

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ЖУКОВА НАДІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.033:004.4 (043.5)

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ФАРМАКОКІНЕТИКА
3-АЛКОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН-2-ОНА (ЕТОКСОЗЕПАМА)

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік НАМН України, професор **ГОЛОВЕНКО Микола Якович**, Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України (м. Одеса), завідувач відділу фізико-хімічної фармакології

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України **ЯКОВЛЄВА Лариса Василівна**, Національний фармацевтичний університет (м. Харків), завідувач кафедри фармакоелектрофізіології

доктор медичних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України **ЛУК'ЯНЧУК Віктор Дмитрович**, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (м. Київ), завідувач відділу фармакокінетики

Захист відбудеться «20» січня 2017 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «16» грудня 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Різноманіття клінічних форм психоневротичних порушень та лікувально-профілактичних напрямів, які розвиваються у медицині, в тому числі, у неврології та психіатрії, потребують наявності широкого переліку суміжних фармакологічних ефектів, у зв'язку з чим, пошук і дослідження нових транквілізаторів продовжуються та проводяться у різних класах хімічних сполук та, у першу чергу, – похідних бенздіазепіну (С. А. Андронати, Т. А. Воронина, Н. Я. Головенко, 1992; С. Б. Середенин, Б. А. Бадыштов, Г. Г. Незнамов, 2001; Н. Mohler, J. Fritshy, U. Rudolf, 2002; М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, Н. В. Овчаренко, 2010; Т. А. Воронина, 2010)

Більш ніж 30 років в Фізико-хімічному інституті ім. О. В. Богатського НАН України (далі – ФХІ НАН України) проводяться дослідження 1,4-бенздіазепінів та споріднених сполук. У ході цих робіт розроблені нові методи їх синтезу, вивчені особливості структури, переважні конформації, хімічні властивості та біологічна дія «структура – активність». Комплексні дослідження привели до створення першого на території колишнього СРСР високоефективного транквілізатора, протисудомного і снодійного препарату – «Феназепам», а пізніше – денного анксиолітика «Гідазепам» та снодійного препарату «Левана® ІС» (С. А. Андронати, Г. Я. Авруцкий, А. В. Богатский, 1982; С. А. Андронати, Т. А. Воронина, Н. Я. Головенко, 1992; С. А. Андронати, Л. Н. Якубовская, К. С. Андронати, 1994; Т. А. Воронина, 2010).

В останній час особлива увага науковців ФХІ НАН України прикута до низки сполук, що представляють собою 3-заміщені 1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-они. Вони є перспективними, оскільки серед них виявлені високоефективні не тільки психотропні, але й аналгетичні засоби, що позбавлені міорелаксації та седації (G. Gubitzi, M. Schmid, 2004; В. И. Павловский, Е. А. Семенишина, С. А. Андронати, 2009; S. Andronati, E. Semenishyna, V. Pavlovsky, et al., 2010). Більше того, етери та естери 3-гідрокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів є цікавими об'єктами дослідження медичної хімії психотропних агентів як для вивчення зв'язку «структура – активність», так і для виявлення специфіки поведінки цих сполук в організмі в якості проліків.

З огляду на вищенаведене, актуальним є дослідження фармакокінетичних властивостей нових 3-алкокси- та ацилокси-1,2-дигідро-3H-1,4-бенздіазепін-2-онів, що викликає не тільки теоретичний, але й значний практичний інтерес для поширення асортименту лікарських препаратів широкого фармакотерапевтичного спектру.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Матеріали дисертації є фрагментами науково-дослідної роботи відділу фізико-хімічної фармакології ФХІ НАН України та виконані в рамках тем: «Структура, селективність зв'язування з біомішенями та активність сполук, які мають нейротропну, імунотропну та антиромботичну активність» (№ держреєстрації 0112U003037), «3-Заміщені 1,4-бенздіазепіни як перспективні знеболюючі та протизапальні засоби (№ держреєстрації 0114U002761). Дисертант є співвиконавцем цих тем.

Мета та задачі дослідження. *Мета роботи* – формування нового алгоритму для вивчення закономірностей фармакокінетичного комплексу (абсорбція, розподіл, метаболізм та екскреція) 3-алкоксипохідного 1,4-бенздіазепіну на основі його радіоактивного похідного – ^{14}C -етоксозепаму.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Обґрунтувати необхідну локалізацію радіоактивної мітки у молекулі та синтезувати зразок ^{14}C -етоксозепаму, встановити його фізико-хімічні властивості та радіохроматографічні характеристики.
2. Дослідити кінетику всмоктування ^{14}C -етоксозепаму із шлунково-кишкового тракту мишей при внутрішньовенному та інтрагастральному шляхах введення. Запропонувати кінетичні схеми транзиту та кількісно охарактеризувати ланки цього процесу.
3. Дослідити зміну концентраційного профілю ^{14}C -етоксозепаму в організмі мишей після внутрішньовенного та інтрагастрального введення; визначити кількісний склад метаболітів у окремих органах, запропонувати оптимальну кінетичну схему розподілу та визначити основні фармакокінетичні параметри цих процесів при різних шляхах уведення.
4. Провести первинну оцінку ступеня метаболізму та можливості зв'язування з білками плазми крові ^{14}C -етоксозепаму в умовах *in vivo*.
5. Обґрунтувати кінетичну схему та дати кількісну оцінку елімінації препарату при його інтрагастральному та внутрішньовенному введенні.
6. В умовах *in vitro* дослідити напрямки метаболізму, можливість елімінації ізотопної мітки з молекули ^{14}C -етоксозепаму та запропонувати можливу схему його метаболізму.
7. Визначити склад метаболітів у екскретах мишей після внутрішньовенного та інтрагастрального введення та дослідити можливість ентерогепатичної циркуляції. Встановити ефективність процесів біотрансформації ^{14}C -етоксозепаму в умовах *in vivo* на підставі розрахованих параметрів екскреції сполуки та метаболітів.

Об'єкт дослідження: пошук та вивчення нових сполук на основі похідних бенздіазепіну.

Предмет дослідження: основні кінетичні закономірності всмоктування, розподілу, метаболізму та екскреції (фармакокінетики етоксозепаму).

Методи дослідження: радіохроматографічні, мас-спектрометричні, фармакологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено систему методів, які забезпечують кількісну оцінку кінетичних процесів на етапі всмоктування (абсорбції), розподілу, елімінації (метаболізму та екскреції) етоксозепаму за умов різних шляхів введення.

Поєднанням методів радіохроматографічного та мас-спектрометричного аналізу доведена будова метаболітів ^{14}C -етоксозепаму та визначені механізми їх утворення.

Продемонстрована можливість елімінації радіоізотопної мітки з алкоксильного радикалу молекули у положенні 3 гетерокільця бенздіазепінів. Отримані нові дані щодо оцінки ефективності цього процесу в умовах *in vitro* та *in vivo*. Ефективність реакції деалкілювання складає 153 ± 34 мкмоль·(см³ мг·протеїну)⁻¹, тобто

37,1 ± 11,7 % загальної максимальної швидкості біотрансформації ліпофільних метаболітів. Запропонована схема метаболізму етоксозепаму, відповідно до якої очікуваним є О-дезалкілювання у гідрофобній порожнині СУР450 через утворення інтермедіату, гідроксильованого по положенню 3 гетерокільця.

Розраховано низку показників, що характеризують фармакокінетичний профіль етоксозепаму та його метаболітів. Введення ¹⁴С-етоксозепаму внутрішньовенно та інтрагастрально в еквівалентних дозах (5 мг/кг) дозволяє також встановити загальну кількість сполуки, що всмокталася із ШКТ, по співвідношенню площ під концентраційними кривими загальних радіоактивних сполук при внутрішньовенному та інтрагастральному введеннях. Цей показник незалежно від органу чи тканини є майже однаковим та знаходиться на рівні 70 % від введеної дози. Запропоновано кінетичні схеми транзиту ¹⁴С-етоксозепаму у шлунково-кишковому тракті мишей, всмоктування, розподілу та елімінації вихідної сполуки та метаболітів.

Результати дослідження розширюють та поглиблюють існуючі уявлення про внесок різних замісників нових 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепіну у фармакокінетичні властивості.

