

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Боцула Ірина Валеріївна

УДК 615.214.22: 615.31

ДИСЕРТАЦІЯ

**Експериментальне дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-
бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

І.В. Боцула

Науковий керівник: Кіреєв Ігор Володимирович, доктор медичних наук,
професор

Харків – 2024

АНОТАЦІЯ

Боцула І.В. Експериментальне дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2024.

Дисертація демонструє результати досліджень фармакологічної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів.

Нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів під шифром МА-252, МА-253, МА-254, МА-255 та МА-261 були синтезовані співробітниками лабораторії фізико-хімічних процесів ДНУ НТК «Інститут монокристалів» НАН України під керівництвом першого заступника генерального директора з наукової роботи, члена-кореспондента НАН України, професора В. А. Чебанова.

За допомогою молекулярного докінгу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бенздіазепінового сайту ГАМК рецептора виявлено, що для всіх S-конфігурацій нових сполук притаманний режим зв'язування подібний до класичних бензодіазепінів. Більше того було знайдено перспективну для експериментальних досліджень молекулу-хіт МА-253, яка мала вищі абсолютні значення скорингової функції порівняно з діазепамом і гідазепамом.

Важливим етапом вивчення фармакологічної активності нових речовин є визначення їх токсикологічних характеристик, зокрема цитотоксичності, генотоксичності та фоточутливості. Вони використовуються для визначення потенційних ризиків, які можуть викликати ліки в поєднанні з впливом сонячного світла. Тест поглинання нейтрального червоного (ПНЧБ) і аналіз МТТ найчастіше використовуються для виявлення життєздатності клітин

після впливу токсичних речовин. Було встановлено, що ріст та проліферація клітин BALB/c 3T3 і метаболічна активність мітохондрій після інкубації з похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не падали нижче 70% порівняно з контролем. Фототоксичність визначається як токсична реакція, викликана місцевим або системним введенням фотореактивних хімічних речовин після впливу на організм зовнішнього світла. У зв'язку з утворенням фотопродуктів МА-252, МА-253 та МА-261 під дією УФ-випромінювання (300-800 нм) проведено визначення токсичності в тесті ПНЧБ. Результати показали, що досліджувані зразки не здійснювали негативний вплив на стан культури клітин, суттєвих відмінностей у кількості живих клітин між зразком і негативним контролем не відзначали. Також оцінено антигенотоксичну активність за умов уму-тесту та встановлено відсутність генотоксичного ефекту на ріст штаму *S. typhimurium*. Отримані результати демонструють відсутність потенційного токсичного впливу нових сполук в умовах *in vitro* та можливості подальшого дослідження *in vivo*.

Вперше проведено скринінг анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах піднесеного хрестоподібного лабіринту і темно-світлої камери, в яких поведінка тварин відображає конфлікт між наданням переваги мишами захищених зон та їх вродженою мотивацією досліджувати нові середовища. Встановлено, що найвираженіші протитривожні властивості мали МА-252, МА-253 і МА-254 в дозі 1 мг/кг, що проявлялось збільшенням часу, проведеного на відкритому просторі: на 86%, 160% та 77% відповідно в порівнянні з групою контролю в тесті ПХЛ, на 132%, 214% та 111% відповідно у тесті ТСК, а також кількістю переходів між рукавами/камерами приладів. Крім того, зменшився емоційний компонент занепокоєння тварин, що можна побачити по зменшенню кількості фекальних болюсів і уринацій у групах тварин, які отримували новосинтезовані похідні триазолобензодіазепінів.

Досліджено антидепресивну активність нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах примусового плавання за Порсолт та

«підвішування за хвіст». Під час визначення відстежували зменшення загальної тривалості завмирання, основного показника «відчаю» тварин, та збільшення латентного періоду першого зависання, що свідчить про прояв антидепресивних властивостей досліджуваних сполук. Індекс депресивності в тесті плавання був найнижчий за застосування похідних МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та статистично значуще не відрізнявся від такого в групі, тварини якої отримували препарат порівняння іміпрамін в дозі 25 мг/кг.

Підвищення м'язового тонусу – доволі часта ознака станів тривоги в людей, що може спричинити виникнення болю, включаючи головний, та нерідко турбує пацієнтів із тривожними станами. Тому було здійснено дослідження впливу нових похідних триазолобензодіазепінів на тонус скелетних м'язів у гризунів за допомогою тесту «вертикальної сітки», та на м'язовий тонус і координацію рухів – за допомогою ротарод-тесту. У результаті експерименту не виявили негативного впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на координацію рухів, встановили невиражений міорелаксантийний ефект при введенні МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг.

Досліджено вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на спонтанну рухову активність гризунів в тесті «відкрите поле» та встановлено, що найвиразніші зміни здійснює похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг, збільшуючи локомоторну та орієнтовно-дослідницьку активності та зменшуючи суму емоційних проявів у тварин, що за характером впливу було подібним до препарату порівняння гідазепаму в дозі 1 мг/кг. Така поведінка мишей може свідчити про зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження тварин.

Виходячи з результатів скринінгових досліджень, для подальшого фармакологічного вивчення відібрано похідні МА-252, МА-253, МА-254 та МА-255 в дозах 0,75 мг/кг та 1 мг/кг.

Проведено визначення наявності аналгетичної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів у тесті гарячої пластини та на моделі

оцтовокислих корчів, де вперше встановлено збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче термічне подразнення кінцівок мишей під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та зменшення кількості корчів на тлі МА-252, МА-253 та МА-254. Проте найвиразнішу аналгетичну активність проявило похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг в обох тестах.

В умовах нормобаричної гіпоксичної гіпоксії похідні МА-252, МА-253 та МА-255 не проявили антигіпоксичних властивостей, однак виявлено пролонгування тривалості життя на тлі похідного МА-254.

Три похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254) були відібрані для подальших досліджень анксиолітичної активності. Вперше сформовано системи доставки досліджуваних речовин на основі нановолокон, завантажених ними, за допомогою технології електропрядіння задля покращення їхньої цільової доставки та фармакодинамічного ефекту. Проведено визначення морфології та фізичного стану нановолокон та встановлено, що аморфний полімер-носій (гідроксипропілметилцелюлоза) може бути використаний для створення електропрядених нановолокон для сучасних нових бензодіазепінів.

Вперше проведено фармакологічні дослідження на тлі введення нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, з залученням тварин. Встановлено виражену анксиолітичну в тестах ПХЛ та темно-світлої камери, антидепресивну в тестах плавання по Порсолт та «підвішування за хвіст», аналгетичну активності в тестах гарячої пластини та оцтовокислих корчів, відсутність антигіпоксичних властивостей та впливу на поведінкові реакції в умовах тесту відкритого поля. При порівнянні з результатами скринінгових досліджень визначено підвищення ефекту на тлі введення нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, зокрема найвиразнішим він був для похідного МА-253.

Проведено поглиблені дослідження похідного МА-253, який на основі найвиразніших змін фармакологічної активності у гризунів було визначено як

сполуку-лідер. Встановлено актопротекторну активність СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними, в тесті вимушеного плавання з навантаженням.

Вперше досліджено взаємодію похідного МА-253, завантаженого в нановолокна, зі сполуками пригнічувального та стимулювального типу дії на моделях етанолового наркозу і в тесті відкритого поля на тлі кофеїну-бензоату натрію та визначено потенціювання дії етанолу шляхом пролонгування тривалості бічного положення, а також антагонізм до кофеїну та посилення гальмівних аденозинергічних впливів у ЦНС.

При введенні похідного МА-253 гризунам протягом 28 днів встановлено відсутність розвитку толерантності раніше досліджених активностей: для похідного характерна виражена анксіолітична активність, стимулювальна дія на локомоторно-дослідницькі реакції та позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох статей.

При визначенні токсикологічних характеристик *in vivo* встановлено, що похідне МА-253 може бути віднесене до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner, так як значення LD_{50} перевищує 2500 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні мишам. Вивчення підгострої токсичності МА-253 протягом 28 днів на щурах обох статей показало відсутність токсичного впливу на загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок. Усі досліджувані показники були в межах значень групи інтактних тварин.

Вперше в рамках дисертаційного дослідження було розроблено та оптимізовано для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку нові функціоналізовані формули ПЕО гелю, що поєднують нановолокна, завантажені похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави. Також визначено його склад з найбільшою здатністю до друку – ПЕО гель з сухим екстрактом 100 мг/мл. Надруковані 3D-зразки, розроблені в цьому дослідженні, придатні для перорального введення з негайним вивільненням, що є перспективним

напрямом в подальшому створенні персоналізованих лікарських препаратів на основі індивідуальних потреб пацієнта.

Запропоновано спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4H-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність (патент України на корисну модель №155538, 2024 р.), спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4H-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність (№156108, 2024 р.).

