

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

КРАМАР ГАННА ІВАНІВНА

УДК 547.856.1:615.211:612.08

**ПОШУК ТА ВИВЧЕННЯ РЕЧОВИН З АНАЛГЕТИЧНОЮ ДІЄЮ В РЯДУ
НОВИХ ПОХІДНИХ 4-ОКСО(АМІНО-)ХІНАЗОЛІНУ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Вінницькому національному медичному університету імені М. І. Пирогова МОЗ України

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор
СТЕПАНЮК Георгій Іванович
Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України
професор кафедри фармакології

Офіційні опоненти:

доктор фармацевтичних наук, професор
МАРЧИШИН Світлана Михайлівна
Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, завідувач кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою

доктор медичних наук, професор
МАМЧУР Віталій Йосипович
ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
професор кафедри фармакології і клінічної фармакології

Захист відбудеться «5» лютого 2021 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «___» _____ 2020 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03
д-р фарм. наук, професор

К. Г. Щокіна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Фармакологічна корекція больового синдрому була і залишається пріоритетним завданням клінічної медицини. Біль порушує активність і соціальну адаптацію хворих, знижує якість їх життя. Згідно з точкою зору експертів ВООЗ, біль набув характер пандемії. Близько 70 % усіх відомих захворювань супроводжуються болем, кожна п'ята працездатна людина страждає від нього. (І. С. Зозуля та співавт., 2016; А. Н. Корж 2017; Т. Ryum, Н. Jacobsen et. al., 2019).

Ефективне та своєчасне усунення больового синдрому, або зменшення ступеню його виразності, покращують якість та продовжують тривалість життя хворого, соціальну адаптацію та працездатність хворих з багатьма гострими та хронічними захворюваннями (В. Morgan, 2018; N. Elder, 2016; R. Schüchen, M. Mücke, et. al., 2018).

На сьогодні для усунення болю використовують різні групи лікарських засобів, однак основним способом позбавлення болю є використання НА, ННА та НПЗЗ та різноманітних їхніх комбінацій (А. А. Котвіцька, Г. В. Костюк, 2016; В. Monje, А. Gimenez-Manzorro, et. al., 2019). В фармакотерапії патологічних процесів, що проявляються больовим синдромом, запаленням, лихоманкою саме ННА та НПЗЗ посідають провідне місце (R. Boughraira, S. Belguith et al., 2019).

Існуючі лікарські засоби не задовольняють запити клініцистів через недостатню ефективність та наявність побічних реакцій, зокрема гастро-, нефро-, гепато-, гематоксичність, що можуть представляти загрозу для здоров'я та життя пацієнтів (Л. В. Журавльова, О. М. Олійник, 2018; Y. Kok, A. Kok, et. al., 2018; D. Nohra, N. Molinari et. al., 2019).

Наведені дані вказують на доцільність пошуку нових хімічних сполук з аналгетичною активністю, придатних для створення на їх основі більш ефективних та безпечних лікарських засобів.

У цьому плані нашу увагу привернули нові похідні 4-оксо(аміно-)хіназоліну, які поруч з потужними церебро-, акто- та стреспротекторною діями, мають низьку токсичність (С. В. Павлов, 2007; О. А. Ходаківський, 2009; О. І. Альчук, 2011). Також відомо, що їх структурні аналоги – похідні (3-*R*-2-оксо-2*H*-[1,2,4]триазино-[2,3-*c*]хіназолін-6-іл)алкілкарбонових кислот, є носіями аналгетичної активності (Г. І. Степанюк та співавт., 2011; В. В. Якубовська, 2018). Проведена, оцінка вірогідної наявності окремих видів фармакологічної активності, отримана за допомогою комп'ютерної програми віртуального скринінгу (PASS C&T), показала, що синтезовані сполуки можуть мати аналгетичну дію (К. П. Шабельник, 2007). Широкий фармакологічний потенціал похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну дає підставу сподіватись на наявність у них знеболюючої дії, що і стало підставою для проведення даного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, затверджених МОЗ України: «Пошук та розробка нових шляхів оптимізації

фармакологічних ефектів нестероїдних протизапальних засобів» (№ держреєстрації 0111 U 002571; 2011–2015 рр.); «Пошук та вивчення біологічно активних речовин серед природних сполук та продуктів хімічного синтезу» (№ держреєстрації 0118U001903; 2018–2022 рр.). Автор є співвиконавцем зазначених тем.

Мета і завдання дослідження. *Метою* дисертаційного дослідження було встановити наявність та ступінь знеболювальної дії в ряду нових похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну, виявити сполуку-лідера, конкурентоспроможну з сучасними препаратами та визначити її перспективність для створення нового лікарського засобу.

Для досягнення цієї мети поставлені такі *завдання*:

1. Провести скринінг аналгетичної активності в ряду нових похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну, на моделях термічного та електроімпульсного подразнення, встановити залежність «структура-ефект» виявити сполуку-лідера, конкурентоспроможну із натрію диклофенаком та кеторолаку трометаміном.

2. Провести поглиблене дослідження фармакологічних властивостей сполуки-лідера: вплив на альтеративну, ексудативну та проліферативну фази запалення, а також жарознижувальну дію, охарактеризувати ступінь гастротоксичності при тривалому введенні в організм.

3. Оцінити ступінь лікувальної дії та безпечності сполуки-лідера на моделі ад'ювантного артриту у щурів за клінічними (летальність, аналгетична та протизапальна дії), гематологічними (ШОЕ, лейкоцити, еритроцити, тромбоцити), біохімічними (активність РGN-синтази, ізоформи NO-синтаз, NO, МДА, СОД, міст загального білка, альбумінів, глобулінів) та морфологічними (зміни у суглобі та шлунку) показниками.

4. Дослідити деякі рецепторні та медіаторні механізми знеболюючої дії сполуки-лідера та її вплив на активність ПГ-синтази.

5. Охарактеризувати перспективи створення нового ненаркотичного анальгетика на основі сполуки-лідера.

Об'єкт дослідження. Перебіг патологічних процесів, що супроводжуються больовим синдромом у лабораторних тварин.

Предмет дослідження. Аналгетична та протизапальна активність похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційної роботи використовували комплексний підхід із залученням фармакологічних (дослідження знеболюючої дії на моделях термічного подразнення, tail flick, електричного подразнення, оцтово-кислих корчах, формаліновий тест, моделі нейропатичного болю; дослідження протизапальної дії: асептична виразка шкіри, карагеніновий набряк, модель ватної гранульоми, АА); токсикологічних (дослідження гастротоксичності – за ступенем множинності, важкості виразкоутворення, величиною виразкового індексу); гематологічних – вміст ШОЕ, гемоглобіну, кількість лейкоцитів, еритроцитів; біохімічних (ферментні системи продукції простагландинів, ферментні системи продукції NO, сумарна та активність різних ізоформ NO-синтаз, вміст МДА,

серомукоїду, активність СОД, ГГТП, вміст загального білка, альбумінів, глобулінів); морфологічних (дослідження гістологічної зміни СОШ та гомілковостопних суглобів тварин), статистичних (розрахунок середньої та її стандартної похибки, довірчого інтервалу, міжгрупових відмінностей тощо) методів дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально доведено на моделях соматичного больового синдрому (тест теплової імерсії хвоста та електроімпульсного подразнення слизової оболонки прямої кишки) наявність аналгетичного ефекту у нових похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну. Виявлено, що аналгетична активність досліджуваних сполук визначається природою замісника у 3-му положенні хіназолінового циклу. Найбільш ефективними виявились похідні в дозі 10 мг/кг, що містять фенільну субституенту з незаблокованою карбоксильною групою у *n*-положенні ПК-66 (169,6 %, $p < 0,05$), ПК-195 (126,4 %, $p < 0,05$), та складноефірною у *m*-положенні ПК-176 (128 %, $p < 0,05$) з розгалуженим аліфатичним ланцюгом 3-го положення хіназолінового циклу, які за величиною знеболюючого ефекту практично зіставлялись з кеторолаку трометаміном (144,0 %, $p < 0,05$), перевищуючи дію натрію диклофенаку (80,4 %, $p < 0,05$). Серед карбоксильних похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну найбільш активними виявились сполуки ПК-195 та ПК-199, які містять карбоксильну групу у *n*- та *m*-положеннях. В свою чергу, серед анілідів (6-*R*-4-оксо-4*H*-хіназолін-3-іл)оцтових кислот, здатність конкурувати з натрію диклофенаком за силою аналгезуючого ефекту виявили сполуки ПК-51 та ПК-53.

На різних моделях больової перцепції доведено, що в ряду досліджуваних похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну найбільш ефективною та безпечною щодо впливу на ШКТ виявилась 4-[4-оксо-(4*H*)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (сполука ПК-66) у дозі 1 мг/кг, яка за ефективністю (ED_{50} на моделі "tail flick") перевершувала натрію диклофенак та кеторолаку трометамін в 4 та 2,4 рази ($p < 0,05$), відповідно. Водночас ульцерогенний індекс цієї сполуки становив 0,25 бали, в порівнянні з аналогічним показником для натрію диклофенаку та кеторолаку трометаміну (2,07 та 1,71 бали).