Фармакокінетичні дослідження інноваційної сполуки етоксозепаму є фрагментом доклінічного вивчення сполуки, що експериментально обґрунтовує режим дозування для проведення 1-ї фази клінічних випробувань.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментально обґрунтовано доцільність цілеспрямованого подальшого пошуку і вивчення сполук з аналгетичною дією серед 3-заміщених похідних 1,4-бенздіазепіну. Матеріали комплексного дослідження використані при розробці інноваційного аналгетика етоксозепаму (протокол засідання науково-технологічної комісії № 7 від 15.05. 2016 року, ТДВ «Інтерхім»).

Матеріали дослідження з визначення фармакокінетики інноваційних лікарських засобів впроваджені в роботу відділу фармакокінетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол № 2 від 24.02. 2016 р.), лабораторії загальної фармакології з методологічною групою з фармакокінетики ДП «ДНЦЛЗ» (протокол № 2 від 16.12. 2015 р.), а також у науково-педагогічний процес на кафедрі фармакології та клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська державна академія МОЗ України» (протокол № 6 від 17.02. 2016 р.).

Матеріали роботи є частиною методичних рекомендацій «Валідація біоаналітичного методу», що затверджені на засіданні науково-експертної ради ДП «Державний експертний центр МОЗ України» (протокол № 1 від 31.01. 2013 р.).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи представлені та обговорені на IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); Національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 2013); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (Дніпропетровськ, 2013); ХХІХ Всеукраїнській науково-практичній конференції «Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення, клінічної апробації лікарських засобів» (Харків, 2012); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасний вимір медичної науки та практики» (Дніпропетровськ, 2014); міжнародній науково-практичній конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання» (Дніпропетровськ, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у наукових фахових журналах, рекомендованих МОН України, 6 тез доповідей у збірниках наукових робіт, 1 методичні рекомендації.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 154 сторінках комп'ютерного тексту та складається зі вступу, 7 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 44 джерела кирилицею та 81 джерело латиною. Дисертація ілюстрована 32 рисунками та 27 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 280 нелінійних мишах (18-25 г) та 20 щурах лінії Вістар (240-260 г) обох статей, які утримувалися на повноцінній лабораторній дієті при природному світловому циклі. Усі дослідження проводились у відповідності з директивою Ради ЄС 86/609 від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети (Strasbourg, 1986) (протокол засідання Комісії з питань біоетики ФХІ НАН України № 7 від 05.12. 2011 р.). Тварин ділили на групи та вводили експериментальну речовину у необхідних дозах за 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0; 32,0 та 48,0 год до відбору біоматеріалу. Сполуку у вигляді твінової емульсії у 0,9 % фізіологічному розчині NaCl вводили у хвостову вену або інтрагастрально. Вибір доз ґрунтувався на підставі окремих завдань роботи (D. J. Cough, 1999; M. Ema, 2005; С. Б. Середенин, 2007).

Фармакокінетичні дослідження проведені з використанням ^{14}C -етоксозепаму. Через 0,25; 0,5; 1,0; 3,0; 6,0; 8,0; 12,0; 24,0; 32,0 та 48,0 год після його введення тварин піддавали хлороформному наркозу, декапітували та відбирали зразки крові, плазми, мозку, печінки та інших органів, у яких методом рідинної сцинтиляційної фотометрії на сцинтиляційному фотометрі TRI-CARB 2700 (Canberra Packard, США) визначали вміст радіоактивного матеріалу (загальні радіоактивні продукти, ліпофільні та гідрофільні метаболіти, окремі індивідуальні сполуки – у аліквотах гомогенатів, після попередньої екстракції з гомогенатів органічними розчинниками (хлороформ, діхлорметан) та з використанням подальшої препаративної тонкошарової радіохроматографії) (Н. Я. Головенко, В. Г. Зиньковський, 1978). Аналіз отриманих даних та розрахунок фармакокінетичних параметрів проводили за описаними схемами (В. Н. Соловьев, 1980; В. Г. Зиньковський, 2005; В. Б. Ларіонов, 2009). Визначали низку фармакокінетичних характеристик при різних шляхах уведення: початкова концентрація (C_0 , нмоль/см³), константа елімінації (k_{el} , год⁻¹), сталий об'єм розподілу (V_{dss} , см³/кг), загальний кліренс ($Cl_{заг.}$, см³/кг*год), час напівелімінації ($t_{1/2}$, год), загальна площа під фармакокінетичною кривою ($AUC_{0-\infty}$, нмоль/см³*год), загальна площа під першим моментом фармакокінетичної кривої ($AUMC_{0-\infty}$, нмоль/см³*год²), середній час утримання (MRT, год), біодоступність (f , %).

Показники ліпофільності, площі полярної поверхні, часткової орбітальної електронегативності розраховано із використанням програми MedChem Designer (TM) version 2.0.0.34 (2011-2012 Simulations Plus, Inc, free demo). Площа полярної поверхні дорівнює 50,69 Å², ліпофільність log P дорівнює 3,005.

Статистичну обробку результатів експерименту проводили з визначенням середньої арифметичної величини (M), середнього відхилення середньої арифметичної (m), у вигляді «середнє – інтерквартильний розкид», та оцінювали за допомогою критерію Ст'юдента та довірчого рівня $p \leq 0,05$. Регресивний аналіз дослідних даних здійснювався методом найменших квадратів зважених середніх групових величин. Для оцінки надійності та прогнозуючої здатності QSAR моделей використовували метод часткових найменших квадратів (PLS-метод, S. A. Rannar, 1994).

Результати та їх обговорення. Синтез та визначення радіохроматографічних показників зразка ^{14}C -етоксозепаму. Введення радіоактивної мітки (^{14}C) у молекулу етоксозепаму було здійснено за допомогою ^{14}C -етилового спирту шляхом конденсації 7-бром-5-феніл-3-хлор-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що аналогічно введенню радіоактивно мічених замісників до сформованого скелету 1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону (М. Я. Головенко, В. І. Павловський, 2007). Фізико-хімічні властивості отриманого зразка ^{14}C -етоксозепаму відповідають аналогічним показникам нерадіоактивної сполуки, радіохроматограма містить лише один пік радіоактивності, R_f якого відповідає нерадіоактивній речовині, а відносна кількість якого складає 96,2 % від загальної кількості радіоактивного матеріалу на хроматограмі. Питома активність ($0,199 \pm 0,001$ Кю/моль ($0,7$ ГБк/моль)).

Абсорбція (всмоктування) ^{14}C -етоксозепаму у шлунково-кишковому тракті мишей. Для визначення можливості ентерогепатичної циркуляції (рис.1) було визначено вміст загальних радіоактивних продуктів у різних відділах ШКТ (% введеної дози) після його внутрішньовенного введення. Головними відділами ШКТ, що приймають участь у процесах масопереносу (рис.1) є тонка (2) та товста (3) кишки, у яких відбуваються секреція з системного кровообігу (із константами швидкості процесів k_{02} та k_{03}), зворотне всмоктування (із відповідними константами k_{20} та k_{30}) та власне транзит радіоактивного матеріалу між відділами ШКТ (із константами k_{23} та k_{34}).

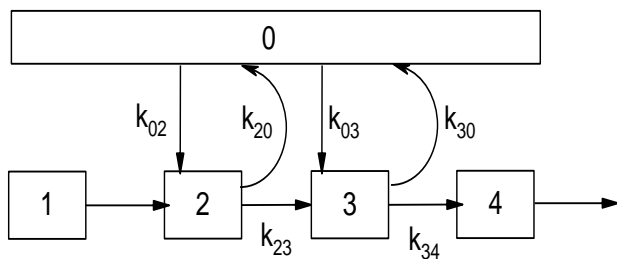


Рис. 1. Схема масопереносу ^{14}C -матеріалу у ШКТ (ентерогепатичної циркуляції та транзитної екскреції) після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксозепаму

Примітка. 0 – системний кровообіг; 1 – шлунок; 2 – тонка кишка; 3 – товста кишка; 4 – пряма кишка; k_{23} та k_{34} – константи швидкості процесів масопереносу між відділами ШКТ; k_{02} та k_{03} – константи швидкості процесів масопереносу радіоактивного матеріалу з системного кровообігу до відповідних відділів ШКТ (секреція); k_{20} та k_{30} – константи швидкості процесів масопереносу з відповідних відділів ШКТ до системного кровообігу (реабсорбція)

Для спрощення розрахунків можливе об'єднання констант односпрямованих процесів – сумарної константи надходження до товстої кишки $\chi_2 = k_{03} + k_{23}$ (для тонкої кишки $\chi_1 = k_{02}$), та сумарних констант елімінації з камер – $\chi_3 = k_{20} + k_{23}$ (для тонкої кишки) та $\chi_4 = k_{30} + k_{34}$ (для товстої кишки).

