

Міністерство охорони здоров'я України  
Державне некомерційне підприємство  
"Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького"

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

**Коваль Андрій Ярославович**

УДК 615.214:615.015.4:547.789.4:612.84:612.592:616-092

**ПОШУК ТА ВИВЧЕННЯ РЕЧОВИН З АНАЛЬГЕТИЧНОЮ,  
ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ТА ФРИГОПРОТЕКТОРНОЮ ДІЄЮ СЕРЕД  
НОВИХ ПОХІДНИХ 5,7-ДІАЦИЛ-3-Н(АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5Н-  
[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ**

222 – Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ А.Я. Коваль

Наукові керівники: Лесик Роман Богданович, доктор фармацевтичних наук,  
професор  
Штриголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук,  
професор

Львів – 2025

## АНОТАЦІЯ

*Коваль А.Я.* Пошук та вивчення речовин з анальгетичною, протизапальною та фригопротекторною дією серед нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина (22 – Охорона здоров'я). – Державне некомерційне підприємство "Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького" МОЗ України, Львів, 2025.

Дисертаційна робота присвячена пошуку та вивченню перспективних речовин з анальгетичною, протизапальною та фригопротекторною дією серед нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, виявленню сполуки-лідера, конкурентоспроможної із сучасними аналогами на предмет придатності для створення нового лікарського засобу.

В роботі вперше зроблено віртуальний прогноз спектру фармакологічної дії 23 нових біологічно активних сполук похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, що дозволило передбачити ймовірність наявності знеболювальної та/чи протизапальної активності у досліджуваних сполук та стало підставою для експериментальної верифікації даних.

Вперше проведено первинний фармакологічний скринінг 23 нових біологічно активних сполук похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину та встановлено, що більшість досліджуваних речовин виявили виразний антиноцицептивний ефект на моделях термічної («гаряча пластина») та хімічної (оцтовокислі «корчі») ноцицептивної стимуляції, який реалізується як на центральному, так і на периферичному рівні. Показано, що окремі сполуки в експерименті виявляли анальгетичну активність, що була близька до такої кеторолаку чи переважала

його.

Отримано нові дані щодо протизапальної дії досліджуваних сполук на моделі карагенінового набряку, котрі засвідчили, що більшість з них виявляють суттєвий ефект, який наближається до дії препарату порівняння диклофенаку натрію.

Згідно з результатами молекулярного докінгу встановлено, що досліджувані сполуки потенційно виявляють протизапальний вплив переважно через вплив на 5-ліпоксигеназо активуючий протеїн та меншою мірою на 5-ліпоксигеназу. Вплив на циклооксигеназу-1 та циклооксигеназу-2 є меншим у порівнянні з референтними лікарськими засобами, однак ця взаємодія може збільшувати сумарний протизапальний ефект досліджуваних речовин.

Подальші дослідження передбачали вивчення гострої токсичності та цитотоксичності найбільш активних сполук з вираженою антиноцицептивною дією (IFT\_180, IFT\_247, IFT\_251, IFT\_252, IFT\_257), оскільки це є ключові етапи доклінічного дослідження потенційних лікарських засобів. Вони необхідні для визначення безпечного діапазону доз, оцінки можливих ризиків для здоров'я, а також для прийняття рішення щодо подальших тестів *in vivo* і клінічних випробувань.

Гостру токсичність зазначених сполук визначали за одноразового в/ш введення. На підставі отриманих результатів розраховано  $LD_{50}$ , яка для досліджуваних сполук коливається в діапазоні від  $2840 \pm 340$  мг/кг до  $4500 \pm 350$  мг/кг. Таким чином, усі досліджувані сполуки належать до IV класу токсичності ( $500 \text{ мг/кг} < LD_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$ ) за класифікацією Hoge та Sterner, тобто є малотоксичними.

Аналіз результатів цитотоксичності сполук на псевдонормальні клітини засвідчили, що токсичність досліджуваних сполук знижувалася в такому порядку: IFT\_180 > IFT\_247 > IFT\_251 > IFT\_252 > IFT\_257 для трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії HEK293T, тобто IFT\_180 була більш токсичною, ніж IFT\_257. Для макрофагів миші лінії J774.2 токсичність досліджуваних сполук знижувалася в такому порядку: IFT\_180 >

IFT\_247 > IFT\_252 > IFT\_257 > IFT\_251.

Таким чином, невисокі токсикометричні параметри досліджуваних сполук є одним із аргументів розглядати їх як потенційно безпечні та обрати їх для подальшого поглибленого доклінічного вивчення.

Скринінгові дослідження найактивніших сполук на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження засвідчили, що така активність не є загальною ознакою сполук цього ряду. Так, сполука IFT-180 не вплинула на час життя мишей за холодової експозиції, тобто вона не має фригопротекторних властивостей. Потужні фригопротекторні властивості виявила сполука IFT\_247, що статистично значуще збільшила тривалість життя щодо контролю на 43,6% ( $p < 0,01$ ), не поступаючись референс-препарату диклофенаку натрію, що збільшив час виживання мишей на 50,9% ( $p < 0,01$ ).

За результатами проведених досліджень для подальшого поглибленого вивчення визначено сполуку-лідера – IFT\_247. За результатами оцінки дозозалежності знеболювального ефекту сполуки IFT\_247 встановлено, що найменша з випробуваних доз 5 мг/кг спричинила слабкий знеболювальний ефект на рівні тенденції (приріст 34,9%). Збільшення дози до 15 мг/кг спричинило більший ефект (приріст 68,1%,  $p < 0,01$ ). Ефект дози 25 мг був найбільшим (приріст 149,6%,  $p < 0,001$ ), а підвищення дози до 35 мг/кг не посилювало його (приріст 135,9%,  $p < 0,001$ ). Отже, анальгетична дія сполуки IFT\_247 залежить від дози, а максимальною ефективною можна вважати дозу 25 мг/кг, і саме її взято для наступних експериментів.

Аналіз результатів вивчення опіоїдергічного механізму сполуки IFT\_247 демонструє, що блокатор опіоїдних рецепторів налоксон не вплинув на її знеболювальний ефект. У тесті «Гаряча пластина» ця сполука *per se* збільшила латентний період облизування задньої лапи в середньому на 54%. На тлі дії налоксону латентний період ноцицептивної реакції зріс на 72,8%, відмінності з показником групи досліджуваної сполуки *per se* відрізняються на рівні тенденції. Для порівняння аналогічний експеримент виконано з класичним анальгетиком-антипіретиком метамізолом натрію. Середній приріст латентного

періоду ноцицептивної реакції за його використання *per se* становив 306,3%, а за попередньої блокади опіоїдних рецепторів налоксоном – 204,4%, тобто зменшувався в середньому на третину, а медіана фінального латентного часу зменшилася в 2 рази при майже однаковому вихідному значенні. Отже, опіоїдєргічний механізм, очевидно, не бере участі в аналгетичній дії сполуки IFT\_247.

Для виявлення небажаних ефектів на центральну нервову систему або змін у поведінці використано тест "відкрите поле", який засвідчив відсутність суттєвого впливу сполуки IFT\_247 на поведінку мишей. Єдиною значущою відмінністю було збільшення кількості болюсів ( $p < 0,05$ ), проте решта показників емоційних реакцій та їх вегетативного супроводу (грумінг, уринації) не відрізнялися від контрольних значень. Таким чином, досліджувана сполука (IFT\_247) не спричиняє ані стимулювального, ані пригнічувального впливу на центральну нервову систему.

Сполука IFT\_247 у дозі 18 мг/кг у щурів за в/ш введення виявляє виразну фригопротекторну активність та на рівні диклофенаку натрію – збільшує час життя мишей за гострого запального охолодження. Так, у найгострішому періоді холодової травми в щурів досліджувана сполука запобігає розвитку синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові у та тромбозу, зменшуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові та нормалізуючи підвищений тромбіновий час. Також встановлено, що IFT\_247 пригнічує розвиток системної запальної реакції: запобігає збільшенню вмісту лейкотриєнів B<sub>4</sub> та тотальних (це підтверджує результати молекулярного докінгу щодо можливості впливу на 5-ліпоксигеназо активуючий протеїн та 5-ліпоксигеназу), поступаючи за цією властивістю диклофенаку натрію; подібно до диклофенаку натрію значно зменшує до субнормального рівня рівень інтерлейкіну 1 $\beta$  та до нормального – фактора некрозу пухлин  $\alpha$  без впливу на інтерлейкін 6 та на зменшений вміст протизапальних цитокінів – інтерлейкінів 4 та 10, нормалізує збільшене співвідношення про- та протизапальних цитокінів.

За холодової травми рівень синтази оксиду азоту у печінці в щурів групи контрольної патології зменшується в 1,5 разу щодо інтактного контролю, що вказує на зменшення продукції оксиду азоту та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження – вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247 рівень синтази оксиду азоту залишається на рівні інтактного контролю.

Ці результати доповнюють фармакологічну характеристику досліджуваного представника 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів як потенційного неопіоїдного анальгетика та фригопротекторного засобу, меншою мірою протизапального засобу, та обґрунтовують доцільність подальшого поглибленого вивчення сполуки 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (IFT-247), що може стати основою для створення нового вітчизняного лікарського препарату.

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових робіт.

**Ключові слова:** похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазол[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів; біологічна активність; анальгетична дія; протизапальна дія; фригопротекторна дія; дозозалежність; механізм дії; гостра токсичність; цитотоксичність; холодова травма; цитокіни; інтерлейкіни; система гемостазу; віртуальний скринінг; молекулярний докінг.

## ABSTRACT

Koval A. Ya. Search and study of substances with analgesic, anti-inflammatory and frigoprotective action among new derivatives of 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

Dissertation to obtain the degree of Doctor of Philosophy, specialty 222 – Medicine (22 – Healthcare). – State non-profit enterprise «Danylo Halytsky National Medical University in Lviv» Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2025.

The dissertation is devoted to the search for and study of promising substances with analgesic, anti-inflammatory, and cryoprotective effects among new derivatives of 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine, and to the identification of a lead compound competitive with current analogs for the potential development of a new medicinal product.

For the first time, a virtual prediction of the pharmacological activity spectrum of 23 new biologically active derivatives of 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine was carried out, which allowed forecasting the likelihood of analgesic and/or anti-inflammatory activity of the studied compounds and served as the basis for experimental verification.

A primary pharmacological screening of 23 new biologically active derivatives of this chemical class was performed for the first time. It was established that most compounds exhibited a pronounced antinociceptive effect in models of thermal ("hot plate") and chemical (acetic acid-induced "writhing") nociceptive stimulation, indicating both central and peripheral mechanisms of action. Some compounds demonstrated analgesic activity comparable to or exceeding that of ketorolac.

New data were obtained on the anti-inflammatory activity of the compounds using the carrageenan-induced paw edema model, indicating that most of them exhibit significant effects approaching those of the reference drug diclofenac sodium.

Molecular docking results revealed that the studied compounds exert potential anti-inflammatory effects mainly by targeting the 5-lipoxygenase-activating protein, and to a lesser extent, 5-lipoxygenase. The effects on Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 were weaker than those of reference drugs but may contribute to the overall anti-inflammatory activity.

Further studies included the evaluation of acute toxicity and cytotoxicity of the most active compounds (IFT\_180, IFT\_247, IFT\_251, IFT\_252, IFT\_257) with pronounced antinociceptive activity, as these are crucial stages of preclinical drug research. They help determine the safe dose range, assess health risks, and support decisions for further in vivo testing and clinical trials.

The compounds' acute toxicity was determined via a single intragastric

administration. The calculated LD<sub>50</sub> ranged from 2840±340 mg/kg to 4500±350 mg/kg, classifying all tested compounds as low-toxic (toxicity class IV, according to Hodge and Sterner classification).

Cytotoxicity analysis on pseudo-normal cells showed the following toxicity ranking for human embryonic kidney HEK293T cells: IFT\_180 > IFT\_247 > IFT\_251 > IFT\_252 > IFT\_257. For murine macrophages (J774.2), the order was: IFT\_180 > IFT\_247 > IFT\_252 > IFT\_257 > IFT\_251. IFT\_257 was the least toxic compound.

Cryoprotective screening using a model of acute generalized hypothermia showed that this property is not inherent to all compounds in the series. For instance, IFT\_180 did not prolong survival under cold exposure, while IFT\_247 significantly increased survival time by 43.6% ( $p<0.01$ ), comparable to diclofenac sodium (50.9%,  $p<0.01$ ).

Based on the results, IFT\_247 was identified as the lead compound for further detailed study. Dose-dependence of the analgesic effect of IFT\_247 was established: the lowest tested dose of 5 mg/kg induced a slight effect (34.9% increase), 15 mg/kg showed greater activity (68.1%,  $p<0.01$ ), and 25 mg/kg resulted in the strongest effect (149.6%,  $p<0.001$ ), which did not increase further at 35 mg/kg.

Investigation of the opioid mechanism of IFT\_247 showed that naloxone did not alter its analgesic effect, indicating a non-opioid mechanism. In the "hot plate" test, IFT\_247 increased the latency to paw licking by 54%, and this effect persisted under naloxone pretreatment.

For comparison, metamizole sodium increased latency by 306.3% alone and by 204.4% with naloxone, suggesting partial involvement of the opioid system. Therefore, IFT\_247 likely acts via a non-opioid mechanism.

An "open field" test found no significant behavioral changes in mice after IFT\_247 administration, except for an increased number of fecal boli ( $p<0.05$ ), with no impact on other indicators of emotional or autonomic reactions.

At 18 mg/kg orally, IFT\_247 exhibited strong cryoprotective activity in rats, similar to diclofenac sodium, improving survival under acute inflammatory



hypothermia. It prevented disseminated intravascular coagulation syndrome and thrombosis, reduced serum D-dimer and fibrinogen levels, and normalized prolonged thrombin time.

IFT\_247 also suppressed systemic inflammation by reducing leukotriene B<sub>4</sub> and total leukotriene levels (supporting the predicted 5-lipoxygenase-activating protein and 5-lipoxygenase targets), and lowered Interleukin-1  $\beta$  and Tumor necrosis factor levels to normal ranges. It had no significant effect on Interleukin-6, Interleukin-4, or Interleukin-10, but normalized the pro-/anti-inflammatory cytokine ratio.

Cold injury reduced hepatic nitric oxide synthase levels by 1.5 times versus controls, indicating decreased nitric oxide production and possible vasoconstriction. Treatment with diclofenac sodium or IFT\_247 restored nitric oxide synthase levels to normal.

These findings characterize the studied 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine derivative as a potential non-opioid analgesic and cryoprotective agent with moderate anti-inflammatory properties. The results justify further in-depth study of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-yl)ethanone (IFT-247) as a candidate for a novel domestic pharmaceutical product.

Based on the dissertation, 15 scientific papers have been published.

**Key words:** derivatives of 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazines; biological activity; analgesic activity; anti-inflammatory activity; cryoprotective activity; dose dependence; mechanism of action; acute toxicity; cytotoxicity; cold injury; cytokines; interleukins; hemostasis system; virtual screening; molecular docking.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Коваль, А. Я., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., Литкін, Д. В., Лебединець, І. О., & Юдкевич, Т. К. (2024). Фригопротекторні властивості похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину в експерименті. Медична та клінічна хімія, (3), 22–32. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2024.i3.14912>. (Особистий внесок авторів: огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті, подання статті до друку – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, методологія дослідження, обговорення результатів, написання висновків, перевірка та редагування – Ш.С.Ю.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Л.Р.Б.; Проведення дослідження – Л.Д.В.; методологія дослідження, перевірка та редагування – Л.І.О.; методологія дослідження, оформлення статті – Ю.Т.К.).

2. Коваль, А., & Штриголь, С. (2023). 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон: дозозалежність аналгетичного ефекту, відсутність опіоїдергічного механізму дії, вплив на поведінкові реакції та гостра токсичність. Acta Medica Leopoliensia, 29(3-4), 192-203. <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>. (Особистий внесок авторів: огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; написання висновків; оформлення статті; подання статті до друку – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, методологія дослідження, обговорення результатів, написання висновків, перевірка та редагування – Ш.С.Ю.).

3. Koval, A., Lozynskyi, A., Shtrygol', S., & Lesyk, R. (2022). An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-inflammatory agents. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2(36), 10–17. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255276>. (Особистий внесок авторів: збір

даних, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – К.А.Я.; аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Л.А.В.; концепція та модель, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Ш.С.Ю.; концепція та модель, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Л.Р.Б.).

4. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2016). 5,7-Діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на винахід № 112372). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/kw0ogor5/>. (Особистий внесок авторів: концепція, проведення досліджень, підготовка анотації – Д.А.М.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації – Я.О.Є.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації, подача заявки – К.А.Я.; проведення досліджень, підготовка анотації – Б.Л.С.; проведення досліджень, підготовка анотації – Я.В.О.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень Д.Д.А.).

5. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Серединська, Н.М., Бухтіарова Т.А., Бершова Т.А., Демченко Д.А., Бобкова Л.С., & Демченко А.М. (2015). Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Медична та клінічна хімія, 17(2). <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866>. (Особистий внесок авторів: проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, подання статті до друку – Я.О.Є.; огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті – К.А.Я.; методологія дослідження, перевірка та редагування – С.Н.М.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків – Б.Т.А.; методологія дослідження, обговорення результатів – Бе.Т.А.; огляд літератури, оформлення статті Д.Д.А.; методологія дослідження, перевірка та редагування – Б.Л.С.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Д.А.М.).

6. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Бухтіарова, Т.А., Хоменко, В.С., Омеляненко, З.П., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Демченко А.М. (2015) Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Acta Medica Leopoliensia. 21(4), 59-63. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch\\_2015\\_21\\_4\\_13](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch_2015_21_4_13). (Особистий внесок авторів: проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, подання статті до друку – Я.О.Є.; огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків – Б.Т.А.; методологія дослідження, обговорення результатів – Бе.Т.А.; огляд літератури, оформлення статті Д.Д.А.; методологія дослідження, перевірка та редагування – Б.Л.С.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Д.А.М.).

**Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

7. Коваль, А.Я., Штриголь, С.Ю., & Лесик Р.Б. (2024). Пошук та вивчення сполук з анальгетичною, протизапальною та фригопротекторною дією серед нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвяченої 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, 23-24 жовтня 2024 року, Харків, (с. 114-117). <https://drive.google.com/file/d/1q6lJDTMF0x3Jf8B5dc4QyLxy61cvw2A2/view>. (Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; написання висновків; оформлення та подання тез).

8. Koval, A. (2024). Valuation of analgesic activity and mechanisms of action 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-

ethanone. Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 10, 11-12. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/WBRpirY3iKZwRNC>.

9. Koval, A. (2023). Analgesic and anti-inflammatory activity of new 5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine derivatives. Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 9, 4. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/6qqGaTfwS9xfQYf>.

10. Коваль, А.Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність похідних 5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину в експерименті. Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», 9-10 листопада 2015 р., Вінниця. (с. 151-152).

11. Коваль, А. Я., & Ядловський, О. Є. (2015). Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23–24 жовтня 2015 р., Львів (с. 96–98). *(Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; оформлення та подання тез)*.

12. Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., Янченко, В.О., & Демченко, А.М. (2015). Пошук нових вискоєфективних аналгетиків в ряді 5,7-диацил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів. Матеріали VI Української конференції «Домбровські хімічні читання – 2015», 22-25 вересня 2015 р., Чернівці. (с.115). *(Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів)*.

13. Коваль, А. Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність нових похідних триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Матеріали VI Південно-східного європейського медичного форуму та XIV З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 9-12 вересня 2015 р. Одеса. (с. 381)

14. Демченко, А.М., Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Янченко, В.О. (2015). Синтез та анальгезуючі властивості 5,7-

диацил-6R-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тідазинів. Збірник тез XV наукової конференції «Львівські хімічні читання – 2015», 25-27 травня 2015, Львів (с. 59). *(Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; подання тез).*

***Наукові праці, які додатково відображають результати дисертації***

15. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2015). 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на корисну модель №102848). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/ot225i3j/>. *(Особистий внесок: патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації, подача заявки).*

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	21
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ НЕНАРКОТИЧНІ АНАЛЬГЕТИКИ: ПЛЮСИ ТА МІНУСИ ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ, ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	32
1.1. Основні механізми аналгетичної та протизапальної дії.....	32
1.2. Сучасні підходи до фармакотерапії болю.....	38
1.3. Методи прогнозу аналгетичної та протизапальної активності.....	42
1.4 Похідні триазолу та тіадіазину як потенційні знеболювальні, протизапальні засоби.....	50
1.5 Нестероїдні протизапальні засоби як потенційні фригопротектори...	58
Висновки до розділу 1.....	63
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	65
2.1 Характеристика тест-зразків, препаратів та реактивів.....	65
2.2 Характеристика лабораторних тварин.....	70
2.3 Фармакологічні методи дослідження.....	73
2.3.1 Моделювання болю, викликаного термічним фактором («гаряча пластина» ).....	73
2.3.2 Моделювання болю, викликаного хімічним фактором (оцтовокислі «корчі»).....	74
2.3.3 Моделювання ексудативного запалення (карагеніновий набряк)...	75
2.3.4 Моделювання гострої холодової травми.....	76
2.3.5 Вивчення гострої токсичності сполук.....	77
2.3.6 Оцінка дозозалежності знеболювального ефекту.....	78
2.3.7 Визначення опіоїдєргічної складової в механізмі дії.....	79
2.3.8 Дослідження поведінкових реакцій в тесті «відкрите поле».....	80

	16
2.4 Біохімічні та гемостазіологічні методи дослідження.....	80
2.5 Методи дослідження <i>in silico</i> та <i>in vitro</i> .....	82
2.5.1 Методика проведення віртуального скринінгу.....	82
2.5.2 Методика проведення молекулярного докінгу.....	83
2.5.3 Вивчення цитотоксичної дії <i>in vitro</i> на клітини різного тканинного походження за допомогою МТТ-тесту.....	84
2.6 Статистичні методи.....	85
Висновки до розділу 2.....	86
РОЗДІЛ 3. СКРИНІНГ НОВИХ ПОХІДНИХ 5,7-ДІАЦИЛ-3- <i>H</i> (АЛКІЛ)-6- АРИЛ-5 <i>H</i> -[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ НА АНАЛГЕТИЧНУ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНУ АКТИВНОСТІ.....	87
3.1 Прогноз аналгетичної та протизапальної активності серед похідних 5,7-диацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазинів (віртуальний скринінг).....	87
3.2. Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-диацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного термічним фактором.....	99
3.3. Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-диацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного хімічним фактором.....	102
3.4. Оцінка протизапального ефекту нових похідних 5,7-диацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазинів на моделі ексудативного запалення.....	105
Висновки до розділу 3.....	108
РОЗДІЛ 4. ПОГЛИБЛЕНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ ПОХІДНИХ 5,7- ДІАЦИЛ-3- <i>H</i> (АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5 <i>H</i> -[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ.....	110



4.1. Визначення можливого механізму дії досліджуваних нових похідних 5,7-діацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину <i>in silico</i> (Молекулярний докінг).....	111
4.2 Дослідження гострої токсичності найбільш активних похідних 5,7-діацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину.	114
4.3 Дослідження цитотоксичної дії <i>in vitro</i> найбільш активних похідних 5,7-діацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на клітини ссавців.....	116
4.4 Скринінг найбільш активних сполук похідних 5,7-діацил-3- <i>H</i> (алкіл)-6-арил-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на фрігопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження.....	122
Висновки до розділу 4.....	124
РОЗДІЛ 5. ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦЕНТРАЛЬНИХ ЕФЕКТІВ НАЙБІЛЬШ АКТИВНОЇ СПЛУКИ 1-(5-АЦЕТИЛ-3-МЕТИЛ-6-ФЕНІЛ-5 <i>H</i> -[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]ТІАДІАЗИН-7-ІЛ)-ЕТАНОНУ.....	126
5.1 Оцінка дозозалежності знеболювального ефекту 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону....	126
5.2 Оцінка опіоїдергічного компонента в механізмі дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону...	128
5.3 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на поведінкові реакції у тесті відкритого поля.....	132
Висновки до розділу 5.....	133
РОЗДІЛ 6. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ 1-(5-АЦЕТИЛ-3-МЕТИЛ-6-ФЕНІЛ-5 <i>H</i> -[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]ТІАДІАЗИН-7-ІЛ)-ЕТАНОНУ НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОЇ ХОЛОДОВОЇ ТРАВМИ В ЩУРІВ.....	135

6.1 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на температуру тіла щурів на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії.....	135
6.2 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на коагулологічні показники щурів із холодовою травмою.....	136
6.3 Дослідження впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на показники запального каскаду та активність синтази оксиду азоту у щурів із холодовою травмою.....	140
Висновки до розділу 6.....	145
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	150
ДОДАТКИ.....	193

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- DMEM – модифіковане середовище Ігла
- DRASIC – кислотно-чутливі іонні канали
- FBS – фетальна бичача сироватка
- GMP – гуанілатмонофосфат
- HEK293T – трансформовані клітини нирки ембріона людини та
- IL – інтерлейкіни
- J774.2 – макрофаги миші.
- NMDA – N-метил-D-аспартат
- NO – оксид азот
- NOS – синтаза оксиду азоту
- PBS – фосфатно-сольовий розчин
- PG – простагландини
- TNF- $\alpha$  – фактор некрозу пухлини  $\alpha$
- TPRV-1 – ванілоїдний рецептор
- TTX-r Na<sup>+</sup> channel – тетродотоксинрезистентні натрієві канали
- TXA<sub>2</sub> – тромбоксан A<sub>2</sub>
- AMPA –  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АЧТЧ – активований частковий протромбіновий час
- в/о – внутрішньоочеревинно
- в/ш – внутрішньошлунково
- ДВЗ – дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
- IC<sub>30</sub> – концентрація сполуки, що пригнічує виживаність клітин на 30% порівняно з контролем;
- IC – напівінгібувальна концентрація сполуки, що пригнічує виживаність клітин на 50% порівняно з контролем.

ЛД<sub>50</sub> – летальна доза, що спричиняє смерть 50% піддослідних тварин

ЛОАП – 5-ліпоксигеназо активуючий протеїн

ЛОГ – ліпоксигеназа

НА – аналгетик-антипіретик

НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби

ПЧ – протромбіновий час

ТЧ – тромбіновий час

ЦНС – центральна нервова система

ЦОГ – циклооксигеназа

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Згідно зі статистичними даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у розвинених країнах біль за поширеністю можна порівняти з пандемією. Больовий синдром є причиною звернень пацієнтів у 52% усіх випадків надання невідкладної медичної допомоги, зокрема на первинному рівні [1]. У США понад 50 мільйонів дорослих відчують гострий щоденний біль, а 19,6 мільйона дорослих відчують сильний гострий або хронічний біль, який заважає повсякденному життю чи роботі [2].

Приблизно 80% госпіталізованих пацієнтів можуть відчувати гострий біль, і до 40% з них можуть повідомляти про сильний біль [3]. Так само більше половини пацієнтів можуть все ще відчувати значний гострий біль (тобто від помірного до сильного) через кілька тижнів після виписки з лікарні [4], а майже дві третини пацієнтів повідомляють про принаймні помірний біль через 12 місяців після травми, а троє з чотирьох пацієнтів повідомляють про те, що біль перешкоджає повсякденній діяльності, наприклад, соціальній активності, роботі та когнітивним і емоційним функціям [5].

Хронічний біль вражає приблизно 1,9 мільярда людей у всьому світі [6]. Так дослідження у США показало, що рівень поширеності хронічного болю становить 20,4% серед дорослих, причому 8% із них повідомляють про сильний біль [7]. У Великій Британії 13-50% дорослих живе з хронічним болем, а у 10,4-14,3% виявлено помірний або сильний інвалідизуючий хронічний біль [8]. На зростання розповсюдженості хронічного болю вплинула епідемія Коронавірусної хвороби 2019, що призвела через зміну способу життя, спричинену дистанційною роботою з порушенням ергономіки, хронічним емоційним стресом і тривогою, депресією, катастрофізацією болю, соціальною ізоляцією, гіподинамією, збільшенням маси тіла, спричиненим зміною харчової поведінки, та іншими чинниками [9].

Ще одним фактором розповсюдженості хронічного болю в Україні є військова агресія росії, яка принесла чимало лиха, із наслідками якого нам ще

треба буде справлятися протягом багатьох років. Сьогодні сімейні лікарі стикаються з великою кількістю звернень, пов'язаних із болем у спині, викликаним носінням важких бронежилетів та інших видів тактичного обмундирування. Лікарі фізичної та реабілітаційної медицини вже відзначають значне зростання пацієнтів із постампутаційними фантомними болями, що важко піддаються консервативній терапії і потребують комплексної реабілітації. Також серед найбільш частих і значних чинників, що відзначаються у пацієнтів із хронічним болем, можна виділити підвищення рівню стресу та тривоги, посилення депресії [10].

Здатність переживати біль є найважливішим захисним механізмом, що забезпечує виживання, навчання й адаптацію живих організмів до мінливих умов зовнішнього середовища. Біль не тільки інформує про пошкодження тканин, але й викликає рефлекторні та поведінкові реакції, що дозволяють звести шкідливу дію до мінімуму. Так, гострий біль у суглобі попереджає про розвиток запалення і спонукає обмежити або змінити траєкторію руху, щоб не травмувати ушкоджений суглоб [11]. Гострий біль у спині попереджає про пошкодження опорно-рухового апарату та спонукає зменшити фізичне навантаження й прийняти позу, що полегшує страждання [12]. У разі реального пошкодження тканин розвиваються гострий біль і підвищена чутливість (гіпералгезія), які носять захисний характер і в нормі повністю регресують після загоєння, що біологічно виправдане. У певних випадках біль регресує до загоєння тканин (транзиторний біль). Біль, який пов'язано з активацією больових рецепторів (ноцицепторів) після пошкодження тканин, що відповідає ступеню пошкодження й тривалості дії пошкоджувальних факторів, а потім повністю регресує після загоєння, називається ноцицептивним. У цих випадках застосування знеболювальних засобів, як правило, короткотривале та обмежується терапією анагетичного засобу одноразово, чи протягом декількох прийомів. Залежно від сили пошкодження можуть використовуватись більшість нестероїдних протизапальних препаратів (ібупрофен, диклофенак, німесулід та ін.) чи анальгетики-антипіретики (парацетамол, метамізол натрію). При

сильному больовому синдрому знайшли своє місце більш сильні анальгетики - кеторолак, декскетопрофен, лорноксикам, а в окремих випадках використовуються опіюїдні анальгетики [13]. Часто пацієнт стикається з низкою проблем, що пов'язані з терапією болю, таких як оптимальний вибір анальгетика в залежності від патології, ризик передозування препарату, що може бути фатальним, ін'єкційне знеболювання, яке потребує залучення відповідного медичного персоналу тощо.

На противагу ноцицептивному болю, неприємні сенсорні відчуття можуть зберігатися або з'являтися після проведеного лікування. Поява такого болю, що класифікується як хронічний, зазвичай пов'язана з ураженням периферичної або центральної нервової системи. Терапія хронічного болю більш складна та потребує індивідуального підходу в залежності від походження болю та індивідуальних особливостей пацієнта [14].

Також актуальною медичною та соціальною проблемою залишається гостра холодова травма [15, 16]. Вона трапляється в різних кліматичних поясах, зокрема в теплому кліматі [17], супроводжується досить високою летальністю – до 8,6 смертельних випадків на 100 000 населення, здебільшого в старшому віці [18]. Особливо часто холодова травма виникає у військових (у США 31,1 випадок на 100 000 людино-років у 2019-2024 рр.) [19], представників екстремальних видів спорту (36,6% альпіністів, 20% лижників) [20], безхатченків тощо. Гостра холодова травма актуальна для сучасної України [21]: ще до початку повномасштабної російської агресії по медичну допомогу лише протягом 4 тижнів (грудень 2018 р. – січень 2019 р.) звернулось 1037 осіб із холодовою травмою, з яких 92% ушпиталено [22]. Під час бойових дій у холодну пору року, особливо за підвищеної вологості, ризик холодової травми збільшується. Ступінь ураження тканин можна визначити лише після зігрівання. Однак зігрівальна маніпуляція має особливості та обмеження залежно від обставин, а несвоєчасно і неправильно виконане відігрівання може призвести до значного підвищення частоти небезпечних ускладнень, інвалідизації або летальності [23]. Лікування холодової травми донині

залишається складним завданням.

Сьогодні клініка та фармацевтична промисловість потребують нових знеболювальних, протизапальних і фригопротекторних засобів, анальгетиків зокрема, оскільки відомі препарати не повною мірою задовольняють вимоги сучасної клінічної практики ефективністю та профілем безпеки. Саме тому ведеться пошук нових речовин із зазначними властивостями, які б могли стати основою для створення нового більш ефективного та безпечного вітчизняного лікарського засобу.

Як **об'єкт** дослідження обрано низку нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, що були синтезовані у відділі синтезу фізіологічно-активних речовин ДУ «Інститут фармакології та токсикології Національної Академії Медичних Наук України» під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора Демченка Анатолія Михайловича.

Широкий фармакологічний потенціал сполук цього класу дає підставу сподіватись на наявність у них знеболюючої та/чи протизапальної та/чи фригопротекторної дії, що і стало підставою для проведення даного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» «Синтез та перетворення нових фізіологічно-активних речовин – похідних неконденсованих і конденсованих сульфур- і нітрогеновмісних гетероциклів та споріднених гетероциклічних систем, з використанням методів *in silico* моделювання, вивчення фізико-хімічних властивостей та проведення фармакологічного скринінгу одержаних сполук, дослідження різних видів дикорослих та культивованих рослин західного регіону України з метою одержання нових лікарських засобів, розробка технології лікарських засобів нових складів та опрацювання сучасних методик фармацевтичного та токсикологічного аналізу» 2021-2025 (№ державної реєстрації 0121U107504) та науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення



біологічно активних речовин та лікарських засобів», 2014-2028 (№ державної реєстрації 0114U000956). Дисертант є співвиконавцем зазначених тем.

**Мета дослідження:** встановити залежність аналгетичного та/чи протизапального та/чи фригопротекторного ефектів у нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину від хімічної структури, виявити найбільш ефективну сполуку із знеболювальною та/чи протизапальною та/чи фригопротекторною дією та провести поглиблене вивчення її фармакологічних властивостей і безпечності на предмет придатності для створення нового лікарського засобу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі **завдання:**

1. Провести віртуальний скринінг нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів з метою виявлення сполук з передбачуваною знеболювальною активністю та/чи протизапальною дією для подальшої експериментальної верифікації.

2. Оцінити аналгетичну активність похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделях термічної стимуляції («гаряча пластина») та хімічної стимуляції (оцтовокислі «корчі»).

3. Оцінити протизапальний ефект похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на моделі карагенінового набряку.

4. Провести молекулярний докінг похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів для визначення можливого механізму дії.

5. Оцінити гостру токсичність та цитотоксичність сполук-хітів серед похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів з виразною аналгетичною та/чи протизапальною активністю.

6. Провести скринінг фригопротекторних властивостей серед найактивніших похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-

*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі гострого загального охолодження та визначити сполуку-лідера.

7. Провести поглиблене дослідження фармакологічної активності сполуки-лідера, а саме: оцінити дозозалежність знеболювального ефекту, оцінити опіоїдергічний компонент в механізмі дії та вивчити вплив на поведінкові реакції у тесті відкритого поля.

8. Дослідити вплив сполуки-лідера на перебіг гострої холодової травми, а саме вплив на температуру тіла, на коагулологічні показники, на маркери запального каскаду та активність синтази оксиду азоту.

**Об'єкт дослідження:** Фармакологічна корекція болю, запалення та гострої холодової травми.

**Предмет дослідження:** фармакодинаміка та механізми дії нових хімічних речовин, що є похідними 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину.

**Методи дослідження:** фармакологічні (моделювання болю, викликаного термічним та хімічним факторами, моделювання ексудативного запалення, моделювання гострої холодової травми, вивчення гострої токсичності, оцінка дозозалежності знеболювального ефекту, визначення опіоїдергічної складової в механізмі дії, дослідження поведінкових реакцій), гемостазіологічні (протромбіновий час, тромбіновий час, активований частковий протромбіновий час, фібриноген, протромбін, тромбін, D-димер), біохімічні (маркери запалення, Синтаза оксиду азоту), віртуальний скринінг, молекулярний докінг, вивчення цитотоксичної дії, статистичні (програми MS Excel 2010, Statistics 10.0, GraphPad Prism).

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дослідженні вперше проведено віртуальний скринінг за допомогою он-лайн сервісу SwissTargetPrediction нових похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, який показав вірогідність широкого спектру біологічних активностей, що може бути пов'язаний із впливом на різні рецепторні та ферментні системи організму, дозволяє передбачити наявність

знеболювальної активності та/чи протизапальної дії та став підставою експериментальної верифікації.

Проведена верифікація антиноцицептивної активності 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделях “гарячої пластини” та оцтовокислих “корчів” з метою виявлення центрального та периферичного впливу на ноцицептивну систему відповідно, засвідчила, що досліджувані сполуки виявляють виражену антиноцицептивну активність.

Проведене дослідження засвідчило, що похідним 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину притаманний певний антиексудативний ефект, котрий за своєю активністю поступається референтному препарату – диклофенаку натрію. Так, сполуки, найбільш активні як анальгетики, не проявили антиексудативного ефекту, а неактивні, як потенційні анальгетики, виявили протизапальний ефект, близький до такого в диклофенаку натрію

Вперше в умовах *in silico* проведений молекулярний докінг нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, згідно з яким протизапальний вплив сполуки виявляють переважно через вплив на ліпоксигеназоактивуєчий протеїн та в меншій мірі через 5-ліпоксигеназу, а вплив на циклооксигеназу-1 та циклооксигеназу-2 є меншим у порівнянні з референтними лікарськими засобами, однак ця взаємодія потенційно збільшує сумарний протизапальний ефект досліджуваних речовин. Також спостерігається невелика перевага взаємодії з циклооксигеназою-2, що свідчить про потенційний більш безпечний фармакологічний профіль цієї групи гетероциклів з меншою кількістю побічних ефектів.

У роботі вперше визначено гостру токсичність за одноразового внутрішньошлункового введення мишам та встановлено, що всі сполуки-хіти належать до IV класу токсичності ( $500 \text{ мг/кг} < \text{LD}_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$ ) за класифікацією Hoge та Sterner (малотоксичні), а також не виявляють суттєвої цитотоксичності для трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії

НЕК293Т і макрофагів миші лінії J774.2, що дозволяє розглядати їх як потенційно безпечні для подальших доклінічних досліджень.

Вперше встановлено, що за результатами скринінгу трьох похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину фригопротекторна активність не є загальною ознакою сполук цього ряду. Потужні фригопротекторні властивості на рівні препарату порівняння диклофенаку натрію виявляє лише 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (статистично значуще збільшує час життя мишей із моделлю гострого загального охолодження).

Вперше показано, що 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон чинить дозозалежний знеболювальний ефект. На моделі соматичного болю (тест «Гаряча пластина») за введення у шлунок у діапазоні доз 5-35 мг/кг максимально ефективною є доза 25 мг/кг.

Доповнено наукові дані щодо механізму аналгетичної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (сполука IFT\_247), а саме що йому не притаманний опіоїдергічний вплив, що доводиться відсутністю змін знеболювального ефекту на тлі дії налоксону (на відміну від метамізолу натрію, аналгетичний ефект якого налоксон зменшує).

Встановлено, що сполука IFT\_247 не спричиняє ані стимулювального, ані пригнічувального впливу на центральну нервову систему. Це засвідчено відсутністю суттєвого впливу досліджуваної сполуки на поведінку мишей у тесті відкритого поля, а єдиною значущою відмінністю було збільшення кількості болюсів ( $p < 0,05$ ), проте решта показників емоційних реакцій та їх вегетативного супроводу (грумінг, уринації) не відрізнялися від контрольних значень.

Дістало подальшого розвитку вивчення фригопротекторних властивостей, яке показало, що 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон) статистично значуще зменшує ступінь гіпотермії у щурів за двогодинної експозиції за  $-18^{\circ}\text{C}$  при

внутрішньошлунковому введенні (18 мг/кг) та запобігає розвитку синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові та тромбозу, зменшуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові та нормалізуючи підвищений тромбіновий час у найгострішому періоді гострої холодової травми.

Вперше встановлено, що 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон за гострої холодової травми пригнічує розвиток системної запальної реакції: запобігає збільшенню вмісту лейкотриєнів (В4 та тотальних), поступаючись за цією властивістю диклофенаку; подібно до диклофенаку значно зменшує до субнормального рівня рівень інтерлейкіну-1 $\beta$  та до нормального – фактору некрозу пухлин альфа без впливу на інтерлейкін-6 та на зменшений вміст протизапальних цитокінів – інтерлейкін-4 та інтерлейкін-10, нормалізує збільшене співвідношення про- та протизапальних цитокінів.

Отримано нові дані, які свідчить, що за холодової травми рівень синтази оксиду азоту у печінці в щурів групи контрольної патології зменшується в 1,5 разу щодо інтактного контролю, що вказує на зменшення продукції оксиду азоту та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження – вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247 рівень синтази оксиду азоту залишається на рівні інтактного контролю.

Отримані результати доповнюють наукові дані та вказують, що похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину є перспективними для створення нових високоефективних та безпечних засобів, а сполука 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон може стати основою для створення нового лікарського засобу з виразною анальгетичною та фригопротекторною дією, а також з помірною протизапальною активністю.

**Практичне значення одержаних результатів.** Результати проведеного експериментального дослідження обґрунтовують можливість створення на основі сполуки-лідера 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-

*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону нового неопіоїдного знеболювального засобу та доцільності подальших поглиблених досліджень механізмів його фригопротекторної активності та впливу на стан окремих органів і систем за холодової травми, як перспективного фригопротектора.

Інформація, що отримана в скринінгових дослідженнях знеболювальної та протизапальної активності нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, дозволить у майбутньому оптимізувати напрямки фармацевтичного синтезу та отримати нові сполуки-кандидати в знеболювальні, протизапальні та фригопротекторні засоби.

Результати дослідження стали основою для патенту України на винахід № 112372, що підтверджує новизну та практичну цінність отриманих даних.

**Особистий внесок здобувача.** У ході виконання роботи автор здійснив експериментальні дослідження, узагальнив отримані результати та сформулював основні положення та висновки, що будуть представлені на захист. Співавторами наукових праць є наукові керівники та дослідники, з якими проводились спільні фармакологічні та біохімічні дослідження.

**Апробація результатів дослідження.** Основні результати дисертаційної роботи було представлено на науково-практичних конференціях: XV наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2015» (Львів, 25-27 травня 2015 р.), VI Південно-східний європейський медичний форуму та XIV З'їзд Всеукраїнського лікарського товариства (Одеса, 9-12 вересня 2015 р.), VI Українська конференція «Домбровські хімічні читання – 2015»(Чернівці, 22-25 вересня 2015 р.), Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії» (Львів, 23-24 жовтня 2015 р.), VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 9-10 листопада 2015 р.), Міжнародна науково-практичної конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (Харків, 23-24 жовтня 2024 року).

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 15 наукових робіт, з них 1 стаття у журналі, що індексуються науково-метричною базою SCOPUS, 4 статті в наукових фахових виданнях України, 1 патент на винахід України, 8 тез доповідей та 1 патент на корисну модель.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 213 сторінках друкованого тексту, з яких 126 основного тексту. Дисертаційна робота складається з анотації, вступ, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних літературних джерел, додатків. Робота ілюстрована 32 рисунками та 18 таблицями. Список використаних джерел налічує 320 найменувань, з них 46 кирилицею та 274 латиницею.

## РОЗДІЛ 1

### СУЧАСНІ НЕНАРКОТИЧНІ АНАЛЬГЕТИКИ: ПЛЮСИ ТА МІНУСИ ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ, ШЛЯХИ ОПТИМІЗАЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

#### 1.1 Основні механізми протизапальної та аналгетичної дії

Біль та запалення є універсальними реакціями організму, що виникають при впливі сильних чи руйнуючих реакцій на організм [24]. Міжнародна асоціація з вивчення болю дає визначення болю як «неприємне фізичне чи емоційне відчуття, що обумовлено реальним чи потенційним пошкодженням тканин, а також описом цього пошкодження» [25]. Тісно з болем пов'язано і запалення. Його визначають як комплексний, місцевий та загальний патологічний процес, що виникає у відповідь на пошкодження клітинних структур організму чи дію патогенного подразника, що проявляється у ексудативних реакціях направлених на усунення продуктів пошкодження, подразників, з метою максимального відновлення у зоні пошкодження [26]. Для терапії цих патологій використовують специфічні лікарські засоби – анальгетики та протизапальні засоби. Оскільки патогенез болю та запалення часто пов'язаний один з одним, для терапії болю разом з специфічними анальгетиками застосовують препарати з суттєвим протизапальним ефектом (кеторолак, диклофенак, ацетилсаліцилова кислота, німесулід тощо) [27].

Відомо про значну різноманітність больових відчуттів, які пов'язані не тільки з запаленням. Вони потребують індивідуальної фармакотерапії, яка іноді є складною та коштовною [28, 29, 30]. На сьогодні є достатньо доказів того, що в основі патофізіологічних процесів розвитку хронічних больових синдромів полягає індивідуальна генетично обумовлена схильність. Генетичну детермінованість больових синдромів пояснює той факт, що одне і те ж захворювання у різних людей може перебігати по-різному: в одних випадках біль переходить в хронічну форму, в інших – ні. Виявляється зв'язок



поліморфізму низки генів, що кодують перспективні для терапії болю мішеней: понад 50 нейротрансмітерів, їх рецепторів і переносників; 8 іонних каналів і їхніх субодиниць; 15 прозапальних цитокінів та їх рецепторів; близько 15 нейротрофічних факторів та їх рецепторів; понад 15 внутрішньоклітинних факторів з розвитком окремих видів хронічного і невропатичного болю, а також з резистентністю больових синдромів до терапії. Також можна з упевненістю говорити про участь генів у кодуванні ванілоїдного рецептора (TPRV-1), інтерлейкіну-1а (IL-1a) та інтерлейкіну-6 (IL-6), що відіграють значну роль у патогенезі хронічного болю [27].

Значна різноманітність больових синдромів пов'язана із значною кількістю біомішеней для знеболення вздовж ноцицептивних шляхів: безпосередньо від ноцицептора до відповідних ділянок головного мозку. Знеболення проводиться або блокуванням проведення ноцицептивного імпульсу, або за допомогою зняття пошкоджувального фактору [31, 32, 33]. Відомо, що пошкодження тканин супроводжується запаленням, яке виявляється гіпертермією, гіперемією, набряком, місцевим ацидозом тощо. Пошкодження супроводжується розширенням судин, що в свою чергу призводить до посилення кровопостачання, сповільнення кровоплину, почервоніння. Спостерігається збільшення проникності капілярів, вихід лейкоцитів, макрофагів, рідинної частини крові на місці пошкодження, і як наслідок утворення набряку [34]. Цей процес регулюється медіаторами запалення, серед яких виділяють простагландини (PG), гістамін, брадикінін, цитокіни тощо. Згідно з сучасними уявленнями, основною біомішенню для лікування запалення та пов'язаного з ним болю є ферменти синтезу та біотрансформації арахідонової кислоти [35, 36].

Відомо, що основним механізмом протизапальної дії нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) та аналгетиків-антипіретиків (НА) є пригнічення ізоферментів циклооксигенази (ЦОГ), яка бере участь у перетворенні арахідонової кислоти в ендопероксида, з яких синтезуються PG і тромбосан [37]. Пригнічення ЦОГ різко знижує рівень PG, відповідальних за

основні симптоми запалення (набряк, розширення судин, почервоніння, біль) та опосередковано впливає на рівень та реактивність неспецифічних медіаторів запалення (гістамін, серотонін, кініни, комплемент, мікросомальні ферменти), які при пошкодженні запускають каскад реакцій, що підтримують окремі ланки запалення. Терапевтичною мішенню протизапальних препаратів є фермент ЦОГ: ЦОГ-1, ЦОГ-2, а також, на думку окремих авторів, ЦОГ-3. Ізофермент ЦОГ-1 (конститутивний) бере участь у найважливіших фізіологічних процесах, зокрема в синтезі простагліну та інших PG, що регулюють стан слизової оболонки ШКТ, функцію тромбоцитів і кровообіг у нирках. Інший ізофермент ЦОГ-2 (індуцибельний) у нормі, як правило, практично відсутній. Він експресується під впливом цитокінів та інших протизапальних агентів і бере участь у синтезі простаглінів, необхідних для розвитку та підтримки запалення. Згідно з сучасними уявленнями, протизапальна дія НПЗЗ зумовлена здебільшого пригніченням ЦОГ-2, а побічні реакції – ЦОГ-1. ЦОГ-3, наявність якої у низки видів ссавців дискусійна, функціонує в структурах центральної нервової системи (ЦНС) [37, 38, 39]. Саме з впливом на ізоферменти ЦОГ-1 та ЦОГ-2 пов'язують активність широко відомих НПЗЗ диклофенаку та ацетилсаліцилової кислоти [39, 40]. Для препаратів нового покоління (мелоксикам, месулід, теносикам, лорноксикам, ельдерин, набуметон та ін.), що стали входити у клінічну практику починаючи з середини 1990-х рр., характерною властивістю фармакодинаміки, на відміну від традиційних НПЗЗ, є вибіркоче пригнічення PG, що призводить до виразної протизапальної та анальгезуючої активності з низьким ступенем розвитку побічних ефектів за тривалого застосування [41, 42]. Високоселективними специфічними інгібіторами ЦОГ-2 є целекоксиб, еторікоксиб та інші, які мають низьку спорідненість з ЦОГ-1, тому суттєво не впливають на синтез тих PG що відповідають за фізіологічні процеси в слизовій оболонці шлунка та тромбоцитах. Необхідно зазначити, що в останні роки дещо змінилось ставлення до ЦОГ-2 як біомішені для НПЗЗ у зв'язку з виявленням серйозних побічних ефектів селективних інгібіторів ЦОГ-2 [43, 44].

Іншою відомою біомішенню для сучасних лікарських засобів, що використовуються для терапії болю, пов'язаного з запаленням, є фосфоліпаза  $A_2$ . Вона необхідна для синтезу арахідонової кислоти. Саме з нею пов'язують протизапальну/знеболювальну активність глюкокортикоїдів [45]. Глюкокортикоїди індукують виділення білків (ліпокортини), що інгібують фосфоліпазу  $A_2$ . Ці білки опосередковано контролюють біосинтез таких сильнодіючих медіаторів запалення, як PG та лейкотрієни, шляхом гальмування вивільнення їх біохімічного попередника – арахідонової кислоти [46].

