

Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ –
гр. Варна

Факултет по Фармация

Катедра по Фармацевтична химия

Ивелин Росенов Илиев

СИНТЕЗ, ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ И ИЗСЛЕДВАНЕ НА
ТОКСИЧНОСТТА НА ЕСТЕРИ НА БЕКСАРОТЕН

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по научна
специалност: 7.3 „Фармацевтична химия“

Научни ръководители:

Доц. Св. Георгиева д.ф.

Доц. Я. Колева д.х.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	9
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	11
III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ	12
1. МАТЕРИАЛИ	12
2. МЕТОДИ	14
2.1. Обща методика за получаване на естери на Бексаротен	14
2.2. Изчисляване на теоретичен, практически и процентен добив	15
2.3. Проследяване на реакционния процес посредством ТСХ анализ	15
2.4. Охарактеризиране на новосинтезираните аналози посредством инструментални методи	16
2.4.1. Охарактеризиране на новополучените аналози посредством точка на топене	16
2.4.2. Инфрачервена спектроскопия	16
2.4.3. UV-VIS спектроскопия	17
2.4.3.1. Приготвяне на стандартен разтвор на Бексаротен за UV-VIS спектроскопски анализ	17
2.4.3.2. Приготвяне на работни разтвори на Бексаротен за количествен UV-VIS спектроскопски анализ	18
2.4.3.3. Приготвяне на тестови проби от продукти на синтез	18
2.4.3.4. Валидиране на UV-VIS спектралния метод	18
2.4.4. Разработване на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните Бексаротенови производни	20
2.5. <i>In silico</i> анализ за прогнозиране на биологичният ефект и теоретична оценка на токсичността на Бексаротен, новосинтезирани Бексаротенови естери и техните метаболити	21
2.5.1. QSAR Toolbox софтуер	21
2.5.2. Molinspiration софтуер - правило на Липински	23

2.5.3. PreADME/Tox софтуер _____	24
2.6. Определяне на обща токсичност посредством <i>in vivo</i> модели _____	25
2.6.1. Експериментални животни _____	25
2.6.2. Приготвяне на разтвори _____	26
2.6.3. Експериментален протокол _____	26
2.7. Статистическа обработка на данните _____	27
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ _____	28
1. ПОЛУЧАВАНЕ НА ЕСТЕРИ НА БЕКСАРОТЕН _____	28
2. ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА РЕАКЦИОННИЯ ПРОЦЕС ПОСРЕДСТВОМ ТСХ АНАЛИЗ _____	32
3. СТРУКТУРНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ ПРОИЗВОДНИ ПОСРЕДСТВОМ ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ _____	35
3.1. Охарактеризиране на производни посредством температура на топене _____	35
3.2. Инфрачервена спектроскопия _____	36
3.3. UV-VIS спектроскопия _____	43
3.3.1. Валидиране на UV-VIS спектрален метод _____	43
3.3.2. Определяне на абсорбционен максимум на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен _____	45
3.3.3. Сравнителен анализ за влиянието на разтворителите върху абсорбционните максимуми _____	48
3.4. HPLC метод за установяване на чистотата на новосинтезираните производни _____	51
3.4.1. Модифициране на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните естери на Бексаротен _____	52
3.4.2. HPLC анализ на Бексаротен и негови аналози _____	52
4. <i>IN SILICO</i> МЕТОДИ ЗА ПРОГНОЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ЕСТЕРИ НА БЕКСАРОТЕН _____	57

4.1. Прогнозиране на потенциалната метаболитна активност на Бексаротен, новосинтезирани естери на Бексаротен и техните метаболити посредством QSAR Toolbox	57
4.1.1. Симулатор на чернодробен in vivo метаболизъм при плъхове	58
<i>4.1.1.1. Свързване с ДНК и протеини</i>	66
4.1.2. Симулатор на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове	69
<i>4.1.2.1. Свързване с ДНК и протеини</i>	73
4.1.3. Симулатор на кожен метаболизъм	74
<i>4.1.3.1. Свързване с ДНК и протеини</i>	76
4.2. Прогнозиране на орална активност на Бексаротен, Бексаротенови метаболити и новосинтезирани естери посредством Molinspiration софтуер	77
4.2.1. Определяне на орална активност чрез Molinspiration софтуер	77
4.2.2. Определяне на биоактивност чрез Molinspiration софтуер	78
4.3. Прогнозиране на абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен посредством PreADME/Tox софтуер	80
5. ОБЩОТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ НА ВЕЩЕСТВАТА, НАБЛЮДАВАНИ IN VIVO ПРИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД ВЪВЕЖДАНЕ НА БЕКСАРОТЕН И ЕТИЛОВ ЕСТЕР НА БЕКСАРОТЕН	85
5.1. Ефекти на Бексаротен и новосинтезираният етилов естер на Бексаротен върху телесните маси при експериментални гризачи	85
5.2. Ефекти на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен върху основни биохимични параметри	87
5.2.1. Чернодробни ензими	88
5.2.2. С-реактивен протеин	90
5.3. Макроскопски оглед на органите след еднократно приложение на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен	91
V. ИЗВОДИ	93
VI. ПРИНОСИ	95

VII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ	96
1. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	96
2. ДРУГИ УЧАСТИЯ	97
VIII. ФИНАНСИРАНЕ	98
IX. ПРИЛОЖЕНИЯ	99
ПРИЛОЖЕНИЕ № 1	99

Дисертационния труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра по Фармацевтична химия при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 192 страници, 63 фигури, 37 таблици и 1 приложение с 5 фигури. Цитирани са 213 заглавия.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в Катедра по Фармацевтична химия при Медицински университет – Варна.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 04.05.2023 г. от 13:00 часа в платформата Webex на открито заседание на Научното жури.

Списък с често използвани съкращения

RDH – ретиноид дехидрогеназа
RA – ретиноева киселина
RARs – рецептори за ретиноева киселина
ATRA – all-trans-ретиноева киселина
13cRA – 13-cis-ретиноева киселина
CTCL – кожен Т-клетъчен лимфом
MDS – миелодиспластичен синдром
VPA – валпроева киселина
AML – остра миелоидна левкемия
ALDH – алдехид дехидрогеназа
9cRA – 9-cis-ретиноева киселина
ADH – алкохол дехидрогеназа
Treg – регулаторна Т клетка
COVID-19 – коронавирусна болест 2019
SARS-CoV-2 – тежък остър респираторен синдром - коронавирус 2
IFN – интерферон
MS – множествена склероза
MeV – вирус на морбили
HREs – елементи на хормонален отговор
PPAR – рецептор, активиран от пероксизомен пролифератор
LXR – чернодробен X рецептор
DBD – ДНК свързващ домейн
LBD – лиганд-свързващ домейн
RXRs – ретиноидни X рецептори
RAREs - елемент за отговор на ретиноева киселина
THR – тиреоиден хормон
NIP – нежелана лекарствена реакция
FDA – администрация по храните и лекарствата
EGFR – рецептора на епидермален растежен фактор
PARP – поли-(АДФ-рибоза) полимераза
NF – ядрен фактор

HPLC – високоефективна течна хроматография

AD – болестта на Алцхаймер

PD – болестта на Паркинсон

ЦНС - централната нервна система

ADME - абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ретиноидите са клас химични съединения, производни на витамин А. Както природните, така и синтетичните ретиноиди имат ключова роля в зрението, ембрионалното развитие, регулацията на клетъчната пролиферация и диференциация, хомеостазата и различни аспекти на метаболизма.

Ретиноидите намират приложение за лечение на ограничен брой заболявания, включително кожни заболявания като акне и псориазис, и за лечение на някои видове рак. Въпреки добрите терапевтични ефекти, приложението им е ограничено поради техния токсикологичен профил. Намалването на нежеланите лекарствени реакции при синтетичните производни на витамин А води до нарастването на употребата на ретиноиди като терапевтични средства, а също и до по-доброто разбиране на техния механизъм на действие.

Обширни проучвания върху механизма на действие на ретиноидите водят до охарактеризирането на ядрените рецептори за ретиноевата киселина (RARs) и ретиноидните X рецептори (RXRs). Тези рецептори са членове на суперсемејството стероидни/тиреоидни рецептори и регулират транскрипцията на таргетни гени след свързването им с лиганд. Биологичната активност на рецепторите за ядрени хормони, съчетана със способността за директно регулиране на тяхната активност чрез малки молекули, прави това суперсемејство цел за откриване на нови лекарства.

Бексаротенът е синтетичен ретиноиден аналог със селективност към трите изоформи на ретиноидните X рецептори и принадлежи към група съединения, наречени ретиноиди. Тези рецептори играят роля в регулирането на клетъчния растеж и диференциацията чрез способността си да регулират транскрипцията. Селективността на Бексаротен към определена изоформа може да осигури терапевтична специфичност и/или намалена токсичност. Бексаротен инхибира растежа на туморни клетъчни линии както от хематопоетичен, така и от сквамозен клетъчен произход. Също така индуцира апоптозата в редица туморни клетъчни линии. Одобрен е за лечение на кожен T-клетъчен лимфом (CTCL), както като орална, така и като дермална лекарствена форма. Наблюдават се терапевтични ефекти при лечение на рак на гърдата и на белите дробове. В редица проучвания се описва потенциала на Бексаротен в лечението на неврологични заболявания, като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и шизофрения.

Един от подходите за оптимизиране на лекарствения профил на лекарствата е прилагането на така наречения „предлекарствен дизайн“. Чрез него се цели подобряването на физико-химичните, фармакокинетичните, фармакологичните, токсикологичните и дори органолептичните свойства на молекулата.

Предлекарството е биологично неактивно съединение, което се метаболизира в тялото до активното лекарство. Основна тенденция в разработването на предлекарства е получаването на естери.

Естеразите, които присъстват навсякъде в тялото, включително в черния дроб, кръвта и други тъкани, бързо хидролизират естерите до освобождаване на активното лекарство.

Предлекарствата могат да бъдат класифицирани като биопрекурсори, класически предлекарства, таргетни лекарства, смесени предлекарства и ко-лекарства. Разликата между отделните видове е носителят на лекарството.

Въпреки всички трудности, които се срещат в предлекарствения дизайн, разработването на предлекарства е по-бърза и по-осъществима стратегия от търсенето на изцяло нов терапевтично активен агент с подходящи ADMET свойства.

Основен проблем е предсказването на нивата на биоконверсия и фармакологичните и/или токсикологичните ефекти на предлекарствата. Скоростта на хидролиза и биоконверсия може да бъде повлияна от различни фактори като възраст, здравословно състояние и пол.

Структурата на Бексаротен дава възможност за прилагане на стратегията за предлекарствен дизайн. Потенциалното му приложение в онкологията и възможността му да модулира редица физиологични ефекти дава основание за синтез, охарактеризиране и изследване на нови терапевтични приложения на нови аналози на Бексаротен.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата научна разработка е да бъдат получени, структурно охарактеризирани и изследвани група нови, не описани в литературата Бексаротенови естерни производни и да бъде изготвен токсикологичен профил на ретиноидните аналози.

Във връзка с изпълнението на поставената цел, се предвижда да бъдат изпълнени следните задачи:

1. Да се разработи подходяща методика за синтез на нови естерни производни на антинеопластичния препарат Бексаротен.

2. Да се разработи подходящ метод за проследяване протичането на реакцията на естерификация на Бексаротен.

3. Да се проведе качествено охарактеризиране на получените производни на Бексаротен чрез прилагането на следните инструментални методи за анализ, включващи:

- Температура на топене;
- ИЧ спектроскопия;
- UV-VIS спектроскопия.

4. Да се разработи HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните производни.

5. Да се извърши теоретична оценка на токсичността на Бексаротен, неговите метаболити и новосинтезираните производни, използвайки *in silico* методи.

6. Да се определи общата токсичност на новосинтезирани производни на Бексаротен посредством *in vivo* модели.

III. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

1. МАТЕРИАЛИ

Бексаротен (Free acid, Fluorochem); метилов алкохол (99.99 %, HPLC grade, Fisher Chemical); етилов алкохол ($\geq 99.8\%$, Analytical reagent grade, Fischer Chemical); 1-пропанол ($\geq 99\%$ (GC), purum, Sigma-Aldrich); 1-бутанол ($\geq 99.5\%$ (GC), Sigma-Aldrich); оксалил хлорид (98%, Sigma-Aldrich); тионил хлорид (99.5+%, Sigma-Aldrich); сярна киселина (95-97%, Chem-Lab); алуминий на прах, ледена оцетна киселина ($\geq 99\%$, Fischer Chemical); амоняк (25%, Sigma-Aldrich); бутанол (anhydrous, 99.8% Sigma-Aldrich); ацетон ($\geq 97\%$, Sigma-Aldrich); хлороформ (anhydrous, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich); петролеев етер (80-100 °C, Fischer Chemical); етил ацетат ($\geq 99.8\%$, Fischer Chemical); хексан (99% HPLC, Lab-Scan); диетилов етер (99.5+%, Chem-Lab), формалдехид (37%, Chem-Lab); вода (HPLC grade, Fisher Chemical); Tween 20 (USP-NF, BP, Ph. Eur., ХИМТЕКС ООД – Димитровград), ацетонитрил ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich), диметил сулфоксид (99.9% for spectroscopy, Thermo Scientific), метанол (99.9% Extra Dry, Acros Organics).

При претегляне на необходимите количества за работа е използвана аналитична везна Ohaus Explorer Analytical – със софтуер SmartText™ 2.0.

По време на синтеза е използвана магнитна бъркалка – Nahita Blue digital magnetic stirrer с нагряване, модел 692/1.

При разработване на тънкослойната хроматография е използвана плака DC-Fertigfolien ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ с дебелина на слоя 0.20 mm, импрегнирана с флуоресцентен индикатор UV₂₅₄.

За визуализиране на плаките, използвани при изработването на тънкослойната хроматография на анализирани вещества е използвана UV светлина на UV лампа Nahita.

За определяне на температура на топене се използва апарат за измерване на температура на топене BUCHI Labortechnik AG M-565, Flawil/Switzerland.

Ултразвукова вана UST1-100t, SIEL ООД.

Инфрачвените спектри в интервала 4000-500 cm⁻¹ са снети на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър. Използвайки ATR – приставка със Smart iTR адаптер.

UV- VIS спектрите са записани с помощта на UV-VIS спектрофотометър T60UV в диапазон на дължина на вълната от 190 до 400 nm на UVWin Software 6.0.

За разработването на HPLC метод е използван апарат за високоефективна течна хроматография (HPLC) Thermo Scientific модел Spectra SYSTEM HPLC с ръчен инжектор, UV-VIS детектор модел Spectra SYSTEM UV2000 и Флуоресцентен детектор модел Spectra SYSTEM FL3000. За целта на анализа е използвана колона Synergi 4u Hydro – RP 80A (250 x 4.00 mm), защитена с предколона Synergi 4u Hydro – RP 80A (250 x 4.00 mm). Системният контрол, събирането на данните и анализът им са извършени с помощта на софтуера за хроматографски данни ChromQuest, версия 4.2.34. Аналитична везна Sartorius A200S; ултразвукова вана UST1-100t, SIEL ООД.

OECD (Q)SAR Application Toolbox е софтуерно приложение за оценка на свойствата на химични вещества, на база тяхната молекулна структура. Софтуерът оценява опасността от различни химични вещества, същевременно намалява времето за изследване, разходите и изпитванията върху опитни животни. По време на OECD (Q)SAR Application Toolbox анализа е използвана компютърна конфигурация COMPAQ Presario SQ61 с процесор AMD Turion™ II Dual-Core Mobile M500 2.20 GHz.

Molinspiration е специализиран софтуер за химична информатика в, разработен на Java. Инструментите на Molinspiration са независими от платформата и могат да се изпълняват на всяка PC, Mac, UNIX или LINUX машина. По време на Molinspiration анализа е използвана компютърна конфигурация COMPAQ Presario SQ61 с процесор AMD Turion™ II Dual-Core Mobile M500 2.20 GHz.

PreADME/Tox е уеб-базирано приложение за прогнозиране на абсорбция, дистрибуция, метаболизъм, екскреция и токсичност и за изграждане на библиотека с молекули, наподобяващи лекарства. По време на PreADME/Tox анализа е използвана компютърна конфигурация COMPAQ Presario SQ61 с процесор AMD Turion™ II Dual-Core Mobile M500 2.20 GHz.

По време на *in vivo* анализа за обща токсичност са използвани плъхове порода Wistar на 8-10 седмици със средно тегло около 210 g. За анестезия на плъховете е използван диетилов етер (99.5+% Chem-Lab). За прерязване на подезичната вена е използвана права ножици за дисекция 11.5 cm с остър връх, а за дисекция - прави ножици тъп-тъп връх 20 cm. За събирането на кръвта са използвани вакутейнери 3 ml VACUSERA K2E K2EDTA. Плъховете са евтаназирани хуманно. Събраните органи се съхраняват в стерилни контейнери във формалдеhid (37%, Chem-Lab).

2. МЕТОДИ

2.1. Обща методика за получаване на естери на Бексаротен

За синтезирането на естерите на Бексаротен е спазена следната методологична схема:

В едногърлена облодънна колба с вместимост 100 ml снабдена с обратен хладник, се поставят предварително претеглен с точност до ± 0.0001 g, 0.03 g Бексаротен. Към него се добавя алкохол в количество достатъчно да разтвори Бексаротена. Разбъркването на сместа се извършва с помощта на магнитна бъркалка, със скорост на разбъркване 500 rpm и нагряване до пълното разтваряне на Бексаротена и получаването на абсолютно бистър хомогенен разтвор.

Към така получения разтвор се прибавя бавно, на капки, 0.4 ml оксалил хлорид. След добавяне на цялото количество оксалил хлорид, разтворът се подлага на непрекъснато разбъркване и нагряване. Реакционните условия за провеждане на синтеза и използваните алкохоли са представени в Таблица 3. В края на синтеза, след темпериране разтворът остава бистър и в колбата се отделя утайка. Полученият разтвор се суши на вакуум изпарител Heidolph Hei-VAP Expert до пълното изпаряване на разтворителя.

Таблица 3. Реакционни условия и използвани алкохоли за получаването на естери на Бексаротен.

<i>Алкохол</i>	<i>Температура</i>	<i>Скорост на разбъркване</i>	<i>Реакционно време</i>
<i>Метанол</i>	40 °C	500 rpm	2 h
<i>Етанол</i>	60 °C	500 rpm	2 h
<i>1-пропанол</i>	60 °C	500 rpm	2 h
<i>1-бутанол</i>	60 °C	500 rpm	3 h

Сушенето на пробите се извършва при различни условия според алкохола, използван за синтеза. Условията на сушене на пробите са представени на Таблица 4.

Таблица 4. Условия за изпаряване на разтворителя чрез вакуум изпарител.

<i>Алкохол</i>	<i>Температура</i>	<i>Скорост на разбъркване</i>	<i>Налягане</i>	<i>Време</i>
<i>Метанол</i>	50 °C	100 rpm	194 mbar	15 min
<i>Етанол</i>	50 °C	100 rpm	95 mbar	15 min
<i>1-пропанол</i>	50 °C	100 rpm	25 mbar	20 min
<i>1-бутанол</i>	50 °C	100 rpm	16 mbar	20 min

2.2. Изчисляване на теоретичен, практически и процентен добив

Теоретичният добив се отнася до количеството продукт, което трябва да се получили след пълното протичане на химичната реакция.

Практичен добив се нарича полученият след отчитане на загубите по време на синтез добивът. Той дава информация за това какво количество продукт се получава при влагане на точно определени количества изходни вещества.

Отношение между практичния и теоретичния добив, изразени в проценти се нарича процентният добив. Изчислява се посредством следната формула:

$$\%Д = \frac{ПД}{ТД} \times 100 ,$$

където:

%Д – процентен добив на получения в резултат на синтеза продукт;

ПД – практически добив;

ТД – теоретичен добив.

2.3. Проследяване на реакционния процес посредством ТСХ анализ

Хроматографията представлява физичен метод за разделяне на органични съединения, основан на различното разпределение на компонентите между две фази, едната от които е неподвижна (стационарна), а другата – подвижна (ПФ).

Тънкослойната хроматография (ТСХ) е метод с широко приложение във фармацевтичната практика, използван както за идентификация на вещества, така и за тяхното количествено определяне. Могат също да се провеждат тестове за чистота, както и за проследяване хода на химичните реакции. Този хроматографски метод притежава

редица предимства, като висока чувствителност, възможност за определяне на малки количества компоненти в сложни смеси, експресност, непосредствена визуална представа за разделяните вещества и най-вече простота на изпълнение.

За проследяването реакционния процес на естерификация на Бексаротен е разработен тънкослойно хроматографски метод. При приготвянето на подвижната фаза се използва разтворител или смес от разтворители, като амоняк, бутанол, ацетон, хлороформ, хексан, етил ацетат и петролеев етер в различни комбинации и съотношения.

Изчезването на хроматографското петно на изходния реагент Бексаротен от реакционната смес, спрямо стандарт Бексаротен, се използва за определяне края на естерификационния процес.

Анализът се провежда на UV-плаки DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ с дебелина на слоя 0.20 mm импрегнирани с флуоресентен индикатор UV₂₅₄. Детекцията се осъществява с UV светлина на UV лампа Nahita.

2.4. Охарактеризиране на новосинтезираните аналози посредством инструментални методи

2.4.1. Охарактеризиране на новополучените аналози посредством точка на топене

Точката на топене на веществото е температурата, при която то променя състоянието си от твърдо в течно. При тази температура твърдата и течната фаза съществуват в равновесие. Точката на топене на веществото зависи от налягането и обикновено се определя при стандартно налягане, като 1 атмосфера или 100 kPa. За определяне на температура на топене на Бексаротен и новосинтезираните му естери се използва апарат за измерване на температура на топене BUCHI Labortechnik AG M-565, Flawil/Switzerland.

2.4.2. Инфрачервена спектроскопия

Един от основните фармакопейни инструментални методи за определяне на идентичност и охарактеризиране на чисти субстанции и новосинтезирани съединения е Инфрачервената спектроскопия (IR спектроскопия или вибрационна спектроскопия). Тя отчита взаимодействието на инфрачервеното лъчение с молекулите чрез абсорбция,

излъчване или отражение. За качествено идентифициране на химични вещества или техни функционални групи анализът може да се извърши в твърда, течна или газообразна форма. За осъществяване на анализ посредством инфрачервена спектроскопия се използва метод на директно снемане на спектри посредством ATR приставка със Smart iTR адаптер.

Инфрачвените спектри са снети в интервала $4000-500\text{ cm}^{-1}$ на апарат Nicolet iS10 FT-IR спектрометър.

2.4.3. UV-VIS спектроскопия

UV-VIS спектроскопията във видимата и ултравиолетовата област е вид електромагнитна спектроскопия, която изследва взаимодействието между светлината и материята. Това е както качествен, така и количествен метод, който измерва до каква степен химическо вещество абсорбира светлина. UV-VIS спектроскопията се основава на поглъщането на ултравиолетова или видима светлина от химически съединения, което води до получаването на различни спектри.

Този спектрален метод има редица предимства пред останалите методи, а именно: универсалност, чувствителност, селективност, точност, лесен начин на работа и пробоподготовка. Електронните спектри се наблюдават във видимата (380 – 780 nm) и близката UV (200 – 380 nm) област на електромагнитния спектър.

Качественото охарактеризиране е извършено чрез отнемане на спектрите на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен и определяне на абсорбционните им максимуми.

Спектрите са записани с помощта на UV-VIS спектрофотометър T60UV в диапазон на дължина на вълната от 190 до 400 nm през интервал от 1 nm на UVWin Software 6.0.

Извършен е сравнителен анализ за влияние на разтворителя върху абсорбционните максимуми.

Разработен и валидиран е метод за количествено определяне на Бексаротен.

2.4.3.1. Приготвяне на стандартен разтвор на Бексаротен за UV-VIS спектроскопски анализ

За приготвяне на стандартен разтвор на Бексаротен се претеглят 10.0 mg сертифицирана стандартна субстанция на Бексаротен на аналитична везна с точност ± 0.0001 g. В мерителна колба с обем 25 ml се поставят 10 ml метанол преди добавянето на стандартна субстанция. Със същия разтворител колбата се допълва до марката. Полученият основен разтвор е с концентрация 0.4 mg/ml.

2.4.3.2. Приготвяне на работни разтвори на Бексаротен за количествен UV-VIS спектроскопски анализ

От получения в т. 2.4.3.1. стандартен разтвор на Бексаротен се приготвят работни стандартни разтвори в концентрационен интервал от 1.84 до 5.20 $\mu\text{g/ml}$ чрез подходящи разреждания. По пет независими абсорбционни измервания са проведени за всеки един работен разтвор.

2.4.3.3. Приготвяне на тестови проби от продукти на синтез

На аналитична везна с точност ± 0.0001 g е претеглена 10.0 mg проба. Към нея се добавя 10 ml метанол. Полученият разтвор се обработва в ултразвукова вана в продължение на 10 минути и се филтрува през мембранен филтър Ministar® Syringe 28 mm с размер на порите 5 μm . В мерително колба от 25 ml се прибавят 10 ml метанол. Към нея количествено се прехвърля филтратът. Обемът на колбата се довежда до марката с метанол. Полученият разтвор е с концентрация 0.4 mg/ml. Чрез подходящи разреждания на основния разтвор се приготвят тестовите проби.

2.4.3.4. Валидиране на UV-VIS спектралния метод

Проведена е процедура по валидиране за доказване приложимостта на метода. Валидирането включва определяне на следните аналитични параметри:

- Линеиност на стандартната права;
- Прецизност;
- Точност;
- Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ).

Посочените характеристики са съобразени с изискванията на ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

- *Линейност на стандартната права*

Линейността е интервалът от концентрации на анализирувания компонент, в който сигналът от детектора е в линейна зависимост от концентрацията му. За построяване на стандартната права е приготвен основен стандартен разтвор на Бексаротен с концентрация 0.4 mg/ml. От него чрез разреждане се получават седем работни разтвора с концентрации 1.84, 2.40, 2.96, 3.52, 4.08, 4.64 и 5.20 µg/ml. Абсорбцията на получените работни разтвори се измерва петкратно. Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права и корелационния коефициент R^2 .

- *Прецизност*

Прецизността е параметър, показващ вариацията в стойностите на паралелни измервания на една и съща проба, получени при определени условия. Количествена мярка за оценка на прецизността е стандартното отклонение (SD), изчислено на база стойностите от n брой измервания, както и относителното стандартно отклонение (RSD). Оценени са повторемостта (последователно петкратно анализиране на три концентрационни нива, в рамките на деня, при едни и същи аналитични условия, от един оператор) и възпроизводимостта в рамките на лабораторията (последователно петкратно анализиране на три концентрационни нива, в различни дни).

