

Farmacocinética del Busulfán: Absorción gastrointestinal e influencia del DMSO

Pharmacokinetics of Busulfan: gastrointestinal absorption and the influence of DMSO

Navarro Moreno MA*, Moreno Gálvez A, Moreno Gálvez E

Dpto. de Ciencias Experimentales y Matemáticas, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia (Spain)
c/ Guillem de Castro, nº 94, 46003 Valencia (Spain)
Tel.: +34 96 3637412 ; Fax: +34 96 3153655
e-mail: angeles.navarro@ucv.es

RESUMEN

Se ha estudiado la farmacocinética de la absorción gastrointestinal del busulfán en dos grupos de ratas, tras su administración por vía oral. La dosis influye en el valor de la constante de absorción (K_a) y en la concentración máxima normalizada (C_{max}), presentando ambos parámetros una disminución al aumentar la dosis de 0,5 a 5 mg. El empleo de un modelo aparente monocompartimental con absorción de primer orden permite una adecuada descripción del perfil de niveles plasmáticos del antineoplásico. El dimetilsulfóxido, utilizado como disolvente del busulfán, no interfiere en los parámetros farmacocinéticos orales del mismo.

ABSTRACTS

We have studied the pharmacokinetics of gastrointestinal absorption of busulfan in two groups of rats, after oral administration. The dose effect on the value of the absorption constant (K_a) and the normalized maximum concentration (C_{max}), presenting both parameters decreased with increasing dose from 0.5 to 5 mg. Using a model with monocompartmental apparent first order absorption allows an adequate description of the profile of plasma levels of antineoplastic. The dimethylsulfoxide used as busulfan solvent, does not interfere with oral pharmacokinetic parameters of it.

PALABRAS CLAVE: Farmacocinética; Busulfán; Oral; Ratas; DMSO

KEYWORDS: Pharmacokinetics; Busulfan; Oral; Rats; DMSO.

1. INTRODUCCIÓN

El presente estudio se encuadra en una línea de investigación cuya finalidad es la predicción farmacocinética en el hombre a partir de los datos obtenidos en animales, y se

centra en el estudio de la farmacocinética del busulfán en la rata Wistar después de su administración por vía oral, interpretando los resultados a partir del análisis de las curvas de nivel plasmático. La rata posee indudables ventajas de tipo práctico (facilidad de manejo y mantenimiento, camadas abundantes y frecuentes, crecimiento rápido, etc) y fisiológico (hábitos alimenticios omnívoros al igual que el hombre) que han dado lugar a que se haya impuesto como uno de los animales de laboratorio por excelencia.

El fármaco objeto de estudio es el busulfán, un antineoplásico sintético que pertenece al grupo de los agentes alquilantes. La escasez de métodos analíticos disponibles para su cuantificación en plasma y otros fluidos biológicos ha limitado la realización de estudios farmacocinéticos y ha motivado el inicio del trabajo experimental expuesto en este estudio. En él se ha utilizado un método analítico por CLAE, puesto a punto por nuestro grupo investigador, para la cuantificación del busulfán en las muestras plasmáticas.

El busulfán presenta numerosos problemas en lo que respecta a su disolución, debido a que dos disolventes en los que es bastante soluble, acetona y cloroformo, están limitados por su alta toxicidad. Los pocos estudios existentes en los que se ha administrado busulfán por vía intravenosa suelen utilizar busulfán marcado radiactivamente con ^{35}S o ^{14}C (1,2), disolviendo el antineoplásico en un volumen de acetona con diez volúmenes de suero salino. La distribución del busulfán al cerebro de rata ha sido estudiada por varios autores (3), habiéndose determinado un cociente de concentraciones cerebro/plasma de $0,74 \pm 0,05$, y un cociente de valores $\text{AUC}_{\text{cerebro}} / \text{AUC}_{\text{plasma}}$ de 0,75.

Con el fin de determinar los parámetros intravenosos del fármaco, se pensó en administrar el busulfán por vía intravenosa disolviéndolo con DMSO (resultados no incluidos en este estudio). Por ello, como paso previo, se decidió estudiar la influencia de este disolvente administrado por vía intravenosa en los parámetros farmacocinéticos orales del busulfán.

