

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
фармацевтичний факультет
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему: **«ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІЧНОЇ**
СТАБІЛЬНОСТІ ТА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ НОВОГО ЦНС АГЕНТА
ПІРИМІДИНОВОГО РЯДУ»

Виконала: здобувачка вищої освіти Фм20(4,10 д)-01
спеціальності 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація
Анастасія ДЕМОКО

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії, д. фарм. н., професор
Ганна СЕВЕРІНА

Консультант: PhD (Pharmacy) Тіна СІКАНЕН

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри
загальної хімії, д. фарм. н., професор Сергій КОЛІСНИК

АНОТАЦІЯ

In vitro оцінку біотрансформації перспективного антиконвульсанта MaIO 168 проведено за допомогою HLMs. Доведено низьку гепатотоксичність на 3D-культурах клітин HepG2. Визначено основні шляхи метаболізму, фармакокінетичні параметри та токсикологічний профіль сполуки.

Робота складається зі вступу, 4 розділів, висновків та списку використаної літератури, що включає 40 джерел. Робота викладена на 77 сторінках і містить 17 таблиць, 16 рисунків.

Ключові слова: епілесія, похідні хіназоліну, метаболічна стабільність, HLM, гепатотоксичність, HepG2, антиконвульсанти.

ANNOTATION

In vitro biotransformation studies of the novel anticonvulsant MaIO 168 were conducted using human liver microsomes (HLMs), demonstrating low hepatotoxicity in 3D HepG2 cell cultures. The research comprehensively determined major metabolic pathways, pharmacokinetic parameters, and the compound's toxicological profile.

This is presented on 77 pages, is structured with an introduction, 4 chapters, conclusions, and a bibliography of 40 sources. It includes 17 tables and 16 figures.

Keywords: epilepsy, quinazoline derivatives, metabolic stability, HLM, hepatotoxicity, HepG2, anticonvulsants.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	1
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1	10
СУЧАСНИЙ СТАН ТЕРАПІЇ ЕПІЛЕПСІЇ. АСПЕКТИ МЕТАБОЛІЗМУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ	10
1.1. Епілесія: визначення, етіологія, сучасні методи медикаментозної терапії.....	10
1.1.1 Загальна характеристика епілепсії, етіології та патогенезу	10
1.1.2 Стратегії фармакотерапії епілепсії	12
1.2. Характеристика метаболізму лікарських засобів у печінці	15
1.2.1. Значення ліпофільності в метаболізмі ЛЗ	15
1.2.2 Фази метаболічних перетворень лікарських засобів	16
1.2.3. Ферментні системи печінки як ключові учасники біотрансформації препаратів	17
1.3. Мікросоми печінки людини (HLM) у дослідженні метаболічної стабільності та шляхів біотрансформації сполук	21
1.4. Вплив функціонального стану печінки на тривалість та інтенсивність дії препаратів.	24
1.5. Гепатотоксичність: механізми, прогнозування та оцінка	26
Висновки до розділу 1	32
РОЗДІЛ 2	34
ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТУ	34
2.1. Характеристика об'єкту дослідження.....	34
2.2. Загальна структура дослідження та його етапи	37
2.3. Обґрунтування вибору методів дослідження	40
Висновки до розділу 2	41
РОЗДІЛ 3	43
3.1. Підготовка експерименту	43

3.2. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ): налаштування параметрів.....	47
3.3. Калібраційні криві: побудова, обґрунтування, результати.	50
3.4. Використання мідазоламу як контрольної сполуки	51
3.4.1. Результати та обґрунтування для мідазоламу.....	53
3.5. Методика інкубації I (мікросоми + кофактори).....	54
3.6. Методика варіативних інкубацій II-VII (зміни умов та використання інгібіторів)	57
3.7. Результати та обґрунтування MaIO 168	62
3.8. Напрямки метаболізму за результатами аналізу метаболічної стабільності MaIO 168	66
3.9. Розрахунки періоду напіввиведення та внутрішнього кліренсу MaIO 168	68
Висновки до розділу 3	70
РОЗДІЛ 4	71
ОЦІНКА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ ДОСЛІДЖУВАНОЇ СПОЛУКИ ЗА ДОПОМОГОЮ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ HEPG2	71
4.1. Методологія оцінки гепатотоксичності	71
4.2. Результати визначення життєздатності клітин під впливом MaIO 168.	73
4.3. Результати флуоресцентного забарвлення сфероїдів.....	74
Висновки до розділу 4	75
ВИСНОВКИ	76
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	78
ДОДАТКИ	83

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

EEG	Електроенцефалограма
DALYs	Disability-adjusted life year
ACDs	Антиконвульсанти
SUDEP	Sudden Unexpected Death in Epilepsy
ГТК	Генералізованих тоніко-клонічні напади
ГАМК	Гамма-аміномасляна кислота
UGTs	Уридин-дифосфат-глюкуронозилтрансфераза
SULTs	Сульфотрансферази
NATs	N-ацетилтрансферази
GSTs	Глутатіон-S-трансферази
TPMTs	Тіопурин-S-метилтрансферази
COMTs	Катехол-O-метилтрансферази
FMO	Флавін монооксигеназа
ABC	АТФ-зв'язувальні касетні транспортери
SLC	Solute carrier transporters
FDA	Food and drug administration
CES	Карбоксилестерази
CYP	Цитохроми P450
DMCO	Диметилсульфоксид
UDPGA	Уридиндифосфат-глюкуронової кислоти
NADPH	Нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат
HLM	Мікросоми печінки людини
CL	Кліренс
CLr	Нирковий кліренс
CLH	Печінковий кліренс
CLint	Внутрішній кліренс
rhCYP	Рекомбінантні CYP-ферменти
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetic modeling

NASH	Неалкогольний стеатогепатит
AST	Аспартат-амінотрансферази
ALT	Аланінамінотрансферази
ALP	Активність лужної фосфатази
GGT	γ-глутамілтрансферази
INR	Міжнародне нормалізоване відношення
AhR	Рецептор арилвуглеводнів
cDNA	complementary DNA
mRNA	Матрична рибонуклеїнова кислота
PTZ	Пентилентетразол
LD50	Середня летальна доза
HCS	Високопродуктивний скринінг
СТД	Стандарт
ВЕРХ	Високоєфективна рідинна хроматографія
LOQ	Межа кількісного визначення
ATCC	American Type Culture Collection
MEM	Minimal essential medium
FBS	Фетальна бичача сироватка
АТФ	Аденозинтрифосфорна кислота

ВСТУП

Актуальність теми:

Епілепсія залишається однією з найбільш поширених неврологічних патологій, яка потребує тривалого медикаментозного лікування. Це підтверджується статистичними даними, які вказують що близько 50 мільйонів людей в усьому світі живуть з епілепсією і щороку фіксується 2,4 млн нових випадків. В Україні існує мало статистики щодо епілепсії, або її просто немає. Хоча за офіційними даними кількість хворих на епілепсію близько 150 тис, імовірно, що у країні налічується все ж близько 300-500 тисяч хворих.

Ефективність існуючих протисудомних препаратів часто обмежується розвитком резистентності, побічними ефектами та токсичністю, зокрема гепатотоксичністю. У зв'язку з цим актуальним є пошук нових молекул з протиепілептичною активністю та сприятливим фармакокінетичним і токсикологічним профілем.

На сьогоднішній день дослідження метаболічної стабільності, біотрансформації та гепатотоксичного потенціалу нових лікарських засобів на доклінічному етапі є важливим етапом у розробці безпечних та ефективних препаратів.

Мета дослідження: Комплексне дослідження метаболічної стабільності, можливих шляхів біотрансформації, гепатотоксичності та гепатичного кліренсу потенційного антиконвульсанта — хіназолінової похідної МаЮ 168 — з використанням мікросомальної фракції печінки людини та клітинної лінії HepG2.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Побудувати логічну структуру експерименту.
2. Дослідити метаболічну стабільність сполуки у системі мікросом печінки людини за наявності відповідних кофакторів.

3. Визначити основні шляхи метаболізму за участі ферментних систем CYP, UGT та можливого залучення шляху CES.
4. Розрахувати фармакокінетичні параметри – період напіввиведення та внутрішньопечінковий кліренс
5. Оцінити гепатотоксичний потенціал за допомогою клітинної лінії HepG2 у широкому діапазоні концентрацій.
6. Проаналізувати результати досліджень та зробити висновки щодо доцільності подальшого вивчення зазначеної сполуки як перспективних кандидатів для протиепілептичної терапії.

Об'єкт дослідження – процеси біотрансформації та гепатотоксичного профілю хіназолінової похідної MaIO 168 за умов її інкубації з мікросомальною фракцією печінки людини та експозиції на клітинну лінію HepG2.

Предмет дослідження: похідна MaIO 168, мікросоми печінки людини (HLM), тривимірні культури клітин HepG2, метаболічні перетворення, гепатотоксичність.

Методи дослідження: застосовано інструментальні, біохімічні та аналітичні підходи, включаючи: вискоєфективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) з використанням діодного детектора DAD SL (G1315C) і флуоресцентного детектора (G1321A) для виявлення та кількісної оцінки MaIO 168; інкубації з мікросомальною фракцією печінки людини (HLM) за наявності кофакторів NADPH, UDPGA, з подальшим аналізом впливу інгібіторів ферментативних систем; культивування клітинної лінії HepG2 у тривимірній структурі (3D-сферах), дослідження життєздатності клітин за допомогою флуоресцентних барвників (Calcein AM, Propidium Iodide, Hoechst 33342); мікроскопію з використанням епіфлуоресцентного мікроскопа AxioVert A1 FL (Zeiss Finland), обладнаного широкосмуговою лампою Illuminator HXP 120V та камерою AxioCam 305; програмне забезпечення Microsoft Excel для статистичної обробки результатів

експериментів та побудови калібраційних кривих; BioviaDraw для графічної побудови структурних перетворень і метаболічних шляхів сполуки.

Практичне значення отриманих результатів: результати експериментального дослідження дозволили визначити основні шляхи метаболізму похідної MaIO 168 та профіль її гепатотоксичності, що є невід’ємним етапом доклінічної розробки нових лікарських засобів. Одержані дані стануть вагомим підґрунтям для подальших експериментальних досліджень біотрансформації похідної MaIO 168 та ідентифікації метаболітів в експериментах *in vivo*.

Апробація результатів дослідження і публікації: Результати випускної кваліфікаційної роботи були представлені на секційному засіданні кафедри фармацевтичної хімії в рамках XXXI Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (23-25 квітня 2025 р.), у конференції в Литві «Contemporary Pharmacy: Issues, Challenges and Expectations 2025». Тези доповіді опубліковані у збірнику конференції (Додатки А, Б).

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи: Кваліфікаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, загальних висновків, списку літератури. Робота викладена на 77 сторінках, ілюстрована 17 таблицями, 16 рисунками. Список використаних літературних джерел містить 40 найменувань, з яких – іноземних авторів 38.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ТЕРАПІЇ ЕПІЛЕПСІЇ. АСПЕКТИ МЕТАБОЛІЗМУ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

1.1. Епілепсія: визначення, етіологія, сучасні методи медикаментозної терапії

1.1.1 Загальна характеристика епілепсії, етіології та патогенезу

Епілепсія – це хронічний розлад мозкової діяльності, для якого характерні напади, що повторюються [1]. Епілепсія є одним із найпоширеніших серйозних захворювань центральної нервової системи, що характеризується виникненням неспровокованих, рецидивуючих нападів внаслідок раптового сплеску аномальної електричної активності у головному мозку. На сьогоднішній день понад 70 мільйонів людей у світі страждають на епілепсію, а захворюваність демонструє бімодальний розподіл з піками у немовлячому та літньому віці [2,3].

Визначення епілепсії базується на наявності принаймні двох неспровокованих нападів з інтервалом більше ніж 24 години; одного неспровокованого нападу за умови високої ймовірності рецидиву протягом наступних 10 років (не менше 60%), або встановлення діагнозу епілептичного синдрому [4]. Фактори, що підвищують ризик рецидиву після першого нападу, включають епілептиформну активність на електроенцефалограмі (ЕЕГ), структурні ураження мозку, виявлені методами нейровізуалізації, попереднє ураження головного мозку та напади під час сну [5].

Етіологія епілепсії є багатофакторною. Значна роль належить генетичним чинникам. Починаючи з кінця 1990-х років, виявлено понад 500 генів, що можуть бути залучені у розвиток епілепсії [6,7]. Наприклад, синдром Драве часто асоціюється з мутаціями у гені SCN1A. Проте не всі мутації є спадковими: мутації типу "de novo" можуть виникати спонтанно, без наявності їх у батьків. Хоча родинний анамнез підвищує ризик розвитку

хвороби, навіть при наявності батьків чи братів/сестер із діагнозом епілепсії ймовірність захворювання до 40 років становить менше ніж 5% [6]. Наявність генералізованої форми епілепсії у родичів підвищує ризик більше, ніж вогнищева форма. Однак епілепсія, що розвинулась внаслідок інсульту або травми мозку у родича, не впливає на спадковий ризик.

Іншими вагомими факторами ризику є перенесені інсульти, черепно-мозкові травми та інфекційні ураження центральної нервової системи. Так, епілепсія після інсульту розвивається у близько 12% пацієнтів протягом 10 років, після тяжких черепно-мозкових травм — у 3% протягом першого року, тоді як у випадку пухлин мозку епілептичні напади фіксуються у 80% пацієнтів, а при нейроцистицеркозі — у 70–95% випадків [4]. За даними глобального аналізу, тягар епілепсії, виражений через DALYs (Disability-adjusted life year — сумарний показник втрати здоров'я, що визначається як сума років життя, втрачених через передчасну смертність, та років, прожитих з інвалідністю), зріс на 13,8% між 1990 та 2017 роками, з вищим навантаженням серед чоловіків, що частково пов'язується з більшим рівнем вживання алкоголю та травматизацією [4].

Класифікація епілептичних нападів та епілепсії була оновлена Міжнародною лігою проти епілепсії у 2017 році. Напади поділяються на фокальні, генералізовані та невідомого типу залежно від клінічних проявів та даних ЕЕГ [8]. Фокальні напади виникають в окремій ділянці мозку, тоді як генералізовані охоплюють обидві півкулі одночасно. Типи епілепсії включають фокальну, генералізовану, комбіновану та епілепсію невизначеного типу, що визначаються на основі типу нападів, даних нейровізуалізації, електрофізіології, генетичних досліджень та супутніх клінічних характеристик. [4]

Клінічна діагностика епілепсії ґрунтується на ретельному зборі анамнезу, описі нападів свідками або за допомогою відеофіксації, а також на виявленні епілептиформної активності за допомогою ЕЕГ [4]. Проте

нормальні результати ЕЕГ не виключають наявність епілепсії, оскільки приблизно у 45–50% рутинних короточасних записів патологія не виявляється. Застосування тривалої реєстрації сну або амбулаторного ЕЕГ суттєво підвищує чутливість методу до 85%. Магнітно-резонансна томографія головного мозку є важливою для виявлення структурних патологій, за винятком випадків класичних генералізованих синдромів із типовими ЕЕГ-ознаками, де її застосування не є обов'язковим [4].

1.1.2 Стратегії фармакотерапії епілепсії

Основною стратегією лікування епілепсії є медикаментозна терапія із застосуванням протиепілептичних препаратів, що дозволяє досягти контролю нападів у близько 70% пацієнтів [4,9]. Препарати повинні застосовуватися суворо за приписами лікаря для забезпечення максимальної ефективності [10]. У випадках рефрактерної епілепсії можуть використовуватися додаткові методи, такі як стимуляція блукаючого нерва, яка полягає в імплантації пристрою для подачі електричних імпульсів до відповідного нерва з метою запобігання нападам [11]. Ще одним підходом є призначення кетогенної дієти, яка може бути ефективною в окремих категорій пацієнтів.

Терапія першого епілептичного нападу базується на ретельній оцінці етіології події, зокрема розмежуванні гострих симптоматичних та неспровокованих нападів [4]. Гострі симптоматичні напади виникають у відповідь на гострі порушення, такі як інсульт, токсичні впливи (наприклад, інтоксикація кокаїном або синдром відміни алкоголю) чи метаболічні розлади (гіпонатріємія, гіпоглікемія, гіперглікемія). У таких випадках терапія основного захворювання є основною стратегією з метою мінімізації ризику повторних нападів. Тимчасове застосування антиконвульсантів (ACDs) може бути доцільним у ситуаціях критичних станів, зокрема при інсульті або субарахноїдальному крововиливі, коли ризик рецидиву нападу зберігається до стабілізації основної патології [4].

Епідеміологічні дані свідчать, що серед 139 пацієнтів із першим нападом у лікарняних умовах у 61,1% відбулися повторні епізоди, причому у 41,1% із них були виявлені метаболічні порушення. У підгрупі пацієнтів із нападом на тлі гострого інсульту повторні напади спостерігалися у 47% випадків. Загалом ризик рецидиву нападу протягом десяти років є нижчим у пацієнтів із гостро спровокованими нападами (19%), ніж у тих, хто переніс неспровокований напад (65%) [4]. У випадку інсульту напади, що виникають у межах перших семи днів, розцінюються як симптоматичні та, як правило, не потребують тривалої протисудомної терапії. Натомість епілептичні напади, які виникають пізніше, класифікуються як спонтанні, свідчать про розвиток фокальної епілепсії та зазвичай вимагають тривалого лікування [4].

Ризик третього епілептичного нападу після двох спонтанних епізодів без лікування сягає 73% протягом наступних чотирьох років, особливо у пацієнтів із супутніми захворюваннями, такими як перенесений інсульт або новоутворення мозку [4]. Рішення щодо початку антиконвульсантної терапії після першого або другого неспровокованого нападу має бути індивідуалізованим, враховуючи співвідношення ризиків і користі для конкретного пацієнта. Наприклад, ранній початок терапії є важливим для осіб, чия професійна діяльність пов'язана з водінням транспорту, тоді як у жінок, які планують вагітність, лікування може бути відтерміноване [4].

Фармакотерапія епілепсії спрямована на досягнення повної ремісії судом без розвитку значущих побічних ефектів. Прогноз досягнення такого результату вищий у пацієнтів із генералізованою епілепсією (64%–82%) порівняно з тими, хто має фокальні форми захворювання (25%–70%) [4]. Повторні судоми асоціюються зі збільшенням частоти травматичних ушкоджень у 28%–40% випадків, а також зі зростанням ризику смерті у 1,6–9,3 рази порівняно із загальною популяцією протягом перших двох років після встановлення діагнозу [4]. Основними причинами смертності серед таких пацієнтів є утоплення, епілептичний статус, самогубство та раптова

несподівана смерть при епілепсії (SUDEP - Sudden Unexpected Death in Epilepsy). SUDEP визначається як нетравматична смерть, не пов'язана з утопленням, без токсикологічних або анатомічних причин, встановлених під час розтину. Показник SUDEP становить близько 0,35 випадків на 1000 людино-років серед пацієнтів із нещодавно діагностованою епілепсією, збільшуючись до 1–6 на 1000 людино-років при хронічній епілепсії і до 6–9 на 1000 людино-років при фармакорезистентних формах захворювання [12].