- *Точност*

Точността е степента на съвпадение на резултата от измерването с истинската стойност на измерената величина. Оценката на точността се прави чрез абсолютна или относителна грешка, които показват доколко средният резултат се отклонява от истинската стойност. Определя се стойността на изместване (bias), както и относителното отклонение в проценти (b%), отчитайки реалната стойност на стандартната субстанция на всяка една от анализираните проби. Проведено е петкратно измерване на абсорбцията при седемте концентрационни нива.

- *Граница на количествено определяне (LOQ)*

Границата на количествено определяне е най-малкото количество от анализа, което методът може да определи количествено с достатъчно точност и прецизност. Границата на количествено определяне е концентрацията на анализа, даваща сигнал 10 пъти по-силен от фоновия шум, т.е. съотношение сигнал/шум = 10. Обикновено LOQ съответства на най-ниската концентрация от калибровъчната графика.

- *Граница на откриване (LOD)*

Границата на откриване показва най-ниското количество вещество в пробата, което може да бъде открито, но не и количествено определено с точна стойност. В много случаи границата на откриване е концентрацията на анализа, даваща сигнал 3 пъти по-силен от фоновия шум, т.е. съотношението сигнал/шум = 3 (или стандартното отклонение от измерване на празната проба).

2.4.4. Разработване на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните Бексаротенови производни

Апаратура и хроматографски условия:

Анализът е извършен с помощта на апарат за високо-ефективна течна хроматография (HPLC) Thermo Scientific модел Spectra SYSTEM HPLC с ръчен инжектор, UV-VIS детектор модел Spectra SYSTEM UV2000 и Флуоресцентен детектор модел Spectra SYSTEM FL3000. За целта на анализа е използвана колона Synergi 4u Hydro – RP 80A (250 x 4.00 mm), защитена с предколона Synergi 4u Hydro – RP 80A (250 x 4.00 mm). Системният контрол, събирането на данните и анализът им са извършени с помощта на софтуера за хроматографски данни ChromQuest, версия 4.2.34.

Условия на хроматографската система:

- Подвижна фаза - 60 % метанол и 40 % ацетонитрил;
- Скорост на потока – 1.3 ml/min;
- UV детекция – при 260 nm;
- Температура на хроматографската колона – 40 °C;
- Температура на ръчен инжектор – 25 °C;
- Обем на пробата за анализ – 20.0 µl.

Анализът е осъществен в изократичен режим с общо времетраене 15 минути.

Основният стандартен разтвор на Бексаротен за провеждане на хроматографския анализ е приготвен чрез разтваряне на подходящо количество от субстанцията в точно определен обем 99.99 % HPLC чист метанол.

2.5. *In silico* анализ за прогнозиране на биологичният ефект и теоретична оценка на токсичността на Бексаротен, новосинтезирани Бексаротенови естери и техните метаболити

Терминът *in silico* произлиза от компютърния компонент силиций, следователно *in silico* методите се отнасят до методи или прогнози, използващи изчислителни подходи. *In silico* методите могат да правят бързи прогнози за голям набор от съединения с висока производителност.

In silico фармакологията (известна още като изчислителна фармакология) е бързо развиваща се област. Тя се занимава с разработването на софтуерни технологии за улавяне, анализиране и интегриране на биологични и медицински данни от много различни източници. По-конкретно определя използването на тази информация при създаването на изчислителни модели или симулации, които могат да се използват за правене на прогнози, предлагане на хипотези и в крайна сметка предоставяне на открития или напредък в медицината и терапията.

2.5.1. QSAR Toolbox софтуер

Софтуера OECD (Организация за икономическо сътрудничество и развитие) (Q)SAR ((Количествени) връзки структура-действие) Toolbox (версия 4.5) е предназначен за оценка на риска от химични съединения. Оценката на риска се извършва на базата на прогнозираните метаболитни промени на химичната структура на съединенията. Нежеланите реакции или токсичността на винаги се дължат на основното съединение. Често те са резултат от биотрансформацията му до активна такава.

При различните биологични видове, органи и дори при различни клетки се наблюдава различна метаболитна трансформация.

Биотрансформацията на химичните вещества често водят до образуването на биологично активни метаболити. Определянето на метаболитите експериментално е

трудемък, скъп и често не достатъчно информативен процес. Това прави математичните модели в метаболитното прогнозиране много приложими.

Използването на алтернативни методи на тестовете с животни, като QSAR Toolbox намалява броя на изпитванията с животни и в същото време се намаля времето, необходимо за изследването, както и разходите по необходимите животни.

Документираните метаболитните пътища в базата данни на QSAR Toolbox софтуера включват метаболизма на над 200 органични вещества в организма на бозайници. Това улеснява достъпа до информация за различни класове химични съединения, с разнообразни функционални групи включително алифатни въглеводороди, халогенирани въглеводороди, алициклични пръстени, фурани, ароматни въглеводороди и халоароматични съединения, нитропроизводни, амини, и др. Токсичността, получена вследствие на метаболитна активация може да се прогнозира от получените данни от метаболитните модели.

- *Симулатор на чернодробен in vivo метаболизъм на плъхове*

Симулаторът на чернодробен *in vivo* метаболизъм на плъхове представлява електронно проектиран набор от 671 структурни, йерархично подредени абиотични и ензимни трансформационни реакции, които са характерни за метаболизма за *in vivo* експериментални системи като гризачи (най-вече плъхове). Основната приложимост на този симулатор е свързана с възпроизвеждането, както и с прогнозирането на реакциите на метаболитно активиране и пътищата на ксенобиотиците, които могат да предизвикат *in vivo* генотоксични ефекти.

- *Симулатор на чернодробен метаболизъм от S9 фракцията на плъх*

In vitro метаболитният симулатор на чернодробен метаболизъм на плъх представлява електронно проектиран набор от 551 структурни, йерархично подредени реакции на биотрансформация, които са характерни за метаболизма за *in vitro* експериментални системи като чернодробни микростоми на гризачи (предимно плъхове) и S9 фракция. Основната приложимост на този симулатор е свързана с възпроизвеждането, както и с прогнозирането на реакциите на метаболитно активиране и пътищата на ксенобиотиците, които могат да предизвикат *in vitro* генотоксични ефекти като бактериална мутагенност и хромозомни аберации.

- *Симулатор на кожен метаболизъм*

Симулаторът на кожен метаболизъм имитира метаболизма на химичните съединения в кожата. Съществува хипотеза, че ензимите в кожата могат да метаболизират ксенобиотици, абсорбирани през нея чрез реакции, аналогични на тези, определени в черния дроб. Симулаторът е разработен като опростен симулатор на чернодробен метаболизъм на бозайници. Симулаторът на кожения метаболизъм съдържа списък от йерархично подредени главни трансформации, които могат да бъдат разделени на два основни типа – определящи скоростта и неопределящи скоростта.

- *Свързване с ДНК от OASIS*

Този анализ е базиран на модела за мутагенност на Амес, част от системата OASIS TIMES. Анализът се състои от 85 структурни предупреждения, отговорни за взаимодействието с ДНК, анализирана в модела за мутагенност на Амес. Анализът изследва наличието на сигнали в целевите молекули, които могат да взаимодействат с ДНК.

- *Свързване с протеини от OASIS*

Този анализ изследва наличието на определени структури в целевите молекули, отговорни за взаимодействието с протеините. Списъкът от 112 структурни предупреждения е разделен на 11 механични домейна. Всеки от механичните домейни е разделен на повече от 2 механистични предупреждения. Резултатът от анализа присвоява цел към съответното структурно предупреждение, механистични предупреждения и домейн.

2.5.2. Molinspiration софтуер - правило на Липински

Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) предлага широка гама от софтуерни инструменти за химична информатика, поддържащи манипулиране и обработка на молекули, включително преобразуване на SMILES и SD файлове, нормализиране на молекули, генериране на тавтомери, фрагментиране на молекули, изчисляване на различни молекулни свойства, необходими в QSAR, молекулярно

моделиране и дизайн на лекарства, висококачествено изобразяване на молекули, инструменти за молекулярни бази данни, поддържащи търсене на субструктура и сходство. Софтуера поддържа също виртуален скрининг, прогнозиране на биоактивност и визуализация на данни.

Molinspiration софтуерът се използва за изчисляване на важни молекулярни свойства (miLogP, обща полярна повърхност, молекулна маса, брой донори и акцептори на водородни връзки, брой въртящи се връзки), както и за прогнозиране на биоактивност за най-важните лекарствени цели (лингади за G-протеин свързани рецептори (GPCR), модулатори на йони канални, киназни инхибитори, лиганди за ядрени рецептори, протеазни инхибитори, ензимни инхибитори).

За да бъде определено лекарствоподобие се прилагаме правилото на Липински. което се използва, за да се определи дали химично съединение с фармакологична или биологична активност има химични и физични свойства, които биха го направили вероятно перорално активно лекарство при хора. Правилото описва молекулни свойства, важни за фармакокинетиката на лекарството в човешкото тяло, включително тяхната абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция (ADME). Правилото обаче не предсказва дали дадено съединение е фармакологично активно.

Правилото на Липински гласи, че едно перорално активно лекарство има не повече от едно нарушение на следните критерии:

- Не повече от 5 донора на водородни връзки (общия брой на връзките азот-водород и кислород-водород);
- Не повече от 10 акцептора на водородни връзки (всички азотни или кислородни атоми);
- Молекулна маса по-малка от 500 далтона;
- Коефициент на разпределение октанол-вода ($\log P$), който не надвишава 5.

По-нататъшни изследвания добавиха още две условия: полярна повърхностна площ (PSA) от 140 \AA^2 и < 10 въртящи се връзки, които корелират съответно с пропускливостта и гъвкавостта на лекарството.

2.5.3. PreADME/Tox софтуер

Фармакокинетичните параметри на абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност (ADME/T) на Бексаротен и новосинтезираните естери на

Бексаротен са оценени с помощта на софтуера PreADME/T (<https://preadmet.qsarhub.com/adme/>).

PreADME/Tox е уеб-базирано приложение за прогнозиране на абсорбция, дистрибуция, метаболизъм, екскреция и токсичност и за изграждане на библиотека с молекули, наподобяващи лекарства, използвайки *in silico* метод.

Над 50% от кандидатите за лекарства се провалят поради недостатъци в ADME/Tox по време на разработка. Това налага използването на компютърни методи за определяне тези показатели с цел отхвърляне на съединенията, които е вероятно да се провалят.

2.6. Определяне на обща токсичност посредством *in vivo* модели

Основен подход за определяне на обща токсичност на новосинтезирани съединения с фармакологичен потенциал е чрез пилотни изследвания с експериментални животни. Те могат да дадат насока за проявата на конкретен тип токсичност макроскопски и чрез биохимични изследвания. Тези проучвания са фундаментални при определяне на безопасността, както и за начална ефективна доза на субстанциите.

Настоящото изследване е насочено към II^{pa} фаза от предклиничния етап в създаването на нови лекарства, а именно фармакологичен скрининг на новосинтезираните от нашия екип естерни производни на Бексаротен.

За определяне на общата токсичност на новосинтезираните естери на Бексаротен е използван етиловият естер. Получените резултати от проведените *in silico* анализи го определят като най-малко токсичен и с най-добри физико-химични характеристики.

2.6.1. Експериментални животни

За определяне на обща токсичност е приложен *in vivo* модел. Използвани са мъжки полове зрели плъхове, порода Wistar, на възраст 8-10 седмици, с тегло от 180 до 260 g. Гризачите се държат в клетка за животни с 12-часов дневен и нощен цикъл на осветление, с достъп до вода и храна *ad libitum*, осигурени оптимална температура, влажност и вентилация на помещенията съобразно изискванията за работа с експериментални животни (Наредба № 20 от 01 Ноември 2012 г. за Минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в сила от 01 Ноември 2013 г., издадена

от Министерството на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09 Ноември 2012 г.) и в съответствие с правилата на Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – гр. Варна. Научната работа е извършена с разрешението на Българската Агенция по Безопасност на Храните (БАБХ) № 307/29.06.2022 г.

За целите на проучването са използвани 34 плъха, разделени в 5 групи:

- Контроли - (n = 6);
- Вехаротене - 500 mg/m² (n = 6);
- Вехаротене - 750 mg/m² (n = 6);
- Етилов естер на Вехаротене - 500 mg/m² (n = 8);
- Етилов естер на Вехаротене - 750 mg/m² (n = 8).

2.6.2. Приготвяне на разтвори

Контролната група е третирана с 25% воден разтвор на етанол с няколко капки суспендиращ агент Tween 20. Приготвени са общо 4 разтвора – 2 на Бексаротен и 2 на етилов естер на Бексаротен с концентрация 16.19 mg/ml и 24.28 mg/ml в обем 34 ml. Субстанциите, средно 1 ml на плъх, са приложени в гореспоменатите дози чрез интрагастрална сонда под формата на суспензии след третиране с ултразвук за 5 минути.

Приложената доза за третиране на плъховете е изчислена съобразно препоръчителната начална еднократната дневната доза на Бексаротен - 300 mg/m² телесна повърхност (Кратка характеристика на продукта – Targretin 75 mg меки капсули).

Телесната повърхност на плъховете е изчислена по формулата на Мостелър [213]:

$$\text{Телесна Повърхност} = \sqrt{\frac{\text{размер,cm} \times \text{тегло,kg}}{3600}}, \text{ m}^2$$

2.6.3. Експериментален протокол

След приложението на Бексаротен и неговия етилов естер плъховете са оставени под наблюдение за период от 72 часа при нормални условия, за да се отчете нивото на лисващ ефект и/или летална доза. Периодично плъховете са наблюдавани за промени в поведението и леталитет.

След 72 часа плъховете са анестезирани с диетилов етер и е събрана кръв за биохимични изследвания след прерязване на подезичната вена във вакутейнери 5 ml VACUSERA CAT Serum GEL & Clot Activator. В края на експеримента плъховете са евтаназирани чрез прекършване на врата, съобразено с изискванията и организацията на работа във Вивариума при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

В медицинска лаборатория „Лина“ – Варна са извършени следните лабораторни изследвания по стандартни протоколи: определяне на аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT) и С-реактивен протеин (CRP) за проследяване наличие на чернодробна токсичност.

При дисекция на плъховете е направен макроскопски оглед на всички органи и са взети сърце, черен дроб и бъбрек за хистологично изследване, което ще бъде описано в следваща научна работа.

2.7. Статистическа обработка на данните

Статистическият анализ е извършен, използвайки вградени функции на Excel за изчисляване на стандартно отклонение и регресионен анализ ANOVA. При анализа се приема допустимо ниво на доверителна вероятност $p < 0.05$, разделено на три възходящи класа: $p < 0.05$, $p < 0.01$ (висока сигнификантност) и $p < 0.001$ (много висока сигнификантност).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

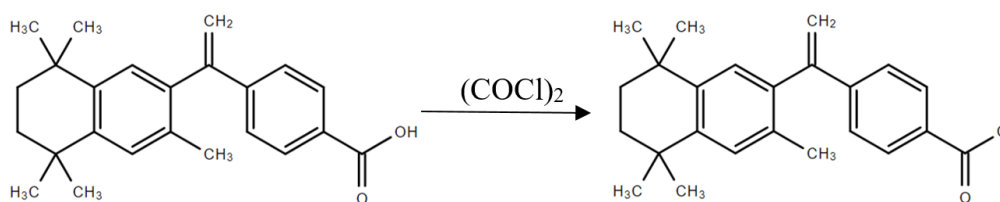
За да бъде постигната поставената цел на настоящата разработка е проведен синтез на естери на Бексаротен.

1. ПОЛУЧАВАНЕ НА ЕСТЕРИ НА БЕКСАРОТЕН

Един от методите за получаване на по-реактивоспособния киселинен хлорид и в следствие на естер, е взаимодействието между карбоксилна киселина и тионил хлорид (SOCl_2). Този подход се оказва неуместен за синтез на естерни производни на Бексаротен, тъй като в хода на реакцията се получават много странични продукти, които значително затрудняват процеса на пречистване на новосинтезираното съединение. В допълнение тионил хлоридът присъства в Списъка със Социално Опасни за Здравето Вещества, защото е реактивен и корозивен. Това налага прилагането на друг подход за синтез на естери на Бексаротен.

Получаването на киселинни хлориди може да се извърши и с оксалил хлорид ($(\text{COCl})_2$). Той се прилага също и за окисление на алкохоли, формилиране на арени, получаване на оксалатни диестери и други.

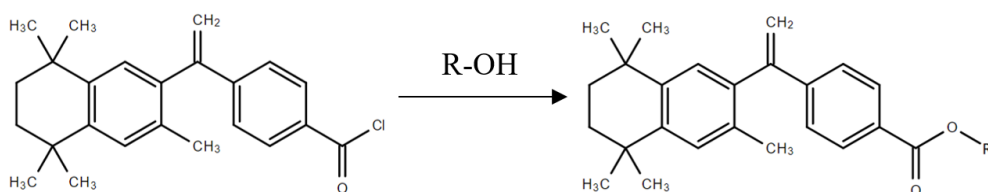
Получаването на киселинен хлорид се явява междинен етап в синтеза на естери на Бексаротен. Общата схема за получаване на киселинен хлорид на Бексаротен е представена на Фигура 38.



Фигура 38. Обща схема за получаване на киселинен хлорид на Бексаротен.

При директно взаимодействие на оксалил хлорид и Бексаротен в среда от алкохол протича процес на естерификация, при който Бексаротен реагира с оксалил хлорид до образуване на ацилхлорид и впоследствие естер. *In situ* полученият киселинен хлорид е изключително реактивоспособен и при взаимодействие с алкохол води до образуване на

съответния естер. Реакционната схема на получаване на естер на Бексаротен от киселинен хлорид на Бексаротен е представена на Фигура 39.



Фигура 39. Обща схема за получаване на естер на Бексаротен.

В процеса на естерификация могат да участват различни по структура алкохоли. За естерификацията са използвани прости алифатни алкохоли. Поради голямата реактивоспособност на вторичните и третичните алкохоли са използвани само първични алкохоли за синтеза на естери на Бексаротен. Всички те са лесно достъпни, което ги прави подходящи реагенти за получаването на естери.

За целите на настоящия труд са използвани първични алкохоли. Техните структури и наименование са представени в Таблица 5.

Таблица 5. Структура на алкохоли, използвани за синтез на естери на Бексаротен.

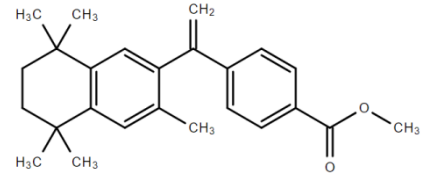
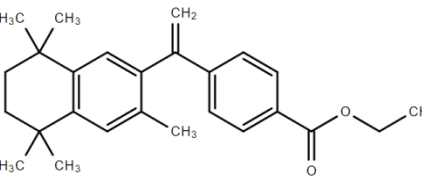
Естери на Бексаротен	Използвани алкохоли	
	Структура	Наименование
E1		Метанол
E2		Етанол
E3		1-пропанол
E4		1-бутанол

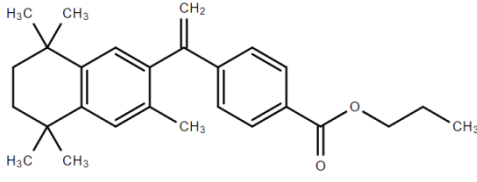
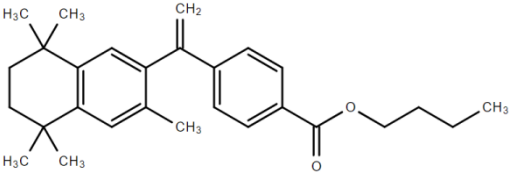
В резултат на описания метод на естерификация и използваните алкохоли в синтеза са получени 4 естера на Бексаротен. Техните структурни формули, химични наименования и физични характеристики са представени в Таблица 6.

Изборът на алкохолите за естерификация е направен на базата на реактивност на алкохолите и способността им да встъпват в реакция на естерификация с Бексаротен. В

бъдеща научна работа предстои разработването на метод за естерификация на Бексаротен с по-сложни алкохоли – вторични, третични и ароматни, като се цели да бъдат подбрани такива алкохоли, които след метаболизъм на естера да се освобождават нетоксични за организма продукти.

Таблица 6. Структура, химично наименование и физични характеристики на получените естери на Бексаротен.

Съединение	Структура	Химично наименование	Физични характеристики
E1		Метил 4-[1-(5,6,7,8-тетрахидро-3,5,5,8,8-пентаметил-2-нафталенил)етенил]бензоат	Бяло кристално вещество, неразтворимо във вода, разтворимо в метанол, етанол, ацетон и DMSO. Слабо разтворим в хексан.
E2		Етил 4-[1-(5,6,7,8-тетрахидро-3,5,5,8,8-пентаметил-2-нафталенил)етенил]бензоат	Бяло кристално вещество, неразтворимо във вода, разтворимо в метанол, етанол, ацетон и DMSO. Слабо

			разтворим в хексан.
E3		Пропил 4-[1-(5,6,7,8-тетрахидро-3,5,5,8,8-пентаметил-2-нафталенил)етенил]бензоат	Бяло вискозно вещество, неразтворимо във вода, разтворимо в метанол, етанол, пропанол и DMSO.
E4		Бутил 4-[1-(5,6,7,8-тетрахидро-3,5,5,8,8-пентаметил-2-нафталенил)етенил]бензоат	Жълто-кафяво вещество с повишен вискозитет, лепкаво, неразтворимо във вода, разтворимо в метанол, етанол, бутанол и DMSO.

В хода на синтеза се наблюдават някои особености. По време на синтеза на метиловия естер на Бексаротен се наблюдава образуване на бяла утайка след 1 час реакционно време. При другите три естера разтворът остава бистър до края на реакционното време.

По време на сушене на вакуум изпарителя се наблюдава образуването на бели утайки. Практическият, теоретичният и процентният добив на новосинтезираните естери на Бексаротен са представени на Таблица 7.

Таблица 7. Моларна маса, практически, теоретичен и процентен добив на новосинтезираните естери на Бексаротен.

<i>Естер на Бексаротен</i>	<i>Моларна маса, g/mol</i>	<i>Практически добив, g</i>	<i>Теоретичен добив, g</i>	<i>Процентен добив, %</i>
<i>E1</i>	362.51072	0.222	0.31207	71.14
<i>E2</i>	376.54072	0.242	0.32415	74.66
<i>E3</i>	390.56592	0.216	0.33622	64.24
<i>E4</i>	404.59172	0.284	0.34830	81.54

2. ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА РЕАКЦИОННИЯ ПРОЦЕС ПОСРЕДСТВОМ ТСХ АНАЛИЗ

По време на реакцията на естерификация на Бексаротен са взети проби за тънкослойно хроматографски анализ, който е извършен при постоянна температура и приблизително еднаква влажност, които могат да бъдат фактори за възпроизводимостта.

За получаването на петна с правилна форма и отсъствието на опашки са приготвени разтвори с концентрации, попадащи в интервала от 0.1 до 1.0 mg/ml.

За разтваряне на анализите е използван разтворителят или сместа от разтворители, присъстващи в състава на ПФ.

За доброто разделяне на веществата от дадена смес основно значение имат начинът на нанасяне на пробата на старта, формата и големината на петната. Изследваният разтвор е нанесен на старта с помощта на спринцовка тип „Хамилтон“.

Тънкослойнохроматографският анализ е проведен на хроматографска плака DC-Fertigfolien ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ с дебелина на слоя 0.20 mm, импрегнирана с флуоресцентен индикатор UV₂₅₄. Като проявител е използвана UV светлина на UV лампа Nahita.

Според литературни данни подвижните фази, които се използват най-често при анализ на Бексаротен и негови аналози варират от двукомпонентни до

четирикомпонентни системи. В Таблица 8 е представен съставът на ПФ, използвани в различни литературни източници.

Таблица 8. Подвижни фази, използвани за провеждане на тънкослойно хроматографски анализ според литературни източници.

<i>ПФ</i>		<i>А</i>			
<i>Компонент</i>	Амоняк	Бутанол	Хлороформ	Ацетон	
<i>Съотношение</i>	1	4	3	3	

<i>ПФ</i>		<i>В</i>		<i>С</i>		<i>Д</i>	
<i>Компонент</i>	Хексан	Хлороформ	Петролеев етер	Етил ацетат	Хексан	Етил ацетат	
<i>Съотношение</i>	2	8	1	6	4	1	

Разработването на тънкослойно хроматографския метод стартира с проверка афинитета на разтворителите, като единствен компонент на ПФ, спрямо анализиранията вещества. При ПФ, съставена от хексан петна, нанесени върху стартовата линия не се придвижват – остават на старта.

При ПФ, съставена само от хлороформ петната се придвижват незначително и се получава ивица на фронта.

С ПФ етил ацетат петната се размиват на фронта, а с ПФ петролеев етер петната се събират на старта.

Проведен е и опит с ПФ метанол, поради добрата разтворимост на Бексаротен и неговите естери в метанол. Получават се петна с голяма Rf стойност, а над петната се наблюдава цяла област от плаката, която флуоресцира.

От получените резултати става видно, че естери имат различен афинитет спрямо изследваните монокомпонентни системи. Това налага провеждането на експеримент с повече от една такава.

При провеждането на тънкослойно хроматографския анализ с ПФ А петната се придвижват достатъчно върху плаката, но не са добре разделени.

Проведени са анализи с четирикомпонентни системи с разтворители, използвани в двукомпонентните (ПФ В, С и D), а именно хексан, етил ацетат, хлороформ и петролеев етер в различни съотношения. Получените резултати са незадоволителни, поради ред причини: получават се опашки, ивица на фронта, петна с неправилна форма или недобро

разделяне на петната. Към тази система е добавена и оцетна киселина за да намалим образуването на опашки, но това не подобри значимо резултатите.

При провеждането на тънкослойно хроматографския анализ с ПФ В петната на естерите почти не се придвижват от старта, а петното на Бексаротен се придвижва незначително и се образува опашка. С цел повишаване полярността на ПФ е добавен метанол 0.05 части, което не променя значимо резултата. При градиентно повишаване количеството на метанола и хлороформа петната започват да се придвижват и да се разделят, но имат неправилна форма, наподобяваща наклонена елипса, чиито оси имат голяма разлика в размерите си. При всички анализирани съотношения на компонентите на ПФ В и метанол се получава ивица на фронта.