Así pues, los objetivos del presente trabajo son:

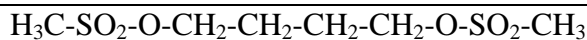
-El estudio de la absorción gastrointestinal del busulfán, tras la administración de dos dosis del mismo por vía oral.

-El estudio del efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la farmacocinética del busulfán.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Fármaco Ensayado

El fármaco ensayado ha sido el 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, comercializado como busulfán. Es un antineoplásico sintético perteneciente al grupo de los agentes alquilantes, que presenta 4 grupos metileno entre dos grupos metil-sulfonato:



2.2. Técnica analítica

Para la valoración de las muestras plasmáticas se colocaron previamente 10 µl de N,N-dimetilformamida (DMF) en un tubo “eppendorf”, al que se le añadieron 0,1 ml de plasma y se agitó manualmente durante unos segundos. A continuación, se adicionaron 20 µl de la dilución de patrón interno (1,5-Bis (metansulfonilo) pentano) y 0,1 ml de acetonitrilo. Después de la agitación en un “Vortex-Mixer”, la mezcla se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos, decantándose 0,150 ml del sobrenadante en otro tubo “eppendorf”. A este se le añadieron 10 µl de Tri-n-Butyl-Phosphina (TBF) al 1 %, 10 µl de Q (10 mg de 8-Mercaptoquinolina en 1 ml de DMF) y 10 µl de NaOH 0,1 N. Esta mezcla se agitó y se incubó en un baño de agua a la temperatura de 80°C durante 1 hora. Las muestras así preparadas se congelaron hasta el momento de su inyección en el cromatógrafo.

Se ha utilizado un cromatógrafo líquido-líquido de alta eficacia “Perkin Elmer” formado por los siguientes módulos:

- bomba Perkin-Elmer, Serie 10.
- inyector automático Perkin-Elmer, Advanced LC Sample Processor ISS200.
- detector de fluorescencia Waters, modelo 420-AC. Se ha utilizado un filtro de excitación de 360 nm y un filtro de emisión de 425 nm.
- registrador-integrador, Perkin-Elmer Nelson, modelo “1020”.

Como fase estacionaria se ha utilizado una columna comercial de fase inversa C-18 “Nova-Pak[®]”, de 15 cm de longitud y 3,9 mm de diámetro interno.

La fase móvil consistió en una mezcla de tampón acetatos de pH=5 y acetonitrilo, en las proporciones volumétricas 45:55. El flujo se mantuvo a 1 ml/min.

Para la cuantificación del busulfán en las muestras, se utilizaron patrones de concentración conocida que se trataron de igual modo que el descrito para las muestras.

2.3. Ensayos

En la tabla 1 se resumen las características de los distintos grupos de animales utilizados en los ensayos.

Las administraciones de busulfán por *vía oral* se realizaron a partir de suspensiones del mismo en metilcelulosa al 0,25 %, utilizándose dos dosis diferentes: 0,5 y 5 mg. Las suspensiones correspondientes a cada una de las dosis se prepararon de la siguiente forma:

Suspensión 1 (2,5 mg/ml): 25 mg de busulfán y 10 ml de metilcelulosa al 0,25 %.

Suspensión 2 (0,25 mg/ml): 1 ml de la suspensión 1 (2,5 mg/ml) y 9 ml de metilcelulosa al 0,25 %.

Tabla 1. Características de los distintos grupos de animales utilizados en los ensayos

ENSAYOS	GRUPOS DE ENSAYO	ADMINISTRACIÓN DE BUSULFÁN	ADMINISTRACIÓN COMPLEMENTARIA
Absorción gastrointestinal del busulfán	1 (n = 9) 2 (n = 9)	oral (dosis = 5 mg) oral (dosis = 0,5 mg)	
Influencia del DMSO en la farmacocinética del busulfán	1 (n = 9) 3 (n = 9)	oral (dosis = 5 mg) oral (dosis = 5 mg)	bolo i.v. DMSO (0,2 ml)

La letra n indica el número de animales incluido en cada grupo.