Ключові слова: похідні триазолобензодіазепіну, ГАМК, анксиолітики, фармакологічна дія, антидепресивна активність, аналгетична дія, цитотоксичність, гостра токсичність, антигіпоксична активність, тест відкритого поля, нановолокна, 3D друк.

Список публікацій здобувача:

1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712> (Scopus, quartile 1) (*Особистий внесок здобувача* – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; J. Schavikin – проведено частину дослідження, здійснено опис результатів; J. Heinämäki – формулювання цілей та задач дослідження, редагування та подача статті; I. Laidmäe – допомога в проведенні експериментального дослідження; Мазур М. О. – здійснено синтез досліджуваних сполук; A. Raal – допомога в проведенні експериментального дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні експериментального дослідження; Кіреєв І. В. –

формулювання цілей та задач дослідження; Чебанов В. А. – синтез сполук, формулювання цілей та задач дослідження).

2. Botsula I., Kireyev I., Koshovyi O., Heinämäki J., Ain R., Mazur M., Chebanov V. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.299205> (Scopus, quartile 3) (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні експериментального дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні експериментального дослідження; J. Heinämäki – формулювання цілей та задач дослідження; A. Raal – формулювання цілей та задач дослідження; Мазур М. О. – аналіз результатів; Чебанов В. А. – формулювання цілей та задач дослідження).

3. Botsula I.V., Kireyev I.V., Koshovyi O.M., Chebanov V.A. The influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the muscle tone of rodents. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 217-222. URL: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.3.287999> (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, аналіз результатів; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження; Чебанов В. А. – формулювання цілей та задач дослідження).

4. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Кошовий О.М., Мазур М.О., Чебанов В.А. Поведінкові реакції гризунів після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тесті «відкритого поля». *Фармацевтичний часопис*. 2023. №

4. С. 70–77. URL: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.4.14297> (*Особистий внесок здобувача* – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Мазур М. О. – узагальнення фізико-хімічних даних; Чебанов В. А. – узагальнення фізико-хімічних даних).

5. Botsula I.V., Kireyev I.V., Mazur M.O., Chebanov V.A. The study of antidepressant properties of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *News of pharmacy*. 2024. № 1 (107). P. 136-143. URL: <https://doi.org/10.24959/nphj.24.144> (*Особистий внесок здобувача* – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Мазур М. О. – проведений синтез вихідних сполук, узагальнення фізико-хімічних даних; Чебанов В. А. – проведений синтез вихідних сполук, узагальнення фізико-хімічних даних).

6. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність: Патент України на корисну модель №155538: МПК: A61K 31/5513 (2006.01); A61K 31/4192 (2006.01); A61P 25/22 (2006.01). Заяв. 25.09.2023; Опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10 (*Особистий внесок здобувача*: проведення інформаційно-патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів та оформлення патенту).

7. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що

виявляє антидепресивну активність: Патент України на корисну модель №156108: МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 01.12.2023; Опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19 (*Особистий внесок здобувача: проведення інформаційно-патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів та оформлення патенту*).

8. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Перспективи застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology* : матеріали Міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.56.

9. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. «*Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів*» : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

10. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.296-297.

11. Botsula I.V., Kireyev I.V. Use of benzodiazepines in patients with anxiety disorders and confirmed COVID-19. *Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects* : матеріали III науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 15-16 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. с.254.

12. Боцула І.В. Можливості використання нових похідних триазоло-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Youth Pharmacy Science: I* Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Харків, 27-29 квітня 2021 р. Харків : НФаУ. – доповідь.

13. Iryna Botsula, Igor Kireyev. Nanofiber-based drug delivery system as a choice for enhancing the solubility of pharmaceutical compounds. *«Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології»* : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. с. 15-16.

14. Iryna Botsula, Johannes Schavikin, Ivo Laidmäe, Igor Kireyev, Jyrki Heinämäki, Oleh Koshovyi. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents*, Tartu, 12-13 October 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023. P. 29.

15. Iryna Botsula. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving pharmacological effect of new benzodiazepine derivatives in rodents. *Seminars in Pharmaceutical Sciences XI*, Tartu, 23 November 2023. Tartu, Estonia, : University of Tartu, 2023.

16. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Mazur M. O., Chebanov V. A. Influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives on spontaneous locomotor activity of rodents. *«Medicines for humans. Modern issues of pharmacotherapy and drugs prescription»* : materials VII International scientific-practical conference, Kharkiv, 21-22 March 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.13-14.

17. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Chebanov V. A. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on rodent muscle tone. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* [Електронний ресурс] : тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, м. Одеса, 9–12 квітня 2024. Одеса: ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 324.

18. Botsula I., Koshovyi O., Kireyev I., Mazur M., Chebanov V., Heinämäki J., Raal A. 3D printing of functionalized polyethylene oxide (peo) gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract using semi-solid extrusion

technology. *Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin* : The Proceedings of the VI International Scientific and Practical Internet-Conference, Kharkiv, 12 April 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.12-13.

19. Botsula I. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the rodent coordination of movements. *Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024* : зб. тез доповідей 84 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 23-24 травня 2024 р. Запоріжжя : ЗДМФУ, 2024. с. 124-125.

ANNOTATION

Botsula I.V. Experimental research of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives as potential anxiolytics.– Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for a Doctor of Philosophy degree by specialty 226 «Pharmacy, industrial pharmacy» (22 Health care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2024.

The thesis demonstrates the results of research of the pharmacological activity of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives as potential anti-anxiety agents.

New 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives MA-252, MA-253, MA-254, MA-255 and MA-261 were synthesized under the supervision of the head of the department of organic and bioorganic chemistry of State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of National Academy of Sciences of Ukraine, Doctor of Chemical Sciences, Professor V.A. Chebanov.

With the help of molecular docking of new derivatives relative to the benzodiazepine site of the GABA receptor, it was found that for all S-configurations of the new compounds, the inherent mode of binding in the benzodiazepine site is

similar to classical benzodiazepines. Moreover, a hit-molecule MA-253, promising for experimental research, was found, which had higher absolute values of the scoring function compared to diazepam and hydazepam.

An important stage in the study of the pharmacological activity of new substances is the determination of toxicological characteristics, in particular cytotoxicity, genotoxicity and photosensitivity. They are used to determine the potential risks that medicines can cause in combination with exposure to sunlight. The neutral red uptake test (NRU) and the MTT assay are most commonly used to detect cell viability after exposure to toxic substances. Growth and proliferation of BALB/c 3T3 cells and mitochondrial metabolic activity after incubation with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives did not fall below 70% compared to controls. Phototoxicity is defined as a toxic reaction caused by local or systemic administration of photoreactive chemicals after exposure to external light. In connection with the formation of photoproducts of MA-252, MA-253 and MA-261 under the action of UV radiation (300-800 nm), toxicity was determined in the NRU test. The results showed that the studied samples did not have a negative effect on the state of the cell culture, significant differences in the number of living cells between the sample and the negative control were not noted. The antigenotoxic activity of 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives under the conditions of the Umu-test was also evaluated and the absence of a genotoxic effect on the growth of the *S. typhimurium* strain was established. The obtained results demonstrate the absence of potential toxic effects of the new compounds *in vitro* and the possibility of further research *in vivo*.

For the first time, the anxiolytic activity of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives was studied in the elevated plus maze and dark-light chamber tests, in which animal behavior reflects the conflict between mice's preference for protected areas and their innate motivation to explore new environments. The most pronounced anti-anxiety properties were established when administered with MA-252, MA-253 and MA-254 at a dose of 1 mg/kg, which were manifested by an increase in the time spent in the open space: by 86%, 160% and

77%, respectively, compared to the control group in tests of EPM, by 132%, 214% and 111%, respectively, in the DLC test, as well as the number of visits between arms/chambers of devices. In addition, the emotional component of the animal's anxiety decreased, which can be seen from the decrease in the number of fecal boluses and urinations in groups of animals that received newly synthesized triazolobenzodiazepine derivatives.

Antidepressant activity of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives was studied in Porsolt forced swim test and "tail suspension" test. During the research, a decrease in the total duration of immobility, the main indicator of "despair" of animals, and an increase in the latent period of the first immobility episode were monitored, which indicates the manifestation of antidepressant properties of the studied compounds. The depression index in the swim test was the lowest after the use of MA-253 and MA-254 derivatives at a dose of 1 mg/kg and was not statistically significantly different from that in the group whose animals received imipramine at a dose of 25 mg/kg.

Increased muscle tone is a fairly common symptom of anxiety in people, which can cause pain, including headache, and often bothers patients with anxiety. Therefore, the effect of new triazolobenzodiazepine derivatives on the tone of skeletal muscles in rodents was investigated using the "vertical grid" test, and on muscle tone and coordination of movements using the rotarod test. As a result, no negative effect of the derivatives on the coordination of movements was found, and a mild muscle relaxant effect was found when MA-252, MA-253 and MA-254 were administered at a dose of 1 mg/kg.

The effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the spontaneous motor activity of rodents in the "open field" test was studied, and it was established that the most pronounced changes are effected by the MA-253 derivative at a dose of 1 mg/kg, increasing locomotor and orientation-exploratory activity and reducing the amount of emotional manifestations in animals, which the nature of the effect was similar to that of the comparator drug, gidazepam. This behavior of mice

may indicate a decrease in the level of anxiety and psycho-emotional stress of animals.

Based on the results of screening studies, MA-252, MA-253, MA-254 and MA-255 derivatives in doses of 0.75 mg/kg and 1 mg/kg were selected for further pharmacological study.

The presence of analgesic activity of 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives was determined in the hot plate test and in the acetic acid spasm model, where for the first time an increase in the latent period of the behavioral response to painful thermal irritation of the limbs of mice under the influence of derivatives MA-252, MA-253 and MA-254 at a dose of 1 mg/kg and a reduction in the number of cramps against the background of MA-252, MA-253 and MA-254 were determined. However, the most pronounced analgesic activity was shown by the MA-253 derivative at a dose of 1 mg/kg in both tests.

In conditions of normobaric hypoxic hypoxia, MA-252, MA-253, and MA-255 derivatives did not show antihypoxic properties, however, life expectancy was prolonged against the background of the MA-254 derivative.

Three 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives (MA-252, MA-253 and MA-254) were selected for further studies of anxiolytic activity. For the first time, drug delivery systems based on nanofibers loaded with them were formed using electrospinning technology to improve their targeted delivery and pharmacodynamic effect. The morphology and physical state of nanofibers were determined and it was established that an amorphous polymer carrier (hydroxypropylmethylcellulose) can be used to create electrospun nanofibers for modern new benzodiazepines.

For the first time, pharmacological studies were conducted against the background of the introduction of nanofibers loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives, involving animals. Pronounced anxiolytic in EPM and dark-light chamber tests, antidepressant in Porsolt forced swim and "tail suspension" tests, analgesic activity in hot plate and acetic acid-induced writhing tests, absence of antihypoxic properties and no effect on behavioral reactions in open field test conditions were established. When compared with the results of screening studies,

an increase in the effect against the background of the introduction of nanofibers loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives was determined, in particular, it was most pronounced for the MA-253 derivative.

In-depth studies of the MA-253 derivative were carried out, which was identified as the leading compound based on the most pronounced changes in pharmacological activity in rodents. The actoprotective activity of DDS based on nanofibers loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives was established in the forced swim test.

For the first time, the interaction of the MA-253 derivative, loaded into nanofibers, with compounds of inhibitory and stimulating type of action was investigated in models of ethanol narcosis and in the open field test against the background of caffeine-sodium benzoate, and the potentiation of the action of ethanol by prolonging the duration of the lateral position, as well as antagonism to caffeine, was determined and strengthening of inhibitory adenosinergic effects in the central nervous system.

The effect of administration of MA-253 derivative for 28 days on pharmacodynamic effects was determined. It was established that there is no development of tolerance to previously studied activities: the derivative is characterized by pronounced anxiolytic activity, stimulating effect on locomotor and exploratory reactions and positive effect on the physical endurance of rats of both genders.

When determining the toxicological characteristics *in vivo*, it was founded that the MA-253 derivative can be assigned to class IV - low-toxic substances according to the Hodge and Sterner classification, since the LD₅₀ value exceeds 2500 mg/kg when administered intragastrically to mice. The study of subacute toxicity of MA-253 for 28 days on rats of both sexes showed the absence of toxic effects on general trophic processes, liver and kidney functions. All the studied parameters were within the values of the group of intact animals.

New functionalized PEO gel formulations combining nanofibers loaded with a 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivative and valine-modified dry extract of

Leonurus cardiaca were developed and optimized for pharmaceutical semi-solid extrusion 3D printing for the first time in a thesis study. Its composition with the highest printability is also determined - PEO gel with a dry extract of 100 mg/ml. The 3D printed samples developed in this study are suitable for oral administration with immediate release, which is a promising direction in the further creation of personalized dosage form based on the patient's individual needs.

Key words: triazolobenzodiazepine derivatives, GABA, anxiolytics, pharmacological effect, antidepressant activity, analgesic effect, cytotoxicity, acute toxicity, antihypoxic activity, open field test, nanofibers, 3D printing.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОХІДНИХ БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	31
1.1 Огляд проблеми тривожних розладів	31
1.2 Патофізіологія тривожного розладу	34
1.3 Застосування бензодіазепінів в терапії тривожних розладів	37
1.4 Аналіз асортименту препаратів на основі похідних бензодіазепінів на фармацевтичному ринку України	42
1.5 Обґрунтування доцільності застосування похідних триазолобензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів.....	44
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	49
РОЗДІЛ 3 СКРИНІНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК IN VITRO ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ	70
3.1 Молекулярний докінг нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора	70
3.2 Безпечність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах <i>in vitro</i> за показниками цитотоксичності та генотоксичності	80
3.2.1 Дослідження впливу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4- бензодіазепінів на життєздатність клітин у тестах МТТ та поглинання нейтрального червоного барвника	81
3.2.2 Визначення генотоксичності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4- бензодіазепінів в умовах уму-тесту	85
3.3 Скринінгові дослідження фармакологічної активності похідних 1,2,3- триазоло-1,4-бензодіазепінів.....	90

3.3.1 Дослідження анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів методами піднесеного хрестоподібного лабіринту та темно-світлої камери.....	90
3.3.2 Вивчення антидепресивної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів методом плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст».....	97
3.3.3 Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на м'язовий тонус та координацію рухів у мишей	102
3.3.4 Дослідження впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на поведінкові реакції дослідних тварин в тесті «відкритого поля» ...	106
РОЗДІЛ 4 ВИЗНАЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СПОЛУК-ЛІДЕРІВ СЕРЕД НОВИХ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ.....	
4.1 Вивчення анагетичної активності сполук-лідерів методами гарячої пластини та оцтовокислих корчів	115
4.2 Визначення антигіпоксичної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.....	121
РОЗДІЛ 5 ВИЗНАЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СПОЛУК-ЛІДЕРІВ СЕРЕД НОВИХ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ, ЗАВАНТАЖЕНИХ В НАНОВОЛОКНА	
5.1 Морфологія поверхні та фізичний стан нановолокон, створених за допомогою ЕП.....	124
5.2 Дослідження анксиолітичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами піднесеного хрестоподібного лабіринту та темно-світлої камери	130
5.3 Вивчення антидепресивної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст».....	137

5.4 Вивчення аналгетичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами гарячої пластини та оцтовокислих корчів	141
5.5 Визначення антигіпоксичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.....	144
5.6 Дослідження впливу нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на поведінкові реакції дослідних тварин в тесті «відкритого поля»	146
РОЗДІЛ 6 ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СПОЛУКИ-ЛІДЕРА	152
6.1 Дослідження актопротекторних властивостей МА-253 в тесті вимушеного плавання до виснаження.....	152
6.2 Взаємодія нановолокон, завантажених МА-253, зі сполуками пригнічувального типу дії.....	153
6.3 Взаємодія нановолокон, завантажених МА-253, з речовинами, що збуджують ЦНС	155
6.4 Дослідження фармакологічної активності похідного МА-253 за умов тривалого введення (протягом 28 днів)	157
6.5 Вивчення гострої токсичності похідного МА-253	161
6.6 Дослідження підгострої токсичності похідного МА-253	161
РОЗДІЛ 7 НАПІВТВЕРДИЙ ЕКСТРУЗІЙНИЙ 3D-ДРУК ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДНИХ ГЕЛІВ, ЗАВАНТАЖЕНИХ НАНОВОЛОКНАМИ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4- БЕНЗОДІАЗЕПІНУ ТА СУХИМ ЕКСТРАКТОМ КРОПИВИ СОБАЧОЇ ТРАВИ (<i>LEONURUS CARDIACA L.</i>), МОДИФІКОВАНОГО ВАЛІНОМ	180
7.1 Фізичний вигляд і в'язкість ПЕО гелів, завантажених нановолокнами з похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну МА-253 та модифікованим валіном сухим екстрактом кропиви собачої трави.....	181
7.2 Можливість напівтвердого екструзійного 3D-друку функціональних ПЕО гелів	184

7.3 Розчинення <i>in vitro</i> решіток, надрукованих шляхом напівтвердого екструзійного 3D-друку.....	186
7.4 Спектрофотометричний аналіз флавоноїдів	186
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	188
ВИСНОВКИ.....	199
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	204
ДОДАТКИ.....	238