Направен е и опит с използването на ПФ, съставена от хлороформ и метанол в съотношение 10:1 и след това е изследвано градиентното намаляване на метанола. При тези ПФ петното на Бексаротен не се открива и се наблюдава ивица на фронта. От друго страна петната на естерите са налични, но са с с неправилна форма и не са добре разделени.

При ПФ С петната почти не се придвижват от старта, имат много малка Rf стойност, която е почти еднаква за всички анализирани вещества. При същата ПФ в съотношение 1:1 петната също не са добре разделени, което обуславя използването на друга ПФ.

ПФ съставена от етил ацетат и хлороформ в съотношение 1:1 успешно разделя петната, не се получава ивица на фронта, но се получават опашки.

Провеждането на анализа с ПФ D даде най-добър резултат. При съотношение 4:1, както е видно в Таблица 8, петната на изследваните вещества не се придвижват значимо от стартовата линия. При добавяне на няколко капки метанол към ПФ, за да се повиши разтворимостта на анализирани вещества, отново се появяват някои от гореописаните проблеми. С цел подобряване на разделянето е приложено градиентно намаляване на хексана и увеличаване на етил ацетата. Също така не е използван метанол. При съотношение на хексан и етил ацетат 1:1 достигаме добро разделяне, относително правилна форма на петната на изследваните вещества, липса на опашки и на ивица на фронта.

От получените експериментални резултати може да заключим, че най-добър резултат се получава при съотношение на компонентите на ПФ, съставена от хексан и етил ацетат 1:1. Резултатът от проведения тънкослойно хроматографски анализ е представен на Фигура 40. Изчислените Rf стойности са представени в Таблица 9.



Фигура 40. Тънкослойно хроматографски анализ на Бексаротен и новосинтезираните естери E1, E2, E3 и E4.

Можем за направим извод, че ПФ със състав хексан етил ацетат в съотношение 1:1 е подходяща за проследяването процеса на естерификация на по-сложни естери на Бексаротен, поради получаването на петна с различни стойности за Rf.

Таблица 9. Rf стойности на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен.

Съединение	Hex	E1	E2	E3	E4
Rf	0.75	0.55	0.64	0.66	0.72

3. СТРУКТУРНО ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ПОЛУЧЕНИТЕ ПРОИЗВОДНИ ПОСРЕДСТВОМ ИНСТРУМЕНТАЛНИ МЕТОДИ

3.1. Охарактеризиране на производни посредством температура на топене

Температурата на топене е температурата, при която дадено съединение преминава от твърдо в течно агрегатно състояние. Този преход се осъществява бавно и протича в определен температурен интервал.

Количеството топлина, необходимо за стапяне на единица маса от дадено вещество в кристална форма при определено налягане, се нарича специфична топлина на топене. Единицата за измерването ѝ в SI е J/kg.

Температурата на топене често се използва за качествена идентификация на съединения и като индикатор за чистота.

Според литературни данни Бексаротен има температура на топене 230 – 231 °C. Проведен е анализ на температурата на топене на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен. Получените резултати са представени на Таблица 10.

Таблица 10. Температура на топене на Бексаротен и новосинтезираните естери.

<i>Съединение</i>	<i>Вех</i>	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>
<i>Температура на топене</i>	227 °C	154.6 °C	171.2 °C	-	-

От получените резултати можем да заключим, че синтезът на нови естерни производни на Бексаротен протича успешно, но не напълно. При определената температура на топене се наблюдават неразтопени частици, вероятно дължащи се на нереагирал Бексаротен. Поради тази причина, след отчитане на температурата на топене на естерите продължихме нагряването до температурата на топене на Бексаротен. При всички проби след достигане на 227 °C се наблюдава пълно стапяне на частиците и получаване на хомогенен разтвор.

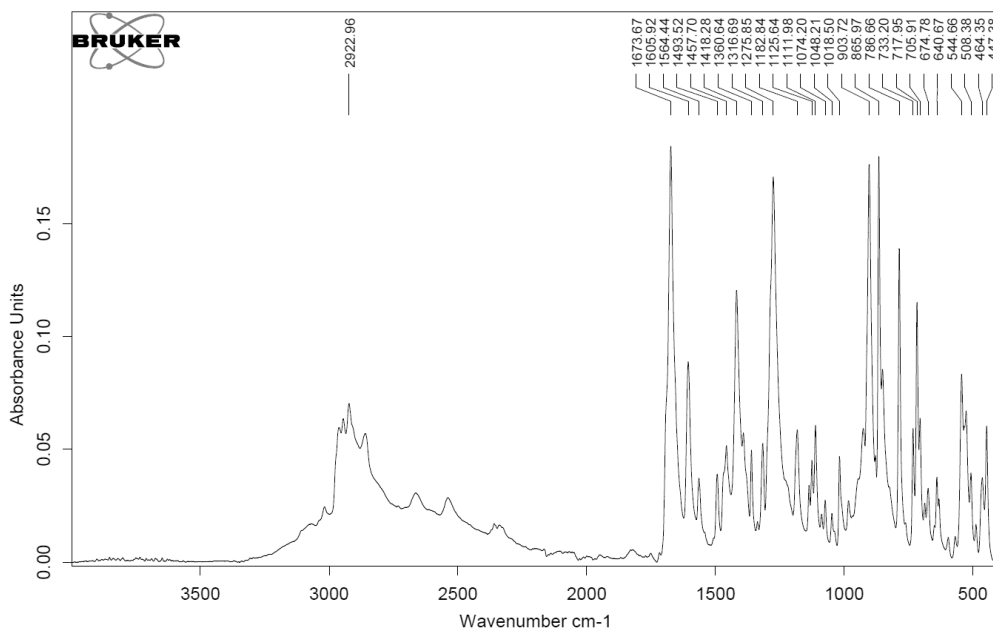
Температурата на топене на съединение E3 и E4 не е определена поради неподходящи физични характеристики на анализиранията вещества, описани в Таблица 6 на страница 30.

3.2. Инфрачервена спектроскопия

За доказване структурата на новосинтезираните аналози на Бексаротен е проведен сравнителен ATR-FTIR анализ на спектрите (представени на Фигура 41 до 45) на

Бексаротен, като изходното съединение и на новополучените му естери в областта 4000-500 cm^{-1} .

ATR-FTIR спектрът на Бексаротен е представени на Фигура 41.



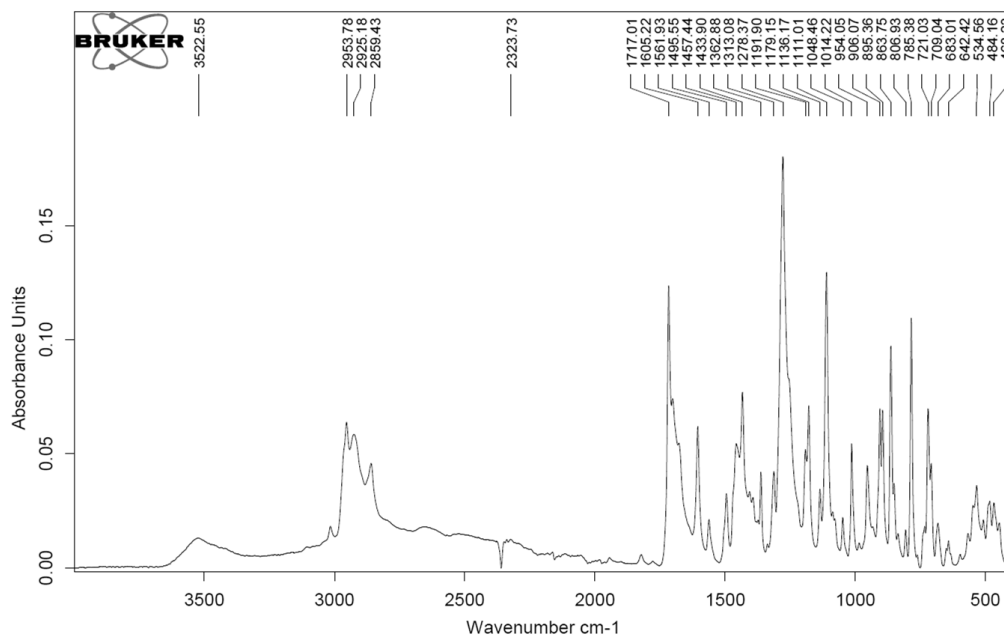
Фигура 41. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на Бексаротен.

При анализ на структурата на Бексаротен се наблюдава появата на няколко ивици, дължащи се на четирите метилови ($-\text{CH}_3$) и една метиленова ($=\text{CH}_2$) група. Валентните трептения при 2872 cm^{-1} (сим.) и 2962 cm^{-1} (асим.) са характерни за метиловата група, докато деформационните трептения са при 1380 cm^{-1} (сим.) и 1460 cm^{-1} (асим.). Метиленовата група има валентни трептения при 2853 cm^{-1} (сим.) и 2926 cm^{-1} (асим.), и деформационни трептения при 1470 cm^{-1} (ножично). Когато две метилови групи са при един C-атом се появява дубрет при 1365 cm^{-1} и 1385 cm^{-1} .

На FT-IR спектъра се наблюдават ивици между 1470 и 1600 cm^{-1} , характерни за скелетните трептения на въглеродният пръстен на ароматното ядро. Може също да се открие ивица за p-дизаместено бензеново ядро между 855 и 790 cm^{-1} .

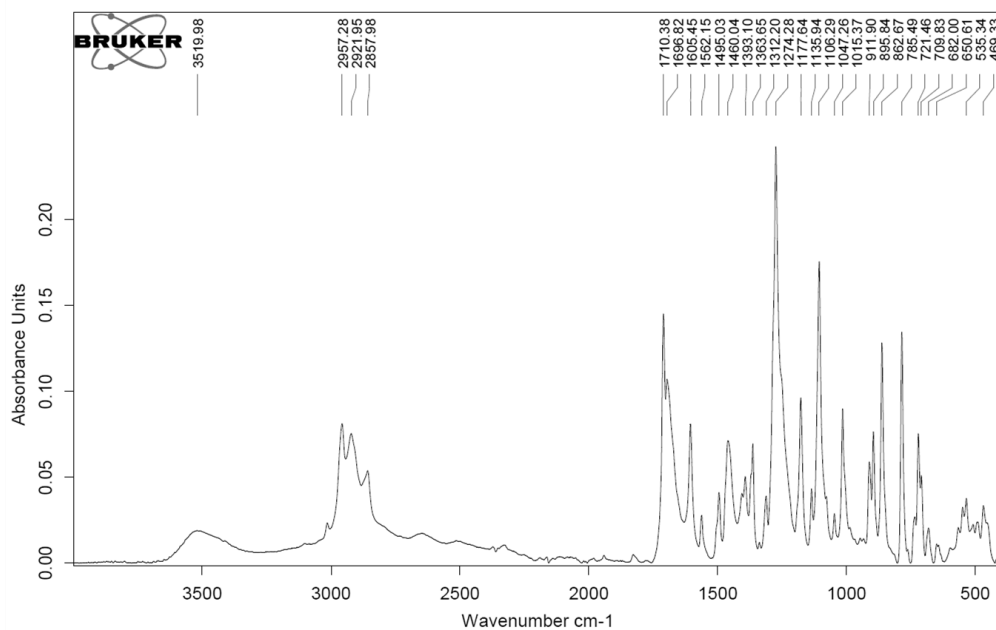
Валентното трептене на карбонилната групата $\text{C}=\text{O}$ е едно от най-интензивните. Честотата му е около 1720 cm^{-1} .

Извършеният FT-IR спектрален анализ на новосинтезираните естери показва някои структурни промени. Спектрите на естерите са представени на Фигура 42, 43, 44 и 45.

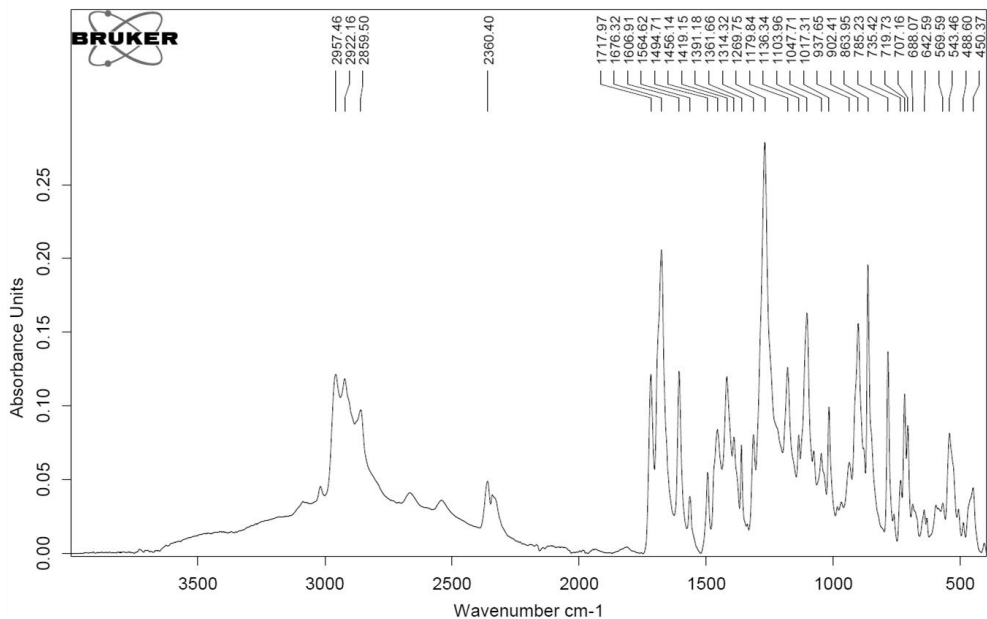


Фигура 42. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на метилов естер на Бексаротен.

Наблюдава се, че пикът при 1717 cm^{-1} е слят с други два пика с по-малък интензитет. Възможно е това да се дължи на нереагирал Бексаротен по време на естерификацията, тъй като при Бексаротен се забелязва пик при 1673 cm^{-1} .

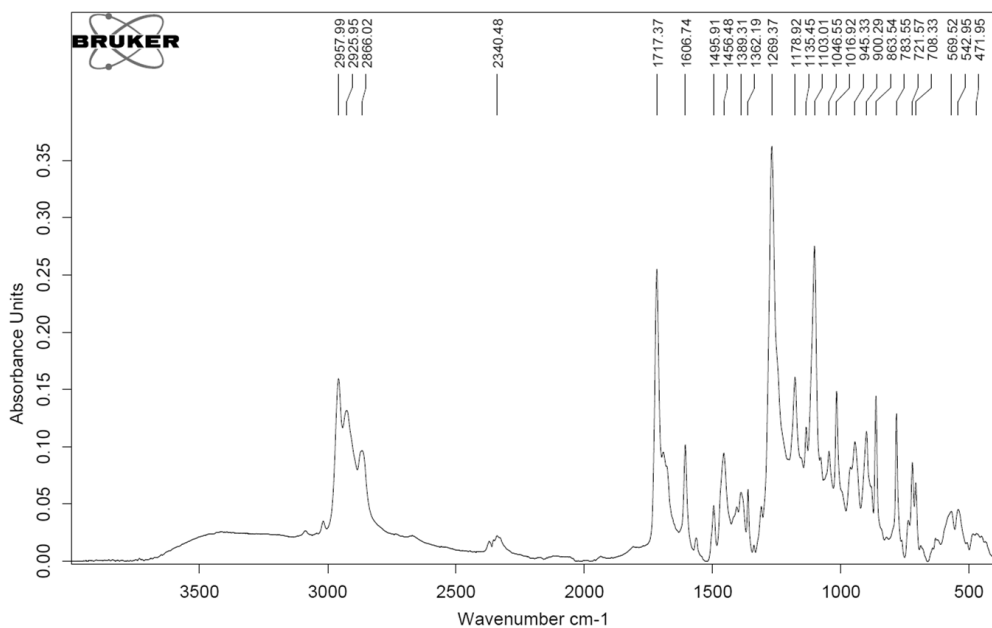


Фигура 43. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на етилов естер на Бексаротен.



Фигура 44. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на пропилов естер на Бексаротен.

Наличието на пик при 1717 cm^{-1} и при 1676 cm^{-1} се дължи на непълно протичане на естерификацията на Бексаротен, който се явява като примес в реакционната смес.



Фигура 45. Данни от проведен FT-IR спектрален анализ на бутилов естер на Бексаротен.

Сходството в структурата на Бексаротен и новосинтезираните му естери е причина за идентичността в получените спектри. Наблюдават се и някои характерни особености. Единствената структурна разлика между новосинтезираните естери е дължината на въглеродородната верига в естерната част. Поради това не се наблюдават значителни промени в отснетите спектри на новополучените аналози на Бексаротен.

Голямо структурно сходство се наблюдава в отснетите спектри в областта от 3000 cm^{-1} до 2800 cm^{-1} . Интензитета и разположението на получените ивици са идентични при максимумите на ивиците. Това се обяснява с факта, че в тази област се проявяват някои характерни колебания на бензеновите ядра, а също симетрични и асиметрични вибрации на С-Н връзката.

Най-големи разлики между спектъра на Бексаротен и на новосинтезираните естери се наблюдават в областта от 1620 cm^{-1} до 1720 cm^{-1} , където се отчита присъствие на средно интензивна ивица в спектрите на естерите. Подобна не се открива в спектъра на Бексаротена. Наличието на такава ивица насочва към протеклия процес на естерификация и извършените структурни промени в карбоксилната група. В областта от спектъра между 1730 cm^{-1} и 1715 cm^{-1} се отчита присъствие на естерна функционална група и деформационни трептения характерни за връзката С=О. Получените данни категорично съответстват на очакваната област на проява на спектрални ивици, присъща за карбоксилните съединения.

При честота от 1717 cm^{-1} се отчита ивица с идентичен интензитет и положение както при Бексаротен, така и при новосинтезираните му естери. Ивицата може да бъде приписана на наличието на карбонилна група в анализирания съединения.

Появата на ивица при по-ниските честоти (около 1606 cm^{-1}) допълнително потвърждава присъствието на карбонилната група в спектъра. Подобна ивица се наблюдава при спектъра на всички новосинтезирани естери на Бексаротен. Разположението на спектрални ивици, характерни за наличието на карбонилна група в спектрите на анализирания съединения са посочени в Таблица 11.

При анализ на получения спектър на Бексаротен в областта $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ се наблюдава проява на интензивна ивица, при 2927 cm^{-1} , а също и при 2859 cm^{-1} .

Таблица 11. Разположение на спектрални ивици характерни за наличието на карбонилна група в структурата на новополучените естери на Бексаротен, отчетен е интервала от 1620 cm^{-1} до 1720 cm^{-1} .

<i>Съединение</i>	<i>Честота, cm⁻¹</i>	
<i>E1</i>	1717.01	1605.22
<i>E2</i>	1710.38	1605.45
<i>E3</i>	1717.97	1606.91
<i>E4</i>	1717.37	1606.74

Подобни ивици в спектрите на новополучените съединения са представени в Таблица 12.

Таблица 12. Разположение на спектрални ивици, наблюдавани при новосинтезираните естери в интервала от 3000 cm⁻¹ до 2800 cm⁻¹.

<i>Съединение</i>	<i>Честота, cm⁻¹</i>	
<i>E1</i>	2953.78	2859.43
<i>E2</i>	2957.28	2857.98
<i>E3</i>	2957.46	2859.50
<i>E4</i>	2957.99	2866.02

Получените данни ни дава основание да допуснем, че в молекулата на съединенията присъстват метилови остатъци. Тяхното присъствие от деформационните C-H трептения. Те могат да се открият в по-нискочестотната област на спектъра, в интервала от около 1365 cm⁻¹ до 1450 cm⁻¹. Във всички спектри на новополучените естери се наблюдава такава ивица. Позиция ѝ е посочена в Таблица 13.

Таблица 13. Позиция на ивица, съответстваща на деформационни C-H трептения при новосинтезирани естери на Бексаротен в интервала от около 1365 cm⁻¹ до 1450 cm⁻¹.

<i>Съединение</i>	<i>Честота, cm⁻¹</i>
<i>E1</i>	1362.88
<i>E2</i>	1363.65
<i>E3</i>	1361.66
<i>E4</i>	1362.19

Както в структурата на Бексаротен, така и в структурите на новосинтезираните естери присъстват пет -CH₃ групи. От това следва да предположим, че техните вибрации ще се проявят с по-голям интензитет в спектрите. В спектрите на всички анализирани

съединения се отчита ясно изразена, силно интензивна ивица с максимум около 1275 cm^{-1} . Нейното присъствие може да отнесем към наличието на метилови групи. Позиция на ивиците отнасящи се към метиловите групи в спектрите на Бексаротен и новосинтезираните естери са представени в Таблица 14.

Таблица 14. Позиция на ивиците отнасящи се към метиловите групи в спектрите на Бексаротен и новосинтезираните естери с максимум при 1275 cm^{-1} .

<i>Съединение</i>	<i>Честота, cm^{-1}</i>
<i>Вех</i>	1275.85
<i>E1</i>	1278.37
<i>E2</i>	1274.28
<i>E3</i>	1269.75
<i>E4</i>	1269.37

Макар и незначителни получените отмествания могат да се отдадат на факта, че заместването в страничната верига е на значително разстояние от метиловите групи в Бексаротеновия скелет.

В интервала от 2000 cm^{-1} до 1660 cm^{-1} се наблюдават слабо интензивни ивици, характерни за бензеновите ядра. За да се потвърди присъствие им е направен анализ на ивиците в интервала между 1600 cm^{-1} и 1440 cm^{-1} . Ивицата при около 1490 cm^{-1} е най-характерна в този участък. Разположение ѝ в спектрите на анализиранияте съединения е представено в Таблица 15.

Таблица 15. Спектрални ивици отчетени в интервала 1600 cm^{-1} до 1440 cm^{-1} , характерни за наличие на бензенови ядра.

<i>Съединение</i>	<i>Честота, cm^{-1}</i>
<i>E1</i>	1495.55
<i>E2</i>	1495.03
<i>E3</i>	1494.71
<i>E4</i>	1495.91

Чрез отчитане на получените ивици от спектъра в интервала около 2000 cm^{-1} и 1660 cm^{-1} , както и тези между $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ е анализиран типа на заместване на бензеновите ядра.

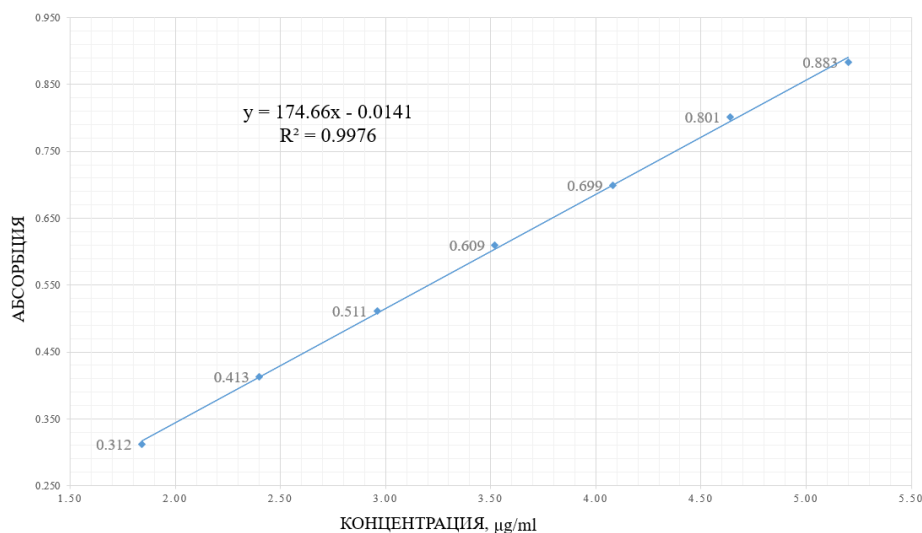
Близката структура на Бексаротен и новополучените му естери се потвърждава от сходните позиции и интензитети на получените пикове в инфрачервените спектри. Това основно се дължи на присъстващия Бексаротенов скелет, съдържащ три ядра и свързаните към тях метилови остатъци. Структурно естерите се различават само по дължината на въглеродородната верига в естерната част, което не се проявява с характерна ивица в инфрачервения спектър на естерите.

3.3. UV-VIS спектроскопия

3.3.1. Валидиране на UV-VIS спектрален метод

Опитно установения абсорбционен максимум на Бексаротен ($\lambda = 204 \text{ nm}$) е използван за разработването на метод за количествено определяне.

На Фигура 46 е представена стандартната права, разработена чрез използване на разтвор на стандартна субстанция Бексаротен. Концентрационният диапазон варира от 1.84 до 5.20 $\mu\text{g/ml}$.



Фигура 46. Стандартна права на стандартен разтвор на Бексаротен в концентрационен диапазон 1.84 – 5.20 $\mu\text{g/ml}$

Стандартната права е построена с цел определяне на линейността на UV-VIS метода.

Линейност

Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната права и корелационния коефициент R^2 .

Получените резултати показват, че е постигната линейност $R^2 = 0.9976$ в целевия концентрационен диапазон 1.84 – 5.20 $\mu\text{g/ml}$.

Прецизност

Оценка на повторяемостта и възпроизводимостта на UV-VIS спектралния метод е представена на Таблица 16.

Таблица 16. Оценка на повторяемостта и възпроизводимостта на UV-VIS спектралния метод.

Съединение	Концентрация, $\mu\text{g/ml}$	Анализ в рамките на деня		Анализ в рамките на последователни дни	
		SD	RSD, %	SD	RSD, %
Бексаротен	1.84	0.001483	0.496399	0.001924	0.642894
	3.52	0.002881	0.465123	0.001817	0.293757
	5.20	0.002280	0.258309	0.002864	0.324594

Изчислените RSD стойности са допустими и попадат в интервала 0.25 – 0.64 %.

Точност

Абсорбцията при седемте концентрационни нива при съответната дължина на вълната е измерена петкратно. Получените данни са представени в Таблица 17.

Таблица 17. Оценка на точността на UV-VIS спектралния метод.

Съединение	Концентрация, $\mu\text{g/ml}$	<i>bias</i>	<i>b</i> , %
Бексаротен	1.84	0.03	1.58
	2.40	0.05	1.89
	2.96	0.05	1.61
	3.52	0.06	1.84
	4.08	0.01	0.25
	4.64	0.04	0.82
	5.20	0.06	1.20

Изчислените стойности на $b\%$ са допустими и попадат в интервала 0.25 – 1.89 %.

Чувствителността се оценява чрез измерване на границата на откриване (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ).

