



Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny

AUTOREFERAT

Maria Walczak

Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej

Wydział Farmaceutyczny

Kraków 2014

Spis treści

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	3
2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	3
2.1. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ	4
3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595, ZE ZM.).....	6
3.1 WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI	6
3.2. PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI	8
3.3. WSTĘP	8
3.4. CEL BADAŃ.....	14
3.5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	16
3.6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI	39
4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH.....	41
4.1. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....	41
4.2. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA.....	46
5. ZGŁOSZENIA PATENTOWE	58
6. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH.....	59
6.1. PROJEKTY FINANSOWANE Z PROGRAMÓW MIĘDZYNARODOWYCH	59
6.2. PROJEKTY FINANSOWANE ZE ŹRÓDEŁ KBN	59
6.3. PROJEKTY ZAMAWIANE	59
7. RECENZJE PRAC NAUKOWYCH.....	60
8. SPECJALIZACJE	60
9. NAGRODY I WYRÓŻNIENIA	60

IMIĘ I NAZWISKO: Maria Walczak

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

a/ magister farmacji

Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Krakowie, 1990 r.

promotor: prof. dr hab. Joanna Szymura-Oleksiak

tytuł pracy magisterskiej: „Farmakokinetyka populacyjna antybiotyków aminoglikozydowych”

b/ doktor nauk farmaceutycznych

Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2001 r.

promotor: prof. dr hab. Joanna Szymura-Oleksiak

tytuł pracy doktorskiej: „Ocena farmakokinetyki acebutololu w aspekcie chiralnej budowy tego leku”

c/ specjalista w dziedzinie: Farmacja Kliniczna

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny, 2013 r.

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Od 2010 do nadal Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET, UJ), adiunkt, kierownik Pracowni Analityki i Farmakokinetyki JCET, UJ

Od 2011 do nadal Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, starszy wykładowca

2001 - 2011 Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, adiunkt

1990 - 2001 Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, asystent naukowo-dydaktyczny

VIII - IX 1990 Zakład Bromatologii Akademia Medyczna w Krakowie, asystent naukowo-techniczny

2.1. KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA DZIAŁALNOŚCI NAUKOWEJ

W latach 1985-1990 studiowałam na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Krakowie. Studia ukończyłam na kierunku Farmacji Klinicznej, pracę magisterską pt. „Farmakokinetyka populacyjna antybiotyków aminoglikozydowych” obroniłam w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego AM w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Szymury-Oleksiak. W tym samym roku rozpoczęłam pracę w Zakładzie Bromatologii na etacie naukowo-technicznym, a po dwóch miesiącach w Zakładzie Chemii Fizycznej, obecnie Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM na etacie naukowo-dydaktycznym, którą kontynuuję do dnia dzisiejszego.

Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych nadany uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM uzyskałam w 2001 roku po obronie pracy doktorskiej pt. „Ocena farmakokinetyki acebutololu w aspekcie chiralnej budowy tego leku”, którą wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Szymury-Oleksiak. Rozprawa ta została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Na tym etapie rozwoju naukowego mój łączny dorobek naukowy obejmował współautorstwo 6 prac, o współczynniku IF = 1.327. W tym okresie byłam kierownikiem projektu badawczego finansowanego ze środków KBN.

Od 1 października 2001 r. do 30 czerwca 2011 r. byłam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM, a od 1 października 2011 roku pracuję na stanowisku starszego wykładowcy w tym samym Zakładzie.

Od początku zatrudnienia moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół badań nad farmakokinetyką kliniczną leków znanych, o udokumentowanej pozycji w terapii, jak również prowadzę badania z zakresu farmakokinetyki eksperymentalnej z udziałem małych zwierząt laboratoryjnych, służącej ocenie profilu farmakokinetycznego nowych związków, potencjalnych leków.

W 2005 roku podjęłam badania nad opracowywaniem i walidacją metod bioanalitycznych stosowanych do identyfikacji i oznaczania ilościowego związków nisko- i wielkocząsteczkowych w różnych matrycach biologicznych z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją masową (LC/MS/MS).

Znaczny wkład w poszerzenie mojego warsztatu naukowego wniosły dwa pobyty szkoleniowe na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Montpellier I (Francja), pierwszy w latach 1993/1994 (6 miesięcy) w Laboratorium Chemii Ogólnej, kierowanym przez prof. Jean Terol w ramach stypendium naukowego Rządu Francuskiego. Drugi pobyt miał miejsce w 2005 roku (2 miesiące) w związku z realizacją projektu Leonardo da Vinci pt. „Nowe trendy w kształceniu zawodowym farmaceutów”. W ramach tego projektu pracowałam w Laboratorium Farmakokinetyki Klinicznej pod opieką dr Francoise Bressolle oraz w Laboratorium Aminokwasów, Peptydów i Białek (LAPP) w zespole kierowanym przez prof. Jean Martinez. W latach 2007-2008, także w ramach projektu Leonardo da Vinci pt. „Standardy kształcenia podyplomowego w zakresie wybranych obszarów farmacji na poziomie europejskim” uczestniczyłam w tworzeniu międzynarodowego programu kształcenia podyplomowego farmaceutów. W tym celu brałam

udział w warsztatach organizowanych na Wydziałach Farmaceutycznych Uniwersytetów w Hamburgu i Barcelonie. W ramach rozwijanych zainteresowań badawczych w aspekcie badań proteomicznych odbyłam szkolenie praktyczne z zakresu przygotowywania próbek do analiz proteomicznych na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Vigo w Ourense (Hiszpania).

Realizowana przeze mnie tematyka badawcza pozwoliła mi na udział w charakterze wykonawcy w trzech projektach finansowanych ze środków Unii Europejskiej. W ramach pierwszego projektu operacyjnego POIG 01.01.02-12-012/09-00, pt. „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” wykonywałam badania identyfikacji metabolitów związków wytypowanych do badań farmakologicznych.

W ramach realizacji dużego infrastrukturalnego projektu ze środków Unii Europejskiej (POIG 2.2.) uczestniczyłam w procesie organizacji od podstaw laboratoriów Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków (JCET, UJ) w Krakowie, a w szczególności Pracowni Analityki i Farmakokinetyki JCET. Od 1 lipca 2011 roku zostałam powołana na stanowisko kierownika Pracowni Analityki i Farmakokinetyki JCET, funkcję tę pełnię do dnia dzisiejszego. W tym okresie uczestniczyłam nie tylko w wyborze aparatury do pracowni, uruchamianiu tej aparatury i organizacji pracy w nowopowstałej pracowni we współpracy z dyrektorem JCET prof. dr hab. Stefanem Chłopickim, ale również w procesie opracowania i wdrożenia w laboratoriach JCET standardowych procedur operacyjnych (SOP) obowiązujących w systemie Dobrej Praktyki Laboratoryjnej. Dzięki tym wysiłkom, decyzją Dyrektora Biura ds. Substancji Chemicznych z siedzibą w Łodzi laboratoria JCET uzyskały certyfikat GLP w zakresie analiz chemicznych, badań biochemicznych, badań bioanalitycznych oraz badań farmakokinetycznych, DECYZJA nr 2/2013/DPL. Na uwagę zasługuje fakt, iż obecnie istnieje w Polsce 27 laboratoriów, które uzyskały certyfikat GLP, lecz laboratoria JCET są pierwszym w Polsce akademickim ośrodkiem posiadającym certyfikat GLP, który pozwolił na przeprowadzenie w tych laboratoriach w 2013 roku pierwszych badań zleconych dla przemysłu zgodnych z wymaganiami GLP.

Obecnie jestem kierownikiem dwóch zadań badawczych projektu współfinansowanego przez Unię Europejską (POIG 1.1.2.) pt. „Śródbłonek naczyń w chorobach cywilizacyjnych, od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym”. Pierwsze zadanie obejmuje „Badania farmakokinetyczne (ADME) wytypowanych związków o działaniu naczynioprotekcyjnym”, drugie „Badania analityczne biomarkerów dysfunkcji śródbłonka techniką LC/MS/MS”. Współuczestniczyłam w przygotowywaniu tych zadań pod merytorycznym nadzorem prof. dr hab. Joanny Szymury-Oleksiak.

Mój aktualny dorobek naukowy obejmuje ogółem 30 prac oryginalnych (w tym 5 prac stanowiących podstawę habilitacji). Spośród wszystkich publikacji, 23 prace ukazały się w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (IF = 42.482, KBN = 485, IC = 21.17), 6 prac opublikowano w czasopiśmie o zasięgu krajowym (KBN = 7, IC = 5.13), ponadto jestem współautorem jednej pracy przeglądowej (KBN = 4), dwóch prac popularno-naukowych (wykaz zagadnień) oraz jednego zgłoszenia patentowego. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wszystkich opublikowanych prac wynosi 42.482, punktacja KBN jest równa 496, Indeks Copernicus wynosi 26.3. Opublikowane prace były cytowane 58 razy, a odpowiadający im Indeks

Hirscha wynosi 4. Wyniki badań zaprezentowałam na 82 plakatach oraz 6 referatach ustnych na 13 konferencjach międzynarodowych oraz 34 zjazdach krajowych. Wyniki badań prezentowałam w charakterze zaproszonego referenta na konferencji międzynarodowej 1st International Symposium on Profiling 2013 w Lizbonie.

Zagadnienia z zakresu farmacji klinicznej, którymi zajmowałam się szczególnie w pierwszych latach zatrudnienia, problematyka badawcza pracy doktorskiej oraz realizowane w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej zajęcia dydaktyczne z tego zakresu, stanowiły podstawę do podjęcia szkolenia specjalizacyjnego z Farmacji Klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Egzamin specjalizacyjny z wynikiem bardzo dobrym zdałam 15 stycznia 2013 roku w Poznaniu. Obecnie pełnię funkcję kierownika szkolenia specjalizacyjnego z Farmacji Klinicznej dwóch osób odbywających szkolenie specjalizacyjne na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz pełnię funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

3. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16, UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. Nr 65, POZ. 595, ZE ZM.)

Pracę habilitacyjną stanowi cykl pięciu oryginalnych prac opublikowanych w latach 2007-2014 objętych wspólnym tytułem „Profil farmakokinetyczny i właściwości fizykochemiczne nowych analogów karwedilolu jako potencjalnych leków układu sercowo-naczyniowego”. Wymienione prace zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (IF = 7.822). W trzech pracach jestem jedynym autorem, w dwóch pozostałych pierwszym autorem, we wszystkich jestem autorem korespondencyjnym, a mój średni procentowy udział w prezentowanych publikacjach wynosi 93%.

3.1 WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

H-1. Walczak M, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, Groszek G, Bednarski M, Filipek B: Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of new nonselective beta-adrenergic blocker 1-(1-H-indol-4-yloxy)-3-{{2-(2-methoxyphenoxy) ethylamino}propan-2-ol (2F109) in rat plasma. *Chirality* 2007, 19(7):536-541.

IF₂₀₀₇ = 2.436

H-2. Walczak M, Szymura-Oleksiak J, Groszek G. Enantioselective LC/ESI-MS/MS analysis and pharmacokinetic and tissue distribution study of (2RS)-1-(7-methoxy-1H-indol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino)-propan-2-ol in rats. *Chirality* 2012, 24(8):591-599.

IF₂₀₁₂ = 1.894

H-3. Walczak M: LC-MS/MS method for simultaneous quantification of a series of aminopropan-2-ol derivatives - application to in vivo pharmacokinetic study. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2014, DOI: 10.1080/10826076.2013.807464. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2013.807464>.

IF₂₀₁₄ = 0.565

H-4. Walczak MZ: Physicochemical profiling of new aminopropan-2-ol derivatives with β -adrenolytic activity - the significance in pharmacokinetic properties. *Pharmazie* 2013, 68(11):866-871.

IF₂₀₁₃ = 0.962

H-5. Walczak M: Binding of new aminopropan-2-ol compounds to bovine serum albumin, α_1 -acid glycoprotein and rat serum using equilibrium dialysis and LC/MS/MS. *Pharmacol Rep* 2013, 65(5):1294-1303.

IF₂₀₁₃ = 1.965

Łączny IF dla publikacji H-1 - H-5 jest równy 7.822.

Przedmiotem badań składających się na wyżej wymienione prace były trzy nowe związki, pochodne aminopropan-2-olu otrzymane w Katedrze Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej przez Zespół dr hab. Grażyny Groszek. Wszystkie badane związki zostały objęte zastrzeżeniami patentowymi^{1, 2, 3}.

Badania farmakologiczne *in vivo* wszystkich badanych związków wykonano w Pracowni Wstępnych Badań Farmakologicznych Katedry Farmakodynamiki Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.^{4, 5}

Ocenę profilu farmakokinetycznego, badania w kierunku enancjoselektywnego przebiegu procesów farmakokinetycznych, identyfikację i ustalanie budowy strukturalnej metabolitów badanych analogów, oszacowanie stopnia wydalania nerkowego, ocenę stopnia wiązania z białkami krwi oraz wyznaczenie podstawowych właściwości fizykochemicznych związków będących przedmiotem badań, przeprowadzono w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji

¹ Bednarski M, Filipek B, Groszek G, Maciąg D: Patent 195413 - „Nowa pochodna 2-aminopropanolu i jej sól” 2007.

² Groszek G, Wdowik T: „Nowy związek, pochodna alkoholoaminy i jej optycznie czynne enancjomery”, nr zgł. P - 380220 z dn. 17.07.2006.

³ Groszek G, Filipek B, Bednarski M: „Nowy związek, pochodna alkoholoaminy i jej optycznie czynne enancjomery”, nr zgł. P - 383352 z dn. 14.09.2007.

⁴ Groszek G, Bednarski M, Dybała M, Filipek B: Synthesis and adrenolytic activity of 1-(1H-indol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]propan-2-ol and its enantiomers. Part 1. *Eur J Med Chem.* 2009, 44(2):809-817.

⁵ Groszek G, Nowak-Król A, Wdowik T, Swierczynski D, Bednarski M, Otto M, Walczak M, Filipek B: Synthesis and adrenolytic activity of 1-(H-indol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamino)propan-2-ol analogs and its enantiomers. Part 2. *Eur J Med Chem.* 2009, 44(12):5103-5111.

Fizycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie oraz w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

3.2. PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ HABILITACJI

3.3. WSTĘP

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się wzrastającą liczbę chorych cierpiących z powodu schorzeń sercowo-naczyniowych, które w chwili obecnej, obok chorób nowotworowych i cukrzycy, stanowią główną przyczynę umieralności na świecie. Według danych WHO około 600 milionów osób obciążonych jest nadciśnieniem tętniczym, z których jedynie 20% jest leczonych, a prawidłową kontrolę ciśnienia tętniczego krwi uzyskuje się zaledwie u 12% pacjentów poddawanych terapii. Z tego względu w wielu ośrodkach naukowych poszukuje się nowych związków lub pochodnych leków już istniejących, które pozwoliłyby zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo terapii oraz poprawiły komfort życia pacjentów. ⁶

Leki β -adrenolityczne zaliczane są do podstawowych związków stosowanych w leczeniu chorób układu krążenia. W szczególności są one szeroko stosowane w zaburzeniach rytmu serca, w nadciśnieniu tętniczym, w chorobie niedokrwiennej serca oraz w niewydolności zastoinowej układu krążenia. W tych wszystkich chorobach ich skuteczność związana jest z zahamowaniem skutków nadmiernej stymulacji adrenergicznej, blokując selektywnie receptory β_1 (acebutolol, atenolol, betaksolol, bisoprolol, celiprolol, metoprolol, nebiwolol), receptory β_1 i β_2 (propranolol, nadolol) lub β_1/β_2 i α_1 (karwedilol, labetalol). ⁷

Na szczególną uwagę zasługują β -adrenolityki trzeciej generacji, wielofunkcyjne, hybrydowe, takie jak nebiwolol i karwedilol, które oprócz właściwości typowych dla leków sympatykolitycznych, posiadają działanie naczyniorozszerzające zależne od śródbłonkowego NO. ^{8, 9} Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że spośród kardioselektywnych leków β -adrenolitycznych, jedynie nebiwolol odwraca dysfunkcję śródbłonka u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. ¹⁰ Podobne działanie śródbłonkowe do nebiwololu wykazuje karwedilol,

⁶ Szymik M, Szyguła-Jurkiewicz B, Partyka R, Owczarek A, Spinczyk B, Chudek J, Poloński L: Three-year survival of patients with chronic systolic heart failure due to hypertension: analysis of prognostic factors. *Pol Arch Med Wewn.* 2012, 122(11):543-550.

⁷ Chłopicki S: Śródbłonkowe działanie leków β -adrenolitycznych. *Kar Dypl.* 2005, 4(10):77-83.

⁸ Altwegg LA, d'Uscio LV, Barandier C, Cosentino F, Yang Z, Lüscher TF: Nebivolol induces NO-mediated relaxations of rat small mesenteric but not of large elastic arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000, 36(3):316-320.

⁹ Cockcroft JR, Chowienzyk PJ, Brett SE, Chen CP, Dupont AG, Van Nueten L, Wooding SJ, Ritter JM: Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995, 274(3):1067-71.

¹⁰ Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation.* 2001, 104(5):511-514.

nieselektywny antagonist receptorów β -adrenergicznych oraz dodatkowo antagonist receptora α_1 -adrenergicznego, który niezależnie od działania hipotensyjnego poprawia upośledzoną czynność śródbłonna u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca.¹¹ Lek ten wykazuje również dodatkowe właściwości, takie jak hamowanie peroksydacji lipidów w komórkach mięśnia sercowego, hamowanie utleniania LDL w komórkach śródbłonna naczyniowego, czy hamowanie proliferacji komórek mięśniówki gładkiej naczyń wieńcowych, zmniejszając uwalnianie endoteliny-1.¹² Działanie takie wykazuje nie tylko związek macierzysty ale również jeden z jego metabolitów, 4'-hydroksykarwedilol.¹³

Działanie na śródbłonek nebiwololu i karwedilolu, przede wszystkim zależne od śródbłonkowego NO działanie naczyniorozszerzające - powoduje dodatkowe, korzystne skutki terapeutyczne tych leków w chorobach układu krążenia, a pojawiające się coraz liczniejsze dane kliniczne, wskazują na ich skuteczność w kierunku przywrócenia prawidłowego fenotypu śródbłonna. Z tego względu, poprawa czynności śródbłonna stała się, obok działania hipotensyjnego, ważnym celem terapeutycznym w nadciśnieniu. Pomimo odrębnego profilu działania leków β -adrenolitycznych na receptory adrenergiczne, w wielu ośrodkach poszukuje się nowych związków, również obdarzonych działaniem śródbłonkowym, odwracających dysfunkcję układu sercowo-naczyniowego. Efektem podejmowanych działań są badania związków różniących się między sobą, zarówno właściwościami farmakologicznymi, jak i profilem farmakokinetycznym.¹⁴

Karwedilol jest związkiem o budowie chiralnej, stosowanym w leczeniu w formie racemicznej, przy czym wobec receptorów β_1 -adrenergicznych aktywny farmakologicznie jest enancjomer (-)-(S)-karwedilolu, podczas gdy obydwa enancjomery wykazują taką samą aktywność antagonistyczną wobec receptorów α_1 -adrenergicznych.¹⁵

W przypadku karwedilolu wykazano enancjoselektywny charakter procesów farmakokinetycznych. Lek ten w organizmie ulega stereoselektywnemu efektowi pierwszego przejścia, w wyniku czego ilość związku, jaka osiąga krążenie ogólne, w przypadku eutomeru (-)-(S)-karwedilolu jest prawie dwukrotnie niższa w porównaniu do jego distomeru.

¹¹ Matsuda Y, Akita H, Terashima M, Shiga N, Kanazawa K, Yokoyama M: Carvedilol improves endothelium-dependent dilatation in patients with coronary artery disease. *Am Heart J.* 2000, 140(5):753-759.

¹² Fahlbusch S, Tsikas D, Mehls Ch, Gutzki F, Boger R, Frolich J, Stichtenoth D: Effects of carvedilol on oxidative stress in human endothelial cells and healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004, 60(2):83-88.

¹³ Chen J, Huang C, Zhang B, Huang Q, Chen J, Xu L: The effects of carvedilol on cardiac structural remodeling: The role of endogenous nitric oxide in the activity of carvedilol. *Mol Med Rep.* 2013, 7(4):1155-1158.

¹⁴ Kossakowski J, Wojciechowska A: Synthesis of oxiran-2-ylmethyl and oxiran-2-ylmethoxy derivatives of some 4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5-diones as potential beta-adrenolytics. *Acta Pol Pharm.* 2006, 63(6):485-490.

¹⁵ Nichols AJ, Sulpizio AC, Ashton DJ, Hieble JP, Ruffolo RR Jr: The interaction of the enantiomers of carvedilol with alpha 1- and beta 1-adrenoceptors. *Chirality.* 1989, 1(4):265-70.

W konsekwencji, biodostępność u zdrowych ochotników (+)-R-karwedilolu jest około dwukrotnie wyższa w porównaniu do (-)-S-karwedilolu.^{16, 17}

Stereoselektywny charakter procesów farmakodynamicznych i farmakokinetycznych leków chiralnych oraz konsekwencje terapeutyczne tego zjawiska, spowodowały, że w przypadku tego typu związków, prowadzenie badań farmakodynamicznych, farmakokinetycznych oraz toksykokinetycznych, wskazane jest w początkowej fazie badań dla każdego z enancjomerów.¹⁸ Brak tego typu danych w odniesieniu do farmakokinetyki związków będących w ramach niniejszej pracy habilitacyjnej przedmiotem badań, stanowi główne uzasadnienie celowości ich podjęcia.

Za istnienie międzyosobniczych różnic obserwowanych m.in. w dyspozycji leków β -adrenolitycznych i wpływających istotnie na efekt farmakologiczny tej grupy związków odpowiada wiele czynników, spośród których na szczególną uwagę zasługuje różna aktywność odmian polimorficznych izoenzymów cytochromu P450 metabolizujących te leki, uwarunkowana genetycznie, polimorfizm transporterów leków oraz białek krwi wiążących te leki.¹⁹

Wynikiem poszukiwań w tej grupie leków aktywnych pochodnych aminopropan-2-olu są związki o akronimach: 2F109 w postaci racemicznej oraz jego izomery optyczne (-)-(S)-2F109 i (+)-(R)-2F109, TWo8 w formie racemicznej oraz jego izomery optyczne (-)-(S)-TWO8 i (+)-(R)-TWO8, jak również racemiczny ANBL oraz jego izomery optyczne (-)-(S)-ANBL i (+)-(R)-ANBL - otrzymane (jak wspomniano wcześniej) w Katedrze Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

Związek 2F109 posiada fragmenty struktury karwedilolu i pindololu połączone ugrupowaniem aminopropanolowym. Analogi ANBL i TWo8 są pochodnymi związku 2F109, do cząsteczki którego wprowadzono ugrupowanie metoksyłowe, odpowiednio w pozycję 5 lub 7 fragmentu indolowego (Ryc. 1).

Istotnym uzasadnieniem podjęcia badań farmakokinetycznych w obrębie tej grupy związków uwzględniających ich chiralną budowę, stanowią wyniki badań farmakodynamicznych, w których wykazano, że wszystkie badane substancje wykazują aktywność α_1 - i β_1 -adrenolityczną, działanie antyarytmiczne w modelu arytmii adrenalinowej, działanie hipotensyjne, jak również stwierdzono enancjoselektywny charakter działania hipotensyjnego i antyarytmicznego tych związków.^{20, 21}

¹⁶ Hanioka N, Tanaka S, Moriguchi Y, Narimatsu S: Stereoselective glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Pharmacology*. 2012, 90(3-4):117-124.

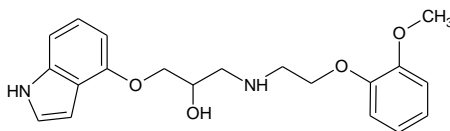
¹⁷ Honda M, Nozawa T, Igarashi N, Inoue H, Arakawa R, Ogura Y, Okabe H, Taguchi M, Hashimoto Y: Effect of CYP2D6*10 on the pharmacokinetics of R- and S-carvedilol in healthy Japanese volunteers. *Biol Pharm Bull*. 2005, 28(8):1476-1479.

¹⁸ FDA guidance drugs. Development of new stereoisomeric drugs: <http://www.fda.gov/drugs/guidance/complianceregulatoryinformation/guidances/ucm122883.htm>, 1992.