В останні десятиріччя проводяться дослідження щодо впливу на інші ланки запалення з метою розробки нових підходів до терапії болю. У цьому аспекті достатньо цікавими є цитокіни, а саме деякі типи інтерлейкінів. Впливаючи на них, можна досить ефективно регулювати як запалення, так і больовий синдром, пов'язаний з запальною реакцією в експерименті [47, 48]. В доступній науковій літературі є дані щодо пошуку нових протизапальних та знеболювальних засобів, що впливають на стан цитокінів [44]. Слід відмітити і моноклональні антитіла, а саме фактор некрозу пухлини  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Це позаклітинний білок, багатофункціональний прозапальний цитокін, що синтезується в здебільшого за участі моноцитів і макрофагів. Він впливає на ліпідний метаболізм, стимулює продукцію інтерлейкінів (IL-1, IL-6, IL-8). Спостерігається його суттєвий ефект при терапії захворювань опорно-рухового апарату, а також значна знеболювальна активність при невропатичному болю в експерименті [49, 50]. Показано перспективність впливу для регуляції болю (та дещо меншою мірою запалення) на субстанцію P, яка синтезується в клітинах ганглію дорсального корінця та шляхом аксоплазменного транспорту потрапляє в центральні та периферичні закінчення аферентних волокон. Субстанція P накопичується в периферичних ділянках та може вивільнятися за їх деполяризації під час пошкодження. Мішенями для субстанції P на периферії є опастисті клітини, кровоносні судини, а також імунокомпетентні клітини. Субстанція P значно посилює капілярну проникність. Проникнення білків із судин супроводжується виходом рідини, яка викликає характерний для

запалення набряк, а також збільшення температури, почервоніння шкіри, що обумовлено вазодилатацією [24, 51]. Саме з впливом на субстанцію Р пов'язують анальгезуючий компонент капсаїциноїдів [52].

Усунення дії пошкоджувального фактора на ноцицептори не завжди є ефективним. Тому значний інтерес як біомішені для знеболювання являють власне ноцицептори, зокрема С-волокна, на яких виявлено специфічні рецептори. Серед широкого спектру ноцицептивних рецепторів слід виділити тетродотоксинрезистентні натрієві канали (TTX-r  $\text{Na}^+$  channel), TRPV1, підтип пуринергічного рецептора  $\text{P}_2\text{X}_3$ , на який діє аденозинтрифосфат (АТФ), а також кислотно-чутливі іонні канали (DRASIC), що містяться зокрема в дорсальних корінцях спинного мозку [53].

Канали TTX-r  $\text{Na}^+$ , відомі також як  $\text{NaV1.8}$  і  $\text{NaV1.9}$ , являють собою натрієві канали закритого типу X і XI. Альфа-субодиницями цих каналів, що складаються з 4 доменів, пов'язаних внутрішньоклітинними спіралями, є  $\text{SCN10A}$  та  $\text{SCN11A}$  відповідно [53, 54, 55, 56]. Ці рецептори відповідають за проведення імпульсу в ноцицептивних нейронах. Експериментальні дані показали значний потенціал зазначених рецепторів як біомішеней для розробки нових анальгетиків, однак компонент анальгетичної дії, пов'язаної з впливом на ці рецептори, поки що показаний лише у орфенадрину [57].

TRPV1 локалізується на плазматичній мембрані ноцицепторів (від периферичного закінчення до центрального відрізка) і являє собою білок, який складається з шести трансмембранних доменів, що формують іонний канал. Як анальгетики, як правило, перспективні антагоністи TRPV1-рецептора, що пригнічують передачу ноцицептивного імпульсу. Суттєву терапевтичну ефективність вплив на цей рецептор виявляє і при експериментальному запаленні, зокрема шляхом регуляції субстанції Р в організмі. Певний інтерес представляють і агоністи TRPV1-рецептора, що за тривалої дії на рецептор викликають значний період десенситизації після періоду збудження [58]. Слід зазначити, що активні центри каналу є внутрішньоклітинними, і основна вимога для потенційних агоністів/антагоністів TRPV1 є ліпофільність. На

сьогодні відомо про анальгетичний компонент капсаїцину, який є першим з відомих лігандів TRPV1. Показано, що відомий анальгетик-антипіретик парацетамол також опосередковано впливає на TRPV1. В результаті метаболізму парацетамолу в організмі утворюється метаболіт N-(4-гідроксифеніл)арахідонілетаноламід. Ця сполука має властивість інгібувати утворення ендogenousного канабіноїду/ванілоїду анандаміду ноцицептивними нейронами. Саме з впливом анандаміду пов'язують активацію TRPV-1 [59, 60].

Рецептор  $P_2X_3$ , представляє собою ліганд-залежний іонний канал. Функція його полягає в регуляції входу іонів  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , а також  $Cl^-$ . Рецептор розташовується в периферичних закінченнях чутливих нервів та на чутливих нейронах задніх корінців спинного мозку. Відомо, що суттєва частина каналу, а як наслідок і активні його центри, локалізуються позаклітинно, утворюючи велику петлю. Однак обидва кінцеві фрагменти петлі розташовуються в середині клітини. Характерною рисою рецептора  $P_2X_3$  є здатність до десенситизації, тобто до втрати чутливості до агоністів за тривалого контакту з ним [61].

На ноцицептивному рецепторі також виявлено кислотно-чутливий іонний канал DRASIC, який належить до потенціал-нечутливих катіонних каналів і активується позаклітинними протонами [62]. Функція каналу полягає в тому, що при його активації спотсеригається посилення проникнення іонів  $Na^+$  і зниження проникнення іонів  $Ca^{2+}$  всередину клітини. В експерименті показано, що блокатори цього рецептора не поступаються за ефективністю морфіну за відсутності побічних ефектів, властивих опіоїдам [63].

Відомо, що первинні аферентні ноцицептори містять низку медіаторів (збуджувальну амінокислоту глутамат, субстанцію P, кальцитонін ген-зв'язаний пептид та інші). Так, глутамат діє на кілька видів рецепторів, зокрема на рецептр  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти (AMPA-рецептор) та N-метил-D-аспартат рецептор (NMDA-рецептор), що сприяють швидкій деполяризації нейронів дорсального рогу завдяки проникненню в клітину іонів  $Na^+$  і виходу  $K^+$ , а NMDA-рецептор, крім цього регулює

надходження в клітину іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . Ці рецептори активуються при тривалій стимуляції дорсального рогу. Серед препаратів, що впливають на зазначені рецептори, в першу чергу необхідно назвати анестетики та анальгетик лакозамід [64, 65].

Таким чином, основними мішенями для знеболення в залежності від патогенезу болю є вплив на різні ланки запального процесу, як правило на метаболізм арахідонової кислоти, зниження активності медіаторів запалення та блокування проведення больових імпульсів як на центральному, так і на периферичному рівнях.

## **1.2 Сучасні підходи до фармакотерапії болю**

Найчастішою причиною звернення хворих за невідкладною медичною допомогою залишається больовий синдром (з 14,5 млн. екстрених звернень помірний больовий синдром був виявлений у 2 млн. пацієнтів (14% випадків), виразний – у 2,9 млн. пацієнтів (20% випадків) [66]. Біль спричиняє тяжкі фізичні та психічні страждання і є основною причиною зниження якості життя хворих та значних економічних затрат. За більшості захворювань біль може бути основним, а іноді і єдиним симптомом хвороби [67]. Здатність переживати біль є найважливішим захисним механізмом, що забезпечує виживання, навчання й адаптацію живих організмів до мінливих умов зовнішнього середовища. Біль не тільки інформує про тканинне пошкодження, але й викликає рефлекторні та поведінкові реакції, що дозволяють мінімізувати шкідливу дію. Так, гострий біль у суглобі попереджає про розвиток запалення і спонукає обмежити або змінити траєкторію руху, щоб не травмувати ушкоджений суглоб. Гострий біль у спині попереджає про пошкодження опорно-рухового апарату і спонукає зменшити фізичне навантаження і зайняти позу, що полегшує страждання. У разі реального пошкодження тканин розвиваються гострий біль і підвищена чутливість (гіпералгезія), які мають захисний характер і в нормі повністю регресують після загоєння, що біологічно

виправдано. У ряді випадків біль регресує до загоєння тканин (транзиторний біль). Біль, який пов'язано з активацією больових рецепторів (ноцицепторів) після тканинного пошкодження, відповідає ступеню тканинного пошкодження і тривалості дії пошкоджувальних факторів, а потім повністю регресує після загоєння, називається ноцицептивним. У цьому випадку застосування знеболювальних засобів, як правило, короткотривале та обмежується одним чи декількома прийманнями аналгетичного препарату. В залежності від сили пошкодження можуть використовуватись більшість НПЗЗ (ібупрофен, диклофенак, німесулід та ін.) чи анальгетики-антипіретики (парацетамол, метамізол натрію). При виразному больовому синдромі знайшли своє місце більш сильні анальгетики – кеторолак, декскетопрофен, лорноксикам, механізм знеболювальної дії яких пов'язують не тільки з впливом на ізоферменти ЦОГ [27]. В окремих випадках використовуються опіїодні анальгетики. Часто пацієнт стикається з низкою проблем, пов'язаних з терапією болю, таких як оптимальний вибір анальгетика в залежності від патології (при пароксизмальних гемикраніях, наприклад, ефективний тільки індометацин у дозі 25 мг три рази на добу); ризик передозування препарату, що може бути фатальним (наприклад, ризик гепатотоксичної дії парацетамолу), ін'єкційне знеболювання (потребує залучення відповідного медичного персоналу) тощо [68, 69]. В окремих випадках пацієнти потребують знеболення наркотичними анальгетиками, що ускладнюється тим фактом, що застосування цієї групи препаратів суворо регламентовано та обмежено [70, 71].

На противагу ноцицептивному болю, неприємні сенсорні відчуття можуть зберігатися або з'являтися після загоєння. В цьому випадку вони не несуть захисної функції, а є причиною страждання. Поява такого болю зазвичай пов'язана з ураженням периферичної або центральної нервової системи, і він належить до хронічних. Хронічний біль розглядається як біль, що «відірвався» від основного захворювання і отримав «надорганний» характер. Міжнародна асоціація з вивчення болю визначає хронічний біль, як «... біль, що триває довше нормального періоду загоєння» [25]. Існують різні підходи в оцінці

тривалості хронічного болю. На думку експертів Міжнародної асоціації з вивчення болю, про хронічний біль слід говорити в тих випадках, коли його тривалість становить не менше 3 місяців [47].

Терапія хронічного болю більш складна та потребує індивідуального підходу в залежності від патології болю та індивідуальних особливостей пацієнта [72]. Відомо про значну кількість видів хронічного болю, ефективність терапії яких не досконала [73]. Як типові приклади особливостей та складностей терапії хронічного болю можна невести декілька з них.

Найбільш яскравим і досить успішним прикладом лікування хронічного болю є програма терапії больового синдрому в онкології, затверджена ще у минулому сторіччі Всесвітня організація охорони здоров'я [74]. Вона складається з трьох ступенів залежно від сили больового синдрому. При слабкому болю використовуються НА, НПЗЗ з ад'ювантними анальгетиками чи без них. При посиленні болю до середньої тяжкості знеболення проводиться слабкими наркотичними анальгетиками у поєднанні з ад'ювантними препаратами чи без них. При сильному болю терапія проводиться сильними наркотичними анальгетиками, у поєднанні з ад'ювантами та/чи ненаркотичними анальгетиками. Причому застосування НПЗЗ може бути важливим, оскільки їх застосування у онкологічних хворих ґрунтується на властивості цих препаратів пригнічувати запальні процеси по периферії пухлини. Крім того відомо, що для росту кісткових метастазів необхідний  $\text{PGE}_2$ , а НПЗЗ інгібують його синтез. Слід вказати на ряд труднощів терапії болю в онкології. Це пов'язано насамперед із застосуванням наркотичних анальгетиків. По-перше, їх застосування суворо регламентовано та обмежено в зв'язку з тим, що вони можуть викликати фізичну та психічну залежність, наркоманію [75]. Небезпечним для життя ускладненням при застосуванні наркотичних анальгетиків (морфін, фентаніл та ін.) є їх здатність пригнічувати дихальний центр, що обмежує їх застосування при порушенні функції дихання [76]. Слід відзначити і недостатньо задовільні фармакокінетичні характеристики опіоїдних анальгетиків. Як правило, при ентеральному введенні



вони мають низьку біодоступність (для морфіну гідрохлориду не більше 10-30%). Ін'єкційне введення характеризується помірною тривалістю ефекту – до 3-4 год. [77]. Це передбачає часте парентеральне введення за тривалого застосування опіоїдів, що дискомфортно для пацієнтів і вимагає регулярного залучення медперсоналу [78].

Суттєві труднощі виявляються за корекції болей в ревматології, що викликають значні страждання та значно погіршують якість життя [79, 80]. Як правило, застосовують НПЗЗ та кортикостероїди, що виявляють протизапальну на імуносупресивну дію, а також препарати, що модифікують перебіг захворювання. У терапії ревматоїдного артрити одночасно використовують препарати різних груп. Тривають дискусії щодо схем терапії, їх тривалості, а також токсичності та ефективності різних препаратів [81]. Проте, базовою групою знеболювальних препаратів є НПЗЗ, які використовують з урахуванням особливостей їх фармакокінетики та фармакодинаміки. Фармакокінетичні характеристики, як правило, дозволяють використовувати їх оминаючи парентеральний шлях застосування [82]. Проте ці препарати можуть викликати широкий спектр серйозних побічних реакцій з боку різних органів і систем організму, особливо при системному їх застосуванні, що неабияк ускладнює тривале лікування. Так, для анальгетиків з циклооксигеназним механізмом дії існують значні ризики виникнення серйозних побічних ефектів, що представляють серйозну загрозу здоров'ю, а іноді й життю пацієнта: ураження шлунково-кишкового тракту (ШКТ) – виразки шлунка та дванадцятипалої кишки (НПЗЗ), печінки (парацетамол та інші). Підвищений ризик виникнення інфарктів, інсультів (виборіркові інгібітори ЦОГ-2, а також диклофенак), вплив на згортання крові (кеторолак та інші), нефротоксичність і багато інших. Це вимагає медичного контролю за їх тривалому застосування у високих дозах [83].

Найбільш поширеною формою первинного болю голови є головний біль напруги, який відчувають майже 40% населення [84], зокрема хронічна її форма (відчування больового синдрому більш ніж 180 днів на рік). Як правило, для

терапії використовують анальгетики-антипіретики на НПЗЗ (ацетилсаліцилова кислота, парацетамол та ін.); досить ефективні їх комбінації з кофеїном [85, 86]. При нефективності використовують НПЗЗ типу напроксену, дифлунізалу чи буталбітал та кофеїнвмісні препарати або малі наркотичні анальгетики, у тому числі комбіновані препарати з кодеїном. При посиленні больового синдрому використовують інтраназальні наркотичні препарати [86, 87, 88]. Однак для усунення рикошетних нападів болю голови цю терапію не можна використовувати частіше двох, максимум трьох днів на тиждень [84]. Крім того, для профілактики головного болю напруги використовують антидепресанти (нортриптілін, докsepін, селективні інгібітори захоплення серотоніну [84, 89, 90]. Серед складностей застосування антидепресантів слід у першу чергу виділити її психотропну дію, що суттєво обмежує їх застосування [91].

Таким чином, терапія як гострого, так і хронічного больового синдрому часто потребує комбінованого застосування знеболювальних засобів різних фармакологічних груп, зокрема тих, застосування яких обмежено і регламентовано, а також з урахуванням співвідношення «користь-ризик» для конкретного пацієнта.

### **1.3 Методи прогнозування аналгетичної та протизапальної активності**

Клінічна практика та фармацевтична промисловість потребують нових аналгетиків, оскільки відомі лікарські засоби не в повній мірі задовольняють вимоги сучасної клінічної практики.

Розробка нового лікарського засобу від оригінальної ідеї до випуску готового продукту – складний процес, який може тривати 12-15 років і коштувати понад 1 мільярд доларів. Ідея біомішені може бути отримана з різних джерел, включаючи академічні та клінічні дослідження та комерційний сектор. Може знадобитися багато років, щоб створити сукупність доказів, перш

ніж вибрати біомішень для комплексної програми створення лікарського засобу. Після того, як бімішень обрано, опрацьовують низку процесів для ідентифікації молекул, які мають відповідні характеристики [92, 93]. Саме тому починаючи з 70-80 рр. минулого сторіччя для пошуку нових ліків стали використовувати різні підходи прогнозу біологічної активності сполук. Ці методи призначені покращити ефективність, якість скринінгу, а також зменшити фінансові витрати на стадії пошуку оригінальної біологічно-активної молекули [94]. Відомо про створення з використанням методів віртуального скринінгу таких препаратів, як каптоприл, дорзоламід, ампренавір, тощо [95].

Слід зазначити, що методи прогнозу активності нових ненаркотичних анальгетиків принципово не відрізняються від методів прогнозу сполук з іншими біологічними активностями [94, 96, 97].

Один з основних підходів для прогнозування біологічних і фізико-хімічних властивостей нових сполук, зокрема анальгетиків, є метод комбінаторного аналізу, що базується на хемоінформатиці (методів інформатики для вирішення хімічних проблем) і комп'ютерному моделюванні. Іншими словами, використовуючи базу даних про активність відомих хімічних сполук, комбінуючи їх структуру за допомогою комп'ютерних програм, можливо здійснити проєктування речовини із заданими властивостями [94, 97, 98]. При цьому широко використовуються різні «бібліотеки» як відомих, так і потенційних біологічно активних малих молекул. Ці бібліотеки містять різну інформацію, корисну для розробки нового препарату, серед якої хімічна структура, фізико-хімічні властивості, спектральні характеристики молекули, нові методи синтезу потенційно активних молекул, відомі біологічні активності, залежність «структура-активність» тощо.

Як правило, інформаційні масиви у цих базах можна розділити на дві основні групи: масиви з інформацією про молекули, які можуть використовуватися як лікарські речовини, і масиви з інформацією про молекули, що не можуть застосовуватися як лікарські засоби [99]. Для створення нових препаратів використовуються різні бази. Слід зазначити, що

ідеологічно ці бази є досить близькими і не істотно відрізняються одна від одної, тому для прикладів можна навести деякі з них.

Конформаційна база даних SuperDrug [100]. Ця база даних містить кілька тисяч 3D-структур активних інгредієнтів існуючих препаратів. Для врахування структурної гнучкості їх представлено більш ніж в 100 структурних конформерах. Для більшої зручності користування автори представляють систему веб-запитів, що дозволяє пошук сполук за назвою, синонімами, назвою в системі ІЮПАК, за допомогою формули, CAS-номера, АТС-коду тощо. У програмі можливо використання скринінгу 2D-подібності (коефіцієнти Танімото) та процедурою автоматичної 3D-суперпозиції на основі конформаційних уявлень. Структури сполук аналізуються за допомогою «порогу подібності». Також використовується накладання конформерів у форматі файлу за допомогою графічного інтерфейсу. Одною з переваг програми є безкоштовний доступ.

Конформаційну базу OMEGA розроблено для користування великими бібліотеками, необхідними для автоматизованого проектування лікарських препаратів. OMEGA генерує структури бази даних у мульти-конформер. З високою швидкістю і надійністю виконує швидке розширення конформацій молекул, отримуючи пропускну здатність у десятки тисяч сполук на день. OMEGA досить ефективно відтворює біоактивні конформації та забезпечує оптимальний баланс між швидкістю й продуктивністю за використання великих баз хімічних сполук [101]. Зазначена база даних може бути використана як доповнення в різних застосунках, включаючи докінг (Fred) і алгоритми фармакофорного сприйняття.

Розробка фірми Thomson Reuters World Drug Index є високотехнологічним та авторитетним ресурсом відомих та досліджуваних препаратів (на стадіях клінічних та доклінічних досліджень), а також біологічно активних молекул. Як і решта баз, вона використовується для віртуального скринінгу нових лікарських засобів [102]. При роботі з інформаційним ресурсом можна використовувати міжнародні назви, синоніми, торгові назви, тривіальні назви та АТС-коди в

одному джерелі, а також структури та дані про їх активність. База містить хімічні та медико-біологічні дані для понад 80000 активних сполук у всьому світі. Кожен запис має хімічну структуру сполуки та класифікуються за активністю, механізмом дії, терапевтичним ефектом (якщо такий є). Окрім цього, оцінюючи молекули, автор може використовувати наукові статті з більш ніж 1200 наукових журналів та збірок наукових праць конференцій, а також фармакопейну інформацію. Ця база даних повністю оновлюється кожен квартал.

Слід також відмітити бібліотеку ZINC, яка містить комерційно доступні сполуки (структури), засновані на віртуальному скринінгу [103]. У даний час база містить близько 90 млн сполук (версії 12-15), які можуть бути використані науковцями. Забезпечуються готові до док-форми та їх D-формати. ZINC доступна в підмножинах для загального скринінгу, а також у промислово орієнтованих напрямках. ZINC є безкоштовною для використання. Ця база даних та обслуговування забезпечується Shoichet Laboratory у Department of Pharmaceutical Chemistry University of California San Francisco [104].

Значний пласт даних містить база GDB-17, що налічує 166,4 млрд. молекул, зокрема віртуальних [105]. При роботі з базою можна використовувати (гліко)пептидні дендримери, інші пептиди, хімічні та фізикохімічні дані, інформацію щодо квантово-хімічних розрахунків, а також дані щодо синтезу малих молекул.

Наведенні програми мають багато переваг у практичній роботі. Серед суттєвих недоліків слід вказати на те, що за відсутності у базі даних структур сполук близьких до досліджуваної програми не можуть надати адекватну відповідь щодо потенційної активності нової сполуки.

У процесі розробки нових лікарських засобів (зокрема анальгетиків) широко використовується інший похід, при якому конструювання нової молекули ведеться з урахуванням впливу потенційного лікарського засобу на мішені – рецептор, фермент тощо. Рациональне проектування лікарського засобу базується на розумінні патологічних і біохімічних аспектів хвороби,

ідентифікації цільового ферменту або рецептору в механізмі дії. Важливі визначення чи прогноз структури цільового ферменту або рецептору, теоретичні дані про взаємодію речовини і рецептора, облік різних міжмолекулярних сил взаємодій. Це особливо важливо в адресації до специфіки різновидів для кожної біологічної системи [106, 107]. При конструюванні нових анальгетиків використовують зокрема мішені, основні з яких наведено у розділі 1.1.

Одним із підходів в рамках використання цього методу є розрахунок взаємодії рецептора та ліганда, які повинні підходити один до одного як ключ до замка (докінгові дослідження) [108]. Суть такого підходу зводиться до звичайних комбінаторних прийомів: можливості вибирати випадкові молекули і поміщати їх у будь-яке незайняте місце на поверхні рецептора, зміщувати фрагменти молекули на поверхні в будь-якому напрямку, випадково міняти атоми і групи молекул на інші, приєднувати випадково взяті з набору фрагменти до вже розміщених на рецепторі, з'єднувати разом розміщені фрагменти молекули теоретично можливими зв'язками [109].

Виділяють два основні методи докінгу: жорсткий докінг (rigid docking) та гнучкий докінг (flexible docking). Метод жорсткого докінгу не враховує конформаційну рухливість як для рецепторів, так і для лігандів. Таким чином, за використання цього методу завдання докінгу зводиться до знаходження оптимальної орієнтації ліганда (в конкретній конформації) у сайті зв'язування рецептора. Оскільки цей метод найбільш простий з обчислювальної точки зору, він сформувався раніше за інші. Але, як правило, дослідження конформаційно рухливих лігандів (наприклад гамма-аміномасляна кислота) цим методом досить обмежене. Фактично жорсткий докінг можна звести до оцінки енергії конкретного комплексу. Гнучкий докінг враховує конформаційну рухливість ліганда, але не враховує конформаційну рухливість молекули рецептора. Переважна більшість сучасних програм докінгу працюють, ґрунтуючись саме на цьому принципі. За своєю суттю гнучкий докінг може бути зведений до автоматичного перебору конформацій і орієнтацій ліганда в аспекті зв'язування

та оцінки енергії взаємодії [85]. Найбільш перспективні, але й найбільш складні для обчислення методи докінгу дозволяють враховувати конформаційну рухливість не тільки ліганда, а й рецептора. На сьогоднішній день існують програмні комплекси, спеціально призначені для докінгу, в яких реалізована така можливість. Найбільш простий варіант реалізації повністю гнучкого докінгу дозволяє враховувати конформаційну рухливість бічних ланцюгів амінокислотних залишків, розташованих безпосередньо в ділянці зв'язування. Конформаційна рухливість основного ланцюга білка та інші процеси, що відбуваються при зв'язуванні ліганду, на сьогодні можуть бути детально досліджені тільки методами молекулярної динаміки [110].

Ідеологічно основні підходи для реалізації наведених задач ґрунтуються, як правило, на таких діях: використання прямих методів стиковки потенційних лігандів з тривимірною моделлю рецептора або застосування непрямих методів, що являють собою отримання тривимірної інформації про структури, що вивчаються, з принципу активності чи неактивності. Існує і третій підхід – комбінація докінг-аналізу з хемоінформаційними методами (використання «просіювання», заснованого на залежностях «структура-активність») [111].

На теперішній час для віртуального скринінгу використовується широкий спектр різноманітних програм Dock, AutoDock, Surflex-Dock, eHiTS, FlexX, GOLD та багато інших [112, 113, 114, 115, 116].

Dock – відома як одна з найбільш популярних і тих, що швидко розвиваються, програм докінгу. Їй притаманна висока швидкість роботи при використанні простих оціночних функцій, а також можливість паралельних обчислень. Це дозволяє проводити ефективний віртуальний скринінг великих бібліотек молекул. Використання більш складних оціночних функцій, що враховують ефекти розчинника і зміну конформації рецептора, дозволяє проводити докладне дослідження зв'язування конкретного ліганду з рецептором [111]. Особливості принципу роботи програми у тому, що потенціали ліганд-рецепторної взаємодії обчислюються у вузлах просторової сітки, що покриває сайт зв'язування. Пошук сайту зв'язування можливий за

геометричними параметрами; при цьому поверхня рецептора апроксимується набором сфер, що стосуються поверхні в двох точках, розташованих назовні від поверхні. У першій версії програми поверхня ліганда представлялася набором аналогічних сфер, розташованих всередині поверхні. Ключове наближення: атоми ліганда можуть розташовуватися тільки в центрах сфер. У поточній версії програми автоматично відбувається поділ молекули ліганда на «якірний фрагмент», для якого ведеться пошук оптимальної орієнтації, і зовнішні замісники, для яких ведеться дослідження всіх можливих конформацій [117].

Програму AutoDock використовують для дослідження поверхні рецептора з метою виявлення потенційного сайту зв'язування (якщо він невідомий). AutoDock призначений для вивчення зв'язування з рецептором відомої 3D-структури певних структур, таких як малі молекули, субстрати або кандидати в препарати. На теперішній час AutoDock складається з двох поколінь програмного забезпечення: AutoDock 4 і AutoDock Vina. AutoDock 4 фактично складається з двох основних програм: AutoDock, що виконує стиковку ліганда з набором сіток, які описують цільової білок, та Autogrid, що попередньо обчислює ці сітки. На додаток до використання стиковки, атомні сітки «спорідненості» можуть бути візуалізовані. Це може допомогти оптимізувати синтез нової молекули. AutoDock Vina не вимагає вибору типу атомів і карти сітки, яку треба попередньо обчислювати. Замість цього він обчислює сітки всередині для досліджуваних атомів структури, і робить це практично миттєво. AutoDock має графічний інтерфейс під назвою AutoDockTools, що між іншим допомагає створити конфігурації, які розглядатимуться за різних положень ліганда відносно рецептора, і допомагає проаналізувати стиковку [113, 118].

Програма Surflex-Dock™ проводить прогноз на основі даних про структуру сайту зв'язування рецептора з прото-молекулою (protomol), що складається з фрагментів CO, CH<sub>4</sub> і NH, на яку накладається структура ліганду. При прогнозі молекула фрагментується таким чином, щоб мінімізувати число конформацій. Оцінка енергії зв'язування проводиться за допомогою емпіричної оцінної функції. Алгоритм програми відрізняється високою



швидкістю роботи. Ця програма може застосовуватися як для дослідження механізму взаємодії ліганда з рецептором, так і для віртуального скринінгу. Слід також зазначити, що функція оцінки програми є похідною від відомих даних спорідненості та зв'язування з рецептором, а також негативних даних. Причому в цьому аспекті програма «навчається», використовуючи як помилкові, так і позитивні результати [114, 119].

GOLD-(CCDC) [115] є програмою для докінг-аналізу взаємодії малих молекул з лігандами протеїнів. Вона розроблена спільно Шеффілдським університетом, GlaxoSmithKline plc і CCDC. Програма включає в себе Генетичний алгоритм для установки ліганду протеїну в док, враховує гнучкість ліганда (повну або часткову), а також гнучкість протеїну. Програма містить статистичну програму ChemScore or Astex Statistical Potential, що дозволяє більш точно робити прогноз. Програма враховує віртуальні механізми дії досліджуваної речовини та обробляє отримані результати, автоматично розглядаючи мішені зв'язування водорозчинних молекул. В програмі удосконалено управління та контроль геометрій металевої координації. Аналіз даних проводиться за допомогою програми RMSD [115, 120].

FlexX (BioSolveIT GmbH) [116] прогнозує можливість утворення протеїн-лігандного комплексу. Головна її відмінність від інших подібних програм полягає в тому, що вона має два застосунки: комплексний прогноз (створення ряду різних варіантів комплексів протеїн-ліганд) і віртуальний скринінг (відбір речовин для випробування в експерименті). При цьому враховується конформаційна гнучкість ліганда, жорсткість протеїну. Алгоритм ґрунтується на енергетичних взаємодіях між молекулами, однак обмежений структурами з низьким рівнем енергії. У програмі використовується база даних просторового розташування молекул MIMUMBA, яка дозволяє робити більш точний опис міжмолекулярних взаємодій [116, 121].

Незважаючи на перспективність використання, методи докінгу мають суттєві недоліки, серед яких слід виділити той факт, що недостатньо відома будова значної кількості рецепторів (зокрема тих, що розглядаються як мішені

для лікування болю). Тому прогноз активності не завжди підтверджується фармакологічною верифікацією.

Наведені методи в цілому мають суттєві недоліки, серед яких обмежена доступність для академічних досліджень, висока вартість та собівартість, значні витрати на синтез тисяч сполук. Не завжди можлива розробка автоматизованих методик, а також низька вірогідність виявлення активних молекул у «сліпому» варіанті методу (без попередньої підготовки виборки). Попри суттєві недоліки, використання методів прогнозу фармакологічної активності є перспективним, оскільки надає прогностичну надійність отриманих результатів. Це ґрунтується на можливості отримання даних щодо взаємозв'язку «структура-активність» при правильній побудові бібліотек, використанні комбінованих методів тощо.

#### **1.4 Похідні тріазолу та тіадіазину як потенційні знеболювальні та протизапальні засобів**

Пошук нових знеболювальних засобів ведеться серед різних класів хімічних сполук. Останнім часом зросла зацікавленість гетероциклічними сполуками та їх аналогами, здебільшого через широкий спектр їх корисних біологічних та фармакологічних властивостей. Зокрема, різноманітні класи гетероциклічних систем полягають в основі багатьох відомих ліків та сполук, що перебувають на заключних етапах доклінічних випробувань [122, 123, 124, 125, 126].

Особливий інтерес у цьому контексті представляє вивчення гетероциклічних сполук на основі азольного ядра, яке має значний синтетичний та фармакологічний потенціал [127, 128, 129, 130, 131]. Унікальність цих гетероциклічних систем полягає в легкій функціоналізації з можливістю отримання різноманітних конденсованих [132, 133, 134, 135, 136, 137, 138] та неконденсованих похідних [139, 140, 141, 142, 143, 144]. Крім того, використання сучасних підходів для вивчення цього класу гетероциклів, таких як спрямований синтез [145, 146, 147] та орієнтований на різноманіття синтез

(diversity oriented synthesis) [148, 149, 150, 151], відкриває можливості отримання комбінаторних бібліотек для ефективного пошуку нових ліків чи потенційних кандидатів на ліки.

Ядро тріазолу присутнє в різних сполуках, яким притаманна виразна антимікробна [152, 153, 154], протигрибкова [153, 154], противірусна [155], проти-ВІЛ-1 [156], антимікобактеріальна [152, 155], антигістамінна [157], протисудомна [158, 159, 160, 161], протипухлинна [154, 156], інсектицидна [162], анксиолітична [163], анальгетична [164] дія. З іншого боку, похідні тіадіазолу як споріднені до тріазолів гетероцикли актуальні у пошуках засобів із протигрибковою [165], антимікробною [166, 167], протипухлинною [168], протиконвульсивною [169], противірусною [167], антибактеріальною [166] активністю.

Тріазоли та тіадіазоли віддзеркалюють широкий спектр біологічної активності та входять до складу різних лікарських засобів. Наприклад, тразодон (антидепресант), різатриптан (анальгетик для лікування болю голови, зокрема мігрені), гексаконазол (протигрибковий засіб) та альпразолам (седативний засіб і транквілізатор). Крім того, відомі структурні похідні тріазолів чи тіадіазинів, що виявилися більше ефективними та менш токсичними [170]. Незважаючи на це, кількість препаратів на основі тріазолів та тіадіазолів, що використовуються в клінічній практиці як анальгетики, залишається досить обмеженою. До таких препаратів належить, зокрема, різатриптан, який продемонстрував ефективність у лікуванні болю голови різного генезу [171, 172, 173, 174, 175, 176].

Важливо відзначити, що похідні тріазолів та тіадіазолів є перспективними в пошуку протизапальних препаратів через їх фармакологічний потенціал та хімічну новизну для сучасної медичної хімії та фармакології. Зокрема, потенційні НПЗЗ серед похідних тріазоло-тіадіазолу викликають інтерес у багатьох наукових груп [170]. Так, N-[5-(4-аміно-5-меркапто-4H-[1,2,4]тріазол-3-іл)-4-метил-1,3-тіазол-2-іл]ацетамідні похідні виявили антиексудативну активність на рівні з референтним препаратом диклофенаком і вище. Крім того, похідні [1,2,4]тріазоло[3,4-*b*]/[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину **1** (рис. 1.1), отримані

шляхом реакції конденсації хлорооцтової кислоти та  $\alpha$ -галокетонів, також виявили достовірну антибактеріальну дію [164]. Деякі похідні [2,1-*b*]фуран-2-іл-5*H*-арил-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазол-6(5*H*)-тіону **2** (рис. 1.1) та [2,1-*b*]фуран-2-іл-5,6-діарил-5,6-дигідро[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазолу **3** (рис. 1.1) виявили суттєву анальгетичну активність на рівні з ацетилсаліциловою кислотою після одноразового внутрішньошлункового (в/ш) введення в нелінійних мишей у дозі 100 мг/кг на моделі вісцерального болю (оцтовокислі "корчі") [177].

Автори [178] спостерігали помірну антиексудативну та значну антиноціцептивну активність 3- $\beta$ -[(*N*-бензолсульфоніл/тосил)-4-феніламіно]етил-4-аміно-5-меркапто-4(*H*)-1,2,4-тріазолів **4** (рис. 1.1). Усі досліджувані похідні також виявили значний антиексудативний ефект на моделі карагенінового набряку у щурів на рівні ацетилсаліцилової кислоти, а також на моделі ватної гранульоми. Окрім того, ці сполуки не викликали ульцерогенної дії в експериментальних тварин. Більш суттєва активність цих похідних була продемонстрована на моделі термічної ноціцептивної стимуляції tail flick з інгібуванням на рівні 81,02-120,72% порівняно з аспірином (інгібування на рівні 49,39%). Автори пов'язують анальгетичний ефект цих сполук з наявністю біологічно активного сульфонамідного фрагменту в структурі.

Синтезовані 5-карбометокси-2-заміщені-7*H*-1,2,4-тріазоло[3,2-*b*]-1,3-тіазин-7-они **5** виявили виразну протизапальну активність при оральному введенні в низьких дозах (10 і 20 мг/кг) на моделях карагенінового та серотонінового набряків, що зіставлялася чи переважала таку диклофенака натрію. Слід зазначити, що протиексудативна активність корелювала з анальгетичним ефектом в моделі оцтовокислих "корчів". Окрім цього, ці біологічні ефекти не супроводжувалися ушкодженням слизової оболонки шлунка [179].

Виявлено виразний антиноціцептивний ефект нових похідних 3-(4-метилфеніл)-4-[3-(феноксиметил)-7*H*-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*][3,4-

b][1,3,4]тіадіазин-6-іл]-1,2,3-оксадіазол-5-олату **6** (рис. 1.1), який переважає ефект парацетамолу, що пов'язують з 4-метилфеніловим фрагментом [180].

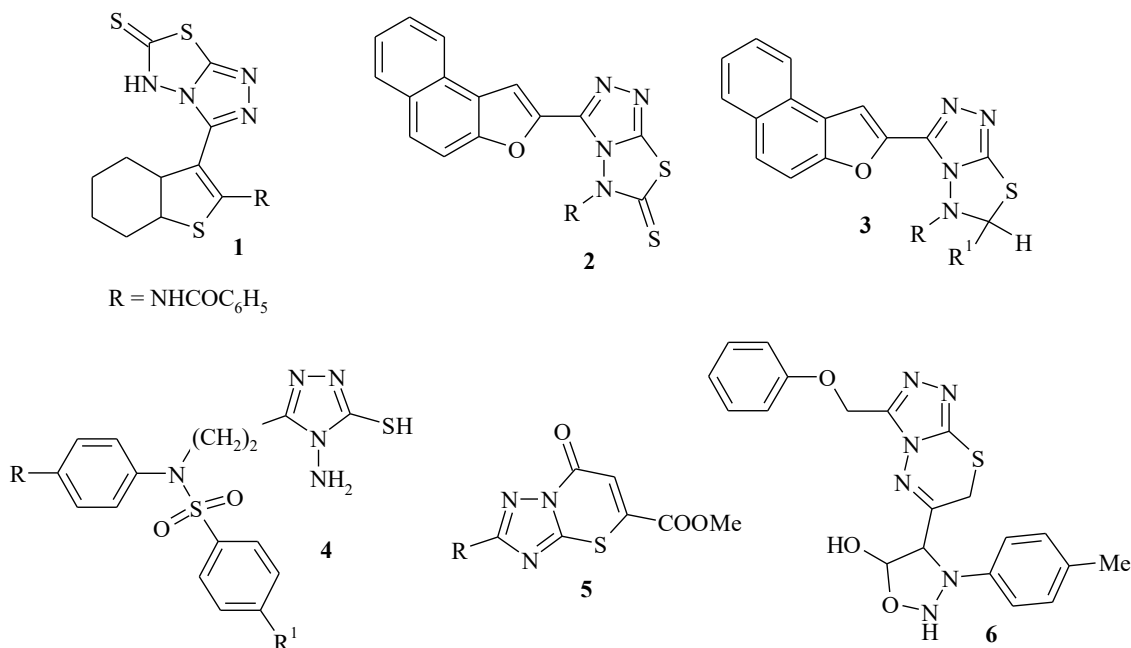


Рисунок 1.1 Похідні тріазолу **1-6** як потенційні анальгетики

Близьку протизапальну активність за в/ш застосування в еквімолярних до індометацину дозах виявили конденсовані 1,2,4-тріазоли з 2,4-дихлорофеноксиметильним фрагментом **7** (рис. 1.2), отриманні з використанням 3-((2,4-дихлорфенокси)метил)-4-аміно-4*H*-1,2,4-тріазол-5-тіолу [181]. Ці сполуки виявили дозозалежний протизапальний ефект на моделях карагенінового та гістамінового набряків. Конденсовані похідні, які мають 2,4-дихлорфенокси групу у 6 положенні, виявляють вищу активність порівняно з індометацином, пригнічуючи на 36-56% ексудативне запалення у щурів.

Нові похідні 3-(*N*-заміщеного карбоксамідетилтіо)-4*H*-1,2,4-тріазолу **8** (рис. 1.2) при в/о введенні щурам в дозі 40 мг/кг виявляли достовірний антиексудативний ефект на моделі формалінового набряку у динаміці (25,92-44,44%), переважаючи протизапальну дію диклофенаку натрію (23,14%). Антиексудативний ефект цих сполук залежить від наявності хлоро-, нітро-, метилових- чи метоксигруп у фенільному кільці.

Також декілька з наведених структур виявляють і антиноцицептивний

ефект у тесті «гарячої пластини» (до 303,4%), що переважає ефект трамадолу (169,4%). Цікавим є і той факт, що найбільш активні сполуки цього ряду не виявляють анксіолітичну активність [182].

Автори [183] вивчали нові похідні 1,3,4-тіадіазолу і 1,2,4-тріазолу, що містять фенілаланіновий фрагмент **9** (рис. 1.2). Досліджувані сполуки мали низьку токсичність (ЛД<sub>50</sub> складала 1025-5010 мг/кг за в/ш введення). При введенні в дозах 1/10 ЛД<sub>50</sub> та 1/5 ЛД<sub>50</sub> на моделі ністатинового набряку сполуки, як правило, переважали за активністю ацетилсаліцилову кислоту та фенілбутазон у відповідних дозах, але поступались за активністю індометацину.

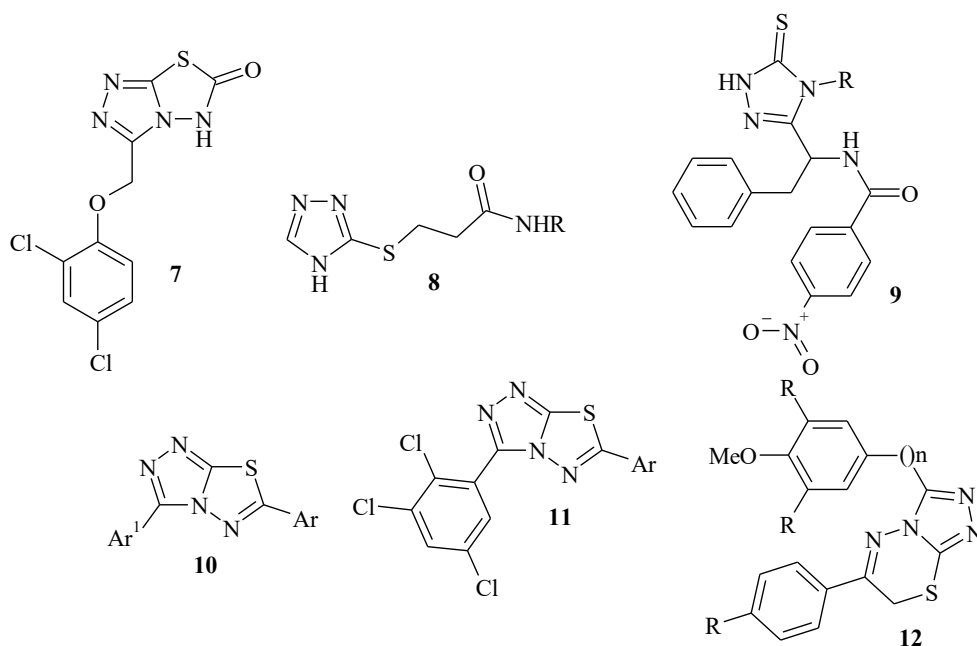


Рисунок 1.2 Структури похідних тріазолу та тіадіазолу **7-12**.

Перспективними як потенційні протизапальні і анальгезуючі засоби виявились тріазоловмісні тетрациклічні тієнопірімідини. При пероральному застосуванні у дозах 10 мг/кг зазначені похідні переважають чи не поступаються за анальгетичною та антиексудативною активністю диклофенаку натрію на моделях карагенінового набряку (інгібування набряку від –31,2% до –56,1%) та оцтовокислих «корчів» (ступінь пригнічення «корчів» від 45,3% до

71,7%) у мишей. Важливим є і той факт, що у досліджуваних сполук була відсутня ульцерогенна дія [184].

Автори [185] синтезували серію конденсованих гетероциклів, а саме похідні 3-[2-(N-метиламіно)феніл]-6-[2-(2,4-дихлорофенокси)етил]-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазолу **10** (рис. 1.2). Для оцінки їх біологічного профілю усі синтезовані сполуки були перевірені на наявність протизапальної активності з використанням експериментального запалення, індукованого введенням у задню лапу щурів розчину карагеніну. Однак всі протестовані сполуки виявили слабку чи помірну антиексудативну активність, поступаючись референтному препарату (диклофенак натрію). При оцінці їх анальгетичної активності на моделі «гарячої пластинки» була виявлена найбільш активна сполука 3-[4-(N,N-диметиламіно)феніл]-6-[2-(2,4-дихлорофенокси)етил]-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазол, яку було відібрано для подальшого поглибленого вивчення.

В іншому дослідженні [186] та ж наукова група дослідила тріазолотіадіазоли, що містять у своїй структурі індольне кільце. Досліджені похідні виявили значну анальгетичну та протизапальну активність, особливо 3-(2-хлоро-5-метоксифеніл)-6-((5-метоксі-1*H*-індол-3-іл)метил)-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазол. Аналіз кореляції «структура-активність» показав, що введення електронодонорних груп (метильна або метоксильна групи) у положення 5 індольного кільця знижує протизапальну та анальгетичну активність.

Показано, що наявність трихлорофенільного фрагменту в тріазолотіадіазольному та тріазолотіадіазиновому ядрі забезпечує значну протизапальну активність сполук, які досліджувались на моделі гострого запалення [187]. Сполука А-561 (6-(4-метоксифеніл)-3-(2,3,5-трихлорофеніл)-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазол) **11** (рис. 1.2) показала найвищий рівень біологічної активності, переважаючи ефект диклофенаку натрію як еталонного препарату. Цікаво відзначити, що відсутність метоксифенільного фрагменту в структурі суттєво знижувало антиексудативну активність.

Автори [188] повідомили про синтез кількох похідних тріазолу **12** (рис. 1.2) та скринінг їх протизапальної та анальгетичної активності. Серед конденсованих похідних сполуки з 3,4,5-триметоксифенільною та 4-флуорофенільною групами у положенні 6 базового гетероциклу виявили найвищу дозозалежну протизапальну активність. Так, серед синтезованих похідних 3-[2-(3,4,5-триметоксифеніл)етил]-6-(4-хлорофеніл)-7*H*-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазин в експерименті продемонстрував найвищу анальгетичну активність, яка була близькою до дії кеторолаку. На думку авторів, саме наявність метоксигрупи робить найбільший внесок у рівень знеболювальної активності.

Синтезовані нові похідні 3,6-дизаміщених-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазолів оцінювали як потенційні протизапальні засоби на моделях карагенінового та формалінового набряків. Досліджені похідні у більшості випадків виявили виразний антиексудативний ефект. Зокрема, 3-(феноксиметил)-6-(3-оксо-3-фенілпропіл)-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазол переважав за протизапальною активністю референтний препарат індометацин. Аналіз результатів показав, що заміна 3-оксо-3-фенілпропільної групи у С-6 положенні іншими молекулярними фрагментами призводило до зниження протизапальної дії. Аналізуючи залежність «структура-активність» в інших рядах протизапальних засобів, автори прийшли до висновку, що похідні тріазолотіадіазолів виявляють більшу антиексудативну активність у порівнянні з похідними феноксіоцтової та саліцилової кислот [189]. При вивченні анальгетичної активності на моделі оцтовокислих «корчів» було показало, що сполуки, які містять 3-оксо-3-фенілпропільну групу в С-3 положенні тріазолотіадіазольного кільця, виявили більш високу знеболювальну активність, у порівнянні з еталонним препаратом (ацетилсаліцилова кислота).

Автори [190] повідомили про скринінг протизапальної активності серії похідних тріазолів та тіадіазолів **13** (рис 1.3), що містять піридиновий фрагмент, в умовах *in vitro* та *in vivo* (модель карагенінового набряку). Досліди *in vivo* проводилися на білих щурах з використанням індометацину як



еталонного препарату. 3,6-Ди(піридин-4-іл)-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазол, що містить піридиновий фрагмент як у 3, так і в 6 положенні базового гетероциклу, виявив максимальну протизапальну активність.

Синтезовані та вивчені авторами [191] нові похідні 3,6-дизаміщених-1,2,4-тріазолотіадіазолів, що містять у своїй структурі фрагмент піразолу, виявляли суттєву протизапальну активність. Експериментальні дані показали, що похідні 3-пропіл-6-(3-(4-хлорофеніл)-1*H*-піразол-4-іл)[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазолу **14** (рис 1.3) значно інгібують ексудативне запалення на моделі карагенінового та серотонінового набряків у порівнянні з диклофенаком натрію.

Автори [192] повідомили про декілька похідних тріазолотіадіазолів **15** (рис 1.3), які виявили значну анальгетичну активність у мишей на моделі вісцерального болю, викликаного в/о введенням оцтової кислоти. Результати засвідчили, що найбільшу анальгетичну активність виявив 5-метокси-2-(3-((5,6,7,8-тетрагідро-нафталін-2-ілокси)метил)-7*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадізін-6-іл)фенол, який переважав за антиноцицептивним ефектом ацетилсаліцилову кислоту як еталон. На думку авторів, наявність гідроксильних і метоксигруп у фенільному кільці у положенні 6 може обумовлювати анальгетичну активність.

Цікаві дані наведено авторами [193], що повідомляють про вивчення численних похідних тріазолу та тіадіазолу **16** (рис. 1.3) на предмет наявності анальгетичної активності на моделі «гаряча пластина». Результати скринінгу показали, що найбільш активними були сполуки 6-(3-хлор-4-фторофеніл)-3-(2,4-дихлоро-5-флуорофеніл)-1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазол та 3-(2,4-дихлоро-5-флуорофеніл)-6-[(4-флуорофенокси)метил]1,2,4-тріазоло[3,4-*b*]-1,3,4-тіадіазол. Анальгетична активність досліджуваних похідних ряду залежала від наявності галогенів (як хлору, так і флуору) в арильних замісниках в 3 і 6 положенні базового гетероциклу.

