

## 5. Diskuse a závěr

Většina výsledků je diskutována v publikacích přiložených k disertaci, proto v této kapitole shrnu jen krátce.

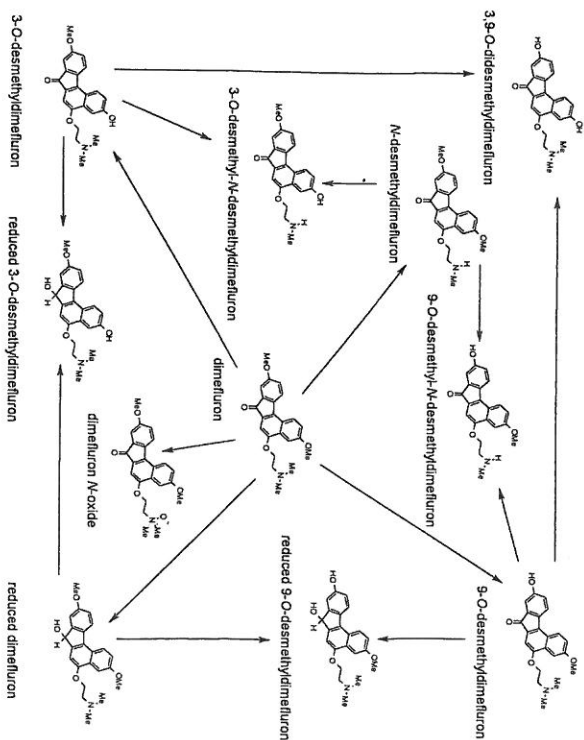
Nejprve byly navrženy předpokládané cesty biotransformace dimefluronu na základě předchozích zkušeností s biotransformací benfluronu.

S využitím poměrně jednoduchých chemických modifikační struktury dimefluronu a jeho prekurzoru 3,9-dimethoxy-5-hydroxy-7H-benzol[*c*]fluoren-7-onu popsaných detailně v kapitole 4.1. bylo připraveno 6 standardů potenciálních metabolitů (produktů *N*-desmethylace, *O*-desmethylace, *N*-oxidace a karbonylredukce) a vnitřní standard (vyšší homolog dimefluronu). Všechny tyto standardy byly charakterizovány NMR a MS spektry a čistota kontrolována HPLC a TLC analýzami.

S použitím těchto standardů byla vyvinuta a zvalidována nová gradientová bioanalytická metoda stanovení dimefluronu a jeho metabolitů pomocí HPLC využívající pentafluorophenylpropyl kolonu, photodiode-array a hmotnostně spektrometrický detektor. Experimenty prokázaly analytickou sílu hyphenacího spojení chromatografie s photodiode-array (PDA) a hmotnostně spektrometrickým (MS) detektorem, kdy pouze kombinace retenčních charakteristik a spektrálních údajů (UV, MS) umožnila jednoznačně prokázat strukturu určitého metabolitu. Například 3-*O*-desmethyl dimefluron a 9-*O*-desmethyl dimefluron mají identická UV a MS spektra, rozlišit se dají pouze chromatograficky (různé retenční charakteristiky v HPLC a TLC, odlišná absorpce ve viditelné oblasti na TLC). V UV spektrální analýze se daly rozlišit pouze dva typy chromoforů [3,9-dimethoxy-5-(2-alkoxy)-7H-benzol[*c*]fluoren-7-on a 3,9-dimethoxy-5-(2-alkoxy)-7H-benzol[*c*]fluoren-7-ol] v porovnání se čtyřmi typy chromoforů, které byly identifikovány u benfluronu a jeho metabolitů. Pro identifikaci dalších (nesyntetizovaných) metabolitů dimefluronu tedy byla hyphenací kombinace HPLC-PDA-MS velmi důležitá.

Celkem se podařilo identifikovat ve stolici a moči potkanů deset metabolitů 1. fáze biotransformace a zatím dva metabolity 2. fáze biotransformace dimefluronu. Na identifikaci dalších metabolitů 2. fáze biotransformace se pracuje. Byly rovněž nalezeny podmínky pro chirální separaci racemického redukovaného dimefluronu a prokázala se enantiospecificita v redukci dimefluronu.

Obř. 12: Navřžené schéma biotransformace dimefluronu

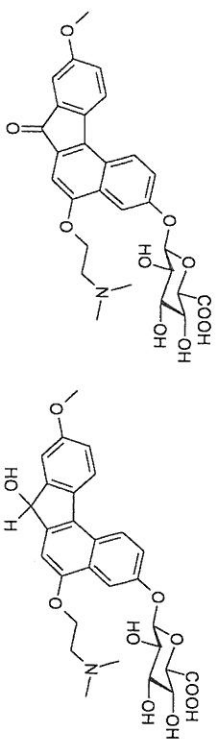


Vyvinutá achirální metoda stanovení dimefluronu a jeho metabolitů byla použita ke studiu osudu dimefluronu po podání potkanům v dávce 250 mg/kg. Získané výsledky byly zpracovány do přehledných grařů. Při srovnání grařů byly nalezeny intersexuální rozdíly v metabolismu a exkreci dimefluronu a jeho metabolitů. U obou pohlaví je zaznamenáno tendence vylučovat trusem nezměněný dimefluron. Hlavními metabolity jsou produkty *O*-desmethylace, přičemž u samic je preferována *O*-desmethylace v poloze 3, zatímco u samic dochází k *O*-desmethylaci více v poloze 9. Následně je možné z grařů odečíst, že maximální množství metabolitů se eliminuje stolicí v prvních třech dnech po podání. Přičemž u samic dochází k 24 hodinovému zpoždění. Tento efekt může být způsoben volným podáváním stravy během pokusu. Vliv by mohlo mít i umístění potkanů, kdy umístění v metabolických klecích mohlo být pro samice stresující. Hypotézy by však bylo nutné podpořit dalšími výzkumy na větším souboru jedinců obou pohlaví.

Při analýzách vzorků moče a experimentech s enzymovou inkubací těchto vzorků bylo zjištěno, že nalezené metabolity 2. fáze biotransformace vznikly přeměnou

3-*O*-desmethyl dimefluronu, respektive jeho v poloze 7 redukované formy. Protože hlavní biotransformační reakcí je glukuronidasace, předpokládám, že nalezené metabolity jsou glukuronidy (glukuronová kyselina ve druhém vzorci v Obr. 13Obr. 13 může být alternativně vázána přes sekundární alkoholovou skupinu). K této domněnce mne vede také fakt, že sulfátasa není dostatečně specifický enzym a štěpí i některé glukuronidy.

Obr. 13: Struktura nalezených metabolitů 2. fáze biotransformace



Závěrem bych chtěl konstatovat, že syntetizované standardy metabolitů dimefluronu a vyvinutá a zvalidovaná metoda LLE-HPLC-PDA-MS budou použity k dalším farmakokinetickým a biotransformačním studiím potenciálního antineoplastika dimefluronu. Bude nyní nezbytné potvrdit předpoklad, že na úrovni mikrosomální frakce lidských jater nebo na úrovni lidských hepatocytů probíhají preferenčně *O*-desmethylace dimefluronu a nikoli redukce karbonylu známé z lidské biotransformace benfluronu. Teprve pak by se mohl dimefluron stát zajímavou strukturou, která biotransformací neztrácí své potenciální interkalací vlastnosti zmíněné v kapitole 3.1.4. Postupy navržené k syntéze dimefluronových metabolitů budou využity k syntéze většího množství těchto metabolitů, aby mohl být testován farmakodynamický a toxikologický profil těchto látek (včetně parentního dimefluronu).