

СПЕКТРАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМУ P450 ПРИ ВЗАЄМОДІЇ З ПРОПОКСАЗЕПАМОМ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТОМ

Вступ. Пропоксазепам (похідне бензодіазепіну) є новаторським анальгетиком, що одночасно гальмує гострий і хронічний біль, з компонентами протизапальної та протисудомної дій, які залежать від стану рецептора гамма-аміномасляної кислоти. Відомості про можливу взаємодію сполуки з іншими препаратами на рівні цитохрому P450 (СYP) на сьогодні відсутні.

Мета дослідження – вивчити показники спектральних змін загального СYP мікросом печінки щурів при взаємодії з пропоксазепамом та його 3-гідроксиметаболітом, що опосередковано може свідчити про взаємодію сполуки з іншими лікарськими засобами.

Методи дослідження. Досліди проведено на статевозрілих щурах лінії Вістар масою 150–180 г, яких поділили на дві групи: 1-ша – тварини, яким протягом 3 днів вводили фенобарбітал (80 мг/кг); 2-га – тварини, яким упродовж 3 днів вводили 3-метилхолантрен (40 мг/кг). Мікросоми печінки щурів ізолювали шляхом ультрацентрифугування постмітохондріальної фракції в середовищі, що містить 1,15 % KCl і 40 мМ трис-НСІ-буфер (рН 7,4), в ультрацентрифузі “Beckman” при 105 000 г. Мікросоми розводили 40 мМ трис-НСІ-буфером (рН 7,4) до вмісту білка 2,6 мг/мл. Пропоксазепам та його 3-гідроксиметаболіт розчиняли в метанолі до концентрації 30 мМ і додавали до 3 мл суспензії мікросом. Вміст СYP та його спектральні характеристики досліджували методом диференційної спектрофотометрії на спектрофотометрі “Aminco”.

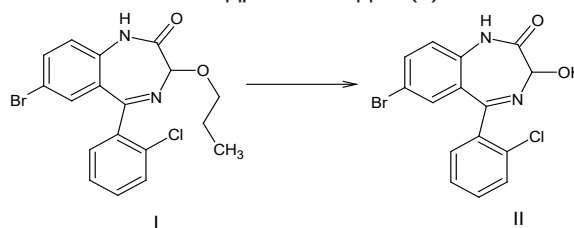
Результати й обговорення. Пропоксазепам (I) та 3-гідроксиметаболіт (II) при взаємодії із СYP печінки щурів, яким вводили фенобарбітал і 3-метилхолантрен, продемонстрували 2-й тип спектральних змін гемопротеїну, що є характерним при зв’язуванні сполук з гемовим залізом. Константи зв’язування I і II істотно відрізняються, що вказує на можливість взаємодії субстратів з різними ділянками СYP. Характерні точки (максимум, мінімум та ізобестика) спектра СYP були зміщені під час титрування II до догхвильової ділянки порівняно з I. Пропоксазепам та його метаболіт проявляли незначну спорідненість до мікросом щурів, які отримували різні індуктори, значення K_s були в межах $0,76 \cdot 10^4$ – $1,25 \cdot 10^4$ М.

Висновок. Кількісні показники інгібіторної активності I та II, визначені з використанням методу диференційної спектрофотометрії, є лише орієнтовними за своєю природою, але все ж можуть припускати принаймні значну можливість інгібіторної взаємодії при клінічному застосуванні ліків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пропоксазепам; СYP; мікросоми печінки щурів; спектральні зміни.

ВСТУП. Інноваційний анальгетичний засіб “Пропоксазепам”, який створено у Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського НАН України і ТДВ “ІНТЕРХІМ”, отримав дозвіл МОЗ України (наказ від 23 лютого 2021 р. № 310) на проведення 1-ї фази клінічних випробувань, які успішно завершилися, і розпочато 2-гу фазу досліджень (наказ МОЗ України від 29 липня 2022 р. № 1340). Основною мішенню сполуки для знеболювання є α_2 - та α_3 -субоддиниці рецепторів гамма-аміномасляної кислоти [1]. Сполука має фармакодинамічний профіль, відмінний від усіх анальгетиків, оскільки одночасно гальмує і гострий, і хронічний біль, та компоненти проти-

запальної і протисудомної дій [2]. За технологічними і терапевтичними показниками пропоксазепам є інноваційним засобом [3]. За умов *in vitro* пропоксазепам (I) продемонстрував [4] відносно високу метаболічну стабільність з ~90 % незміненої сполуки після 4 год інкубації з гепатоцитами людини. Основним виявленим метаболітом є 3-гідроксипохідне (II):

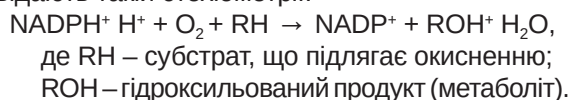


© М. Я. Головенко, В. Б. Ларіонов, І. П. Валіводзь, 2023.