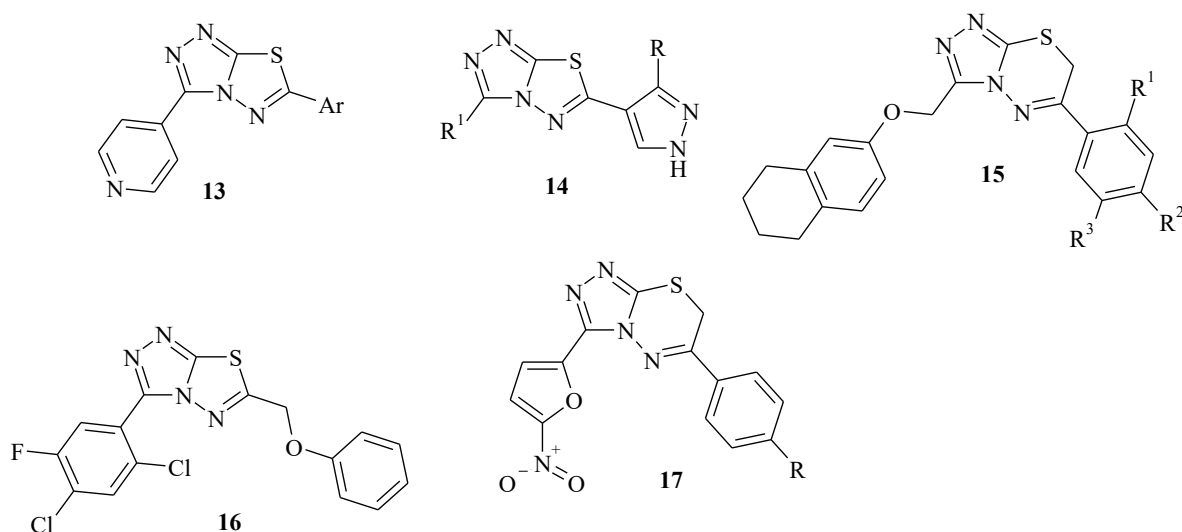


Рисунок 1.3 Структури коненсованих похідних тріазолу **13-17**.

Результати дослідження нових похідних тріазолотіадіазолу і тріазолотіадіазинів **17** (рис. 3.1), що вміщують 3-нітронафто[2,1-*b*]фурановий фрагмент, показали суттєвий антиноцицептивний ефект [64]. Активність синтезованих похідних була співмірною з препаратом порівняння трамадолом. Крім того, похідні тріазолотіадіазолу та тріазолотіадіазину мають інші види біологічної активності, а саме протиракову [194, 195, 196], протилейшманіальну [197] та протимікробну [198, 199, 200, 201, 202] діями.

Також необхідно зауважити, що дослідження методом молекулярного докінгу щодо біомішеней ЦОГ-2 [203, 204, 205], 15-ліпоксигенази 1 (15-ЛОГ) [206], p38 мітоген-активованої протеїнкінази [207, 208] і TNF- $\alpha$  [209] для похідних тріазолу та тіадіазолу корелює з експериментальними даними, що підтверджує та обґрунтовує виразний анагетичний та протизапальний потенціал цих сполук.

### 1.5 Нестероїдні протизапальні засоби як потенційні фригопротектори

Лікування холодової травми донині залишається складним завданням. Саме тому пошук засобів з фригопротекторною дією набуває розвитку. Фригопротекторні засоби – це збірна група препаратів, що чинять комплексний

захисний вплив за низьких температур довкілля. За холодової травми, коли тепловіддача перевищує теплопродукцію, виникає гіпотермія: організм не здатний виробляти достатньо тепла, необхідного для підтримання гомеостазу. Прогноз залежить від тяжкості гіпотермії, а якщо температура тіла занадто низька, розвиваються глибокі порушення нервової, серцево-судинної та дихальної систем, що може спричинити смерть [210].

Відносна стабільність температури тіла гомойотермних організмів, до яких належать людина, ссавці та птахи, забезпечується низкою фізіологічних механізмів. За гострого загального охолодження втраті тепла протидіє звуження периферичних судин та централізація кровообігу [211], термогенез за рахунок скорочення скелетних м'язів [212], посилення теплопродукції внаслідок активації основних метаболічних процесів [213].

Значну роль у патогенезі холодової травми відіграє запалення [214]. Згідно з сучасними уявленнями, основними біомішенями для терапії запалення та пов'язаного з ним болю є ферменти синтезу та біотрансформації арахідонової кислоти – PG та лейкотрієнів [215, 216]. Відома, зокрема, роль  $\text{PGF}_{2\alpha}$  і тромбоксану  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), що відповідають за розвиток запальної реакції та ішемії тканин внаслідок посилення агрегації тромбоцитів та вазоконстрикції [217, 218].  $\text{PGI}_2$  сприяє збільшенню тепловіддачі завдяки розширенню периферичних судин [219]. Порушення балансу між окремими ейкозаноїдами впливає на динаміку температури тіла в умовах холодової травми. Певною мірою це пояснюється впливом гіпотермії на утворення ендотеліну,  $\text{PGI}_2$  та  $\text{TXA}_2$ . Зазначені біологічно активні речовини беруть участь у регуляції місцевого кровообігу, а дисбаланс між ними сприяє вазоконстрикції та тромбоутворенню, що порушує кровообіг та викликає ішемічне ураження [220]. В умовах достатньої кількості метаболічної енергії виникає гіперпіретичний ефект  $\text{PGE}_2$ , однак при виснаженні енергетичних ресурсів за охолодження можуть посилюватися гіпотермічні реакції, опосередковані  $\text{PGD}_2$  [221]. Наприклад, у відповідь на введення певних пірогенів у щурів знижувалася

ректальна температура, що пов'язують з індукцією синтезу  $\text{PGD}_2$  в мозку, насамперед у преоптичній області.

З огляду на участь каскаду арахідонової кислоти у патогенезі холодових уражень перспективним напрямком фригопротекції є його пригнічення, зокрема НПЗЗ [222]. Цей підхід довів свою дієвість. Ще в ранніх дослідженнях показано, що індометацин та інші інгібітори ЦОГ блокують продукцію  $\text{PGD}_2$  та запобігають розвитку гіпотермічної реакції за профілактичного введення [223]. Застосування ацетилсаліцилової кислоти та ібупрофену за холодових уражень кінцівок покращує прогноз лікування [224].

В експерименті на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії у мишей досліджено порівняльну ефективність 11 інгібіторів каскаду арахідонової кислоти різного механізму та селективності. Доведено фригопротекторні властивості ацетилсаліцилової кислоти, диклофенаку натрію, ібупрофену, мефенамінової кислоти, мелоксикаму, целекоксибу, еторикоксибу, дарбуфелону мезилату та інгібіторів каскаду арахідонової кислоти іншого механізму дії, таких як блокатор лейкотрієнових рецепторів монтелукаст [225, 226, 227]. Ці дослідження свідчать, що виразність фригопротекторного ефекту НПЗЗ не залежить від селективності інгібування ЦОГ: найефективніше протидіють впливу низьких температур неселективний інгібітор ЦОГ диклофенак натрію та високоселективний інгібітор ЦОГ-2 еторикоксиб, під впливом яких тривалість життя мишей на моделі гострого загального охолодження зростає в середньому на 30-55%. Проте анальгетик-антипіретик парацетамол не чинить захисного впливу на зазначеній моделі гострої холодової травми [225, 226]. Отже, наявність протизапальних властивостей, як і здатність інгібувати каскад арахідонової кислоти, не гарантує потужного фригопротекторного ефекту.

У дослідях на щурах диклофенак натрію забезпечує максимальний фригопротекторний ефект за інтегральним показником – антигіпотермічною дією [228, 229]. Поглиблені дослідження конкретизували вплив найпотужніших фригопротекторних НПЗЗ (диклофенаку натрію та

еторикоксибу) на стан ЦНС [228], перебіг стрес-реакції, стан видільної та серцево-судинної систем [229], системи гемостазу [230].

Заслуговує на докладний розгляд вплив найефективніших фригопротекторних НПЗЗ на стан каскаду арахідонової кислоти та енергетичного обміну за гострої холодової травми, що дозволяє оцінити тонкі механізми їхньої дії.

В експерименті на щурах, що протягом 2 годин перебували при температурі повітря  $-18^{\circ}\text{C}$ , з'ясовано вплив зазначених засобів на стан каскаду арахідонової кислоти [216]. У печінці нелікованих щурів (група контрольної патології) помірно зростає вміст ЦОГ-1 і дуже виразно ЦОГ-2, зменшується рівень  $\text{PGE}_2$  та збільшується вміст PG інших класів:  $\text{PGF}_{2\alpha}$  та особливо  $\text{PGI}_2$  і  $\text{TXB}_2$ . У сироватці крові рівень ЦОГ-1, навпаки, зменшується, а зміни ЦОГ-2 і PG подібні таким у печінці. За виразністю фригопротекторного ефекту диклофенак натрію дещо переважає еторикоксиб. Проте диклофенак натрію помірно впливає на рівень обох ізоформ ЦОГ у печінці щурів у бік нормалізації, помірно збільшує вміст  $\text{PGE}_2$  і зменшує  $\text{PGF}_{2\alpha}$  та  $\text{TXB}_2$  без впливу на підвищений рівень  $\text{PGI}_2$ . У сироватці крові диклофенак натрію сприяє зменшенню вмісту ЦОГ-1 до субнормального рівня, а вплив на інші біомаркери подібний до такого в печінці, окрім помірного зменшення  $\text{PGI}_2$ . За впливом на циклооксигеназний шлях арахідонового каскаду диклофенак натрію поступається еторикоксибу, який у печінці нормалізує ЦОГ-1, ЦОГ-2,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ , вміст  $\text{PGF}_{2\alpha}$  та  $\text{TXB}_2$  виразно знижує до субнормальних значень, а в сироватці крові зменшує до субнормальних значень ЦОГ-1, ЦОГ-2 і  $\text{PGE}_2$ , нормалізує  $\text{PGF}_{2\alpha}$  і  $\text{PGI}_2$ , а також виразно знижує вміст  $\text{TXB}_2$ . Еторикоксиб на моделі холодової травми зменшує рівень як ЦОГ-1, так і ЦОГ-2. Вміст 8-ізопростану в печінці щурів групи контрольної патології після холодової експозиції значно збільшується. Диклофенак натрію помірно зменшує, а еторикоксиб повністю нормалізує цей біомаркер оксидативного стресу. Протилежна виразність впливу диклофенаку та еторикоксибу на циклооксигеназний шлях і на температуру тіла вказує на дисоціацію

протизапального та фригопротекторного ефектів. Пригнічення оксидативного стресу не є вирішальним для фригопротекторної активості НПЗЗ, оскільки слабший вплив диклофенаку на вміст 8-ізопростану не заважає максимальній антигіпотермічній дії [216].

І диклофенак натрію, і еторикоксиб запобігають порушенням енергетичного обміну, спричиненим впливом холоду: зменшують концентрацію молочної кислоти та співвідношення лактат/піруват, збільшують вміст пірувату та аденозинтрифосфату в печінці тварин. Проте еторикоксиб нормалізує вміст інтермедіатів енергетичного обміну до показників інтактних тварин, а диклофенак натрію поступається селективному інгібітору ЦОГ-2, хоча за профілактичного введення перед гострим загальним охолодженням ефективно запобігає гіпотермії в щурів, перевершуючи еторикоксиб [215]. Ця дисоціація підтверджує, що біохімічні механізми протизапальної та фригопротекторної дії мають спільні риси, але не співпадають.

Таким чином, огляд даних літератури свідчить, що протизапальна та фригопротекторна дія НПЗЗ дисоціюють. Про це яскраво свідчить і той факт, що в умовах гострого загального повітряного охолодження в мишей диклофенак натрію зменшує ступінь гіпотермії, але майже втрачає протизапальну (антиексудативну) дію на моделі карагенінового набряку [222]. До того ж виразність запальної реакції при гіпотермії незалежно від її причини (перебування тварин при низькій температурі довкілля або введення хлорпромазину) зменшується, що показано на моделі карагенінового набряку лапи в щурів [231] і мишей [222].

Розглянуті дисоціації виразності фригопротекторного ефекту та стану каскаду арахідонової кислоти та енергетичного обміну свідчать на користь залежності захисного впливу НПЗЗ за холодової травми від багатьох механізмів. Можна вважати, що в них бере значну участь вплив на судинні реакції, що не обов'язково залежать від ЦОГ-залежних механізмів. Про це говорять, зокрема, результати досліджень [232, 233, 234]. Зазначені

дослідження переконливо доводять, зокрема, роль впливу статевих гормонів на холодову чутливість.

З огляду на вищевикладені особливості впливу НПЗЗ на перебіг гострої холодової травми пошук фригопротекторів з-поміж сполук, що містять тріазоловий і/або тіадіазольний фрагмент, є перспективним. Це обумовлено їх протизапальною та нейропротекторною активністю, хімічною варіативністю, можливістю взаємодії з клітинними структурами, а також низькою токсичністю, що є критичним у стані гіпотермії.

## Висновки до розділу 1

1. Проаналізувавши дані джерел літератури, можна зробити висновки, що сучасна медицина потребує впровадження у клінічну практику нових знеболювальних засобів, які переважають існуючі за ефективністю та/чи безпекою, оскільки відомі анальгетики повною мірою не задовольняють вимог практичної медицини. Це пов'язано як із складністю терапії больових синдромів, зокрема хронічних, так і з особливістю застосування окремих груп лікарських засобів (наркотичні анальгетики, парентеральні форми знеболювальних засобів тощо).

2. Пошук нових анальгетиків ведеться серед різних рядів хімічних сполук. У цьому аспекті цікаві сполуки, що містять тріазоловий та/чи тіадіазольний фрагменти, оскільки відомо, що зазначеним похідним притаманний значний антиноцицептивний та антиексудативний ефект, який часто супроводжується низькою токсичністю та відсутністю ульцерогенної дії. Тому зазначені похідні представляють суттєвий інтерес для створення знеболювальних та протизапальних лікарських засобів.

3. Враховуючи наведені дані наукової літератури, як пріоритетний напрямок нашої роботи обрано вивчення анальгетичної, протизапальної та фригопротекторної активності нових похідних 5,7-діацил-3*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, дослідження окремих аспектів їх

токсичності і фармакодинаміки з метою пошуку найбільш активної сполуки як потенційного анальгетика, що має протизапальну та фригопротекторну дію, перспективного для створення на його основі нового лікарського засобу.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [235].

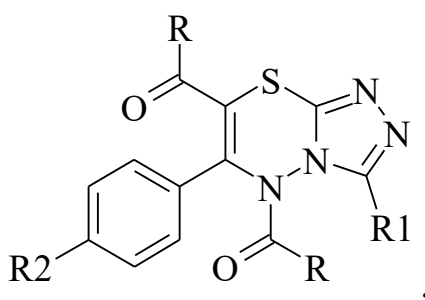


## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Характеристика тест-зразків, препаратів та реактивів

Як об'єкти дослідження обрано 23 нові біологічно активні сполуки, похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину (рис. 2.1).



де R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, н-С<sub>3</sub>H<sub>7</sub>. R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, цикло-С<sub>6</sub>H<sub>11</sub>,  
R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, цикло-С<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCHF<sub>2</sub>, Cl, Br,  
за умови, коли R=R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> не є H.

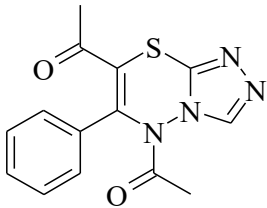
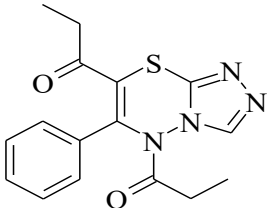
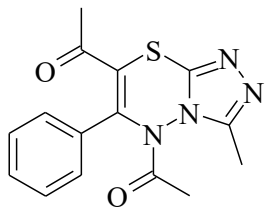
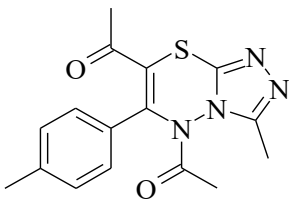
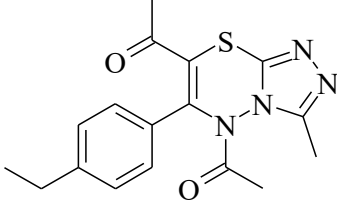
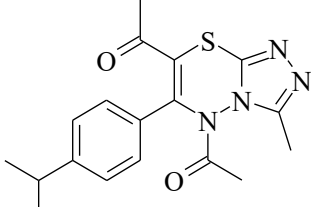
Рисунок 2.1 Загальна формула досліджуваних похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

Ці сполуки синтезовано у відділі синтезу фізіологічно-активних речовин Державної Установи «Інститут фармакології та токсикології Національної Академії Медичних Наук України» (м. Київ) під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора Анатолія Михайловича Демченка.

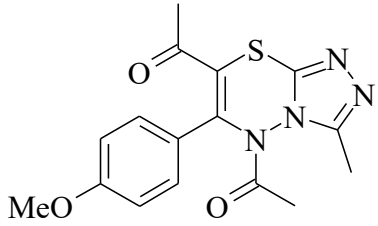
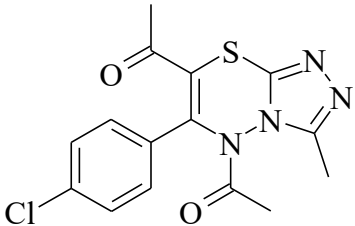
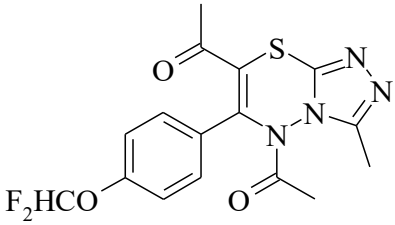
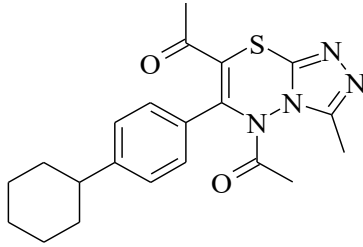
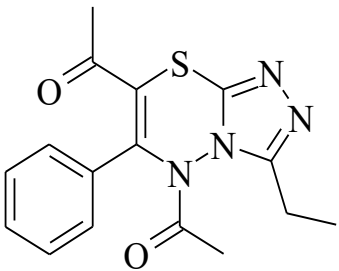
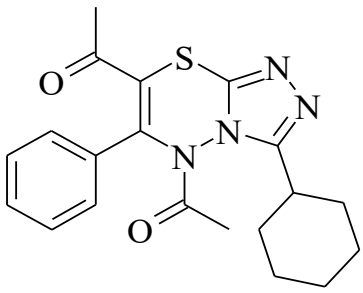
Хімічну будова 23 сполук, які взято у фармакологічне дослідження, наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

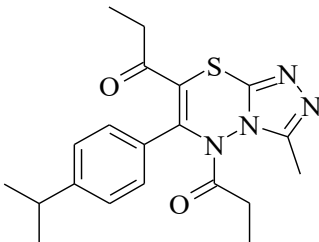
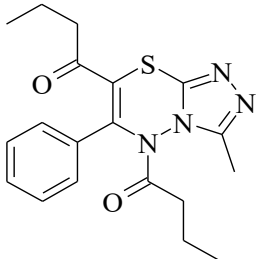
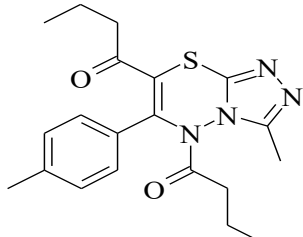
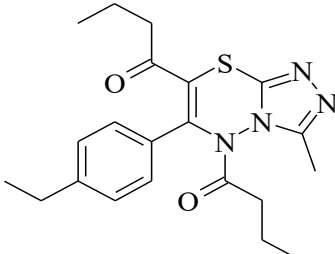
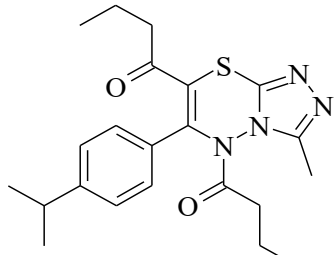
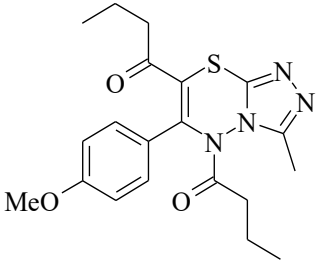
Хімічна будова сполук – нових похідних похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

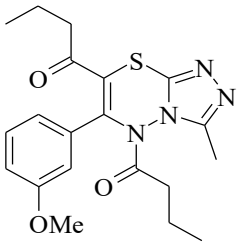
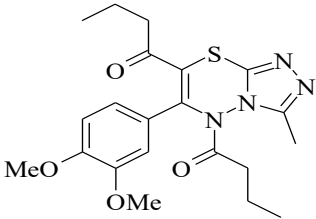
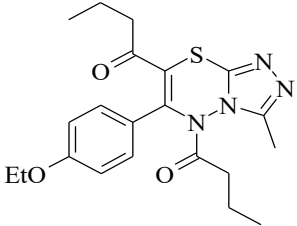
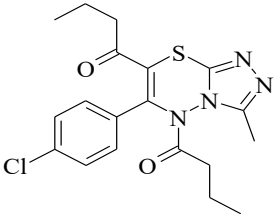
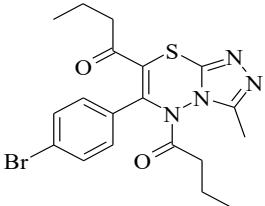
Шифр сполуки	Формула сполуку	Хімічна назва
2	3	4
IFT_372		5,7-Диацетил-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_373		5,7-Дипропіоніл-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_247		5,7-Диацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_371		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -толіл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_249		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -етилфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_248		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -ізопропілфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин

продовження таблиці 2.1

2	3	4
IFT_251		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -метоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_370		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -хлорфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_253		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -дифторметоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_252		5,7-Диацетил-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -циклогексилфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_375		5,7-Диацетил-3-етил-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_376		5,7-Диацетил-3-циклогексил-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин

продовження таблиці 2.1

2	3	4
IFT_250		5,7-Дипропіоніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -ізопропілфеніл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_257		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_260		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -толіл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_255		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -етилфеніл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_180		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -ізопропілфеніл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4] тіадіазин
IFT_258		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -метоксифеніл)-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин

2	3	4
IFT_263		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(3 <sup>1</sup> -метоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_256		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(3 <sup>1</sup> , 4 <sup>1</sup> -диметоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_262		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -етоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_261		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -хлорфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин
IFT_259		5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4 <sup>1</sup> -бромфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин

Допоміжні речовини та референс-препарати, що використовували в дослідженнях, наведено в табл.2.2.

Препарати вводили в діапазоні терапевтичних доз, що рекомендуються для експериментальних досліджень згідно з вимогами Державного експертного центру МОЗ України з доклінічного вивчення лікарських засобів [236, 237].

Таблиця 2.2

Допоміжні речовини та референс-препарати,  
що використовували в дослідженнях

Назва	Виробник
3-(4,5-ди-метилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолію	«Sigma-Aldrich», США
Tween-20	«Sigma», США
Tween-80	«Sigma», США
диклофенак натрію	«Sigma», США
диклофенак натрію (Вольтарен, таблетки)	«Novartis», Швейцарія
доксорубіцин	«Actavis», Румунія
кеторолак	«Quimica Sintetica S.A.», Іспанія
метамізол натрію (Анальгін)	«Лекхім», Україна
налоксон (Налоксон-ЗН)	ТОВ «Здоров'я народу», Україна
розчин карагеніну 1%	«Sigma», США
розчин оцтової кислоти 99,8%;	«Sigma», США
спирт етиловий 96,0%;	АТ« Лубнифарм», Україна
тіопентал-натрію	ПАТ «Київмедпрепарат», Україна

## 2.2 Характеристика лабораторних тварин

Первинну оцінку аналгетичної та протизапальної активності синтезованих сполук та визначення гострої токсичності проводили на білих нелінійних мишах (самці та самиці) масою  $20 \pm 2$  г, розведення віварію ДУ “Інститут фармакології та токсикології” НАМН України. Інші дослідження (скринінг на фригопротекторні властивості, дозозалежність, оцінка опіоїдергічного компонента, вплив на поведінкові реакції) проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою близько 30 г та білих безпородних щурах-самцях масою 300–350 г, розведення віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету.

Період акліматизації тварин становив 10 діб. Перед початком експериментів усі тварини підлягали візуальному огляду, а за наявності відхилень у загальному стані тварин не включали в дослідження. Розподіл тварин на експериментальні групи виконувався шляхом блокової рандомізації за допомогою вбудованих функцій програми Microsoft Office Excel 2007. Кожна відібрана тварина маркувалася шляхом нанесення індивідуальних кольорових міток на тілі. Миші утримувались у пластмасових боксах з оцинкованою сіткою розміром 300×220×100 мм по 10 голів у клітці. Щурів утримували у пластмасових ящиках з оцинкованою сіткою розміром 500×320×200 мм по 5 голів у клітці. Як підстилку використовували тирсу листяних дерев. Протягом експерименту тварини перебували в стандартних умовах (світловий режим складав 12 год світла та 12 год темноти, стала температура повітря на рівні +21-22°C і вологість 55-65%). Тварин годували гранульованим комбікормом, фуражним зерном, хлібом, коренеплодами (буряк, морква). Корм містив усі необхідні поживні речовини, зокрема білки, вуглеводи, жири, вітаміни й мінерали. Тварин напували охолодженою кип'яченою водою *ad libitum*.

Досліди виконано згідно з Директивою Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» (2010 р.) щодо експериментів на тваринах [238]. Під час усіх маніпуляцій з тваринами дотримувались вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. зі змінами «Про захист тварин від жорстокого поводження» [239], керувалися положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях» » (Страсбург, 1986) [240], «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001 р.) [241], Наказу Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 р. №249 «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» [242], а також відповідно до рекомендацій Державного підприємства «Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України» [243, 244].

Дослідження проводились на основі рішень Комісії з питань біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол № 01/12/13 від 26 грудня 2013 р., протокол № 01/03/25 від 26 березня 2025 р.), Комісії з біоетики Національного фармацевтичного університету (протокол № 12 від 10 січня 2024 р.) та Комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» (протокол № 6 від 19 травня 2025 р.

Відповідно до мети та завдань дослідження всі експериментальні тварини були поділені на групи згідно з етапами дослідження (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Розподіл експериментальних тварин згідно з етапами дослідження

№	Етап дослідження	Кількість	
		миші	щурі
1	2	3	4
1.	Оцінка аналгетичної активності похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на моделі термічної стимуляції («гаряча пластина»)	120	-
2.	Оцінка аналгетичної активності похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на моделі хімічної стимуляції (оцтовокислі «корчі»)	198	-
3.	Оцінка протизапального ефекту похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на моделі карагенінового набряку	140	-
4.	Дослідження гострої токсичності найбільш активних сполук похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину	50	-
5.	Скринінг найбільш активних сполук похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження	32	-



## закінчення таблиці 2.3

1	2	3	4
6.	Оцінка дозозалежності знеболювального ефекту 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону	31	-
7.	Оцінка опіоїдергічного компонента в механізмі дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону	32	-
8.	Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на поведінкові реакції у тесті відкритого поля	14	-
9.	Поглиблене дослідження 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5 <i>H</i> -[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону за критеріями впливу на температуру тіла, стан системи гемостазу, низку показників запального каскаду та синтази оксиду азоту.	-	34
	Всього	617	34

## 2.3 Фармакологічні методи дослідження

### 2.3.1 Моделювання болю, викликаного термічним фактором («гаряча пластина»)

Первинну оцінку аналгетичної активності похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину проводили на моделі термічної стимуляції («гаряча пластина») [245, 246] що характеризує переважно спінальний рівень антиноцицептивної активності.

В експеримент у тесті «гаряча пластина», який проводили на приладі Hot plate (Ugo Basil, Італія), відбирали тварини (по 5 у групі), у яких латентний період реакції «облизування» лапки не перевищував 20 секунд. Після відбору

тварин зважували та маркували. Тест-речовини (досліджувана речовина та препарат порівняння кеторолак) вводили тваринам у тест-дозі 25 мг/кг маси тіла в/ш з використанням як розчинника водно-спиртової суміші (5% спирту) з додаванням емульгатора 5% твіну-20. Об'єм отриманої водно-спиртової емульсії, що вводилася тваринам, не перевищував 0,2 мл на тварину.

Через годину кожную тварину розміщували на «гарячій пластині» приладу та вимірювали латентний період «облизування» лапки. Максимальний час перебування тварин становив 30 с, у випадку відсутності реакції мишу виключали з дослідження, щоб уникнути опіку [247]. Гарячу пластину очищали 20% розчином етанолу після кожної миші [248]. Про антиноцицептивну активність судили за зміною латентного періоду облизування задньої лапи у порівнянні з вихідним значенням, тобто розраховували процент зміни до вихідного латентного періоду реакції в кожній групі.

### ***2.3.2 Моделювання болю, викликаного хімічним фактором (оцтовокислі «корчі»)***

Первинну оцінку аналгетичної активності похідних 5,7-диацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину також проводили на моделі вісцерального болю, що викликали хімічною стимуляцією («оцтовокислі «корчі»») [249].

Досліджувані речовини та препарат порівняння (субстанція кеторолак “Quimica Sintetica S.A.”, Іспанія) вводили в/ш в дозі 25 мг/кг у вигляді водно-спиртової емульсії. Контрольна група отримувала розчинник (водно-спиртова емульсія) в еквівалентній дозі.

Оцтовокислі «корчі» моделювали шляхом в/о введення 0,6% розчину оцтової кислоти, який готували з льодяної оцтової кислоти (99,8%) безпосередньо перед початком уведення тваринам. Розчин вводили з розрахунку 0,1 мл/10 г маси тіла через 1 год після введення досліджуваних речовин. Після введення розчину оцтової кислоти тварин поміщали на паперову

підстилку на лабораторному столі та накривали спеціальним скляним ковпаком з отвором для вільного доступу повітря. Підрахунок кількості «корчів» (характерні рухи тварин включали скорочення та розслабленням черевних м'язів, витягування задніх кінцівок і прогини спини тварин) проводили з 5 по 15 хв (час вимірювали за допомогою секундоміра) після введення розчину оцтової кислоти. Порівнювали число корчів у тварин дослідних (по 7 мишей у групі) та контрольної (10 мишей у групі) груп. Вираховували процент зменшення кількості "корчів" (антиноцицептивну активність) у дослідних групах відносно контролю за формулою 2.1 [243].

$$\text{Антиноцицептивна активність (\%)} = ((\text{ККк} - \text{ККд}) / \text{ККк}) \times 100 \%, \quad (2.1)$$

де: ККк – середня кількість корчів у мишей контрольної групи;  
ККд – середня кількість корчів у мишей дослідної групи.

### ***2.3.3 Моделювання ексудативного запалення (карагеніновий набряк)***

Первинну оцінку протизапальної активності синтезованих сполук проводили на моделі ексудативного запалення – карагенінового набряку [250]. Як препарат порівняння використовували субстанцію диклофенаку натрію (Sigma, США). Карагеніновий набряк моделювали шляхом субплантарного введення 1% розчину карагеніну в об'ємі 0,02 мл на мишу. Сполуки вводили за 1 год до введення флогогенного агента, контрольній групі аналогічним чином вводили розчинник (водно-спиртова емульсія). Облік ефекту здійснювали на максимумі запалення, через 3 год після введення флогогенного агенту. Миші підлягали евтаназії шляхом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом (аерозольний шлях введення). Потім на рівні гомілковостопного суглобу проводили ампутацію обох кінцівок (з набряком та без набряку) з подальшим зважуванням на торсійних вагах та розрахунком ступеню інгібування набряку за формулою 2.2.

$$\text{Інгібування набряку (\%)} = 100 \% - (M_{se} - M_{he}) / (M_{sc} - M_{hc}) \times 100 \%, \quad (2.2)$$

де  $M_{se}$  – маса набряклої лапки в експерименті,  $M_{he}$  – маса інтактної лапки в експерименті,  $M_{sc}$  – маса набряклої лапки в контролі,  $M_{hc}$  – маса інтактної лапки в контролі.

#### **2.3.4 Моделювання гострої холодової травми**

Для моделювання гострого загального охолодження мишей вміщували до індивідуальних пластикових контейнерів об'ємом 500 см<sup>3</sup> без обмеження рухової активності та доступу повітря. Клітки розташовували в морозильній камері «Nord Inter-300» з прозорою кришкою за температури  $-18^{\circ}\text{C}$ . Реєстрували час життя тварин [251]. Методом випадкового вибору сформували групи сполук IFT\_180 (n=6), IFT\_247 (n=8), IFT\_251 (n=6). Досліджувані сполуки вводили в/ш крізь зонд у дозі 25 мг/кг у формі водної суспензії, стабілізованої твіном-80, в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси за 60 хв до холодової експозиції. У групі препарату порівняння (n=6) використовували диклофенак натрію (Вольтарен, таблетки, «Novartis», Швейцарія) – засіб із доведеною фригопротекторною активністю в дозі 14 мг/кг в/ш в аналогічному об'ємі [225]. Мишам контрольної групи (n=6) вводили еквівалентну кількість розчинника (носія). Визначали час життя тварин у кожній групі та відмінності щодо контролю (%).

Для поглиблених досліджень модель гострої холодової травми відтворювали на щурах шляхом двогодинної експозиції за  $-18^{\circ}\text{C}$  в індивідуальних пластикових пеналах об'ємом 5000 см<sup>3</sup> [251, 252]. Експериментальні групи сформовано методом випадкового вибору таким чином: група сполуки IFT\_247 (n=7) отримували її в/ш в дозі 18 мг/кг (її визначено шляхом перерахунку з дози мишей з урахуванням коефіцієнта видової стійкості [243]) у формі водної суспензії з твіном-80 в об'ємі 2 мл/кг за

60 хв до початку холодової експозиції; щурам групи препарату порівняння (n=10) вводили диклофенак натрію в дозі 7 мг/кг в/ш також у вигляді водної суспензії з твіном-80 в об'ємі 2 мл/кг [252, 253]; інтактний контроль (n=9) і контрольна патологія (n=8) – тварини отримували в/ш розчинник (носій) в об'ємі 2 мл/кг. Ректальну температуру щурів до та безпосередньо після холодової експозиції вимірювали цифровим термометром Gamma Thermo Base.

### 2.3.5 Вивчення гострої токсичності сполук

Для вивчення гострої токсичності був обраний табличний експрес-метод за В. Б. Прозоровським [254]. Метод ґрунтується на принципі використання досліджуваних сполук в дозах, які розміщені в логарифмічній шкалі з інтервалом 0,1. Усі можливі достовірні результати ЛД<sub>50</sub> та їх похибки розраховані попередньо за допомогою програми пробіт-аналізу [255, 256]. В експерименті застосовували 2 тварини (миші) для дослідження 1 дози сполуки, заздалегідь зваживши, помітивши та оцінивши *habitus animalis*. Досліджувані речовини вводили в/ш в дозах, що наведені в логарифмічній шкалі (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Логарифмічна шкала

0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	і т.д.
1	1,2589	1,5848	1,9952	2,5118	3,1622	3,981	5,0118	6,3095	7,9432	10	12,589	і т.д.

ЛД<sub>50</sub> та їх середньоквадратичне відхилення при дослідженні 4 сусідніх використаних доз по 2 спостереження на кожну дозу визначали за допомогою табл. 2.5.

Таблиця 2.5

ЛД<sub>50</sub> та їх середньоквадратичне відхилення

Послідовність ефектів	Показник	Доза, мг/кг					
		2000	2500	3170	3980	5010	6310
1	2	3	4	5	6	7	8
0 0 1 2	ЛД <sub>50</sub>	3090	3890	4900	6160	7760	9770
	$\sigma$	290	370	460	580	730	920
0 0 2 1	ЛД <sub>50</sub>	3340	4210	5310	6680	8420	10600
	$\sigma$	570	720	900	1130	1420	1790
0 0 2 2	ЛД <sub>50</sub>	2830	3570	4500	5660	7140	8980
	$\sigma$	230	280	350	450	560	710
0 1 0 2	ЛД <sub>50</sub>	3060	3860	4960	6240	7700	9690
	$\sigma$	420	520	660	830	1220	1530
0 1 1 2	ЛД <sub>50</sub>	2840	3570	4500	5660	7130	9000
	$\sigma$	340	430	540	680	860	1080
0 1 2 1	ЛД <sub>50</sub>	3060	3850	4850	6240	7700	9690
	$\sigma$	700	880	1100	1400	1750	2200
0 1 2 2	ЛД <sub>50</sub>	2630	3310	4170	5250	6610	8340
	$\sigma$	260	320	400	510	640	810
0 2 1 2	ЛД <sub>50</sub>	2420	3040	3820	4820	6070	7640
	$\sigma$	520	650	820	1040	1300	1650
1 0 1 2	ЛД <sub>50</sub>	2760	3480	4320	5510	6940	8700
	$\sigma$	530	680	850	1070	1350	1700
1 0 2 2	ЛД <sub>50</sub>	2500	3140	3950	4980	6270	7900
	$\sigma$	430	550	690	870	1090	1370
1 1 0 2	ЛД <sub>50</sub>	2890	3630	4580	5760	7260	9140
	$\sigma$	920	1170	1460	1740	2310	2920

### 2.3.6 Оцінка дозозалежності знеболювального ефекту

Для оцінки дозозалежності знеболювального ефекту використовували базову модель дослідження соматичного болю – тест «Гаряча пластина» [246]. Зазначена модель ґрунтується на подразненні ноцицепторів шкіри лап помірно гарячою пластиною (прилад Hot/Cold Plate (Bioseb, USA) при температурі поверхні +54°C. Реєстрували латентний період типової поведінкової відповіді на ноцицептивну стимуляцію – облизування задньої лапи, що є найбільш специфічним маркером больових почуттів [246, 257]. Перебування мишей на

гарячій пластині обмежували 60 с з метою уникнення опіку. Якщо протягом цього часу реакція була відсутня, вважали, що латентний період дорівнює 60 с. Також враховували кількість тварин з іншими стандартними для цього тесту поведінковими патернами (клімбінг, стрибки).

Оцінку дозозалежності знеболювального ефекту проводили після визначення вихідного латентного періоду мишам в/ш вводили сполуку-лідер IFT\_247 в дозах 5; 15; 25 і 35 мг/кг у вигляді водної суспензії, стабілізованої твіном-80, в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси. Через 60 хв повторювали визначення латентного періоду. Контрольним тваринам вводили в/ш еквівалентну кількість води.

### ***2.3.7 Визначення опіоїдергічної складової в механізмі дії***

Можливу участь опіоїдергічного механізму в аналгетичній дії сполуки IFT\_247 визначали у максимально ефективній дозі. Для цього тваринам після визначення вихідного латентного періоду у тесті «Гаряча пластина» вводили конкурентний блокатор опіоїдних рецепторів налоксон (Налоксон-ЗН, ТОВ “Здоров’я народу”, Україна) в/о в дозі 5 мг/кг [258] за 30 хв до досліджуваної сполуки, а через 60 хв після її введення повторно вимірювали ЛП.

Як препарат порівняння в цих дослідах використовували метамізол натрію, для якого доведено наявність опіоїдергічної ланки механізму дії. Цей анальгетик здійснює знеболювальну дію за участі кількох механізмів, з-поміж яких найкраще досліджено інгібування ЦОГ, уповільнення активації L-аргініну/NO/cGMP/K<sup>+</sup>-каналу на периферії та в спинному мозку, активація низхідної гальмівної системи контролю болю, взаємодія з глутаматергічною системою та вивільнення ендogenous опіоїдних пептидів [259]. Метамізол натрію (Анальгін, «Лекхім», Харків) вводили в/о в дозі 500 мг/кг у вигляді водного розчину в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси.

Частині мишей за 30 хв. до метамізолу вводили налоксон як описано вище. Контрольним тваринам у цьому експерименті в/о вводили розчинник

(ізотонічний розчин *NaCl* в еквівалентному об'ємі). Додатково визначали кількість мишей з певними проявами реакцій під час латентного періоду облизування лапи (стрибки, клімбінг).

### ***2.3.8 Дослідження поведінкових реакцій в тесті «відкрите поле»***

Поведінкові реакції (локомоторну активність, орієнтовно-дослідницьку діяльність та емоційну сферу) досліджували в тесті «відкрите поле» [243]. Сполуку IFT\_247 вводили мишам в/ш в дозі 25 мг/кг, як описано вище, одноразово (контрольним тваринам воду в аналогічному об'ємі).

Через 1 год. тварин розміщували в центрі освітленого пристрою, що являє собою обмежений бортами майданчик із 16 квадратами 5×5 см, у середині яких наявні отвори діаметром 1,5 см.

Протягом 3 хв оцінювали локомоторну активність за кількістю перетнутих квадратів, орієнтовно-дослідницьку діяльність за кількістю вертикальних стійок та обстежених отворів, а емоційний стан та його вегетативний супровід – за кількістю фекальних болюсів, уринацій та актів грумінгу. Додатково розраховували суми показників орієнтовно-дослідницької активності, вегетативного супроводу емоційних реакцій та суму всіх видів активності.

## **2.4 Біохімічні та гемостазіологічні методи дослідження**

Через 5-10 хв після завершення холодової експозиції щурів піддавали евтаназії під загальною анестезією тіопенталом-натрію (40 мг/кг) та отримували кров шляхом декапітації, що забезпечує швидке припинення життєвих функцій та мінімізує вплив стресових факторів на біохімічні показники.

Негайно після декапітації кров збирали безпосередньо з місця рани у підготовлені пробірки. Для отримання плазми крові використовували пробірки, попередньо заповнені антикоагулянтом - етилендіамінтетраоцтова кислота



(ЕДТА), їх кілька разів акуратно інвертували для рівномірного розподілу антикоагулянта. Для отримання сироватки використовували пробірки без антикоагулянту.

Плазму отримували шляхом центрифугування при 3000 об/хв протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Після центрифугування плазма знаходиться у верхній частині, яку обережно відбирали в мікропробірки Еппендорф 2,0 мл та до проведення досліджень зберігали за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Пробірки зі зразками крові без антикоагулянту залишали при кімнатній температурі на 20-30 хв для повного згортання крові. Після утворення згустків пробірки центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хв. Після центрифугування сироватка залишалася у верхній частині пробірки. Її обережно відбирали в мікропробірки Еппендорф 2,0 мл та до проведення досліджень зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$ .

У плазмі визначали протромбіновий час (ПЧ), тромбіновий час (ТЧ), активований частковий протромбіновий час (АЧТЧ), фібриноген; використовували набори BioSystem S.A. (Іспанія).

У сироватці крові вимірювали залишкову кількість щурячого протромбіну, тромбіну, фібриногену, а також D-димер методом імуноферментного аналізу за допомогою видоспецифічних наборів: Rat Prothrombin ELISA Kit, Rat TM (Thrombin) ELISA Kit, Rat FG (Fibrinogen) ELISA Kit, Rat D-Dimer, D2D ELISA Kit (MyBioSource, США).

У щурів вилучали печінку та заморожували її рідким азотом, зберігаючи до аналізу в морозильній камері за  $-70^{\circ}\text{C}$ .

У гомогенаті печінки визначали імуноензиматичними методами вміст низки маркерів запалення: 5-ліпоксигеназу (5-ЛОГ), лейкотриєн B<sub>4</sub> та тотальні лейкотриєни; низку інтерлейкінів: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10; TNF- $\alpha$ ; синтазу оксиду азоту (NOS). Використовували видоспецифічні набори: Rat 5-lipoxygenase (5-LO) ELISA Kit, Rat Leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ELISA Kit (Competitive ELISA), Rat Total Leucotriene (LT) ELISA Kit (Competitive ELISA),

Rat Interleukin 1 Beta (IL1b) ELISA Kit, Rat Interleukin 4 (IL4) ELISA Kit, High Sensitivity Rat Interleukin 6 (IL6) ELISA Kit, Rat Interleukin 10 (IL10) ELISA Kit, Rat TNF alpha PicoKine ELISA Kit, Rat Nitric Oxide Synthase (NOS) PicoKine ELISA Kit виробництва MyBioSource (США).

Усі дослідження проведенні імуноферментним методом за видоспецифічними наборами проводили у повній відповідності до інструкцій фірми-виробника. Детекцію проводили на приладі LAB Analyt M201 Microplate Reader за довжини хвилі 450 нм (диференційний фільтр – 630 нм).

## **2.5 Методи дослідження *in silico* та *in vitro***

### **2.5.1 Методика проведення віртуального скринінгу**

Для біоінформатичного передбачення активності молекул використовували веб-інструмент SwissTargetPrediction ([www.swisstargetprediction.ch](http://www.swisstargetprediction.ch)), що не потребує установки програмного забезпечення. Метою цього дослідження є прогнозування найімовірніших білкових мішеней малих молекул [260]. Прогнози базуються на принципі подібності шляхом зворотного скринінгу та виконуються шляхом пошуку подібних молекул у 2D та 3D у з бібліотекою з 37 000 відомих активних речовин більш ніж 3000 білків трьох різних видів. [261].

Система порівнює досліджувану молекулу з великою базою даних відомих біоактивних сполук (ChEMBL). Подібність розраховується як: 2D-подібність (на основі бітуваних хімічних відбитків), 3D-подібність (просторове порівняння молекулярних форм і електронної густини та комбінування цих параметрів (комбінуються для підвищення точності передбачення).

Результат передбачення полягає у тому, що кожній мішені присвоюється ймовірність зв'язування та виводиться список найімовірніших білкових мішеней для введеної сполуки. Використовували топ-25 найбільш пов'язаних зі

сполукою мішеней із зазначенням ID та значень активності. Результати експортувалися у вигляді діаграми та таблиці для кожної сполуки окремо.

### **2.5.2 Методика проведення молекулярного докінгу**

Для визначення можливого механізму дії досліджуваних сполук використали техніку молекулярного докінгу. Симуляцію *in silico* здійснювали з використанням програми AutoDock Vina v.1.2.0. [118] Як цільові ферменти для тестування вибрали Циклооксигеназу-1 (ЦОГ-1, PDB код 5WBE), Циклооксигеназу-2 (ЦОГ-2, PDB код 3LN1), 5-Ліпоксигеназу (5-ЛОГ, PDB код 3V92) і 5-Ліпоксигеназо активуючий протеїн (ЛОАП, PDB код 6VGI). Рентгенівські спектри вибраних ензимів завантажені з Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Перед проведенням докінгу здійснили генерацію 3D моделей сполук за допомогою програмного пакету Avogadro [262]. Оптимізацію структур проводили методом молекулярної механіки MMFF94 з кількістю циклів 10000 [263]. Для більш якісної симуляції параметр exhaustiveness для AutoDock Vina змінили зі стандартного значення 8 на 32. Підготовка ензимів до докінгу виконана за допомогою програмного пакету AutoDock Tool 1.5.6. Валідація вибраних параметрів та програмного забезпечення проводилася шляхом ре-докінгу вихідних лігандів зі рентгенівських спектрів вибраних ферментів та порівнянням фактичного та передбаченого положень лігандів всередині алостеричних центрів. Тільки для 5-ЛОГ був використаний лікарський засіб лікофелон як відомий інгібітор 5-ЛОГ [264]. Оцінку афінності до вибраних ензимів здійснювали шляхом порівняння з енергією зв'язування нативних лігандів. Також для більш чіткої оцінки протизапальної активності для докінгу в якості референтної сполуки використали Кеторолак, оскільки даний лікарський засіб використовувався для порівняння в біологічній частині дослідження.

### ***2.5.3 Вивчення цитотоксичної дії in vitro на клітини різного тканинного походження за допомогою МТТ-тесту***

Використано такі лінії клітин: HEK293T – трансформовані клітини нирки ембріона людини та J774.2 – макрофаги миші. Клітини культивували в модифікованому середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM) із 2 мМ глютаміну та 10% фетальної бичачої сироватки (FBS) за 37°C при 95% вологості. При досягненні конфлюенту клітини лінії HEK293T клітини від'єднували від поверхні флакону через трипсинізацію. Для цього промивали клітини фосфатно-сольовим розчином (PBS), щоб повністю видалити залишки сироватки. Додавали 1 мл теплового (37°C) розчину трипсину/ЕДТА (0,05% : 0,02% у PBS), щоб покрити поверхню з клітинами. Інкубували посудину при 37°C (у термостаті) до 2 хв, поки клітини не почнуть відшаровуватись, що контролювали обережним постукуванням по стінці флакона або переглядом під мікроскопом. Додавали середовище з сироваткою (DMEM + 2 мМ глютаміну + 10% FBS), щоб зупинити дію трипсину. Клітини лінії J774.2 від'єднували від поверхні флакону через її промивання струменем культивального середовища. Клітини переносили у пробірку, центрифугували протягом 3–5 хв при 1000 об/хв, після чого ресуспендували клітини у свіжому середовищі [265]. Якість культури клітин (кількість живих та мертвих клітин) оцінювали методом забарвлення клітин трипановим синім (кінцева концентрація барвника 0,1%). Кількість живих (не зафарбованих) і мертвих (зафарбованих) клітин підраховували в камері Нейбауера [265] за допомогою світлового мікроскопу.

Клітини досліджуваних ліній висівали у кількості 5000 клітин / 100 мкл у лунку 96-лункового планшета та інкубували у повноцінному середовищі (DMEM + 2 мМ глютаміну + 10% FBS) протягом ночі, щоб клітини прикріпилися до поверхні. Наступного дня відбирали середовище і до клітин додавали нове середовище (100 мкл), що містило відповідні концентрації досліджуваних речовин (1, 10, 25, 50, 100, 250 і 500 мкМ) упродовж 72 год. За 3 год до завершення періоду інкубації в середовище додавали МТТ-реагент, 3-

(4,5-ди-метилтіазол-2-іл)-2,5-диметилбромід тетразолію (Sigma-Aldrich, США), у кінцевій концентрації 500 мкг/мл. Проводимо інкубацію клітин з МТТ після цього упродовж 1-3 год в лунки додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) для розчинення кристалів формазану, які утворилися внаслідок відновлення МТТ-реагенту живими клітинами. Концентрацію формазану в лунках визначали фотометрично на апараті «Plate Reader BioTek» (США) за оптичним поглинанням при 490 нм. Кількість живих клітин визначали у частках відносно контролю [266]. Як позитивний контроль використовували Доксорубіцин (Actavis, Румунія). Досліди МТТ повторювали тричі з трьома паралельними експериментами у кожному варіанті.

## 2.6 Статистичні методи

Результати обробляли за допомоги програми STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Результати наводили як середні арифметичні зі стандартними помилками ( $M \pm m$ ), а також як медіани з 25% і 75% процентилями ( $Me [Q25; Q75]$ ). Нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уилка (W). Статистичну значущість змін всередині групи в динаміці всередині групи визначали за парним критерієм Вілкоксона, міжгрупові відмінності – за t-критерієм Ст'юдента за нормального розподілу та за критерієм Мана-Вітні за його відсутності, а у випадку обліку показників в альтернативній формі (наявність або відсутність певної ознаки) – за кутовим перетворенням Фішера. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$  [267].