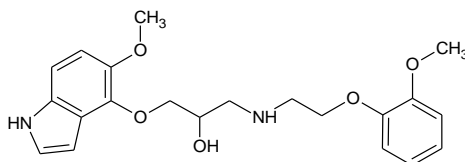
¹⁹ Chan SW, Hu M, Tomlinson B: The pharmacogenetics of β -adrenergic receptor antagonists in the treatment of hypertension and heart failure. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012, 8(7):767-790.

²⁰ Groszek G, Bednarski M, Dybała M, Filipek B: *Op. cit.*

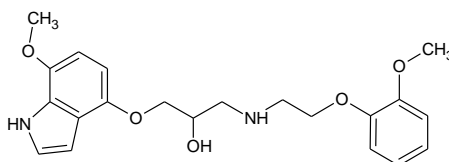
²¹ Groszek G, Nowak-Król A, Wdowik T, Swierczynski D, Bednarski M, Otto M, Walczak M, Filipek B: *Op. cit.*



2F109 - (2RS)-(1-(1*H*-indol-4-iloxy)-3-(2-(2-metoksyfenoksy)etyloamino)propan-2-ol



ANBL - (2RS)-(1-(5-metoksy-1*H*-indol-4-iloxy)-3-(2-(2-metoksyfenoksy)etyloamino)propan-2-ol



TWo8 - (2RS)-(1-(7-metoksy-1*H*-indol-4-iloxy)-3-(2-(2-metoksyfenoksy)etyloamino)propan-2-ol

Rycina 1. Wzory strukturalne badanych związków.

Z przeprowadzonych badań wynika, że dla związku racemicznego 2F109 wartość K_i w odniesieniu do receptorów α_1 -adrenergicznych wynosiła 89.8 ± 9.5 nM, do receptorów α_2 -adrenergicznych była równa 1.4 ± 0.4 μ M, natomiast do receptorów β_1 -adrenergicznych wynosiła 3 ± 0.6 nM. Wartości K_i dla karwedilolu jako leku odniesienia wynosiły odpowiednio do receptorów α_1 , α_2 i β_1 -adrenergicznych 2.2 ± 0.2 nM, 3.4 ± 0.9 μ M oraz 0.81 ± 0.06 nM. Enancjomery związku 2F109 blokowały receptory α - i β -adrenergiczne w sposób enancjoselektywny. Większe powinowactwo wykazywał enancjomer (-)-(S)-2F109 dla którego wyznaczona wartość K_i w odniesieniu do receptorów α_1 -adrenergicznych wynosiła 56.7 ± 2.1 nM w porównaniu do izomeru (+)-(R)-2F109, dla którego była równa 88.3 ± 5.8 nM. Natomiast w przypadku receptorów β_1 -adrenergicznych wartość K_i wynosiła 2 ± 0.08 nM oraz 143 ± 16.5 nM. Silniejsze powinowactwo do receptorów α_2 -adrenergicznych wykazywał izomer (-)-(S)-2F109 ($K_i = 365.5 \pm 28.2$ nM) w porównaniu do enancjomeru (+)-(R)-2F109 ($K_i = 467.3 \pm 32.3$). Z porównania wartości ED_{50} w modelu arytmii adrenaliny dla związku racemicznego i jego enancjomerów wynika, że silniejsze właściwości przeciwarytmiczne posiadał enancjomer (-)-(S)-2F109 ($ED_{50} = 0.059$ mg/kg), enancjomer (+)-(R)-2F109 działał słabiej ($ED_{50} = 0.43$ mg/kg). Związek racemiczny 2F109, podany dożylnie, działał hipotensyjnie w dawce 0.25 - 1 mg/kg i podobnie jak w modelu

arytmii adrenalinowej, silniejsze działanie wykazywał enancjomer (-)-(S)-2F109 (0.0625 mg/kg) w porównaniu do izomeru (+)-(R)-2F109 (1 mg/kg).²²

Związek racemiczny ANBL wykazywał, podobnie jak 2F109, słabsze powinowactwo do receptorów α_1 , α_2 i β_1 -adrenergicznych w porównaniu do karwedilolu. Stała K_i była równa 21.1 ± 1.7 nM, 56.9 ± 0.7 nM oraz 1600 ± 200 nM - odpowiednio do receptorów α_1 , α_2 i β_1 -adrenergicznych. Podobnie jak poprzedni analog, związek ANBL blokował receptory adrenergiczne w sposób enancjoselektywny. Enancjomer (+)-(R)-ANBL wykazywał prawie 4-krotnie większe powinowactwo do receptorów α_1 -adrenergicznych, w porównaniu do izomeru (-)-(S)-ANBL, a stałe K_i były równe odpowiednio 11.3 ± 0.3 nM i 45.8 ± 6.8 nM. W mniejszym stopniu enancjomery związku ANBL wiązały się z receptorami β_1 adrenergicznymi, przy czym silniej z tym receptorem wiązał się enancjomer (-)-(S)-ANBL ($K_i = 886.7 \pm 46.9$ nM) w porównaniu do (+)-(R)-ANBL ($K_i = 3400 \pm 600$ nM). Związek racemiczny ANBL wykazywał działanie przeciwarystmiczne w modelu arytmii adrenalinowej ($ED_{50} = 0.38$ mg/kg). Skuteczność przeciwarystmiczna obu form optycznych była porównywalna, przy czym około 2-krotnie silniejsze działanie wykazywał enancjomer (+)-(R)-ANBL ($ED_{50} = 0.16$ mg/kg) w porównaniu do (-)-(S)-ANBL ($ED_{50} = 0.3$ mg/kg). Związek racemiczny ANBL i jego enancjomery podane dożylnie w dawkach 0.125 - 1 mg/kg istotnie obniżały ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi.¹⁹

Związek racemiczny TWo8 wykazywał słabsze powinowactwo do receptorów α_1 , α_2 i β_1 adrenergicznych w porównaniu do karwedilolu, stałe K_i były odpowiednio równe 75.8 ± 2.7 nM, 180.8 ± 3.7 nM oraz 125 ± 5.2 nM. Wzorem pozostałych analogów, związek TWo8 blokował receptory adrenergiczne w sposób enancjoselektywny. Enancjomer (-)-(S)-TWo8 wykazywał prawie 10-krotnie większe powinowactwo do receptorów β_1 -adrenergicznych ($K_i = 59.3 \pm 5.8$ nM) w porównaniu do enancjomeru (+)-(R)-TWo8 ($K_i = 530.6 \pm 24.8$ nM). Enancjomer (+)-(R)-TWo8 około 2.5 krotnie silniej wiązał się z receptorami α_1 -adrenergicznymi ($K_i = 60.9 \pm 1.6$ nM) w porównaniu do jego antypody optycznej ($K_i = 168.8 \pm 7.2$ nM). Podobnie enancjomer (+)-(R)-TWo8 silniej wiązał się z receptorem α_2 -adrenergicznym ($K_i = 108.8 \pm 2.3$ nM) w porównaniu do izomeru (-)-(S)-TWo8 ($K_i = 277.2 \pm 13.2$). Związek racemiczny TWo8 wykazywał również działanie przeciwarystmiczne w modelu arytmii adrenalinowej. Wartość $ED_{50} = 0.45$ mg/kg dla związku TWo8 była dwukrotnie niższa w porównaniu do propranololu. Wyznaczone wartości ED_{50} dla działania przeciwarystmicznego (-)-(S)-TWo8 oraz (+)-(R)-TWo8 wynosiły odpowiednio 0.53 mg/kg oraz 0.38 mg/kg. Związek racemiczny TWo8 i jego enancjomery podane dożylnie w dawkach 0.25 - 1 mg/kg istotnie obniżały ciśnienie skurczowe i rozkurczowe krwi.²³

Podsumowując, badane analogi wykazywały słabsze działanie przeciwarystmiczne i hipotensyjne w porównaniu do karwedilolu, natomiast wszystkie badane pochodne okazały się bardziej aktywne w porównaniu do propranololu.

²² Groszek G, Bednarski M, Dybała M., Filipek B: *Op. cit.*

²³ Groszek G, Nowak-Król A, Wdowik T, Swierczynski D, Bednarski M, Otto M, Walczak M, Filipek B: *Op. cit.*

Podstawowym celem badań farmakokinetycznych jest określenie zależności pomiędzy dawką związku, jego stężeniem w pobliżu receptora (biofазie), a wywoływanym przez ten związek efektem farmakologicznym. O tym jak szybko i w jakiej ilości lek pojawia się w miejscu działania oraz jak długo tam przebywa, decyduje nie tylko podana dawka, ale także szereg procesów związanych z jego przemieszczaniem się w organizmie, obejmującym wchłanianie leku z miejsca podania do krążenia ogólnego, dystrybucję w płynach i tkankach organizmu oraz eliminację na drodze biotransformacji i wydalania. Poznanie mechanizmu tych procesów, a także ich ocena ilościowa oraz w przypadku leków chiralnych, badanie enancjoselektywnego przebiegu tych procesów, stanowią przedmiot badań farmakokinetycznych.²⁴

Do istotnych parametrów, których ocena jest niezbędna w badaniach przedklinicznych, należy potwierdzenie liniowości procesów farmakokinetycznych, które wiąże się z oceną możliwości zwiększania dawek danego związku, zastosowanego w celach terapeutycznych, zapewniającego proporcjonalny wzrost stężenia leku we krwi. Ponadto, istotne znaczenie w ocenie profilu farmakokinetycznego, ma poznanie stopnia wiązania leku z białkami krwi, które wpływa na zależność pomiędzy dawką związku, jego stężeniem w miejscu działania, a wywoływanym efektem farmakologicznym.²⁵

W świetle tych danych rodzi się pytanie - w jakim stopniu obserwowane różnice w aktywności postaci racemicznych oraz enancjomerów badanych związków, zależą od ich enancjoselektywnej farmakodynamiki i farmakokinetyki.

W ostatnich latach, dynamicznie rozwijającą się techniką analityczną stosowaną również na obszarze badań farmakokinetycznych, jest połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową (LC/MS/MS). Z tego względu, oznaczenia bioanalityczne wszystkich badanych w niniejszej pracy związków, wykonano z zastosowaniem tej techniki. Wprowadzenie techniki LC/MS/MS pozwoliło na zwiększenie selektywności, specyficzności i czułości analiz, umożliwiając równoczesne oznaczanie wielu związków w jednej próbce. Rozwiązanie takie stało się niezmiernie ważne do szybkiej, lecz zarazem rzetelnej selekcji nowych związków, kandydatów na leki innowacyjne w kolejnych etapach ich rozwoju. Technika LC/MS/MS dzięki możliwości detekcji jonów macierzystych i potomnych oraz oznaczania ich w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji, pozwala również na identyfikację i określenie budowy strukturalnej metabolitów związków macierzystych, co stało się możliwe po wprowadzeniu wysoko rozdzielczych spektrometrów mas, pozwalających na dokładny pomiar masy analitu. Czułość spektrometru masowego, przewyższająca inne detektory, umożliwia pomiar niskich stężeń leku,

²⁴ Patel K, Kirkpatrick CM: Pharmacokinetic concepts revisited-basic and applied. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011, 12(12):1983-1990.

²⁵ Bohnert T, Gan LS: Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci.* 2013, 102(9):2953-2994.

co ma szczególne znaczenie w przypadku analizy stężeń wolnej frakcji enancjomerów badanych związków.²⁶

3.4. CEL BADAŃ

Znaczenie leków β -adrenolitycznych w terapii schorzeń sercowo-naczyniowych sprawia, że nieustannie poszukuje się nowych związków o coraz korzystniejszych właściwościach terapeutycznych. Poszukiwanie nowych leków jest procesem złożonym, czasochłonnym i bardzo kosztownym.²⁷ Wraz z dynamicznym rozwojem chemii kombinatorycznej i wprowadzeniem wysokoprzepustowych badań przesiewowych aktywności biologicznej związków otrzymuje się pochodne o bardzo zróżnicowanych właściwościach. Otrzymywane są związki o większej masie cząsteczkowej, zwiększonej lipofilowości i w konsekwencji gorszej rozpuszczalności w wodzie.²⁸ Obecnie, coraz częściej podkreśla się, że sukces w zakresie wprowadzania nowego leku, zależy od kombinacji takich czynników jak rozpuszczalność, zdolność przenikania przez błony biologiczne, stabilność metaboliczna oraz rodzaj transportera - określanych jako „drug-like property”.²⁹ Niekorzystne parametry fizykochemiczne związku i w konsekwencji niekorzystny profil farmakokinetyczny, stanowią główną przyczynę odrzucenia kandydata na lek. Z tego powodu dokłada się wielu starań, aby parametry fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne związku mogły być określane na jak najwcześniejszym etapie badań nad nowym lekiem, najlepiej zanim kandydat na lek zostanie zakwalifikowany do etapu optymalizacji struktury wiodącej. Znajomość profilu fizykochemicznego - rozpuszczalności, lipofilowości, zdolności do jonizacji oraz przenikania przez błony biologiczne, pozwala na wstępne oszacowanie profilu farmakokinetycznego związku chemicznego. W ten sposób, do fazy rozwoju leku wprowadza się jedynie związki o dużej sile działania i odpowiednich właściwościach farmakokinetycznych.³⁰

²⁶ Xia YQ, Lau J, Olah T, Jemal M: Targeted quantitative bioanalysis in plasma using liquid chromatography/high-resolution accurate mass spectrometry: an evaluation of global selectivity as a function of mass resolving power and extraction window, with comparison of centroid and profile modes. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011, 25(19):2863-2878.

²⁷ Collier R: Drug development cost estimates hard to swallow. *CMAJ*, 2009, 180(3):279-280.

²⁸ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001, 46(1-3):3-26.

²⁹ Di L, Kerns EH, Carter GT: Drug-like property concepts in pharmaceutical design. *Curr Pharm Des.* 2009, 15(19):2184-2194.

³⁰ Henchoz Y, Bard B, Guillarme D, Carrupt PA, Veuthey JL, Martel S: Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. *Anal Bioanal Chem.* 2009, 394(3):707-729.

W związku z rozwojem stereochemii, dla związków chiralnych zaleca się prowadzenie badań aktywności biologicznej, ocenę farmakokinetyczną i toksykologiczną dla każdego z enancjomerów. Wymogiem FDA ³¹ jest określenie, dla każdego z izomerów optycznych, wszystkich etapów losu leku w organizmie (stopnia inwersji chiralnej, wchłaniania, dystrybucji, biotransformacji, wydalania). Istotną przeszkodą w prowadzeniu badań nad lekami chiralnymi są duże różnice międzygatunkowe profilu farmakokinetycznego, czego konsekwencją jest utrudnione przewidywanie farmakokinetyki u ludzi, na podstawie danych od zwierząt.

Z uwagi na fakt, że związki będące przedmiotem badań są pochodnymi karwedilolu, dla którego wykazano stereoselektywny charakter działania na receptory β_1 -adrenergiczne oraz enancjoselektywny profil działania farmakokinetycznego, z tego względu wymagane jest dla nowych związków, pochodnych tej struktury wykonanie badań aktywności receptorowej oraz oceny przebiegu procesów farmakokinetycznych, zarówno dla form racemicznych, jak również dla każdego z izomerów optycznych badanych analogów.

W świetle powyższych danych celem badań obejmujących habilitację jest:

1. Opracowanie oryginalnych metod ilościowego oznaczania wszystkich badanych związków (2F109, ANBL, TWo8) w matrycach biologicznych szczura (surowica, mocz, kał, homogenaty tkankowe, mikrosomy wątroby), zarówno w ich postaci racemicznej, jak i pojedynczych enancjomerów, z zastosowaniem techniki LC/MS/MS (publikacje H-1, H-2, H-3).
2. Ocena profilu farmakokinetycznego w/w badanych związków w aspekcie achiralnego przebiegu procesów ich wchłaniania, dystrybucji i eliminacji w organizmie szczura po jednorazowym podaniu dożylnym i dożołądkowym każdego z badanych związków oraz wyznaczenie ich bezwzględnej dostępności biologicznej (publikacja H-3).
3. Ocena enancjoselektywnej dystrybucji badanych substancji w organizmie szczura po jednorazowym podaniu dożylnym i dożołądkowym każdego z badanych związków (publikacje H-1, H-2).
4. Poszukiwanie ścieżek metabolizmu badanych analogów w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Identyfikacja i ustalanie budowy strukturalnej prawdopodobnych metabolitów, z zastosowaniem wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Względna analiza ilościowa metabolitów badanych analogów w surowicy, moczu, kale, wybranych tkankach oraz mikrosomach wątroby szczura. Badanie wydalania nerkowego związków będących przedmiotem badań (praca w trakcie recenzji).
5. Wyznaczanie podstawowych właściwości fizykochemicznych (pK_a , $\log P$, $\log D$) badanych związków oraz ocena zależności pomiędzy tymi parametrami a stopniem wiązania z białkami krwi, badanych analogów (publikacja H-4).

³¹ FDA guidance drugs. Development of new stereoisomeric drugs: *Op. cit.*

6. Analiza wolnej, aktywnej farmakologicznie frakcji badanych związków i ich enancjomerów oraz wyznaczenie parametrów wiązania z białkami krwi (albumina i kwaśna α_1 -glikoproteina) w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* w surowicy szczura (publikacja H-5).

Podsumowując, celem pracy była ocena przebiegu procesów farmakokinetycznych nowych związków, analogów karwedilolu, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska enancjoselektywności, obserwowanego zarówno w aspekcie działania farmakodynamicznego leków β -adrenolitycznych jak i znajdującego odzwierciedlenie w ich działaniu terapeutycznym. Z tego względu ocena nowych związków w aspekcie ich struktury przestrzennej, pozwala na właściwą interpretację ich profilu farmakodynamicznego, farmakokinetycznego i klinicznego.

Przeprowadzono również badania w kierunku identyfikacji metabolitów analogów karwedilolu, poszukiwano ścieżek ich metabolizmu oraz dróg ich wydalania. Badania te podyktowane były faktem udowodnionej aktywności farmakologicznej metabolitów tej grupy leków, niejednokrotnie przewyższającej aktywność związku macierzystego.

Badania w kierunku stereoselektywnego wiązania analogów karwedilolu z białkami krwi pomagają w wyjaśnieniu przyczyny zjawiska enancjoselektywności, mogącego wynikać z odmiennego oddziaływania izomerów optycznych z białkami krwi.

3.5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

3.5.1. Opracowanie i walidacja metod bioanalitycznych

Ocenę farmakokinetyki związków stanowiących przedmiot badania prowadzono z zastosowaniem wysoko selektywnej i przepustowej techniki LC/ESI-MS/MS. Do badań zastosowano chromatograf cieczowy Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy) połączony ze spektrometrem mas API 2000 (Applied Biosystems MDX SCIEX, Concorde, Ontario, Kanada).

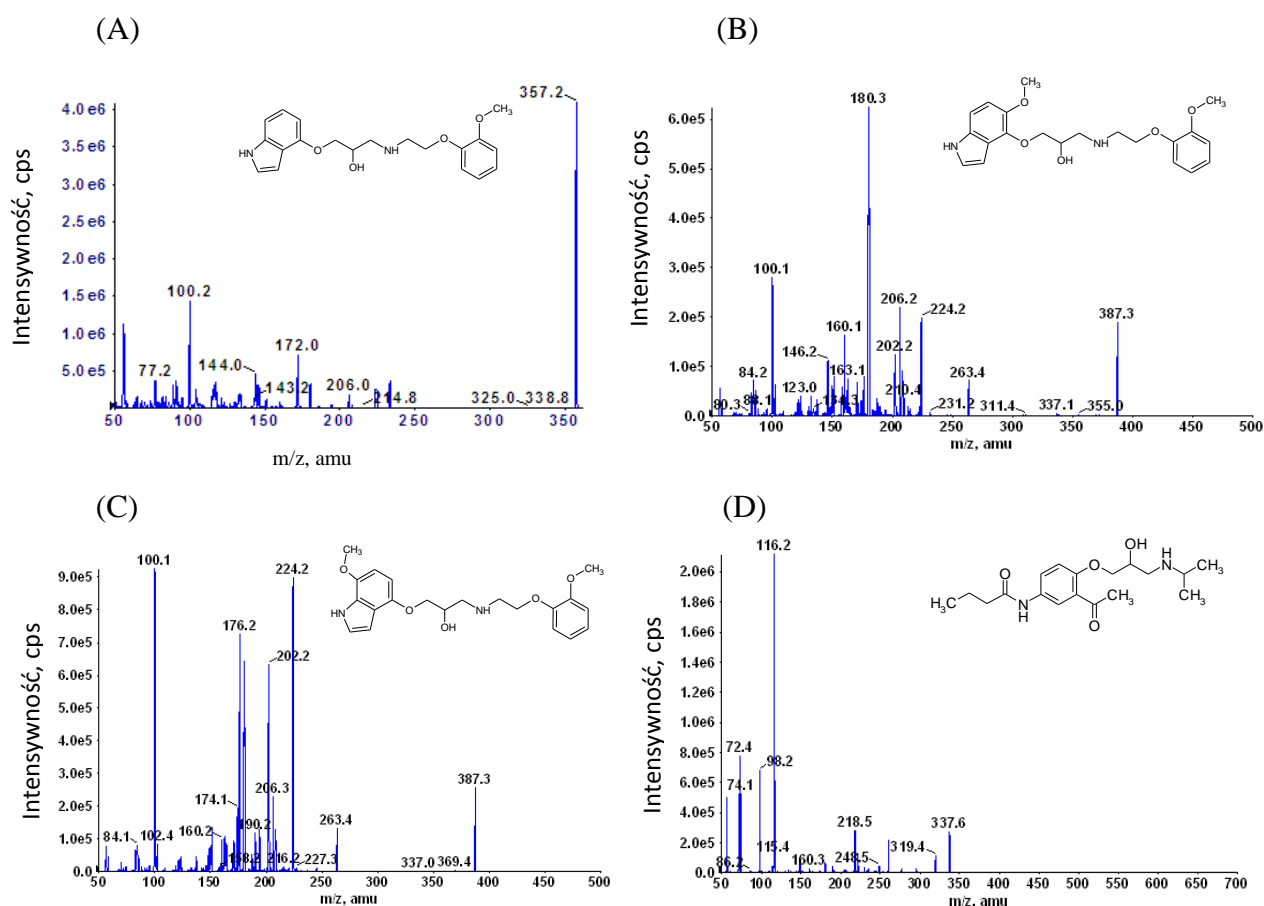
Do oznaczenia stężeń wszystkich badanych związków opracowano i zwalidowano zgodnie z wymogami GLP^{32, 33} odpowiednie metody analityczne dla achiralnych [H-3] i chiralnych pochodnych [H-1, H-2, Groszek i wsp. 2009] w matrycach biologicznych szczura: surowicy, moczu, homogenatach wątroby, nerek, mózgu, serca, jelit, płuc, śledziony, kału oraz mikrosomów wątroby.

³² Guideline on Bioanalytical Methods Validation, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA), 21 July 2011, coming into effect on 1 February 2012.

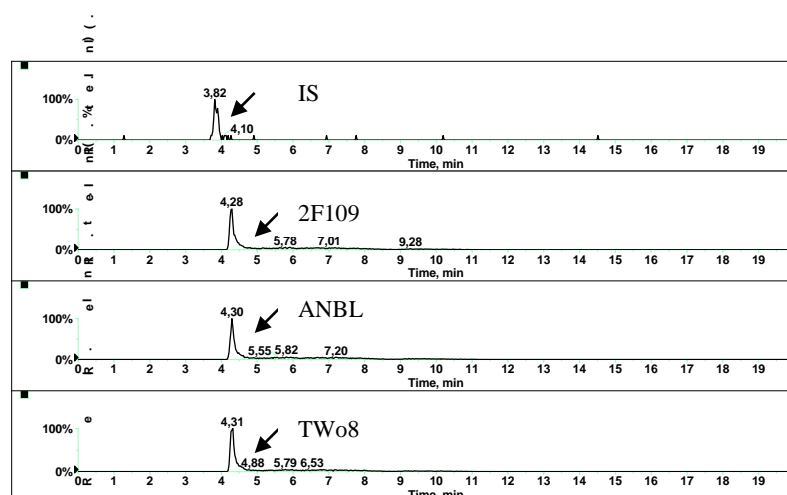
³³ Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May 2001.

