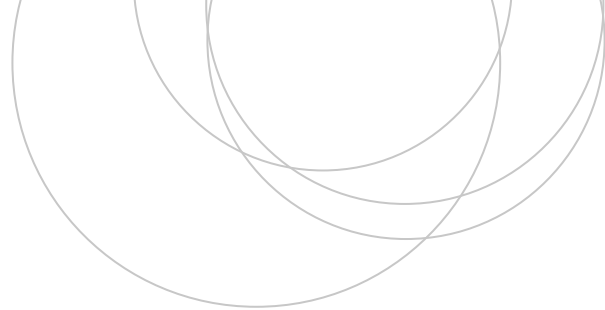




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Kimikako Gradua

Kaspofungina antifungikoaren adsortzioaren azterketa beirazko materialean UHPLC-FLUOren bidez

Egilea:

Ane Yaldebere Irusta

Zuzendaria:

Oskar Gonzalez Mendia

Zuzendarikidea:

Beatriz Uribe Oñate

AURKIBIDEA

1. SARRERA.....	1
1.1 ANTIFUNGIKOEKIKO ERRESISTENTZIA.....	2
1.2 EKINOKANDINAK	3
1.3 KASPOFUNGINA	5
1.4 KASPOFUNGINAREN ANALISIRAKO METODO ANALITIKOAK.....	6
1.5 KASPOFUNGINAREN ETA PEPTIDOEN ADSORTZIOA	8
1.5.1 Kanpoko baldintzen eragina	9
1.5.2 Agente silanizatzaileak.....	10
1.6 HELBURUA	11
2. ATAL ESPERIMENTALA	13
2.1 ERREAKTIBOAK.....	13
2.2 TRESNERIA	13
2.3 BALDINTZA KROMATOGRAFIKOAK	14
2.4 KASPOFUNGINA DISOLUZIOAK	14
2.5 BEIRAZKO MATERIALAREN TRATAMENDUA.....	14
2.6 KASPOFUNGINAREN ADSORTZIOAREN AZTERKETA	15
2.6.1 Materialaren tratamenduaren eragina	15
2.6.2 Adsortzio-zinetikaren azterketa	16
2.6.3 Disolbatzaile organikoen eragina	16
2.6.4 pHaren eragina.....	17
3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	18
3.1 MATERIALAREN TRATAMENDUAREN ERAGINA	18
3.2 ADSORTZIO-ZINETIKAREN AZTERKETA.....	22

3.3	DISOLBATZAILE ORGANIKOEN ERAGINA.....	24
3.4	pH-AREN ERAGINA.....	26
4.	ONDORIOAK ETA ETORKIZUNeko LANA	30
5.	ESKER ONAK	32
6.	BIBLIOGRAFIA	33

1. SARRERA

Onddoak ia edozein lekutan (airean, uretan, lurrian, giza gorputzean...) bizi daitezkeen organismo eukariotikoak dira, haien biziraupena parasitismoan edo pitogenesian (materiaren deskonposiziotik sortzea) oinarritzen delarik (1). Gizakiongan sor ditzaketen gaixotasunen artean azaleko infekzioak oso ohikoak izaten dira; hain zuzen ere, mundu osoko biztanleriaren % 25ari eragiten diete (2). Hainbat onddo espezie gai dira gizakion ahuldutako immunitate sistemaz aprobetxatzeko, hilkortasuna eraginez (3). Izan ere, nahiz eta Infekzio Fungiko Inbaditzaileek (IFlek) biztanleriaren ehuneko gutxiagori eragiten dieten, kezka larrikoak dira, hilkortasun-tasa altua baitakarte. Urtero milioi eta erdi pertsona hiltzen dira IFlen ondorioz; tuberkulosiaren edo malariaren eraginez hiltzen direnak bezain beste (4).

Esan beharra dago azkeneko bi hamarkadetan nabarmen areagotu direla infekzio fungikoak. Esaterako, organismo fungikoek eragindako septizemia (mikroorganismo patogenoak odol zirkulaziora sartzearen ondoriozko infekzio orokorra) tasa % 207 hazi zen Estatu Batuetan 1979-2000 urteen tartean (5). Izan ere, medikuntzan gaixotasun larriak sendatzeko egindako aurrerapenek immunitate sistema ahultzea ekarri dute, eta ondorioz, IFlek eragindako heriotza-tasa igo egin da (6).

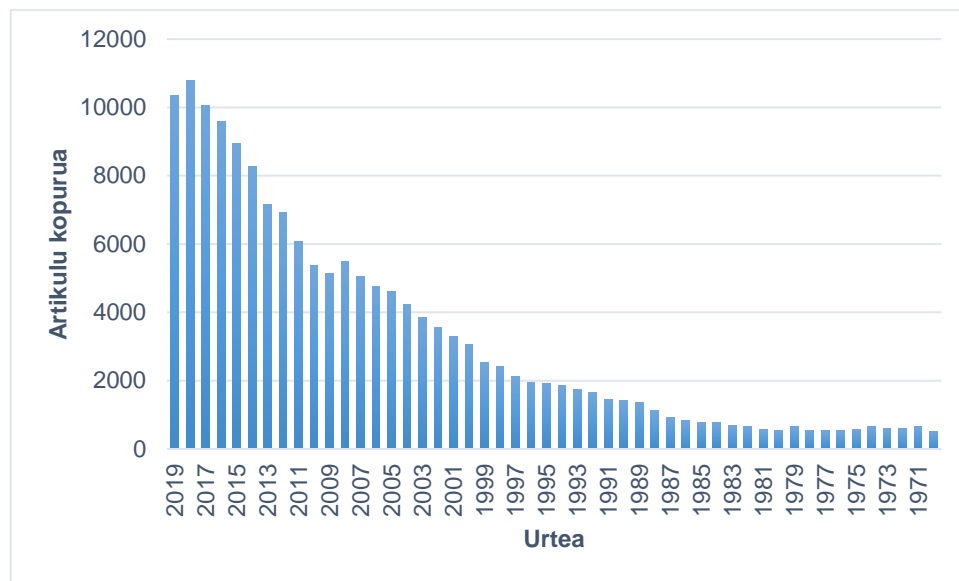
Onddo espezie asko dira infekzio inbaditzaileen eragileak, baina nagusienak *Candida*, *Cryptococcus*-a eta *Aspergillus*-a dira (7). *Candida* generoari dagokionez, espezie gutxi batzuk baino ez dira gizakion patogeno oportunistak (soilik ostalariaren immunitate sistema ahulduta dagoenean gaixotasunak eragin ditzaketen mikroorganismoak), esaterako, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* eta *Candida parapsilosis* (8). Gaur egun, *C. albicans* gizakion patogeno fungiko nagusia dela uste da. *C. albicans*-ek pertsona osasuntsuen larruazala eta mukosak koloniza ditzake, traktu gastrointestinallean, ahobarrunbean eta baginan infekzioak eraginez. Halaber, *C. albicans* odol zirkulaziora sar daiteke, ehunak kaltetu ondoren epitelioan zuzenean

sartzeagatik, edo pazientearen organismoan sartutako gailu medikoetan (hala nola, hortz-inplanteak, endoprotesiak, artikulazio artifizialak edo nerbio-sistema zentralaren deribazioak) biofilmak (mikroorganismoek gainazaletan eratzen dituzten populazioak) eratzeagatik (9).

1.1 ANTIFUNGIKOEKIKO ERRESISTENTZIA

IFlak eta azaleko infekzioak sendatzeko polienoak (anfoterizina B, adibidez) eta antifungiko azolikoak erabili izan dira batez ere. Farmako hauek ergosterolaren biosintesia inhibitzen dute, ugaztunon zeluletako kolesterolaren baliokide fungikoa dena. Hala ere, sortu ziren lehen azolek (ketokonazola, mikonazola eta klotrimazola) efektu hepatotoxikoak, funtzio gastrointestinalen eta endokrinoen narriadura eta larruazalaren narriadura eragin zitzaizketela ikusi zen. Beraz, bioerabilgarriagoak diren itrakonazola, flukanozola eta posakonazola bezalako azolak sintetizatu ziren (10).

Dena dela, antifungiko azolikoek denbora luzez tratamendu eraginkorra eman badute ere, azkeneko urteotan egindako hainbat ikerketa epidemiologikok erakutsi dute *Candida* espezie batzuek azolekiko erresistentzia garatu dutela, ingurune klinikoan arazo kritikoa izan daitekeena (11). Orokorrean, onddoek antifungikoekiko erresistentzia garatu dute, eta gai horrek interes handia piztu du ikerlarien artean; hain zuzen ere, 1. Irudian azkeneko 50 urteotan onddoen erresistentziari buruz idatzi diren artikuluko kopurua adierazten da urteko.



1. Irudia: 1970etik 2019ra bitartean urteko idatzi diren artikuluak "fungal resistance"-i buruz, PubMed (sarrera data: 2020/04/14)

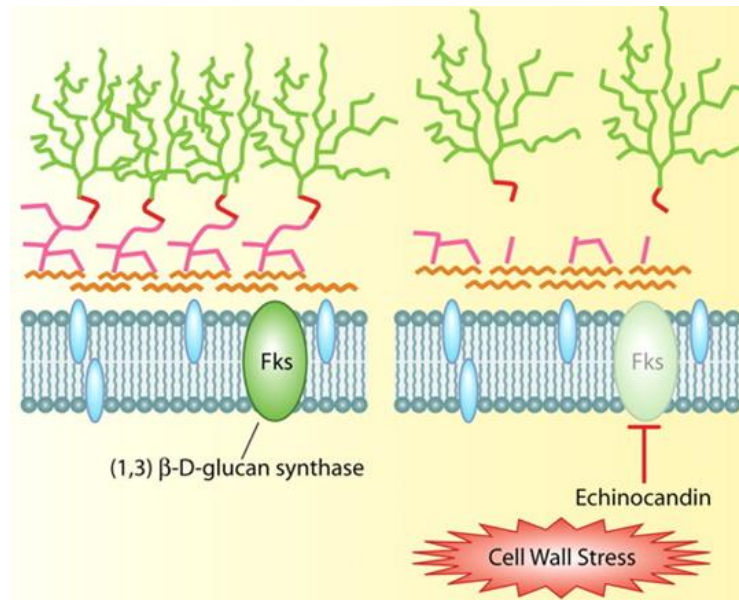
Azolek mikosien aurrean duten eraginkortasun urria ikusita, tratamendua egiteko beste antifungiko batzuk sintetizatze beharra sortu zen: ekinokandinak (12).

1.2 EKINOKANDINAK

Ekinokandinak oraintsuago garatu diren agente antifungikoak dira, Estatu Batuetako Droga eta Elikagaien Administrazioak (FDA) eta Europako Sendagaien Agentziak (EMA) onartu dituztenak. Nahiz eta Candida espezie batzuek ekinokandinekiko erresistentzia erakutsi duten, antifungiko hauek kandidiasia sendatzeko tratamendu nagusi bilakatu dira. Zenbait jarraibide gomendatzen dute ekinokandinak lehen mailako agente antifungiko gisa erabiltzea paziente helduetan kandidiasi inbaditzailea tratatzeko (13).