Встановлено що, сполуці ПК-66 у дозі 1 мг/кг притаманна виразна антиальтеративна (71,4 %, $p < 0,05$) та помірні антиексудативна (31,8 %, $p < 0,05$), антипроліферативна (12,0 %, $p < 0,05$) та антипірогенна (43,2 %, $p < 0,05$) активності.

Вперше доведено лікувальну дію сполуки ПК-66 у дозі 1 мг/кг на моделі АА у щурів та оцінено ступінь її безпечності (ВІ – 0,31 балів) щодо основних органівмішеної токсичного впливу ненаркотичних аналгетиків (шлунку, суглобів, крові).

Дослідження за допомогою фармакологічних аналізаторів сприяло встановленню основних нейрохімічних механізмів антиноціцептивної дії сполуки ПК-66, а саме – участь адренергічної (альфа-2), дофамінергічної та ГАМК-ергічної систем за відсутності впливу ПК-66 на опіїдні рецептори. Крім того, вперше доведено наявність у сполуки ПК-66 в дозі 1 мг/кг помірного депримуєчого впливу на сумарну активність РGH-синтази в плазмі крові щурів із експериментальним запальним процесом, та відсутністю цього впливу у інтактних тварин, що дало

підставу зробити припущення про переважання інгібуючого впливу ПК-66 на активність ЦОГ-2.

Наукова новизна роботи підтверджена патентом України на корисну модель № 79947 «Застосування 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти як засобу з центральною знеболюючою дією».

Практичне значення отриманих результатів. Результати проведеного дослідження розширили уявлення про фармакодинаміку похідних хіназоліну та його конденсованих аналогів.

Отримані в роботі дані, стосовно фармакологічної активності та безпечності найбільш активної композиції 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (ПК-66) вказують на доцільність її подальших поглиблених досліджень як потенційного неопіоїдного анагетика з низькою гастротоксичністю та оригінальним механізмом дії.

Результати роботи впроваджено в наукову роботу наукової лабораторію хіміко-фармакологічних досліджень Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол № 5 від 16.01.2019 р.), науково-дослідний інститут медико-біологічних проблем Дніпропетровської медичної академії (протокол № 6 від 21.12.2018), наукову роботу відділу НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол № 4 від 19.09.2019 р.), в науково-педагогічний процес кафедр органічної і біоорганічної хімії, Запорізького державного медичного університету (протокол № 4 від 16.10.2019 р.), фармакології ВДНЗ України «Буковинського державного медичного університету» (протокол № 1 від 29.08.2019), патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол № 7 від 21.11.2019 р.).

За результатами досліджень створено та опубліковано інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Застосування нових похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну як засобів з центральною знеболюючою дією» (№ 268-2014).

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником визначені мета та завдання дослідження, розроблені методичні підходи для вибору моделей та методів проведення експерименту. Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано дані вітчизняної та зарубіжної літератури за темою дисертації, виконано усі експериментальні дослідження, математичну обробку і статистичний аналіз результатів. Самостійно написано та оформлено розділи роботи, разом із науковим керівником сформульовано основні положення та висновки дисертації, підготовлено матеріали до друку та впровадження.

Співавторами наукових праць є науковий керівник роботи професор кафедри фармакології Г. І. Степанюк та науковці, за консультативної допомоги та участі яких проведено окремі дослідження – завідувач кафедри фармакології ВНМУ ім. Пирогова проф. Н. І. Волощук, доц. кафедри фармакології І. В. Таран, доц. кафедри фармакології О. І. Альчук, завідувач кафедри органічної і біоорганічної хімії ЗДМУ проф. С. І. Коваленко.

Біохімічні дослідження проведено за консультативної допомоги завідувача кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. Пирогова проф. Н. В. Заїчко,

морфологічні дослідження – за консультативної допомоги професора кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права ВНМУ ім. М. І. Пирогова д-р мед. наук С. В. Вернигородського. Дисертант вдячний усім науковцям за консультативну допомогу.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладені та обговорені на: IV Національному з'їзді фармакологів України (м. Київ, 10–12 жовтня 2011 р.), 72 Всеукраїнській науково-практичній конференції «Медицина та фармація XXI століття – крок у майбутнє» (м. Запоріжжя, 19–20 квітня 2012 р.), VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань в світлі доказової медицини» (м. Вінниця, 26–27 листопада 2013 р.); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (м. Вінниця, 9–10 листопада 2015 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2015» (м. Запоріжжя, 14–15 травня 2015 р.); VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (м. Харків, 13–16 вересня 2016 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (м. Запоріжжя, 24–25 листопада 2016 р.); Науковій конференції з міжнародною участю «Актуальные вопросы фармакологии и клинической фармакологии» (м. Кишинів, 30 листопада 2018 р.).

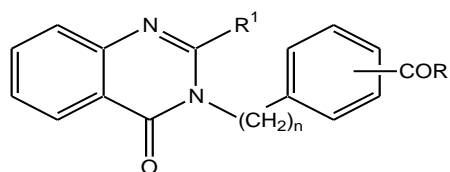
Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 17 наукових праць: 7 статей (3 – одноосібних), серед яких 5 – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 2 – у зарубіжних періодичних наукових виданнях, в т.ч. 1 – у міжнародній наукометричній базі даних Scopus, 8 тез доповідей, 1 патент України на корисну модель (№ 79947), 1 інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 219 сторінках комп'ютерного друку і містить анотації українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, розділ «Матеріали та методи дослідження», 5 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, висновки і список використаних джерел в кількості 334 найменувань, з яких 174 – кирилицею та 160 – латиною. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота проілюстрована 37 таблицями та 28 рисунками.

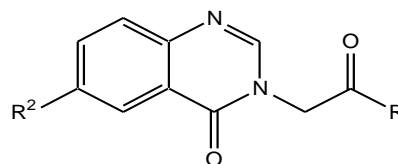
ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Об'єктом для дослідження було взято 15 оригінальних похідних похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну (рис. 1), які синтезовані на кафедрі органічної і біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету під керівництвом проф. С. І. Коваленко.

Досліджувані тест-зразки розчиняли в тріс-амінометановому буфері та вводили в/оч в емпірично взятій дозі 10 мг/кг (О. А. Ходаківський, 2009; О. І. Альчук, 2011). Тварини контрольних груп отримували еквіоб'ємні кількості 0,9 % розчину NaCl. В якості препаратів-порівняння використовували 2,5 % ампульний розчин диклофенаку натрію ("Немофарм" АД, Сербія) та 0,3 % ампульний розчин кеторолаку трометаміну під торговою назвою «Кетанов» ("Ranbaxy Laboratories Limited", Індія).



ПК-66, *p*-COR, R=OH, R¹=H, n=0;
 ПК-157, *p*-COR, R=NHCH(CH₃)(COOCH₃), R¹=H, n=0;
 ПК-103, *p*-COR, R=NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)(COOCH₃), R¹=H, n=0;
 ПК-176, *m*-COR, R=NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)(COOCH₃), R¹=H, n=0;
 ПК-195, *p*-COR, R=OH, R¹=CH₃, n=0;
 ПК-199, *m*-COR, R=OH, R¹=CH₃, n=0;
 ПК-205, *o*-COR, R=OH, R¹=CH₃, n=0;
 ПК-210, *p*-COR, R=OCH₂CH₃, R¹=C(O)(OCH₂CH₃), n=0;
 ПК-193, *p*-COR, R=OH, R¹=CH₃, n=1.



ПК-41, R=NHC₆H₅, R²=H;
 ПК-51, R=NHC₆H₄(3-CF₃), R²=H;
 ПК-53, R=NHC₆H₄(3-Cl), R²=H;
 ПК-32, R=NHC₆H₄(4-C(O)OCH₂CH₃), R²=NO₂;
 ПК-42, R=NHC₆H₄(3-NO₂), R²=H;
 ПК-166, R=NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)(COOCH₃), R²=H.

Рис. 1 – Принципова будова похідних 4- оксо(аміно-) хіназоліну

Експериментальна частина роботи виконана на 737 білих нелінійних щурах та 78 мишах обох статей, розводки віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, а також 302 щурах-самцях лінії Вістар, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Дотримання біотичних норм при проведенні експериментальних досліджень на тваринах засвідчено висновком комісії з питань біомедичної етики ВНМУ імені М. І. Пирогова (протокол № 4 від 21 березня 2013 р. та № 3 від 28 лютого 2019 р.).

Скринінг аналгетичної активності похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну, проводили на моделях болювого синдрому термічного подразнення хвоста щурів гарячою водою t 50 °C (О. В. Стефанов, 2001) та електроімпульсним подразненням прямої кишки (В. В. Гацура, 1974). Досліджувані сполуки та препарати порівняння вводили в емпірично взятій дозі 10 мг/кг в/оч (В. В. Якубовська, 2016; М. І. Белецкий, 1963; О. І. Альчук, 2011).

Визначення ЕД₅₀ за аналгетичною активністю сполук проводили на моделі термічного подразнення хвоста щурів та розраховували графічним методом за Літчфілдом-Уілкоксоном, за результатами оцінки дії 5 доз. Досліджувані сполуки та препарати-порівняння подальших дослідженнях застосовувались в розрахованих дозах в/оч.