W pierwszym etapie badań opracowano i zwalidowano metodę jednoczesnego oznaczania związków racemicznych 2F109, ANBL oraz TWo8 we wspomnianych powyżej matrycach. Analizę ilościową wszystkich badanych związków wykonano w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji (SRM), pozwalającej na jednoczesne oznaczanie wielu związków w jednej próbce. Wykorzystano wartości stosunku intensywności jonu macierzystego do potomnego wynoszące odpowiednio dla związku 2F109: m/z 357.3 \rightarrow 100.1, dla związku ANBL: m/z 387.3 \rightarrow 180.3, dla związku TWo8: m/z 387.3 \rightarrow 224.3 oraz dla acebutololu (standard wewnętrzny): m/z 337.5 \rightarrow 116.2. Maksymalną czułość oznaczeń uzyskano w trybie dodatniej jonizacji (Ryc. 2).

Pełny i poprawny rozdział chromatograficzny związków 2F109, ANBL oraz TWo8 uzyskano na kolumnie XBridge C18 MS (300 mm x 2.1 mm, 3 μ m, Waters, Irlandia). Jako fazę ruchomą zastosowano układ acetonitrylu i wody z dodatkiem 0.01% kwasu mrówkowego, w elucji gradientowej, z szybkością przepływu 300 μ L/min (Ryc. 3).



Rycina 2. Widma fragmentacyjne MS/MS 2F109 (A), ANBL (B), TWo8 (C) oraz AC (D) wykonane w jonizacji dodatniej.



Rycina 3. Chromatogramy masowe próbki surowicy szczura do której dodano 2F109, ANBL, TWo8 oraz AC o stężeniu 500 ng/mL.

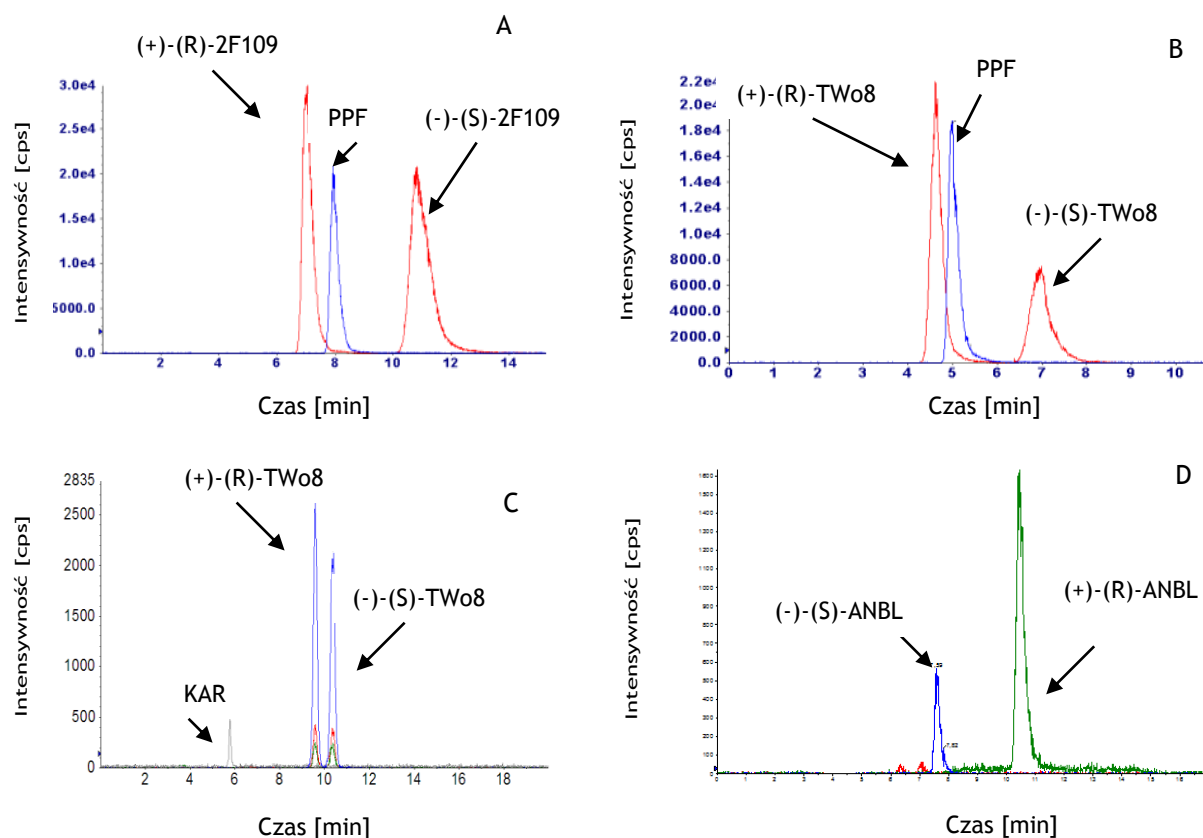
Liniowość metody wyznaczono w zakresie 2-2000 ng/mL. Granica oznaczalności (LLOQ) dla wszystkich badanych związków wynosiła 2 ± 0.5 ng/mL ($S/N = 10$), granica wykrywalności (LLOD) była równa 0.5 ng/mL ($S/N = 3$). Opracowana metoda jednoczesnego oznaczania trzech pochodnych aminopropan-2-olu wykazuje zadawalającą wewnątrz- i między-seryjną precyzję oznaczeń, która dla związku ANBL była równa 7.2 - 11.4%, dla oznaczeń TWo8 wynosiła 6.3 - 14.2%, dla związku 2F109 była równa 8.4 - 13.2%. Dokładność metody dla związku ANBL była równa -5.8 - 4.8%, dla związku TWo8 wynosiła 3.4 - 9.3%, dla związku 2F109 wynosiła -3.6 - 7.3%. Krótko i długo terminowe badania stabilności substancji potwierdziły trwałość związków w czasie wykonywania badań bioanalitycznych i przeprowadzania eksperymentów farmakokinetycznych. W procesie walidacji metody z zastosowaniem techniki LC/ESI-MS/MS zbadano wpływ matrycy na stopień jonizacji związków, poprzez ocenę „względnego” i „bezwzględnego” efektu matrycy. Nie wykazano wpływu „względnego” efektu matrycy w stopniu mogącym mieć znaczenie dla dokładności oznaczeń; współczynniki zmienności mieściły się w granicach norm wyznaczonych dla walidacji metod bioanalitycznych. Przeprowadzona procedura walidacji pozwala na stosowanie tej metody do rutynowego oznaczania badanych substancji w matrycach biologicznych szczura [H-3].

Ponieważ badane związki mają budowę chiralną, z tego względu do enancjoselektywnej oceny ich profilu farmakokinetycznego opracowano i zwalidowano cztery niezależne metody ilościowego oznaczania enancjomerów badanych analogów w surowicy i homogenatach wybranych tkanek szczura, z zastosowaniem techniki LC/ESI-MS/MS (Ryc. 4).

Enancjomery związku 2F109 oznaczano bezpośrednio na kolumnie chiralnej Chiralcel OD-RH (150 x 4.6 mm, 5 μ m, Daicel Chemical Industries, Tokio, Japonia). Rozdział wykonano w warunkach izokratycznych, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu i wody (35:65 v/v) z dodatkiem 0.01% kwasu mrówkowego, z szybkością przepływu fazy ruchomej 500 μ L/min.

Enancjomery oznaczano w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji, skanując dwie pary mas: dla związku 2F109 m/z 357.3 \rightarrow 100.1 oraz dla standardu wewnętrznego (propentofilina) m/z 307.2 \rightarrow 209. W opisanych warunkach uzyskano zadawalający rozdział enancjomerów związku 2F109 (współczynnik rozdzielania $R_s = 5.5$), unikając interferencji z pochodzącymi z próbek endogennymi składnikami matrycy biologicznej. Czasy retencji izomerów związku 2F109 wynosiły 7.2 min i 11.6 min, odpowiednio dla izomerów (+)-R-2F109 i (-)-S-2F109 oraz 8.1 min dla PPF (Ryc. 4A). Granica wykrywalności dla obu enancjomerów 2F109 była równa 1.25 ng/mL ($S/N=3$), natomiast granica ich oznaczalności w surowicy wynosiła 2.5 ± 0.5 ng/mL.

Opracowana metoda cechowała się akceptowaną dla metod bioanalitycznych precyzją i dokładnością, badaną zarówno w jednym dniu, jak i w różnych dniach. Precyzja między-seryjna wynosiła 3.6 - 12%, a dokładność była równa 89.1 - 106.2%. Podobnie jak w przypadku metody achiralnej, w badaniu oceniono „względny” i „bezwzględny” wpływ matrycy na stopień jonizacji 2F109. W badaniu tym nie wykazano obecności „względnego” efektu matrycy, w stopniu mogącym mieć wpływ na dokładność oznaczenia. Przeprowadzona procedura walidacji umożliwia stosowanie tej metody do rutynowego oznaczania enancjomerów związku 2F109 w surowicy szczura [H-1]. Proces walidacji metody oznaczania enancjomerów związku 2F109 wykonano również w homogenatach tkanki wątrobowej, płuc, nerek, serca, mózgu i jelit.



Rycina 4. Przykładowe chromatogramy masowe enancjomerów 2F109 (A), TWo8 (B i C) oraz ANBL (D) w surowicy szczura wykonane w trybie SRM.

W przypadku oznaczania enancjomerów związku TWo8, opracowano dwie, niezależne metody z zastosowaniem techniki LC/ESI-MS/MS. W pierwszej metodzie, rozdział enancjomerów wykonano bezpośrednio na kolumnie Chiralpak AD (10 μ m, 250 x 4.6 mm, Daicel Chemical Industries, Tokio, Japonia). Analizy przeprowadzono w warunkach gradientowych, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę etanolu i heksanu z dodatkiem 0.1% octanu amonu, z szybkością przepływu fazy ruchomej 1 mL/min. W opracowanych warunkach rozdziału uzyskano stosunkowo krótkie czasy retencji oznaczanych enancjomerów, wynoszące 4.6 min oraz 7 min, odpowiednio dla (+)-R-TWo8 oraz (-)-S-TWo8 (Ryc. 4B).

Metodę zastosowano do oceny czystości enancjomerycznej izomerów związku TWo8, która wynosiła 99% dla (+)-R-TWo8 oraz 99.9% dla (-)-S-TWo8. Metodę cechowała zadawalająca precyzja (5.7 - 11.6%) i dokładność (88.3 - 112.7%), jednak czułość metody okazała się zbyt niska (50 ± 4.2 ng/mL), niewystarczająca na potrzeby badań farmakokinetycznych [Groszek i wsp. 2009].

Z tego względu, do enancjoselektywnej oceny profilu farmakokinetycznego TWo8 opracowano metodę pośrednią polegającą na derywatywacji izomerów optycznych badanej substancji do odpowiednich diastereoizomerów. Jako odczynnik derywatyżujący zastosowano izotiocyjanian 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -glukopiranozyli (GITC), który wiąże się z azotem drugorzędowej aminy w łańcuchu aminopropanolowym, tworząc pochodną tiomocznikową. Do rozdziału diastereoizomerów związku TWo8 zastosowano kolumnę Aquasil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, Thermo Hypersil Keystone, Polygen, Horsens, Dania). Rozdział prowadzono w warunkach izokratycznych, stosując jako fazę ruchomą acetonitryl i wodę, zmieszane w stosunku 60:40 z dodatkiem 0.005% kwasu trifluorooctowego, z szybkością przepływu fazy ruchomej 1 mL/min. Analizę ilościową prowadzono w trybie śledzenia wybranych reakcji fragmentacji, skanując masy m/z 776.4 \rightarrow 387.2 dla diastereoizomerów TWo8 oraz m/z 237.2 \rightarrow 194.4 dla karbamazepiny (standard wewnętrzny). Diastereoizomery eluowały w czasach retencji 9.5 min oraz 10.4 min, odpowiednio dla (+)-R-TWo8 oraz (-)-S-TWo8, przy współczynniku rozdzielania równym 2.4 (Ryc. 4C). Walidację metody przeprowadzono w surowicy oraz homogenatach wątroby, płuc, nerek, serca, jelit, mózgu i śledzionie szczura. Liniowość metody badano w zakresie stężeń 5-1000 ng/mL dla każdego z diastereoizomerów, uzyskując współczynniki determinacji $R^2 \geq 0.956$ dla (-)-S-TWo8 oraz $R^2 \geq 0.971$ dla (+)-R-TWo8. Granica wykrywalności dla obu diastereoizomerów była równa 1 ng/mL (S/N=3), granica oznaczalności wynosiła 5 ± 0.4 ng/mL zarówno dla (-)-S-TWo8 jak i (+)-R-TWo8. Opracowana metoda cechowała się wymaganą dla metod bioanalitycznych precyzją i dokładnością, wyznaczoną zarówno w jednym dniu, jak i w różnych dniach. Precyzja między-seryjna była równa 2.1 - 14.9% dla (-)-S-TWo8 i 1.3-14.8% dla (+)-R-TWo8, dokładność metody wynosiła 86 - 114% dla (-)-S-TWo8 oraz 91-111% dla (+)-R-TWo8. Krótko i długoterminowe badania stabilności wykazały, że diastereoizomery analogu TWo8 były stabilne w czasie całego procesu przeprowadzania badań bioanalitycznych [H-2].

Do stereoselektywnej oceny farmakokinetyki związku ANBL opracowano i zwalidowano metodę umożliwiającą bezpośrednie oznaczanie tego analogu w surowicy i homogenatach

wybranych tkanek szczura. Enancjomery związku ANBL oznaczano na kolumnie chiralnej Chiralcel OD-RH (5 μ m, 150 x 4.6 mm I.D., Daicel Chemical Industries, Tokio, Japonia). Jako fazę ruchomą zastosowano układ metanolu i wody z dodatkiem 0.1% octanu amonu, z szybkością przepływu fazy ruchomej 1 mL/min. W ustalonych warunkach rozdzielono enancjomery badanego analogu w czasach retencji wynoszących odpowiednio 7.9 min oraz 11.6 min (Ryc. 4D). Metodę zastosowano również do oceny czystości enancjomerycznej badanego analogu, która wynosiła 99% dla (+)-(R)-ANBL oraz 99.9% dla (-)-(S)-ANBL. Metoda wykazywała zadawalającą precyzję 8.4 - 14.7% dla (-)-(S)-ANBL oraz 7.5 - 13.9% dla (+)-(R)-ANBL, dokładność metody była równa 87.4-112.5% dla izomeru (-)-(S)-ANBL oraz 84.8-14.2% dla izomeru (+)-(R)-ANBL. Liniowość metody badano w zakresie 10-1000 ng/mL dla każdego z izomerów. Granica wykrywalności dla enancjomerów ANBL wynosiła 5 ng/mL (S/N=4), natomiast granica oznaczalności dla izomerów analogu ANBL była równa 10 ± 1.2 ng/mL [Groszek i wsp. 2009].

W podsumowaniu otrzymanych wyników należy podkreślić, że opracowane metody analityczne należą do oryginalnych i zgodnie z wymaganiami spełniają kryteria zawarte w wytycznych FDA oraz ICH.^{34, 35} Przeprowadzone procesy walidacji tych metod bioanalitycznych pozwalają na ich rutynowe stosowanie w badaniach przesiewowych oraz na oznaczanie badanych związków w wybranych matrycach szczura.

3.5.2. Ocena profilu farmakokinetycznego badanych analogów

Profil farmakokinetyczny związków będących przedmiotem badań oceniono w warunkach *in vivo*, w surowicy szczurów szczepu Wistar (Charles River Laboratory, Niemcy). Farmakokinetykę związków racemicznych 2F109, ANBL i TWo8 oceniono po ich jednorazowym dożylnym lub dożołądkowym podaniu w dawce 1 mg/kg, natomiast badania w kierunku oceny zjawiska enancjoselektywności przeprowadzono po jednorazowym podaniu dożylnym badanych substancji w dawce 2 mg/kg. Badania te miały na celu wyznaczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych badanych substancji, takich jak okres półtrwania ($t_{0.5}$), objętość dystrybucji (V_{ss}), klirens (Cl) oraz wyznaczenie bezwzględnej dostępności biologicznej (F), ponadto ocenę liniowości procesów farmakokinetycznych. Wszystkie obliczenia farmakokinetyczne wykonano z zastosowaniem programu Phoenix WinNonlin (Certara, St. Louis, Missouri, USA).

Ocena przebiegu procesów farmakokinetycznych związku 2F109 wykazała, że substancja ta cechuje się krótkim okresem półtrwania ($t_{0.5} = 39$ min oraz $t_{0.5} = 72$ min), odpowiednio po podaniu dożylnym i dożołądkowym, co wskazuje na stosunkowo szybką eliminację związku z organizmu szczura. Związek ten posiada dużą objętością dystrybucji ($V_{ss} = 2.46$ L/kg) wskazującą

³⁴ Food and Drug Administration. *Op. cit.*

³⁵ Shabir GA: Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*. 2003, 987(1-2):57-66.

na możliwość jego penetracji do kompartmentu obwodowego. Dostępność biologiczna 2F109 jest stosunkowo niska ($F = 40.2\%$), większa od biodostępności karwedilolu ($F = 25\%$)³⁶, lecz niższa od biodostępności pindololu ($F = 95\%$).³⁷ Po podaniu dożołądkowym związek 2F109 szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając w krótkim czasie stężenie maksymalne we krwi szczura ($t_{\max} = 10 \text{ min}$) [H-3].

Ocena liniowości procesów farmakokinetycznych 2F109 u szczura po podaniu dożylnym trzech różnych dawek badanego analogu (0.125, 1, 2 mg/kg) wykazała, że w zakresie stosowanych dawek farmakokinetyka 2F109 jest liniowa.

Ocena właściwości farmakokinetycznych związku ANBL wykazała, że związek ten cechuje się w porównaniu z 2F109 dłuższym, zbliżonym do karwedilolu okresem półtrwania równym 4.37 h oraz 3.56 h, odpowiednio po podaniu dożylnym oraz dożołądkowym. Biologiczny okres półtrwania karwedilolu u zdrowych ochotników waha się po podaniu doustnym od 4 do 8 h, a po podaniu dożylnym wynosi około 14.5 h. Związek posiada dużą objętością dystrybucji ($V_{ss} = 2.88 \text{ L/kg}$), wskazującą na zdolność penetracji tej substancji do kompartmentu obwodowego oraz niewielką dostępnością biologiczną równą 26.2%, porównywalną z biodostępnością karwedilolu, lecz niższą od dostępności biologicznej pindololu. Po podaniu dożołądkowym ANBL szybko wchłania się z przewodu pokarmowego, osiągając w krótkim czasie stężenie maksymalne we krwi szczura ($t_{\max} = 10 \text{ min}$) [H-3].

W zakresie podawanych drogą dożylną trzech różnych dawek związku ANBL (0.38, 1 i 2 mg/kg) procesy farmakokinetyczne tej substancji miały charakter liniowy.

Przeprowadzone badania profilu farmakokinetycznego związku TWo8 pozwalają wnioskować, że analog ten cechuje się krótkim okresem półtrwania ($t_{0.5} = 3.8 \text{ h}$ oraz $t_{0.5} = 3.1 \text{ h}$), odpowiednio po podaniu dożylnym lub dożołądkowym. Objętość dystrybucji tej pochodnej jest niższa w porównaniu do poprzednich analogów ($V_{ss} = 1.3 \text{ L/kg}$). Związek ten z przewodu pokarmowego szczurów wchłania się stosunkowo szybko ($t_{\max} = 10 \text{ min}$), lecz jego biodostępność jest bardzo niska ($F = 14.7\%$) [H-3].

Przeprowadzone badania liniowości TWo8 podanego dożylnie w trzech różnych dawkach (0.45, 1 i 2 mg/kg) wykazały nieproporcjonalny wzrost wartości pola pod krzywą stężenie-czas począwszy od dawki 1 mg/kg, co może świadczyć o nieliniowości procesów farmakokinetycznych w zakresie stosowanych dawek.

Reasumując, wszystkie badane analogi szybciej wchłaniają się z przewodu pokarmowego w porównaniu z karwedilolem i pindololem, które to leki stężenie maksymalne osiągają po 1-2 h od chwili podania. Objętość dystrybucji tych związków jest podobna do objętości dystrybucji zarówno karwedilolu (1.5 - 2 L/kg), jak i pindololu (2 L/kg), dlatego też rozmieszczają się w kompartmentcie obwodowym. Niska dostępność biologiczna wszystkich badanych związków może wynikać przede wszystkim z intensywnego metabolizmu presystemowego, jakiemu ulegają te analogi głównie w wątrobie lub w ścianie jelit. Istotną rolę w procesie metabolizmu tych

³⁶ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01136>

³⁷ <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00960>

substancji mogą odgrywać, podobnie jak w przypadku karwedilolu i pindololu polimorficzne izoenzymy CYP2D6 oraz CYP2C9 należące do układu monoooksygenaz frakcji mikrosomalnej wątroby, odpowiadającego za procesy utleniania leków.^{38, 39}

Na uwagę zasługuje również fakt, że zachodzące w żywym organizmie procesy biotransformacji i eliminacji leków wymagają obecności określonych transporterów. Badania nad farmakokinetyką celiprololu wskazują na rolę P-glikoproteiny (P-gp), transportera dla kationów organicznych (OCT2) oraz polipeptydu transportującego aniony (OATP) jako czynników modyfikujących dostępność biologiczną tego leku.⁴⁰ Proces wysycenia nośnika przy wysokim stężeniu substancji może występować także w przypadku badanych w niniejszej pracy substancji. Przykładowo dla T_{Wo8}, ekspresja P-gp w komórkach nabłonka jelit może być indukowana przez ten związek i tym samym sprzyjać jego usuwaniu do światła jelit, a w konsekwencji prowadzić do zmniejszenia stężenia T_{Wo8} w surowicy, pomimo zwiększania dawek tego związku, stąd prowadzić do nieliniowości.

3.5.3. Ocena enancjoselektywnej farmakokinetyki badanych analogów

Enancjoselektywność stanowi integralną część charakterystyki profilu farmakokinetycznego leków β -adrenolitycznych, odgrywając istotną rolę w ocenie zależności dawka-stężenie-efekt.⁴¹

W przeprowadzonych badaniach wykazano stereoselektywny charakter dyspozycji związku 2F109 w organizmie szczura po przykładowo wybranej dawce 2 mg/kg podanej dożylnie. Wartości pola pod krzywą stężenie-czas ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) zmierzone w surowicy dla badanych enancjomerów różniły się istotnie ($p < 0.03$). $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ dla enancjomeru (-)-(S)-2F109 było równe 202.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, dla porównania w przypadku izomeru (+)-(R)-2F109 wynosiło 620.7 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$. Okres półtrwania był równy 42.6 min oraz 33.5 min, odpowiednio dla enancjomeru (-)-(S)-2F109 oraz (+)-(R)-2F109 [H-1].

Wykazano stereoselektywny charakter dyspozycji 2F109 w wybranych tkankach szczura odgrywających istotną rolę w procesie ich dystrybucji oraz eliminacji. Zaobserwowano istotne statystycznie zróżnicowanie wartości $AUC_{0 \rightarrow t}$ dla enancjomerów 2F109 w jelitach ($p < 0.03$), nerkach ($p < 0.05$), śledzionie ($p < 0.04$) i mózgu ($p < 0.001$). W matrycach tych $AUC_{0 \rightarrow t}$ wyznaczone dla (+)-(R)-2F109 było wyższe od wartości obserwowanych dla (-)-(S)-2F109. W przypadku izomeru (+)-(R)-2F109 najwyższe stężenie obserwowano w śledzionie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 241.3 $\text{ng}\cdot\text{h}/\text{g}$) i

³⁸ Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009, 48(11):689-723.

³⁹ Zhou HH, Wood AJ: Stereoselective disposition of carvedilol is determined by CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 1995, 57(5):518-524.

⁴⁰ Kato Y, Miyazaki T, Kano T, Sugiura T, Kubo Y, Tsuji A: Involvement of influx and efflux transport systems in gastrointestinal absorption of celiprolol. *J Pharm Sci.* 2009, 98 (7):2529-2539.

⁴¹ Sanaee F, Valente Neves D, Lanchote VL, Jamali F: Pharmacokinetics of nebivolol in the rat: low oral absorption, loss in the gut and systemic stereoselectivity. *Biopharm Drug Dispos.* 2013, 34(6):312-320.

nerkach ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 154.8 ng·h/g), najniższe natomiast w wątrobie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 4.8 ng·h/g) i mózgu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 17.5 ng·h/g) szczura. W przypadku izomeru (-)-(S)-2F109 podobnie, jak jego antypody najwyższe stężenie oznaczono w nerkach ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 281.7 ng·h/g) i śledzionie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 145.1 ng·h/g), natomiast najniższe w wątrobie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 1.4 ng·h/g) i mózgu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 7.9 ng·h/g) szczura.