Antifungiko hauek lipopeptido molekula luze eta erdisintetikoak dira, modu ez lehiakorren β -(1,3)-D-glukan sintetasa entzima inhibitzen dutenak (2. Irudia) (14). Konplexu honek bi azpiunitate ditu: FKS1p eta Rho1p. Lehenengoa, onddoaren zelula-paretaren birmoldaketaren arduraduna da, eta bigarrena,

berriz, erregulazioarena (15). Entzima horrek onddoaren zelula-paretaren sintesian parte hartzen du, eta beraz, polisakaridoaren sintesia etetea, zelula-pareta kaltetzen da. Horren ondorioz, osmosia desorekatzen da eta *Candida* bezalako onddoen zelulen lisia ematen da (16).



2. Irudia (*Robbins et. al-etik hartua* (14)): ekinokandinen akzio mekanismoa. Ezkerreko atalean ikus daiteke onddoaren zelula-pareta osasuntsua. Eskumako irudian, berriz, ekinokandina β-(1,3)-D-glukan sintetasa entzimara lotzen da, zelula-pareta kaltetu eta zelularen lisia ematen delarik

Ekinokandinak gorputzean nahiko ondo jasan daitezkeen agenteak dira, eta gainera, saiakuntza klinikoan emaitzen arabera, albo ondorio gutxi dituzte. Horietako batzuk flebitisa, buruko mina, sukarra, goragalea, beherakoa, sabelaldeko mina eta larruazaleko erupzioa izan daitezke (17). Oro har, larritasun maila txiki edo ertainekoak izaten dira, eta paziente gutxi behar izaten dute terapia etetea. Bestalde, ez dute beste sendagaiekin elkarrekintza esanguratsurik egiten (18). Azolekin eta polienoekin konparatuz, hauen kontzentrazio minimo inhibitzaile (MIC) balioa ekinokandinena baino handiagoa da; hots, ekinokandina kontzentrazio baxuagoa behar da onddoaren hazkuntza gelditzeko (19).

Gaur egun, hiru ekinokandina daude merkaturatuta: anidulafungina (1974. urtean aurkitua), kaspofungina (1989. urtean aurkitua) eta mikafungina (1990. urtean

aurkitu zen aitzindaria) (20). Hala ere, garapen bidean dagoen laugarren ekinokandina ere badago, rezafungina izenekoa (21).

1.3 KASPOFUNGINA

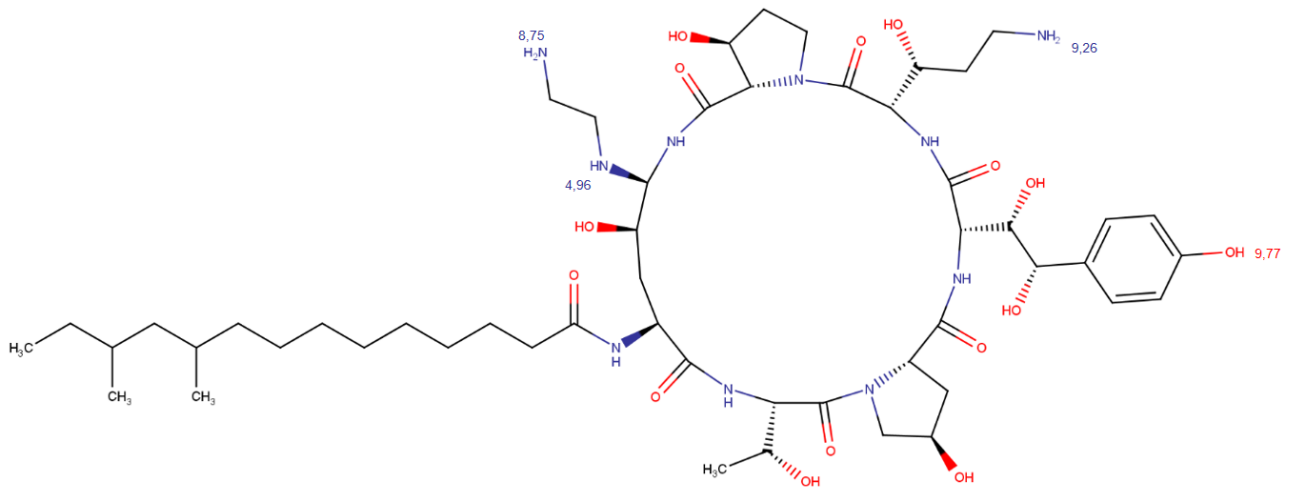
Kasporfungina (CSF) (3. Irudia) *Glarea lozoyensis* onddoaren hartidura produktu batetik eratorritako pneumokandina erdisintetikoa da (22). CSF azetato moduan komertzializatzen hasi zen 2001. urtean, Estatu Batuetako FDAk onetsita (23).

Egun, sendagaia ezin da ahotik kontsumitu, ahoko bioerabilgarritasun eskasaren ondorioz. Hori dela eta, zain barnetik bakarrik eman daiteke. Dosifikazioa gorputzaren pisuan oinarritzen da. 70 mg-ko karga-dosia gomendatzen da, eta, ondoren, 50 mg-ko edo 70 mg-ko eguneroko mantentze-dosia, 80 kg-tik beherako edo 80 kg-tik gorako pisua duten pazienteentzat, hurrenez hurren (24). Dosia hartu ondoren, CSFren % 97 serumean albuminarekin lotzen da. Gero, farmakoa gibelean metabolizatzen da astiro, peptidoen hidrolisiaren, N-azetilazioaren eta berezko degradazio kimikoaren ondorioz. Kasporfunginaren metabolitoek ez dute jarduera antifungikorik, eta gernuan eta gorozkietan irazten dira (25). 1. Taulan CSFren propietate kimikoak ageri dira, CSF azetatoaren propietate farmakologikoekin batera.

1. Taula: CSFren propietate kimikoak eta CSF azetatoaren propietate farmakologikoak

Datu kimikoak (CSF) (17)	Formula molekularra	$C_{52}H_{88}N_{10}O_{15}$
	Pisu molekularra (g/mol)	1093
	Disolbagarritasuna uretan	28 mg/L
Datu farmakologikoak (CSF azetatoa) (26)	1. dosia (mg/egun)	70
	Gainontzeko dosiak (≤ 80 kg) (mg/egun)	50
	$t_{1/2}$ (h)	9-11
	C_{max} plasman (mg/L)	10-12
	Albuminari atxikimendua (%)	97
	Gernu bidezko irazketa (%)	41
	Gorozki bidezko irazketa (%)	34

Bestalde, aipatzekoa da CSF metanoletan arinki disolbagarria dela, eta dimetil sulfoxidotan eta pH 3,2-ko disoluzio urtsuetan oso disolbagarria dela.



3. Irudia: CSFren egitura molekularra. Urdin kolorez marraztuta dauden pKa-k funtzio talde basikoei dagozkie eta gorrix marraztutakoak, ordea, azidoei.

3. Irudian ikus daitezkeen moduan, CSFk eraztun zikliko hexapeptidiko polarra du bi ornitina, bi prolina eta bi treoninarekin. Alboko N-azil kate lipofilikoa gantz azido kateak osatzen du, bi metil talde estereogeniko dituena. Talde funtzional azido eta basikoen pKa-k ere ageri dira (gorrix marraztutakoak azidoak dira, eta urdinez marrazturikoak, berriz, basikoak), eta beraz, pHa funtzio taldeen pKa balioa baino txikiagoa denean, talde azidoak neutro egongo dira, eta basikoak, berriz, kargatuta (27).

1.4 KASPOFUNGINAREN ANALISIRAKO METODO ANALITIKOAK

Antifungikoen determinazioaren helburu nagusiak farmakoen monitorizazio terapeutikoa eta azterketa farmakozinetikoa izaten dira. Hori dela eta, CSFren determinaziorako garatu diren metodo gehienak odoletik (plasma edo serumetik) hartutako matrizeetara bideraturik daude. Matrize konplexuak izanik, aurretratamendua beharrezkoa izaten da (28).

Plasma eta serum laginetarako laginen tratamendua azetonitrilo (AZN) edo metanol (MeOH) bidezko proteinen prezipitazio prozedura izaten da normalean, lagin:disolbatzaile erlazioa 1:1etik (v/v) 1:8ra (v/v) bitartekoa izan daitekeelarik (29). Plasmaz gain, beste odol zelula mota batzuk aztertzeko; hala nola, odol periferikoko zelula mononuklearrak, leukozito polimorfonuklearrak eta eritrozitoak, azetonitriloa erabili izan da erauzketa-agente moduan (30). Odol osoko CSFren determinaziorako, odol tanta lehorra erabiliz analitoa erauzi izan da H₂O:MeOH (50:50, v/v) nahastea erabiliz, eta gero azetonitriloaren bidez proteinen prezipitazioa eginez (31).

Fase solidoko erauzketa (SPE) ere erabili izan da serum, plasma eta gernu laginetan CSF determinatzeko. Alderantzizko fasea, diol fasea eta fase mixtoa konparatuz, alderantzizko fasearekin lortu izan dira berreskurapenik altuenak, eluitzaile moduan metanola erabiliz ingurune azidoan (32).

Halaber, "online column switching" deritzona erabiliz, plasmako CSF determinatzeko lagina zuzenean injektatu izan da sistema kromatografikoan. Horrela, matrizearen garbiketa sistema kromatografoan bertan egiten da zutabe kromatografikoa baino lehen (33). Prozedura hau erabiltzen da RPMI bezalako ingurune zelularretan CSFren determinazioa egiteko. Kultibo zelularrak aminoazidoez, gatzaz eta bitaminez osaturiko matrize konplexuak direnez, aurretratamendua beharrezkoa izaten da. Online column-switching-aren bidez bolumen txikiko lagin kopuru handiak analizatu daitezkeenez, aukera egokia da kultibo zelularretako farmakoen determinaziorako (34).

Ekinokandinak konposatu ez polar samarrak direnez, haien determinaziorako alderantzizko likido kromatografia erabili izan ohi da; hau da, fase geldikor ez polarra (C8 edo C18) erabiliz. CSFren determinazioa gradiente eran egiten da; hots, fase mugikorraren konposizioa aldatuz doa denboran zehar. Normalean azido trifluoroazetikoaz edo azido formikoaz azidotutako fase urtsua erabiltzen da eta fase organiko moduan azetonitriloa edo metanola (29).

Detekzioari dagokionez, ekinokandinak detektatzeko metodo gehienak masa espektrometrian (MS), fluoreszentsian (FLUO) edo ultramore-ikuskor absortzio espektroskopian (UV/Vis) oinarritzen dira. Masa espektrometriaren selektibitatea eta sentikortasuna ona izan arren, fluoreszentsia bidezko detekzioa oso ohikoa da, erabiltzeko errazagoa baita eta instrumentazioa merkeagoa baita. CSFren fenol taldea dela eta, konposatuak fluoreszentsia bizia du. Baldintza basikoetan, fluoreszentsia banda desplazatu eta intentsitatea jaisten da, ziurrenik, talde funtzional horren ionizazioaren ondorioz (35). CSFren analisi fluorimetrikorako metodo guztiak honako uhin luzera hauetan gauzatu dira: 220 nm inguru kitzikapenerako eta 304 nm inguru igorpenerako (29).