Вибір протисудомного препарату залежить від точного визначення типу нападів і епілептичного синдрому [4]. Лікування слід розпочинати з монотерапії, використовуючи найнижчі ефективні дози з поступовим титруванням до середніх або оптимальних значень для мінімізації побічних ефектів. Якщо судомии не контролюються або розвиваються значущі побічні реакції, дозу препарату слід коригувати або змінювати схему терапії шляхом переходу на інший антиконвульсант із поступовим виведенням першого препарату. При необхідності швидкого досягнення терапевтичної концентрації препарату в крові (наприклад, при кластерних судамах) можливе використання внутрішньовенного введення [13].

У разі неефективності монотерапії двома відповідними препаратами у належних дозах діагностується фармакорезистентна епілепсія, що вимагає розгляду комбінованої терапії. Концентрацію антиконвульсантів у сироватці крові можна вимірювати для всіх препаратів, однак рутинний моніторинг традиційно застосовується для препаратів першого покоління, таких як фенобарбітал, примідон, фенітоїн, карбамазепін, вальпроєва кислота та етосуксимід, а також деяких препаратів нового покоління, наприклад, ламотриджину. Проте нині рівень антиконвульсантів у крові рекомендується визначати переважно для моніторингу прихильності до лікування, дослідження причин побічних ефектів та адаптації дози у спеціальних клінічних ситуаціях, таких як вагітність, печінкова або ниркова недостатність [14].

Серед основних протисудомних засобів першого покоління фенітоїн, карбамазепін та вальпроєва кислота ефективні проти фокальних та генералізованих тоніко-клонічних (ГТК) нападів, тоді як етосуксимід показаний при абсанс-нападах. Вони діють переважно шляхом блокади натрієвих каналів або кальцієвих каналів Т-типу, а також впливають на ферментативні системи CYP450 [4]. Препарати другого покоління, такі як габапентин, ламотриджин, топірамат, леветирацетам, окскарбазепін і зонісамід, мають ширший спектр дії та різноманітні механізми впливу, зокрема блокаду натрієвих або кальцієвих каналів, модулювання активності ГАМК або взаємодію з синаптичними білками. Препарати третього покоління, включно з лакосамідом та еслікарбазепіном, забезпечують нові підходи до модуляції натрієвих каналів шляхом уповільненої інактивації, що відкриває перспективи для лікування фармакорезистентних форм епілепсії [4].

Таким чином, епілепсія залишається суттєвою медико-соціальною проблемою, що потребує індивідуалізованого підходу до діагностики, лікування та довготривалої підтримки пацієнтів.

1.2. Характеристика метаболізму лікарських засобів у печінці

1.2.1. Значення ліпофільності в метаболізмі ЛЗ

Печінка є центральним органом у процесах захисту організму від інтоксикацій і метаболізму лікарських засобів. Вона щоденно нейтралізує значні кількості ксенобіотиків, що надходять до організму разом із тютюновим димом, токсичними газами, харчовими барвниками, консервантами, дезінфікуючими засобами та лікарськими препаратами. В умовах сучасного суспільства деякі групи лікарських речовин, зокрема седативні та стимулюючі засоби, із суто терапевтичних агентів перетворилися на масові продукти споживання, подібні до харчових речовин,

що підсилює їх значення як факторів впливу на біохімічні процеси в організмі людини [15].

Більшість лікарських засобів є ліпофільними сполуками, що забезпечує їхню здатність проникати через клітинні мембрани. Проте саме ліпофільність зумовлює повільне виведення таких речовин нирками у незмінній формі, а їх накопичення при регулярному надходженні може досягати токсичних концентрацій. Завдяки функціонуванню ферментативних систем печінки ліпофільні молекули зазнають біотрансформації, в результаті чого перетворюються на гідрофільні метаболіти, які легше виводяться із організму (рис. 1.1) [15]. Ступінь затримки лікарських засобів в організмі залежить від співвідношення їх розчинності у ліпідах та воді: чим вища ліпофільність сполуки, тим більше вона затримується в тканинах, тоді як підвищена гідрофільність сприяє ефективному виведенню через нирки [15].

Таким чином, печінка виконує критичну роль у підтримці гомеостазу, перетворюючи жиророзчинні речовини на полярні метаболіти.

1.2.2 Фази метаболічних перетворень лікарських засобів

Метаболізм лікарських засобів у печінці відбувається у три послідовні фази: модифікації, кон'югації та екскреції. У фазі I основними реакціями є окиснення, відновлення, гідроліз, циклізація та дециклізація, які змінюють хімічну структуру молекул, підвищуючи їхню полярність і полегшуючи подальше виведення [16]. Фаза I також може включати біоактивацію проліків, перетворюючи їх у фармакологічно активні форми. Наприклад, діазепам метаболізується до десметилдіазепаму та оксазепаму, що зберігають подібну фармакологічну активність [16,17]. Основним

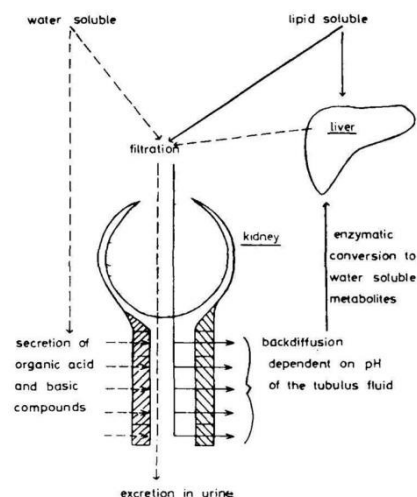


Figure 1. Elimination of drugs.

Рис. 1.1 Схема елімінації ЛЗ в організмі людини

ферментативним комплексом, що каталізує більшість цих перетворень, є система цитохрому P450, також відома як мікросомальна змішана функціональна оксидаза.

Фаза II метаболізму полягає у кон'югації лікарських засобів або їх метаболітів із полярними молекулами, такими як сульфати, глюкуроніди або глутатіон. Ці реакції, що включають метилювання, ацетилювання, сульфатування та глюкуронідацію, сприяють значному підвищенню водорозчинності речовин і зазвичай призводять до втрати їх фармакологічної активності [17,18]. Прикладом є глюкуронідування оксазепаму, після чого препарат втрачає фізіологічну активність і виводиться із організму без подальших змін.

Фаза III метаболізму передбачає транспортування кон'югованих метаболітів через клітинні мембрани для їх екскреції. Цей процес залежить від ефективності ферментативних систем перших двох фаз та функціонування спеціалізованих транспортерів лікарських засобів [15]. Серед основних учасників цього етапу слід зазначити білкові транспортери, що забезпечують перенесення великих або заряджених молекул у гепатоцити та їх секрецію з жовчю [18].

Таким чином, печінка є провідним органом метаболізму ксенобіотиків, забезпечуючи їх детоксикацію через складну багатofазну систему ферментативних і транспортних механізмів. Функціональний стан печінки істотно впливає на тривалість, інтенсивність та безпечність фармакотерапії, визначаючи фармакокінетичні характеристики лікарських засобів і рівень їх ефективності в клінічній практиці.

1.2.3. Ферментні системи печінки як ключові учасники біотрансформації препаратів

Біотрансформація лікарських засобів у печінці є багатоступеневим процесом, що включає ферментативні реакції різних типів. На першій фазі метаболізму основними каталітичними агентами виступають ферменти

надродини цитохромів P450 (CYP450), які забезпечують окислювальні, відновлювальні та гідролітичні перетворення субстратів, готуючи їх до подальших етапів метаболічної обробки [18]. На другій фазі лікарські засоби або їхні первинні метаболіти зазнають реакцій кон'югації з гідروفільними ендogenousними сполуками під дією ферментів-трансфераз, серед яких основне місце займають уридин-дифосфат-глюкуронозилтрансферази (UGTs), сульфотрансферази (SULTs), N-ацетилтрансферази (NATs), глутатіон-S-трансферази (GSTs), тіопурин-S-метилтрансферази (TPMTs) та катехол-O-метилтрансферази (COMTs).[18]

Окрім ферментативних систем, важливу роль у фармакокінетиці лікарських речовин відіграють транспортні білки. Білки родини ABC (ATP-binding cassette transporters) забезпечують ефлюкс лікарських речовин із клітини, тоді як переносники родини SLC (solute carrier transporters) здійснюють аптейк та транспортування розчинених сполук через клітинні мембрани, часто за механізмом спряженого транспорту.

Аналіз, проведений в Університеті Род-Айленду на основі 249 препаратів, схвалених FDA у період 2005–2016 років, продемонстрував, що 54% лікарських засобів метаболізуються за участю цитохромів P450, 40% — UGT, а 10% — CESs [19]. З огляду на ці дані, подальший виклад акцентується на характеристиці трьох ключових ферментних систем: CYP450, UGTs та CESs.

Цитохроми P450 (CYP450) є переважно печінковими ферментами, що каталізують окиснення й відновлення лікарських речовин у ході реакцій першої фази метаболізму. Їхня функціональна активність пов'язана із залізовмісним гемом, що забезпечує поглинання світла при довжині хвилі 450 нм у присутності чадного газу [18]. Розроблена у 1980-х роках система номенклатури CYP450, запропонована Nebert, нині налічує понад 115 генів і псевдогенів у людини, що відображає генетичну різноманітність ферментів і пояснює індивідуальні варіації у метаболізмі препаратів [18].

Ферменти CYP450 присутні в багатьох тканинах, зокрема печінці, кишечнику, нирках, легенях і мозку, проте найвищу активність у метаболізмі препаратів демонструють саме печінкові та кишкові ізоформи. У печінці найпоширенішим є CYP3A4 (22,1% загального вмісту CYP450), далі йдуть CYP2E1 (15,3%) і CYP2C9 (14,6%) [18]. CYP450 каталізують різноманітні реакції, серед яких основною є окиснення. Ця реакція може бути описана рівнянням:



де RH — субстрат, ROH — продукт окиснення.

Активність CYP450 може змінюватися під дією різних лікарських засобів. Індуктори, такі як рифампіцин і фенobarбітал, підвищують активність CYP450, пришвидшуючи метаболізм препаратів і знижуючи їх ефективність. Наприклад, індукція CYP3A4 збільшує метаболізм такролімусу, циклоспорину та сиролімусу. Натомість інгібітори, зокрема азольні протигрибкові засоби та інгібітори протеази ВІЛ, зменшують активність ферментів, що може призводити до підвищення концентрації препаратів у крові і ризику токсичних ефектів [18].

Другою важливою системою є UGT, яка каталізує кон'югацію субстратів із глюкуроновою кислотою, забезпечуючи водорозчинність і виведення лікарських речовин [18]. Процес починається із синтезу уридиндифосфат-глюкуронової кислоти (UDPGA), що транспортується у внутрішній простір ендоплазматичного ретикулума, де ферменти UGT здійснюють кон'югацію субстратів шляхом нуклеофільної атаки.

Ферменти UGT належать до надродини білків із молекулярною масою 50–60 кДа, мають каталітичний і мембранозв'язуючий домени та поділяються на чотири родини: UGT1, UGT2 (із підродинами UGT2A і UGT2B), UGT3 та UGT8. Найбільш експресованими є ферменти UGT1A1, відповідальний за метаболізм білірубину, та UGT2B7, що метаболізує опіоїди [18]. Локалізовані переважно у печінці та кишечнику, UGT-ферменти можуть

бути індуковані або інгібовані певними лікарськими засобами, що змінює швидкість біотрансформації препаратів.

Ще однією критично важливою групою ферментів у біотрансформації є карбоксилестерази (CES), представники суперсімейства серинових гідролаз [18]. Вони каталізують гідроліз естерів, тіоестерів, амідів і карбаматів, перетворюючи їх на більш полярні сполуки. Серед трьох основних карбоксилестераз найбільш дослідженими є CES1 та CES2, що беруть участь у метаболізмі численних лікарських засобів, таких як осельтамівір, клопідогрель, іринотекан та капецитабін [20].

Карбоксилестерази мають характерну будову α/β -гідролаз і здійснюють каталітичні реакції за допомогою тріади Ser-His-Glu. Їхня каталітична активність включає стадії утворення ацил-ферментного комплексу і наступного гідролізу. Особливої уваги заслуговує здатність CES1 до трансестерифікації в присутності етанолу, що має клінічне значення, наприклад, при утворенні токсичного метаболіту кокаєтилену у людей, які вживають кокаїн разом із алкоголем.[18]

Інгібування CES може мати серйозні фармакокінетичні наслідки. Наприклад, пригнічення CES2 зменшує побічні ефекти іринотекану, підвищуючи його терапевтичну ефективність [20]. Окрім біотрансформації лікарських засобів, CES також активно залучені у метаболізм ендогенних ліпідів, регулюючи рівень триацилгліцеридів та холестеринових естерів у печінці та жировій тканині [18,21]. Виявлено, що експресія CES1 зростає при ожирінні та діабеті 2 типу, що відкриває нові перспективи у розробці терапевтичних стратегій для лікування метаболічних захворювань.

Таким чином, ферментні системи печінки, зокрема цитохроми P450, уридин-дифосфат-глюкуронозилтрансферази та карбоксилестерази, є ключовими детермінантами фармакокінетичних властивостей лікарських засобів, визначаючи їхню ефективність, безпечність та тривалість дії.

1.3. Мікросоми печінки людини (HLM) у дослідженні метаболічної стабільності та шляхів біотрансформації сполук

До початку ХХІ століття фармакокінетичні проблеми становили близько 40% усіх невдач при розробці лікарських засобів [18]. Для подолання цієї проблеми були створені високопродуктивні *in vitro* тести, зокрема аналіз метаболічної стабільності, що дозволяють оцінювати фармакокінетичні властивості сполук на ранніх етапах створення препаратів [22]. Гепатична метаболічна стабільність є ключовою характеристикою, яка впливає як на біодоступність лікарських засобів при пероральному прийомі, так і на їхнє виведення з організму. Кліренс (CL) визначається як об'єм плазми або крові, очищеної від препарату за одиницю часу, і є основним параметром прогнозування фармакокінетики у людини на основі *in vitro* досліджень та експериментів на тваринах. [23]

Підходи до прогнозування кліренсу у людини поділяються на алометричні методи та фізіологічно обґрунтовані фармакокінетичні моделі (PBPK). Алометричні методи особливо ефективні для оцінки ниркового кліренсу (CL_r), оскільки клубочкова фільтрація добре корелює з масою або площею поверхні тіла. Для прогнозування печінкового кліренсу (CL_H) зазвичай застосовують PBPK-моделі на основі *in vitro* даних, хоча алометричні підходи також використовуються. Завдяки розвитку методів *in vitro* прогнозування CL_H стало можливим узгоджено екстраполювати результати від клітин печінки чи мікросом до людини середньої маси тіла (60–70 кг) [23].

Для визначення внутрішнього кліренсу (CL_{int}) у лабораторних умовах використовують три основні матеріали: гепатоцити людини, мікросоми печінки людини (HLM) та рекомбінантні CYP-ферменти (rhCYP). Оцінка проводиться шляхом вимірювання зниження концентрації субстрату або збільшення концентрації метаболітів [23]. Одним із найпоширеніших *in vitro*

тестів є аналіз стабільності за допомогою HLM, результати якого дозволяють ранжувати сполуки за потенціалом подальшої розробки.

Мікросоми печінки являють собою везикули ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів, де локалізовані ферменти I фази метаболізму, включаючи родину цитохромів P450 (CYP) [22]. Визначення ферментів, що беруть участь у метаболізмі, встановлення місць біотрансформації, ідентифікація метаболітів і оцінка швидкості реакцій є важливими аспектами досліджень. *In vitro* методи та обчислювальні моделі, спрямовані на прогнозування метаболізму, а також встановлення взаємозв'язку між структурою молекул та їх метаболічною активністю, відіграють критичну роль у передбаченні можливих взаємодій та токсичності лікарських засобів [22].

HLM є субклітинною фракцією печінки, одержаною за допомогою диференційного високошвидкісного центрифугування. Вони містять ферменти CYP, FMO, карбоксилестерази, епоксид-гідролази та UGT, що робить їх важливою моделлю для оцінки печінкового метаболізму [24]. Інтеріндивідуальні варіації активності ферментів у HLM можуть бути зменшені шляхом об'єднання мікросом від кількох донорів. Крім печінкових мікросом, для дослідження позапечінкового метаболізму також використовуються мікросоми кишечника, нирок та легень [24].

HLM застосовуються у дослідженнях ідентифікації та профілювання метаболітів, оцінки міжвидових відмінностей, прогнозування *in vivo* кліренсу, фенотипування реакцій і визначення метаболічних шляхів [24]. При вивченні активності ферментів до системи інкубації додаються NADPH або система регенерації NADPH, а для оцінки активності UGT — UDPGA та аламетицин. Основними перевагами HLM є доступність, простота застосування, зручність зберігання та придатність для високопродуктивного скринінгу. Проте вони не охоплюють всі шляхи метаболізму через

відсутність ферментів, таких як NAT, GST та SULT, що обмежує аналіз конкурентного метаболізму [24].

Для *in vitro* досліджень рекомендують використовувати концентрацію препарату у діапазоні 1–10 мМ. Перевагу надають низьким концентраціям, щоб забезпечити реакцію за кінетикою першого порядку та мінімізувати вплив органічних розчинників на активність ферментів. Контрольні групи повинні виключати субстрат, мікросоми або NADPH. Реакцію зупиняють додаванням охолодженого ацетонітрилу або метанолу, а інкубацію проводять за температури 37°C протягом менше ніж 2 годин [24].

Органічні розчинники, такі як ДМСО, метанол, етанол і ацетонітрил, можуть інгібувати активність CYP, тому їх концентрація повинна бути мінімальною (<1% для метанолу та ацетонітрилу, <0,2% для ДМСО).

Метаболічна стабільність є визначальним параметром для оцінки схильності лікарського засобу до біотрансформації. Вона визначається за рівнем зникнення субстрату у *in vitro* системі протягом певного часу і має пряме значення для прогнозування біодоступності та періоду напіврозпаду лікарського засобу [25]. Рисунок 2 показує різні етапи дослідження метаболічної стабільності. [24]

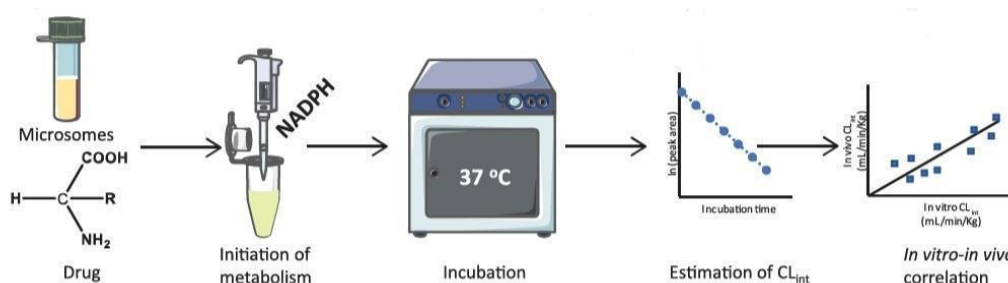


Рис. 1.2 Схема оцінки метаболічної стабільності сполуки *in vitro*: інкубація з мікросомами у фосфатному буфері (pH 7,4), додавання NADPH, інкубація при 37°C, відбір проб у часові точки, аналітичне визначення концентрації, побудова графіка $\ln(\text{залишку})$ для розрахунку швидкості елімінації та внутрішнього кліренсу.