Новий препарат повинен не лише демонструвати належну фармакологічну дію і достатню безпеку, але й уникати ризику взаємодії з іншими лікарськими засобами (ВЛЗ), що можуть серйозно вплинути на ефективність препаратів, які вводять одночасно. Ензими цитохрому Р450 (СYP) спричиняють більшість ВЛЗ, оскільки відіграють важливу роль у метаболізмі значної кількості ксенобіотиків, у тому числі й лікарських засобів, доступних зараз на ринку [5]. На сьогодні в людей ідентифіковано 57 генів СYP, однак понад 95 % схвалених Управлінням з контролю за продуктами й ліками (FDA) препаратів метаболізуються лише шістьма ізоформами СYP: СYP1A2, СYP2B6, СYP2C9, СYP2C19, СYP2D6 та СYP3A4 [6]. Основними причинами ВЛЗ є інгібування СYP (70 %) та індукція (23 %); таким чином, рекомендації FDA вимагають оцінки препаратів для інгібування СYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 і 3A4/5, а також для індукції СYP1A2, 2B6, 2C та 3A [7]. Інгібування або індукція СYP, викликані введеними препаратами, може призвести до небажаних побічних ефектів, пов'язаних з підвищенням концентрації в плазмі, або значного зниження ефективності, пов'язаної зі зменшенням концентрації в плазмі інших препаратів, які вводять одночасно. Тому багато фармацевтичних компаній проводять скринінгові тести для нових препаратів-кандидатів, щоб уникнути або послабити потенційні ВЛЗ.

Функціональна система СYP складається з гемового ензиму і його окисно-відновних партнерів, які містять залізо-сірчані білки та флавопротеїни, зі специфічними варіаціями в різних біологічних видах – від прокаріотів до еукаріотів і від рослин до тварин. Усі вони містять однаково простетичну групу гему (Fe – протопорфірин IX) із цистеїном, що бере участь у легуванні гемового заліза [8], та використовують подібний каталітичний цикл, який активує молекулярний кисень або перекис водню.

Реакції окиснення, які каталізує СYP, відповідають такій стехіометрії:



Каталітична активність СYP пов'язана з редокс-партнерськими білками, які переносять електрони від NADPH до гемового центру гемопротеїну [9].

Окиснення хімічної речовини за допомогою СYP є складним процесом, який полягає в перенесенні електронів, утворенні дуже реакційноздатного залізо-кисневого комплексу і розриві C-H та/або інших зв'язків [10]. Першим кроком у реакційному циклі, як правило, є зв'язування субстрату, оскільки присутність субстрату полег-

шує введення електрона у тривалентне залізо в деяких, але не в усіх випадках. Зв'язування субстратів також може відбуватися після початкового відновлення заліза [11], що призводить до зміни стану заліза з низького на високий спін (різницею спектри типу I), які пов'язані з частковим видаленням дистального ліганду (H₂O) з гемового заліза активного центру [12]. Деякі ліганди, переважно інгібітори активностей СYP, зв'язуються безпосередньо з гемовим залізом через основні атоми азоту, утворюючи так звані спектральні спектри типу II, але деякі з цих лігандів також можуть бути субстратами [13]. Зазначені подібності в структурі й каталізі реакцій дають можливість екстраполювати інформацію, отриману для одних ізоферментів СYP, на дослідження інших, а також зробити певні прогнози щодо їх функціональних властивостей лише на основі їх головних фізико-хімічних характеристик. Важливим є також те, що всі вони демонструють подібні спектроскопічні властивості, це дозволяє ідентифікувати даний ензим за його унікальною спектральною ознакою. До речі, завдяки цьому дані ензими отримали свою назву від слова "pigment" і довжини хвилі максимуму поглинання відновленої форми білка в комплексі з оксидом вуглецю при 450 нм – Р450 [14]. Дослідження зв'язування сполуки з СYP становить значний інтерес, оскільки розкриває деталі субстратної специфічності ензиму, незвичайної кінетики його окиснення (тобто кооперативності), особливостей будови активного центру та розуміння окремих етапів його каталітичного циклу. Спектральні дослідження СYP основані на наявності характеристичної для простетичної групи цих гемопротеїнів смуги поглинання світлової хвилі, що робить UV-Vis-спектроскопію домінуючою при розрахунку концентрації гемопротеїну, дослідженні фізико-хімічних властивостей, вивченні взаємодії не тільки із субстратами, але й індукторами та інгібіторами [15], що є важливим етапом у прогнозуванні ВЛЗ. Особливо це стосується незворотного гальмування активностей СYP.