Тонка кишка є відсіком ШКТ, до якого відбувається основна секреція радіоактивного матеріалу ($\chi_1 = 0,136 \pm 0,005 \text{ год}^{-1}$), тоді як у випадку товстої кишки ($\chi_2 = 0,093 \pm 0,002 \text{ год}^{-1}$) більш ймовірним є надходження не з системного кровообігу, а шляхом транзиту з тонкої кишки. Розрахований ступінь надходження радіоактивного матеріалу до ШКТ складає $0,147 \pm 0,003$, тобто, близько 15 % від введеної дози екскретуються через печінку до тонкої кишки.

На підставі розрахованих параметрів створено модель процесу масопереносу загального радіоактивного матеріалу у відділах ШКТ після внутрішньовенного введення. Запропонована модель з високим ступенем достовірності ($r=0,8-0,86$) описує зміну вмісту ^{14}C -продуктів у відповідних відділах ШКТ. Втім, спостерігаються певні розбіжності між розрахованими значеннями та експериментальними даними вмісту радіоактивного матеріалу в товстій кишці в період з 12 до 24 години після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксозепаму, що обумовлене, можливо, паралельністю перебігу процесів транспорту радіоактивного матеріалу крізь ці відділи та циркуляцією радіоактивних сполук у системному кровообігу.

Після інтрагастрального введення вміст ^{14}C -продуктів у відділах ШКТ є значно більший. Високе значення показника χ_1 для тонкої кишки ($0,141 \pm 0,002 \text{ год}^{-1}$) обумовлене значною швидкістю транспорту радіоактивного матеріалу до цього відділу ШКТ із шлунка, а показника χ_2 ($0,182 \pm 0,005 \text{ год}^{-1}$) для товстої кишки (приймаючи до уваги низьку величину $\chi_3 = 0,032 \pm 0,001 \text{ год}^{-1}$ для проксимального відділу – тонкої кишки) – за рахунок, ймовірно, секреції радіоактивних сполук з системного кровообігу. Інтрагастральний шлях введення ^{14}C -етоксозепаму характеризується швидким всмоктуванням препарату з ШКТ, і «вікнами всмоктування» є тонка та товста кишки.

Залежність «доза-концентрація» при внутрішньовенному введенні ^{14}C -етоксозепаму та його взаємодія із біологічними молекулами органів та тканин мишей. Для визначення лінійності процесів масопереносу ^{14}C -етоксозепаму різні його дози (1-15 мг/кг) було введено внутрішньовенно у твіновій емульсії мишам та через 3 години після введення визначено вміст загального радіоактивного матеріалу, ліпофільних метаболітів та вихідної сполуки у мозку, печінці та крові. Була відмічена різниця у розподілі радіоактивного матеріалу між органом та цільною кров'ю чи безпосередньо плазмою. Збільшення дози сполуки (рис. 2) призводить до відповідного збільшення вмісту незмінної речовини у мозку та печінці. Привертає до себе увагу той факт, що у мозку при введенні низьких доз (1 – 2 мг/кг) етоксозепаму його відносний вміст поступово підвищується та одночасно з цим зменшується питома кількість інших ліпофільних метаболітів.

Лінеаризацією даних вмісту ^{14}C -етоксозепаму у головному мозку та розрахованих величин швидкості його біотрансформації в умовах *in vivo* у подвійних зворотних координатах (метод Лайнуівера-Берка) було визначено умовне значення максимальної швидкості його метаболізму в головному мозку (V_{max}), яке склало $0,481 \pm 0,13 \text{ нмоль}/(\Gamma_{\text{тканини}} \cdot \text{год})$. Умовна константа Міхаеліса-Ментен, (K_m) даного процесу (як інтегральна характеристика зменшення концентрації вільної сполуки у тканинах мозку) склало $1,41 \pm 0,37 \text{ (нмоль}/\Gamma_{\text{тканини}})^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$. Виходячи з отриманих величин варто визнати, що процеси його біотрансформації відіграють значну роль у процесі елімінації.

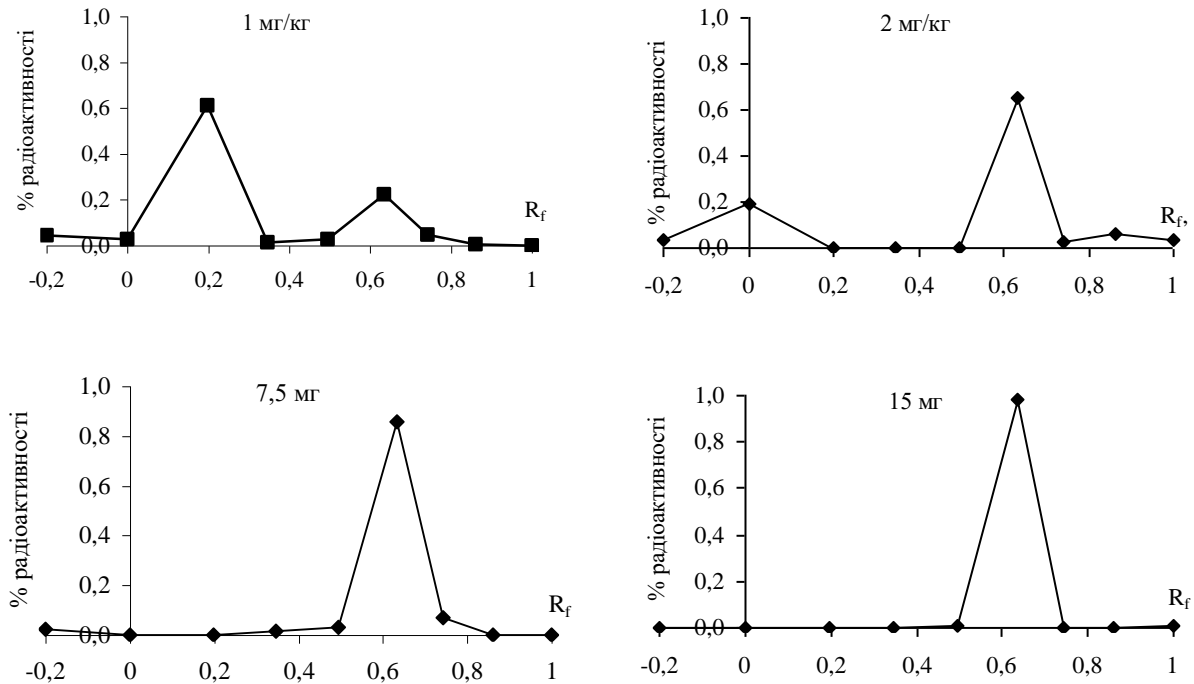


Рис. 2. Радіохроматограми хлороформних екстрактів мозку мишей після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксоzepаму ($0,199 \pm 0,001$ Кю/моль, $0,7$ ГБк/моль) у різних дозах

Примітка. вихідна сполука $R_f=0,62-0,65$ у % від загальної активності хроматограми

Переважає кількість ^{14}C -етоксоzepаму в інтервалі введених доз 1-10 мг/кг знаходиться у зв'язаному вигляді у плазмі крові, тоді як його вміст у ліпідних компонентах є значно нижчим і поступове збільшення його концентрації спостерігається лише при застосуванні відносно високих доз (7,5-15 мг/кг). Залежність концентрації зв'язаного та вільного ^{14}C -етоксоzepаму у крові у координатах Скетчерда не є лінійною, а отриманий профіль вказує на ймовірну позитивну кооперативність зв'язування (наявність максимуму). Аналіз даних за методом Бьеррума показав, що фіксація його на молекулі альбуміну здійснюється у двох місцях (наявність двох піків на диференційній кривій, що характеризуються близькими значеннями констант дисоціації ($K_{d1} = 1,1 \pm 0,1$ нмоль/см³ та $K_{d2} = 3,9 \pm 0,5$ нмоль/см³, відповідно). Ймовірно, що зв'язування етоксоzepаму відбувається за участі окремого транспортного білка, на що вказує низька різниця між константами його зв'язування з компонентами плазми крові.