2.2.1. Estudio de la absorción gastrointestinal del busulfán. Grupos 1 y 2.

El busulfán se administró por vía oral a 2 grupos de animales, compuesto cada uno por 9 ratas, con un peso aproximado de 300 g. Los animales del primer grupo recibieron una dosis de 5 mg (2 ml de la suspensión 1) y los del segundo grupo recibieron 0,5 mg (2 ml de la suspensión 2).

Tras la administración, se tomaron muestras de sangre, a través de la cánula implantada en la vena yugular, a los siguientes tiempos de muestreo: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 300, 420 y 540 minutos.

2.2.2. Estudio de la influencia del disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) en la farmacocinética del busulfán. Grupo 3.

Para la realización de este ensayo se utilizó un grupo de 9 animales, con un peso de aproximadamente 300 g, a los que se administró por vía oral una dosis de 5 mg (2 ml de la suspensión 1). Inmediatamente se les administró un bolo intravenoso de 0,2 ml de DMSO y 0,3 ml de suero fisiológico. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 300, 420 y 540 minutos.

Los resultados de este grupo de animales se compararon con los obtenidos en el grupo 1, cuyos animales no recibieron DMSO.

2.4. Ecuaciones

En el caso de la administración oral del antineoplásico, se tuvieron en cuenta las

siguientes expresiones de concentración plasmática en función del tiempo:

$$C = C^0 \cdot (e^{-K_{el} \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}) \quad \text{Ec. 1}$$

$$C = L \cdot e^{-\beta \cdot t} - (L + M) \cdot e^{-K_a \cdot t} + M \cdot e^{-\alpha \cdot t} \quad \text{Ec. 2}$$

Correspondientes a los modelos monocompartimental y bicompartimental respectivamente.

2.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó en primer lugar la prueba de Bartlett para contrastar la homogeneidad de las varianzas.

En los casos en los que las varianzas fueron homogéneas, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) correspondiente a un diseño experimental completamente aleatorizado de un factor. Cuando el ANOVA detectó diferencias significativas se utilizaron las pruebas de comparación múltiple de Tukey y de Dunnett, según el ensayo considerado.

En los casos en que las varianzas no fueron homogéneas según la prueba de Bartlett, se utilizó la prueba no paramétrica de comparación de K grupos independientes de Kruskal-Wallis. Cuando esta prueba dió diferencias significativas se recurrió a la prueba no paramétrica de comparación de dos grupos con datos independientes U de Mann-Whitney.

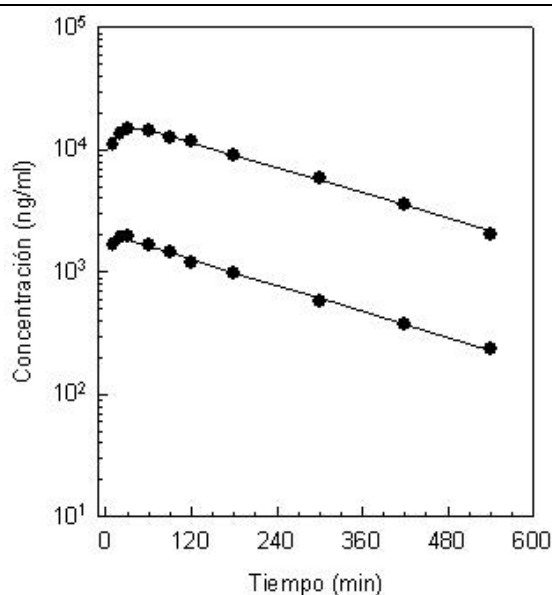
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Absorción gastrointestinal del busulfán

3.1.1. Niveles plasmáticos

En la figura 1 se han representado los niveles plasmáticos promedios correspondientes a los grupos 1 y 2, después de dosis orales de 5 y 0,5 mg respectivamente.

Figura 1. Curvas de niveles plasmáticos



Obtenidas tras la administración por vía oral de 5 (curva superior) y 0,5 (curva inferior) mg de busulfán, a los animales de los grupos 1 y 2. Las curvas trazadas corresponden a las curvas teóricas obtenidas tras el ajuste de una ecuación biexponencial (Ec.1).