1.4. Вплив функціонального стану печінки на тривалість та інтенсивність дії препаратів.

Функціональний стан печінки відіграє ключову роль у метаболізмі як ендогенних сполук, так і лікарських засобів. При ураженні печінки відбуваються істотні зміни у фармакокінетиці препаратів, що зумовлено зниженням печінкового кровотоку, порушенням експресії ферментів метаболізму, змінами у доступності кофакторів та зменшенням здатності препаратів зв'язуватися з білками плазми. [27]

Патологічні процеси в печінці, такі як неалкогольний стеатогепатит (NASH), цироз або холестаз, істотно змінюють активність ферментів, відповідальних за біотрансформацію лікарських засобів. Зокрема, при NASH концентрація мідазоламу у плазмі крові пацієнтів зростає більш ніж удвічі порівняно зі здоровими особами, що свідчить про зниження активності печінкового метаболізму. Крім того, при стеатозі зафіксовано понад 50% зниження рівня 4 β -гідроксихолестеролу — ендогенного біомаркера активності CYP3A4 [26]. Аналогічно, при цирозі печінки істотно знижується кліренс лікарських засобів, особливо тих, які метаболізуються виключно у печінці. Наприклад, у пацієнтів із печінковою недостатністю відзначено значне зниження кліренсу вориконазолу, що потребує корекції дозування для запобігання токсичним ефектам. [27]

Різні форми ураження печінки по-різному впливають на активність основних ферментів метаболізму. Цироз асоціюється зі зниженням активності ферментів CYP2E1, CYP2C9, CYP3A, CYP1A2 та уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераз (UGTs), що змінює метаболізм такролімусу, сиролімусу, циклоспорину, мідазоламу та діазепаму. Гепатит переважно пригнічує активність CYP2E1, CYP3A та CYP2C19, впливаючи на фармакокінетику омепразолу, фенітоїну та лансопразолу. При NASH зниження активності CYP2E1, CYP3A, UGTs та сульфотрансфераз (SULTs) змінює метаболізм мідазоламу, циклоспорину та дакарбазину. Холестаз

також впливає на активність CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 та UGTs, що позначається на кліренсі ацетамінофену, кофеїну, верапамілу та інших препаратів [27].

Порушення функції печінки супроводжується характерними змінами лабораторних показників, що дає змогу орієнтуватися у типі ураження органа. Підвищення рівнів аспартат-амінотрансферази (AST) і аланінамінотрансферази (ALT) є ознакою гепатоцелюлярного ушкодження, яке може бути зумовлене вірусним гепатитом, аутоіммунними захворюваннями або токсичним ураженням печінки. Підвищення активності лужної фосфатази (ALP) та γ -глутамілтрансферази (GGT) свідчить про холестаз, що виникає при жовчнокам'яній хворобі, новоутвореннях або на тлі прийому певних лікарських засобів, таких як антибіотики, анаболічні стероїди чи оральні контрацептиви. Змішані зміни біохімічних показників зазвичай спостерігаються при сепсисі, алкоголізмі, застійній серцевій недостатності або деяких лікарських реакціях. Ізольоване підвищення некон'югованого білірубіну характерне для синдрому Жильбера або гемолітичних станів. [27]

Порушення фармакокінетики при захворюваннях печінки охоплює всі етапи руху лікарських засобів в організмі. Абсорбція препаратів може змінюватися через порушення моторики шлунково-кишкового тракту, що призводить до уповільнення або, навпаки, прискорення шлункового випорожнення, а також через розвиток діареї. Об'єм розподілу препаратів зростає внаслідок затримки рідини в організмі при печінковій недостатності, що особливо впливає на лікарські засоби, які зазвичай залишаються в плазмі. Гіпоальбумінемія знижує зв'язування препаратів із білками, збільшуючи частку вільної активної форми лікарських засобів, що зумовлює необхідність корекції їхнього дозування, як це спостерігається для фенітоїну, бензодіазепінів, аспіріну та варфарину. [27]

Порушення метаболізму і виведення лікарських засобів пов'язане зі змінами кровопостачання печінки, зокрема розвитком портосистемних шунтів при цирозі. Це призводить до зниження ефективності першого проходження через печінку і підвищення біодоступності препаратів, таких як морфін і фентаніл, з подальшим ризиком їхньої кумуляції. Відповідно до їхньої залежності від печінкового кровотоку, лікарські засоби поділяють на препарати з високим коефіцієнтом екстракції ($>0,7$), для яких печінковий кліренс прямо залежить від кровотоку (наприклад, морфін, фентаніл), та препарати з низьким коефіцієнтом екстракції ($<0,3$), метаболізм яких обмежений активністю ферментів (наприклад, діазепам, метадон).[27]

Корекція дозування лікарських засобів при захворюваннях печінки є складним завданням, оскільки на відміну від ниркової недостатності, немає універсального показника для оцінки ступеня печінкової дисфункції. Для цього застосовуються біохімічні маркери (рівні AST, ALT, альбуміну), міжнародне нормалізоване відношення (INR) та спеціальні клінічні шкали, такі як Child-Pugh і MELD. Зміни фармакокінетики вимагають індивідуального підходу до корекції дози, частоти введення або вибору альтернативного препарату. Зокрема, для седативних засобів, таких як бензодіазепіни, рекомендується зниження початкової та підтримуючої дози з метою уникнення їхньої акумуляції та розвитку токсичних ефектів. [27,28]

Таким чином, розуміння змін фармакокінетики лікарських засобів при ураженні печінки є критично важливим для безпечного та ефективного призначення терапії. Особливу увагу слід приділяти також ризикам розвитку гепатотоксичності лікарських засобів, що потребує подальшого розгляду аспектів її прогнозування та оцінки.

1.5. Гепатотоксичність: механізми, прогнозування та оцінка

Гепатотоксичність є однією з основних причин припинення розробки лікарських засобів та відкликання препаратів з ринку. Традиційно для її

оцінки використовували моделі *in vivo*, проте складність, вартість, етичні міркування щодо використання тварин, а також невисока прогностична цінність таких досліджень для людини зумовили активний розвиток альтернативних *in vitro* методів. Моделі, засновані на культурах клітин печінки, дозволяють не лише скоротити кількість тварин у дослідженнях, зменшити витрати й час тестування, але й забезпечують високу пропускну здатність і глибше розуміння механізмів токсичності [29].

У дослідженнях фармакокінетики та токсичності лікарських засобів *in vitro* широко застосовуються різноманітні культури печінкових клітин. Основними моделями для оцінки гепатотоксичності є гепатоцити людини, клітинні лінії, похідні від пухлин печінки, а також тривимірні системи культивування.[29]

Серед традиційних *in vitro* моделей печінки історично використовували скибки печінкової тканини, ізольовані мікросоми, перфузовану печінку, іморталізовані клітинні лінії та первинні гепатоцити. Скибки печінки мають певні переваги: вони зберігають клітинну архітектуру органу, демонструють відповідність між *in vitro* та *in vivo* метаболізмом ксенобіотиків, а також підтримують зональну активність цитохромів і механізми токсичності протягом перших 20–96 годин культивування [82]. Тим не менш, поступове зниження функціональності ферментів другого етапу метаболізму та продукції альбуміну обмежує їх довгострокове застосування. [29]

Суспензії первинних гепатоцитів, отримані за допомогою колагеназного розщеплення, зберігають високу метаболічну активність у короткострокових дослідженнях і краще корелюють з *in vivo* токсичністю, ніж клітинні лінії. Однак руйнування клітинних зв'язків і стрес, спричинений ізоляцією, призводять до втрати полярності, пошкодження ферментів цитохрому та зниження життєздатності вже через кілька годин після ізоляції [29].

Іморталізовані клітинні лінії печінки, такі як HepG2, Hep3B, Huh7 і HepaRG, набули широкого застосування завдяки доступності, легкості у використанні й стабільності характеристик протягом тривалого часу. У різноманітних дослідженнях метаболізму лікарських засобів і гепатотоксичності *in vitro* використовувалися кілька людських і гризунових гепатомних клітинних ліній (Таблиця 1.1) [30]. Більшість із них демонструють низьку експресію основних цитохромів P450 (CYP), характерних для печінки людини (тобто низький рівень ферментів і відносно висока експресія форм, нехарактерних для печінки, таких як CYP1A1). Подібним чином, експресія ферментів II фази кон'югації, таких як N-ацетилтрансфераза або ізоформи глутатіон-S-трансферази (GST), у гепатомних клітинах більше відповідає позапечінковому, ніж печінковому профілю [29]. Це важливо враховувати при інтерпретації результатів експериментів, оскільки обмеження метаболічної активності може впливати на точність моделювання процесів біотрансформації лікарських засобів.

Таблиця 1.1

Гепатомні клітинні лінії людини та гризунів у дослідженнях метаболізму лікарських засобів та гепатотоксичності

Клітинна лінія	Характеристики	Застосування у дослідженнях метаболізму лікарських засобів/токсичності
HepG2	Високий рівень експресії CYP1A1 (мРНК) Низька експресія інших CYP (мРНК, активність) Вимірювані рівні GST, UGT і SULT (мРНК, активність) Індукція через рецептор AhR	Індукція CYP1A1 Біоактивація через CYP1A1 Оцінка ризику токсичності небіоактивованих сполук Часто використовуються

	Високий рівень НАДФН-цитохром Р450 редуктази і цитохрому b5 Експресія багатьох диференційованих функцій печінки	як клітини-хазяїни для експресії cDNA CYP за допомогою вірусів вакцини або аденовірусних векторів
Mz-Нер-1	Базальні активності CYP зазвичай відсутні Індукція активності CYP1A1 ароматичними вуглеводнями Індукція CYP1A1 через AhR	Індукція CYP1A1
Нер3В	Експресія CYP1A1 (мРНК, активність) Низькі рівні інших CYP та ферментів II фази печінки (мРНК, активність)	Індукція CYP1A1 Дослідження гепатотоксичності, не пов'язаної з метаболізмом
Fa2N4	Низька експресія більшості печінкових CYP і ферментів II фази (мРНК, активність) Індукція CYP1A2, CYP2C9 і CYP3A4 (мРНК, активність), без індукції CYP2B6	Високопродуктивна оцінка індукції ферментів CYP (CYP1A2, CYP2C9, CYP3A)
HuH7	Експресія CYP1A1 (мРНК) Низька експресія інших CYP (мРНК, активність) Підвищення рівня CYP3A4 (мРНК, активність) у щільних культурах Вимірювана, але низька експресія GST, SULT і UGT (мРНК, активність)	Потенційне використання для досліджень метаболізму, залежного від CYP3A4 (у щільних культурах) Дослідження гепатотоксичності небіоактивованих сполук

BC2 (4-тижневі культури)	Спонтанна диференціація у щільних культурах Вимірювана, але низька активність кількох CYP і ферментів II фази (GST і UGT)	Індукція CYP1A1/2, CYP2B6 і CYP3A4 (активність)
НераRG (диференційовані)	Диференціація у щільних культурах за допомогою ДМСО Висока експресія (вища за гепатоцити людини) CYP1A1, CYP3A4 і GSTA1 (мРНК та/або активність) Експресія CYP2C9, CYP2C19 і SULT2A1 (мРНК, активність), подібна до гепатоцитів людини Низька експресія інших CYP і UGT2B7 (мРНК)	Дослідження метаболізму лікарських засобів Дослідження індукції ферментів CYP (переважно CYP1A2 та CYP3A4) Дослідження гепатотоксичності небіоактивованих сполук Довгострокові (4 тижні) дослідження гепатотоксичності
Н4ІІЕ (щур)	Експресія базових та індукованих рівнів CYP1A (мРНК, білок, активність) Індукція CYP1A1 через AhR Низька експресія інших CYP (мРНК, активність) Активність GST	Дослідження індукції CYP1A Дослідження токсичності, не пов'язаної з метаболізмом Часто використовуються як клітини-хазяїни для експресії cDNA CYP за допомогою аденовірусних векторів

Фао (щур)	Експресія (білок, мРНК, активність) базових та індукованих рівнів ферментів CYP1A Низька експресія ферментів CYP2B (мРНК, активність) Вимірювана активність GST	Дослідження індукції CYP1A Дослідження токсичності, не пов'язаної з метаболізмом
Нера 1c1c7 (миша)	Базальна та індукована експресія CYP1A1/2 (активність) Вимірювана активність GST	Дослідження індукції CYP1A Дослідження гепатотоксичності, не пов'язаної з метаболізмом

Серед гепатомних клітинних ліній однією з найпоширеніших є НерG2, створена у 1970-х роках із гепатобластоми людини. НерG2 експресує багато генів, характерних для печінки, однак профіль експресії ферментів фаз I та II може варіюватися між пасажами, що ускладнює міжлабораторну порівняльність даних [29]. Незважаючи на обмеження у метаболічній активності, ця лінія залишається цінною моделлю для дослідження гепатотоксичності, зокрема у вивченні індукції CYP1A1 через рецептор арилвуглеводнів (AhR) та біоактивації канцерогенів, таких як поліциклічні ароматичні вуглеводні [30]. Як і більшість інших гепатомних клітинних ліній, НерG2 має обмежену експресію основних печінкових цитохромів P450 (наприклад, CYP3A4, CYP2C9) і водночас високу експресію CYP1A1 та ферментів другого етапу метаболізму (GST), що наближає її профіль до позапечінкових тканин [29].

Інші гепатомні клітинні лінії, такі як Нер3В, Нuh7, Fa2N-4 і НBG, демонструють подібні обмеження та застосовуються переважно для скринінгу базової токсичності або вивчення індукції окремих ферментів [29,30].

Останні досягнення у сфері клітинних технологій привели до розробки тривимірних (3D) культур гепатоцитів, ко-культур різних клітин печінки та біоартифіціальних систем. Зокрема, 3D-культури, такі як сфероїди гепатоцитів, забезпечують краще збереження полярності клітин, стабільну експресію ферментів метаболізму та тривалішу життєздатність у порівнянні з традиційними 2D-культурами. Показано, що у сфероїдах експресія ферментів Cyp1a2, Cyp1a1, Cyp2b9 і Cyp2b10 залишається стабільною протягом кількох днів, тоді як у 2D-культурах вона різко знижується [29].

Мікрооточення гепатоцитів *in vivo*, включаючи міжклітинні взаємодії, подачу кисню та присутність позаклітинного матриксу, відіграє критичну роль у підтримці нормальної функціональності печінкових клітин. Відтворення цих умов у 3D-культурах дозволяє краще імітувати фізіологічне середовище печінки, що особливо важливо для виявлення тонких механізмів токсичності.[29]

Таким чином, незважаючи на обмеження щодо функціональної активності певних ферментів, іморталізовані клітинні лінії, зокрема HepG2, залишаються корисним інструментом для первинного скринінгу гепатотоксичності та дослідження механізмів ушкодження печінки на клітинному рівні. Їхнє застосування, особливо у поєднанні з удосконаленими 3D-культурами та біоінженерними підходами, дозволяє підвищити прогностичну точність *in vitro* моделей і сприяє розвитку альтернативних методів оцінки токсичності без використання тварин.

Висновки до розділу 1

1. Проведено аналіз сучасних наукових даних щодо епілепсії, її етіології, патогенезу та стратегій медикаментозної терапії, з акцентом на обмеження ефективності існуючих протисудомних препаратів.
2. Узагальнено механізми біотрансформації лікарських засобів у печінці, зокрема фазові реакції метаболізму, функції ферментних систем CYP, UGT та CES та їх вплив на фармакокінетичний профіль сполук.

3. Розглянуто особливості застосування мікросомальної фракції печінки людини як інструменту для оцінки метаболічної стабільності та шляхів біотрансформації перспективних кандидатів на роль лікарських засобів.
4. Проаналізовано сучасні підходи до оцінки гепатотоксичності *in vitro* із використанням клітинної лінії HepG2, а також наведено порівняльну характеристику її метаболічної активності та релевантності для токсикологічного скринінгу.

РОЗДІЛ 2

ДИЗАЙН ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТУ

2.1. Характеристика об'єкту дослідження

У рамках досліджень, проведених на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету, було синтезовано нову біологічно активну сполуку - N-[(2,4-дихлорфеніл)метил]-2-(2,4-діоксо-1H-хіназолін-3-іл)ацетамід, яка отримала умовне позначення MaIO 168 (Рис. 2.1). Структурно сполука належить до класу похідних 2,4-діоксохіназолінів, що привертає увагу завдяки потенціалу до прояву нейротропної активності.

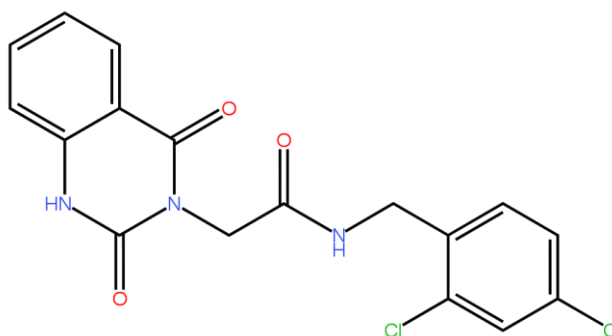


Рис. 2.1. Структурна формула MaIO 168

Комплексні *in vivo* дослідження продемонстрували високий рівень протисудомної активності MaIO 168 на кількох експериментальних моделях. Зокрема, на моделі пентилентетразолових (PTZ) судом сполука MaIO 168 продемонструвала вкрай високу ефективність: вона забезпечувала повний захист піддослідних тварин від летального наслідку, що контрастувало з 91,7% летальності у контрольній групі та 16,7% — у групі, що отримувала натрій вальпроат. За всіма основними показниками протисудомної дії MaIO 168 не поступалася референс-препарату.

Сполука достовірно впливала на ключові характеристики судомного процесу: латентний період до початку нападів було подовжено у 3,52 раза порівняно з контролем, що свідчить про уповільнення розвитку патологічного збудження. Кількість клоніко-тонічних судом на одну тварину

зменшилася до 1,00, тоді як у контрольній групі цей показник становив 3,58. Тяжкість судом, оцінена за бальною шкалою, становила лише 2,8 бала у групі MaЮ 168, що майже удвічі нижче, ніж у контролі (5,83 бала) та співставно з натрієм вальпроатом (2,83 бала).

Окремо варто відзначити вплив сполуки на тривалість судомного нападу: MaЮ 168 забезпечувала її зниження у 26,7 раза порівняно з контролем та у 16,9 раза — відносно референс-препарату, що є свідченням високої ефективності в припиненні або запобіганні генералізації нападів (рис. 2.2).

