczne poddano procesowi strącenia białek, i na podstawie wartości odzysku stwierdzono, że ta technika oczyszczania próbek charakteryzuje się wysoką wydajnością, niezależnie od użytej matrycy biologicznej. W przypadku czterech z pięciu analizowanych matryc biologicznych nie stwierdzono absolutnego efektu matrycy. Jedynie w przypadku próbek moczu stwierdzono znaczne zmniejszenie sygnału w stosunku do czystych roztworów analitów. Przyczyną tego zjawiska była supresja jonizacji standardu wewnętrznego wywołana prawdopodobnie kwaśnym odczynem moczu. Nie zaobserwowano supresji sygnału V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. Pomimo efektu zmniejszenia jonizacji, zjawisko to było stałe i nie wpływało na precyzję oznaczeń, a liniowy przebieg krzywej kalibracyjnej obejmował cały zakres stężeń. Dodatkowo, wartości współczynników wariacji dla krzywych kalibracyjnych były niewielkie, co wskazuje, że opracowana metoda jest wolna od względnego efektu matrycy. Analizowane próbki biologiczne były stabilne w warunkach przeprowadzanych oznaczeń.

Przeprowadzona procedura walidacji metody jednoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO pozwala na wiarygodne stosowanie tej metody w laboratorium do rutynowej analizy stężeń badanych związków.

5.2. Opracowanie metody badania aktywności izoenzymów cytochromu P450 z zastosowaniem systemu LC/MS/MS

Interesującą metodą stosowaną w badaniach metabolizmu jest jednoczesne wyznaczenie wpływu badanych substancji na aktywność izoenzymów cytochromu P450. W metodzie tej wykorzystuje się mikrosomy wątrobowe, będące najczęstszym modelem stosowanym w badaniach metabolizmu ksenobiotyków²⁰⁶. Główną zaletą tej metody jest jednoczesne i szybkie sprawdzenie aktywności najważniejszych izoenzymów CYP450, co pozwala na zaliczenie metody do metod wysokoprzepływowych.

Według zaleceń Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków oraz Europejskiej Agencji Leków, przedkliniczne badania metabolizmu leków powinny być prowadzone z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów wątroby^{6,9}, jednakże wiele badań prowadzonych jest z zastosowaniem szczurzych mikrosomów lub hepatocytów z powodu łatwiejszej dostępności wątroby szczurzej oraz komplementarności z innymi badaniami prowadzonymi na modelach zwierzęcych²⁰⁷⁻²¹⁰. Używając mikrosomów pochodzących od szczurów należy mieć na uwadze różnice międzygatunkowe w budowie, aktywności oraz specyficzności substratowej izoenzymów cytochromu P450. Izoenzymy CYP1A2 oraz CYP2E1 wykazują silny konserwatyzm strukturalny pomiędzy gatunkami (powyżej 80%) oraz podobną aktywność, co stwarza możliwość ekstrapolacji wyników między gatunkami. Enzymy podrodziny CYP2C stanowią największy procent wszystkich białek cytochromu P450 w wątrobie u gryzoni, podczas gdy u ludzi głównym izoenzymem jest CYP3A4. Głównymi izoformami podrodziny u ludzi są CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 oraz CYP2C19, podczas gdy u szczurów CYP2C6, -2C7, -2C11, -2C12, -2C13, -2C22 oraz -2C23. Enzymy tej podrodziny u szczurów wykazują różnice w ekspresji w zależności od płci. Ekspresja CYP2C12 występuje głównie u szczurów płci żeńskiej, natomiast CYP2C11 oraz CYP2C13 u osobników męskich. Izoenzym CYP2C11 jest główną izoformą w wątrobie męskich szczurów, obejmując ponad 50% wszystkich izoenzymów cytochromu P450. W podrodzinie izoenzymów CYP2D u ludzi znajduje się jeden enzym CYP2D6, stanowiący około 4% całkowitej puli enzymów cytochromu, lecz odpowiedzialny za biotransformację około 30% leków obecnych na rynku. U szczurów występuje 6 izoenzymów podrodziny CYP2D (CYP2D1, -2D2, -2D3, -2D4, -2D5 oraz -2D18), które charakteryzują się wysokim podobieństwem do ludzkiego CYP2D6 (>70%). Wśród wszystkich izoform, CYP2D1 jest szczurzym ortologiem ludzkiego CYP2D6. Enzymy podrodziny CYP3A (głównie CYP3A4 oraz CYP3A5), metabolizując ponad połowę wszystkich leków obecnych na rynku są najważniejszymi enzymami metabolizującymi ksenobiotyki u ludzi. Najbardziej zbliżonymi strukturalnie oraz funkcjonalnie odpowiednikami tych enzymów u szczurów są CYP3A1 oraz CYP3A2²¹¹.

Przy wyborze składników koktajlu substratów izoenzymów cytochromu P450 kierowano się możliwością przyszłego zastosowania opracowanej metody także dla ludzkich mikrosomów wątrobowych. Z tego względu wybór analizowanych związków był kompromisem pomiędzy substratami selektywnymi dla ludzkich i szczurzych izoenzymów cytochromu P450. Na podstawie analizy danych literaturowych (**tabela 5.1**) wybrano jako

substancje modelowe: fenacetynę, tolbutamid, mefenytoinę, bufuralol, chlorzoksazon oraz midazolam. Izoenzymy CYP1A2 oraz CYP2E1 charakteryzują się wysoką konserwatywnością międzygatunkową, stąd zastosowane substraty, odpowiednio fenacetyna i chlorzoksazon mogą być z powodzeniem wykorzystane do badania aktywności izoenzymów szczurzych i ludzkich^{212,213}. Substraty ludzkich izoenzymów rodziny CYP2C: tolbutamid (CYP2C9) oraz S-(+)-mefenytoina (CYP2C19) są również metabolizowane przez szczurze mikrosomy wątrobowe. S-(+)-mefenytoina jest przekształcana do 4'-hydroksymefenytoiny przez szczurzy izoenzym CYP2C11, jednakże wydajność tego procesu jest około 14-krotnie niższa w porównaniu do ludzkich mikrosomów wątroby²¹². Tolbutamid jako substancja modelowa aktywności ludzkiego izoenzymu CYP2C9 jest często stosowany w badaniach z zastosowaniem mikrosomów szczurzych, jak i ludzkich. Jednakże, jego metabolizm do 4-hydroksytolbutamidu w ludzkich mikrosomach wątroby jest silnie hamowany przez sulfafenazol (IC₅₀ 0,14 μM). Natomiast w przypadku szczurzych mikrosomów inhibitor ten charakteryzuje się bardzo słabymi właściwościami hamującymi (IC₅₀ < 100 μM)²¹³. Sugeruje to różnicę w budowie pomiędzy centrum aktywnym ludzkiego izoenzymu CYP2C9 i jego szczurzym odpowiednikiem (CYP2C6)²¹². W przypadku ludzkiego izoenzymu CYP2D6 oraz szczurzych odpowiedników, CYP2D1 oraz CYP2D2, najczęściej wybieranym substratem modelowym jest bufuralol. Aktywność 1-hydroksylacji bufuralolu jest wyższa w przypadku stosowania szczurzych mikrosomów wątroby, natomiast chinidyna, silny inhibitor ludzkiego CYP2D6 powoduje jedynie nieznaczne zahamowanie aktywności szczurzych izoenzymów²¹². Spośród dostępnych substratów podrodziny izoenzymu CYP3A wybrano midazolam, którego 1- oraz 4-hydroksylacja jest specyficzna zarówno dla ludzkich izoenzymów CYP3A4/3A5 oraz szczurzych odpowiedników CYP3A1/3A2²¹⁴.

Tabela 5. 1. Wybrane substancje modelowe w badaniach metabolizmu leków z udziałem cytochromu P450 stosowane w badaniach na modelach zwierzęcych wraz z odnośnikami literaturowymi

Izoenzym	Substancja modelowa	Metabolit	Źródła literaturowe
CYP1A2	Fenacetyna	Paracetamol (ACP)	Kobayashi et al ^{214,215} Easterbrook et al ²¹⁶ Wang et al ^{217,218} Yamasaki et al ²¹⁹ Zhang et al ²²⁰
CYP2C9	Tolbutamid	4-hydroksytolbutamid (4-OH-TB)	Easterbrook et al ²¹⁶ Han et al ²⁰⁸ Rolsted et al ²²¹ Videau et al ²²² Wang et al ^{217,218} Yamasaki et al ²¹⁹ Zhang et al ²²⁰
CYP2C19	S-(+)-mefenytoina	4-hydroksymefenytoina (4-OH-MP)	Kobayashi et al ²¹⁴ Easterbrook et al ²¹⁶ Bogaards et al ²¹² Zhang et al ²²⁰
CYP2D6	Bufuralol	1'-hydroksybufuralol (1-OH-BF)	Kobayashi et al ^{214,215} Hiroi et al ²²³ Bogaards et al ²¹² Rolsted et al ²²¹
CYP2E1	Chlorzoksazon	6-hydroksychlorzoksazon (6-OH-CH)	Kobayashi et al ^{214,224} Gómez-Lechón et al ²²⁴ Easterbrook et al ²¹⁶ Bogaards et al ²¹² Han et al ²⁰⁸ Rolsted et al ²²¹ Wang et al ²¹⁷ Yamasaki et al ²¹⁹
CYP3A4	Midazolam	1'- oraz 4 – hydroksymidazolam (1-OH-MZ) oraz (4-OH-MZ)	Kobayashi et al ^{214,215} Gómez-Lechón et al ²²⁴ Han et al ²⁰⁸ Rolsted et al ²²¹ Uchida et al ²²⁵ Videau et al ²²² Wang et al ²¹⁸ Yamasaki et al ²¹⁹ Zhang et al ²²⁰

Opracowaną metodę oznaczania stężeń metabolitów wybranych substancji modelowych izoenzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątroby szczura poddano procesowi walidacji. Badane anality oznaczano selektywnie z wysoką oznaczalnością wynoszącą 10 ng/mL dla 4-OH-MP i 4-OH-TB, 25 ng/mL dla ACP, 6-OH-CH, 1-OH-MZ i 4-OH-MZ oraz 50 ng/mL dla 1-OH-BF. Opracowane warunki analizy zapewniały zadowalającą precyzję oraz dokładność pomiarów. Zastosowane strącenie białka okazało się wystarczające do oznaczenia stężeń metabolitów, obecnych w badanych próbkach. Osiągnięto odzysk od 69% do 92,6% dla poszczególnych analitów, którego wartość była stała w zakresie analizowanych stężeń, co wskazuje na wiarygodność otrzymanych wyników. Bezwzględny efekt matrycy wynosił od 0,3 do 62,3%. Znaczącą supresję jonizacji zaobserwowano w przypadku paracetamolu (- 62,3%), lecz mimo tego zjawiska uzyskana krzywa wzorcowa obejmowała cały zakres stężeń. Współczynnik zmienności dla tg kąta nachylenia (α) prostej kalibracyjnej dla sześciu analiz wykorzystujących niezależne matryce biologiczne nie przekraczał 4%, co według pracy Matuszewski¹⁹⁴ wskazuje, że metoda jest wolna od względnego efektu matrycy. Ponadto, badane próbki biologiczne były stabilne w czasie prowadzenia analiz. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że metoda jednoczesnego oznaczania badanych metabolitów substancji modelowych pozwala na otrzymanie powtarzalnych i rzetelnych wyników i może być stosowana do wyznaczania aktywności izoenzymów cytochromu P450.

Badając kinetykę reakcji enzymatycznych badanych substancji modelowych stwierdzono, że biotransformacja bufuralolu do hydroksylowej pochodnej oraz metabolizm midazolamu do 1'- oraz 4-hydroksymidazolamu nie wykazywały typowej kinetyki Michaelisa-Menten, lecz zachodziły z udziałem autoaktywacji. Efekt ten zaobserwowano zarówno podczas inkubacji pojedynczych substratów, jak i w trakcie inkubacji koktajlu substancji modelowych. Wcześniejsze badania wskazywały na możliwą aktywację heterotropową lub homotropową izoenzymu CYP3A4, związaną z przypuszczalnym wiązaniem do centrum aktywnego enzymu kilku substratów jednocześnie^{226–232}. Takie oddziaływanie prowadziło do sigmoidalnej kinetyki metabolizmu midazolamu. Badania kinetyki biotransformacji bufuralolu do 1'-hydroksybufuralolu opisywano dotychczas modelem typowej lub dwufazowej kinetyki enzymatycznej²³³. Zjawisko inhibicji substratowej miało miejsce podczas inkubacji S(+)-mefenytoiny z frakcją mikrosomalną

wątroby szczura. We wcześniejszych pracach, wykorzystujących ludzkie mikrosomy wątroby, metabolizm mefenytoiny wykazywał cechy typowej kinetyki Michaelisa-Menten^{233,234}. Ponieważ związek ten jest izomerem optycznym, podjęto próbę oceny kinetyki metabolizmu związku racemicznego. W przypadku metabolizmu związku racemicznego, proces inhibicji substratowej również wpływał na całkowity profil kinetyczny. Jak wcześniej wykazano, różnice międzygatunkowe mogą tłumaczyć różny obserwowany profil kinetyczny badanych substratów²³⁵. Zastosowane inhibitory poszczególnych izoenzymów powodowały zahamowanie aktywności badanych reakcji katalitycznych, co także potwierdziło poprawność przeprowadzonych badań. W celu zahamowania aktywności izoenzymów: CYP1A2 przez furafylinę, CYP2C6 (odpowiednik ludzkiego CYP2C9 w mikrosomach szczurzych) przez sulfafenazol oraz CYP1D1/1D2 (odpowiedniki ludzkiego CYP2D6) przez chinidynę, niezbędne były wysokie stężenia inhibitorów. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi^{212,213}. Uzyskane wartości Km dla poszczególnych substratów izoenzymów cytochromu P450 stosowanych w postaci koktajlu wraz z wartościami dostępnymi w piśmiennictwie zebrano w **tabeli 5.2**.

Tabela 5. 2. Otrzymane eksperymentalnie wartości stałej Km dla poszczególnych substratów izoenzymów cytochromu P450 porównane z wartościami literaturowymi

Izoenzym	Substrat	Km [μ M]	Wartości literaturowe Km [μ M]
CYP1A2	Fenacetyna	42,5	10-50 ²³⁶⁻²⁴³
CYP2C9	Tolbutamid	10	100-200 ^{221,236,238-242,244-246}
CYP2C19	(S)(+) mefenytoina	50*	20-100 ^{216,238-242,244,245,247-249}
CYP2D6	Bufuralol	11	5-20 ^{215,221,236-238,243,247}
CYP2E1	Chlorzoksazon	72	40-100 ^{216,221,238-242,245,246,248}
CYP3A4	Midazolam	10	2-25 ^{215,221,236-243,246-249}

*wartości uzyskane podczas inkubacji pojedynczego substratu

Wartości parametrów kinetycznych, obliczone za pomocą różnych przekształceń (równania Lineweaver-Burka, Eadie-Hofstee, Hanesa-Woolfa) nie różniły się znacząco od parametrów wygenerowanych metodą regresji nieliniowej, co świadczy o dokładności wszystkich metod i możliwości ich zamiennego stosowania. Wartości parametrów kinetycznych Km oraz Vmax uzyskanych dla pojedynczych substratów i dla mieszaniny substancji modelowych były podobne dla bufuralolu, chlorzoksazonu oraz midazolamu, natomiast w przypadku fanacetyny oraz tolbutamidu były niższe po zastosowaniu koktajlu. Powód tej różnicy nie jest zrozumiały, zwłaszcza, że dane literaturowe wskazują, że

wartości K_m wzrastają w przypadku zastosowania mieszaniny substratów²⁵⁰. W przypadku mefenytoliny, zastosowanej jako substrat dla izoenzymu CYP2C19, z powodu mało wydajnej biotransformacji nie udało się oznaczyć stężeń 4-hydroksymefenytoliny w próbkach inkubacyjnych wszystkich substratów jednocześnie. W przyszłości należałoby rozważyć zastosowanie innego substratu modelowego tego izoenzymu, np. omeprazolu. W pracy porównano kinetykę metabolizmu izomeru S(+) mefenytoliny oraz związku racemicznego. W obu przypadkach wykazano inhibicję substratową, przy czym wyznaczona stała inhibicji dla związku racemicznego była niższa, w porównaniu do izomeru (S)(+), co może świadczyć o niższym powinowactwie tego enancjomeru do miejsca hamującego aktywność enzymu. Uzyskane wartości K_m dla poszczególnych substratów izoenzymów cytochromu P450 stosowanych w postaci koktajlu odpowiadały wartościom literaturowym, w przypadku wszystkich analizowanych związków z wyjątkiem tolbutamidu. Należy mieć jednak na uwadze, że dostępne dane literaturowe opisują procesy kinetyki enzymatycznej zachodzące w ludzkich mikrosomach wątrobowych. Powodem odmiennych wartości, może być wcześniej wspomniana różnica w budowie między ludzkim izoenzymem CYP2C9 oraz CYP2C6 - jego szczurzym odpowiednikiem²¹², a także prawdopodobnym różnym poziomem ekspresji oraz aktywności białek mikrosomalnych²¹¹. Badane substraty modelowe w dalszych badaniach aktywności stosowane były w stężeniach zbliżonych do uzyskanych wartości K_m .

