

КІНЕТИКА ГІДРОЛІЗУ ПОХІДНОГО 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІНУ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗАМИ В ОРГАНІЗМІ МИШЕЙ

М. Я. ГОЛОВЕНКО, В. Б. ЛАРІОНОВ

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса;
e-mail: lvb_78@mail.ru

Створення проліків хімічною модифікацією фізіологічно активних сполук є одним зі шляхів для оптимізації фармакотерапевтичного впливу на організм. Метою роботи було визначення кінетичних характеристик неспецифічних естераз, що каталізують процес гідролітичного розщеплення снодійного препарату «Левана» (похідного 1,4-бенздіазепіну). Досліди проведено із використанням ^{14}C -мічених аналогів левани та її активного метаболіту – 3-гідроксифеназепаму. В умовах *in vitro* показано, що левана піддається спонтанному гідролізу навіть у буферному середовищі (рН 7,4), а у плазмі крові та гомогенатах мозку й печінки цей процес відбувається інтенсивніше (умовна V_{\max} складає $6,9 \pm 0,5$, 19 ± 4 та 12 ± 1 мМ/год·мг протеїну відповідно). Зазначені тест-об'єкти різняться активністю тканинних естераз, які активніші в печінці (умовна K_m $0,45 \pm 0,04$ мМ – для печінки та 47 ± 11 мМ – для мозку). У плазмі активність карбоксилестераз (у відношенні до левани) є найнижчою (умовна K_m 129 ± 10 мМ). В експериментах *in vivo* встановлено підвищену здатність левани (порівняно із 3-гідроксифеназепамом) долати гематоенцефалічний бар'єр, внаслідок чого збільшується вміст активного метаболіту в тканинах мозку після її гідролізу. Кількісно це виражається як підвищення показника співвідношення концентрації 3-гідроксифеназепаму в мозку та крові мишей ($C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}}$) у $\sim 1,4$ раза.

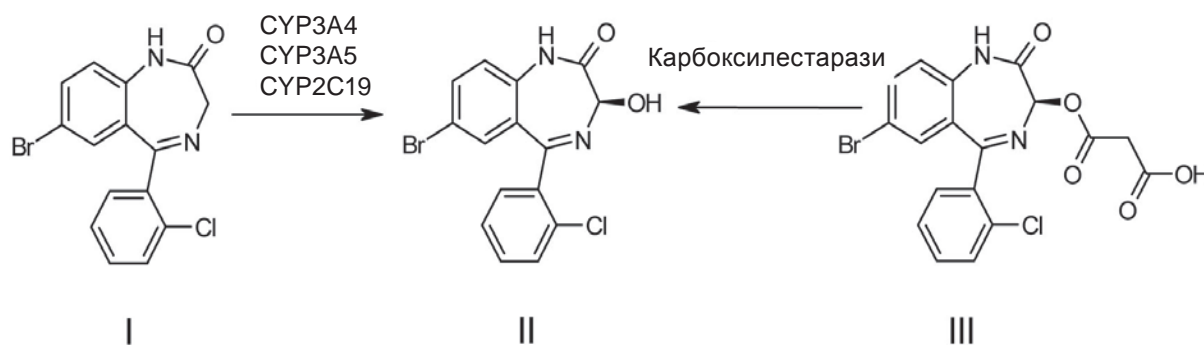
Ключові слова: препарат «Левана», 3-гідроксифеназепам, ензиматичний гідроліз, гематоенцефалічний бар'єр, проліки.

Одним із сучасних методів створення безпечних та ефективних лікарських засобів є синтез так званих проліків, молекули яких є менш активними, ніж їх метаболіти. Введення до структури фізіологічно активних сполук аміної, карбоксильної або гідроксильної групи сприяє їх біодоступності (всмоктуванню), поліпшує розподіл в організмі та зменшує ступінь метаболічної дезактивації (ефект присистемної елімінації). Наявність в молекулі сполуки естерних, амідних, аміноалкільних хімічних зв'язків, здатних до хімічного або ензиматичного розщеплення, обумовлює утворення активного метаболіту та реалізацію фармакологічної дії.