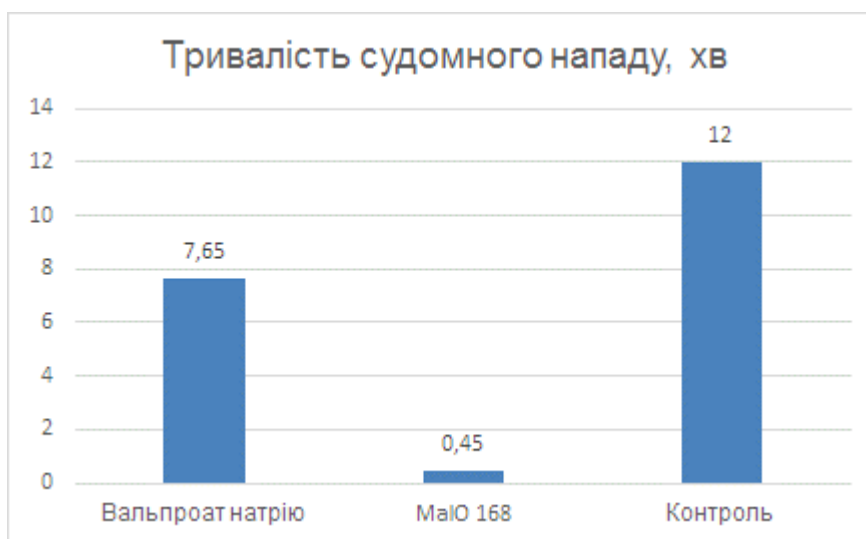


Рис. 2.2. Діаграма тривалості судомного нападу на PTZ-моделі

На моделі пікротоксин-індукованих судом сполука також продемонструвала виражену антиконвульсантну активність із мінімальним рівнем летальності. У дослідженнях на моделі електроіндукованих судом спостерігалась помірна активність, із достовірним скороченням тривалості нападів і тенденцією до зменшення летальності.

Особливої уваги заслуговують результати, отримані на моделях з ураженням різних нейромедіаторних систем (рис. 2.3). Зокрема, на стрихнін-індукованій моделі MaЮ 168 виявила активність, що свідчить про залучення гліцинергічних механізмів, тоді як ефективність на кофеїн-індукованих

судомом вказує на потенційне аденозинергічне залучення. Усі ці дані підтверджують мультитаргетний характер дії сполуки.

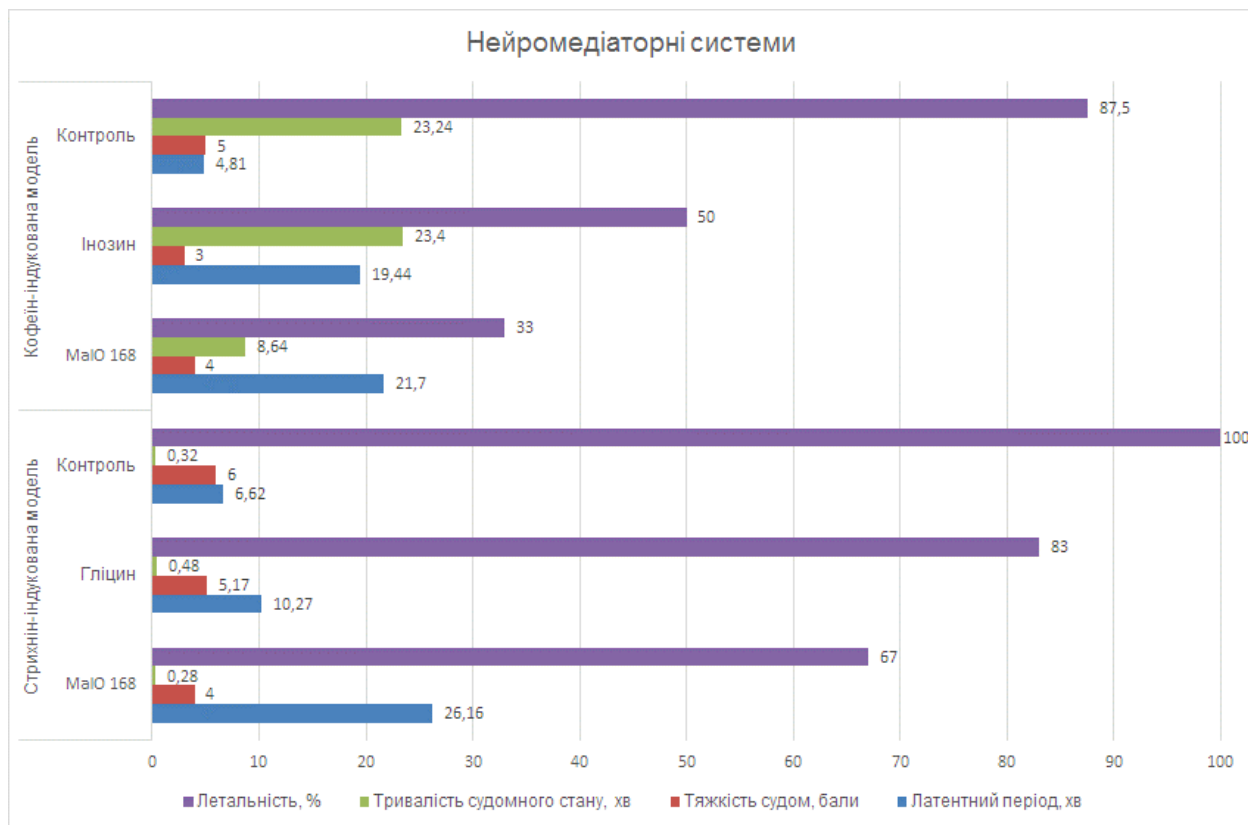


Рис. 2.3. Візуалізація результатів стрихнін- та кофеїн-індукованої моделей

Додатково було встановлено, що MaIO 168 не проявляє нейротоксичності: не порушує координацію рухів, не впливає на м'язовий тонус (за тестом на обертовому стрижні), а також має кращий профіль переносимості, ніж натрій вальпроат. У дослідженні гострої токсичності не вдалося визначити середню летальну дозу (LD_{50}), оскільки навіть за введення максимальної дози (5000 мг/кг) летальних наслідків не зафіксовано. Таким чином, MaIO 168 віднесено до V класу токсичності за класифікацією Hodge та Sterner — як практично нетоксичну речовину.

Загалом, MaIO 168 є перспективною протисудомною сполукою з широким спектром дії, мультимеханістичним підходом до нейромедіаторної регуляції та сприятливим профілем безпеки, що визначає її потенціал для

подальшого фармакологічного дослідження та розробки як препарату з антиепілептичною дією. [31,32]

2.2. Загальна структура дослідження та його етапи

На першому етапі було складено дизайн дослідження, який наведений на рис. 2.4

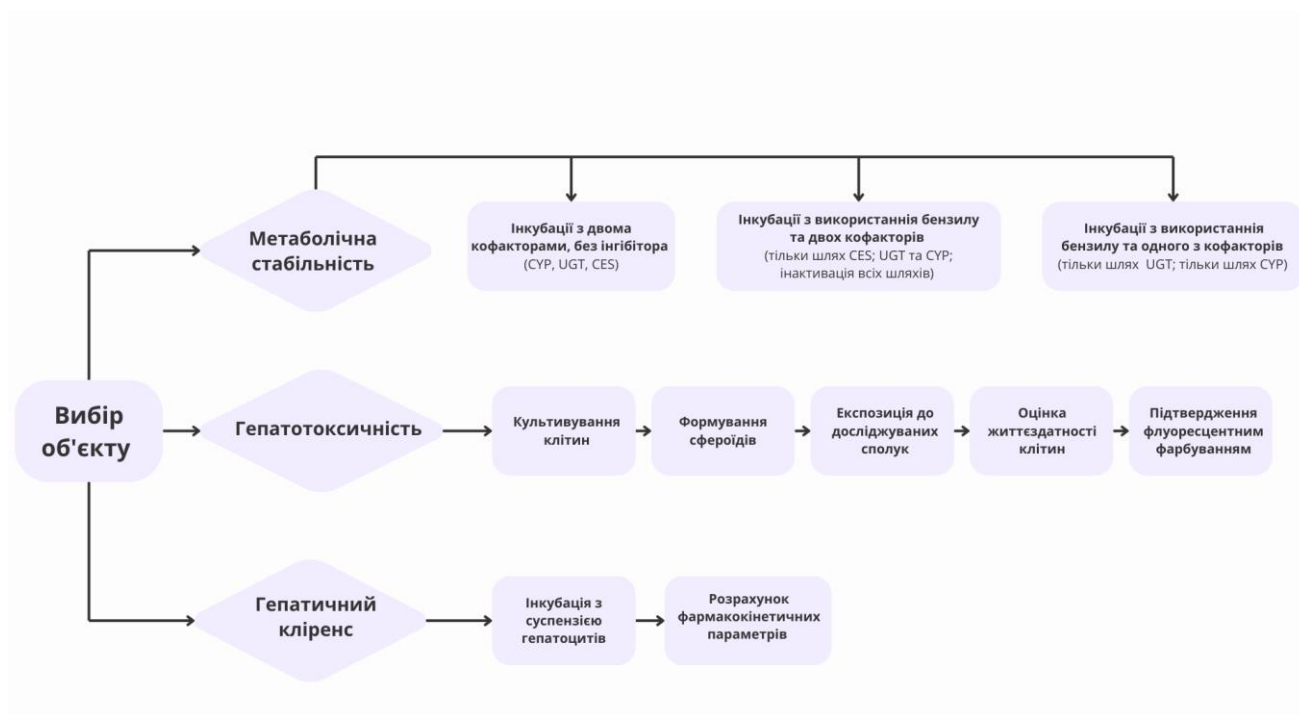


Рис. 2.4. Схематичне зображення етапів дослідження

Дослідження метаболічних шляхів сполуки MaЮ168 проводилося в серії інкубацій з різними комбінаціями кофакторів та інгібіторів ферментів. Основною метою було оцінити вплив ферментативних систем мікросом печінки людини (HLM) на метаболізм досліджуваних сполук, а також визначити роль основних метаболічних шляхів, зокрема гідролізу карбоксилестеразами (CES), глюкуронідації уридин-дифосфат-глюкуронозилтрансферазами (UGT) та окислення цитохромом P450 (CYP).

Етапи експерименту складали 7 циклів, які охарактеризовані нижче.

1. Інкубаційний цикл 1 (з кофакторами, без інгібіторів CES)

Цей етап передбачав інкубацію досліджуваної сполуки у присутності всіх необхідних кофакторів (NADPH та UDPGA) без додавання інгібіторів

CES. У таких умовах активними залишалися всі основні ферментативні системи мікосом (CYP, UGT та CES). Даний цикл слугував референтним для порівняння із подальшими експериментами. Зразки відбирали кожні 30 хв починаючи з 0 до 150 хв.

2. Інкубаційний цикл 2 (повторення інкубаційного циклу 1 із зміненими часовими точками збору зразків)

Для підвищення точності оцінки швидкості метаболічних перетворень та зменшення можливих похибок було проведено повторний експеримент, ідентичний до інкубаційного циклу 1, але зі зміненими часовими інтервалами збору зразків. Перший зразок відбирали через 2 хв після початку реакції, наступний через 10 хв після початку. Подальші зразки до 60 хв відбиралися з проміжком у 10 хв.

3. Інкубаційний цикл 3 (з кофакторами, з 10 мкМ бензилу – інгібітора CES)

Для вибіркового пригнічення активності CES був доданий специфічний інгібітор – бензил (1,2-дифенилетан-1,2-діон), який був визначений як одна з найважливіших хімічних сполук для інгібування CES зі значеннями K_i в наномолярному діапазоні, які демонструють потужні та селективні інгібуючі ефекти щодо CES1 або CES2. Це дозволило оцінити метаболізм сполуки за рахунок лише CYP- та UGT-залежних шляхів, унеможлививлюючи гідроліз CES.

4. Інкубаційний цикл 4 (без кофакторів, з 10 мкМ бензилу)

На цьому етапі досліджувана сполука інкубується без додавання кофакторів NADPH та UDPGA, а також за наявності інгібітора CES. Таким чином, активність основних ферментативних систем (CYP, UGT та CES) була повністю виключена, що дозволяло оцінити можливість спонтанного розпаду або не ензиматичної деградації сполуки.

5. Інкубаційний цикл 5 (без кофакторів, без бензилу)

Новий етап експерименту, спрямований на дослідження виключно CES-опосередкованого метаболізму. Відсутність кофакторів виключала

активність CYP та UGT, тоді як відсутність бензилу дозволяла оцінити роль CES у метаболізмі сполуки.

6. Інкубаційний цикл 6 (з UDPGA та бензилом, без NADPH)

Для оцінки ролі глюкуронідації сполуки інкубація проводилась у присутності UDPGA (кофактора UGT) та бензилу (інгібітора CES), але без NADPH, що виключало активність CYP. Цей цикл дозволяв оцінити можливість прямої глюкуронідації досліджуваної сполуки та порівняти значущість CYP-залежного метаболізму відносно циклів 1 і 2.

7. Інкубаційний цикл 7 (з NADPH та бензилом, без UDPGA)

Цей цикл спрямований на вивчення окислювального метаболізму, що каталізується CYP. Для цього інкубація проводилася у присутності NADPH та бензилу (інгібітора CES), але без UDPGA, що виключало можливість глюкуронідації. Даний цикл дозволяв оцінити важливість CYP-залежного шляху у порівнянні з іншими ферментативними системами.

Оцінка гепатотоксичності сполук MaIO168 проводилася на клітинній лінії HepG2 з використанням тривимірної культури та люмінесцентного аналізу життєздатності клітин. Дослідження включало послідовні етапи: культивування клітин, формування сфероїдів, експозицію до тестованих сполук, оцінку життєздатності клітин та підтвердження результатів флуоресцентним фарбуванням.

Визначення гепатичного кліренсу проводиться представниками університету Гельсинки шляхом інкубації досліджуваних сполук з суспензією гепатоцитів та розрахунки фармакокінетичних показників заснованих на результатах інкубацій. Ці результати використовуються для подальшої валідації фармакокінетичних параметрів; експеримент триває.

2.3. Обґрунтування вибору методів дослідження

Печінка є основним органом метаболізму лікарських засобів в організмі людини, що визначає доцільність використання субклітинних фракцій печінки, зокрема мікросом, для дослідження печінкового кліренсу *in vitro*. Мікросоми легко готуються, можуть зберігатися протягом тривалого часу та містять ключові ферменти фази I (цитохроми P450, флавінмонооксигенази, естерази, амідази, епоксидгідролази) і фази II (UDP-глюкуронозилтрансферази) метаболізму препаратів. Використання мікросомальної фракції HLM дозволяє одночасно досліджувати обидві фази метаболізму, що підвищує інформативність аналізу. Додавання активуючих кофакторів (NADPH для ферментів фази I та UDPGA для ферментів фази II) стимулює активність відповідних шляхів біотрансформації, забезпечуючи ширшу картину метаболічних перетворень порівняно з експериментами із застосуванням лише рекомбінантних ферментів [33,34].

Одним із ключових напрямів дослідження була оцінка гепатотоксичності сполук. Враховуючи, що гепатотоксичність є основною причиною припинення розробки нових препаратів на доклінічних та клінічних етапах, а також відкликання вже зареєстрованих лікарських засобів, було обрано високочутливий підхід для її виявлення. Традиційні *in vitro* методи оцінки токсичності печінки мають низку обмежень, таких як низька специфічність, обмежене число контрольованих параметрів та недостатня чутливість до ранніх стадій ушкодження. У зв'язку із цим перспективним підходом виявився мультипараметричний високопродуктивний скринінг (HCS), що дає змогу одночасно оцінювати вплив сполук на декілька клітинних механізмів, підвищуючи точність та надійність прогнозування гепатотоксичності [28,30].

Вибір клітинної моделі для досліджень відіграє критичну роль. Первинні гепатоцити людини, хоча й вважаються золотим стандартом для оцінки метаболізму та токсичності лікарських засобів, мають обмеження

через низьку доступність, донорську варіабельність, короткий термін зберігання та зниження функціональної активності при культивуванні. Тому альтернативою стали клітинні лінії гепатоми людини, серед яких особливе місце займає HepG2. Ця лінія характеризується високою доступністю, необмеженим терміном культивування, стабільним фенотипом і доброю відтворюваністю, що робить її зручною моделлю для дослідження гепатотоксичності [28,30].

Хоча клітини гепатоми демонструють нижчу експресію ферментів метаболізму лікарських засобів і транспортних білків порівняно з первинними гепатоцитами, клітини HepG2 залишаються однією з найкраще охарактеризованих моделей для оцінки цитотоксичності. Вони широко застосовуються у вивченні механізмів токсичності завдяки накопиченому обсягу даних щодо впливу різноманітних хімічних речовин, лікарських препаратів та гепатотоксинів на життєздатність клітин, мембранну цілісність, проліферацію та енергетичний обмін [28].

Подальше вдосконалення методик включало розробку мультиплексних високопродуктивних скринінгових систем, адаптованих для використання з культурами HepG2 у 96- та 384-лункових планшетах. Завдяки таким підходам стало можливим ефективно ідентифікувати сполуки з потенційною гепатотоксичністю на ранніх етапах розробки лікарських засобів. Мультипараметричні методи з використанням HepG2 довели свою чутливість і специфічність у відборі гепатотоксичних і безпечних препаратів, що остаточно обґрунтовує доцільність використання цієї клітинної лінії в даному дослідженні [28].

Висновки до розділу 2

1. Узагальнено дані попередніх експериментальних досліджень біологічної активності сполуки MaIO 168 на класичних експериментальних моделях судом, що слугувало підґрунтям для

підтвердження актуальності використання об'єкту в подальших етапах дослідження.

2. Визначено основні методичні підходи для дослідження метаболічної стабільності сполуки з використанням мікросом печінки людини, що дозволить оцінити її фармакокінетичний профіль та визначити основні шляхи біотрансформації.
3. Розроблено план *in vitro* оцінки гепатотоксичного потенціалу MaIO 168 із використанням тривимірної культури клітин HepG2 та подальшим аналізом життєздатності клітин.
4. Запропоновано структурований дизайн дослідження, який об'єднує експериментальні методики для всебічного аналізу метаболічного профілю сполуки.

РОЗДІЛ 3

ВИЗНАЧЕННЯ МЕТАБОЛІЧНОЇ СТАБІЛЬНОСТІ ТА ШЛЯХІВ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСОМАЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ ПЕЧІНКИ ЛЮДИНИ

3.1. Підготовка експерименту

На початку експерименту були підготовлені стокові розчини досліджуваної сполуки в ДМСО з концентрацією 1,5 мМ. Для цього 5 мг сполуки було розчинено у приблизно 10 мл ДМСО.

Розрахунок маси речовини, необхідної для приготування 1 мл розчину з концентрацією 1,5 мМ, здійснювався за формулою:

$$\frac{x}{M_w} = C \times V$$

де:

- x – маса речовини (г),
- M_w – молекулярна маса сполуки (г/моль),
- C – концентрація розчину (моль/л),
- V – об'єм розчину (л).