Граница на количествено определяне (LOQ)

Границата на количествено определяне е изчислена на база съотношението сигнал/шум ($S/N \geq 10$). В условията на нашия експеримент границата на количествено определяне на Бексаротен е 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Границата на откриване (LOD)

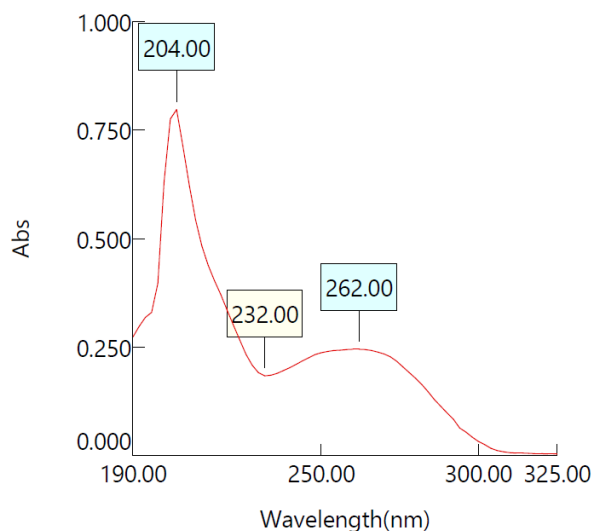
Границата на откриване показва най-ниското количество вещество в пробата, което може да бъде открито. В условията на нашия експеримент границата на количествено определяне на Бексаротен е 0.3 $\mu\text{g/ml}$.

Получените резултати показват, че разработения и валидиран UV-VIS спектрофотометричен метод за количествено определяне на Бексаротен е бърз и опростен. Той е подходящ за рутинни анализи в ежедневната лабораторна практика. Характеризира се с добра линейност и висока прецизност. Пробоподготовката и времето за анализ са сравнително кратки, себестойността на метода е сравнително ниска.

3.3.2. Определяне на абсорбционен максимум на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен

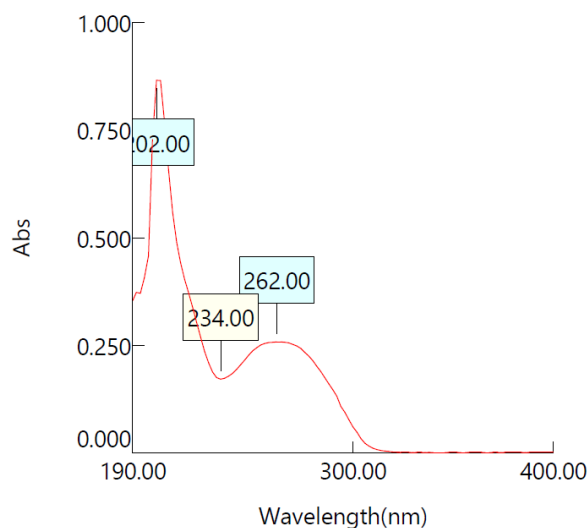
Проведен е UV-VIS спектроскопски анализ на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен с цел определяне на абсорбционните максимуми на изследваните съединения.

Спектрите на анализиранияте съединения са снети в разтворител метанол, спрямо празна проба чист метанол и съответните графични изрази са показани на Фигура 47 до Фигура 51. Разтворите на пробите са приготвени в концентрация, която попада в интервала на абсорбция между 0.500 и 1.00.



Фигура 47. UV-VIS спектър на Бексаротен в метанол.

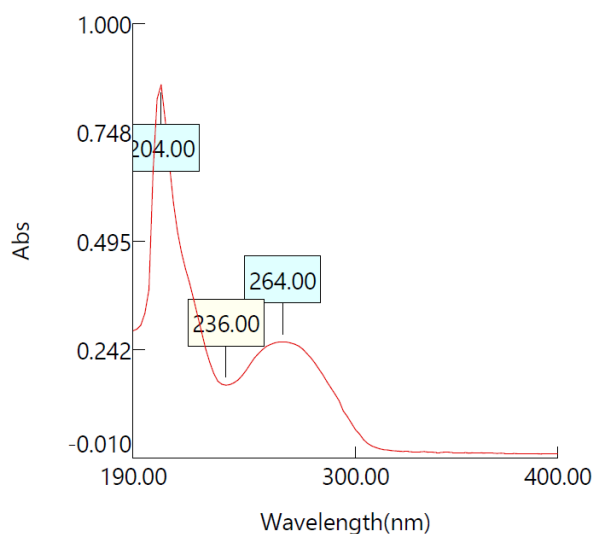
От отснетия спектър на Бексаротен се вижда, че той разполага с два абсорбционни максимума при дължина на вълната 204 nm и при 262 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.798 и 0.245. Също така се наблюдава абсорбционен минимум при 232 nm с абсорбция 0.184.



Фигура 48. UV-VIS спектър на метилов естер на Бексаротен (E1) в метанол.

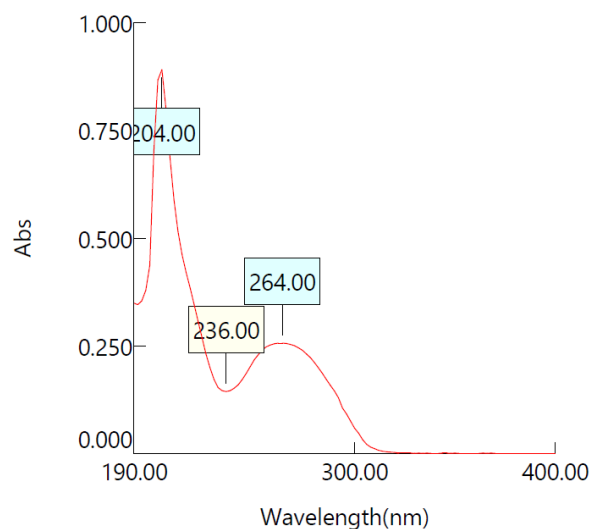
На Фигура 48 е представен спектърът на метилов естер на Бексаротен (E1), на който се наблюдават 2 абсорбционни максимума при дължина на вълната 202 nm и 262

nm. Измерената абсорбция е съответно 0.866 и 0.258. Също така се наблюдава абсорбционен минимум при 234 nm с абсорбция 0.172.



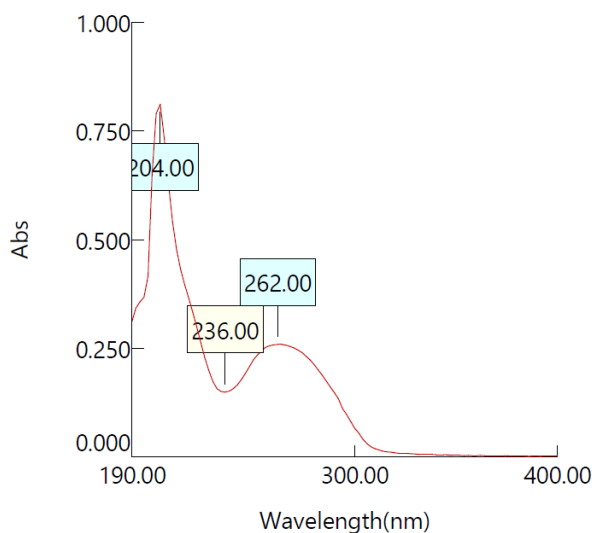
Фигура 49. UV-VIS спектър на етилов естер на Бексаротен (E2) в метанол.

На Фигура 49 е представен спектърът на етилов естер на Бексаротен (E2), на който се наблюдават два абсорбционни максимума при дължина на вълната 204 nm и 264 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.858 и 0.260. Наблюдава се и абсорбционен минимум при дължа на вълната 236 nm с абсорбция 0.159.



Фигура 50. UV-VIS спектър на пропилов естер на Бексаротен (E3) в метанол.

На Фигура 50 е представен спектърът на пропиловия естер на Бексаротен (Е3), на който се наблюдават 2 абсорбционни максимума при дължина на вълната 204 nm и 264 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.892 и 0.256. Наблюдава се и абсорбционен минимум при дължа на вълната 236 nm с абсорбция 0.144.



Фигура 51. UV-VIS спектър на бутилов естер на Бексаротен (Е4) в метанол.

На Фигура 51 е представен спектърът на бутиловия естер на Бексаротен (Е4), на който се наблюдават 2 абсорбционни максимума при дължина на вълната 204 nm и 262 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.812 и 0.259. Наблюдава се и абсорбционен минимум при дължа на вълната 236 nm с абсорбция 0.149.

3.3.3. Сравнителен анализ за влиянието на разтворителите върху абсорбционните максимуми

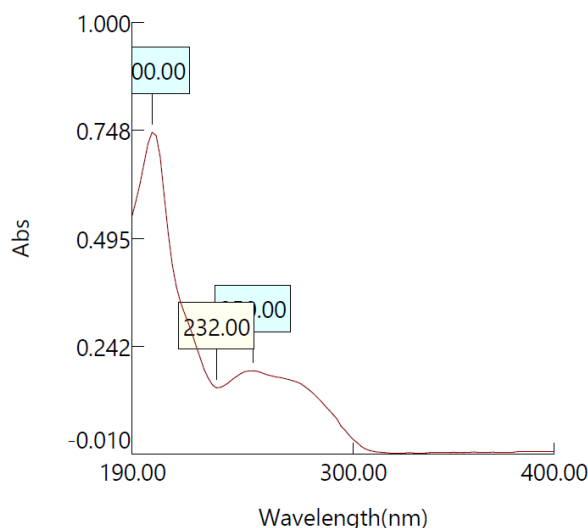
Проведен е сравнителен анализ при промяна на разтворителите. Използвани са разтворители с различна гранична (cutoff) дължина на вълната, представени в Таблица 18.

Разтворителите диметил сулфоксид (DMSO) и ацетон не са подходящи за провеждането на UV-VIS спектроскопски анализ на Бексаротен и неговите естери. Въпреки добрата разтворимост на анализиранията вещества в тези разтворители, техните гранични дължини на вълните са с голяма стойност, а под тази дължина на вълната абсорбират светлината.

Таблица 18. Използвани разтворители и техните гранични (cutoff) дължини на вълните.

<i>Разтворител</i>	<i>UV cutoff, nm</i>
<i>Метанол</i>	205
<i>Хексан</i>	195
<i>Ацетонитрил</i>	190
<i>Диметил Сулфоксид (DMSO)</i>	268
<i>Ацетон</i>	330

Спектрите на анализиранияте съединения са снети в разтворител ацетонитрил, спрямо празна проба чист ацетонитрил. На Фигура 52 е представен спектъра на Бексаротен с разтворител ацетонитрил.



Фигура 52. UV-VIS спектър на Бексаротен с разтворител ацетонитрил.

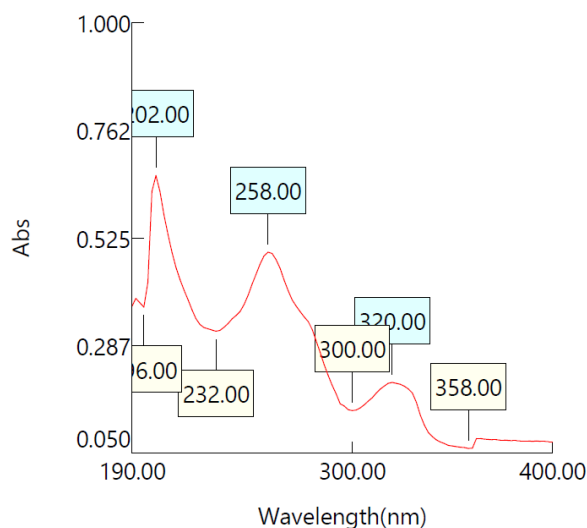
На спектъра се наблюдават 2 абсорбционни максимума при дължина на вълната 200 nm и 250 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.744 и 0.185. Наблюдава се и абсорбционен минимум при дължина на вълната 232 nm с абсорбция 0.145.

Провеждането на анализа с новосинтезираните естери на Бексаротен даде идентични резултати. Хипсохромното (синьо) изместването на максимума на поглъщане се дължи на използвания разтворител, който е с по-малка стойност на граничната дължина на вълната. Въпреки това се наблюдава графика, наподобяваща тази, представена на Фигура 47. Аналогични резултати се получават и с разтворител хексан спрямо празна проба хексан.

Поради опасения за настъпването на мигновени хидролизни процеси вследствие наличието на вода в използваните разтворители при разтварянето на естерите е направен опит с абсолютно сух метанол. Получените резултати са аналогични на тези, с 99.99 %, HPLC grade метанола.

От друга страна при определяне на температурата на топене установихме кристали на нереагирал Бексаротен. Това може да влоши спектрите, като дава ивици, които припокриват тези на естерите. Затова по време на качествения анализ на естерите е събрана фракция от течния хроматограф при съответното им време на задържане, с което се гарантира, че пробите са чисти. Тъй като пробите за HPLC са разтворени в метанол и ацетонитрил в съотношение 3:1, UV-VIS спектралният анализ е направен при същите разтворители спрямо празна проба от метанол и ацетонитрил (3:1).

На Фигура 53 е представен спектъра на метилов естер на Бексаротен с разтворител метанол и ацетонитрил (3:1).



Фигура 53. UV-VIS спектър на Бексаротен с разтворител метанол и ацетонитрил (3:1).

На спектъра се наблюдават 3 абсорбционни максимума при дължина на вълната 202 nm, 258 nm и 320 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.662, 0.494 и 0.206. Наблюдава се и 4 абсорбционни минимума при дължа на вълната 196 nm, 232 nm, 300 nm и 358 nm. Измерената абсорбция е съответно 0.372, 0.319, 0.143 и 0.060. Провеждането на анализа с другите естери на Бексаротен даде идентични резултати.

Получените абсорбционни максимуми при използването на разтворител метанол и ацетонитрил са идентични на тези, получени при използване на разтворител чист метанол, но се получават и два нови пика.

От проведеният сравнителен анализ можем да заключим, че всеки един разтворител с ниска стойност на гранични дължини на вълните е подходящ за провеждане на анализа, но за целта на научната работа е използван метанол, тъй като той е най-безопасен.

Идентичните резултати, получени по време на анализа са вследствие близката структура на карбоксилната киселина, присъстваща в молекулата на Бексаротен, и на естерната група в молекулата на новосинтезираните Бексаротенови естери. Карбоксилната функционална група дава абсорбционен максимум при дължина на вълната 210 nm, а естерната – при около 207 nm. Това прави метода неподходящ за качествено разграничаване на новополучените естери на Бексаротен посредством UV-VIS спектрофотометрия.

Новоразработеният и валидиран метод за количествено определяне на Бексаротен не е подходящ за определяне на смеси на Бексаротен и негови естери.

3.4. HPLC метод за установяване на чистотата на новосинтезираните производни

Високоэффективната течна хроматография (HPLC) е специфична форма на колонна хроматография, която обикновено се използва в анализа за разделяне, идентифициране и количествено определяне на компоненти в състава на сложни смеси [163].

HPLC използва колона, пълна със сорбент (неподвижна фаза), помпа, която движи подвижната фаза през колоната, и детектор, който показва времето на задържане на отделните анализирани компоненти. Времето на задържане варира в зависимост от взаимодействията между неподвижната фаза, молекулите, които се анализират, и използвания разтворител. На база времето на задържане може да бъде направено заключение относно състава на компонентите в анализирана смес [163].

HPLC е многостранна, възпроизводима хроматографска техника за оценка на лекарствените вещества. Тя има широк обхват на приложение в различни области засягащи количествената и качествена оценка на активните вещества [163].

3.4.1. Модифициране на HPLC метод за установяване чистотата на новосинтезираните естери на Бексаротен

В литературата са описани методи за анализ на Бексаротен, основаващи се на различни хроматографски условия. Съобщава се, че като подвижна фаза може да бъде използвана система от ацетонитрил и буфер (амониев ацетат и оцетна кселина); ацетонитрил, вода и ледена оцетна киселина; метанол и вода (в съотношение 9:1). Някои автори разглеждат възможността за използване на подвижната фаза от ацетонитрил, вода и тетрахидрофуран в съотношение 70:20:10. При всички описани методи UV-детекцията е осъществена в дапазона 255-269 nm [163].

Модификацията на вече описаните в литературата подходи за анализ на Бексаротен се състои в избора на подходящи хроматографски условия, определяне на подходяща дължина на вълната за детекция и избор на подвижна фаза. За настоящия анализ е избрана дължина на вълната от 260 nm, тъй като се съобщава че произвежда по-малко шум, което улеснява възможността за количествено определяне на присъствието на Бексаротен в смес [163].

За да се постигне добро разделяне на веществата при изократични условия, като подвижна фаза са тествани смеси от разтворители като мравчена киселина, вода, ацетонитрил, метанол и изопропанол в различни комбинации и съотношение.

След провеждане на редица изследвания като най-оптимална подвижна фазова система, осигуряваща добро разделяне, симетрични пикове и висока ефективност за анализа е подбрана система от метанол и ацетонитрил в съотношение 3:1.

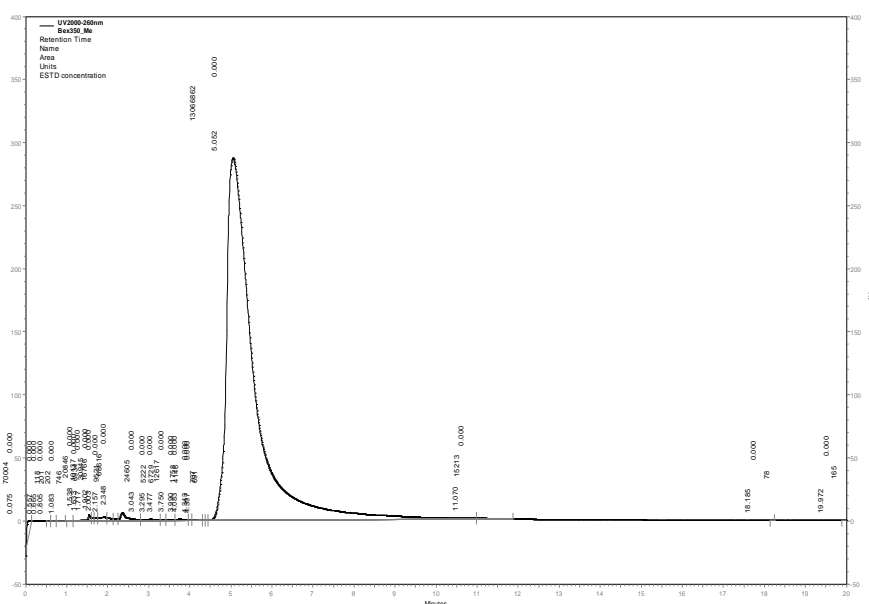
3.4.2. HPLC анализ на Бексаротен и негови аналози

Разработеният HPLC метод позволява да бъде анализиран състава на получените в резултат на синтеза съединения.

Отчетените във всяка една хроматограма пикове следва да бъдат отнесени към наличието на определени компоненти, присъстващи в състава на отделните проби. Тъй като времето за елуиране на всяко съединение е различно, на база получените данни може да се направи заключение относно състава на пробите подложени на анализ.

За целта първо е осъществена хроматография на стандартна субстанция Бексаротен, който играе ролята на свидетел (стандарт) при определяне на компонентния състав на пробите на новосинтезираните Бексаротенови производни.

Приготвен е разтвор на Бексаротен с концентрация 350.00 µg/ml в метанол. Получената хроматограма е представена на Фигура 54.



Фигура 54. Хроматограма, получена при анализ на стандартен разтвор на Бексаротен с концентрация 350.00 µg/ml

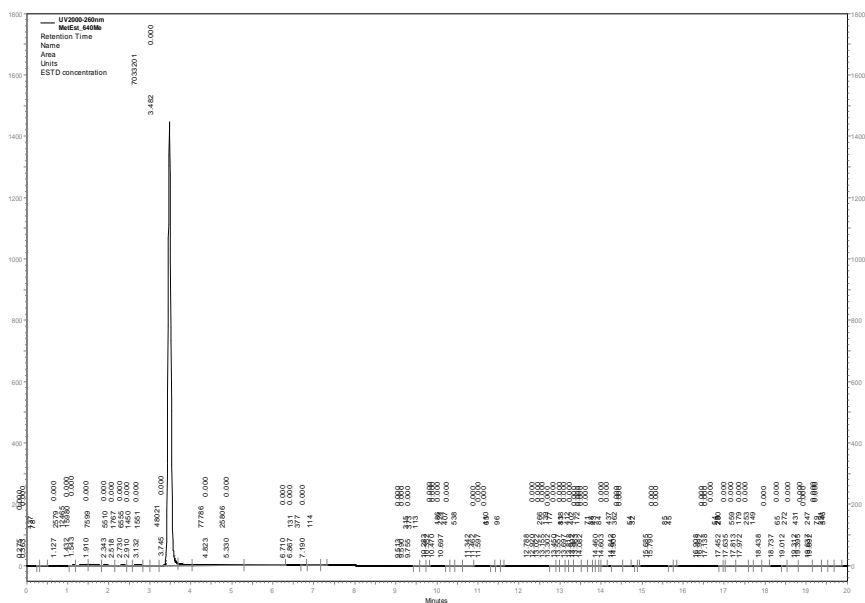
В получената хроматограма се отчита присъствие на един пик с максимум при 5.052 min. Отсъствието на каквито и да било други пикове в хроматограмата ни дава пълно основание да отчетем, че полученият пик се отнася за ретиноида Бексаротен и времето му на задържане отговаря на 5.052 min.

Анализът на метиловия естер на Бексаротен (E1) проведохме съгласно описания хроматографски метод, използван и при анализ на стандартна субстанция Бексаротен. При провеждане на анализа е използван работен разтвор с концентрация 640.00 µg/ml.

В получената хроматограма се отчита присъствието на ясно изразен пик при време на задържане 3.482 min. Така наблюдаваният пик може да бъде отнесен към метилов естер, характеризиращ се с време на задържане 3.482 min. Получените данни са представени на Фигура 55.

В хроматограмата на Бексаротен се наблюдава образуването на опашка, която може да се коригира чрез подкисляване на подвижната фаза. Такова явление обаче не се наблюдава на хроматограмата на метилов естер на Бексаротен. Наблюдаваният пик е

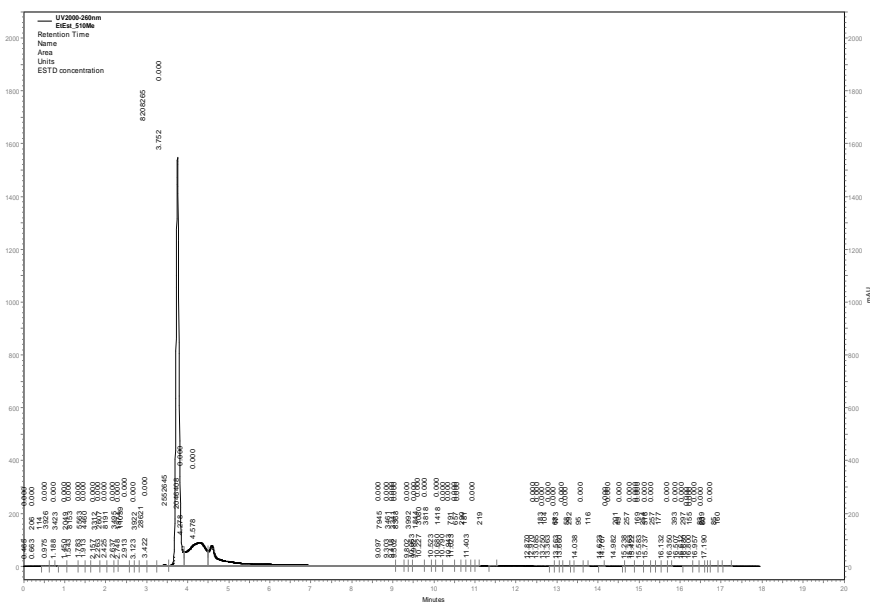
висок и с тясна основа, което показва че използваната хроматографска система е с достатъчна ефективност.



Фигура 55. Хроматограма, получена при анализ на метилов естер на Бексаротен (E1) с концентрация 640.00 µg/ml

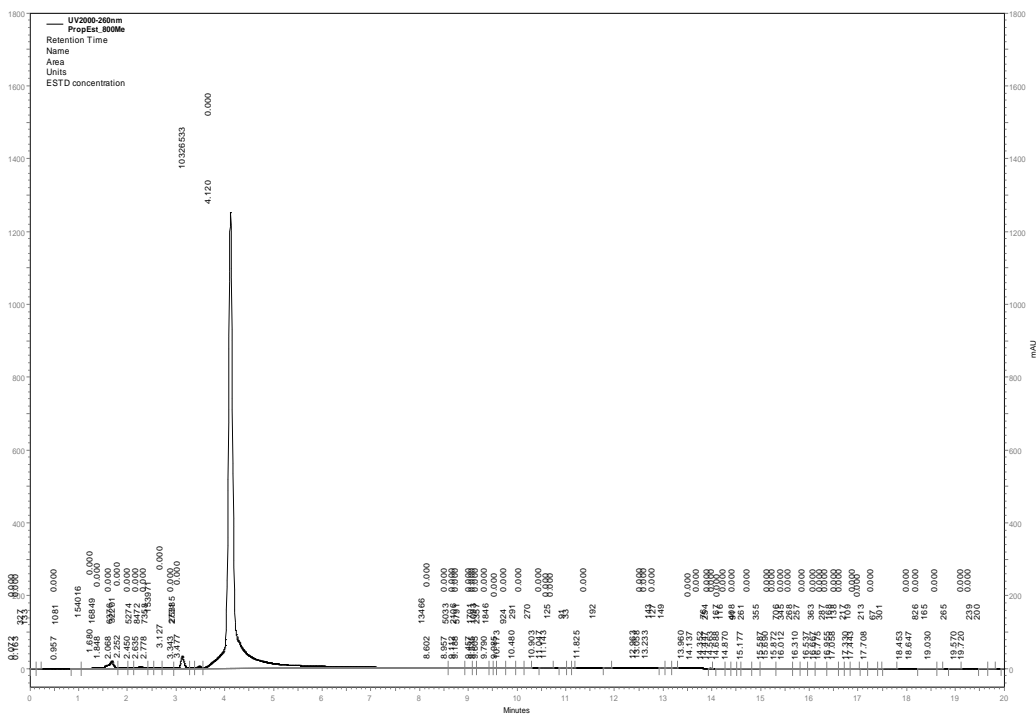
Анализът на етиловият естер на Бексаротен (E2) е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция Бексаротен. Концентрацията на използвания при анализ работен разтвор е 510.00 µg/ml. Резултатите от анализа са представени на Фигура 56.