1.5 KASPOFUNGINAREN ETA PEPTIDOEN ADSORTZIOA

Ekinokandina moduko peptidoetan eta proteinetan oinarrituriko biofarmakoek garrantzi handia dute industria farmazeutikoan, funtsezko prozesu fisiologiko ia guztietan parte hartzen baitute. Hala ere, peptidoetarako metodo bioanalitikoak garatzea zaila da, laginak prestatzen diren baldintzetan duten joera oraindik ez baita ondo ulertzen. Izan ere, lagina prestatzean erabilitako materialen gainazalei atxikitze joera dute; hala nola, pipeta-puntei eta biltegitratze-hodie (36).

Laginen tratamenduan zehar, ekinokandinak gainazal desberdinetan adsorbatzen (adsortzio edo absortzio ez-espezifikoa) direla uste da, hainbat ikerlarik egindako lanetan konposatu hauen berreskurapen oso eskasak lortu baitira. Esaterako, CSF farmako moduan ikertzen ari zenean, SPE prozeduran zehar plastikozko gainazaletan atxikita geratu zela ondorioztatu zen. Adsortzio hori ekiditeko, % 0,25eko behi-serumaren albumina (BSA) erabili zen, eta berreskurapena % 67,5etik % 94ra igo zen (35). Giza mikrodialisietan CSFren determinazio kuantitatiborako egindako beste ikerketa batean, berriz, proteinen prezipitazioko urratsean berreskurapen baxuak lortu zirenez, pHaren eragina eta disolbatzaile organikoen adizioaren eragina aztertu ziren. Prezipitazioa burutu aurretik lagina pH 4ra azidifikatzean, berreskurapena % 30etik % 70era igo zen,

CSF ionizatua hobeto erauzten baita proteinetatik. Bestalde, laginean % 33 1-propanol gehitzean, % 81-89ko berreskurapena lortu zen, antifungikoak fase organikoarekin duen afinitate altua dela eta (37). Modu berean, plasma laginetan anidulafungina eta mikafungina determinatzeko egindako ikerketa batean, SPE prozeduraren ostean oso berreskurapen baxuak (% 40 inguru) lortu ziren, adsortzioa dela medio (38). Hala eta guztiz ere, disoluzio estandarretan % 50 MeOH gehitzean farmakoen galera ekiditen zela ikusi zen (39).

Partikula zurrun gisa jokatzen duten molekula txikiak ez bezala, peptido gehienak ez dira hain sinpleki gainazalera adsorbatzen edo desorbatzen. Peptidoen konposizio eta egitura konplexuen ondorioz, adsortzio fenomenoan egitura berrantolaketak, gainazalarekiko afinitate aldaketak edo tamainaren araberako bazterketak gertatzen dira (40).

Materialen gainazalarekiko peptidoen elkarrekintzek garrantzi handia dutenez hainbat aplikaziotan (biomedikuntzan, adibidez), kanpoko baldintzek adsortzioan duten eragina aztertzea beharrezkoa da (41).

1.5.1 Kanpoko baldintzen eragina

Adsortzioan eragina duten kanpoko parametroak, funtsean, temperatura, pHa, indar ionikoa eta tanpoi-konposizioa dira. Askotan, ekinokandinen analisiak burutu nahi direnean, parametro horiek benetako baldintza fisiologikoen balio berdinetan finkatzen dira. Hala ere, beste azterketa esperimental asko analisirako egokiagoak diren baldintzetan egiten dira, posiblea den neurrian.

Temperaturak eragina du oreka egoeran eta baita peptidoen adsortzioaren zinetikan ere. Peptidoen difusio abiadura handitzen denean, adsortzio handiagoa espero daiteke. Beraz, ondoriozta daiteke temperatura altuetan, orokorrean, peptido gehiago adsorbatzen direla gainazalera (42).

Bestalde, pHari dagokionez, parametro honek peptidoen egoera elektrostatikoa zehazten du. pHa peptido baten puntu isoelektrikoaren (pI) berdina denean, karga

negatiboak eta positiboak orekan daude; hots, molekula neutroa da. pH balio baxuetan ($\text{pH} < \text{pI}$), peptidoen karga osoa positiboa da, eta pH balio altuetan ($\text{pH} > \text{pI}$), ordea, negatiboa. Beraz, adsortzioa altua da peptidoak eta substratuak kontrako karga daukatenean, erakarren elektrostatiakoek gainazalerako migrazioa bizkortzen baitute (40).

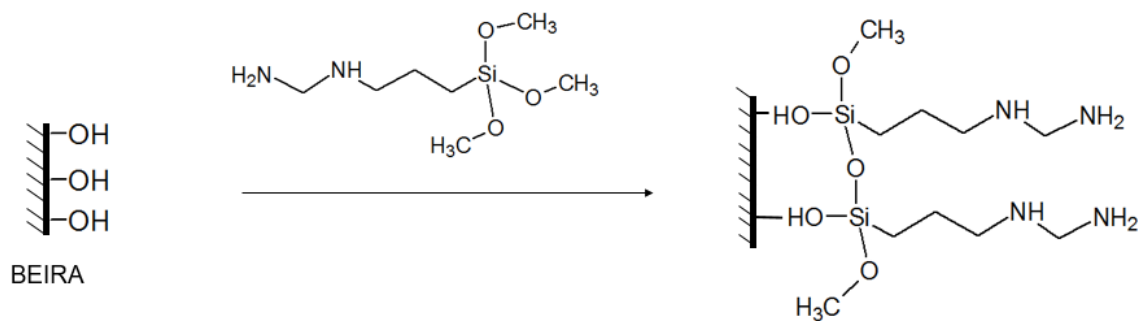
Peptidoen adsortzio prozesua baldintzatzen duen beste parametro bat indar ionikoa da (ioi disolbatuen kontzentrazioa adierazten duen terminoa). Indar ionikoa zenbat eta handiagoa izan, orduan eta laburragoak dira kargatutako ioien arteko interakzio elektrostatiakoak. Ondorioz, proteina kargatuak kontrako karga duten ioietan adsorbatzea oztopatzen da, eta antzeko karga duten substratuetan, berriz, adsortzioa hobetzen da (40).

Horrez gain, surfaktante edo tentsioaktiboek peptidoen adsortzioa gutxitu dezaketela uste da, tentsioaktiboek gainazal solidoarekin elkarrekintza sortu dezaketelako, eta beraz, farmakoaren eta gainazalaren elkarrekintzak gutxitzen dira. Gainera, surfaktanteak disoluzioaren propietateak aldatu ditzake, eta horren ondorioz, farmakoaren eta disoluzioaren arteko elkarrekintzak sendotu egiten dira (43). Izan ere, peptido-surfaktante elkarrekintzaren ondorioz, solutua disoluzio urtsuan disolbatzea faboratzen da. Elkarrekintzaren sendotasuna peptidoaren aminoazidoen kopuruaren, alboko katearen bolumenaren eta aminoazidoen propietate elektronikoen eta hidrofobizitatearen arabera da (44). Era berean, konposatu organikoen adizioak peptidoen adsortzioa nabarmen murrizten duela ikusi da, farmakoek konposatu organikoekiko duten afinitatea dela eta (45). Diluitzailea azidifikatzean edo behi-serum albumina erabiltzean ere peptidoen adsortzioa gutxitzen dela ikertu da (46).

1.5.2 Agente silanizataleak

Peptidoen adsortzio azterketetan erabiltzen den materiala askotan beira izaten da; eta ohikoa izaten da material horren gainazalean aldaketak aplikatzea adsortzioa ekiditeko gainazal egokia lortzeko. Hori burutzeko metodo

erabilienetako bat silanizazioa da, alkoxi taldeen kondentsazioa eragiten duen prozesua, hain zuzen ere. Organosilanoak ekonomikoki eta komertzialki eskuragarriak diren konposatuak dira. Silizioa duten monomero hauek bi talde errektibo mota dituzte: hidrolizagarria den taldea (Si-OR), gainazaleko hidroxilo taldeekin kondentsatu daitekeena, eta materialaren gainazalarekin bateragarria edo erreakzionatzeko gai den beste talde funtzional mota bat (X). Beraz, bi funtzio talde hauei esker, silanoak material desberdinei (plastikoari edo beirari, adibidez) “akoplatzeko” gai dira (47). Horrela, materialen gainazalean monogezuza funtzionalizatu bat sortzen da, materialaren propietate optikoak aldatu barik (gardentasuna, esaterako) (48). 4. Irudian agente silanizatzaile batek; N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilanoak (AATMS), hain zuzen ere, beirarekin duen erreakzioaren eskema ageri da.



4. Irudia: beiraren silanizazioaren eskema, N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilano (AATMS) agente silanizatzailea erabiliz

1.6 HELBURUA

CSF farmakoaren analisi egokia egin ahal izateko, egonkortasuna eta adsortzioa kontuan hartu beharreko parametroak dira. Izan ere, CSFk beirara eta plastikora atxikitzen duen joera dela eta, farmakoaren analisisa burutzea erronka handia da.

Beraz, lan honen helburua CSF antifungikoaren adsortzioa aztertzea izan da fluoreszentsia detektagailuari akoplaturiko bereizmen oso altuko likido-kromatografia (UHPLC-FLUO) metodo analitikoa erabiliz, eta horretarako kanpoko baldintzek (pHa, tenperatura, disolbatzaile organikoa...) adsortzioan duten eragina ikertu dugu. Bestetik, adsortzioa ekiditeko agente silanizatzaile eta baldintza egokienak aurkitzea ere izan dugu helburu.

2. ATAL ESPERIMENTALA

2.1 ERREAKTIBOAK

CSF azetatoa Finetech-etik (Wuhan, Hubei) lortu da, eta dimetil sulfoxidoa (DMSO), berriz, VWR Chemicals (Llinars del Vallès, Espainia) etxe komertzialetik. Azido 3-(N-morfolino)propanosulfonikoa (MOPS) Fluka (Burch, Suitza) etxe komertzialetik lortu da. pH desberdineko disoluzioak prestatzeko, sodio hidrogeno karbonatoa eta potasio karbonatoa Merck (Darmstadt, Alemania) etxe komertzialak hornitu du, eta amonio formiatoa, berriz, Fluka etxe komertzialak. Fase mugikorretarako, azido trifluoroazetikoa (TFA), azetonitriloa (AZN) (HPLC LC-MS kalitatekoa), eta metanola (MeOH) (HPLC-Isokratiko kalitatekoa) erabili dira, VWR Chemicals etxe komertzialetik lortuak. Bestalde, N-(2-aminoetil)-3-aminopropiltrimetoxisilanoa (AATMS), biniltrimetoxisilanoa (VTMS) eta 3-glizidiloxipropiltrimetoxisilanoa (GPTMS) agente silanizatzaileak Sigma-Aldrich (Saint Louis, AEB) etxe komertzialak hornitu ditu. Azido azetikoa (LC-MS kalitatekoa) Fluka (Burch, Suitza) etxe komertzialetik lortu da. Azkenik, erabilitako ur ultrapurua Milli-Q Element A10 sistematik (Millipore, Milford, AEB) lortutakoa izan da.