Тривалість антиноціцептивної дії речовин в дозах ЕД₅₀ за аналгетичною активністю встановлювали на моделі термічного подразнення («tail-flick») за допомогою аналгезиметра (Ugo Basile, Italy) (О. В. Стефанов, 2001).

Аналгетичну активність досліджуваних сполук та препаратів-порівняння в дозах ЕД₅₀ за аналгетичною активністю, вивчали на моделі «оцтовокислих корчів», шляхом введення розчину 0,6 %, оцтової кислоти, в об'ємі 0,1 мл/10 г миші (О. В. Стефанов, 2001) та на моделі невропатичного болю, яку відтворювали шляхом перерізки сідничного нерва (А. Н. Миронов, 2012), де ПБЧ порівнювали на неушкодженій та ушкодженій кінцівках на 14 день експерименту.

Протизапальну дію досліджували на моделі асептичного запалення шкіри, яку відтворювали підшкірним одноразовим введенням тварині в ділянці спини 0,5 мл 9 % розчину оцтової кислоти з одночасним в/оч введенням 6 % розчину декстрану

(Ф. П. Трінус та співавт., 1975). Гостре ексудативне запалення викликали введенням 0,1 мл 1 % розчину карагеніну під подошвенний апоневроз правої задньої кінцівки щура (А. Н. Миронов, 2012). Антипроліферативну дію досліджували на моделі ватної гранульоми (О. В. Стефанов, 2001).

Антипірогенну дію речовин досліджували на моделі молочної лихоманки (О. В. Стефанов, 2001).

Дослідження гастротоксичної дії сполук здійснювали у інтактних тварин за тривалого введення (30 діб), сполуки вводили в/оч один раз на день у дозах, які дорівнювали $\frac{1}{2}$ ЕД₅₀. (Р. У. Хабриев, 2005). На 31 добу проводили макроскопічне дослідження СОШ (Л. В. Яковлева, 2001).

АА у щурів моделювали введенням під подошвенний апоневроз задньої правої лапи 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда (Thermo Fisher scientific, США) (О. В. Стефанов, 2001). Оцінювали товщину ушкодженої кінцівки (Г. І. Степанюк, 1989), ПБЧ та безпечність лікування шляхом макроскопічної та мікроскопічної оцінки стану СОШ та гомілкових суглобів.

Гематологічний аналіз крові проводили на автоматичному гемоаналізаторові Erma PCS-210 (Японія). Вміст нітритів та нітратів в гомогенаті СОШ визначали за реакцією з реактивом Гріса (І. М. Коренман, 1975). Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) у гомогенатах СОШ щурів встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніону (NO₂⁻) (Н. М. Гула, 2007). Для визначення активності індуцибельної ізоформи NOS до складу інкубаційної суміші замість CaCl₂ додавали ЕДТА до кінцевої концентрації 4 мМ. Активність ендотеліальної ізоформи NOS розраховували як різницю активності сумарної NOS та її індуцибельної ізоформи (Н. М. Гула, 2007). Активність простагландин-ендопероксидсинтази (PGH-синтази, КФ 1.14.99.1) в гомогенатах СОШ визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисненої форми донору електронів - адреналіну (А. Т. Мевх, 1982).

Загальний вміст білка в гомогенатах тканин визначали колориметричним методом Lowry (Л. А. Данилова, 2003). Активність ГГТ (КФ 2.3.2.2) в сироватці крові визначали методом за набором «ГГТ» (Філісіт-Діагностика, Україна) (В. В. Меньшиков, 1987). Вміст серомукоїдів визначали турбодиметричним методом за набором «Серогликоїди» (Філісіт-Діагностика, Україна). Вміст МДА визначався за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Владимиров, Арчаков, 1972). Активність СОД КФ 1.15.1.1 оцінювали за відсотком гальмування окиснення кверцетину (В. А. Костюк, 1990).

Препарати оцінки морфологічних змін фрагментів СОШ та суглоба експериментальних тварин з АА готували за стандартною методикою, гістологічні зрізи товщиною (5–7) мкм фарбували гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за ван Гізеном, основним коричневим за Шубічем, комбінацією основного коричневого та міцного зеленого барвника, ШИК-реакції з альціановим синім (Г. Г. Автандилов, 2002; В. Ю. Голофеевській та співавт., 1978; А. Г. Сапожников та співавт., 2000).

Оцінку механізмів аналгетичної дії сполуки ПК-66 проводили на моделі формалінового тесту, шляхом субплантарного введення 0,1 мл 5 % розчину

формаліну (J. E. Torres-Lopez, 2002), оцінювали вплив ПК-66 та натрію диклофенаку на тривалість ЛП I та II фази даного тесту.

Дослідження деяких механізмів дії сполуки-лідера проводили на моделі термічного подразнення («tail-flick») з використанням фармакологічних аналізаторів: налоксон (субстанція, ТОВ «ІНТЕРХІМ», Україна), трамадол (5 % розчин в ампулах по 2 мл, ВАТ «Дніпрофарм», м. Дніпропетровськ, Україна), резерпін (субстанція, Sigma, США), норадреналіну тартрат (концентрат для р-ну д/інф. по 4 мл в амп., Лаб. Агетан, Франція), клонідин (субстанція, Sigma, США), йохімбін (табл. 5 мг, ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я»», м. Харків, Україна), леводопа (табл. по 25 мг/250 мг Карбідopa I Леводопа, ТЕВА, Ізраїль), аміназин (25 мг/мл по 2 мл в амп.), дофамін (40 мг/мл, амп. по 5 мл Дарниця, Україна), мемантин (субстанція, ТДВ «ІНТЕРХІМ»), діазепам (розчин 2 мл (5 мг/мл) в ампулах, "Elegant India", Індія), а також субстанції брадикініну (Sigma, США), зимозану (Sigma, США), карагеніну (Sigma, США). Препарати вводили в діапазоні терапевтичних доз, які запозичені з даних літератури (А. Н. Миронов, 2012; S. G Khasar, 2003; Н. І. Волощук, та співавт., 2017; D. C. Jewett, 2005; M. A. Smith, 2005; S. E. Nsimba 2009; О. Є. Ядловський, 2014; X. Gao et al., 2001; E. J. Calabrese, 2001; S. E. Lee et al., 2016; О. Г. Кметь, 2004; A. Latremolier, 2009; С. Е. Сердюк, 2014; Т. Д. Никула та співавт., 2003; R. P. Priyadharsini, 2014; M. K. Mahoney, 2016; M. Q. Hassan, 2015; T. L. Verplaetse, 2015), і які згідно вимог ДФЦ МОЗ України по доклінічному вивченню лікарських засобів (О. В. Стефанов, 2001) рекомендуються для експериментальних досліджень. Порівнювали вихідні показники тривалості ЛП та зміни його через 1, 2, 4 та 6.

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою критерію Шапіро-Уїлка, множинні порівняння даних з нормальним розподілом – параметричний однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA та метод Н'юмена-Кейлса, ранговий аналіз варіацій за Крускалом-Уоллісом та порівняння вибірок за допомогою критерію Мана-Уїтні. Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$ (С. Н. Лапач та ін. 2001).

Результати та їх обговорення.

У рамках скринінгового дослідження похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну на моделях соматичного больового синдрому найбільш ефективними виявились сполуки з лабораторними шифрами ПК-66, ПК-176 та ПК-195 в дозі 10 мг/кг, в/оч. Аналіз «структура-активність» показав: наявність *n*-карбоксылної (ПК-66, ПК-195) або *m*-карбамідної (ПК-176) груп при фенільній субституенті положення 3 хіназолінового циклу забезпечує високий аналгетичний ефект, вказані сполуки практично зіставлялись з кеторолаку трометаміном, перевищуючи дію натрію диклофенаку.

Середно-ефективні дози за аналгетичною активністю сполук, які виявили найбільшу ефективність на скринінгових моделях та препарати-порівняння можна розташувати у такий ряд: ПК-66>ПК-199>ПК-53>кеторолак>ПК-193>ПК-51>диклофенак>ПК-195>ПК-176 (табл. 1). За показником аналгетичної активності (ЕД₅₀) сполукою-лідером можна вважати ПК-66, яка переважає кеторолаку трометамін у 2,4 рази ($p < 0,05$), а натрію диклофенак у 4 рази ($p < 0,05$) (табл. 1).

Середня ефективна доза похідних хіназоліну, натрію диклофенаку та кеторолаку трометаміну за анальгетичною активністю у щурів ($M \pm m$, $n = 7$)

| Шифр сполук | ЕД ₅₀ та її довірчий інтервал, мг/кг |
|-----------------------|---|
| ПК-66 | 1,04 (0,17 ÷ 1,91) |
| ПК-199 | 1,5 (0,42 ÷ 2,58) |
| ПК-53 | 2,15 (1,32 ÷ 2,98) |
| Кеторолаку трометамін | 2,39 (1,33 ÷ 3,45) |
| ПК-193 | 2,42 (1,25 ÷ 3,59) |
| ПК-51 | 3,19 (2,30 ÷ 4,08) |
| Натрію диклофенак | 4,1 (3,48 ÷ 4,72) |
| ПК-195 | 5,83 (5,01 ÷ 6,65) |
| ПК-176 | 5,96 (5,20 ÷ 6,72) |

За тривалістю знеболення ПК-66 вірогідно переважала інші досліджувані сполуки та препарати порівняння, оскільки тривалість латентного періоду ПК-66 (1 мг/кг в/оч) становила понад 6 год проти 1 год на тлі натрію диклофенаку (4 мг/кг в/оч) та 3 години під дією кеторолаку трометаміну (2,4 мг/кг в/оч) (рис. 2).