W celu weryfikacji poprawności opracowanej metody przeprowadzono badanie aktywności wszystkich analizowanych izoenzymów w obecności ketokonazolu. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że ketokonazol jest silnym inhibitorem izoenzymu CYP3A4 (IC_{50} 1 μ M), ale również hamuje aktywność izoenzymów CYP1A2 (IC_{50} 4,4 μ M), CYP2E1 (IC_{50} 8,1 μ M) oraz CYP2C9 (IC_{50} 23,5 μ M), podczas gdy aktywność izoenzymu CYP2D6 nie uległa zmianie. Dane te są zgodne z wynikami wielu badaczy, którzy dowodzą, że antybiotyki przeciwgrzybicze z grupy azoli mogą hamować aktywność kilku izoenzymów cytochromu P450. W pracy Paine i wsp.²⁵¹ wykazano zahamowanie izoenzymu CYP1A2 zlokalizowanego w jelitach przez ketokonazol. Supresja hydroksylacji tolbutamidu (reakcji katalizowanej przez CYP2C9) przez azole w modelach *in vitro* była badana przez Back'a i współautorów²⁵². Autorzy wykazali, że ketokonazol hamuje aktywność izoenzymu CYP2C9 w ludzkich mikrosomach wątrobowych z IC_{50} równym 16,5 μ M. Efekt nieselektywnych inhibitorów cytochromu P450, jak

1-aminobenzotriazolu, SKF – 525A oraz ketokonazolu na ludzkie izoenzymy cytochromu P450 badano także przez grupę Chie Emoto²⁵³. Dowiedziono, że ketokonazol posiada słabe właściwości hamujące izoenzym CYP1A2 ($K_i=120 \mu\text{M}$) oraz, że jest inhibitorem kompetycyjnym izoform z rodziny CYP2C ($K_i = 7,9 \mu\text{M}$ dla CYP2C9 oraz $K_i = 6,9 \mu\text{M}$ dla CYP2C19), mieszanym inhibitorem wobec izoenzymu CYP2D6 ($K_i = 12 \mu\text{M}$) oraz CYP2E1 ($K_i = 41 \mu\text{M}$) oraz bardzo silnym inhibitorem kompetycyjnym izoenzymu CYP3A4 ($K_i = 0,02 \mu\text{M}$). Wpływ ketokonazolu na metabolizm amiodaronu wykorzystując zarówno ludzkie, jak i szczurze mikrosomy badał Elsherbinyi wsp.²⁵⁴. Co ciekawe, w przypadku mikrosomów pozyskanych z wątroby szczurów, ketokonazol okazał się silniejszym inhibitorem wobec izoenzymów z rodziny CYP2D niż CYP3A. Stosując ludzkie mikrosomy, ketokonazol okazał się silnym inhibitorem izoenzymów CYP1A1, CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2. Także Kobayashi i wsp.²¹⁵ oraz Eagling'a i wsp.²¹³, którzy badali wpływ różnych inhibitorów na izoenzymy cytochromu P450 u szczurów, wykazali, że ketokonazol nie jest selektywnym inhibitorem izoenzymów z rodziny CYP3A, lecz powoduje hamowanie aktywności pozostałych izoenzymów. Tylko w jednej pracy wykazano, że ketokonazol nie wpływa na aktywność izoenzymów cytochromu P450²²⁵.

W świetle przedstawionych wyników należy uznać, że ketokonazol jest silnym inhibitorem nie tylko izoenzymu CYP3A4, lecz także CYP1A2, CYP2E1 oraz CYP2C9 i nie powinien być uznawany jako specyficzny inhibitor CYP3A4 w mikrosomach wątroby szczura.

5.3. Opracowanie metody elektrochemicznego utleniania związków z zastosowaniem systemu ROXY™ połączonego z tandemowym spektrometrem mas

W ostatnich latach dokłada się wielu starań aby opracować różne metody, które mogą symulować procesy utleniania związków, zachodzące najczęściej z udziałem izoenzymów cytochromu P450. Obok ogólnie stosowanych i akceptowanych metod *in vitro*, wykorzystujących frakcje subkomórkowe wątroby (cytozol, mikrosomy, frakcja S9) lub rekombinowane enzymy, interesującą metodą może być połączenie detektora elektrochemicznego (EC) z tandemową spektrometrią mas (MS). Metoda ta zaliczana jest do technik instrumentalnych, w których nie stosuje się układów biologicznych. Pozwala ona

na identyfikację produktów końcowych oraz pośrednich reakcji elektrochemicznych badanych związków²⁵⁵. Zastosowanie tej metody pozwala na identyfikację produktów utlenienia badanych związków, czyli ich potencjalnych metabolitów natychmiast po ich utworzeniu. Jest to wielka zaleta tego typu oznaczeń, gdyż nawet wysokoreaktywne i niestabilne metabolity oraz produkty pośrednie reakcji są możliwe do wykrycia. Brak układów enzymatycznych może być równocześnie uważany za podstawową wadę metody, ponieważ elektrochemiczne utlenianie badanych związków nie zawsze odzwierciedla unikalną biotransformację zachodzącą z udziałem enzymów. Jurva i wsp.²⁵⁶ wykazali, że metody wykorzystujące utlenianie elektrochemiczne mogą być skutecznie stosowane w celu przewidywania procesu utleniania, który zapoczątkowany zostaje utlenieniem jednoelektronowym, takim jak N-dealkilacja, S-oksydacja, P-oksydacja, utlenienie alkoholi, hydroksylacja układów aromatycznych oraz dehydrogenacja. Elektrochemia nie jest korzystna w przypadku reakcji zapoczątkowanych przez bezpośrednie pozyskiwanie atomu wodoru, jak na przykład O-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych, z powodu zbyt wysokiego potencjału utleniającego wymaganego dla reakcji elektrochemicznego utlenienia²⁵⁶. System ten dotychczas zastosowano do badania metabolizmu wielu leków, takich jak paracetamol²⁵⁷, klozapina²⁵⁸, amodiachina²⁵⁹, werapamil²⁶⁰, diklofenak²⁶¹, galantamina²⁶², haloperidol²⁶³ czy tetrazepam²⁶⁴.

W omawianej pracy przygotowano metodę elektrochemicznej symulacji metabolizmu z wykorzystaniem potencjostatu ROXY™ sprzężonego z tandemową spektrometrią mas. Podczas opracowania metody przeprowadzono elektrochemiczne utlenienie związku referencyjnego, jakim był karwedilol. W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano kilka pochodnych, prawdopodobnych produktów utlenienia tego leku. Dzięki zastosowaniu tandemowego analizatora mas opisano struktury potencjalnych metabolitów, jako pochodne hydroksylowe oraz ketonowe dołączone do pierścienia karbazolu. Porównując proces elektrochemicznego utleniania oraz metabolizm karwedilolu przebiegający w warunkach *in vitro*¹⁹⁷, jak i *in vivo*¹⁹⁸ można wnioskować, że przewidywanie procesów utleniania za pomocą ROXY™ jest zbliżone do I fazy metabolizmu karwedilolu zachodzącej w organizmie, jednak nie obejmuje pełnego spektrum powstających metabolitów. W procesie biotransformacji karwedilolu u ludzi i badanych gatunków zwierząt laboratoryjnych głównymi szlakami metabolizmu I fazy jest hydroksylacja pierścieni karbazolowego, lecz również fenylowego^{198,265}. Schaefer i wsp.¹⁹⁸ opisali

struktury hydroksylowych metabolitów karwedilolu, jako 1-hydroksykarbazolylo-, 3-hydroksykarbazolylo-, 8-hydroksykarbazolylo- karwedilol oraz 4'-fenylo- i 5'-fenylo- karwedilol. Ponadto, dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczej spektrometrii mas, zidentyfikowano kolejne metabolity powstające w układach biologicznych, m.in. pochodną ketonową (m/z 421), metabolity dihydroksylowe (m/z 439) oraz związki o dodatkowych ugrupowaniach hydroksylowych i ketonowych (m/z 437)¹⁹⁶. W wyniku elektrochemicznego utlenienia obserwowano liczne metabolity, jednakże związane tylko z hydroksylacją oraz karbonylacją pierścienia karbazolu. Nie uzyskano pochodnych hydroksylowych w pierścieniu fenylovym, które również tworzone są w reakcjach biotransformacji w układach biologicznych.

Podczas badania procesów utleniania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO stosując tę metodę, nie zaobserwowano tworzenia się pochodnych epoksydowych, powstających przez utlenienie za pomocą cytochromu P450, lecz odnotowano prawdopodobnie tworzenie się produktów rozpadu badanych związków.

5.4. Ocena profilu farmakokinetycznego oraz metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO

Opierając się na strategii proleków, uwalnianie aktywnego metabolitu w specyficznym miejscu docelowego działania może być osiągnięte poprzez selektywną aktywację związku w danej tkance, mogącą być rezultatem reakcji enzymatycznej unikalnej dla danej tkanki, bądź wysokim stężeniem enzymu w tkance docelowej (w porównaniu do innych tkanek)²⁶⁶. W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po podaniu dootrzewnowym szybko wchłaniały się do krążenia ogólnego, z niecałkowitą biodostępnością wskazującą na intensywny efekt pierwszego przejścia oraz metabolizm wątrobowy badanych związków. Biodostępność V-PYRRO/NO była niższa w porównaniu do V-PROLI/NO i wynosiła około 27% (dla V-PROLI/NO 51%), sugerując intensywny metabolizm wątrobowy związków. Podobne wyniki dotyczące biodostępności V-PYRRO/NO przedstawiono w pracy Stinson i wsp.¹⁹⁵. Jednakże, wyniki eksperymentów badających eliminację wątrobową w modelu *ex vivo* izolowanej, perfundowanej wątroby wykazały, że związki charakteryzowały się dużo niższym wychwytem przez wątrobę ($E = 0,3$ oraz $E = 0,05$, odpowiednio dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO). Wyniki te nasuwają

wniosek, że niekompletna biodostępność badanych związków może być także wynikiem metabolizmu pozawątrobowego. Ponieważ enzymy cytochromu P450 zlokalizowane są również w innych tkankach, np. w płucach, nerkach lub jelicie cienkim^{267–269}, mogą one również brać udział w biotransformacji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. Częściowy rozkład badanych związków w innych tkankach może tłumaczyć ponadto zwiększenie stężenia azotanów (III) i (V) w osoczu, po dożylnym podaniu badanych analogów. Niewielki pozawątrobowy metabolizm związków może powodować ogólnoustrojowe działanie uwolnionego tlenu azotu. Saavedra i wsp.¹⁶⁵ wykazali, że dożylne podanie V-PYRRO/NO powoduje nieznaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi, podczas gdy nitroprusydek sodu (SNP) powodował natychmiastowy, znaczny spadek ciśnienia tętniczego krwi. Ponadto, jedynie po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO zauważono zwiększenie stężenia cGMP w wątrobie, nie zaobserwowanego w przypadku podania SNP.¹⁶⁵

Badane związki były szybko eliminowane z organizmu, po ich dożylnym podaniu zwierzętom, lecz drogi ich eliminacji były odmienne. V-PYRRO/NO był wychwytywany i metabolizowany przez wątrobę, podczas gdy V-PROLI/NO był w większości eliminowany przez nerki w niezmienionej formie. Różnice w ich profilach farmakokinetycznych mogły być związane z różnicami w lipofilowości obu związków. Dodatkowe ugrupowanie karboksylowe w strukturze V-PROLI/NO spowodowało znaczne zmniejszenie lipofilowości analogu. Wartości logP otrzymane w wyniku przewidywania *in silico* (Pallas) wynosiły od -1,63 do 1,01 dla V-PYRRO/NO oraz od -3,92 do -2,76 dla V-PROLI/NO w zależności od pH środowiska. Różnice we właściwościach fizykochemicznych związków mogły wpływać w znaczny sposób na dystrybucję tych analogów^{270–272}. V-PYRRO/NO, będąc bardziej lipofilowy, rozmieszczał się w całkowitej wodzie organizmu ($V_{d_{ss}} = 0,88$ L/kg), podczas gdy dystrybucja V-PROLI/NO ograniczona była głównie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej ($V_{d_{ss}} = 0,15$ L/kg). V-PROLI/NO, prawdopodobnie z powodu wyższej polarności i mniejszej dystrybucji nie był metabolizowany w wątrobie, lecz eliminowany głównie na drodze nerkowej.

Warunkiem koniecznym do wywierania działania selektywnego w wątrobie, w przypadku badanych analogów był wychwyt oraz metabolizm wątrobowy. V-PYRRO/NO był metabolizowany w wątrobie, a jego współczynnik ekstrakcji wątrobowej wynosił 0,3. Wskazuje to, że jego eliminacja była zależna zarówno od przepływu wątrobowego, jak również od aktywności enzymów wątrobowych. Natomiast eliminacja V-PROLI/NO, w tym

samym modelu doświadczalnym okazała się znikoma. Dodatkowo, intensywny metabolizm wątrobowy V-PYRRO/NO, lecz nie V-PROLI/NO, tłumaczy wysokie stężenia V-PROLI/NO w wątrobie, utrzymujące się godzinę od podania związku. Ponadto, zwiększone stężenia azotanów (III) oraz (V) w wątrobie po perfuzji V-PYRRO/NO wskazują na metabolizm wątrobowy tego analogu z uwolnieniem NO. Badanie procesu biotransformacji V-PYRRO/NO wykazało, że związek był metabolizowany przez enzymy mikrosomalne, głównie przez izoenzym CYP2E1, ale także CYP1A2, CYP2C9 oraz CYP3A4. Wyniki te są częściowo zgodne z obserwacjami Inami i wsp.¹⁶⁹, którzy wykazali, że w mikrosomach ludzkich, izoenzymy CYP2E1, CYP2A6 oraz CYP2B6 odpowiadały za metabolizm V-PYRRO/NO. V-PROLI/NO natomiast wykazywał niskie powinowactwo do enzymów mikrosomalnych wątroby. Przedstawione w pracy badania *in vitro* wskazały, że V-PROLI/NO był metabolizowany głównie przez CYP1A2 oraz w mniejszym stopniu przez CYP2E1 oraz CYP3A4, jak wcześniej wskazywał Chakrapani i wsp.¹⁶⁶.

Z drugiej strony w badaniach przeprowadzonych przez Hong i wsp.¹⁸⁸ nad wpływem tych NO-donorów na komórki HepG2, V-PROLI/NO był intensywniej metabolizowany oraz uwalniał NO w większym stosunku w porównaniu do V-PYRRO/NO¹⁸⁸. Jednakże, w badaniu tym zastosowano wysokie stężenia obu analogów, a mierzone stężenia azotanów (III) były niskie, co sugeruje niepełną biotransformację badanych związków w komórkach HepG2. Wyniki te są zgodne z licznymi doniesieniami, wskazującymi, że ekspresja większości izoenzymów cytochromu P450 jest dużo niższa (około 100–1000-krotnie) w ludzkich komórkach nowotworów wątroby (np. HepG2), w porównaniu do pierwotnych ludzkich hepatocytów^{273–275}. Ponadto, w przypadku komórek linii HepG2, również aktywność enzymów cytochromu P450 jest niższa w porównaniu do izolowanych *ex vivo* pierwotnych hepatocytów^{274,275}. Można sądzić, że ponieważ ekspresja oraz aktywność izoenzymu CYP1A2 w komórkach HepG2 jest wyższa w porównaniu do CYP2E1²⁷⁴, Hong i wsp.¹⁸⁸ wykazali większe uwalnianie NO z V-PROLI/NO, niż z V-PYRRO/NO, który był zależny od aktywności CYP2E1. Co więcej, Gong i wsp.¹⁸⁰ wykazali, że w komórkach HepG2, nie zawierających izoenzymu CYP2E1, metabolizm V-PYRRO/NO nie zachodził. Należy więc podkreślić, że, model wykorzystujący komórki HepG2 do badania uwalniania NO z V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO nie jest odpowiedni. Z tego względu wyniki przedstawione w pracy Hong i wsp.¹⁸⁸ wyniki nie są zgodne z naszymi obserwacjami uzyskanymi zarówno

w badaniach *in vivo* jak również z zastosowaniem modelu *ex vivo* izolowanej, perfundowanej wątroby.