2.2 TRESNERIA

CSFren analisia egiteko, Waters (Milford, AEB) etxeko Acquity UPLC sistema kromatografikoa erabili da, fluoreszentzia (FLUO) detektagailuari akoplatuta. Zutabe kromatografikoa ere Waters etxekoa izan da, Acquity HSS T3 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm) hain zuzen ere. Bestalde, Empower software-a erabili da sistema kromatografikoaren kontrola eta datuen prozesatzea egiteko. Disoluzioen pHa neurtzeko erabilitako pH-metroa Crison pH Meter GLP 22 markakoa izan da, 5209 modeloko beirazko elektrodo konbinatuarekin. Disoluzioak homogeneizatzeko erabilitako irabiagailu magnetikoa Huanyu etxeko TP-350s izan da; eta laginak homogeneizatzeko, berriz, VWR markako vortex irabiagailua

erabili da. Pisaketak egiteko, Sartorius etxeko CP224-s ($\pm 0,0001$ g) balantza analitikoa erabili da. Azkenik, datuak tratatzeko Microsoft Excel 2007 programa erabili da.

2.3 BALDINTZA KROMATOGRAFIKOAK

Banaketa kromatografikorako bi fase mugikor erabili dira, fase urtsua eta organikoa. Fase urtsua (A) TFA (10 mM, pH = 2,10 inguru) izan da; eta organikoa (B), berriz, AZN purua. Gradientearen konposizioari dagokionez, % 20 B-rekin hasten da, eta fase honen konposizioa linealki igotzen da 5,8. minutuan %100 den arte. Gero, hasierako baldintzetara bueltatzen da 6,3. minutuan, eta horrela mantentzen da, egonkortzeko, 8. minutura arte. Fluxua 0,5 mL/min-koa izan da, zutabearen tenperatura 35 °C-koa, eta laginak, berriz, 22 °C-tan mantendu dira. Injektatutako bolumena 5 μ L-koa izan da. Fluoreszentzia detektagailuaren kitzikapen uhin-luzera 229 nm-tan finkatu da, eta igorpenekoa, berriz, 300 nm-tan, balio horiek baitira sentikorrenak.

2.4 KASPOFUNGINA DISOLUZIOAK

CSFren 1600 mg/L-ko disoluzio estandarra DMSOtan prestatu da, eta -20 °C-tan gorde. Bertatik abiatuz prestatu dira lanean erabilitako gainontzeko CSFren disoluzioak, baina hauek MOPSetan (10 mM) prestatu dira (pH 7 inguru).

2.5 BEIRAZKO MATERIALAREN TRATAMENDUA

Beirazko materiala tratatu (desaktibatu) behar izan denean, Fukazawa et al.-en lanean oinarritutako tratamendua jarraitu da (49). Horretarako, lehenik eta behin % 1 azido azetikoaren disoluzioa prestatu da uretan. Disoluzio hori disolbatzaile moduan erabiliz, % 1eko agente silanizatzaile (AATMS, GPTMS edo VTMS) disoluzioa prestatu da. Ordu betez irabiagailu magnetikoan irabiatzen utzi ostean,

disoluzioa tratatu nahi den materialera (matraze aforatuak, bialak) igaro da, hustu aurretik 5 minutu itxaron dira eta gero materiala labean (50 °C) sartu da 24 orduz, lehortu arte.

2.6 KASPOFUNGINAREN ADSORTZIOAREN AZTERKETA

Kromatografoan injektatutako disoluzio guztien CSFren kontzentrazioa 0,25 mg/L-koa izan da, eta bial guztietan jarritako bolumena, berriz, 1 mL-takoa. Bestalde, aipatzekoa da CSF disoluzioa prestatu eta bialetara igaro aurretik ordu erdi itxaron dela. Izan ere, egun bakoitzeko esperimentuak konparatuko direnez, eta adsortzioa matrazearen arabera oso aldakorra denez (egun bakoitzean CSF matraze desberdin batean prestatzen da), errepikakortasun falta murrizteko asmoz itxaron da ordu erdi.

2.6.1 Materialaren tratamenduaren eragina

Trataturiko materialak adsortzioan duen eragina aztertzeko, AATMS bidez trataturiko matrazean 0,25 mg/L-ko CSF disoluzioa prestatu da, eta ordu erdi igarota 1 mL eraman da bialetara. Bost bial mota erabili dira: tratamendurik jasan ez dutenak (bial normalak), komertzialki trataturikoak (agente metilatzaile baten bidez gainazal hidrofobikoagoa daukaten bialak), AATMS bidez trataturikoak, VTMS bidez trataturikoak eta GPTMS bidez trataturikoak. Bakoitzetik bost erreplika egin dira, eta beste ordu erdi itxaron ostean, kromatografoan injektatu dira. Injektatu arte pasatutako denbora faktore kritikoa izan daitekeenez, injektatzeko ordena kontuan izan da eragina minimizatzeko eta aztertzeko asmoarekin. Horretarako, injekzioen sekuentzia honakoa izan da: normal-komertzial-AATMS-VTMS-GPTMS, bakoitzaren lehenengo erreplikatik hasita bosgarrenera arte.

Lehenengo injekziotik 24 ordu igaro ondoren, berriro injektatu da sekuentzia bera, ordena berean. Gero, bial guztietan 400 µL AZN gehitu dira CSFren seinalearen

jaitsiera berreskuratzen den ala ez ziurtatzeko, eta sekuentzia osoa berriz analizatu da.

2.6.2 Adsortzio-zinetikaren azterketa

Denborak adsortzioan duen eragina modu xeheagoan aztertzeko, 0,25 mg/L-ko CSF disoluzioa AATMS bidez trataturiko matrizean prestatu da MOPSetan. Ordu erdi itxaron ondoren, bialera eraman da disoluzioa. Esperimentua bi bider egin da, batean bial normala erabiliz, eta bestean, berriz, AATMS bidez trataturikoa. Orduan, denboran zehar injekzioak egin dira, lehenengoz 10 minuturik behin ordu betez, gero ordu erdirik behin bi orduz, horren ondoren ordurik behin beste bi orduz, eta azkenekoa lehenengo injekzioa egin eta 12 ordutara.

2.6.3 Disolbatzaile organikoen eragina

AZNk CSFren adsortzioan duen eragina ikertzeko, CSFren 0,50 mg/L-ko disoluzioa egin da MOPSetan AATMS bidez trataturiko matrizean. Horrela, gero erdira diluituko denez, injektatuko den CSF disoluzioa 0,25 mg/L-koa izango da. Kasu honetan ere, esperimentua bi bider errepikatu da: batean tratatu gabeko bialak erabiliz, eta bigarrenean, berriz, AATMSz trataturikoak erabiliz. Beraz, bialean disolbatzaile organikoaren % 0, % 10, % 20, % 30, % 40 eta % 50-eko proportzioak aztertu dira, eta proportzio bakoitzaren bost erreplika egin dira. Hortaz, laginak prestatzeko 500 µL CSF disoluzio, beharrezko AZN bolumena eta MOPS (guztira 1 mL izan dadin) gehitu dira.

Bestalde, MeOHk duen eragina ere aztertu da prozedura berdina jarraituz bi bider (bial normalekin eta AATMS bidez trataturikoekin). Hala ere, kasu honetan disolbatzaile organikoaren proportzioa % 0-tik % 70-era arte aztertu da, CSFren adsortzioa ekiditeko disolbatzaile organiko gehiago behar baita. Beraz, bialeako CSFren kontzentrazioa 0,25 mg/L-koa izan dadin, trataturiko matrizean 0,83 mg/L-ko kontzentrazioko disoluzioa prestatu da. Izan ere, disolbatzaile

organikoaren proportzio maximoa % 70 denez, egingo den diluzioa handiagoa izango da (3:10). Beraz, kasu honetan laginak prestatzeko 300 µL CSF disoluzio, beharrezko MeOH bolumena eta guztira 1 mL osatzeko MOPS gehitu dira.

2.6.4 pHaren eragina

10 mM kontzentrazioko hiru tanpoi disoluzio prestatu dira: pH azidorako formiko/formiato tanpoia erabili da, pH neutrorako MOPS tanpoia, eta pH basikorako, berriz, bikarbonato/karbonato tanpoia. pH disoluzio bakoitzetik 0,5 mL hartu, eta bial desberdinetan jarri dira.

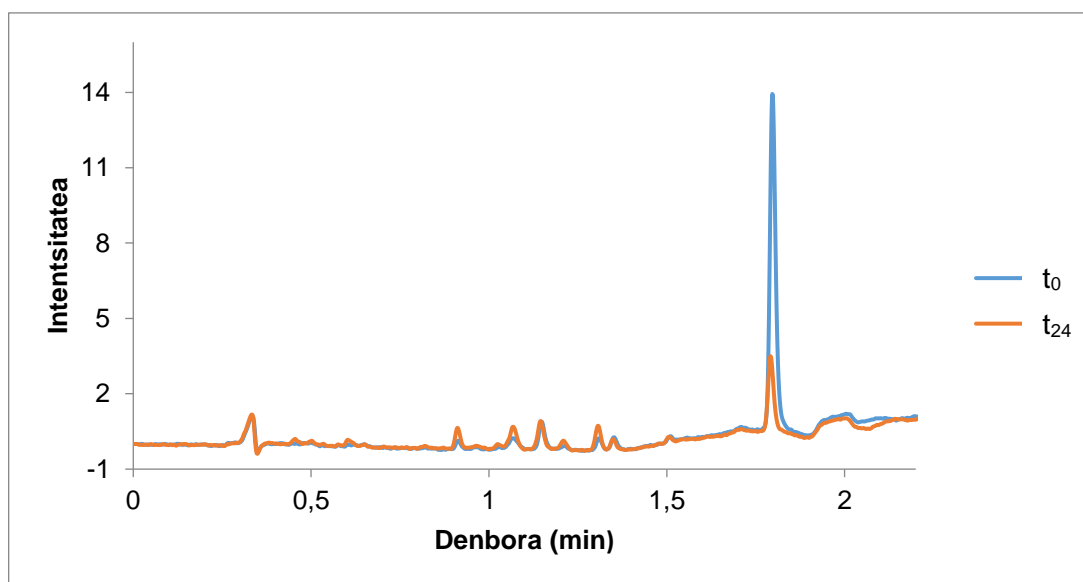
Gero, CSFren 0,50 mg/L-ko disoluzioa matraze tratatuan prestatu da (MOPSetan, pH 7), ordu erdi itxaron, eta bertatik 0,5 mL eraman dira pH desberdineko disoluzioa daukaten bialetara (bial bakoitzeko bost erreplika egin dira). Amaierako disoluzioen pHa 4, 7 eta 10 izan da. Laginak vortex irabiagailuan homogeneizatu ostean, kromatografoan injektatu dira.

Kasu honetan ere, esperimentua bi bider errepikatu da, batean tratatu gabeko bialak erabiliz, eta bigarreanean, ordea, AATMS bidez trataturikoak.