На фармацевтичному ринку пострадянського простору в медичній практиці з успіхом використовується лікарський засіб феназепам [1]. На жаль, поряд із позитивною дією (анксіолітичною, снодійною) йому притаманні і деякі побічні властивості (міорелаксанта, седативна). За визначення механізму дії препарату

встановлено [1], що під час метаболізму феназепаму головним є утворення 3-гідроксифеназепаму. Для цього метаболіту характерним є зовсім інший спектр фармакологічної дії, ніж у феназепаму. Проте наявність гідроксильної групи в положенні 3 гетероциклічного кільця молекули призводить до утворення в організмі глюкуронідів та сульфатів, що сприяє дуже швидкій його елімінації. З метою запобігання цьому процесу було проведено хімічну модифікацію 3-гідроксифеназепаму з наступним створенням нового препарату – «Левана» (7-бром-5-(о-хлорфеніл)-1,2-дигідро-3-гемісукцинат-3Н-1,4-бенздіазепін-2-он). Зменшення побічної дії та відсутність впливу на структуру сну роблять його одним з перспективних снодійних препаратів [2].

За хімічною будовою препарат «Левана» (III) – це естер гемісукцинату 3-гідроксифеназепаму – активного метаболіту, що утворюється під час окислювального гідрокслювання феназепаму (I).



Основним напрямом метаболізму феназепаму є його гідроксилювання в положенні 3 молекули гетерокільця з утворенням 3-гідроксифеназепаму. Каталізують цей процес відповідні ізоформи цитохрому P450 (CYP3A4, CYP3A5 та CYP2C19) [3]. Введення гідроксигрупи одночасно перетворює атом вуглецю в асиметричний з утворенням *in vivo* R- або S-енантіомеру (II). Незалежно від природи енантіомеру вони є нестійкими продуктами і піддаються рацемізації.

З іншого боку, наявність у молекулі левани естерного зв'язку передбачає можливість його гідролізу як спонтанно [4], так і за впливу неспецифічних карбоксилестераз [5, 6]. Ці ензими належать до суперродини серинових α, β -гідролаз, що специфічно взаємодіють з естерним зв'язком карбонових кислот і в різній кількості присутні в усіх органах та тканинах із переважною міжклітинною або мікросомною локалізацією [7]. Основна біологічна роль ензимів цієї групи – метаболізм ксенобіотиків, який здійснюється за рахунок розщеплення естерних, амідних або тіоестерних зв'язків. Крім того, вони беруть участь у трансформації жирних кислот та естерів холестеролу в печінці та в процесі утримання протеїнів (як комплекси із C-реактивним протеїном або β -глюкуронідазами) в ендоплазматичному ретикулумі.

Левана також вміщує у 3-му положенні гетерокільця асиметричний центр і є рацемічною сумішшю R- та S-енантіомерів. Відомо [8], що близький аналог препарату III (3-ацетокси похідне 1,4-бенздіазепіну) за дії карбоксипептидаз мікросомної фракції печінки гідролізується стереоселективно з утворенням R-3-гідрокси похідного та накопичення S-ацильованого енантіомеру, який здатний в подальшому піддаватись неспецифічному хімічному гідролізу.

Припускається, що кількісне співвідношення вихідної сполуки та 3-гідроксифеназепаму, який вивільнився в процесі ензиматичного гідролізу, є визначальним фактором, що забезпечує фармакологічну дію препарату, тому необхідним було визначити кінетичні характеристики неспецифічних естераз, що каталізують цей процес. Це і було метою нашої роботи.

Матеріали і методи

Досліди було проведено на білих безпородних мишах-самцях (20–25 г), яких утримували згідно з міжнародними та національними біоетичними рекомендаціями на стандартній лабораторній дієті і природному світловому режимі з вільним доступом до води та позбавленням їжі за 12 годин до початку експерименту. У роботі використано радіоактивні ^{14}C -аналоги (надані к.х.н. В. І. Павловським, співробітником відділу медичної хімії Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України), мічені в положенні «2» гетерокільця [9]. Сполуки вводили тваринам (групи з 6 тварин) внутрішньочеревинно в дозі 10 мкмоль/кг (4 мг/кг). Через певні проміжки часу тварин піддавали хлороформному наркозу, декапітували, збирали кров у центрифужні пробірки та відбирали зразки мозку і печінки. Вміст вільних ліпофільних метаболітів у гомогенатах органів (1 : 5 маса : об'єм, у 0,9%-му NaCl) або крові визначали після додавання рівного об'єму розчину янтарної кислоти (0,5 М) та екстракції хлороформом (двократний об'єм, 3 рази) з подальшою препаративною радіохроматографією (пластини Silufol UV 254) за методом, наведеним в [10]. Після хроматографування та підсушування на пластинках визначали зони (під УФ-світлом, 254 нм), що містять індивідуальні речовини, розрізали

їх та поміщали у флакони для рідинної сцинтиляційної фотометрії, додавали 10 мл ксилольно-спиртового сцинтилятора (Canberra PACKRAD) і визначали вміст радіоактивних продуктів (рідинний сцинтиляційний фотометр TRI CARB Canberra PACKARD 2700). Концентрацію сполук виражали у мкмоль/г тканини органа або мкмоль/мл крові.