Найбільш частим механізмом клінічно значущих ВЛЗ є пригнічення ізоферментів СYP. При цьому спостерігають зниження метаболізму комплексу препарат – субстрат інгібованого ізоферменту, що призводить до збільшення концентрації даної сполуки у плазмі та її токсичної дії [16]. Процес зниження активності СYP внаслідок безпосередньої його взаємодії з лікарським засобом починається з першої дози інгібітора, а початок і кінець інгібування корелюють з періодом напіввиведення цих препаратів.

Мета дослідження – вивчити показники спектральних змін загального СYP мікросом печінки

щурів при взаємодії з пропоксазепамом та його 3-гідроксиметаболітом, що опосередковано може свідчити про взаємодію сполуки з іншими лікарськими засобами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для дослідження використовували щурів-самців лінії Вістар масою 150–180 г, дотримуючись біоетичних принципів відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради ЄС про захист тварин, які використовуються з науковою метою [17]. Тваринам внутрішньочеревно протягом 3 днів вводили фенobarбітал (ФБ) (80 мг/кг) і 3-метилхолантрен (3-МХ) (40 мг/кг), розчинені у соняшниковій олії. Мікросоми печінки щурів ізолювали шляхом ультрацентрифугування постмітохондріальної фракції в середовищі, що містить 1,15 % KCl і 40 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,4), в ультрацентрифузі “Beckman” при 105 000 g. Мікросоми розводили 40 мМ трис-HCl-буфером (pH 7,4) до вмісту білка 2,6 мг/мл. Субстрати розчиняли в метанолі до концентрації 30 мМ і додавали до 3 мл суспензії мікросом. У контрольну кювету додавали рівну кількість метанолу. Після кожної добавки записували різницю в поглинанні між 390 і 420 нм. Вимірювання проводили при кімнатній температурі [18]. Вміст СУР та його спектральні характеристики досліджували методом диференційної спектрофотометрії на спектрофотометрі “Amipco” [14].

Сполуки I і II синтезовано у Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського НАН України, їх чистоту (>99,8 %) та ідентичність доведено низкою фізико-хімічних методів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Правильне віднесення окремих ізоформ СУР до певних метаболічних шляхів має велике значення, зокрема в раціональному прогнозуванні взаємодії між ліками. Нині використовують багато різних стратегій для однозначної ідентифікації ізоформ СУР, відповідальних за біотрансформацію терапевтичних засобів. До них належать застосування селективних хімічних інгібіторів ізоформ СУР, інгібіторних антитіл до СУР, дослідження з очищеними, відновленими ензимами та кореляція імунокількісних рівнів СУР і швидкості метаболізму [19]. Відсутність зразків печінки людини для досліджень взаємодії препаратів може бути компенсована мікросомами печінки щурів, що дозволяє прогнозувати відповідну залежність у людини [20].

Відповідно до публікації [21], загальна кількість СУР мікросом печінки щурів становить 0,65 нмоль/мг білка, що не завжди дає змогу визначити деякі кінетичні параметри ензиму. В нашому дослідженні ми використали принцип

індукції загальної кількості СУР класичними індукторами – фенobarбіталом і 3-метилхолантrenom. Відомо [22], що ФБ індукують такі ізоформи СУР мікросом печінки, як 1A2, 2B6, 2C9, 2C19 та 3A4/5. На відміну від ФБ, 3-МХ у процесі індукції СУР збільшує його загальну кількість тільки за рахунок ізоформи 1A2. Вміст СУР при індукції ФБ становив 1,3 нмоль/мг білка, 3-МХ – 0,98 нмоль/мг білка. У цьому випадку ми використовували певною мірою “коктейль” ізоформ СУР [23].

Цитохром P450 мікросом печінки щурів, яким вводили ФБ при взаємодії з I, давав максимум поглинання при 412 нм, мінімум – при 384 нм з ізобестичною точкою при 400 нм. Для II ці показники відповідали 415, 386 та 404 нм. Для спектра зв'язування гемопротейну печінки щурів, яким вводили 3-МХ, спостерігали подібну картину, але з деяким зсувом характеристичних точок. Характер взаємодії гемопротейнів з I та II відповідав 2-му, або так званому аніліновому, типу субстратного зв'язування (рис.). Він виникав при безпосередньому приєднанні субстрату до гемової групи.