Розрахунки MaIO 168 ($M_w=378,21$ г/моль):

$$\frac{x}{378,21} = 1,5 \times 10^{-3} \Rightarrow x = 0,000567315 \text{ г} = 0,567315 \text{ мг}$$

Під час приготування розчинів було виявлено, що у розчині MaIO 168 спостерігалася наявність мікрочастинок чорного кольору. Для їх усунення розчин було профільтровано через мембранний фільтр Whatman Puradisk 25AS (поліефірсульфорова мембрана, діаметр 25 мм, розмір пор 0,2 мкм).

Для подальших експериментальних досліджень було підготовлено буферний розчин та аліквоти аламетацину, які забезпечують відповідні фізико-хімічні умови реакцій. Буферний розчин (рН 7,4) готували у два етапи:

1. Розчин калію фосфату 200 мМ (рН 7,4) *

- 6,967 г калію фосфату двоосновного (CAS №174.18, Sigma-Aldrich, P3786) розчиняли у приблизно 120 мл mQ-H₂O.
- Поступово додавали 50 мл розчину калію фосфату одноосновного (приготованого шляхом розчинення 2,722 г речовини у 100 мл mQ-H₂O, CAS №136.09, Sigma-Aldrich, P0662) до досягнення pH 7,4.
- Доводили об'єм до 200 мл.

2. Розчин хлориду магнію 10 мМ

- 0,203 г магнію хлориду гексагідрату (Mw=203,3, Sigma-Aldrich, M9272) розчиняли у 100 мл mQ-H₂O.

** При змішуванні у співвідношенні 1:1 з 10 мМ розчином хлориду магнію отриманий розчин використовувався як робочий буфер для створення відповідного середовища реакцій та розведення розчинів стандартів. Далі ця суміш буде називатись "Буфер".*

Приготування розчину аламетацину

Аламетацин (5 мг/мл) розчиняли в етанолі, після чого здійснювали аліквотування розчину.

Аламетацин використовується для активації НЛМ шляхом підвищення проникності їхніх мембран. Це забезпечує більш ефективне проникнення досліджуваних сполук до внутрішніх ферментативних систем мікросом, зокрема до цитохрому Р450, який є ключовим у метаболізмі лікарських засобів та ксенобіотиків. Завдяки властивості аламетацину формувати трансмембранні іонні канали в ліпідних мембранах, він сприяє активації мембранозв'язаних ферментів мікросомального фракції печінки, що є важливим етапом у дослідженні біотрансформації сполук *in vitro* [35,36]

Підготовка стандартних розчинів.

Для підготовки стандартних розчинів використовували ацетонітрил як розчинник, у який додавали відповідний стоковий розчин досліджуваної сполуки. Спочатку готували розчин із найвищою концентрацією, після чого

проводили серійні (покрокові) розведення для отримання стандартів із нижчими концентраціями.

Для подальшої підготовки 50 мкл стандартного розчину змішували з 50 мкл буферу, що призводило до двократного зниження концентрації. Точні об'єми та концентрації стандартних розчинів для досліджуваної сполуки наведено в таблицях 3.1 та 3.2.

Після приготування стандартні розчини:

1. Перемішували на вортекс-міксері (віортексували) для досягнення рівномірного розподілу сполуки в розчині.
2. Інкубували в морозильній камері протягом 30 хвилин.
3. Піддавали центрифугуванню при 16 000 g протягом 10 хвилин.
4. Переносили 80 мкл супернатанту у скляні аналітичні флакони з пластиковими вставками.
5. Відправляли на аналіз.
6. Будуvalи калібраційні криві за отриманими даними з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel.

Таблиця 3.1

Підготовка стандартних розчинів для MaIO 168

Станд арт	Концентр ація в ацетонітр илі (нМ)	Об'єм ацетоніт рилу (мкл)	Об'єм стокового розчину/стан дарту, що додають (мкл)	Стоковий розчин/станд арт, що використову ють	Концентрація після додавання буферу (нМ)
СТД5	2143	699	1	1.5 мМ стоковий розчин в ДМСО	1071

СТД4	1071	100	100	СТД5	536
СТД3	536	100	100	СТД4	268
СТД2	268	100	100	СТД3	134
СТД1	134	100	100	СТД2	67
СТД0	0	699	1	ДМСО	0

Таблиця 3.2

Підготовка стандартних розчинів для мідазоламу

Стандарт	Концентрація в ацетонітрилі (нМ)	Об'єм ацетонітрилу (мкл)	Об'єм стокового розчину/стандарту, що додають (мкл)	Стоковий розчин/стандарт, що використовують	Концентрація після додавання буферу (нМ)
СТД5	2000	999	1	2mM стоковий розчин в Етанолі	1000
СТД4	1000	100	100	СТД5	500
СТД3	500	100	100	СТД4	250
СТД2	250	100	100	СТД3	125
СТД1	125	100	100	СТД2	62.5
СТД0	0	999	1	Етанол	0

Для певних інкубацій було скориговано об'єми або додано додаткові стандарти для підвищення точності калібраційної кривої:

Таблиця 3.3

Коригування стандартних розчинів для інкубацій II–VII

Стандарт	Концентрація в ацетонітрилі (нМ)	Об'єм суміші ацетонітрилу та буферу 1:1 (мкл)	Об'єм стокового розчину/стандарту, що додають (мкл)	Стоковий розчин/стандарт, що використовують
СТД9	2000	690	10	0,15 мМ розчин речовини в ДМСО
СТД8	1000	300	300	СТД9
СТД7	800	80	320	СТД8
СТД6	500	120	200	СТД7
СТД5	300	120	180	СТД6
СТД4	250	35	175	СТД5
СТД3	125	100	100	СТД4
СТД2	62,5	100	100	СТД3
СТД1	40	54	96	СТД2
СТД0	0	690	10	ДМСО

3.2. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ): налаштування параметрів

Для дослідження МаЮ 168 використовували попередньо оптимізовані параметри рідинної хроматографії, які раніше були розроблені для мідазоламу. Оскільки методика продемонструвала високу ефективність,

необхідні коригування стосувалися лише вибору довжини хвилі для максимальної абсорбції та зміни співвідношення фаз у градієнті.

Зокрема, для MaIO 168 було необхідне підвищення вмісту органічної фази (ацетонітрилу) на початкових та кінцевих етапах градієнту для покращення розділення та відтворюваності піку.

Для налаштування параметрів було підготовлено стандартні розчини (СТД5) сполуки в ацетонітрилі, які змішували з буфером у співвідношенні 1:1 та піддавали аналізу за різних умов.

Таблиця 3.4

Характеристика пристрою та умов хроматографування

Параметр	Опис
Хроматографічна система	Agilent Technologies 1200 series
Precolumn	Phenomenex Krudkatcher ULTRA HPLC in-line filter 2.0 µm depth filter x 0.004in ID
Аналітична колонка	InfinityLab Poroshell 120 EC 4.6×50 mm, pore size 2.7 µm
Фаза А (водна)	вода з додаванням 0,1% мурашиної кислоти
Фаза В (органічна)	ацетонітрил з додаванням 0,1% мурашиної кислоти
Швидкість потоку	1.6-2.0 мл/хв
Температура колонки	30 °C
Детектор	DAD SL (G1315C) / флуоресцентний детектор (G1321A)

Таблиця 3.5

Параметри налаштування детектора під час хроматографічного розділення

Сполука	MaIO 168
Довжина хвилі детектування*	242 та 311 нм (UV)
Гradient розчинників	
Час (хв)	%B
0-2.00	25
2.00-4.00	75
4.00-4.05**	95
4.05-4.50**	95
4.50-4.60	25
4.60-5.50	25
Час утримання (хв)	3.56 (CV 0.23%, n=43)
Об'єм введення зразка (мкл)	10 мкл

**Параметри детектора, використані для подальшого кількісного аналізу, виділено жирним шрифтом.*

*Швидкість потоку становила 1.6 мл/хв, за винятком секцій, позначених **, де вона була збільшена до 2.0 мл/хв.*

Оцінка точності та відтворюваності методики проводилася шляхом аналізу лінійності калібраційної кривої, визначення межі кількісного визначення (LOQ) та теоретичного діапазону калібрування.

Таблиця 3.6

Показники оцінки точності та відтворюваності методики

Сполука	MaIO 168
Тип зважування	None
Intercept	0.0086

Slope	0.8703
Коефіцієнт лінійності (R^2)	0.9916
Теоретичний діапазон калібрування (мкМ)	0.134-2.143
Межа кількісного визначення (LOQ, мкМ)	0.158

3.3. Калібраційні криві: побудова, обґрунтування, результати.

Для побудови калібраційних кривих та подальшої обробки експериментальних даних використовували програмне забезпечення Microsoft Excel. Дані, отримані за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), переносили у табличний формат для подальшого аналізу.

Калібраційні криві будували шляхом нанесення залежності площі піку від теоретичної концентрації стандартного розчину. Для отриманих точок проводили лінійну регресію, додаючи рівняння прямої та коефіцієнт детермінації R^2 , який характеризував якість апроксимації експериментальних даних.

Основні параметри, отримані після регресійного аналізу:

- Slope (нахил прямої) – коефіцієнт, що характеризує чутливість методу до зміни концентрації аналіту.
- Intercept (вільний член рівняння регресії) – значення перетину прямої з віссю у, яке може відображати системну похибку або фоновий сигнал.

Отримані значення використовували для розрахунку концентрації досліджуваних речовин у пробах, відібраних у певні проміжки часу під час подальших експериментів. Це дозволяло кількісно оцінити кінетику метаболізму та динаміку змін концентрації сполук у системі.

Результати дослідження МаЮ 168 та мідазоламу наведені на рис. 3.1

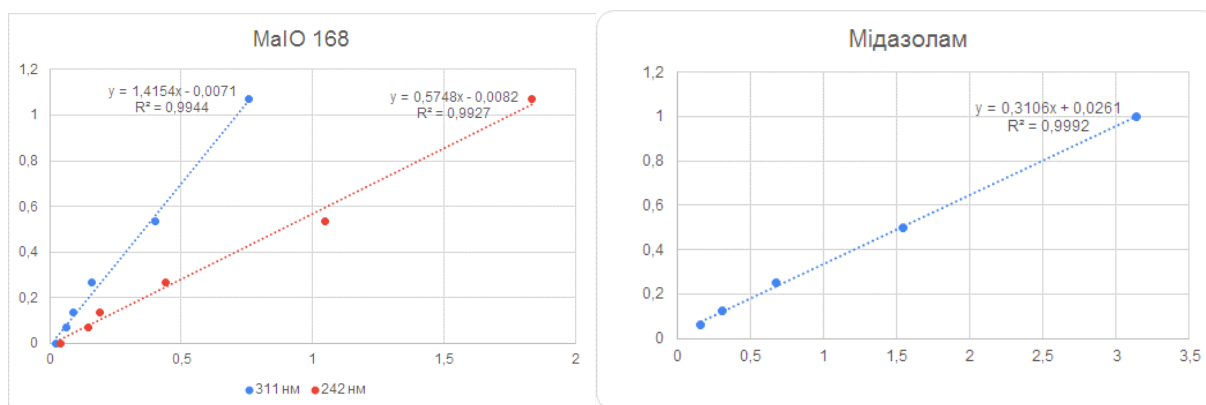


Рис. 3.1. Калібраційні криві MaIO 168 та сполуки-референсу Мідазоламу

Побудова калібраційної кривої для сполуки MaIO 168 дозволила ідентифікувати оптимальну довжину хвилі для подальшого аналітичного визначення. За результатами хроматографічного аналізу встановлено, що при довжині хвилі 242 нм площа аналітичного піку була найбільшою навіть за умов зниженої концентрації, що свідчить про вищу чутливість детектування в цьому діапазоні.

3.4. Використання мідазоламу як контрольної сполуки

Мідазолам широко використовується як контрольний субстрат для оцінки активності мікросом печінки людини (HLMs) через його метаболізм ферментом CYP3A4. Це дозволяє перевірити функціональність мікросом у дослідженнях метаболізму лікарських засобів. [37]

Таблиця 3.7

Підготовка 1.43X MASTER розчину мідазоламу

Компонент	Стоковий розчин	Перше проміжне розведення в буфері	Інкубація I	Інкубації II–VII
Мідазолам	2,0 мМ в	10 мкл 2,0 мМ + 90 мкл	0,5 мкл 2,0 мМ	5 мкл 0,2 мМ

	етанолі	буфера = 0,2 мМ		
Буфер			699 мкл	695 мкл

Протокол інкубації:

1. Підготувати 6 пробірок, кожна з яких містить 50 мкл ацетонітрилу, та зберігати їх на льоду.
2. Підготувати та маркувати 4 пробірки для подальшого додавання реагентів відповідно до схеми (табл. 3.8)

Таблиця 3.8

**Схема розподілу реагентів у реакційні та контрольні пробірки для
Мідазоламу**

Крок	Реакції (2 пробірки)	+Контроль (2 пробірки)
Додавання розчину MASTER	2 × 77 мкл MASTER	2 × 42 мкл MASTER
Додавання СУМІШІ КОФАКТОРІВ або БУФЕРУ	2 × 22 мкл СУМІШІ КОФАКТОРІВ	2 × 12 мкл БУФЕРУ
Преінкубація протягом 5 хв при 37С		
Додавання преактивованих HLM	2 × 11 мкл	2 × 6 мкл
Віортексувати та продовжувати інкубацію при 200 об/хв		

Після інкубації здійснюється відбір проб у пробірки з холодним ацетонітрилом відповідно до наступного алгоритму:

1. Відбір проб – відібрати 50 мкл зразка та додати до пробірки з 50 мкл холодного ацетонітрилу.
2. Обробка зразків – ретельно перемішати та залишити на 30 хвилин на льоду.

3. Центрифугування – після інкубації на льоду провести центрифугування при 16 000 g протягом 10 хвилин.

Розклад ініціації та збору зразків: використовуйте наведені часові інтервали для ініціації реплік I та II:

Таблиця 3.9

Розклад ініціації та збору зразків Мідазоламу

0:15	Додайте 6 мкл HLM до +Контроль
0:30	Додайте 11 мкл HLM до реакцій
Зберіть зразки 0 хв	Відберіть 50 мкл з пробірок реакцій
1:15	Додайте 6 мкл HLM до +Контроль
1:30	Додайте 11 мкл HLM до реакцій
Зберіть зразки 0 хв	Відберіть 50 мкл з пробірок реакцій
Зберіть зразки +Контроль	Відберіть 50 мкл з пробірок +Контроль
Зберіть зразки 5 хв	Відберіть 50 мкл з пробірок реакцій

3.4.1. Результати та обґрунтування для мідазоламу

Мідазолам було використано як контрольну сполуку в кожній інкубаційній серії з метою перевірки ефективності метаболічної системи. Нижче подано результати одного репрезентативного аналізу, отриманого за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), які ілюструють очікувану кінетику метаболізму мідазоламу.

Згідно з побудованими графіками (рис. 3.2), концентрація мідазоламу зменшувалась майже вдвічі протягом перших 5 хвилин інкубації. Це свідчить про його низьку метаболічну стабільність, що є узгодженим із відомими літературними даними про швидкий метаболізм цієї сполуки через ізофермент CYP3A4. Такі результати підтверджують, що мікросомальна фракція була успішно активована, а проведення подальших інкубацій із тестованими сполуками є методологічно обґрунтованим та валідним.

Таким чином, мідазолам виконав функцію позитивного контролю, продемонструвавши очікувану швидкість елімінації та підтвердивши функціональність експериментальної моделі.

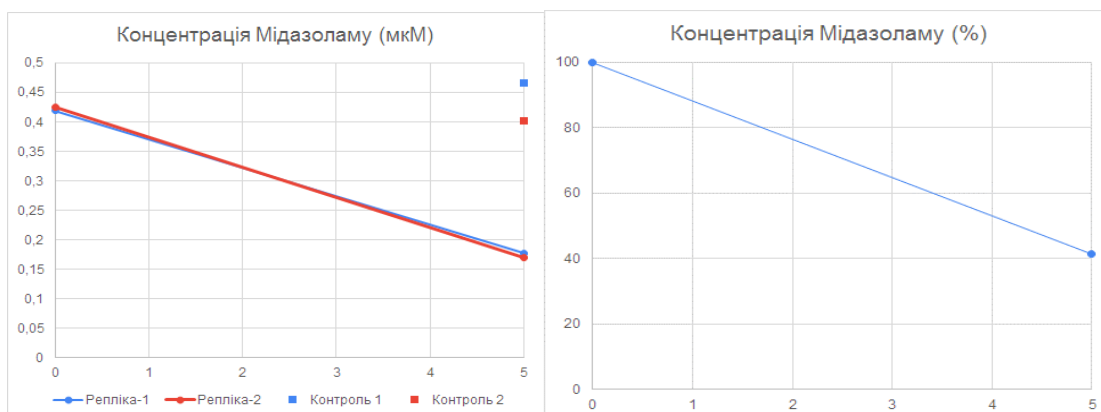


Рис. 3.2. Динаміка зниження концентрації мідазолamu в інкубаційному середовищі: абсолютні значення (мкМ) та відносні показники (% залишку) у часовому розрізі

3.5. Методика інкубації I (мікросоми + кофактори)

У день проведення експерименту здійснюється приготування реагентів, які мають бути свіжопідготовлені, відповідно до наведених у таблиці 3.10 алгоритмів:

Таблиця 3.10

Алгоритм підготовки реагентів

БУФЕР	Для приготування необхідно змішати 200 мМ фосфатний буфер (pH 7,4) та 10 мМ розчин хлориду магнію у співвідношенні 1:1. Загальний об'єм буферного розчину має становити не менше ніж 10 мл.
NADPH (10 mM)	Відважити 8,3335 мг NADPH гідрату тетранатрієвої солі ($M_w = 833,35$, N1630 from Sigma-Aldrich) та розчинити у 1000 мкл БУФЕРУ*
UDPGA (20 mM)	Відважити 12,925 мг UDPGA тринатрієву сіль ($m_w = 646,23$, U6751 from Sigma-Aldrich) та розчинити у 1000

	мкл БУФЕРУ*
СУМІШ КОФАКТОРІВ	Для отримання суміші кофакторів змішати розчини NADPH (10 mM) та UDPGA (20 mM) у співвідношенні 1:1. Загальний об'єм суміші має становити не менше ніж 1 мл.
1.43X MASTER	До 0,94 мкл 1,5 mM стокового розчину досліджуваної речовини в ДМСО додати 986 мкл БУФЕРУ
1.43X BLANK	До 0,94 мкл ДМСО додати 986 мкл БУФЕРУ.
Преактивація HLMs	Для підготовки мікросом печінки людини: 1. Взяти аліквоту 50 мкл розчину мікросом (концентрація 20 мг/мл; Corning, Ref. 452161, lot. 1151001**). 2. Додати 148 мкл БУФЕРУ. 3. Додати 2 мкл розчину аламетацину (5 мг/мл). 4. Інкубувати на льоду протягом 30 хвилин.