При анализ на хроматограмата на етилов естер на Бексаротен се отчита наличие на три недобре разделени пика. Пикът с по-висок интензитет в получената хроматограма следва да бъде отнесен към целевия продукт на синтеза. Посоченият пик е отчетен при време на задържане отговарящо на 3.752 min. Наблюдава се и пик при около 4.278 min и при 4.578 min. Не е определено на какво отговаря този пик. Вероятно е страничен продукт от синтеза или нереагирал Бексаротен.



Фигура 56. Хроматограма, получена при анализ на етилов естер на Бексаротен (E2) с концентрация 510.00 µg/ml

Анализът на пропилов естер на Бексаротен (E3) е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция Бексаротен. Използваната концентрация на работен разтвор на пробата е 800.00 µg/ml. Резултатите от анализа са представени на Фигура 57.



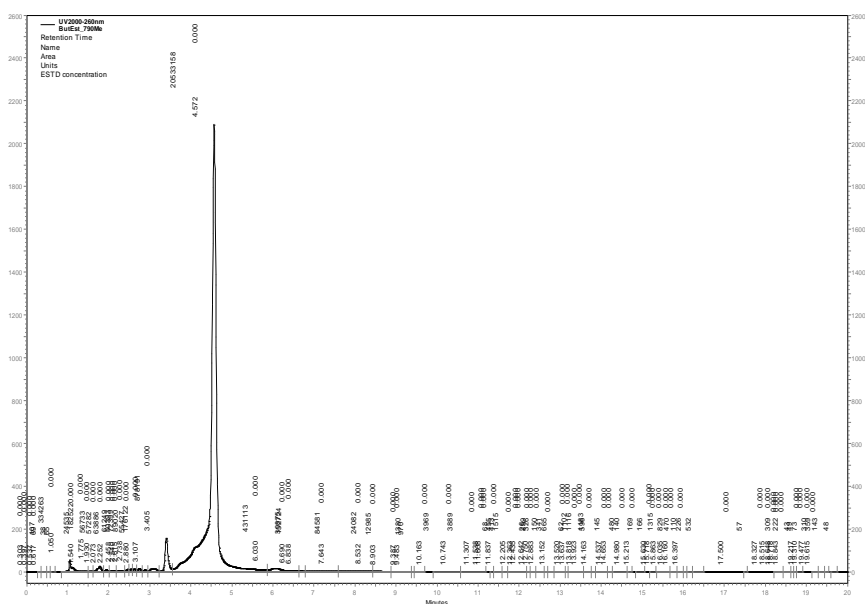
Фигура 57. Хроматограма, получена при анализ на пропилов естер на Бексаротен (E3) с концентрация 800.00 µg/ml

При анализ на хроматограмата на пропилов естер на Бексаротен се отчита наличие на два пика. Пикът с по-висок интензитет в получената хроматограма следва да бъде отнесен към целевия продукт на синтеза. Посоченият пик е отчетен при време на задържане отговарящо на 4.12 min. Наблюдава се и пик при около 3.127 min. Не е определено на какво отговаря този пик. Вероятно е страничен продукт от синтеза.

Анализът на бутилов естер на Бексаротен (E4) е проведен съгласно описания хроматографски метод, използван за анализа на стандартна субстанция Бексаротен. Концентрация на работен разтвор на пробата е 790.00 µg/ml. Резултатите от анализа са представени на Фигура 58.

Получените хроматографски данни показват наличие на висок интензивен пик при време на задържане 4.572 min. Пикът с по-висок интензитет в получената хроматограма следва да бъде отнесен към целевия продукт на синтеза.

На хроматограмата се наблюдава и още един пик с време на задържане 3.405 min и рамо на високо интензивния пик, които вероятно се дължат на примеси от синтеза на бутиловия естер на Бексаротен.



Фигура 58. Хроматограма, получена при анализ на бутилов естер на Бексаротен (E4) с концентрация 790.00 µg/ml

От представените хроматограми можем да заключим, че времената на задържане на всички анализирани вещества са с близки стойности, но въпреки това могат да се

отдиференцират като различни съединения. Сходните времена на задържане са вследствие на сродните им структури.

4. *IN SILICO* МЕТОДИ ЗА ПРОГНОЗИРАНЕ НА БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА ЕСТЕРИ НА БЕКСАРОТЕН

4.1. Прогнозиране на потенциалната метаболитна активност на Бексаротен, новосинтезирани естери на Бексаротен и техните метаболити посредством QSAR Toolbox

Проведено е изследване посредством метаболитни модели за потенциалната метаболитна активност на структурата на Бексаротен и на новополучените му естери.

Прилагането на QSAR модели позволява да се идентифицират метаболитите, да се охарактеризират физикохимичните свойства и да се определят свойствата, повлияващи биологичната активност на Бексаротен и неговите естери.

За пълна оценка активността на естерите на Бексаротен е необходим детайлен анализ на изходното съединение, което включва както експериментално, така и теоретично предсказване на метаболитната му активност. От своя страна, естерите могат да проявят по-голяма биологична активност и токсичност.

За цялостното охарактеризиране на новополучените аналози на Бексаротен освен метаболитната активност, се определя и тяхното потенциално взаимодействие с ДНК и белтъци. Получената информация е от съществено значение за изследването на биологичния потенциал на новосинтезираните съединения и техният профил на безопасност.

За целта на научната работа е приложен математичен модел за определяне на потенциалната метаболитна активност на структурата на Бексаротен.

Този модел ни даде възможност да идентифицираме и определим физикохимичните свойства на Бексаротен и неговите естери, както и някои от свойствата, повлияващи биологичната активност на молекулите.

Получените резултати за свързване на Бексаротен и неговите естери с ДНК и протеини са представена на Таблица 19.

Таблица 19. Свързване на изходните съединения с ДНК и протеини.

<i>Съединение</i>	<i>Bexarotene</i>	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>
<i>Свързване с ДНК</i>	-	-	-	-	-
<i>Свързване с протеини</i>	-	-	-	-	-

От проведения *in silico* анализ се вижда, че нито Бексаротен, нито новосинтезираните му естери се свързват с ДНК и протеини, следователно не предизвикват мутагенност и генотоксичност. От това следва, че естерите са с профил на безопасност идентичен на този на Бексаротен.

4.1.1. Симулатор на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове

Наборът от молекулярни трансформации в симулатора на чернодробен метаболизъм се състои отчасти от 30-40 абиотични (неензимни) и 630-640 ензимни реакции. Смята се, че абиотичните реакции протичат с много висока скорост и на тези реакции се дава по-висок приоритет. Тази подгрупа от реакции включва също трансформации на силно реактивни функционални групи и междинни съединения, като тавтомеризация, прегрупиране на арен епоксид във феноли и т.н.

Симулаторът съдържа също 520-530 ензимни трансформации от I^{ba} фаза, като алифатно С-окисление, ароматно С-хидроксилиране, окислително N- и O-деалкилиране, епоксидиране, естерна и amidна хидролиза, редукция на карбонилни групи, редукция на нитро- и азо- групи, N-хидроксилиране, окислително дезаминиране, бета-окисление, разцепване на пръстена, хидролитично разцепване, въвеждане на ароматни фрагменти, декарбоксилиране, дехалогениране и т.н. Моделът включва 100-110 ензимни трансформации от II^{pa} фаза, като глюкурониране, сулфатиране, конюгиране на глутатион, N-ацетилиране и т.н., които, за разлика от *in vitro* системите, се смята, че се случват с висок приоритет *in vivo*. Посредством QSAR Toolbox се визуализират само метаболитите (продукти), получени от I^{ba} фаза реакции.

Посредством метаболитни модели е проведено изследване за потенциалната метаболитна активност на структурата на Бексаротен и новосинтезираните му естери.

Прилагането на модел на математично прогнозиране ни даде възможност да идентифицираме и определим физикохимичните свойства на структурата на Бексаротен

и естерните му производни, както и някои от свойствата, повлияващи биологичната активност на препарата.

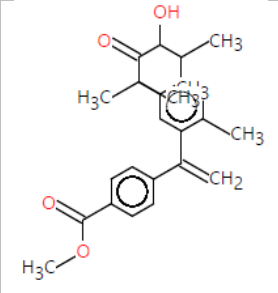
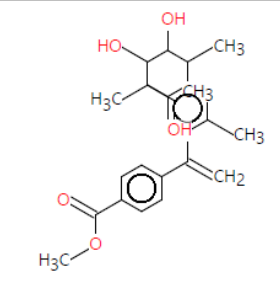
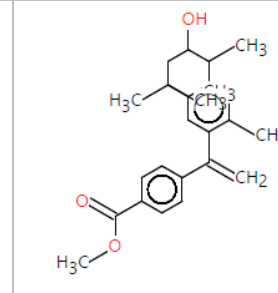
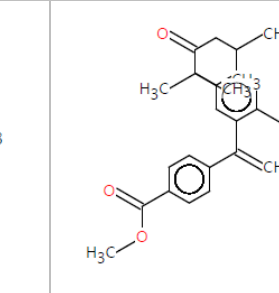
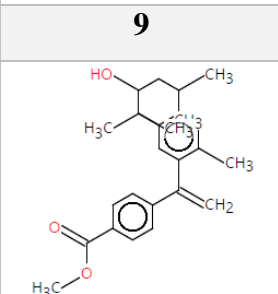
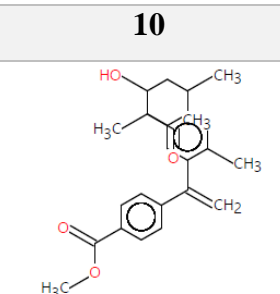
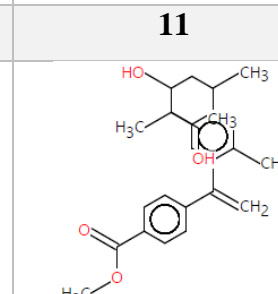
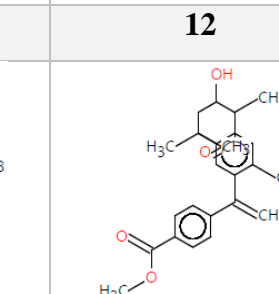
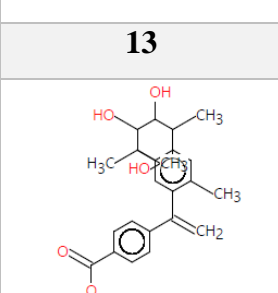
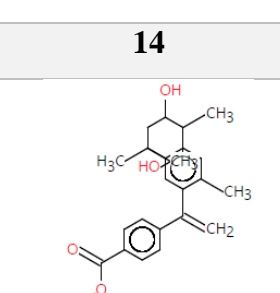
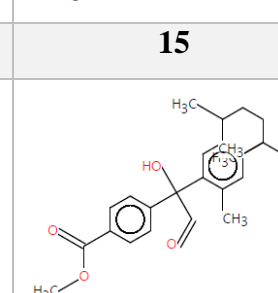
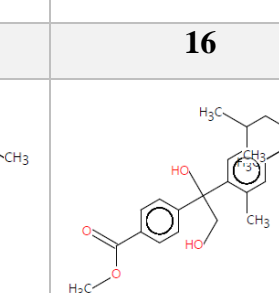
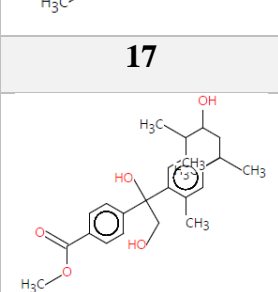
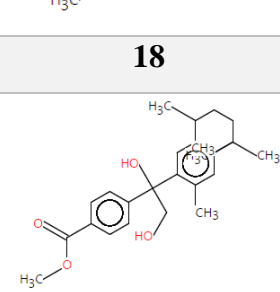
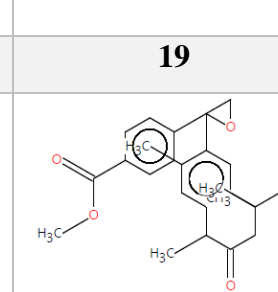
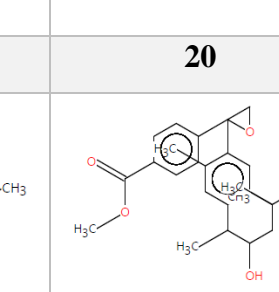
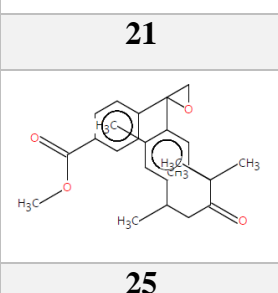
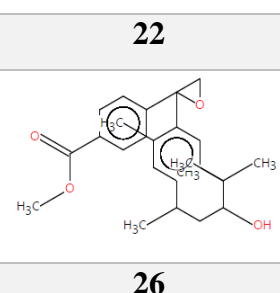
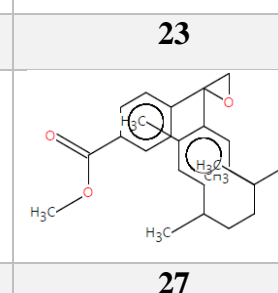
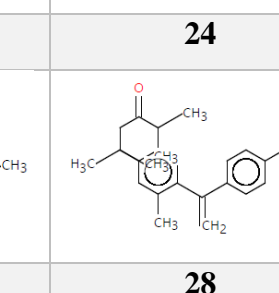
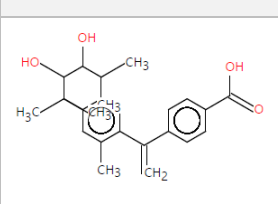
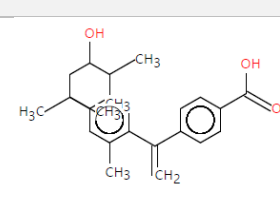
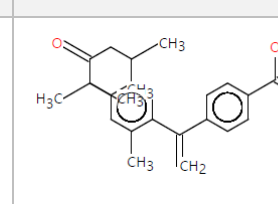
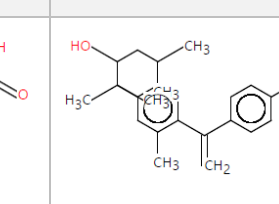
Като резултат от проведеното математично прогнозиране чрез симулатора на *in vivo* метаболизъм при плъхове на Бексаротен на Таблица 20 са представени получените метаболити. Метаболизмът на естерите на Бексаротен E1, E2, E3 и E4 са представени съответно на Таблица 21, 22, 23 и 24.

Таблица 20. Номера и структура на предвидените метаболити на Бексаротен, получени след направена симулация на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10		11

Таблица 21. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E1, получени след направена симулация на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
5	6	7	8

			
9	10	11	12
			
13	14	15	16
			
17	18	19	20
			
21	22	23	24
			
25	26	27	28
			
29	30	31	32

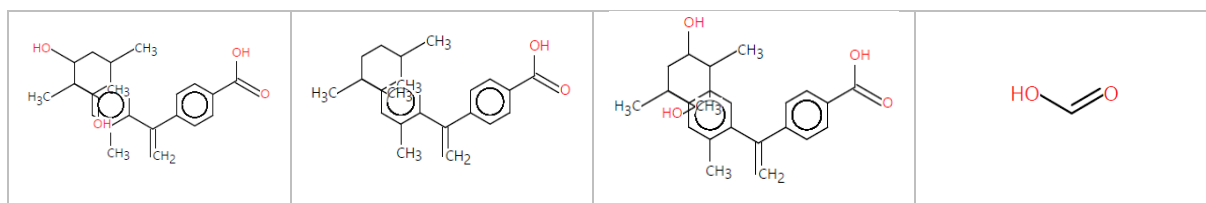


Таблица 22. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E2, получени след направена симулация на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24

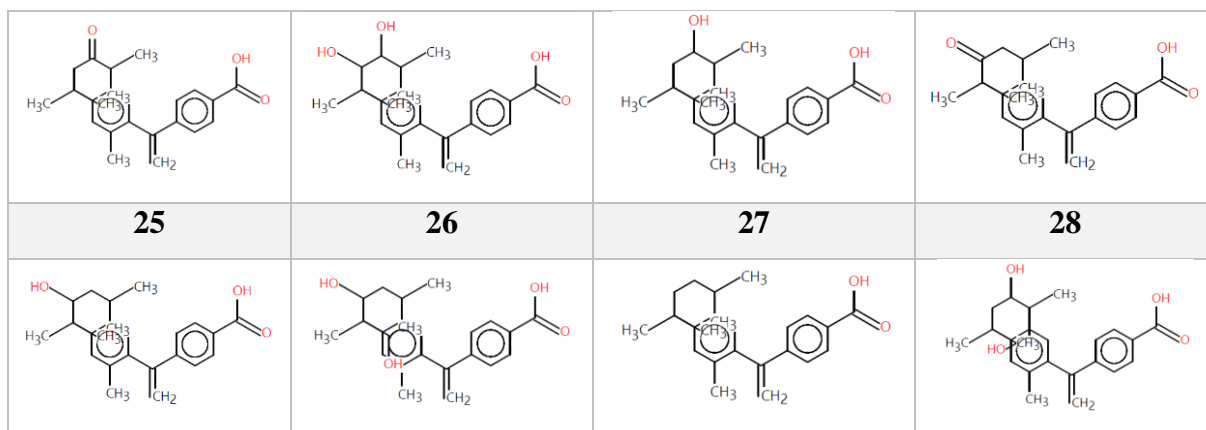
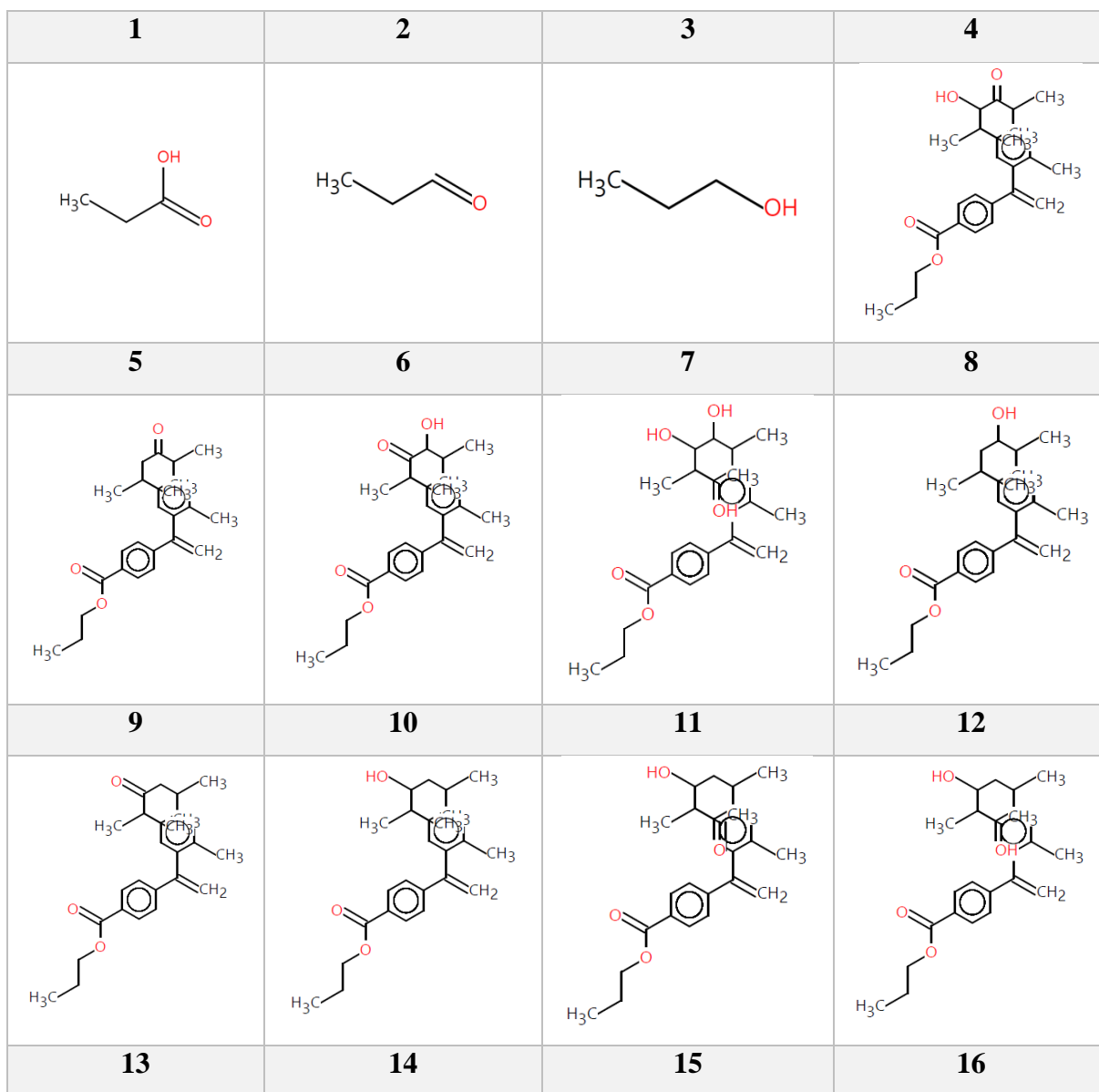


Таблица 23. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение Е3, получени след направена симулация на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове.



17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32

Таблица 24. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E4, получени след направена симулация на чернодробен *in vivo* метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4

5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32

33	34	35	36
37	38	39	40
41	42	43	44
45	46	47	48
49			

Представените данни сочат, че метаболитите получени от естерите на Бексаротен частично се припокриват с тези, получени от Бексаротен. Това се дължи на метаболитната трансформация (хидролизата) на естерите до Бексаротен и алкохолът, използван за синтеза на естерите. Това обуславя възможността им да бъдат използвани като предлекарства поради способността им да освобождават Бексаротен след перорално приложение.

Метаболитите на естерите, различни от тези на Бексаротен, са получени вследствие на биотрансформации, предхождащи хидролизата. Също така може да се отбележи, че по-сложните естери, или тези с по-голяма молекулна маса, дават по-голям брой метаболити.

Полученият вследствие на хидролиза алкохол също претърпява биотрансформация. Известно е, че алкохолите се метаболизират от ензима алкохол дехидрогеназата до алдехиди и след това до карбоксилни киселини. Метанолът първоначално се метаболизира до формалдехид (HCHO) и след това до мравчена киселина (HCOOH), които предизвикват тежка ацидоза и водят до увреждане на ЦНС и зрителния нерв. Етанолът има директен наркотичен ефект върху ЦНС. След метаболизиране се получава ацеталдехид (CH_3CHO), а след това оцетна киселина (CH_3COOH), вследствие на което е възможно да се достигне до метаболитна ацидоза. Метанолът и пропанолът са по-токсични от етанола, като двата алкохола имат сериозни отрицателни ефекти върху гастро-интестиналния тракт и ЦНС. Ефектите на пропанола върху човека наподобяват тези на етанола, но с 2-4 пъти по-силно действие. Метаболизира се до пропанова киселина ($\text{C}_2\text{H}_6\text{COOH}$), от която също може да се получи метаболитна ацидоза. Бутанолът дразни очите, дихателните пътища и кожата при продължителна експозиция, въпреки че острата перорална или парентерална експозиция на големи дози за терапевтични цели при хора няма неблагоприятни ефекти. Достатъчно безопасен е за приложение в козметиката. Според литературни данни в повечето случаи бутанолът се метаболизира бързо до въглероден диоксид. При симулацията на чернодробен метаболизъм се получава бутанова киселина ($\text{C}_3\text{H}_9\text{COOH}$).

Големият набор от възможни метаболити предразполага към по-силно изразени фармакологични или токсични ефекти, което налага необходимостта от провеждане на допълнителни изследвания за биологичната активност на получените метаболити.

4.1.1.1. Свързване с ДНК и протеини

За охарактеризиране на новополучените аналози на Бексаротен освен метаболитната активност, се определя и тяхното потенциално взаимодействие с ДНК и белтъци. Получената информация е от съществено значение за изследването на биологичния потенциал на новосинтезираните съединения и техният профил на безопасност.

На основата на проведения анализ са идентифицирани и обобщени механизмите, посредством които Бексаротеновите метаболити и неговите естери могат да увредят черния дроб. Такива са специфични реакции на взаимодействие с биологичните макромолекули (ДНК и протеини) в черния дроб. Възможността за свързване на

получените метаболити на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК и белтъци са представени съответно на Таблица 25 и 26.

На базата на проведения анализ се счита, че структурата на Бексаротен и неговите естери имат способността да образуват метаболити, които могат да се свързват както с ДНК, така и с протеини.

Структурите, свързващи се с ДНК е възможно да притежават генотоксичност. Свързване с протеини може да доведе до образуването на протеинови конюгати, които могат да окажат директно въздействие върху клетката, чрез нарушаване на основните ѝ функции. Могат да действат и индиректно, което също може да доведе до увреждане.

Таблица 25. Свързване на метаболитите на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК.

Свързване с ДНК	Структура	<i>Няма намерено структурно сходство</i>	<i>Епоксиди, Азиридили, Тишрани и Оксетани</i>
	Механизъм	-	<i>Алкилиране, директно действащи епоксиди и подобни</i>
	Механистичен домейн	-	S_N^2
Метаболит №	<i>Вех</i>	1-11	-
	<i>E1</i>	1-18, 24-32	19-23
	<i>E2</i>	1-14, 21-28	15-20
	<i>E3</i>	1-19, 25-32	20-24
	<i>E4</i>	1-22, 28-46, 49	23-27, 47, 48

Таблица 26. Свързване на метаболитите на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с протеини.

Свързване с	Структура	<i>Няма намерено структурно сходство</i>	<i>Алдехиди</i>	<i>Кетони</i>	<i>Епоксиди, Азиридили и Сулфурани</i>
	Механизъм	-	<i>Формиране на шифови бази с</i>	<i>Присъединява не към двойна връзка</i>	<i>Отваряне на пръстена</i>

		карбонилни съединения	въглерод- хетеро атом	чрез S_N^2 реакция	
Механисти чен домейн		Формиране на шифови бази	Нуклеофилно присъединява не	S_N^2	
Метаболит №	Вех	2-4, 6, 8, 10, 11	7, 9	1, 5	-
	E1	2, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 16-18, 25, 26, 28-32	1, 10, 12, 15	3-5, 8, 19, 21, 24, 27	19-23
	E2	1, 3, 7, 8, 10, 12- 14, 22, 23, 25-28	2, 11	4-6, 9, 15, 18, 21, 24	15-20
	E3	1, 3, 7, 8, 10, 12, 14, 15, 17-19, 26, 27, 29-32	2, 11, 13, 16	4-6, 9, 20, 22, 25, 28	20-24
	E4	1, 3, 7, 8, 10, 12, 14-18, 20-22, 28, 33, 34, 36, 37, 39, 40, 42-46, 49	2, 11, 13, 19, 29-31	4-6, 9, 23, 25, 32, 35, 38, 41	23-27, 47, 48

В резултат на този метаболизъм Бексаротен дава 11 метаболита, като нито един от тях не може да се свърже с ДНК, но 4 от тях могат да се свържат с протеини.