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2-АА	– 2-аміноантрацен;
4-НХО -	– 4-нітрохінолін оксид;
АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт;
в/о	– внутрішньоочеревинно;
ВП	– відкрите поле;
в/ш	– внутрішньошлунково;
ГАМК	– γ -аміномасляна кислота;
ГЕБ	– гематоенцефалічний бар'єр;
ГПМЦ	– гідроксипропілметилцелюлоза;
ГТР	– генералізований тривожний розлад;
ДМСО	– диметилсульфоксид;
ЕП	– електропрядіння;
МТТ	– 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетранатрію бромід;
НЧБ	– нейтральний червоний барвник;
ПЕО	– поліетиленоксид;
ПНЧБ	– поглинання нейтрального червоного барвника;
ПР	– панічний розлад;
ПХЛ	– піднесений хрестоподібний лабіринт;
СТР	– соціальний тривожний розлад;
СДЛ	– система доставки ліків;
СІЗЗС	– селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну;
ТР	– тривожний розлад;
ТСК	– темно-світла камера;
ЦНС	– центральна нервова система.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Тривожні розлади (ТР) – найпоширеніший тип психічних захворювань у Європі, який виникає у 14 % осіб віком від 14 до 65 років та в два-три рази частіше вражає жінок, ніж чоловіків [1]. Перші ознаки тривожних розладів можуть з'явитись ще в дитячому та підлітковому віці за рахунок розвитку специфічних і соціальних фобій. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [2], ТР у світі зайняли 6-те місце та 4-те у високорозвинених країнах серед усіх психічних і соматичних захворювань, які стали причиною розвитку інвалідності; вони належать до хронічних захворювань, які мають найбільший вплив на життя пацієнтів [3, 4]. За підрахунками близько третини населення України пережило щонайменше один психічний розлад протягом життя. Гендерні відмінності стосуються посттравматичного стресового розладу та розладу, спричиненого вживанням алкоголю, які є більш поширеними серед чоловіків, тоді як депресія та тривожність більш поширені серед жінок [5]. Чисельність вимушено переміщених осіб зросла з початком бойових дій на території України, починаючи з 2014 року даний показник тільки зростає [6–8]. Масштабне дослідження показало, що у 20% внутрішньо переміщених осіб та 12% загальної популяції фіксувався помірний чи важкий рівень тривоги, у 25% та 15% відповідно виявлялася депресія, а в 16% і 8% відповідно поєднувалися тривожні та депресивні прояви [9]. В ході іншого дослідження встановлено, що поширеність посттравматичного стресового розладу серед внутрішньопереміщених осіб становила 32%, депресії – 22%, порушень тривожного спектра – 17% [10].

У багатьох клінічних дослідженнях в онкології вивчалася поширеність тривожних станів і, зокрема, станів депресивного спектру на різних етапах діагностики раку, тяжкості стану і по відношенню до різних локалізацій раку та визначено, що пацієнти з вираженими симптомами ТР та депресивних станів не отримували належного лікування [11–13].

Розлади психічного здоров'я, пов'язані з психологічною травмою, війнами, конфліктними ситуаціями, визначенням онкологічної патології, особливо на пізніх стадіях, є серйозною проблемою громадської охорони здоров'я в усьому світі. Тому доцільним є пошук та створення нових засобів з анксиолітичною та аналгетичною діями для профілактики та лікування ТР, особливо в онкологічних пацієнтів в перед- та післяопераційний періоди, а також на тлі бойової травми чи травматичного досвіду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконана за планом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакологічне вивчення біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер держреєстрації 0114U000956), в якій дисертант є співвиконавцем.

Мета та завдання дослідження. *Метою* дисертаційної роботи є експериментальне обґрунтування можливості застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в якості потенційних протитривожних засобів.

Для досягнення мети роботи були поставлені наступні **завдання**:

1. Провести молекулярний докінг нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту рецептора ГАМК.
2. Оцінити безпечність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах *in vitro* за показниками цитотоксичності та генотоксичності з метою встановлення можливості подальшого дослідження *in vivo*.
3. Здійснити скринінгові дослідження фармакологічної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, а саме анксиолітичної та антидепресивної активностей, впливу на м'язовий тонус та поведінкові реакції.
4. Визначити аналгетичну активність сполук-лідерів та їх антигіпоксичні властивості.
5. Сформувати нановолокна, завантажені похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, та провести визначення їх фармакологічної активності.

6. Дослідити актопротекторні властивості сполуки-лідера, його взаємодію зі сполуками пригнічувального та стимулювального типу дії, протитривожну активність та вплив на фізичну витривалість та поведінкові реакції протягом тривалого введення.

7. Оцінити токсикологічні характеристики похідного-лідера в умовах гострої та підгострої токсичностей.

8. З'ясувати можливості напівтвердого екструзійного 3D-друку функціональних ПЕО гелів, завантажених нановолокнами та сухим екстрактом кропиви собачої трави.

Об'єкт дослідження: фармакокорекція тривожних розладів.

Предмет дослідження – вивчення анксиолітичної, антидепресивної, анагетичної активностей, впливу на м'язовий тонус та координацію рухів, поведінкові реакції, фізичну витривалість, показники безпеки нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

Під час виконання дисертаційної роботи було використано такі методи **дослідження:** фармакологічні (анксиолітичної, антидепресивної, анагетичної активностей, впливу на м'язовий тонус та координацію рухів, взаємодії зі сполуками пригнічувального та стимулювального типу дії), токсикологічні (дослідження цитотоксичності, генотоксичності та хронічної токсичності), технологічні (електропрядіння, 3D-друк), біохімічні, гістологічні, статистичні (розрахунок середньої та її стандартної похибки, міжгрупових відмінностей тощо), метод гнучкого рецепторно-орієнтованого докінгу.

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі вперше проведено дослідження фармакологічних властивостей нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Вперше досліджено цитотоксичність, генотоксичність та фоточутливість досліджуваних похідних в умовах *in vitro* та встановлено відсутність їхнього токсичного впливу на проліферацію та метаболічну активність мітохондрій культур клітин та ріст штаму *S. typhimurium* при відтворенні відповідних тестів.

Вперше проведено скринінг анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах піднесеного хрестоподібного лабіринту і темно-світлої камери, та визначено їхні виражені протитривожні властивості, а також антидепресивну активність в тестах плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст».

Встановлено відсутність вираженого міорелаксуючого впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах вертикальної сітки і стрижня, що обертається, та зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження в умовах тесту відкритого поля.

Визначено аналгетичну активність похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в тестах гарячої пластини та оцтовокислих корчів, демонструючи вплив на центральні та периферичні механізми розвитку больової реакції.

Вперше сформовано системи доставки ліків на основі нановолокон, завантажених МА-252, МА-253 та МА-254, за допомогою технології електропрядіння (ЕП) з метою покращення їхньої цільової доставки та фармакодинамічного ефекту. При дослідженні морфології та фізичного стану нановолокон визначено, що ГПМЦ може бути використана для створення електропрядених нановолокон для сучасних нових бензодіазепінів.

Вперше проведено фармакологічні дослідження на тлі введення нановолокон, завантажених похідними, з залученням гризунів. Встановлено покращення анксиолітичної в тестах ПХЛ та ТСК, антидепресивної в тестах плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст», аналгетичної активностей в тестах гарячої пластини та оцтовокислих корчів в порівнянні зі скринінговими дослідженнями. Визначено актопротекторну активність систем доставки ліків (СДЛ) на основі нановолокон, завантажених похідними, в тесті вимушеного плавання з навантаженням.

Вперше виявлено потенціювання дії етанолу похідним МА-253 шляхом пролонгування тривалості бічного положення, а також антагонізм до кофеїну та посилення гальмівних аденозинергічних впливів у ЦНС.

Встановлено відсутність розвитку толерантності раніше досліджених активностей на тлі похідного МА-253 при тривалому введенні тваринам: характерна виражена анксиолітична активність, стимулювальна дія на локомоторно-дослідницькі реакції та позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох статей.

Вперше вивчено токсичність похідного МА-253 за умов однократного гострого введення мишам та тривалого застосування протягом 28 днів у щурів, встановлено безпечність його використання без негативного впливу на поведінку, зовнішній вигляд та загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок.

Вперше розроблено та оптимізовано склад нових функціоналізованих формул ПЕО-гелю, що поєднують нановолокна, завантажені похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави, для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку. Продемонстровано придатність надруковані 3D-зразків для перорального застосування з негайним вивільненням, що може бути використано при створенні персоналізованих лікарських препаратів згідно індивідуальних потреб пацієнта.

Фрагменти дисертаційної роботи впроваджені у науково-педагогічний процес кафедр наступних закладів вищої освіти: хімії ПВНЗ «Київський медичний університет» (протокол № 10 від 30 травня 2024 року), клінічної фармакології та внутрішньої медицини Харківського національного медичного університету (протокол № 17 від 31 травня 2024 року), фармакології, клінічної фармакології та фармації Полтавського державного медичного університету (протокол № 20 від 14 червня 2024 року), фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету (протокол № 7 від 19 червня 2024 року), загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету (протокол № 11 від 20 червня 2024 року).