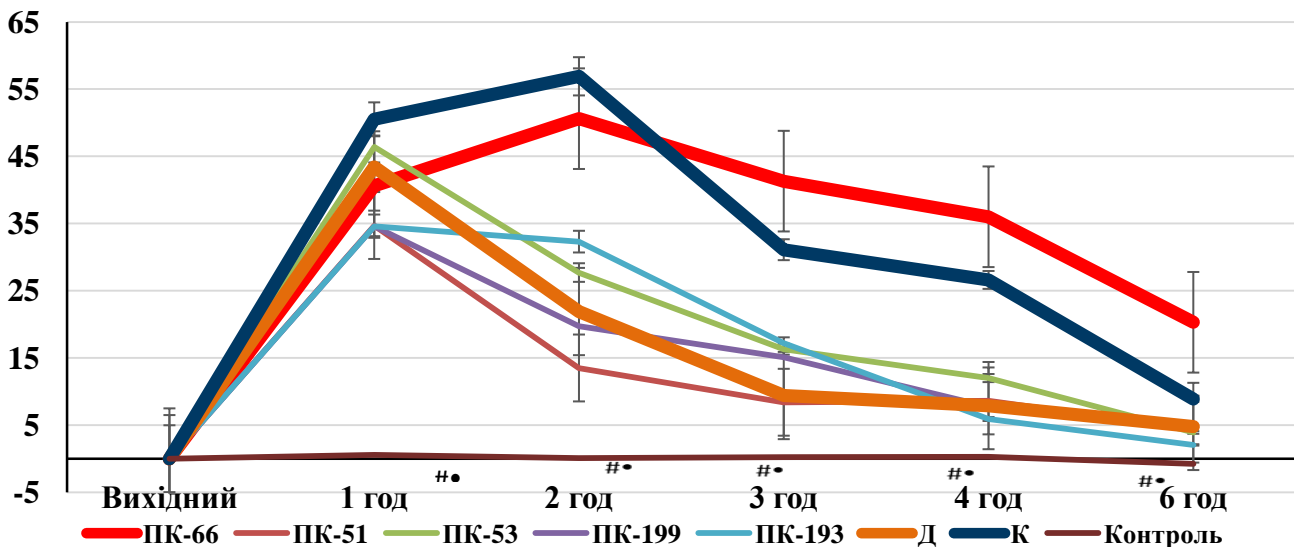


Рис. 2 – Дослідження тривалості знеболюючої дії похідних хіназоліну, диклофенаку та кеторолаку ($M \pm m$, $n = 7$)

Примітка. * – відхилення достовірно щодо вихідного рівня, $p < 0,05$; # – відхилення достовірно щодо натрію диклофенаку, $p < 0,05$; • – відхилення достовірно щодо кеторолаку трометаміну, $p < 0,05$.

Максимальний ефект ПК-66 (+50,6 %, $p < 0,05$) проявлявся на 2 год досліджу (рис. 2).

За анальгетичною активністю, на моделі «оцтовокислих корчів», найбільш ефективними в дозі ЕД₅₀, виявились сполуки ПК-66 та ПК-199, які викликали

статистично вірогідне зменшення кількості корчів на 35,6 % та 32,9 % ($p < 0,05$), порівнюючись до натрію диклофенаку (33,1 %) та поступались кеторолаку трометаміну (48,3 %, $p < 0,05$).

На моделі нейропатичного болю ПК-66 (1 мг/кг в/оч) проявляла виразну анальгезуючу дію, про що свідчить вірогідне зростання ПБЧ на ушкодженій кінцівці в середньому на 46,7 % ($p < 0,05$) порівняно з початковим показником до введення речовини. За цією активністю ПК-66 практично співставлялась з кеторолаку трометаміном (2,4 мг/кг в/оч), який викликав зростання ПБЧ на 51,9 % ($p < 0,05$).

На тлі попереднього введення налоксону антиноціцептивний ефект ПК-66 (1 мг/кг в/оч) не змінився протягом всіх термінів дослідження, тоді як ефект трамадолу (33 мг/кг в/оч) практично нівелювався, що вказує на відсутність опіоїдергічного механізму в антиноціцептивній активності ПК-66.

За спроможністю стимулювати репаративні процеси в ділянці асептичного запалення ПК-66 вірогідно переважала натрію диклофенак: в кінці експерименту кількість тварин із повним загоєнням шкірних дефектів становила відповідно 71,4 та 57,1 % проти 14,3 % ($p < 0,05$) в контролі. За величиною антиексудативної дії ПК-66 вірогідно поступалась натрію диклофенаку, а за ступенем антипроліферативної та за величиною жарознижуючої дії вказана сполука практично співставлялась з натрію диклофенаком. ПК-66 (1 мг/кг в/оч), як і натрію диклофенак (4 мг/кг в/оч) сприятливо впливала на перебіг усіх компонентів запального процесу.

Дослідження гастротоксичності при 30-денному введенні інтактним щурам показало, що сполука ПК-66 (0,5 мг/кг, в/оч), як і натрію диклофенак (2 мг/кг, в/оч) та кеторолаку трометамін (1,2 мг/кг в/оч), не викликали летальності тварин, однак призводили до розвитку пошкоджень СОШ різного ступеню. Множинність виразкування для сполуки ПК-66 становила в середньому $0,9 \pm 0,46$ балів на 1 тварину, а важкість ураження СОШ – $0,6 \pm 0,30$ балів, виразковий індекс для ПК-66 становив 0,25 балів, натрію диклофенаку – 2,07 балів, кеторолаку трометаміну – 1,71 балів. Ці дані вказують на більшу безпечність ПК-66 щодо ШКТ порівняно з натрію диклофенаком, що може бути віддзеркаленням практично відсутності у похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну порівняно з препаратами-порівняння антициклооксигеназної активності.

Дослідження стану ферментних систем, що забезпечують захист СОШ, показав, що натрію диклофенак (4 мг/кг в/оч) знижував активність РGH-синтази в СОШ щурів на 38,1 %, а ПК-66 (1 мг/кг в/оч) на 6,9 %, відносно контролю, $p < 0,05$. На тлі введення щурам ПК-66, спостерігалось вірогідне зростання в СОШ рівня стабільних метаболітів NO на 72,6 % ($p < 0,05$), на тлі натрію диклофенаку даний показник знизився на 22,6 % ($p > 0,05$) (табл. 2).

Встановлено, що сполука ПК-66 вірогідно ($p < 0,05$), не впливала на сумарну активність NO-синтази, її ендотеліальної та індукцйбельної ізоформ в СОШ. Натомість натрію диклофенак спричиняв зменшення сумарної активності NO-синтази на 28,2 % ($p < 0,05$) та її ендотеліальної ізоформи – на 42,9 % ($p < 0,05$), порівняно з показниками контролю. Отримані дані є важливим доказом відсутності гастротоксичної дії сполуки ПК-66 у інтактних тварин в дозі, що становить її $\frac{1}{2}$ ЕД₅₀,

порівняно з натрію диклофенаком в аналогічній дозі, який спричиняв виразні пошкодження СОШ.

Таблиця 2

Динаміка активності PGH-синтази та NO в супернатанті гомогенату СОШ щурів в умовах 3-х денного голодування на фоні введення ПК-66 та натрію диклофенаку ($M \pm m, n = 7$)

| Умови досліджу | Активність PGH – синтази, мкмоль/хв/мг білка | Динаміка відносно контролю % | Рівень стабільних метаболітів NO в СОШ, нмоль/г тканини | Динаміка відносно контролю, % |
|-----------------------------------|--|------------------------------|---|-------------------------------|
| Контроль (голод + 0,9 % р-н NaCl) | 17,3 ± 1,8 | | 310 ± 16,4 | - |
| ПК-66, 1 мг/кг, в/оч | 16,1 ± 3,7* | -6,9 % | 535 ± 19,5* | +72,6 % |
| Натрію диклофенак 4 мг/кг, в/оч | 10,7 ± 2,4* | -38,1 % | 240 ± 14,9 | -22,6 % |
| Інтактні (0,9 % р-н NaCl), в/оч | 20,4 ± 3,1 | | 300 ± 15,2 | |

Примітка. * – відхилення достовірно щодо групи контролю, $p < 0,05$.

Лікування АА за допомогою ПК-66 (1 мг/кг в/оч) та натрію диклофенаком (4 мг/кг в/оч), супроводжувалось зменшенням товщини ушкодженої кінцівки в кінці експерименту відповідно на 15 % та 22,4 % ($p < 0,05$) та зменшенням больового відчуття, на що вказувало вірогідне зростання ПБЧ відповідно на 73,8 % та 46,5 % відносно піку захворювання ($p < 0,05$).