Метиловият естерът на Бексаротен (E1) дава 32 метаболита, като 5 от тях могат да се свържат с ДНК и 15 - с протеини.

Аналогично на E1, етиловият естер (E2) дава 28 метаболита - 6 от тях могат да се свържат с ДНК и 14 с протеини. Пропиловият естер (E3) дава 32 метаболита. 4 се свързват с ДНК и 15 с протеини, а бутиловият естер (E4) дава 49 метаболита, от които 7 се свързват с ДНК и 22 с протеини.

При всички прогнозираните метаболити на новосинтезираните естери с възможност за свързване с ДНК, механизмът на свързване е чрез S_N^2 реакция. Свързването с протеини се осъществява чрез формиране на шифови бази, нуклеофилно присъединяване и чрез S_N^2 реакция.

Най-висока метаболитна активност показва естерът E4. Той образува най-голям брой метаболити, които се свързват с ДНК и с протеини.

4.1.2. Симулатор на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове

Чернодробният S9 метаболизъм се дефинира от „Речника на термините, използвани в токсикологията на IUPAC“ на Националната медицинска библиотека на САЩ като „супернатантна фракция, получена от хомогенат на орган (обикновено черен дроб) чрез центрофугиране при 9000 g за 20 минути в подходяща среда. Тази фракция съдържа смес от нефракционирани микрозомни и цитозол“. Микрозомната компонента на S9 фракцията съдържа голямо разнообразие от ензими, които метаболизират ксенобиотици. Обикновено се използва за *in vitro* ADME проучвания на метаболизъм от I^{ва} и II^{ра} фаза.

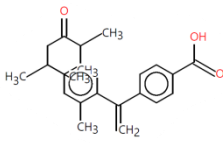
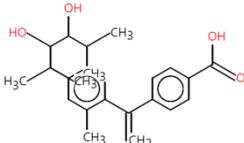
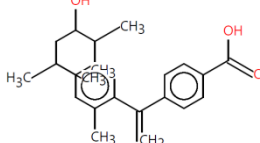
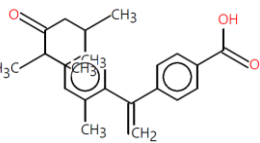
За разлика от чернодробните микрозомни, които съдържат само субклетъчната фракция на ендоплазмения ретикулум (съдържаща най-вече цитохром P450 ензими или и уридин 5'-дифосфо-глюкуронозилтрансфераза), S9 фракциите съдържат и цитозолни ензими като алдехид оксидаза, ксантин оксидаза, сулфотрансферази, метилтрансферази, N-ацетил трансферази и глутатион трансферази.

Симулацията на метаболизъм вследствие на чернодробната S9 фракция е наложително поради възможността за образуване на метаболити, различни от тези, получени при чернодробната *in vivo* симулацията. Получените метаболити, вследствие на симулацията на чернодробен S9 метаболизъм на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 са представени съответно в Таблицы 27, 28, 29, 30 и 31.

Получените данни показват, че при симулация на чернодробен S9 метаболизъм Бексаротен дава 5 метаболита. Естерите на Бексаротен дават по-голям брой метаболити – E1 дава 12, а E2, E3 и E4 дават по 14 метаболита.

При метаболизма на естерите на Бексаротен се наблюдава хидролиза до Бексаротен и алкохола, използван за синтеза. Това допълнително потвърждава хипотезата, че естерите на Бексаротен могат да се прилагат като предлекарства.

Таблица 27. Номера и структура на предвидените метаболити на Бексаротен, получени след направена симулация на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
			

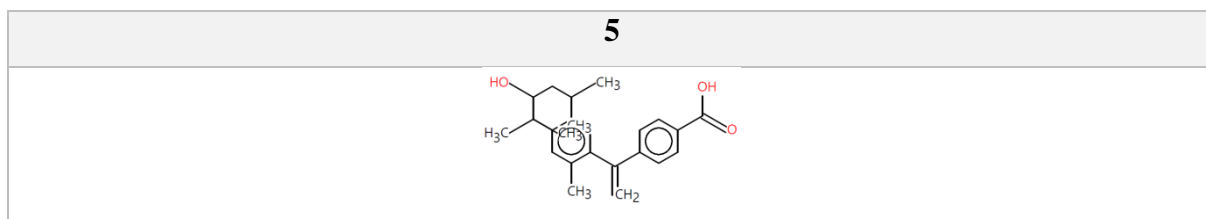


Таблица 28. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E1, получени след направена симулация на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

Таблица 29. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E2, получени след направена симулация на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4

5	6	7	8
9	10	11	12
13		14	

Таблица 30. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение E3, получени след направена симулация на черндробен S9 метаболизъм при плъхове.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12

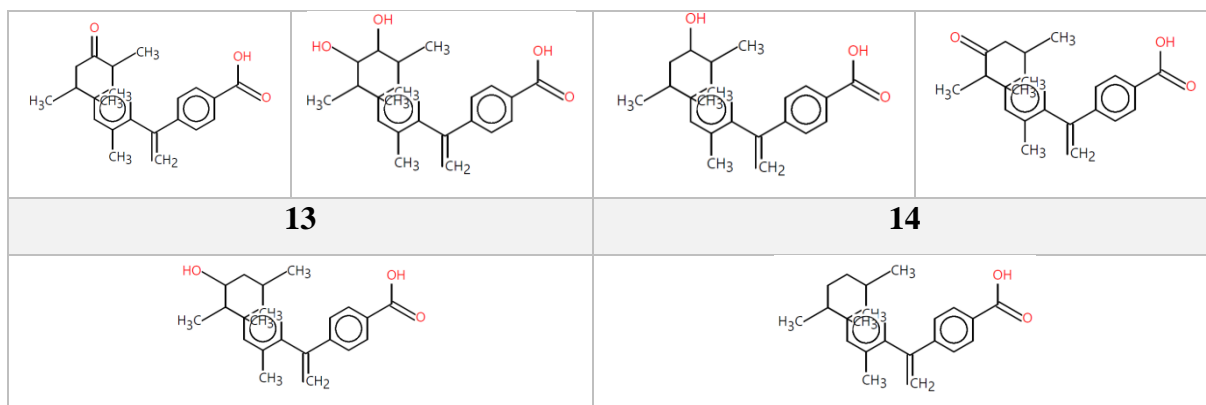
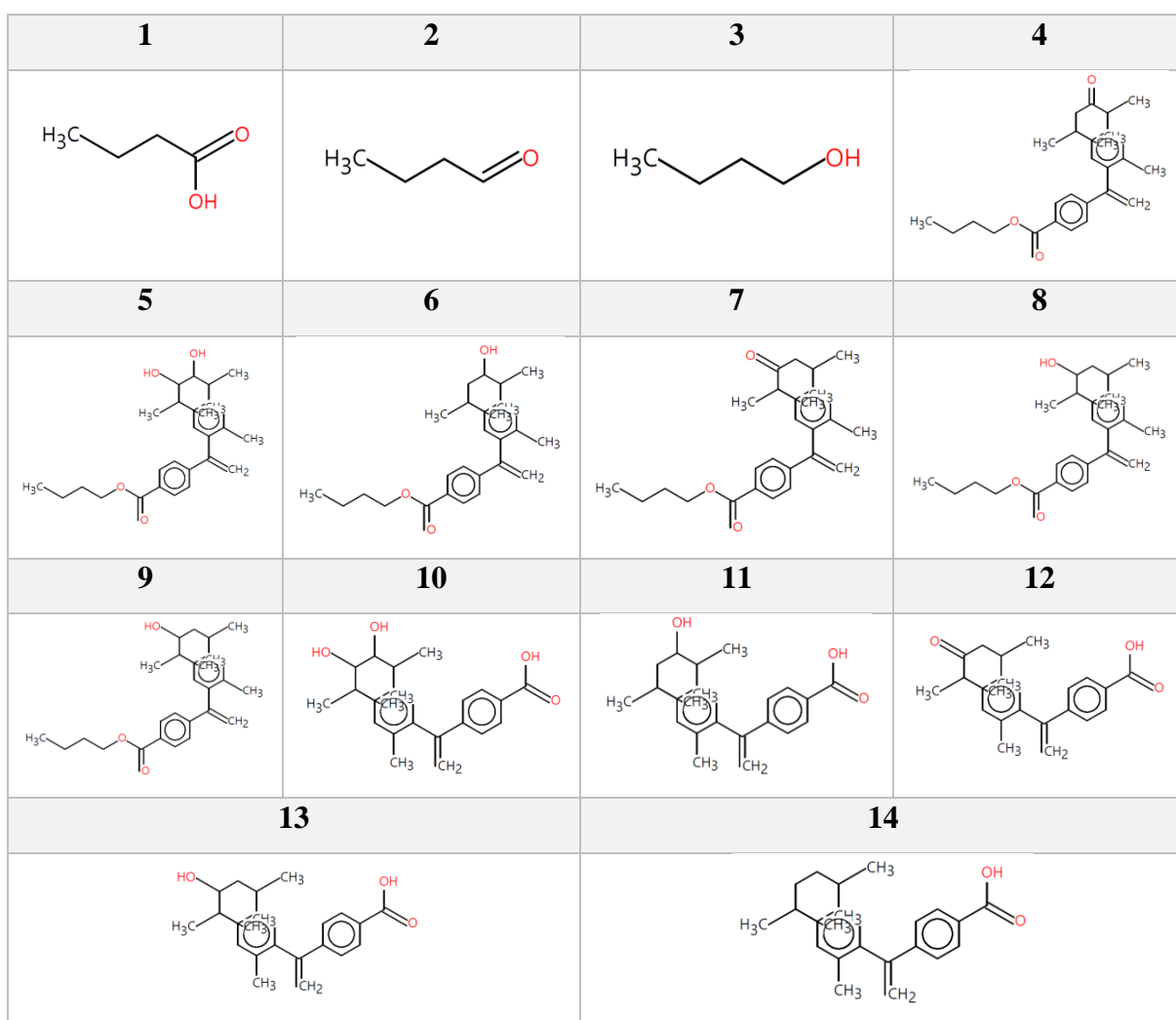


Таблица 31. Номера и структура на предвидените метаболити на съединение Е4, получени след направена симулация на чернодробен S9 метаболизъм при плъхове.



При E1 Бексаротен е метаболит № 12, а при E2, E3 и E4 Бексаротен е метаболит № 14. След освобождаването на Бексаротен, той също се метаболизира до същите метаболити, получени при симулацията на метаболизъм на Бексаротен. Останалите метаболити на естерите са получени вследствие на реакции предхождащи хидролизата.

4.1.2.1. Свързване с ДНК и протеини

Направен е анализ за възможността за свързване с ДНК и протеини на метаболитите, получени при симулатора на чернодробен S9 метаболизъм. Възможността за свързване на получените метаболити на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК и белтъци са представени съответно на Таблица 32.

Таблица 32. Свързване на метаболитите на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК и протеини.

	Свързване с ДНК		Свързване с протеини			
	Структура	Няма намерено структурно сходство	Структура	Няма намерено структурно сходство	Алдехиди	Кетони
Свързване с ДНК	Механизъм	-	Механизъм	-	Формиране на шифови бази с карбонилни съединения	Присъединяване към двойна връзка въглерод-хетеро атом
	Механистичен домейн	-	Механистичен домейн	-	Формиране на шифови бази	Нуклеофилно присъединяване
Метаболит №	Вех	1-5	Вех	2, 3, 5	-	1, 4
	E1	1-12	E1	1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12	-	2, 5, 7, 10
	E2	1-14	E2	1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14	2	4, 7, 9, 12

<i>E3</i>	1-14		1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14	2	4, 7, 9, 12
<i>E4</i>	1-14		1, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 14	2	4, 7, 9, 12

На базата на проведеня анализ можем да заключим, че структурата на Бексаротен и неговите естери имат способността да образуват метаболити, които могат да се свързват с протеини, но не и с ДНК.

При свързване с протеини е възможно протеиновите конюгати да окажат директно въздействие върху клетката, чрез нарушаване на основни нейни функции или да действат индиректно и отново да доведат до увреждане.

Нито един от метаболитите, получени вследствие на симулацията на чернодробен S9 метаболизъм на Бексаротен и неговите естери не може да се свърже с ДНК. От получените 5 метаболита на Бексаротен 3 не могат да се свържат с ДНК, а два от тях могат да се свържат с протеини посредством нуклеофилно присъединяване.

Осем от метаболитите на естера E1 не могат да се свържат с протеини. Останалите 4 могат да се свържат с протеини посредством нуклеофилно присъединяване.

При естерите E2, E3 и E4 се наблюдава, че 9 от получените метаболити не могат да се свържат с протеини, 1 може да се свърже чрез формиране на шифови бази и 4 – чрез нуклеофилно присъединяване.

Най-висока метаболитна активност показват естерите E2, E3 и E4. Те образуват най-голям брой метаболити, които се свързват с протеини.

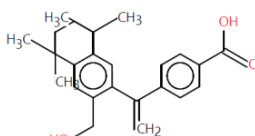
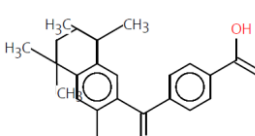
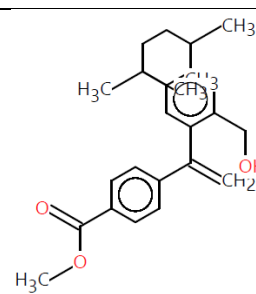
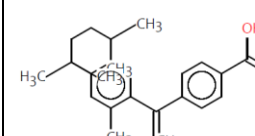
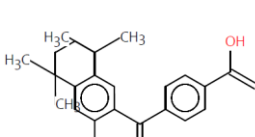
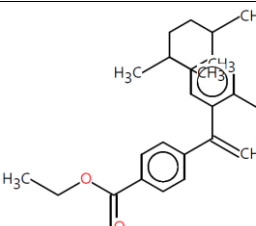
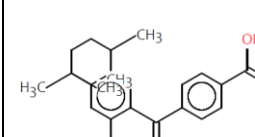
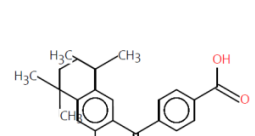
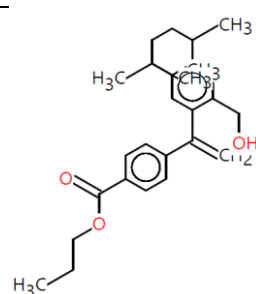
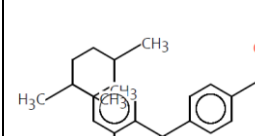
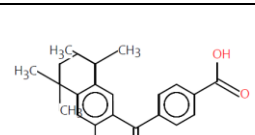
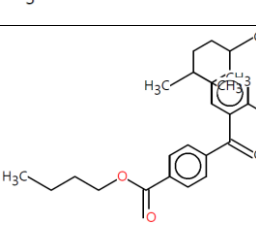
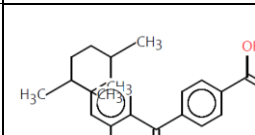
4.1.3. Симулатор на кожен метаболизъм

Кожата е способна да метаболизира както ендогенни, така и екзогенни вещества, подобно на други органи в човешкия организъм, които съдържат множество ензими. Процесите, които могат да се повлияят от кожния метаболизъм са кожна токсичност, абсорбция, поддържане на хомеостаза, доставка на дермални лекарствени форми и ефикасност. Интересът към потенциалните широко обхватни ефекти на кожата нараства. Това от своя страна води до развитието на *in vitro* методи за прогнозиране на потенциала на различни вещества да продуцират кожни метаболити.

Тъй като Бексаротен основното, но не само, е показание за приложение при СТCL под формата на 1% гел е от особено значение да се изследват възможностите на кожен метаболизъм на новосинтезираните Бексаротенови аналози.

Поради това е проведен анализ за определяне на потенциалния кожен метаболизъм на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4. Получените данни са представени съответно в Таблица 33.

Таблица 33. Номера и структура на предвидените метаболити на Бексаротен и неговите естери, получени след направена симулация на кожен метаболизъм.

№	1	2	3	4
Bex		-	-	-
E1		$\text{H}_3\text{C}-\text{OH}$		
E2		$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$		
E3		$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$		
E4		$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$		

Получените данни показват, че при симулация на кожен метаболизъм Бексаротен дава 1 метаболит, а неговите естери дават по 4 метаболита. Метаболит № 1 е един и същ както за Бексаротен, така и за неговите естери. Отново се наблюдава процес на хидролиза, при който се освобождава Бексаротен (метаболит № 4) и алкохолът, използван за синтеза на естера. Това потвърждава възможността за дермално приложение на естерите на Бексаротен като предлекарства според QSAR Toolbox.

4.1.3.1. Свързване с ДНК и протеини

Направен е анализ за възможността за свързване с ДНК и протеини на метаболитите, получени при симулатора на кожен метаболизъм. Възможността за свързване на получените метаболити на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК и белтъци са представени съответно на Таблица 34.

Таблица 34. Свързване на метаболитите на Бексаротен и неговите естери E1, E2, E3 и E4 с ДНК и протеини.

<i>Свързване с ДНК</i>	Структура	<i>Няма намерено структурно сходство</i>	<i>Свързване с протеини</i>	Структура	<i>Няма намерено структурно сходство</i>
	Механизъм	-		Механизъм	-
	Механистичен домейн	-		Механистичен домейн	-
<i>Метаболит №</i>	<i>Вех</i>	1	<i>Метаболит №</i>	Вех	1
	<i>E1</i>	1-4		E1	1-4
	<i>E2</i>	1-4		E2	1-4
	<i>E3</i>	1-4		E3	1-4
	<i>E4</i>	1-4		E4	1-4

На базата на проведения анализ се счита, че структурата на Бексаротен и неговите естери имат способността да образуват метаболити, които не могат да се свързват нито с ДНК, нито с протеини.

4.2. Прогнозиране на орална активност на Бексаротен, Бексаротенови метаболити и новосинтезирани естери посредством Molinspiration софтуер

4.2.1. Определяне на орална активност чрез Molinspiration софтуер

Идеалната лекарствена молекула трябва да има определени физикохимични свойства, които да отговарят на правилото на Липински. Последният предсказва възможността една биологично активна молекула да може да бъде приемана перорално. Съгласно правилото на Липински една молекула трябва да има молекулна маса < 500 далтона; коефициент на разпределение октанол-вода ($miLogP$) < 5 ; < 5 донора на водородни връзки; < 10 акцептора на водородни връзки; полярна повърхностна площ от $< 140 \text{ \AA}^2$; < 10 въртящи се връзки.

Ако едно съединение не нарушава повече от едно правило, тогава то ще има добри фармакокинетични свойства и повишена бионаличност в метаболитния процес на организма.

Определянето на фармакокинетичните свойства на Бексаротен и на новосинтезираните естери на Бексаротен е направено посредством Molinspiration софтуер. Резултатите от анализа са представени на Таблица 35.

Скоростта на абсорбция зависи от липофилността на лекарствената молекула. Липофилността се изразява като логаритъм от съотношението на лекарството, което се разпределя в органичната фаза към това във водната фаза, или „LogP”. Съществуват както физични, така и математични методи за измерването на LogP. В случая LogP се изчислява по методологията, разработена от Molinspiration като сума от приноси, базирани на фрагменти и корекционни фактори. Методът може да обработва практически всички органични и повечето органометални молекули.

Молекулярната полярна повърхност се изчислява като сума от приноса на фрагменти. Разглеждат се полярни фрагменти с кислороден O- и азотен N-атом. Доказано е, че полярната повърхност е показател, характеризиращ абсорбцията на лекарството, включително чревната абсорбция, бионаличността, пропускливостта на аденокарцином на дебелото черво (Caco-2) и проникването през кръвно-мозъчната бариера.

Таблица 35. Фармакокинетични показатели на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен, получени посредством Molinspiration софтуер.

Свойство	Вех	Е1	Е2	Е3	Е4
miLogP	6.81	7.07	7.44	7.95	8.41
TPSA	37.30	26.30	26.30	26.30	26.30
Молекулна маса	348.49	362.51	376.54	390.57	404.59
Брой Н-акцептори	2	2	2	2	2
Брой Н-донори	1	0	0	0	0
Брой нарушения	1	1	1	1	1
Брой въртящи се връзки	3	4	5	6	7
Молекулен обем	348.76	366.29	383.09	399.89	416.69

Увеличаването на молекулната маса води до намаляване на пропускливостта в червата и в централната нервна система. Следователно съединенията с по-голяма молекулна маса е по-малко вероятно да бъдат орално активни.

Броят въртящи се връзки е мярка за молекулярна гъвкавост. От нея зависи бионаличността на лекарствата. Въртяща се връзка се дефинира като всяка единична връзка без пръстен, свързана с нетерминален тежък (т.е. неводороден) атом. Амидните C-N връзки не се разглеждат поради тяхната висока ротационна енергийна бариера.

След проведеното проучване се установи, че според правилото на Липински всички съединения дават по 1 нарушение. От това следва, че както Бексаротен, така и новосинтезираните естери са орално активни, т.е. имат добри фармакокинетични показатели и повишена бионаличност в метаболитния процес на организма.

4.2.2. Определяне на биоактивност чрез Molinspiration софтуер

Лекарственото подобие може да се определи като сложен баланс на различни молекулни свойства и структурни характеристики, които определят дали дадена молекула е подобна на вече познато лекарство. Тези свойства, главно хидрофобност, електронно разпределение, характеристики на водородно свързване, размер и гъвкавост на молекулата и разбира се наличието на различни фармакофорични характеристики влияят на поведението на молекулата в жив организъм, включително бионаличност,

транспортни свойства, афинитет към протеини, реактивност, токсичност, метаболитни стабилност и много други.

Разнообразието от възможни мишени за лекарства (от които всяка изисква различна комбинация от съвпадащи молекулни характеристики) е толкова огромно, че е възможно да се намери общ знаменател за всички тях и да се изрази подобие на молекулата на лекарството чрез едно „магическо число“. Прости критерии за преброяване (като граници за молекулно тегло, logP или брой донори или акцептори на водородни връзки) също имат относително ограничена приложимост и са полезни само за изхвърляне на очевидни нелекарства. Колкото по-висока е стойността, толкова по-добре се свързва съединение с конкретния рецептор или ензим.

Отново чрез Molinspiration software е направен анализ за биоактивността на Бексаротен и на новосинтезираните естери на Бексаротен. Резултатите от анализа са представени на Таблица 36.

Таблица 36. Биоактивност на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен, получени посредством Molinspiration софтуер.

<i>Свойство</i>	Вех	E1	E2	E3	E4
<i>Лиганд за GPCR</i>	0.47	0.32	0.28	0.30	0.33
<i>Модулятор на йонни канали</i>	0.14	0.04	0.06	0.05	0.07
<i>Киназен инхибитор</i>	0.01	-0.06	-0.11	-0.09	-0.07
<i>Лиганд за ядрени рецептори</i>	0.92	0.71	0.70	0.68	0.68
<i>Протеазен инхибитор</i>	0.02	-0.10	-0.13	-0.11	-0.07
<i>Ензимен инхибитор</i>	0.39	0.24	0.20	0.23	0.25

От получените данни се вижда, че Бексаротен има най-голяма биологична активност от всички съединения. Въпреки това естерите сами по себе си имат активност спрямо рецепторите и ензимите посочени в Таблица 36. В такъв случай естерите не отговарят напълно на определението за предлекарства. От друга страна активността на естерите спрямо същите рецептори и ензими би повишило активността на лекарството.

От т. 4.1. установихме, че след метаболизъм естерите освобождават Бексаротен, от което следва, че приложението на Бексаротен под формата на предлекарство (естер) би следвало да бъде в по-ниски дози и вероятно да се прилага по-рядко. Това от своя страна ще повиши „комплайънса“ на пациентите.

4.3. Прогнозиране на абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен посредством PreADME/Tox софтуер

Прогнозирането на фармакокинетичния и токсикологичния профил на молекулите е от съществено значение в разработването на лекарства, което спестява време, разходи и излишни тестове с опитни животни. Получените резултати от *in silico* анализа са описани в Таблица 37.

Таблица 37. Фармакокинетични и токсикологични параметри на Бексаротен и новосинтезираните естери на Бексаротен, използвайки PredADME/T софтуер.

ADME/T параметри	Вех	Е1	Е2	Е3	Е4
Абсорбция					
<i>Чревна резорбция</i>	97.93	100	100	100	100
<i>Сасо-2</i>	22.220	27.559	42.081	43.436	44.676
<i>Пропускливост през кожата</i>	-0.7892	-0.7898	-0.7696	-0.7324	-0.7089
Разпределение					
<i>Свързване с плазмените протеини</i>	100	100	100	100	100
<i>Кръвно-мозъчна бариера</i>	1.8619	9.2775	11.216	13.846	15.833
Метаболизъм					
<i>Инхибитор на CYP3A4</i>	-	Инхибитор	Инхибитор	Инхибитор	Инхибитор
<i>Субстрат за CYP3A4</i>	Субстрат	Субстрат	Субстрат	Субстрат	Субстрат

<i>Инхибитор на CYP2C19</i>	-	-	-	-	-
<i>Инхибитор на CYP2C9</i>	Инхибитор	Инхибитор	Инхибитор	Инхибитор	Инхибитор
<i>Инхибитор на CYP2D6</i>	-	-	-	-	-
<i>Субстрат за CYP2D6</i>	-	-	-	-	-
Ренална екскреция					
<i>MDCK</i>	0.0775394*	0.0733903*	0.0656403*	0.0989707*	0.0927979*
Токсичност					
<i>Амес тест</i>	+	+	+	+	+
<i>Карциногенност при плъхове</i>	-	+	-	-	-
<i>Карциногенност при мишки</i>	-	-	-	-	-
<i>Инхибиране на hERG</i>	Среден риск	Среден риск	Среден риск	Среден риск	Среден риск

Чревна резорбция: Ниска абсорбция 0.00 – 20.00 %; Умерена абсорбция 20.00 – 70.00 %; Отлична абсорбция 70.00 – 100.00 %;

Сасо-2 клетъчна пропускливост: Висока пропускливост > 70.0 nm/sec; Средна пропускливост 4.0 - 70.0 nm/sec; Ниска пропускливост < 4.0 nm/sec;

Пропускливост през кожата: стойностите варират от -3.00 до 6.00;

Свързване с плазмените протеини: Силна връзка > 90.0%; Слаба връзка < 90.0%

Кръвно-мозъчна бариера: Висока абсорбция в ЦНС > 2.00; Средна абсорбция в ЦНС 0.10 ÷ 2.00; Ниска абсорбция в ЦНС < 0.10

MDCK: Ниска пропускливост < 25.0 nm/sec; Средна пропускливост 25.0 ÷ 500.0 nm/sec; Висока пропускливост > 500.0 nm/sec

Амес тест: Положителен: мутагенен; Отрицателен: немутагенен.

