

УДК 61:577.1, 616-008.9:577.23:577.12:612.014.482-092.9  
DOI 10.32782/2226-2008-2022-3-2

Г. Ф. Степанов, К. В. Олійник, А. А. Костіна, Г. С. Маринюк

## ОКИСНЕННЯ ГІДРАЗИДНОГО ФРАГМЕНТУ ГІДАЗЕПАМА – СТАДІЯ, ЩО ЛІМІТУЄ ЙОГО ЕЛІМІНАЦІЮ

Одеський національний медичний університет МОЗ України, Одеса, Україна

УДК 61:577.1, 616-008.9:577.23:577.12:612.014.482-092.9

Г. Ф. Степанов, К. В. Олійник, А. А. Костіна, Г. С. Маринюк

ОКИСНЕННЯ ГІДРАЗИДНОГО ФРАГМЕНТУ ГІДАЗЕПАМА – СТАДІЯ, ЩО ЛІМІТУЄ ЙОГО ЕЛІМІНАЦІЮ

Одеський національний медичний університет МОЗ України, Одеса, Україна

Проведені дослідження показали, що введення тваринам фенобарбіталу та омепразолу загалом не впливає на кінетику виведення радіоактивного матеріалу з організму щурів. У всіх випадках спостерігається максимум виведення радіоактивного матеріалу у першу добу. Проте фенобарбітал прискорює екскрецію речовин ренальним шляхом, а омепразол – біліарним.

Враховуючи той факт, що фенобарбітал відноситься до індукторів CYP3A4, а омепразол – до інгібіторів субстратів CYP2C19, можна припустити, що N<sup>1</sup>-деалкілювання гідазепаму каталізується цими ферментами. При цьому основним CYP450 у процесі є CYP 2C19.

**Ключові слова:** гідазепам, індуктор, інгібітор, екскреція, цитохром P-450.

UDC 614.876:616-055.6:577.122:616-092.4

G. F. Stepanov, K. V. Oleynik, A. A. Kostina, G. S. Maryniuk

HYDROSIN'S OXIDATION OF GIDAZEPAM FRAGMENT- ITS LIMITING ELIMINATION STAGE

Odessa National Medical University

The carried-out researches showed that administration by an animal of phenobarbital and omeprazol as a whole doesn't influence on kinetics removal of radioactive material from organism of rats. In all cases the maximum removal of radioactive material in the first days is observed. Nevertheless, phenobarbital accelerates the excretion of substances by the renal way, and omeprazol – by biliar.

Considering the fact that phenobarbital is belong to the inductors CYP3A4, and omeprazol inhibitors substrate of CYP2C19 can assume that N<sup>1</sup>-dealkylation of gidazepam is catalyzed by these enzymes. Thus CYP450 basic in that process is CYP 2C19.

**Key words:** gidazepam, inductor, inhibitor, excretion, P-450 cytochrome.

**Вступ.** Гідазепам має оригінальний спектр фармакологічної активності, виражену анксиолітичну дію та не викликає, у високих терапевтичних дозах, деяких седативних ефектів – міорелаксації, порушення координації рухів і оперантної активності, сонливості й т.п. Перераховані властивості препарату визначають його переваги порівняно з іншими транквілізаторами I, 4-бензодіазепінового ряду [1].

Вивченню особливостей фармакокінетики гідазепаму присвячена низка досліджень. Зокрема, встановлена структура його метаболітів [2], кінетика розподілу гідазепаму і його метаболітів в організмі експериментальних тварин [3]. Представлені також дані [4] по експериментальній і клінічній фармакокінетиці гідазепаму.

Більшість із перерахованих робіт з експериментальної фармакокінетики гідазепаму були виконані з використанням міченого радіоактивним ізотопом (<sup>14</sup>C)-препарату. Мітка в такій молекулі перебувала в положенні «2» гетероциклічного кільця [5].