Відомо [24], що характерною структурною особливістю СУР є так звана спінова рівновага, яка змінюється через взаємодію іона гемового заліза з лігандами, що супроводжується переходами між двома магнітними вихідними положеннями Fe^{3+} , тобто шестикоординаційного низькоспінового без субстрату та п'ятикоординаційного високоспінового, з'єднаного із субстратом. Спектру поглинання окисненої Fe^{3+} форми СУР властивий максимум спектральної смуги Сорє при 415–417 нм. Різні сполуки (субстрати), що взаємодіють із СУР, можуть викликати модифікацію у диференційних спектрах поглинання, що пов'язано зі зміною спінового стану гемового заліза [25]. Спектральні зміни 1-го типу характеризуються максимумом поглинання при довжині хвилі 390 нм та мінімумом – при 420 нм. Сполуки, що викликають ці зміни, переводять іон гемового заліза ензиму у високоспіновий стан, і, як правило, до таких сполук належать субстрати СУР. Спектральні зміни 2-го типу характеризуються максимумом поглинання при довжині хвилі в межах 425–440 нм та мінімумом – при 390–415 нм. До сполук, що спричиняють спектральні зміни цього типу, належать азотовмісні речовини, які здатні до координації з іоном гемового заліза. Деякі сполуки можуть викликати спектральні зміни так званого “модифікованого 2-го типу”, або “реверсивного 1-го типу”, що є дзеркальним відображенням спектральних змін 1-го типу [26]. Тому абсорбційну спектроскопію використовують для скринінгу потенційних субстратів чи інгібіторів СУР, що є важливим при прогнозуванні ВЛЗ.

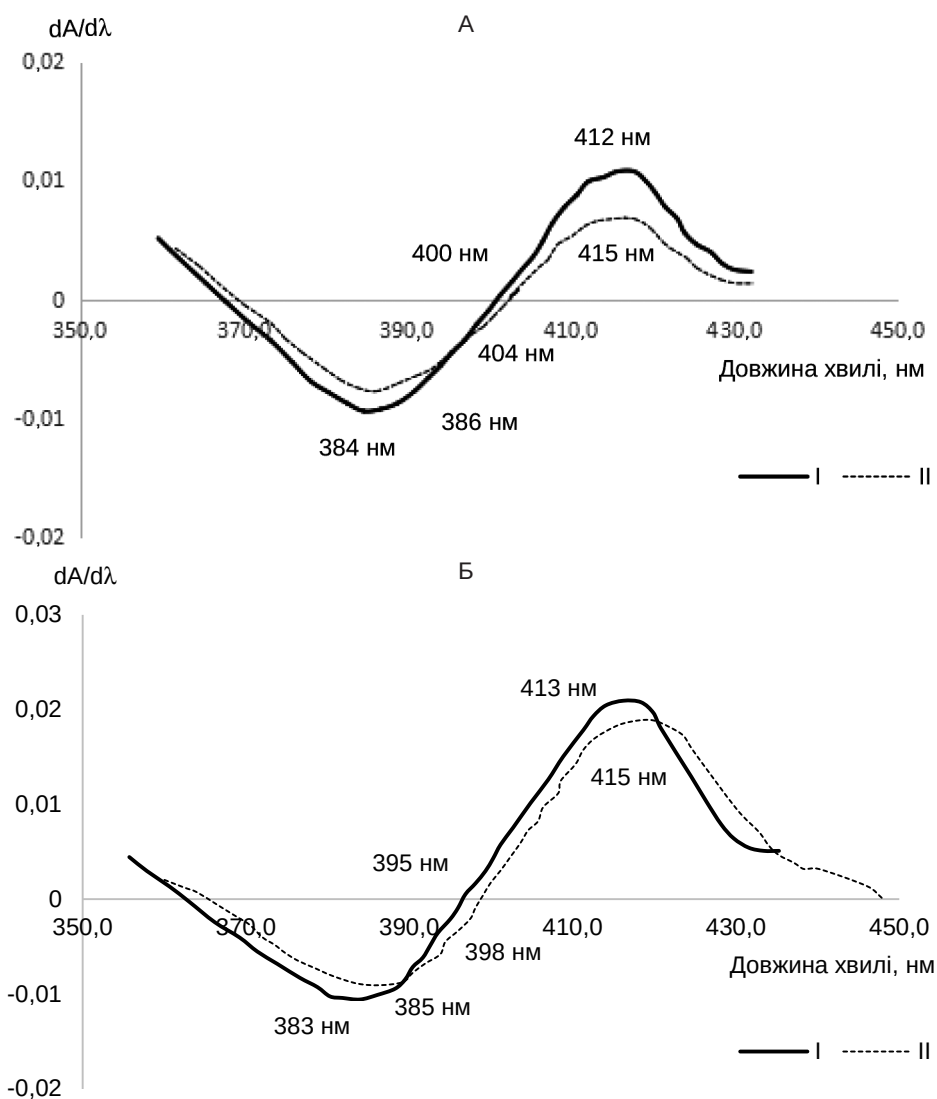


Рис. Диференційні спектри мікросом печінки щурів за умов індукції цитохрому Р450: А – фенобарбіталом; Б – 3-метилхолантреном і при додаванні пропоксазепаму (I) та його метаболіту (II).