Примітки:

*Об'єм буферного розчину може бути скоригований залежно від точної маси реагентів, відваженої в день експерименту.

**Мікросоми з цього лоту були поділені на 10 аліквот по 50 мкл кожна та використовувалися для подальших експериментів.

Попередня підготовка зразків для аналізу сполуки

Для аналізу потрібно

1. Підготувати 22 пробірки, кожна з яких містить 50 мкл ацетонітрилу, та зберігати їх на льоду.
2. Підготувати та маркувати 7 пробірок для подальшого додавання реагентів відповідно до таблиці 3.11:

Таблиця 3.11

**Схема розподілу реагентів у реакційні та контрольні пробірки для
MaIO 168**

Крок	+Контроль (3 пробірки)	Реакція (3 пробірки)	-Контроль (1 пробірка)
Додавання розчину MASTER або розчину BLANK	3 × 77 мкл MASTER	3 × 231 мкл MASTER	1 × 77 мкл BLANK
Додавання СУМІШІ КОФАКТОРІВ або БУФЕРУ	3 × 22 мкл БУФЕР	3 × 66 мкл СУМІШІ КОФАКТОРІВ	1 × 22 мкл СУМІШІ КОФАКТОРІВ
Преінкубація протягом 5 хв при 37С			
Додавання преактивованих HLM	3 × 11 мкл	3 × 33 мкл	1 × 11 мкл
Віортексувати та продовжувати інкубацію при 200 об/хв			

Після інкубації здійснюється відбір проб у пробірки з холодним ацетонітрилом відповідно до наступного алгоритму:

1. Відбір проб – відібрати 50 мкл зразка та додати до пробірки з 50 мкл холодного ацетонітрилу.
2. Обробка зразків – ретельно перемішати та залишити на 30 хвилин у морозильній камері.
3. Центрифугування – після інкубації в морозильній камері провести центрифугування при 16 000 g протягом 10 хвилин.

Таблиця 3.12

Розклад ініціації та збору зразків MaIO 168

Ініціювати +Контроль (15 с)	додати 3x11 мкл HLM до +Контроль
Ініціювати реакції (30 с)	додати 3x33 мкл HLM до реакцій
Зібрати зразки 0 хв (45 с)	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Ініціювати -Контроль (50 с)	додати 11 мкл of HLM to -CTRL
Зібрати зразки 30 хв	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки 60 хв	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки 90 хв	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки 120 хв	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки +Контроль	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки 150 хв	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції
Зібрати зразки -Контроль	відібрати 3x50 мкл з 330 мкл реакції

Примітка: Відбір проб здійснюється у визначеній послідовності: повтор 1 → повтор 2 → повтор 3.

3.6. Методика варіативних інкубацій II-VII (зміни умов та використання інгібіторів)

Процес підготовки реагентів у день експерименту аналогічний до підготовки для інкубації I, за винятком змін у приготуванні робочих розчинів MASTER та BLANK. У таблицях 3.13 та 3.14 наведено оновлені етапи підготовки.

Таблиця 3.13

Підготовка розчину MASTER для MaIO 168

Компонент	Стоковий розчин	Перше проміжне розведення в буфері	Друге проміжне розведення в буфері	Інкубація II (кофактори, без бензила)	Інкубація III (кофактори, з бензилом)	Інкубація IV (без кофакторів, з бензилом)	Інкубація V (без кофакторів, без бензила)	Інкубації VI-VII (один кофактор, з бензилом)
Тестова сполука (MaIO168)	1,5 мМ у ДМСО	10 мкл 1,5 мМ + 290 мкл буфера = 0,05 мМ	-	20 мкл 0,05 мМ	20 мкл 0,05 мМ	20 мкл 0,05 мМ	20 мкл 0,05 мМ	20 мкл 0,05 мМ
Інгібітор (бензил)	10 мМ у етанолі	51 мкл 10 мМ + 289 мкл буфера = 1,5 мМ	10 мкл 1,5 мМ + 290 мкл буфера = 0,05 мМ	-	200 мкл 0,05 мМ	200 мкл 0,05 мМ	-	200 мкл 0,05 мМ
Буфер		-	-	679,9 мкл	479,9 мкл	479,9 мкл	679,9 мкл	479,9 мкл
Кінцева концентрація				MaIO 168: 1 мкМ; Бензил: 0 мкМ	MaIO 168: 1 мкМ; Бензил: 10 мкМ	MaIO 168: 1 мкМ; Бензил: 10 мкМ	MaIO 168: 1 мкМ; Бензил: 0 мкМ	MaIO 168: 1 мкМ; Бензил: 10 мкМ

Таблиця 3.14

Підготовка розчину BLANK для MaIO 168

Компонент	Стоковий розчин	Перше проміжне розведення в буфері	Друге проміжне розведення в буфері	Інкубація II (кофактори, без бензила)	Інкубація III (кофактори, з бензилом)	Інкубація IV (без кофакторів, з бензилом)	Інкубація V (без кофакторів, без бензила)	Інкубації VI-VII (один кофактор, з бензилом)
	ДМСО	10 мкл ДМСО + 290 мкл буфера		5 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл	5 мкл
	Етанол	51 мкл етанолу + 289 мкл буфера	10 мкл + 290 мкл буфера	-	50 мкл	50 мкл	-	50 мкл
Буфер				170 мкл	120 мкл	120 мкл	170 мкл	120 мкл
Кінцева концентрація				ДМСО 0,07%	ДМСО 0,07%; Етанол 0,1%	ДМСО 0,07%; Етанол 0,1%	ДМСО 0,07%	ДМСО 0,07%; Етанол 0,1%

Попередня підготовка зразків для аналізу сполуки. Для аналізу потрібно

1. Підготувати пробірки, кожна з яких містить 40 мкл ацетонітрилу, та зберігати їх на льоду. Загальна кількість пробірок визначається як добуток кількості повторень на кількість часових точок (2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 хв) для кожної реакції, а також додатково по одній пробірці на кожну сполуку для контролю.
2. Підготувати та маркувати 5 пробірок для подальшого додавання реагентів відповідно до таблиці 3.15:

Таблиця 3.15

Схема розподілу реагентів у реакційні та контрольні пробірки

Крок	MaIO 168, Реакція (2 пробірки)	Матричний контроль (1 пробірка)
Додавання розчину MASTER або розчину BLANK	2 × 266 мкл MASTER	1 × 77 мкл BLANK
Додавання СУМІШІ КОФАКТОРІВ або БУФЕРУ	2 × 76 мкл СУМІШІ КОФАКТОРІВ*	1 × 22 мкл СУМІШІ КОФАКТОРІВ*
Прейнкубація протягом 5 хв при 37C		
Додавання преактивованих HLM	2 × 38 мкл	1 × 11 мкл
Віортексувати та продовжувати інкубацію при 200 об/хв		

**Під час інкубацій 4-5, замість суміші кофакторів додається буфер для забезпечення однакового фінального об'єму реакційної суміші.*

Під час інкубацій 6–7, коли використовується лише один із кофакторів, суміш кофакторів готуватиметься шляхом змішування відповідного кофактора з буферним розчином у співвідношенні 1:1. Це забезпечить однакову концентрацію вибраного кофактора впродовж усіх інкубацій.

Після інкубації здійснюється відбір проб у пробірки з холодним ацетонітрилом відповідно до наступного алгоритму:

1. Відбір проб – відібрати 40 мкл зразка та додати до пробірки з 40 мкл холодного ацетонітрилу.
2. Обробка зразків – ретельно перемішати та залишити на 30 хвилин на льоду.
3. Центрифугування – після інкубації на льоду провести центрифугування при 16 000 g протягом 10 хвилин.

Таблиця 3.16

Розклад ініціації та збору зразків

Ініціювати Контроль	додати 1x11 мкл HLM до пробірок контролю з кожної сполуки
Ініціювати реакції	додати 2x38 мкл HLM до реакцій
Зібрати зразки 2 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 10 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 20 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 30 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 40 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 50 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 60 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки
Зібрати зразки 90 хв	відібрати 2x40 мкл з пробірок реакції з кожної сполуки

Зібрати зразки Контроль	відібрати 1x40 мкл з пробірок контролю з кожної сполуки
-------------------------	---

Примітка: Відбір проб здійснюється у визначеній послідовності: повтор 1 → повтор 2.

3.7. Результати та обґрунтування MaIO 168

Інкубації I та II (умови: наявність обох кофакторів) проводились з метою визначення метаболічної стабільності сполуки Farm 513 у мікросомальній фракції печінки людини (HLM) за умов наявності обох кофакторів (NADPH та UDPGA), необхідних для функціонування основних ферментативних систем CYP450 та UGT відповідно.

Після побудови калібрувальної кривої та розрахунку концентрацій на основі отриманих хроматографічних даних, було встановлено наступне: у першій інкубації (I) сполука MaIO 168 продемонструвала високу метаболічну стабільність. Хроматографічні піки були зареєстровані у всіх зразках, відібраних упродовж 150 хв експерименту (інтервали відбору — кожні 30 хв). Це свідчить про поступовий метаболізм без стрімкого зниження концентрації.

На графіку також позначені контрольні умови:

- Позитивний контроль (+Контроль) — інкубація без кофакторів, що має відображати стабільність вихідної концентрації сполуки. Отримані результати відповідають очікуваному рівню з урахуванням допустимих похибок.
- Негативний контроль (–Контроль) — інкубація без сполуки, яка демонструє фоновий сигнал, обумовлений виключно мікросомальною фракцією.

У другій інкубації (II), з відбором проб кожні 10 хв протягом 90 хв, також спостерігалось поступове зменшення концентрації сполуки, хоча графік демонструє певні коливання, що можуть бути пов'язані з

варіативністю біологічної системи або технічними похибками при роботі з пробами.

На рисунку 3.3 представлено усереднені значення концентрацій сполуки, отримані з трьох технічних реплік для інкубації I та двох — для інкубації II.

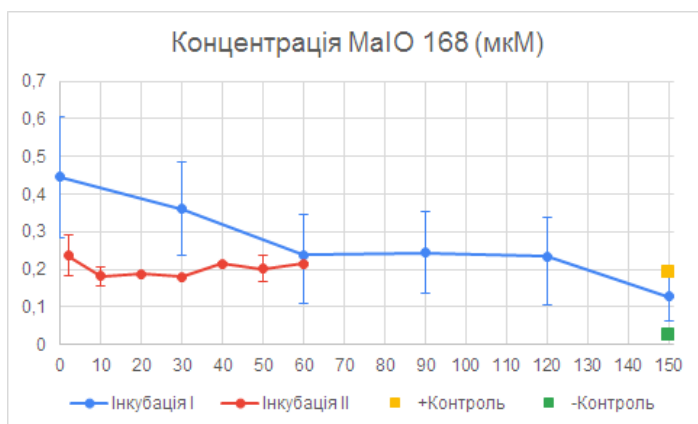


Рис. 3.3. Динаміка зниження концентрації MaIO 168 під час інкубацій I та II: абсолютні значення (мкМ)

Для глибшого аналізу побудовано графіки, що демонструють відсотковий залишок сполуки відносно концентрації у першій пробі (взятої за 100%), а також графік натурального логарифму відсоткового залишку (рис. 3.4). На останньому визначається лінійна регресія, значення нахилу якої (slope) використовується для розрахунку константи швидкості елімінації (k). Отримане значення k надалі використовується для обчислення приблизного періоду напіввиведення ($t_{1/2}$) та внутрішнього кліренсу (intrinsic clearance, Cl_{int}) (див. розділ 3.9).

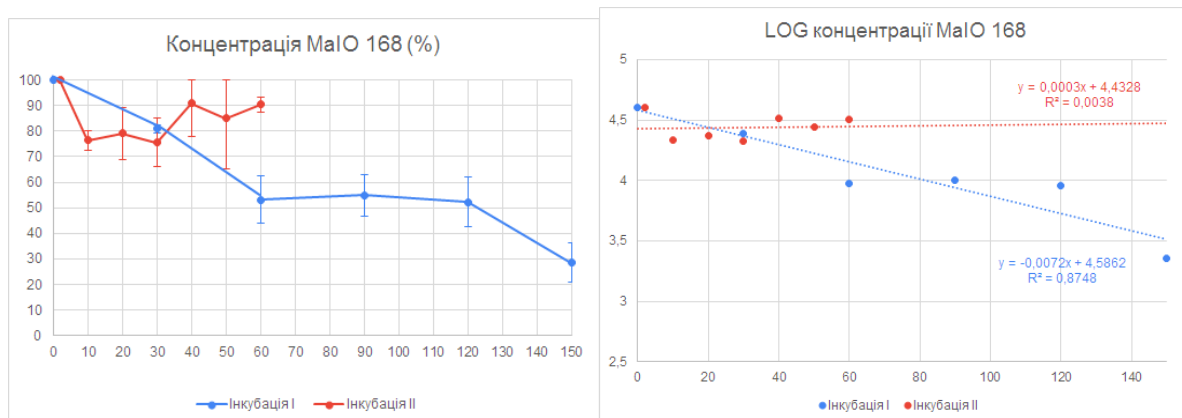


Рис. 3.4 Зміна відсоткового залишку MaIO 168 та його натурального логарифму в процесі інкубацій I та II

Інкубації з використанням бензилу проводились для оцінки участі шляху CES у метаболізмі сполуки, а також для перевірки можливості неспецифічного зв'язування сполуки з мікросомами за відсутності активного метаболізму (рис. 3.5).

При інкубації з бензилом і сумішшю кофакторів, спостерігалось поступове зниження концентрації MaIO 168 протягом 90 хв, що вказує на метаболічну трансформацію за участі ферментів CYP та/або UGT. Незначні коливання на графіку пов'язані з варіативністю експерименту.

За умов інкубації з бензилом, але без кофакторів, концентрація залишалася стабільною протягом усього часу спостереження. Це підтверджує відсутність неспецифічного зв'язування та мінімальну метаболічну активність у таких умовах. Додаткова інкубація без бензилу та без кофакторів також показала стабільність сполуки протягом 90 хв, що дає підстави припускати незначну або відсутню участь CES у метаболізмі MaIO 168.

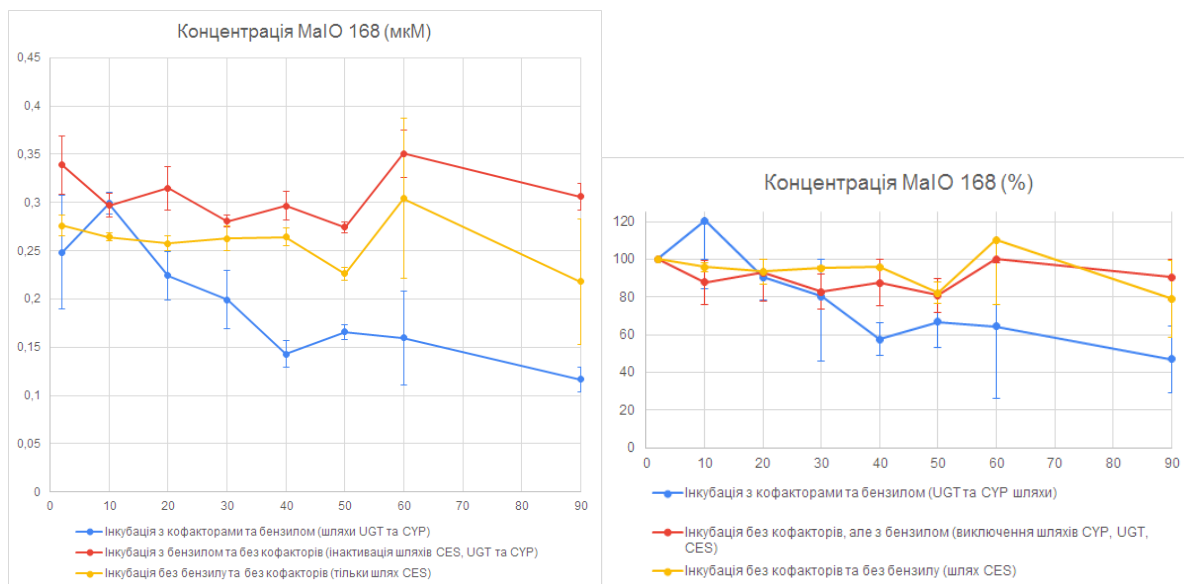


Рис. 3.5. Динаміка зниження концентрації MaIO 168 в інкубаційному середовищі: абсолютні значення (мкМ) та відносні показники (% залишку) у часовому розрізі

Інкубація з бензилом та одним кофактором проводилась з метою визначити, який з двох основних метаболічних шляхів (глюкуронідація або окиснення) є переважним для сполуки MaIO 168 (рис 3.6).

У разі інкубації з бензилом і UDPGA (без NADPH), концентрація сполуки залишалася майже незмінною протягом 90 хв, що свідчить про низьку активність глюкуронідації.

Натомість за наявності бензилу та NADPH (без UDPGA), спостерігалось поступове зниження концентрації сполуки від 100% до приблизно 55% наприкінці експерименту. Це свідчить про те, що основним метаболічним шляхом для MaIO 168 є окиснювальний шлях за участі ферментів цитохрому P450 (CYP).

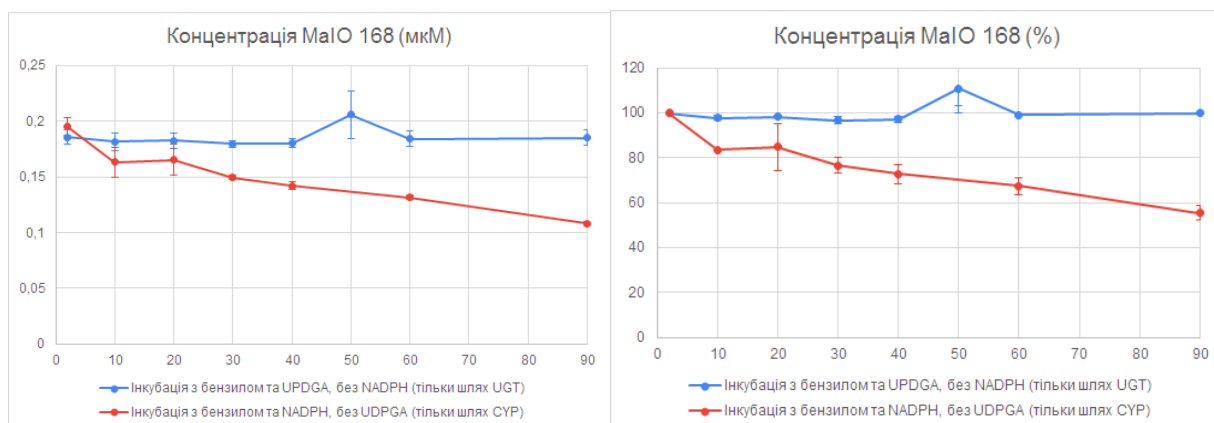


Рис. 3.6. Динаміка зниження концентрації MaIO 168 в інкубаціях з використанням бензилу та одного кофактору: абсолютні значення (мкМ) та відносні показники (% залишку) у часовому розрізі

3.8. Напрямки метаболізму за результатами аналізу метаболічної стабільності MaIO 168

На основі проведених досліджень, які включали використання ферментативних систем мікросомальної фракції печінки людини за участі специфічних кофакторів та інгібіторів, було побудовано узагальнену схему метаболізму сполуки MaIO 168. Результати вказують на переважання оксидативного шляху трансформації, що опосередковується ізоферментами системи цитохрому P450. Це дозволяє припустити, що основним первинним процесом біотрансформації є окисне гідроксилювання алкільних або ароматичних фрагментів молекули.