В умовах АА лікувальна дія ПК-66 та натрію диклофенаку, проявлялась позитивною динамікою гематологічних (зменшення показників ШОЕ в 2,8 та 2,9 рази, відповідно, $p < 0,05$, кількості лейкоцитів на 72,5 % та 73,8 %, $p < 0,05$, усунення ознак анемії, на 28 добу) та біохімічних показників крові (зниження рівня МДА відповідно на 30 % та 28,8 % при одночасному зростанні активності СОД відповідно на 24,6 % та 20,3 % ($p < 0,05$), зниження вмісту серомукоїду відповідно на 43,0 % та 45,7 % ($p < 0,05$), зменшення активності ГГТП відповідно на 28,3 % та 31,0 % ($p < 0,05$), порівняно з нелікованими тваринами.

Макроскопічна оцінка СОШ у щурів з АА показала, що сполука ПК-66 була більш безпечною речовиною ніж натрію диклофенак щодо впливу на ШКТ, ступінь поверхневих пошкоджень СОШ прирівнювалась до групи нелікованих тварин. На більшу безпечність ПК-66 вказувало також те що, виразковий індекс сполуки ПК-66 у 5,5 рази був менший ніж у натрію диклофенаку (рис. 3).

Застосування сполуки ПК-66 при АА супроводжувалося менш виразним протизапальним ефектом порівняно з натрію диклофенаком. Під впливом ПК-66, сумарна активність NO-синтази та активність її індукбельної ізоформи були в 1,4–1,5 рази ($p < 0,05$) менші, та в 2 рази ($p < 0,05$) на тлі натрію диклофенаку, порівняно з нелікованими тваринами. ПК-66 не викликала вірогідних змін активності

ендотеліальної NO-синтази, що ймовірно лежить в основі відсутності гастротоксичної дії цієї сполуки у тварин з АА. Поряд з цим натрію диклофенак викликав зменшення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази в 2,1 рази ($p < 0,05$). Результати дослідження свідчили, що на тлі АА у натрію диклофенаку реєструвався потужний протизапальний ефект, який асоціювався з вираженою гастротоксичністю.

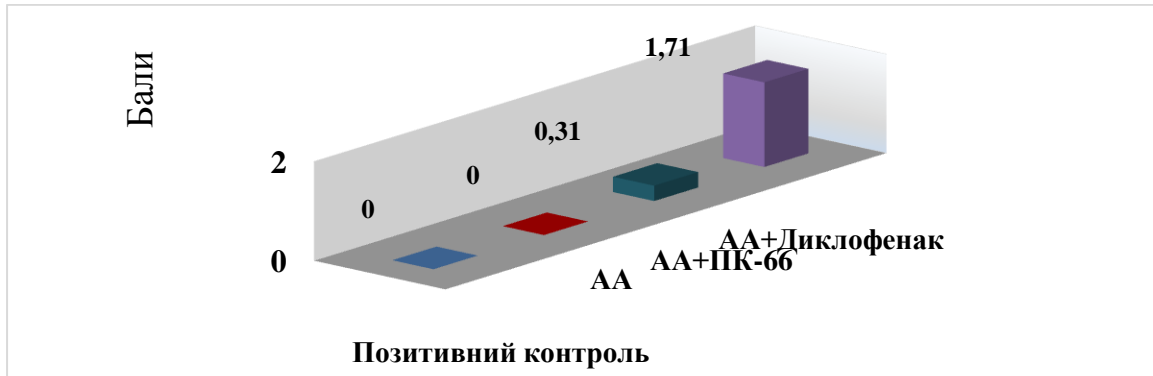


Рис. 3 – Характеристика пошкоджуючої дії сполук ПК-66 та натрію диклофенаку на СОШ щурів з адювантним артритом за величиною виразкового індексу

Підтвердженням більшої безпечності ПК-66 порівняно з натрію диклофенаком при АА служило також гістоморфологічні зміни в СОШ та ушкодженому суглобі. У групі щурів з АА, лікованих ПК-66, характерним було збереження гістоархітектоніки СОШ, інколи з гіперсекрецією нейтральних муцинів шийкованими мукоцитами. На відміну цьому, введення натрію диклофенаку викликало дистрофічно-дегенеративні зміни в СОШ з руйнуванням базальної мембрани та утворенням ерозій (рис. 4).

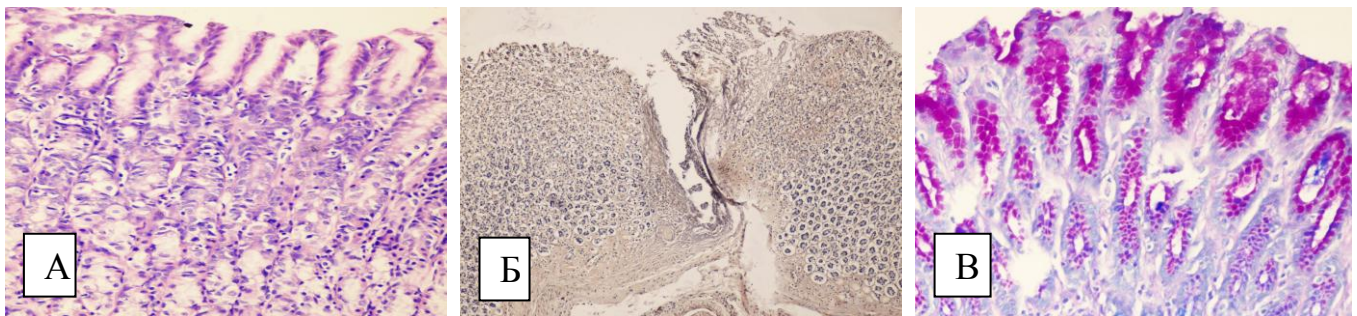


Рис 4 – Зміни СОШ щурів з АА на тлі сполуки ПК-66 та натрію диклофенаком, 28 доба експерименту

Примітка. (А) АА без лікування (збережена гістоархітектоніка СО фундаментального відділу шлунка). Забарвлення гематоксилином та еозином x 200; (Б) АА, лікованого натрію диклофенаком (глибока ерозія СО антрального відділу шлунка щура). Забарвлення основним коричневим x 100; (В) АА лікованого сполукою ПК-66 (переважно нейтральні глікопротеїди (малинового кольору) в епітеліоцитах валиків та екзокриноцитах ямок). Комбінована ШИК-реакція – альціановий синій. x 100.

Застосування ПК-66 у більшості щурів з АА приводило до зменшення або відсутності запалення як у суглобі, так і в періартикулярних тканинах. Шкірний покрив мав звичайну гістологічну структуру у більшості експериментальних тварин. Хрящова поверхня була гладенькою, з чітко обумовленими зонами і наявністю незмінених хондроцитів (рис. 4).

На моделі формалінового тесту встановлено, що знеболююча дія ПК-66 у більшій мірі проявилася у 1-шу фазу модельного патологічного стану, в якій залучені переважно центральні механізми антиноцицепції і несуттєво впливала на латентний період та тривалість 2-ї фази, в якій беруть участь медіатори запалення, головним чином ПГ, лейкотрієни, тощо. Це підтверджувало, що у сполуки ПК-66 знеболююча дія переважала над протизапальною, а у натрію диклофенаку – навпаки, що узгоджується із результатами оцінки лікувального ефекту обох речовин при АА.

Дослідження медіаторних механізмів знеболюючої та протизапальної активності ПК-66, показало, що сполука має здатність усувати гіпералгезію, викликану різними альгогенами. Найбільш виразно знеболююча дія ПК-66 проявилася на тлі введення брадикініну, де її анальгезуюча активність складала 53,4 % ($p < 0,05$). Менш виразна антиноцицепція сполуки ПК-66 виявилася в умовах карагенінового набряку (38,5 %, $p > 0,05$) та при зимозановій гіпералгезії (26,9 %, $p > 0,05$). У той же час, дослідження антиексудативної дії продемонструвало, що ступінь виразності антифлогогенної дії сполуки ПК-66 був дещо вищим при карагеніновому набряку: антиексудативна активність становила 16,1 %, проти 12,8 % ($p > 0,05$) при зимозановому.

Дослідження рецепторних механізмів знеболюючої дії за допомогою фармакологічних аналізаторів показали, що попереднє перед ПК-66 введення резерпіну через 1 год спостереження незначно підвищувало знеболюючу дію, а через 2 год навпаки суттєво знижувало і становили 13,2 % проти 57 % ($p < 0,05$) при окремому введенні ПК-66. Тобто резерпін викликав нівелювання анальгетичного ефекту ПК-66, що мало місце і в пізніші терміни експерименту.

Сумісне застосування похідного хіназоліну з клонідином викликало сумачію знеболюючих ефектів на першій та 6-й год, тоді як на 2-й год – навпаки, дія сполуки була меншою – 40,9 %, ніж за її окреме введення – 51,2 %, $p < 0,05$. На цьому терміні дослідження попереднє введення блокатора α_2 -адренорецепторів йохимбіну – навпаки сприяло суттєвому збільшенню антиноцицептивного ефекту ПК-66 (65,9 %, $p < 0,05$).

Блокада дофамінових D2-рецепторів хлорпромазином викликала статистично вірогідне зменшення знеболюючої дії сполуки ПК-66 практично до нівелювання. Натомість введення леводопи – навпаки потенціювало анальгетичну дію та суттєво її подовжувало, що особливо проявилось на 2–6 год експерименту.