Wyniki symulacji komputerowej metabolizmu badanych analogów oraz procesów ich elektrochemicznego utleniania nie były zgodne z danymi literaturowymi^{169,188}. Podczas analizy strukturalnej produktów elektrochemicznego utleniania badanych substancji oraz symulacji z zastosowaniem programu PALLAS nie zaobserwowano powstawania pochodnych epoksydowych. W ostatnim czasie nastąpił rozwój wielu modeli pozwalających na przewidywanie procesów farmakokinetycznych w warunkach *in silico*, co w projektach rozwoju leków, zwiększyło wpływ tego typu analiz na podejmowane decyzje²⁷⁶⁻²⁷⁸. Często zdarza się jednak, że modele te nie są skuteczne w przewidywaniu i aby uzyskać rzetelną wiedzę na temat farmakokinetyki badanych związków należy przeprowadzić badania z udziałem zwierząt laboratoryjnych²⁷⁸.

Biorąc pod uwagę, że tlenek azotu silnie reaguje z hemoproteinami, powodując np. hamowanie aktywności cytochromu P450²⁷⁹⁻²⁸², w przedstawionej pracy sprawdzono również prawdopodobny wpływ cząsteczek V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO na główne izoenzymy cytochromu P450 u szczurów. Wyniki badań wykazały, że badane związki nie mają wpływu na enzymy cytochromu w teście bezpośredniej inhibicji. Inhibicja ta, spowodowana jest szybką asocjacją oraz dysocjacją badanych związków z enzymami cytochromu. Jednakże, metabolity V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO oraz uwolniony tlenek azotu mogą być odpowiedzialne za inhibicję cytochromu, tworząc nieodwracalne kompleksy z hemem²⁸³.

5.5. Ograniczenia V-PYRRO/NO

W niniejszej pracy wykazano, że V-PYRRO/NO, w przeciwieństwie do V-PROLI/NO, jest metabolizowany i uwalnia NO w wątrobie. Zmiana struktury tego związku uwalniającego NO w wątrobie w kierunku mniej toksycznego prolinowego analogu, spowodowała zmianę profilu farmakokinetycznego tego związku oraz jego eliminację nerkową, bez wcześniejszej aktywacji przez izoenzymy cytochromu P450. Nie uzyskano więc lepszego związku.

V-PYRRO/NO posiada kilka cech, które sprawiają, że nie jest on idealnym związkiem hepatoselektywnym. Uwalnianie aktywnego metabolitu w innych miejscach niż docelowe

nie powinno zachodzić, gdyż może znosić wszelkie korzystne efekty selektywnego dostarczania proleków⁷⁹, a wyniki przedstawione w pracy sugerują, że metabolizm V-PYRRO/NO przebiega również w tkankach pozawątrobowych. Ponadto, selektywność uwalniania NO w wątrobie jest szczególnie ważna w leczeniu schorzeń wątroby, w przebiegu których często występuje nadekspresja eNOS i nadprodukcja NO w krążeniu systemowym^{284,285}. W piśmiennictwie występują różne informacje dotyczące ogólnoustrojowego działania V-PYRRO/NO. Saavedra i wsp.¹⁶⁵ zauważyli stosunkowo niewielkie obniżenie ciśnienia po dożylnym podaniu szczurom V-PYRRO/NO w dawce 30 nmol/kg. Także Edwards i wsp.¹⁸⁴ podając związek myszom z marskością wątroby i związanym z nią nadciśnieniem wrotnym zanotowali zmniejszenie ciśnienia tętniczego o około 6% po jednorazowym podaniu związku w dawce 30 nmol/kg. Jednakże, w celu osiągnięcia efektu farmakologicznego potrzebna była wielokrotnie wyższa dawka związku, około 200 nmol/kg, która powodowała znaczne obniżenie ciśnienia tętniczego (o ponad 21%). Z drugiej strony, Moal i wsp. oraz Ricciardi i wsp., badając wpływ podawania V-PYRRO/NO na wartość ciśnienia wrotnego w zwierzęcych modelach uszkodzenia wątroby, nie zaobserwowali wpływu NO-donora na ciśnienie tętnicze^{182,186}. Zamiast dożylnych iniekcji, zastosowali oni pompy infuzyjne, pozwalające na ciągłą infuzję V-PYRRO/NO. Pozwala to przypuszczać, że ciągła infuzja V-PYRRO/NO nie prowadziła do spadku ciśnienia tętniczego krwi. Wytłumaczeniem tego zjawiska może być rozwijająca się tolerancja na działanie hipotensyjne związku, bądź całkowita biotransformacja V-PYRRO/NO w wątrobie, przy tym sposobie jego podawania. Można sądzić, że wysokie dawki V-PYRRO/NO powodują wysycenie enzymów wątrobowych, co z kolei może prowadzić do zwiększenia metabolizmu pozawątrobowego, w wyniku którego NO uwalniany w innych narządach dostaje się do krążenia ogólnego, co skutkuje obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi. Ogólnoustrojowe działanie hipotensyjne związku jest czynnikiem bezpośrednio ograniczającym stosowanie V-PYRRO/NO u ludzi.

Projektując związki metabolizowane przez izoenzymy cytochromu P450 należy mieć na uwadze również możliwość występowania licznych interakcji międzylekowych. Wiele związków może wpływać na metabolizm tych proleków, zwiększając ich aktywność (możliwość wystąpienia efektów toksycznych związanych z wysokim stężeniem aktywnych metabolitów), bądź ją hamując (brak efektów terapeutycznych). Dodatkowym wyzwaniem dla tego typu proleków są międzyosobnicze różnice w ekspresji i aktywności izoenzymów

cytochromu P450 odpowiedzialnych za biokonwersję leków, w tym ich polimorfizm genetyczny^{117,286}. Ponadto, bardzo szybka eliminacja związku (MRT około 6 min) nie pozwala na przedłużone działanie NO w wątrobie oraz ustalenie racjonalnego dawkowania związku.

Kolejnym aspektem ograniczającym zastosowanie V-PYRRO/NO jest potencjalna toksyczność jego metabolitów. W wyniku biotransformacji może zostać on przekształcony do N-nitrozopirolidonu, jednego z najsilniejszych hepatokarcynogenów¹⁴⁸. Efekt leczenia ostrej bądź chronicznej toksyczności wątroby nie może prowadzić do zwiększenia ryzyka wystąpienia nowotworów. Przykładem sposobu zniwelowania tego ryzyka jest synteza takich pochodnych, które przekształcane są do związków nietoksycznych. Jednym z nich miał być badany w tej pracy V-PROLI/NO, którego potencjalny metabolit N-nitrozoprolina jest endogennym składnikiem ludzkiego moczu i nie wykazuje działań toksycznych¹⁴⁷. Jeszcze innymi strategiami zmniejszającymi toksyczność diolanów diazoniowych jest kowalencyjne przyłączenie ugrupowania uwalniającego NO do nierozpuszczalnych materiałów. Powoduje to ograniczenie ekspozycji NO na komórki i tkanki, z którymi związek ma bezpośredni kontakt, jednocześnie nie uwalniając żadnych produktów ubocznych. Przykładami takich związków mogą być odpowiednie poliakrylonitryle (PAN/NO), poliuretany oraz inne nierozpuszczalne materiały, których powierzchnie można dodatkowo zmienić na ugrupowania uwalniające NO – polietylenoiminy, silikon lub hydrożele^{287–290}. Jednak, tego typu strategie nie mogą zostać wykorzystane do selektywnego uwalniania NO w wątrobie.

Podsumowując, V-PYRRO/NO był metabolizowany w wątrobie i uwalniał tlenek azotu, jednak część związku prawdopodobnie metabolizowana była pozawątrobowo, co mogło powodować ogólnoustrojowe działania niepożądane, a także tworzyć produkty uboczne jego metabolizmu, o potencjalnym działaniu toksycznym. Dalsze modyfikacje strukturalne V-PYRRO/NO wydają się niezbędne do opracowania optymalnego związku uwalniającego NO selektywnie w wątrobie.

5.6. Wpływ stłuszczenia wątroby na profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO

Choroby wątroby mogą w znaczny sposób zmienić profil farmakokinetyczny leków, zwłaszcza tych, które eliminowane są na drodze metabolizmu wątrobowego. Zdolność

wątroby do metabolizowania leków zależy od przepływu krwi przez ten narząd oraz od aktywności enzymów wątrobowych. Oba te parametry mogą zmieniać się w stanach patologicznych wątroby. Szczegółowa wiedza dotycząca izoenzymów odpowiedzialnych za metabolizm badanych związków oraz wpływ schorzeń wątroby na te izoenzymy może być podstawą przewidywania efektywności terapii lekami, metabolizowanymi przez cytochrom P450²⁹¹. Zmiany wywołane przez otyłość mogą znacząco wpłynąć na białka osocza, enzymy metabolizujące leki, transportery oraz przepływ krwi przez różne narządy, wpływając przez to na procesy dystrybucji, metabolizmu oraz eliminacji leków²⁹².

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że stłuszczenie wątroby spowodowało zmniejszenie całkowitego klirensu V-PYRRO/NO (o około 70%), co spowodowało wydłużenie średniego czasu przebywania związku w organizmie. Objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym V-PYRRO/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby zmniejszyła się o około 50% w porównaniu do myszy zdrowych. Te zmiany parametrów farmakokinetycznych związane były ze wzrostem stężenia V-PYRRO/NO w osoczu. Eliminacja nerkowa związku nie uległa zmianie u myszy ze stłuszczeniem wątroby. Wartość współczynnika ekstrakcji wątrobowej V-PYRRO/NO wzrosła istotnie od 0,3 do 0,48 u myszy ze schorzeniem wątroby, jednak wartość klirensu wątrobowego związku po znormalizowaniu na masę ciała zwierzęcia zmniejszyła się. Zostało dowiedzione, że tylko poważne uszkodzenie wątroby może znacząco wpływać na proces metabolizmu leków. Zwiększenie zawartości tłuszczu w wątrobie u ludzi otyłych zmienia aktywność enzymów wątrobowych²⁹³. Zwiększona wartość współczynnika ekstrakcji wątrobowej V-PYRRO/NO, metabolizowanego głównie przez CYP2E1, może być spowodowana zmianami aktywności i ekspresji enzymów metabolizujących leki w stłuszczeniu wątroby. Wykazano, że stłuszczenie wątroby wiązało się z nadekspresją izoenzymu CYP2E1 oraz zmniejszeniem ilości CYP3A4^{294–297}. Obładowanie hepatocytów lipidami prowadziło również do zwężenia zatok wątrobowych i związanego z tym zmniejszenia przepływu krwi przez wątrobę²⁹⁸, co może skutkować zmniejszeniem klirensu wątrobowego związku. Stłuszczenie wątroby powoduje zmniejszenie beztłuszczowej masy ciała, co w znacznym stopniu może zmniejszyć objętość dystrybucji związków rozmieszczających się w całkowitej wodzie organizmu.

W przedstawianej rozprawie ukazano również wpływ stłuszczenia wątroby na profil farmakokinetyczny V-PROLI/NO. Całkowity klirens związku zwiększył się dwukrotnie,

powodując zmniejszenie średniego czasu przebywania związku w organizmie. Zaobserwowano również zwiększoną eliminację nerkową V-PROLI/NO w stłuszczeniu wątroby, natomiast eliminacja wątrobowa nie uległa zmianie i pozostała nieistotna w procesie jego całkowitej eliminacji. Wykazano, że stłuszczenie wątroby i towarzysząca mu otyłość jest przyczyną zwiększonej filtracji kłębuszkowej oraz zwiększenia klirensu kreatyniny, co związane jest ze wzrost liczby nefronów oraz wagi nerki²⁹². W rezultacie, zwiększenie masy ciała często powoduje skrócenie biologicznego okresu półtrwania leków z powodu wyższego klirensu leków eliminowanych głównie przez nerki^{299–301}. Pomimo, że V-PROLI/NO jest związkiem polarnym, jego objętość dystrybucji zwiększyła się u zwierząt ze stłuszczeniem wątroby. Paradoksalnie, objętość dystrybucji niektórych polarnych, rozpuszczalnych w wodzie leków może wzrastać u pacjentów z nadwagą. Powodem tego zjawiska jest występowanie dodatkowej ilości płynów organizmu zgromadzonych w przestrzeni międzykomórkowej tkanki tłuszczowej. Zwiększenie objętości dystrybucji leków hydrofilowych dotyczy głównie tych związków, które mają niewielką objętość dystrybucji (ograniczoną do przestrzeni zewnątrzkomórkowej)³⁰⁰.

5.7. Podsumowanie

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że opisane wcześniej różnice w aktywności przeciwstłuszczeniowej V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO związane były z różnicami farmakokinetyki i metabolizmu tych związków. V-PYRRO/NO można uznać za związek referencyjny uwalniający NO w wątrobie, podczas gdy V-PROLI/NO nie jest wychwytywany przez wątrobę, a jest eliminowany przede wszystkim w postaci niezmienionej przez nerki. Pomimo, opisanego w tej pracy korzystnego profilu farmakokinetycznego, V-PYRRO/NO okazał się częściowo metabolizowany pozawątrobowo, co powodowało uwolnienie NO do krążenia ogólnego, mogąc potencjalnie prowadzić do obniżenia ciśnienia tętniczego krwi.

Terapia za pomocą hepatoselektywnych NO-donorów, wolnych od ogólnoustrojowych działań niepożądanych może przynieść wiele korzyści w leczeniu schorzeń wątroby. Ostatnie wyniki wskazują, że V-PYRRO/NO może okazać się skuteczny w leczeniu stłuszczenia wątroby oraz insulinooporności¹⁶². Wykazano również, że badany NO-donor skutecznie obniżał nadciśnienie wrotne, które jest najczęstszą konsekwencją marskości wątroby¹⁸⁴. Ponadto, Moal i wsp.¹⁸² wykazali, że V-PYRRO/NO zmniejszał

zwłóknienie wątroby w szczurzym modelu cholestazy wywołanej podwiązaniem przewodu żółciowego. V-PYRRO/NO okazał się również skuteczny jako związek ochronny zmniejszając opór wątrobowy, poprawiając właściwości hemodynamiczne oraz funkcję wątroby w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym¹⁸⁶. Nowe związki posiadające odpowiedni profil farmakokinetyczny, stworzone na bazie V-PYRRO/NO mogą w przyszłości stanowić podstawowe środki terapeutyczne do walki z różnymi schorzeniami wątroby. Podczas projektowania nowych związków, selektywnie działających w wątrobie, należy rozważyć zastosowanie innych strategii zwiększającej dystrybucję związków do wątroby.

Być może, dołączenie do cząsteczki V-PYRRO/NO ugrupowania będącego substratem transportera białkowego, wybiórczo wychytującego i transportującego związek do komórek wątrobowych (np. NCTP¹²⁸), zwiększyłoby selektywność dystrybucji tego NO-donora do komórek wątroby i mogłoby ograniczyć ogólnoustrojowe działanie NO. Zastosowanie nietoksycznych pochodnych V-PYRRO/NO, zawierających w swojej strukturze kwasy żółciowe, może być kolejnym krokiem rozwoju NO-donorów selektywnie dostarczanych do wątroby. Podejście to połączyłoby cechy aktywowanego przez izoenzymy cytochromu P450 V-PYRRO/NO oraz transportowanego przez sodowo-zależne transportery kwasów żółciowych NCX-1000¹⁴⁶, który nie byłby rozkładany przez pozawątrobowe esterazy. Ciekawą perspektywą wydaje się również zastosowanie pochodnych diolanów diazoniowych zawierających reszty mannozy. Ze względu na obecność licznych receptorów mannozowych na komórkach śródbłonna zatok wątrobowych (LSEC), zwiększyłoby to aktywność biologiczną NO bezpośrednio w komórkach śródbłonna LSEC⁷⁹, wzmacniając mechanizmy hepatoprotekcyjne i przeciwstłuszczeniowe zależne od NO wytwarzanego przez LSEC³⁰².

6. Wnioski

1. W niniejszej pracy doktorskiej opracowano i zwalidowano trzy metody badawcze wykorzystujące system LC/MS/MS:
 - a. metodę jednoczesnego oznaczania V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO
 - b. metodę równoczesnego badania aktywności izoenzymów cytochromu P450 oraz
 - c. metodę przewidywania metabolizmu nowych związków za pomocą detektora elektrochemicznego ROXY sprzężonego z tandemową spektrometrią mas.

Pierwsze dwie metody okazały się niezbędne w ocenie profilu farmakokinetycznego i metabolizmu V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, natomiast alternatywna elektrochemiczna metoda badania metabolizmu nie spełniała stawianych jej wymagań. Wygenerowane za jej pomocą potencjalne metabolity badanych związków nie były zgodne z produktami biotransformacji *in vivo*.