Наукова новизна дисертаційного дослідження підтверджена патентами України на корисну модель №155538 (06.03.2024, Бюл. №10), №156108 (08.05.2024, Бюл. №19).

Теоретичне і практичне значення отриманих результатів. Одержані результати створюють теоретичне підґрунтя для створення лікарських засобів з анксиолітичною та аналгетичною активністю на основі похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, що мають широкий спектр фармакологічної дії, відсутність толерантності при застосуванні протягом 28 днів та сприятливий профіль безпеки.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Спільно з науковим керівником були сформовані мета, задачі дисертаційної роботи та розроблені методичні підходи проведення експериментальних досліджень. Особисто дисертанткою проведено інформаційно-патентний пошук за темою дисертації, проаналізовано та узагальнено доступні дані сучасних літературних джерел з досліджуваної проблеми, сформульовано мету та завдання дослідження.

Дисертантка особисто виконала ряд експериментальних досліджень, самостійно провела аналіз отриманих результатів та їх порівняння з даними сучасних публікацій з тематики дисертаційної роботи, самостійно проводила статистичну обробку, систематизацію одержаних результатів та оформлення їх у дисертаційну роботу. Дослідження методом молекулярного докінгу здійснено за консультативної допомоги д. фарм. н., проф., зав. кафедри медичної хімії НФаУ Переходи Ліни Олексіївни та к. фарм. н., доцента Сулейман Маргарити Мохеддінівни. Дослідження цитотоксичності та генотоксичності проведено під керівництвом професора кафедри токсикології та броматології, PhD Grzegorz Nałęcz-Jawecki та професора кафедри органічної хімії, декану фармацевтичного факультету, PhD Piotr Lulinski в рамках участі в програмі ERASMUS+ на базі Варшавського медичного університету, м. Варшава, Польща (04.05.2022-31.07.2022). Гістологічні дослідження проведено під керівництвом д.мед.н., проф., зав. кафедри патологічної

анатомії та судово-медичної експертизи Навчально-наукового інституту післядипломної освіти ХНМУ Яковцової Ірини Іванівни та за консультативної підтримки к.мед.н, доцента Григоренко Варвари Романівни. Дисертанткою опановано технологію отримання нанониток, завантажених лікарською речовиною, шляхом ЕП, а також основи 3D-друку під керівництвом професорів Jyrki Tapiro Heinämäki, Ain Raal, Кошового Олега Миколайовича та доцента Ivo Laidmäe на базі Інституту фармації Тартуського університету, м. Тарту, Естонія в рамках програм ERASMUS+ (25.04.2023-06.05.2023, 04.09.2023-04.02.2024).

Усі розділи дисертації написані власноруч. У наукових роботах, опублікованих у співавторстві з керівником та науковцями, спільно з якими проведені дослідження, дисертанткою наведені результати власних експериментальних досліджень, взято участь у аналізі та узагальненні отриманих даних та написанні статей. В опублікованих у співавторстві наукових працях дисертантці належить фактичний матеріал та основний творчий доробок.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на Всеукраїнських наукових конференціях з міжнародною участю. Дисертантка брала участь у наступних заходах: Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (м. Харків, 19 лютого 2021 року); V Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів» (м. Харків, 11-12 березня 2021 року); XXVIII Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів, присвячена 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка «Topical issues of new medicines development» (м. Харків, 18-19 березня 2021 року); III науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects» (м. Харків, 15-16 квітня 2021 р); I Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth Pharmacy

Science» (м. Харків, 27-29 квітня 2021 р); III Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 24 листопада 2023 р); Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023 (Tartu, Estonia, 12-13 October 2023); Seminars in Pharmaceutical Sciences XI (Tartu, Estonia, 23 November 2023); VII International scientific-practical conference «Medicines for humans. Modern issues of pharmacotherapy and drugs prescription» (Kharkiv, March 21-22, 2024); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (м. Одеса, 9–12 квітня 2024); VI International Scientific and Practical Internet-Conference «Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin» (Kharkiv, 12 April 2024); 84 Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024» (м. Запоріжжя, 23 - 24 травня 2024 р).

Структура та обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 274 сторінках та складається з анотації українською та англійською мовами, змісту, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження» та 5 розділів з результатами власних експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, загальних висновків, списку використаних джерел і 4 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 38 таблицями та 46 рисунками. Список використаних джерел налічує 273 найменувань, із них 45 кирилицею та 228 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНИЙ СТАН ДОСЛІДЖЕНЬ ЩОДО ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОХІДНИХ БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Огляд проблеми тривожних розладів

ТР – найпоширеніший тип психічних захворювань у Європі, який виникає у 14 % осіб віком від 14 до 65 років. Як правило, жінки страждають удвічі-втричі частіше, ніж чоловіки [1, 14]. Перші ознаки ТР з'являються ще в дитячому та підлітковому віці за рахунок специфічних і соціальних фобій [15]. У 2–3 % дітей виражений ТР розлуки зберігається аж до дошкільного або шкільного віку. За даними ВООЗ [2], ТР у світі посіли 6-те місце та 4-те у високорозвинених країнах серед усіх психічних і соматичних захворювань, які стали причиною розвитку інвалідності; вони належать до хронічних захворювань, які мають найбільший вплив на життя пацієнтів [4]. Світова пандемія COVID-2019 виступила провокуючим фактором загострення вже наявних психічних порушень [16, 17] та значно прискорила темпи поширення нових випадків депресивних (53,2 млн) та тривожних розладів (76,2 млн) за 2020 р. порівняно з 2019 р. в середньому на 25% по всьому світу [18, 19]. Розлади, викликані тривожністю та депресією, коштують світовій економіці 1 трлн доларів США щороку [20].

За підрахунками близько третини населення України пережило щонайменше один психічний розлад протягом життя. Гендерні відмінності стосуються посттравматичного стресового розладу та розладу, спричиненого вживанням алкоголю, які є більш поширеними серед чоловіків, тоді як депресія та тривожність більш поширені серед жінок [5]. Дослідження [5, 21] показали, що поширеність психічних розладів та фактори ризику різняться в різних регіонах України, як і наявність кваліфікованих спеціалістів з охорони психічного здоров'я. Східний регіон України пов'язаний з вищим рівнем

самогубств, тоді як Київ та східні регіони України пов'язані з вищим рівнем поширеності психічних розладів, а саме афективних та ТР і розладу, спричиненого вживанням алкоголю [22].

Психічне захворювання – це один з найбільших невидимих тягарів у всіх країнах, відповідаючих за 4 з 10 основних причин інвалідності у світі. До 2030 року депресія стане третьою найбільш поширеною причиною тягара захворювань в країнах з низьким рівнем доходу та другою найбільш поширеною причиною в країнах з середнім рівнем доходу. Результати аналізу даних ВООЗ свідчать про те, що група ТР є шостою за частотою причиною втрати працездатності як у країнах з високим рівнем доходу, так і з середнім та низьким, включаючи Україну [23].

В Україні психічні, неврологічні розлади та розлади, спричинені вживанням психоактивних речовин, є другою основною причиною тягара інвалідності щодо DALYs (роки життя з поправкою на інвалідність).

За даними Всесвітньої асамблеї охорони здоров'я психічні розлади мають суттєвий вплив на розвиток та перебіг різних хвороб таких, як онкологічні, серцево-судинні захворювання, хвороби печінки, ВІЛ/СНІДу [24, 25]. Також відомі випадки, коли депресивно-тривожні розлади підвищували схильність до виникнення інфаркту міокарда та цукрового діабету [26].

Тривожність часто асоційована з погіршенням соматичних станів, до прикладу інтенсивністю болю. Це може бути пов'язано з тим, що у пацієнтів із тривогою часто діагностують стани, асоційовані з больовим синдромом, наприклад, хронічний головний біль напруження, неспецифічний біль у спині та низку інших. Згідно з отриманими результатами масштабного мультинаціонального обстеження, хронічний біль протягом останніх 12 місяців відзначали у себе 19,7% пацієнтів з тривожністю або депресією [27]. Таким чином, кожен п'ятий пацієнт із ТР потребує також терапії, спрямованої на усунення болю.

У клінічних дослідженнях онкологічного профілю вивчалася поширеність тривожних станів і, зокрема, станів депресивного спектру на

різних етапах діагностики раку, тяжкості стану і по відношенню до різних локалізацій раку та визначено, що пацієнти з вираженими симптомами ТР та депресивних станів не отримували належного лікування [11–13]. Метааналіз 16 когортних досліджень (Health Survey for England) за участю понад 163 тис. чоловіків і жінок, які не хворіли на рак при включенні до дослідження, показав, що за 9,5 років спостереження особи з високим показником тривожності/депресії (оцінювалось за опитувальником загального стану здоров'я GHQ-12) на момент включення значущо частіше помирали від раку, ніж особи з низьким відповідним показником [4]. Таким чином, раннє виявлення та лікування ТР можуть мати вторинний профілактичний ефект щодо подальших психічних і соматичних захворювань, що також сприяє позитивному впливу на перебіг соматичних патологій.