Введення діазепаму подовжувало та потенціювало дію ПК-66 на моделі термічної ноцицепції. У той же час, на тлі дії мемантину величина анальгетичного ефекту зросла лише на 1-й год та меншою мірою – на 2-й год експерименту. Отже,

участь ГАМК-ергічних структур у механізмі знеболюючої дії ПК-66 не викликає сумнівів, а участь глутаматних рецепторів потребує подальших досліджень.

Встановлено, наявність у сполуки ПК-66 помірного депримуючого впливу на сумарну активність РGH-синтетази в плазмі крові щурів із експериментальним запальним процесом та відсутність цього впливу у інтактних тварин. Тому можна припустити, що виявлений ефект ПК-66 є результатом її інгібуючого впливу переважно на активність ЦОГ-2.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика сполуки ПК-66, натрію диклофенаку та кеторолаку трометаміну на різних моделях ноцицепції

| Умови досліджу | ЕД ₅₀ (мг/кг) | Аналгезуюча активність | | | | | |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|-------------------------|
| | | Tail-flick (%) | Оцтові корчі (%) | Нейропатичний біль (%) | АА (28 доба) (%) | Формаліновий тест | |
| | | | | | | Тривалість I фази (хв) | Тривалість II фази (хв) |
| Контроль | - | +0,55 ± 0,79#• | - | +0,35 | -2,6 | 5,14 ± 0,61 | 32,0 ± 1,09 |
| ПК-66 | 1 | +40,60 ± 4,36* | -35,6 | +46,7 | +73,8 | 5,64 ± 0,28 | 18,7 ± 2,58* |
| Натрію диклофенак | 4 | +43,40 ± 2,78* | -33,1 | - | +46,5 | 4,48 ± 0,29# | 29,4 ± 1,15# |
| Кеторолаку трометамін | 2,4 | +50,40 ± 5,61* | -48,3 | +51,9 | - | - | - |

Примітка.* – відхилення достовірно щодо вихідного рівня, $p < 0,05$; # – відхилення достовірно щодо натрію диклофенаку, $p < 0,05$; • – відхилення достовірно щодо кеторолаку трометаміну, $p < 0,05$.

Таким чином, узагальнюючи результати проведеного дослідження можна зробити висновок, що похідним 4-оксо(аміно-)хіназоліну притаманна виразна знеболююча дія, яка в найбільшій мірі проявилась у сполуки ПК-66, як у здорових щурів при електричному, термічному та хімічному ураженнях, так і в умовах гострого та хронічного запального синдрому.

За величиною аналгетичного ефекту ПК-66 у певній мірі переважає натрію диклофенак, поступаючись йому за ступенем протизапальної дії, а головною перевагою похідного хіназоліну є його низький ступінь гастротоксичності.

Основні точки прикладення механізмів аналгетичного ефекту ПК-66 наведено в рис. 5.

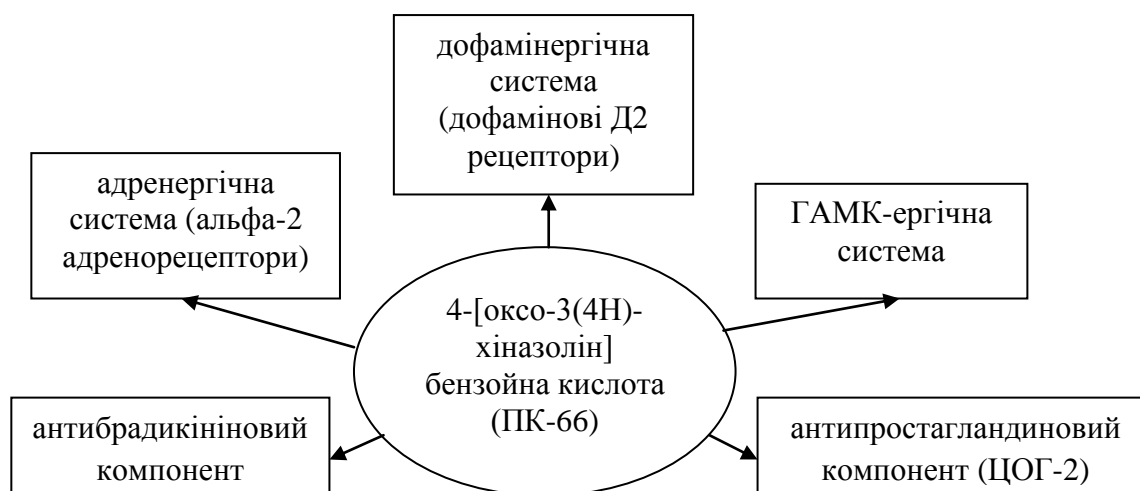


Рис. 5 – Основна спрямованість механізмів знеболюючої дії сполуки ПК-66 (схема)

В цьому плані ПК-66 виглядає більш безпечною та перспективною речовиною для створення нового НПЗЗ та ННА.

ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично обгрунтовано та експериментально доведено доцільність цілеспрямованого синтезу та пошуку серед похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну сполук із знеболюючим та протизапальним ефектами, перспективних для створення на їх основі нового ННА, конкурентоспроможного з кеторолаку трометаміном та натрію диклофенаком.

1. У результаті фармакологічного скринінгу, встановлено, що серед похідних 4-ОАХ найбільш ефективними виявились сполуки ПК-66, ПК-176 та ПК-195, які в дозі 10 мг/кг в/оч збільшували тривалість ЛП больової реакції тварин, при термічному подразненні хвоста відповідно на 169,6; 128 % та 126,4 % ($p < 0,05$) проти 144 % під впливом кеторолаку трометаміну та 80,4 % – на тлі натрію диклофенаку ($p < 0,05$). Аналіз «структура-активність» показав, що ступінь анагетичного ефекту визначається наявністю *n*-карбокисильної (ПК-66 та ПК-195) або *m*-карбамідної (ПК-176) груп при фенільній субституенті положення 3 хіназолінового циклу. Сполука ПК-66 є лідером за анагетичною активністю, її ED_{50} становила 1,04 мг/кг в/оч проти 4,1 мг/кг в/оч та 2,39 мг/кг в/оч у натрію диклофенаку та кеторолак трометаміну відповідно. За ефективністю антиноціцепції сполука-лідер ПК-66 співставляється з натрію диклофенаком та кеторолаку трометаміном на моделях вісцерального і нейропатичного болю. Встановлено відсутність центрального опіоїдергічного механізму в антиноціцептивній активності ПК-66.

2. Встановлено сполука ПК-66 (1 мг/кг, в/оч) та натрію диклофенак (4 мг/кг, в/оч) впливають на всі фази запального процесу. За спроможністю стимулювати репаративні процеси в ділянці асептичного запалення ПК-66 вірогідно переважала натрію диклофенак (97,5 % проти 92,1 %, $p < 0,05$), співставлявшись з ним за антиексудативною, антипроліферативною та жарознижуючою діями. За умов

30-денного в/оч введення інтактним щурам ПК-66, викликала менше пошкоджень СОШ, ніж натрію диклофенак. Виразковий індекс для ПК-66 становив 0,25 бали проти 2,07 для натрію диклофенаку та 1,71 – для кеторолаку трометаміну. Сполука ПК-66 практично не впливала на механізми протективних властивостей СОШ у щурів без запального процесу, на відміну від натрію диклофенаку, який викликав вірогідне падіння активності РGH-синтази, вмісту нітратів та нітритів, сумарної активності NO-синтази, її ендотеліальної та індукційної ізоформ.

3. На моделі АА, встановлено, що лікування сполукою ПК-66 (1 мг/кг, в/оч), як і натрію диклофенаком (4 мг/кг, в/оч), викликало в ушкодженій кінцівці вірогідне послаблення запальної (зниження товщини лапки відповідно на 15,0 % та 22,4 % відносно пікового терміну ($p < 0,05$) та ноцицептивної (зростання ПБЧ відповідно на 73,8 % та 46,5 % $p < 0,05$) реакції. Спостерігалась позитивна динаміка гематологічних та біохімічних показників на тлі ПК-66 та натрію диклофенаку, що корелювало із позитивними змінами гістоморфологічної картини ушкодженого суглоба. Встановлено, ПК-66 є більш безпечною речовиною, ніж диклофенак, при АА, оскільки має низький рівень гастротоксичності: виразкові індекси становили відповідно 0,31 та 1,71 бали. ПК-66, на відміну від натрію диклофенаку, не викликав вірогідних змін активності ендотеліальної NO-синтази, зменшуючи лише сумарну активність NO-синтази та активність її індукційної ізоформи в 1,4–1,5 рази ($p < 0,05$).

4. За даними формалінового тесту, доведено, що в знеболюючій дії ПК-66 переважають центральні механізми антиноцицепції, у натрію диклофенаку – периферичні (медіаторні). Антимедіаторна дія ПК-66 у більшій мірі обумовлена антагонізмом до брадикініну (53,4 %, відносно контролю, $p < 0,05$), в меншій – до простагландинів та лейкотриєнів (38,5 % та 26,9 %, $p > 0,05$). В рецепторних механізмах ноцицептивної дії ПК-66 залучені адренергічна, дофамінергічна та ГАМК-ергічна системи.