2. Wykorzystując opracowany warsztat badawczy wykazano, że profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO, pomimo podobnej struktury był odmienny. V-PYRRO/NO ulegał metabolizmowi w wątrobie przez izoenzymy cytochromu P450 uwalniając NO, podczas gdy V-PROLI/NO nie był wychwytywany i metabolizowany w wątrobie, natomiast był eliminowany przede wszystkim przez nerki w postaci niezmienionej.
3. Wykazano, że stłuszczenie wątroby modyfikowało profil farmakokinetyczny badanych związków. V-PYRRO/NO był wolniej eliminowany u myszy ze stłuszczeniem wątroby, a jego objętość dystrybucji zmniejszyła się o połowę. Natomiast V-PROLI/NO był szybciej wydalany drogą nerkową u myszy ze stłuszczeniem wątroby, w porównaniu do myszy zdrowych. Paradoksalny efekt stłuszczenia wątroby na objętość dystrybucji i wydalanie nerkowe V-PROLI/NO wskazuje na istotne mechanizmy pozawątrobowe, które mogą mieć znaczenie w metabolizmie leków w stłuszczeniu wątroby.

7. Streszczenie

W toku badań prowadzonych w JCET nad farmakologią dwóch NO-donorów selektywnie uwalniających NO w wątrobie wykazano, że jeden z nich, V-PYRRO/NO przeciwdziałał rozwojowi stłuszczenia wątroby u myszy, podczas gdy jego analog V-PROLI/NO, pomimo wyników wskazujących na lepszy profil uwalniania NO w badaniach *in vitro* okazał się nieaktywny. Wyjaśnienie różnic w efektywności farmakologicznej tych związków może leżeć w odmiennym profilu farmakokinetycznym oraz metabolizmie tych związków. Celem niniejszej pracy doktorskiej było więc opracowanie i zwalidowanie metod, służących do badania metabolizmu dwóch związków uwalniających NO w wątrobie, V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, aby z wykorzystaniem tych metod przeprowadzić kompleksową analizę ich farmakokinetyki i metabolizmu.

W pierwszej części pracy opracowano panel metod służących ocenie farmakokinetyki i metabolizmu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO. Zoptymalizowano i zwalidowano metodę jednoczesnego oznaczania badanych analogów w matrycach biologicznych. Przygotowano metodę „koktajlu”, służącą do oznaczania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 w jednej próbce, którą zweryfikowano za pomocą związku referencyjnego, jakim był ketokonazol. Opracowano również alternatywną metodę badania metabolizmu związków wykorzystującą elektrochemiczne utlenienie za pomocą systemu ROXY™ połączonego ze spektrometrią mas.

W drugiej części pracy oceniono profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w modelach *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo*. Otrzymane wyniki istotnie wskazywały, że badane analogi, V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO, cechowały się odmiennym profilem farmakokinetycznym. Badane związki były szybko eliminowane z organizmu po podaniu dożylnym, szybko wchłaniały się do krążenia ogólnego po podaniu dootrzewnowym, a ich biodostępność wynosiła około 30% dla V-PYRRO/NO oraz 50% dla V-PROLI/NO. V-PYRRO/NO był metabolizowany w wątrobie przez izoenzymy cytochromu P450 przede wszystkim przez CYP2E1 i w mniejszym stopniu przez CYP1A2, CYP2C9 oraz CYP3A4. V-PROLI/NO był wydalany głównie przez nerki w niezmienionej postaci. Badane związki nie hamowały aktywności izoenzymów cytochromu P450 nawet w wysokim stężeniu. Stłuszczenie wątroby w znacznym stopniu modyfikowało profil

farmakokinetyczny obu związków, sugerując, że zmiany patologiczne, takie jak stłuszczenie wątroby i otyłość mogą w znaczny sposób wpływać na profil farmakokinetyczny leków metabolizowanych w wątrobie, lecz również leków wydalanych innymi drogami. Wskazuje to na rolę mechanizmów pozawątrobowych, które mogą również mieć istotne znaczenie w farmakokinetyce leków w stłuszczeniu wątroby.

8. Summary

Studies over two hepatoselective NO-donors, that were conducted in JCET, revealed that only V-PYRRO/NO attenuated liver steatosis in mice. Its analog, V-PROLI/NO, despite *in vitro* results indicating better NO-releasing profile, was not effective. The explanation of distinct pharmacological effects may be related with different pharmacokinetic and metabolic profiles of studied compounds, V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO. Therefore, the purpose of this study was to develop and validate methods for assessment of pharmacokinetics and metabolism of two hepatoselective NO-releasing compounds, V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO and to perform the comprehensive evaluation of their pharmacokinetic profiles.

In the first part, the panel of methods for assessing the pharmacokinetics and metabolism was prepared. The bioanalytical method for V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO determination in biological matrices was optimized and validated. The 'cocktail' method for assessment of activity of selected cytochrome P450 isoenzymes in one sample was prepared and verified using reference compound – ketoconazole. Also, an alternative method for studying drug metabolism was developed. The method uses the electrochemical oxidation controlled by ROXY™ detector combined with mass spectrometry.

In the second part, the pharmacokinetic profiles of V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO were evaluated using *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models. The results indicated, that the studied analogs V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO were characterized by a different pharmacokinetic profile. Both compounds are quickly eliminated from the body after intravenous administration, rapidly absorbed into the systemic circulation when administered intraperitoneally with the bioavailability about 30% and 50% for V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO, respectively. V-PYRRO/NO was metabolized in the liver mainly by the cytochrome P450 CYP2E1 and in lesser extent by CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4. V-PROLI/NO was mainly excreted by the kidneys in unchanged form. The studied compounds did not inhibit the activity of cytochrome P450 even in high concentrations. Liver steatosis has significantly amended the pharmacokinetic profile of both compounds, suggesting that the liver diseases, such as fatty liver and obesity can significantly affect the pharmacokinetic

profile of drugs metabolized in the liver, but also drugs excreted by other routes of elimination. This indicates a significant extrahepatic mechanisms, which may also be important in the pharmacokinetics of drugs in liver steatosis.

9. Literatura

- [1] E. Ohlstein „Drug discovery in the next millennium” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 40, no. 2, pp. 177–91, 2000.
- [2] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski „The price of innovation: new estimates of drug development costs” *J. Health Econ.*, vol. 22, no. 2, pp. 151–85, 2003.
- [3] J. A. Dimasi „The value of improving the productivity of the drug development process faster times and better decisions” *Pharmacoeconomics*, vol. 20, no. Suppl. 3, pp. 1–10, 2002.
- [4] K. Sato, T. Watanabe, K. Nishioka, M. Yabuki, S. Komuro „Key issues and perspectives for drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery and development” *Sumitomo Kagaku*, vol. II, pp. 1–11, 2004.
- [5] FDA „Guidance for industry safety testing of drug guidance for industry safety testing of drug metabolites”, pp. 1–11, 2008.
- [6] FDA „Guidance for industry: Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: Studies in vitro”, pp. 1–10, 1997.
- [7] FDA „Drug administration guidance for industry: drug interaction studies—study design, data analysis, and implications for dosing and labeling”, pp. 1-52, 2006.
- [8] FDA „Guidance for industry: In vivo drug metabolism/drug interaction studies—study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling”, pp. 1–16, 1999.
- [9] EMEA „Guideline on the investigation of drug interactions” vol. 44, pp. 1-22, 2013.
- [10] V. J. Stella „Prodrugs: Some thoughts and current issues” *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 12, pp. 4755–65, 2010.
- [11] V. J. Stella, K. W. Nti-Addae „Prodrug strategies to overcome poor water solubility” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 7, pp. 677–94, 2007.
- [12] P. Ettmayer, G. L. Amidon, B. Clement, B. Testa „Lessons learned from marketed and investigational prodrugs” *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 2393–404, 2004.
- [13] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen „Prodrugs: design and clinical applications” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 3, pp. 255–70, 2008.
- [14] A. Albert „Chemical aspects of selective toxicity” *Nature*, vol. 182, no. 4633, pp. 421–2, 1958.

- [15] B. Testa „Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 338–44, 2009.
- [16] S. Jana, S. Mandlekar, P. Marathe „Prodrug design to improve pharmacokinetic and drug delivery properties: challenges to the discovery scientists” *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 32, pp. 3874–3908, 2010.
- [17] J. Rautio (ditor) „Prodrugs and targeted delivery: Towards better ADME properties” Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 9783527633166, 2010.
- [18] Higuchi T., et al. „Pro-drugs as Novel Drug Delivery Systems” Washington, DC: American Chemical Society, ISBN 0-8412-0291-5, 1975.
- [19] S. Papot, I. Tranoy, F. Tillequin, J.-C. Florent, J.-P. Gesson „Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies” *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, vol. 2, no. 2, pp. 155–85, 2002.
- [20] N. Das, M. Dhanawat, B. Dash, R. C. Nagarwal, S. K. Shrivastava „Codrug: an efficient approach for drug optimization” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 5, pp. 571–88, 2010.
- [21] R. Karaman „Using predrugs to optimize drug candidates,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 9, no. 12, pp. 1405–19, 2014.
- [22] A. B. Olejniczak, J. B. Zawilska „Terapie przyszłości – proleki,” *Farm. Pol.*, no. 5, pp. 7–9, 2012.
- [23] K.-M. Wu „A new classification of prodrugs: regulatory perspectives” *Pharmaceuticals*, vol. 2, no. 3, pp. 77–81, 2009.
- [24] P. Nasa, P. Phougat „Prodrug : A Novel Approach of Drug Delivery” *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 25, no. 32, pp. 188–191, 2014.
- [25] K. M. Huttunen, H. Raunio, J. Rautio „Prodrugs — from serendipity to rational design” *Pharmacol. Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 750–771, 2011.
- [26] P.-W. Hsieh, C.-F. Hung, J.-Y. Fang „Current prodrug design for drug discovery” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, pp. 2236–2250, 2009.
- [27] P. Ehrlich „Die Grundlagen der experimentellen Chemotherapie” *Zeitschrift für Angew. Chemie*, vol. 23, no. 1, pp. 2–8, 1910.
- [28] J. Rautio, K. Laine, M. Gynther, J. Savolainen, “Prodrug approaches for CNS delivery” *AAPS J.*, vol. 10, pp. 92–102, 2008.
- [29] R. K. Upadhyay „Drug delivery systems , CNS protection , and the blood brain barrier” *Biomed Res. Int.*, p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/869269>, 2014.

- [30] D. Vytla, R. E. Combs-Bachmann, A. M. Hussey, S. T. McCarron, D. S. McCarthy, J. J. Chambers „Prodrug approaches to reduce hyperexcitation in the CNS” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 7, pp. 666–85, 2012.
- [31] D. P. Sinica, S. Roy, L. Limited, R. Formulation, I. Plaza „Pelagia research library strategic drug delivery targeted to the brain : a review” *Der Pharm. Sin.*, vol. 3, no. 1, pp. 76–92, 2012.
- [32] B. Pavan, A. Dalpiaz, N. Ciliberti, C. Biondi, S. Manfredini, S. Vertuani „Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach” *Molecules*, vol. 13, no. 5, pp. 1035–1065, 2008.
- [33] C.-T. Lu, Y.-Z. Zhao, J. Cai, L. Peng, X.-Q. Tian „Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 2241–2257, 2014.
- [34] E. Joseph, R. N. Saha „Advances in brain targeted drug delivery : nanoparticulate systems,” *J. PharmaSciTech*, vol. 3, no. 1, 2013.
- [35] D. J. Begley „Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities” *Pharmacol. Ther.*, vol. 104, no. 1, pp. 29–45, 2004.
- [36] T. Siegal „Which drug or drug delivery sysem can change clinical practice for brain tumor” *Neuro. Oncol.*, vol. 15, no. 6, pp. 656–669, 2013.
- [37] W. H. Oldendorf, S. Hyman, L. Braun, S. Z. Oldendorf „Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection” *Science (80-.)*, vol. 178, no. 4064, pp. 984–6, 1972.
- [38] W. M. Pardridge „The blood-brain barrier : bottleneck in brain drug development” *NeuroRx*, vol. 2, pp. 3–14, 2005.
- [39] P. Zhou, X. Sun, Z. Zhang „Kidney–targeted drug delivery systems” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 4, no. 1, pp. 37–42, 2014.
- [40] K. Shirota, Y. Kato, K. Suzuki, Y. Sugiyama „Characterization of novel kidney-specific delivery system using an alkylglucoside vector” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 299, no. 2, pp. 459–67, 2001.
- [41] K. Suzuki, H. Susaki, S. Okuno, Y. Sugiyama „Renal drug targeting using a vector ‘alkylglycoside’” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 288, no. 1, pp. 57–64, 1999.
- [42] K. Suzuki, H. Susaki, S. Okuno, H. Yamada, H. K. Watanabe, Y. Sugiyama „Specific renal delivery of sugar-modified low-molecular-weight peptides” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 288, no. 2, pp. 888–97, 1999.

- [43] Y. Lin, X. Sun, T. Gong, Z. R. Zhang „Synthesis and in vivo distribution of 2-deoxy-2-aminodiglucose–prednisolone conjugate (DPC)” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 23, no. 5, pp. 557–560, 2012.
- [44] Y. Lin, X. Sun, T. Gong, Z. R. Zhang „Prednisolone succinate–glucosamine conjugate: Synthesis, characterization and in vitro cellular uptake by kidney cell lines” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 23, no. 1, pp. 25–28, 2012.
- [45] S. Wilk, H. Mizoguchi, M. Orlowski „gamma-Glutamyl dopa: a kidney-specific dopamine precursor” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 206, no. 1, pp. 227–32, 1978.
- [46] H. Mizoguchi, M. Orlowski, S. Wilk, J. P. Green „γ-glutamyl dopa and γ-glutamyl dopamine: Effect of plasma glucose levels” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 57, no. 2–3, pp. 239–245, 1979.
- [47] M. Pestana, P. Soares-da-Silva „The renal handling of dopamine originating from l-DOPA and γ-glutamyl-l-DOPA” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 112, no. 2, pp. 417–422, 1994.
- [48] M. Su, Q. He, Z. Zhang, B. Hu, S. Liu „Kidney-targeting characteristics of N-acetyl-L-glutamic prednisolone prodrug” *Acta Pharm. Sin.*, vol. 38, no. 8, pp. 627–30, 2003.
- [49] M. E. M. Dolman, S. Harmsen, G. Storm, W. E. Hennink, R. J. Kok „Drug targeting to the kidney: Advances in the active targeting of therapeutics to proximal tubular cells” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 14, pp. 1344–57, 2010.
- [50] P. S. Low, S. A. Kularatne „Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 256–62, 2009.
- [51] C.-Y. Ke, C. J. Mathias, M. A. Green „Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, pp. 1143–1160, 2004.
- [52] S. S. Dhaneshwar, M. Sharma, G. Vadnerkar „Co-drugs of aminosaliclates and nutraceutical amino sugar for ulcerative coliti” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 21, no. 6, pp. 527–533, 2011.
- [53] S. S. Dhaneshwar „Colon-specific prodrugs of 4-aminosalicylic acid for inflammatory bowel disease” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 13, pp. 3564–3571, 2014.
- [54] B. J. R. Whittle, C. Varga „New light on the anti-colitic actions of therapeutic aminosaliclates: The role of heme oxygenase” *Pharmacol. Reports*, vol. 62, pp. 548–556, 2010.
- [55] S. S. Dhaneshwar, M. Chail, M. Patil, S. Naqvi, G. Vadnerkar „Colon-specific mutual amide prodrugs of 4-aminosalicylic acid for their mitigating effect on experimental colitis in rats” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 1, pp. 131–42, 2009.
- [56] M. C. Di Paolo, O. A. Paoluzi, R. Pica, F. Iacopini, P. Crispino, M. Rivera, G. Spera, P. Paoluzi „Sulphasalazine and 5-aminosalicylic acid in long-term treatment of

- ulcerative colitis: report on tolerance and side-effects" *Dig. Liver Dis.*, vol. 33, no. 7, pp. 563–9, 2001.
- [57] R. A. J. Ransford „Sulphasalazine and mesalazine: serious adverse reactions re-evaluated on the basis of suspected adverse reaction reports to the Committee on Safety of Medicines" *Gut*, vol. 51, no. 4, pp. 536–539, 2002.
- [58] J. L. Wallace, G. Cirino, A. Soaratore, „US patent. 20060003972A1," *Pat. Appl. Publ.*, vol. 0003972 A1, pp. 1–11, 2006.
- [59] S. F. Sheng, H. X. Zheng, J. Liu, Z. B. Zhao „Synthesis of phenol-class azo derivatives of 4-aminosalicylic acid" *Chinese Chem. Lett.*, vol. 19, no. 4, pp. 419–422, 2008.
- [60] S. Dhaneshwar, H. Gautam „Exploring novel colon-targeting antihistaminic prodrug for colitis" *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 63, no. 12, pp. 327–337, 2012.
- [61] F. M. de Groot, E. W. Damen, H. W. Scheeren „Anticancer prodrugs for application in monotherapy: targeting hypoxia, tumor-associated enzymes, and receptors" *Curr. Med. Chem.*, vol. 8, pp. 1093–1122, 2001.
- [62] A. K. Sinhababu, D. R. Thakker „Prodrugs of anticancer agents," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 19, no. 2, pp. 241–273, 1996.
- [63] S. K. Quinney, S. P. Sanghani, W. I. Davis, T. D. Hurley, Z. Sun, D. J. Murry, W. F. Bosron „Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide" *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 313, no. 3, pp. 1011–1016, 2005.
- [64] C. M. Walko, C. Lindley „Capecitabine: a review.," *Clin. Ther.*, vol. 27, no. 1, pp. 23–44, 2005.
- [65] L. Bodnar, C. Szczylik „Kapecytabina w chemioterapii paliatywnej raka jelita grubego – skuteczność i toksyczność" *Współczesna Onkol.*, vol. 13, no. 4, pp. 167–176, 2009.
- [66] M. Miwa, M. Ura, M. Nishida, N. Sawada, T. Ishikawa, K. Mori, N. Shimma, I. Umeda, H. Ishitsuka „Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue" *Eur. J. Cancer*, vol. 34, no. 8, pp. 1274–81, 1998.
- [67] M. Venturini „Rational development of capecitabine" *Eur. J. Cancer*, vol. 38 Suppl 2, pp. 3–9, 2002.
- [68] R. Mahato, T. Wanyi, K. Cheng „Prodrug for improving tumor targetability and efficiency" *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 8, pp. 659–670, 2011.
- [69] N. Schellmann, P. M. Deckert, D. Bachran, H. Fuchs, C. Bachran „Targeted enzyme prodrug therapies" *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 10, no. 10, pp. 887–904, 2010.