Для оцінки гідролітичного розщеплення левани в умовах *in vitro* з інкубаційного середовища відбирали по 1 мл суміші та визначали вміст ліпофільних метаболітів та вихідної сполуки екстракцією хлороформом, як зазначено раніше. Склад інкубаційного середовища: 1 мл розчину ^{14}C -левани у 1,2-пропіленгліколі (10 мг/мл); гомогенат мозку чи печінки (1 : 5 у 0,1 М натрій-фосфатному буфері) або плазми крові – 0,625 мл із додаванням 0,1 М фосфатного буферного розчину (3,125 мл); розчин натрію азиду (1,5%) – 5 мл; 0,1 М фосфатний буфер з рН 7,4 – до 50 мл; температура інкубації $37 \pm 0,5$ °C).

Для оцінки вмісту водорозчинних метаболітів водну суміш кількісно перенесли до сцинтиляційних флаконів, додавали 2 мл мурашиної кислоти та упарювали до загального об'єму 1–1,5 мл, потім додавали 1 мл тритону X-100, 10 мл ксилольно-спиртового сцинтилятора та визначали вміст радіоактивного матеріалу (дані представлено в перерахунку на 3-гідроксифеназапам).

Швидкість гідролізу в дослідних пробах $(\Delta C/\Delta t)_{\text{експ.}} - (\Delta C/\Delta t)_{\text{контр.}}$, де $(\Delta C/\Delta t)_{\text{контр.}}$ – швидкість гідролізу у відповідних контрольних зразках) оцінювали як різницю концентрацій сполук у послідовних відборах проб ($\Delta C = (C_{t_1} - C_{t_2})$ у відношенні до інтервалу часу між відборами проб ($\Delta t = t_2 - t_1, t_1 < t_2 < \dots < t_n$). Аналіз кінетики гідролізу проводили в координатах «швидкість гідролізу–концентрація (на кінцевий момент інтервалу між відборами проб t)», а лінеаризацією одержаних даних у подвійних зворотних координатах визначали умовні значення V_{max} (відрізок, що відсікається прямою на осі ординат, як $1/V_{\text{max}}$) та K_m (відрізок, що відсікається прямою на осі абсцис, як $-1/K_m$) за алгоритмами [11].

Одержані дані оброблено за допомогою статистичного пакету програми MS Excel та представлено у вигляді $M \pm m$ (середнє та стандартна похибка середнього, n – кількість тварин/паралелів в групах).

Результати та обговорення

З метою оцінки ефективності перебігу процесу ензиматичного гідролізу левани, що каталізується карбоксилестеразами, об'єктами досліджу було обрано мозок (біофаза дії психотропних препаратів), печінку (основний орган, що виконує біотрансформаційну функцію) та плазму крові (що є центральним відсіком кінетичної схеми та забезпечує розподіл препарату і його метаболітів в організмі).

Швидкість гідролізу левани відрізняється в гомогенатах органів та плазмі крові мишей (табл. 1) та значно перевищує швидкість спонтанного гідролізу у водному середовищі (контроль – 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4) завдяки присутності тканинних естераз. Втім, слід зазначити, що близько 50% від загальної кількості препарату піддається спонтанному гідролізу протягом часу експерименту (48 год). Присутність метаболіту левани – 3-гідроксифеназапаму реєструється у всіх пробах гомогенатів біологічних об'єктів (табл. 1). Проте динаміка його накопичення лише в контролі є лінійною, тоді як у плазмі крові та гомогенатах печінки зміна його концентрації має різний характер, що обумовлено подальшим метаболізмом з утворенням водорозчинних метаболітів (табл. 1), зокрема глюкуронових або сульфатних кон'югатів. Це підтверджується тим, що після екстракції хлороформом у водному середовищі виявляється певний вміст радіоактивного матеріалу, що є значно вищим за кількістю, ніж у контрольному експерименті (табл. 1). Певне прискорення швидкості гідролізу левани в контрольних зразках, на нашу думку, є наслідком накопичення в середовищі одного із продуктів гідролізу – сукцинату.