5. В умовах експериментального артрити, встановлено, що на тлі в/оч одноразового застосування ПК-66 активність РGH-синтази зростала в 3,48 рази, порівняно з тваринами інтактної групи, а на тлі натрію диклофенак в 2,7 рази ($p < 0,05$). Введення сполуки ПК-66 тваринам без запального процесу практично не змінювало активність РGH-синтази.

6. За ступенем вираженості аналгетичного та протизапального ефектів на тлі низької гастротоксичності сполуку ПК-66 (4-[4-оксо-4Н-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти) можна вважати перспективною речовиною для створення на їх основі нового ННА та НПЗЗ, конкурентоспроможного з натрію диклофенаком та кеторолаку трометаміну.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Юрченко А. І. Скринінг аналгетичної дії похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну. *Фармакол. та лікарська токсикологія*. 2013. № 2 (33). С. 89–91. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, аналіз літературних джерел, участь в узагальненні даних, написання першого варіанту статті).

2. Юрченко А. І., Степанюк Г. І., Альчук О. І., Коваленко С. І., Шабельник К. П. Порівняльна оцінка гастротоксичності похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну (сполук ПК-66 та ПК-199), натрію диклофенаку та кеторолак трометамолуу при їх тривалому введенні в організм. *Український біофармацевтичний журнал*. 2014. № 6 (35) С. 60–63. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, аналіз та узагальнення отриманих результатів, написання першого варіанту статті, оформлення до друку).

3. Юрченко А. І., Степанюк Г. І., Альчук О. І., Коваленко С. І., Шабельник К. П. Порівняльна оцінка впливу 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (сполуки ПК-66) та натрію диклофенаку натрію на перебіг ад'ювантного артрити у щурів. *Фармакол. та лікарська токсикологія*. 2015. № 4–5 (45). С. 103–107. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, обробка та аналіз даних, написання статті, оформлення до друку).

4. Kramar H. I. Experimental study new 3-(2-R1-6-R2-4-oxoquinoline-3(4H)-yl)alkyl (alkaryl, aryl) carboxylic acid derivative (PC-66 compound). *Curierul medical*. 2017. № 1. P. 32–34. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, аналіз літературних джерел, участь в узагальненні даних, написання першого варіанту статті).

5. Kramar H. I. Experimental study of state of gastric mucosa in rats under introduction of new derivate of 4-[4-oxo-4H-quinazoline-3-yl] benzoic acid (PC-66) *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2017. № 2 (6). P. 53–58. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, участь в узагальненні даних, написання статті).

6. Kramar H., Stepaniuk H., Voloshchuk N., Taran I, Kovalenko S. Experimental study of pain-relieving mechanisms of 4-[4-oxo-(4H)-quinazolin-3-yl]-benzoic acid (PC-66 compound). *Georgian medical news*. 2018. № 10 (283). P. 148–154. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, аналіз літературних джерел, участь в узагальненні даних, першого варіанту статті).

7. Крамар Г. І., Степанюк Г. І., Волощук Н. І., Альчук О. І. Експериментальне дослідження медіаторних механізмів антиноціцептивної дії 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (сполуки ПК-66). *Медична та клінічна хімія*. 2019. Т. 21 № 4. С. 67–73. (Особистий внесок: участь у розробці протоколу, проведення дослідів, аналіз літературних джерел, участь в узагальненні даних, написання статті).

8. Застосування 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти як засобу з центральною знеболюючою дією : пат. № 79947 на винахід Україна № u 2012 12266 / Г. І. Юрченко, Г. І. Степанюк, Н. Г. Черноіван, С. І. Коваленко, К. П. Шабельник ; заявл. 26.10.2012 ; опубл. 13.05.2013, Бюл. № 9 (Особистий внесок: здійснення патентного пошуку, участь у розробці протоколу дослідів, їх виконання, аналіз даних, оформлення заявки).

9. Юрченко Г. І., Степанюк Г. І., Альчук І. Д., Коваленко С. І., Шабельник К. П., Цимбалюк В. В., Глушак Р. В., Гриб В. В. Оцінка аналгетичної активності в ряду похідних 4-оксо(аміно-)хіназоіну. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2011.

№ 5 (24): матеріали IV Національного з'їзду фармакологів України, Київ, 10–12 жовт. 2011 р. К., 2011. С. 308–309.

10. Юрченко А. І., Цимбалюк В. В., Альчук О. І., Шабельник К. П. Порівняльна оцінка знеболюючої дії похідних 4-оксо(аміно) хіназоліну та препарату порівняння кетанову. *Медицина та Фармація XXI століття – крок у майбутнє* : матеріали 72 Всеукр. наук.-практ. конф., Запоріжжя, 19–20 квіт. 2012 р. З., 2012. С. 237.

11. Юрченко Г. І., Степанюк Г. І., Коваленко С. І., Шабельник К. П. Порівняльна оцінка аналгетичної дії похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну, натрію диклофенаку натрію та кетаролаку на моделі оцтовокислих корчів. *Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань у світі доказової медицини* : матеріали VII Всеукр. наук.-практ. конф., Вінниця, 26–27 лист. 2013 р. В., 2013. С. 155–156.

12. Юрченко Г. І., Ожиганов А. В., Гриб В. В. Порівняльна оцінка протизапальної та аналгетичної дії похідних хіназоліну сполук ПК-66 та DSK-38. *Сучасні аспекти медицини та фармації – 2015* : матеріали Всеукраїнської наук.-практ. конф., Запоріжжя 14–15 травня 2015 р. Запоріжжя, 2015. С. 31.

13. Крамар Г. І., Степанюк Г. І., Альчук О. І. Порівняльна характеристика протизапальної дії 4-[4-оксо- (4Н)-хіназолін – 3-іл] бензойної кислоти та натрію диклофенаку натрію. *Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини* : матеріали Всеукраїнської VIII наук.-практ. конференції, Вінниця 9–10 листопада 2015 р. Вінниця, 2015. С. 161–162.

14. Крамар Г. І., Таран І. В. Деякі механізми аналгетичної активності похідного 4-оксо(аміно-хіназоліну (сполука ПК-66) *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, Харків, 13–16 верес. 2016 р. Харків : НФаУ, 2016. Т. 2. С. 60–62.

15. Крамар Г. І. Вплив похідного 4-оксо(аміно-хіназоліну (сполуки ПК-66) на активність простагландин-синтетази та вміст стабільних метаболітів нітроген монооксиду у щурів. *Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології* : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В. В. Дунаєва, м. Запоріжжя, 24–25 листопада 2016 р. Запоріжжя, 2016. С. 50–51.

16. Крамар А. І., Степанюк Г. І., Волощук Н. І., Альчук А. І. Экспериментальное исследование механизмов антиноцицепционного действия 4- [4-оксо-4н-хиназолин-3-ил] бензойной кислоты. *Общественное здоровье, экономика и менеджмент в медицине*. Научно практический журнал : материалы научной конференции с международным участием, г. Кишинев, 31 ноября 2018 г. Кишинев, 2018 № 4 (78). С. 143.

17. Крамар Г. І., Степанюк Г. І., Степанюк Н. Г. Застосування нових похідних 4-оксо(аміно-) хіназоліну як засобів з центральною знеболюючою дією : *Інформаційний лист № 268-2014*. Укрмедпатентінформ МОЗ України. Випуск 5 з проблеми «Фармакологія». К., 2014. 4 с. (*Особистий внесок: участь у розробці протоколу дослідів, їх виконання, аналіз даних, підготовка до друку*).

АНОТАЦІЯ

Крамар Г. І. Пошук та вивчення речовин з аналгетичною дією в ряду нових похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну (експериментальне дослідження). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2019.

Дисертація присвячена теоретичному та експериментальному обґрунтуванню доцільності цілеспрямованого синтезу та пошуку серед похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну сполук із знеболюючим та протизапальним ефектами, перспективних для створення на їх основі нового ненаркотичного аналгетика, конкурентоспроможного з кеторолаком та диклофенаком.

У скринінгових дослідженнях аналгетичної дії похідних 4-оксо(аміно-)хіназоліну на моделях болю, викликаного у щурів електричним, термічним та хімічним факторами, встановлено, сполуку лідера 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойної кислоти (ПК-66), конкурентоспроможну з диклофенаком та кеторолаком. Проведене поглиблене вивчення фармакологічних властивостей ПК-66, та її вплив на компоненти запалення. Доведена більша безпечність сполуки - лідера щодо ШКТ при 30-денному введенні інтактним щурам, порівняно із сучасними ненаркотичними аналогами. Проведена оцінка лікувального ефекту та безпечності ПК-66 на моделі АА. Встановлені основні нейрохімічні та медіаторні механізми антиноціцептивної дії та охарактеризовано механізм протизапального ефекту сполуки-лідера. Визначена перспективність ПК-66 для створення на її основі нового ННА або НПЗЗ, конкурентоспроможного з диклофенаком та кеторолаком.