Як свідчать результати вимірювання амплітуди спектральних змін комплексу гемопротейн – бензодіазепін, вони залежать від концентрації субстрату. Титрування бензодіазепінами мікросом печінки щурів, які отримали фенобарбітал, показало, що насичення ензиму настає при концентрації I 300 мкмоль, а II – 200 мкмоль. Звідси показники K_s та $\Delta D_{\text{макс}}$ для I і II, графічно визначені за методом Лайнуівера – Берка, значно відрізняються (табл.). При індукції монооксигеназ печінки тварин 3-МХ насичення гемопротейну настає при концентрації I близько 400 мкмоль, а II – приблизно 100 мкмоль. Одночасно змінюються оптичні властивості комплексу, що проявляється двократним зменшенням значення $\Delta D_{\text{макс}}$ для I та незначним збільшенням цього показника для II. Такі відмінності оптичних властивостей комплексу гемопротейну з I та II можуть бути викликані вмістом різних ізоформ CYP, які утворюються при індукції ФБ або 3-МХ.

Загалом як для I, так і для II відмічено низькі значення K_s , які не збігаються зі значеннями K_m , це свідчить про те, що дані сполуки зв'язуються з гемопротейном по двох центрах – гему й апоферменту. При взаємодії з першим спостерігають спектральні зміни 2-го типу, а з іншим – утворення комплексу субстрат – ензим, що забезпечує окисну трансформацію I та II у процесі ароматичного гідроксилування, тобто утворення мінорних метаболітів [4].

Відмінність спектральних характеристик (K_s , $\Delta D_{\text{макс}}$) комплексів, а також зміщення точок максимумів та мінімумів, що викликаються I і II, можуть бути зумовлені електронною структурою цих субстратів, яким властива наявність різних стеричних ділянок (бензольного кільця, конденсованого з гетероциклом, гетерокільця та вільного бензольного кільця). Це дає можливість молекулі бензодіазепіну взаємодіяти як із різними центрами зв'язування, так і з модифікаціями

Таблиця – Характеристика диференційних спектрів цитохрому P450 мікросом печінки щурів при взаємодії з I і II за умов індукції фенобарбіталом та 3-метилхолантrenom

Умова досліджу	Фенобарбітал		3-Метилхолантрен	
	I	II	I	II
Інтервал концентрацій, МКМОЛЬ	20–300	20–300	40–400	40–250
$\Delta D_{\text{макс}}$, нмоль, СУР	0,0014	0,0016	0,0006	0,0020
K_s , М	$0,76 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\lambda_{\text{мін}}$, нм	384	386	383	385
$\lambda_{\text{макс}}$, нм	412	415	413	415

гемопротейну, співвідношення яких і визначатиме тип взаємодії.

Встановлено, що для субстратів 2-го типу зв'язування значна роль в утворенні такого спектра належить атомам азоту, що безпосередньо взаємодіють електронною парою з гемовим залізом. На підставі отриманих даних можна припустити, що спостережувані для II зміщення точок максимуму і мінімуму в довгохвильову ділянку, а також відмінність у кінетичних параметрах зв'язування, порівняно з I, можуть бути викликані впливом гідроксигрупи, що зменшує електронну щільність гетерокільця, зокрема на атомах азоту (N^1 та N^4). При цьому може змінитися стан електронів гемового заліза, що впливає через аксіальні ліганди на апофермент. Це може спричинити конформаційні зміни макромолекули. Імовірно, гідроксильна група II може взаємодіяти з полярними групами прилеглих амінокислотних залишків, змінюючи тим самим положення площини порфіринового кільця, в результаті чого відбуватиметься взаємодія порфірину й амінокислотного ланцюга молекули СУР.

ВИСНОВКИ. Зв'язування субстрату із СУР – важливий крок у вивченні загального механізму каталізу ензиму. Не менш важливим є те, що отримані дані можуть слугувати доповненням до ензиматичних та фармакологічних методів дослідження з використанням оптичної абсорбційної спектроскопії. Спектри оптичного поглинання гему є чутливими до спінового стану гемового заліза, що відображається в характерних положеннях смуги Сорє в УФ-спектрах: 415–417 нм для низькоспінового СУР і 390–394 нм – для високоспінового.

Пропоксазепам (I) та його 3-гідроксиметаболіт (II) при взаємодії із СУР печінки щурів, яким вводили фенобарбітал і 3-метилхолантрен, продемонстрували 2-й тип спектральних змін гемопротейну, що є характерним при зв'язуванні сполук з гемовим залізом. Константи зв'язування I і II істотно відрізняються, що вказує на можливість взаємодії субстратів з різними ділянками СУР. Характерні точки (максимум, мінімум та ізобестика) спектра СУР були зміщені під час титрування II до довгохвильової ділянки порівняно з I. Пропоксазепам та його метаболіт проявляли незначну спорідненість до мікросом щурів, які отримували різні індуктори, значення K_s були в межах $0,76 \cdot 10^{-4}$ – $1,25 \cdot 10^{-4}$ М.