- [70] K. D. Bagshawe, S. K. Sharma, R. H. J. Begent „Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 4, no. 11, pp. 1777–89, 2004.
- [71] Y. L. Leu, S. R. Roffler, J. W. Chern „Design and synthesis of water-soluble glucuronide derivatives of camptothecin for cancer prodrug monotherapy and antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)” *J. Med. Chem.*, vol. 42, pp. 3623–3628, 1999.
- [72] S. K. Sharma, K. D. Bagshawe, R. H. J. Begent „Advances in antibody-directed enzyme prodrug therapy” *Curr. Opin. Investig. Drugs*, vol. 6, no. 6, pp. 611–5, 2005.
- [73] R. J. Francis, S. K. Sharma, C. Springer, a J. Green, L. D. Hope-Stone, L. Sena, J. Martin, K. L. Adamson, a Robbins, L. Gumbrell, D. O’Malley, E. Tsiompanou, H. Shahbakhti, S. Webley, D. Hochhauser, a J. Hilson, D. Blakey, R. H. J. Begent, “A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours” *Br. J. Cancer*, vol. 87, pp. 600–607, 2002.
- [74] K. Chester, B. Pedley, B. Tolner, J. Violet, A. Mayer, S. Sharma, G. Boxer, A. Green, S. Nagl, R. Begent „Engineering antibodies for clinical applications in cancer” *Tumour Biol.*, vol. 25, pp. 91–98, 2004.
- [75] G. U. Dachs, J. Tupper, G. M. Tozer „From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer” *Anticancer. Drugs*, vol. 16, pp. 349–359, 2005.
- [76] “Endocyte, (2000) Study of EC0225 for the treatment of refractory of metastatic tumors. National Library of Medicine: NLM Identifier: NCT00441870, ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00441870>. [Accessed: 02-Mar-2015].
- [77] “Endocyte, (2012) Study of EC0489 for the treatment of refractory or metastatic tumors. National Library of Medicine: NLM Identifier: NCT00852189, ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00852189>. [Accessed: 02-Mar-2015].
- [78] L. Teng, J. Xie, L. Teng, R. J. Lee „Clinical translation of folate receptor-targeted therapeutics” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no. 8, pp. 901–8, 2012.
- [79] N. Mishra, N. P. Yadav, V. K. Rai, P. Sinha, K. S. Yadav, S. Jain, S. Arora „Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance” *Biomed Res. Int.*, p. doi: 10.1155/2013/382184, 2013.
- [80] J. E. van Montfoort, B. Hagenbuch, G. M. M. Groothuis, H. Koepsell, P. J. Meier, D. K. F. Meijer „Drug uptake systems in liver and kidney” *Curr. Drug Metab.*, vol. 4, no. 3, pp. 185–211, 2003.

- [81] F. P. Guengerich „Common and uncommon cytochrome p450 reactions related to metabolism and chemical toxicity” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 14, no. 6, pp. 611–650, 2001.
- [82] G. A. Kullak-Ublick, U. Beuers, G. Paumgartner „Hepatobiliary transport” *J. Hepatol.*, vol. 32, no. 1 Suppl, pp. 3–18, 2000.
- [83] M. Tu, A. M. Mathiowetz, J. A. Pfefferkorn, K. O. Cameron, R. L. Dow, J. Litchfield, L. Di, B. Feng, S. Liras „Medicinal chemistry design principles for liver targeting through OATP transporters” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 13, pp. 857–866, 2013.
- [84] J. Wu „Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications” *Front. Biosci.*, vol. 7, no. 1–3, p. d717, 2002.
- [85] D. Meijer, G. Molema „Targeting of drugs to the liver” *Semin. Liver Dis.*, vol. 15, no. 03, pp. 202–256, 1995.
- [86] P. van der Sluijs, D. K. Meijer „Limitations on the specificity of targeting asialoglycoprotein-drug conjugates to hepatocytes” *Targeted Diagn. Ther.*, vol. 4, pp. 235–64, 1991.
- [87] L. Fiume, F. Bonino, A. Mattioli, E. Chiaberge, M. Torrani Cerenzia, C. Busi, M. Brunetto, G. Verme „Inhibition of hepatitis B virus replication by vidarabine monophosphate conjugated with lactosaminated serum albumin” *Lancet*, vol. 332, no. 8601, pp. 13–15, 1988.
- [88] M. D. Erion, P. D. van Poelje, D. a Mackenna, T. J. Colby, A. C. Montag, J. M. Fujitaki, D. L. Linemeyer, D. a Bullough „Liver-targeted drug delivery using HepDirect prodrugs” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 312, no. 2, pp. 554–60, 2005.
- [89] J. Zhang, Q. Tian, S. Yung Chan, S. Chuen Li, S. Zhou, W. Duan, Y.-Z. Zhu „Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications” *Drug Metab. Rev.*, vol. 37, no. 4, pp. 611–703, 2005.
- [90] K. Misiura „Leki oksazafosforinowe . Poszukiwanie nowych pochodnych , badania metabolizmu i stosowanie nowych strategii terapeutycznych Oxazaphosphorinane drugs . New analogues , metabolic studies , and therapeutic approaches CF” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 58, pp. 463–471, 2004.
- [91] C.-S. Chen, J. T. Lin, K. A. Goss, Y. He, J. R. Halpert, D. J. Waxman „Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics” *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 5, pp. 1278–85, 2004.
- [92] Z. Huang, P. Roy, D. J. Waxman „Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 59, no. 8, pp. 961–72, 2000.

- [93] D. Zhou, Y. Lu, M. S. Steiner, J. T. Dalton „Cytochrome P-450 2C9 sensitizes human prostate tumor cells to cyclophosphamide via a bystander effect” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 10, pp. 2659–2663, 2000.
- [94] R. Schmidt, F. Baumann, H. Knüpfer, M. Brauckhoff, L.-C. Horn, M. Schönfelder, U. Köhler, R. Preiss „CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 expression and ifosfamide turnover in breast cancer tissue microsomes” *Br. J. Cancer*, vol. 90, no. 4, pp. 911–6, 2004.
- [95] P. Roy, L. J. Yu, C. L. Crespi, D. J. Waxman”Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 27, no. 6, pp. 655–666, 1999.
- [96] P. Roy, O. Tretyakov, J. Wright, D. J. Waxman, “Stereoselective metabolism of ifosfamide by human P-450s 3A4 and 2B6. Favorable metabolic properties of R-enantiomer” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 27, no. 11, pp. 1309–1318, 1999.
- [97] O. Kan, S. Kingsman, S. Naylor „Cytochrome P450-based cancer gene therapy: current status” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 2, no. 8, pp. 857–68, 2002.
- [98] Y. Jounaidi, C.-S. Chen, G. J. Veal, D. J. Waxman „Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 3, pp. 541–55, 2006.
- [99] O. Kan, L. Griffiths, D. Baban, S. Iqbal, M. Uden, H. Spearman, J. Slingsby, T. Price, M. Esapa, S. Kingsman, a Kingsman, a Slade, S. Naylor „Direct retroviral delivery of human cytochrome P450 2B6 for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer” *Cancer Gene Ther.*, vol. 8, no. 7, pp. 473–482, 2001.
- [100] J. P. Braybrooke, A. Slade, G. Deplanque, R. Harrop, S. Madhusudan, M. D. Forster, R. Gibson, A. Makris, D. C. Talbot, J. Steiner, L. White, O. Kan, S. Naylor, M. W. Carroll, S. M. Kingsman, A. L. Harris „Phase I study of MetXia-P450 gene therapy and oral cyclophosphamide for patients with advanced breast cancer or melanoma” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 1512–20, 2005.
- [101] K. R. Reddy, M. C. Matelich, B. G. Ugarkar, J. E. Gómez-Galeno, J. DaRe, K. Ollis, Z. Sun, W. Craigo, T. J. Colby, J. M. Fujitaki, S. H. Boyer, P. D. van Poelje, M. D. Erion „Pradefovir: a prodrug that targets adefovir to the liver for the treatment of hepatitis B” *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 666–76, 2008.
- [102] S. J. Hecker, K. R. Reddy, P. D. Van Poelje, Z. Sun, W. Huang, V. Varkhedkar, M. V. Reddy, J. M. Fujitaki, D. B. Olsen, K. A. Koeplinger, S. H. Boyer, D. L. Linemeyer, M. Maccoss, M. D. Erion „Liver-targeted prodrugs of 2' - C -methyladenosine for therapy of hepatitis C virus infection” *J. Med. Chem.*, vol. 50, pp. 3891–3896, 2007.
- [103] S. H. Boyer, Z. Sun, H. Jiang, J. Esterbrook, J. E. Gómez-Galeno, W. Craigo, K. R. Reddy, B. G. Ugarkar, D. a MacKenna, M. D. Erion „Synthesis and characterization of a novel liver-targeted prodrug of cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside monophosphate for

- the treatment of hepatocellular carcinoma" *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 26, pp. 7711–20, 2006.
- [104] M. D. Erion, K. R. Reddy, S. H. Boyer, M. C. Matelich, J. Gomez-Galeno, R. H. Lemus, B. G. Ugarkar, T. J. Colby, J. Schanzer, P. D. Van Poelje „Design, synthesis, and characterization of a series of cytochrome P(450) 3A-activated prodrugs (HepDirect prodrugs) useful for targeting phosph(on)ate-based drugs to the liver" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 16, pp. 5154–63, 2004.
- [105] M. D. Erion, E. E. Cable, B. R. Ito, H. Jiang, J. M. Fujitaki, P. D. Finn, B.-H. Zhang, J. Hou, S. H. Boyer, P. D. van Poelje, D. L. Linemeyer „Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 39, pp. 15490–5, 2007.
- [106] K. M. Huttunen, N. Mähönen, H. Raunio, J. Rautio „Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery" *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, no. 23, pp. 2346–65, 2008.
- [107] K. M. Huttunen, N. Mähönen, J. Leppänen, J. Vepsäläinen, R. O. Juvonen, H. Raunio, H. Kumpulainen, T. Järvinen, J. Rautio „Novel cyclic phosphate prodrug approach for cytochrome P450-activated drugs containing an alcohol functionality" *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 679–87, 2007.
- [108] M. D. Erion, D. A. Bullough, C.-C. Lin, Z. Hong „HepDirect prodrugs for targeting nucleotide-based antiviral drugs to the liver" *Curr. Opin. Investig. Drugs*, vol. 7, no. 2, pp. 109–17, 2006.
- [109] C. Lin, C. Fang, S. Benetton, G. Xu, L.-T. Yeh „Metabolic activation of pradefovir by CYP3A4 and its potential as an inhibitor or inducer" *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 9, pp. 2926–31, 2006.
- [110] P. Marcellin, T.-T. Chang, S. G. Lim, M. J. Tong, W. Sievert, M. L. Shiffman, L. Jeffers, Z. Goodman, M. S. Wulfsohn, S. Xiong, J. Fry, C. L. Brosgart „Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B" *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 9, pp. 808–16, 2003.
- [111] T. Dando, G. Plosker „Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B" *Drugs*, vol. 63, no. 20, pp. 2215–34, 2003.
- [112] C.-C. Lin, L.-T. Yeh, D. Vitarella, Z. Hong, M. D. Erion „Remofovir mesylate: a prodrug of PMEAs with improved liver-targeting and safety in rats and monkeys" *Antivir. Chem. Chemother.*, vol. 15, no. 6, pp. 307–17, 2004.
- [113] H. L. Tillmann „Pradefovir, a liver-targeted prodrug of adefovir against HBV infection" *Curr. Opin. Investig. drugs*, vol. 8, no. 8, pp. 682–90, 2007.

- [114] L. M. Hynicka, N. Yunker, P. H. Patel „A Review of Oral Antiretroviral Therapy for the Treatment of Chronic Hepatitis B” *Ann. Pharmacother.*, vol. 44, pp. 1271–1286, 2010.
- [115] „Open-label treatment extension study for patients who complete study RNA200103-201 - Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00230490?term=pradefovir&rank=2>. [Accessed: 12-Apr-2015].
- [116] K. R. Reddy, T. J. Colby, J. M. Fujitaki, P. D. van Poelje, M. D. Erion, „Liver targeting of hepatitis-B antiviral lamivudine using the HepDirect prodrug technology” *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*, vol. 24, no. 5–7, pp. 375–81, 2005.
- [117] P. R. Ortiz de Montellano „Cytochrome P450-activated prodrugs” *Future Med. Chem.*, vol. 5, no. 2, pp. 213–228, 2013.
- [118] C. R. Sirtori „Tissue selectivity of hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors” *Pharmacol. Ther.*, vol. 60, no. 3, pp. 431–59, 1993.
- [119] Y. Shitara, Y. Sugiyama „Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions” *Pharmacol. Ther.*, vol. 112, no. 1, pp. 71–105, 2006.
- [120] D. A. Powell, W. C. Black, K. Bleasby, C.-C. Chan, D. Deschenes, M. Gagnon, R. Gordon, J. Guay, S. Guiral, M. J. Hafey, Z. Huang, E. Isabel, Y. Leblanc, A. Styhler, L.-J. Xu, L. Zhang, R. M. Oballa „Nicotinic acids: liver-targeted SCD inhibitors with preclinical anti-diabetic efficacy” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 24, pp. 7281–6, 2011.
- [121] M. Issandou, A. Bouillot, J.-M. Brusq, M.-C. Forest, D. Grillot, R. Guillard, S. Martin, C. Michiels, T. Sulpice, A. Daugan „Pharmacological inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 improves insulin sensitivity in insulin-resistant rat models” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 618, no. 1–3, pp. 28–36, 2009.
- [122] G. Liu „Recent advances in stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors for dyslipidemia and obesity” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 10, no. 4, pp. 419–33, 2010.
- [123] K. A. Atkinson, E. E. Beretta, J. A. Brown, M. Castrodad, Y. Chen, J. M. Cosgrove, P. Du, J. Litchfield, M. Makowski, K. Martin, T. J. McLellan, C. Neagu, D. A. Perry, D. W. Piotrowski, C. M. Stepan, R. Trilles „N-benzylimidazole carboxamides as potent, orally active stearoylCoA desaturase-1 inhibitors” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 6, pp. 1621–5, 2011.
- [124] G. Liu „Stearoyl-CoA desaturase inhibitors: update on patented compounds” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 19, no. 9, pp. 1169–91, 2009.