Згідно даних стосовно надання психіатричної допомоги населенню України за 2018-2020 роки на лікування невротичних розладів, пов'язаних зі стресом, в амбулаторних умовах припадає 149 044 випадки з 1 748 840, що становить 8,5% від загальної кількості, а в стаціонарних – 5,16% випадків [28]. Враховуючи дані з Форми 10 [28], маємо наступну кількість осіб, яким надавалась амбулаторна психіатрична допомога у зв'язку з невротичним розладом, пов'язаним зі стресом, на кінець року: за 2018 рік 120 883 осіб з 1 151 383 (10,5%); 2019 рік 119 269 - з 1 524 699 (7,8%); 2020 рік 121 107 з 1 531 234 (7,9%). В стаціонарному відділенні 2018 рік 16 261 з 310 665 (5,23%); 2019 рік 16 665 з 302 218 (5,51%); 2020 рік 12 405 з 239 641 (5,18%). З початку 2014 року з розгортанням подій на Сході країни, вторгненням російських військ та порушенням суверенітету країни з 24 лютого 2022 року громадяни вимушено переселені чи то внутрішньо, чи за необхідності та можливості виїхали за кордон: хтось постраждав чи отримав психологічну травму, втратив близького чи знайомого, має порушення сну чи високий рівень тривожності, панічні розлади (ПР) і т.д. У значної частини військовослужбовців Збройних Сил України, які брали участь в обороні суверенітету та територій батьківщини, та/або постраждали в результаті збройного конфлікту, спостерігаються

розлади психогенного характеру. Тому статистика буде зростати та кількість пацієнтів буде більшою.

Розлади психічного здоров'я, пов'язані з психологічною травмою, війнами, конфліктними ситуаціями, визначенням онкологічної патології, особливо на пізніх стадіях, є серйозною проблемою громадської охорони здоров'я в усьому світі. Тому доцільним залишається пошук, створення та дослідження нових засобів з анксиолітичною та аналгетичною діями для попередження виникнення та лікування ТР, особливо на тлі онкологічного захворювання в перед- та післяопераційний періоди, а також у пацієнтів з бойовою травмою чи травматичним досвідом.

1.2 Патофізіологія тривожного розладу

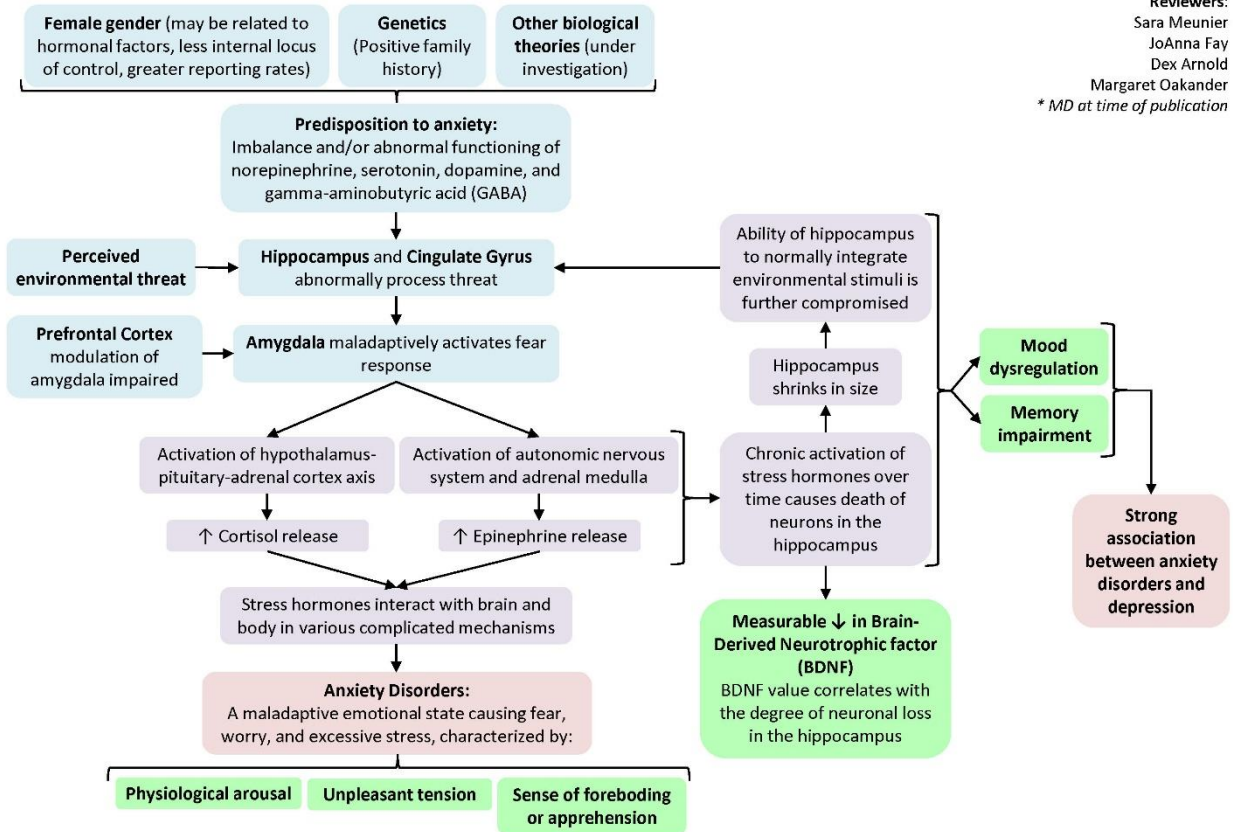
Деякі зони головного мозку відіграють ключову роль у формуванні відчуття страху і тривоги. До таких нейронних структур належать мигдалеподібне тіло, гіпоталамус, блакитна пляма (*locus ceruleus*), періакведуктальна сіра речовина, префронтальна кора та фронтальна частина поясної звивини. Ці області регулюють центральні та периферичні прояви реакції тривоги [29, 30]. Острівець (*insula*), що бере участь у функціонуванні свідомості, реагує на інтероцептивні сигнали, забезпечуючи регуляцію гомеостазу та емоцій, та ядро ложа термінальної смуги (частина мигдалини), яке, як вважається, регулює мотивовану поведінку, також залучені у формування тривожності, особливо характерної для генералізованого тривожного розладу (ГТР), панічного (ПР) та соціального тривожного розладу (СТР) [4, 31]. Для ТР, зокрема ГТР, характерні значні анатомічні зміни в мозку, а саме, до прикладу, збільшення обсягу сірої речовини головного мозку в мигдалеподібному тілі та/або зменшення гіпокампу [32]. Частіше за все у жінок з ГТР відстежується збільшення мигдалини та дорсомедіальної префронтальної кори, відповідальних за виникнення тривоги, а також

зменшення об'єму орбітофронтальної кори, що бере участь в прийнятті рішень [33].

Існує припущення, що результати нейровізуалізаційних досліджень можуть свідчити про дисфункціональну взаємодію між лімбічною системою (мигдалина, ядро ложа термінальної смуги, острівець), яка підсилює тривожність, та кортикальними ділянками (префронтальна кора, орбітофронтальна кора, передня поясна звивина), що послаблюють тривожність. Ця дисфункція може бути нейронним корелятом нездатності регулювати занепокоєння при ТР, особливо у пацієнтів літнього віку [34, 35]. Як наслідок, тривожні люди виявляють підвищену увагу до загрози (тобто упередженість уваги) і більш схильні інтерпретувати емоційно неоднозначні стимули у спосіб, пов'язаний із загрозою. Їм стає важче зосередитися на завданні та ефективно обробляти інформацію, що часто призводить до зниження когнітивних здібностей [36].

Патофізіологія ТР досі залишається невідомою, однак ключовими факторами є дисфункції в нейротрансмісії серотоніну (5-НТ), норадреналіну, гамма-аміномасляної кислоти (ГАМК), холецистокініну і кортикотропін-вивільняючого фактора (рис. 1.1). Серотонін відіграє важливу роль у виникненні тривожності через свою іннервацію лімбічної системи, гіпоталамуса і таламуса. У пацієнтів з ГТР виявляються низькі рівні метаболіту серотоніну 5-гідроксиіндолоцтової кислоти у спинномозковій рідині, а симптоми тривожності посилюються при прийомі агоніста 5-НТ1/5-НТ2-рецепторів m-хлорофенілпіперазину. Крім того, у цих пацієнтів спостерігається знижене зв'язування селективного інгібітора зворотного захоплення серотоніну (СИЗС) пароксетину тромбоцитами [37]. У нелікованих пацієнтів виявляють знижену кількість зон зв'язування бензодіазепінів на тромбоцитах, при застосуванні діазепаму їх кількість зростає, аналогічну тенденцію встановлено щодо лімфоцитів.