Відомо [3], що гідролітичне розщеплення лікарських засобів каталізується ензимами, що спроможні розривати певні зв'язки. Для левани, в молекулі якої присутній естерний зв'язок, цією групою ензимів є неспецифічні естерази (3.1), що широко представлені в різних органах і тканинах [5]. З цієї групи ензимів доцільніше виділити карбоксилестерази ссавців, що у великій кількості експресуються у ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів, клітинах кишечника, нирок, серця та ін. [12]. Як було показано експериментами *in vivo* та *in vitro*, ензими цього класу беруть активну участь у метаболізмі лікарських сполук – меперидину [13] (специфічність до

Таблиця 1. Концентрація левани, 3-гідроксифеназепаму та залишкових водорозчинних метаболітів у гомогенатах мозку, печінки та плазмі крові мишей за інкубації (гідроліз *in vitro*, $M \pm m$, $n = 4$, у нмоль/мл інкубаційного середовища)

Час інкубації, год	Контроль	Мозок	Кров	Печінка
<i>Левана</i>				
0	196 ± 25	187 ± 29	193 ± 22	191 ± 37
1	–	76 ± 1	155 ± 14	68 ± 4
3	176 ± 13	63 ± 5**	137 ± 18	65 ± 10**
6	–	66 ± 2	103 ± 7	62 ± 5
10	171 ± 1	62 ± 2**	116 ± 11*	53 ± 2**
24	157 ± 21	38 ± 1*	67 ± 6*	40 ± 2*
30	–	38 ± 2	53 ± 2	37 ± 1
33	–	28 ± 5	67 ± 5	34 ± 1
48	88 ± 9	21 ± 1**	43 ± 3*	28 ± 2**
<i>3-Гідроксифеназепам</i>				
0	45 ± 3	48 ± 7	51 ± 8	55 ± 12
0,5	–	90 ± 3	163 ± 9	109 ± 20
1	–	119 ± 4	150 ± 9	128 ± 1
3	189 ± 1	125 ± 23	146 ± 14	118 ± 11*
6	–	98 ± 39	142 ± 5	88 ± 4
10	206 ± 5	151 ± 8*	158 ± 4**	99 ± 7**
24	229 ± 13	107 ± 2**	196 ± 8	79 ± 7**
30	–	131 ± 12	197 ± 11	60 ± 6
33	–	109 ± 10	203 ± 7	53 ± 9
48	308 ± 10	97 ± 20**	36 ± 2**	70 ± 6**
<i>Залишкові водорозчинні метаболіти</i>				
0,5	–	18 ± 2	4,3 ± 0,6	14 ± 1
1	–	12 ± 1	4,1 ± 0,1	20 ± 3
3	1,05 ± 0,03	14 ± 1**	7,8 ± 0,6**	16 ± 1**
6	–	10 ± 1	6,3 ± 0,5	16 ± 3
10	1,17 ± 0,05	9,3 ± 0,4**	12,6 ± 0,5**	12 ± 1**
24	1,2 ± 0,1	13 ± 1**	9,6 ± 0,9**	15 ± 1**
30	–	16 ± 1	11 ± 1	15 ± 1
33	–	15 ± 2	15 ± 4	15 ± 2
48	1,17 ± 0,04	11 ± 2**	20 ± 1**	19 ± 1**

* Вірогідно порівняно з контролем ($P \leq 0,05$); ** вірогідно порівняно з контролем ($P \leq 0,01$). Контроль – 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4, температура інкубації $37 \pm 0,5$ °С

естерів, що містять залишки аліфатичних спиртів), іринотекану [14] та ін. З метою визначення участі карбоксилестераз у метаболізмі препарату нами розраховано умовні константи Міхаеліса та умовні величини максимальної швидкості реакції гідролізу для різних органів

і тканин (табл. 2). Наведені дані свідчать про те, що ензими, які каталізують гідроліз сполуки є різними, оскільки величина умовної константи Міхаеліса вірогідно ($P \geq 0,95$) відрізняється. Це збігається з даними щодо різної швидкості гідролізу речовини, яка є найменшою в плазмі