Отримані дані свідчать про можливе незворотне інгібування активностей СУР сполуками I і II. При такому типі інгібування сполука або її проміжні метаболіти ковалентно зв'язуються з гемом СУР, тим самим інактивуючи його, і відновлення активності залежить від періоду синтезу нового ензиму. Отже, кількісні показники інгібіторної активності пропоксазепаму та його метаболіту, визначені з використанням методу диференційної спектрофотометрії, є лише орієнтовними за своєю природою, але все ж можуть припускати принаймні значну можливість інгібіторної взаємодії при клінічному застосуванні ліків. Механізми інгібування можуть бути дуже складними і потребувати поглиблених експериментів, щоб розкрити деталі інгібування на підставі дослідів *in vitro* та *in vivo*. Слід також підкреслити, що концентрація лікарського засобу, що взаємодіє з ензимом, може відрізнитися від концентрації в плазмі крові, яку необхідно буде отримати під час клінічних випробувань і пізніших заходів моніторингу.

З цієї причини константу інгібування або такі відповідні показники, як K_s та $\Delta D_{\text{макс}}$ і фактичну терапевтичну концентрацію препарату в крові необхідно враховувати в подальших інтерпретаціях отриманих даних.

Роботу виконували в межах фінансування дослідницького проєкту “Визначення безпечності новаторського анальгетичного засобу пропоксазепаму при його хімічній та біологічній взаємодії з іншими препаратами в умовах політерапії” у Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського НАН України за бюджетною програмою КПКВК 6541230 (Постанова НАН України від 28.12.2022 р. № 414, № держреєстрації: 0123U100824).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Reder A. Subunit-dependent interaction of propoxazepam and its metabolite with the γ -aminobutyric acid type A receptor / A. Reder, V. Larionov, M. Golovenko // EUREKA: Health Sciences. – 2022. – No. 5. – P. 10–18.
2. Pharmacological analysis of neurochemical antinociceptive mechanisms of propoxazepam action / N. I. Voloshchuk, A. S. Reder, M. Y. Golovenko [et al.] // Pharmacology and Drug Toxicology. – 2017. – No. 1. – P. 3–11.
3. Use of 7-bromo-5-(4-chlorophenyl)-3-propoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-one for inhibition of neuropathic pain and seizures of different etiology / A. S. Reder, S. A. Adronati, M. Ya. Golovenko [et al.] // Patent No. : US 11,304,956 B2(45) Date of Patent : Apr. 19. – 2022.
4. Golovenko M. Ya. Species differences metabolism *in vitro* model of a novel analgesic propoxazepam with polymodal mechanism of action / M. Ya. Golovenko, A. S. Reder, V. B. Adronati // GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. – 2022. – 2, No. 19. – P. 1–7.
5. Головенко Н. Я. Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P-450 / Н. Я. Головенко // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 3. – С. 22–41.
6. Sim S. C. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects / S. C. Sim, M. Ingelman-Sundberg // Hum. Genom. – 2010. – 4, No. 4. – P. 278–281.
7. Administration FaD. *In vitro* metabolism- and transporter-mediated drug-drug interaction studies guidance for industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-metabolism-and-transporter-mediated-drug-drug-interaction-studies-guidance-industry-2017>.
8. Cederbaum A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications / A. I. Cederbaum // Redox Biol. – 2015. – No. 4. – P. 60–73.
9. Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase / M. Sugishima, H. Sato, Y. Higashimoto [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – 7. – P. 2524–2529.
10. Cytochrome P450 is present in both ferrous and ferric forms in the resting state within intact *Escherichia coli* and hepatocytes / W. A. Johnston, D. J. Hunter, C. J. Noble [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – No. 286. – P. 40750–40759.
11. Schenkman J. B. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 / J. B. Schenkman, H. Remmer, R. W. Estabrook // Mol. Pharmacol. – 1967. – No. 3. – P. 113–123.
12. Type II ligands as chemical auxiliaries to favor enzymatic transformations by P450E1 / A. Meuard, C. Fabra, Y. Huang, K. Auclair // Chembiochem. – 2012. – No. 13. – P. 2527–2536.
13. Guengerich F. P. Human cytochrome P450 enzymes bind drugs and other substrates mainly through conformational-selection modes / F. P. Guengerich, C. J. Wilkey, T. N. Phan // J. Biol. Chem. – 2019. – 28, No. 294. – P. 10928–10941.
14. Omura T. The Carbon monoxide-binding pigment of liver Microsomes. Evidence for its hemoprotein nature / T. Omura, R. Sato // The Journal of Biological Chemistry. – 1964. – 7, No. 239. – P. 2370–2378.
15. Mak P. J. Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms / P. J. Mak, I. G. Denisov // BBB Proteins Proteomics. – 2018. – No. 1866. – P. 178–204.
16. Hakkola J. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update / J. Hakkola, J. Hukkanen, M. Turpeinen, O. Pelkonen // Archives of Toxicology. – 2020. – No. 94. – P. 3671–3722.
17. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. 20.10.2010. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
18. Differentiation between type I and type II substrate binding to cytochrome P450 by temperature studies / G.-R. Jiinig, R. Misselwitz, D. Zirwer [et al.] // CCACAA. – 1977. – 2, No. 49. – P. 263–270.
19. *In vitro* methods for assessing human hepatic drug metabolism: Their use in drug development / S.A. Wrighton, M. Vandenbranden, J. C. Stevens [et al.] // Drug Metab Rev. – 1993. – No. 25. – P. 453–483.
20. Paine A. J. Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance / A. J. Paine // Human Exp. Toxicol. – 1995. – No. 14. – P. 1–7.
21. Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, quinea pigs, dogs, monkeys, and humans / T. Shimada, M. Mimura, K. Inoue [et al.] // Arch. Toxicol. – 1997. – No. 71. – P. 401–408.
22. Dieter Schmidt. Enzyme induction with antiepileptic drugs: Cause for concern? / M. J. Brodie, S. Mintzer, A. M. Pack [et al.] // Epilepsia. – 2013. – 1, No. 54. – P. 11–27.
23. Li G. High-throughput cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing drug-drug and drug-botanical interactions / G. Li, K. H. Dejan, N. R. van Breemen // Drug Metabolism and Disposition. – 2015. – 11, No. 43. – P. 1670–1678.
24. Isin E. M. Substrate binding to cytochromes P450 / E. M. Isin, F. P. Guengerich // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – 6, No. 392. – P. 1019–1030.
25. Luthra A. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates / A. Luthra, I. G. Denisov, S. Sligar // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2011. – 1, No. 507. – P. 26–35.
26. Temperature-dependent and induced spectral characteristics and transitions of liver microsomes / J. B. Schenkman, D. L. Cinti, S. Orrenius [et al.] // Biochemistry. – No. 11. – P. 4243–4251.