3.1.2. Parámetros farmacocinéticos

En la tabla 2 se resumen los valores de los principales parámetros farmacocinéticos del antineoplásico, así como los resultados del estudio estadístico realizado a fin de evaluar la influencia de la dosis administrada (5 y 0,5 mg) sobre dichos parámetros.

Tabla 2. Valores promedio y desviación estándar de los principales parámetros farmacocinéticos calculados para las dos dosis administradas por vía oral a los animales de los grupos 1 y 2.

Parámetro	Dosis 0,5 mg	Dosis 5 mg	Bartlett	ANOV A	Kruskal-Wallis
K_{el}	0,00422 ± 0,00048	0,00413 ± 0,00067	NS	NS	-
K_a	0,185 ± 0,092	0,0866 ± 0,0302	< 0,05	-	< 0,05
$t_{1/2}$	165,9 ± 17,0	173,2 ± 38,9	< 0,05	-	NS
C_{max}	18736 ± 3290	15450 ± 3177	NS	< 0,05	-
t_{max}	25,8 ± 14,8	40,7 ± 14,5	NS	NS	-
$AUC \cdot 10^{-3}$	4884 ± 679	4396 ± 918	NS	NS	-
Cl_{ap}	1,04 ± 0,14	1,19 ± 0,27	NS	NS	-
Cl_{ap}/kg	3,62 ± 0,46	4,06 ± 0,93	NS	NS	-

El cociente Cl_{ap}/Kg representa el aclaramiento aparente (Cl_{ap}) normalizado para el peso del animal. En las tres últimas columnas se indica el resultado de la comparación estadística, que en el caso del AUC y C_{max} se efectuó previa normalización para la dosis mayor. Las letras NS indican que no hay diferencias significativas. Las unidades son las siguientes: C_{max} (ng/ml), t_{max} (min), AUC (ng·min/ml), Cl_{ap} (ml/min), Cl_{ap}/kg (ml/min·kg)

K_{el} y K_a (min^{-1}) y $t_{1/2}$ (min).

El busulfán presenta en la rata un perfil de niveles plasmáticos biexponencial tras su administración oral.

Los valores de la constante de absorción (K_a) presentaron una gran variabilidad, con coeficientes de variación que oscilaron entre el 35 % y el 50 % según la dosis administrada. La varianzas no fueron homogéneas, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre las dos dosis con la prueba de Kruskal-Wallis. Los valores de K_a fueron 0,185 y 0,087 min^{-1} para las dosis de 0,5 y 5 mg, respectivamente.

En cuanto al valor de la constante de eliminación (K_{el}), no se observaron diferencias significativas para las dos dosis ensayadas. Esto permite considerar un valor medio de $0,00418 \pm 0,00006 \text{ min}^{-1}$ ($n = 18$) como el más representativo de dicha constante en la rata.

A partir de los parámetros anteriores, se calcularon para cada dosis el resto de los parámetros cinéticos.

En este sentido, el estudio estadístico (tabla 2) de dichos parámetros cinéticos para las dos dosis administradas detectó diferencias significativas sólo en el caso de C_{max} normalizado tomando un valor de 18736 y 15450 ng/ml para las dosis de 0,5 (previa normalización a una dosis de 5 mg) y 5 mg, respectivamente.

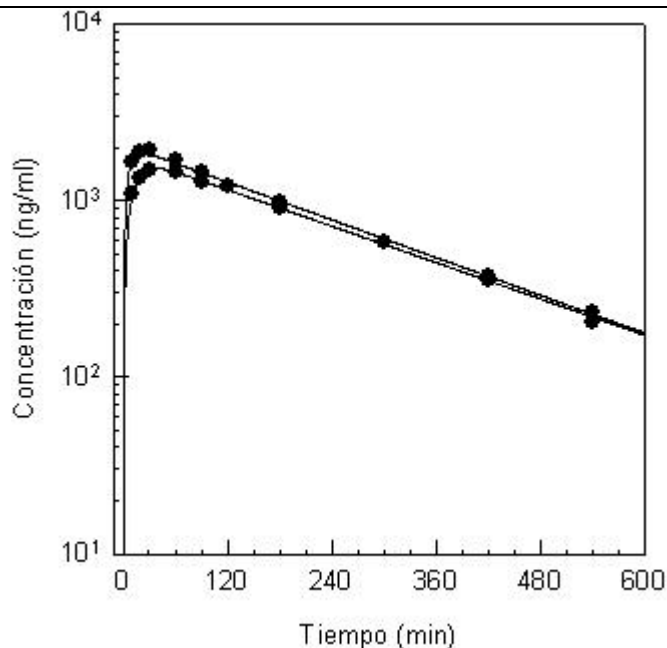
En cuanto al valor de $t_{1/2}$, la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas.