- [125] C. S. Li, L. Belair, J. Guay, R. Murgasva, W. Sturkenboom, Y. K. Ramtohol, L. Zhang, Z. Huang „Thiazole analog as stearyl-CoA desaturase 1 inhibitor” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 17, pp. 5214–7, 2009.
- [126] S. Léger, W. C. Black, D. Deschenes, S. Dolman, J.-P. Falguyret, M. Gagnon, S. Guiral, Z. Huang, J. Guay, Y. Leblanc, C.-S. Li, F. Massé, R. Oballa, L. Zhang „Synthesis and biological activity of a potent and orally bioavailable SCD inhibitor (MF-438)” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 2, pp. 499–502, Jan. 2010.
- [127] P. A. Dawson, T. Lan, A. Rao „Bile acid transporters” *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 12, pp. 2340–57, 2009.
- [128] P. A. Dawson „Role of the intestinal bile acid transporters in bile acid and drug disposition” *Handb. Exp. Pharmacol.*, no. 201, pp. 169–203, 2011.
- [129] A. Balakrishnan J. E. Polli „Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): a potential prodrug target” *Mol. Pharm.*, vol. 3, no. 3, pp. 223–230, 2006.
- [130] E. Sievänen „Exploitation of bile acid transport systems in prodrug design” *Molecules*, vol. 12, pp. 1859–1889, 2007.
- [131] D. Starke, K. Lischka, P. Pagels, E. Uhlmann, W. Kramer, G. Wess, E. Petzinger „Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 11, no. 7, pp. 945–9, 2001.
- [132] G. A. Kullak-Ublick, J. Glasa, C. Böker, M. Oswald, U. Grützner, B. Hagenbuch, B. Stieger, P. J. Meier, U. Beuers, W. Kramer, G. Wess, G. Paumgartner „Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas” *Gastroenterology*, vol. 113, no. 4, pp. 1295–305, 1997.
- [133] W. Kramer, G. Wess, G. Schubert, M. Bickel, F. Girbig, U. Gutjahr, S. Kowalewski, K. H. Baringhaus, A. Enhsen, H. Glombik „Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 26, pp. 18598–604, 1992.
- [134] W. Kramer, G. Wess, G. Neckermann, G. Schubert, J. Fink, F. Girbig, U. Gutjahr, S. Kowalewski, K. H. Baringhaus, G. Böger „Intestinal absorption of peptides by coupling to bile acids” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 14, pp. 10621–7, 1994.
- [135] W. Kramer, G. Wess, A. Enhsen, K. Bock, E. Falk, A. Hoffmann, G. Neckermann, D. Gantz, S. Schulz, L. Nickau „Bile acid derived HMG-CoA reductase inhibitors” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1227, no. 3, pp. 137–54, 1994.
- [136] O. Briz, M. A. Serrano, N. Rebollo, B. Hagenbuch, P. J. Meier, H. Koepsell, J. J. G. Marin „Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells” *Mol. Pharmacol.*, vol. 61, no. 4, pp. 853–60, 2002.

- [137] R. I. Macias, M. J. Monte, M. Y. El-Mir, G. R. Villanueva, J. J. Marin „Transport and biotransformation of the new cytostatic complex cis-diammineplatinum(II)-chlorocholylglycinate (Bamet-R2) by the rat liver” *J. Lipid Res.*, vol. 39, no. 9, pp. 1792–8, 1998.
- [138] P. L. Anelli, L. Lattuada, V. Lorusso, G. Lux, A. Morisetti, P. Morosini, M. Serletti, F. Uggeri „Conjugates of gadolinium complexes to bile acids as hepatocyte-directed contrast agents for magnetic resonance imaging” *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 14, pp. 3629–41, 2004.
- [139] S. Tolle-Sander, K. A. Lentz, D. Y. Maeda, A. Coop, J. E. Polli „Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate” *Mol. Pharm.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–8, 2004.
- [140] S. Fiorucci, E. Antonelli, O. Morelli, a Mencarelli, a Casini, T. Mello, B. Palazzetti, D. Tallet, P. del Soldato, A. Morelli „NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 15, pp. 8897–902, 2001.
- [141] S. Fiorucci, E. Antonelli, V. Brancaleone, L. Sanpaolo, S. Orlandi, E. Distrutti, G. Acuto, C. Clerici, M. Baldoni, P. Del Soldato, A. Morelli „NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver” *J. Hepatol.*, vol. 39, no. 6, pp. 932–939, 2003.
- [142] S. Fiorucci, E. Antonelli, P. Tocchetti, A. Morelli, “Treatment of portal hypertension with NCX-1000, a liver-specific NO donor. A review of its current status.” *Cardiovasc. Drug Rev.*, vol. 22, no. 2, pp. 135–46, Jan. 2004.
- [143] A. Ouazzani-Chahdi, A. Elimadi, A. Chabli, J. Spénard, P. Colin, P. S. Haddad: Combining ursodeoxycholic acid or its NO-releasing derivative NCX-1000 with lipophilic antioxidants better protects mouse hepatocytes against amiodarone toxicity” *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 85, no. 2, pp. 233–42, 2007.
- [144] Y. Haddad, D. Vallerand, A. Brault, J. Spénard, P. S. Haddad, “NCX 1000 alone or in combination with vitamin E reverses experimental nonalcoholic steatohepatitis in the rat similarly to UDCA” *Int. J. Hepatol.*, vol. 2011, p. 136816, 2011.
- [145] S. Fiorucci, E. Antonelli, E. Distrutti, A. Mencarelli, S. Farneti, P. Del Soldato, and A. Morelli „Liver delivery of NO by NCX-1000 protects against acute liver failure and mitochondrial dysfunction induced by APAP in mice” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 143, no. 1, pp. 33–42, 2004.
- [146] A. Berzigotti, P. Bellot, A. De Gottardi, J. C. Garcia-Pagan, C. Gagnon, J. Spénard, J. Bosch „NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of UDCA, does not decrease portal pressure in patients with cirrhosis: results of a randomized, double-blind, dose-escalating study” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 105, no. 5, pp. 1094–101, 2010.

- [147] L. K. Keefer „Fifty years of diazeniumdiolate research. From laboratory curiosity to broad-spectrum biomedical advances” *ACS Chem. Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1147–55, 2011.
- [148] L. K. Keefer „Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 43, pp. 585–607, 2003.
- [149] A. L. Fitzhugh, L. K. Keefer „Diazeniumdiolates : pro- and antioxidant applications of the ‘NONOates,’” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, no. 10, pp. 1463–1469, 2000.
- [150] G. B. Kauffman, J. E. Saavedra, L. K. Keefer „Products of chemistry versatile nitric oxide-releasing compounds in biomedical research and potential clinical applications,” *J. Chem. Educ.*, vol. 79, no. 12, pp. 1427–1434, 2002.
- [151] J. Kitagaki, Y. Yang, J. E. Saavedra, N. H. Colburn, L. K. Keefer, and A. O. Perantoni, “Nitric oxide prodrug JS-K inhibits ubiquitin E1 and kills tumor cells retaining wild-type p53” *Oncogene*, vol. 28, no. 4, pp. 619–24, 2009.
- [152] M. Z. Kaczmarek, R. J. Holland, S. A. Lavanier, J. A. Troxler, V. I. Fesenkova, C. A. Hanson, J. L. Cmarik, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, S. K. Ruscetti „Mechanism of action for the cytotoxic effects of the nitric oxide prodrug JS-K in murine erythroleukemia cells” *Leuk. Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 377–82, 2014.
- [153] U. Förstermann, W. C. Sessa „Nitric oxide synthases: regulation and function” *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 829–37, 837a–837d, 2012.
- [154] D. C. Rockey, V. Shah „Nitric oxide biology and the liver: report of an AASLD research workshop” *Hepatology*, vol. 39, no. 1, pp. 250–7, 2004.
- [155] S. Tateya, N. O. Rizzo, P. Handa, A. M. Cheng, V. Morgan-Stevenson, G. Daum, A. W. Clowes, G. J. Morton, M. W. Schwartz, F. Kim „Endothelial NO/cGMP/VASP signaling attenuates Kupffer cell activation and hepatic insulin resistance induced by high-fat feeding” *Diabetes*, vol. 60, no. 11, pp. 2792–801, 2011.
- [156] Y. M. Kim, T. H. Kim, H. T. Chung, R. V. Talanian, X. M. Yin, T. R. Billiar „Nitric oxide prevents tumor necrosis factor alpha-induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosylation of caspase-8” *Hepatology*, vol. 32, no. 4 Pt 1, pp. 770–8, 2000.
- [157] C. E. Carnovale, M. T. Ronco „Role of nitric oxide in liver regeneration” *Ann. Hepatol.*, vol. 11, no. 5, pp. 636–47, 2012.
- [158] W. S. Jobgen, S. K. Fried, W. J. Fu, C. J. Meininger, and G. Wu „Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 9, pp. 571–88, 2006.
- [159] L. S. Hu, J. George, J. H. Wang „Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension” *World J. Gastroenterol.*, vol. 19, no. 11, pp. 1707–17, 2013.

- [160] L. D. DeLeve „Sinusoidal Obstruction Syndrome” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 4, no. 2, pp. 101–103, 2008.
- [161] A. Siriussawakul „Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury” *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 48, pp. 6079–86, 2010.
- [162] E. Maslak, P. Zabielski, K. Kochan, K. Kus, A. Jaształ, B. Sitek, B. Proniewski, T. Wojcik, K. Gula, A. Kij, M. Walczak, M. Baranska, A. Chabowski, R. J. Holland, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, and S. Chlopicki „The liver-selective NO donor, V-PYRRO/NO, protects against liver steatosis and improves postprandial glucose tolerance in mice fed high fat diet” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 93, no. 3, pp. 389–400, 2015.
- [163] Z. An, J. J. Winnick, M. C. Moore, B. Farmer, M. Smith, J. M. Irimia, P. J. Roach, A. D. Cherrington „A cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway can regulate net hepatic glucose uptake in vivo” *Diabetes*, vol. 61, no. 10, pp. 2433–41, 2012.
- [164] S. Z. Lutz, A. M. Hennige, S. Feil, A. Peter, A. Gerling, J. Machann, S. M. Kröber, M. Rath, A. Schürmann, C. Weigert, H.-U. Häring, and R. Feil „Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes liver inflammation and fasting hyperglycemia” *Diabetes*, vol. 60, no. 5, pp. 1566–76, 2011.
- [165] J. E. Saavedra, T. R. Billiar, D. L. Williams, Y. Kim, S. C. Watkins, L. K. Keefer „Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. design of a liver-selective no donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and toxicity in the liver” *J. Med. Chem.*, vol. 40, no. 13, pp. 1947–1954, 1997.
- [166] H. Chakrapani, B. M. Showalter, L. Kong, L. K. Keefer, J. E. Saavedra „V-PROLI/NO, a prodrug of the nitric oxide donor, PROLI/NO.” *Org. Lett.*, vol. 9, no. 17, pp. 3409–12, 2007.
- [167] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, „Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes” *Chem. Rev.*, vol. 104, pp. 3947–3980, 2004.
- [168] K. Ota, B. D. Hammock „Cytosolic and microsomal epoxide hydrolases: differential properties in mammalian liver” *Science.*, vol. 207, no. 4438, pp. 1479–81, 1980.
- [169] K. Inami, R. W. Nims, A. Srinivasan, M. L. Citro, J. E. Saavedra, A. I. Cederbaum, L. K. Keefer „Metabolism of a liver-selective nitric oxide-releasing agent, V-PYRRO/NO, by human microsomal cytochromes P450” *Nitric oxide*, vol. 14, no. 4, pp. 309–15, 2006.
- [170] J. Liu, J. E. Saavedra, T. Lu, J.-G. Song, J. Clark, M. P. Waalkes, L. K. Keefer „O(2)-Vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate protection against D-galactosamine/endotoxin-induced hepatotoxicity in mice: genomic analysis using microarrays” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 300, no. 1, pp. 18–25, 2002.
- [171] W. Qu, J. Liu, R. Fuquay, R. Shimoda, T. Sakurai, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. P. Waalkes „The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, protects against cadmium toxicity and apoptosis at the cellular level” *Nitric oxide*, vol. 12, no. 2, pp. 114–20, 2005.

- [172] J. Liu, W. Qu, J. E. Saavedra, M. P. Waalkes „The nitric oxide donor, O²-vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO), protects against cadmium-induced hepatotoxicity in mice” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 310, no. 1, pp. 18–24, 2004.
- [173] W. Qu, J. Liu, R. Fuquay, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. P. Waalkes „The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, mitigates arsenic-induced liver cell toxicity and apoptosis” *Cancer Lett.*, vol. 256, no. 2, pp. 238–45, 2007.
- [174] C. Li, J. Liu, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. P. Waalkes „The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced nephrotoxicity in mice” *Toxicology*, vol. 189, no. 3, pp. 173–180, 2003.
- [175] J. Liu, C. Li, M. P. Waalkes, J. Clark, P. Myers, J. E. Saavedra, L. K. Keefer „The nitric oxide donor, V-PYRRO/NO, protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice” *Hepatology*, vol. 37, no. 2, pp. 324–33, 2003.
- [176] A. Holownia, J. Jablonski, A. Skiepkowski, R. Mroz, E. Sitko, J. J. Braszko „Ruthenium red protects HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against acetaminophen cytotoxicity” *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 379, no. 1, pp. 27–35, 2009.
- [177] I. Shokolenko, T. M. Oberyszyn, S. M. D'Ambrosio, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, S. P. LeDoux, G. L. Wilson, F. M. Robertson „Protection of human keratinocyte mtDNA by low-level nitric oxide” *Nitric Oxide*, vol. 5, no. 6, pp. 555–60, 2001.
- [178] J. Liu, M. P. Waalkes „Nitric oxide and chemically induced hepatotoxicity: beneficial effects of the liver-selective nitric oxide donor, V-PYRRO/NO” *Toxicology*, vol. 208, no. 2, pp. 289–97, 2005.
- [179] R. González, A. Cruz, G. Ferrín, P. López-Cillero, R. Fernández-Rodríguez, J. Briceño, M. a Gómez, S. Rufián, M. D. La Mata, A. Martínez-Ruiz, J. J. G. Marin, J. Muntané „Nitric oxide mimics transcriptional and post-translational regulation during α -tocopherol cytoprotection against glycochenodeoxycholate-induced cell death in hepatocytes” *J. Hepatol.*, vol. 55, no. 1, pp. 133–44, 2011.
- [180] P. Gong, A. I. Cederbaum, N. Nieto „The liver-selective nitric oxide donor O²-Vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO) protects HEPG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity” *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 1, pp. 130–138, 2004.
- [181] K. Chang, S.-J. Lee, I. Cheong, T. R. Billiar, H.-T. Chung, J.-A. Han, Y.-G. Kwon, K.-S. Ha, Y.-M. Kim „Nitric oxide suppresses inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B” *Experimental Mol. Med.*, vol. 36, no. 4, pp. 311–324, 2004.
- [182] F. Moal, D. Chappard, J. Wang, E. Vuillemin, S. Michalak-Provost, M. C. Rousselet, F. Oberti, P. Calès „Fractal dimension can distinguish models and pharmacologic changes in liver fibrosis in rats” *Hepatology*, vol. 36, no. 4 Pt 1, pp. 840–9, 2002.

- [183] J. Liu, Y.-Y. He, C. F. Chignell, J. Clark, P. Myers, J. E. Saavedra, M. P. Waalkes „Limited protective role of V-PYRRO/NO against cholestasis produced by alpha-naphthylisothiocyanate in mice” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 70, no. 1, pp. 144–51, 2005.
- [184] C. Edwards, H.-Q. Feng, C. Reynolds, L. Mao, D. C. Rockey „Effect of the nitric oxide donor V-PYRRO/NO on portal pressure and sinusoidal dynamics in normal and cirrhotic mice” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 294, no. 6, pp. G1311–7, 2008.
- [185] L. D. DeLeve, X. Wang, G. C. Kanel, Y. Ito, N. W. Bethea, M. K. McCuskey, Z. A. Tokes, J. Tsai, R. S. McCuskey „Decreased hepatic nitric oxide production contributes to the development of rat sinusoidal obstruction syndrome” *Hepatology*, vol. 38, no. 4, pp. 900–8, 2003.
- [186] R. Ricciardi, D. P. Foley, S. H. Quarfordt, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, S. M. Wheeler, S. E. Donohue, M. P. Callery, W. C. Meyers „V-PYRRO/NO: an hepato-selective nitric oxide donor improves porcine liver hemodynamics and function after ischemia reperfusion” *Transplantation*, vol. 71, no. 2, pp. 193–8, 2001.
- [187] D. J. Waterhouse, J. E. Saavedra, K. M. Davies, M. L. Citro, X. Xu, D. a. Powell, G. J. Grimes, G. K. Potti, L. K. Keefer „Injectable formulation of disodium 1-[2-(carboxylato)pyrrolidin-1-yl] diazen-1-ium-1,2-diolate (PROLI/NO), an ultrafast nitric oxide donor prodrug” *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 1, pp. 108–115, 2006.
- [188] S. Y. Hong, G. L. Borchert, A. E. Maciag, R. S. Nandurdikar, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, J. M. Phang, H. Chakrapani „The Nitric Oxide Prodrug V-PROLI/NO Inhibits Cellular Uptake of Proline” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 1, no. 8, pp. 386–389, 2010.
- [189] W. Qu, J. Liu, A. L. Dill, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. P. Waalkes „V-PROLI/NO, a Nitric Oxide Donor Prodrug, Protects Liver Cells from Arsenic-Induces Toxicity” *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 3, pp. 382–388, 2010.
- [190] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall „Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent” *J. Biol. Chem.*, no. 193, pp. 265–275, 1951.
- [191] FDA „Guidance for industry. process validation: general principles and practices” pp. 1-22, 2011.
- [192] FDA „Guidance for industry, bioanalytical methods validation” pp. 1-22, 2001.
- [193] EMEA „Guideline on bioanalytical method validation,” vol. 44, pp. 1-22, 2012.
- [194] B. K. Matuszewski „Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 830, no. 2, pp. 293–300, 2006.