Графіки будували за допомогою програми GraphPad Prism (версія 9). Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината діаграм відповідає середньому значенню "М", розрахованому за результатами трьох вимірювань в одному з кількох однотипних експериментів.

Усі використані у роботі одиниці вимірювання та параметри наведені у відповідності до міжнародної системи одиниць.

## **Висновки до розділу 2**

Виходячи з мети, завдань, предмету, об'єктів наукового дослідження розроблено його етапність, що складалась із взаємопов'язаних послідовних етапів, забезпечених методами дослідження. Це дозволило опрацювати отримані результати та сформулювати висновки.

### РОЗДІЛ 3

## СКРИНІНГ НОВИХ ПОХІДНИХ 5,7-ДИАЦИЛ-3-*H*(АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5*H*- [1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ НА АНАЛГЕТИЧНУ ТА ПРОТИЗАПАЛЬНУ АКТИВНОСТІ

Сполуки, що містять тріазоловий та/чи тіадіазоліновий фрагмент представляють суттєвий інтерес, оскільки таким похідним притаманний суттєвий антиноцицептивний та антиексудативний ефект, що часто супроводжується низькою токсичністю, відсутністю ульцерогенної дії [179]. Тому нові похідні 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів є досить перспективними класом гетероциклічних сполук для створення нових високоефективних та безпечних знеболювальних та протизапальних засобів.

Метою цього етапу дослідження було провести скринінгову оцінку аналгетичної та протизапальної активності серед похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів з подальшою експериментальною верифікацією отриманих даних

### 3.1 Прогноз аналгетичної та протизапальної активності серед похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів (віртуальний скринінг)

У процесі створення нових препаратів широко використовуються різні методи прогнозу фармакологічного спектру хімічних сполук. Одним з ефективних інструментів для первинної оцінки потенційних біологічно активних сполук є онлайн-ресурс SwissTargetPrediction [260]. Цей веб-сайт дозволяє прогнозувати найбільш імовірні макромолекулярні мішені для «малих молекул», які вважаються біоактивними. Прогноз ґрунтується на поєднанні 2D і 3D подібності з бібліотекою з 37 000 відомих активних речовин більш ніж 3000

білків трьох різних видів [261]. Також слід зазначити, що цей метод є відносно швидким та простим у користуванні.

Біоінформатичне передбачення особливостей біологічної активності нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину засвідчило ймовірність широкого фармакологічного спектру та мультитаргетності досліджуваних сполук, що може бути пов'язаним з впливом на різні рецепторні та ферментні системи організму (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Результати віртуального скринінгу 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на основі онлайн-ресурсу SwissTargetPrediction

Сполука	Потенційна біомішень
1	2
IFT_372	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A)
IFT_373	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> ADORA1, ADORA2A метаботропний глутаматного рецептор 5 (GRM5) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2)
IFT_247	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A)
IFT_371	метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) катепсин К, S і L (CTSK, CTSS, CTSL) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)
IFT_249	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK)



## продовження таблиці 3.1

1	2
IFT_248	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) моноаміноксидаза B (MAOB) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин K (CTSK)
IFT_251	трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) аденозиновий рецептор A1 (ADORA1) моноаміноксидаза B (MAOB) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A) канабіноїдні рецептори 1 (CNR1) моноаміноксидаза A (MAOA)
IFT_370	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин K (CTSK) канабіноїдні рецептори 1 (CNR1) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A)
IFT_250	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) прогестероновий рецептор (PGR) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) моноаміноксидаза B (MAOB) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин K і S (CTSK, CTSS) фосфодіестераза типу 5A (PDE5A) моноаміноксидаза A (MAOA)
IFT_253	трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) фосфодіестераза 4D (PDE4D) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A (PDE10A)
IFT_252	трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) моноаміноксидаза B (MAOB) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)
IFT_375	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) канабіноїдні рецептори 2 (CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин K (CTSK) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)

## продовження таблиці 3.1

1	2
IFT_376	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)
IFT_257	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) прогестероновий рецептор (PGR) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К (CTSK) епоксидгідролаза 2 (EPHX2) фосфодіестераза типу 5A (PDE5A)
IFT_260	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К і S (CTSK, CTSS) фосфодіестераза типу 5A (PDE5A)
IFT_255	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К, S, L (CTSK, CTSS, CTSL) епоксидгідролаза 2 (EPHX2) фосфодіестераза типу 5A (PDE5A)
IFT_180	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) прогестероновий рецептор (PGR) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин К, S, L (CTSK, CTSS, CTSL) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)
IFT_256	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO)
IFT_262	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) канабіоїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) Катепсин К, S (CTSK, CTSS) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO)

## закінчення таблиці 3.1

1	2
IFT_258	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) трансієнтний рецептор потенціалу ваніліної 1 (TRPV1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) катепсин K, S (CTSK, CTSS) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO)
IFT_259	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) прогестероновий рецептор (PGR) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) катепсин K (CTSK) моноаміноксидаза A (MAOA)
IFT_263	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> (ADORA1) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) моноаміноксидаза B (MAOB) фосфодіестераза типу 10A і 5A (PDE10A, PDE5A) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) епоксидгідролаза 2 (EPHX2)
IFT_261	аденозинові рецептори A <sub>1</sub> і A <sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A) прогестероновий рецептор (PGR) метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5) канабіноїдні рецептори 1 і 2 (CNR1, CNR2) транслокаційний білок 18 кДа (TSPO) катепсин K (CTSK) моноаміноксидаза A (MAOA) фосфодіестераза типу 5A (PDE5A)

Як видно з таблиці 3.1, для сполук прогнозується практично однакові біологічні мішені, що пояснюється структурною близькістю досліджуваних похідних. Так, аналгетична і протизапальна активність 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5-*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів може бути пов'язана з афінітетом до аденозинових рецепторів A<sub>1</sub> і A<sub>2A</sub> (ADORA1, ADORA2A). Вважається, що аденозинові рецептори A<sub>1</sub> і A<sub>2A</sub> регулюють потребу міокарда в кисні та посилюють коронарну циркуляцію шляхом розширення судин. Крім того, рецептор A<sub>2A</sub> може пригнічувати імунні клітини, тим самим захищаючи тканини від запалення [268]. Рецептор A<sub>2A</sub> також експресується в головному мозку, де він відіграє важливу роль у регуляції вивільнення глутамату та

дофаміну, що робить його потенційною терапевтичною мішенню для лікування таких станів, як безсоння, біль, депресія та хвороба Паркінсона [269].

Наступною ланкою впливу досліджуваних сполук імовірно є метаботропний глутаматний рецептор 5 (GRM5), афінітет до якого прогнозується практично для всіх похідних. Метаботропний глутаматний рецептор 5 є збуджувальним Gq-зв'язаним g-білокспряженим рецептором [270], що переважно експресується на постсинаптичних ділянках нейронів [271]. Кодований однойменним геном GRM5. L-Глутамінова ксилота є основним збуджувальним нейромедіатором у центральній нервовій системі та активує як іонотропні, так і метаботропні рецептори глутамату. Глутаматергічна нейротрансмісія бере участь у більшості аспектів нормального функціонування мозку і може бути порушена при багатьох його патологічних станах. Було проведено широке дослідження ролі метаботропного глутаматного рецептора 5 у психологічних розладах, таких як залежність [272] і тривога [273]. Нові дослідження переконливо вказують на те, що mGluR5 відіграє безпосередню роль у патогенезі алкогольних розладів у людей, демонструючи безпосередню участь у розвитку поведінкової сенсibiliзації до етанолу на тваринних моделях.

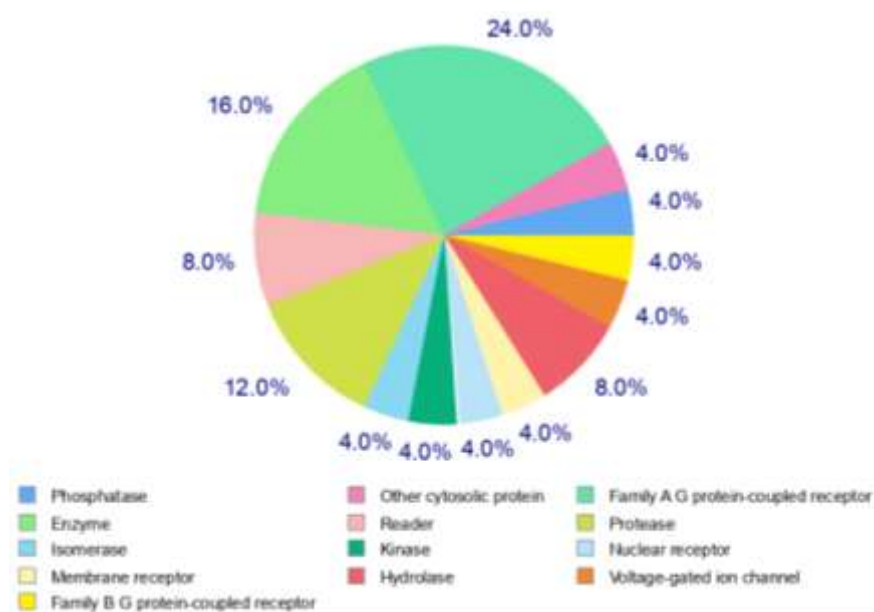
Крім зазначених біомішеней, цілком імовірним є вплив похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на транслокаційний білок 18 кДа (TSPO), який останнім часом став популярною біомішенню для дизайну потенційних лікарських засобів, в тому числі з протизапальною дією. Транслокаторний білок (TSPO) вперше він був описаний як периферичний бензодіазепіновий рецептор і вторинний сайт зв'язування діазепаму, але подальші дослідження виявили, що рецептор експресується у всьому тілі та мозку [274]. Було виявлено, що фармакологічна активація TSPO є потужним стимулятором біосинтезу стероїдів [275, 276], зокрема нейроактивних стероїдів у мозку (наприклад алопрегнанолон), що мають анксиолітичні властивості [277]. Таким чином, ліганди TSPO вважаються корисними як потенційні анксиолітики, що можуть мати менше побічних ефектів, пов'язаних із залежністю, ніж традиційні препарати бензодіазепінового

типу [278]. Крім того, для транслокаційного білка 18 кДа (TSPO) встановлено різноманітні впливи на імунні клітини, зокрема модуляцію окиснювальних вибухів нейтрофілами та макрофагами, інгібування проліферації лімфоїдних клітин і секрецію цитокінів макрофагами [279, 280]. Експресія TSPO також пов'язана із запальними реакціями, що виникають після ішемічно-реперфузійного ушкодження, після геморагічного ушкодження мозку [281] і при деяких нейродегенеративних захворюваннях.

Фармакологічний потенціал досліджуваних гетероциклічних сполук може бути пов'язаний із тропністю до катепсину К (CTSK). Катепсин К є протеазою, яка характеризується високою специфічністю до кінінів, що беруть участь у резорбції кісткової тканини. Здатність ферменту катаболізувати еластин, колаген і желатин дозволяє йому руйнувати кістки і хрящі. Ця катаболічна активність також частково відповідає за втрату еластичності легень за емфіземи. Інгібітори катепсину К демонструють суттєвий потенціал у лікуванні остеопорозу [282]. Експресія катепсину К стимулюється запальними цитокінами, які вивільняються після пошкодження тканин.

Одним з найбільш цікавих результатів віртуального скринінгу є потенційний неспецифічний афінитет похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів до канабіноїдних рецепторів 1 і 2 (CNR1, CNR2). Відомо, що канабіноїдний рецептор 1 (CNR1) клінічно є прямою мішенню ліків для фармакотерапії болю, епілепсії та ожиріння [283]. Функція рецептора CB1 пов'язана з психічними, неврологічними та нейродегенеративними розладами (хвороба Хантінгтона, розсіяний склероз і хвороба Альцгеймера). Канабіноїдні рецептори CNR2 можуть мати можливу терапевтичну роль у лікуванні нейродегенеративних розладів, таких як хвороба Альцгеймера. Зокрема, агоніст CB2 JWH-015 спонукає макрофаги видаляти природний бета-амілоїдний білок із заморожених тканин людини [284]. У пацієнтів із хворобою Альцгеймера бета-амілоїдні білки утворюють агрегати, відомі як сенільні бляшки, що порушують нервову функцію [285].

Таким чином, результати віртуального скринінгу дозволяють окреслити можливі напрямки дослідження 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів методами молекулярної біології для обґрунтування їх потенціалу як потенційних анальгетичних та протизапальних засобів з оригінальним механізмом дії. Типовий спектр потенційного афінітету сполук-хітів IFT\_180, IFT\_247, IFT\_251, IFT\_252 та IFT\_257 до ензимів та біосистем представлено на рис. 3.1-3.5.



Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Cannabinoid receptor 1	CNR1	P21554	CHEMBL218	Family A G protein-coupled receptor	0	1190 / 0
Cannabinoid receptor 2	CNR2	P34972	CHEMBL253	Family A G protein-coupled receptor	0	1071 / 0
Phosphodiesterase 10A (by homology)	PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	Phosphodiesterase	0	801 / 0
Metabotropic glutamate receptor 5	GRM5	P41594	CHEMBL3227	Family C G protein-coupled receptor	0	721 / 0
MAP kinase p38 alpha	MAPK14	Q16539	CHEMBL260	Kinase	0	617 / 0
Adenosine A1 receptor (by homology)	ADORA1	P30542	CHEMBL226	Family A G protein-coupled receptor	0	550 / 0
Translocator protein (by homology)	TSPO	P30536	CHEMBL5742	Membrane receptor	0	530 / 0
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1	HSD11B1	P28845	CHEMBL4235	Enzyme	0	405 / 0
Adenosine A2a receptor (by homology)	ADORA2A	P29274	CHEMBL251	Family A G protein-coupled receptor	0	379 / 0
Adenosine A3 receptor	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256	Family A G protein-coupled receptor	0	354 / 0
Melatonin receptor 1A	MTNR1A	P48039	CHEMBL1945	Family A G protein-coupled receptor	0	303 / 0
Monoamine oxidase B	MAOB	P27338	CHEMBL2039	Oxidoreductase	0	290 / 0
Protein farnesyltransferase	FNTA FNTB	P49354 P49356	CHEMBL209410	Enzyme	0	283 / 0
Cathepsin K	CTSK	P43235	CHEMBL268	Protease	0	282 / 0
Epoxide hydratase	EPHX2	P34913	CHEMBL2409	Protease	0	273 / 0
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	O75874	CHEMBL200762	Enzyme	0	256 / 0
Vanilloid receptor	TRPV1	Q8NER1	CHEMBL4794	Voltage-gated ion channel	0	230 / 0
Neuropeptide Y receptor type 5	NPY5R	Q15761	CHEMBL4561	Family A G protein-coupled receptor	0	221 / 0
Glucocorticoid receptor	NR3C1	P04150	CHEMBL2034	Nuclear receptor	0	216 / 0
Phosphodiesterase 5A	PDE5A	O76074	CHEMBL1827	Phosphodiesterase	0	211 / 0
Gamma-secretase	EN NCSTN APH1A	P92542 Q96B13	CHEMBL209413	Protease	0	209 / 0
Cathepsin S	CTSS	P25774	CHEMBL2954	Protease	0	209 / 0
Corticotropin releasing factor receptor 1	CRHR1	P34998	CHEMBL1800	Family B G protein-coupled receptor	0	200 / 0
Progesterone receptor	PGR	P06401	CHEMBL208	Nuclear receptor	0	182 / 0
Cathepsin L	CTSL	P07711	CHEMBL3837	Protease	0	175 / 0

Рисунок 3.1 Топ-25 найбільш пов'язаних з IFT\_180 мішеней, отриманих за допомогою онлайн-інструмента SwissTargetPrediction

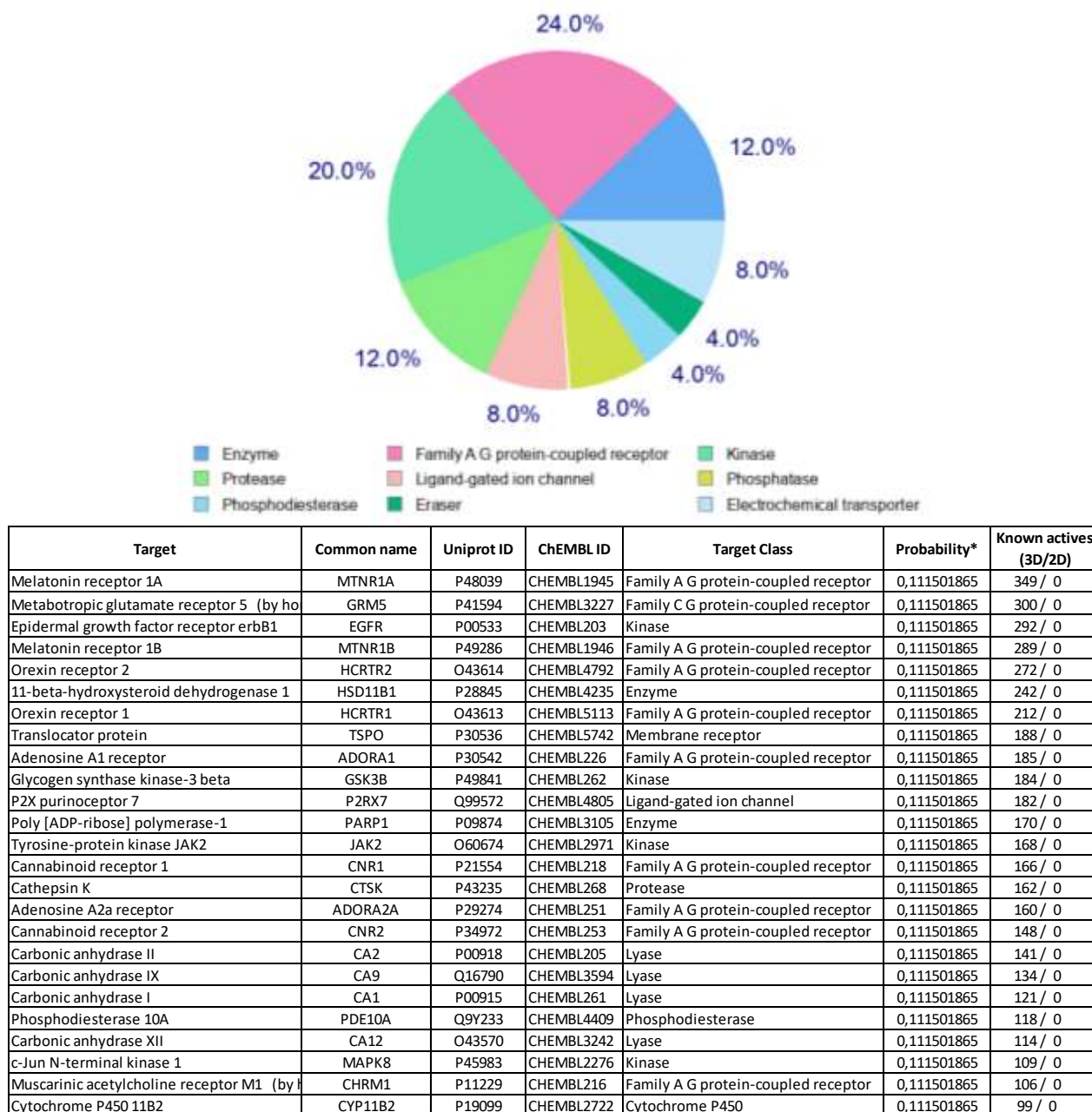


Рисунок 3.2 Топ-25 найбільш пов'язаних з IFT<sub>247</sub> мішеней, отриманих за допомогою онлайн-інструмента SwissTargetPrediction.

Аналіз результатів прогнозу потенційних мішеней для нових досліджуваних молекул на основі структурної подібності до відомих активних сполук отриманих за допомогою онлайн-сервісу SwissTargetPrediction засвідчив, що жодна з досліджуваних сполук немає активних сполук у 2D-базі. Саме це вказує на те, що для простої 2D-структурної подібності (плоска хімічна будова) не знайдено аналогів, а молекули мають унікальну хімічну будову, яка не збігається з відомими молекулами.

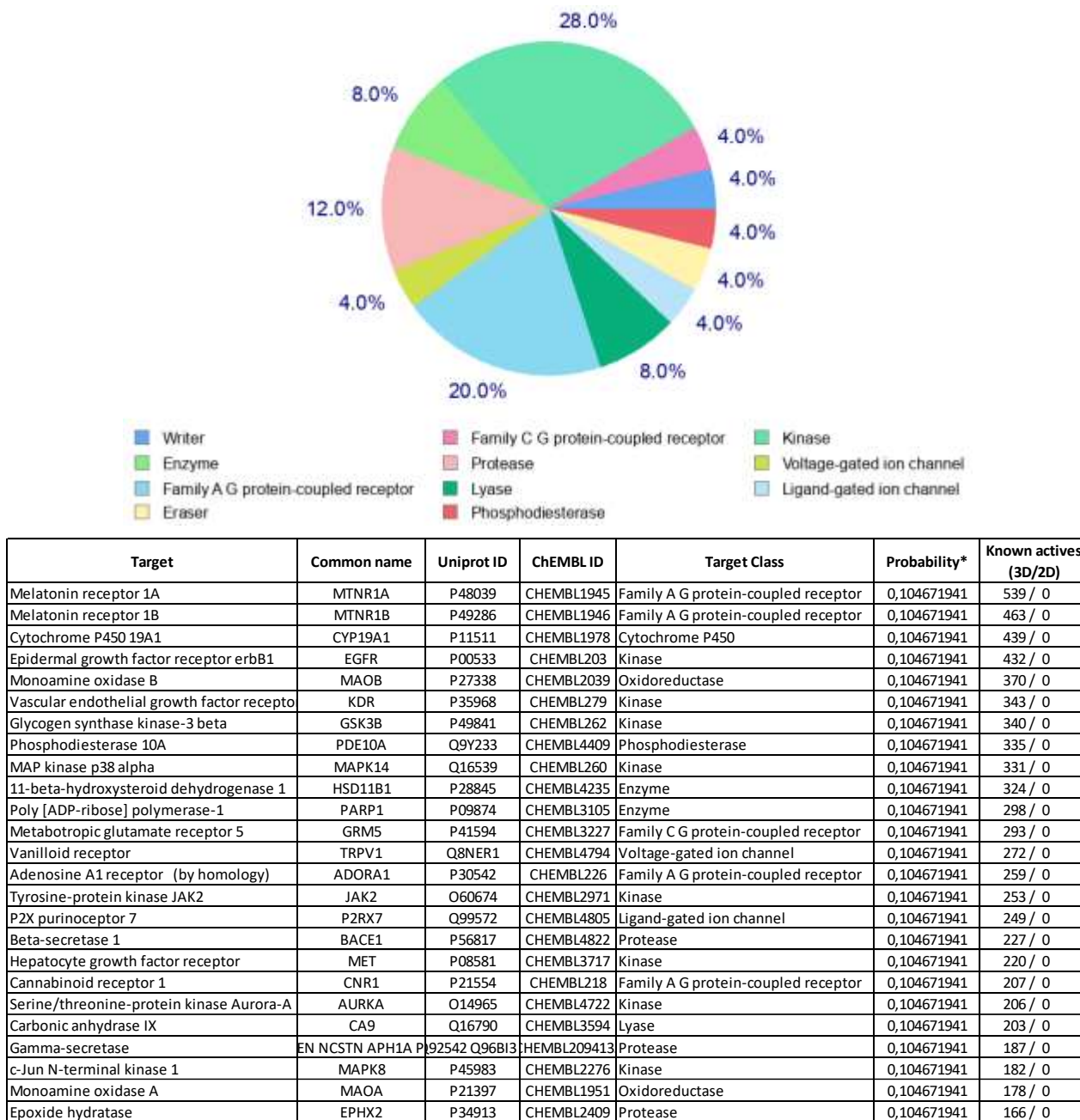
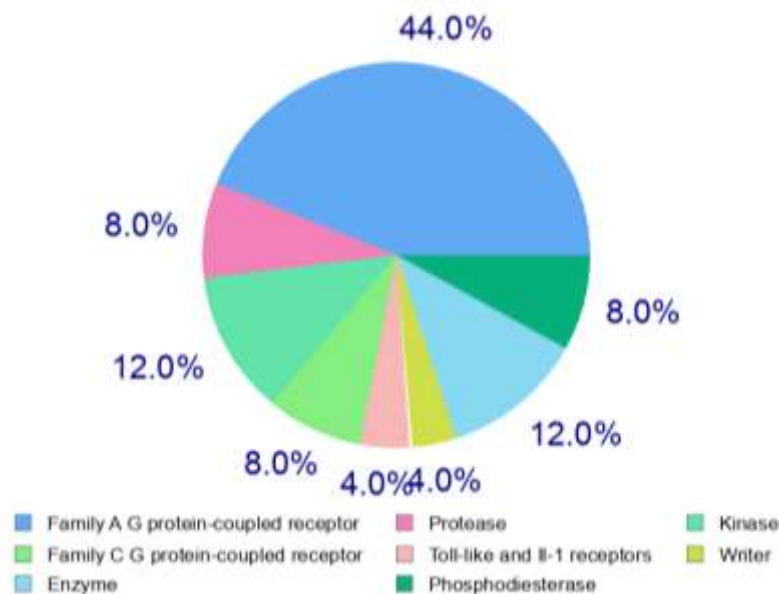


Рисунок 3.3 Топ-25 найбільш пов'язаних з IFT\_251 мішеней, отриманих за допомогою онлайн-інструмента SwissTargetPrediction.

Кількість активних сполук у 3D-базі коливається від 106 до 1704, що вказує на те, що велика кількість відомих лігандів має спорідненість з конкретною мішенню.



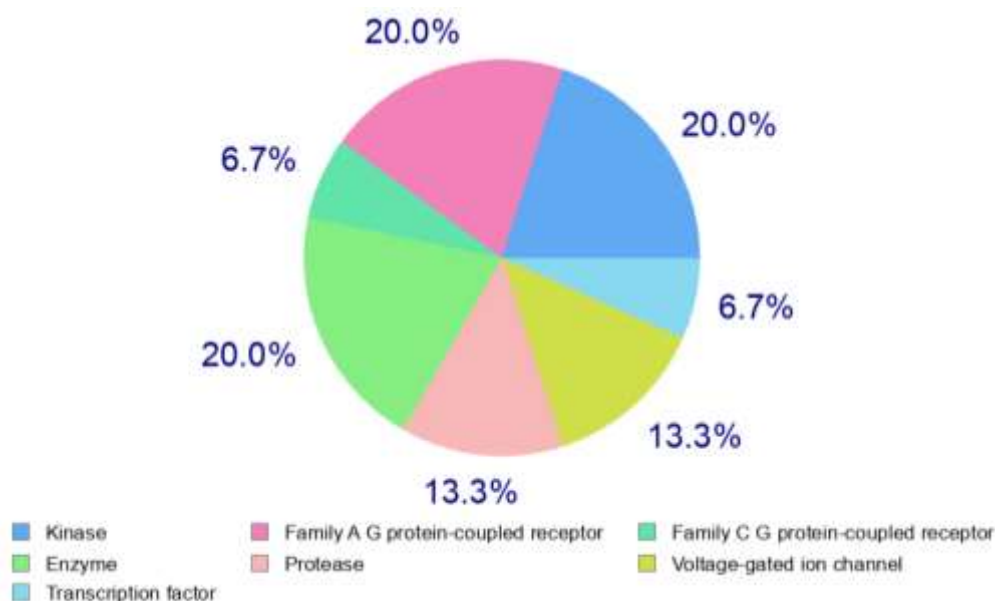


Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Cannabinoid receptor 1	CNR1	P21554	CHEMBL218	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	1506 / 0
Phosphodiesterase 10A	PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	Phosphodiesterase	0,115736675	1486 / 0
Cannabinoid receptor 2	CNR2	P34972	CHEMBL253	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	1301 / 0
MAP kinase p38 alpha	MAPK14	Q16539	CHEMBL260	Kinase	0,115736675	1179 / 0
Metabotropic glutamate receptor 5	GRM5	P41594	CHEMBL3227	Family C G protein-coupled receptor	0,115736675	1074 / 0
Orexin receptor 2	HCRTR2	O43614	CHEMBL4792	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	950 / 0
Orexin receptor 1	HCRTR1	O43613	CHEMBL5113	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	798 / 0
Adenosine A3 receptor	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	521 / 0
P2X purinoceptor 7	P2RX7	Q99572	CHEMBL4805	Ligand-gated ion channel	0,115736675	484 / 0
Vanilloid receptor	TRPV1	Q8NER1	CHEMBL4794	Voltage-gated ion channel	0,115736675	481 / 0
Melatonin receptor 1A	MTNR1A	P48039	CHEMBL1945	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	468 / 0
Monoamine oxidase B	MAOB	P27338	CHEMBL2039	Oxidoreductase	0,115736675	448 / 0
Cholecystokinin B receptor	CCKBR	P32239	CHEMBL298	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	438 / 0
Melatonin receptor 1B	MTNR1B	P49286	CHEMBL1946	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	434 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK2	JAK2	O60674	CHEMBL2971	Kinase	0,115736675	433 / 0
Thrombin and coagulation factor X	F10	P00742	CHEMBL244	Protease	0,115736675	386 / 0
Epoxide hydratase	EPHX2	P34913	CHEMBL2409	Protease	0,115736675	384 / 0
Neuropeptide Y receptor type 5	NPY5R	Q15761	CHEMBL4561	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	381 / 0
Phosphodiesterase 5A	PDE5A	O76074	CHEMBL1827	Phosphodiesterase	0,115736675	381 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK3	JAK3	P52333	CHEMBL2148	Kinase	0,115736675	364 / 0
Dopamine D2 receptor	DRD2	P14416	CHEMBL217	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	360 / 0
Cytochrome P450 19A1	CYP19A1	P11511	CHEMBL1978	Cytochrome P450	0,115736675	358 / 0
Gamma-secretase	EN NCSTN APH1A P92542 Q96B13		CHEMBL209413	Protease	0,115736675	345 / 0
Anandamide amidohydrolase	FAAH	O00519	CHEMBL2243	Enzyme	0,115736675	324 / 0
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor	HTR2A	P28223	CHEMBL224	Family A G protein-coupled receptor	0,115736675	315 / 0

Рисунок 3.4 Топ-25 найбільш пов'язаних з IFT\_252 мішеней, отриманих за допомогою онлайн-інструмента SwissTargetPrediction.

Для більшості досліджуваних сполук ймовірність (Probability) коливається від 0,1016 до 0,1157, що є відносно низькою ймовірністю, а досліджувана молекула має помірну спорідненість або частковий агонізм/антагонізм. Оскільки сполуки IFT\_180 та IFT\_262 мають ймовірність 0, це означає, що система не ідентифікувала значної структурної подібності між досліджуваною молекулою та відомими лігандами для конкретної мішені. Проте низька

ймовірність або її відсутність не тотожні відсутності активності. Вона може вказувати на унікальність хімічної структури або її низьку спорідненість до відомих мішеней, а також що молекули потенційно активні, а мішені – нетипові або маловивчені та може свідчити про новий хімічний клас для певної біологічної активності.



Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Cannabinoid receptor 1	CNR1	P21554	CHEMBL218	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	972 / 0
Cannabinoid receptor 2	CNR2	P34972	CHEMBL253	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	864 / 0
Metabotropic glutamate receptor 5 (by ho	GRM5	P41594	CHEMBL3227	Family C G protein-coupled receptor	0,097239989	832 / 0
Orexin receptor 2	HCRTR2	O43614	CHEMBL4792	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	797 / 0
Orexin receptor 1	HCRTR1	O43613	CHEMBL5113	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	658 / 0
Adenosine A1 receptor (by homology)	ADORA1	P30542	CHEMBL226	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	561 / 0
MAP kinase p38 alpha	MAPK14	Q16539	CHEMBL260	Kinase	0,097239989	542 / 0
Translocator protein (by homology)	TSPO	P30536	CHEMBL5742	Membrane receptor	0,097239989	518 / 0
11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1	HSD11B1	P28845	CHEMBL4235	Enzyme	0,097239989	496 / 0
Melatonin receptor 1A	MTNR1A	P48039	CHEMBL1945	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	463 / 0
P2X purinoceptor 7 (by homology)	P2RX7	Q99572	CHEMBL4805	Ligand-gated ion channel	0,097239989	444 / 0
Melatonin receptor 1B	MTNR1B	P49286	CHEMBL1946	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	389 / 0
Vascular endothelial growth factor recepto	KDR	P35968	CHEMBL279	Kinase	0,097239989	379 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK2	JAK2	O60674	CHEMBL2971	Kinase	0,097239989	330 / 0
Cathepsin K	CTSK	P43235	CHEMBL268	Protease	0,097239989	324 / 0
Adenosine A3 receptor	ADORA3	P0DMS8	CHEMBL256	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	310 / 0
Epoxide hydratase	EPHX2	P34913	CHEMBL2409	Protease	0,097239989	290 / 0
Protein farnesyltransferase	FNTA FNTB	P49354 P49356	CHEMBL209410	Enzyme	0,097239989	286 / 0
Tyrosine-protein kinase JAK3	JAK3	P52333	CHEMBL2148	Kinase	0,097239989	278 / 0
Carbonic anhydrase II	CA2	P00918	CHEMBL205	Lyase	0,097239989	277 / 0
Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	P49841	CHEMBL262	Kinase	0,097239989	271 / 0
Neuropeptide Y receptor type 5 (by homo	NPY5R	Q15761	CHEMBL4561	Family A G protein-coupled receptor	0,097239989	263 / 0
Phosphodiesterase 5A	PDE5A	O76074	CHEMBL1827	Phosphodiesterase	0,097239989	249 / 0
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	O75874	CHEMBL200762	Enzyme	0,097239989	234 / 0
Progesterone receptor	PGR	P06401	CHEMBL208	Nuclear receptor	0,097239989	230 / 0

Рисунок 3.5 Топ-25 найбільш пов'язаних з IFT<sub>257</sub> мішеней, отриманих за допомогою онлайн-інструмента SwissTargetPrediction.

Таким чином, отримані дані за допомогою он-лайн сервісу SwissTargetPrediction дозволили передбачати ймовірність наявності знеболювальної та/чи протизапальної активності у досліджуваних нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину та стали підставою для експериментальної верифікації даних.

### **3.2 Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного термічним фактором**

Первинну оцінку анальгетичної активності проведено на моделі термічної стимуляції («гаряча платівка») [245], що характеризує спінальний рівень антиноцицептивної активності з метою виявлення центрального впливу на ноцицептивну систему. Вона ґрунтується на вимірюванні латентного періоду (часу до прояву больової реакції) у тварин після введення тестових сполук.

Як референтний препарат використано кеторолак, що є одним із найпотужніших ненаркотичних анальгетиків [286]. Кеторолак – гетероциклічне похідне оцтової кислоти – широко відомий знеболювальний засіб та НПЗЗ, що зазвичай використовується як анальгетик широкого спектру дії. Кеторолак може застосовуватися або у вигляді таблеток, або у вигляді розчину для внутрішньом'язових ін'єкцій, і є рацемічною сумішшю (S)-(-)-форми (активна) та (R)-(+)-форми [287]. Кеторолак пригнічує активність ЦОГ-1 та ЦОГ-2 і блокує синтез PG. Подібно до інших анальгетиків, кеторолак виявляє низку негативних побічних ефектів, насамперед з боку органів ШКТ (діарея, нудота, гастралгія, диспепсія тощо), з боку центральної нервової системи (сонливість, головний біль, запаморочення) та інші. Також можливі прояви алергічних реакцій [29].

Тест-речовини (досліджувана речовина та речовина порівняння кеторолак) вводили тваринам у тест-дозі 25 мг/кг маси тіла в/ш, а об'єм що вводився тваринам, не перевищував 0,2 мл на тварину.

Встановлено, що досліджувані нові похідні 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного термічним фактором, виявили антиноцицептивний ефект в діапазоні від +22,63 % до +232,57 % (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного в мишей термічним фактором у тесті «Гаряча пластина»  
( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Сполука	Латентний період до появи больової реакції, с		Анальгетичний ефект, %
	вихідний	через 60 хвилин	
1	2	3	4
IFT_180	10,36±1,85	33,78±7,39	+226,06*
IFT_247	13,06±2,20	30,36±3,66	+232,47*
IFT_248	12,46±1,60	30,38±7,97	+143,82
IFT_249	12,15±1,78	15,38±2,05	+26,58
IFT_250	13,50±0,96	20,82±1,95	+154,22*
IFT_251	8,86±0,55	23,20±4,99	+161,85*
IFT_252	10,98±1,54	24,74±2,33	+225,32*
IFT_253	13,30±2,08	22,22±4,52	+67,07
IFT_255	11,36±2,63	21,21±2,78	+86,71*
IFT_256	9,24±2,49	12,82±2,03	+72,07
IFT_257	14,92±1,87	34,70±4,11	+232,57*
IFT_258	13,56±1,65	26,78±2,09	+197,49*
IFT_259	11,22±1,68	15,30±2,36	+36,36
IFT_260	10,82±1,64	19,57±2,96	+80,87*
IFT_261	9,94±1,41	19,62±4,57	+97,38
IFT_262	8,86±0,79	20,72±1,34	+133,86*

продовження таблиці 3.2

1	2	3	4
IFT_263	9,66±1,74	19,78±4,04	+104,01
IFT_370	12,00±2,01	30,34±7,61	+152,83*
IFT_371	10,30±1,77	18,46±2,63	+79,22*
IFT_372	12,82±1,25	19,90±2,85	+55,23*
IFT_373	12,46±2,09	15,28±3,34	+22,63
IFT_375	12,98±1,91	20,64±6,78	+59,01
IFT_376	11,06±1,36	20,70±2,94	+87,16*
Кеторолак	9,28±1,13	19,74±2,17	+112,71*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з вихідним.

Найменший вплив на больову реакцію спричинили сполуки IFT\_373 (+22,63 %), IFT\_249 (+26,58 %), IFT\_259 (+36,36 %) та IFT\_372 (+55,23 %), а їх аналгетичний ефект становить  $< 50,0$  % ефективності щодо кеторолаку (+112,71 %). Інші сполуки, а саме IFT\_375 (+59,01 %), IFT\_253 (+67,07 %), IFT\_256 (+72,07 %), IFT\_371 (+79,22 %) та IFT\_260 (+80,87 %), виявляли помірну аналгетичну активність ( $< 75,0$  % ефективності щодо кеторолаку).

Схожий з кеторолаком аналгетичний ефект виявили сполуки IFT\_255 (+86,71 %), IFT\_376 (+87,16 %), IFT\_261 (+97,38 %), IFT\_263 (+104,01 %) та IFT\_262 (+133,86 %), а у сполук: IFT\_248 (+143,82 %), IFT\_250 (+154,22 %), IFT\_370 (+152,83 %), IFT\_251 (+161,85 %) переважав його. Значно вищий знеболювальний ефект порівняно з кеторолаком продемонстрували 5 сполук: IFT\_258 (+197,49 %), IFT\_252 (+225,32 %), IFT\_180 (+226,06 %), IFT\_247 (+232,47 %) та IFT\_257 (+232,57 %).

Встановлено, що більшість досліджуваних речовин виявила виражений антиноцицептивний ефект, а характерною особливістю структури похідних 5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину є модифікація замісників у 3, 5, 6, 7 положеннях гетероциклу. Так, сполука IF\_372, що має радикали у 5 і 7 положеннях гетероциклу та фенольний радикал у 6 положенні, виявила

помірний антиноцицептивний ефект. Введення метильних замісників у параположення бензольного кільця та в 3 положення тіазолового фрагмента гетероциклу (сполука IFT\_371) викликало збільшення аналгетичної активності порівняно з активністю сполуки IFT\_372. Виділення з параположення бензольного кільця структури IFT\_371 метильної групи (сполука IFT\_247) чи заміна її на ізопропільний радикал (сполука IFT\_248) спричинили різке підвищення антиноцицептивної активності до 232,46 чи 143,82 % відповідно.

Результати дослідження вказують, що антиноцицептивна активність вивчених сполук пов'язана з модуляцією замісників у пара-положенні бензольного кільця структури 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Так, наприклад, введення у пара-положення атому бромів нивілює антиноцицептивну дію (сполука IFT\_259).

Таким чином, вивчені похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів за антиноцицептивною активністю на моделі болю, викликаного термічним фактором, можна розтшувати у такий ряд: IFT\_257 > IFT\_247 > IFT\_180 > IFT\_252 > IFT\_258 > IFT\_251 > IFT\_370 > IFT\_250 > IFT\_248 > IFT\_262 > кеторолак > IFT\_263 > IFT\_261 > IFT\_376 > IFT\_255 > IFT\_260 > IFT\_371 > IFT\_256 > IFT\_253 > IFT\_375 > IFT\_372 > IFT\_259 > IFT\_249 > IFT\_373.

### **3.3. Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного хімічним фактором**

На наступному етапі дослідження оцінено аналгетичну активність на моделі хімічної стимуляції очередини («оцтовокислі корчі»), що використовується для оцінки периферичного впливу на ноцицептивну систему [249]. Вона ґрунтується на підрахунку кількості характерних скорочень м'язів черевного преса («корчів») у мишей після в/о введення 0,6% розчину оцтової кислоти. Введення розчину оцтової кислоти сприяє загальній активації

ноцицептивної системи та місцевому вивільненню брадикініну, гістаміну, серотоніну PG тощо [243]. Для порівняння обрано кеторолак як один з найпотужніших ненаркотичних анальгетиків [286].

Встановлено, що досліджувані нові похідні 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю, викликаного хімічним фактором, виявили активність в діапазоні від -72,35% до -25,89% (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Оцінка знеболювального ефекту нових похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі болю «оцтовокислі корчі», викликаного в мишей хімічним фактором ( $M \pm m$ ,  $n=7-10$ )

Сполука	Число «корчів»		Зменшення кількості «корчів», %
	вихідне	через 60 хв	
1	2	3	4
IFT_180	26,00±1,07	11,90±1,74	-54,23*
IFT_256	26,00±3,70	9,40±1,31	-63,84*
IFT_259	26,00±3,70	18,01±3,67	-30,71
IFT_261	26,00±3,70	9,41±2,57	-63,85*
IFT_262	26,00±3,70	9,80±3,24	-62,30*
IFT_263	26,00±3,70	11,67±2,04	-55,10*
IFT_371	26,00±3,70	14,80±1,48	-43,07*
IFT_372	26,00±3,70	15,80±2,04	-39,23*
IFT_373	26,00±3,70	17,80±0,87	-31,53*
IFT_247	22,80±2,21	7,60±2,30	-66,67*
IFT_250	22,80±2,21	9,60±1,11	-57,89*
IFT_252	22,80±2,21	11,40±1,61	-50,00*
IFT_257	22,80±2,21	8,00±2,31	-64,91*
IFT_258	22,80±2,21	10,60±2,41	-53,50*

продовження таблиці 3.3

1	2	3	4
IFT_260	22,80±2,21	10,60±2,12	-53,51*
IFT_248	22,40±1,88	16,60±2,64	-25,89
IFT_249	22,40±1,88	6,20±1,39	-72,35*
IFT_251	22,40±1,88	13,70±2,04	-38,85*
IFT_253	22,40±1,88	9,40±2,42	-58,04*
IFT_255	22,40±1,88	13,60±2,35	-39,24*
IFT_370	22,40±1,88	15,50±2,12	-30,85*
IFT_375	22,40±1,88	15,40±2,16	-31,25*
IFT_376	22,40±2,21	14,70±1,49	-34,03*
Кеторолак	27,20±2,02	10,60±2,72	-61,02*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з вихідним рівнем.

Сполуки IFT\_248 (-25,89 %), IFT\_259 (-30,71 %) та IFT\_370 (-30,85 %) продемонстрували найменшу активність, що свідчить про їх слабку здатність пригнічувати больову реакцію.

Сполуки IFT\_375 (-31,25 %), IFT\_373 (-31,53 %), IFT\_376 (-34,03 %), IFT\_251 (-38,85 %), IFT\_372 (-39,23 %), IFT\_255 (-39,24 %) та IFT\_371 (-43,07 %) виявляли помірну аналгетичну активність.

Схожий з кеторолаком аналгезуючий ефект на моделі болю, викликаного хімічним фактором, виявили сполуки IFT\_252 (-50,00 %), IFT\_258 (-53,50 %), IFT\_260 (-53,51 %), IFT\_180 (-54,23 %), IFT\_263 (-55,10 %), IFT\_250 (-57,89 %), IFT\_253 (-58,04 %).

Сполуки IFT\_262 (-62,30 %), IFT\_256 (-63,84 %), IFT\_261 (-63,85 %), IFT\_257 (-64,91 %) та IFT\_247 (-66,67 %) також мали значну аналгетичну дію (>60% інгібування), що вказує на перспективність цих сполук.

Сполука IFT\_249 (-72,35 %) показала найвищу аналгетичну активність, перевищуючи кеторолак (-61,02%), що свідчить про потенційно виразну



периферичну аналгезію.

На моделі оцтовокислих “корчів” більшість сполук виявила помірну активність, що вказує на те, що заміна замісників у системі 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину не мала суттєвого значення для прояву антиноцицептивного ефекту на цій моделі. Однак наявність фенольного радикала в бензольному кільці гетероциклу (сполука IFT\_247) викликала суттєве збільшення аналгетичної активності до рівня кеторолаку.

Отже, вивчені похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів за антиноцицептивною активністю на моделі болю, викликаного термічним фактором, можна розташувати таким чином: IFT\_249 > IFT\_247 > IFT\_257 > IFT\_261 > IFT\_256 > IFT\_262 > Кеторолак > IFT\_253 > IFT\_250 > IFT\_263 > IFT\_180 > IFT\_260 > IFT\_258 > IFT\_252 > IFT\_371 > IFT\_255 > IFT\_372 > IFT\_251 > IFT\_376 > IFT\_373 > IFT\_375 > IFT\_370 > IFT\_259 > IFT\_248.

### **3.4 Оцінка протизапального ефекту нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі ексудативного запалення**

Зазначений етап передбачав оцінку протизапальної активності синтезованих сполук на моделі ексудативного запалення (карагеніновий набряк) [243, 250]. Для оцінки протизапального ефекту нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі карагенінового набряку використовували вимірювання ступеня зменшення набряку лапи миші після введення досліджуваних речовин у порівнянні з контролем і препаратом порівняння— диклофенаком натрію.

Встановлено, що досліджувані похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі ексудативного запалення продемонстрували варіативний протизапальний ефект, а ступінь інгібування

набряку становить від -32,57% до -1,7% (табл. 3.4). Сполуки IFT\_250 (-3,96 %), IFT\_180 (-1,70 %) та IFT\_253 (0,00 %) показали найменші зачення, що свідчить про низьку або відсутню протизапальну активність. Сполуки IFT\_247 (-8,33 %), IFT\_256 (-14,01 %), IFT\_252 (-14,42 %), IFT\_257 (-15,08), IFT\_376 (-15,40 %), IFT\_371 (-16,41 %) та IFT\_255 (-17,75 %) виявляли помірну протизапальну активність. Сполуки IFT\_260 (-18,67 %), IFT\_249 (-19,63 %), IFT\_263 (-21,48 %), IFT\_375 (-25,25 %), IFT\_248 (-26,38 %) та IFT\_251 (-26,38 %) мали виразну, але менш ефективну протизапальну дію у порівнянні з диклофенаком.

Таблиця 3.4

Оцінка протизапального ефекту нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів на моделі ексудативного запалення у мишей (карагеніновий набряк) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Сполука	Величина набряку, мг		Зменшення набряку, %
	контроль	дослід	
1	2	3	4
IFT_180	64,80±6,04	63,70±6,49	-1,70
IFT_255	64,80±6,04	53,30±6,18	-17,75
IFT_260	64,80±6,04	52,70±5,58	-18,67
IFT_247	50,40±4,40	46,20±7,87	-8,33
IFT_250	50,40±4,40	48,40±5,22	-3,97
IFT_257	50,40±4,40	42,80±4,53	-15,08
IFT_248	65,20±5,90	48,00±6,66	-26,38
IFT_249	65,20±5,90	52,40±8,81	-19,63
IFT_251	65,20±5,90	48,00±3,7	-26,38*
IFT_252	65,20±5,90	55,80±3,5	-14,42
IFT_253	65,20±5,90	65,20±8,58	0,00
IFT_370	79,20±3,41	55,60±3,51	-29,80*
IFT_371	79,20±3,41	66,20±5,56	-16,41
IFT_372	79,20±3,41	56,60±7,47	-28,53*
IFT_373	79,20±3,41	53,40±8,4	-32,57*

продовження таблиці 3.4

1	2	3	4
IFT_375	79,20±3,41	59,20±8,98	-25,25
IFT_376	79,20±3,41	67,00±4,37	-15,40
IFT_256	59,60±4,96	51,20±5,26	-14,01
IFT_259	59,60±4,96	56,80±4,90	-4,67
IFT_261	59,60±4,96	41,80±6,53	-29,87
IFT_262	59,60±4,96	42,40±5,44	-28,86*
IFT_263	59,60±4,96	46,80±5,01	-21,48
диклофенак натрію	59,60±4,96	38,40±4,72	-35,57*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

Жодна з досліджуваних сполук не перевершила диклофенак натрію за пригніченням набряку (-35,57 %). Проте значний протизапальний ефект, що наближається до дії диклофенаку, виявили сполуки IFT\_372 (-28,53 %), IFT\_262 (-28,86 %), IFT\_370 (-29,80 %), IFT\_261 (-29,87 %) та IFT\_373 (-32,57 %). Це вказує на перспективність зазначених сполук.

Досліджуваним похідним 5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину притаманний певний антиексудативний ефект, проте найбільш активна як анальгетик сполука IFT\_247 не виявила антиексудативних властивостей. Неактивна як потенційний анальгетик сполука IF\_373 мала протизапальний ефект, близький до такого в диклофенаку натрію.

При утворенні ацетилових груп тіазинового кільця шляхом виключення метилових груп зі сполуки IFT\_373, що характеризувалося наявністю 5-оксопропільного радикала, відзначали антиексудативний ефект, близький до активності диклофенаку натрію (сполука IFT\_372). Близьку протизапальну активність виявляла сполука IFT\_248. Отже, протизапальна активність вивчених сполук може бути пов'язана з наявністю ацетильних замісників у тіадіазиновому фрагменті. Введення алкільних груп у тріазоловий фрагмент чи

до бензольного кільця тіадизину не відіграло істотної ролі у формуванні протизапальної активності.