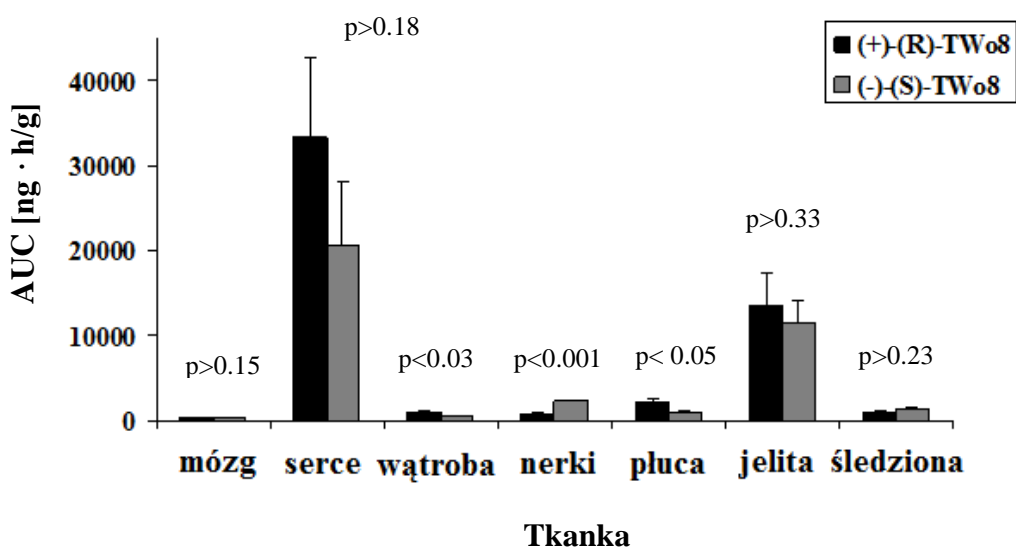
Wyniki badań dla związku ANBL wykazały stereoselektywny proces dyspozycji enancjomerów tej substancji w organizmie szczura, o czym świadczą zmierzone w surowicy wartości pola pod krzywą stężenie-czas, które dla badanych enancjomerów różniły się istotnie ($p < 0.05$). $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ mierzone dla (-)-(S)-ANBL wynosiło 636 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, dla izomeru (+)-(R)-ANBL było równe 1055 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$. Okres półtrwania wynosił 3.2 h oraz 4.5 h, odpowiednio dla enancjomeru (-)-(S)-ANBL oraz (+)-(R)-ANBL.

Podobna ocena dyspozycji związku ANBL w tkankach szczura pozwoliła zaobserwować istotne statystycznie różnice wartości $AUC_{0 \rightarrow t}$ dla enancjomerów ANBL w nerkach ($p < 0.05$), jelitach ($p < 0.002$) oraz sercu ($p < 0.001$). We wszystkich matrycach, w których oznaczano izomery ANBL pole pod krzywą stężenie-czas wyznaczone dla (+)-(R)-ANBL było wyższe od $AUC_{0 \rightarrow t}$ wyznaczonego dla (-)-(S)-ANBL. Najwyższe stężenia izomerów oznaczono w nerkach ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 35.3 ng·h/g oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 23.3 ng·h/g, odpowiednio dla (+)-(R)-ANBL oraz (-)-(S)-ANBL) oraz w sercu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 45.7 ng·h/g dla (+)-(R)-ANBL oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 31.3 ng·h/g dla (-)-(S)-ANBL). Najniższe stężenie izomerów oznaczono w wątrobie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 21.4 ng·h/g dla (+)-(R)-ANBL oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 17.3 ng·h/g dla (-)-(S)-ANBL) oraz w mózgu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 12,5 ng·h/g dla (+)-(R)-ANBL oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 21.4 ng·h/g dla (+)-(R)-ANBL).

Dyspozycja enancjomerów związku TWo8 w organizmie szczura zachodziła również stereoselektywnie, o czym świadczą różniące się statystycznie wartości $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (2074 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ dla (-)-(S)-TWo8 oraz 3792 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ dla (+)-(R)-TWo8, $p < 0.02$). Wartości okresów półtrwania wynosiły 2.6 h oraz 3 h, odpowiednio dla (-)-(S)-TWo8 oraz (+)-(R)-TWo8 [H-2].

W przypadku związku TWo8 oceniono jego penetrację do tych samych tkanek szczura. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy $AUC_{0 \rightarrow t}$ dla diastereoizomerów TWo8 w wątrobie ($p < 0.03$), nerkach ($p < 0.001$) oraz płucach ($p < 0.05$). Najwyższe stężenia diastereoizomerów oznaczono w sercu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 20.7 ng·h/g oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 33.4 ng·h/g, odpowiednio dla (-)-(S)-TWo8 oraz (+)-(R)-TWo8) oraz w jelitach ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 11.5 ng·h/g dla (-)-(S)-TWo8 oraz $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 13.6 ng·h/g dla (+)-(R)-TWo8) lecz wartości te nie różniły się istotnie statystycznie. Najniższe stężenia enancjomerów TWo8 oznaczono w mózgu ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 4.96 ng·h/g dla (-)-(S)-TWo8 oraz $AUC_{0 \rightarrow t}$ 5.83 ng·h/g) oraz w wątrobie ($AUC_{0 \rightarrow t}$ 10 ng·h/g dla (-)-(S)-TWo8 oraz 17.7 ng·h/g dla (+)-(R)-TWo8), Ryc. 5, [H-2].

Reasumując, źródła enancjoselektywnej farmakokinetyki wszystkich badanych związków można upatrywać w ich enancjoselektywnym metabolizmie, stereoselektywnym wiązaniu z białkami krwi lub w procesie stereoselektywnego transportu badanych analogów przez błony biologiczne.



Rycina 5. Dyspozycja enancjomerów TWO8 w tkankach szczura po jednorazowym podaniu dożylnym związku racemicznego w dawce 2 mg/kg.

W przypadku wszystkich badanych substancji w surowicy szczura stężenie enancjomeru o konfiguracji (+)-(R)- było większe w porównaniu do jego antypody optycznej. Ilość leku osiągająca krążenie ogólne w przypadku eutomeru (-)-(S)-2F109, (-)-(S)-ANBL oraz (-)-(S)-TWO8 była prawie dwukrotnie mniejsza w porównaniu do ich distomerów.

Badania wykonane dla karwedilolu ⁴² i pindololu ⁴³ wykazały stereoselektywny charakter metabolizmu tych leków. W przypadku karwedilolu, enancjomer (-)-(S)- ulega szybszej biotransformacji w porównaniu do izomeru (+)-(R)-karwedilolu. Stężenie enancjomeru (+)-(R)-karwedilolu w osoczu jest 2-3 razy wyższe w porównaniu do formy (-)-(S)-karwedilolu. Związane są z tym różnice w wartościach biologicznego okresu półtrwania oraz biodostępności. Enancjomer (-)-(S)-karwedilolu wykazuje dwukrotnie mniejszą dostępność biologiczną (15%) w porównaniu do enancjomeru (+)-(R)-karwedilolu (31%). Biologiczny okres półtrwania (+)-(R)-karwedilolu wynosi 5-9 h, a izomeru (-)-(S)-karwedilolu jest równy 7-11 h.

⁴² Ishida K, Taira S, Morishita H, Kayano Y, Taguchi M, Hashimoto Y: Stereoselective oxidation and glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Biol Pharm Bull.* 2008, 31(6):1297-1300.

⁴³ Gonçalves PV, Matthes Ado C, Da Cunha SP, Lanchote VL. Enantioselectivity in the steady-state pharmacokinetics and transplacental distribution of pindolol at delivery in pregnancy-induced hypertension. *Chirality.* 2002, 14(8):683-687.

3.5.4. Identyfikacja metabolitów badanych związków

Badanie biotransformacji związków jest procesem złożonym, przeprowadzanym m.in. w warunkach *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo*. Spośród dostępnych technik analitycznych LC/MS/MS jest uniwersalnym narzędziem stosowanym do potwierdzania obecności związków macierzystych i identyfikacji ich prawdopodobnych metabolitów, obecnych najczęściej w złożonym środowisku biologicznym.

W początkowym etapie identyfikację metabolitów związków będących przedmiotem badań wykonano w warunkach *in silico*, korzystając z oprogramowania Pallas⁴⁴, następnie w warunkach *in vivo* w surowicy, moczu, homogenatach wątroby, jelit, płuc, nerek, serca, mózgu i kału szczura oraz w warunkach *in vitro* w mikrosomach wątroby szczura. Przeprowadzono również badania nad procesami utleniania i redukcji badanych analogów w potencjostacie systemu elektrochemicznego ROXY™ (Antec, Holandia). W przypadku wszystkich badanych związków, zidentyfikowano struktury metabolitów I i II fazy, powstające w organizmie zwierzęcym w wyniku biotransformacji.

Do identyfikacji metabolitów i ustalenia ich struktury zastosowano wysokorozdzielczy spektrometr masowy LTQ XL Orbitrap Discovery (Thermo Scientific), pozwalający na uzyskanie widm masowych o rozdzielczości 30 000, co warunkuje dokładny pomiar masy analitu oraz odtwarzalność wyników analiz. W badaniu zastosowano strategię identyfikacji i ustalania budowy strukturalnej metabolitów, na podstawie porównania widm fragmentacyjnych substancji macierzystej i metabolitu oraz traconych obojętnych mas.

Do analizy danych zastosowano oprogramowanie MS/MS Comparison Tool (AB SCIEX), które tworzy listy wspólnych jonów fragmentacyjnych związku macierzystego i metabolitu oraz traconych, obojętnych cząsteczek. Badanie przeprowadzono poprzez porównanie próbek badanych i kontrolnych, interpretację budowy chemicznej produktów fragmentacji oraz odszczepianych, obojętnych mas. Porównanie widma MS/MS związku macierzystego i fragmentu, pozwala z dużą dokładnością na wyznaczenie prawdopodobnej struktury tworzonych metabolitów. Należy podkreślić, że takie podejście jest możliwe jedynie na podstawie analiz wykonanych wysokorozdzielczą spektrometrią mas.

Dla związku 2F109, spośród metabolitów I fazy zidentyfikowano, we wszystkich matrycach szczura, produkty utlenienia, w wyniku hydroksylacji w pierścieniu fenylowym w pozycji 4 lub 5, oraz hydroksylacji w ugrupowaniu indolowym w pozycji 1 lub 3 (m/z 373, **M1**). Zidentyfikowano również produkty będące wynikiem aromatycznej dihydroksylacji (m/z 386, **M4**) oraz utleniania związku do chinonu (m/z 371, **M5**). Na uwagę zasługują dwa metabolity II fazy biotransformacji o m/z 437 (sprzężanie z resztą kwasu siarkowego, **M2**) oraz m/z 533 (sprzężanie z kwasem glukuronowym, **M3**). Wzory strukturalne zidentyfikowanych metabolitów przedstawiono na **Ryc. 6**.

⁴⁴ Pallas CompuDrug (CompuDrug International, INC, Sedona, USA) <http://www.compudrug.com/>

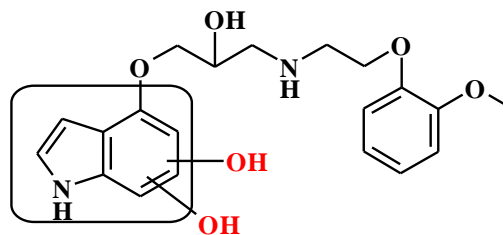
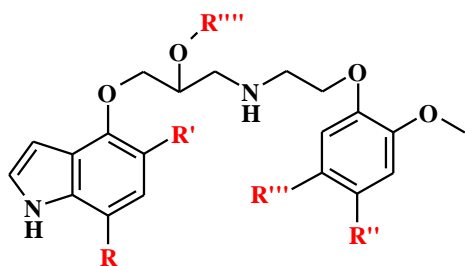
W przypadku związku ANBL, zidentyfikowano w matrycach szczura pochodne hydroksylowe (m/z 403, **M2**), jako wynik utlenienia pierścienia fenyloвого w pozycji 4 lub *N*-hydroksylacji w ugrupowaniu indolowym. Kolejny metabolit jest wynikiem aromatycznej dihydroksylacji (m/z 419, **M6**) oraz utleniania do chinonu (m/z 401, **M7**). Jako metabolity II fazy zidentyfikowano produkt metylacji ANBL (m/z 401, **M1**), następnie produkt acetylacji (m/z 429, **M3**), produkt sprzęgania z resztą kwasu siarkowego (m/z 467, **M4**) oraz produkt sprzęgania z kwasem glukuronowym (m/z 563, **M5**). Zidentyfikowane struktury metabolitów związku ANBL przedstawiono na **Ryc. 7**.

Podobne badania wykonano dla związku TWo8, identyfikując jako produkty utlenienia pochodne hydroksylowe, jako wynik utlenienia pierścienia fenyloвого w pozycji 4 lub *N*-hydroksylacji w ugrupowaniu indolowym (m/z 403, **M2**), pochodną dihydroksylową, jako wynik utlenienia w pierścieniu aromatycznym (m/z 419, **M6**) oraz utlenianie pierścienia aromatycznego do chinonu (m/z 401, **M7**). W badaniu zidentyfikowano 4 metabolity II fazy biotransformacji, będące wynikiem procesu metylacji (m/z 401), acetylacji (m/z 429, **M3**), sprzęgania z resztami kwasu siarkowego (m/z 467, **M4**) oraz z kwasem glukuronowym (m/z 563, **M5**), **Ryc. 8**.

Względna analiza ilościowa zidentyfikowanych produktów metabolizmu badanych analogów w surowicy, moczu, homogenatach tkanek i kału oraz w mikrosomach wątroby szczura, wykazała najwyższą zawartość produktów utlenienia badanych związków. W przypadku wszystkich badanych analogów oznaczono względną zawartość sulfonianów i glukuronianów, natomiast w przypadku ANBL oraz TWo8 oznaczono również względną zawartość produktów acetylacji i metylacji.

Ocena klirensu nerkowego badanych analogów oraz stopnia ich eliminacji z moczem i kałem w postaci związków macierzystych wykazała, że związki te są wydalane przede wszystkim pozanerkowo. Klirens nerkowy badanych analogów jest bardzo niski, wynoszący 0.0014 mL/min, 0.011 mL/min oraz 0.0045 mL/min, odpowiednio dla 2F109, ANBL oraz TWo8. Po dożylnym podaniu związków w dawce 2 mg/kg stwierdzono, że zaledwie 0.1%, 1.5% oraz 1.2% podanej dawki 2F109, ANBL oraz TWo8 jest wydalane z moczem i kałem w postaci niezmienionej w ciągu 24 h. Badane analogi są intensywnie metabolizowane w wątrobie, jelitach, nerkach i płucach, co może stanowić prawdopodobną przyczynę ich niskiej biodostępności. Związki te zachowują się podobnie jak karwedilol, który z uwagi na fakt, że jest lekiem o względnie wysokiej lipofilności ($\log P = 4.19$) jest ekstensywnie metabolizowany w układzie mikrosomalnym wątroby, przez enzymy cytochromu P450, przede wszystkim CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2 oraz CYP2E1, z tego powodu mniej niż 2% podanej dawki leku ulega wydalaniu w postaci niezmienionej z moczem.⁴⁵

⁴⁵ Neugebauer G, Neubert P: Metabolism of carvedilol in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1991, 16(4):257-60.



2F109 (m/z 357) – R, R', R'', R''' and R'''' =H,

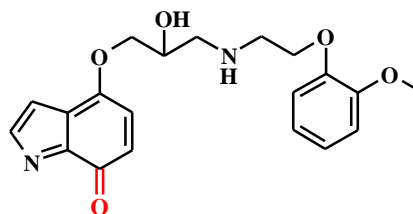
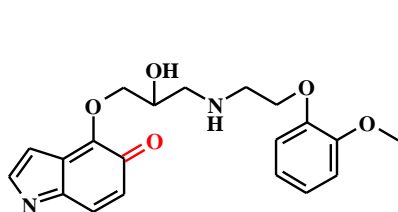
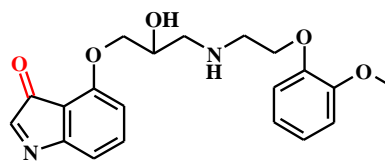
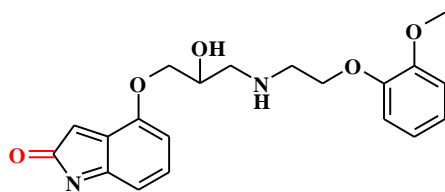
M4 (m/z 386)

M1 (m/z 373) – R or R' or R'' or R''' =OH,

and R'''' =H

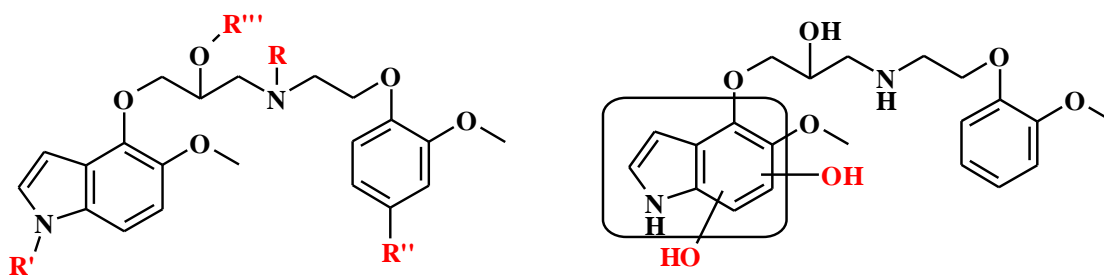
M2 (m/z 437) – R, R', R'' and R''' =H; R'''' =SO₃H,

M3 (m/z 533) – R, R', R'' and R''' =H; R'''' =glucuronic substituent, C₆H₉O₆.



M5 (m/z 371)

Rycina 6. Wzory strukturalne zidentyfikowanych metabolitów związku 2F109.



ANBL (m/z 387) – R, R', R'' and R''' =H,

M6 (m/z 419)

M1 (m/z 401) – R', R'' and R''' =H; R=CH₃,

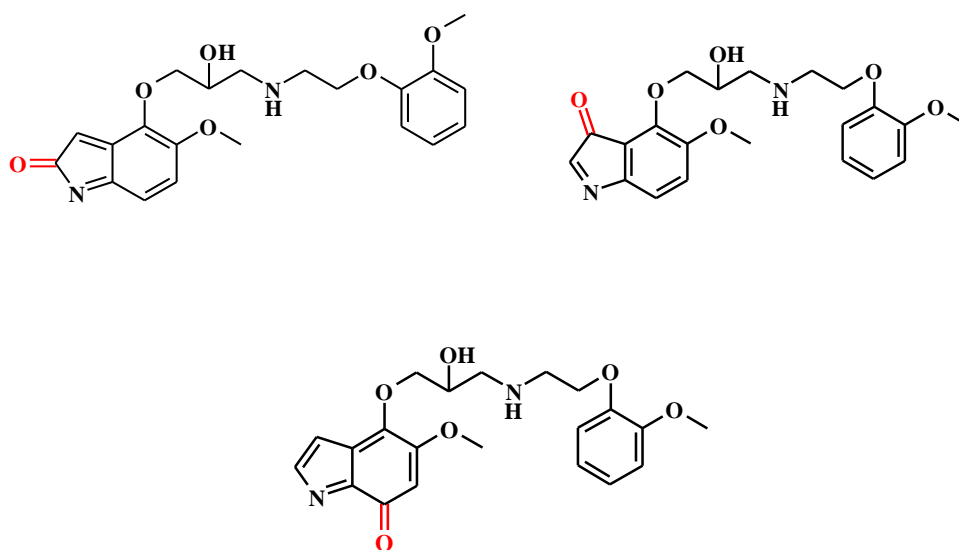
M2 (m/z 403) – R, R'' and R''' =H; R'=OH

or R, R' and R''' =H; R''=OH,

M3 (m/z 429) – R, R' and R'' =H; R''' =C(O)CH₃,

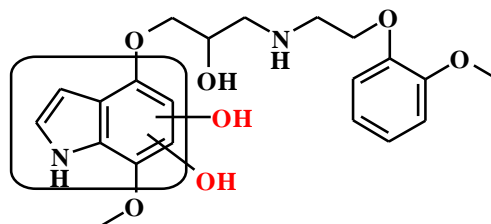
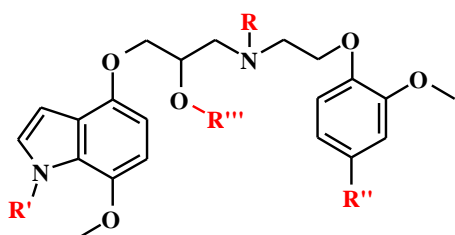
M4 (m/z 467) – R, R' and R'' =H; R''' =SO₃H,

M5 (m/z 563) – R, R' and R'' =H; R''' =glucuronic substituent, C₆H₉O₆.



M7 (m/z 401)

Rycina 7. Wzory strukturalne zidentyfikowanych metabolitów związku ANBL.



TWo8 (m/z 387) – R, R', R'' and R''' =H,

M6 (m/z 419)

M1 (m/z 401) – R', R'' and R''' =H; R=CH₃,

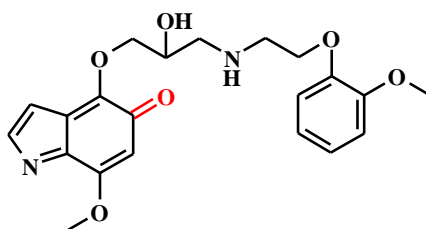
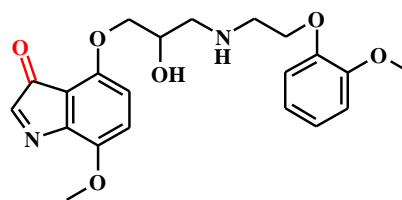
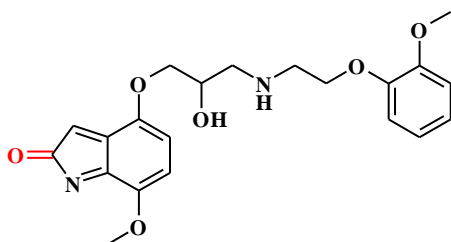
M2 (m/z 403) – R, R'' and R''' =H; R' =OH

or R, R' and R''' =H; R'' =OH,

M3 (m/z 429) – R, R' and R'' =H; R''' =C(O)CH₃,

M4 (m/z 467) – R, R' and R'' =H; R''' =SO₃H,

M5 (m/z 563) – R, R' and R'' =H; R''' =glucuronic substituent, C₆H₉O₆.



M7 (m/z 401)

Rycina 8. Wzory strukturalne zidentyfikowanych metabolitów związku TWo8.