- [195] S. F. Stinson, T. House, C. Bramhall, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, R. W. Nims „Plasma pharmacokinetics of a liver-selective nitric oxide-donating diazeniumdiolate in the male C57BL/6 mouse” *Xenobiotica*, vol. 32, no. 4, pp. 339–47, 2002.
- [196] H.-K. Lim, J. Chen, C. Sensenhauser, K. Cook, V. Subrahmanyam „Metabolite identification by data-dependent accurate mass spectrometric analysis at resolving power of 60,000 in external calibration mode using an LTQ/Orbitrap” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 21, no. 12, pp. 1821–32, 2007.
- [197] H. G. Oldham, S. E. Clarke „In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 25, no. 8, pp. 970–977, 1997.
- [198] W. H. Schaefer, J. Politowski, B. Hwang, F. Dixon Jr., A. Goalwin, L. Gutzait, K. Anderson, C. DeBrosse, M. Bean, G. R. Rhodes „Metabolism of Carvedilol in Dogs, Rats, and Mice” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 26, no. 10, pp. 958–969, 1998.
- [199] K. E. Lasser, P. D. Allen, S. J. Woolhandler, D. U. Himmelstein, S. M. Wolfe, D. H. Bor „Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications” *JAMA*, vol. 287, no. 17, pp. 2215–20, 2002.
- [200] M. A. Friedman, J. Woodcock, M. M. Lumpkin, J. E. Shuren, A. E. Hass, L. J. Thompson „The safety of newly approved medicines: do recent market removals mean there is a problem?” *JAMA*, vol. 281, no. 18, pp. 1728–34, 1999.
- [201] I. Kola, J. Landis „Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 8, pp. 711–5, 2004.
- [202] T. D. Bjornsson, J. T. Callaghan, H. J. Einolf, V. Fischer, L. Gan, S. Grimm, J. Kao, S. P. King, G. Miwa, L. A. N. Ni, G. Kumar, J. M. C. Leod, R. S. Obach, S. Roberts, A. M. Y. Roe, A. Shah, F. Snikeris, J. T. Sullivan, D. Tweedie, J. M. Vega, J. Walsh, S. A. Wrighton “The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies : a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 31, no. 7, pp. 815–832, 2003.
- [203] P. Fasinu, P. J. Bouic, B. Rosenkranz „Liver-Based In Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies - A Review” *Curr. Drug Metab.*, vol. 13, no. 2, pp. 215–224, 2012.
- [204] D. Zhang, G. Luo, X. Ding, C. Lu „Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 2, no. 6, pp. 549–561, 2012.
- [205] X. Liu, L. Jia „The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practise (I): Analytical Systems and In Vivo Studies” *Curr. Drug Metab.*, vol. 8, no. 8, pp. 815–821, 2009.

- [206] S. Asha, M. Vidyavathi „Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 160, no. 6, pp. 1699–722, 2010.
- [207] B. Yang, W. Liu, K. Chen, Z. Wang, C. Wang „Metabolism of diosbulbin B in vitro and in vivo in rats: formation of reactive metabolites and human enzymes involved” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 42, no. 10, pp.1737-50, 2014.
- [208] Y.-L. Han, D. Li, B. Ren, G.-P. Jing, X.-L. Meng, Z.-Y. Zhou, Q. Yu, Y. Li, L.-L. Wan, C. Guo „Evaluation of impact of Herba Erigerontis injection, a Chinese herbal prescription, on rat hepatic cytochrome P450 enzymes by cocktail probe drugs” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 139, no. 1, pp. 104–9, 2012.
- [209] B. Wang, S. Yang, J. Hu, Y. Li „Multifaceted interaction of the traditional Chinese medicinal herb Schisandra chinensis with cytochrome P450-mediated drug metabolism in rats” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 155, pp. 1473–1482, 2014.
- [210] P. Chen, M. Guo, D. Wygle, P. A. Edwards, J. R. Falck, R. J. Roman, A. G. Scicli „Inhibitors of cytochrome P450 4A suppress angiogenic responses” *Am. J. Pathol.*, vol. 166, no. 2, pp. 615–24, 2005.
- [211] M. Martignoni, G. M. M. Groothuis, R. de Kanter „Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 2, no. 6, pp. 875–94, 2006.
- [212] J. Bogaards, M. Bertrand, P. C. Jackson, M. Oudshoorn, R. Weaver, P. van Bladeren, B. Walther „Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man” *Xenobiotica*, vol. 30, no. 12, pp. 1131–1152, 2000.
- [213] V. A. Eagling, J. F. Tjia, and D. J. Back „Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 45, no. 2, pp. 107–14, 1998.
- [214] K. Kobayashi, K. Urashima, N. Shimada, K. Chiba „Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 63, pp. 889–896, 2002.
- [215] K. Kobayashi, K. Urashima, N. Shimada, K. Chiba „Selectivities of human cytochrome P450 inhibitors toward rat P450 isoforms: study with cDNA-expressed systems of the rat” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 31, no. 7, pp. 833–836, 2003.
- [216] J. Easterbrook, D. Fackett, A. P. Li „A comparison of aroclor 1254-induced and uninduced rat liver microsomes to human liver microsomes in phenytoin O - deethylation , coumarin 7-hydroxylation , tolbutamide and testosterone 6 b - hydroxylation” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 134, pp. 243–249, 2001.

- [217] B. Wang, F. He, Y. Lin, M. Huang, S.-F. Zhou „Effect of Recombinant Human Thymosin-1, an Immuno-Modulating Peptide with 28 Amino Acids, on the Activity of Cytochrome P450s” *Drug Metab. Lett.*, vol. 1, pp. 199–204, 2007.
- [218] X. Wang, M. Chen, X. Chen, J. Ma, C. Wen, J. Pan, L. Hu, G. Lin „The effects of acute hydrogen sulfide poisoning on cytochrome P450 isoforms activity in rats” *Biomed Res. Int.*, doi: 10.1155/2014/209393, 2014.
- [219] I. Yamasaki, M. Yamada, N. Uotsu, S. Teramoto, R. Takayanagi, Y. Yamada „Inhibitory effects of kale ingestion on metabolism by cytochrome P450 enzymes in rats” *Biomed. Res.*, vol. 33, no. 4, pp. 235–42, 2012.
- [220] S. Zhang, N. Song, Q. Li, H. Fan, C. Liu „Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous evaluation of activities of five cytochrome P450s using a five-drug cocktail and application to cytochrome P450 phenotyping studies in rats” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 871, no. 1, pp. 78–89, 2008.
- [221] K. Rolsted, A.-M. Kissmeyer, G. M. Rist, S. H. Hansen „Evaluation of cytochrome P450 activity in vitro, using dermal and hepatic microsomes from four species and two keratinocyte cell lines in culture” *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 300, no. 1, pp. 11–8, 2008.
- [222] O. Videau, S. Pitarque, S. Troncale, P. Hery, E. Thévenot, M. Delaforge, H. Bénech „Can a cocktail designed for phenotyping pharmacokinetics and metabolism enzymes in human be used efficiently in rat?” *Xenobiotica*, vol. 42, no. 4, pp. 349–54, 2012.
- [223] T. Hiroi, T. Chow, S. Imaoka, Y. Funae „Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 9, pp. 970–976, 2002.
- [224] M. J. Gómez-Lechón, A. Lahoz, N. Jiménez, J. Vicente Castell, M. T. Donato „Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing” *Xenobiotica*, vol. 36, no. 6, pp. 457–72, 2006.
- [225] S. Uchida, S. Tanaka, N. Namiki „Simultaneous and comprehensive in vivo analysis of cytochrome P450 activity by using a cocktail approach in rats” *Biopharm. Drug Dispos.*, vol. 35, no. 4, pp. 228–36, 2014.
- [226] J. M. Hutzler, T. S. Tracy „Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 4, pp. 355–362, 2002.
- [227] Y. Kapelyukh, M. J. I. Paine, J.-D. Maréchal, M. J. Sutcliffe, C. R. Wolf, G. C. K. Roberts „Multiple substrate binding by cytochrome P450 3A4: estimation of the number of bound substrate molecules” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 36, no. 10, pp. 2136–44, 2008.

- [228] A. Galetin, S. E. Clarke, J. B. Houston „Multisite kinetic analysis of interactions between prototypical CYP3A4 subgroup substrates : midazolam , testosterone , and nifedipine” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 31, no. 9, pp. 1108–1116, 2003.
- [229] K. E. Kenworthy, S. E. Clarke, J. Andrews, J. B. Houston „Multisite kinetic models for CYP3A4 : simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 29, no. 12, pp. 1644–1651, 2001.
- [230] M. Sakamoto, T. Itoh, R. Fujiwara „Prediction of in vivo carbamazepine 10 , 11-epoxidation from in vitro metabolic studies with human liver microsomes : importance of its sigmoidal kinetics,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 36, no. December, pp. 1959–1963, 2013.
- [231] K. Maekawa, T. Yoshimura, Y. Saito, Y. Fujimura, F. Aohara, C. Emoto, K. Iwasaki, N. Hanioka, S. Narimatsu, T. Niwa, J. Sawada „Functional characterization of CYP3A4.16: catalytic activities toward midazolam and carbamazepine” *Xenobiotica.*, vol. 39, no. 2, pp. 140–7, 2009.
- [232] J. B. Houston, A. Galetin „Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 433, no. 2, pp. 351–60, 2005.
- [233] R. A. E. Yuan, S. Madani, X. Wei, K. Reynolds „Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 12, pp. 1311–1319, 2002.
- [234] Y. U. H. Lin, P. Lu, C. Tang, Q. I. N. Mei, G. Sandig, A. D. Rodrigues, T. H. Rushmore, D. Metabolism, W. Point „Substrate inhibition kinetics for cytochrome P450-catalyzed reactions” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 29, no. 4, pp. 368–374, 2001.
- [235] B. Carr, R. Norcross, Y. Fang, P. Lu, A. D. Rodrigues, M. Shou, T. Rushmore, C. Booth-Genthe „Characterization of the rhesus monkey CYP3A64 enzyme: Species comparisons of CYP3A substrate specificity and kinetics using baculovirus-expressed recombinant enzymes” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 34, no. 10, pp. 1703–1712, 2006.
- [236] S. A. J. Testino, G. Patonay „High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography–tandem mass spectrometry” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, pp. 1459–1467, 2003.
- [237] P. G. Alden, R. S. Plumb, M. D. Jones, P. D. Rainville, D. Shave „A rapid ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric methodology for the in vitro analysis of Pooled and Cocktail cytochrome P450 assays” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 1, pp. 147–54, 2010.
- [238] R. Yuan, S. Madani, X.-X. Wei, K. Reynolds, S.-M. Huang „Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 30, no. 12, pp. 1311–1319, 2002.

- [239] M.-J. Kim, H. Kim, I.-J. Cha, J.-S. Park, J.-H. Shon, K.-H. Liu, J.-G. Shin „High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes in vitro using liquid chromatography/tandem mass spectrometry” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, no. 18, pp. 2651–8, 2005.
- [240] L. De Bock, K. Boussery, P. Colin, J. De Smet, H. T’jollyn, J. Van Bocxlaer „Development and validation of a fast and sensitive UPLC-MS/MS method for the quantification of six probe metabolites for the in vitro determination of cytochrome P450 activity” *Talanta*, vol. 89, pp. 209–16, 2012.
- [241] R. L. Walsky, R. S. Obach „Validated assays for human cytochrome P450 activities” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 6, pp. 647–660, 2004.
- [242] K. S. Lee, S. K. Kim „Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 33, no. 2, pp. 100–8, 2013.
- [243] K. Kozakai, Y. Yamada, M. Oshikata, T. Kawase, E. Suzuki, Y. Haramaki, H. Taniguchi „Cocktail-substrate approach-based high-throughput assay for evaluation of direct and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450 isoforms” *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 29, no. 2, pp. 198–207, 2014.
- [244] M. Dasgupta, W. Tang, G. W. Caldwell, Z. Yan „Use of stable isotope labeled probes to facilitate liquid chromatography/mass spectrometry based high-throughput screening of time-dependent CYP inhibitors” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 15, pp. 2177–2185, 2010.
- [245] Y. Ding, Y. Jia, C. Lu, W. Liu, J. Yang, Y. Song, Y. Zhu, L. Yang, L. Ding, A. Wen „In vitro assessment of cytochrome P450 inhibition and induction potential of felotaxel (SHR110008)” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 66, no. 4, pp. 318–21, Jun. 2012.
- [246] M. Turpeinen, J. Uusitalo, U. Jouko, J. Jalonen, J. Jorma, O. Pelkonen, P. Olavi „Multiple P450 substrates in a single run: rapid and comprehensive in vitro interaction assay” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 123–32, 2005.
- [247] E. A. Dierks, K. R. Stams, H.-K. Lim, G. Cornelius, H. Zhang, S. E. Ball „A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 29, no. 1, pp. 23–29, 2001.
- [248] V. C. Pillai, S. C. Strom, S. N. Caritis, R. Venkataramanan „A sensitive and specific CYP cocktail assay for the simultaneous assessment of human cytochrome P450 activities in primary cultures of human hepatocytes using LC-MS/MS” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 74, pp. 126–32, 2013.

- [249] D. Smith, N. Sadagopan, M. Zientek, A. Reddy, L. Cohen „Analytical approaches to determine cytochrome P450 inhibitory potential of new chemical entities in drug discovery” *J. Chromatogr. B*, vol. 850, no. 1–2, pp. 455–63, 2007.
- [250] M. Zientek, H. Miller, D. Smith, M. B. Dunklee, L. Heinle, A. Thurston, C. Lee, R. Hyland, O. Fahmi, D. Burdette „Development of an in vitro drug-drug interaction assay to simultaneously monitor five cytochrome P450 isoforms and performance assessment using drug library compounds” *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 58, no. 3, pp. 206–214, 2008.
- [251] M. F. Paine, P. Schmiedlin-oren, P. B. Watkins „Cytochrome P-450 1A1 expression in human small bowel : interindividual variation and inhibition by ketoconazole” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 27, no. 3, pp. 360–364, 1999.
- [252] D. J. Back, J. F. Tjia, J. Karbwang, J. Colbert „In vitro inhibition studies of tolbutamide hydroxylase activity of human liver microsomes by azoles, sulphonamides and quinolines” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 26, no. 1, pp. 23–9, 1988.
- [253] C. Emoto, S. Mrase, Y. Sawada, B. C. Jones, K. Iwasaki „In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes : a comparison with SKF-525A and ketoconazole” *Drug Metabolism Pharmacokin.*, vol. 18, no. 5, pp. 287–295, 2003.
- [254] M. E. Elsherbiny, A. O. S. El-Kadi, D. R. Brocks „The metabolism of amiodarone by various CYP isoenzymes of human and rat, and the inhibitory influence of ketoconazole” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 147–59, 2008.
- [255] S. Jahn, U. Karst „Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry--current state and future perspectives” *J. Chromatogr. A*, vol. 1259, pp. 16–49, 2012.
- [256] U. Jurva, H. V. Wikström, L. Weidolf, A. P. Bruins „Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 8, pp. 800–10, 2003.
- [257] H. Simon, D. Melles, S. Jacquilleot, P. Sanderson, R. Zazzaroni, U. Karst „Combination of electrochemistry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for metabolism studies” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 20, pp. 8777–82, 2012.
- [258] S. M. van Leeuwen, B. Blankert, J.-M. Kauffmann, U. Karst „Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 382, no. 3, pp. 742–50, 2005.
- [259] W. Lohmann, U. Karst „Generation and identification of reactive metabolites by electrochemistry and immobilized enzymes coupled on-line to liquid chromatography/mass spectrometry” *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 17, pp. 6831–9, 2007.

- [260] S. Jahn, A. Baumann, J. Roscher, K. Hense, R. Zazzeroni, U. Karst „Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry - a comparative study with liver cell microsomes” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 51, pp. 9210–20, 2011.
- [261] H. Faber, D. Melles, C. Brauckmann, C. A. Wehe, K. Wentker, U. Karst „Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/(liquid chromatography/)mass spectrometry” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, no. 2, pp. 345–54, 2012.
- [262] S. Jahn, B. Seiwert, S. Kretzing, G. Abraham, R. Regenthal, U. Karst „Metabolic studies of the Amaryllidaceous alkaloids galantamine and lycorine based on electrochemical simulation in addition to in vivo and in vitro models” *Anal. Chim. Acta*, vol. 756, pp. 60–72, 2012.
- [263] T. J. Mali'n, L. Weidolf, N. Castagnoli, U. Jurva „P450-catalyzed vs. electrochemical oxidation of haloperidol studied by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, no. 9, pp. 1231–40, 2010.
- [264] A. Baumann, W. Lohmann, B. Schubert, H. Oberacher, U. Karst „Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 15, pp. 3192–8, 2009.
- [265] G. Neugebauer, P. Neubert „Metabolism of carvedilol in man” *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 16, no. 4, pp. 257–260, 1991.
- [266] H. K. Han, G. L. Amidon „Targeted prodrug design to optimize drug delivery.” *AAPS PharmSci*, vol. 2, no. 1, p. E6, 2000.
- [267] X. Ding, L. S. Kaminsky „Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 43, pp. 149–73, 2003.
- [268] P. Pavek, Z. Dvorak, “Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues” *Curr. Drug Metab.*, vol. 9, no. 2, pp. 129–43, 2008.
- [269] F. Peter „Characterization of human cytochrome P450” *FASEB J.*, vol. 6, no. 2, pp. 745–748, 1992.
- [270] P. Poulin, S. Haddad „Pharmacokinetics , pharmacodynamics and drug metabolism advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue-composition-based model as a mechanistic animal” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 6, pp. 2250–2261, 2012.