Таблиця 2. Кінетичні параметри ензиматичного гідролізу ^{14}C -левани в плазмі крові та гомогенатах мозку і печінки мишей

Параметр ензиматичного процесу	Плазма	Мозок	Печінка
K_m , мМ	129 ± 10	47 ± 11	$0,45 \pm 0,04$
V_{max} , мМ/(год·мг протеїну)	$6,9 \pm 0,5$	19 ± 4	12 ± 1

крові, де найбільша величина K_m , та найбільша у гомогенаті печінки (найменша величина K_m). У той самий час значна різниця у величині K_m для печінки і мозку та однаковий порядок величини швидкості гідролізу препарату в гомогенатах цих органів (табл. 1) можна пояснити наявністю більшої кількості неспецифічних гідролітичних ензимів у мозку.

Із метаболізмом препарату пов'язана ще одна проблема, яка стосується фізико-хімічних властивостей сполук. Присутність вільної карбоксильної групи в молекулі левани та здатність до зворотної іонізації обумовлюють як її розчинність у біологічних рідинах (у депротонваному стані), так і здатність долати біологічні мембрани (у неіонізованій формі) шляхом простої дифузії. В умовах *in vivo* це забезпечує ефективно долаття гематоенцефалічного бар'єра, яке може бути визначене як співвідношення концентрацій досліджуваної сполуки в мозку та крові ($C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}}$). Порівнювання співвідношення концентрацій препарату і його метаболіту (при їх окремому введенні) є мірою ефективності надходження крізь гематоенцефалічний бар'єр.

За внутрішньочеревинного введення ^{14}C -левани мишам у внутрішніх органах та тканинах реєструються як вихідна сполука, так і вільні ліпофільні метаболіти, переважну частину яких складає 3-гідроксифеназепам, а також залишкові водорозчинні метаболіти (рис.). Різна концентрація цих сполук у мозку, плазмі крові та печінці обумовлена як виявленими розбіжностями у швидкості метаболізму, так і здатністю вихідної сполуки надходити до цих органів. Вміст 3-гідроксифеназепаму в цих органах є вищим, ніж інших груп метаболітів, тоді як вміст левани є значно нижчим внаслідок її гідролізу. Лише в крові концентрації 3-гідроксифеназепаму та левани є зіставними завдяки більшій розчинності цього препарату в плазмі порівняно з його метаболітом.

Привертає до себе увагу той факт, що співвідношення концентрацій левани в мозку і крові тварин після внутрішньочеревинного введення є низьким (максимальне значення $0,64 \pm 0,11$ реєструється лише в перші хвилини після введення), тоді як аналогічний показник для 3-гідроксифеназепаму (у той самий час) складає $1,81 \pm 0,23$ (табл. 3). Враховуючи факт, що співвідношення концентрацій в мозку і крові після внутрішньочеревинного введення ^{14}C -3-гідроксифеназепаму не перевищує $1,3 \pm 0,3$ (на четверту годину після введення), можна припустити, що левана легше перетинає гематоенцефалічний бар'єр та швидше надходить із крові до головного мозку, ніж її активний метаболіт. Беручи до уваги різний рівень неспецифічної естеразної активності в мозку та крові (табл. 2), низьке значення співвідношення концентрацій для вихідної сполуки пояснюється її швидким гідролізом у тканинах мозку із утворенням 3-гідроксифеназепаму. Більше того, коливання співвідношення концентрацій 3-гідроксифеназепаму після його внутрішньочеревинного введення є виразнішими протягом часу експерименту, ніж після введення левани. Поясненням цьому може бути дифузійний характер процесу розподілу 3-гідроксифеназепаму між кров'ю та мозком, тоді як на показник співвідношення концентрацій цього метаболіту після введення левани більшою мірою впливає процес гідролізу в тканинах мозку.