Фармакокінетичні параметри розподілу ^{14}C -етоксоzepаму по органах та тканинах при його різних шляхах введення. Після внутрішньовенного одноразового введення сполуки, що вивчається, присутність радіоактивного матеріалу реєстрували у всіх внутрішніх органах та тканинах, починаючи вже з перших годин після введення та впродовж всього часу експерименту (рис. 3), що характеризує швидкість перебігу процесів транспорту сполук. Незважаючи на високу ліпофільність етоксоzepаму, вміст загальних радіоактивних продуктів в різних органах та тканинах знаходиться майже на однаковому рівні.

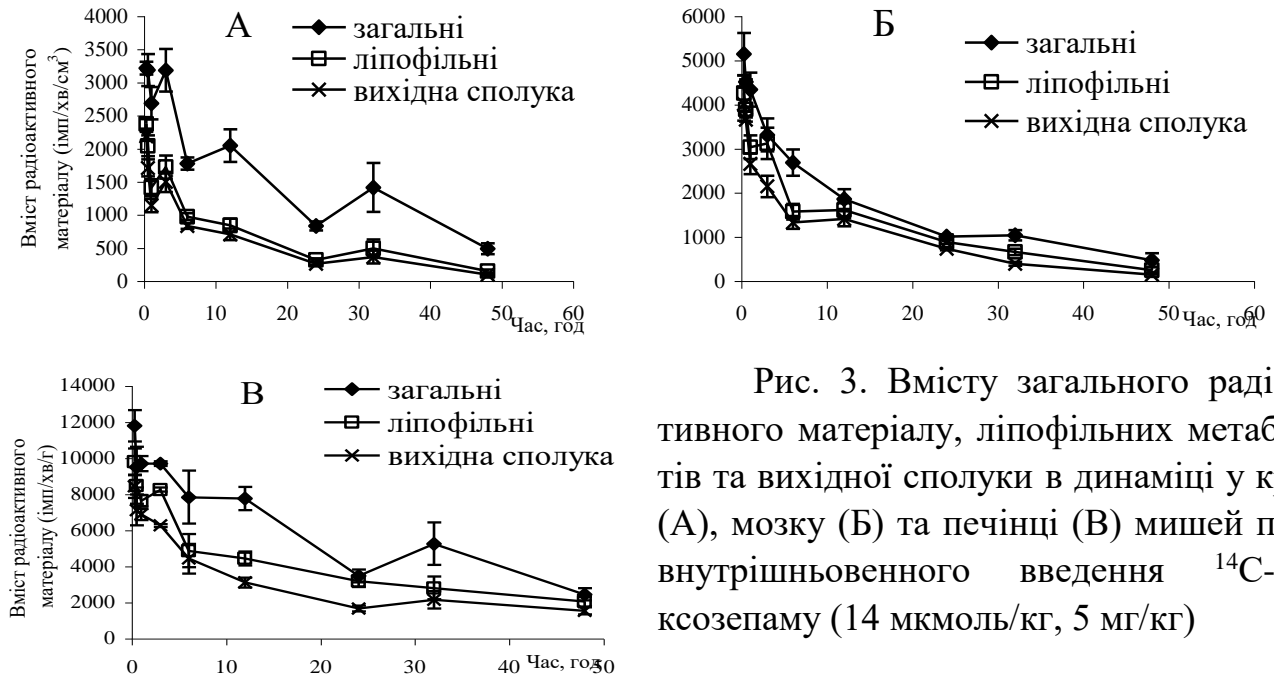


Рис. 3. Вмісту загального радіоактивного матеріалу, ліпофільних метаболітів та вихідної сполуки в динаміці у крові (А), мозку (Б) та печінці (В) мишей після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксозепаму (14 мкмоль/кг, 5 мг/кг)

Фармакокінетичний профіль як загальної радіоактивності (рис. 3), так і вмісту індивідуальної речовини в крові, мозку та печінці має однофазний характер (коефіцієнт кореляції становить 0,92-0,97) та описується однокамерною фармакокінетичною моделлю (табл. 1). Зменшення вмісту в органах вільної речовини спостерігається майже паралельно, однак, на підставі величини показника початкової концентрації (C_0) можна заключити, що розподіл етоксозепаму між цими органами не є рівномірним. Найбільший вміст вихідної сполуки відмічається у печінці ($14,26 \pm 0,5$ нмоль/г). Важливим показником ступеня біотрансформації речовини є співвідношення площ під фармакокінетичними кривими вмісту в органі чи тканині вихідної сполуки та загальних радіоактивних продуктів (імп/хв), що є інтегральною характеристикою метаболізму етоксозепаму при даному шляху введення ($f_{\text{біотрансф.}}$). Після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксозепам піддається біотрансформації, при цьому у печінці фракція незмінної речовини складає $0,5 \pm 0,14$, у мозку та крові ці показники є близькі ($0,39 \pm 0,18$ та $0,32 \pm 0,07$, відповідно), що ще раз підтверджує високу швидкість обміну сполуки між зазначеними тканинами (табл. 1).

Фармакокінетичний профіль ^{14}C -етоксозепаму після його інтрагастрального введення зберігає характерні особливості профілю після внутрішньовенного введення. Так, розподіл речовини по органах та тканинах описується однокамерною моделлю із всмоктуванням, на підставі якої були розраховані основні фармакокінетичні параметри, що наведені в табл. 2. Слід відмітити збереження величини константи елімінації сполуки з тест-об'єктів у порівнянні з внутрішньовенним введенням, а також те, що незалежно від шляху введення не змінюються шляхи виведення та інтенсивності елімінації. Однакові значення константи елімінації для крові та печінки ($0,062 \pm 0,004$ год $^{-1}$ та $0,065 \pm 0,004$ год $^{-1}$, відповідно) обумовлені швидким настанням рівноваги розподілу між кров'ю та печінкою. Підвищене значення константи елімінації для мозку ($0,12 \pm 0,01$ год $^{-1}$) також відображує швидкість процесу масопереносу з цього органу до крові, незважаючи на його більш високу ліпофільність у

порівнянні з печінкою. Характерно, що у цьому органі не відбувається кумуляції, оскільки значення загального кліренсу для мозку ($253 \pm 20 \text{ см}^3/\text{кг}\cdot\text{год}$) та крові ($252 \pm 20 \text{ см}^3/\text{кг}\cdot\text{год}$) статистично не відрізняються.

Таблиця 1

Фармакокінетичні параметри ^{14}C -етоксоzepаму після його внутрішньовенного введення (14 мкмоль/кг, 5 мг/кг)

Фармакокінетичний параметр	Кров	Мозок	Печінка
Початкова концентрація, C_0 , нмоль/г	$3,43 \pm 0,13$	$6,68 \pm 0,25$	$14,26 \pm 0,5$
Константа елімінації, k_{el} , год ⁻¹	$0,06 \pm 0,002$	$0,063 \pm 0,002$	$0,036 \pm 0,001$
Сталий об'єм розподілу, V_{dss} , см ³ /кг	4068 ± 199	2092 ± 103	979 ± 48
Загальний кліренс, $Cl_{заг.}$, см ³ /кг*год	231 ± 14	131 ± 8	$34,9 \pm 2,2$
Час напівелімінації, $t_{1/2}$, год	$12,2 \pm 0,5$	$11,04 \pm 0,42$	$19,4 \pm 0,7$
Загальна площа під фармакокінетичною кривою, $AUC_{0-\infty}$, нмоль/см ³ *год	$58,84 \pm 3,15$	102 ± 5	392 ± 21
Загальна площа під першим моментом фармакокінетичної кривої $AUMC_{0-\infty}$, нмоль/см ³ *год ²	1053 ± 56	1667 ± 89	12494 ± 670
Співвідношення площ під фармакокінетичними кривими вмісту індивідуальної сполуки та загальних радіоактивних продуктів, $f_{біотрансф.}$	$0,32 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,18$	$0,5 \pm 0,14$
MRT, год	$17,9 \pm 1,4$	$16,3 \pm 1,2$	$31,9 \pm 2,4$

Відповідні значення MRT при інтрагастральному введенні (табл. 2) є менші за аналогічні показники при внутрішньовенному введенні за рахунок повного та ефективного всмоктування сполуки після інтрагастрального введення. Це також підтверджується високим значенням біодоступності незміненого ^{14}C -етоксоzepаму, що було визначено як співвідношення загальних площ під фармакокінетичними кривими вмісту індивідуальної речовини у цих органах при інтрагастральному та внутрішньовенному шляхах введення.