Канцерогенност: Положителен: канцерогенен; Отрицателен: неканцерогенен.

Направена е оценка на абсорбцията, разпределението, метаболизма, екскрецията и токсичността на новосинтезираните молекули. За оценка на профила на абсорбция са анализирани два основни модела за прогнозиране, този на пропускливостта в клетки, получени от аденокарцином на дебелото черво (Caco-2) и процентът на чревна абсорбция при хора (HIA). Caco-2 клетките имат няколко механизма за транспорт на лекарства през чревния епител и се използват главно като *in vitro* модел за оценка на абсорбцията на лекарства за орално приложение. HIA е сумата от бионаличността и абсорбцията на тестваното съединение, оценена от съотношението на екскреция или кумулативна екскреция в урината, жлъчката и изпражненията. От получените данни се вижда, че чревната абсорбция след орално приложение за естерите е отлична (100%). Наблюдава се, че всички молекули имат средна клетъчна пропускливост, като пропускливостта нараства с нарастване на молекулната маса.

За прогнозиране на профила на разпределение е оценена способността за свързване с плазмените протеини и способността за преминаване през кръвно-мозъчната бариера. Степента на свързване с плазмени протеини е от изключително значение, тъй като процесът на неговото разпределение от тялото влияе върху наличността, действието и последващата ефикасност на лекарството и трябва да се вземе предвид при определянето на подходящата дозировка. По този начин е установено, че всички анализирани съединения имат висок афинитет към плазмените протеини (100%).

Добро *in vivo* разпределение се предполага, че имат молекулите с по-слабо свързване с плазмените протеини. Фармакологично активно е несвързаното лекарство, тъй като в свободна форма такива молекули могат да се разпространяват през биологични мембрани и да достигат своите специфични цели.

Проникването през кръвно-мозъчната бариера е важен фармакокинетичен параметър за анализа на потенциални лекарства, които трябва да се вземат предвид за лечение на заболявания на ЦНС.

Сред анализираните съединения се наблюдава, че Бексаротен е с най-ниската степен на абсорбция през кръвно-мозъчната бариера. Всички новосинтезирани естери на Бексаротен имат висока степен на абсорбция през кръвно-мозъчната бариера, повечето от които със стойности над 10.00. Лечението на тумори в ЦНС с естер на Бексаротен би следвало да бъде по-ефективно отколкото с Бексаротен, тъй като естерът играе ролята на предлекарство и след преминаване на кръвно-мозъчната бариера ще се освободи Бексаротен. Това ще даде възможност за разширяване на познанията за действието на

Бексаротен в лечение и на други заболявания, като болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и шизофрения.

Метаболизмът на естерите се оценява чрез способността им да инхибират четири ензима от комплекса цитохром P450 (CYP450), който се състои от семейство чернодробни ензими, отговорни за метаболизма на ендогенни и ксенобиотични вещества в човешкото тяло. CYP450 е отговорен за метаболизма на приблизително 90% от ксенобиотиците в човешкото тяло, включително лекарства, който се извършва главно от CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 и CYP2D6. Инхибирането на някои от тези ензими показва потенциала на тестваното лекарство да взаимодейства с метаболизма на други лекарства, които използват същия път на биотрансформация, правейки ги акумулиращи и следователно токсични за пациентите.

От анализиранияте съединения всички са инхибитори на CYP2C9 и само Бексаротен не е инхибитор на CYP3A4.

CYP2C9 съставлява около 18% от протеина цитохром P450 в чернодробните микросоми. Около 100 лекарства се метаболизират от CYP2C9, включително лекарства с тесен терапевтичен индекс като варфарин и фенитоин и други често предписвани лекарства като аценокумарол, толбутамид, лосартан, глипизид и някои нестероидни противовъзпалителни лекарства.

CYP3A4 метаболизира около 30% от предписваните лекарства. Субстрати за изоензима включват ацетаминофен, кодеин, циклоспорин (циклоспорин), диазепам и еритромицин. Ензимът също метаболизира някои стероиди и канцерогени. От получените данни се вижда, че Бексаротен и неговите естери също са субстрати за CYP3A4.

От това следва, че съединения, инхибитори на съответните изоензими не трябва да се прилагат с други лекарства или ксенобиотици субстрати за цитохром P450 изоензимите поради риск от повишаване на плазмените им концентрации.

За анализ на профила на екскреция на естерите е оценен моделът на клетъчна пропускливост на MDCK, използван за предсказване на екскрецията на лекарства. Всички съединения имат ниска пропускливост към MDCK клетки при *in silico* анализ, което предполага, че тези молекули ще имат дълго време на екскреция през бъбреците.

Токсичността на новосинтезираните естери също трябва да се анализира, особено параметри като канцерогенност, мутагенност и кардиотоксичност. Най-често използваните антинеопластични лекарства са мутагенни и тератогенни при *in vivo* тестове.

Моделът за предсказване на мутагенност на естерите е тестът на Амес. Той е разработен през 1972 г. и използва щамове на бактерии *Salmonella typhimurium*. Последните се използват за оценка дали тестваните съединения могат да генерират увреждане на бактериалната ДНК. В този модел е потвърдено, че всички тествани съединения имат мутагенен ефект. Необходими са допълнителни *in vitro* и *in vivo* проучвания, за да се докаже мутагенността и да се провери дали терапевтичните ползи от тези новосинтезирани естери превишават рисковете от тяхното приложение.

При оценяване на токсичността трябва да се анализира и канцерогенността на новосинтезираните естери, тъй като много антинеопластични агенти водят до развитието на вторични ракови заболявания. От анализиранияте естери само E1 показва канцерогенна активност при плъхове, докато нито едно от новосинтезираните съединения не показва канцерогенна активност при мишки. Това показва релевантна степен на безопасност за съединения E2, E3 и E4.

Друг параметър при оценяване на нови лекарствени съединения е кардиотоксичността. Инхибирането на гена hER води до нарушена експресия на калиеви канали и последващата поява на сърдечни проблеми. В някои случаи е възможен фатален край. Наблюдава се, че анализиранияте съединения имат среден риск при инхибиране на гена hER и следователно не са потенциално кардиотоксични производни според *in silico* тестовете.

След оценка на фармакокинетичния профил на новосинтезираните естери се наблюдава, че молекулите представят обещаващи характеристики на чревна абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност. Вижда се, че съединения E2, E3 и E4 са с най-обещаващия ADME/T *in silico* профил, показващ висока чревна абсорбция и задоволителен профил на разпределение. Трите съединения са с малка бъбречна екскреция. Съединението E1 показва висока токсичност, поради мутагенно и карциногенно действие, вероятно дължащо се на хидролизата на E1 до Бексаротен и метанол, описано т. 4.1. Съединенията E2, E3 и E4 показват по-ниска токсичност. ADME/T профилът на съединения E2, E3 и E4 ги прави потенциални антинеопластични агенти с действие в ЦНС.

5. ОБЩОТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ НА ВЕЩЕСТВАТА, НАБЛЮДАВАНИ *IN VIVO* ПРИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД ВЪВЕЖДАНЕ НА БЕКСАРОТЕН И ЕТИЛОВ ЕСТЕР НА БЕКСАРОТЕН

Сходните фармацевтични профили на новосинтезираните естери на Бексаротен дават възможност за тяхното изследване *in vivo*. Проведеният QSAR анализ за определяне на метаболитна активност, описан в т. 4.1., показва, че след метаболизъм естерите се хидролизират до Бексаротен и алкохола, използван за синтеза им. Това ни дава основание да използваме етиловия естер на Бексаротен в *in vivo* проучвания, тъй като отделеният вследствие на хидролиза етанол е най-малко токсичен в сравнение с алкохолите, получени от другите естери, а именно метанол, пропанол и бутанол.

Анализът за определяне на обща токсичност от части потвърди изводите, направени от проведените *in silico* проучвания, описани в т. 4.2 и 4.3, за новосинтезираните естери на Бексаротен.

След приложение на етиловия естер на Бексаротен с концентрация 16.19 mg/ml в рамките на 30 минути при един от плъховете се наблюдава клатушкане и липса на координация. В групата третирана с по-висока доза етилов естер, 24.28 mg/ml, при два от плъховете се наблюдава нарушение на походката и клатушкане, а при друг – провлачване на задните крака, забавени движения и затруднено дишане, но се наблюдава запазена изследователска активност.

Този страничен ефект не се наблюдава в групата, третирана с Бексаротен. Вероятно този ефект се дължи на възможността естерите да преминават хематоенцефалната бариера, както е описано в т. 4.3. Това тяхно свойство би засилило действието на отделения вследствие на хидролизата етанол върху ЦНС.

До шестия час след приложение се забеляза значително подобрение в двигателната активност на засегнатите плъхове.

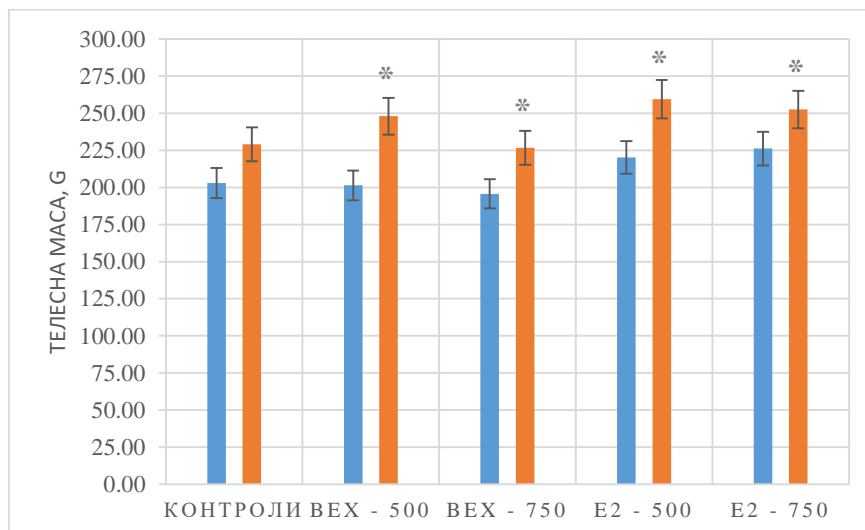
В края на изследвания период не е отчетен леталитет при плъховете.

5.1. Ефекти на Бексаротен и новосинтезираният етилов естер на Бексаротен върху телесните маси при експериментални гризачи

Изменението на телесните маси при опитните животни е един от основните показатели за оценка на токсикологичните свойства/особености на изследваното вещество. Резултатите от са представени на Фигура 59.

Повишаване на телесните маси се наблюдава при плъховете във всички експериментални групи. Това е показател за нормален физиологичен статус и липса на страдание у гризачите.

В контролната група не се наблюдават статистически значими промени в изследвания показател. При третираните с Бексаротен и неговия етилов естер опитните животни имат значимо нарастване на телесните тегла. С най-голяма статистическа достоверност е изменението при групата, третирана с етилов естер на Бексаротен в доза 500 mg/m² т.п. ($p < 0.01$).



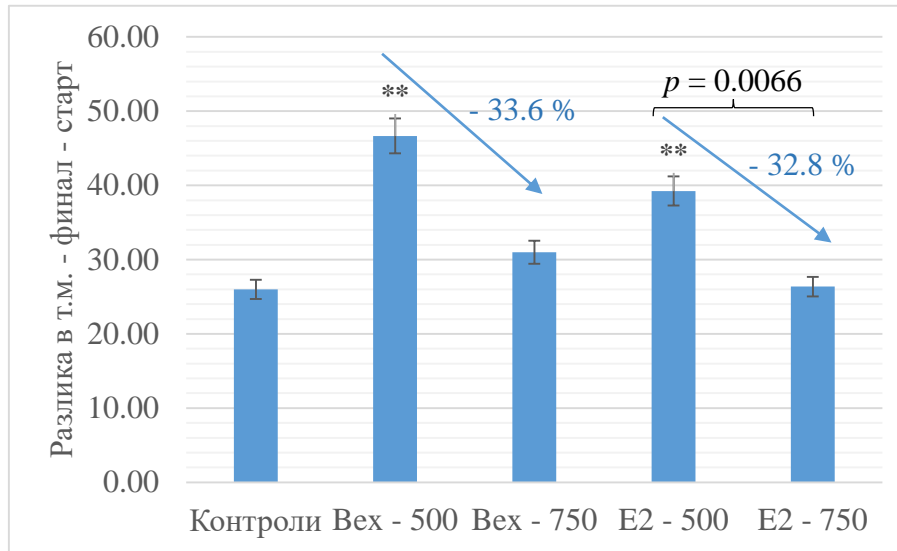
Фигура 59. Ефекти върху телесните маси при плъхове 72 часа след еднократно приложение на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен в дози 500 и 750 mg/m² телесна повърхност (* $p < 0.05$ спрямо Контроли).

Особеностите в динамиката на телесните тегла насочват към нисък риск от токсичност при еднократно приложение на ретиноида и неговия новосинтезиран естер.

Проследяване изменението на телесните тегла и отчитане на разликата в показателя в края на експеримента спрямо началото в отделните групи е представено на Фигура 60.

Значително повишаване в показателя се наблюдава в групите, третирани с Бексаротен и етилов естер на Бексаротен в доза 500 mg/m² т.п. спрямо контролите ($p <$

0.01). При плъховете, третирани с по-високи дози Бексаротен и неговия етилов естер (750 mg/m²), ефектът е по-слабо изразен, като стойностите на показателя са близки до тези на контролите.



Фигура 60. Изменение в телесните маси при плъхове 72 часа след еднократно орално приложение на суспензии на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен 500 и 750 mg/m² телесна повърхност - разлика финал – старт (* $p < 0.05$ спрямо Контроли; ** $p < 0.01$ спрямо Контроли).

Приложението на Бексаротен и неговият етилов естер в по-ниски дози водят до значимо изменение в телесните тегла. При сравняване динамиката в показателя между двете дози тенденцията е запазена. Изменението на телесните маси в групата, третирана с Бексаротен 750mg/m² т.п., е с 33.60% по-малко от това в групата Бексаротен 500 mg/m² т.п., а при приложена доза от 750 mg/m² етилов естер изменението е с 32.80 % по-малко от дозата 500 mg/m² ($p = 0.0066$).

Може да се направи извода, че липсват симптоми на токсичност при отчитане на телесната маса след перорално приложение на Бексаротен и неговия етилов естер.

5.2. Ефекти на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен върху основни биохимични параметри

5.2.1. Чернодробни ензими

Черният дроб е основният метаболитен орган, свързан с биотрансформацията както на ендогенни субстрати, така и на ксенобиотици, в това число лекарства. Повишените нива на някои биохимични маркери отразява увреждането му. Пример за това са ензимите аспартат аминотрансфераза (ASAT) и аланин аминотрансфераза (ALAT).

Повишаването на серумните нива на тези ензими ни дава информация за чернодробно увреждане, но не винаги е достатъчно за точно диагностициране на проблема. Въпреки че ASAT не е специфичен за черния дроб, тъй като се съдържа в различни органи, като черен дроб, мозък, сърце и т.н., може да се използва като индикатор за чернодробно увреждане. От друга страна повишените стойност на ALAT могат да се индикатор за чернодробно увреждане. Серумните му нива се повишават основно при хепатит и възпаление на черния дроб.

Съотношението на стойностите на двата ензима има голяма информативна стойност, като това дали състоянието е остро или хронично. Също така дава индикация за заболяването, въпреки, че то не може да бъде диагностицирано само по съотношението ASAT / ALAT.

При съотношението $ASAT / ALAT < 1$ – неалкохолна мастна чернодробна болест.

При съотношението $ASAT / ALAT = 1$ – остър вирусен хепатит или лекарствено токсично действие.

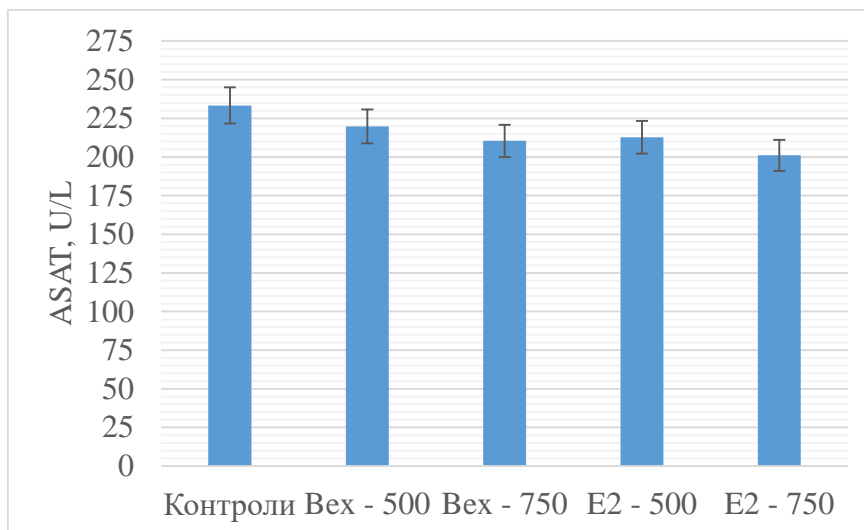
При съотношението $ASAT / ALAT > 1$ – цироза.

При съотношението $ASAT / ALAT > 2$ – алкохолна чернодробна болест.

Определянето на чернодробната токсичност е важна част от прецизирането на нивото на безопасност на новосинтезирани лекарствени молекули, тъй като черният дроб е основният метаболизиращ орган. Провеждането на експерименти с животни е неотменна част от първоначалния токсикологичен скрининг и дава информация за началото и степента на увреждане на този жизнено важен орган.

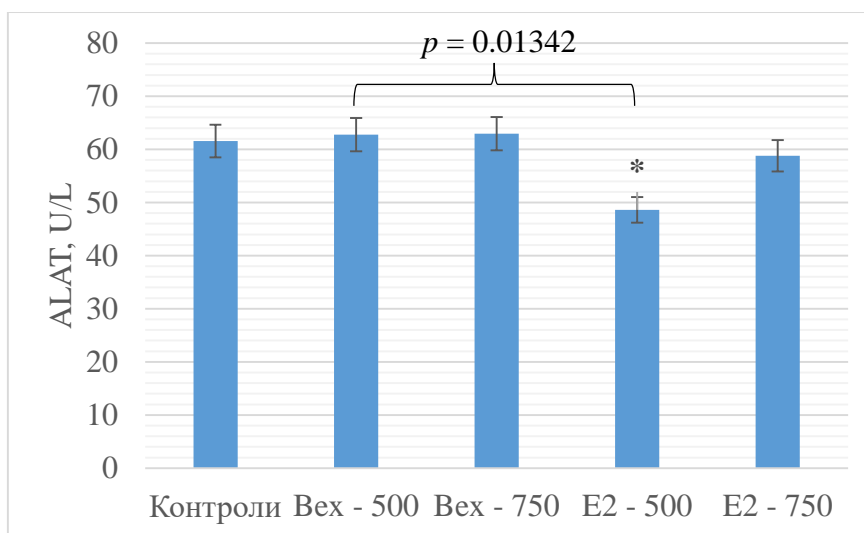
Промените в концентрациите на ензима ASAT на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в посочените дози са представени на Фигура 61.

Наблюдават се незначителни изменения в концентрациите на ензима ASAT при експозираните групи спрямо контролата.



Фигура 61. Промени в концентрациите на ензима ASAT на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в дози 500 и 750 mg/m² телесна повърхност.

Промените в концентрациите на ензима ALAT на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в посочените дози са представени на Фигура 62.



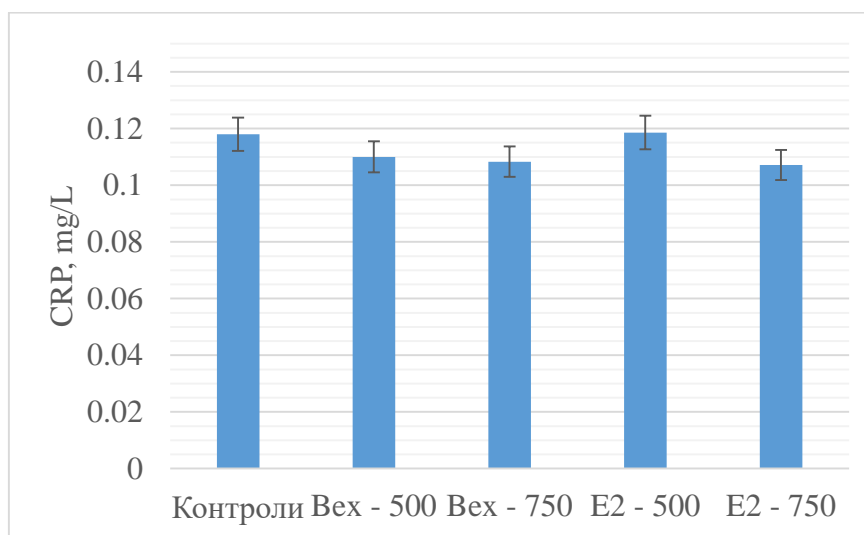
Фигура 62. Промени в концентрациите на ензима ASAT на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в дози 500 и 750 mg/m² телесна повърхност (* $p < 0.05$ спрямо Контроли).

При гризачите, третирани с 500 mg/m^2 етилов естер на Бексаротен се наблюдава значимо понижение на показателя спрямо контролите ($p = 0.012$), докато при другите групи не се отчитат статистически значими промени. Разликата между Бексаротен и неговия етилов естер в дози 500 mg/m^2 т.п. е със степен на достоверност $p = 0.013$, докато при дозите от 750 mg/m^2 т.п. липсва такава.

Особеностите в динамиката на тези чернодробни биохимични маркери насочват към нисък риск от хепатотоксичност след еднократно приложение на ретиноида и неговия новосинтезиран естер. Липсват литературни данни за наличие на такава органична токсичност на новосинтезирани Бексаротенови естери. За първи път в нашите експерименти се провежда такова пилотно изследване.

5.2.2. С-реактивен протеин

С-реактивният протеин (CRP) е цикличен, острофазов протеин, синтезиран от черния дроб при наличието на възпаление. Той се освобождава в рамките на 4 до 6 часа след стартирането на възпалителния процес. Най-високи концентрации се достигат след 36 до 50 часа. CRP е надежден ранен маркер за възпалителен отговор.



Фигура 63. Промени в концентрациите на CRP на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в дози 500 и 750 mg/m^2 телесна повърхност.

Промените в концентрациите на CRP на опитните животни след еднократно третиране с Бексаротен и неговия етилов естер в посочените дози са представени на Фигура 63.

Наблюдават се незначителни вариации в концентрациите на CRP при експозирани групи. Особеностите в динамиката на този показател също насочват към нисък риск от токсичност при еднократно приложение на ретиноида и неговия новосинтезиран естер.

5.3. Макроскопски оглед на органите след еднократно приложение на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен

Макроскопският оглед на органи е един от основните и най-стари методи за изследване и диагностика. Осъществява се чрез дисекция на труп, за да се определи причината и начина на смърт и да се оцени всяко заболяване или нараняване, което може да е налице.

Вътрешният оглед на трупа започва с разрязването му. Това има за цел да позволи на изследователя да прецени анатомично разположение и отношение между съседните органи. Вземането и съхраняването на органни проби позволява да се направи макроскопска преценка на формата, теглото, големината, еластичността, консистенцията и дори цвета на органите. Това би ни дало информация за евентуално настъпилите остро токсични ефекти на приложените дози на новосинтезирани лекарства.

При макроскопският оглед на органите при дисекция на плъховете 72 часа след перорално приложение на Бексаротен и етилов естер на Бексаротен в дози 500 и 750 mg/m² т.п. се наблюдават следните промени:

- Раздуване на червата и стомаха;
- Хематоми на белите дробове.

Стомашно-чревните проблеми могат да се дължат на физиологични фактори, докато хематомите вероятно са получени вследствие на сондирането на плъховете при приложението на разтворите. В приложение № 1, Фигура 1 до 5, са представени изображения от проведения макроскопски оглед.

В заключение можем да кажем, че Бексаротен и новосинтезираният му етилов естери не повлияват значимо телесното тегло и не притежават органна токсичност. Съставеният безопасен фармакологичен профил на новосинтезирания етилов естер дава

възможност за провеждане на по-задълбочени изследвания върху фармакокинетичните и фармакодинамичните му характеристики.

V. ИЗВОДИ

Като резултат от нашите изследвания могат да бъдат направяни следните изводи:

1. Разработен е синтетичен метод за получаване на естерни производни на антинеопластичният препарат Бексаротен, с помощта на който са получени четири нови естера.
2. Разработен е метод за проследяване на реакционния процес, използвайки тънкослойна хроматография.
3. Новополучените съединения са структурно охарактеризирани с помощта на температура на топене, ИЧ-спектроскопия, UV-VIS спектроскопия и HPLC.
4. Разработен е нов HPLC метод за определяне на Бексаротен и негови производни самостоятелно и в смеси.
5. Приложен е теоретичен модел за оценка на потенциалната чернодробна и кожна метаболитна активност на Бексаротен и неговите новосинтезирани производни.
Установено е, че:
 - При четири от теоретичните метаболита на Бексаротен съществува възможност за свързване с протеини, като два от тях чрез образуване на шифови бази и два – чрез нуклеофилно присъединяване.
 - Изследваните Бексаротенови производни показват потенциал за свързване с ДНК и протеини, което е възможно да бъде причина за генериране на токсични ефекти.
6. Приложен е теоретичен модел за оценка на фармакокинетичните характеристики на Бексаротен и новосинтезираните естери и тяхната биоактивност.
 - Естерите на Бексаротен показват добри фармакокинетични характеристики според правилото на Липински в сравнение с Бексаротен. Също е определена биологична активност, идентична на тази на Бексаротен.
 - Новосинтезираните естери се характеризират с добри ADME/Tox свойства. Възможността им да преминават кръвно-мозъчната бариера дава възможност за лечение на заболявания, свързани с ЦНС.
7. Приложен е *in vivo* модел за определяне на общотоксични ефекти на Бексаротен и етиловия естер на Бексаротен.

- Резултатите показват липса на чернодробна токсичност на етиловия естер на Бексаротен в доза 750 mg/m^2 .