Anxiety Disorders: Pathogenesis of Anxiety



Author:
Yan Yu
Reviewers:
Sara Meunier
JoAnna Fay
Dex Arnold
Margaret Oakander
* MD at time of publication

Legend: Pathophysiology Mechanism Sign/Symptom/Lab Finding Complications Published October 28, 2013 on www.thecalgaryguide.com

Рис. 1.1 Патогенез тривожного розладу (автор Yan Yu [38])

ГАМК є головним інгібіторним нейромедіатором в центральній нервовій системі, що відіграє ключову роль в регуляції тривожності. У пацієнтів з ТР часто спостерігається дисфункція ГАМК-ергічної системи, яка призводить до зниження інгібуючого контролю над нейронними мережами, що відповідають за тривогу і стрес. Це може спричиняти підвищену збудливість нейронів, що проявляється через посилення тривожних і страхових реакцій. Бензодіазепіни, як позитивні алостеричні модулятори ГАМК-А рецептора, часто використовуються для лікування ТР, оскільки вони сприяють зниженню нервової збудливості та тривожності [39].

1.3 Застосування бензодіазепінів в терапії тривожних розладів

ТР – це тип психіатричного розладу, що виникає як наслідок надмірної поведінкової реакції на стрес [40]. Різні екзогенні та ендогенні фактори можуть ускладнювати ситуацію та стан людини, викликаючи необхідність застосування поведінкової терапії та/або медикаментозного лікування.

Структура ядра бензоазепіну є добре відомим фармакофором, який присутній у кількох препаратах від розладів настрою, таких як іміпрамін, діазепам і лоразепам. Крім того, ця основна структура демонструє різні біологічні дії: протипухлинну (оланзапін, рукапаріб, клозапін, антраміцин і томайміцин), антибактеріальну (діазепіноміцин), протисудомну та антигіпертензивну (беназеприл) дію, а також дію проти ВІЛ-1 [41–44].

Бензодіазепіни, які діють як агоністи ГАМК-А рецепторів, є надзвичайно універсальними препаратами, які можна призначати для широкого спектру станів, включаючи алкогольну абстиненцію, збудження або агресію, анестезію, кататонію, манію, безсоння, м'язові спазми, епілепсію або судоми та розлади сну, розлади поведінки та руху [45]. Їх можна використовувати в короткостроковій перспективі постійно або за потреби для ПР, ГТР і СТР у поєднанні з СІЗЗС протягом перших тижнів до початку ефективності антидепресантів [46, 47].

ГАМК виступає як основний інгібітор нейротрансмісії в центральній нервовій системі (ЦНС), чия дія реалізується за рахунок зв'язування з ліганд-залежними ГАМК-А рецепторами. Після активації рецептора внутрішній хлоридний канал відкривається, відбувається приток іонів хлориду, який гіперполяризує мембранний потенціал, та в подальшому призводить до інгібування нейронів. Таким чином, модуляція функції рецептора ГАМК А є важливим механізмом індукції та підтримки седації, сну та анестезії, а також алкогольної інтоксикації [48]. ГАМК А-рецепторний комплекс представлений пентамерами, які потенційно можуть бути зібрані з 19 можливих субодиниць ($\alpha(1-6)$, $\beta(1-3)$, $\gamma(1-3)$, δ , ϵ , θ , π і $\rho(1-3)$) у ссавців. Найбільш поширеними

нативними рецепторами є гетеропентамери, що складаються з двох α_1 , двох β_2 та однієї γ_2 субодиниці [49]. Два ГАМК-зв'язуючих сайти знаходяться на межі α_1 та β_2 , а сайт аллостеричного зв'язування бензодіазепінів – на межі α_1 і γ_2 (рис. 1.2).

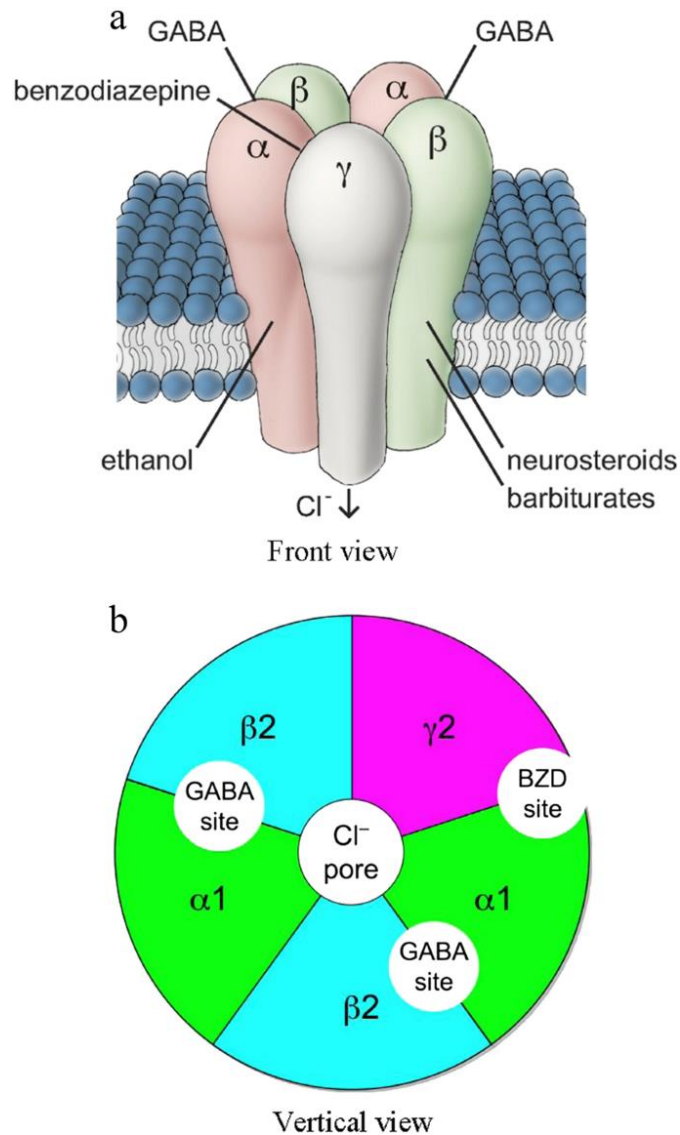


Рис. 1.2 Схематичне зображення ГАМК-А рецептора [50]. *Примітка:* бензодіазепіни зв'язуються з поверхнею між субодиницями α і γ , тоді як ендогенна ГАМК - між субодиницями α і β .

Бензодіазепіни не здатні активувати ГАМК-рецептор, однак, алостерично взаємодіючи зі своїм місцем зв'язування, вони викликають конформаційні зміни рецептора, які призводять до підвищення його афінності

до ГАМК, тим самим збільшується надходження іонів хлору всередину нейронів і підвищується гальмівний постсинаптичний потенціал, що, в свою чергу, знижує збудливість нейронів. На рівні одиничних каналів бензодіазепіни збільшують середній час відкритого стану каналів [51]. Агоністи діють, збільшуючи частоту відкриття каналів, що забезпечує чисту гіперполяризацію нейрона та зниження збудливості [52].

Похідним бензодіазепіну притаманна анксіолітична, снодійна, седативна активності, які обумовлені їхньою пригнічувальною дією на нейрони лімбічної системи, включаючи мигдалину, і активуючою на серотонінергічні (5-НТ) і норадренергічні нейрони ретикулярної формації стовбура мозку шляхом стимуляції бензодіазепінових сайтів ГАМК-А рецепторів [50]. Бензодіазепіни за рахунок пригнічення полісинаптичних рефлексів на рівні спинного мозку здатні знижувати тонус скелетних м'язів та проявляти протисудомну активність за рахунок впливу на нейрони кори, потенціювати дію речовин, що пригнічують ЦНС, у тому числі алкоголю і препаратів для наркозу, та викликати антероградну амнезію [53].

Як відомо, бензодіазепіни діють на бензодіазепіновий сайт рецепторів розташований на межі субодиниць α/γ [54]. Чутливі до бензодіазепіну α -підтипи ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) ГАМК-А рецептора пов'язані з різними фармакологічними діями бензодіазепінового сайту [55, 56]. Седативні, гіпнотичні та протисудомні ефекти пов'язані з $\alpha 1$ підтипом ГАМК-А рецепторів, анксіолітичну, міорелаксуючу та анальгетичну дії пов'язують з $\alpha 2$ субодиницею, а підтипи $\alpha 5$ асоціюються з пізнанням та реалізацією афективної та когнітивної функції в моделі депресії [57-59]. Також вважається, що похідні, які є селективними для підтипів $\alpha 2/\alpha 3$ ГАМК-А рецепторів, потенційно можуть спричиняти антиноцицептивні ефекти без інших фармакологічних ефектів, пов'язаних з бензодіазепінами, таких як седация та когнітивні порушення [60].