При внутрішньовенному введенні ^{14}C -етоксоzepаму у незмінному вигляді в організмі циркулює 30 – 50 % вихідної речовини. При інтрагастральному введенні навпаки до визначених внутрішніх органів потрапляє 40 – 60 % речовини від загальної її кількості, що надійшла до внутрішнього середовища, тобто, інтенсивність біотрансформації речовини при даному шляху введення зменшується, що й визначає високий ступінь біодоступності незмінної сполуки.

Фармакокінетичні параметри ¹⁴C-етоксозепаму після його інтрагастрального введення (14 мкмоль/кг, 5 мг/кг)

Фармакокінетичний параметр	Кров	Мозок	Печінка
Константа елімінації, k_{el} , год ⁻¹	0,062 ± 0,004	0,12 ± 0,01	0,065 ± 0,004
Константа абсорбції, k_{abs} , год ⁻¹	0,39 ± 0,02	0,149 ± 0,01	0,790 ± 0,051
Сталий об'єм розподілу, V_{dss} , см ³ /кг	4068 ± 199	2092 ± 102	979 ± 48
Загальний кліренс, $Cl_{заг.}$, см ³ /кг*год	252 ± 20	253 ± 20	63,5 ± 5,1
Час напівелімінації, $t_{el1/2}$, год	11,2 ± 0,7	5,7 ± 0,4	10,7 ± 0,7
Час напіабсорбції, $t_{abs1/2}$, год	1,8 ± 0,1	4,6 ± 0,3	0,88 ± 0,06
Час досягнення максимальної концентрації, T_{max} , год	5,6 ± 0,5	7,4 ± 0,7	3,4 ± 0,3
Метод статистичних моментів			
Загальна площа під фармакокінетичною кривою, $AUC_{0-\infty}$, нмоль/см ³ *год	58 ± 5	101 ± 9	276 ± 25
Загальна площа під першим моментом фармакокінетичної кривої $AUMC_{0-\infty}$, нмоль/см ³ *год ²	917 ± 83	1477 ± 134	4146 ± 376
Середній час утримання, MRT, год	15,85 ± 2,03	14,6 ± 1,9	15 ± 2
Біодоступність, f	0,98 ± 0,10	0,99 ± 0,10	0,70 ± 0,07

Метаболізм 3-етоксозепаму в умовах in vitro. Етерний зв'язок (-O-) у молекулі етоксозепаму є стабільнішим за естерний, але значно підвищує ліпофільність молекули та робить її більш спорідненою як субстрату до ферментів метаболізму ксенобіотиків у гепатоцитах, що обґрунтовує необхідність визначення можливості перебігу процесу окиснювального деалкілювання. При інкубації зразку ¹⁴C-етоксозепаму у гомогенатах печінки реєструється поступове накопичення вмісту гідрофільних радіоактивних сполук, але радіоактивна мітка не залишається цілком у молекулі вихідної сполуки (з матеріального балансу загальної кількості радіоактивності). Разом з тим, відносний склад ліпофільних метаболітів зберігається постійним та представлений здебільшого незмінним етоксозепамом (від 70 до 90 % від загальної кількості сполук, що екстрагуються хлороформом) протягом всього часу інкубації.

Користуючись даними максимальної швидкості процесів окиснення ліпофільних метаболітів та утворення гідрофільних (як відрізок, що відсікається на осі ординат у зазначених координатах, $\ln(V_{max})$), було розраховано теоретичну кількість продуктів у концентраційно-залежних реакціях ($V_{max}/K_{гальм.}$). Цей показник становив: 260 ± 57 та 413 ± 92 мкмоль (см³ мг·протеїну)⁻¹ для утворення гідрофільних та ліпофільних метаболітів відповідно. Отже, різниця в кількості гідрофільних та ліпофільних метаболітів, є суттєвою і складає 153 ± 34 мкмоль (см³ мг·протеїну)⁻¹ тобто

37,1 ± 11,7% загальної максимальної швидкості біотрансформації ліпофільних метаболітів.

Отримані дані та аналіз молекулярної структури етоксозепаму свідчать про С3-деалкілювання як можливий напрямок його метаболічної трансформації. Можливість зазначеного процесу доведена на підставі розрахованих (програма MedChem Designer(TM) version 2.0.0.34) показників часткової орбітальної електронегативності (partial equalization of orbital electronegativity, PEOE) на атомах вуглецю бенздіазепінів, що можуть бути потенційними центрами для взаємодії з активним центром монооксигенази. Це дозволяє запропонувати схему біотрансформації етоксозепаму (1), відповідно до якої очікуваним є О-деалкілювання у гідрофобній порожнині СYP450 через утворення інтермедіату (3), гідроксильованого по положенню 3 гетерокільця (рис. 4).

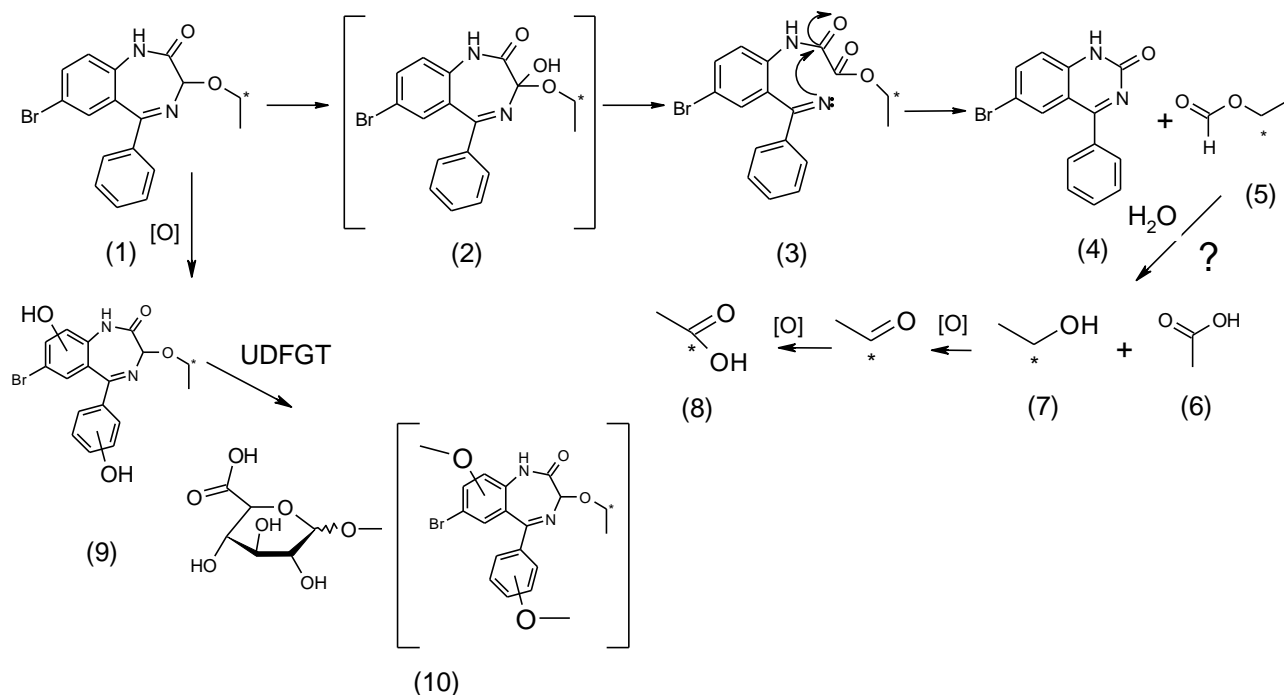


Рис. 4. Можлива схема елімінації радіоактивної мітки з молекули етоксозепаму та утворення водорозчинних радіоактивних метаболітів (UDFGT – уридин-5-дифосфат глюкуронілтрансфераза)

Склад метаболітів у сечі та калі мишей після внутрішньовенного та інтрагастрального введення ^{14}C -етоксозепаму. Процес виведення загальних радіоактивних продуктів, а також ліпофільних та гідрофільних метаболітів після внутрішньовенного введення має моноекспоненційний характер, а сумарна більша кількість гідрофільних метаболітів, ніж ліпофільних, вказує на значний ступінь метаболізму речовини та утворення гідрофільних кон'югатів, що більш ефективно екскретуються із сечею. Виведення радіоактивних сполук з калом при внутрішньовенному способі введення ^{14}C -етоксозепаму обумовлене наявністю ентерогепатичної циркуляції та утворенням здебільшого метильованих метаболітів.