Крім того, враховуючи потенційну присутність функціональних груп, схильних до гідролітичного розщеплення, ферментативний гідроліз розглядається як один із додаткових метаболічних механізмів. Утворені гідроксильовані або гідролізовані метаболіти можуть підлягати фазі II метаболізму, зокрема шляхом глюкуронідації, що забезпечує їх поляризацію та виведення з організму.

З урахуванням присутності галогензаміщених фрагментів у структурі MaIO 168, не виключається також поступове дегалогенування як вторинний шлях біотрансформації, характерний для деяких хлор- або фторвмісних сполук. Цей процес потенційно може супроводжуватись утворенням реактивних метаболітів або зміненою фармакологічною активністю.

Запропонована схема (рис. 3.7) базується на типових шляхах метаболізму молекул у печінкових мікросомах, а також узгоджується з характерними трансформаціями, що спостерігаються для структурно подібних сполук. Її формування дозволяє краще зрозуміти біохімічну долю сполуки в організмі та є основою для подальших досліджень фармакокінетичних властивостей MaIO 168.

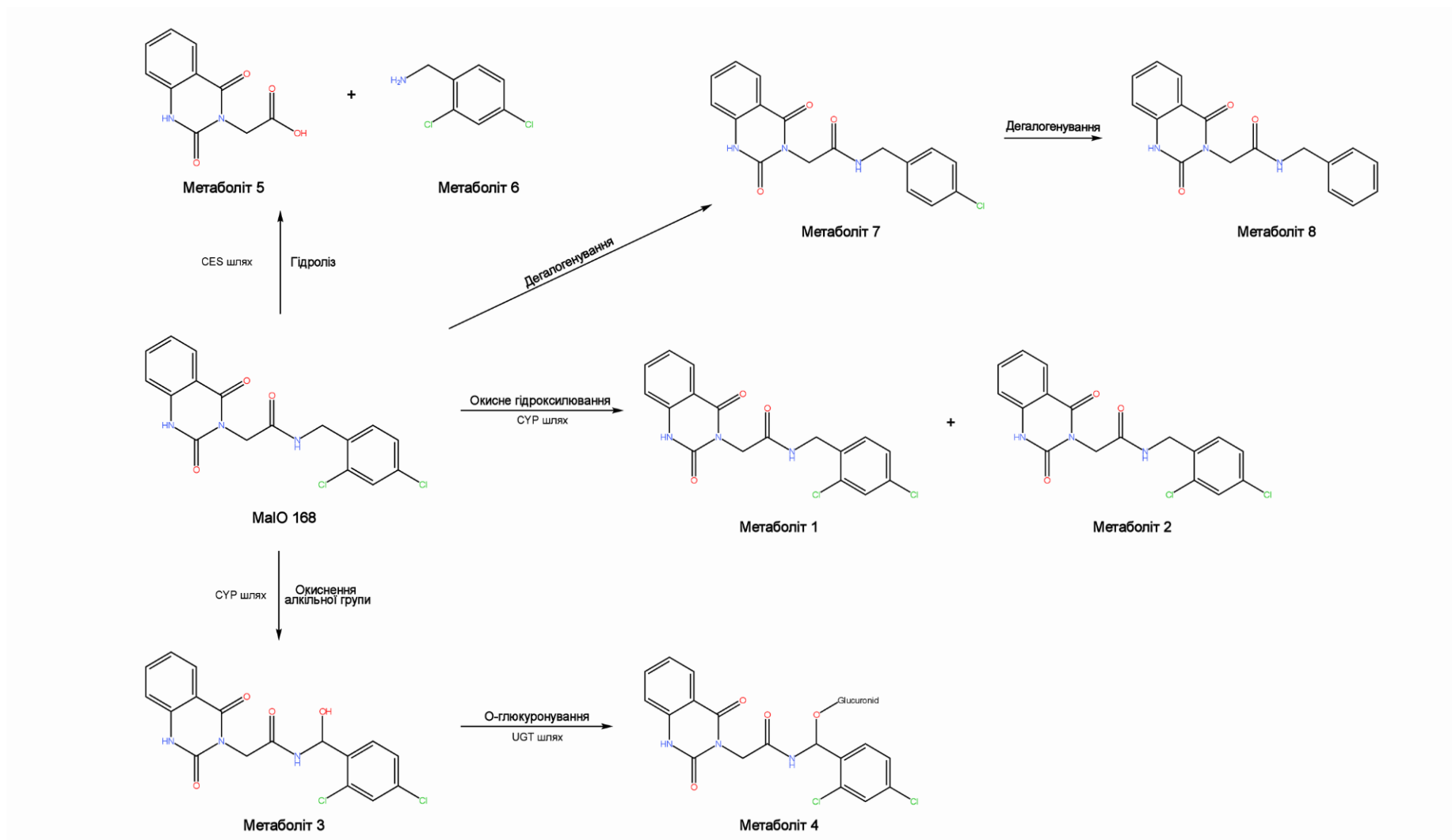


Рис. 3.7. Візуалізація напрямків метаболізму досліджуваної сполуки

3.9. Розрахунки періоду напіввиведення та внутрішнього кліренсу MaIO 168

Для досліджуваної сполуки було побудовано графік залежності натурального логарифму відсоткового залишку концентрації від часу (рис. 3.8).

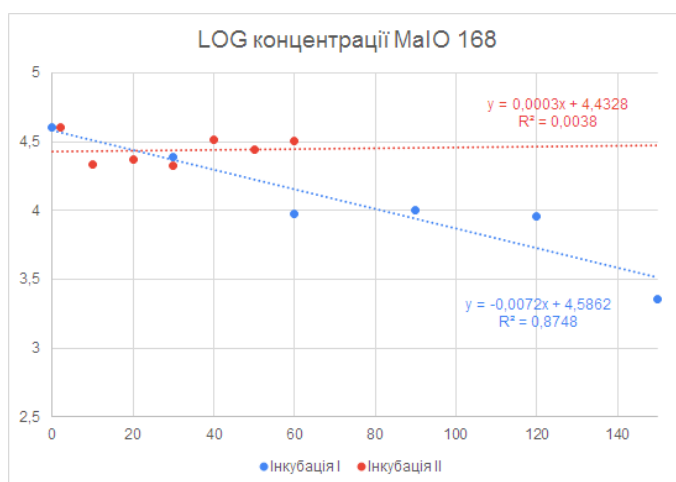


Рис. 3.8. Зміна натурального логарифму відсоткового залишку MaIO 168 інкубацій I та II

Побудова лінійної регресії на цьому графіку дозволила визначити константу швидкості елімінації (k), а також розрахувати період напіврозпаду ($t_{1/2}$) відповідно до формули:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Результати розрахунків для MaIO 168 подано нижче:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{0,0072} = 96,27 \text{ хв}$$

На основі отриманих значень $t_{1/2}$ розраховано внутрішній кліренс (CL_{int}) за допомогою формули:

$$CL_{int} = \frac{V \times \ln(2)}{t_{1/2}}$$

де V - об'єм інкубації, скоригований на масу мікросом у реакції.

Розрахунок параметрів інкубаційної системи для MaIO 168 здійснено наступним чином:

Для приготування інкубаційної суміші до 50 мкл розчину мікросомальної фракції (20 мг/мл) додавали 148 мкл буфера та 2 мкл аламетацину, що становило загальний об'єм 200 мкл.

$$\text{Маса мікросом у 50 мкл розчину: } 20 \frac{\text{мг}}{\text{мл}} \times 0,05 \text{ мл} = 1 \text{ мг}$$

$$\text{Концентрація мікросом у преактивованому розчині: } \frac{1 \text{ мг}}{0,2 \text{ мл}} = 5 \frac{\text{мг}}{\text{мл}}$$

В інкубації використовували 33 мкл розчину преактивованих мікросом, що при загальному об'ємі інкубації 330 мкл давало:

$$0,033 \text{ мл} \times 5 \frac{\text{мг}}{\text{мл}} = 0,165 \text{ мг}$$

Таким чином, об'єм інкубації на 1 мг мікросом становив:

$$V = \frac{330 \text{ мкл}}{0,165 \text{ мг}} = 2000 \frac{\text{мкл}}{\text{мг}}$$

Для сполуки з періодом напіврозпаду 96,27 хв, внутрішній кліренс розраховують як:

$$CL_{int} = \frac{V \times \ln(2)}{t_{1/2}} = \frac{2000 \times \ln(2)}{96,27} = 14,4 \text{ мкл/хв/мг}$$

Згідно з класифікацією McNaney, сполуки з $CL_{int} < 15$ мкл/хв/мг (еквівалентно приблизно <15 мЛ/хв/кг для людини) вважаються такими, що мають низький кліренс; від 15 до 45 — помірний; понад 45 — високий кліренс [24]. Отримане значення CL_{int} для сполуки MaIO 168 (14,4 мкл/хв/мг) вказує на низький метаболічний кліренс, що узгоджується з тривалим періодом напіввиведення (96,27 хв).

Подальша валідація фармакокінетичних параметрів здійснюється шляхом дослідження печінкового кліренсу в первинних гепатоцитах; експеримент триває.

Висновки до розділу 3

1. Описано методологію визначення метаболічної стабільності сполук у мікросомальній фракції печінки людини з використанням високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).
2. Продемонстровано валідність мікросомальної моделі шляхом застосування мідазоламу як контрольної сполуки з відомим профілем швидкого метаболізму.
3. Проведено інкубації сполуки MaIO 168 за наявності обох кофакторів (NADPH, UDPGA) та за умов варіативної активації метаболічних шляхів.
4. Визначено кінетичні параметри метаболізму MaIO 168, зокрема константу швидкості елімінації, період напіввиведення ($t_{1/2} = 96,27$ хв) та внутрішній кліренс ($CL_{int} = 14,4$ мкл/хв/мг).
5. Встановлено, що основним шляхом метаболізму MaIO 168 є оксидація за участі ізоферментів CYP, тоді як глюкуронідація та ферментативний гідроліз відіграють мінімальну роль.
6. Побудовано узагальнену схему метаболізму досліджуваної сполуки з урахуванням можливого дегалогенування та утворення метаболітів із зміненою фармакологічною активністю.

РОЗДІЛ 4

ОЦІНКА ГЕПАТОТОКСИЧНОСТІ ДОСЛІДЖУВАНОЇ СПОЛУКИ ЗА ДОПОМОГОЮ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ НЕРG2

4.1. Методологія оцінки гепатотоксичності

Для дослідження гепатотоксичності використовувалася клітинна лінія НерG2, яка була отримана від ATCC (кат. № HB-8065).

Клітини вирощували в мінімальному середовищі Ігла (MEM), що містило 2 мМ L-глутаміну, буфер Ерла (Earle's BSS), 1,5 г/л гідрокарбонату натрію, 0,1 мМ незамінних амінокислот та 1,0 мМ пірувату натрію. Середовище додатково збагачували 10% фетальною бичачою сироваткою (FBS). За необхідності до складу середовища вводили пеніцилін-стрептоміцин для запобігання бактеріального контамінування.

Культитивування проводили у флаконах T-150 (з вентильованими кришками, без покриття) з 20 мл культурального середовища за стандартних умов інкубації (37°C, 5% CO₂). [38-40]

Пересів клітин здійснювали у співвідношенні 1:4 або 1:5 (приблизно 4×10⁶ клітин) кожні 3–4 дні, коли клітини досягали 70% конфлюентності.

Процедура пересіву:

1. Видалити культуральне середовище з флакона T-150.
2. Двічі промити клітинний моношар 4 мл підігрітого 0,25% трипсину з EDTA.
3. Додати 2 мл трипсину та інкубувати при 37°C протягом 10 хвилин, доки клітини повністю не відокремляться від поверхні.
4. Додати 8 мл середовища для росту для деактивації трипсину.
5. Інтенсивно піпетувати вгору-вниз для зменшення утворення клітинних агрегатів.
6. Перенести клітинну суспензію у 15 мл центрифужну пробірку.
7. Подрібнити клітинні агрегати шприцом 5 мл з голкою 20G, тричі прокачуючи суспензію.

8. Виконати підрахунок клітин та розвести до необхідної концентрації для подальших експериментів. [38-40]

Клітини висівали у 96-лункові планшети з U-подібним дном (Corning, кат. № 7007) у концентрації 200 клітин/лунку. Культивування тривало 7 діб, що забезпечувало формування тривимірних сфероїдів, які більш точно відтворюють архітектуру печінкової тканини порівняно з двовимірними культурами. Інкубацію здійснювали за стандартних умов (37°C, 5% CO₂). [38-40]

Після завершення формування сфероїдів клітини піддавали дії досліджуваних лікарських сполук протягом 48 годин. Контрольні зразки містили тільки 1% ДМСО, що відповідало концентрації розчинника у дослідних зразках.

Оцінку життєздатності клітин проводили за допомогою люмінесцентного аналізу, використовуючи CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega), який дозволяє визначати рівень АТФ – маркера метаболічно активних клітин.

Процедура аналізу:

1. До кожної лунки додавали реагент CellTiter-Glo® у співвідношенні 1:1 до об'єму культурального середовища.
2. Інтенсивно перемішували вміст лунок протягом 5 хвилин.
3. Інкубували ще 25 хвилин при кімнатній температурі.
4. Вимірювали інтенсивність люмінесцентного сигналу за допомогою мікропланшетного рідера.

Отримані значення нормалізували відносно контрольних зразків, що містили 1% ДМСО без тестованих сполук. Результати виражали у вигляді відсотка життєздатності клітин відносно контролю.

Для підтвердження результатів люмінесцентного аналізу проводили флуоресцентне фарбування клітин, використовуючи такі барвники:

- Calcein AM (1 μ M, Thermo Scientific) – мітить цитозоль життєздатних клітин (зелений флуоресцентний сигнал).
- Propidium iodide (ReadyProbes Reagents, Thermo Scientific) – забарвлює ядра мертвих клітин (червоний сигнал).
- Hoechst 33342 (NucBlue, ReadyProbes Reagents, Thermo Scientific) – забарвлює всі ядра клітин (синій сигнал, без диференціації між живими та мертвими клітинами).

Флуоресцентний аналіз дозволяв візуалізувати розподіл життєздатних і нежиттєздатних клітин у сфероїдах, що підвищувало точність оцінки гепатотоксичності тестованих сполук.

4.2. Результати визначення життєздатності клітин під впливом MaIO

168

Визначення гепатотоксичності здійснювалося у широкому діапазоні концентрацій: від 0,625 мкМ з подальшим дворазовим збільшенням до максимальної концентрації 100 мкМ. Експеримент повторювався двічі з використанням 3 реплік в кожному для точного підтвердження результатів. Обидва графіки (рис. 4.1) підтверджують, що гепатотоксичність сполуки є мінімальною, адже зі збільшенням концентрації процент життєздатності клітин варіюється в проміжку від приблизно 85% до 105%.

На графіках спостерігаються поодинокі аномальні значення — різкі "скачки" до 0% або понад 100%. Такі відхилення пов'язані з технічними похибками під час перенесення клітинних сфероїдів у лунки планшетів для подальшого аналізу або прилипанні сфероїду до одноразового наконечнику піпетки для забору зразків. Також випадки підвищеної життєздатності є результатом випадкового потрапляння ворсинок у лунки, що могло призвести до переоцінки кількості клітин. Таким чином, ці значення слід розглядати як технічні артефакти, а не достовірні біологічні результати.

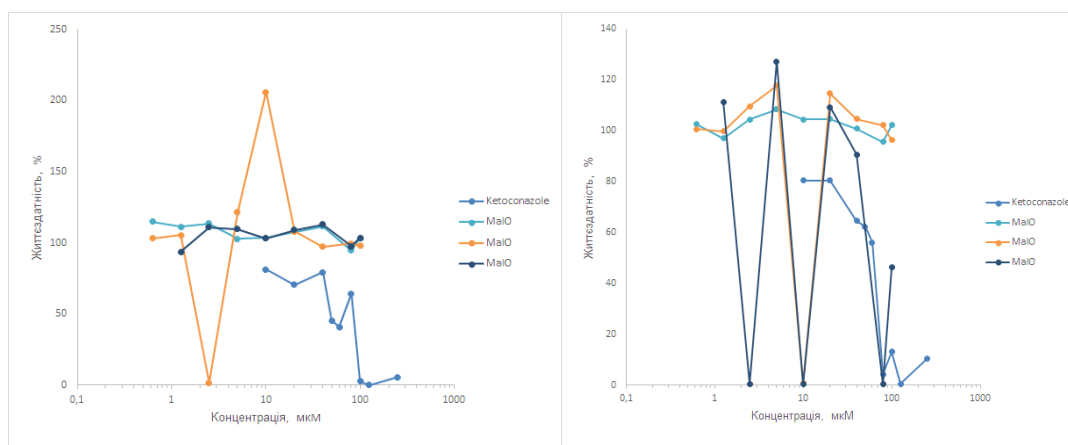


Рис. 4.1. Вплив MaIO 168 на життєздатність клітинної лінії HepG2 у широкому діапазоні концентрацій: відносна життєздатність (%) за результатами двох незалежних експериментів з трьома технічними реплікатами

4.3. Результати флуоресцентного забарвлення сфероїдів

Також додатково провели підтвердження результатів люмінесцентного аналізу за допомогою флуоресцентне фарбування клітин (Calcein AM (1 µM, Thermo Scientific), Propidium iodide (ReadyProbes Reagents, Thermo Scientific), Hoechst 33342 (NucBlue, ReadyProbes Reagents, Thermo Scientific)).