Переваги роботи з таким препаратом очевидні, тому що дозволяють встановити баланс мас уведеного препарату. До недоліків слід віднести те, що в експериментах з такою сполукою неможливо простежити процес N<sup>1</sup>-деалкілювання без попереднього хроматографічного поділу. Важливість встановлення механізмів цього процесу полягає в тому, що це перший і основний етап метаболізму гідазепаму. Утворений N<sup>1</sup>-деалкільний

метаболіт відноситься до речовин з досить високими фармакодинамічними властивостями, а також певною спорідненістю до бензодіазепінових рецепторів [6]. У цілому, по більшості фармакологічних тестів активність гідазепаму обумовлена його деалкільним метаболітом [7]. Тому виникає необхідність встановити природу ферменту, каталізуючого таке перетворення з метою прогнозування можливої взаємодії гідазепаму з іншими лікарськими засобами.

У цій роботі використані різні методичні прийоми для встановлення механізмів окиснення гідразидного фрагменту в молекулі гідазепаму. Визначена роль цього процесу в елімінації гідазепаму з організму білих щурів.

Мета роботи – вивчення впливу індукторів та інгібіторів ізоформ CYP450 на напрямки метаболізму гідазепаму.

**Матеріали й методи.** У дослідженнях використовувався <sup>14</sup>C-гідазепам, мічений у гідразидному фрагменті молекули, з питомою радіоактивністю 0,07 Ки/моль і радіохімічною чистотою 92%. Робота виконувалася на щурах масою 290–320 г. Тваринам впродовж чотирьох діб, до введення <sup>14</sup>C-гідазепаму, інтрагастрально вводили індуктор (фенобарбітал) у дозі 80 мг/кг, потім, на п'яту добу однократно, інтрагастрально, вводили <sup>14</sup>C-гідазепам, у дозі 5 мг/кг. Омепразол (інгібітор), аналогічно, вводили впродовж чотирьох діб в дозі 80 мг/кг, до однократного введення міченого гідазепаму (5 мг/кг). Зразки сечі та калу збирали впродовж п'яти діб після введення міченого

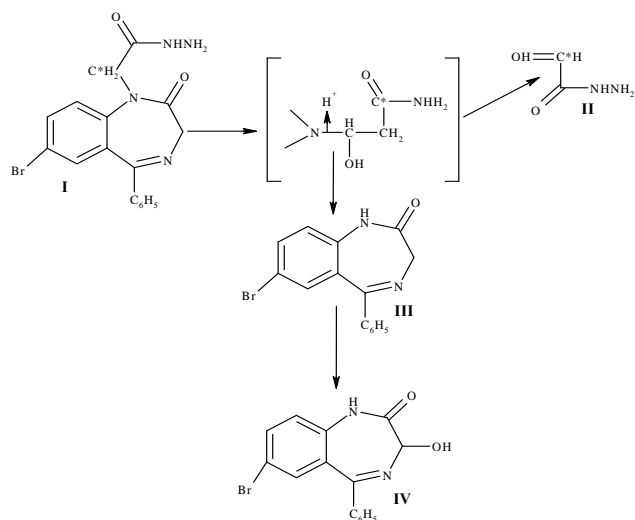
## ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

препарату. Увесь цей час тварини перебували в метаболічних клітках.

Екстрагування зразків калу та сечі дозволяє розділити метаболіти на дві групи. У першу групу входять метаболіти, які утворюються після  $N^1$ -деалкілювання молекули гідазепама. За своїми фізико-хімічними властивостями вони відносяться до ліпофільних речовин. Інша група метаболітів – це гідрофільні метаболіти, які утворюються в процесах гідроксилування. Відділення метаболітів першої групи від другої здійснювали в розділовій лійці в системі хлороформ-вода (1:1).

Радіометричне визначення вмісту радіоактивного матеріалу здійснювалося на рідинному сцинтиляційному фотометрі TRI-CARB (Canberra-Packard, USA).

**Результати і їх обговорення.** Наші попередні дослідження метаболізму гідазепама (I), за допомогою комбінації методів тонкошарової хроматографії й мас-спектрометрії показали [5], що до основних напрямів його метаболізму відноситься  $N^1$ -деалкілювання з наступним  $C^3$ -гідроксилуванням.