У сумарному процесі виведення (із сечею та калом) рівень глюкуронових кон'югатів не перевищує 52 % та незначно (статистично недостовірно) зменшується наприкінці експерименту. Незмінна речовина виводиться у досить незначній кілько-

сті відносно загальної кількості радіоактивного матеріалу, що екскретується, решту складають глюкуронові кон'югати та неідентифіковані метаболіти – продукти подальшої біотрансформації. Виведення із сечею є основним шляхом екскреції етоксоzepаму та його метаболітів. Із калом виводиться на порядок менша кількість як вільної речовини, так і продуктів окиснення.

Процес виведення загальних радіоактивних продуктів з організму мишей після інтрагастрального введення ^{14}C -етоксоzepаму як із сечею, так й з калом також носить моноекспоненційний характер. Загальна кількість ліпофільних метаболітів, що виводяться з сечею та калом, складає близько 55 % від кількості загальних радіоактивних продуктів (окремо для сечі чи калу є 53 % та 57 % відповідно). При внутрішньовенному введенні ліпофільні метаболіти виводяться у кількості, що не перевищує 35 % від суми загальних радіоактивних продуктів. Особливу увагу слід приділити максимальній кількості загальних радіоактивних продуктів, що виводяться при різних шляхах введення (табл. 3).

Таблиця 3

Параметри екскреції ^{14}C -етоксоzepаму (10 мг/кг) після внутрішньовенного та інтрагастрального введення мишам із сечею та калом

Внутрішньовенне				
Сполуки	Сеча		Кал	
	Q_{\max}	k_{el}	Q_{\max}	k_{el}
Загальні радіоактивні	$11,4 \pm 1,4$	$0,030 \pm 0,003$	$6,6 \pm 2,1$	$0,020 \pm 0,004$
Загальні ліпофільні	$5,1 \pm 0,5$	$0,036 \pm 0,003$	$2,1 \pm 0,8$	$0,019 \pm 0,005$
Глюкуронові кон'югати	$2,7 \pm 0,7$	$0,028 \pm 0,005$	$2,7 \pm 1,3$	$0,024 \pm 0,008$
Негідролізуємі	$3,6 \pm 0,6$	$0,024 \pm 0,003$	$1,9 \pm 0,5$	$0,014 \pm 0,002$
Інтрагастральне				
Загальні радіоактивні	$16,5 \pm 3,8$	$0,023 \pm 0,004$	$12,5 \pm 4,2$	$0,030 \pm 0,007$
Загальні ліпофільні	$8,9 \pm 2,9$	$0,022 \pm 0,005$	$7,1 \pm 2,4$	$0,037 \pm 0,009$
Глюкуронові кон'югати	$3,4 \pm 1,3$	$0,028 \pm 0,008$	$3,3 \pm 1,4$	$0,024 \pm 0,007$
Негідролізуємі	$4,2 \pm 1,8$	$0,023 \pm 0,007$	$2,1 \pm 0,9$	$0,028 \pm 0,009$

Примітка. Q_{\max} – максимальна кількість речовини, що виводиться при нескінченному часі експерименту, у % від дози, що введено; k_{el} – константа елімінації

Встановлено, що сумарно із сечею та калом при внутрішньовенному введенні виводиться $18,0 \pm 3,5$ % від введеної дози, а при інтрагастральному $29,0 \pm 8,0$ % від введеної дози (табл. 3). Оскільки при обох шляхах введення не реєструється кількість радіоактивних сполук, близько до 100 % від введеної дози, можливо припустити, що в організмі також має місце напрямок біотрансформації вихідної сполуки, при якому відбувається елімінація радіоактивної мітки з молекули.

ВИСНОВКИ

Враховуючи наявність різних варіацій клінічних форм психоневротичних розладів та підходів до їх лікування, сучасна неврологія та психіатрія потребує пошуку та вивчення нових транквілізаторів. Перспективними в даному аспекті є нові сполуки 3-алкокси- та ацилокси-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онів, що дозволять розширити та наповнити відповідний сектор фармацевтичного ринку високоефективними засобами.

Дисертаційна робота присвячена вирішенню актуального наукового завдання, яке полягає у розробці сучасних підходів до вивчення закономірностей фармакокінетичного комплексу (абсорбція, розподіл, метаболізм та екскреція) 3-алкоксипохідного 1,4-бенздіазепіну (на основі його радіоактивного похідного – ^{14}C -етоксозепаму) як перспективного лікарського засобу нейротропної дії.

1. Проведено цілеспрямований синтез ^{14}C -3-етокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он (етоксозепам), що містить радіоактивну мітку у алкоксильному радикалі положення 3 гетерокільця. Сполука за своїми фізико-хімічними характеристиками (ЯМР-, ІЧ-, мас-спектри) відповідає нерадіоактивному зразку, а питома активність (0,7 ГБк/моль) та радіохроматографічна чистота (96,2 %) дозволяють використовувати його для подальших фармакокінетичних досліджень.

2. Встановлено, що тонка кишка є відсіком шлунково-кишкового тракту, де відбувається процес всмоктування етоксозепама та його метаболітів ($\chi_1 = 0,136 \pm 0,005 \text{ год}^{-1}$), тоді як для товстої кишки ($\chi_2 = 0,093 \pm 0,002 \text{ год}^{-1}$) більш ймовірним є його надходження не з системного кровообігу, а шляхом транзиту з тонкої кишки. Розрахований ступінь надходження радіоактивного матеріалу до ШКТ після внутрішньовенного введення складає близько 14 % введеної дози. Інтрагастральний шлях введення характеризується швидким всмоктуванням ^{14}C -етоксозепаму («вікнами всмоктування» є тонка та товста кишки).

3. Фармакокінетичний профіль етоксозепама в крові, мозку та печінці описується однокамерною фармакокінетичною моделлю (коефіцієнт кореляції 0,92-0,97). Після внутрішньовенного введення у печінці фракція незмінної речовини складає $0,5 \pm 0,14$, а у мозку та крові $0,39 \pm 0,18$ та $0,32 \pm 0,07$ відповідно. При інтрагастральному введенні відбувається швидке всмоктування сполуки. Після внутрішньовенного введення ^{14}C -етоксозепаму ступінь біотрансформації складає 50-70 %. При інтрагастральному введенні до внутрішніх органів потрапляє від ~40 до 60 % незмінної речовини від загальної кількості, що надійшла до внутрішнього середовища, тобто, ступінь біотрансформації речовини при даному шляху введення зменшується, що й визначає високу ступінь біодоступності незмінної сполуки.

4. В умовах *in vivo* умовне значення максимальної швидкості метаболізму ^{14}C -етоксозепаму в головному мозку (V_{\max}) складає $0,481 \pm 0,13 \text{ нмоль}/(\text{г тканини} \cdot \text{год})$, а умовна константа Міхаеліса-Ментен, (K_m) процесу $1,41 \pm 0,37 \text{ (нмоль/г тканини)}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$, на підставі чого зроблено висновок про значну роль процесів метаболізму у елімінації сполуки. У процесі абсорбції ^{14}C -етоксозепаму білками плазми крові *in vivo* приймають участь два центра зв'язування із незначними розбіжностями у величинах констант дисоціації

($K_{d1} = 1,1 \pm 0,1$ нмоль/см³ та $K_{d2} = 3,9 \pm 0,5$ нмоль/см³) та слабкою кооперативністю між ними.