Таким чином, одержані дані свідчать про здатність левани до гідролізу, який перебігає як спонтанно, так і за впливу карбоксилестераз, що містяться в плазмі крові та гомогенатах головного мозку і печінки мишей. В умовах *in vitro* продемонстровано високу активність гідролітичних ензимів у гомогенаті печінки (величина умовної $K_m = 0,45 \pm 0,04$ мМ). Під час вивчення розподілу левани в організмі мишей (*in vivo*)

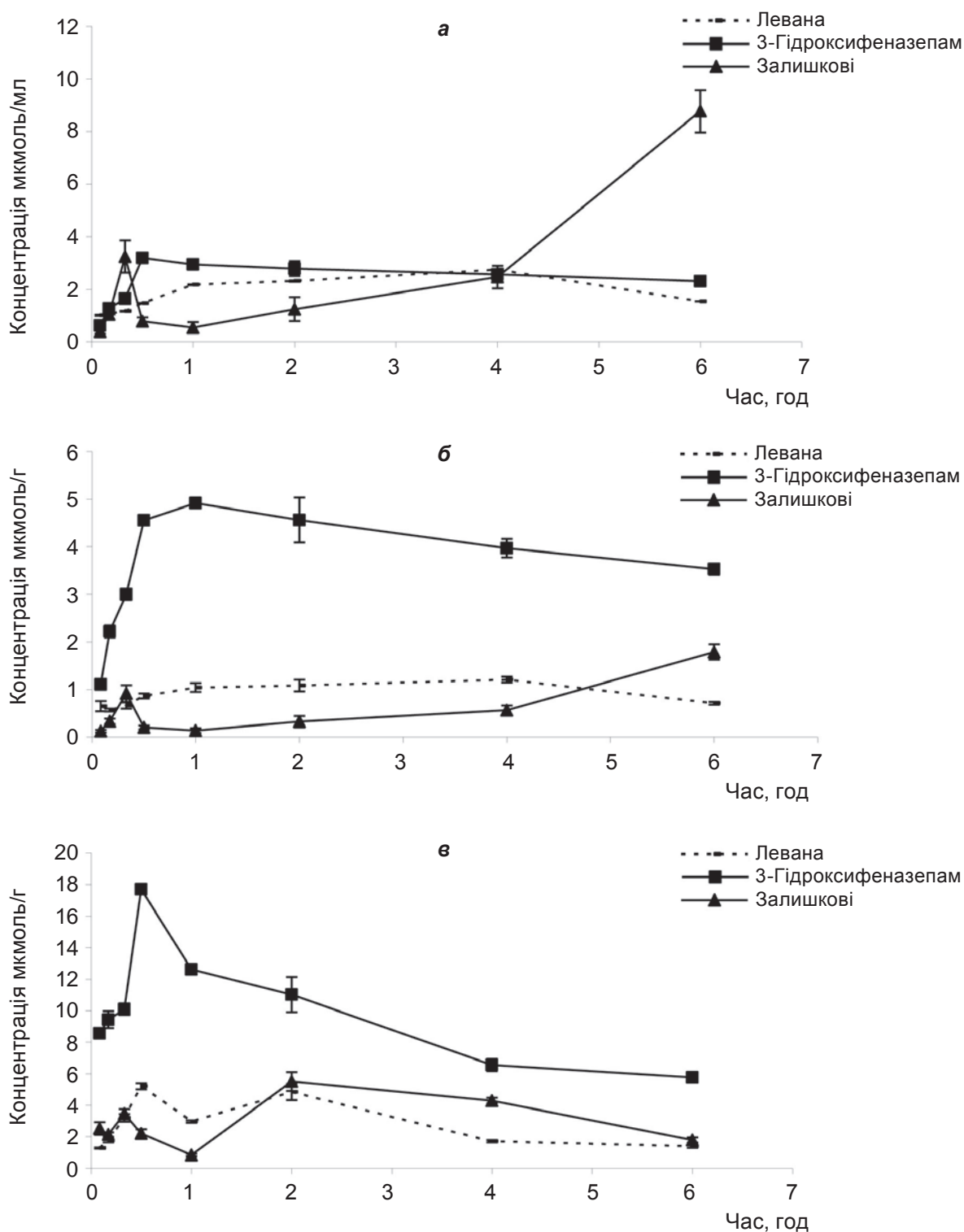


Рис. Вміст вихідної сполуки (левани), 3-гідроксифеназепаму та залишкових водорозчинних метаболітів у крові (а), мозку (б) та печінці (в) мишей після внутрішньочеревинного введення ^{14}C -левани (10 мкмоль/кг; $M \pm m$, $n = 6$)

Таблиця 3. Співвідношення концентрацій вихідної сполуки та головного метаболіту в мозку та крові мишей після внутрішньочеревинного введення ^{14}C -левани або ^{14}C -3-гідроксифеназепаму ($M \pm m$, $n = 6$)