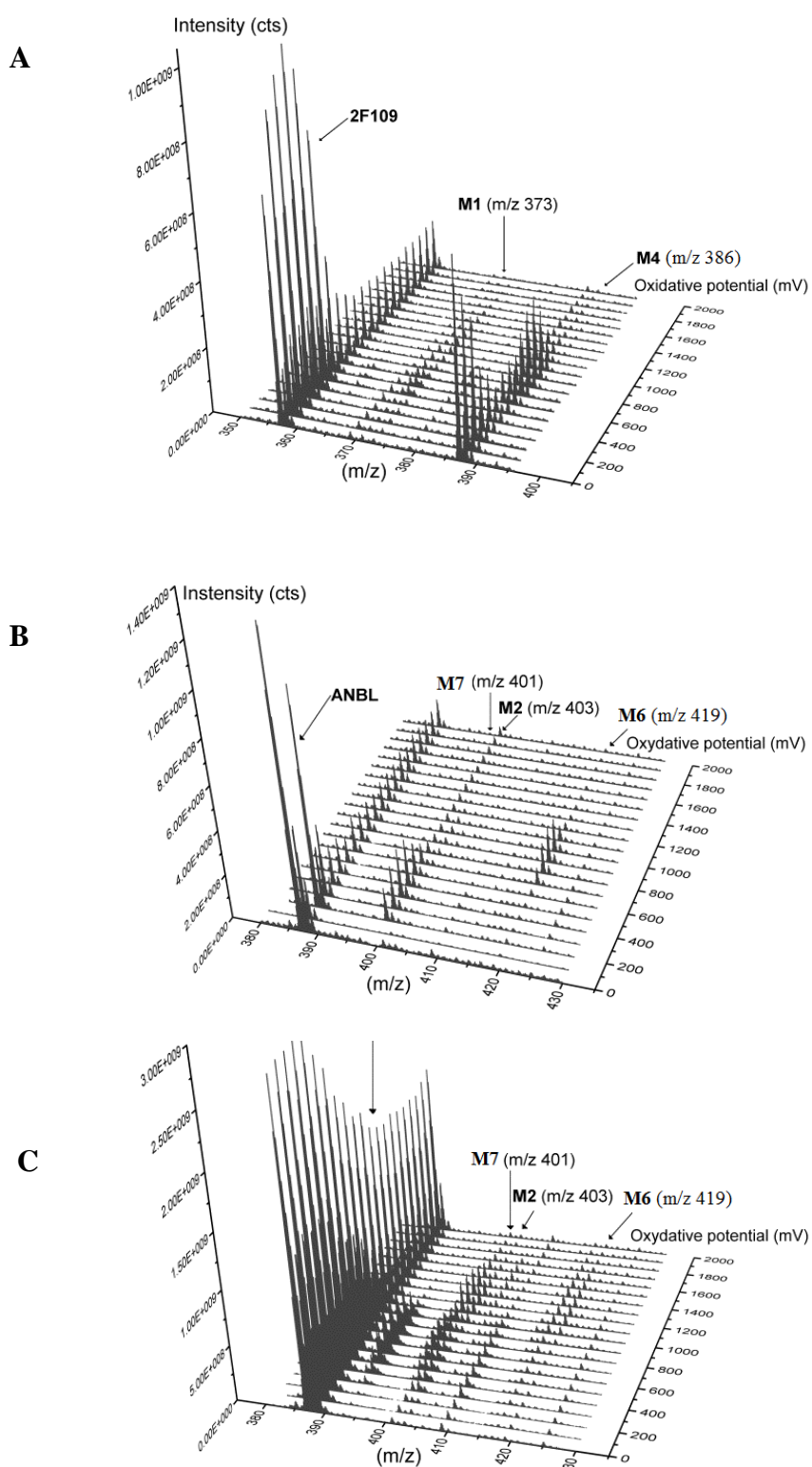
U ludzi zidentyfikowano trzy aktywne farmakologicznie metabolity karwedilolu, powstałe przez demetylację lub hydroksylację pierścienia fenylowego. Spośród nich najsilniejsze działanie blokujące receptory β -adrenergiczne wykazuje 4'-hydroksykarwedilol. Karwedilol u ludzi ulega sprzęganiu z kwasem glukuronowym. Stężenie metabolitów odpowiada 1/10 stężenia leku macierzystego. Około 60% metabolitów jest wydalanych z żółcią, a następnie z kałem, około 16% metabolitów wydalają się z moczem.⁴⁶ W przypadku pindololu 35-40% leku niezmiennego jest wydalana z moczem, 60-65% ulega metabolizmowi do pochodnych hydroksylowych, a następnie sprzęganiu z kwasem glukuronowym i resztami kwasu siarkowego. Około 6-9% leku ulega wydalaniu do żółci.

Obecność produktów utlenienia potwierdzono w badaniach *in vitro*, inkubując związki z mikrosomami wątroby szczura; całkowita ilość produktów utlenienia tych analogów nie przekraczała 15 %.

W wyniku reakcji utleniania badanych substancji w potencjostacie elektrochemicznego systemu ROXY™ uzyskano woltamogramy masowe, przedstawiające intensywność jonu w zależności od stosunku masy do uzyskanego ładunku oraz przyłożonego napięcia. Stosując tę technikę potwierdzono dla analogu 2F109 obecność dwóch produktów utlenienia, tj. pochodnej hydroksylowej (+O, m/z 373, Δ 16) oraz produktów dihydroksylacji (+2O, m/z 386, Δ 32), **Ryc. 9A**. Na woltamogramie masowym dla ANBL i TWo8 widoczne są trzy produkty utlenienia; pochodne hydroksylowe (+O, m/z 403, Δ 16), chinon (+O-H₂, m/z 401, Δ 14) oraz pochodne dihydroksylowe (+2O, m/z 419, Δ 32), **Ryc. 9B-C**. Opracowane wyniki tych badań, w postaci publikacji znajdują się w trakcie recenzji.

Uzupełnieniem prezentowanych wyników będą planowane badania nad identyfikacją izoenzymów cytochromu P450, potencjalnie zaangażowanych w metabolizm tych związków, badania w kierunku stabilności metabolicznej oraz określenie roli transporterów błonowych w procesie wchłaniania tych analogów.

⁴⁶ Hanioka N, Tanaka S, Moriguchi Y, Narimatsu S: Stereoselective glucuronidation of carvedilol in human liver and intestinal microsomes. *Pharmacology*. 2012, 90(3-4):117-124.



Rycina 9. Przykładowe woltamogramy masowe jako funkcja zmiennego napięcia utleniającego dla 2F109 (A), ANBL (B) oraz TWo8 (C).

3.5.5. Ocena właściwości fizykochemicznych badanych analogów

Właściwości fizykochemiczne związku stanowią ważny czynnik odgrywający istotną rolę w ocenie profilu farmakokinetycznego oraz aktywności biologicznej potencjalnego leku. Znajomość profilu fizykochemicznego substancji pozwala m.in. na wstępne przewidywanie zdolności przechodzenia związku przez błony biologiczne, jego penetracji do mózgu oraz ocenę stopnia wiązania z białkami krwi.^{47, 48}

W badaniach wyznaczono trzy podstawowe parametry fizykochemiczne mające zasadniczy wpływ na losy leku w organizmie, takie jak pK_a , $\log P$ oraz $\log D$.⁴⁹

Wartość pK_a wyznaczono metodą potencjometryczną, która uznana jest za metodę referencyjną w tego typu badaniach.⁵⁰ Z uwagi na słabą rozpuszczalność badanych związków w wodzie, substancje rozpuszczano w mieszaninach wodno-organicznych, takich jak metanol - woda, dimetylosulfotlenek - woda oraz dimetyloformamid - woda, w stosunkach objętościowych 20:80, 25:75, 30:70 oraz 35:65 z dodatkiem 0.15 mol/L roztworu KCl. W pierwszym etapie badań wyznaczono pozorny wykładnik stałej dysocjacji p_sK_a poszczególnych związków miareczkując ich roztwory wodno-organiczne roztworem HCl. We wszystkich przypadkach krzywa miareczkowania potencjometrycznego była charakterystyczna dla układu słaba zasada i jej sól z mocnym kwasem. Opierając się na założeniach metody Yashudy-Shedlovskiego, wyznaczano metodą graficzną, bezwzględne wartości wykładników stałych dysocjacji badanych substancji.⁵¹ Wartości te dla badanych analogów były podobne. Dla związku 2F109 wartość pK_a wynosiła 8.64 ± 0.06 , dla związku ANBL była równa 8.85 ± 0.51 , dla TWo8 wynosiła 8.26 ± 0.45 , co potwierdza zasadowy charakter badanych analogów oraz właściwości zbliżone do karwedilolu ($pK_a = 8.74$) **Ryc. 10 [H-4]**.

W następnym etapie, korzystając z techniki HPLC i opierając się na założeniach metody Soczewińskiego-Snydera⁵² wyznaczono chromatograficzne współczynniki podziału ($\log k$) badanych

⁴⁷ Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002, 45(12):2615-2623.

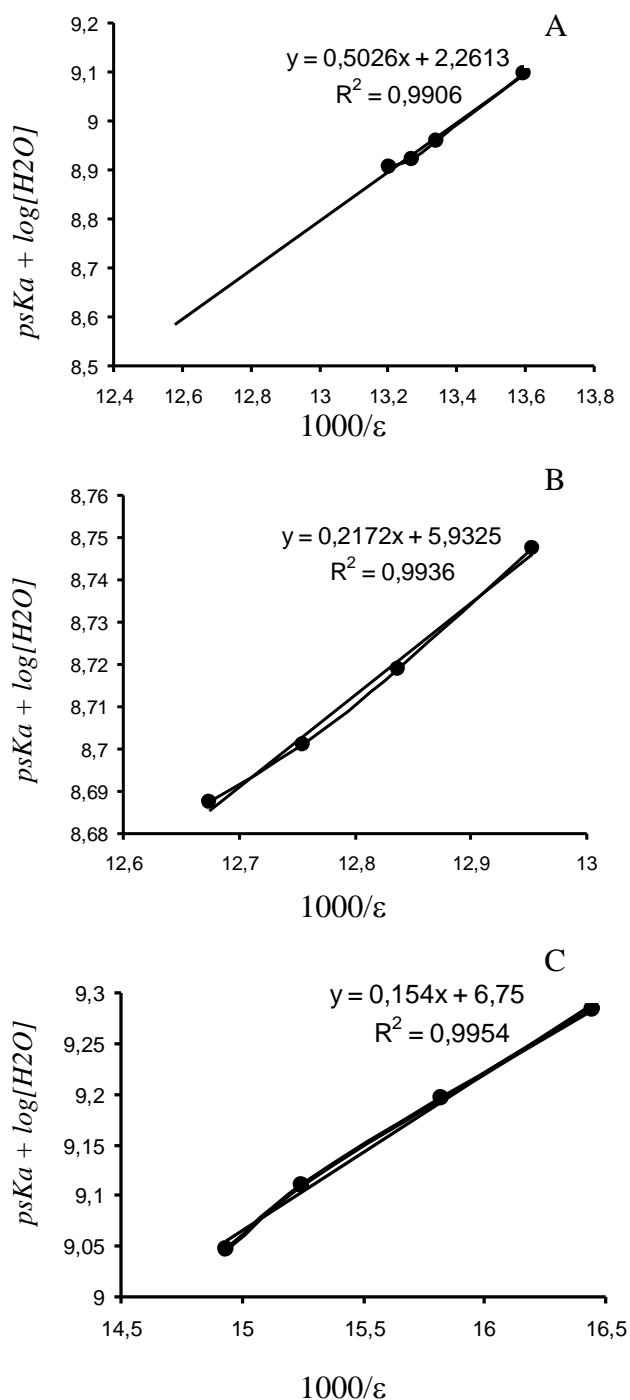
⁴⁸ Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H: Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2009, 99(3):1107-1122.

⁴⁹ Kah M, Brown CD: Log D : Lipophilicity for ionisable compounds. *Chemosphere*, 2008, 72(10):1401-1408.

⁵⁰ Voldyi G, Ruiz R, Box K, Comer J, Bosch E, Takács-Novák K: Potentiometric and spectrophotometric pK_a determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new co-solvent system. *Anal Chim Acta* 2007, 583(2):418-428.

⁵¹ Avdeef, Box KJ, Comer JE, Gilges M, Hadley M, Hibbert C, Patterson W, Tam KY: PH-metric $\log P$ 11. pK_a determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures. *J Pharm Biomed Anal* 1999, 20(4):631-641.

⁵² Gulyaeva N, Zaslavsky A, Lechner P, Chlenov M, McConnell O, Chait A, Kipnis V, Zaslavsky B: Relative hydrophobicity and lipophilicity of drugs measured by aqueous two-phase partitioning, octanol-buffer



Rycina 10. Przykładowe wykresy typu Yasuda-Shedlovsky dla 2F109 (A), ANBL (B) oraz TWo8 (C) w mieszaninie DMF-woda.

związków, odpowiednio na kolumnie IAM.PC.DD2 (150 mm x 4.6 mm, 10 μ m, Regis Technologies, Morton Grave, IL, USA) oraz na kolumnie Zorbax Extend C18 (250 mm x 4.6 mm, 10 μ m, Agilent Technologies, Darmstadt, Niemcy). Jako fazę ruchomą stosowano acetonitryl i bufor

fosforanowy, zmieszane w stosunku 80:20, 70:30 oraz 60:40, odpowiednio o pH 7.4 oraz 10.5. Tak uzyskane wartości $\log k$ ekstrapolowano do 100% zawartości wody, uzyskując $\log k_w$. Wartość $\log k_w$ wyznaczona na kolumnie IAM.PC.DD2 w pH 7.4 posłużyła do wyznaczenia $\log D$, natomiast wartość $\log k_w$ wyznaczona na kolumnie Zorbax Extend C18 w pH 10.5 wykorzystano do wyznaczenia $\log P$.

Wyznaczone w ten sposób współczynniki podziału badanych związków były podobne i wynosiły 1.9846, 1.9999, 1.9584, odpowiednio dla 2F109, ANBL oraz TWo8, co wskazuje na umiarkowaną lipofilność badanych substancji, będącą prawdopodobnie przyczyną ich słabej rozpuszczalności w wodzie i konieczności stosowania w przypadku pomiarów pK_a roztworów wodno-organicznych. Zbliżone wartości $\log P$ dla wszystkich badanych związków wskazują na ich podobną zdolność do przenikania przez błony biologiczne. Zróżnicowana i niska dostępność biologiczna poszczególnych substancji może wynikać prawdopodobnie z nasilenia ich metabolizmu presystemowego oraz zmiennej, zależnej od pH przewodności pokarmowego, rozpuszczalności. Lipidowo-białkowe błony biologiczne są lepiej penetrowane przez niezdysoncjowane cząsteczki kwasów i zasad, niż przez jony. Fakt ten powoduje, że stosunek stężeń leku o charakterze słabego kwasu lub słabej zasady po obu stronach błony zależy, w wyraźny sposób, od pH panującego po obu jej stronach i od pK_a kwasu lub zasady.⁵³ Pod względem lipofilności, właściwości badanych substancji są zbliżone do pindololu ($\log P = 1.75$).

Z uwagi na zasadowy charakter badanych substancji i prawdopodobną dysocjację związków w buforze o pH 7.4, współczynniki dystrybucji były niższe od współczynników podziału i wynosiły 1.5816, 1.6268, 1.4502 odpowiednio dla 2F109, ANBL oraz TWo8. Współczynniki dystrybucji $\log D$ nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi związkami i prawdopodobnie wielkości te nie miały istotnego wpływu na objętość dystrybucji badanych substancji. W tym przypadku, przyczyn zróżnicowanej objętości dystrybucji badanych analogów, można poszukiwać w procesie ich wiązania z białkami krwi [H-4].

3.5.6. Ocena procesu wiązania z białkami krwi badanych analogów

Celem pełnej charakterystyki profilu farmakokinetycznego badanych związków przeprowadzono ocenę stopnia wiązania z białkami krwi: albumina wołowa (BSA) i kwaśna α_1 -glikoproteina (AGP) analogów 2F109, ANBL i TWo8, w postaci racemicznej oraz ich enancjomerów, z wykorzystaniem urządzenia do dializy równowagowej typu Fast Micro-Equilibrium Dialyzer (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus, Niemcy-USA). W badaniach tych wyznaczono procent i siłę wiązania związków z BSA oraz AGP w warunkach *in vitro* oraz oceniano wiązanie badanych substancji w warunkach *in vivo*, z surowicą szczura.

⁵³ Yang Y, Engkvist O, Llinàs A, Chen H : Beyond size, ionization state, and lipophilicity: influence of molecular topology on absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity for drug like compounds. *J Med Chem*, 2012, 55(8):3667-3677.

Badanie stopnia wiązania nowych analogów aminopropan-2-olu przeprowadzono w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (BSA = 597 μM , AGP = 25 μM) w pH 7.4 oraz w szerokim zakresie stężeń badanych związków: 2.5 - 900 μM w przypadku wiązania z BSA oraz 2.5 - 300 w przypadku wiązania z AGP. Tak dobrane warunki pozwoliły na wysycenie procesu wiązania i wykreślenie dla każdej z badanych substancji zależności stałej wysycenia (r) jako funkcji stężenia leku wolnego, niezwiązanego z białkami (C_u).⁵⁴

Korzystając z równania Scatcharda⁵⁵ dla wiązania 2F109 z BSA oraz AGP, uzyskano linową zależność $r/C_u = f(r)$, wskazującą na występowanie na obu białkach, jednej klasy miejsc wiążących ($m = 1$). Związek 2F109 wiązał się z BSA w jednym miejscu ($n = 0.53$), natomiast z AGP w dwóch miejscach ($n = 2.21$). Siła wiązania 2F109 z BSA była niewielka ($K_a = 1.18 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), natomiast z AGP była stosunkowo wysoka ($K_a = 2.14 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Na podstawie wykresów Scatcharda dla wiązania ANBL z BSA i AGP, wyznaczono (na obu białkach) jedną klasę miejsc wiążących ($m = 1$). Związek ANBL wiązał się z BSA w jednym miejscu ($n = 0.132$), natomiast z AGP w trzech miejscach wiążących ($n = 2.76$); siła tego wiązania dla ANBL w przypadku obu białek była stosunkowo niewielka - rzędu $K_a = 5.21 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ dla wiązania z BSA oraz $K_a = 2.88 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ dla wiązania z AGP.

W przypadku wiązania TWo8 z BSA i AGP, przebieg wykresów Scatcharda był liniowy, co również wskazywało na obecność jednej klasy miejsc wiążących na tych białkach ($m = 1$). Związek TWo8 wiązał się z BSA w jednym miejscu ($n = 0.13$), natomiast z AGP w 2 miejscach wiążących ($n = 2.28$). Siła tych wiązań była niewielka - rzędu $K_a = 5.86 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ dla wiązania z BSA oraz $K_a = 8.83 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ w przypadku wiązania z AGP, Ryc. 11.

W warunkach *in vitro* związki 2F109 oraz ANBL wiązały się z BSA, odpowiednio w $45.4 \pm 3.5\%$ i $34.2 \pm 2.7\%$, porównywalnie do pindololu (40%), co kwalifikuje je jako substancje średnio wiążące się z białkami krwi, natomiast TWo8 wiązał się z BSA w największym stopniu ($71.2 \pm 4.2\%$). Jako związki o charakterze zasadowym wszystkie badane substancje w większym stopniu wiązały się z kwaśną α_1 -glikoproteina. Procent wiązania dla 2F109, ANBL oraz TWo8 wynosił odpowiednio $79.5 \pm 4.3\%$, $71.5 \pm 2.7\%$ oraz $85.2 \pm 3.8\%$.

Ocena stopnia wiązania badanych substancji w warunkach *iv vivo* z surowicą szczura wykazała, że 2F109, ANBL oraz TWo8 wiązały się w zbliżonym stopniu, odpowiednio w $99 \pm 2.5\%$, $91 \pm 3,4\%$ oraz $98 \pm 2.8\%$, podobnie do karwedilolu (95%). Silniejsze wiązanie wszystkich badanych analogów z białkami surowicy szczura może być spowodowane ich powinowactwem do innych komponent białkowych krwi.

Z uwagi na fakt, że w warunkach fizjologicznych, wszystkie badane związki występują w formie zdysocjowanej, z tego względu można przypuszczać, że siły oddziaływań elektrostatycznych będą odgrywać istotną rolę w procesie ich wiązania z białkami krwi.

⁵⁴ Oravcová J, Böhs B, Lindner W: Drug-protein binding sites. New trends in analytical and experimental methodology. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996, 677(1):1-28.

⁵⁵ Scatchard G: Note on the equation of state explicit in the volume. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1930, 16(12):811-813.

Współczynnik podziału, współczynnik dystrybucji, wiązanie z białkami oraz dystrybucja do tkanek należą do podstawowych parametrów wpływających na dyspozycję leków w organizmie.⁵⁶ W badaniu wykazano istotną korelację pomiędzy stopniem wiązania z białkami, badanych analogów, a współczynnikiem dystrybucji - $R^2 = 0.9974$ dla wiązania z BSA oraz $R^2 = 0.8779$ dla wiązania z AGP. Istotną zależność wykazano również pomiędzy wiązaniem badanych substancji, a ich współczynnikiem podziału ($R^2 = 0.9946$ oraz $R^2 = 0.9402$), odpowiednio dla wiązania z BSA oraz AGP.

Na dystrybucję badanych analogów, istotny wpływ ma stopień ich wiązania z białkami krwi, w szczególności z kwasną α_1 -glikoproteiną ($R^2 = 0.9381$) oraz z surowicą szczura ($R^2 = 0.9402$).

Z uwagi na fakt, że wszystkie związki będące przedmiotem badań mają budowę chiralną, a przeprowadzona ocena ich profilu farmakokinetycznego wykazała enancjoselektywny charakter procesów, dlatego też oceniono stopień wiązania enancjomerów 2F109, ANBL oraz TWo8 z surowicą szczura w warunkach *in vivo*. W przypadku 2F109 i ANBL potwierdzono enancjoselektywny charakter ich wiązania. Enancjomer (-)-(S)-2F109 wiązał się z białkami surowicy szczura w 95%, natomiast izomer (+)-(R)-2F109 wiązał się w 65%. W przypadku wiązania ANBL, stwierdzono, że eutomer (-)-(S)-ANBL wiązał się z surowicą szczura w 78%, natomiast jego antypoda optyczna w 90%. Różnice pomiędzy enancjomerami zostały porównane testem t-Studenta dla zmiennych powiązanych.

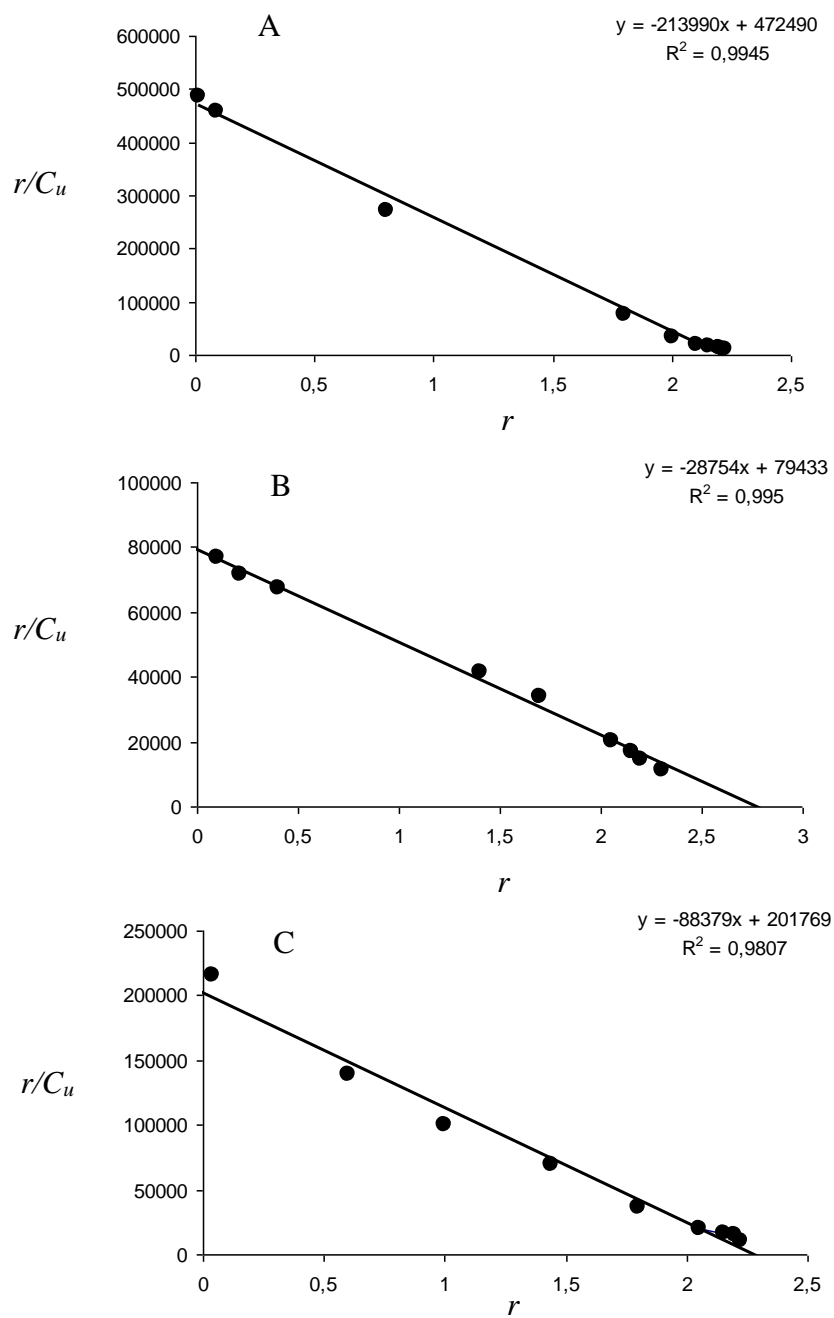
Badania *in vivo* dla związku TWo8, nie wykazały enancjoselektywności procesu wiązania tego analogu z białkami krwi, enancjomery (+)-(R)-TWo8 i (-)-(S)-TWo8 wiązały się w zbliżonym procencie, wynoszącym odpowiednio 96 i 94%. Z tego względu, dla związku TWo8, przyczyn stereoselektywności należy poszukiwać w innych procesach, prawdopodobnie w jego stereoselektywnym metabolizmie lub stereoselektywnym transporcie tej substancji przez błony biologiczne. Prawdopodobną konsekwencją słabszego wiązania enancjomerów (+)-(R)-2F109 oraz (-)-(S)-ANBL z białkami surowicy szczura w warunkach *in vivo*, było skrócenie ich okresów półtrwania [H-5].