Таким чином, вивчені похідні 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів та препарат порівняння за протизапальною активністю на моделі ексудативного запалення (карагеніновий набряк) можна розташувати в такій послідовності: диклофенак натрію > IFT\_373 > IFT\_261 > IFT\_370 > IFT\_262 > IFT\_372 > IFT\_248 > IFT\_251 > IFT\_375 > IFT\_263 > IFT\_249 > IFT\_260 > IFT\_255 > IFT\_371 > IFT\_376 > IFT\_257 > IFT\_252 > IFT\_256 > IFT\_247 > IFT\_259 > IFT\_250 > IFT\_180 > IFT\_253.

### Висновки до розділу 3

1. Прогноз за допомогою он-лайн сервісу SwissTargetPrediction синтезованих сполук показав вірогідність широкого спектру біологічних активностей, який може бути пов'язаний із впливом на різні рецепторні та ферментні системи організму.

2. Всі досліджувані сполуки виявили схожі імовірності активностей, що можна пояснити близькістю їх молекулярних структур (всі вони є похідними 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину).

3. Отримані дані дозволили передбачати ймовірність наявності знеболювальної активності та/чи протизапальної дії, що стало підставою для експериментальної верифікації.

4. Експериментальна верифікація антиноцицептивної активності 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів, що проводилась на моделях “гарячої пластини” та оцтовокислих “корчів” з метою виявлення центрального та периферичного впливу на ноцицептивну систему відповідно, засвідчила, що досліджувані сполуки виявляють виразну антиноцицептивну активність.

5. Більшості досліджуваних похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину притаманний помірний антиексудативний ефект, за яким вони поступаються референтному препарату диклофенаку натрію. Сполуки, найбільш активні як анальгетики, не виявили виразного ефекту, а неактивні як анальгетики, навпаки, виявили протизапальний ефект, близький до такого в диклофенаку натрію.

6. Антиноцицептивна активність у похідних 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину пов'язана з модифікацією структури у пара-положенні бензольного кільця.

7. Для подальших досліджень відібрані сполуки IFT\_247 (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-1,2,4-тіазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)етанон), IFT\_180 (5,7-дибутироніл-3-метил-6-(4-ізопропілфеніл)-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин) та IFT\_251 (5,7-диацетил-3-метил-6-(4-метоксифеніл)-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин), що мають різні співвідношення знеболювальних та протизапальних властивостей, не поступаються чи переважають кеторолак на моделях ноцицептивної стимуляції ("гаряча пластина" та оцтовокислі "корчі").

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298]

## РОЗДІЛ 4

### ПОГЛИБЛЕНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НОВИХ ПОХІДНИХ 5,7-ДІАЦИЛ-3- Н(АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5Н-[1,2,4]ТРІАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ

На цьому етапі дослідження для визначення можливого механізму дії нових похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину використано методологію молекулярного докінгу. Молекулярний докінг дозволяє передбачати афінність (спорідненість) ліганду до біомішені, оцінити енергію взаємодії між лігандом і білком, а також виявити ключові амінокислотні залишки мішеней, що беруть участь у взаємодії з лігандами.

Результати попередніх етапів дослідження дозволили обрати найбільш активних представників похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Подальші дослідження передбачали вивчення гострої токсичності та цитотоксичності найбільш активних сполук, оскільки це є ключові етапи доклінічного вивчення потенційних лікарських засобів. Вони необхідні для визначення безпечного діапазону доз, оцінки можливих ризиків для здоров'я, а також для прийняття рішення щодо подальших тестів *in vivo* і клінічних випробувань.

Було проведено визначення летальної дози (ЛД<sub>50</sub>) та встановлення класу токсичності відповідно до міжнародних класифікацій (класифікація Hodge & Sterner), а також проведено вивчення цитотоксичності на культурах клітин (НЕК-293Т, J774.2) для виявлення потенційно шкідливого впливу на нормальні клітини ссавців.

Також на цьому етапі виконано скринінг низки найактивніших сполук (IFT\_247, IFT\_251, IFT\_180) на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження у мишей.

#### 4.1 Визначення можливого механізму дії досліджуваних нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину *in silico* (молекулярний докінг)

Гіпотезу щодо можливого механізму дії досліджуваних сполук обґрунтовано методом молекулярного докінгу, що дозволяє моделювати взаємодію між малою молекулою і цільовим біологічним макромолекулярним рецептором та прогнозувати положення та силу взаємодії ліганду з активним центром білка.

Прогнозовані значення енергії зв'язування комплексів білок-ліганд, отримані в результаті докінгових досліджень похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, наведено в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Енергії зв'язування комплексів білок-ліганд на основі докінгових досліджень похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

Сполука / препарат	ЦОГ-1 PDB 5WBE (ккал/моль)	ЦОГ-2 PDB 3LN1 (ккал/моль)	5-ЛОГ PDB 3V92 (ккал/моль)	ЛОАП PDB 6VGI (ккал/моль)
1	2	3	4	5
IFT_372	-5,3	-7,7	-7,4	-7,5
IFT_373	-6,0	-7,3	-6,8	-7,9
IFT_247	-7,2	-6,3	-6,9	-6,7
IFT_371	-7,6	-6,4	-7,1	-6,8
IFT_249	-7,8	-6,9	-6,9	-6,9
IFT_248	-6,6	-7,1	-7,2	-7,2
IFT_251	-7,7	-6,4	-6,9	-6,6
IFT_370	-7,5	-6,3	-7,0	-6,7
IFT_253	-8,3	-7,1	-7,1	-7,0
IFT_252	-4,5	-6,5	-6,9	-8,1
IFT_375	-7,1	-6,3	-6,8	-6,7
IFT_376	-2,4	-2,8	-8,4	-8,5
IFT_250	-5,3	-7,5	-7,0	-7,5

продовження таблиці 4.1

1	2	3	4	5
IFT_260	-5,2	-7,1	-7,1	-6,9
IFT_257	-3,7	-6,9	-6,9	-6,7
IFT_255	-5,9	-7,6	-7,1	-7,2
IFT_180	-4,2	-7,7	-6,8	-7,6
IFT_258	-5,8	-7,3	-7,0	-7,0
IFT_263	-6,0	-7,4	-7,2	-7,1
IFT_256	-5,7	-6,6	-6,7	-6,9
IFT_262	-5,8	-7,4	-6,9	-7,3
IFT_261	-5,3	-7,2	-7,1	-6,8
IFT_259	-4,9	-7,0	-6,9	-6,7
Кеторолак	-8,7	-8,8	-8,1	-6,2
Мофезолак	-8,8	-	-	-
Целекоксиб	-	-12,3	-	-
Лікофелон	-	-	-10,0	-
МК-866	-	-	-	-7,9

Значення енергії зв'язування менше -7,0 ккал/моль зазвичай свідчать про високу спорідненість,  $\geq -6,0$  – середню, а -5,0 і вище – слабку. Аналіз результатів молекулярного докінгу з точки зору енергії зв'язування між потенційними лігандами (нові сполуки та відомі НПЗЗ) та відповідними мішенями (ЦОГ-1, ЦОГ-2, 5-ЛОГ, ЛОАП) засвідчив, що лише окремі похідні показали багатофокусну активність (IFT\_253, IFT\_249, IFT\_248).

Також можна зробити висновки щодо окремих мішеней. Зокрема, до ЦОГ-1 (PDB: 5WBE) більшість нових сполук мають енергію зв'язування від -6,0 до -7,8, тобто від середньої до високої спорідненості, а кращими в цьому аспекті сполуками, що мають від помірної до високої афінності, є IFT\_249 (-7,8), IFT\_251 (-7,7), IFT\_371 (-7,6) та IFT\_370 (-7,5). Найвища афінність характерна для IFT\_253 (-8,3), що наближається до кеторолаку (-8,7).

До ЦОГ-2 (PDB: 3LN1) мають досить високу афінність сполуки IFT\_272 (-7,7), IFT\_180 (-7,7), IFT\_255 (-7,6), IFT\_250 (-7,5), проте вона значно нижче за афінність кеторолаку (-8,8) та целекоксибу (-12,3).



До 5-ЛОГ (PDB: 3V92) енергію зв'язування в межах -7,1...-7,2 – середня/висока афінність мають сполуки IFT\_248, IFT\_253, IFT\_260, IFT\_255, IFT\_263. Найкраща серед нових похідних і навіть сильніша, ніж кеторолак (-8,1), сполука IFT\_376 (-8,4), проте суттєво слабша за потужний інгібітор ліпооксигенази лікофелон (-10,0).

Афінитет до ЛОАП (PDB: 6VGI) для більшості досліджуваних сполук перебуває в діапазоні від -6,6 до -7,5, що свідчить про їх помірну активність. Найвища спорідненість притаманна сполукам IFT\_252 (-8,1) та IFT\_376 (-8,5).

Як приклад можна навести взаємодію IFT\_262 з ЦОГ-2. Сполука всередині алостеричного центру утворює ряд взаємодій, у тому числі водневі зв'язок з Ser516 довжиною 1.57Å. 4-Етоксифенільне ядро допасовується до гідрофобної кишені всередині алостеричного центру ЦОГ-2, який утворений рядом ліпофільних альфатичних та ароматичних амінокислот. Тріазольна частина молекули також вступає в ліпофільну нековалентну взаємодію з Val335, Ala513 та Leu517.

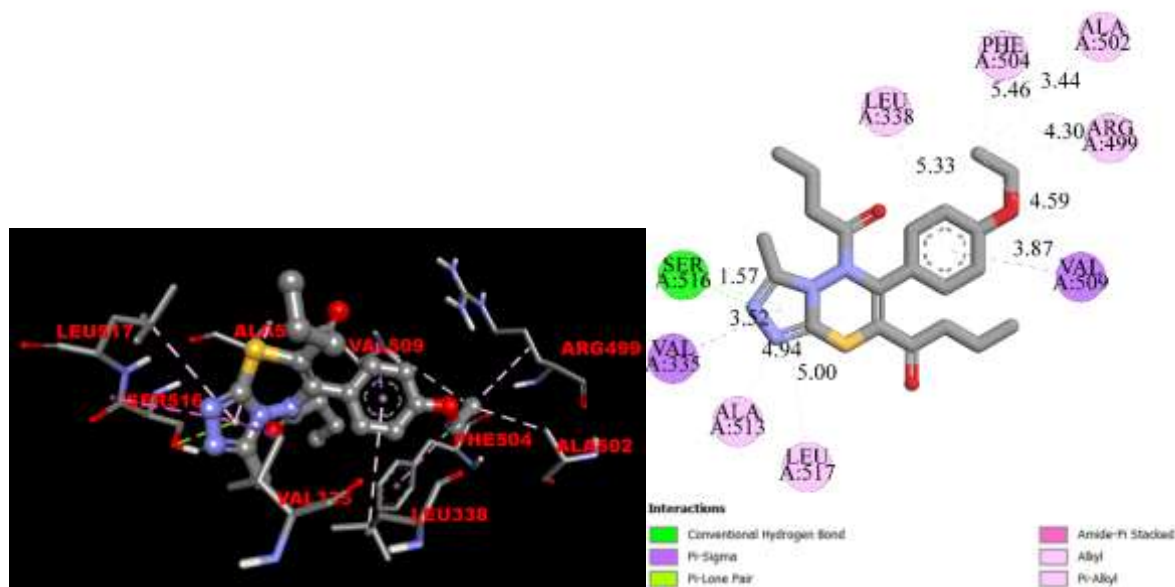


Рисунок 4.1 Взаємодія IFT\_262 з ЦОГ-2 всередині алостеричного центру ензиму

Таким чином, згідно з отриманими даними нові похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину виявляють свій протизапальний вплив переважно через вплив на ЛОАП та меншою мірою через 5-ЛОГ.

Вплив на ЦОГ-1 та ЦОГ-2 є меншим у порівнянні з референтними лікарськими засобами, однак дана взаємодія може збільшувати сумарний протизапальний ефект досліджуваних речовин.

Також спостерігається невелика перевага взаємодії з ЦОГ-2, що свідчить про потенційно більш безпечний фармакологічний профіль цієї групи гетероциклічних сполук з меншою кількістю побічних ефектів з боку ШКТ.

#### **4.2 Дослідження гострої токсичності найбільш активних похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину**

Гостра токсичність – це показник, що характеризує шкідливий вплив речовини на організм за одноразового введення. Основним параметром гострої токсичності є летальна доза, що спричиняє смерть 50% піддослідних тварин (ЛД<sub>50</sub>).

Для визначення гострої токсичності найбільш активних похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину використано стандартний підхід, що широко застосовується у токсикологічних дослідженнях фармакологічних сполук та ґрунтується на розрахунках кількісних параметрів дії, що вражає організм, із використанням експрес-методу [243].

Гостру токсичність досліджуваних сполук оцінювали на лабораторних тваринах (мишах) шляхом одноразового в/ш введення відповідно до методу Прозоровського. Визначали кількість загиблих тварин за різних доз, після чого розраховували ЛД<sub>50</sub> за спеціальними таблицями (табл. 2.6), заснованими на відсотку загибелі тварин за кожної дози.

Результати дослідження наведено в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Гостра токсичність сполук  
за одноразового внутрішньошлункового введення мишам

Сполука	Доза, мг/кг	Результат, загибель	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг
IFT_180	2000	0	4500±350
	3170	0	
	3980	0	
	5010	2	
	6310	2	
IFT_247	2000	0	2840±340
	2500	1	
	3170	1	
	3980	1	
	5010	2	
IFT_251	2000	0	3570±280
	2500	0	
	3170	0	
	3980	2	
	5010	2	
IFT_252	2000	0	2840±340
	2500	1	
	3170	1	
	3980	1	
	5010	2	
IFT_257	2000	0	3310±320
	2500	0	
	3170	1	
	3980	2	
	5010	2	

За визначенні гострої токсичності для усіх досліджуваних сполук (IFT\_180, IFT\_247, IFT\_251, IFT\_252, IFT\_257) доза 2000 мг/кг не викликала летального ефекту в жодної миші. Сполуки IFT\_247 та IFT\_252 починають викликати летальність вже з 2500 мг/кг і мають подібну токсичність – на рівні ЛД<sub>50</sub> (2840 мг/кг). Сполуки IFT\_251 та IFT\_257 виявляють токсичність у дозах

> 3170 мг/кг, але з різною швидкістю наростання летальності. Частка загиблих мишей збільшується зі зростанням дози майже для всіх сполук, що відповідає типовій дозозалежній токсичності.

На підставі отриманих результатів розраховано  $LD_{50}$ , що коливається в діапазоні від  $2840 \pm 340$  мг/кг до  $4500 \pm 350$  мг/кг, а найнижчу токсичність серед досліджуваних сполук виявила IFТ\_180, яка має найвищу  $LD_{50}$  (4500 мг/кг).

Таким чином, усі досліджувані сполуки належать до IV класу токсичності ( $500 \text{ мг/кг} < LD_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$ ) за класифікацією Hoge та Sterner [243, 299], тобто є малотоксичними, що дозволяє розглядати їх як потенційно безпечні для подальших доклінічних досліджень.

#### **4.3 Дослідження цитотоксичної дії *in vitro* найбільш активних похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5-*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на клітини ссавців**

На цьому етапі роботи вивчали цитотоксичну дію *in vitro* 5 найбільш активних похідних на клітини різного тканинного походження за допомогою МТТ-тесту. Метод МТТ – це колориметричний тест, що використовується для оцінки життєздатності клітин, здебільшого у токсикологічних, фармакологічних і біомедичних дослідженнях. Принцип методу МТТ полягає у відновленні жовтого тетразолієвого барвника МТТ до фіолетового формазану мітохондріальними ферментами життєздатних клітин, що дозволяє оцінити їх метаболічну активність. Що більше живих клітин, то більше формазану утворюється, то вище оптична густина. Якщо клітини гинуть (наприклад, після дії токсичної сполуки), то утворюється менше формазану, реєструється нижчий сигнал. Використано такі лінії клітин: НЕК293Т – трансформовані клітини нирки ембріона людини та J774.2 – макрофаги миші.

Для оцінювання цитотоксичної дії сполук використовували 2 показники:  $IC_{30}$  і  $IC_{50}$ .  $IC_{30}$  – концентрація сполуки, що пригнічує виживаність клітин на 30% порівняно з контролем;  $IC_{50}$  – напівінгібувальна концентрація сполуки, що

пригнічує виживаність клітин на 50% порівняно з контролем. У стандарті ISO 10993-5:2009 [300] і ДСТУ EN ISO 10993-5:2015 [301] зазначено, що якщо життєздатність клітин після впливу матеріалу перевищує 70% порівняно з контролем, такий матеріал вважається нецитотоксичним. Цей поріг застосовується за оцінки біосумісності медичних виробів за допомогою *in vitro* методів, в тому числі і такого як МТТ.

Встановлено, що сполука IFT\_180 пригнічувала виживаність трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії НЕК293Т із показником напівінгібувальної концентрації  $IC_{50}$   $13,63 \pm 3,13$  мкМ, фібробластів миші лінії J774.2 з  $IC_{50}$   $15,32 \pm 1,19$  мкМ (рис. 4.2, табл. 4.3). Під впливом даної сполуки показник  $IC_{30}$  щодо цих клітин становив  $8,18 \pm 0,66$  мкМ для клітин НЕК293Т і  $9,19 \pm 0,50$  мкМ – для J774.2 (рис. 4.2, табл. 4.3). Можна припустити, що IFT\_180 нетоксична для трансформованих клітин нирки ембріона людини і фібробластів миші у концентрації до 8,18-9,19 мкМ.

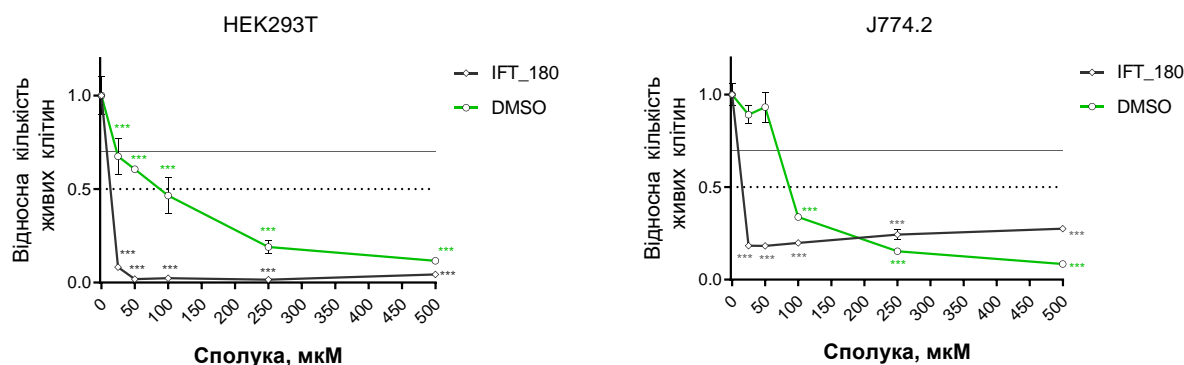


Рисунок 4.2 Цитотоксичний вплив сполуки IFT\_180 та ДМСО на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії НЕК293Т та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами представлені як  $M \pm \sigma$ . Виживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Сполука IFT\_247 знижувала виживаність трансформованих клітин нирки ембріона людини (НЕК293Т) з  $IC_{50}$   $22,52 \pm 0,64$  мкМ та клітинної лінії J774.2 з

$IC_{50}$   $25,38 \pm 0,73$  мкМ (рис. 4.3, табл. 4.3). Значення  $IC_{30}$  для цих клітин становили відповідно  $12,60 \pm 0,29$  мкМ та  $12,22 \pm 0,61$  мкМ, що дозволяє припустити відсутність цитотоксичної дії сполуки IFT\_247 у концентрації до 12,22 мкМ.

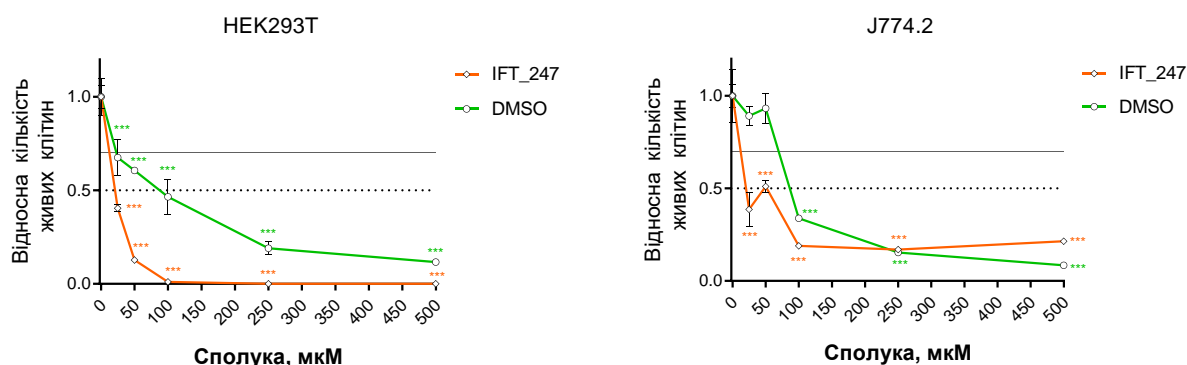


Рисунок 4.3 Цитотоксичний вплив сполуки IFT\_247 та ДМСО на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії HEK293T та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами представлені як  $M \pm \sigma$ . Виживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Сполука IFT\_251 зумовлювала зниження життєздатності трансформованих клітин нирки ембріона людини (HEK293T) та мишачих фібробластів лінії J774.2 із значеннями  $IC_{50}$   $41,34 \pm 0,78$  мкМ і  $49,53 \pm 4,08$  мкМ відповідно (рис. 4.4, табл. 4.3). Значення  $IC_{30}$  для становили  $34,44 \pm 0,33$  мкМ і  $30,52 \pm 0,50$  відповідно. Це дозволяє розглядати концентрації до 30,52–34,44 мкМ як потенційно нетоксичні для зазначених клітинних ліній.

Результати дослідження засвідчили, що сполука IFT\_252 зменшувала кількість живих трансформованих клітин нирки ембріона людини (HEK293T) із значеннями  $IC_{50}$   $254,11 \pm 1,24$  мкМ та мишачих фібробластів (J774.2) із значеннями  $IC_{50}$   $19,80 \pm 1,48$  мкМ (рис. 4.5, табл. 4.3). Значення  $IC_{30}$  для зазначених клітин становили  $152,78 \pm 0,75$  мкМ і  $11,12 \pm 0,58$  мкМ відповідно.

Отримані результати дозволяють припустити, що макрофаги (клітини крові) є суттєво чутливими до дії IFT\_252. Концентрацію до 11,12 мкМ можна

вважати потенційно нетоксичною для макрофагів миші, тоді як концентрацію 152,78 мкМ – для трансформованих клітин нирки ембріона людини.

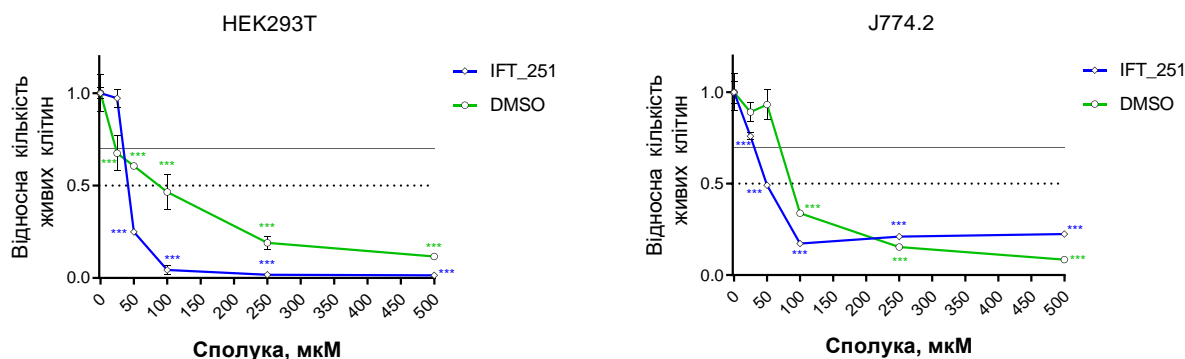


Рисунок 4.4 Цитотоксичний вплив сполуки IFT\_251 та ДМСО на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії HEK293T та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами представлені як  $M \pm \sigma$ . Вживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*\*  $p < 0,001$ .

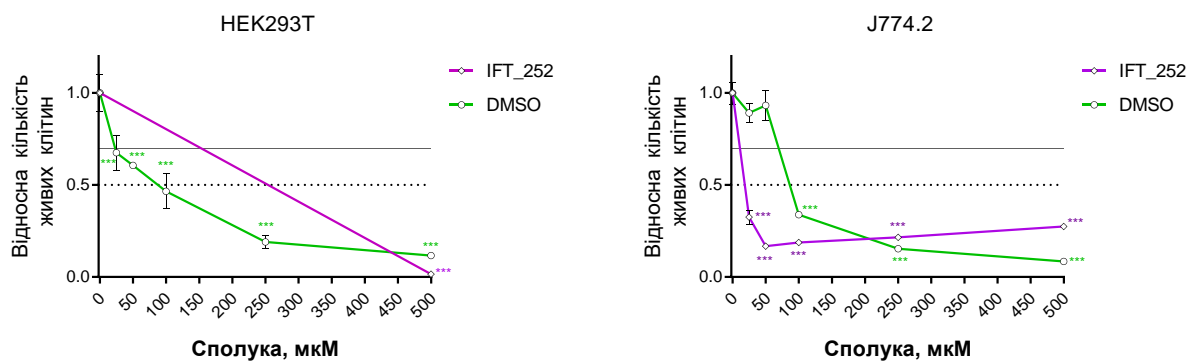


Рисунок 4.5 Цитотоксичний вплив сполуки IFT\_252 та ДМСО на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії HEK293T та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами представлені як  $M \pm \sigma$ . Вживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Встановлено, що сполука IFT\_257 пригнічувала виживаність трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії HEK293T із показником  $IC_{50}$   $356,26 \pm 19,38$  мкМ, а фібробластів миші лінії J774.2 з  $IC_{50}$   $15,32 \pm 1,19$  мкМ (рис. 4.6, табл. 4.3). Під впливом цієї сполуки показник  $IC_{30}$  становив  $256,44 \pm 1,33$  мкМ для клітин HEK293T і  $35,03 \pm 0,36$  мкМ – для клітин J774.2 (рис. 4.6, табл. 4.3). Можемо припустити, що IFT\_257 нетоксична для трансформованих клітин нирки ембріона людини у концентрації 256,44 мкМ і фібробластів миші у концентрації до 35,03 мкМ.

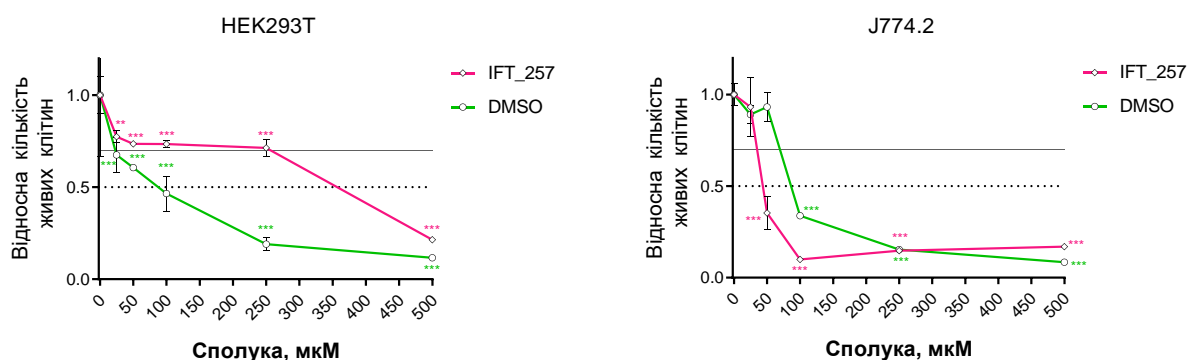


Рисунок 4.6 Цитотоксичний вплив сполуки IFT\_257 та ДМСО на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії HEK293T та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з досліджуваними речовинами представлені як  $M \pm \sigma$ . Виживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Під впливом доксорубіцину показник  $IC_{50}$  становив  $0,75 \pm 0,11$  мкМ для клітин HEK293T і  $0,66 \pm 0,09$  мкМ – для J774.2 (рис. 4.7, табл. 4.3). Отже, доксорубіцин виявив найбільш виражену токсичну дію щодо досліджуваних клітин. Він у 18–475 разів більш токсичний, ніж досліджувані похідні для клітин лінії HEK293T, та у 23–75 разів – для J774.2.

Показники цитотоксичної дії  $IC_{30}$  і  $IC_{50}$  досліджуваних сполук щодо клітинних ліній HEK293T (трансформованих клітин нирки ембріона людини) та J774.2 (макрофагів миші) наведено в таблиці 4.3.



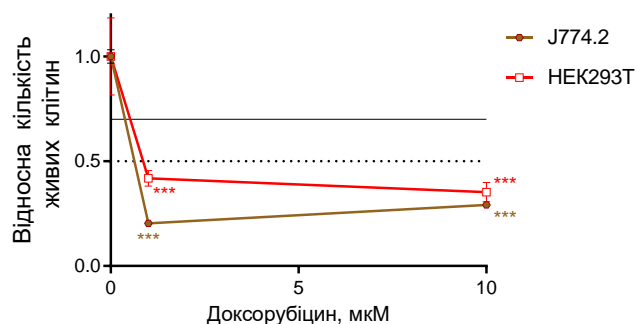


Рисунок 4.7 Цитотоксичний вплив доксорубіцину на трансформовані клітини нирки ембріона людини лінії HEK293T та макрофаги миші лінії J774.2. Дані МТТ тесту після 72 год інкубації клітин з доксорубіцином представлені як  $M \pm \sigma$ . Виживаність клітин у відповідних контролях приймали за 1. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Таблиця 4.3

Показник цитотоксичності досліджуваних речовин для клітинних ліній HEK293T (трансформованих клітин нирки ембріона людини) та J774.2 (макрофагів миші) за даними МТТ тесту на 72 год дії речовин

Речовина	IC <sub>30</sub> , мкМ		IC <sub>50</sub> , мкМ	
	HEK293T	J774.2	HEK293T	J774.2
IFT_180	8,18 ± 0,66	9,19 ± 0,50	13,63 ± 3,13	15,32 ± 1,19
IFT_247	12,60 ± 0,29	12,22 ± 0,61	22,52 ± 0,64	25,38 ± 0,73
IFT_251	34,44 ± 0,33	30,52 ± 0,50	41,34 ± 0,78	49,53 ± 4,08
IFT_252	152,78 ± 0,75	11,12 ± 0,58	254,11 ± 1,24	19,80 ± 1,48
IFT_257	256,44 ± 1,33	35,03 ± 0,36	356,26 ± 19,38	43,66 ± 2,02
ДМСО	23,05 ± 0,70	69,60 ± 1,46	88,43 ± 2,01	86,40 ± 1,71
Dox	0,51 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,75 ± 0,11	0,66 ± 0,09

Примітки: IC<sub>30</sub> – концентрація, що пригнічує виживаність клітин на 30% порівняно з контролем; IC<sub>50</sub> – концентрація, що пригнічує виживаність клітин на 50% порівняно з контролем; ДМСО – диметилсульфоксид; Dox – доксорубіцин

Спираючись на отримані результати, робимо висновок, що досліджувані похідні пригнічували виживаність трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії HEK293T за  $IC_{50}$  13,63-356,26 мкМ та знижували життєздатність макрофагів миші лінії J774.2 за  $IC_{50}$  15,32-49,53 мкМ.

Отже, для трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії HEK293T токсичність досліджуваних похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину знижувалася у такому порядку: IFT\_180 > IFT\_247 > IFT\_251 > IFT\_252 > IFT\_257, тобто IFT\_180 більш токсична, ніж IFT\_257.

Для макрофагів миші лінії J774.2 токсичність похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину знижувалася в такому порядку: IFT\_180 > IFT\_247 > IFT\_252 > IFT\_257 > IFT\_251.

#### **4.4 Скринінг найбільш активних сполук похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на фригопротекторні властивості на моделі гострого загального охолодження**

Лікування холодової травми донині є складним завданням. Набувають розвитку фригопротекторні засоби – збірна група препаратів, що чинять комплексний захисний вплив за низьких температур довкілля. Значну роль у патогенезі холодової травми відіграє запалення [302], тому перспективними фригопротекторами є інгібітори каскаду арахідонової кислоти.

Для скринінгу на фригопротекторну активність на мишах взято три похідні: (1-[5-бутирил-6-(4-ізопропілфеніл)-3-метил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл]-бутан-1-он), лабораторний шифр IFT\_180; (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон), лабораторний шифр IFT\_247; (1-[5-ацетил-6-(4-метоксифеніл)-3-метил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл]-етанон), лабораторний шифр IFT\_251. Вони мають різне співвідношення знеболювальних та протизапальних властивостей.

Дослідження проводили на моделі гострого загального охолодження на самцях білих рандомбредних мишей. Стать тварин обрано на підставі вищої чутливості самців до гострого впливу холоду та виразнішого впливу фригопротекторів саме на самців [303]. Результати скринінгу на фригопротекторну активність наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Вплив похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на час життя мишей на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії ( $M \pm m$ ;  $Me[Q25; Q75]$ )

Група, препарат, кількість тварин	Доза, мг/кг	Час життя, хв	Відмінності щодо контролю, %
Контроль (n=6)	—	56,2±4,8 60,5 [50,0; 65,0]	—
Диклофенак натрію (n=6)	7,0	84,8±6,2** 79,0 [77,0; 90,0]	+50,9
IFT-180 (n=6)	25,0	55,2±3,7 56,0 [46,0; 63,0]	-1,8###
IFT-247 (n=8)	25,0	80,3±4,7** 81,0 [69,65; 87,0]	+43,6
IFT-251 (n=6)	25,0	60,8±4,5 65,0 [55,0; 69,0]	+8,2##

Примітка. Статистична значущість відмінностей з контролем: \*\* –  $p < 0,0$ ; з показником групи диклофенаку натрію: ## –  $p < 0,01$ , ### –  $p < 0,01$ ; n – кількість тварин у групі.

Як видно з отриманих даних (табл. 4.4), сполука IFT\_180 не вплинула на час життя мишей за холодової експозиції. Отже, вона на має фригопротекторних властивостей. Сполука IFT\_251 тенденційно збільшила тривалість життя щодо контролю на 8,2%, а сполука IFT\_247 – статистично

значуще на 43,6% ( $p < 0,01$ ), не поступаючись диклофенаку натрію, що збільшив час виживання мишей на 50,9% ( $p < 0,01$ ).

Таким чином, з-поміж 3 оригінальних похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, що мають властивості НПЗЗ, лише (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон), або сполука IFT\_247, у дозі 25 мг/кг в/ш у мишей виявляє виразну фригопротекторну активність на моделі гострого загального охолодження, не поступаючись диклофенаку натрію. Відсутність фригопротекторних властивостей у споріднених сполук IFT\_180 та IFT\_251, що мають різну виразність протизапального ефекту (відносно слабкий у IFT\_180 та досить потужний у IFT\_251), не суперечить участі запалення як важливої складової патогенезу холодової травми, позаяк виразний захисний ефект за холодової травми виявляють не всі класичні інгібітори ЦОГ. Зокрема, не є ефективними фригопротекторами мефенамінова кислота [225] та парацетамол [226], а протизапальний та фригопротекторний ефекти НПЗЗ дисоціюють [222]. Сполука IFT\_247 на рівні диклофенаку натрію збільшує час життя мишей за гострого загального охолодження, що обґрунтовує доцільність його подальшого поглибленого вивчення, як потенційного протизапального, знеболювального та фригопротекторного засобу.

## Висновки до розділу 4

1. Результати молекулярного докінгу засвідчили, що нові похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину можуть виявляти протизапальний вплив переважно через вплив на 5-ліпоксигеназо активуючий протеїн та меншою мірою через 5- ліпоксигеназу, а вплив на циклооксигеназу-1 та циклооксигеназу-2 є меншим у порівнянні з референтними лікарськими засобами, однак дана взаємодія потенційно збільшує сумарний протизапальний ефект досліджуваних речовин. Також спостерігається невелика перевага взаємодії з циклооксигеназою-2, що свідчить

про потенційний більш безпечний фармакологічний профіль цієї групи гетероциклів з меншою кількістю побічних ефектів.

2. За визначення гострої токсичності при одноразовому внутрішньошлунковому введенні мишам встановлено, що всі 5 досліджуваних сполук належать до IV класу токсичності ( $500 \text{ мг/кг} < \text{LD}_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$ ) за класифікацією Hoge та Sterner, тобто є малотоксичними, що дозволяє розглядати їх як потенційно безпечні для подальших доклінічних досліджень.

3. Дослідження цитотоксичної дії *in vitro* 5 досліджуваних похідних на клітини ссавців показали, що потенційно нетоксичною концентрацією для трансформованих клітин нирки ембріону людини лінії HEK293T у сполуки IFT\_180 є доза  $8,18 \pm 0,66 \text{ мкМ}$ , IFT\_247 –  $12,60 \pm 0,29 \text{ мкМ}$ , IFT\_251 –  $34,44 \pm 0,33 \text{ мкМ}$ , IFT\_252 –  $152,78 \pm 0,75 \text{ мкМ}$  і IFT\_257 –  $256,44 \pm 1,33 \text{ мкМ}$ , а потенційно нетоксичною концентрацією для макрофагів миші лінії J774.2 у сполуки IFT\_180 є доза  $9,19 \pm 0,50 \text{ мкМ}$ , IFT\_247 –  $12,22 \pm 0,61 \text{ мкМ}$ , IFT\_251 –  $30,52 \pm 0,50 \text{ мкМ}$ , IFT\_252 –  $11,12 \pm 0,58 \text{ мкМ}$  і IFT\_257 –  $35,03 \pm 0,36 \text{ мкМ}$ .

4. За результатами скринінгу трьох похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину фригопротекторна активність не є загальною ознакою сполук цього ряду. Потужні фригопротекторні властивості на рівні препарату порівняння диклофенаку натрію виявляє 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT\_247), що статистично значуще збільшує час життя мишей із моделлю гострого загального охолодження.

5. Узагальнення результатів цих досліджень обґрунтовують доцільність подальшого поглибленого вивчення як потенційного протизапального, знеболювального та фригопротекторного засобу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (IFT\_247).

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [295, 304, 305]

## РОЗДІЛ 5

### ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦЕНТРАЛЬНИХ ЕФЕКТІВ НАЙБІЛЬШ АКТИВНОЇ СПОЛУКИ 1-(5-АЦЕТИЛ-3-МЕТИЛ-6-ФЕНІЛ- 5*H*-[1,2,4]ТРІАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИН-7-ІЛ)-ЕТАНОНУ

Попередні етапи дослідження засвідчили, що одним з найактивніших представників похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*v*][1,3,4]тіадіазину, який виявляє виразні аналгетичні, помірні протизапальні та потужні фригопротекторні властивості, виявився 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT\_247). Тому на наступному етапі роботи необхідно було провести поглиблене фармакологічне дослідження цієї сполуки. Протокол цього дослідження передбачав оцінку дозозалежності знеболювального ефекту сполуки IFT\_247, участь опіодергічної складової в механізмі її аналгетичної дії, з'ясування супутніх нейротропних ефектів.

#### 5.1 Оцінка дозозалежності знеболювального ефекту 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону

Дозозалежність – це взаємозв'язок між дозою лікарського засобу та фармакологічною відповіддю організму. Вона є фундаментальним принципом фармакології, що визначає ефективність і безпеку препаратів [306]. Для визначення дозозалежності сполуки IFT\_247 використовували базову модель дослідження соматичного болю – тест «Гаряча пластина» [246]. Перебування мишей на гарячій пластині обмежували 60 с з метою уникнення опіку. Якщо протягом цього часу реакція була відсутня, вважали, що латентний період дорівнює 60 с. Також враховували кількість тварин з іншими стандартними для цього тесту поведінковими патернами (клімбінг, стрибки).

Після визначення вихідного латентного періоду мишам в/ш вводили сполуку IFT\_247 у дозах 5; 15; 25 і 35 мг/кг у вигляді водної суспензії,

стабілізованої твіном-80, в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси. Через 60 хв повторювали визначення латентного періоду. Контрольним тваринам вводили в/ш еквівалентну кількість води.

Результати дослідження дозозалежності знеболювальної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону в тесті «Гаряча пластина» в мишей (табл. 5.1) засвідчили, що найменша з випробуваних доз 5 мг/кг спричинила слабкий знеболювальний ефект на рівні тенденції (приріст латентного періоду облизування задньої лапи склав у середньому 34,9%). Збільшення дози до 15 мг/кг спричинило більший ефект (приріст дорівнював 68,1%,  $p<0,01$ ).

Таблиця 5.1

Дозозалежність знеболювальної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону в тесті «Гаряча пластина» в мишей ( $M\pm m$ ,  $n=6-7$ )

Група, кількість тварин	Доза, мг/кг	Латентний час реакції, с		Динаміка, %
		вихідний	через 60 хв	
Контроль	—	13,3 $\pm$ 0,99 13,0 [11,9; 14,7]	12,9 $\pm$ 0,79 12,5 [12,1; 14,3]	–1,6 $\pm$ 7,3
Сполука IFT_247	5	14,4 $\pm$ 1,44 14,5 [11,1; 17,1]	18,2 $\pm$ 2,27 18,1 [12,9; 20,3]	+34,9 $\pm$ 24,3
	15	13,0 $\pm$ 2,23 11,8 [8,7; 13,5]	23,4 $\pm$ 5,32 <sup>^</sup> 21,0 [12,2; 26,9]	+68,1 $\pm$ 14,5**
	25	11,3 $\pm$ 1,11 11,55 [9,7; 18,1]	27,9 $\pm$ 3,26 <sup>^</sup> 29,5 [20,2; 31,2]	+149,6 $\pm$ 18,1***
	35	12,9 $\pm$ 1,60 12,1 [9,4; 15,9]	29,1 $\pm$ 2,07 <sup>^</sup> 28,0 [25,2; 31,4]	+135,9 $\pm$ 20,8***

Примітка. Статистично значущі відмінності: <sup>^</sup> – з вихідним показником відповідної групи ( $p<0,05$ ); \*\* – з контролем ( $p<0,01$ ); \*\*\* – з контролем ( $p<0,001$ ).

Ефект дози 25 мг був найбільшим (приріст латентного періоду склав 149,6%,  $p < 0,001$ ), а підвищення дози до 35 мг/кг не посилювало його (приріст латентного періоду був 135,9%,  $p < 0,001$ ).

Результати дослідження дозозалежності знеболювальної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону в тесті «Гаряча пластина» в мишей засвідчили, що аналгетична дія IFT\_247 залежить від дози, а максимальною ефективною є доза 25 мг/кг, яку і обрано для наступних експериментів для поглибленого вивчення сполуки-лідера.

## **5.2 Оцінка опіоїдергічного компонента в механізмі дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону**

Метою цього етапу дослідження було визначити можливу участь опіоїдергічного механізму в аналгетичній дії сполуки IFT\_247 для з'ясування питання, до якої групи аналгетиків (наркотичних чи ненаркотичних) вона належить.

Згідно з методичними рекомендаціями з доклінічного дослідження лікарських засобів з аналгетичною активністю, обов'язковим етапом є встановлення наявності центрального компонента в механізмах дії сполуки [243]. Дослідження базується на антагоністичній взаємодії налоксону з наркотичними аналгетиками. Налоксон – ефективний антагоніст опіоїдних рецепторів, який швидко усуває ефекти наркотичних анальгетиків. Механізм дії базується на конкурентному витісненні опіоїдів з рецепторів, що забезпечує антагоністичний ефект [307].

Тваринам після визначення вихідного латентного періоду у тесті «Гаряча пластина» вводили налоксон (Налоксон-ЗН, ТОВ “Здоров’я народу”, Україна) в/о в дозі 5 мг/кг [258] за 30 хв до досліджуваної сполуки, а через 60 хв після її введення повторно вимірювали латентний період. Як препарат порівняння в цих дослідах використовували метамізол натрію, для якого доведено наявність опіоїдергічної ланки механізму дії. Цей анальгетик здійснює знеболювальну



дію за участі кількох механізмів, з-поміж яких найкраще досліджено інгібування ЦОГ, уповільнення активації L-аргініну/NO/cGMP/K<sup>+</sup>-каналу на периферії та в спинному мозку, активація низхідної гальмівної системи контролю болю, взаємодія з глутаматергічною системою та вивільнення ендогенних опіоїдних пептидів [259]. Метамізол натрію (Анальгін, «Лекхім», Харків) вводили в/о в дозі 500 мг/кг у вигляді водного розчину в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси. Частині мишей за 30 хв. до метамізолу вводили налоксон як описано вище. Контрольним тваринам у цьому експерименті в/о вводили розчинник (ізотонічний розчин *NaCl* в еквівалентному об'ємі). Додатково визначали кількість мишей з певними проявами реакцій під час латентного періоду облизування лапи (стрибки, клімбінг, тощо).

Аналіз впливу налоксону на аналгетичний ефект 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (25 мг/кг) (табл. 5.2) демонструє, що блокатор опіоїдних рецепторів налоксон практично не змінив знеболювальний ефект сполуки IFT\_247.

Зазначена сполука *per se* збільшила латентний період облизування задньої лапи в середньому на 54% (менший приріст порівняно з таким за визначення дозозалежності, очевидно, пов'язаний з хронофармакологічним чинником, позаяк ці експерименти виконано в різні дні). На фоні дії налоксону латентний період ноцицептивної реакції зріс на 72,8%, відмінності з показником групи досліджуваної сполуки *per se* відрізняються на рівні тенденції. Отже, опіоїдєргічний механізм, очевидно, не бере участі в аналгетичній дії сполуки IFT\_247.

Для порівняння аналогічний експеримент виконано з класичним анальгетиком-антипіретиком метамізолом натрію (500 мг/кг) (табл. 5.2). Середній приріст латентного періоду ноцицептивної реакції за його використання *per se* становив 306,3%, а за попередньої блокади опіоїдних рецепторів налоксоном – 204,4%, тобто зменшувався в середньому на третину, а медіана фінального латентного часу зменшилася в 2 рази за майже однакового вихідного значення.

Таблиця 5.2

Вплив налоксону на аналгетичний ефект 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (25 мг/кг) і метамізолу натрію (500 мг/кг) у тесті «Гаряча пластина» у мишей ( $M \pm m$ ,  $Me[Q25; Q75]$ , %)

Група, кількість тварин	Латентний час облизування задньої лапи, с			Кількість мишей з іншими поведінковими патернами, абс. і %	
	вихідний	через 60 хв	динаміка, %	клімбінг	стрибки
Контроль, n=7	15,1 $\pm$ 1,72 15,5[12,5; 18,6]	11,6 $\pm$ 2,12 11,1[6,9; 12,8]	-1,6 $\pm$ 22,5	5/7 (71,4%)	0/7 (0%)
Метамізол натрію, n=6	12,4 $\pm$ 2,39 9,9[8,7; 14,4]	41,3 $\pm$ 6,68 <sup>^</sup> 40,2[26,8; 60,0]	+306,3 $\pm$ 107,5 <sup>**</sup>	3/6 (50%)	1/6 (16,7%)
Налоксон + метамізол натрію, n=5	12,2 $\pm$ 0,70 11,9[11,6; 13,6]	34,9 $\pm$ 9,79 <sup>^</sup> 22,0[17,5; 57,5]	+204,4 $\pm$ 99,5 <sup>*</sup>	5/5 (100%) <sup>*#</sup>	2/5 (40%) <sup>**</sup>
IFT_247, n=7	17,6 $\pm$ 3,88 13,6[10,6; 21,9]	27,5 $\pm$ 7,57 <sup>^</sup> 23,0[14,1; 27,2]	+54,0 $\pm$ 17,9 <sup>*</sup>	6/7 (85,7%)	0/7 (0%)
Налоксон + IFT_247, n=7	11,5 $\pm$ 1,35 11,1[8,0; 14,2]	19,3 $\pm$ 2,20 <sup>^</sup> 17,9[12,9; 25,5]	+72,8 $\pm$ 13,0 <sup>**</sup>	6/7 (85,7%)	0/7 (0%)

Примітка. <sup>^</sup> – статистично значущі відмінності з вихідним показником відповідної групи ( $p < 0,05$ ), <sup>\*</sup> – з контролем ( $p < 0,05$ ), <sup>\*\*</sup> – з контролем ( $p < 0,01$ ), <sup>#</sup> – з показником на тлі метамізолу натрію ( $p < 0,05$ ).

Наведені вище експериментальні дані свідчать, що у знеболювальному ефекті метамізолу певна роль належить опіоїдергічним механізмам. Їх вивчено досить глибоко. З'ясовано, зокрема, що метамізол діє шляхом невідбиркового пригнічення синтезу PG завдяки інгібуванню насамперед ЦОГ-1 і ЦОГ-3, активує нейрони периакведуктального ядра, гальмуючі передачу больових імпульсів у спинному мозку, та безпосередньо пригнічує спинальні чутливі нейрони, перешкоджає участі глутамату в центральній ноцицепції, а на периферії стимулює NOS (підвищений рівень оксиду азоту (NO) збільшує вміст циклічного гуанілатмонофосфату (GMP), що десенсибілізує ноцицептори). Показана також роль активації ендогенної канабіноїдної системи в механізмі дії цього анальгетика [308]. Доведено, що в ЦНС метамізол стимулює вивільнення ендогенних опіоїдів без безпосередньої активації опіоїдних рецепторів ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ ), а налоксон при системному введенні або мікроін'єкції у відповідні структури головного мозку зменшує знеболювальний ефект метамізолу [309, 310, 311] і частково запобігає гострим антиноцицептивним ефектам комбінації морфіну з метамізолом. Опіоїдергічні механізми беруть участь у розвитку толерантності до метамізолу після його повторного введення [312]. При цьому метамізол не посилює викликаний морфіном закреп, що свідчить про часткову участь опіоїдної системи у спостережуваному синергізмі з опіоїдним анальгетиком [313]. Отже, наші результати щодо послаблення знеболювального ефекту метамізолу налоксоном відповідають даним інших авторів.

Тонкий нейрохімічний механізм анальгетичного ефекту сполуки IFT\_247 потребує подальшого поглибленого з'ясування. Проте на підставі відсутності зменшення цього ефекту під впливом налоксону можна припустити, що механізм дії досліджуваної сполуки відрізняється від механізму класичного анальгетика-антипіретика метамізолу натрію. На різницю характеру впливу досліджуваної сполуки та метамізолу натрію на ноцицептивну реакцію вказують і відмінності поведінкових патернів під час тестування на гарячій пластині (табл. 5.2).