При цьому утворюються гідрозид гліоксалевої кислоти (II), деалкілгідазепам (III) і його 3-оскіпохідне (IV) (зірочкою позначено  $^{14}C$  ізоотоп). Ми вважаємо, що кращим механізмом  $N^1$ -деалкілювання гідазепама є той, який представлений на схемі. Він включає утворення проміжного метаболіту – карбіноламіну (у квадратних дужках). Відзначимо також, що відщиплення метаболіту II відбувається стехіометрично з утворенням метаболіту III. Тому визначаючи вміст метаболіту II, ми можемо говорити про кількість метаболіту III. Така ж аналогія характерна для всіх процесів  $N$ -деметилування ксенобіотиків, де в однакових кількостях утворюються  $N$ -деалкільний метаболіт і формальдегід, який може бути визначений реактивом Наше. Утворення карбіноламіну можливо при окисненні гідрозидного фрагменту в монооксигеназному каталізі, де цитохром P-450 (CYP450) активує один атом молекулярного кисню й впроваджує в субстрат, а другий – відновлює до води [8]. Альтернативний механізм, що включає пероксидазні реакції [9] мало ймовірний, про що й свідчать подальші наші дослідження з використанням індуктора CYP450 фенобарбіталу та інгібітору – омепразолу.

Вибір індуктора та інгібітору CYP450 був не випадковим і ґрунтувався на даних, отриманих із літературних джерел. Так відомо, що діазепам і нордіазепам мають структурну аналогію з гідазепамом і деалкілдіазепамом. У процесі  $N^1$ -деалкілювання та  $C^3$ -гідроксилування вони використовують як ферменти CYP2C19 і CYP3A4 [10]. Відповідно, для першого індуктором є фенобарбітал, а для другого інгібітором є омепразол. Використовуючи інгібіторний аналіз у дослідях *in vivo*, ми спробували визначити роль метаболізму ( $N^1$ -деалкілювання) у загальному процесі елімінації гідазепама.

Аналіз кінетики виведення радіоактивного матеріалу з організму щурів показав (табл. 1), що більша його частина екскретується впродовж 24 годин. При цьому співвідношення вмісту речовин у сечі та калі становить 1:7.

Враховуючи той факт, що в даному експерименті враховується радіоактивність речовин, які представлені сумою I + II, ми можемо зробити наступні припущення: по-перше, обидві речовини можуть всмоктуватися в кишечник і потім їх одна частина ренальним шляхом елімінує з організму, а друга частина, за рахунок жовчної секреції, знову потрапляє в кишечник, тобто включається у кишково-печінкову циркуляцію. По-друге, маючи низьку молекулярну масу, метаболіт II може переміщатися уздовж кишкового тракту й безпосередньо виводиться з калом.

Другий шлях, на нашу думку, кращий, оскільки в процесі дослідження ми не спостерігали появи додаткових піків концентрації речовин.

Уведення фенобарбіталу експериментальним тваринам свідчить про підвищення процесів елімінації з 84,7% (табл. 1) до 97,1 (табл. 2). При цьому таке збільшення здійснюється за рахунок ренального шляху. В той же час відомо [11], що зміна внутрішньопечінкової циркуляції ліків може бути викликана попереднім введенням речовин, що прискорюють або сповільнюють холестаза, метаболізм сполук і формування комплексів речовина-жовч.

Введення щурам фенобарбіталу призводить до збільшення виділення жовчі у щурів, а звідси, і до інтенсивності екскреції деяких препаратів [9].

У деяких випадках кількість жовчі, що виділяється при введенні індукторів CYP450, може залишатися на попередньому рівні, однак вміст метаболітів у сечі різко зростає. Ймовірно, таке явище спостерігається й у нашому випадку.

Уведення омепразолу експериментальним тваринам впродовж чотирьох діб так само змінює концентраційний профіль радіоактивного матеріалу (табл. 3).