5. Встановлено, що незалежно від шляху введення не змінюються шляхи виведення та інтенсивності елімінації. Однакові значення константи елімінації для крові та печінки ($0,062 \pm 0,004$ год⁻¹ та $0,065 \pm 0,004$ год⁻¹, відповідно) обумовлені швидким настанням рівноваги розподілу між кров'ю та печінкою. Підвищене значення константи елімінації для мозку ($0,12 \pm 0,01$ год⁻¹) також відображує швидкість процесу масопереносу з цього органу до крові, незважаючи на його більш високу ліпофільність у порівнянні з печінкою. Характерно, що у цьому органі не відбувається кумуляції, оскільки значення загального кліренсу для мозку (253 ± 20 см³/кг*год) та крові (252 ± 20 см³/кг*год) статистично не відрізняються.

6. Встановлено, що з вихідної структури відбувається елімінація радіоізотопної мітки, ефективність реакції деалкілювання складає 153 ± 34 мкмоль*(см³ мг·протеїну)⁻¹ тобто $37,1 \pm 11,7\%$ загальної максимальної швидкості біотрансформації ліпофільних метаболітів. У гомогенатах печінки спостерігається поступове накопичення вмісту гідрофільних радіоактивних сполук, як кінцевих метаболітів ¹⁴C-етоксозепаму біотрансформації. Запропонована схема метаболізму етоксозепаму, відповідно до якої очікуваним є О-деалкілювання у гідрофобній порожнині СУР450 через утворення інтермедіату, гідроксильованого по положенню 3 гетерокільця.

7. Переважна кількість радіоактивного матеріалу з організму мишей після внутрішньовенного введення ¹⁴C-етоксозепаму виводиться із сечею. У сумарному процесі виведення (із сечею та калом) рівень глюкуронідів не перевищує 52 %. Із сечею та калом при внутрішньовенному введенні виводиться $18,0 \pm 3,5$ % введеної дози, а при інтрагастральному $29,0 \pm 8,0$ % від введеної дози, за рахунок біотрансформації вихідної сполуки *in vivo*. Виведення радіоактивних сполук з калом при внутрішньовенному способі введення ¹⁴C-етоксозепаму обумовлене наявністю ентогепатичної циркуляції та утворенням здебільшого метильованих метаболітів.

8. Результати фармакокінетичних досліджень нового похідного 1,4-бенздіазепіну етоксозепаму засвідчують перспективність створення на його основі лікарського засобу з психотропними властивостями.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Синтез ¹⁴C-етоксозепаму та визначення його основних фізико-хімічних та радіологічних показників /В. І. Павловський, К. О. Семенішина, В. Б. Ларіонов, Н. О. Жукова // Фармацевтичний журнал. – 2012. – № 2. – С. 43–49. (Внесок дисертанта – проведення експериментальної роботи, обробка експериментальних даних, участь у формуванні наукової ідеї дослідження, узагальнення обговорення результатів).

2. Кінетика всмоктування та транспорту етоксозепаму в шлунково-кишковому тракті білих мишей /М. Я. Головенко, І. Ю. Борисюк, Н. В. Овчаренко, Н. О. Жукова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 2 (27). – С. 13–18. (Внесок дисертанта – участь у формуванні схеми проведення роботи, аналіз результатів).

3. Жукова Н. О. Фармакокінетичний профіль та метаболізм ¹⁴C-етоксозепаму в організмі мишей після внутрішньовенного введення /

Н. О. Жукова, М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 32–38. (*Внесок дисертанта – формування наукової ідеї і завдань дослідження, проведення експериментальної роботи, обробка, аналіз та узагальнення експериментальних даних*).

4. Жукова Н. О. Біокінетика ^{14}C -етоксозепаму після його інтрагастрального введення мишам / Н. О. Жукова, М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов // Український біофармацевтичний журнал. – 2012. – № 5 – 6 (22 – 23). – С. 4–11. (*Внесок дисертанта – формування загальної концепції, проведення експериментальної роботи, аналіз та систематизація результатів, підготовка до друку*).

5. Головенко М. Я. Особливості біокінетики та дозозалежність концентраційного профілю ^{14}C -етоксозепаму в організмі мишей після його внутрішньовенного введення / М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, Н. О. Жукова // Журнал Національної академії медичних наук України. – 2013. – Т. 19, №2. – С. 242–248. (*Внесок дисертанта – проведення інформаційного пошуку, узагальнення даних літератури, підготовка до друку*).

6. Головенко М. Я. Механізми реакцій метаболізму етоксозепаму в гомогенатах печінки щурів / М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, І. П. Валіводзь, Н. О. Жукова // Запорозький медичний журнал. – 2015. – № 4 (91). – С. 100–104. (*Внесок дисертанта – формування загальної концепції, проведення експериментальної роботи, аналіз та систематизація результатів, підготовка до друку*).

7. Синтез 7-бром-5-феніл-3-(^{14}C -етокси)-1,2дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону та його елімінація з організму щурів / В. І. Павловський, К. О. Семенішина, В. Б. Ларіонов, Н. О. Жукова // IV Національний з'їзд фармакологів України: тези доповідей, Київ, 10-12 жовтня 2011 р. – Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 5 (24). – С. 238–239.

8. Овчаренко Н. В. Метаболізм та фармакокінетика ^{14}C -етоксозепаму в організмі мишей після його інтрагастрального введення / Н. В. Овчаренко, В. Б. Ларіонов, Н. О. Жукова // Національний конгрес «Клінічна фармація: 20 років в Україні»: матеріали Національного конгресу, Харків, 21-22 березня 2013 р. / М-во охорони здоров'я, М-во освіти і науки України; НАН України та ін. – Х., 2013. – С. 175.

9. Жукова Н. О. Проникність гематоенцефалічного бар'єру для ацетоксі- та алкоксіпохідних 1,4-бенздіазепіну / Н. О. Жукова, Н. В. Овчаренко, В. Б. Ларіонов // Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, Дніпропетровськ, 26-27 вересня 2013 р. – Дніпропетровськ, 2013. – С. 146–147.

10. Жукова Н. О. Екскреція ^{14}C -етоксозепаму та його метаболітів з організму мишей при внутрішньовенному введенні / Н. О. Жукова, В. Б. Ларіонов, Н. В. Овчаренко // Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів: матеріали ХХІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 15 березня 2012 р. – Харків: НФаУ, 2012. – С. 43.

11. Жукова Н. О. Порівняльна фармакокінетика ^{14}C -етоксозепаму при різних шляхах його введення / Н. О. Жукова / Сучасний вимір медичної науки та практики: збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції, Дніпропетровськ, 13-14 червня 2014 р. – Дніпропетровськ: Організація наукових медичних досліджень «Salutem», 2014 – С. 14–15.

12. Жукова Н. О. Переважна напрямки метаболічної трансформації алкокси- та ацилокси-похідних 1,4-бенздіазепіну / Н. О. Жукова, І. П. Валіводзь // Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання: збірник матеріалів Міжнародної науково-практичної конференції, Дніпропетровськ, 10-11 квітня 2015 р. – Дніпропетровськ: Організація наукових медичних досліджень «Salutem», 2015 – С. 9–12.

13. Валидація биоаналитического метода: метод. рек. / Н. А. Жукова, В. В. Либина, И. В. Кудрис, Н. Н. Падалко. – К.: МОЗ Украины, ГП «ГЭЦ МОЗ Украины», 2013. – 35 с. (*Внесок дисертанта – формування загальної концепції, аналіз та систематизація результатів, підготовка до друку*).

АНОТАЦІЯ

Жукова Н.О. Экспериментальная фармакокинетика 3-алкокси-1,4-бенздиазепин-2-она (етоксозепама) – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2016.