Час	Введення левани		Введення 3-гідроксифеназепаму
	Співвідношення концентрацій « $C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}}$ »		
	левана	3-гідроксифеназепам	Співвідношення, « $C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}}$ »
5 хв	0,64 ± 0,11	1,81 ± 0,23	0,74 ± 0,09
10 хв	0,53 ± 0,03	1,75 ± 0,14	0,8 ± 0,1
20 хв	0,57 ± 0,06	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1
30 хв	0,59 ± 0,04	1,43 ± 0,09	1,2 ± 0,2
1 год	0,48 ± 0,04	1,67 ± 0,05	0,8 ± 0,1
2 год	0,47 ± 0,05	1,64 ± 0,24	0,8 ± 0,2
4 год	0,44 ± 0,02	1,55 ± 0,11	1,3 ± 0,3
6 год	0,46 ± 0,02	1,54 ± 0,07	1,2 ± 0,2

після внутрішньочеревинного введення було встановлено, що завдяки особливостям хімічної будови левана легше, ніж її активний метаболіт, перетинає гематоенцефалічний бар'єр. Завдяки ензиматичному гідролізу левани в тканинах мозку вміст активного метаболіту є вищим, ніж за введення власне 3-гідроксифеназепаму. Зміна характеру його розподілу кількісно виражається у підвищенні співвідношення концентрацій « $C_{\text{мозок}}/C_{\text{кров}}$ ».

КИНЕТИКА ГИДРОЛИЗА ПРОИЗВОДНОГО 1,4-БЕНЗДИАЗЕПИНА КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗАМИ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ

Н. Я. Головенко, В. Б. Ларионов

Физико-химический институт
им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса;
e-mail: lvb_78@mail.ru

Создание пролекарств химической модификацией физиологически активных соединений является одним из путей для оптимизации фармакотерапевтического воздействия на организм. Целью работы было изучение кинетических характеристик неспецифических эстераз, катализирующих процесс гидролитического расщепления снотворного препарата «Левана»

(производного 1,4-бенздиазепина). Эксперименты проводили с использованием ^{14}C -меченных аналогов леваны и ее активного метаболита – 3-гидроксифеназепаму. В условиях *in vitro* показано, что левана подвергается спонтанному гидролизу даже в буферном растворе (рН 7,4), однако в плазме крови и гомогенатах мозга и печени этот процесс протекает более интенсивно (кажущаяся V_{max} составляет $6,9 \pm 0,5$, 19 ± 4 и 12 ± 1 мМ/(ч·мг протеина соответственно). Указанные тест-объекты отличаются активностью тканевых эстераз, которые наиболее активны в печени (условная K_m $0,45 \pm 0,04$ мМ для печени и 47 ± 11 мМ для мозга). В плазме крови активность карбоксилэстераз (по отношению к леване) самая низкая (кажущаяся K_m 129 ± 10 мМ). В экспериментах *in vivo* показана повышенная способность леваны (по сравнению с 3-гидроксифеназепамом) преодолевать гематоэнцефалический барьер, что приводит к повышению содержания активного метаболита в тканях мозга после ее гидролиза. Количественно это выражается как повышение соотношения концентраций 3-гидроксифеназепаму в мозгу и крови мышей ($C_{\text{мозг}}/C_{\text{кровь}}$) в $\sim 1,4$ раза.

Ключевые слова: препарат «Левана», 3-гидроксифеназепам, энзиматический гидролиз, гематоэнцефалический барьер, пролекарство.