У сечі вміст речовин був аналогічним контрольним показникам (табл. 1). Однак у калі тварин кількість радіоактивного матеріалу на 10% перевищувало як у контрольної, так і експериментальної групи тварин, якій вводили фенобарбітал.

Представлені результати (табл. 1–3) свідчать про те, що введення тваринам фенобарбіталу та омепразолу в цілому не впливає на кінетику виведення радіоактивного матеріалу з організму щурів. У всіх випадках спостерігається максимум виведення радіо-

Таблиця 1

Кількість виведеного радіоактивного матеріалу (імп/хв і % уведеної дози) з організму щурів, яким інтрагастрально ввели <sup>14</sup>C-гідазепам (5 мг/кг)

Час, год	Сеча		Кал			
	Імп/хв	% від уведеної дози	Імп/хв	% від уведеної дози	Сума	% від уведеної дози
0–12	39468±198	4,3±0,7	239074±488	26,1±2,1	278542±528	30,4±4,6
12–24	46245±215	5,2±0,8	295762±543	32,3±4,9	342007±548	37,5±5,3
24–48	5035±70	0,5±0,6	68211±260	7,4±2,3	73243±270	8,0±2,5
48–72	7754±58	0,8±0,8	55736±220	4,5±1,8	63490±252	5,4±2,2
72–96	2879±53	0,3±0,4	6350±79	3,1±1,7	9229±96	3,4±1,8
0–120	101381±124	11,2±1,8	665133±7103	73,5±16,9	766514±773	84,7±8,1

Таблиця 2

Кількість виведеного радіоактивного матеріалу (імп/хв і % уведеної дози) з організму щурів, яким після 4-х денного введення фенобарбіталу (80 мг/кг) вводили <sup>14</sup>C-гідазепам (5 мг/кг)

Час, год	Сеча		Кал			
	Імп/хв	% від уведеної дози	Імп/хв	% від уведеної дози	Сума	% від уведеної дози
0–12	81468±1203	9,0±1,2	200026±1313	22,0±7,1	281494±2516	30,9±8,3
12–24	103734±6867	11,4±2,3	469600±8183	51,6±10,8	573334±15050	63,0±13,1
24–48	11548±70	1,3±0,4	13162±1260	1,4±0,3	24710±1330	2,8±0,7
48–72	993±17	0,11±0,08	3290±722	0,4±0,06	4283±739	0,5±0,14
72–96	0	0	457±110	0,1±0,004	457±110	0,1±0,004
96–120	0	0	196±10	0,02±0,001	196±10	0,02±0,001
0–120	197743±840	21,7±1,8	686731±11598	75,4±18,26	766514±12438	97,1±20,06

Таблиця 3

Кількість виведеного радіоактивного матеріалу (імп/хв і % уведеної дози) з організму щурів, яким після 4-х денного введення омепразолу (80 мг/кг) вводили <sup>14</sup>C-гідазепам (5 мг/кг)

Час, год	Сеча		Кал			
	Імп/хв	% від уведеної дози	Імп/хв	% від уведеної дози	Сума	% від уведеної дози
0–12	29385±1203	3,3±0,2	200596±1123	22,2±7,2	229981±1816	25,5±7,1
12–24	56452±6867	6,3±1,1	506701±9183	56,2±10,8	563153±3478	62,5±12,3
24–48	4073±70	0,4±0,09	40131±1160	4,4±1,3	44204±1720	4,9±1,7
48–72	5326±117	0,6±0,08	20292±1722	2,2±0,6	25618±1239	2,8±0,4
72–96	1894±125	0,2±0,06	8475±910	0,9±0,8	10369±925	1,2±0,04
96–120	657±26	0,1±0,01	1962±556	0,2±0,01	2619±256	0,3±0,01
0–120	97787±8408	11,0 ±1,54	778157±14654	86,3±20,7	875944±12438	97,1±20,1

Таблиця 4

Співвідношення метаболітів гідазепаму в сечі та калі експериментальних тварин (у відсотку від загальної кількості)