Por otra parte, los valores de Cl_{ap}/Kg y t_{max} aumentaron ligeramente al aumentar la dosis pero no se detectaron diferencias significativas. Además, el valor de t_{max} presentó una gran variabilidad, con coeficientes de variación que oscilaron entre el 36 % y el 57 % según la dosis administrada.

3.1.3. Estudio de la linealidad cinética

En la figura 2 se han representado los niveles plasmáticos promedios obtenidos tras la administración oral del fármaco a las dos dosis ensayadas, normalizados para la dosis de 0,5 mg. La observación de dicha figura permite apreciar que, en la fase de absorción, los niveles plasmáticos promedio obtenidos tras la administración de la dosis mayor (5 mg) son proporcionalmente más pequeños que los obtenidos tras la administración de la dosis menor (0,5 mg), lo que sugiere una absorción menor o más lenta en el caso de la dosis de 5 mg. Sin embargo, en la fase de eliminación ambas curvas son prácticamente coincidentes.

Figura 2. Niveles plasmáticos promedio.



Representación gráfica de los niveles plasmáticos promedio (normalizados para la dosis de 0,5 mg) obtenidos tras la administración oral de busulfán a las dosis de 0,5 mg (curva superior) y 5 mg (curva inferior). Los símbolos corresponden a la curva experimental y la línea de trazo continuo a la curva teórica obtenida tras el ajuste de una ecuación biexponencial (Ec.1).

Las diferencias en los valores de K_a y C_{max} normalizado (tabla 4) pueden atribuirse a la escasa solubilidad en agua del busulfán. Al preparar la suspensión más concentrada queda una mayor proporción del antineoplásico sin disolver, lo que se traduciría en una menor absorción o en una absorción más lenta y, por tanto, en la obtención de menores concentraciones plasmáticas para la dosis mayor.

La ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los valores normalizados de AUC de ambas dosis, indica que la farmacocinética del busulfán en la rata tras la administración oral a las dosis empleadas es aparentemente lineal.

3.1.4 Estudio comparativo

No se dispone de estudios de linealidad cinética del busulfán. Únicamente, Vassal y col. (4) observaron que tras una dosis oral de 0,9-2,6 mg/Kg en humanos la farmacocinética del busulfán era lineal, pues no se encontró ninguna correlación entre la dosis y el aclaramiento, ni entre la dosis y el volumen de distribución. Por otra parte, tras la administración intravenosa también se han obtenido en algunos estudios valores de AUC lineales con la dosis (5,6). De acuerdo con los datos anteriores, en nuestro estudio observamos que, ni el AUC (normalizado para la dosis mayor) ni el Cl_{ap}/Kg se vieron afectados por la dosis. Por el contrario, tanto la K_a como el C_{max} (normalizado para la dosis mayor) mostraron diferencias estadísticamente significativas según la dosis administrada.

A continuación, en la tabla 3 se exponen los valores de algunos de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos por Hassan y col (8)., tras una dosis oral de 1 mg/Kg

de busulfán en pacientes adultos, y los mismos parámetros obtenidos por nosotros en la rata tras la administración de 0,5 mg (1,6 mg/Kg).

Tabla 3. Valores de algunos de los principales parámetros farmacocinéticos tras la administración oral del busulfán en dos estudios diferentes

	N	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (ng·min/ml)
Hassan y col.(7)	5	1730 ± 845	1,5 ± 1,1	3,38 ± 1,75	490200 ± 130200
Nuestro estudio	9	1874 ± 329	0,4 ± 0,2	2,77 ± 0,28	488400 ± 67900

El estudio de Hassan y col. (7) fue realizado en pacientes adultos, y nuestro estudio, en ratas. La letra N representa el número de individuos pertenecientes a cada estudio.