- [271] R. Jansson, U. L. F. Bredberg, M. Ashton „Drug metabolism prediction of drug tissue to plasma concentration ratios using a measured volume of distribution in combination with lipophilicity” *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 6, pp. 2324–2339, 2008.
- [272] T. Rodgers, M. Rowland „Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions” *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 6, pp. 1238–57, Jun. 2006.
- [273] M. Pawłowska, E. Augustin „Systemy ekspresyjne białek cytochromu P450 w badaniach in vitro metabolizmu leków Expression systems of cytochrome P450 proteins in studies of drug metabolism in vitro” *Postepy Hig. Med. Dosw.*, no. 65, pp. 367–376, 2011.
- [274] W. M. A. Westerink, W. G. E. J. Schoonen „Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells” *Toxicol. Vitr.*, vol. 21, no. 8, pp. 1581–91, 2007.
- [275] J. Lin, L. Schyschka, R. Mühl-Benninghaus, J. Neumann, L. Hao, N. Nussler, S. Dooley, L. Liu, U. Stöckle, A. K. Nussler, S. Ehnert „Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism” *Arch. Toxicol.*, vol. 86, no. 1, pp. 87–95, 2012.
- [276] T. Hou, J. Wang „Structure-ADME relationship: still a long way to go?” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 4, no. 6, pp. 759–70, 2008.
- [277] M. Paul Gleeson, A. Hersey, S. Hannongbua „In-Silico ADME Models: A General Assessment of their Utility in Drug Discovery Applications” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 11, no. 4, pp. 358–381, 2011.
- [278] I. V Tetko, P. Bruneau, H.-W. Mewes, D. C. Rohrer, G. I. Poda „Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions?” *Drug Discov. Today*, vol. 11, no. 15–16, pp. 700–7, 2006.
- [279] R. Vuppugalla, R. Mehvar „Selective effects of nitric oxide on the disposition of chlorzoxazone and dextromethorphan in isolated perfused rat livers” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 34, no. 7, pp. 1160–1166, 2006.
- [280] R. Vuppugalla, R. Mehvar „Enzyme-selective effects of nitric oxide on affinity and maximum velocity of various rat cytochromes P450” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 33, no. 6, pp. 829–836, 2005.
- [281] R. Vuppugalla, R. Mehvar „Hepatic disposition and effects of nitric oxide donors: rapid and concentration-dependent reduction in the cytochrome P450-mediated drug metabolism in isolated perfused rat livers” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 310, no. 2, pp. 718–27, 2004.

- [282] J. Stadler, J. Trockfeld, W. A. Schmalix, T. Brill, J. R. Siewert, H. Greim, J. Doehmer, "Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 9, pp. 3559–63, 1994.
- [283] B. M. VandenBrink, N. Isoherranen „The role of metabolites in predicting drug-drug interactions Focus on irreversible P450 inhibition" *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, vol. 13, no. 1, pp. 66–77, 2010.
- [284] P. Y. Martin, P. Ginès, R. W. Schrier „Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium and water retention in cirrhosis" *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 8, pp. 533–41, 1998.
- [285] A. Rodríguez-Vilarrupla, M. Fernández, J. Bosch, J. C. García-Pagán „Current concepts on the pathophysiology of portal hypertension" *Ann. Hepatol.*, vol. 6, no. 1, pp. 28–36, Jan.
- [286] S.-D. Clas, R. I. Sanchez, R. Nofsinger „Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges" *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 1, pp. 79–87, 2014.
- [287] M. E. Robbins, M. H. Schoenfisch „Surface-localized release of nitric oxide via sol–gel chemistry" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 20, pp. 6068–6069, 2003.
- [288] H. Zhang, G. M. Annich, J. Miskulin, K. Osterholzer, S. I. Merz, R. H. Bartlett, M. E. Meyerhoff „Nitric oxide releasing silicone rubbers with improved blood compatibility: preparation, characterization, and in vivo evaluation" *Biomaterials*, vol. 23, no. 6, pp. 1485–94, 2002.
- [289] D. J. Smith, D. Chakravarthy, S. Pulfer, M. L. Simmons, J. A. Hrabie, M. L. Citro, J. E. Saavedra, K. M. Davies, T. C. Hutsell, D. L. Mooradian, S. R. Hanson, L. K. Keefer, "Nitric oxide-releasing polymers containing the [N(O)NO]- group" *J. Med. Chem.*, vol. 39, no. 5, pp. 1148–56, 1996.
- [290] F. DeRosa, M. R. Kibbe, S. F. Najjar, M. L. Citro, L. K. Keefer, J. A. Hrabie „Nitric oxide-releasing fabrics and other acrylonitrile-based diazeniumdiolates" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 13, pp. 3786–7, 2007.
- [291] V. Rodighiero „Effects of liver disease on pharmacokinetics. An update" *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 37, no. 5, pp. 399–431, 1999.
- [292] R. Jain, S. M. Chung, L. Jain, M. Khurana, S. W. J. Lau, J. E. Lee, J. Vaidyanathan, I. Zadezensky, S. Choe, C. G. Sahajwalla „Implications of obesity for drug therapy: limitations and challenges" *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 90, no. 1, pp. 77–89, 2011.
- [293] C. D. Fisher, A. J. Lickteig, L. M. Augustine, J. Ranger-Moore, J. P. Jackson, S. S. Ferguson, N. J. Cherrington „Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease" *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, no. 10, pp. 2087–94, 2009.

- [294] E. Kathirvel, K. Morgan, S. W. French, T. R. Morgan „Overexpression of liver-specific cytochrome P4502E1 impairs hepatic insulin signaling in a transgenic mouse model of nonalcoholic fatty liver disease” *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 21, no. 9, pp. 973–83, 2009.
- [295] M. G. Emery, J. M. Fisher, J. Y. Chien, E. D. Kharasch, E. P. Dellinger, K. V Kowdley, K. E. Thummel, “CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease.,” *Hepatology*, vol. 38, no. 2, pp. 428–35, 2003.
- [296] M. A. Abdelmegeed, A. Banerjee, S.-H. Yoo, S. Jang, F. J. Gonzalez, B.-J. Song „Critical role of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the development of high fat-induced non-alcoholic steatohepatitis” *J. Hepatol.*, vol. 57, no. 4, pp. 860–6, 2012.
- [297] J. Aubert, K. Begriche, L. Knockaert, M. A. Robin, B. Fromenty „Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role” *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 35, no. 10, pp. 630–7, 2011.
- [298] G. C. Farrell, N. C. Teoh, R. S. McCuskey „Hepatic microcirculation in fatty liver disease” *Anat. Rec.*, vol. 291, no. 6, pp. 684–92, 2008.
- [299] Y. Leykin, L. Miotto, T. Pellis „Pharmacokinetic considerations in the obese” *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, vol. 25, no. 1, pp. 27–36, 2011.
- [300] M. J. Hanley, D. R. Abernethy, D. J. Greenblatt „Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans” *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 49, no. 2, pp. 71–87, 2010.
- [301] S.-J. Cho, I.-S. Yoon, D.-D. Kim „Obesity-related physiological changes and their pharmacokinetic consequences” *J. Pharm. Investig.*, vol. 43, no. 3, pp. 161–169, 2013.
- [302] E. Maslak, A. Gregorius, S. Chlopicki „Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) function and NAFLD; NO based therapy targeted to the liver” *Pharmacol. Reports*, doi:10.1016/j.pharep.2015.04.010, 2015.

10. Spis rycin i tabel

Spis rycin

Rycina 1. 1. Ogólny schemat selektywnej terapii nowotworów, wykorzystujący systemy ADEPT oraz GDEPT.....	14
Rycina 1. 2. Schemat biotransformacji proleków o strukturze cyklicznych fosforanów w hepatocytach.....	16
Rycina 1. 3. Ogólny schemat budowy diolanów diazoniowych.	19
Rycina 1. 4. Wzory strukturalne oraz okresy półtrwania ($t_{0.5}$) diolanów diazoniowych o budowie jonowej.....	22
Rycina 1. 5. Schemat metabolizmu V-PYRRO/NO poprzez strukturę pośrednią PYRRO/NO do biologicznie aktywnego NO.....	23
Rycina 3. 1. Wzory strukturalne badanych związków V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO.....	26
Rycina 4. 1. Przykładowy chromatogram masowy dla V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO, próbki ślepej nie zawierającej analitów oraz próbki zerowej zawierającej standard wewnętrzny.....	47
Rycina 4. 2. Widma fragmentacyjne metabolitów substratów modelowych oraz standardu wewnętrznego.....	53
Rycina 4. 3. Chromatogramy wybranych jonów dla metabolitów selektywnych substratów izoenzymów cytochromu P450 oraz standardu wewnętrznego oraz próby ślepej.....	55
Rycina 4. 4. Zależność stężenia powstających metabolitów od czasu inkubacji.....	58
Rycina 4. 5. Zależność stężenia powstających metabolitów od stężenia białka mikrosomalnego..	59
Rycina 4. 6. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji fenacetyny do paracetamolu wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem furafyliny.....	60
Rycina 4. 7. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji tolbutamidu do 4-hydroksytolbutamidu wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem sulfafenazolu.....	60
Rycina 4. 8. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji S(+)-mefenytoiny do 4-hydroksymefenytoiny wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem (+)-N-3—benzyl-nirwanolu.....	61

Rycina 4. 9. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji racemicznej mefenytoiny do 4-hydroksymefenytoiny wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem (+)-N-3—benzyl-nirwanolu.....	61
Rycina 4. 10. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji bufuralolu do 1-hydroksybufuralolu wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem chinidyny	62
Rycina 4. 11. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji chlorzoksazonu do 6-hydroksychlorzoksazonu wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem disulfiramu	63
Rycina 4. 12. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji midazolamu do 1-hydroksymidazolami wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem ketokonazolu.....	63
Rycina 4. 13. Zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu dla biotransformacji midazolamu do 4-hydroksymidazolamu wraz z przekształceniami oraz krzywa hamowania aktywności izoenzymu pod wpływem ketokonazolu.....	64
Rycina 4. 14. Zależności szybkości reakcji od stężenia substratów inkubowanych w formie koktajlu wraz z odpowiadającymi im krzywymi Eadie-Hofstee	65
Rycina 4. 15. Krzywe hamowania wybranych izoenzymów cytochromu P450 po inkubacji z ketokonazolem	67
Rycina 4. 16. Woltamogramy przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnału karwedilolu oraz jego potencjalnych metabolitów w zależności od przyłożonego napięcia.....	69
Rycina 4. 17. Woltammogram masowy dla karwedilolu wygenerowany za pomocą EC-ESI/MS (elektrochemii połączonej ze spektrometrią mas). Widma masowe przedstawiono w zależności od rosnącego potencjału oksydacyjnego	70
Rycina 4. 18. Widma fragmentacyjne karwedilolu oraz jego potencjalnych metabolitów	71
Rycina 4. 19. Chromatogram wybranych jonów dla karwedilolu i jego metabolitów.....	72
Rycina 4. 20. Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PYRRO/NO przy pomocy oprogramowania PALLAS.....	74
Rycina 4. 21. Przewidywanie ścieżek metabolizmu V-PROLI/NO przy pomocy oprogramowania PALLAS.....	75
Rycina 4. 22. Profil farmakokinetyczny V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu związków u myszy.....	75
Rycina 4. 23. Zależność stężenia od czasu dla V-PROLI/NO w wątrobie po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanego związku u myszy.....	77

Rycina 4. 24. Stężenia azotanów (III) i azotanów (V) w osoczu myszy po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO	78
Rycina 4. 25. Procent dawki V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO wydalonej z moczem w postaci niezmienionej po 24 godzinach po podaniu związków	78
Rycina 4. 26. Różnice stężeń V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w próbkach buforu przed i po perfuzji narządowej przy stężeniach związków 10 μ M oraz 50 μ M. Stężenie azotanów (III) oraz azotanów (V) w homogenatach wątroby po godzinnej perfuzji wątroby	80
Rycina 4. 27. Zależność ubytku stężenia V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO od czasu inkubacji oraz stężenia białka mikrosomalnego w mieszaninie inkubacyjnej mikrosomów wątroby szczura	81
Rycina 4. 28. Kinetyka biotransformacji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w mikrosomach wątroby szczura. Wykresy przedstawiają krzywe Michaelisa – Menten odpowiednio dla V-PYRRO/NO, V-PROLI/NO oraz zależności Eadie – Hofstee odpowiednio dla V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO	82
Rycina 4. 29. Wpływ selektywnych inhibitorów cytochromu P450 na metabolizm V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO	82
Rycina 4. 30. Procent aktywności poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 po inkubacji mikrosomów wątroby z badanymi związkami, V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO o stężeniu odpowiednio 100 μ M oraz 1 mM	83
Rycina 4. 31. Woltamogramy masowe 2D, przedstawiające zmiany intensywności sygnałów dla jonów badanych substancji oraz produktów ich utlenienia w zależności od wartości przyłożonego napięcia dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO	84
Rycina 4. 32. Woltamogramy masowe 3D, przedstawiające zmieniającą się intensywność widma masowego badanych substancji V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w zależności od wartości przyłożonego napięcia	84
Rycina 4. 33. Profil farmakokinetyczny związków V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po podaniu badanych analogów dożylnie oraz dootrzewnowo w dawce 30 μ mol/kg u myszy ze stłuszczeniem wątroby	86
Rycina 4. 34. Zależność stężenia od czasu dla V-PROLI/NO w wątrobie po dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków myszom ze stłuszczeniem wątroby	86
Rycina 4. 35. Wartości stężeń azotanów (III) oraz azotanów (V) w osoczu po dożylnym podaniu V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO u myszy ze stłuszczeniem wątroby	87
Rycina 4. 36. Obliczone różnice stężeń V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO pomiędzy próbkami buforu przed i po perfuzji narządowej myszy ze stłuszczeniem wątroby przy stężeniach związków. Stężenie azotanów (III) oraz azotanów (V) w homogenatach wątroby po godzinnej perfuzji narządu	88
Rycina 4. 37. Ułamek dawki związków eliminowany przez nerki w postaci niezmienionej po dożylnym podaniu badanych analogów u myszy ze stłuszczeniem wątroby	89

Spis tabel

Tabela 4. 1. Monitorowane przejścia jonowe wraz z napięciami oraz energiami zderzeń dla oznaczanych analitów	46
Tabela 4. 2. Liniowość i dokładność metody oznaczenia V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy	49
Tabela 4. 3. Wartości precyzji i dokładności metody wyznaczone w jednym dniu i między dniami dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy	50
Tabela 4. 4. Odzysk oraz efekt matrycy dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO we wszystkich analizowanych matrycach biologicznych myszy	51
Tabela 4. 5. Stabilność V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO w próbkach po 24 h przechowywania w autosamplerze w temp. 10°C	51
Tabela 4. 6. Analizowane przejścia jonowe dla metabolitów substancji modelowych i wzorca wewnętrznego wraz z wartościami odpowiadających im energii zderzeń	52
Tabela 4. 7. Liniowość, współczynnik determinacji (r^2) oraz wartości dolnej granicy oznaczalności oraz wykrywalności dla każdego z metabolitów substancji modelowych	55
Tabela 4. 8. Precyzja w jednym dniu- i między dniami oraz dokładność metody oznaczania metabolitów substancji modelowych	56
Tabela 4. 9. Stabilność związków podczas przechowywania próbek w autosamplerze przez 24 h	56
Tabela 4. 10. Odzysk oraz bezwzględny i względny efekt matrycy dla metabolitów substratów modelowych.....	57
Tabela 4. 11. Wartości V_{max} oraz K_m dla modelowych substratów wybranych izoenzymów cytochromu P450	66
Tabela 4. 12. Otrzymane eksperymentalnie wartości IC_{50} dla ketokonazolu względem wybranych izoenzymów cytochromu P450	68
Tabela 4. 13. Wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po jednorazowym dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków	76
Tabela 4. 14. Wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych wyznaczonych dla V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO po jednorazowym dożylnym oraz dootrzewnowym podaniu badanych związków u myszy ze stłuszczeniem wątroby	85
Tabela 5. 1. Wybrane substancje modelowe w badaniach metabolizmu leków z udziałem cytochromu P450 stosowane w badaniach na modelach zwierzęcych wraz z odnośnikami literaturowymi.....	95
Tabela 5. 2. Otrzymane eksperymentalnie wartości stałej K_m dla poszczególnych substratów izoenzymów cytochromu P450 porównane z wartościami literaturowymi	97