W badaniach wykonanych dla karwedilolu wykazano enancjoselektywny charakter wiązania tego leku z białkami krwi. Stosunek związanego z białkami enancjomeru (+)-(R)-karwedilolu do (-)-(S)-karwedilolu wynosił 1.53 w badaniach *in vivo* oraz 1.27 w badaniach *in vitro*^{57, 58}

⁵⁶ Zonzini L, Bianchi F, Cesari N, Sartori M: In vivo rat PK profiling in drug discovery: new challenges. *Expert Opin Drug Discov.* 2010, 5(11):1031-1037.

⁵⁷ Morgan T: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clin Pharmacokinet.* 1994, 26(5):335-346.

⁵⁸ Stahl E, Mutschler E, Baumgartner U, Spahn-Langguth H: Carvedilol stereopharmacokinetics in rats: affinities to blood constituents and tissues. *Arch Pharm (Weinheim).* 1993, 326(9):529-533.



Rycina 11. Przykładowe wykresy Scatcharda dla wiązania 2F109 (A), ANBL (B) oraz TWo8 (C) z AGP (25 μM).

3.6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Badania nad potencjalnym lekiem mają na celu nie tylko ocenę jego działania farmakodynamicznego i toksycznego, ale także pełne poznanie profilu farmakokinetycznego, co związane jest z określeniem zdolności wchłaniania leku z miejsca podania, penetracji do miejsca działania, określenia dróg wydalania, oszacowania szybkości eliminacji, identyfikacji metabolitów, badania stabilności metabolicznej, wyznaczenia stopnia wiązania leku z białkami krwi, a więc pozyskania wiedzy niezbędnej do opracowywania schematów dawkowania danego leku. Istotne jest także badanie leków i ich metabolitów w aspekcie ich struktury przestrzennej, zwłaszcza jeśli antypody te różnią się między sobą siłą działania farmakodynamicznego, a charakterystyka profilu fizykochemicznego pozwala na przewidywanie zachowania się cząsteczki w złożonym środowisku biologicznym.

Przeprowadzone badania, opisane w ramach rozprawy habilitacyjnej stanowią fragment wczesnych badań przedklinicznych wykonywanych dla nowych związków, potencjalnych kandydatów na leki o udokumentowanej aktywności β -adrenolitycznej u szczurów. Celem tych badań było oszacowanie profilu farmakokinetycznego postaci racemicznych nowych analogów, wyznaczenie ich bezwzględnej dostępności biologicznej, potwierdzenie liniowości farmakokinetyki w zakresie stosowanych dawek badanych substancji, identyfikacja i ustalenie struktury potencjalnych metabolitów, oszacowanie stopnia wydalania nerkowego oraz wyznaczenie stopnia wiązania badanych związków z białkami krwi.

Z uwagi na fakt, iż wszystkie związki stanowiące przedmiot badania są strukturami chiralnymi, oceniono ich zachowanie w organizmie zwierząt w kierunku potwierdzenia lub wykluczenia farmakokinetyki enancjoselektywnej. Celem wyjaśnienia zjawiska enancjoselektywności wykonano badania w kierunku enancjoselektywnego wiązania tych analogów z białkami krwi.

Badania te pozwoliły na ocenę dystrybucji enancjomerów badanych związków w organizmie szczura, który to proces zależy od wielu czynników, m. in. od stopnia wiązania substancji z białkami krwi, stopnia jej wychwytu przez tkanki, szybkości przepływu krwi przez tkanki, właściwości kwasowo-zasadowych oraz od cech hydrofilowo-hydrofobowych związków. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły oparte na budowie chemicznej związków założenia o ich charakterze zasadowym. Pod względem właściwości kwasowo-zasadowych, badane analogi zbliżone są do karwedilolu, natomiast w aspekcie charakteru hydrofilowo-hydrofobowego podobne są do pindololu.

Stosując technikę LC/MS/MS podjęte badania pozwoliły na opracowanie szybkich i selektywnych metod oznaczania ilościowego badanych analogów (2F109, ANBL, TWo8), zarówno ich form racemicznych, jak i pojedynczych enancjomerów i mogą służyć jako metody modelowe do oznaczania innych substancji o podobnej strukturze.

Zastosowanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas pozwoliło również na opracowanie strategii umożliwiającej identyfikację, ustalenie budowy strukturalnej i względne oznaczanie ilościowe metabolitów nowych związków, bez dostępu do substancji wzorcowych, których

synteza, szczególnie w przypadku metabolitów, nie zawsze jest możliwa, z uwagi na czasochłonność i wysokie koszty.

Opracowane, selektywne metody analizy ilościowej badanych pochodnych oraz zidentyfikowanych metabolitów, pozwalają na wstępne oszacowanie podatności związków macierzystych na biotransformację, co jest niezwykle istotne przed wprowadzeniem związku do dalszych etapów badań lub jego wczesnym wycofaniem z badań. Strategia ta może być pomocna w kontekście wyboru substancji do dalszych badań lub projektowania leków o korzystnych właściwościach farmakokinetycznych.

Podjęte badania nad enancjoselektywną oceną profilu farmakokinetycznego nowych związków, wyznaczeniem stopnia ich wiązania z białkami krwi oraz charakterystyką fizykochemiczną, umożliwią twórcom nowych leków, specjalizującym się w technikach modelowania molekularnego oraz w syntezie chemicznej, na projektowanie nowych struktur o potencjalnym działaniu β -adrenolitycznym.

Na podstawie otrzymanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

- Chiralna struktura badanych analogów wymaga dostępu do czułych i selektywnych technik analitycznych, spośród których uniwersalną jest połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją masową, umożliwiającą oznaczanie wielu związków w jednej próbce, z wysoką czułością, również niskich stężeń poszczególnych enancjomerów, zarówno ich postaci związanych, jak i wolnych (nie związanych) z białkami krwi, w złożonych matrycach biologicznych: surowica, mocz, kał, homogenaty tkankowe i mikrosomach wątroby szczura.
- Chromatografia chiralna jest niezbędnym narzędziem do oceny enancjoselektywnej farmakokinetyki leków racemicznych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.
- Enancjoselektywny charakter farmakokinetyki badanych związków wymaga, do oceny ich profilu farmakokinetycznego, uwzględnienia stężeń poszczególnych enancjomerów, szczególnie w aspekcie uściślenia zależności pomiędzy dawką związku, a wywoływanym efektem.
- Otrzymane, aktywne struktury, pozwalają na dalszy rozwój tej grupy związków przy równoczesnym polepszeniu profilu farmakokinetycznego następnych analogów, szczególnie parametrów gwarantujących zwiększenie dostępności biologicznej oraz eliminację zjawiska nieliniowości.
- Zrealizowane badania mogą być przydatne w racjonalnym projektowaniu nowych analogów, zwiększając możliwość osiągnięcia sukcesu w procesie poszukiwania nowych leków, również w aspekcie korzystnych cech fizykochemicznych.
- Wyniki badań otwierają nowy, istotny w kontekście badań farmakokinetycznych, obszar wykorzystania wysokorozdzielczej spektrometrii mas w kierunku śledzenia ścieżek metabolizmu nowych potencjalnych leków - umożliwiając identyfikację i ustalanie budowy strukturalnej metabolitów, zarówno I jak i II fazy biotransformacji, bez dostępu do substancji wzorcowych tych metabolitów.
- Wszystkie opracowane i zwalidowane metody bioanalityczne oznaczania badanych analogów achiralnych i chiralnych z zastosowaniem systemu LC/MS/MS, zostaną wykorzystane w planowanych, dalszych etapach badań, których celem będzie określenie stabilności

metabolicznej badanych analogów, identyfikacja i oszacowanie aktywności izoenzymów cytochromu P450 zaangażowanych w metabolizm tych pochodnych oraz badanie roli transporterów błonowych w procesie wchłaniania tych związków.

4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

4.1. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Farmakokinetyka kliniczna leków wywodzących się z takich grup terapeutycznych jak leki przeciwartymiczne, przeciwnadciśnieniowe, antybiotyki aminoglikozydowe oraz leki przeciwnowotworowe stanowiły wiodącą tematyką badawczą jaką realizowałam w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej UJ CM (poprzednio Zakład Chemii Fizycznej) przed uzyskaniem stopnia doktora.

W początkowym okresie kontynuowałam badania jakie podjęłam w związku z realizacją pracy magisterskiej, dotyczące zagadnień zastosowania populacyjnych metod do indywidualizacji farmakoterapii antybiotyków aminoglikozydowych u chorych z ciężkimi postaciami zakażeń wywołanych bakteriami Gram (-). Antybiotyki aminoglikozydowe stanowią modelową grupę, których skuteczność terapeutyczna oraz niepożądane działania toksyczne są ściśle związane z ich stężeniem we krwi. W badaniach tych skoncentrowano się na ocenie różnicującej wartości stężeń minimalnych i maksymalnych mierzonych w surowicy chorych w stanie stacjonarnym celem optymalizacji dawkowania gentamycyny i tobramycyny metodą Bayesa zastosowaną w farmakokinetyce przez Shainera i wsp.⁵⁹

U każdego z badanych chorych oznaczano w surowicy stężenia minimalne (C_{min}^{ss}) i maksymalne (C_{max}^{ss}) w stanie stacjonarnym, w drugiej dobie leczenia metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA, Abbott).⁶⁰ Na podstawie znajomości populacyjnych parametrów farmakokinetycznych uzyskanych z wcześniejszych badań własnych, danych demograficznych (wiek, płeć, masa ciała) chorych oraz pomiaru jednego lub dwóch stężeń leku w surowicy obliczano podstawowe parametry farmakokinetyczne (klirens, objętość dystrybucji) leku u indywidualnego chorego. Parametry te w następnym etapie badań służyły do modyfikacji dawki, przedziału dawkowania lub przewidywania stężeń leku w grupie tych samych chorych po określonym dawkowaniu.

Uzyskane wyniki pozwoliły na większą precyzję w przewidywaniu stężeń w surowicy chorych po zastosowaniu do obliczeń stężeń minimalnych. Korelacja między stężeniami przewidywanymi teoretycznie, a zmierzonymi była istotna ($R = 0.653$ dla C_{max}^{ss} i $R = 0.891$ dla C_{min}^{ss}). Można więc wnioskować, że w aspekcie bezpieczeństwa leczenia indywidualizacja dawkowania gentamycyny i tobramycyny na podstawie stężeń minimalnych w znacznie większym stopniu zapewniała

⁵⁹ Sheiner L, Beal S: Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokin Biopharm.* 1981, 9(4):503-512.

⁶⁰ White LO, Holt HA, Reeves DS, MacGowan AP: Evaluation of Innofluor fluorescence polarization immunoassay kits for the determination of serum concentrations of gentamicin, tobramycin, amikacin and vancomycin. *lesassays@ukneqasaa.win-uk.net. J Antimicrob Chemother.* 1997, 39(3):355-361.

żądane stężenie antybiotyku w surowicy chorego, a tym samym ograniczała występowanie działania toksycznego tych leków. Badania te przyczyniły się do opracowania schematu dawkowania gentamycyny i tobramycyny u chorych poprawiającego bezpieczeństwo i skuteczność leczenia. Badanie to pozwoliło na ocenę skuteczności optymalizacji dawkowania antybiotyków aminoglikozydowych na podstawie zintegrowanych badań klinicznych i farmakokinetycznych [A1].

W swojej działalności badawczej wiele uwagi poświęciłam opracowaniu i walidacji odpowiednich metod analitycznych stanowiących podstawowe narzędzie w badaniach farmakokinetycznych, decydujących o jakości i rzetelności tych badań. Z uwagi na fakt, że badania farmakokinetyczne prowadzone na materiale klinicznym dotyczą bardzo niskich stężeń analizowanych związków, a w przypadku stosowania politerapii stwarzają konieczność oznaczania w jednej analizowanej próbce kilku analitów równocześnie, z tych względów istnieje potrzeba dysponowania odpowiednio czułą, specyficzną i selektywną metodą analityczną. Należy również uwzględnić założenie, że wyniki tych badań muszą być użyteczne w klinice, dlatego oznaczenia powinny trwać w miarę krótko. Ponadto u podstaw badań farmakokinetycznych leży konieczność pomiaru w materiale biologicznym nie tylko stężenia leku macierzystego, ale bardzo często także jego aktywnych farmakologicznie metabolitów. ⁶¹

Jednym z tego typu badań było opracowanie metody jednoczesnego oznaczania amiodaronu i jego aktywnego farmakologicznie metabolitu desetyloamiodaronu techniką HPLC z detekcją UV-Vis u chorych z zaburzeniami rytmu serca. Dla potrzeb optymalizacji leczenia, lek macierzysty i metabolit oznaczano w próbkach krwi chorych pobieranych bezpośrednio przed przyjęciem porannej dawki leku (C_{min}^{ss}). Opracowana metoda cechowała się odpowiednią dokładnością (89.5 - 111.3%), precyzją (7.3 - 14.2%) oraz czułością (15 ± 1.2 ng/mL) wymaganą dla metod bioanalitycznych, zadawalającą w oznaczeniach rutynowych, realizowanych dla potrzeb kliniki. Wyniki tych badań pozwoliły na dostrzeżenie ważnego z klinicznego punktu widzenia zjawiska kumulacji leku macierzystego i jego metabolitu, wpływając na bezpieczeństwo stosowania tego leku. Uwzględnienie analizy farmakokinetycznej pozwoliło na racjonalny dobór dawki leku, zapewniającej pożądane jego stężenie we krwi. W efekcie końcowym zmniejszono liczbę chorych, u których lek nie wykazywał dostatecznego efektu klinicznego, jak również zmniejszono odsetek chorych, u których mogły pojawić się efekty niepożądane [A2].

Ważną problematyką podjętą przeze mnie była ocena względnej dostępności biologicznej hydroksymocznika z preparatu Hydroxycarbamid, produkowanego przez Krakowskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfarm”. W badaniu tym jako preparat referencyjny zastosowano Hydrea (Squibb, USA). Preparat badany i referencyjny w dawce 2000 mg podawano jednorazowo chorym z przewlekłą białaczką granulocytową stosując metodę krzyżową. Stężenie leku w próbkach krwi oznaczano metodą spektrofotometryczną ($\lambda = 540$ nm) polegającą na utlenianiu hydroksymocznika do azotynu, połączeniu go w reakcji dwuazowania z kwasem sulfanilowym, a

⁶¹ Marzo A. Development steps of pharmacokinetics: a perspective on bioanalytical methods and bioequivalence. *Curr Clin Pharmacol*. 2012, 7(4):328-332.

następnie sprzęganiu otrzymanego produktu z naftylem. W badaniu stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic ($p < 0.05$) pomiędzy średnimi wartościami parametrów określających dostępność biologiczną hydroksymocznika przy stosowaniu preparatu Hydroxycarbamid oraz odpowiednika zagranicznego, preparatu Hydrea, uznanego za referencyjny, co stanowiło podstawę do uznania obydwu preparatów za biologicznie równoważne. Tego typu badania są niezbędne dla przemysłu farmaceutycznego, gdyż pozwalają na otrzymanie odpowiedniej jakości leków generycznych, a kształtując rynek farmaceutyczny umożliwiają racjonalizowanie ekonomii leczenia [A3].

W dalszych etapach działalności naukowej skoncentrowałam się na ocenie profilu farmakokinetycznego acebutololu (AC) i jego aktywnego farmakologicznie metabolitu diacetololu (DC) u chorych z nadciśnieniem tętniczym. Projekt ten realizowano we współpracy z I Kliniką Kardiologii UJ CM. Celem tych badań była ocena profilu farmakokinetycznego zarówno formy racemicznej leku i jego metabolitu, jak również ich izomerów optycznych w organizmie chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Zagadnienia te stały się wiodącym tematem mojej pracy doktorskiej.

W pierwszym etapie badań opracowano metodę pozwalającą na ilościowe oznaczanie acebutololu i diacetololu w formie racemicznej w surowicy chorych z zastosowaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis. W badaniu tym przy założeniu otwartego modelu jednokompartimentowego obliczono podstawowe parametry farmakokinetyczne AC i DC. Uzyskane wyniki wykazały, że profile farmakokinetyczne acebutololu oraz jego aktywnego metabolitu diacetololu różniły się istotnie. Okres półtrwania diacetololu był czterokrotnie większy w porównaniu z lekiem macierzystym, co potwierdza wolniejszą jego eliminację. Stężenie maksymalne metabolitu było dwukrotnie większe od związku macierzystego, natomiast pole pod krzywą stężenie-czas dla DC było sześciokrotnie większe w porównaniu z AC. W badaniu tym na podstawie narastającego stosunku stężeń DC/AC wykazano kumulację metabolitu w porównaniu z lekiem macierzystym. Wyniki tych badań pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmu i czasu działania acebutololu dzięki stwierdzeniu obecności wolno metabolizującego się diacetololu [A4].

Pomiary stężenia acebutololu oraz jego metabolitu wykorzystano w procesie modelowania efektu farmakologicznego tego leku z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych (Matlab).⁶² W badaniu tym przewidywano stężenie DC na podstawie pomiarów stężenia AC, znajomości przedziału dawkowania leku oraz danych demograficznych chorych [A5].

W ramach prowadzonych badań opracowano również metody pozwalające na oznaczanie enancjomerów acebutololu i jego aktywnego farmakologicznie metabolitu diacetololu z zastosowaniem techniki HPLC z detekcją UV-Vis i spektrofлуorymetryczną. Badania te oparto na założeniu, że enancjomery leków, które podawane są w formie racemicznej wprowadzone do środowiska chiralnego, jakim jest ludzki organizm działają jako dwa różne związki wykazujące

⁶² Veng-Pedersen P, Modi NB: Application of neutral networks to pharmacodynamics. *J Pharm Sci.* 1993, 82(9):918-926.

odmienne właściwości biologiczne. Różnice te są wynikiem interakcji enancjomerów z optycznie aktywnymi receptorami, białkami i enzymami, czego efektem jest zróżnicowanie procesów farmakokinetycznych, takich jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, eliminacja oraz wiązanie z białkami krwi.⁶³

Izomery optyczne badanych związków rozdzielano bezpośrednio na kolumnie chiralnej Chiralpak AD (25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm) lub oznaczano pośrednio na kolumnie Supelcosil LC-Si (25 cm x 4.6 mm I.D., 5 µm) jako diastereoizomery po wcześniejszej derywatacji 1-(1-naftylo)etylo-izocyjanianem (NEIC). W badaniu porównano przydatność obu metod do oznaczania enancjomerów badanych związków w surowicy chorych, wykazano równocześnieść tych metod w aspekcie czułości, powtarzalności, precyzji oznaczeń i przydatności dla celów rutynowych oznaczeń próbek klinicznych [A6].

W efekcie końcowym wyznaczono profil farmakokinetyczny enancjomerów acebutololu i jego metabolitu diacetololu u chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Obserwowane zarówno w osoczu, jak również pełnej krwi wartości stężeń stacjonarnych enancjomerów (-)-(S)-AC oraz (-)(S)-DC były wyższe w porównaniu do stężeń formy (+)-(R)-AC i (+)-(R)-DC. Enancjoselektywny charakter dyspozycji acebutololu i diacetololu w organizmie badanych chorych mógł stanowić przyczynę międzyosobniczych różnic w ocenie zależności pomiędzy dawką leku a obserwowanym efektem po podaniu leku racemicznego.

Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w 6 pracach (ZAŁĄCZNIK A) oraz były tematem 18 doniesień prezentowanych w postaci referatów oraz plakatów na 5 konferencjach międzynarodowych oraz 13 zjazdach krajowych (ZAŁĄCZNIK B).

ZAŁĄCZNIK A - PRACE OPUBLIKOWANE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

A1. Śnieżek-Maciejewska M, Kawecka-Jaszcz K, Kochman J, Czarnecka D, Szymura-Oleksiak J, Walczak M, Witek J: Leczenie amiodaronem opornych zaburzeń rytmu serca pod kontrolą stężenia leku we krwi. *Probl Ter Monitor* 1993, 4(3):110-116.

A2. Szymura-Oleksiak J, Walczak M, Jawień W, Kurek E: Zastosowanie farmakokinetyki populacyjnej w optymalizacji dawkowania antybiotyków aminoglikozydowych. *Probl Ter Monitor* 1994, 5(1):3-9.

A3. Witek J, Walczak M, Szymura-Oleksiak J, Jeziorek A, Skotnicki A: Dostępność biologiczna hydroksymocznika z kapsułek Hydroxycarbamid. *Farm Pol* 1996, 52(21):1016-1019.

A4. Kochman J, Baciór B, Grodecki J, Kawecka-Jaszcz K, Szymura-Oleksiak J, Walczak M, Bury J: Ocena hipotensyjnego działania acebutololu na podstawie 24-godzinnej monitorowania ciśnienia tętniczego, wskaźnika t/p i stężenia leku w surowicy. *Probl Ter Monitor* 1996, 7(2):67-72.

A5. Jawień W, Walczak M: Modelling of pharmacological effect with neural networks. *Comp Med* 1997, 4(1):166-169.

⁶³ Campo VL, Bernardes LS, Carvalho I: Stereoselectivity in drug metabolism: molecular mechanisms and analytical methods. *Curr Drug Metab.* 2009, 10(2):188-205.

A6. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Bojarski J, Aboul-Enein HY: Enantioselective high performance liquid chromatographic assay of acebutolol and its active metabolite diacetolol in human serum. *Chirality* 1999, 11(4):267-271.

IF₁₉₉₉ = 1.327

ZAŁĄCZNIK B - STRESZCZENIA KONFERENCYJNE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Konferencje międzynarodowe

B1. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Cios A, Bacior B, Kawecka-Jaszcz K: Estimation of the pharmacokinetics of acebutolol and diacetolol in patients with hypertension. Role of red blood cell partitioning. 1th Congress of European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Paryż, Francja 1995.

B2. Kawecka-Jaszcz K, Bacior B, Kochman J, Grodecki J, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Bury J: Trough/peak ratio in the assessment of the hypotensive effect of acebutolol. XI Congress of American Society of Hypertension, Nowy Jork, USA 1996. *Am J Hypertens* 1996, 9(4).

B3. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bacior B, Kochman J, Kawecka-Jaszcz K: Steady-state serum concentrations of acebutolol and its enantiomers in patients with hypertension. 26th European Symposium on Clinical Pharmacy, Tours, Francja 1997.

B4. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Bojarski J, Aboul-Enein HY: Enantioselective high-performance liquid chromatographic assay of acebutolol and its metabolite in human blood serum. 22nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, St. Luis, Missouri, USA 1998.

B5. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bacior B, Kochman J, Kawecka-Jaszcz K: Pharmacokinetics of acebutolol and diacetolol enantiomers in patients with hypertension. VII World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics & 4th Congress of European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics. British Journal of Clinical Pharmacology, Florencja, Włochy 2000.

Konferencje krajowe

B6. Szymura-Oleksiak J, **Szot M (Walczak M)**, Jawień W, Czapiński P: Zastosowanie populacyjnych parametrów farmakokinetycznych w optymalizacji dawkowania antybiotyków aminoglikozydowych. I Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Wenecja k/Żnina 1991.

B7. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J: Badanie wiązania amiodaronu z białkami osocza. II Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Międzyzdroje 1992.

B8. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Wyska E, Jawień W: Ocena farmakokinetycznych metod indywidualizacji dawkowania antybiotyków aminoglikozydowych. XV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Warszawa 1992.

B9. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Bury J, Bacior B, Kawecka-Jaszcz K: Farmakokinetyka acebutololu i diacetololu w surowicy chorych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. III Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Łódź 1993. *Probl Ter Monitor* 1993, 4(4):179-180.

B10. Witek J, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Jeziorek A, Skotnicki A: Farmakokinetyka kliniczna hydroksymocznika u chorych z przewlekłą białaczką szpikową. Seminarium Naukowe „Terapeutyczne monitorowanie leków istotnym postępowaniem farmakoterapii”, Poznań 1993. *Probl Ter Monitor* 1993, 4(3):154.