Речовина	Сеча			Кал		
	Контроль	Фенобарбітал	Омепразол	Контроль	Фенобарбітал	Омепразол
II	9,0±2,1	16,5±5,6	5,8±1,5	56,9±12,7	66,0±17,7	56,6±17
I	1,9±0,9	5,1±1,1	4,9±1,1	16,0±4,8	9,4±1,8	26,6±1,8
III	4,7	3,2	1,2	3,5	7,0	2,1

радіоактивного матеріалу в першу добу. Проте фенобарбітал прискорює екскрецію речовин ренальним шляхом, а омепразол – біліарним. Мабуть, пояснення цього явища можуть бути ізоформи СУР450, які каталізують N<sup>1</sup>- деалкілювання гідазепаму. Для підтвердження цього припущення нами у всіх трьох випадках (табл. 1–3) у загальній кількості сечі та калу (4–5 добового відбору) був визначений вміст

окремо вихідної сполуки (I) і його метаболіту (II). Розраховане відсоткове співвідношення між речовинами, що перебувають у біологічному матеріалі (табл. 4).

Виявилося, що омепразол інгібує утворення II, що позначається на його вмісті в сечі та калі. У той же час фенобарбітал, навпаки, збільшував вміст II у калі, що вказує на можливість його індукованої дії. Швидше

## ТЕОРІЯ ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

за все, така індукція СYP450 має місце безпосередньо в кишечнику.

Враховуючи той факт, що фенобарбітал відноситься до індукторів СYP3A4, а омепразол – до інгі-

біторів субстратів СYP2C19, можна припустити, що N<sup>1</sup>- деалкілювання гідазепаму каталізується цими ферментами. При цьому основним СYP450 у процесі є СYP 2C19.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Savchenko MA. Isolation of gidazepam and its metabolites by solid-phase extraction. *Pharmaceutical journal*. 2016; 2: 43–47. URL: <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.16.02> (in Ukrainian).
2. Chubenko AV, Savchenko MA. Development and validation of the method for determining hydazepam in biological material by chromatography-mass spectrometry. *Vestn. Kazakh National honey. Univ.* 2015; 2: 504–507.
3. Kolyvanov GB. Pharmacokinetic assessment of tablet dosage forms of hydazepam prepared by various technologies. *Experimental and clinical pharmacology*. 2004; Volume 67, No. 2: 63–66.
4. Golovenko NYa, Venerable EV. Pharmacological and toxicological characteristics of hydazepam and its metabolites. *Contemporary problems of toxicology*. 2007; 4: 39–41.
5. Synthesis of Benzodiazepines Through Ring Opening/Ring Closure of Benzimidazole Salts/ Sheng Tao, Dr. Qingqing Bu, Qianqian Shi, Prof. Dr. Donghui Wei. *Chemistry – A European Journal*. 2020; 26. № 15: 3252–3258. <https://doi.org/10.1002/chem.201905828>.
6. Benzodiazepines: Uses, Dangers, and Clinical Considerations/ Edinoff A.N., Nix C.A., Hollier J., et al. *Neurol Int*. 2021; № 13(4): 594–607. doi: 10.3390/neurolint13040059.
7. Golovenko NYa, Kravchenko IA. Biochemical pharmacology of prodrugs. Odessa: Ecology, 2007; 352.
8. Testa B, Kraemer SD. The biochemistry of drug metabolism – An introduction. Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem. Biodivers*. 2007; Vol. 4, № 3: 257–405. PMID: 17372942 DOI: 10.1002/cbdv.200790032.
9. Verbeeck RK. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008; № 64(12): 1147–1161. doi: 10.1007/s00228-008-0553-z.
10. Guengerich FP. Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal*. 2018; № 8(12):10964–10976. doi: 10.1021/acscatal.8b03401.
11. Golovenko NYa. Physical and chemical pharmacology. Odessa: Astroprint; 2004. pp. 105–112.

Надійшла до редакції 07.12.2022 р.

Прийнята до друку 15.12.2022 р.

Електронна адреса для листування [alinakostina@ukr.net](mailto:alinakostina@ukr.net)