Llama la atención la similitud de los valores de C_{max} observados en ambas especies. Por el contrario, los valores de t_{max} y t_{1/2} son más cortos en la rata que en la especie humana. El hecho de que los animales de pequeño tamaño presenten habitualmente ciclos vitales más cortos y, en consecuencia, procesos metabólicos más rápidos, condiciona que, para la mayoría de las sustancias, los procesos de eliminación discurren con mayor rapidez en estas especies, obteniéndose valores de t_{1/2} inferiores a los observados en humanos.

Respecto a los valores de las constantes K_a y K_{el}, existe una gran homogeneidad en humanos. En la tabla 4 se detallan los valores de dichas constantes pertenecientes a tres estudios realizados en pacientes adultos, junto con los valores obtenidos por nosotros en la rata.

Tabla 4. Valores de la constante de absorción (K_a) y de la constante de eliminación (K_{el}), obtenidos en 4 estudios.

	Grochow y col. (9)	Grochow y col.(10)	Grochow(11)	Nuestro estudio
N	28	25	136	9
K _a	0,0204 ± 0,0240	0,017 ± 0,019	0,019 ± 0,021	0,185 ± 0,092
K _{el}	0,00496 ± 0,00261	0,005 ± 0,003	0,0058 ± 0,003	0,00422 ± 0,00048

Los tres primeros están realizados en pacientes adultos y dichos parámetros farmacocinéticos se han obtenido tras la administración de una dosis de 1 mg/Kg de busulfán por vía oral. El último está realizado en ratas en nuestro laboratorio tras una dosis oral de busulfán de 1,6 mg/Kg. La letra N representa el número de individuos pertenecientes a cada estudio. Las unidades de K_a y K_{el} son min⁻¹.

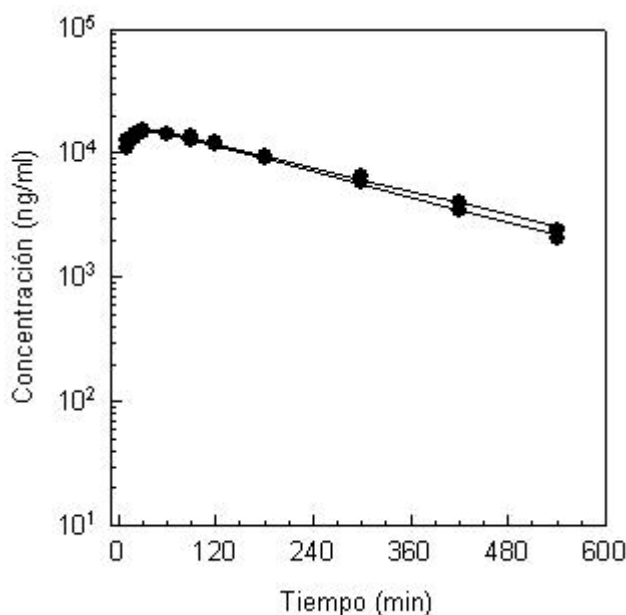
Como puede observarse, el valor de la K_a en pacientes adultos es mucho menor que el obtenido en nuestro estudio. En cambio, el valor de K_{el} es semejante al obtenido en la rata.

3.2. Influencia del DMSO como disolvente

3.2.1. Niveles plasmáticos

En la figura 3 se han representado los niveles plasmáticos promedios de los animales del grupo 1 a los que se les administró una dosis oral de 5 mg, y los niveles plasmáticos promedios de los animales del grupo 3 a los que se les administró la misma dosis del antineoplásico seguido de un bolo intravenoso de DMSO.

Figura 3. Influencia del DMSO.



Curvas de nivel plasmático obtenidas tras la administración por vía oral de 5 mg de busulfán (curva inferior) y 5 mg de busulfán seguido de un bolo intravenoso de DMSO (curva superior) a los animales de los grupos 1 y 3 respectivamente. Las curvas trazadas corresponden a las curvas teóricas obtenidas tras el ajuste de una ecuación biexponencial (Ec. 1).