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

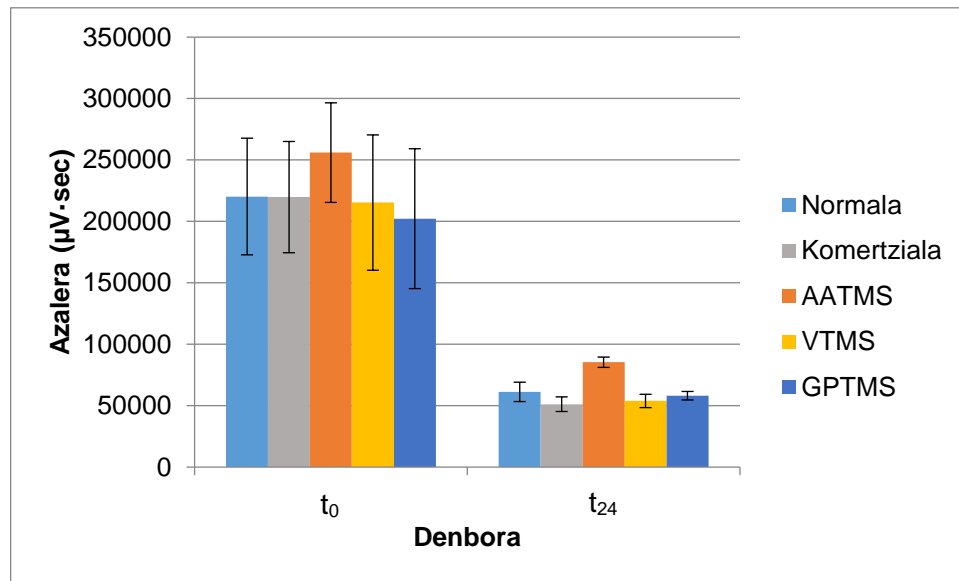
3.1 MATERIALAREN TRATAMENDUAREN ERAGINA

Aurretik esan den bezala, materialaren tratamenduak CSFren adsortzioan duen eragina aztertzeko beirazko bial desberdinak erabili dira. Banaketa kromatografikoa 8 minutukoa izan da, eta CSF 1,7. minutuan eluitu da, gutxi gorabehera. 5. Irudian AATMS agente silanizatzailearen bidez trataturiko bial baten kromatograma ikus daiteke, lagina prestatu eta berehalako injekzioan (t_0) eta 24 ordu igaro ostean egindako analisisian (t_{24}).



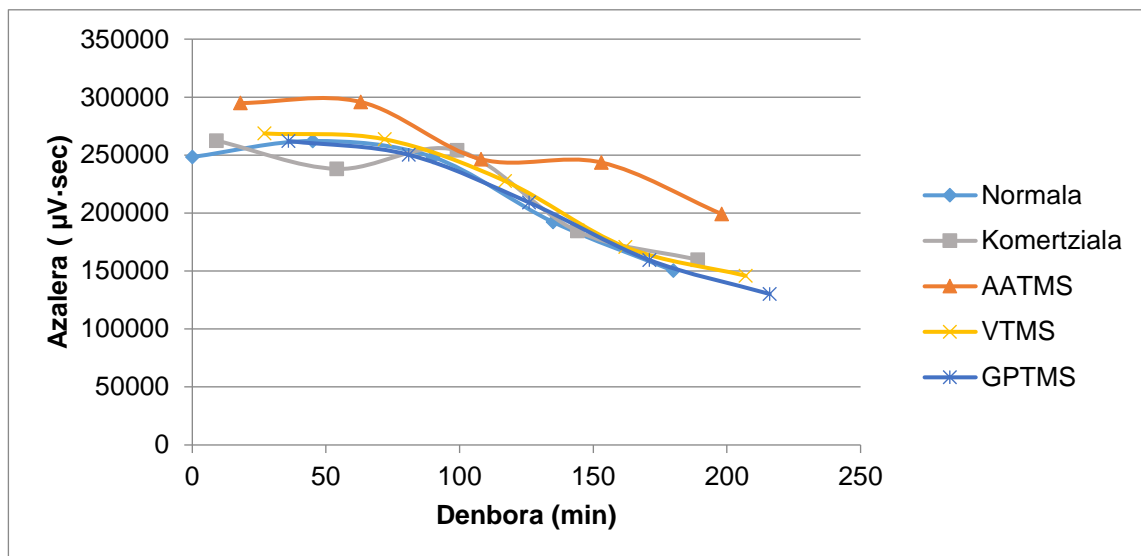
5. Irudia: laginak prestatu eta berehalako injekzioaren (t_0) eta 24 ordu igaro ostean egindako analisisaren (t_{24}) kromatograma AATMS bidez trataturiko bialean. 1,7. minutuan ageri den gailurra dagokio CSFri

Gailurren azalaren balioak edukita, bial mota bakoitzaren errepliken batz besteko azalaren balioak kalkulatu dira desbideratze estandarrarekin batera (6. Irudia):



6. Irudia: bial mota bakoitzeko errepliken (n=5) CSFren azalaren batz bestekoa eta desbideratze estandarra, laginak prestatu eta berehalako injekzioetan (t₀) eta 24 ordu igaro osteko analisisian (t₂₄)

Irudian ikus daitekeen moduan, laginak prestatu eta berehala egindako injekzioetan (t₀) desbiderapen estandarra oso handia da. Izan ere, erreplika bakoitzean lortutako azaleraren balioa denbora igaro ahala txikituz joan da modu esanguratsuan; hau da, adsortzio prozesua oso azkarra izan da (7. Irudia).

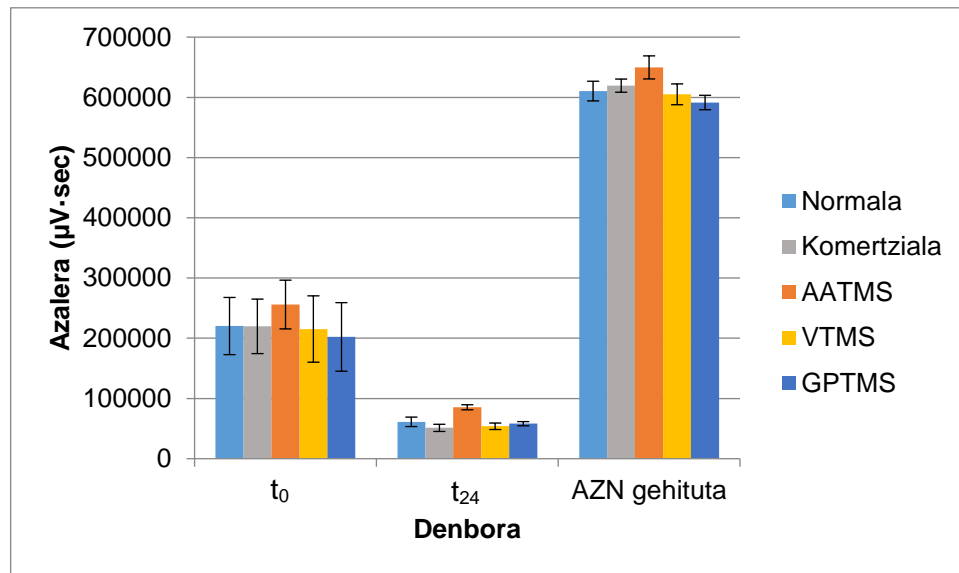


7. Irudia: laginak prestatu eta berehalako injekzioen (t_0) bial mota bakoitzaren erreplikien azalera denboran zehar

Desbiderapen handiaren ondorioz, lehenengo eguneko injekzio horietan ez dago desberdintasun esanguratsurik bialen artean; hau da, azalaren batz bestekoak estatistikoki konparagarriak dira % 95eko konfiantza mailan. Hori dela eta, ezin dezakegu esan bial mota bat erabiltzea beste bat erabiltzea baino egokiagoa denik. Bestalde, denboran zehar bial mota guztiek aurkezten duten joera antzekoa da.

Bial berdinak 24 ordu geroago injektatzean, azalaren seinalearen jaitiera nabarmena behatzen da bial mota guztietan, eta desbiderapen estandarra jada ez da horren handia; hots, 24 ordu igarota bial mota bakoitzeko erreplikien azalaren balioak nahiko antzekoak dira, adsortzioa orekara iritsi delaren seinale. Gainera, kasu honetan seinalerik altuena ematen duen biala AATMS bidez trataturikoa da.

Bestalde, atal esperimentalean esan bezala, 24 orduko injekzioen ostean AZN gehitu da seinalea igotzen den ala ez aztertzeko, disolbatzaile organikoek adsortzioa ekiditen dutela ezaguna baita. Horrela, 8. Irudian aurkezten dira AZN gehitu eta osteko emaitzak, t_0 eta t_{24} -ko emaitzekin batera.



8. irudia: t₀ eta t₂₄-ko emaitzez gain, AZN gehitu ondoren lorturiko emaitzak biala mota guztietan (n=5). Disolbatzaile organikoa gehitzean diluzio bat egin denez, emaitza horiek aurreko egunekoekin konparatu ahal izateko egindako diluzioa kontuan hartu da eta seinalea zuzendu edo birkalkulatu da.

CSFk t₀-tik t₂₄-ra duen seinalearen jaitsiera hiru arrazoiren ondorio izan daiteke: disolbagarritasun arazoak, adsortzioa edo degradazioa. Hala eta guztiz ere, azkeneko aukera hau baztertu daiteke. Izan ere, 8. Irudian ikus daitekeen moduan, bialean AZN gehitzean seinalea asko igotzen da, eta seinalearen jaitsiera farmakoaren degradazioaren ondorio izango balitz, ez zatekeen seinalearen igoera hori ikusiko. Halaber, t₀-an ez da seinale altuena lortzen, AZN gehituta lortzen den seinalea t₀-ko injekzioena baino hiru aldiz handiagoa baita, gutxi gorabehera. Beraz, adsortzioa prozesu azkarra dela ondorioztatu daiteke, CSF disoluzioa bialelara pasatu bezain laster adsortzio prozesu esanguratsua baitago.

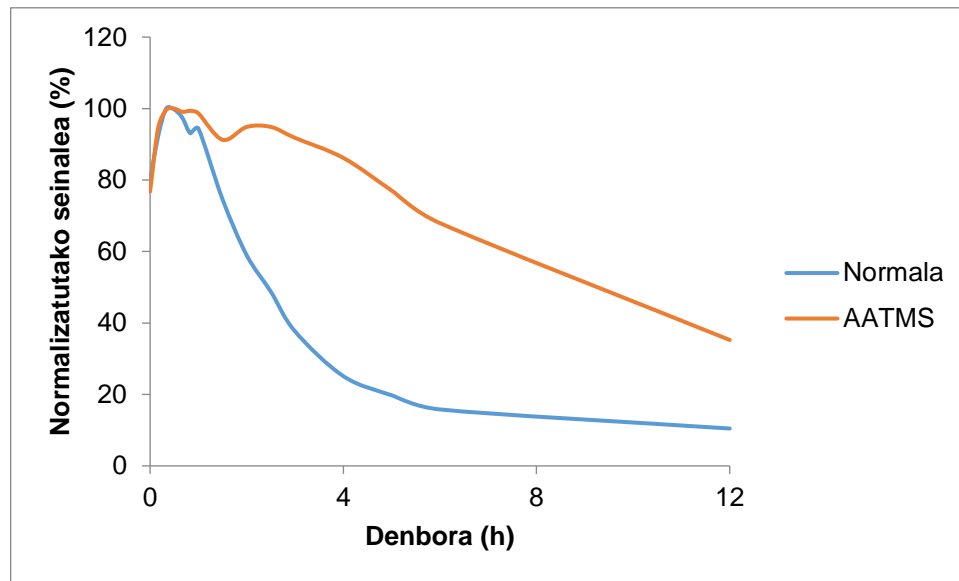
Arazoa adsortzian edo disolbagarritasunean dagoen jakiteko, esperimentu sinple bat burutu zen. Bertan, CSF disoluzioa AATMSz trataturiko bi bialelara eraman zen. Bialekako bat vortex irabiagailuan egon zen irabiatzen, bestea, ordea, ez. Horren ostean, bi bialak injektatu ziren, eta irabiatzen egondako bialean lorturiko seinalea gelditu egondako bialarena baino baxuagoa zela ikusi

zen. Disolbagarritasun arazoa izan balitz, irabiatutako bialean lortutako seinalea handiagoa izango zatekeen. Beraz, suposatu daiteke irabiatzearen ondorioz CSFk bialeko hormarekin daukan kontaktua handiagoa dela; hau da, adsortzioa handiagoa dela eta horregatik lortzen dela seinale baxuagoa. Adsortzio ez espezifikoa mekanismoa oraindik ezagutzen ez denez (50), ezin daiteke ziurtasun osoz esan AZN gehitzean ikusten den seinalearen igoera adsortzioa ekiditearen ondorio izan denik, baina lan honetan aukera hori hartuko da hipotesi nagusi moduan.