У групі метамізолу кількість тварин, у яких спостерігали вертикальні стійки коло бар'єру по периметру пластини (клімбінг), під впливом налоксону збільшилась удвічі (з 50% до 100%,  $p < 0,05$ ) і достовірно перевищила контрольний показник (100% проти 71,4%,  $p < 0,05$ ). На тлі метамізолу тенденційно, а за його комбінації з налоксоном статистично значуще (40% проти 0% у контролі,  $p < 0,05$ ) збільшилася частка мишей, що підстрибували під час перебування на гарячій пластині. Під впливом сполуки IFT\_247 та її комбінації з налоксоном поведінка мишей не відрізнялася від такої у контрольних тварин: клімбінг мав місце відповідно у 86,7% випадків проти 71,4%, стрибки не спостерігалися.

Таким чином, у механізмі аналгетичної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону не бере участі опіодергичний вплив, що доводиться відсутністю змін знеболювального ефекту на тлі дії налоксону (на відміну від метамізолу натрію, аналгетичний ефект якого налоксон зменшує).

### **5.3 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на поведінкові реакції у тесті відкритого поля**

Поведінкові реакції (локомоторну активність, орієнтовно-дослідницьку діяльність та емоційну сферу) досліджували в тесті «відкрите поле» [243]. Сполуку IFT\_247 вводили мишам в/ш в дозі 25 мг/кг одноразово (контрольним тваринам воду в аналогічному об'ємі).

У тесті відкритого поля не виявлено суттєвого впливу сполуки IFT\_247 на поведінку мишей (табл. 5.3). Зокрема, залишалися без змін локомоторна та орієнтовно-дослідницька активності. Єдиною статистично значущою відмінністю було збільшення кількості болюсів ( $p < 0,05$ ), проте решта показників емоційних реакцій та їх вегетативного супроводу (грумінг, уринації) не відрізнялися від контрольних значень.

Таблиця 5.3

Вплив 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (25 мг/кг) на поведінкові реакції мишей у тесті «Відкрите поле»  
( $M \pm m$ , Me[Q25; Q75])

Субтести		Контроль (n=6)	Сполука IFT_247, 25 мг/кг (n=8)
Локомоторна активність (перетнуто квадратів)		51,3±5,30 54,5 [44; 56]	44,3±5,06 45 [35,5; 54]
Орієнтовно- дослідницька діяльність	Стійки	1,67±0,61 1,5 [1; 3]	2,63±1,28 1,5 [0,5; 3]
	Обстежено отворів	29,7±2,59 31 [22; 34]	29,5±2,05 29,5 [26,5; 32]
	Сума	31,3±2,78 32,5 [26; 36]	32,1±2,95 30,5 [27,5; 38,5]
Емоційні реакції та їх вегетативний супровід	Болюси	0,50±0,34 0 [0; 1]	1,75±0,31* 1,50 [1; 2,5]
	Уринації	0 0 [0; 0]	0,13±0,12 0 [0; 0]
	Грумінг	1,33±0,71 0,50 [0; 3]	0,25±0,16 0 [0; 0,5]
	Сума	1,83±1,01 0,50 [0; 5]	2,13±0,29 2 [1,5; 3]
Сума всіх активностей		84,3±6,22 85,5 [84; 92]	78,5±5,06 81,5 [73; 89,5]

Примітка. \* – статистично значущі відмінності з контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, досліджувана сполука 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон не спричиняє ані стимулювального, ані пригнічувального впливу на ЦНС.

## Висновки до розділу 5

1. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон чинить дозозалежний знеболювальний ефект. На моделі

соматичного болю (тест «Гаряча пластина») за введення у шлунок у діапазоні доз 5-35 мг/кг максимально ефективною є доза 25 мг/кг.

2. Для механізму аналгетичної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону не притаманний опіоїдергічний вплив, що доводиться відсутністю змін знеболювального ефекту на тлі дії налоксону (на відміну від метамізолу натрію, аналгетичний ефект якого налоксон зменшує).

3. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон не викликає змін поведінки мишей у тесті відкритого поля.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [295, 304, 314].

## РОЗДІЛ 6

### ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ 1-(5-АЦЕТИЛ-3-МЕТИЛ-6-ФЕНІЛ-5*H*-[1,2,4]ТРІАЗОЛО[3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИН-7-ІЛ)-ЕТАНОНУ НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОЇ ХОЛОДОВОЇ ТРАВМИ В ЩУРІВ

Попередні етапи дослідження показали, що за результатами скринінгу похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину потужні фригопротекторні властивості на рівні препарату порівняння диклофенаку натрію виявляє 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT-247). Тому на наступному етапі роботи доцільно провести поглиблене дослідження впливу IFT-247 на перебіг гострої холодової травми в щурів. Протокол цього експерименту передбачав визначення впливу на температуру тіла, стан системи гемостазу, низку показників запального каскаду та активність NOS.

#### 6.1 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на температуру тіла щурів на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії

Поглиблене дослідження впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на перебіг гострої холодової травми виконували на білих безпородних щурах самцях. Стать тварин обрано на підставі вищої чутливості самців до гострого впливу холоду та виразнішого впливу фригопротекторів саме на самців [303]. Гостру холодову травму моделювали шляхом двогодинної експозиції тварин за  $-18^{\circ}\text{C}$  [251, 252]. Ректальну температуру до та безпосередньо після холодової експозиції вимірювали цифровим термометром.

Фригопротекторні властивості сполуки IFT\_247 на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії підтверджено результатами термометрії (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Вплив сполуки IFT\_247 на ректальну температуру щурів на моделі гострої загальної повітряної гіпотермії ( $M \pm m$ ; Me[Q25; Q75])

Група, кількість тварин	Ректальна температура, °С		
	Вихідна	Через 2 год. перебування за −18°С	Різниця
Інтактний контроль (n=9)	36,8±0,14 36,7 [36,6; 37,0]		
Холодова травма			
Контрольна патологія (n=8)	37,2±0,12 37,1 [37,0; 37,4]	35,2±0,47 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup> 35,4 [35,0; 36,0]	−2,0±0,46 −1,7 [−1,93; −1,3]
Диклофенак натрію, 7 мг/кг (n=10)	36,8±0,16 36,85 [36,5; 37,1]	36,3±0,28 <sup>&amp;</sup> 36,55 [35,9; 37,0]	−0,5±0,23 <sup>##</sup> −0,3 [−0,8; −0,1]
IFT_247, 15 мг/кг (n=7)	36,7±0,17 37,1 [36,7; 37,6]	36,2±0,31 <sup>&amp;</sup> 36,75 [36,0; 37,1]	−0,5±0,22 <sup>#</sup> −0,4 [−1,0; −0,2]

Примітка. Статистично значущі відмінності з показником групи контрольної патології:  $\#$  –  $p < 0,05$ ,  $##$  –  $p < 0,01$ ; з вихідним показником тієї ж групи:  $\&$  –  $p < 0,05$ ,  $\&\&\&$  –  $p < 0,001$ ; n – кількість тварин у групі.

Вихідна ректальна температура щурів усіх груп не мала значущих відмінностей. У групі контрольної патології протягом двогодинної холодової експозиції вона знизилася щодо вихідної в середньому на  $2,0^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,001$ ). За впливу сполуки IFT\_247 та препарату порівняння диклофенаку натрію зниження температури склало лише  $0,5^{\circ}\text{C}$  – достовірно менше, ніж у групі контрольної патології (відповідно  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ).

## 6.2 Вивчення впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на коагулологічні показники щурів із холодовою травмою

Через 5-10 хв після завершення холодової експозиції та вимірювання ректальної температури щурів піддавали евтаназії та отримували кров шляхом



декапітації [243]. У плазмі крові визначали ПЧ, ТЧ, АЧТЧ, фібриноген. У сироватці крові вимірювали залишкову кількість щурячого протромбіну, тромбіну, фібриногену, а також D-димер.

У найгострішому періоді холодової травми у щурів змінюються коагулологічні показники (табл. 6.2). У групі контрольної патології значно (в середньому на 26,8%,  $p < 0,001$  проти інтактного контролю) збільшився ТЧ. Під впливом диклофенаку він зріс у вигляді тенденції на 5,8%, а на тлі сполуки IFT\_247 – на 13,1% щодо інтактного контролю. Ці значення достовірно поступалися показникові контрольної патології. Вміст фібриногену в плазмі крові щурів групи контрольної патології збільшився на 21,7% ( $p < 0,05$ ), під впливом диклофенаку та сполуки IFT\_247 – тенденційно відповідно на 18,4% та 6,2%.

Визначення фібриногену одночасно в плазмі та сироватці крові є спеціальним методичним підходом [252]. Сироватку крові вважають вільною від фібриногену, позаяк за гемокоагуляції фібриноген перетворюється на фібрин, але його вміст у сироватці крові важливий з позиції зіставлення зі вмістом D-димеру.

Як видно з табл. 6.2, у сироватці крові щурів групи контрольної патології спостерігається виразне (в середньому в 3,1 разу) збільшення вмісту D-димеру щодо інтактного контролю ( $p < 0,001$ ). На фоні диклофенаку та особливо сполуки IFT\_247 це зростання значно менше (відповідно в 1,8 та в 1,5 разу), а рівень D-димеру в крові був достовірно меншим, ніж у тварин групи контрольної патології. При цьому в групі диклофенаку вміст D-димеру достовірно перевищує показник інтактних тварин ( $p < 0,05$ ).

Рівень сироваткового фібриногену зазнав аналогічних змін. Він виявився максимальним у групі контрольної патології (у 2,2 разу вище за інтактний контроль,  $p < 0,001$ ), а в групах диклофенаку та сполуки IFT\_247 це збільшення становило в середньому відповідно 1,4 ( $p < 0,05$ ) та 1,6 разу ( $p < 0,01$ ).

Таблиця 6.2

Вплив сполуки IFT\_247 та диклофенаку натрію на коагулологічні показники щурів із холодовою травмою  
( $M \pm m$ ; Me[Q25; Q75])

Біомаркери	Інтактний контроль (n=5)	Холодова травма		
		Контрольна патологія (n=5)	Диклофенак натрію (n=5)	IFT_247 (n=6)
Плазма крові				
ПЧ, с	18,3±0,88 18,9 [16,8; 19,8]	17,2±0,42 17,5 [16,9; 17,8]	20,04±1,15 20,0 [18,5; 21,5]	19,43±1,10 19,45 [17,4; 20,5]
ТЧ, с	43,62±1,08 44,7 [43,0; 45,0]	55,30±1,00*** 54,4 [53,9; 55,7]	46,16±3,54 <sup>#</sup> 43,7 [39,7; 50,6]	49,35±1,69 <sup>#</sup> 48,65 [45,5; 52,3]
АЧТЧ, с	20,84±1,04 20,3 [18,8; 22,1]	21,84±1,69 23,8 [18,0; 22,4]	23,60±1,21 24,1 [21,1; 25,9]	22,05±1,76 20,5 [19,4; 22,3]
Фібриноген, г/л	4,83±0,16 5,0 [4,8; 5,0]	5,88±0,31* 5,7 [5,4; 5,5]	5,72±0,37 5,6 [5,0; 6,5]	5,13±0,61 5,55 [3,9; 6,5]
Сироватка крові				
Протромбін, пг/мл	95,82±16,84 100,485 [62,435; 136,7]	305,58±77,26* 244,3 [213,4; 305,5]	231,36±87,09 202,2 [127,5; 211,1]	236,82±51,17* 198,75 [132,1; 362,7]
Тромбін, пг/мл	37,82±1,18 37,92 [35,81; 40,885]	43,420±2,38 43,9 [38,76; 45,63]	39,80±1,57 39,61 [38,76; 43,03]	41,20±2,03 41,213 [38,76; 45,63]
Фібриноген, нг/мл	150,36±15,22 159,90 [120,795; 185,05]	326,74±29,68*** 333,1 [317,9; 371,1]	217,12±21,67* <sup>#</sup> 228,0 [171,1; 250,3]	234,22±18,64** <sup>##</sup> 235,25 [199,6; 247,9]
D-димер, нг/мл	844,2±79,8 754,45 [679,35; 1090,5]	2596,0±219,2*** 2542,45 [2282,0; 2689,0]	1490,5±254,1* <sup>##</sup> 1433,0 [1161,0; 1491,0]	1289,4±311,6 <sup>##</sup> 1020,9 [864,4; 1807,1]

Примітка. Статистично значущі відмінності: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  щодо інтактного контролю; <sup>#</sup> –  $p < 0,05$ ,

<sup>##</sup> –  $p < 0,01$  щодо контрольної патології; n – кількість визначень показника.

Концентрація фібриногену в сироватці крові групи IFT\_247 та групи диклофенаку натрію статистично значуще поступалося такому в групі контрольної патології.

Залишковий вміст протромбіну в сироватці крові щурів усіх груп зростає, особливо у контрольній патології (у 3,2 разу щодо інтактного контролю,  $p < 0,05$ ), у групі диклофенаку менш виразно, тенденційно, а під впливом сполуки IFT\_247 – достовірно в 2,5 разу ( $p < 0,05$ ). Рівень тромбіну практично не зазнав змін.

Отримані результати, як в іншому дослідженні [252], вказують, що в найгострішому періоді холодової травми у щурів групи контрольної патології виникає тромбоз та гострий синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ). Його пряма ознака – значне збільшення рівня D-димеру, важливого маркера тромбоутворення [315], з яким може бути пов'язане збільшення ТЧ у групі контрольної патології. ТЧ характеризує фінальну стадію каскаду зсідання крові – перетворення фібриногену на фібрин. Збільшення ТЧ вказує на швидкий перехід до гіпокоагуляційної стадії ДВЗ-синдрому. Швидкий розвиток ДВЗ-синдрому за холодової травми спостерігали також в інших експериментальних [316, 317] і клінічних дослідженнях [318, 319]. Наші результати підтверджують ці дані вже для найгострішого періоду холодової травми.

Як вже зазначено вище, фібриноген зазвичай визначають у плазмі крові. Але він наявний і в сироватці, хоча його рівень на 8 порядків нижче, ніж у плазмі. Разом із визначенням D-димеру цей маркер може тлумачитися як продукт деградації фібрину. Його збільшення причетне до розвитку артеріального тромбозу [320], що додатково доводить активацію тромбоутворення та ризик тромботичних ускладнень за гострої холодової травми.

Встановлено, що і диклофенак натрію, і сполука IFT\_247 значно зменшують несприятливий зсув гемокоагуляції у найгострішому періоді холодової травми. Під впливом кожного засобу нормалізується ПЧ, а достовірні

зміни ТЧ, АЧТЧ, фібриногену в плазмі крові відсутні. Достовірне щодо контрольної патології зниження вмісту D-димеру та фібриногену в сироватці крові на тлі обох засобів вказує на менший ризик тромбозу та ДВЗ-синдрому вже в найгострішій фазі холодової травми. Однакова антигіпотермічна активність диклофенаку та сполуки IFT\_247 (табл. 6.1) відповідає їх близькій антитромботичній ефективності за гострої холодової травми (табл. 6.2).

### **6.3 Дослідження впливу 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону на показники запального каскаду та активність синтази оксиду азоту у щурів із холодовою травмою**

Після евтаназії та отримання крові шляхом декапітації у щурів вилучали печінку та заморожували її рідким азотом, зберігаючи до аналізу в морозильній камері за  $-70^{\circ}\text{C}$ . У гомогенаті печінки визначали імуноензиматичними методами вміст низки маркерів запалення: 5-ЛОГ, лейкотриєн В4 та тотальні лейкотриєни; низку інтерлейкінів: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ; NOS. Використовували видоспецифічні набори.

Як видно з табл.6.3, у щурів групи контрольної патології швидко виникає системна запальна реакція, пов'язана, зокрема, з активацією ліпоксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти. У печінці зростає вміст тотальних лейкотриєнів (в 1,9 разу,  $p<0,01$ ), зокрема лейкотриєну В4 (в 1,6 разу,  $p<0,05$ ). Це може бути зумовлено підвищенням активності 5-ЛОГ, позаяк кількість цього ензиму була майже однаковою в усіх групах (табл. 6.3). Диклофенак натрію зменшував вміст лейкотриєнів достовірно щодо контрольної патології ( $p<0,05$ ), сполука IFT\_247 – тенденційно, і їх вміст у печінці тварин цих груп не мав значущих відмінностей щодо інтактного контролю. Це вказує на протизапальний вплив обох досліджуваних фригопротекторів.

Цитокінова ланка запальної відповіді за гострого загального охолодження мала в щурів групи контрольної патології певні особливості (табл. 6.3). Жоден із трьох досліджених прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) не зазнав

статистично значущих змін щодо інтактного контролю (хоча IL-1 $\beta$  тенденційно збільшився в 1,2 разу, а TNF- $\alpha$  – в 1,8 разу,  $p > 0,05$ ). Але при цьому значно (в 1,7 разу) знизився вміст протизапальних цитокінів IL-4 ( $p < 0,01$ ) та IL-10 ( $p < 0,001$ ).

Фригопротекторний ефект диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247 характеризується статистично значущим зменшенням вмісту IL-1 $\beta$  як щодо контрольної патології (майже в 2 рази,  $p < 0,05$ ), так і щодо інтактного контролю (в 1,5-1,6 разу,  $p < 0,001$ ). Рівень IL-6 на тлі обох засобів не змінювався, а TNF- $\alpha$  знижувався до значень інтактних тварин та був достовірно меншим щодо контрольної патології ( $p < 0,05$ ). Натомість уміст протизапальних цитокінів IL-4 та IL-10 залишався достовірно зменшеним проти показників інтактного контролю та майже не відрізнявся від значень контрольної патології (табл. 6.3).

Отже, за гострого загального охолодження виникає дисбаланс про- та протизапальних цитокінів. Співвідношення їх сумарних кількостей в інтактних щурів становить 0,73 (табл. 6.4). Як видно з табл. 6.3 та 6.4, за гострого загального охолодження у групі контрольної патології здебільшого статистично значуще зменшується рівень низки протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10), тимчасом як кількість прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  зростає тенденційно, а IL-6 не зазнає суттєвих змін. Як наслідок співвідношення суми про- та протизапальних цитокінів збільшується щодо інтактного контролю в 2,3 рази (табл. 6.4).

Проте в механізмі фригопротекторної дії диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247 бере участь достовірне зменшення вмісту IL-1 $\beta$  та TNF- $\alpha$  до субнормальних (IL-1 $\beta$ ) та нормальних (TNF- $\alpha$ ) значень без суттєвого впливу на решту досліджених цитокінів (табл. 6.3). Це виводить їх баланс на новий рівень з переважанням протизапальних: співвідношення про- та протизапальних цитокінів зменшується вдвічі та практично досягає значення інтактного контролю (табл. 6.4).

Таблиця 6.3

Вплив сполуки IFT\_247 та диклофенаку натрію на вміст 5-ЛОГ, лейкотриєнів, інтерлейкінів та NO-синтази в печінці щурів із холодовою травмою ( $M \pm m$ ; Me[Q25; Q75])

Біомаркери	Інтактний контроль (n=8)	Холодова травма		
		Контрольна патологія (n=5)	Диклофенак натрію (n=5)	IFT_247 (n=6)
5-ЛОГ, нг/г	160±3,65 163 [155,5; 168,5]	174±4,46 172 [167; 183]	166±1,93 165 [163; 166]	135±22,0 153,5 [135; 170]
Тотальні лейкотриєни, пг/г	1785±241 1998,5 [1073; 2321,5]	3479±274 ** 3770 [2938; 3778]	2171±216 <sup>#</sup> 1994 [1982; 2097]	2839±291 2838,7 [2274; 3144]
Лейкотриєн В4, пг/г	702±49,3 782,5 [549,5; 808,5]	1113±62,7 * 1077 [1039; 1150]	791±63,0 <sup>#</sup> 783 [744; 912]	859±104,2 934,5 [710; 990]
IL-1β, нг/г	6,02±0,28 5,95 [5,275; 6,69]	7,45±1,21 6,21 [5,60; 7,95]	3,98±0,40*** <sup>#</sup> 3,46 [3,41; 4,29]	3,80±0,18*** <sup>#</sup> 3,84 [3,55; 4,10]
IL-6, нг/г	0,21±0,02 0,22 [0,16; 0,25]	0,15±0,04 0,11 [0,11; 0,16]	0,15±0,02 0,15 [0,14; 0,16]	0,18±0,03 0,16 [0,12; 0,18]
TNF-α, нг/г	1,59±0,16 1,475 [1,210; 1,935]	2,84±0,47 2,70 [2,25; 3,54]	1,76±0,06 <sup>#</sup> 1,77 [1,69; 1,83]	1,50±0,13 <sup>#</sup> 1,575 [1,16; 1,65]
IL-4, нг/г	8,92±0,78 8,86 [7,09; 10,80]	5,22±0,15** 5,24 [4,93; 5,35]	6,17±0,79* 5,85 [4,82; 7,22]	5,11±0,22*** 5,07 [4,88; 5,48]
IL-10, нг/г	1,86±0,06 1,915 [1,73; 2,01]	1,07±0,06*** 1,09 [0,98; 1,12]	1,25±0,08* 1,16 [1,13; 1,43]	1,19±0,07* 1,205 [1,10; 1,23]
NOS, нг/г	171±7,54 166,5 [153,3; 187,5]	117±9,23* 116 [103; 127]	158±3,73 <sup>#</sup> 160 [152; 164]	153±3,40 <sup>#</sup> 154 [147; 158]

Примітка. Статистично значущі відмінності: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  щодо інтактного контролю; <sup>#</sup> –  $p < 0,05$ ,

<sup>##</sup> –  $p < 0,01$  щодо контрольної патології; n – кількість визначень показника.

Таблиця 6.4

Зміни кількісного співвідношення низки про- та протизапальних цитокінів у печінці щурів з гострою холодовою травмою та вплив на нього фригопротекторів – диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247

Експериментальна група	Сумарний вміст, нг/г		Співвідношення прозапальні / протизапальні цитокіни
	Прозапальні цитокіни IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$	Протизапальні цитокіни IL-4, IL-10	
Інтактний контроль	7,82	10,78	0,73
Гостра холодова травма без корекції (контрольна патологія)	10,44	6,29	1,66
Диклофенак натрію + гостра холодова травма	5,89	7,42	0,79
IFT_247 + гостра холодова травма	5,48	6,30	0,86

Рівень NOS у печінці щурів групи контрольної патології знижувався в 1,5 разу щодо інтактного контролю ( $p < 0,05$ ). Це відповідає даним [233] про зменшення продукції NO в щурів за гострого загального охолодження та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження, скеровану на пригнічення продукції монооксиду азоту та відповідно на вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та сполуки IFT\_247, що зменшували ступінь гіпотермії, рівень NOS не зазнав змін і залишився на рівні інтактного контролю (табл. 6.3), достовірно перевершуючи значення контрольної патології ( $p < 0,05$ ). Такий результат, очевидно, пов'язаний з меншим ступенем гіпотермії та вказує на відсутність обмежень синтезу NO. Він може свідчити про збереження функціональної активності ендотелію та фізіологічних функцій монооксиду азоту на тлі застосування обох досліджуваних фригопротекторів.

Таким чином, сполука 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT\_247), у дозі 18 мг/кг у щурів при в/ш виявляє виразну фригопротекторну активність на моделі

гострого запального охолодження, не поступаючись диклофенаку натрію. Також сполука IFT\_247 на рівні диклофенаку натрію запобігає розвитку ДВЗ-синдрому в найгострішому періоді гострої холодової травми; пригнічує запальну відповідь переважно шляхом зменшення вмісту лейкотриєну B<sub>4</sub> і тотальних лейкотриєнів, а також прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і TNF- $\alpha$ ; запобігає падінню рівня NOS. За характером впливу на гемостаз, запальні маркери та NOS сполука IFT\_247 наближається до препарату порівняння диклофенаку натрію, що має доведені фригопротекторні властивості.

Ці результати доповнюють фармакологічну характеристику досліджуваного представника 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів як потенційного знеболювального, протизапального та фригопротекторного засобу.

При цьому варто наголосити, що протизапальні та фригопотекторні властивості сполуки IFT\_247 дисоціюють. Її антиексудативна дія на моделі карагенінового запалення виражена помірно, що вказує на відсутність потужних протизапальних властивостей. Проте як у скринінгу на мишах, так і в поглибленому дослідженні на щурах сполука IFT\_247 виявила сильну фригопротекторну дію, за якою не поступається диклофенаку натрію. Це підтверджує вже згадані результати попередніх досліджень, відповідно до яких повний паралелізм цих видів фармакологічної активності відсутній. Найбільш повно зазначене питання досліджено для диклофенаку натрію та еторикоксибу. Зокрема, на моделі гострої холодової травми в мишей диклофенак натрію ефективно зменшує ступінь гіпотермії, але його протизапальна дія на моделі карагенінового набряку за низької температури довкілля майже втрачається [222]. Виразність фригопротекторного ефекту диклофенаку натрію більша, ніж в еторикоксибу, але за нормалізуючим впливом на циклооксигеназний шлях арахідонового каскаду диклофенак натрію поступається еторикоксибу [216]. Обидва інгібітори арахідонового каскаду запобігають порушенням енергетичного обміну за холодової травми, проте еторикоксиб нормалізує вміст інтермедіатів енергетичного обміну до показників інтактних тварин, а



диклофенак натрію поступається селективному інгібітору ЦОГ-2 [215]. Отже, попри спільні риси біохімічні механізми протизапальної та фригопротекторної дії не співпадають. Результати дослідження фригопротекторних властивостей сполуки IFT\_247 стали новим підтвердженням цього положення. Очевидно, захист від впливу низьких температур докільля значною мірою ґрунтується на механізмах, меншою мірою пов'язаних із запальним каскадом, насамперед на гострих судинних реакціях.

Результати обґрунтовують доцільність подальшого поглибленого вивчення сполуки IFT\_247. Зокрема, важливо визначити її вплив на стан циклооксигеназного шляху каскаду арахідонової кислоти, тромбоцитарну ланку гемостазу, стан системного та локального кровообігу та його регуляторні механізми, енергетичний метаболізм, а також органотропні ефекти досліджуваної сполуки в динаміці перебігу гострої холодової травми та у відновному періоді.

Підсумовуючи комплекс отриманих результатів експериментального дослідження, слід зазначити, що сполуку IFT\_247 доцільно розглядати насамперед як неопіоїдний анальгетик та фригопротекторний засіб, меншою мірою як протизапальний засіб.

## **Висновки до розділу 6**

1. (1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон) статистично значуще зменшує ступінь гіпотермії у щурів за двогодинної експозиції за  $-18^{\circ}\text{C}$  (18 мг/кг), що свідчить про його фригопротекторні властивості.

2. У найгострішому періоді холодової травми в щурів сполука IFT\_247 запобігає розвитку синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання та тромбозу, зменшуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові та нормалізуючи підвищений тромбіновий час.

3. (1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон) за гострої холодової травми пригнічує розвиток системної запальної реакції: запобігає збільшенню вмісту лейкотриєнів (В4 та тотальних), поступаючись за цією властивістю диклофенаку; подібно до диклофенаку значно зменшує до субнормального рівня рівень інтерлейкіну-1 $\beta$  та до нормального – фактор некрозу пухлини  $\alpha$  без впливу на інтерлейкін-6 та на зменшений вміст протизапальних цитокінів – інтерлейкін-4 та інтерлейкін-10, нормалізує збільшене співвідношення про- та протизапальних цитокінів.

4. За холодової травми рівень синтази оксиду азоту у печінці в щурів групи контрольної патології зменшується в 1,5 разу щодо інтактного контролю, що вказує на зменшення продукції оксиду азоту та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження – вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та досліджуваної сполуки рівень синтази оксиду азоту залишається на рівні інтактного контролю.

5. Показано, що (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон) є перспективним фригопротектором, що є обґрунтуванням доцільності подальших поглиблених досліджень механізмів його фригопротекторної активності та впливу на стан окремих органів і систем за холодової травми.

Результати досліджень даного розділу наведено в публікаціях: [295, 305].

## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Для нових сполук похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину на основі он-лайн сервісу віртуального скринінгу SwissTargetPrediction передбачено імовірність знеболювальної активності та/чи протизапальної дії шляхом впливу на аденозинові рецептори A1 і A2A, фосфодіестеразу типу 10A і 5A, метаботропний глутаматний рецептор 5 та канабіноїдні рецептори. Це обґрунтовує та окреслює напрямки досліджень зазначеного нового класу гетероциклічних сполук.

2. Вперше показано, що 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини виявляють виразну антиноцицептивну на моделях “гарячої пластини” та оцтовокислих “корчів”. Це дозволило обрати для поглиблених досліджень сполук-лідери IFT\_247 (1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-1,2,4-тіазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)етанон), IFT\_180 (5,7-дибутироніл-3-метил-6-(4-ізопропілфеніл)-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4] тіадіазин) та IFT\_251 (5,7-діацетил-3-метил-6-(4-метоксифеніл)-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин), які не поступаються чи переважають кеторолак на досліджуваних фармакологічних моделях.

3. Для похідних тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів експериментально встановлено протизапальний (антиексудативний) ефект, що має зворотну кореляцію з анальгетичною дією. Найбільш активні анальгетики не виявили антиексудативного ефекту, а малоактивні виявили його на рівні, що наближається до такого в диклофенаку натрію.

4. На основі молекулярного докінгу показано, що нові похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину можуть виявляти протизапальний вплив переважно через вплив на 5-ліпоксигеназо активуючий протеїн та меншою мірою через 5-ліпоксигеназу. Афінітет до циклооксигенази-1 та циклооксигенази-2 є меншим у порівнянні з референтними лікарськими засобами, однак ця взаємодія потенційно може збільшувати сумарний протизапальний ефект досліджуваних речовин.

5. Нові похідні 5,7-диацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини за одноразового внутрішньошлункового введення мишам є малотоксичними за класифікацією Hoge та Sterner (IV класу токсичності, 500 мг/кг < ЛД<sub>50</sub> < 5000 мг/кг), а також не виявляють суттєвої цитотоксичності для трансформованих клітин нирки ембріона людини лінії НЕК293Т і макрофагів миші лінії J774.2.

6. Вперше встановлено суттєву фригопротекторну активність сполуки-лідера IFT\_247, що статистично значуще збільшує час життя мишей із моделлю гострого загального охолодження. Це дозволяє розглядати зазначену сполуку як потенційний фригопротекторний засіб і є підставою для поглиблених досліджень.

7. Встановлено, що 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон (IFT\_247) чинить дозозалежний знеболювальний ефект на моделі соматичного болю (тест «Гаряча пластина») за введення у шлунок у діапазоні доз 5-35 мг/кг, а максимально ефективною є доза 25 мг/кг. Механізму аналгетичної дії зазначеної сполуки не притаманний опіоїдєргічний вплив, що доводиться відсутністю змін знеболювального ефекту на тлі дії налоксону (на відміну від метамізолу натрію, аналгетичний ефект якого налоксон зменшує).

8. Сполука-лідер IFT\_247 (18 мг/кг) статистично значуще зменшує ступінь гіпотермії у щурів за двогодинної експозиції за -18°C. У найгострішому періоді холодової травми в щурів запобігає розвитку синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання та тромбозу, зменшуючи вміст D-димеру та фібриногену в сироватці крові та нормалізуючи підвищений тромбіновий час, а також пригнічує розвиток системної запальної реакції: запобігає збільшенню вмісту лейкотриєнів (В4 та тотальних), поступаючись за цією властивістю диклофенаку (7 мг/кг); подібно до диклофенаку зменшує до субнормального рівня рівень інтерлекіну 1β та до нормального – фактора некрозу пухлин α без впливу на інтерлейкін 6 та на зменшений вміст протизапальних інтерлейкінів 4 та 10, нормалізує збільшене співвідношення про- та протизапальних цитокінів.

Під впливом сполуки-лідера IFT\_247 рівень синтази оксиду азоту у печінці в щурів групи контрольної патології зменшується в 1,5 разу щодо інтактного контролю, що вказує на зменшення продукції оксиду азоту та може віддзеркалювати адаптивну реакцію на загальне охолодження – вазоконстрикцію задля зменшення втрат тепла. Під впливом диклофенаку натрію та досліджуваної сполуки рівень синтази оксиду азоту залишається на рівні інтактного контролю.

9. (1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-1,2,4-тіазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)етанон) за результатами доклінічних досліджень є перспективною насамперед як неопіоїдний анальгетик та фригопротектор, меншою мірою як протизапальний засіб.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
2. U.S. Department of Health and Human Services. (2019). *Pain management best practices inter-agency task force report: Updates, gaps, inconsistencies, and recommendations* [Report]. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.hhs.gov/sites/default/files/pain-mgmt-best-practices-draft-final-report-05062019.pdf>.
3. Gregory, J., & McGowan, L. (2016). An examination of the prevalence of acute pain for hospitalised adult patients: a systematic review. *Journal of clinical nursing*, 25(5-6), 583–598. <https://doi.org/10.1111/jocn.13094>.
4. Park, R., Mohiuddin, M., Arellano, R., Pogatzki-Zahn, E., Klar, G., & Gilron, I. (2023). Prevalence of postoperative pain after hospital discharge: systematic review and meta-analysis. *Pain reports*, 8(3), e1075. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000001075>.
5. Lin, R. J., Reid, M. C., Liu, L. L., Chused, A. E., & Evans, A. T. (2015). The Barriers to High-Quality Inpatient Pain Management: A Qualitative Study. *The American journal of hospice & palliative care*, 32(6), 594–599. <https://doi.org/10.1177/1049909114530491>.
6. Antunes, F., Pereira, R. M., Afonso, V., & Tinoco, R. (2021). Prevalence and Characteristics of Chronic Pain Among Patients in Portuguese Primary Care Units. *Pain and therapy*, 10(2), 1427–1437. <https://doi.org/10.1007/s40122-021-00308-2>.
7. Dahlhamer, J., Lucas, J., Zelaya, C., Nahin, R., Mackey, S., DeBar, L., Kerns, R., Von Korff, M., Porter, L., & Helmick, C. (2018). Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. *MMWR*.

*Morbidity and mortality weekly report*, 67(36), 1001–1006.  
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>.

8. Mills, S. E. E., Nicolson, K. P., & Smith, B. H. (2019). Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *British journal of anaesthesia*, 123(2), e273–e283. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.03.023>.

9. Clauw, D. J., Häuser, W., Cohen, S. P., & Fitzcharles, M. A. (2020). Considering the potential for an increase in chronic pain after the COVID-19 pandemic. *Pain*, 161(8), 1694–1697.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001950>.

10. Романенко, В. (2023). Проблеми і виклики медицини болю в Україні у 2022 році. *Українські медичні вісті*, (1–2)(94–95), 54–57.  
<https://doi.org/10.32782/umv-2023.1.10>.

11. Duong, V., Oo, W. M., Ding, C., Culvenor, A. G., & Hunter, D. J. (2023). Evaluation and Treatment of Knee Pain: A Review. *JAMA*, 330(16), 1568–1580.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2023.19675>.

12. George, S. Z., Fritz, J. M., Silfies, S. P., Schneider, M. J., Beneciuk, J. M., Lentz, T. A., Gilliam, J. R., Hendren, S., & Norman, K. S. (2021). Interventions for the Management of Acute and Chronic Low Back Pain: Revision 2021. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, 51(11), CPG1–CPG60.  
<https://doi.org/10.2519/jospt.2021.0304>.

13. Shaheed, C. A., Machado, G. C., & Underwood, M. (2020). Drugs for chronic pain. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, 70(701), 576–577.  
<https://doi.org/10.3399/bjgp20X713549>.

14. Correction. (2021). *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, 71(707), 255.  
<https://doi.org/10.3399/bjgp21X716141>.

15. Heil, K., Thomas, R., Robertson, G., Porter, A., Milner, R., & Wood, A. (2016). Freezing and non-freezing cold weather injuries: a systematic review. *British medical bulletin*, 117(1), 79–93. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldw001>.

16. Stjernbrandt, A., Björ, B., Andersson, M., Burström, L., Liljelind, I., Nilsson, T., Lundström, R., & Wahlström, J. (2017). Neurovascular hand symptoms in relation to cold exposure in northern Sweden: a population-based study. *International archives of occupational and environmental health*, 90(7), 587–595. <https://doi.org/10.1007/s00420-017-1221-3>.
17. Shakirov B. M. (2020). Frostbite injuries and our experience treatment in the Samarkand area Uzbekistan. *International journal of burns and trauma*, 10(4), 156–161.
18. QuickStats: Death Rates\* Attributed to Excessive Cold or Hypothermia<sup>†</sup> Among Persons Aged  $\geq 15$  Years, by Urban-Rural Status<sup>§</sup> and Age Group - National Vital Statistics System, United States, 2019. (2021). *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 70(7), 258. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7007a6>.
19. Armed Forces Health Surveillance Division (2023). Cold Weather Injuries Among the Active and Reserve Components of the U.S. Armed Forces, July 2018-June 2023. *MSMR*, 30(11), 2–11.
20. Fudge J. (2016). Preventing and Managing Hypothermia and Frostbite Injury. *Sports health*, 8(2), 133–139. <https://doi.org/10.1177/1941738116630542>.
21. Кравець, О. В., Єхалов, В. В., & Седінкін, В. А. (2022). Оптимізоване життєзабезпечення при ненавмисному загальному переохолодженні організму (науково-літературний огляд). *Медицина невідкладних станів*, 18(1), 12–20. <https://doi.org/10.22141/2224-0586.18.1.2022.1453>
22. Moz.gov.ua. (2019). Як уникнути переохолодження: нагадуємо основні правила поведінки у холод. <https://moz.gov.ua/article/news/jak-uniknuti-pereoholodzhennja-nagaduemo-osnovni-pravila-povedinki-u-holod>.
23. Kravets, O., Yekhalov, V., Gorbuntsov, V., Stanin, D., & Krishtafor, D. (2023). Methods and pathophysiology of rewarming in case of local cold injury. Literature review. *General Surgery*, (2), 90–97. <https://doi.org/10.30978/GS-2023-2-90>.



24. Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I., & Lopes, A. (2018). Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*, 41(4), 1115–1127. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>.
25. Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X. J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.
26. Регеда, М. С., Бойчук, Т. С., Бондаренко, Ю. І., & Регеда, М. М. (2013). *Запалення типовий патологічний процес* (2-ге вид., доп. та перер.). Львів: СПОЛОМ.
27. Brunton, L. L., Hilal-Dandan, R., & Knollmann, B. C. (Eds.). (2017). *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics* (13th ed.). McGraw-Hill Education. <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2189&sectionid=165936845>.
28. Smith, T. J., & Hillner, B. E. (2019). The Cost of Pain. *JAMA network open*, 2(4), e191532. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.1532>.
29. Gillis, J. C., & Brogden, R. N. (1997). Ketorolac. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in pain management. *Drugs*, 53(1), 139–188. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753010-00012>.
30. Ohashi, N., & Kohno, T. (2020). Analgesic Effect of Acetaminophen: A Review of Known and Novel Mechanisms of Action. *Frontiers in pharmacology*, 11, 580289. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580289>.
31. Pirie, K., Traer, E., Finniss, D., Myles, P. S., & Riedel, B. (2022). Current approaches to acute postoperative pain management after major abdominal surgery: a narrative review and future directions. *British journal of anaesthesia*, 129(3), 378–393. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2022.05.029>.

32. Stein C. (2020). Opioid analgesia: recent developments. *Current opinion in supportive and palliative care*, 14(2), 112–117.  
<https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000495>.
33. Bannister, K., & Dickenson, A. H. (2020). Central Nervous System Targets: Supraspinal Mechanisms of Analgesia. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 17(3), 839–845.  
<https://doi.org/10.1007/s13311-020-00887-6>.
34. Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5), 627–635.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.
35. Zhang, Y., Liu, Y., Sun, J., Zhang, W., Guo, Z., & Ma, Q. (2023). Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm*, 4(5), e363.  
<https://doi.org/10.1002/mco2.363>.
36. Cox, A. J., West, N. P., & Cripps, A. W. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 3(3), 207–215.  
[https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70134-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70134-2).
37. Mazaleuskaya, L. L., & Ricciotti, E. (2020). Druggable Prostanoid Pathway. *Advances in experimental medicine and biology*, 1274, 29–54.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-030-50621-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50621-6_3).
38. Patrignani, P., & Patrono, C. (2015). Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et biophysica acta*, 1851(4), 422–432.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2014.09.016>.
39. Hua, K. F., Chou, J. C., Ka, S. M., Tasi, Y. L., Chen, A., Wu, S. H., Chiu, H. W., Wong, W. T., Wang, Y. F., Tsai, C. L., Ho, C. L., & Lin, C. H. (2015). Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production. *Journal of cellular physiology*, 230(4), 863–874.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.24815>.
40. Iolascon, G., Giménez, S., & Mogyorósi, D. (2021). A Review of Aceclofenac: Analgesic and Anti-Inflammatory Effects on Musculoskeletal

Disorders. *Journal of pain research*, 14, 3651–3663.  
<https://doi.org/10.2147/JPR.S326101>.

41. Stiller, C. O., & Hjemdahl, P. (2022). Lessons from 20 years with COX-2 inhibitors: Importance of dose-response considerations and fair play in comparative trials. *Journal of internal medicine*, 292(4), 557–574.  
<https://doi.org/10.1111/joim.13505>

42. Ferrer, M. D., Busquets-Cortés, C., Capó, X., Tejada, S., Tur, J. A., Pons, A., & Sureda, A. (2019). Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Current medicinal chemistry*, 26(18), 3225–3241.  
<https://doi.org/10.2174/0929867325666180514112124>.

43. Yang, C., Nilsson, L., Cheema, M. U., Wang, Y., Frøkiær, J., Gao, S., Kjems, J., & Nørregaard, R. (2015). Chitosan/siRNA nanoparticles targeting cyclooxygenase type 2 attenuate unilateral ureteral obstruction-induced kidney injury in mice. *Theranostics*, 5(2), 110–123. <https://doi.org/10.7150/thno.9717>.

44. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, 180, 114147.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.

45. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G. I., Inoue, K., & Kudo, I. (2017). Regulatory Functions of Phospholipase A2. *Critical reviews in immunology*, 37(2-6), 127–195. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20>.

46. Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., & Libert, C. (2018). Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29(1), 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>.

47. Sekido, R., Ishimaru, K., & Sakita, M. (2004). Corticotropin-releasing factor and interleukin-1beta are involved in the electroacupuncture-induced analgesic effect on inflammatory pain elicited by carrageenan. *The American journal of Chinese medicine*, 32(2), 269–279. <https://doi.org/10.1142/S0192415X04001928>.

48. Wautier, J. L., & Wautier, M. P. (2023). Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: A Mini Review. *International journal of molecular sciences*, 24(11), 9647. <https://doi.org/10.3390/ijms24119647>.
49. Dimitroulas, T., Lambe, T., Raphael, J. H., Kitas, G. D., & Duarte, R. V. (2019). Biologic Drugs as Analgesics for the Management of Low Back Pain and Sciatica. *Pain medicine (Malden, Mass.)*, 20(9), 1678–1686. <https://doi.org/10.1093/pm/pny214>.
50. Imam A. A. (2024). Anti-TNF Alpha and Risk of Lymphoma in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 60(7), 1156. <https://doi.org/10.3390/medicina60071156>.
51. Bignami, F., Rama, P., & Ferrari, G. (2016). Substance P and its Inhibition in Ocular Inflammation. *Current drug targets*, 17(11), 1265–1274. <https://doi.org/10.2174/1389450116666151019100216>.
52. Ianowski, J. P., Choi, J. Y., Wine, J. J., & Hanrahan, J. W. (2008). Substance P stimulates CFTR-dependent fluid secretion by mouse tracheal submucosal glands. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 457(2), 529–537. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0527-0>.
53. Zheng, G., Hong, S., Hayes, J. M., & Wiley, J. W. (2015). Chronic stress and peripheral pain: Evidence for distinct, region-specific changes in visceral and somatosensory pain regulatory pathways. *Experimental neurology*, 273, 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.013>.
54. van Cann, M., Kuzmenkov, A., Isensee, J., Andreev-Andrievskiy, A., Peigneur, S., Khusainov, G., Berkut, A., Tytgat, J., Vassilevski, A., & Hucho, T. (2021). Scorpion toxin MeuNaTx $\alpha$ -1 sensitizes primary nociceptors by selective modulation of voltage-gated sodium channels. *The FEBS journal*, 288(7), 2418–2435. <https://doi.org/10.1111/febs.15593>.
55. Nakamura, M., & Jang, I. S. (2022). Contribution of tetrodotoxin-resistant persistent Na<sup>+</sup> currents to the excitability of C-type dural afferent neurons in rats. *The journal of headache and pain*, 23(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s10194-022-01443-7>.

56. Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological reviews*, 99(2), 1079–1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>.
57. Fu, J. L., & Perloff, M. D. (2022). Pharmacotherapy for Spine-Related Pain in Older Adults. *Drugs & aging*, 39(7), 523–550. <https://doi.org/10.1007/s40266-022-00946-x>.
58. Liao, C., Liu, Y., Liu, C., Zhou, J., Li, H., Wang, N., Li, J., Liu, T., Ghaleb, H., Huang, W., & Qian, H. (2018). Phenylquinoline transient receptor potential vanilloid 1 antagonists for the treatment of pain: Discovery of 1-(2-phenylquinoline-4-carbonyl)-N-(4-(trifluoromethyl)phenyl)pyrrolidine-3-carboxamide. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(4), 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.048>.
59. Souza Monteiro de Araujo, D., Nassini, R., Geppetti, P., & De Logu, F. (2020). TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert opinion on therapeutic targets*, 24(10), 997–1008. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1815191>.
60. Aghazadeh Tabrizi, M., Baraldi, P. G., Baraldi, S., Gessi, S., Merighi, S., & Borea, P. A. (2017). Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists. *Medicinal research reviews*, 37(4), 936–983. <https://doi.org/10.1002/med.21427>.
61. Петренко, Н.С., & Кришталь (2013). Десенситизація P2X3-рецепторів як альтернативний механізм аналгезії. *Фізіологічний журнал*. 59(2). 104-110. Retrieved from [https://fz.kiev.ua/journals/2013\\_V.59/2013\\_2/104-110.pdf](https://fz.kiev.ua/journals/2013_V.59/2013_2/104-110.pdf).
62. Hildebrand, M. S., de Silva, M. G., Klockars, T., Rose, E., Price, M., Smith, R. J., McGuirt, W. T., Christopoulos, H., Petit, C., & Dahl, H. H. (2004). Characterisation of DRASIC in the mouse inner ear. *Hearing research*, 190(1-2), 149–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(04\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(04)00015-2).
63. Diochot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschalier, A., Lingueglia, E., & Baron, A. (2016). Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and

neuropathic pain. *Pain*, 157(3), 552–559.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000397>.

64. Khan, I., Ibrar, A., & Abbas, N. (2013). Triazolothiadiazoles and triazolothiadiazines-biologically attractive scaffolds. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 854–868. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.060>.

65. Carona, A., Bicker, J., Silva, R., Fonseca, C., Falcão, A., & Fortuna, A. (2021). Pharmacology of lacosamide: From its molecular mechanisms and pharmacokinetics to future therapeutic applications. *Life sciences*, 275, 119342. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119342>.

66. Goldberg, D. S., & McGee, S. J. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC public health*, 11, 770. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-770>.

67. Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>.

68. Loeser, J. D., & Ballantyne, J. C. (2024). Pains Revisited. *The Clinical journal of pain*, 40(8), 459–462. <https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000001224>.

69. Wong, A., & Graudins, A. (2017). Risk prediction of hepatotoxicity in paracetamol poisoning. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 55(8), 879–892. <https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1317349>.

70. Міністерство охорони здоров'я України. (2015, серпень 7). *Наказ № 494: Про деякі питання придбання, перевезення, зберігання, відпуску, використання та знищення наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів у закладах охорони здоров'я* (Ідентифікатор: z1028-15). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1028-15#Text>.

71. Abdel Shaheed, C., Maher, C. G., Williams, K. A., Day, R., & McLachlan, A. J. (2016). Efficacy, Tolerability, and Dose-Dependent Effects of Opioid Analgesics for Low Back Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA internal medicine*, 176(7), 958–968. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.1251>.

72. Волощук, Н. І., Денисюк, О. М., Пашинська, О. С., Волощук, С. Я., & Іваниця, А. О. (2023). Сучасні уявлення про формування больового синдрому та підходи до його ефективної фармакологічної корекції. Частина 2. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 17(3), 143-156. <https://doi.org/10.33250/17.03.143>.

73. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). (2021, April 7). *Chronic pain (primary and secondary) in over 16s: Assessment of all chronic pain and management of chronic primary pain* (NICE Guideline No. 193). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK569960/>.

74. Gelband, H., Jha, P., Sankaranarayanan, R., & Horton, S. (Eds.). (2015). *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-0349-9>.

75. Els, C., Jackson, T. D., Hagtvedt, R., Kunyk, D., Sonnenberg, B., Lappi, V. G., & Straube, S. (2023). High-dose opioids for chronic non-cancer pain: an overview of Cochrane Reviews. *The Cochrane database of systematic reviews*, 3(3), CD012299. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012299.pub3>.

76. Nagappa, M., Weingarten, T. N., Montandon, G., Sprung, J., & Chung, F. (2017). Opioids, respiratory depression, and sleep-disordered breathing. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 31(4), 469–485. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2017.05.004>.

77. Yadlapalli, J. S. K., Albayati, Z. A. F., Breen, P. J., Dobretsov, M., Penthala, N. R., Hendrickson, H. P., & Crooks, P. A. (2021). A pharmacokinetic study of morphine-6-O-sulfate in rat plasma and brain. *Drug development research*, 82(6), 802–814. <https://doi.org/10.1002/ddr.21785>.

78. Paul, A. K., Smith, C. M., Rahmatullah, M., Nissapatorn, V., Wilairatana, P., Spetea, M., Gueven, N., & Dietis, N. (2021). Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(11), 1091. <https://doi.org/10.3390/ph14111091>.