VI. ПРИНОСИ

- Разработеният в катедра „Фармацевтична химия“ синтетичен подход за получаване на нови естерни производни на Бексаротен представлява принос към химията на синтетичните ретиноиди.
- Успешно е разработен метод за проследяване на реакционния процес, използвайки тънкослойна хроматография.
- Успешно е проведено структурно охарактеризиране на новосинтезираните съединения посредством температура на топене, ИЧ-спектроскопия, UV-VIS спектроскопия и HPLC.
- Успешно е приложен новоразработен HPLC метод за определяне на Бексаротен и негови производни самостоятелно и в смеси.
- С помощта на теоретични подходи успешно са идентифицирани възможностите за метаболитно активиране на Бексаротен, неговите метаболити и производни, включително са определени и някои техни фармакокинетични характеристики и биоактивност.
- Експериментално са оценени и общотоксичните ефекти *in vivo* върху черния дроб на Бексаротен и етиловият естер на Бексаротен.

VII. СПИСЪК С ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ

1. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Яна Колева, Светлана Георгиева, Надя Агова, **Ивелин Илиев** – Молекулярни свойства и оценка на биоактивността на новосинтезирани производни на Бексаротен, New Industries, Digital Economy, Society – Projections of the Future II – Booklet of the 58th Science Conference of Ruse University, България, 2019, p26-31
2. Надя Агова, **Ивелин Илиев**, Емилия Георгиева, Нели Ерменлиева, Светлана Георгиева - Антибактериална активност на 4-изопропил-фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтаден-2-ил)етенил] бензо хидразид, Варненски медицински форум, 2021, Април 1, р. 336-370
3. Надя Агова, **Ивелин Илиев**, Силвия Стамова, Светлана Георгиева - Подходи за синтез на хидразони с потенциална биологична активност, Academic journal Management and education - june 2021, р. 137-141
4. **Ивелин Илиев**, Яна Колева, Светлана Георгиева - Влияние на кожните метаболити на новосинтезираните производни на Бексаротен и парацетамол върху потенциалния антитуморен ефект, Bulgarian Chemical Communications, Volume 54, Special Issue B2 (pp. 15-19) 2022.

2. ДРУГИ УЧАСТИЯ

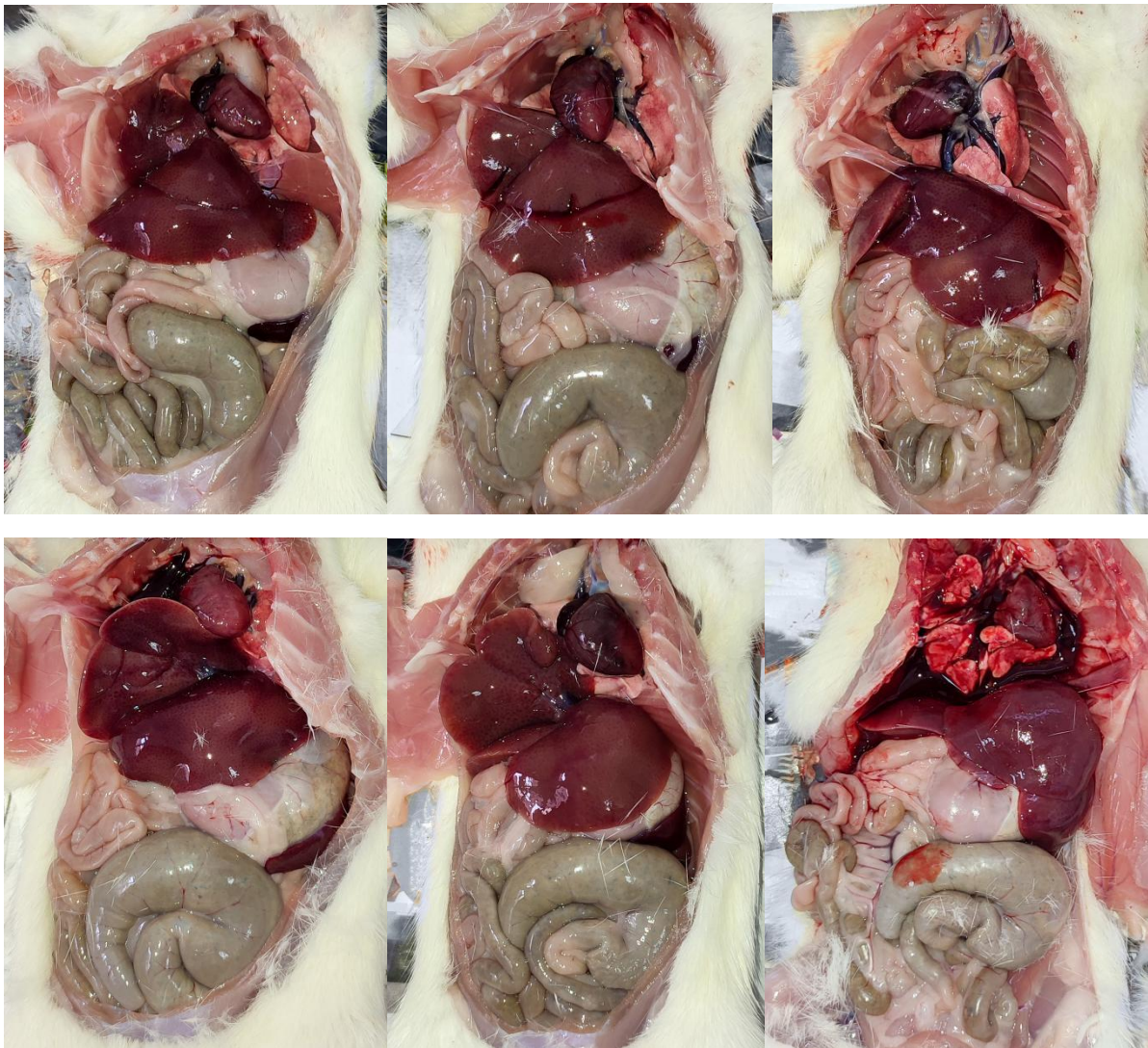
1. Conference with International Interest “New Industries, Igital Economy, Society – Projections Of The Future”, Razgrad – 2019 г.
2. Международна научна конференция “Образование, наука, икономика и технологии”, Бургас - 01. Септември 2020 г. и 24-25. Юни 2021 г.
3. IX-A научна сесия за преподаватели и студенти на Медицински колеж – Варна – 26-31. Март 2021 г.
4. International Asian Congress on Contemporary Sciences-V - 01-02. Юни 2021 г.
5. Национална програма Европейски научни мрежи (Drug Molecule) - 30. Юни 2021 г.
6. Ninth International Conference “Modern Trends in Science” - 15-19. Септември 2021 г.
7. Седми Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция “Дигитални решения и иновации във фармацевтичната практика и образование – предизвикателства и възможности” - 22-23. Октомври 2021 г.
8. International Conference On Innovative Studies Of Contemporary Sciences, Tokyo summit - 15. Януари 2022 г.
9. 4th International Congress Of Multidisciplinary Studies In Medical Sciences –18-20. Февруари 2022 г.
10. Ankara Congressi - 02. Април 2022 г.
11. International Conference "Education, Science, Economics and Technologies" – Бургас - 23. Юни 2022 г.
12. Научна Конференция „Море и здраве“ – 20. Май 2022 г.
13. „80 години Медицински колеж - Варна“ - десета научна сесия с международно участие – 21-22. Октомври 2022 г.
14. Осми Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция “Фармацевти и лекари – обединени в подкрепа на пациента“ - 28–29. Октомври 2022 г.

VIII. ФИНАНСИРАНЕ

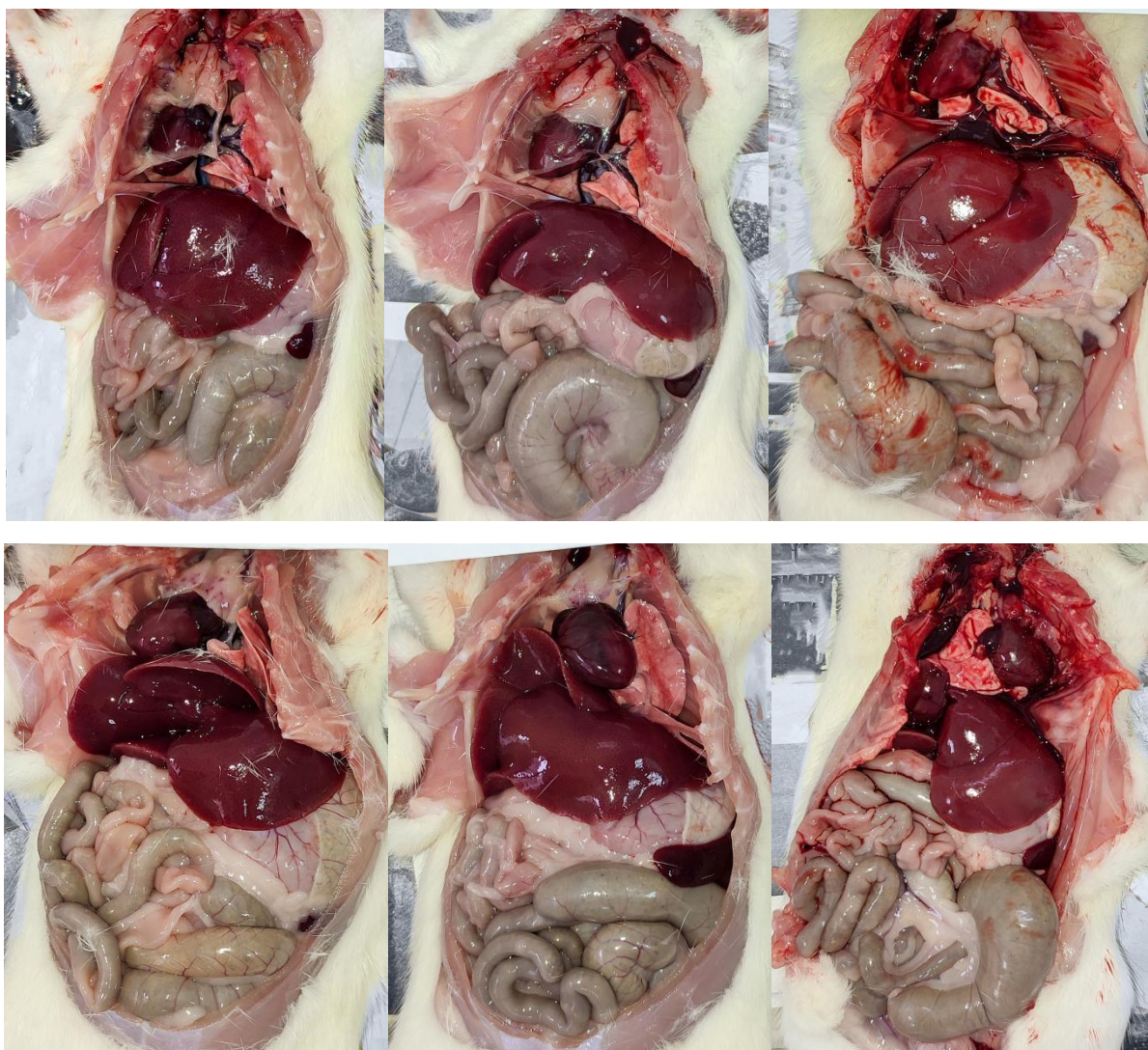
Проект № 20008/2020 г. – Фонд "Наука" на МУ – Варна „Изследване на токсичността на хидразони на Бексаротен чрез прилагане на *in vitro* и *in vivo* модели“ с ръководител на проекта доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф., базова организация: Факултет „Фармация“, МУ-Варна.

IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

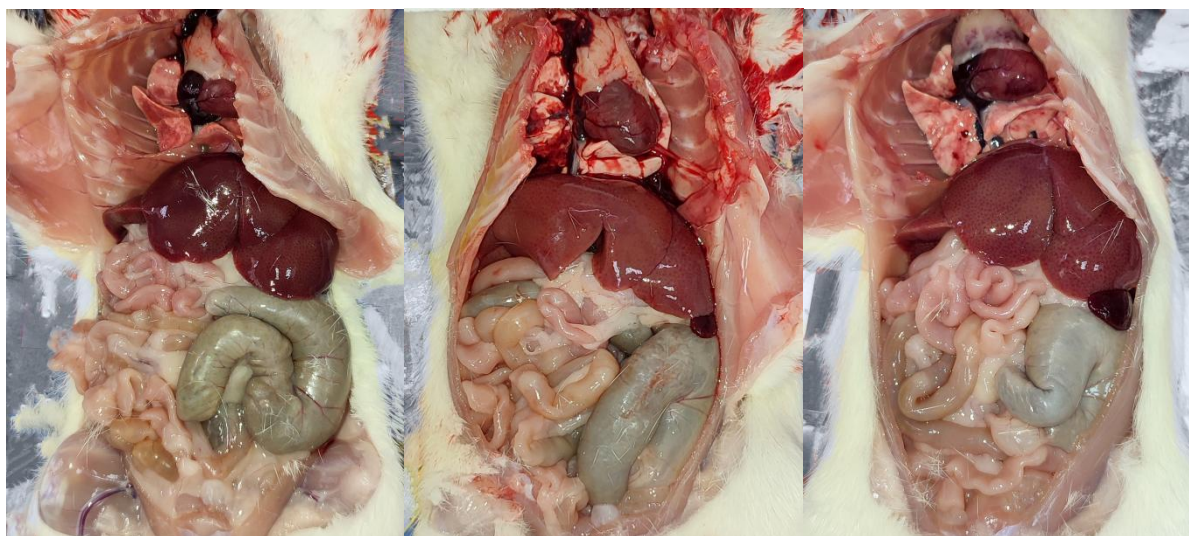
ПРИЛОЖЕНИЕ № 1

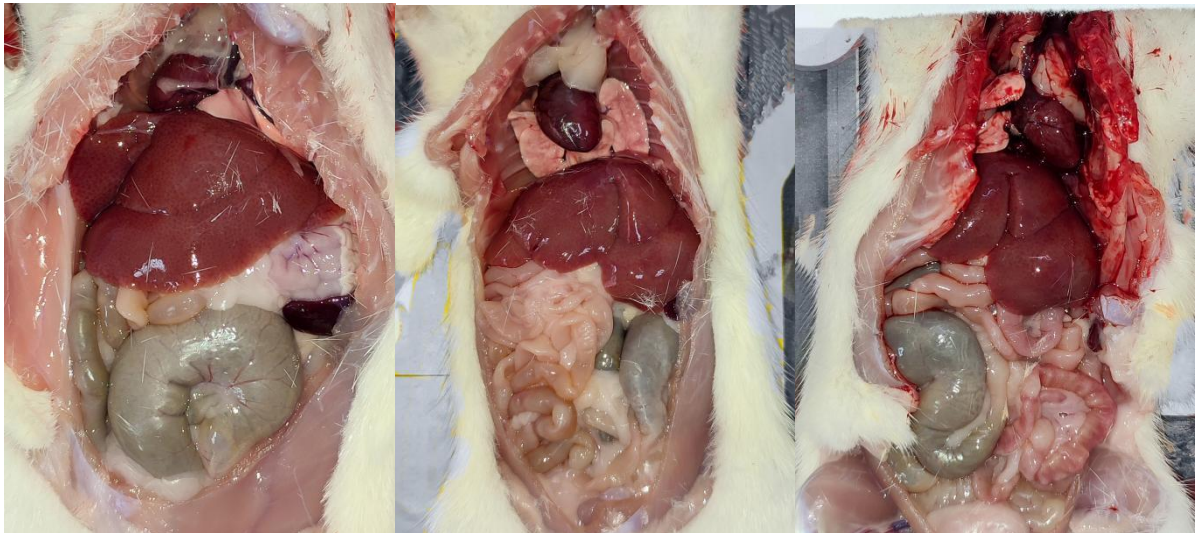


Фигура 1. Макроскопски оглед на контролна група, третирана с 25 % воден разтвор на етанол.

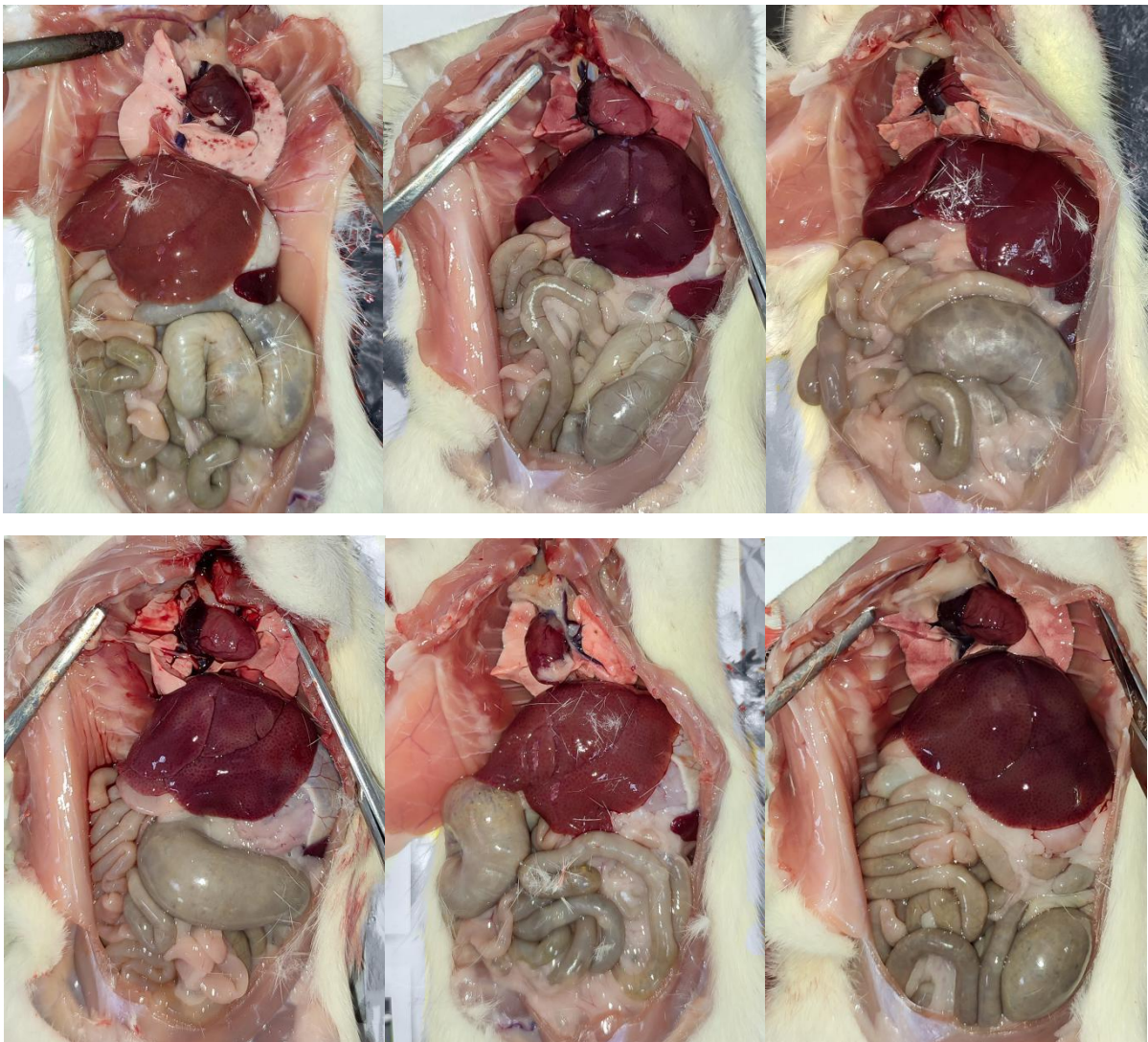


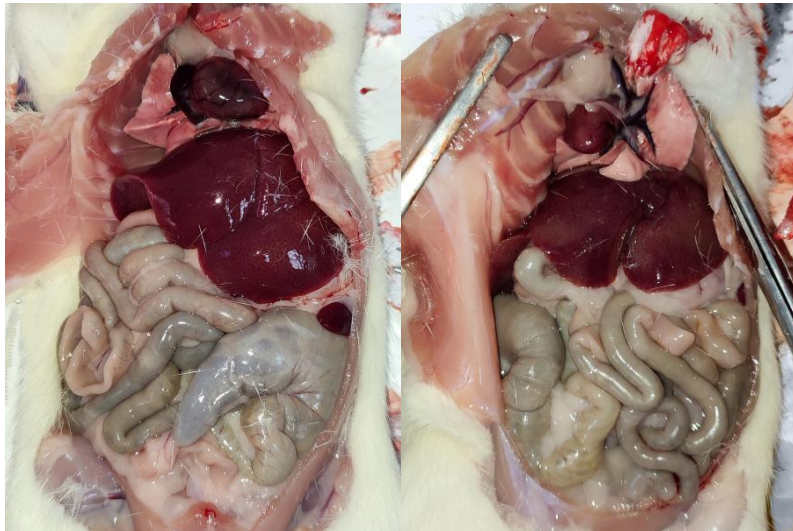
Фигура 2. Макроскопски оглед на плъхове, третирана с доза 500 mg/m² Бексаротен.



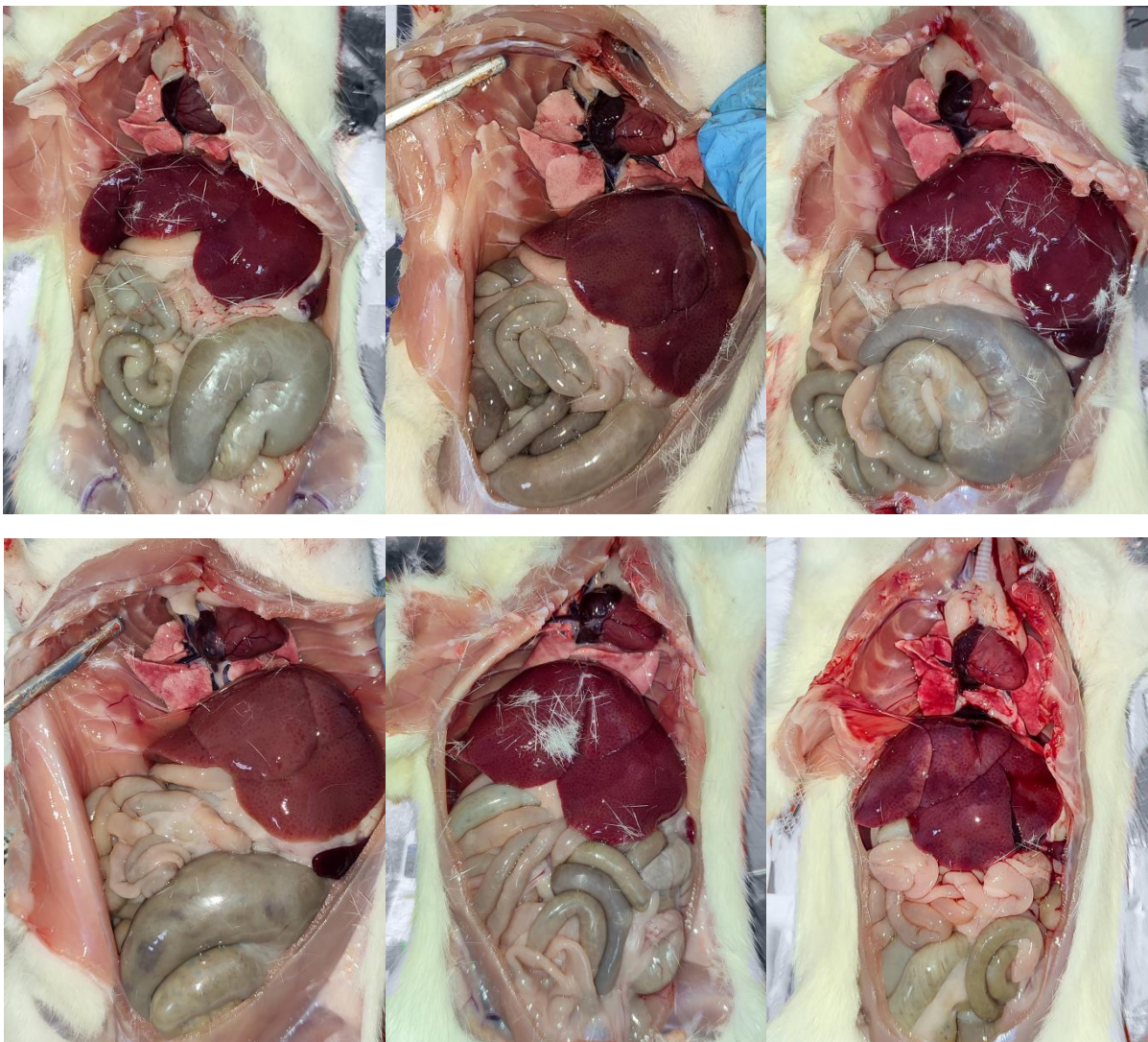


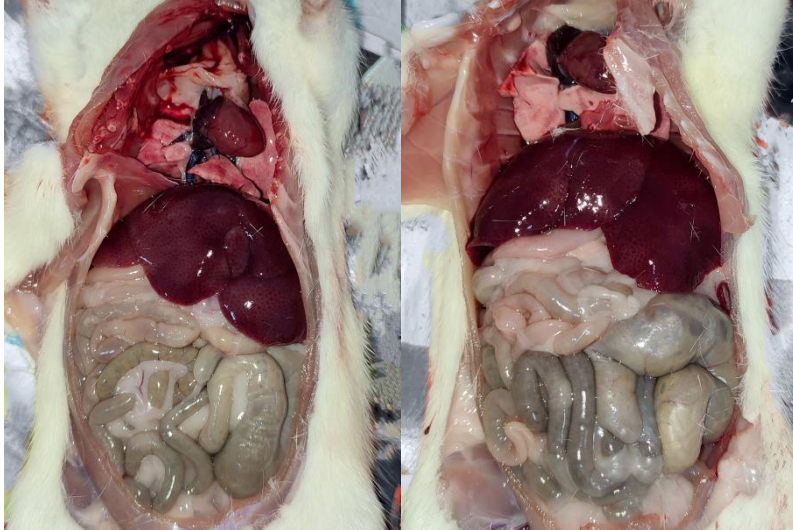
Фигура 3. Макроскопски оглед на пљхове, третирана с доза 750 mg/m^2 Бексаротен.





Фигура 4. Макроскопски оглед на плъхове, третирана с доза 500 mg/m^2 етилов естер на Бексаротен.





Фигура 5. Макроскопски оглед на плъхове, третирана с доза 750 mg/m^2 етилов естер на Бексаротен.