Bestetik, materialaren tratamendua guztiz eraginkorra ez den arren, agente silanizatzaile onena AATMS dela ondoriozta daiteke, 24 orduren ostean adsortzioa hoberen ekiditen duena baita. Edonola ere, bereziki azpimarratzekoa da denboran zehar ikusi den seinalearen jaitsiera esanguratsua.

3.2 ADSORTZIO-ZINETIKAREN AZTERKETA

Aurreko esperimentuan ikusi den moduan, t_0 -ko erreplikaren desbiderapen estandarra oso altua da; hau da, seinalea asko jaisten da denboran zehar, denborak adsortzioan eragina baitu (7. Irudia). Hori aztertzeko, adsortzio-zinetikaren esperimentuan bial berbereko disoluzioa behin eta berriro injektatuz lorturiko profil zinetiko normalizatuak 9. Irudian aurkezten dira. Bi esperimenduetako (bial normalarena eta trataturikoarena) balioak konparatu ahal izateko, saiakuntza bakoitzeko balioak normalizatu dira seinale maximoarekiko.



9. Irudia: zinetikaren azterketan (bial normalarekin eta AATMS bidez trataturikoarekin) lorturiko azalerak normalizaturik seinale maximoarekiko, eta denborarekiko adierazita

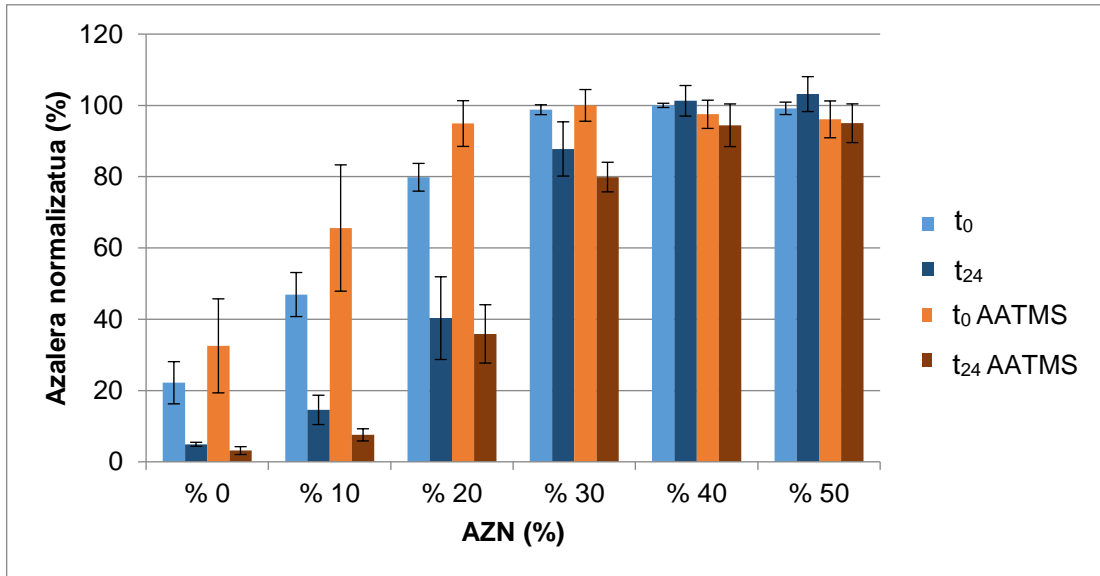
Hasieran bi bialek antzeko joera duten arren, 2. ordutik aurrera, gutxi gorabehera, bial normalaren seinalearen jaitziera trataturikoarena baino handiagoa da. Izan ere, bial normalaren jaitzieraren joera nahiko esponentziala da, baina trataturiko bialarena, ordea, linealagoa.

Beraz, esperimentu honekin ikusi da zenbat eta denbora gehiago igaro, orduan eta farmako gutxiago dagoela disoluzioan, CSF bialeko hormari atxikita geratzen baita. Hala ere, bial tratatuak erabiliz gero, atxikipen hori ez da horren handia. Bial normaletan, lehenengo 6 orduetan jaitziera oso bortitza izan da, baina hortik aurrera badirudi adsortzioa orekara heldu dela. Bial tratatuetan, ordea, 12 orduetan behintzat joera berdintsua ageri da. Alabaina, suposatu daiteke adsortzioa oreka batera iritsiko dela, baina ziurtasunez jakiteko zinetika denbora luzeagoz aztertu beharko litzateke.

3.3 DISOLBATZAILE ORGANIKOEN ERAGINA

Atal esperimentalean esan bezala, bi disolbatzailereren eragina adsortzio fenomenoan aztertu da, AZNrena eta MeOHrena.

10. Irudian ageri dira AZNrekin bial normaletan eta trataturikoetan lorturiko balio normalizatuak:



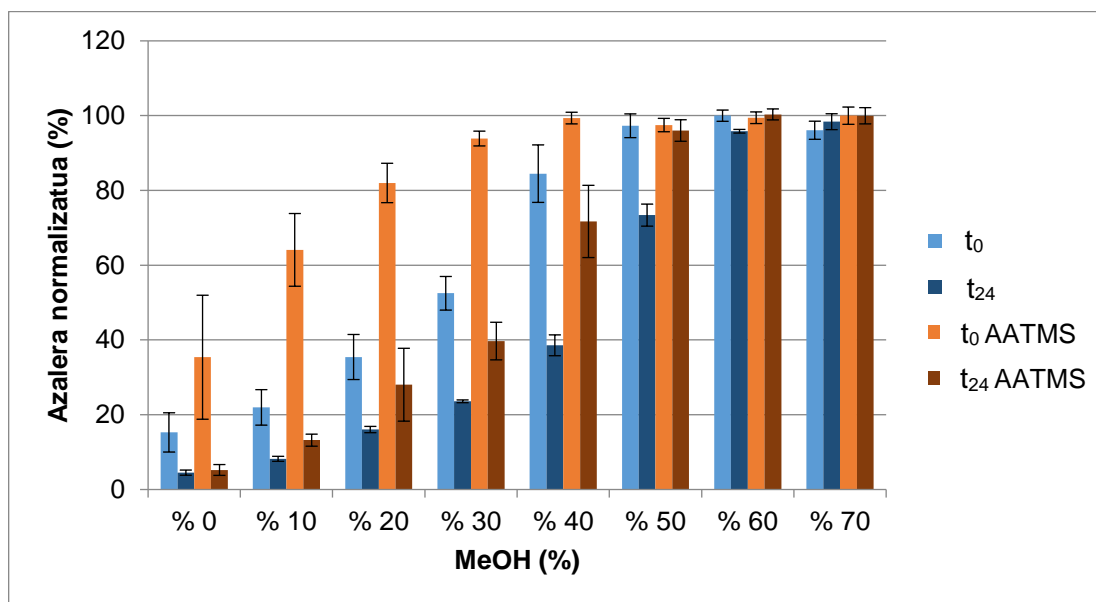
10. Irudia: AZNren konposizio desberdinetan lorturiko balio normalizatuak, bial normaletan eta trataturikoetan (n=5)

Bertan ikus daitekeen bezala, AZNren konposizioa % 30etik gorakoa denean lortzen da seinale maximoa, bai bial normaletan eta baita tratatuetan ere. Hala ere, ehuneko horretan 24 orduren ostean seinalea modu esanguratsuan jaitsi egiten da, eta t₀-an eta t₂₄-an lortutako balioak ez dira konparagarriak %95eko konfiantza mailan. AZNren % 40 eta % 50 konposizioan, ordea, bi egunetako balioak estatistikoki konparagarriak dira bi bial motetan. Hori dela eta, esan daiteke adsortzioa modu egokian ekiditen dela AZNren konposizioa % 40 denean. Gainera, AZNren proportzio txikietan desbiderapen estandarra oso handia dela ikus daiteke; hots, denborak adsortzioan duen eragina nabarmena da, erreplika bakoitzean lehenengo injekziotik bigarrenera bitartean adsortzioa ematen baita.

Proporzio handietan, ordea, injekzio ordenaren independentea da, denborak ez baitu eraginik adsortzioan.

Beste alde batetik, ikus daiteke bialen tratamenduak ez duela eraginik izan; hau da, bi bial motek antzeko joera erakutsi dute. Hain zuzen ere, Suelter et. al.-ek egindako ikerketa batek frogatu zuen peptidoen adsortzioa murrizteko eraginkorragoa dela disolbatzailearen natura aldatzea gainazala tratatzea baino (45).

MeOHri dagokionez, 11. Irudian aurkezten dira bial mota bakoitzarekin lortutako balio normalizatuak:



11. Irudia: MeOHren konposizioa aldatuz bial normal eta tratatuetan (n=5) lorturiko azalaren balio normalizatuak ehunekotan

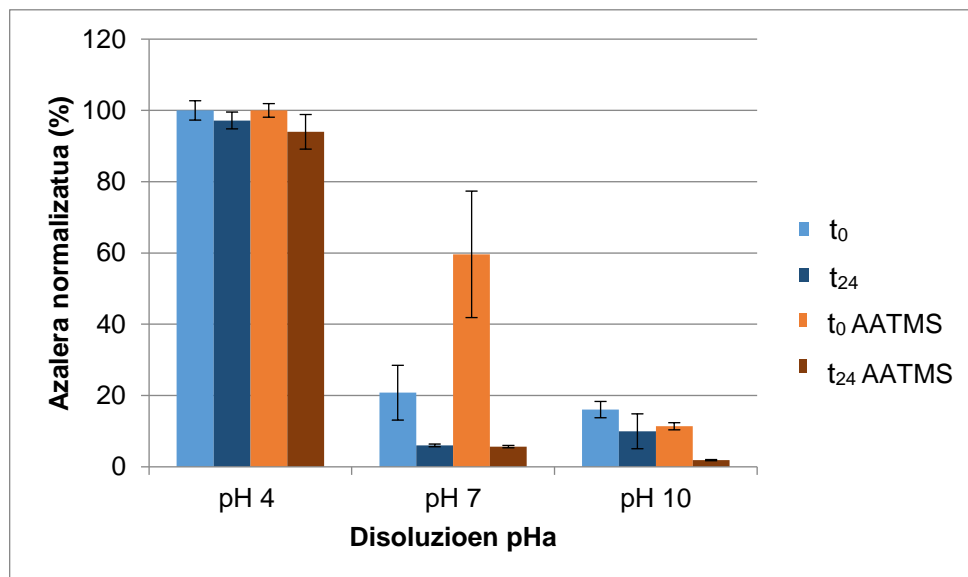
Kasu honetan, seinale maximoa lortzeko disolbatzaile organikoaren kantitate gehiago behar da, bial tratatuetan % 50 izango litzateke egokiena. Izan ere, nahiz eta % 40arekin seinale maximoa lortu, 24 ordu igarota seinalea modu esanguratsuan jaisten da, t₀-ko eta t₂₄-ko emaitzak konparagarriak ez direlarik % 95eko konfiantza mailan. Bial normaletan, berriz, t₀-ko eta t₂₄-ko emaitzen artean denborak adsortzioan eraginik eduki ez dezan MeOHren % 70eko proporzioa

behar da. Hortaz, MeOHren kasuan bialen tratamenduaren eragina ikus daiteke. Horrez gain, lehenengo eguneko injekzioen MeOHren % 10-% 40 proportzio tartean materialaren tratamenduak eragina duela esan daiteke, aldaketa esanguratsua baitago bial tratatuen eta normalen seinaleen batz bestekoen artean.