79. Yu, H., Huang, T., Lu, W. W., Tong, L., & Chen, D. (2022). Osteoarthritis Pain. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms23094642>.
80. Sánchez-Flórez, J. C., Seija-Butnaru, D., Valero, E. G., Acosta, C. D. P. A., & Amaya, S. (2021). Pain Management Strategies in Rheumatoid Arthritis: A Narrative Review. *Journal of pain & palliative care pharmacotherapy*, 35(4), 291–299. <https://doi.org/10.1080/15360288.2021.1973647>.
81. Corr M. (2021). Pain in Rheumatic Diseases. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 47(2), xiii–xv. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2021.02.001>.
82. Richard, M. J., Driban, J. B., & McAlindon, T. E. (2023). Pharmaceutical treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 31(4), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.11.005>.
83. Curtis, E., Fuggle, N., Shaw, S., Spooner, L., Ntani, G., Parsons, C., Corp, N., Honvo, G., Baird, J., Maggi, S., Dennison, E., Bruyère, O., Reginster, J. Y., & Cooper, C. (2019). Safety of Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs & aging*, 36(Suppl 1), 25–44. <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00664-x>.
84. Ashina, S., Mitsikostas, D. D., Lee, M. J., Yamani, N., Wang, S. J., Messina, R., Ashina, H., Buse, D. C., Pozo-Rosich, P., Jensen, R. H., Diener, H. C., & Lipton, R. B. (2021). Tension-type headache. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00257-2>.
85. Makino, S., & Kuntz, I. D. (1997). Automated flexible ligand docking method and its application for database search. *Journal of Computational Chemistry*, 18(14), 1812–1825. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19971115\)18:14<1812::AID-JCC10>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19971115)18:14<1812::AID-JCC10>3.0.CO;2-H).
86. Xie, R., Li, J., Jing, Y., Tian, J., Li, H., Cai, Y., Wang, Y., Chen, W., & Xu, F. (2024). Efficacy and safety of simple analgesics for acute treatment of episodic tension-type headache in adults: a network meta-analysis. *Annals of medicine*, 56(1), 2357235. <https://doi.org/10.1080/07853890.2024.2357235>.



87. Ertsey, C., Magyar, M., Gyüre, T., Balogh, E., & Bozsik, G. (2019). A tenziós fejfájás és kezelése [Tension type headache and its treatment possibilities]. *Ideggyógyászati szemle*, 72(1-2), 13–21. <https://doi.org/10.18071/isz.72.0013>.
88. Weatherall M. W. (2015). Drug therapy in headache. *Clinical medicine (London, England)*, 15(3), 273–279. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.15-3-273>.
89. Banzi, R., Cusi, C., Randazzo, C., Sterzi, R., Tedesco, D., & Moja, L. (2015). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) for the prevention of tension-type headache in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2015(5), CD011681. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011681>.
90. Zhao, H. J., Tan, J. Y., Wang, T., & Jin, L. (2015). Auricular therapy for chronic pain management in adults: A synthesis of evidence. *Complementary therapies in clinical practice*, 21(2), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2015.03.006>.
91. Burch R. (2019). Antidepressants for Preventive Treatment of Migraine. *Current treatment options in neurology*, 21(4), 18. <https://doi.org/10.1007/s11940-019-0557-2>.
92. Santana, K., do Nascimento, L. D., Lima E Lima, A., Damasceno, V., Nahum, C., Braga, R. C., & Lameira, J. (2021). Applications of Virtual Screening in Bioprospecting: Facts, Shifts, and Perspectives to Explore the Chemo-Structural Diversity of Natural Products. *Frontiers in chemistry*, 9, 662688. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.662688>.
93. Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
94. Böhm, H.-J., Schneider, G., Mannhold, R., Kubinyi, H., & Timmermann, H. (Eds.). (2000). *Virtual screening for bioactive molecules* (p. 235). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527613083>.

95. Prada-Gracia, D., Huerta-Yépez, S., & Moreno-Vargas, L. M. (2016). Application of computational methods for anticancer drug discovery, design, and optimization [Aplicación de métodos computacionales para el descubrimiento, diseño y optimización de fármacos contra el cáncer]. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México* (English Edition), 73(6), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.bmhime.2017.11.040>.
96. Dixon, S. L., Smondyrev, A. M., Knoll, E. H., Rao, S. N., Shaw, D. E., & Friesner, R. A. (2006). PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *Journal of computer-aided molecular design*, 20(10-11), 647–671. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9087-6>.
97. Geppert, H., Vogt, M., & Bajorath, J. (2010). Current trends in ligand-based virtual screening: molecular representations, data mining methods, new application areas, and performance evaluation. *Journal of chemical information and modeling*, 50(2), 205–216. <https://doi.org/10.1021/ci900419k>.
98. Lewell, X. Q., Judd, D. B., Watson, S. P., & Hann, M. M. (1998). RECAP-retrosynthetic combinatorial analysis procedure: a powerful new technique for identifying privileged molecular fragments with useful applications in combinatorial chemistry. *Journal of chemical information and computer sciences*, 38(3), 511–522. <https://doi.org/10.1021/ci970429i>.
99. Головенко, Н. Я. (2004). *Фізико-хімічна фармакологія: Монографія*. Одеса: Астропринт.
100. Goede, A., Dunkel, M., Mester, N., Frommel, C., & Preissner, R. (2005). SuperDrug: a conformational drug database. *Bioinformatics* (Oxford, England), 21(9), 1751–1753. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti295>.
101. Hawkins, P. C., & Nicholls, A. (2012). Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *Journal of chemical information and modeling*, 52(11), 2919–2936. <https://doi.org/10.1021/ci300314k>.

102. Thomson Reuters. (n.d.). *World Drug Index*. Retrieved May 23, 2023, from <http://thomsonreuters.com/en/products-services/pharma-life-sciences/life-science-research/world-drug-index.html>.
103. ZINC: Sterling and Irwin, J. *Chem. Inf. Model*, 2015 <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00559>.
104. Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 45(1), 177–182. <https://doi.org/10.1021/ci049714+>.
105. Reymond Group. (2015). *The Chemical Space Project* [Website]. <http://www.gdb.unibe.ch/>.
106. Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., Söhngen, C., Stelzer, M., Thiele, J., & Schomburg, D. (2011). BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D670–D676. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1089>.
107. William Reed Business Media SAS. (2011). *OutSourcing-Pharma.com* [Website]. <http://www.drugresearcher.com/news/products.asp>.
108. Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6(3), 402–406. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(96\)80061-3](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(96)80061-3).
109. Jiménez, F., Pérez-Sánchez, H., Palma, J., Sánchez, G., & Martínez, C. (2019). A methodology for evaluating multi-objective evolutionary feature selection for classification in the context of virtual screening. *Soft Computing*, 23(18), 8775–8800. <https://doi.org/10.1007/s00500-018-3479-0>.
110. Raval, K., & Ganatra, T. (2022). Basics, types and applications of molecular docking: A review. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, 7(1), 12-16. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2022.003>.
111. Irwin, J. J., Shoichet, B. K., Mysinger, M. M., Huang, N., Colizzi, F., Wassam, P., & Cao, Y. (2009). Automated docking screens: a feasibility study. *Journal of medicinal chemistry*, 52(18), 5712–5720. <https://doi.org/10.1021/jm9006966>.

112. Martin, Y. C., Kofron, J. L., & Traphagen, L. M. (2002). Do structurally similar molecules have similar biological activity?. *Journal of medicinal chemistry*, 45(19), 4350–4358. <https://doi.org/10.1021/jm020155c>.
113. The Scripps Research Institute. (2015). *AutoDock* [Website]. <http://autodock.scripps.edu/>.
114. Tripos, L.P. (2010). *Surflex-Dock*. A Certara-Company. [Website]. [http://www.tripos.com/index.php?family=modules,SimplePage,,,&page=surflex\\_dock&s=0](http://www.tripos.com/index.php?family=modules,SimplePage,,,&page=surflex_dock&s=0).
115. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*, 52(4), 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465>.
116. BioSolveIT GmbH. (2015). *FlexX-Screen: Interactive virtual screening* [Website]. [http://www.biosolveit.de/conferences/abstracts/2007-08-20\\_ACS2\\_HC.html](http://www.biosolveit.de/conferences/abstracts/2007-08-20_ACS2_HC.html).
117. Coleman, R. G., & Sharp, K. A. (2010). Protein pockets: inventory, shape, and comparison. *Journal of chemical information and modeling*, 50(4), 589–603. <https://doi.org/10.1021/ci900397t>.
118. Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
119. Spitzer, R., & Jain, A. N. (2012). Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *Journal of computer-aided molecular design*, 26(6), 687–699. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9533-y>.
120. Mooij, W. T., & Verdonk, M. L. (2005). General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins*, 61(2), 272–287. <https://doi.org/10.1002/prot.20588>.
121. Claussen, H., Gastreich, M., Apelt, V., Greene, J., Hindle, S. A., & Lemmen, C. (2004). The FlexX database docking environment--rational extraction of

receptor based pharmacophores. *Current drug discovery technologies*, 1(1), 49–60. <https://doi.org/10.2174/1570163043484815>.

122. Pibiri I. (2024). Recent Advances: Heterocycles in Drugs and Drug Discovery. *International journal of molecular sciences*, 25(17), 9503. <https://doi.org/10.3390/ijms25179503>.

123. Heravi, M. M., & Zadsirjan, V. (2020). Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. *RSC advances*, 10(72), 44247–44311. <https://doi.org/10.1039/d0ra09198g>.

124. Broughton, H. B., & Watson, I. A. (2004). Selection of heterocycles for drug design. *Journal of molecular graphics & modelling*, 23(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2004.03.016>.

125. Taylor, A. P., Robinson, R. P., Fobian, Y. M., Blakemore, D. C., Jones, L. H., & Fadeyi, O. (2016). Modern advances in heterocyclic chemistry in drug discovery. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(28), 6611–6637. <https://doi.org/10.1039/c6ob00936k>.

126. Keserü, G. M., & Makara, G. M. (2009). The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(3), 203–212. <https://doi.org/10.1038/nrd2796>.

127. Maertens J. A. (2004). History of the development ofazole derivatives. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10 Suppl 1, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>.

128. Zhang, H. Z., Gan, L. L., Wang, H., & Zhou, C. H. (2017). New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(2), 122–166. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160630120725>.

129. Melekh, B., Ilkiv, I., Lozynskyi, A., & Sklyarov, A. (2017). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in rat liver exposed to celecoxib and lansoprazole under epinephrine-induced stress. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(10), 94–99. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.71013>.

130. Lesyk, R. B., & Zimenkovsky, B. S. (2004). 4-Thiazolidones: Centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Current Organic Chemistry*, 8(16), 1547–1577. <https://doi.org/10.2174/1385272043369773>.

131. Dwivedi, A. R., Kumar, R., & Kumar, V. (2018). Recent synthetic strategies for monocyclic azole nucleus and its role in drug discovery and development. *Current Organic Synthesis*, 15(3), 321–340. <https://doi.org/10.2174/1570179414666171013154337>.

132. Shafran, E. A., Bakulev, V. A., Rozin, Y. A., & Shafran, Y. M. (2008). Condensed 1,2,3-triazoles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 44(9), 1040–1069. <https://doi.org/10.1007/s10593-008-0155-9>.

133. Xu, P. F., Zhang, Z. H., Hui, X. P., Zhang, Z. Y., & Zheng, R. L. (2004). Synthesis of triazoles, oxadiazoles and condensed heterocyclic compounds containing cinchopheny and studies on biological activity of representative compounds. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51(2), 315–319. <https://doi.org/10.1002/jccs.200400049>.

134. El Bakri, Y., Marmouzi, I., El Jemli, M., Karthikeyan, S., Harmaoui, A., Faouzi, M. E. A., Mague, J. T., & Essassi, E. M. (2019). Synthesis, biological activity and molecular modeling of a new series of condensed 1,2,4-triazoles. *Bioorganic Chemistry*, 92, 103193. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103193>.

135. Wang, Z., Shi, H., & Shi, H. (2001). Novel synthesis of condensed heterocyclic systems containing 1,2,4-triazole ring. *Synthetic Communications*, 31(18), 2841–2848. <https://doi.org/10.1081/SCC-100105335>.

136. Sai Sudhir, V., Phani Kumar, N. Y., Nasir Baig, R. B., & Chandrasekaran, S. (2009). Facile entry into triazole fused heterocycles via sulfamidate derived azido-alkynes. *The Journal of organic chemistry*, 74(19), 7588–7591. <https://doi.org/10.1021/jo9016748>.

137. Dwivedi, J., Kaur, N., Kishore, D., Kumari, S., & Sharma, S. (2016). Synthetic and Biological Aspects of Thiadiazoles and their Condensed Derivatives:

An Overview. *Current topics in medicinal chemistry*, 16(26), 2884–2920. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160506144859>.

138. Swamy, S. N., Basappa, Priya, B. S., Prabhuswamy, B., Doreswamy, B. H., Prasad, J. S., & Rangappa, K. S. (2006). Synthesis of pharmaceutically important condensed heterocyclic 4,6-disubstituted-1,2,4-triazolo-1,3,4-thiadiazole derivatives as antimicrobials. *European journal of medicinal chemistry*, 41(4), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.12.009>.

139. El-Sayed, R. (2013). Substituted thiadiazole, oxadiazole, triazole and triazinone as antimicrobial and surface activity compounds. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/s11743-012-1368-6>.

140. Holland-Nell, K., & Meldal, M. (2011). Maintaining biological activity by using triazoles as disulfide bond mimetics. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(22), 5204–5206. <https://doi.org/10.1002/anie.201005846>.

141. Yushyn I, Holota S, Lesyk R. 2,2-Dichloro-*N*-[5-[2-[3-(4-methoxyphenyl)-5-phenyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrazol-2-yl]-2-oxoethyl]sulfanyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl]acetamide. *Molbank*. 2022; 2022(1):M1328. <https://doi.org/10.3390/M1328>.

142. Frija, L. M., Pombeiro, A. J., & Kopylovich, M. N. (2016). Coordination chemistry of thiazoles, isothiazoles and thiadiazoles. *Coordination Chemistry Reviews*, 308, 32–55. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.10.003>.

143. Sayed, A. R. (2010). Synthesis of novel thiadiazoles and bis-thiadiazoles from carbonothioic dihydrazide. *Tetrahedron Letters*, 51(34), 4490–4493. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.06.060>.

144. Gomha, S. M., Salah, T. A., & Abdelhamid, A. O. (2015). Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of some novel thiadiazoles and thiazoles incorporating pyrazole moiety as anticancer agents. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 146, 149–158. <https://doi.org/10.1007/s00706-014-1303-9>.

145. Zhu, Y. P., Cai, Q., Gao, Q. H., Jia, F. C., Liu, M. C., Gao, M., & Wu, A. X. (2013). Target-oriented synthesis: miscellaneous synthetic routes to access 1, 4-

enediones through the coupling of 1,3-dicarbonyl compounds with multiform substrates. *Tetrahedron*, 69(31), 6392-6398. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.05.106>.

146. Rivkin, A., Yoshimura, F., Gabarda, A. E., Chou, T. C., Dong, H., Tong, W. P., & Danishefsky, S. J. (2003). Complex target-oriented total synthesis in the drug discovery process: the discovery of a highly promising family of second generation epothilones. *Journal of the American Chemical Society*, 125(10), 2899–2901. <https://doi.org/10.1021/ja029695p>.

147. Magalhães, C. M., González-Berdullas, P., Duarte, D., Correia, A. S., Rodríguez-Borges, J. E., Vale, N., Esteves da Silva, J. C. G., & Pinto da Silva, L. (2021). Target-Oriented Synthesis of Marine Coelenterazine Derivatives with Anticancer Activity by Applying the Heavy-Atom Effect. *Biomedicines*, 9(9), 1199. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091199>.

148. Basso, A., Park, S. B., & Moni, L. (2019). Editorial: Diversity Oriented Synthesis. *Frontiers in chemistry*, 6, 668. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00668>.

149. Galloway, W. R., Isidro-Llobet, A., & Spring, D. R. (2010). Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nature communications*, 1, 80. <https://doi.org/10.1038/ncomms1081>.

150. Biggs-Houck, J. E., Younai, A., & Shaw, J. T. (2010). Recent advances in multicomponent reactions for diversity-oriented synthesis. *Current opinion in chemical biology*, 14(3), 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.03.003>.

151. Bender, A., Fergus, S., Galloway, W. R., Glansdorp, F. G., Marsden, D. M., Nicholson, R. L., Spandl, R. J., Thomas, G. L., Wyatt, E. E., Glen, R. C., & Spring, D. R. (2006). Diversity oriented synthesis: a challenge for synthetic chemists. *Ernst Schering Research Foundation workshop*, (58), 47–60. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-37635-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-37635-4_4).

152. Shiradkar, M., Pandit, U., Akula, K. C., Maheta, A., & Kumar, G. V. S. (2006). Microwave assisted synthesis and antimicrobial screening of fused triazoles. *Arkivoc*, 14, 141-154. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0007.e16>.

153. Lingappa, B., Girisha, K. S., Kalluraya, B., Rai, N. S., & Kumari, N. S. (2008). Regioselective reaction: synthesis of novel Mannich bases derived from 3-



(4,6-disubstituted-2-thiomethylpyrimidyl)-4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazoles and their antimicrobial properties. *Indian. J. Chem*, 47B, 1858-1864. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7113>.

154. Gautam, N., & Chourasia, O. P. (2010). Synthesis, antimicrobial and insecticidal activity of some 4H-1,2,4 triazole derivatives. *Indian. J. Chem*, 49B, 956-959. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7115>.

155. Kumar, P. V., & Rao, V. R. (2008). Synthesis and antitubercular, antiviral and anticancer activity of 3-(3-mercaptoalkyl-7H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]-thiadiazin-6-yl)chromen-2-one and its derivatives. *Indian. J. Chem*, 47B, 106-111. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7113>.

156. Wu, J., Liu, X., Cheng, X., Cao, Y., Wang, D., Li, Z., Xu, W., Pannecouque, C., Witvrouw, M., & De Clercq, E. (2007). Synthesis of novel derivatives of 4-amino-3-(2-furyl)-5-mercapto-1,2,4-triazole as potential HIV-1 NNRTIs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(8), 2003–2016. <https://doi.org/10.3390/12082003>.

157. Fathalla, W., El Rayes, S. M., & Ali, I. A. (2007). Convenient synthesis of 1-substituted-4-methyl-5-oxo[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinazolines. *Arkivoc*, 173-186. <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.g18>.

158. Chen, J., Sun, X.Y., Chai, K. Y., Lee, J. S., Song, M. S., & Quan, Z. S. (2007). Synthesis and anticonvulsant evaluation of 4-(4-alkoxyphenyl)-3-ethyl-4H-1,2,4-triazoles as open-chain analogues of 7-alkoxyl-4,5-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinolines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(21), 6775–6781. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.004>.

159. Kavraiskiy, D. P., Shtrygol', S. Yu., Georgiyants, V. A., & Saidov, N. B. (2016). Screening investigation of novel 1,2,4-triazole-3-thione derivatives on anticonvulsant activity. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 2(2), 47-51. <https://doi.org/10.11648/j.ijpc.20160202.18>.

160. Глущенко, А. В., Рибальченко, Т. Л., Штриголь, С. Ю., Георгіянц, В. А., & Перехода, Л. О. (2010). Протисудомна активність похідних 1-заміщеного

5-метил(аміно)-1,2,3-триазолу. *Український біофармацевтичний журнал*, (3), 28–34. Retrieved from <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/3687>.

161. Rybalchenko, T. L., Shtrygol, S. Yu., & Georgiyants, V. A. (2014). Determination of the spectrum of anticonvulsant action of new anticonvulsants derivatives of 1,2,3-triazole and 1,3,4-oxadiazole. *Actual Problems of Medicine*, 26-1 (11 (182)), 199-203. <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/4699>.

162. Zhao, X. L., Zhao, Y. F., Guo, S. C., Song, H. S., Wang, D., & Gong, P. (2007). Synthesis and anti-tumor activities of novel [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 12(5), 1136–1146. <https://doi.org/10.3390/12051136>.

163. Manikrao, A. M., Fursule, R. A., Rajesh, K. S., Kunjwani, H. K., & Sabale, P. M. (2010). Synthesis and biological screening of novel derivatives of 3-(N-substituted carboxamidoethylthio)-(4H)-1,2,4-triazoles. *Indian. J. Chem*, 49B, 1642-1647. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7115>.

164. Ramakrishna, M., Himabindu, V., Reddy, T., & Chakravarthy, A. (2011). *s*-Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles, *s*-Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazines and *s*-Triazolo[3',4':2,3]thiadiazino[5,6-*b*]quinoxaline derivatives of clubbed triazole: Novel pharmacophore as dual inhibitors. *Asian Journal of Chemistry*, 23(1), 439–443. Retrieved from <https://asianpubs.org/index.php/ajchem/article/view/10053>.

165. Sukla, D. K., & Srivastava S.D. (2008). Synthesis of some new 5-[(1,2,3-benzotriazole)-1-yl-methyl]-1'-(4'-substituted aryl-3'-chloro-2'-oxo azetidine)}amino-1,3,4-thiadiazoles: antifungal and antibacterial agents. *Indian. J. Chem*, 47B, 463-469. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7113>.

166. Demirbas, N., Demirbas, A., Karaoglu, S. A., & Celik, E. (2005). Synthesis and antimicrobial activities of some new [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles and [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazines. *Arkivoc*, 13, 75-91. Retrieved from <https://www.arkat-usa.org/get-file/19831/>.

167. Farghaly, A. R., De Clercq, E., & El-Kashef, H. (2006). Synthesis and antiviral activity of novel [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazoles, [1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazines and [1,2,4]triazolo[3,4-

b][1,3,4]thiadiazepines. *Arkivoc*, 137-151. Retrieved from <https://www.arkat-usa.org/get-file/23539/>.

168. Matysiak, J., Nasulewicz, A., Pełczyńska, M., Switalska, M., Jaroszewicz, I., & Opolski, A. (2006). Synthesis and antiproliferative activity of some 5-substituted 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 41(4), 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.12.007>.

169. Pattanayak, P., Sharma R. 2-Amino-5-sulphanyl 1,3,4-thiadiazole derivatives as anticonvulsant agents: Synthesis and Evaluation (2010). *Indian J. Chem*, 49B, 1531-1534. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/7115>.

170. Sahu, J. K., Ganguly, S., & Kaushik, A. (2013). Triazoles: a valuable insight into recent developments and biological activities. *Chinese journal of natural medicines*, 11(5), 456–465. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60084-9](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60084-9).

171. Teall, J., Tuchman, M., Cutler, N., Gross, M., Willoughby, E., Smith, B., Jiang, K., Reines, S., & Block, G. (1998). Rizatriptan (MAXALT) for the acute treatment of migraine and migraine recurrence. A placebo-controlled, outpatient study. Rizatriptan 022 Study Group. *Headache*, 38(4), 281–287. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.1998.3804281.x>.

172. Dooley, M., & Faulds, D. (1999). Rizatriptan: a review of its efficacy in the management of migraine. *Drugs*, 58(4), 699–723. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958040-00013>.

173. Silberstein, S. D., Massiou, H., Le Jeunne, C., Johnson-Pratt, L., McCarroll, K. A., & Lines, C. R. (2000). Rizatriptan in the treatment of menstrual migraine. *Obstetrics and gynecology*, 96(2), 237–242. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)00880-2](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)00880-2).

174. Láinez M. J. (2006). Rizatriptan in the treatment of migraine. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2(3), 247–259. <https://doi.org/10.2147/nedt.2006.2.3.247>.

175. Winner, P., Lewis, D., Visser, W. H., Jiang, K., Ahrens, S., Evans, J. K., & Rizatriptan Adolescent Study Group (2002). Rizatriptan 5 mg for the acute

treatment of migraine in adolescents: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Headache*, 42(1), 49–55. <https://doi.org/10.1046/j.1526-4610.2002.02013.x>.

176. Ahonen, K., Hämäläinen, M. L., Eerola, M., & Hoppu, K. (2006). A randomized trial of rizatriptan in migraine attacks in children. *Neurology*, 67(7), 1135–1140. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000238179.79888.44>.

177. Ravindra, K. C., Vagdevi, H. M., & Vaidya, V. P. (2008). Synthesis, characterization and pharmacological studies on some triazolothiadiazines and triazolothiadiazoles containing naphtho[2,b]furan. *Indian. J. Chem*, 47B, 1271-1276. <https://doi.org/10.56042/ijc.v47>.

178. Desai, S. R., Laddi, U., Bennur, R. S., Patil, P. A., & Bennur, S. (2011). Synthesis and pharmacological activities of some new 3-substituted-4-amino-5-mercapto-1,2,4-triazoles. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(1), 115–120. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.89771>.

179. Tozkoparan, B., Aktay, G., & Yeşilada, E. (2002). Synthesis of some 1,2,4-triazolo[3,2-b]-1,3-thiazine-7-ones with potential analgesic and antiinflammatory activities. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)*, 57(2), 145–152. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(01\)01195-8](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(01)01195-8).

180. Goh, J. H., Fun, H. K., Nithinchandra, & Kalluraya, B. (2010). 4-[3-(Phen-oxy-meth-yl)-7H-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thia-diazin-6-yl]-3-(p-tol-yl)sydnone. *Acta crystallographica. Section E, Structure reports online*, 66(Pt 8), o2178–o2179. <https://doi.org/10.1107/S1600536810029910>.

181. El Shehry, M. F., Abu-Hashem, A. A., & El-Telbani, E. M. (2010). Synthesis of 3-((2,4-dichlorophenoxy)methyl)-1,2,4-triazolo(thiadiazoles and thiadiazines) as anti-inflammatory and molluscicidal agents. *European journal of medicinal chemistry*, 45(5), 1906–1911. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.030>.

182. Mahajan, N. S., Manikrao, A. M., Shinde, P. N., Jawarkar, R. D., Khatale, P. N., & Dhawale, S. C. (2012). A Review: Biological Importance of Mercapto Substituted 1,2,4-triazole Derivatives. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 5(7), 863-876. <https://doi.org/10.5958/0974-360X>.

183. Moise, M., Sunel, V., Profire, L., Popa, M., Desbrieres, J., & Peptu, C. (2009). Synthesis and biological activity of some new 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole compounds containing a phenylalanine moiety. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(7), 2621–2631. <https://doi.org/10.3390/molecules14072621>.

184. Mulla, J. A. S., Khazi, M. I. A., Panchamukhi, S. I., Gong, Y. D., & Khazi, I. A. M. (2014). Synthesis and pharmacological evaluation of novel thienopyrimidine and triazolothienopyrimidine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 23(6), 3235–3243. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0900-1>.

185. Mathew, V., Keshavayya, J., & Vaidya, V. P. (2006). Heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom: synthesis and pharmacological activities of some substituted 1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 41(9), 1048–1058. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.03.018>.

186. Mathew, V., Keshavayya, J., Vaidya, V. P., & Giles, D. (2007). Studies on synthesis and pharmacological activities of 3,6-disubstituted-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles and their dihydro analogues. *European journal of medicinal chemistry*, 42(6), 823–840. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.12.010>.

187. Karegoudar, P., Prasad, D. J., Ashok, M., Mahalinga, M., Poojary, B., & Holla, B. S. (2008). Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory activities of some 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles and 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines bearing trichlorophenyl moiety. *European journal of medicinal chemistry*, 43(4), 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.06.026>.

188. Aytaç, S. P., Tozkoparan, B., Kaynak, F. B., Aktay, G., Göktaş, O., & Ünüvar, S. (2009). Synthesis of 3,6-disubstituted 7H-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazines as novel analgesic/anti-inflammatory compounds. *European journal of medicinal chemistry*, 44(11), 4528–4538. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.06.026>.

189. Husain, A., & Naseer, M. A. (2011). Studies on fused heterocyclic 3,6-disubstituted-1,2,4-triazolo-1,3,4-thiadiazoles: synthesis and biological evaluation.

*Medicinal Chemistry Research*, 20(1), 47-54. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9281-x>.

190. Hussein, M. A., Shaker, R. M., Ameen, M. A., & Mohammed, M. F. (2011). Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities of some triazole, triazolothiadiazole, and triazolothiadiazine derivatives. *Archives of Pharmacal Research*, 34(8), 1239-1250. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0802-z>.

191. Malladi, S., Isloor, A. M., Shetty, P., Fun, H. K., Telkar, S., Mahmood, R., & Isloor, N. (2012). Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some new 3,6-disubstituted-1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles bearing pyrazole moiety. *Medicinal Chemistry Research*, 21(10), 3272-3280. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9865-0>.

192. Turan-Zitouni, G., Kaplancikli, Z. A., Erol, K., & Kiliç, F. S. (1999). Synthesis and analgesic activity of some triazoles and triazolothiadiazines. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)*, 54(4), 218-223. [https://doi.org/10.1016/s0014-827x\(99\)00016-6](https://doi.org/10.1016/s0014-827x(99)00016-6).

193. Karthikeyan, M. S., Holla, B. S., Kalluraya, B., & Kumari, N. S. (2007). Biological studies of some 2,4-dichloro-5-fluorophenyl containing triazolothiadiazoles. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 138(12), 1309-1316. <https://doi.org/10.1007/s00706-007-0718-y>.

194. Kamel, M. M., & Megally Abdo, N. Y. (2014). Synthesis of novel 1,2,4-triazoles, triazolothiadiazines and triazolothiadiazoles as potential anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.047>.

195. Boraie, A. T. A., Ghabbour, H. A., Gomaa, M. S., El Ashry, E. S. H., & Barakat, A. (2019). Synthesis and Anti-Proliferative Assessment of Triazolo-Thiadiazepine and Triazolo-Thiadiazine Scaffolds. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(24), 4471. <https://doi.org/10.3390/molecules24244471>.

196. Ma, W., Chen, P., Huo, X., Ma, Y., Li, Y., Diao, P., Yang, F., Zheng, S., Hu, M., You, W., & Zhao, P. (2020). Development of triazolothiadiazine derivatives as highly potent tubulin polymerization inhibitors: Structure-activity relationship,

in vitro and in vivo study. *European journal of medicinal chemistry*, 208, 112847. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112847>.

197. Ibrar, A., Zaib, S., Jabeen, F., Iqbal, J., & Saeed, A. (2016). Unraveling the Alkaline Phosphatase Inhibition, Anticancer, and Antileishmanial Potential of Coumarin-Triazolothiadiazine Hybrids: Design, Synthesis, and Molecular Docking Analysis. *Archiv der Pharmazie*, 349(7), 553–565. <https://doi.org/10.1002/ardp.201500392>.

198. Kaplancikli, Z. A., Turan-Zitouni, G., Ozdemir, A., & Revial, G. (2008). New triazole and triazolothiadiazine derivatives as possible antimicrobial agents. *European journal of medicinal chemistry*, 43(1), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.03.019>.

199. Suresh Kumar, G. V., Rajendra Prasad, Y., Mallikarjuna, B. P., & Chandrashekar, S. M. (2010). Synthesis and pharmacological evaluation of clubbed isopropylthiazole derived triazolothiadiazoles, triazolothiadiazines and mannich bases as potential antimicrobial and antitubercular agents. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 5120–5129. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.023>.

200. Asif Husain, Mohammad Asif, Rubina Bhutani, & Manni Dutta. (2013). Triazolothiadiazoles as antimicrobial agent: A short review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(4), 138–150. Retrieved from <https://wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/60>.

201. Appell, M., Compton, D. L., & Evans, K. O. (2020). Predictive Quantitative Structure-Activity Relationship Modeling of the Antifungal and Antibiotic Properties of Triazolothiadiazine Compounds. *Methods and protocols*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.3390/mps4010002>.

202. Sim, K. M., & Teo, K. C. (2018). Synthesis, characterization and antibacterial evaluation of some new 1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazines as potential antibacterial agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, 15(7), 733-743. <https://doi.org/10.2174/1570180814666170922165933>.

203. Zhang, H. J., Wang, X. Z., Cao, Q., Gong, G. H., & Quan, Z. S. (2017). Design, synthesis, anti-inflammatory activity, and molecular docking studies of

perimidine derivatives containing triazole. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 27(18), 4409–4414. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.014>.

204. Mehta, D. K., Taya, P., Das, R., & Dua, K. (2019). Design, Synthesis and Molecular Docking Studies of Novel Thiadiazole Analogues with Potential Antimicrobial and Antiinflammatory Activities. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, 18(2), 91–109. <https://doi.org/10.2174/1871520619666190307162442>.

205. Shkair, A. M., Shakya, A. K., Raghavendra, N. M., & Naik, R. R. (2016). Molecular Modeling, Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1,3,4-Thiadiazoles as Anti-inflammatory and Analgesic Agents. *Medicinal chemistry (Sharikhah (United Arab Emirates))*, 12(1), 90–100. <https://doi.org/10.2174/1573406411666150608102236>.

206. Omar, Y. M., Abdu-Allah, H. H. M., & Abdel-Moty, S. G. (2018). Synthesis, biological evaluation and docking study of 1,3,4-thiadiazole-thiazolidinone hybrids as anti-inflammatory agents with dual inhibition of COX-2 and 15-LOX. *Bioorganic chemistry*, 80, 461–471. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.036>.

207. Tariq, S., Alam, O., & Amir, M. (2018). Synthesis, anti-inflammatory, p38 $\alpha$  MAP kinase inhibitory activities and molecular docking studies of quinoxaline derivatives containing triazole moiety. *Bioorganic chemistry*, 76, 343–358. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.003>.

208. Tariq, S., Alam, O., & Amir, M. (2018). Synthesis, p38 $\alpha$  MAP kinase inhibition, anti-inflammatory activity, and molecular docking studies of 1,2,4-triazole-based benzothiazole-2-amines. *Archiv der Pharmazie*, 351(3-4), e1700304. <https://doi.org/10.1002/ardp.201700304>.

209. Haider, S., Alam, M. S., Hamid, H., Dhulap, A., & Kumar, D. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of benzoxazolinone-containing 1,3,4-thiadiazoles as TNF- $\alpha$  inhibitors. *Heliyon*, 5(4), e01503. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01503>.



210. Duong, H., & Patel, G. (2024, January 19). Hypothermia. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545239/>.
211. Charkoudian N. (2010). Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 109(4), 1221–1228. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00298.2010>.
212. Haman, F., & Blondin, D. P. (2017). Shivering thermogenesis in humans: Origin, contribution and metabolic requirement. *Temperature (Austin, Tex.)*, 4(3), 217–226. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1328999>.
213. van Marken Lichtenbelt W. (2012). Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 15(6), 547–552. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283599184>.
214. Gross, E. A., & Moore, J. C. (2012). Using thrombolytics in frostbite injury. *Journal of emergencies, trauma, and shock*, 5(3), 267–271. <https://doi.org/10.4103/0974-2700.99709>.
215. Shtrygol', S., Koiro , O., Kudina , O., Yudkevych , T., & Gorbach , T. . (2022). Comparative analysis of the effect of diclofenac sodium and etoricoxib on energy metabolism in rat liver in the acute general cooling model. *Медичні перспективи*, 27(4), 51–57. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2022.4.271171>.
216. Shtrygol', S., Tovchiga, O., Kudina, O., Koiro1, O., Yudkevich, T., & Gorbach, T. (2022). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the body temperature and cyclooxygenase pathway of the arachidonic acid cascade on the model of acute general cooling (air hypothermia) in rats. *Česká a slovenská farmacie*, 71(5), 214–222. <https://doi.org/10.5817/CSF2022-5-214>.
217. McIntosh, S. E., Freer, L., Grissom, C. K., Rodway, G. W., Giesbrecht, G. G., McDevitt, M., Imray, C. H., Johnson, E. L., Pandey, P., Dow, J., & Hackett, P. H. (2024). Wilderness Medical Society Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Treatment of Frostbite: 2024 Update. *Wilderness & environmental medicine*, 35(2), 183–197. <https://doi.org/10.1177/10806032231222359>.

218. Sachs, C., Lehnhardt, M., Daigeler, A., & Goertz, O. (2015). The Triaging and Treatment of Cold-Induced Injuries. *Deutsches Arzteblatt international*, 112(44), 741–747. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0741>.

219. Fosslien E. (2005). Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of clinical and laboratory science*, 35(4), 347–385. <https://www.annclinlabsci.org/content/35/4/347.long>.

220. Polderman K. H. (2009). Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine*, 37(7 Suppl), S186–S202. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>.

221. Romanovsky, A. A., & Garami, A. (2010). Prostaglandin riddles in energy metabolism: E is for excess, D is for depletion. Focus on "Food deprivation alters thermoregulatory responses to lipopolysaccharide by enhancing cryogenic inflammatory signaling via prostaglandin D2". *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(6), R1509–R1511. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00253.2010>.

222. Капелька, І. Г., & Штриголь, С. Ю. (2020). Характеристика протизапальної дії диклофенаку натрію за низької та нормальної температури. *Вісник фармації*, 2(100), 106–112. <https://doi.org/10.24959/nphj.20.37>.

223. Ueno, R., Narumiya, S., Ogorochi, T., Nakayama, T., Ishikawa, Y., & Hayaishi, O. (1982). Role of prostaglandin D2 in the hypothermia of rats caused by bacterial lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), 6093–6097. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.6093>.

224. Imray, C., Grieve, A., Dhillon, S., & Caudwell Xtreme Everest Research Group (2009). Cold damage to the extremities: frostbite and non-freezing cold injuries. *Postgraduate medical journal*, 85(1007), 481–488. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2008.068635>.

225. Капелька, І. Г., & Штриголь, С. Ю. (2019). Скринінгове дослідження фригопротекторних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів за

гострого загального охолодження. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 13(5), 338–343. <https://doi.org/10.33250.13.05.338>.

226. Капелька, І. Г., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., Лозинський, А. В., Хом'як, С. В., & Новіков, В. П. (2020). Скринінг низки інгібіторів каскаду арахідонової кислоти на фригопротекторні властивості. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 14(2), 122–128. <https://doi.org/10.33250/14.02.122>.

227. Shtrygol , S., Kapelka, . I., Mishchenko , M., & Mishchenko , O. . (2021). Non-obvious effects of montelukast – leukotriene receptor blocker: frigoprotective and anticonvulsant properties. *Медичні перспективи*, 26(2), 19–25. <https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.2.234486>.

228. Kapelka, I., Shtrygol, S., Koiro, O., Merzlikin, S., Kudina, O., & Yudkevych, T. (2021). Effect of arachidonic acid cascade inhibitors on body temperature and cognitive functions in rats in the Morris water maze after acute cold injury. *Die Pharmazie*, 76(7), 313–316. <https://doi.org/10.1691/ph.2021.1571>.

229. Shtrygol', S., Koiro, O., Kudina, O., Tovchiga, O., Yudkevych, T., & Oklei, D. (2022). The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the course of stress reaction, the functional state of kidneys, liver, and heart on the model of acute general cooling. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(36), 46–55. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255797>.

230. Shtrygol', S., Taran, A., Yudkevych, T., Lytkin, D., Lebedinets, I., Chuykova, P., & Koiro, O. (2023). Effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on systemic hemostasis during the most acute period of cold injury in rats. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 6(46), 25–30. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.294311>.

231. Thomas, G., & Sousa, P. S. (1986). Early inflammatory response to carrageenan in the pleural cavity and paw of rats with altered body temperature. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 38(12), 936–938. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb03390.x>.

232. Юхимчук, А. В., & Волощук, Н. І. (2023). Вплив глюкозаміну на коагуляційний та агрегатний гемостаз у самців та самок щурів за гострої холодової травми. *Перспективи та інновації науки (Серія «Педагогіка», Серія «Психологія», Серія «Медицина»)*, 16(34), 1024–1035. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-16\(34\)-1024-1035](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-16(34)-1024-1035).

233. Yuhimchuk, A. V., Voloshchuk, N. I., Shtrygol' S. Yu., Nefodov, O. O., Piliponova, V. V., Oliinyk, Yu., Tepla, A. M. & Nefodova, O. O. (2023). Vascular mechanisms in the formation of gender differences in the protective effect of glucosamine in experimental cold injury. *World of Medicine and Biology*, 4, 243-247. <https://doi.org/10.26724/2079-8334-2023-4-86-243-247>.

234. Волощук, Н. І., & Юхимчук, А. В. (2023). Статевий диморфізм змін мікроциркуляції шкіри щурів на тлі гострої холодової травми. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. Експериментальна медицина*, 4(98), 21-27. <https://doi.org/10.25040/ecpb2023.04.021>.

235. Koval, A., Lozynskyi, A., Shtrygol', S., & Lesyk, R. (2022). An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-inflammatory agents. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(36), 10–17. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255276>.

236. Міністерство охорони здоров'я України. (2009, 14 грудня). *Наказ № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів»*. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10#Text>.

237. Міністерство охорони здоров'я України. (2024, 25 жовтня). *Наказ № 1803 «Про затвердження Порядку проведення доклінічних досліджень лікарських засобів»*. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1686-24#n17>.

238. European Parliament, & Council of the European Union. (2010, September 22). *Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes*. Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng>.

239. Верховна Рада України. (2006, 21 лютого). *Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (зі змінами)*. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>.

240. Council of Europe. (1986). *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes* (ETS No. 123). Strasbourg. <https://rm.coe.int/168007a67b>.

241. Резніков, О. Г. (2003). Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Ендокринологія*, 8(1), 142–145. <https://endokrynologia.com.ua/index.php/journal/issue/view/59/65>.

242. Міністерство освіти і науки, молоді та спорту України. (2012, березень 1). *Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах* (Наказ № 249). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>.

243. Стефанов, О. В. (Ред.). (2001). *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації*. Київ: Авіцена.

244. Стефанов, О., Бухтіарова, Т., Коваленко, В., та ін. (2009). *Настанова. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика*. Київ: Міністерство охорони здоров'я України. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0095282-09#n4280>.

245. Komlos, E., Porszasz, J., & Knoll, J. (1950). Morphin-prostigmin synergismus. *Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1(1), 77–90.

246. Ядловський, О.Є., Суворова, З.С., & Науменко, М.В. (2020). Особливості застосування методу «Гаряча пластина» у фармакологічних дослідженнях. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 14(3), 177–184. <https://doi.org/10.33250/14.03.177>.

247. Deuis, J. R., Dvorakova, L. S., & Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>.

248. Inaltekin, A., & Kivrak, Y. (2021). Evaluation of the Effect of Vortioxetine on Pain Threshold By Hot-Plate Test in Mice. *Noro psikiyatri arsivi*, 58(4), 274–277. <https://doi.org/10.29399/npa.27462>.

249. Wood, R. L. (1941). Animal models in analgesic testing. In M. Kuhar & J. Pasternak (Eds.), *Analgesics: Neurochemical, behavioral and clinical perspectives* (Vol. 42, p. 74). Raven Press.

250. Тринус, Ф. П., Мохорт, Н. А., & Клебанов, Б. М. (1975). *Нестероїдні протизапальні засоби*. Київ: Здоров'я.

251. Бондарєв, Є. В., Штриголь, С. Ю., Дроговоз, С. М., & Щокіна, К. Г. (2018). *Холодова травма: доклінічне вивчення лікарських препаратів з фригопротекторними властивостями* [Методичні рекомендації]. МОЗ України, Національний фармацевтичний університет. Харків.

252. Штриголь, С. Ю., Таран, А. В., Юдкевич, Т. К., Литкін, Д. В., Лебединець, І. О., Чуйкова, П. О., & Койро, О. О. (2023). Вплив нестероїдних протизапальних препаратів на стан гемостазу в найгострішому періоді холодової травми в щурів. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (6(46), 25–30. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2023.294311>.

253. Shtrygol, S., Tovchiga, O., Kudina, O., Koiro, O., Yudkevich, T., & Gorbach, T. (2022). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs with different mechanisms of action on the body temperature and cyclooxygenase pathway of the arachidonic acid cascade on the model of acute general cooling (air hypothermia) in rats. *Ceska a Slovenska farmacie : casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 71(5), 214–223. <http://doi.org/10.5817/csf2022-5-214>.

254. Прозоровський, В. Б. (1998). Табличний експрес-метод визначення середніх ефективних доз на біологічні об'єкти. *Токсикологічний вісник*, 1, 28–32.

255. Прозоровський, В. Б. (1962). Використання методу найменших квадратів для пробіт-аналізу кривих летальності. *Фармакологія та токсикологія*, 23(1), 115–120.

256. Lei, C., & Sun, X. (2018). Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. *BMC pharmacology & toxicology*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0250-1>.
257. Huang, J. (2006). Sweating guarded hot plate test method. *Polymer Testing*, 25(5), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2006.03.002>.
258. Подольський, І. М., & Штриголь, С. Ю. (2017). Роль опіоїдергічної ланки антиноцицептивної системи в механізмі аналгетичної дії атристаміну. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 11(6), 23–30. <https://pharmaj.org.ua/index.php/pharmtox-j/issue/view/30/30>.
259. Nikolova, I., Petkova, V., Tencheva, J., Benbasat, M. N., Voinikov, J., & Danchev, N. (2013). Metamizole: A review profile of a well-known “forgotten” drug. Part II: Clinical profile. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(2), 3605–3619. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2012.0135>.
260. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic acids research*, 47(W1), W357–W364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>.
261. Gfeller, D., Michielin, O., & Zoete, V. (2013). Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(23), 3073–3079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt540>.
262. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
263. Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5-6), 490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).

264. Alvaro-Gracia J. M. (2004). Licofelone--clinical update on a novel LOX/COX inhibitor for the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 43 Suppl 1, i21–i25. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh105>.
265. Гарманчук, Л. В. (2013). *Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Культура клітин та клонування» (частина II)*. Київ.
266. Finiuk, N., Kryshchyshyn-Dylevych, A., Holota, S., Klyuchivska, O., Kozytskiy, A., Karpenko, O., Manko, N., Ivasechko, I., Stoika, R., & Lesyk, R. (2022). Novel hybrid pyrrolidinedione-thiazolidinones as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *European journal of medicinal chemistry*, 238, 114422. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114422>.
267. Голованова, І. А., Бєлікова, І. В., & Ляхова, Н. О. (2017). *Основи медичної статистики: навч. посіб. для аспірантів та клінічних ординаторів*. Полтава.
268. Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414(6866), 916–920. <https://doi.org/10.1038/414916a>.
269. Hack, S. P., & Christie, M. J. (2003). Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Critical reviews in neurobiology*, 15(3-4), 235–274. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v15.i34.30>.
270. Chu, Z., & Hablitz, J. J. (2000). Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain research*, 879(1-2), 88–92. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02752-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02752-9).
271. Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P. J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(19), 7503–7522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07503.1997>.



272. Brown, R. M., Mustafa, S., Ayoub, M. A., Dodd, P. R., Pflieger, K. D., & Lawrence, A. J. (2012). mGlu5 Receptor Functional Interactions and Addiction. *Frontiers in pharmacology*, 3, 84. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00084>.
273. Tan, S. Z. K., & Kim, J. H. (2021). mGlu5: A double-edged sword for aversive learning related therapeutics. *Neuroanatomy and Behaviour*, 3, e16. <http://dx.doi.org/10.23668/psycharchives.4843>.
274. Chang, Y. J., McCabe, R. T., Rennert, H., Budarf, M. L., Sayegh, R., Emanuel, B. S., Skolnick, P., & Strauss, J. F., 3rd (1992). The human "peripheral-type" benzodiazepine receptor: regional mapping of the gene and characterization of the receptor expressed from cDNA. *DNA and cell biology*, 11(6), 471–480. <https://doi.org/10.1089/dna.1992.11.471>.
275. Veenman, L., Papadopoulos, V., & Gavish, M. (2007). Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Current pharmaceutical design*, 13(23), 2385–2405. <https://doi.org/10.2174/138161207781368710>.
276. Falchi, A. M., Battetta, B., Sanna, F., Piludu, M., Sogos, V., Serra, M., Melis, M., Putzolu, M., & Diaz, G. (2007). Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands. *Neuropharmacology*, 53(2), 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.016>.
277. Farb, D. H., & Ratner, M. H. (2014). Targeting the modulation of neural circuitry for the treatment of anxiety disorders. *Pharmacological reviews*, 66(4), 1002–1032. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009126>.
278. Taliani, S., Da Settimo, F., Da Pozzo, E., Chelli, B., & Martini, C. (2009). Translocator protein ligands as promising therapeutic tools for anxiety disorders. *Current medicinal chemistry*, 16(26), 3359–3380. <https://doi.org/10.2174/092986709789057653>.
279. Morohaku, K., Pelton, S. H., Daugherty, D. J., Butler, W. R., Deng, W., & Selvaraj, V. (2014). Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology*, 155(1), 89–97. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1556>.

280. Midzak, A., & Papadopoulos, V. (2014). Binding domain-driven intracellular trafficking of sterols for synthesis of steroid hormones, bile acids and oxysterols. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 15(9), 895–914. <https://doi.org/10.1111/tra.12177>.

281. Ren, H., Han, R., Chen, X., Liu, X., Wan, J., Wang, L., Yang, X., & Wang, J. (2020). Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: An update. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 40(9), 1752–1768. <https://doi.org/10.1177/0271678X20923551>.

282. Ren, Z. Y., Machuca-Gayet, I., Domenget, C., Buchet, R., Wu, Y., Jurdic, P., & Mebarek, S. (2015). Azanitrile Cathepsin K Inhibitors: Effects on Cell Toxicity, Osteoblast-Induced Mineralization and Osteoclast-Mediated Bone Resorption. *PloS one*, 10(7), e0132513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132513>.

283. Huang, S., Xiao, P., & Sun, J. (2020). Structural basis of signaling of cannabinoids receptors: paving a way for rational drug design in controlling multiple neurological and immune diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 127. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00240-5>.

284. Tolón, R. M., Núñez, E., Pazos, M. R., Benito, C., Castillo, A. I., Martínez-Orgado, J. A., & Romero, J. (2009). The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain research*, 1283, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.098>.

285. Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, 62(11), 1984–1989. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000129697.01779.0a>.

286. Andersen, K. V., Nikolajsen, L., Haraldsted, V., Odgaard, A., & Søballe, K. (2013). Local infiltration analgesia for total knee arthroplasty: should ketorolac be added?. *British journal of anaesthesia*, 111(2), 242–248. <https://doi.org/10.1093/bja/aet030>.

287. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 84003, Ketorolac Tromethamine. Retrieved May 21, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketorolac-Tromethamine>.

288. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Серединська, Н.М., Бухтіарова Т.А., Бершова Т.А., Демченко Д.А., Бобкова Л.С., & Демченко А.М. (2015). Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацил- 3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. *Медична та клінічна хімія*, 17(2). <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866>.

289. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Бухтіарова, Т.А., Хоменко, В.С., Омеляненко, З.П., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Демченко А.М. (2015) Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] тріазоло[3,4-*b*] [1,3,4]тіадіазину. *Acta Medica Leopoliensia.*, 21(4), 59-63. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch\\_2015\\_21\\_4\\_13](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch_2015_21_4_13).

290. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2016). 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на винахід № 112372). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/kw0ogor5/>.

291. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2015). 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на корисну модель №102848). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/ot225i3j/>.