Ключові слова: похідні 4-оксо(аміно-)хіназоліну, 4-[4-оксо-(4Н)-хіназолін-3-іл] бензойна кислота, аналгетична дія, ноціцепція, біль, запалення, ад'ювантний артрит.

АННОТАЦИЯ

Крамар А. И. Поиск и изучение веществ с анальгезирующим действием в ряду новых производных 4-оксо (амино) хиначолина (экспериментальное исследование). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2019.

Диссертация посвящена теоретическому и экспериментальному обоснованию целесообразности целенаправленного синтеза и поиска среди производных 4-оксо (амино) хиначолина соединений с обезболивающим и противовоспалительным эффектами, перспективных для создания на их основе нового ненаркотического анальгетика, конкурентоспособного с кеторолаком и диклофенаком.

В скрининговых исследованиях анальгезирующего действия производных 4-оксо (амино) хиначолина на моделях боли, вызванной электрическим, термическим и химическим факторами, установлено соединение-лидер 4- [4-оксо-(4Н)-хиначолин-3-ил] бензойной кислоты (ПК-66), конкурентоспособное с диклофенаком и кеторолаком. Проведено углубленное изучение фармакологических

свойств ПК-66, и ее влияние на компоненты воспаления. Доказана большая безопасность соединения - лидера на ЖКТ при 30-дневном введении интактным крысам, по сравнению с современными ненаркотическими аналогами. Проведена оценка лечебного эффекта и безопасности ПК-66 на модели АА. Установлены основные нейрорхимические и медиаторные механизмы антиноцицептивного действия и охарактеризованы механизмы противовоспалительного эффекта соединения-лидера. Определена перспективность ПК-66 для создания на ее основе нового ННА или НПВП, конкурентоспособного с диклофенаком натрия и кеторолаком трометамином.

Ключевые слова: производные 4-оксо (амино) хиназолина, 4 [4-оксо-(4H)-хиназолин-3-ил] бензойная кислота, анальгетическое действие, ноцицепция, боль, воспаление, адьювантный артрит.

SUMMARY

Hanna Kramar. Search and Study of Substances with Analgesic Action in a Range of New Derivatives of 4-oxo (amino-) quinazoline (Experimental Study) – Qualifying Scientific Work on the Rights of the Manuscript.

The thesis for a candidate degree in pharmaceutical sciences in speciality 14.03.05 «Pharmacology». – National University of Pharmacy of Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The main aim of our research was to determine the presence and degree of analgesic action in a number of new derivatives of 4-oxo (amino-) quinazoline, identify a leading-edge compound competitive with modern analogues, and determine its prospects for the creation of a new drug.

The given dissertation is the first to prove on the large experimental material that 4-oxo (amino-) quinazoline derivatives are carriers of analgesic activity, which is most characteristic of 4- [4-oxo (4H) -quinazolin-3-yl] benzoic acid (PK -66).

The screening among 4-oxo (amino-) quinazoline derivatives, performed on the models of somatic pain syndrome: thermal immersion of the tail and electro-pulse irritation of the rectal mucosa. The most effective derivatives proved to be ones with PK-66 (+169,6 %, $p < 0,05$), PK-176 (+128 %, $p < 0,05$) and PK-195 (126,4 %, $p < 0,05$) laboratory ciphers containing the phenyl substituent with the unblocked carboxyl group in the *n*-position (PK-66, PK-195), and the ester in the *m*-position (PK-176) with a branched aliphatic chain of the 3rd position of the quinazoline cycle which was almost compared to ketorolac by virtue of the analgesic effect, exceeding that of diclofenac.

Regarding the analgesic activity (ED_{50}), the PK-66 can be considered as a leading compound, which prevails over ketorolac 2.4 times and diclofenac – 4 times ($p < 0,05$).

4- [4-oxo-(4H)-quinazolin-3-yl] benzoic acid within the analysis of the activity duration absolutely prevailed over other combinations and drugs under comparison, since the duration of the latent period of PK-66 (1 mg / kg i/h) was more than 6 hours against 1 hour against diclofenac (4 mg / kg pk) and 3 hours under the ketorolac (2,4 mg / kg i/h) activity.

In various models of pain perception (in the model of the visceral pain and of the neuropathic pain), PC-66 (1 mg / kg i/h) was found to be the most effective and safe in a number of 4-oxo (amino-) quinazoline derivatives studied.

Studies on the part of the opioidergic system in the mechanisms of the analgesic action of the leading combination have shown the absence of a central opioidergic mechanism in the antinociceptive activity of PK-66.

The pharmacodynamic characteristics of derivative of 4-oxo (amino) quinazoline were clarified and supplemented by establishing a pronounced anti-alterative, which was 71.4 % ($p < 0.05$) and moderately pronounced anti-exudative, 31.8 % ($p < 0.05$), antiproliferative – 12.0 % ($p < 0.05$) and antipyrogenic properties – 43.2 % ($p < 0.05$).

Proved greater safety of the compound – the leader in the gastrointestinal tract at 30 days of intact rats, compared with modern non-narcotic analogues. According to the ulcerous index, PK-66 (0,25 points) has the lowest degree of gastric toxicity compared to ketorolac (1,17 points) and diclofenac (2,07 points).

This is probably resulted in the virtual absence of the anticyclooxygenase activity in PK-66. It is determined that the 3-day injection of pre-starved rats (a stress factor), the total activity of PGH synthase in the GM homogenate on the background of PK-66 eased off by 7 % ($p > 0.05$) respective to control against 38 % under the action of diclofenac ($p > 0.05$).

During the simultaneous injection of PK-66 into rats, in contrast to diclofenac, there is a probable 73.6% increase of steady NO metabolites in GM metabolism, while this indicator decreases by 23 % ($p > 0.05$) against diclofenac). Increase in the quantity of the stable NO metabolites in TPS under the action of PK-66 may be a manifestation of a stimulating effect on NO production in TPS.

The course treatment of AA with PK-66 (1 mg / kg), as well as with diclofenac (4 mg/kg), was accompanied by a significant decrease in the variable of the inflammatory response of the injured limb at the end of the experiment. This resulted in probable cutting down its thickness by 15 % and 22.4 % ($p > 0.05$) relative to the previous research spell. The PK-66 and diclofenac-induced decrease in inflammatory response in the joint correlated with lessening a pain, as indicated by a probable increase in TPS by 68 and 57.5 % ($p > 0.05$) correspondingly. However, the degree of anti-inflammatory effect of PK-66 was somehow inferior to diclofenac.

The positive dynamics of hematological (ESR, the number of leukocyte) and biochemical parameters (malondialdehyde, enzymes superoxide dismutase, seromuroid, GGT). is proved by the therapeutic effect of PK-66, as well as diclofenac, in AA.

Positive changes in clinical, hematological, and biochemical parameters of the inflammatory response are caused by PK-66 and diclofenac, they correlated with alterations in the morphological pattern of the injured joint.

The study reveals that PK-66 is a safer substance for the gastrointestinal tract.

Investigation of the mediator mechanisms of the analgesic and anti-inflammatory activity of PC-66 has shown that the compound has the ability to eliminate hyperalgesia caused by various algogens.

Research using pharmacological analyzers has demonstrated that the adrenergic system, in particular α 2-adrenoreceptors, dopaminergic and GABA-ergic systems are involved in the mechanism of PK-66 analgesic effect.

The results of the research demonstrate that 4-oxo (amino-) quinazoline derivatives are a promising class of chemical combinations for finding substances with analgesic and anti-inflammatory activity that are competitive with modern analogues. 4- [4-oxo- (4H) -quinazolin-3-yl] benzoic acid is of interest for further study of its pharmacodynamics and safety for the creation of a new domestic non-narcotic analgesic on its basis.

Keywords: 4-oxo (amino) quinazoline derivatives, 4- [4-oxo- (4H) -quinazolin-3-yl] benzoic acid, analgesic action, pain, inflammation, nociception, adjuvant arthritis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

4 – ОАХ – похідні 4 – оксо(аміно-)хіназоліну;
ЕД₅₀ – середньо ефективна доза;
NMDA – N-метил-D-аспартат;
NO – оксид азоту;
АА – ад'ювантний артрит;
в/оч – внутрішньоочеревинно;
ГГТП – гамма-глутамілтранспептидаза;
ЛП – латентний період;
МДА – малоновийдиальдегід;
НА – наркотичні аналгетики;
ННА – ненаркотичні аналгетики;
НПЗЗ – нестероїдні протизапальні лікарські засоби;
ПБЧ – поріг больової чутливості;
СО – слизова оболонка;
СОШ – слизова оболонка шлунка;
ШКТ – шлунково-кишковий тракт;
ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів;
ГАМК – гамма-аміномасляна кислота;
СОД – супероксиддисмутаза;
ЕД₅₀ – середньо ефективна доза.

Підписано до друку 21.12.2020. Формат 60x84/16. Папір офсетний.
Гарнітура Times ET. Умов. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Замов. № 1221/5-20.

Надруковано з готових оригінал-макетів у друкарні ФОП Петров В. В.
Єдиний державний реєстр юридичних осіб та фізичних осіб-підприємців.

Запис № 2400000000106167 від 08.01.2009 р.
61144, м. Харків, вул. Гв. Широнінців, 79в, к. 137,
тел. (057) 78-17-137, e-mail:bookfabrik@mail.ua