Дисертація присвячена дослідженню процесів всмоктування, розподілу, метаболізму та елімінації ^{14}C -етоксозепаму. Конденсацією відповідного 3-хлоропохідного 1,4-бенздіазепіну та ^{14}C -етилового спирту було синтезовано ^{14}C -мічену сполуку із питомою активністю 0,7 ГБк/моль та радіохроматографічною чистотою 96,2 %. Встановлено факт часткової (до 14% від введеної дози) секреції сполуки до шлунково-кишкового тракту після внутрішньовенного введення та швидкої повної абсорбції після інтрагастрального введення.

Фармакокінетичний профіль етоксозепаму в крові, мозку та печінці описується однокамерною фармакокінетичною моделлю. В організмі сполука піддається метаболізму – після внутрішньовенного введення в органах та тканинах вміст незмінної речовини складає 50-70 % загальної радіоактивності. В умовах *in vitro* (гомогенат печінки) було встановлено факт елімінації радіоізотопної мітки з молекули ($37,1 \pm 11,7\%$ загальної максимальної швидкості біотрансформації ліпофільних метаболітів) та запропоновано схему його метаболізму. При внутрішньовенному введенні виводиться $18,0 \pm 3,5\%$ від введеної дози, а при інтрагастральному $29,0 \pm 8,0\%$ від введеної дози, за рахунок біотрансформації вихідної сполуки *in vivo* та високого ступеню елімінації ізотопної мітки в цих умовах.

Ключові слова: ^{14}C -етоксозепам, фармакокінетика, метаболізм, абсорбція, елімінація.

АННОТАЦИЯ

Жукова Н.А. Экспериментальная фармакокинетика 3-алкокси-1,4-бенздиазепин-2-она (этоксозепама). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – Фармакология. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2016.

Диссертация посвящена изучению процессов всасывания, распределения, метаболизма и элиминации ^{14}C -этоксозепама. Учитывая наличие различных вариаций клинических форм психоневротических расстройств и подходов к их лечению, современная неврология и психиатрия требует поиска и изучения новых транквилиза-

торов. Перспективными в данном аспекте есть новые соединения 3-алкокси- и ацилокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, которые позволят расширить и наполнить соответствующий сектор фармацевтического рынка высокоэффективными средствами. Конденсацией соответствующего 3-хлорпроизводного 1,4-бенздиазепина и ^{14}C -этилового спирта был синтезирован меченный по алкоксильному радикалу образец этоксозепама с удельной активностью $0,7$ ГБК/моль и радиохроматографической чистотой $96,2$ %. После внутривенного введения отмечается частичная секреция радиоактивного материала в желудочно-кишечный тракт мышей с желчью, степень которой составляет ~ 14 % от введенной дозы с интегральной константой процесса $\chi_1 = 0,136 \pm 0,005 \text{ ч}^{-1}$. При интрагастральном введении всасывание ^{14}C -этоксозепама происходит быстро и полно, «окнами всасывания» являются тонкая и толстая кишки. В дистальных отделах (прямая кишка) содержание радиоактивного материала не превышает $0,168 \pm 0,005$ %. Предложена кинетическая схема транзита и рециркуляции (всасывания и секреции) этоксозепама с параметрами, определенными в физиологических условиях.

При введении увеличивающихся доз ^{14}C -этоксозепама и одновременным определением состава липофильных и гидрофильных метаболитов в гомогенатах органов и тканей мышей в условиях *in vivo* определено значение условной максимальной скорости метаболизма в головном мозге ($V_{\text{max}} = 0,481 \pm 0,13$ нмоль/(г ткани*ч)). Условная величина K_m процесса $1,41 \pm 0,37$ (нмоль/г ткани) $^{-1}$ *ч $^{-1}$ предполагает значительный вклад биотрансформации в общий процесс его элиминации. Установлено, что в процессе связывания этоксозепама с белками плазмы крови принимают участие два центра связывания с незначительными отличиями в величинах констант диссоциации ($K_{d1} = 1,1 \pm 0,1$ нмоль/см 3 и $K_{d2} = 3,9 \pm 0,5$ нмоль/см 3 соответственно) и слабой кооперативностью между ними.

Фармакокинетический профиль этоксозепама в крови, мозге и печени описывается однокамерной фармакокинетической моделью. После внутривенного введения фракция исходного соединения в печени составляет $0,5 \pm 0,14$, а в мозге и крови $0,39 \pm 0,18$ и $0,32 \pm 0,07$ соответственно. Степень биотрансформации соединения составляет $50 - 70$ % по данным в разных органах. после интрагастрального введения в организм поступает $40 - 60$ % неизменного соединения, и сохраняется статистически достоверная инвариантность основных фармакокинетических параметров распределения и элиминации из организма.

В гомогенатах печени отмечается постепенное накопление конечных гидрофильных метаболитов и осуществляется частичная элиминация радиоактивной метки из молекулы (в условиях *in vitro* эффективность реакции дезалкоксилирования составляет 153 ± 34 мкмоль*(см 3 мг·протеина) $^{-1}$, или $37,1 \pm 11,7\%$ от общей скорости биотрансформации липофильных метаболитов). предложена схема метаболизма этоксозепама, согласно которой ожидаемым является О-дезаалкоксилирование через образование интермедиата, гидроксильированного по положению 3 гетерокольца.

Наибольшее количество радиоактивного материала после внутривенного введения выводится из организма мышей с мочой. В суммарном процессе экскреции уровень глюкуроновых конъюгатов составляет ~ 52 %. Относительный состав глюкуроновых конъюгатов после внутривенного и интрагастрального введения не из-

меняется, подтверждая неизменность скорости и эффективности путей конъюгации. Суммарно после внутривенного введения выводится $18,0 \pm 3,5$ % от введенной дозы, тогда как после интрагастрального $29,0 \pm 8,0$ % за счет биотрансформации и значительного вклада элиминации радиоактивной метки из структуры молекулы в условиях *in vivo*.

Результаты фармакокинетических свойств этоксозепама, нового производного бензодиазепина, свидетельствуют о перспективности создания на его основе нового лекарственного средства анксиолитического действия.

Ключевые слова: ^{14}C -этоксозепам, фармакокинетика, метаболизм, абсорбция, элиминация.

SUMMARY

Zhukova N.O. Experimental pharmacokinetics of 3-alkoxy-1.4-benzodiazepine-2-one (ethoxozepam). – As a manuscript.

Thesis for Candidate of Pharmaceutical Sciences scientific degree on speciality 14.03.05 – pharmacology. – National University of Pharmacy, Kharkiv, 2016.

The dissertation is dedicated to studying of absorption, distribution, metabolism and elimination processes of ^{14}C -ethoxozepam. Via condensation of the corresponding 3-chloroderivative 1.4-benzodiazepine with ^{14}C -ethanol the ^{14}C -labeled sample with specific activity 0.7GBk/mol and radiochromatographic purity 96.2 % had been obtained. It was found that after intravenous administration substance partially (up to 14 % of the dose administered) secreted to the gastro-intestinal tract, while fully and readily being absorbed after intragastral administration.

Ethoxozepam's concentration in blood, brain and liver is described with the one-compartment pharmacokinetic model. In the organism the studied substance undergoes metabolism – after intravenous administration in organs and tissues the unchanged substance quantity is from 50 to 70 % of the total radioactivity. *In vitro* the radioisotope label elimination from structure ($37,1 \pm 11,7\%$ of the total maximum biotransformation of lipophilic metabolites) had been found and the scheme of its possible transformation had been suggested. After intravenous administration the total quantity of radioactivity excreted is $18,0 \pm 3,5$ %, while after intragastral – $29,0 \pm 8,0$ % of the dose administered that proves the impact of the intense biotransformation and isotope elimination from ethoxozepam molecule *in vivo*.

Key words: ^{14}C -ethoxozepam, pharmacokinetics, metabolism, absorption, elimination.

Підписано до друку 15.12.2016 р. Формат 60×90/16. Папір офсет. Друк офсет.
Умов.друк.арк. 0,7. Тираж 100 прим. Замовл. № 316/12
Надруковано у копі-центрі «МОДЕЛІСТ», ФО-П Миронов М.В.,
м. Харків, вул. Мистецтв, 3 літер Б-1.
Тел. (057) 7-170-354 e-mail: kmodelist@ukr.net
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ВО 4 № 022953