- B11. Bacior B, Kawecka-Jaszcz K, Kochman J, Grodecki J, **Walczak M**, Bury J, Szymura-Oleksiak J: Działanie hipotensyjne i farmakokinetyka acebutololu i diacetololu u chorych z nadciśnieniem tętniczym. 55 Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Poznań 1994. *Kardiol Pol* 1994, 41:121.
- B12. Kochman J, Bacior B, Grodecki J, Kawecka-Jaszcz K, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**: Parametry 24-godzinnego monitorowania ciśnienia tętniczego w ocenie leczenia hipotensyjnego acebutololem. IV Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Kraków 1995.
- B13. **Walczak M**, Bury J, Cios A, Szymura-Oleksiak J, Kochman J, Bacior B, Grodecki J, Kawecka-Jaszcz K: Wpływ dawkowania acebutololu na farmakokinetykę acebutololu i diacetololu w osoczu chorych z nadciśnieniem tętniczym. IV Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Kraków 1995.
- B14. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bojarski J: Stereoselektywne oznaczanie acebutololu i diacetololu w surowicy krwi techniką HPLC Konferencja Naukowo - Szkoleniowa Towarzystwa Terapii Monitorowanej „Rola metabolizmu leków w terapii monitorowanej”, Warszawa 1996.
- B15. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bacior B, Kochman J, Kawecka-Jaszcz K: Znaczenie aktywnego metabolitu w modelowaniu farmakokinetyczno-farmakodynamicznym acebutololu. V Ogólnopolski Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Łódź 1997. *Probl Ter Monitor* 1997, 8(4):132.
- B16. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bacior B, Kochman J, Szot WM, Kawecka-Jaszcz K: Stężenia stacjonarne enancjomerów acebutololu i diacetololu w surowicy chorych z nadciśnieniem tętniczym. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, Kraków 1998.
- B17. Witek J, **Walczak M**, Jureczek K, Szymura-Oleksiak J, Sacha T, Skotnicki A: Analiza stężeń hydroksymocznika u chorych z przewlekłą białaczką szpikową. XVII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Kraków 1998.
- B18. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J: Stereoselektywne oznaczanie acebutololu i diacetololu w surowicy krwi metodą HPLC z zastosowaniem detekcji spektrofлуorymetrycznej. VI Ogólnopolski Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Wrocław 1999.

4.2. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po uzyskaniu stopnia doktora rozpoczęłam działalność, której zadaniem w pierwszym etapie było wypracowanie metodyk z zakresu farmakokinetyki eksperymentalnej z udziałem małych zwierząt laboratoryjnych oraz nowoczesnych technik separacyjnych. W pierwszym etapie, prace dotyczyły oceny profilu farmakokinetycznego oraz dyspozycji do tkanek pentoksyfiliny (PTX) i jej aktywnego farmakologicznie metabolitu lizofiliny (-)-(R)-M1 u szczurów. W tym celu opracowano metodę jednoczesnego oznaczania leku macierzystego i metabolitu w surowicy i wybranych tkankach szczura z zastosowaniem metody HPLC z detekcją UV-Vis. Badane związki oznaczano na kolumnie chiralnej Chiralpak AD (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 mm) stosując jako fazę ruchomą mieszaninę heksanu i 2-propanolu (84:16, v/v) z dodatkiem 0.01% dietyloaminy. Dla wszystkich badanych związków uzyskano zadawalającą czułość oznaczeń równą 10 ng/mL, w zakresie liniowości 0.01 - 100 µg/L. W badaniach tych wykazano istotne statystycznie różnice ($p < 0.05$) pomiędzy stężeniami PTX, (-)-(R)-M1 i (+)-(S)-M1 obserwowanymi w surowicy i tkankach szczura, wskazujące na stereoselektywny charakter dyspozycji aktywnego farmakologicznie metabolitu M1 pentoksyfiliny. Badania wykazały ponadto, że wątroba nie jest jedynym miejscem

metabolizmu badanego leku, a proces ten może zachodzić także w erytrocytach lub w płucach badanych zwierząt. Wyniki tych badań zostały opublikowane [C3].

Warunkiem oceny farmakokinetyki leku jest dostęp do odpowiedniej metody analitycznej, pozwalającej w sposób rzetelny i zgodny z wymogami procedur GLP na oznaczanie stężenia leku w materiale biologicznym. Znaczącą rolę w udoskonalaniu mojego warsztatu badawczego odegrały prace z zastosowaniem systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją masową (LC/MS/MS). Do zalet tej techniki należy zaliczyć wysoką specyficzność, selektywność i czułość oznaczeń, co ma istotne znaczenie podczas podawania zwierzętom niskich dawek leku, oznaczania niskich stężeń związków oraz ich metabolitów, w szczególności izomerów optycznych oraz wolnej, nie związanej z białkami frakcji leku, jak również dysponowania niewielką objętością badanych próbek biologicznych.⁶⁴

Korzystając z tej nowoczesnej, wysoko przepustowej techniki analitycznej opracowywałam metody pozwalające na równoczesne oznaczanie wielu związków w jednej próbce, w złożonych matrycach biologicznych. Pierwsza z metod dotyczyła jednoczesnego oznaczania propentofiliny (PPF) i jej chiralnego metabolitu hydroksypropentofiliny (M1) w surowicy oraz w homogenatach wybranych struktur mózgu szczura. Z uwagi na fakt, że farmakokinetyka PPF nie jest dokładnie poznana, a dostępne dane nie są spójne metodę tą zastosowano do oszacowania profilu farmakokinetycznego PPF oraz jej metabolitu, ze szczególnym uwzględnieniem mózgu jako miejsca działania leku. W badaniu wyznaczono współczynnik wychwytu do mózgu leku macierzystego oraz enancjomerów jej aktywnego metabolitu na podstawie stosunku pola pod krzywą stężenie-czas (AUC) w mózgu do AUC w surowicy. Dzięki zastosowaniu w przeprowadzonych badaniach do oznaczeń substancji techniki LC/MS/MS możliwe było podawanie niskich dawek PPF, oznaczanie całkowitych stężeń leku i metabolitu oraz ich frakcji wolnej, nie związanej z białkami, jak również enancjomerów chiralnego metabolitu. Otrzymane wyniki przyczyniły się do zrozumienia mechanizmu działania PPF oraz wyjaśnienia roli metabolitów w ocenie profilu farmakokinetycznego tego leku, ze szczególnym uwzględnieniem dystrybucji leku do tkanki mózgowej szczura. Ponadto badania te pozwoliły na ocenę korelacji pomiędzy wolną frakcją tego leku w krwi badanych zwierząt, a jego stężeniem oznaczanym w mózgu. Zrealizowanie tych badań zaowocowało publikacją [C6].

Zdobyte doświadczenia w zakresie rozdziału związków chiralnych wykorzystywałam w dalszej pracy, m.in. do oceny czystości enancjomerycznej nowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym, pochodnych ksantonu otrzymanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, jak również pochodnych *trans*- lub *cis*-2-(2,6-dimetylofenoksy)-*N*-(2-lub 4-hydroksycykloheksylo)acetamidu zsyntetyzowanych z Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM, pochodnych *trans*- lub *cis*-2,6-dimetylofenoksyacetylowych z ugrupowaniem 2- i 4-aminocyklohexanolowym w ramach współpracy z Zakładem Biochemii Farmaceutycznej UJ CM oraz pochodnych aminopropan-2-ol w

⁶⁴ Liang Y, Wang G, Xie L, Sheng L: Recent development in liquid chromatography/mass spectrometry and emerging technologies for metabolite identification. *Curr Drug Metab.* 2011,12(4), 329-344.

ramach współpracy z Katedrą Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym [C1, C2, C7, C18].

Istotny wkład w poszerzenie mojego warsztatu naukowego miała również współpraca z zespołem Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UJ CM, z którym prowadziłam badania nad oceną stabilności leków wywodzących się z różnych grup farmakologicznych. W badaniach tych oceniano wpływ warunków stresowych, takich jak środowisko kwaśne, podwyższona temperatura, promieniowanie UV, dodatek soli Cu(II), Zn(II), Al(III) oraz Fe(III) na stabilność antybiotyków fluorochinolowych (ciprofloksacyna, norfloksacyna, moksifloksacyna), azytromycyny, betaksololu, anksjolityków i neuroleptyków (klonazepam, diazepam, haloperidol, doksepina, fluoksetyna) oraz oceniano kinetykę i termodynamikę zachodzących reakcji. W ramach współpracy zajmowałam się identyfikacją i ustalaniem struktury produktów degradacji badanych leków z zastosowaniem opracowanych oryginalnych metod LC/MS/MS. Otrzymane wyniki miały istotne znaczenie w ocenie stabilności i jakości badanych leków, szczególnie w aspekcie ich czystości. Wyniki tych badań zaowocowały ukazaniem się siedmiu publikacji o zasięgu międzynarodowym [C4, C8, C10, C11, C12, C15, C16].

Ważnym elementem pogłębiającym moje doświadczenie w pracy badawczej była współpraca z zespołem naukowym Zakładu Farmakologii Doświadczalnej Katedry Farmakologii UJ CM. W ramach tej współpracy rozwinęłam zainteresowania badawcze koncentrujące się na problematyce oznaczania ilościowego biomarkerów układu sercowo-naczyniowego, pełniących swoistą rolę w regulacji procesów śródbłonkowych, odgrywających ważne znaczenie w diagnostyce licznych schorzeń przebiegających z dysfunkcją tego narządu. Odkrycie funkcji i znaczenia specyficznych biomarkerów przyczyniło się do zwiększenia skuteczności leczenia wielu chorób cywilizacyjnych, takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca i choroby nowotworowe.⁶⁵

W ramach tej współpracy opracowałam i zwalidowałam metodę oznaczania endoteliny-1 (ET-1) w osoczu, efluentach z krążenia płucnego izolowanego płuca szczura, homogenacie płuc i cytozolu płuc szczura techniką LC/ESI-MS/MS. Rozdział chromatograficzny tego peptydu przeprowadzono na kolumnie XTerra MS C18 (3 cm, 3.5 µm, Waters, Irlandia) stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem 0.01% kwasu mrówkowego.

Endotelina-1 jest związkiem o masie cząsteczkowej 2492 Da. Zastosowany do jej oznaczenia detektor masowy posiada zdolność oznaczania związków w zakresie mas od 50 do 1800 Da. Z uwagi na fakt, że jest to peptyd zdolny do przyłączenia wielu protonów, dlatego też występuje w formie jonów dwukrotnie $[M+2H]^{2+}$ i trzykrotnie $[M+3H]^{3+}$ naładowanych, odpowiednio o masach m/z 1247 oraz m/z 832. Do analizy ilościowej wykorzystano jon trzykrotnie naładowany o masie m/z 832 oraz jego fragmenty o największej intensywności, odpowiednio o masach m/z 318 oraz m/z 243.

⁶⁵ Gram AS, Skov J, Thorkil Ploug, Sidelmann JJ, Stallknecht BM, Bladbjerg EM. Biomarkers of coagulation, fibrinolysis, endothelial function, and inflammation in arterialized venous blood. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print].

Walidację metody oznaczania ET-1 w badanych matrycach szczura przeprowadzono zgodnie z wytycznymi FDA oraz ICH wyznaczając takie parametry jak specyficzność, selektywność, LLOD, LLOQ, precyzję, dokładność, odzysk oraz oceniono nowy parametr istotny w aspekcie oznaczeń z zastosowaniem systemu LC/ESI-MS/MS, jakim jest efekt matrycy. Przyjęty w badaniu tryb śledzenia wybranych reakcji fragmentacji zapewniał wysoką specyficzność i selektywność oznaczeń w stosunku do badanego peptydu. Granica wykrywalności dla ET-1 była równa 5 ng/mL ($S/N=4$), natomiast granica oznaczalności dla tego peptydu wynosiła 10 ± 1.2 ng/mL.

Po zakończeniu procedury walidacyjnej wykonano oznaczenia stężeń ET-1 w efluentach z krążenia płucnego izolowanego ptuła szczura, u którego wywołano nadciśnienie płucne podaniem monokrotalinu. Celem tych oznaczeń było potwierdzenie, że opracowana metoda może zostać wykorzystana w badaniach eksperymentalnych. Badania ilościowe biomarkerów należą w chwili obecnej do wiodących analiz, gdyż umożliwiają konstrukcję odpowiednich modeli farmakokinetyczno-farmakodynamicznych (PK/PD), pozwalają na wyjaśnianie patogenezы danego schorzenia, mechanizmu działania leku oraz optymalizację leczenia. Wyniki tych badań zostały opublikowane [C5] i posłużyły jako punkt wyjścia do dalszych badań realizowanych w ramach projektu POIG 1.1.2.

W ramach współpracy z Kliniką Neonatologii Szpitala Uniwersyteckiego UJ CM prowadziłam badania nad oceną wpływu suplementacji preparatami zawierającymi kwas cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy (DHA) na zapobieganie spadkowi stężenia DHA w pierwszych tygodniach po urodzeniu u wcześniaków z bardzo małą urodzeniową masą ciała. Dzieci otrzymywały w żywieniu pozajelitowym od pierwszej doby życia emulsję tłuszczową opartą na oleju rybim. W badaniach tych zajmowałam się oznaczaniem stężenia DHA w osoczu i erytrocytach krwi noworodków korzystając z opracowanej oryginalnej metody oznaczania tego związku z zastosowaniem systemu LC/ESI-MS/MS. Rozdział chromatograficzny związków prowadzono na kolumnie Zorbax Eclipse XDB C8 (150 mm x 4.5 mm, 5 μ m, Agilent) stosując jako fazę ruchomą acetonitryl i wodę (80:20 v/v) z dodatkiem 10 mmol/L octanu amonu. Oznaczenia wykonywano w warunkach izokratycznych, z szybkością przepływu fazy 800 μ L/min. Związek badany oraz standard wewnętrzny oznaczano w jonizacji ujemnej, w trybie śledzenia wybranych jonów macierzystych m/z 327.5 dla DHA oraz m/z 341.5 dla standardu wewnętrznego (kwas cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy-21,21,22,22,22-d₅). Opracowana metoda pozwoliła na rutynowe oznaczanie stężenia DHA w osoczu i erytrocytach krwi noworodków. Wyniki tych badań posłużyły do optymalizacji dawkowania DHA, wpływając na rozwój i przeżycie dzieci przedwcześnie urodzonych. Wyniki tych badań zostały opublikowane [C9. C17]. W kolejnym etapie badań metodę wzbogacono poprzez jednoczesne oznaczanie kwasu cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenowego (EPA).

Moje zainteresowania badawcze nad wykorzystaniem wysoko przepustowych technik separacyjnych do oceny ilościowej związków poszerzyłam o technikę elektroforezy kapilarnej. To nowoczesne rozwiązanie analityczne zaliczane jest do technik uniwersalnych, gdyż umożliwia oznaczanie substancji o różnych właściwościach fizykochemicznych, w złożonych matrycach biologicznych, wykorzystując niewielką objętość próbki i niewielkie objętości odczynników. W

ramach zadań badawczych projektu POIG 1.1.2 uczestniczyłam w badaniach wiązania leku modelowego, deksametazonu (DXM), z albuminą wołową (BSA) oraz ludzką (HSA) z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie frontalnym (CE/FA) oraz dializy równowagowej (ED), jako metody referencyjnej w tego typu badaniach. Badania prowadzono w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w buforze fosforanowym o pH = 7.4 oraz sile jonowej $i = 0.17$. W badaniu tym wyznaczono korzystając z obu metod stopień wiązania leku z HSA równy odpowiednio $87.18 \pm 2.6\%$ i $82.5 \pm 4.8\%$ przy zastosowaniu metody ED oraz CE/FA, natomiast stopień wiązania z BSA wynosił 74.67 ± 5.2 i 71.96 ± 6.6 , odpowiednio przy zastosowaniu ED oraz CE/FA. W badaniu niezależnie od użytej techniki wyznaczono dla obu białek jedną klasę miejsc wiążących oraz w zależności od użytej metody 4 lub 5 miejsc wiążących na HSA i 3 miejsca wiążące na BSA. Badanie to pozwoliło na ocenę międzygatunkowych różnic w procesie wiązania DXM z białkami krwi oraz na weryfikację przydatności elektroforezy kapilarnej jako szybkiej metody skryningowej do oceny wiązania leków z białkami krwi. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy [C13].

W ramach realizacji zadań badawczych projektu POIG 1.1.2 uczestniczyłam w ocenie profilu farmakokinetycznego 1,4-dimetylopirydyny, związku o potencjalnym działaniu śródbłonkowym, otrzymanego w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Badaną substancję oznaczano korzystając z metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z detekcją masową (Agilent 1100, API 2000, ABSciex) na kolumnie Aquasil C18 (4.6 x 150 mm, 5 μ m, Thermo Scientific, Rockford, USA) w elucji izokratycznej, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę acetonitrylu i wody z dodatkiem 0.01% kwasu mrówkowego. Związki oznaczano w jonizacji dodatniej, w trybie śledzenia wybranych jonów macierzystych, m/z 108 dla 1,4-DMP oraz m/z 111 dla 1,4-DMP-d₃ (standard wewnętrzny). Zwalidowaną zgodnie z wytycznymi FDA metodę bioanalityczną zastosowano do oznaczania stężenia badanego związku w osoczu szczura celem oszacowania jego profilu farmakokinetycznego. Związek 1,4-DMP podawano szczurom jednorazowo dożylnie w dawce 100 mg/kg. Na podstawie wartości podstawowych parametrów farmakokinetycznych wykazano, że eliminacja 1,4-DMP z organizmu szczura zachodzi szybko, okres półtrwania tego związku jest krótki, wynosi zaledwie 71 min, przy stosunkowo dużej objętości dystrybucji równej 0.7 L/kg, co wskazuje na możliwość penetracji tej substancji do kompartmentu obwodowego. Wyniki tych badań zostały opublikowane [C14].

W trakcie wykonywania pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora nadal kontynuuję badania z zakresu farmacji klinicznej, co obok współpracy z Kliniką Neonatologii znalazło również wyraz w pracy przeglądowej, w której jestem współautorem z zakresu terapii monitorowanej leków wywodzących się z różnych grup farmakologicznych [C19].

Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w 19 pracach (ZAŁĄCZNIK C), były tematem 70 doniesień prezentowanych w postaci referatów oraz plakatów na 8 konferencjach międzynarodowych oraz 22 zjazdach krajowych (ZAŁĄCZNIK D) oraz dwóch opracowań zbiorowych (ZAŁĄCZNIK E).

ZAŁĄCZNIK C - PRACE OPUBLIKOWANE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA, INNE NIŻ W pkt 2.1.

- C1. Marona H, Pękała E, Antkiewicz-Michaluk L, **Walczak M**, Szneler E: Anticonvulsant activity of some xanthone derivatives. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16(15):7234-7244. **IF₂₀₀₈ = 3.075**
- C2. Groszek G, Nowak-Król A, Wdowik T, Swierczyński D, Bednarski M, Otto M, **Walczak M**, Filipek B: Synthesis and adrenergic activity of 1-(1H-indol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxy phenoxy)ethylamino)propan-2-ol analogs and its enantiomers. Part 2. *Eur J Med Chem* **2009**, 44(12):5103-5111. **IF₂₀₀₉ = 3.269**
- C3. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Pękała E: Validation of a high-performance liquid chromatography method for pharmacokinetic evaluation of pentoxifylline and lisofylline in rat serum and tissues. *Acta Pol Pharm* **2009**, 66(3):215-224. **IF₂₀₀₉ = 0.358**
- C4. Hubicka U, Krzek J, **Walczak M**: Stability of ciprofloxacin and norfloxacin in the presence and absence of metal ions in acidic solution. *Pharm Dev Tech* **2010**, 15(5):532-544. **IF₂₀₁₀ = 1.107**
- C5. **Walczak M**, Fedorowicz A, Chłopicki S, Szymura-Oleksiak J: Determination of endothelin-1 in rats using a high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **2010**, 82(2), 710-718. **IF₂₀₁₀ = 3.722**
- C6. **Walczak M**, Kozaczek E, Szymura-Oleksiak J, Pękała E: Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative analysis of propentofylline and its chiral metabolite M1 in rats. *Biomed Chromatogr* **2011**, 25(3):381-390. **IF₂₀₁₁ = 1.966**
- C7. Pękała E, Waszkielewicz AM, Szneler E, **Walczak M**, Marona H: Synthesis and anticonvulsant activity of trans- and cis-2-(2,6-dimethylphenoxy)-N-(2- or 4-hydroxycyclohexyl)acetamides and their amine analogs. *Bioorg Med Chem* **2011**, 19(22):6927-6934. **IF₂₀₁₁ = 2.921**
- C8. Maślanka A, Krzek J, Stolarczyk M, **Walczak M**, Głogowska A: Stability studies of clonazepam, diazepam, haloperidol, and doxepin with diverse polarities in an acidic environment. *J AOAC Int* **2011**, 94(6):1791-1799. **IF₂₀₁₁ = 1.199**
- C9. Pawlik D, Lauterbach R, **Walczak M**, Hurkała J: Docosahexaenoic acid (DHA) concentration in very low birth weight newborns receiving a fish-oil based fat emulsion from the first day of life. Preliminary clinical observation. *Med Wieku Rozwoj* **2011**, 15(3):312-317. **KBN = 7**
- C10. Hubicka U, Żuromska-Witek B, Krzek J, **Walczak M**, Żylewski M: Kinetic and thermodynamic studies of moxifloxacin hydrolysis. *Acta Pol Pharm* **2012**, 69(5):821-831. **IF₂₀₁₂ = 0.665**
- C11. Hubicka U, Krzek J, Żuromska B, **Walczak M**, Żylewski M, Pawłowski D: Determination of photostability and photodegradation products of moxifloxacin in the presence of metal ions in solutions and solid phase. Kinetics and identification of photoproducts. *Photochem Photobiol Sci*. **2012**, 11(2):351-357. **IF₂₀₁₂ = 2.923**
- C12. Kwiecień A, Krzek J, **Walczak M**: Stress degradation studies on azithromycin and development of a validated stability-indicating TLC-densitometric method with HPLC/electrospray ionization-MS analysis of degradation products. *J. AOAC Int* **2012**, 95(5):1418-1424. **IF₂₀₁₂ = 1.233**
- C13. Gonciarz A, Kus K, Szafarz M, **Walczak M**, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J: Capillary electrophoresis/frontal analysis versus equilibrium dialysis in dexamethasone sodium phosphate-serum albumin binding studies. *Electrophoresis* **2012**, 33(22):3323-3330. **IF₂₀₁₂ = 3.261**

C14. Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, Zakrzewska A, **Walczak M**, Kus K, Gonciarz A: Liquid chromatography-mass spectrometry method for the analysis of 1,4-dimethyl pyridinium in rat plasma - application to pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr* **2013**, 27(1):73-79.

IF₂₀₁₃ = 1.945

C15. Kwiecień A, Krzek J, **Walczak M**, Mazur M: Development and validation of a stability-indicating TLC-densitometric method for the determination of betaxolol with LC-ESI/MS analysis of degradation product. *Acta Pol Pharm* **2013**, 70(4):643-652.

IF₂₀₁₃ = 0.665

C16. Maślanka A, Hubicka U, Krzek J, **Walczak M**, Izworski G: Determination of fluoxetine in the presence of photodegradation products appearing during UVA irradiation in a solid phase by chromatographic-densitometric method, kinetics and identification photoproducts. *Acta Chromatogr* **2013**, 25(3):465-481.

IF₂₀₁₃ = 0.644

C17. Pawlik D, Lauterbach R, **Walczak M**, Hurkała J, Sherman MP: Fish-oil emulsion supplementation reduces the risk of retinopathy in very low birth weight infants: A prospective, randomized study. *JPEN* **2013**, DOI: 10.1177/0148607113499373.

IF₂₀₁₃ = 2.486

C18. **Walczak M**, Pekala E, Waszkielewicz AM, Marona H: Simultaneous LC/ESI-MS separation method for the enantioseparation of some new anticonvulsant drugs. *Chirality* **2014**, DOI: 10.1002/chir.22282.

IF₂₀₁₄ = 1.894

Prace przeglądowe:

1. Szymura-Oleksiak J, Szafarz M, **Walczak M**: Terapia Monitorowana Stężeniem Leku we Krwi. *Med Dypl* **2012**, 21(12):28-37.

KBN = 4

ZAŁĄCZNIK D - STRESZCZENIA KONFERENCYJNE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Konferencje międzynarodowe

D1. Pękala E, Kieć-Kononowicz K, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J: Metabolites of pentoxifylline. Biotransformation of PTX. XVIIth International Symposium on Medicinal Chemistry, Barcelona, Hiszpania **2002**.