292. Коваль, А. Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність нових похідних тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. *Матеріали VI Південно-східного європейського медичного форуму та XIV З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства*, 9-12 вересня 2015 р. Одеса. (с. 381).

293. Коваль, А. Я., & Ядловський, О. Є. (2015). Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] тріазоло[3,4-*b*] [1,3,4]тіадіазину. *Збірник матеріалів*

міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23–24 жовтня 2015 р., Львів (с. 96–98).

294. Коваль, А.Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність похідних 5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*] [1,3,4]тіадіазину в експерименті. *Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини»*, 9-10 листопада 2015 р., Вінниця. (с. 151-152).

295. Коваль, А.Я., Штриголь, С.Ю., & Лесик, Р.Б. (2024). Пошук та вивчення сполук з анальгетичною, протизапальною та фригопротекторною дією серед нових похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвяченої 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету*, 23-24 жовтня 2024 року, Харків, (с. 114-117).  
<https://drive.google.com/file/d/1q6lJDTMF0x3Jf8B5dc4QyLxy61cvw2A2/view>.

296. Демченко, А.М., Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Янченко, В.О. (2015). Синтез та анальгезуючі властивості 5,7-діацил-6R-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів. *Збірник тез XV наукової конференції «Львівські хімічні читання – 2015»*, 25-27 травня 2015, Львів (с. 59)

297. Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., Янченко, В.О., & Демченко, А.М. (2015). Пошук нових високоефективних анальгетиків в ряді 5,7-діацил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів. *Матеріали VI Української конференції «Домбровські хімічні читання – 2015»*, 22-25 вересня 2015 р., Чернівці. (с.115).

298. Koval, A. (2023). Analgesic and anti-inflammatory activity of new 5Н-[1,2,4] triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine derivatives. *Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University*, 9, 4. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/6qqGaTfwS9xfQYf>.

299. Hodge, N. C., & Sterner, L. H. (1943). Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 10(4), 93.

300. International Organization for Standardization. (2009). *ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. <https://www.iso.org/standard/36406.html>.

301. Державне підприємство "Український науково-дослідний і навчальний центр проблем стандартизації, сертифікації та якості". (2015). *ДСТУ EN ISO 10993-5:2015. Біологічне оцінювання медичних виробів. Частина 5. Випробовування на цитотоксичність in vitro (EN ISO 10993-5:2009, IDT; ISO 10993-5:2009, IDT)*. Затверджено наказом від 25.12.2015 № 208.

302. Штриголь, С. Ю., Койро, О. О., Кудіна, О. В., Товчига, О. В., Юдкевич, Т. К., & Оклеї, Д. В. (2022). Вплив нестероїдних протизапальних препаратів різного механізму дії на перебіг стрес-реакції, функціональний стан нирок, печінки та серця на моделі гострого загального охолодження. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, (2(36), 46–55. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255797>.

303. Волощук, Н. І. & Юхимчук, А. В. (2023). Статеві особливості виживання тварин за гострої холодової травми та корекції глюкозаміну гідрохлоридом. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 17(4), 248-254. <https://doi.org/10.33250/17.04.248>.

304. Коваль, А., & Штриголь, С. (2023). 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5h-[1,2,4]тріазоло [3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон: дозозалежність аналгетичного ефекту, відсутність опіоїдергічного механізму дії, вплив на поведінкові реакції та гостра токсичність. *Acta Medica Leopoliensia*, 29(3-4), 192-203. <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>.

305. Коваль, А. Я., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., Литкін, Д. В., Лебединець, І. О., & Юдкевич, Т. К. (2024). Фригопротекторні властивості похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5h-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазину в експерименті. *Медична та клінічна хімія*, (3), 22–32. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2024.i3.14912>.

306. Emilien, G., van Meurs, W., & Maloteaux, J. M. (2000). The dose-response relationship in phase I clinical trials and beyond: use, meaning, and

assessment. *Pharmacology & therapeutics*, 88(1), 33–58.  
[https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(00\)00077-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(00)00077-2).

307. NIDA. (2022, January 11). *Naloxone drugfacts*. National Institute on Drug Abuse. <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/naloxone>.

308. Escobar, W., Ramirez, K., Avila, C., Limongi, R., Vanegas, H., & Vazquez, E. (2012). Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *European journal of pain (London, England)*, 16(5), 676–689. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00057.x>.

309. Tortorici, V., & Vanegas, H. (2000). Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *The European journal of neuroscience*, 12(11), 4074–4080. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00295.x>.

310. Vazquez, E., Hernandez, N., Escobar, W., & Vanegas, H. (2005). Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain research*, 1048(1-2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.083>.

311. Jasiocka, A., Maślanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 207–214. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030>.

312. Garcia Mayorga , E. A., Hernández Degadillo , G. P., Rocha Aguirre , L. L., Lugo Garcia, A. D., & Castro Lugo, M. P. (2023). Evaluation of Analgesic Tolerance Induced by Metamizole in the Writhing Test Model. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(5), 3994–3520. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v7i5.7972](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i5.7972).

313. Hernández-Delgadillo, G. P., Ventura Martínez, R., Díaz Reval, M. I., Domínguez Ramírez, A. M., & López-Muñoz, F. J. (2002). Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *European journal of pharmacology*, 441(3), 177–183. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01344-4](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01344-4).

314. Koval, A. (2024). Valuation of analgesic activity and mechanisms of action 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5h-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone. *Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University*, 10, 11-12. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/WBRpirY3iKZwRNC>.

315. Adelborg, K., Larsen, J. B., & Hvas, A. M. (2021). Disseminated intravascular coagulation: epidemiology, biomarkers, and management. *British journal of haematology*, 192(5), 803–818. <https://doi.org/10.1111/bjh.17172>.

316. Юхимчук, А. В., Волощук, Н. І., & Штриголь, С. Ю. (2023). Вплив глюкозаміну на стан системи згортання крові у самців та самок щурів за гострої холодової травми. У *Клінічна фармакологія сьогодення: шляхи максимальної допомоги лікарській спеціальності: Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології* (с. 170–172). Вінниця.

317. Бондарев, Є. В. (2020). *Експериментальне обґрунтування оптимізації профілактики та лікування холодової травми засобами метаболіотропної та протизапальної дії* (Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису). Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 «Фармакологія» (22 – Охорона здоров'я). Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків. <http://dspace.nuph.edu.ua/handle/123456789/24555>.

318. Jin, H. X., Teng, Y., Dai, J., Zhao, X. D., & Members of the Emergency Medicine Committee of the People's Liberation Army (2021). Expert consensus on the prevention, diagnosis and treatment of cold injury in China, 2020. *Military Medical Research*, 8(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00295-z>.

319. Rathjen, N. A., Shahbodaghi, S. D., & Brown, J. A. (2019). Hypothermia and Cold Weather Injuries. *American family physician*, 100(11), 680–686. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2019/1201/p680.html>.

320. Grotta, J. C., Albers, G. W., Broderick, J. P., Kasner, S. E., Lo, E. H., Sacco, R. L., Wong, L. K. S., & Day, A. L. (Eds.). (2021). *Stroke: Pathophysiology*,

*diagnosis, and management* (7th ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02267-7>.



## ДОДАТКИ

Додаток А

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:*

1. Коваль, А. Я., Штриголь, С. Ю., Лесик, Р. Б., Литкін, Д. В., Лебединець, І. О., & Юдкевич, Т. К. (2024). Фригопротекторні властивості похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину в експерименті. Медична та клінічна хімія, (3), 22–32. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2024.i3.14912>. (Особистий внесок авторів: огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті, подання статті до друку – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, методологія дослідження, обговорення результатів, написання висновків, перевірка та редагування – Ш.С.Ю.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Л.Р.Б.; Проведення дослідження – Л.Д.В.; методологія дослідження, перевірка та редагування – Л.І.О.; методологія дослідження, оформлення статті – Ю.Т.К.).

2. Коваль, А., & Штриголь, С. (2023). 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон: дозозалежність анагетичного ефекту, відсутність опіоїдергічного механізму дії, вплив на поведінкові реакції та гостра токсичність. Acta Medica Leopoliensia, 29(3-4), 192-203. <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>. (Особистий внесок авторів: огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; написання висновків; оформлення статті; подання статті до друку – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, методологія дослідження, обговорення результатів, написання висновків, перевірка та редагування – Ш.С.Ю.).

3. Koval, A., Lozynskyi, A., Shtrygol', S., & Lesyk, R. (2022). An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-

inflammatory agents. ScienceRise: Pharmaceutical Science, 2(36), 10–17. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.255276>. (Особистий внесок авторів: збір даних, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – К.А.Я.; аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Л.А.В.; концепція та модель, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Ш.С.Ю.; концепція та модель, аналіз та інтерпретація даних, складання рукопису – Л.Р.Б.).

4. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2016). 5,7-Діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на винахід № 112372). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/kw0ogor5/>. (Особистий внесок авторів: концепція, проведення досліджень, підготовка анотації – Д.А.М.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації – Я.О.Є.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації, подача заявки – К.А.Я.; проведення досліджень, підготовка анотації – Б.Л.С.; проведення досліджень, підготовка анотації – Я.В.О.; патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень Д.Д.А.).

5. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Серединська, Н.М., Бухтіарова Т.А., Бершова Т.А., Демченко Д.А., Бобкова Л.С., & Демченко А.М. (2015). Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Медична та клінічна хімія, 17(2). <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866>. (Особистий внесок авторів: проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, подання статті до друку – Я.О.Є.; огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті – К.А.Я.; методологія дослідження, перевірка та редагування – С.Н.М.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків – Б.Т.А.; методологія дослідження, обговорення результатів – Бе.Т.А.; огляд літератури, оформлення статті Д.Д.А.;

*методологія дослідження, перевірка та редагування – Б.Л.С.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Д.А.М.).*

6. Ядловський, О.Є., Коваль, А.Я., Бухтіарова, Т.А., Хоменко, В.С., Омеляненко, З.П., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Демченко А.М. (2015) Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. *Acta Medica Leopoliensia*. 21(4), 59-63. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch\\_2015\\_21\\_4\\_13](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch_2015_21_4_13).  
(*Особистий внесок авторів: проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, подання статті до друку – Я.О.Є.; огляд літератури, проведення дослідження, формулювання та обговорення результатів, написання висновків, оформлення статті – К.А.Я.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків – Б.Т.А.; методологія дослідження, обговорення результатів – Бе.Т.А.; огляд літератури, оформлення статті Д.Д.А.; методологія дослідження, перевірка та редагування – Б.Л.С.; вибір теми та постановка проблеми, написання висновків, перевірка та редагування – Д.А.М.).*

### ***Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:***

7. Коваль, А.Я., Штриголь, С.Ю., & Лесик Р.Б. (2024). Пошук та вивчення сполук з анальгетичною, протизапальною та фригопротекторною дією серед нових похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвяченої 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, 23-24 жовтня 2024 року, Харків, (с. 114-117).  
<https://drive.google.com/file/d/1q6lJDTMF0x3Jf8B5dc4QyLxy61cvw2A2/view>.  
(*Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; написання висновків; оформлення та подання тез).*

8. Koval, A. (2024). Valuation of analgesic activity and mechanisms of action 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-

ethanone. Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 10, 11-12. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/WBRpirY3iKZwRNC>.

9. Koval, A. (2023). Analgesic and anti-inflammatory activity of new 5*H*-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine derivatives. Annals of Pharmaceutical Faculty Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 9, 4. <https://nextcloud.meduniv.lviv.ua/s/6qqGaTfwS9xfQYf>.

10. Коваль, А.Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність похідних 5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину в експерименті. Матеріали VIII науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», 9-10 листопада 2015 р., Вінниця. (с. 151-152).

11. Коваль, А. Я., & Ядловський, О. Є. (2015). Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Збірник матеріалів міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23–24 жовтня 2015 р., Львів (с. 96–98). (*Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; оформлення та подання тез*).

12. Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., Янченко, В.О., & Демченко, А.М. (2015). Пошук нових вискоєфективних аналгетиків в ряді 5,7-диацил-5*H*-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів. Матеріали VI Української конференції «Домбровські хімічні читання – 2015», 22-25 вересня 2015 р., Чернівці. (с.115). (*Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів*).

13. Коваль, А. Я. (2015). Анальгезуюча та протизапальна активність нових похідних триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину. Матеріали VI Південно-східного європейського медичного форуму та XIV З'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 9-12 вересня 2015 р. Одеса. (с. 381)

14. Демченко, А.М., Коваль, А.Я., Ядловський, О.Є., Бобкова, Л.С., Демченко, Д.А., & Янченко, В.О. (2015). Синтез та анальгезуючі властивості 5,7-

диацил-6R-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тідазинів. Збірник тез XV наукової конференції «Львівські хімічні читання – 2015», 25-27 травня 2015, Львів (с. 59). *(Особистий внесок: Огляд літератури; проведення дослідження; формулювання та обговорення результатів; подання тез).*

***Наукові праці, які додатково відображають результати дисертації***

15. Демченко, А. М., Ядловський, О. Є., Коваль, А. Я., Бобкова, Л. С., Янченко, В. О., & Демченко, Д. А. (2015). 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини, що проявляють анальгетичні властивості (Патент України на корисну модель №102848). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://iprop-ua.com/inv/ot225i3j/>. *(Особистий внесок: патентно-інформаційний пошук, проведення досліджень, підготовка анотації, подача заявки).*

**АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. XV Наукова конференція «Львівські хімічні читання – 2015», Львів, 25-27 травня 2015 р. - публікація тез, усна доповідь.
2. VI Південно-східний європейський медичний форум та XIV З'їзд Всеукраїнського лікарського товариства, Одеса, 9-12 вересня 2015 р. - публікація тез.
3. VI Українська конференція «Домбровські хімічні читання – 2015», Чернівці, 22-25 вересня 2015 р. - публікація тез, усна доповідь.
4. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», Львів, 23–24 жовтня 2015 р. - публікація тез.
5. VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», Вінниця, 9-10 листопада 2015 р. - публікація тез, усна доповідь.
6. Міжнародна науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету, Харків, 23-24 жовтня 2024 р. - публікація тез, усна доповідь.





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112372** (13) **C2**  
 (51) МПК (2016.01)  
**C07D 513/04** (2006.01)  
**C07B 41/06** (2006.01)  
**A61K 31/549** (2006.01)  
**A61P 29/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: <b>а 2015 02269</b>	(72) Винахідник(и): <b>Демченко Анатолій Михайлович (UA),</b> <b>Ядловський Олег Євгенович (UA),</b> <b>Коваль Андрій Ярославович (UA),</b> <b>Бобкова Людмила Станіславівна (UA),</b> <b>Янченко Віктор Олексійович (UA),</b> <b>Демченко Діана Анатоліївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>13.03.2015</b>	(73) Власник(и): <b>Демченко Анатолій Михайлович,</b> просп. Перемоги, 163, кв. 16, м. Чернівці, 14013 (UA), <b>Ядловський Олег Євгенович,</b> вул. Бугорна, 10-а, кв. 19, м. Київ 03086 (UA), <b>Коваль Андрій Ярославович,</b> вул. Ясна, 11, м. Львів, 79039 (UA), <b>Бобкова Людмила Станіславівна,</b> вул. Пушиної, 8, кв. 39, м. Київ, 03115 (UA), <b>Янченко Віктор Олексійович,</b> пр. Перемоги, 92, кв. 38, м. Чернівці, 14000 (UA), <b>Демченко Діана Анатоліївна,</b> пр. Алішера Навої, 69, кв. 336, м. Київ, 02125 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.08.2016</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010151799 A2, 29.12.2010, сполука 24813820 Демченко А.М. Синтез та антиоксидантні властивості похідних 6,7-дигідро-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазину / А.М. Демченко, В.О. Янченко, О.С. Смольський, В.О. Агеев та інш. // Фармацевтичний журнал. – 2003. – №6. – С. 40-44 Мальшев В.В. Стереоселективный синтез 3-алкил-6-арил-7-бензил-6,7-дигидро-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]тіадіазинів / В.В. Мальшев, В.А. Янченко, А.М. Демченко // Сборник научных трудов. Международная конференция по химии фосфора Санкт-Петербург, 2002. Секция 2. Сервоорганические соединения, реферат Pfeiffer W.-D. Zur Reaktivität von 2-Hydrazino-1,3,4-thiadiazinen / W.-D. Pfeiffer, E. Dilk, E. Bulka // Zeitschrift fuer Chemie (Stuttgart, Germany). - 1977. - Vol. 17. - P. 15 Westphal, G. Darstellung einiger Triazolo[3,4- <i>b</i> ]-1,3,4-thiadiazine / G. Westphal, P. Henklein // Zeitschrift fuer Chemie (Stuttgart, Germany). - 1969. - Vol. 9. - № 3. - P. 111-112 Sasaki T. Ring Transformation of 1,3,4-Oxadiazole to s-Triazole-Fused Heterocycles. New Synthetic Route for Thiazolo[2,3- <i>c</i> ]-s-triazole and 7H-s-Triazolo[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]thiadiazine / T. Sasaki, E. Ito, I. Shimizu // Journal of Organic Chemistry. - 1982. - Vol. 47. - № 14. - P. 2757-2760 Ядловський О.Є. АНАЛЬГЕЗИВНА ТА ПРОТИЗАПАЛЬНА ДІЯ ПОХІДНИХ 5,7-ДІАЦИЛ-3-Н(АЛКИЛ)-6-АРИЛ-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4- <i>b</i> ][1,3,4]ТІАДІАЗИНУ / О.Є. Ядловський, А.Я. Коваль, Н.М. Серединська та інш. // Медична та клінічна хімія. – 2015. – Т. 17. – №2. – С. 33-38
(41) Публікація відомостей про заявку: <b>27.07.2015, Бюл.№ 14</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.08.2016, Бюл.№ 16</b>	

UA 112372 C2

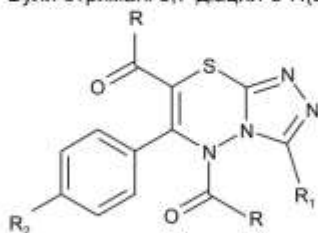


UA 112372 C2

(54) 5,7-ДІАЦИЛ-3-Н(АЛКІЛ)-6-АРИЛ-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[3,4-Ь][1,3,4]ТІАДІАЗИНИ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ АНАЛЬГЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

(57) Реферат:

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема одержання біологічно активних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][1,3,4]тіадіазинів, які виявляють анальгетичну активність і можуть стати основою для розробки нових анальгетичних засобів. Були отримані 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-Ь][1,3,4]тіадіазини формули:



де R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>; R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCHF<sub>2</sub>, Cl, Br, які виявляють анальгетичну активність.

## UA 112372 C2

Винахід належить до фармацевтичної хімії та медицини, зокрема одержання біологічно активних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів, які виявляють анальгетичну активність і можуть стати основою для розробки нових анальгетичних засобів.

Анальгетичні засоби (такі як морфін, кеторолак, анальгін) - це лікарські засоби, що застосовують для боротьби з болем. Анальгетики поділяються на наркотичні, що діють на ЦНС та, зазвичай, викликають звикання, наприклад, опіоїди, і на ненаркотичні, що діють на периферичні центри, знижуючи утворення простагландинів шляхом блокування циклооксигенази.

При незначному болю та болю середньої інтенсивності застосовують ненаркотичні (неопіоїдні) анальгетики, такі, як анальгін, парацетамол, кеторолак, або їх поєднання з наркотичними анальгетиками з невисокою активністю, таких, як кодеїн, дигідрокодеїн та інші.

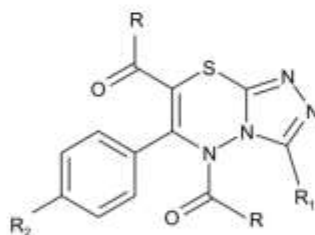
Існують додаткові засоби, що посилюють дію анальгетиків. Препарати цієї групи самі по собі не є анальгетиками, але при болю використовуються у поєднанні з останніми, оскільки можуть змінювати ставлення до сприйняття болю, знижувати тривогу, страх та депресію. Такими засобами можуть бути психотропні препарати, а також ті, що діють на механізм больових відчуттів, наприклад, усувають спазми гладкої мускулатури. При сильному болю використовують високоактивні опіоїди, такі, як морфін [1].

Кеторолак - сполука з групи гетероциклічних похідних оцтової кислоти - є широко відомим знеболювальним нестероїдним протизапальним засобом та, зазвичай, використовується як анальгетик широкого спектру дії. Кеторолак може застосовуватися або у вигляді таблеток, або у вигляді розчину для внутрішньом'язових ін'єкцій, і є рацемічною сумішшю (S)-(-)-форми (активна) та (R)-(+)- форми [2].

Кеторолак пригнічує активність циклооксигенази (ЦОГ-1 та ЦОГ-2) та блокує синтез простагландинів. Подібно до інших анальгетиків, кеторолак проявляє ряд негативних побічних ефектів, а саме, з боку органів шлунково-кишкового тракту (діарея, нудота, гастралгія, диспепсія), з боку нервової системи (сонливість, головний біль, запаморочення) та інші. Також можливі прояви алергічних реакцій.

В основу винаходу поставлена задача пошуку нових біологічно активних нестероїдних сполук з анальгетичною активністю.

Поставлена задача вирішується тим, що як нові біологічно активні сполуки запропоновано ряд 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів формули:

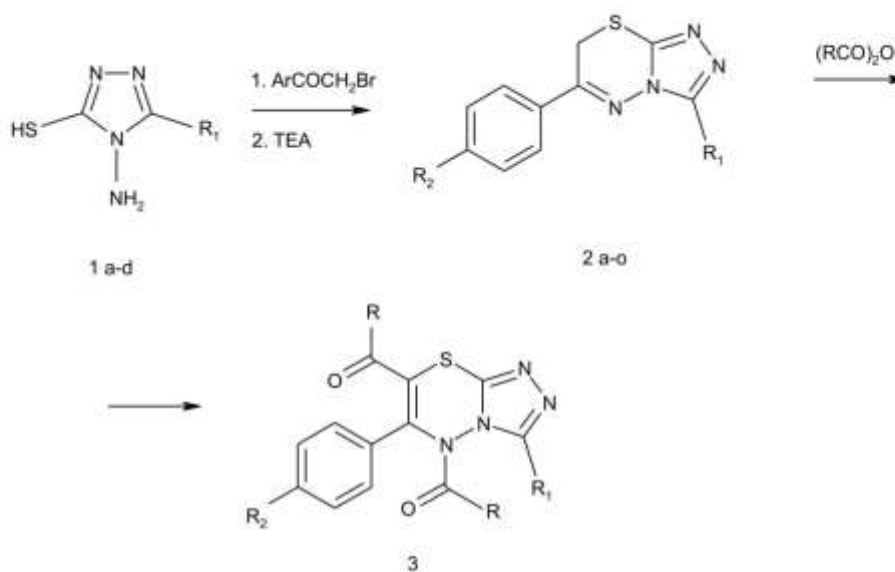


де R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>; R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCHF<sub>2</sub>, Cl, Br, які виявляють анальгетичну активність.

Заявлені сполуки отримують за загальною схемою кип'ятінням відповідних 3-R<sub>1</sub>-6-арил-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів 2 а-о з ангідридами аліфатичних кислот. Останні синтезують при конденсації 4-аміно-5-R<sub>1</sub>-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіолів 1а-д [3-6] із заміщеними фенацилбромідами та подальшою обробкою проміжних гідробромідів триетиламіном [7-12].

Синтез 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазинів 3.

UA 112372 C2



де 1-3 R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>; R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCHF<sub>2</sub>, Cl, Br.

5 Первинну оцінку анальгетичної активності проведено на моделях термічної ("гаряча пластина") [13] та хімічної ("оцетової корчі") [14] стимуляції. Дослідження виконані на білих нелінійних мишах-самках масою 20±2 г, розпліднених у віварії Державної установи "Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України". Тварини утримувались на стандартному харчовому раціоні, отримували їжу та воду *ad libitum*.

10 Тест-речовини (досліджувана речовина та речовина порівняння кеторолак) вводили тваринам у тест-дозі 25 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково з використанням як розчинника водно-спиртової суміші (5 % спирту) з додаванням емульгатора 5 % твіну-20. Об'єм отриманої водно-спиртової емульсії, що вводилася тваринам, не перевищував 0,2 мл на тварину.

Приклади конкретного виконання.

15 4-Аміно-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіол 1а отримано за методом [3] взаємодією тіокарбодіазиду з формамідом, 4-аміно-5-метил(етил)-4Н-[1,2,4]триазоліл-3-тіоли 1b та 1c були одержані за методами [4, 5] взаємодією тіокарбодіазиду з відповідною кислотою. 4-Аміно-5-циклогексил-4Н-[1,2,4]триазол-3-тіол 1d було одержано за методом [6] з гідразиду циклогексилкарбонкової кислоти, CS<sub>2</sub> та гідрозину.

20 6-Феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2а одержано за методом [7], 6-(4'-толіл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2b одержано за методом [8], 3-метил-6-феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2c - за методом [9], 3-метил-6-(4'-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2d - за методом [10], 3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2e - за методом [11], 3-етил-6-феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2f - за методом [12]. Інші заміщені 7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б]тіадіазин 2g-о були синтезовані за одним із вищенаведених методів та використані без додаткового очищення та ідентифікації.

Приклад 1

30 Синтез 5,7-діацетил-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазину 3а: 3,0 г (0,01 моля) 6-феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б] тіадіазину 2а кип'ятили в 10 мл оцтового ангідриду протягом 3 годин із зворотним холодильником. Реакційну суміш охолоджували і виливали у воду. Продукт відфільтровували та перекристалізовували із ізопропанолу. Вихід 81 %. T<sub>пл.</sub> = 111-2 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. ч. (CDCl<sub>3</sub>): 2,39 (с, 3H, NCOCH<sub>3</sub>), 2,65 (с, 3H, CCOCH<sub>3</sub>), 7,44-7,69 (м, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 8,32 (с, 1H, 3-Н).

35 Знайдено, %: N-18,3; S 10,5. C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S. Вирахувано, %: N-18,6; S-10,7.

Приклад 2

Синтез 5,7-дипропіоніл-6-феніл-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазин 3b: 3,0 г (0,01 моля) 6-феніл-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б] тіадіазину 2а кип'ятили в 10 мл пропіонового ангідриду

## UA 112372 C2

протягом 3 годин із зворотним холодильником. Реакційну суміш охолоджували і виливали у воду. Продукт відфільтровували та перекристалізовували із ізопропанолу. Вихід 72 %.  $T_{\text{пл.}} = 118-9^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,05 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,15 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,64 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,04 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,46-7,69 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 9,43 (с, 1H, 3-H).

5 Знайдено, %: N-17,3; S-9,56.  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-17,1; S-9,74.

Приклад 3

5,7-Діацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3с був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-феніл-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 79 %.  $T_{\text{пл.}} = 151-2^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,34 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,57 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,67 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 7,48-7,71 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ). Знайдено, %: N-17,9; S-10,1.  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-17,8; S-10,2.

Приклад 4

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-толіл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3d був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-толіл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 73 %.  $T_{\text{пл.}} = 151-2^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,32 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,36 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,56 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 7,30 і 7,57 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-17,0; S-9,68.  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-17,1; S-9,75.

Приклад 5

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-етилфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3e був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-етилфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 78 %.  $T_{\text{пл.}} = 166-7^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,21 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,33 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,56 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,67 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,33 і 7,60 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ). Знайдено, %: N 16,5; S 9,49.  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-16,4; S-9,35.

Приклад 6

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3f був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 71 %.  $T_{\text{пл.}} = 161-2^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,23(д, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 2,34 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,56 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,96 (м, 1H, CH), 7,37 і 7,61 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-15,9; S-9,07.  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-15,7; S-8,97.

Приклад 7

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-метоксифеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3g був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-метоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 85 %.  $T_{\text{пл.}} = 178-9^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,33 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,56(с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 3,81 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,05 і 7,63 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-16,2; S-9,21.  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ . Вирахувано, %: N-16,3; S-9,29.

Приклад 8

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3h був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 84 %.  $T_{\text{пл.}} = 142-3^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,35 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,57 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,67 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 7,57 і 7,71 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-16,3; S-9,22.  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-16,1; S-9,17.

Приклад 9

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-диформетоксифеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3i був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-диформетоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 73 %.  $T_{\text{пл.}} = 123-4^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 2,34 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,57 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,67 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 7,34 (т, 1H,  $\text{OCHF}_2$ ,  $J=72,4$  Гц), 7,30 і 7,76 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-14,8; S-8,49.  $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,7; S-8,41.

Приклад 10

5,7-Діацетил-3-метил-6-(4'-циклогексилфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3j був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-метил-6-(4'-циклогексилфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 76 %.  $T_{\text{пл.}} = 142-3^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,25-1,82 (м, 10H,  $(\text{CH}_2)_5$ ), 2,34 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,56 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 7,34 і 7,61 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-14,3; S-8,22.  $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N - 14,1; S-8,07.

Приклад 11

5,7-Діацетил-3-етил-6-феніл-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3k був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-етил-6-феніл-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду.

## UA 112372 C2

Вихід 74 %.  $T_{\text{пл}} = 113-4^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,44 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,35 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,58 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 3,08 (кв., 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,48-7,70 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

Знайдено, %: N-17,0; S-9,61.  $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-17,1; S-9,74.

Приклад 12

- 5 5,7-Діацетил-3-циклогексил-6-феніл-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3l був одержаний згідно з прикладом 1 з 3-циклогексил-6-феніл-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та оцтового ангідриду. Вихід 76 %.  $T_{\text{пл}} = 138-9^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,28-2,21 (м, 10H,  $(\text{CH}_2)_5$ ), 2,33 (с, 3H,  $\text{NCOCH}_3$ ), 2,56 (с, 3H,  $\text{CCOCH}_3$ ), 3,21 (с, 1H, CH), 7,45-7,68 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

- 10 Знайдено, %: N-14,4; S 8,23.  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,6; S-8,37.

Приклад 13

- 5,7-Дипропіоніл-6-(4'-толіл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3m був одержаний згідно з прикладом 2 з 6-(4'-толіл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та пропіонового ангідриду. Вихід 69 %.  $T_{\text{пл}} = 119-21^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,06 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,15 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,36 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,64 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,03 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,30 і 7,57 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 9,40 (с, 1H, 3-H).

- 15 Знайдено, %: N-16,2; S-9,27.  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-16,3; S-9,35.

Приклад 14

- 20 5,7-Дипропіоніл-3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3n був одержаний згідно з прикладом 2 з 3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та пропіонового ангідриду. Вихід 72 %.  $T_{\text{пл}} = 146-7^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,06 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,14 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,64 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,67 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,99 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,57 і 7,71 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-14,7; S 8,38.  $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,9; S-8,49.

- 25 Приклад 15. 5,7-Дипропіоніл-3-метил-6-(3',4'-диметоксифеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3o був одержаний згідно з прикладом 2 з 3-метил-6-(3',4'-диметоксифеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та пропіонового ангідриду. Вихід 79 %.  $T_{\text{пл}} = 141-2^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,06 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,15 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,64 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,68 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,99 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,77 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,82 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,04 і 7,28 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

- 30 Знайдено, %: N-14,0; S-8,04.  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ . Вирахувано, %: N-13,9; S-7,95.

Приклад 16

- 35 5,7-Дипропіоніл-3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3p був одержаний згідно з прикладом 2 з 3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та пропіонового ангідриду. Вихід 77 %.  $T_{\text{пл}} = 110-11^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,06 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,14 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,24 (д, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 2,63 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,95 (м, 1H, CH), 2,99 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,35 і 7,62 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-14,5; S-8,27.  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,6; S-8,32.

Приклад 17

- 40 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3q: 3,0 г (0,01 моля) 6-феніл-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину 2a кип'ятили в 10 мл масляного ангідриду протягом 3 годин із зворотним холодильником. Реакційну суміш охолоджували і виливали у воду. Продукт відфільтровували та перекристалізовували із ізопропанолу. Вихід 69 %.  $T_{\text{пл}} = 93-4^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 0,86 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,56 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,68 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,67 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,96 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,47-7,69 (м, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ).

- 45 Знайдено, %: N-15,2; S-8,76.  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-15,1; S-8,64.

Приклад 18

- 50 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-толіл)-5H-[1,2,4]триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3r був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-толіл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 71 %.  $T_{\text{пл}} = 108-9^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 0,86 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,56 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,36 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,60 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,97 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,28 і 7,57 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ). Знайдено, %: N-14,5; S 8,23.  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,6; S-8,32.

Приклад 19

- 55 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-етилфеніл)-5H-[1,2,4] триазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин 3s був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-етилфеніл)-7H-[1,2,4]триазоло[3,4-b]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 66 %.  $T_{\text{пл}} = 107-8^{\circ}\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. ( $\text{DMSO}-d_6$ ): 0,86 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (т, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,55 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,68 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,50 (кв, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,59 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3H, 3- $\text{CH}_3$ ), 2,95 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,31 і 7,59 (д-д, 4H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).

Знайдено, %: N-14,3; S-8,12.  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,1; S-8,03.

- 60 Приклад 20

## UA 112372 C2

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3t був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-ізопропілфеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 70 %.  $T_{\text{пл}} = 121-2^\circ\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,85 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,23 (д, 6Н,  $2\text{CH}_3$ ), 1,56 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,95 (м, 3Н,  $\text{CH}+\text{CH}_2$ ), 7,34 і 7,60 (д-д, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).
- Знайдено, %: N-13,7; S-7,75.  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$  Вирахувано, %: N-13,6; S-7,76.

## Приклад 21

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-метоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3u був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 73 %.  $T_{\text{пл}} = 120-1^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,86 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,57 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,59 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,95 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 3,81 (с, 3Н,  $\text{OCH}_3$ ), 7,03 і 7,63 (д-д, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).
- Знайдено, %: N-14,1; S-8,06.  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,0; S-7,99.

## Приклад 22

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(3'-метоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3v був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(3'-метоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 67 %.  $T_{\text{пл}} = 91-2^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,87 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,58 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,67 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,96 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 3,80 (с, 3Н,  $\text{OCH}_3$ ), 7,03-7,42 (м, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).
- Знайдено, %: N-13,9; S-7,87.  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ . Вирахувано, %: N-14,0; S-7,99.

## Приклад 23

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(3', 4'-диметоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3w був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(3', 4'-диметоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 66 %.  $T_{\text{пл}} = 128-9^\circ\text{C}$  Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,87 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,55 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,68 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,61 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,95 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 3,79 (с, 3Н,  $\text{OCH}_3$ ), 3,81 (с, 3Н,  $\text{OCH}_3$ ), 7,03-7,26 (м, 3Н,  $\text{C}_6\text{H}_3$ ).
- Знайдено, %: N-13,1; S-7,51.  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ . Вирахувано, %: N-13,0; S-7,43.

## Приклад 24

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-етоксифеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3x був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-етоксифеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 71 %.  $T_{\text{пл}} = 128-30^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,87 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,96 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,36 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,57 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,68 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,66 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,95 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 4,08 (кв, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 7,01 і 7,62 (д-д, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ).
- Знайдено, %: N-13,4; S-7,68.  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ . Вирахувано, %: N-13,5; S-7,72.

## Приклад 25

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3y був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-хлорфеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 78 %.  $T_{\text{пл}} = 129-30^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,86 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,56 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,67 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,67 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,96 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 7,55 і 7,71 (д-д, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ). Знайдено, %: N-13,9; S-7,98.  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-13,8; S-7,90.

## Приклад 26

- 5,7-Дибутироніл-3-метил-6-(4'-бромфеніл)-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин 3z був одержаний згідно з прикладом 17 з 3-метил-6-(4'-бромфеніл)-7Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*]тіадіазину та масляного ангідриду. Вихід 75 %.  $T_{\text{пл}} = 125-6^\circ\text{C}$ . Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. ч. (DMSO- $d_6$ ): 0,86 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,95 (т, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 1,56 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 1,68 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (м, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 2,67 (с, 3Н,  $3-\text{CH}_3$ ), 2,96 (т, 2Н,  $\text{CH}_2$ ), 7,63 і 7,71 (д-д, 4Н,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ). Знайдено, %: N-12,3; S-6,98.  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrN}_4\text{O}_2\text{S}$ . Вирахувано, %: N-12,5; S-7,12.

## Приклад 27

- У тесті "гарячої пластини" на приладі Hot-plate metter (Ugo Basile, Італія) тестування проводили на мишах (по 5 у групі), у яких вихідне значення латентного періоду реакції "облизання" лапки не перевищувало 20 с. Латентний період реакції в секундах вимірювали через 1 год, після введення тест-речовин. Розраховували процент зміни до вихідного латентного періоду реакції в кожній групі.

Моделювання вісцерального болю проводили шляхом внутрішньоочеревинного введення мишам 0,6 % розчину оцтової кислоти із розрахунку 0,1 мл/10 г маси тіла через 1 год. після введення тваринам тест-речовин (дослідні групи, по 7 мишей у групі) або розчинника (контрольна група, 10 мишей в групі). Підрахунок кількості "корчів" проводили з 5 по 15 хв. після



## UA 112372 C2

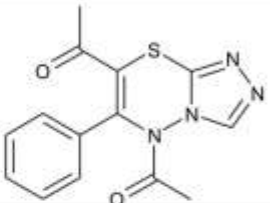
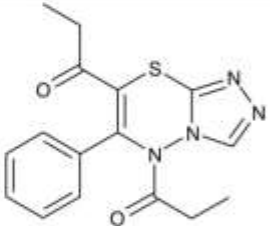
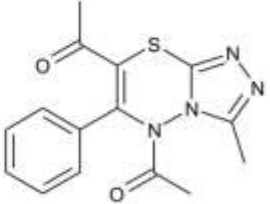
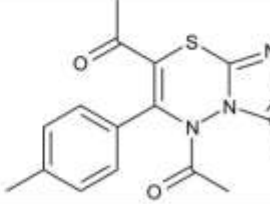
введення оцтової кислоти. Вираховували процент інгібіції числа "корчів" у дослідних групах відносно контролю.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за методом Стюдента. Достовірними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

- 5 Показано, що на моделях термічної та хімічної ноцицептивної стимуляції заявлені сполуки проявляють більш високу активність, ніж кеторолак. Проценти зміни до вихідного латентного періоду реакції та проценти інгібіції числа "корчів" у дослідних групах відносно контролю наведені в таблиці.

Таблиця

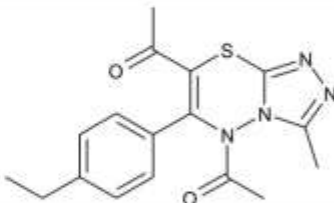
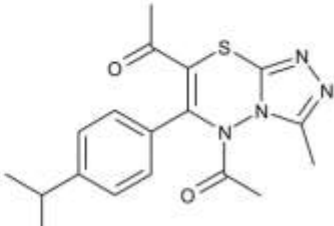
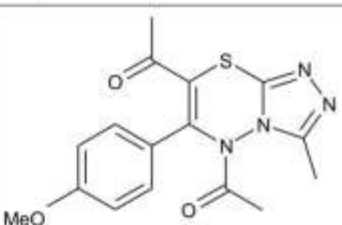
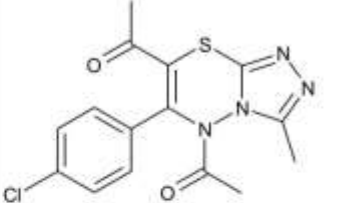
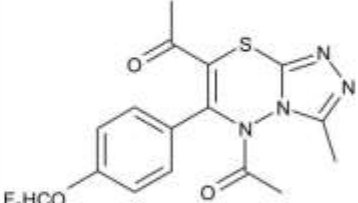
Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокіслі корчі	Карагеніновий набряк
3a	IFT_372		55,2		-28,5
3b	IFT_373		22,6		-32,6
3c	IFT_247		232,5*	-66,7*	-8,33
3d	IFT_71		79,2*		-16,4

UA 112372 C2

Таблиця

Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

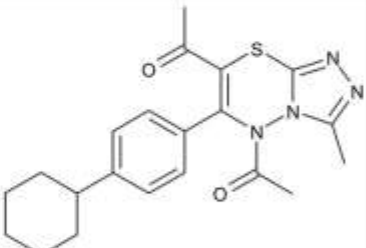
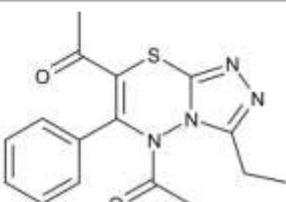
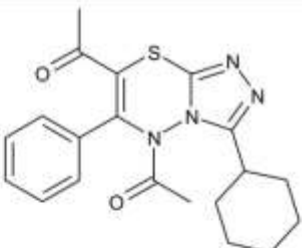
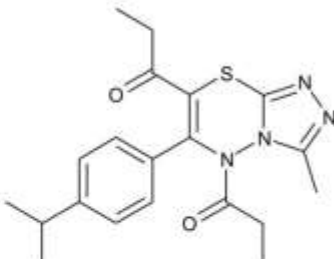
№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокислі корчі	Карагеніновий набряк
3e	IFT_249		26,6	-72,4*	-19,6
3f	IFT_248		143,8*	-25,9*	-26,4*
3g	IFT_251		161,9*	-38,9*	-6,00
3h	IFT_370		152,8*	-30,9	-29,8*
3i	IFT_253		67,1*	-58,0	0



UA 112372 C2

Таблиця

Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокислі корчі	Карагеніновий набряк
3j	IFT_252		225,3*	-50,0*	-14,4
3k	IFT_375		59,0		-25,3
3l	IFT_376		87,2	-34,0*	-15,4
3p	IFT_250		154,2*	-57,9	-3,97

UA 112372 C2

Таблиця

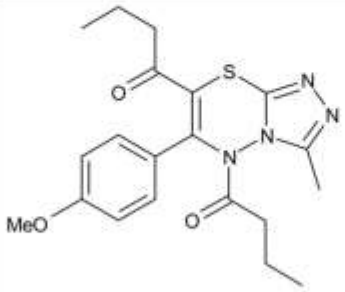
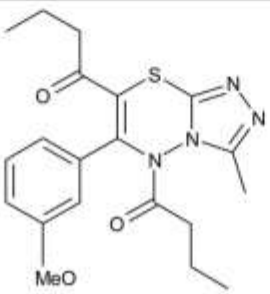
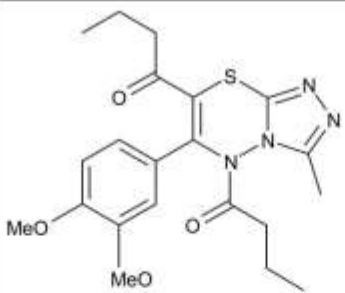
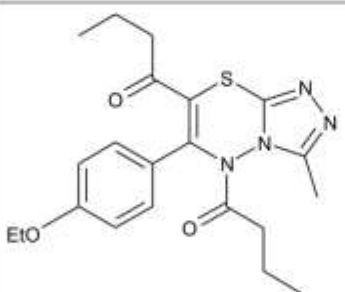
Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]гіадіазину

№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокислі корчі	Карагеніновий набряк
3q	IFT_257		232,6*	-64,9*	-15,1
3r	IFT260		80,9*	-53,5*	-18,7
3s	IFT_255		86,7*	-39,2	-17,8
3t	IFT_80		226,0*	-54,2*	-1,7

UA 112372 C2

Таблиця

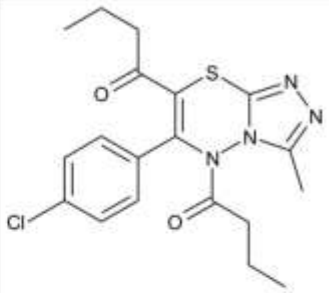
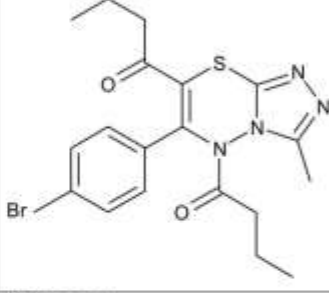
Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокислі корчі	Карагеніновий набряк
3u	IFT_258		197,5*	-53,5*	
3v	IFT_263		104,0*	-55,1	-21,5
3x	IFT_256		72,1	-63,9*	-14,0
3x	IFT_262		133,9*	-62,3*	-28,9

UA 112372 C2

Таблиця

Анальгетична та протизапальна дія похідних 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4] триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину

№	Шифр сполуки	Сполука	Тести		
			Гаряча пластина	Оцтовокислі корчі	Карагеніновий набряк
3у	IFT_261		97,4*	-63,9*	-29,9
3z	IFT_259		36,4	-30,7	-4,67
		Кеторолак	112,7*	-68,0	-35,6*

Примітка: \* $P < 0,05$ .

Вивчення протизапальної дії запропонованих сполук на моделі карагенінового набряку показало, що більшість з них проявляють суттєву протизапальну дію, яка наближається до дії препарату-порівняння кеторолаку.

- 5 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини проявляють анальгетичні властивості. На моделях термічної та хімічної ноцицептивної стимуляції 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазини проявляють більш високу активність, ніж кеторолак. Так, активність сполук IFT\_180, IFT\_247, IFT\_252 та IFT\_257 в тесті "гаряча пластина" складає, відповідно, 226,0 %, 232,5 %, 225,3 % та 232,6 % зміни латентного періоду реакції, в той час як у кеторолаку - 112,7 %. В тесті "оцтовокислі корчі" процент інгібіції числа "корчів" складає 72,4 % для сполуки IFT\_249 та 68,0 % для кеторолаку.

Джерела інформації:

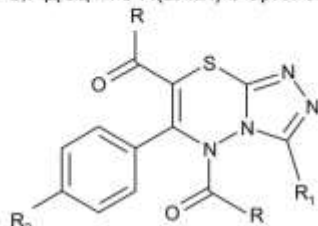
1. Analgesic // Encyclopaedia Britannica Online. [Електронний ресурс]. -Режим доступу:  
 15 <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/22403/analgesic>.  
 2. Toradol (ketorolac tromethamine) product information. Roche Laboratories, Nutley, NJ. 2002.  
 3. Song, Ming-Xia; Zhang, Chun-Bo; Deng, Xian-Qing; Sun, Zhi-Gang; Quan, Zhe-Shan. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of 6-phenyl-7H [1, 2,4]triazolo[3,4-*b*][1, 3,4]thiadiazines // Letters in Drug Design and Discovery. -2011. - Vol. 8. - № 9. - P. 769-773.  
 20 4. Invidiata, Francesco Paolo; Furno, Giancarlo; Lampronti, Ilaria; Simoni, Daniele. 1,2,4-Triazoles. Improved Synthesis of 5-Substituted 4-Amino-3-mercato-(4H)-1, 2,4-triazoles and a Facile Route to 3,6-Disubstituted 1,2,4-Triazolo[3,4-*b*][1, 3,4]thiadiazoles // Journal of Heterocyclic Chemistry. - 1997. - Vol. 34. - № 4.-P. 1255-1258.  
 5. Bhalerao, Uday T.; Muralikrishna, Chivukula; Rani, Bonala Radha. Laccase Enzyme Catalysed Efficient Synthesis of 3-Substituted-1, 2,4-Triazolo(4,3-*b*)(4,1, 2)Benzothiadiazine-8-Ones // Tetrahedron.- 1994. - Vol.50. - № 13. -P. 4019-4024.  
 25

UA 112372 C2

6. Marakos, Panagiotis; Papakonstantinou-Garoufalas, Spyroula; Tani, Ekaterini; Kourounakis, Panos N.; Athanasiou, George; Chytyro glou-Lada, Aikaterini. Synthesis and antifungal and antioxidant properties of some new 5-substituted-4-amino(or aryl)-3-mercapto-4(H)-l, 2,4-triazoles *Arzneimittel-Forschung // Drug Research*. - 2002. - Vol. 52. - № 7. - P. 572-577.
- 5 7. Ibrahim, Yehia A.; Al-Awadi, Nouria A.; John, Elizabeth Pyrolytic desulfurization ring contraction of condensed thiadiazines as a general route towards pyrazoloazines and pyrazoloazoles with a bridgehead (ring junction) nitrogen atom // *Tetrahedron*. - 2008. - Vol. 64. - № 45. - P. 10365-10374.
8. Song, Ming-Xia; Zhang, Chun-Bo; Deng, Xian-Qing; Sun, Zhi-Gang; Quan, Zhe-Shan. Synthesis and anticonvulsant activity evaluation of 6-phenyl-7H [1, 2, 4]triazolo[3, 4-b] [1, 3, 4]thiadiazines // *Letters in Drug Design and Discovery*. -2011. -Vol. 8. -№ 9. -P. 769-773.
- 10 9. Heravi; Bakherad; Rahimzadeh; Bakavoli. Solid acid induced cyclo-condensation: A facile, one-pot synthesis of 7H-[l, 2,4]triazolo[3,4-b][l, 3,4]thiadiazines // *Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements*. - 2002. -Vol. 177. - № 10. - P. 2403-2407.
- 15 10. Westphal, G.; HenkleinJP. Darstellung einiger Triazolo[3,4-b]-l, 3, 4-thiadiazine // *Zeitschrift fuer Chemie (Stuttgart, Germany)*. - 1969. - Vol. 9. - № 3. -P. 111-112.
11. Wolf-Diethard Pfeiffer, Erich Dilk and Ehrenfried Bulka. Zur Reaktivitat von 2-Hydrazino-l, 3,4-thiadiazinen // *Zeitschrift fuer Chemie (Stuttgart, Germany)*. -1977. -Vol. 17. -P. 15.
12. Sasaki, Tadashi; Ito, Eikoh; Shimizu, Ikuo. Ring Transformation of 1,3,4-Oxadiazole to s-Triazole-Fused Heterocycles. New Synthetic Route for Thiazolo[2,3-c]-s-triazole and 7H-s-Triazolo[3,4-b][l, 3,4]thiadiazine // *Journal of Organic Chemistry*. - 1982. - Vol. 47. - № 14. - P. 2757-2760.
- 20 13. Komlos E., Porsresr J., Knole J. Morfin-prostigmin synergismus // *Az. Acta. Physiologica. Acad. Scient. Hungaricae*. - 1950. - №1. - P. 77-83.
- 25 14. Wood R.L. Animal models in analgesic testing// *Analgesics: Neuroche-mical, Behavioral and Clinical perspectives*. Kuhar M., Pasternak J. (Eds) Raven Press/ New-York. - 1941. -Vol.42. - P. 74.

## ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 30 5,7-Діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]триазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазини формули:



- де R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, H-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>; R<sub>1</sub> = H, CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, цикло-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>; R<sub>2</sub> = H, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, цикло-C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>, OCH<sub>3</sub>, OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, OCHF<sub>2</sub>, Cl, Br,  
 35 за умови, коли R = R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> не є H,  
 що проявляють анальгетичні властивості.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601