3.3.2. Estudio estadístico de los parámetros farmacocinéticos

En la tabla 5 se resumen los valores de los principales parámetros farmacocinéticos tras una dosis oral de busulfán de 5 mg (grupo 1), así como los resultados del estudio estadístico realizado acerca del efecto del disolvente DMSO (grupo 3) en dichos parámetros.

Tabla 5. Valores promedios y desviación estándar de los principales parámetros farmacocinéticos calculados en los dos grupos de ensayo.

Parámetro	Dosis 5 mg	Dosis 5 mg + DMSO	Bartlett	ANOVA	Kruskal-Wallis
K_{el}	0,00413 ± 0,00067	0,00368 ± 0,00060	NS	NS	-
K_a	0,0866 ± 0,0302	0,147 ± 0,082	< 0,05	-	NS
$t_{1/2}$	173,2 ± 38,9	193,3 ± 35,9	NS	NS	-
$AUC \cdot 10^{-3}$	4396 ± 918	4805 ± 547	NS	NS	-
C_{max}	15450 ± 3177	15767 ± 2865	NS	NS	-
t_{max}	40,7 ± 14,5	33,5 ± 23,2	NS	NS	-
Cl_{ap}	1,19 ± 0,27	1,05 ± 0,11	< 0,05	-	NS

En el primero de ellos se administró una dosis oral de 5 mg de busulfán (grupo 1) y en el segundo la misma dosis oral y un bolo intravenoso de 0,2 ml de DMSO (grupo 3). En las tres últimas columnas se indica el resultado de la comparación estadística. Las letras NS indican que no hay diferencias significativas. Las unidades son las siguientes: C_{max} (ng/ml), t_{max} (min), AUC (ng·min/ml), Cl_{ap} (ml/min), Cl_{ap}/kg (ml/min·kg) K_{el} y K_a (min^{-1}) y $t_{1/2}$ (min).

Como se puede apreciar en la tabla 5, ni la prueba no paramétrica de comparación de K grupos independientes de Kruskal-Wallis ni el ANOVA detectaron diferencias significativas, por lo que puede concluirse que el DMSO no altera la farmacocinética del busulfán.

ONCLUSIONES

- Cuando se administra el busulfán por vía oral, la dosis influye en el valor de la constante de absorción (K_a) y en la concentración máxima normalizada (C_{max}), presentando ambos parámetros una disminución al aumentar la dosis de 0,5 a 5 mg.
- El empleo de un modelo aparente monocompartimental con absorción de primer orden permite una adecuada descripción del perfil de niveles plasmáticos del antineoplásico.
- El dimetilsulfóxido, utilizado como disolvente del busulfán, no interfiere en los parámetros farmacocinéticos orales del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hassan M, Öberg G, Ericson K, Ehrsson H, Eriksson L, Ingvar M et al. In vivo distribution of [^{11}C]-busulfan in cynomolgus monkey and in the brain of a human patient. Cancer Chemother Pharmacology 1992; 30:81-85.

-
2. Nadkarni MV, Trams EG, Smith PK. Preliminary studies on the distribution and fate of TEM, TEPA and myleran in the human. *Cancer Research* 1959; 19:713-718.
 3. Hassan M., Ehrsson H., Wallin Y. y Eksborg S. "Pharmacokinetic and metabolic studies of busulfan in rat plasma and brain". *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 13: 301-305, (1988).
 4. Vassal G, Fischer A, Challine D, Boland Y, Ledheist F, Lemerle et al. Busulfan Disposition Below the Age of Three: Alteration in Children with Lysosomal Storage Disease. *Blood* 1993; 82:1030-1034.
 5. Ehrsson H, Hassan M, Ehrnebo M, Beran M. Busulfan kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther* 1983; 34, 86.
 6. Schuler U, Schroer S, Kühnle A, Blanz J, Mewes K, Kumbier I et al. Busulfan pharmacokinetics in bone marrow transplant patients: is drug monitoring warranted? *Bone Marrow Transplantation* 1994; 14:759-765.
 7. Hassan M, Öberg G, Ehrsson H, Ehrnebo M, Wallin I, Smedmyr B et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of high-dose busulphan in adults. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 1989; 36:525-530.