D2. **Walczak M**, Bieńkowski T, Szymura-Oleksiak J, Jezierska E, Pękala E, Kieć-Kononowicz K: Use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of propentofylline and its metabolite in rat serum, cortex and hippocamp tissue. 11th International Symposium on Separation Sciences, Pardubice, Czechy **2005**.

D3. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Cios A, Szafarz M, Witek J, Wyska E, Dartsch D: Postgraduate education in clinical pharmacokinetics: Application of an e-learning method. European Association of Faculties of Pharmacy, 2008 Annual Conference: "New issues in pharmacy education", Lille, Francja **2008**.

D4. Gonciarz A, Kuś K, Szafarz M, **Walczak M**, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J: Capillary Electrophoresis/Frontal Analysis versus Equilibrium Dialysis in drug plasma protein binding. 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, Genewa, Szwajcaria **2012**.

D5. Kij A, **Walczak M**, Szafarz M, Kuś K, Gonciarz A, Zakrzewska A, Suraj J, Szymura-Oleksiak J: LTQ XL Orbitrap as a great identification tool in peptides research. 31th Informal Meeting on Mass Spektrometry, Palermo, Włochy **2013**.

D6. Suraj J, **Walczak M**, Kij K, Szafarz M, Kuś K, Gonciarz A, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J: Production of ¹⁸O-labeled endothelin-1 fragments in the course of enzymatic and chemical

digestion of peptide using nanoLC-nanoESI-FT/MS. 31th Informal Meeting on Mass Spektrometry, Palermo, Włochy **2013**.

D7. **Walczak M**, Suraj J: Metabolite characterization studies of new β -adrenolytics. 31th Informal Meeting on Mass Spektrometry, Palermo, Włochy **2013**.

D8. Szafarz M, **Walczak M**, Kij A, Kus K, Zakrzewska A, Gonciarz A, Suraj J, Szymura-Oleksiak J: Quantification of endothelins using LC/MS/MS technique. 31st IMMS Informal Meeting on Mass Spectrometry, Palermo, Włochy **2013**.

D9. **Walczak M**, Suraj J, Kij A, Zakrzewska A, Szafarz M, Kuś K, Gonciarz G: Application of a high-resolution mass spectrometry for identification and quantification of endothelium biomarkers. 1st International Symposium on Profiling, Lizbona, Portugalia **2013**.

D10. Kij A, Gonciarz A, Kuś K, Suraj J, Szafarz M, Zakrzewska A, **Walczak M**: Method development for separation of arachidonic acid metabolites from biological samples and its quantification using LC-MS/MS technique. 19th International Symposium on Separation Sciences, "New achievements in chromatography", Poreč, Chorwacja **2013**.

D11. Szafarz M, Zakrzewska A, Koralewicz G, Gonciarz A, Kij A, Kuś K, Suraj J, **Walczak M**: Development of bioanalytical LC/MS/MS assay for quantifying 5-fluorouracil and its two metabolites in human plasma. 19th International Symposium on Separation Sciences, "New achievement in chromatography", Poreč, Chorwacja **2013**.

D12. Kuś K, Gonciarz A, Kij A, Suraj J, Szafarz M, Zakrzewska A, **Walczak M**: Oxidative metabolism of carvedilol based on electrochemical simulation coupled to liquid chromatography-mass spectrometry (EC-LC/MS/MS). 19th International Symposium on Separation Sciences, "New achievement in chromatography", Poreč, Chorwacja **2013**.

D13. Gonciarz A, Kij A, Kuś K, Suraj J, Szafarz M, Zakrzewska A, **Walczak M**: Influence of different kinds of cyclodextrins on separation of pravastatin to bovine serum albumin - application to protein binding studies by capillary electrophoresis. 19th International Symposium on Separation Sciences, "New achievement in chromatography", Poreč, Chorwacja **2013**.

D14. Kij A, Mateuszuk Ł, Kmiecik K, Sitek B, Wandzel K, **Walczak M**, Chłopicki S: Quantification of TXB₂ and PGI₂ metabolites in mice with hypertension induced by L-NAME. The 15th International Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, USA **2014**.

Konferencja krajowe oraz krajowe o zasięgu międzynarodowym

D15. Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Kieć-Kononowicz K, Pękala E: Oznaczanie stężeń lizofiliny z zastosowaniem HPLC. VII Ogólnopolski Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej, Spała **2001**.

D16. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Pękala E, Kieć-Kononowicz K: Oznaczanie stężenia lizofiliny w surowicy krwi z zastosowaniem HPLC z detekcją UV. Sympozjum LEK „Problemy analityczne w ocenie czystości i farmakokinetyki leku“ Kraków **2002**.

D17. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Szotłowska I, Pękala E: Ocena enancjoselektywnej dyspozycji pentoksyfiliny u szczurów. XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Wrocław **2004**.

D18. Cios A, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Otowska A: Walidacja metody oznaczania mesalazyny i jej zanieczyszczeń w czopkach z zastosowaniem metody HPLC. XIX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Wrocław **2004**.

D19. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Szoldrowska I, Pękała E: Enancjoselektywna dyspozycja pentoksyfiliny po wielokrotnym podaniu dootrzewnowym u szczurów. Ogólnopolska Konferencja Naukowo - Szkoleniowa "Perspektywy rozwoju terapii monitorowanej", Kraków **2004**.

D20. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Szoldrowska I, Pękała E: Ocena interakcji pomiędzy pentoksyfiliną a cyprofloksacyną u szczurów. Ogólnopolska Konferencja Naukowo - Szkoleniowa "Perspektywy rozwoju terapii monitorowanej", Kraków **2004**.

D21. **Walczak M**, Jezierska E, Szymura-Oleksiak J, Pękała E: Pharmacokinetics and tissue distribution of propentofylline and its chiral metabolite in rats. 24th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Ustroń **2006**.

D22. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Bednarski M, Groszek G, Szafarz M, Filipek B: Use of liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the analysis of nonselective β -adrenolytic compound (2F109) in rat plasma. 24th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Ustroń **2006**.

D23. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J: Zastosowanie techniki LC/MS/MS w analizie związków biologicznie aktywnych. Referat wygłoszony na Sympozjum „Nowoczesne Techniki Badawcze w Ocenie Jakości Produktów Leczniczych”, Lublin **2006**.

D24. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Fedorowicz A, Chłopicki S: Zastosowanie spektrometrii mas do oznaczania endoteliny-1 w materiale biologicznym. Referat wygłoszony na XX Naukowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice **2007**.

D25. Jezierska E, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Brzoza P: Ocena enancjoselektywnej dyspozycji propentofiliny i jej metabolitów w mózgu szczura metodą mikrodializy. XX Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Katowice **2007**.

D26. Fedorowicz A, Jakubowski A, Skórka T, Heinze-Paluchowska S, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Chłopicki S: Badanie dysfunkcji śródbłonna w nadciśnieniu płucnym w modelu izolowanego płuca. XII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PT Kardiologicznego, Komisji Krążenia i Oddychania oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN, Serock **2007**.

D27. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Fedorowicz A, Chłopicki S: High-throughput liquid chromatographic - tandem mass spectrometric determination of endothelin-1; the biochemical marker of the progression of pulmonary hypertension in rats. 1st Conference of Polish Mass Spectrometry Society, Puławy **2008**. *Acta Biochim Pol* **2008**, 55(2):34.

D28. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Groszek G: Simultaneous determination of new nonselective beta-adrenolytic compounds by liquid chromatography - tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. 1st Conference of Polish Mass Spectrometry Society, Puławy **2008**. *Acta Biochim Pol* **2008**, 55(2):56

D29. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Szafarz M, Chłopicki S, Groszek G: Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in pharmaceutical bioanalysis. Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech 2008, Kraków **2008**. *Acta Biochim Pol* **2008**, 55(4): 66.

D30. Fedorowicz A, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Dzieża J, Skórka T, Chłopicki S: Farmakologiczna modulacja aktywności śródbłonkowej endoteliny 1 i prostacykliny w modelu nadciśnienia płucnego wywołanego przez monokrotalin. XIII Sympozjum Sekcji Kardiologii

Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Komisji Krążenia i Oddychania Komitetu Nauk Fizjologicznych PAN, Komisji Kardiologii Komitetu Patofizjologii Klinicznej PAN, Białystok 2008. *Kardiol Pol* 2008, 66, 10(3):385.

D31. Fedorowicz A, Skorka T, Jakubowski A, Walczak M, Szymura-Oleksiak J, Szuba A, Chlopicki S: Analysis of endothelial dysfunction in rat's model of pulmonary hypertension. 8th Meeting of France - New EU Members 16th JMRC Symposium, Kraków 2008. *New Frontiers in Cardiovascular Research* 2008.

D32. **Walczak M**, Kucharzewska M, Szymura-Oleksiak J, Groszek G: Badanie enancjoselektywnej farmakokinetyki związku 2F109 u szczura techniką ESI-LC/MS/MS. Sympozjum „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych”. Lublin 2009.

D33. **Walczak M**, Łagowska I, Szymura-Oleksiak J, Groszek G: Ocena procesu wiązania z białkami krwi związku 2F109 techniką dializy równowagowej. Referat wygłoszony na Sympozjum: „Nowoczesne Techniki Badawcze w Ocenie Jakości Produktów Leczniczych”. Lublin 2009.

D34. **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Groszek G.: Simultaneous determination of new aminopropan-2-ol compounds in rat serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. 2nd Conference of Polish Mass Spectrometry Society, Poznań 2010. *Acta Biochim Pol* 2010, 57(1).

D35. **Walczak M**, Pękala E, Marona H: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of enantiomeric purity of new anticonvulsant compounds. 2nd Conference of Polish Mass Spectrometry Society, Poznań 2010. *Acta Biochim Pol* 2010, 57(1).

D36. Zakrzewska A, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Kuś K: Jednoczesne oznaczanie pochodnych pirydyny o działaniu śródbłonkowym w osoczu szczura techniką LC/MS/MS. VI Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej” Warszawa 2011.

D37. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, **Walczak M**, Szymura-Oleksiak J, Gonciarz A: Zastosowanie techniki LC/ESI-MS/MS do identyfikacji izoenzymów cytochromu P450 z wykorzystaniem koktajlu odpowiednich substancji modelowych. VI Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej” Warszawa 2011.

D38. **Walczak M**, Groszek G, Szymura-Oleksiak J: Badanie procesu wiązania z białkami krwi nowego związku pochodnej aminopropan-2-olu techniką dializy równowagowej. VI Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej” Warszawa 2011.

D39. **Walczak M**, Groszek G, Szymura-Oleksiak J: Enancjoselektywne oznaczanie nowego związku pochodnej aminopropan-2-olu techniką LC/ESI-MS/MS. VI Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej” Warszawa 2011.

D40. **Walczak M**, Zakrzewska A, Kuś K, Szymura-Oleksiak J, Szafarz M, Gonciarz A: Oznaczanie endoteliny-1 z wykorzystaniem systemu nanoLC LTQ Orbitrap. Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej: VI konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej” Warszawa 2011.

D41. Gonciarz A, Szymura-Oleksiak J, Kuś K, Szafarz M, **Walczak M**, Zakrzewska A: Equilibrium dialysis versus capillary electrophoresis/frontal analysis in drug-plasma protein binding studies. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D42. Szafarz M, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Kuś K, Gonciarz A: Determination of pharmacokinetic properties of 1,4-DMP and 1-MP after intravenous and intragastric administration to rats. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D43. Zakrzewska A, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Kuś K, Gonciarz A: Development and validation of LC/MS/MS method for quantifying two pyridine derivatives with potential endothelial activity in rat plasma. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D44. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Gonciarz A: In vitro LC-MS/MS „cocktail” assay to determine cytochrome P450 activities. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D45. **Walczak M**, Zakrzewska A, Kuś K, Szymura-Oleksiak J, Szafarz M, Gonciarz A: Accurate mass screening and identification of endothelin 1 by nano liquid chromatography coupled to a hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry - a preliminary study. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D46. Fedorowicz A, Grochal E, **Walczak M**, Zakrzewska A, Bartuś M, Mateuszuk Ł, Sternak M, Łomnicka M, Chłopicki S: „Endothelial dysfunction in diabetic rats; NO, ET-1 and ET-2”. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D47. Żołądź J, Majerczak J, Szafarz M, **Walczak M**, Wójcik T, Sitek B, Grandys M, Kuczek P, Duda K, Chłopicki S: The effect of single bout of physical exercise and five month of endurance training on plasma 1-methylnicotinamide and prostacyclin concentrations in young, healthy men. II Interdyscyplinarne Seminarium JCET „Śródbłonek w chorobach cywilizacyjnych” Kraków 2011.

D48. Fedorowicz A, Grochal E, Bartuś M, Sitek B, Wojcik T, Maslak E, Jaształ A, Kij A, Zakrzewska A, **Walczak M**, Chłopicki S: Effects of 1,4 DMP and perindopril on endothelial dysfunction in aorta in coronary and pulmonary circulation in db/db mice. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.

D49. Gonciarz A, Kij A, Szafarz M, Kuś K, **Walczak M**, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J: High-throughput capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of interactions of new, potentially anticoagulant compounds with bovine serum albumin at near-physiological conditions. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.

D50. Kij A, Szafarz M, Gonciarz A, Kuś K, **Walczak M**, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J: Comparison of nano and microflow liquid chromatography coupled with MS detector in simultaneous determination of angiotensin family. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.

D51. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, **Walczak M**, Gonciarz A, Kij A, Szymura-Oleksiak J: Evaluation of elimination of 1,4-DMP into urine in rats and mice. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.

D52. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, **Walczak M**, Gonciarz A, Kij A, Szymura-Oleksiak J: In silico metabolism prediction and pilot in vitro and in vivo models of drug metabolism studies for six new compounds-pyridine derivatives. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.

- D53. Maślak E, Jasztal A, Sitek B, Sternak M, **Walczak M**, Fedorowicz A, Chtopicki S: Pharmacology of endothelium in mice models of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); a preliminary study. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.
- D54. Szafarz M, Zakrzewska A, **Walczak M**, Gonciarz A, Kij A, Kuś K, Szymura-Oleksiak J: Tissue distribution study of 1,4-DMP in rats by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.
- D55. **Walczak M**, Zakrzewska A, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, Kuś K, Gonciarz A, Kij A: Pharmacokinetic study and bioavailability of 1,4-dimethylpyridinium after a single dose in mice. 20th Krakow Conference on Endothelium, Seminarium JCET 2012.
- D56. **Walczak M**, Groszek G, Szymura-Oleksiak J, Kuś K: Determination of physicochemical properties of new compounds with β -adrenolytic activity. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 2012.
- D57. **Walczak M**, Lauterbach R, Pawlik D, Zakrzewska A: Application of LC/MS/MS method for simultaneous determination of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in newborns. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 2012.
- D58. Zakrzewska A, Szafarz M, **Walczak M**, Kuś K, Gonciarz A, Kij A, Szymura-Oleksiak J: Development of quantitative LC/MS/MS bioanalytical method coupled with turbulent flow chromatography for 1-methylnicotinamide and its metabolites. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 2012.
- D59. Gonciarz A, Kuś K, Szafarz M, **Walczak M**, Zakrzewska A, Kij A, Szymura-Oleksiak J: Capillary electrophoresis as one of the separation methods used in drug-protein binding studies. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 2012.
- D60. Kuś K, Zakrzewska A, Szafarz M, **Walczak M**, Gonciarz A, Kij A, Szymura-Oleksiak J: In vitro cytochrome P450 activity: development and validation of LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of six specific metabolites. 29th International Symposium on Chromatography, Toruń 2012.
- D61. **Walczak M**, Kuś K, Szafarz M, Zakrzewska A, Szymura-Oleksiak J, Gonciarz A: Quantitation of endothelin-1 using a high-resolution accurate mass spectrometer-LTQ XL Orbitrap Discovery. Joint Conference of Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań 2012.
- D62. Zakrzewska A, Szafarz M, Szymura-Oleksiak J, **Walczak M**, Kuś K, Gonciarz A: Development and validation of bioanalytical LC/MS/MS assay for quantifying of two pyridine derivatives with potential endothelial activity in mice serum. Joint Conference of Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań 2012.
- D63. Kij A, **Walczak M**, Szafarz M, Kuś K, Gonciarz A, Zakrzewska A, Suraj J: De novo Sequencing Approach in Peptides Identification. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.
- D64. Maślak E, Jasztal A, Sitek B, Wójcik T, Proniewski B, Broniec A, Chmura-Skirińska A, Kuś K, Kij A, **Walczak M**, Chabowski A, Keefer L, Chtopicki S: Effects of liver-selective NO donors on the development of liver steatosis in mice model of NAFLD. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D65. Suraj J, **Walczak M**, Kij A, Szafarz M, Zakrzewska A, Gonciarz A, Kuś K: Comparison of chemical and enzymatic treatment of ET-1. Preliminary studies of biomarker identification in biological samples using 'proteolytic 16O/18O-labeling. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D66. Kramkowski K, Przyborowski K, Leszczyńska A, Buczek W, Zakrzewska A, **Walczak M**, Pernak J, Kalvinsh I, Chłopicki S: Antithrombotic effect of a novel MNA-releasing compounds with NO-dependent activity. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D67. Kuś K, Kij A, Zakrzewska A, Szafarz M, Gonciarz A, Suraj J, **Walczak M**: Kinetics of MNA release from the novel compounds - pyridine derivatives. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D68. Gonciarz A, Kij A, Kuś K, Szafarz M, Suraj J, Zakrzewska A, **Walczak M**: Study of binding of nicotinic acid and its derivatives to main plasma proteins - the influence of physicochemical properties. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D69. **Walczak M**, Szafarz M, Kuś K, Zakrzewska A, Kij A, Gonciarz A, Suraj J, Wandzel K: Pharmacokinetics of MNANO₂ vs MNACL in rats - a preliminary study. 21th Krakow Conference on Endothelium, JCET Seminar, Kościelisko 2013.

D70. Suraj J, **Walczak M**: Badanie farmakokinetyki nowego związku pochodnej aminopropan-2-olu techniką LC/ESI-MS/MS. III Konferencja Naukowa Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego UJ CM, Kraków 2013.

ZAŁĄCZNIK E - PRACE ZBIOROWE

1. Clinical pharmacy: european postgraduate training program (curriculum). Audrey Castet, Agnieszka Cios, Dorothee C. Dartsch, Carola Dehmel, Celine Eiden, Annabelle Fenske, Sylvie Hansel-Esteller, Aurelian Istrati, Witold Jucha, Mirosław Krośniak, Cecilia F. Lastra, Eduardo L. Marino, Goentje Marquardt, Pilar Modamio, Agata Ogórka, Tomasz Ogórka, Barbara Pandyr-Kowalska, Helene Peyriere, Barbara Pieszczyk, Joan Sebarroja, Małgorzata Szafarz, Joanna Szymura-Oleksiak, **Maria Walczak**, Jerzy Witek, Elżbieta Wyska, Justyna Zamarska. Kraków: Wydawnictwo Scriptum s.c., 2008 79s. ISBN 978-83-927659-3-6.

2. Farmacja kliniczna: europejski program studiów podyplomowych (wykaz zagadnień). Audrey Castet, Agnieszka Cios, Dorothee C. Dartsch, Carola Dehmel, Celine Eiden, Annabelle Fenske, Sylvie Hansel-Esteller, Aurelian Istrati, Witold Jucha, Mirosław Krosniak, Cecilia F. Lastra, Eduardo L. Marino, Goentje Marquardt, Pilar Modamio, Agata Ogórka, Tomasz Ogórka, Barbara Pandyr-Kowalska, Helene Peyriere, Barbara Pieszczyk, Joan Sebarroja, Małgorzata Szafarz, Joanna Szymura-Oleksiak, **Maria Walczak**, Jerzy Witek, Elżbieta Wyska, Justyna Zamarska. Kraków: Wydawnictwo Scriptum s.c., 2008 80s. ISBN 978-83-927659-7-4.

5. ZGŁOSZENIA PATENTOWE

1. Azotan(III) 3-karbamoilo-1-metylopirydyniowy, sposób jego otrzymywania i zastosowanie, P.404273, dn. 2013-06-11.

6. UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH

6.1. Projekty finansowane z programów międzynarodowych

1. Projekt powołania Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków (JCET). POIG 2.2. **2010-2011** (wykonawca projektu).
2. „Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych, od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym”. POIG 1.1.2. **2010-2015** (kierownik zadań badawczych 4 i 15).
3. „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej”. POIG 01.01.02-12-012/09-00. **2011/2012** (wykonawca projektu).

6.2. Projekty finansowane ze źródeł KBN

1. 4PO5F 011 14 „Ocena właściwości farmakokinetycznych acebutololu w aspekcie chiralnej budowy tego leku”. **1997-2000** (kierownik projektu).
2. 2PO5F 010 28 „Struktura a aktywność adrenolityczna chiralnych pochodnych 1-(1-H-indol-4-yloksy)-3-[2-(2-metoksyfenoksy)etylo]amino]propan-2-olu i jego analogów. **2005-2007** (wykonawca projektu).

6.3. Projekty zamawiane

1. Opracowanie innowacyjnego leku stosowanego w terapii ośrodkowego układu nerwowego, schizofrenii, depresji i lęku, badania przedkliniczne. Projekt realizowany we współpracy Collegium Medicum z firmą farmaceutyczną Adamed oraz Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, dofinansowany przez NCBiR w ramach programu Inicjatywa Technologiczna I KB/88/12655/IT1-C/U/08. **2008-2012** (wykonawca w zadaniu syntetycznym, analizy LC/MS/MS).

6.4. Badania własne

1. WŁ/241/P/F „Ocena wpływu aktywnego metabolitu na modelowanie farmakokinetyczno-farmakodynamiczne leku macierzystego”, **2002** (kierownik projektu).
2. WŁ/269/P/F „Wpływ cyprofloksacyny na oznaczanie stężenia lizofiliny w materiale biologicznym”, **2003-2004** (kierownik projektu)
3. WŁ/341/P/F „Zastosowanie systemu LC/MS do oznaczania wybranych leków oraz związków biologicznie aktywnych w badaniach *in vivo*”, **2005 - 2006** (kierownik projektu).
4. WŁ/405/P/F „Identyfikacja i oznaczanie wybranych markerów schorzeń neurodegeneracyjnych z zastosowaniem techniki LC/MS/MS u szczurów”, **2007-2008**, (kierownik projektu).
5. K/ZBW/000492 „Ocena właściwości farmakokinetycznych nowych pochodnych aminopropan-2-olu”, **2009-2011** (kierownik projektu).
6. K/ZDS/003302 „Ocena profilu farmakokinetycznego nowego związku (ANBL) pochodnej aminopropan-2-olu o właściwościach beta-adrenolitycznych”, **2012** (kierownik projektu).
7. K/ZDS/004135 „Ocena właściwości fizykochemicznych nowych związków pochodnych aminopropan-2-olu o właściwościach β -adrenolitycznych”, **2013** (kierownik projektu).

7. RECENZJE PRAC NAUKOWYCH

Recenzent 9 publikacji w następujących czasopismach o zasięgu międzynarodowym: Chirality (2 prace), Separation Science (2 prace), Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies (2 prace), Pharmacological Reports (1 praca), Reviews in Analytical Chemistry (1 praca), Acta Poloniae Pharmaceutica (1 praca).

8. SPECJALIZACJE

Specjalizacja w dziedzinie Farmacji Klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, zakończona egzaminem specjalizacyjnym z wynikiem bardzo dobrym w Poznaniu, 15 stycznia 2013 r.

9. NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

1. Nagroda naukowa Towarzystwa Terapii Monitorowanej za najlepszą pracę opublikowaną w „Problemach Terapii Monitorowanej” w 1996 r. dla Zespołu: J. Kochman, B. Bacior, J. Grodecki, K. Kawecka-Jaszcz, J. Szymura-Oleksiak, **M. Walczak**, J. Bury.
2. Wyróżnienie rozprawy doktorskiej, Wydział farmaceutyczny UJ CM, Kraków 2001 r.
3. Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe w 2011 r.
4. Nagroda zespołowa dla **M. Walczak**, A. Zakrzewska, K. Kuś, J. Szymura-Oleksiak, M. Szafarz, A. Gonciarz za zajęcie II miejsca w zakresie prezentowanej zawartości merytorycznej plakatu pt. "Oznaczanie endoteliny-1 z wykorzystaniem systemu nano LC LTQ Orbitrap". VI Konferencja "Analityczne Zastosowanie Chromatografii Cieczowej", Warszawa 2011 r.
5. Nagroda Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM za osiągnięcia naukowe w 2012 r.

Alexis Delcels