REFERENCES

1. Reder, A., Larionov, V., Golovenko, M. (2022). Subunit-dependent interaction of propoxazepam and its metabolite with the γ -aminobutyric acid type a receptor. *EUREKA: Health Sciences*, 5, 10-18.
2. Voloshchuk N.I., Reder A.S., Golovenko M.Y., Taran I.V., Pashinska O.S. (2017). Pharmacological analysis of neurochemical antinociceptive mechanisms of propoxazepam action. *Pharmacology and Drug Toxicology*, (1), 3-11.
3. Reder A.S., Adronati S.A., Golovenko M.Ya., Pavlovski V.I., Kabanova T.A., Khalimova O.I., Larionov, V.B., Voloshchuk, N.I. (2022). Use of 7-bromo-5-0-chlorophenyl)-3 propoxy-1,2-dihydro-3H-1,4 benzodiazepin- 2-one for inhibition of neuropathic pain and seizures of different etiology. *Patent No. US 11,304,956 B2(45) Date of Patent : Apr. 19.*
4. Golovenko, M.Ya., Reder, A.S., Adronati, S.A. (2022). Species differences metabolism *in vitro* model of a novel analgesic propoxazepam with polymodal mechanism of action. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19 (02), 1-7.
5. Golovenko, N.Ya. (2001). Some aspects of biochemistry, chemistry, molecular biology and genetics of cytochrome. *Modern Problems of Toxicology*, 3, 22-41 [in Russian].
6. Sim, S.C., & Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genom.*, 4 (4), 278-281.
7. Administration FaD. *In vitro* metabolism- and transporter- mediated drug-drug interaction studies guidance for industry. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-metabolism-and-transporter-mediated-drug-drug-interaction-studies-guidance-industry-2017>.
8. Cederbaum, A.I. (2015). Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol.*, 4, 60-73.
9. Sugishima, M., Sato, H., Higashimoto, Y., Harada, J., Wada, K., Fukuyama, K., & Noguchi, M. (2014). Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 111 (7), 2524-2529.
10. Johnston, W.A., Hunter, D.J., Noble, C.J., Hanson, G.R., Stok, J.E., Hayes, M.A., De Voss, J.J., Gillam, E.M. (2011). Cytochrome P450 is present in both ferrous and ferric forms in the resting state within intact *Escherichia coli* and hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 286, 40750-40759.
11. Schenkman, J.B., Remmer, H., & Estabrook, R.W. (1967). Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.*, 3, 113-123.
12. Meuard, A., Fabra, C., Huang, Y., and Auclair, K. (2012). Type II ligands as chemical auxiliaries to favor enzymatic transformations by P4502E1. *ChemBiochem.*, 13, 2527-2536.
13. Guengerich F.P., Wilkey, C.J., Phan, T.N. (2019). Human cytochrome P450 enzymes bind drugs and other substrates mainly through conformational-selection modes. *J. Biol. Chem.*, 294 (28), 10928-10941.
14. Omura, T., & Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry.*, 239 (7), 2370-2378
15. Mak, P.J., & Denisov, I.G. (2018). Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *BBB Proteins Proteomics*, 1866, 178-204.
16. Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of Toxicology*, 94, 3671-3722.
17. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*. 20.10.2010. URL: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
18. Jiinig, G.-R., Misselwitz, R., Zirwer, D., Buder, E., Rein, H., Ruckpaul, K. (1977). Differentiation between type I and type II substrate binding to cytochrome P450 by temperature studies. *CCACAA.*, 49 (2), 263-270.
19. Wrighton, S.A., Vandenbranden, M., Stevens, J.C., Shipley LA, Ring BR. (1993). In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: Their use in drug development. *Drug Metab Rev.*, 25, 453-483.
20. Paine, A.J. (1995) Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Human Exp. Toxicol.*, 14, 1-7.
21. Shimada, T.M., Mimura, K., Inoue, S., Nakamura, H., Oda, S., Ohmori H. Yamazaki. (1997). Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, quinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Arch. Toxicol.*, 71, 401-408.
22. Brodie, M.J., Mintzer, S., Pack, A.M., Gidal, B.E., Vecht, C.J. (2013). Dieter Schmidt. Enzyme induction with antiepileptic drugs: Cause for concern? *Epilepsia*, 54 (1), 11-27.
23. Li, G., Dejan, K.H., van Breemen, N.R. (2015). High-throughput cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing drug-drug and drug-botanical interactions. *Drug Metabolism and Disposition.*, 43 (11), 1670-1678.
24. Isin, E.M., & Guengerich, F.P. (2008). Substrate binding to cytochromes P450. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392 (6), 1019-1030.
25. Luthra, A., Denisov, I.G., & Sligar, S. (2011). Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 507 (1), 26-35.
26. Schenkman, J.B., Cinti, D.L., Orrenius, S., Moldeus, P., Kraschnitz, R. (1972). Temperature-dependent and induced spectral characteristics and transitions of liver microsomes. *Biochemistry*, 11, 4243-4251