AZN eta MeOH konparatuz, bi disolbatzaile organiko hauek ezaugarri desberdinak dituzte. MeOH disolbatzaile protikoa izanik, hidrogeno loturak egiteko gaitasuna du; AZNk, ordea ez. Azken honek, berriz, momentu dipolar eta konstante dielektriko handiagoa du (51). Disolbatzaile hauen CSFren disolbagarritasunaren datu zehatzik ez dagoen arren, bibliografiaren arabera AZN eraginkorragoa da kate ez-polar luzeak disolbatzeko; eta MeOH, ordea, kate ez-polar laburrak disolbatzeko (52). Emaitzak ikusirik, eta CSFk kate ez-polar luzea duela jakinik, suposatzen daiteke CSF AZNtan MeOHTan baino disolbagarriagoa dela, AZN kantitate gutxiagorekin lortzen baita seinale maximoa. Horrez gain, aipatzekoa da CSF alderantzizko fasean AZNrekin MeOHrekin baino azkarrago eluitzen dela.

3.4 pH-AREN ERAGINA

pH bakoitzeko (4, 7 eta 10) bial tratatu eta ez tratatuekin lorturiko balio normalizatuak 12. Irudian ageri dira:



12. Irudia: pH desberdinekin (n=5) lortutako balio normalizatuen ehunekoak bial normal eta AATMS bidez trataturikoetan

Bertan ikus daitekeen moduan, pHa 4 denean lortzen da seinale maximoa, eta pHa zenbat eta basikoagoa izan, orduan eta baxuagoa da seinalea. Baldintza azidoetan lorturiko emaitzak bial tratatu eta normaletan konparagarriak (% 95eko konfiantza mailan) izateaz gain, 24 ordu pasatutakoan ez da adsortziorik antzeman, t₀ eta t₂₄-ko emaitzak konparagarriak baitira bi kasuetan % 95eko konfiantza mailan. Kasu honetan, desbiderapena txikia da, adsortzioa egotekotan, orekara laster iritsi delaren seinale. Gainerako pHtan, ordea, adsortzio prozesua denborarekin aurrera doala ikusten da. Bestalde, pH 7an t₀-ko injekzioetan (bial normal eta tratatuetan) desbiderapen estandarra altua dela ikus daiteke; hau da, injekzio ordenak eragina izan du.

Baldintza basikoetan lorturiko seinalea oso baxua izatearen arrazoia farmakoaren degradazioa ez dela ziurtatzeko, % 30 AZN gehitu zaio, eta horren ondoren injektatzean seinalea handitzen dela behatu da. CSFren seinalearen jaitziera farmakoa beste konposatu batzuetan degradatzearen ondorio den ziurtatzeko ikerketa bat egin zen laborategiko taldean. Bertan, CSF disoluzioak muturreko baldintzetan (azido, alkalino eta oxidatzaile) prestatu ziren, eta hiru metodo

analitiko desberdinen bidez neurketak egin ziren: HPLC-FLUO, erresonantzia magnetiko nuklearra eta HPLC-MS. Emaitzetan ikusi zen CSF molekula oso egonkorra dela, erabilitako baldintzak oso muturrekoak izan arren, molekulak ez baitu degradazio handiegirik jasaten pH 13an izan ezik .

Seinale maximoa pH azidoan lortzearen zergatia ulertzeko, CSFren, bialeko hormaren eta AATMSren ionizazio egoera ezagutu behar da. CSFri dagokionez, seinalearen jaitsiera farmakoaren polaritatearekin lotu daiteke. Zenbat eta polarragoa izan, orduan eta handiagoa da disoluzio urtsuan mantentzeko duen joera; eta pHa igo ahala, CSFren polaritatea jaisten doa. Bial tratatuen kasuan, pHa 4 denean, CSFren amino funtzio taldeak protonaturik daude, eta baita AATMS agentearen amino taldeak ere (amina primarioaren pKa 7,12 eta amina sekundarioaren pKa 9,88). Beraz, biek zeinu bereko karga izatean, aldarapen indarren ondorioz, CSF disoluzioan egotea faboratuta dago. Bial normalen kasuan, nahiz eta beirako silanol taldeak (pKa 7) neutro egon (53), eta beraz, aldarapen indarrak ez egon, baldintza hauetan CSFren natura polarrena da beste bi baldintzen aldean. Hori dela eta, CSF disoluzioan egotera faboratuta dago.

pHa 7 denean, CSFren natura ez da horren polarra, amino talde bat gutxiago baitu protonatuta. Horregatik, disoluzio urtsuarekin dituen elkarrekintzak gutxitzen dira, eta beirarekin dituenak, ordea, handitu. Hau da, adsortzioa nabariagoa da. Kasu honetan, gainera, bial tratatu eta normalen seinaleen artean aldaketa esanguratsua dago to-ko injekzioetan, tratamenduak eragina izan duelarik. Izan ere, agentearen amino taldeak protonaturik egotearen ondorioz, CSFren eta AATMSren artean aldarapen indarrak daude, eta horrek adsortzioa murriztea eragiten du.

pHa 10 denean, ordea, AATMSren amino taldeak ez daude protonatuta; eta ondorioz, tratamendua ez da eraginkorra. Are gehiago, kasu honetan bial normaletako seinalearen eta trataturikoen artean aldaketa esanguratsua dago, normalen seinalea altuagoa izanik. Izan ere, baldintza hauetan CSFren natura ez polarrena da. Hortaz, ez dago faboratuta CSF uretan disolbatuta egotea, baina

bial normalen silanol taldeen desprotonazioa dela eta, karga negatiboa dago, eta beraz, aldarapen indar gehiago daude bial tratatuetan baino, CSF ere desprotonatuta baitago, eta ondorioz, karga negatiboa baitauka. Bial tratatuetan, AATMS neutro egotearen ondorioz, elkarrekintza hidrofobikoak ematen direla suposatu daiteke, CSF adsorbatuta geratzen delarik.

4. ONDORIOAK ETA ETORKIZUNEN LANA

Lan honetan kaspofungina antifungikoaren adsortzioan eragina duten kanpoko baldintzak aztertu dira UHPLC-FLUO metodo analitikoaren bidez, beiraren silanizazioa eraginkorra den ala ez ikertzearekin batera.

Egindako saiakuntzetan argi ikusi da CSFk beirari itsasteko joera duela, eta adsortzioa prozesu azkarra dela. Hala ere, agente silanizatzaileen bidez beira tratatzean, adsortzioaren murrizketa behatu da, ikertutako agenteen artean AATMS izanik eraginkorrena. Gainera, espero bezala, CSF disoluzioari disolbatzaile organikoak gehitzean adsortzioa ekiditea lortu da, AZNren kasuan MeOHrean baino proportzio txikiagoarekin lortu delarik. AZNren kasuan % 40ko proportzioa behar izan da adsortzioa guztiz ekiditeko bi bial motetan, eta MeOHren kasuan, berriz, % 50 trataturikoetan eta % 70 normaletan. Bestalde, CSF disoluzioaren pHa aldatzean, ikusi da baldintza azidoetan ekiditen dela hoberen adsortzioa, eta baldintzak basikotu ahala, adsortzioa handitzen doala. Emaizta horiek CSFren polartasunarekin erlazionatu dira; izan ere, pHa handitzean farmakoaren polartasuna jaisten da, eta beraz, urarekin daukan afinitatea ere gutxitzen da. Urarekin duen afinitatea jaistean, bialera adsorbatzeko joera handiagoa da.

CSFren adsortzioa murrizteko baldintza apropos batzuk aurkitu diren arren, kontuan izan behar da baldintzak prozesu errealetera egokitu behar direla; hala nola, kultibo zelularretara. Ingurune zelularrak aztertzen diren plakak AATMS bidez tratatzea bideragarria da, baina laneko pHa 7 ingurura doitu behar da. *In vivo* egiten diren esperimentuak baldintza fisiologikoetan burutu behar direnez, ezin da disolbatzaile organikorik gehitu, baina determinazio analitikoa egiteko bai, eta bertan ere pHa aldatu daiteke. Hala ere, ikuspuntu praktikotik, ingurune zelularretan egiten diren analisiak fidagarriak izan behar direnez, garrantzitsua da laginak prestatuko diren materialaren tratamendua eraginkorra izatea, eta gure lanean aztertutako agenteekin ez da hori lortu, adsortzioa ez baita guztiz ekidin.

Esan beharra dago ikerketa honetarako planteatuta zeuden hainbat esperimentu ezin izan zirela egin, lan hau burutzen ari zen bitartean koronabirusaren pandemia iritsi baitzen. Horietako bat tenperaturak adsortzioan duen eragina aztertzea zen. Horretarako, pentsatuta zegoen injektatuko diren laginen tenperatura aldatzea (esperimentu bat 4 °C-tan, beste bat 22 °C-tan eta azkenekoa 37 °C-tan), eta zinetika jarraitzea, adsortzio-zinetikaren esperimentuan bezalaxe.

Bestetik, surfaktanteek adsortzioa murrizteko joera dutenez, tentsoaktiboekin (sodio n-dodezil sulfatoa, Triton X-100, etab.) esperimentu batzuk egitea ere planteatuta zegoen, adsortzioa murrizteko beharrezkoa den tentsoaktibo kantitatea ezagutzea helburu zutenak.

Horrez gain, RPMI ingurune zelularrean dagoen CSFren determinazioa egin nahi zen 96 mikropuzuetako plaka normal eta tratatuetan. Horrela, beira ez den materiala aztertzeaz gain, CSFk mikropuzuetan duen adsortzioa aztertuko zen, tratamenduaren eraginkortasuna aztertzearekin batera.

Bestalde, interesgarria izango litzateke pHaren baldintzak ikertzen jarraitzea. pH azidoan adsortzioa gutxitzen den arren, ez da ikertu ea % 100ean ekiditen den. Hori ikertzeko, pH azidoko esperimentua adsortzioa jasaten ez den baldintzekin (AZNrekin) konparatu beharko litzateke. Seinale berbera lortzea adsorbatzen ez delaren ezaugarri izango litzateke.

Infekzio fungiko inbaditzaileak hazten ari direla eta onddoek antifungikoekiko duten erresistentziaren bilakaera ikusita, ekinokandina berrien garapena beharrezkoa da. Hori dela eta, metodo analitiko egokiak garatzea premiazkoa da. Hala ere, CSF moduko farmako askok duten egitura peptidikoaren ondorioz ematen den adsortzio ez-espezifikoaren mekanismoa ondo ez ezagutzea oztopo izan daiteke farmakoen analisi kuantitatiboetan; eta beraz, beharrezkoa da honen inguruan ikertzen jarraitzea.