KINETICS OF HYDROLYSIS OF 1,4-BENZODIAZEPINE DERIVATIVE BY CARBOXYLESTERASES IN MICE ORGANISM

M. Ya. Golovenko, V. B. Larionov

A. V. Bogatsky Physics-Chemical Institute, National
Academy of Sciences of Ukraine, Odesa;
e-mail: lvb_78@mail.ru

Chemical modification of the physiologically active substances and creation of prodrugs is one of the ways for pharmacotherapy optimization. The aim of the work was determination of the kinetic parameters of nonspecific esterases that catalyze hydrolysis of new hypnotic drug Levana (1,4-benzodiazepine derivative). The experiments were carried out using the ^{14}C -labelled Levana and its active metabolite – 3-hydroxyphenazepam. *In vitro* it was shown that Levana undergoes spontaneous hydrolysis even in buffer solution (pH 7.4), though in plasma and homogenates of brain and liver this process is more intensive (conventional V_{\max} was 6.9 ± 0.5 , 19 ± 4 and 12 ± 1 mM/(h·mg of protein, correspondingly). The samples mentioned differ by activity of tissue esterases being most active in the liver (conventional K_m 0.45 ± 0.04 mM for the liver and 47 ± 11 mM for the brain). In plasma carboxylesterase activity (for Levana) is the lowest (conventional K_m 129 ± 10 mM). *In vivo* it was shown that Levana more easily permeates brain-blood barrier (compared to 3-hydroxyphenazepam), that leads to higher concentrations (after hydrolysis) of its metabolite in brain tissue. Also it is quantitatively estimated as the increase of concentration (brain/blood) ratio ~ 1.4 times.

Key words: drug «Levana», 3-hydroxyphenazepam, enzymatic hydrolysis, brain-blood barrier, prodrug.

References

1. Andronati S. A., Avrutskiy G. Ya., Bogatskiy A. B., Voronina T. A. et al. Phenazepam – K.: Nauk. Dumka, 2003. – 219 p. (In Russian).
2. Andronati S. A., Karaseva T. L., Popova L. V., Makan S. Yu., Boyko I. A., Bitenskiy B. S. GABA-ergic hypnotic drugs // *Vistn. Psychiatr. Psychopharmacother.* – 2004. – **5**, N 1. – P. 6–17. (In Russian).
3. Golovenko N. Ya., Zinkovskiy V. G., Yacubovskaya L. N. Synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives, labeled with radioactive isotopes, and determination of their metabolite's structure // *Ukr. Chem. J.* – 1999. – **65**, N 9. – P. 34–44. (In Russian).
4. Golovenko N. Ya., Zinkovskiy V. G. Determination of benzodiazepine tranquilizers and their metabolites in biological samples // *Chem. Pharm. J.* – 1978. – **12**, N 1. – P. 3–14. (In Russian).
5. Keleti T. Basic enzyme kinetics. – M.: Mir, 1990. – 348 p. (In Russian).
6. Ono S., Hatanaka T., Miyazawa S., Tsutsui M., Aoyama T., Gonzalez F. J., Satoh T. Human liver microsomal diazepam metabolism using cDNA-expressed cytochrome P450s : role of CYP2B6,2C19 and the 3A subfamily // *Xenobiotica.* – 1996. – **26**, N 11. – P. 1155–1166.
7. Golovenko M. Ya., Maltsev E. V., Larionov V. B. Kinetics of the chemical hydrolysis of hypnotic drug «Levana IC» // *Pharmaceut. J.* – 2010. – N 4. – P. 79–87. (In Ukrainian).
8. Golovenko N. Ya. Physics-Chemical Pharmacology. – Odessa: Astroprint, 2004. – 720 p. (In Russian).
9. Golovenko N. Ya., Kravchenko I. A. Biochemical pharmacology of prodrugs. – Odessa: «Ecologiya», 2007. – 360 p. (In Russian).
10. Satoh T., Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases: From Molecules to Functions // *Pharmacol. Toxicol.* – 1998. – **38**. – P. 257–288.
11. Andronati S. A., Shesterenko E. A., Sevastyanov O. B., Romanovskaya I. I., Pavlovskiy V. I., Semenishina K. O., Osetrov V. E. Isolation and characterization of carboxylesterase from piggy liver and its usage in stereoselective hydrolysis of 1,4-benzodiazepine-2-one derivatives // *Biotechnology.* – 2011. – **4**, N 5. – P. 71–76. (In Ukrainian).
12. Redinbo M. R., Bencharit S., Potter P. M. Human carboxylesterase 1: from drug metabolism to drug discovery // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – **31**, N 1. – P. 620–624.
13. Zhang J., Burnell J. C., Dumauval N., Bosron W. F. Binding and Hydrolysis of Meperidine by Human Liver Carboxylesterase hCE-1 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1999. – **290**, N 1. – P. 314–318.
14. Micheal W., Mingxing X. Mouse liver and kidney carboxylesterase rapidly hydrolyzes antitumor prodrug irinotecan and the n-terminal three quarter sequence determines substrate selectivity // *Drug Metab.* – 2003. – **31**, N 1. – P. 21–27.

Отримано 09.12.2013