SPECTRAL CHARACTERISTICS OF CYTOCHROME P450 IN THE INTERACTION WITH PROPOXAZEPAM AND ITS METABOLITE

Summary

Introduction. Propoxazepam (a 1,4-benzodiazepine derivative) is a novel analgesic that simultaneously inhibits acute and chronic pain with anti-inflammatory and anticonvulsant components that depend on the state of the gamma-aminobutyric acid receptor. There is currently no information on the possible interaction of the compound with other drugs at the cytochrome P-450 (CYP) level.

The aim of the study – to study the indicators of spectral changes of total CYP of rat liver microsomes when interacting with propoxazepam and its 3-hydroxymetabolite, which may indirectly indicate the interaction of the compound with other drugs.

Research Methods. Experiments were conducted on mature Wistar rats weighing 150–180 g, which were divided into two groups: 1 – animals that were treated with phenobarbital (80 mg/kg) for 3 days; 2 – which was treated with 3-methylcholanthrene (40 mg/kg) for 3 days. Rat liver microsomes were isolated by ultracentrifugation of the postmitochondrial fraction in a medium containing 1.15 % KCl and 40 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 in a Beckman ultracentrifuge at 105,000 g. Microsomes were diluted with 40 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 to a protein concentration of 2.6 mg/ml. Propoxazepam and its 3-hydroxymetabolite were dissolved in methanol to a concentration of 30 mM and added to 3 ml of microsome suspension. The content of CYP and its spectral characteristics were studied by the method of differential spectrophotometry on the "Aminco" spectrophotometer.

Results and Discussion. Propoxazepam (I) and 3-hydroxymetabolite (II) interacting with CYP of the liver of rats administered phenobarbital and 3-methylcholanthrene demonstrated the 2nd type of spectral changes in hemoprotein. The binding constants of I and II considerably differ, which points to the possibility of interaction of substrates with different areas of CYP. The characteristic points (maximum, minimum and isobestic) of CYP spectrum were displaced during II titration to the longwave region as compared with I. Propoxazepam and its metabolite showed negligible affinity to microsomes of rats treated with different inductors, K_s values were in the range $0.76 \cdot 10^{-4}$ – $1.25 \cdot 10^{-4}$ M.

Conclusions. Quantitative indicators of the inhibitory activities of I and II using the method of differential spectroscopy are only indicative in nature, but still can suggest at least a significant possibility of inhibitory interaction in clinical use of drugs.

KEY WORDS: Propoxazepam; CYP; rat liver microsomes; spectral changes.

Отримано 19.04.23

Адреса для листування: М. Я. Головенко, Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: n.golovenko@gmail.com.