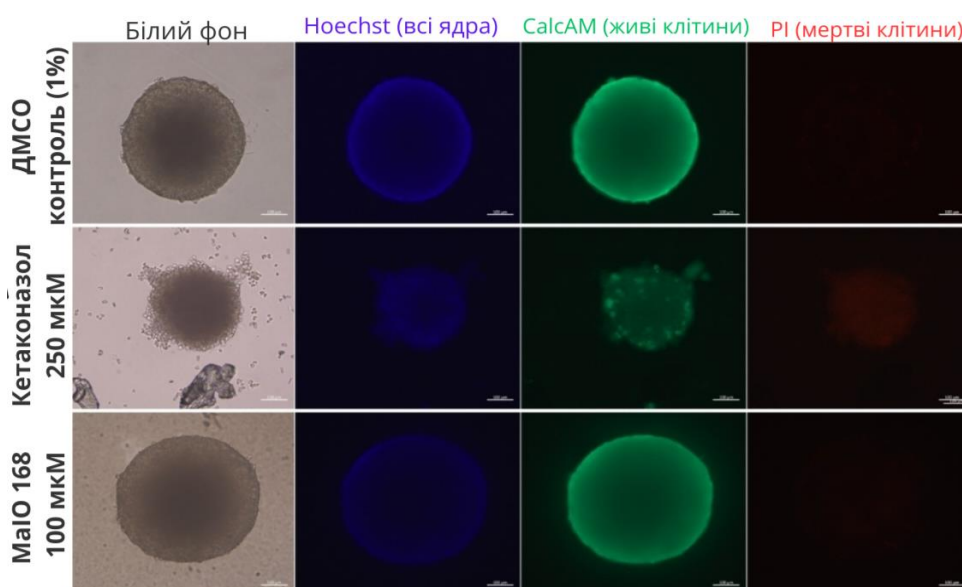


Рис. 4.2 Візуалізація життєздатності клітин HepG2 у тривимірних сфероїдах за результатами флуоресцентного фарбування після обробки кетоконазолом, MaIO 168 та контрольними зразками (ДМСО)

Згідно з результатами флуоресцентного фарбування, кетоконазол спричиняв найвищий рівень загибелі клітин у складі сфероїдів, що свідчить про його значну токсичність при максимальній досліджуваній концентрації. Навпаки, сполука MaIO 168 продемонструвала найнижчу токсичність серед усіх трьох досліджуваних речовин (включаючи контроль, що містив лише ДМСО), забезпечуючи збереження більшості клітин. Отримані дані корелюють з результатами, представленими на відповідних графіках.

Висновки до розділу 4

1. Проведено оцінку гепатотоксичності досліджуваної сполуки MaIO 168 із використанням тривимірної моделі сфероїдів клітинної лінії HepG2, що відтворює фізіологічні умови печінкової тканини.
2. Визначено життєздатність клітин після 48-годинної експозиції MaIO 168 у широкому діапазоні концентрацій за допомогою люмінесцентного аналізу рівня АТФ, що дозволило кількісно оцінити метаболічну активність клітин.
3. Встановлено, що сполука MaIO 168 не проявляє значної гепатотоксичності: життєздатність клітин зберігається в межах 85–105% відносно контролю навіть при максимальних досліджуваних концентраціях.
4. Застосовано флуоресцентне фарбування сфероїдів (Calcein AM, Propidium iodide, Hoechst 33342), яке підтвердило мінімальний рівень клітинної загибелі під впливом MaIO 168 у порівнянні з кетоконазолом – референсною токсичною сполукою.
5. Результати обох методів - люмінесцентного та флуоресцентного - узгоджуються між собою та свідчать про високий профіль безпеки досліджуваної сполуки MaIO 168 щодо гепатоцитів HepG2 у модельній системі *in vitro*.

ВИСНОВКИ

1. Узагальнено сучасні уявлення про епілепсію, її етіологію, патогенез та підходи до медикаментозної терапії, а також розглянуто основні механізми метаболізму лікарських засобів у печінці, включно з роллю ліпофільності, фазами біотрансформації та участю ферментних систем.
2. Проаналізовано наукові джерела щодо використання мікосом печінки людини як *in vitro* моделі для дослідження метаболічної стабільності, а також використання лінії гепатоми людини HepG2 для визначення гепатотоксичності сполук.
3. Проведено комплексне дослідження метаболічної стабільності, шляхів біотрансформації та гепатотоксичного потенціалу перспективної протиепілептичної сполуки МаІО 168 із застосуванням мікосомальної моделі печінки людини та тривимірної культури клітин HepG2.
4. Встановлено, що МаІО 168 характеризується високою метаболічною стабільністю: за умов дії ферментів фаз I (CYP) та II (UGT) сполука зберігається протягом 150-хвилинної інкубації, що підтверджено методом ВЕРХ. Період напіввиведення становить близько 95 хвилин, внутрішній кліренс — 14,4 мкл/хв/мг.
5. Ідентифіковано основні шляхи біотрансформації МаІО 168: оксидація ізоферментами CYP, дегалогенування та гідроліз (фаза I), глюкуронування (фаза II). Побудовано узагальнену схему метаболізму з урахуванням утворення потенційно активних метаболітів.
6. Проведена оцінка гепатотоксичності у 3D-моделі клітинної лінії HepG2 продемонструвала відсутність токсичного ефекту МаІО 168: життєздатність клітин зберігалася на рівні 85–105% навіть при максимальних досліджуваних концентраціях.

7. Додаткове флуоресцентне фарбування сфероїдів (Calcein AM, Hoechst 33342, Propidium iodide) підтвердило відсутність вираженої клітинної загибелі та узгоджується з результатами люмінесцентного аналізу.
8. Отримані результати свідчать про високий профіль безпеки МаІО 168 у модельній системі *in vitro* та підтверджують доцільність її подальшого дослідження як перспективного кандидата для протиепілептичної терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Що треба знати про епілепсію і як надати першу допомогу URL: <https://moz.gov.ua/uk/scho-treba-znati-pro-epilepsiju-i-jak-nadati-pershu-dopomogu>. (дата звернення: 02.04.25).
2. Thijs R. D., Surges R., O'Brien T. J., Sander J. W. Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*. 2019. Vol. 393. P. 689–701. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0.
3. Hu Y., Shan Y., Du Q. Gender and Socioeconomic Disparities in Global Burden of Epilepsy: An Analysis of Time Trends From 1990 to 2017. *Front Neurol*. 2021. Vol. 12. P. 643450. DOI: 10.3389/fneur.2021.643450.
4. Kanner A. M., Bicchi M. M. Antiseizure Medications for Adults With Epilepsy: A Review. *JAMA*. 2022. Vol. 327, № 13. P. 1269–1281. DOI: 10.1001/jama.2022.3880.
5. Krumholz A., Wiebe S., Gronseth G. S. Evidence-based guideline: management of an unprovoked first seizure in adults: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and American Epilepsy Society. *Neurology*. 2015. Vol. 84, № 16. P. 1705–1713. DOI: 10.1212/WNL.0000000000001487.
6. Causes of Epilepsy URL: <https://www.epilepsy.com/causes/genetic> (Date of access: 11.02.2025).
7. Weber Y. G., Biskup S., Helbig K. L., Von Spiczak S. The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2017. Vol. 17, № 8. P. 739–750. DOI: 10.1080/14737159.2017.1335598.
8. Scheffer I. E., Berkovic S., Capovilla G. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017. Vol. 58, № 4. P. 512–521. DOI: 10.1111/epi.13709.

9. Епілепсія URL: <https://uk.m.wikipedia.org/wiki/Епілепсія> (дата звернення: 11.02.2025).
10. Epilepsy Medications List URL: <https://www.healthline.com/health/epilepsy/medications-list> (Date of access: 11.02.2025).
11. Vagus Nerve URL: <https://www.healthline.com/health/vagus-nerve> (Date of access: 11.02.2025).
12. Devinsky O., Hesdorffer D. C., Thurman D. J., Lhatoo S. Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Neurol.* 2016. Vol. 15, № 10. P. 1075–1088. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30158-2.
13. Haut S. R. Seizure clusters: characteristics and treatment. *Curr Opin Neurol.* 2015. Vol. 28, № 2. P. 143–150. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000177.
14. Aícuá-Rapún I., André P., Rossetti A. O. Therapeutic drug monitoring of newer antiepileptic drugs: a randomized trial for dosage adjustment. *Ann Neurol.* 2020. Vol. 87, № 1. P. 22–29. DOI: 10.1002/ana.25641.
15. Susa S. T., Hussain A., Preuss C. V. Drug metabolism StatPearls - NCBI Bookshelf. 2023. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442023/>.
16. Garza A. Z., Park S. B., Kocz R. Drug Elimination StatPearls. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662/> . (Date of access: 11.02.2025).
17. Azzam A. A. H., McDonald J., Lambert D. G. Hot topics in opioid pharmacology: mixed and biased opioids. *Br J Anaesth.* 2019. Vol. 122, № 6. P. e136–e145. DOI: 10.1016/j.bja.2019.03.006.
18. Almazroo O. A., Miah M. K., Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis.* 2017. Vol. 21, № 1. P. 1–20. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.

19. In Vitro Strategies for Evaluating Non-CYP Metabolism Pathways. URL: <https://bioivt.com/in-vitro-strategies-for-evaluating-non-cyp-metabolism-pathways> (Date of access: 11.02.2025).
20. Wang D., Zou L., Jin Q. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B*. 2018. Vol. 8, № 5. P. 699–712. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.05.005.
21. Lian J., Nelson R., Lehner R. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein & Cell*. 2018. Vol. 9, № 2. P. 178–195. DOI: 10.1007/s13238-017-0437-z.
22. Liu R., Schyman P., Wallqvist A. Critically Assessing the Predictive Power of QSAR Models for Human Liver Microsomal Stability. *J. Chem. Inf. Model*. 2015. Vol. 55. P. 1566–1575. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00255.
23. Yim D. S., Bae S. H., Choi S. Predicting human pharmacokinetics from preclinical data: clearance. *Transl Clin Pharmacol*. 2021. Vol. 29, № 2. P. 78–87. DOI: 10.12793/tcp.2021.29.e12.
24. Nageswara Rao Gajula S., Asgar Vora S., Dikundwar A. G., Sonti R. In Vitro Drug Metabolism Studies Using Human Liver Microsomes. DOI: 10.5772/intechopen.108246.
25. Gajula S. N. R., Nadimpalli N., Sonti R. Drug metabolic stability in early drug discovery to develop potential lead compounds. *Drug Metabolism Reviews*. 2021. Vol. 53. P. 1–47.
26. Woolsey S. J., Mansell S. E., Kim R. B. CYP3A Activity and expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2015. Vol. 43, № 10. P. 1484–1490.
27. Vaja R., Rana M. Drugs and the liver URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7508170/> (Date of access: 07.11.2024).

28. Godfrey E. L., Kueht M. L., Rana A., Awad S. MELD-Na (the new MELD) and peri-operative outcomes in emergency surgery *American Journal of Surgery*. 2018. Vol. 216. P. 407–413. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2018.04.017
29. Soldatow V. Y., Lecluyse E. L., Griffith L. G., Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)*. 2013. Vol. 2, № 1. P. 23–39. DOI: 10.1039/C2TX20051A.
30. Donato M. T., Jover R., Gómez-Lechón M. J. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab*. 2013. Vol. 14, № 9. P. 946–968.
31. El Kayal W. M., Shtrygol S. Y., Zalevskiy S. V. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. *Eur J Med Chem*. 2019. Vol. 180. P. 134–142.
32. Shtrygol S., Zalevskiy S., Mishchenko M. Promising anticonvulsant N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-2-(2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-yl)acetamide: dose-dependent study and evaluation of anticonvulsant action spectrum in vivo and in silico. *Ceska Slov Farm*. 2022. Vol. 71, № 5. P. 224–233.
33. Mieszkowska A., Hemine K., Skwierawska A. Detoxification of the tricyclic antidepressant opipramol and its analog by UGT enzymes before and after activation by phase I enzymes in rat liver microsomes. *Chem. Pap*. 2021. Vol. 75. P. 4973–4978. DOI: 10.1007/s11696-021-01647-2.
34. Richardson S. J., Bai A., Kulkarni A. A., Moghaddam M. F. Efficiency in drug discovery: Liver S9 fraction assay as a screen for metabolic stability. *Drug Metabolism Letters*. 2016. Vol. 10, № 2. P. 83–90.
35. UGT inhibition studies in the presence or absence of alamethicin: Evaluation of UGT1A1 and UGT2B7 inhibition in HLM and recombinant enzymes
URL: <https://www.xenotech.com/wp->

- content/uploads/2015/10/XenoTech_UGT-Inhibition_ISSX.pdf (Date of access: 12.10.2024).
- 36.Miners J. O., Rowland A., Novak J. J. Evidence-based strategies for the characterisation of human drug and chemical glucuronidation in vitro and UDP-glucuronosyltransferase reaction phenotyping. *Pharmacol Ther.* 2021. Vol. 218. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107689.
- 37.Denisov I. G., Grinkova Y. V., McLean M. A. Midazolam as a Probe for Heterotropic Drug-Drug Interactions Mediated by CYP3A4. *Biomolecules.* 2022. Vol. 12, № 6. DOI: 10.3390/biom12060853.
- 38.CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay. URL: <https://surl.li/iumrqn> (Date of access: 15.11.2024).
- 39.Sigma Aldrich DeepWeb Product Document URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/322/358/hcs100.pdf> (Date of access: 15.11.2024)
- 40.Redalyc. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/919/91932969007.pdf> (Date of access: 15.11.2024).

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

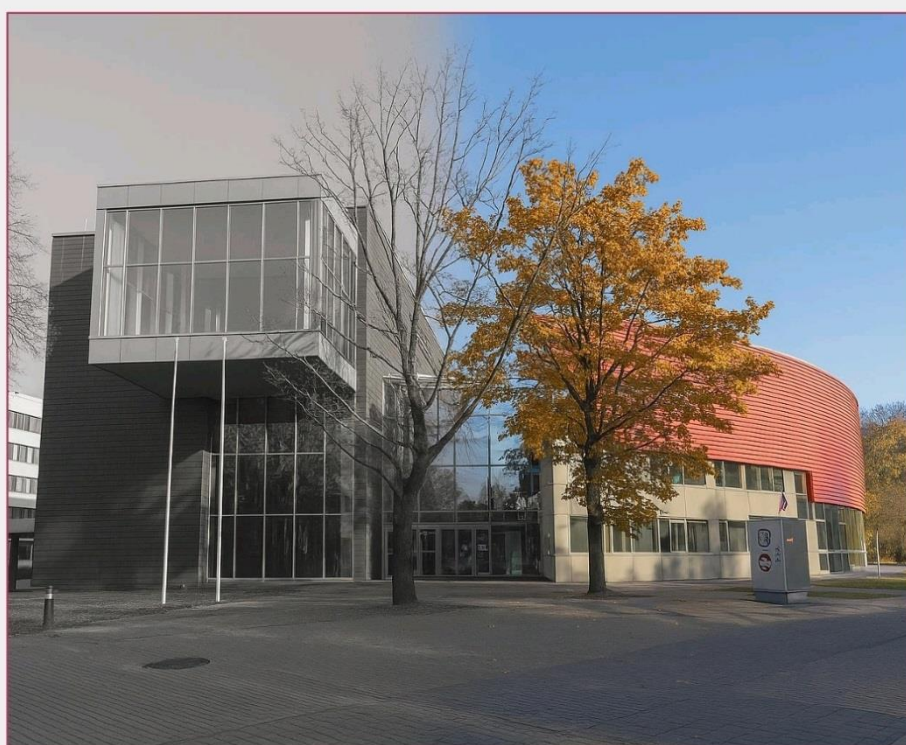


LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF PHARMACY



international
conference

ABSTRACT BOOK



**CONTEMPORARY PHARMACY:
ISSUES, CHALLENGES AND
EXPECTATIONS 2025**

April 10
Lithuania, Kaunas

Determination of the Hepatotoxicity of the New Anticonvulsant Drug Candidate Using the HepG2 Cell Line

Anastasiia Demko^{1*}, Hanna Severina¹, Tiina Sikanen², Päivi Järvinen², Victoriya Georgiyants¹

¹National University of Pharmacy, 53 Hryhorii Skovoroda St., 61002 Kharkiv, Ukraine

² University of Helsinki, Yliopistonkatu 4, 00100 Helsinki, Finland

*Corresponding author e-mail: demkoanastasiia@gmail.com

Background: Drug-induced liver injury is a key safety issue in drug development, causing many clinical trial failures and drug withdrawals. As the main site of drug metabolism, the liver is highly vulnerable to toxicity, especially from new compounds with unknown profiles. In vitro screening helps identify risks early, but traditional methods lack specificity and fail to predict late-onset toxicity. Human hepatoma cell lines like HepG2 provide a practical alternative due to their availability, reproducibility, and ease of use.

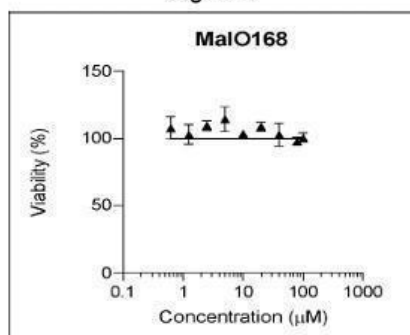
Aim(s): To evaluate the hepatotoxic potential of the new anticonvulsant drug candidate - 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)-N-[(2,4-dichlorophenyl)methyl]-acetamide (MAIO 168) using the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line as an in vitro model.

Methods: HepG2 cells (ATCC HB-8065) were cultured as 3D spheroids in 96-well U-bottom plates (Corning, Cat. No. 7007) at 200 cells per well in MEM with 10% FBS and incubated (37°C, 5% CO₂) for seven days. Cells were then exposed to MAIO 168 for 48 hours; controls contained 1% DMSO. Viability was assessed using CellTiter-Glo® 3D (Promega, Cat. No. G9681) per the manufacturer's protocol, measuring ATP levels via luminescence.

Results: Data analysis reveals no significant reduction in cell viability at concentrations up to 100 µM. At higher concentrations, drug precipitation was observed, potentially impacting cellular bioavailability, though without demonstrable cytotoxic effects.

Cell viability analysis showed variability due to spheroid displacement during plate transfer, typical for 3D cultures experiments, where mechanical manipulation can affect cell distribution. A replicated biological experiment confirmed these findings, validating the hepatotoxicity assessment methodology.

Figure 1



Conclusion: Three-dimensional HepG2 cell cultures are a promising in vitro model for assessing the hepatotoxicity of drugs. The absence of significant toxic effects of MAIO 168 under these experimental conditions indicates its safety in the early stages of research. Further studies will be aimed at a more detailed analysis of the metabolic profile of the drug and the assessment of additional markers of hepatotoxicity.

References:

1. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Cofield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology* [Internet]. 2006 Sep 1;80(9):580–604.
2. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay Instructions for Use of Products G9681, G9682 and G9683 [Internet]. Promega.co.uk. Available from: <https://www.promega.co.uk/resources/protocols/technical-manuals/101/celltiter-glo-3d-cell-viability-assay-protocol>
3. El Kayal WM, Shtrygol SY, Zalevskiy SV, Shark AA, Tsyvunin VV, Kovalenko SM, et al. Synthesis, in vivo and in silico anticonvulsant activity studies of new derivatives of 2-(2,4-dioxo-1,4-dihydroquinazolin-3(2H)-yl)acetamide. *Eur J Med Chem*. 2019;180:134-42.

ДОДАТОК Б



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ



СЕРТИФІКАТ УЧАСНИКА

Цим засвідчується, що

Demko A.A.

Scientific supervisors: Severina H.I., Sikanen Tiina

брав(ла) участь у роботі
XXXI Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»

В.о. ректора
Національного фармацевтичного
університету



Алла КОТВИЦЬКА

23-25 квітня 2025 р, м. Харків