5. ESKER ONAK

Gradu amaierako lan hau aurrera eraman da UPV/EHUko Zientzia eta Teknologia Fakultatean. Eskerrak eman nahiko nizkieke Kimika Analitikoa saileko FarmArteM ikerketa taldeko kideei behar izan dudan guztietan laguntzeko prest agertu izanagatik.

Amaitzeko, nire eskerrik beroenak Oskar Gonzalez Mendia doktoreari eta Beatriz Uribe Oñate doktoregaiari emandako aholku, gomendio eta laguntzagatik, bizi dugun egoera zail honetan adierazitako prestutasunagatik eta izandako pazientzia guztiagatik. Eskerrik asko, batez ere, etapa berezi honen amaieran bidelagun izan izanagatik.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Wang, J.; Zu, Q.; Wang, W. Analysis of factors of pulmonary fungal infection in mice in respiratory medicine department based on logistic regression analysis model and Progranulin. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020, 27, 629-635.
2. Havlickova Blanka, B.; Havlickova Blanka Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008, 51, 2-15.
3. Datt, M.; Sharma, A. Novel and unique domains in aminoacyl-tRNA synthetases from human fungal pathogens *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *BMC Genomics*. 2014, 15, 1069.
4. Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*. 2012, 4, 165rv13.
5. Martin, G. S.; Mannino, D. M.; Eaton, S.; Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 1546-1554.
6. Shao, P.; Huang, L.; Hsueh, P. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2007, 30, 487-495.
7. Ibáñez-Martínez, E.; Ruiz-Gaitán, A.; Pemán-García, J. Update on the diagnosis of invasive fungal infection. *Revista Española de Quimioterapia*. 2017, 30.
8. Fernandes, L.; Ribeiro, H.; Oliveira, A.; Sanches Silva, A.; Freitas, A.; Henriques, M.; Rodrigues, M. E. Portuguese honeys as antimicrobial agents

against *Candida* species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* . 2020.

9. Karkowska-Kuleta, J.; Rapala-Kozik, M.; Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Pol.* 2009, 56, 211-224.

10. Elias, R.; Benhamou, R. I.; Jaber, Q. Z.; Dorot, O.; Zada, S. L.; Oved, K.; Pichinuk, E.; Fridman, M. Antifungal activity, mode of action variability, and subcellular distribution of coumarin-based antifungal azoles. *European Journal of Medicinal Chemistry* . 2019, 179, 779-790.

11. Whaley, S. G.; Berkow, E. L.; Rybak, J. M.; Nishimoto, A. T.; Barker, K. S.; Rogers, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Frontiers in microbiology*. 2016, 7, 2173.

12. Pfaller, M. A.; Castanheira, M.; Lockhart, S. R.; Ahlquist, A. M.; Messer, S. A.; Jones, R. N. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50, 1199-1203.

13. Chen, Y.; Cheng, I.; Lai, C.; Tang, H. Echinocandins vs. amphotericin B against invasive candidiasis in children and neonates: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Antimicrobial Agents* . 2019, 53, 789-794.

14. Robbins, N.; Caplan, T.; Cowen, L. E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 2017, 71, 753-775.

15. Bal, A. M. The echinocandins: three useful choices or three too many?. *International Journal of Antimicrobial Agents* . 2010, 35, 13-18.

16. Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2011, 75, 213-267.
17. Sable, C. A.; Nguyen, B. T.; Chodakewitz, J. A.; DiNubile, M. J. Safety and tolerability of caspofungin acetate in the treatment of fungal infections. *Transplant infectious disease.* 2002, 4, 25-30.
18. Wiederhold, N. P.; Lewis, R. E. The echinocandin antifungals: an overview of the pharmacology, spectrum and clinical efficacy. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2003, 12, 1313-1333.
19. Schmalreck, A. F.; Willinger, B.; Haase, G.; Blum, G.; Lass-Flörl, C.; Fegeler, W.; Becker, K.; Antifungal Susceptibility Testing-AFST Study Group Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Mycoses.* 2012, 55, 124.
20. Denning, D. W. Echinocandin antifungal drugs. *The Lancet.* 2003, 362, 1142-1151.
21. Sofjan, A. K.; Mitchell, A.; Shah, D. N.; Nguyen, T.; Sim, M.; Trojcek, A.; Beyda, N. D.; Garey, K. W. Rezafungin (CD101), a next-generation echinocandin: A systematic literature review and assessment of possible place in therapy. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2018, 14, 58-64.
22. Williams, J. R.; Tenforde, M. W.; Chan, J. D.; Ko, A.; Graham, S. M. Safety and clinical response of intraventricular caspofungin for *Scedosporium apiospermum* complex central nervous system infection. *Medical Mycology Case Reports.* 2016, 13, 1-4.
23. Stone, E. A.; Fung, H. B.; Kirschenbaum, H. L. Caspofungin: An echinocandin antifungal agent. *Clinical Therapeutics.* 2002, 24, 351-377.

24. Pérez-Pitarch, A.; Ferriols-Lisart, R.; Aguilar, G.; Ezquer-Garín, C.; Belda, F. J.; Guglieri-López, B. Dosing of caspofungin based on a pharmacokinetic/pharmacodynamic index for the treatment of invasive fungal infections in critically ill patients on continuous venovenous haemodiafiltration. *International Journal of Antimicrobial Agents* . 2018, *51*, 115-121.
25. Kartsonis, N. A.; Nielsen, J.; Douglas, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. *Drug Resistance Updates* . 2003, *6*, 197-218.
26. Kofla, G.; Ruhnke, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis-review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 2011, *16*, 159.
27. Leonard, W. R.; Belyk, K. M.; Bender, D. R.; Conlon, D. A.; Hughes, D. L.; Reider, P. J. Determination of the relative and absolute configuration of the dimethylmyristoyl side chain of pneumocandin b0 by asymmetric synthesis. *Org. Lett.* 2002, *4*, 4201-4204.
28. Iriarte, G. LC teknika desberdinen erabilera Síndrome metabolikoaren aurkako terapian erabiltzen diren farmakoen determinazioarako, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea, 2011.
29. Uribe, B.; Gonzalez, O.; Ba, B. B.; Gaudin, K.; Alonso, R. M. Chromatographic methods for echinocandin antifungal drugs determination in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2019, *11*, 1217-1228.
30. Farowski, F.; Cornely, O. A.; Vehreschild, J. J.; Hartmann, P.; Bauer, T.; Steinbach, A.; Rüping, M. J.; Müller, C. Quantitation of azoles and echinocandins in compartments of peripheral blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, *54*, 1815-1819.

31. Cheng, X.; Liu, K.; Liu, Y.; Wang, M.; Ma, Y. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of caspofungin in dried blood spots. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2018, 32, 1068-1074.
32. Bi, S.; Schwartz, M. S.; Desai, R. B.; Miller, A. R.; Matuszewski, B. K. A semi-automated procedure for the determination of caspofungin in human plasma using solid-phase extraction and HPLC with fluorescence detection using secondary ionic interactions to obtain a highly purified extract. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2005, 28, 2895-2908.
33. Egle, H.; Trittler, R.; Kümmerer, K. An advanced double column-switching technique (LC-LC) for liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry for fully automated analysis of caspofungin. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2004, 18, 2871-2877.
34. Uribe, B.; González, O.; Ourliac-Garnier, I.; Le Pape, P.; Ba, B. B.; Alonso, R. M.; Gaudin, K. Determination of antifungal caspofungin in RPMI-1640 cell culture medium by column-switching HPLC-FLD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* . 2020, 188, 113366.
35. Schwartz, M.; Kline, W.; Matuszewski, B. Determination of a cyclic hexapeptide (L-743 872), a novel pneumocandin antifungal agent in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* . 1997, 352, 299-307.
36. Maes, K.; Smolders, I.; Michotte, Y.; Van Eeckhaut, A. Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography–mass spectrometry based bioanalyses: An overview. *Journal of Chromatography A* . 2014, 1358, 1-13.

37. Traunmüller, F.; Steiner, I.; Zeitlinger, M.; Joukhadar, C. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of caspofungin with amperometric detection and its application to in vitro microdialysis experiments. *Journal of Chromatography B* . 2006, *843*, 142-146.
38. Martens-Lobenhoffer, J.; Rupprecht, V.; Bode-Böger, S. M. Determination of micafungin and anidulafungin in human plasma: UV- or mass spectrometric quantification?. *Journal of Chromatography B* . 2011, *879*, 2051-2056.
39. Sutherland, C. A.; Nicolau, D. P.; Kuti, J. L. Development of an HPLC method for the determination of anidulafungin in human plasma and saline. *J. Chromatogr. Sci.* 2011, *49*, 397-400.
40. Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* . 2011, *162*, 87-106.
41. Zheng, K.; Kapp, M.; Boccaccini, A. R. Protein interactions with bioactive glass surfaces: A review. *Applied Materials Today* . 2019, *15*, 350-371.
42. Malmsten, M. Formation of Adsorbed Protein Layers. *Journal of Colloid and Interface Science* . 1998, *207*, 186-199.
43. Duncan, M. R.; Lee, J. M.; Warchol, M. P. Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene. *International Journal of Pharmaceutics* . 1995, *120*, 179-188.
44. Cserhádi, T.; Forgács, E.; Deyl, Z.; Miksik, I.; Eckhardt, A. Interaction of surfactants with homologous series of peptides studied by reversed-phase thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* . 2001, *910*, 137-145.

45. Suelter, C. H.; DeLuca, M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Anal. Biochem.* 1983, *135*, 112-119.
46. Goebel-Stengel, M.; Stengel, A.; Taché, Y.; Reeve Jr, J. R. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal. Biochem.* 2011, *414*, 38-46.
47. Vennerberg, D.; Rueger, Z.; Kessler, M. R. Effect of silane structure on the properties of silanized multiwalled carbon nanotube-epoxy nanocomposites. *Polymer* . 2014, *55*, 1854-1865.
48. Siniscalco, D.; Dutreilh-Colas, M.; Hjezi, Z.; Cornette, J.; El Felss, N.; Champion, E.; Damia, C. Functionalization of hydroxyapatite ceramics: Raman mapping investigation of silanization. *Ceramics*. 2019, *2*, 372-384.
49. Fukazawa, T.; Yamazaki, Y.; Miyamoto, Y. Reduction of non-specific adsorption of drugs to plastic containers used in bioassays or analyses. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* . 2010, *61*, 329-333.
50. Li, Y.; Lee, M. L. Biocompatible polymeric monoliths for protein and peptide separations. *Journal of separation science*. 2009, *32*, 3369-3378.
51. Hutchinson, J. P.; Remenyi, T.; Nesterenko, P.; Farrell, W.; Groeber, E.; Szucs, R.; Dicoski, G.; Haddad, P. R. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* . 2012, *750*, 199-206.
52. Gekko, K.; Ohmae, E.; Kameyama, K.; Takagi, T. Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1998, *1387*, 195-205.

53. Altug, I.; Hair, M. L. Cation exchange in porous glass. *J. Phys. Chem.* 1967, 71, 4260-4263.