Було продемонстровано, що специфічний залишок гістидину в гомологічному положенні субодиниць $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ і $\alpha 5$ є вирішальним в

реалізації ефектів похідних бензодіазепінів, коли заміна на залишок аргініну в N-кінцевої положенні субодиниць $\alpha 4$ і $\alpha 6$ робить їх бензодіазепінонечутливими [61, 62].

Різноманітність ГАМК-А рецепторів, яку забезпечують різні комбінації субодиниць, використовується для створення нових лікарських засобів [49]. Така варіативність дозволяє сподіватися на розробку майбутніх бензодіазепіноподібних препаратів з вищою селективністю, які матимуть менш виражений седативний ефект або рідше викликатимуть залежність [63].

Окрім реалізації дії через центральні ГАМК-А рецептори, бензодіазепіни також взаємодіють з периферичними бензодіазепіновими рецепторами, які присутні в основному в периферичній нервовій системі та нейроглії, та структурно не пов'язані з ГАМК А-рецепторами [64]. Проте вони здатні модулювати імунну систему та брати участь у відповідній реакції організму на пошкодження. Бензодіазепіни сприяють накопиченню ендogenous аденозину в позаклітинному просторі шляхом інгібування поглинання аденозину через транспортери аденозину, що, можливо, частково опосередковує їхні протисудомні, анксиолітичні та міорелаксуючі ефекти [65].

Анксиолітична дія бензодіазепінів починається незабаром після перорального або парентерального застосування. На відміну від антидепресантів, бензодіазепіни не призводять до початкового підвищення збудження та безсоння [66]. У Сполучених Штатах від 55% до 94% пацієнтів із ТР лікуються бензодіазепінами [67]. Подібним чином європейські дослідження показали високий рівень тривалого застосування бензодіазепінів [68]. Однак застосування бензодіазепінів від 4 до 8 місяців у деяких пацієнтів може призвести до розвитку залежності, толерантність же, що характеризується постійним бажанням пацієнта підвищити дозу, виникає рідко. Тому перед лікуванням бензодіазепінами варто ретельно оцінити співвідношення ризиків та переваг.

ГАМК-А рецептор служить основною мішенню не тільки бензодіазепінів, але й барбітуратів та етанолу, обумовлюючи його деякі

токсичні ефекти. Вони діють за допомогою алостеричної регуляції та взаємно підсилюють дію один одного, що пояснює небезпеку передозування при їхньому спільному застосуванні або розвиток толерантності [69]. Етиловий спирт не зв'язується з самим рецептором, а змінює його мембранне оточення [70].

ГАМК-ергічні інтернейрони утворюють локальні ланцюги та контролюють діяльність нейронів через вивільнення ГАМК. Було показано важливу роль прелімбічної області в сенсорних та емоційних аспектах болю та визначено ГАМК-ергічні ланцюги в цій області як потенційну мішень для знеболюючої терапії [71]. Відомо, що тривалий біль здатний викликати тривогу з прогресуючим депресивним станом та посилювати сприйняття болю. Одночасне виникнення болю та депресії пов'язане з функціональним погіршенням, гіршою відповіддю на лікування і вищими витратами на охорону здоров'я [72].

Бензодіазепіни (до прикладу, діазепам, оксазепам, нітразепам) застосовують в якості премедикації за рахунок їхньої здатності значно послаблювати стан емоційної напруги, викликаний очікуванням болю перед операційними втручаннями, та ефективно зменшувати реакцію страху та болю у відповідь на больовий вплив. Зокрема в ході доклінічних досліджень мідазоламу було показано виражену аналгетичну дію при інтратекальному шляху введення лабораторним тваринам, а при застосуванні у людей визначено зменшення післяопераційного болю, хронічного болю в попереку після епідурального введення. Механізм такого ефекту ще недостатньо вивчений: можливо пов'язаний зі взаємодією мідазоламу з бензодіазепіновими сайтами ГАМК-А рецепторів та подальшим знеболювальним ефектом при непрямому впливові на спінальну передачу опіоїдів. У дослідженні підтверджено пряму взаємодію цих бензодіазепінів як агоністів κ-рецепторів [73]. Також бензодіазепіни (діазепам, мідазолам) ефективно застосовуються при нейролептанальгезії, або зокрема атаралгезії [74]. Стани «атараксії» та вираженої аналгезії досягають за допомогою седативних препаратів та

аналгетиків (седуксен, мідазолам, фентаніл, морфін, промедол). Поєднання атаралгезії з місцевою анестезією активно використовують, наприклад, у щелепно-лицьовій хірургії, ендоскопічних дослідженнях, лапароскопічних оперативних втручаннях [75]. Це визначає перспективність розробки нових протитривожних засобів з аналгетичною дією, що може бути застосовно у пацієнтів в перед- та післяопераційний період або перед інвазивними втручаннями.

1.4 Аналіз асортименту препаратів на основі похідних бензодіазепінів на фармацевтичному ринку України

У системі анатомо-терапевтичної хімічної класифікації (АТС) бензодіазепіни представлені під кодами N03 (протиепілептичні засоби) і N05 (психолептики), у яких вони далі поділяються на N05B (анксіолітики) і N05C (снодійні та седативні засоби). Вони є корисними терапевтичними засобами при багатьох захворюваннях і розладах, таких як ТР, епілепсія або розлади сну. Однак у більшості терапевтичних схем їх широкий фармакологічний профіль викликає небажані або побічні ефекти на додаток до бажаних ефектів [76, 77].

Згідно бази даних ClinCalc DrugStats до списку ТОП 300 ліків, які йнайчастіше призначалась в США в 2022 році, належать алпразолам (41 місце з 14 988 526 виписаних рецептів), клоназепам (57 місце, 11 711 065 рецептів), лоразепам (81 місце, 8 502 480 рецептів), діазепам (169 місце, 3 093 210 рецептів) [78].

Бензодіазепіни схвалені в Німеччині для гострого лікування «станів напруги, збудження та тривоги». Тим не менш, німецькі рекомендації щодо лікування ТР обговорюють використання бензодіазепінів для цієї мети в критичних термінах через їх помітні побічні ефекти [4].

При дослідженні питання призначення бензодіазепінів в якості медичної допомоги хворим на ТР встановлено, що окремого клінічного протоколу не існує. В Україні розроблено та затверджено клінічні протоколи надання

медичної допомоги хворим на ПР [79], де описано застосування діазепаму, феназепаму, клоназепаму та альпразоламу, на депресію [80], де у випадку наявності тривожної компоненти на фоні основного стану рекомендують використовувати діазепам, оксазепам або хлордіазепоксид, а також пацієнтам з реакцією на важкий стрес та розладами адаптації, ПТСР [81], в якому вказано про заборону прийому даного класу речовин. Згідно клінічного протоколу первинної, екстреної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Епілепсії у дорослих» та «Епілепсії у дітей» (затверджено Наказом Міністерства охорони здоров'я України 17.04.2014 № 276) використовується діазепам 0,3-0,4 мг/кг при тривалості нападу епілепсії до 10 хв або повторно 0,2-0,4 мг/кг при тривалості нападу більш ніж 10 хв [82, 83]. У протоколі «Новий клінічний протокол. Екстрена медична допомога: догоспітальний етап» надана інформація по застосуванню наступних препаратів при наданні допомоги пацієнту, який знаходиться у збудженому та агресивному стані, а також неконтактним пацієнтам, при судомах: діазепаму 5 мг в/в або 10 мг в/м дорослим, 0,05-0,1 мг/кг в/в або 0,1-0,2 мг/кг в/м; лоразепаму 2 мг в/в або 4 мг в/м дорослим, 0,05 мг/кг в/в або 0,05 мг/кг в/м дітям; мідазолам 5 мг в/в або 10 мг в/м або назально дорослим, 0,05 мг/кг в/в або 0,1-0,15 мг/кг в/м або 0,3 мг/кг назально дітям [84].

За уніфікованим клінічним протоколом паліативної медичної допомоги при хронічному больовому синдромі, затвердженого Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 25 квітня 2012 р. № 311, перелік лікарських засобів-анксиолітиків включає діазепам, хлордіазепоксид, оксазепам, альпразолам, тофізолам, гідазепам, феназепам [85].

Аналізуючи американські протоколи, визначено, що в якості другої лінії фармакотерапії ГТР використовують діазепам 2-10 мг 2 рази на добу, алпразолам 0,25-0,5 мг 3 рази на добу, лоразепам 10 мг, клоназепам 0,25-0,5 мг 2 рази на добу [86]. В Канаді серед бензодіазепінів найчастіше призначають альпразолам, клоназепам, лоразепам, діазепам [87]. В Індії, в свою чергу,

призначають клоназепам, хлордіазепоксид, діазепам, альпразолам при ГТР та панічних атаках [88].

Згідно Британського формуляру в якості терапії тривожних станів серед похідних бензодіазепінів використовують альпразолам 250–500 мкг 3 рази на добу, хлордіазепоксиду гідрохлорид 10 мг 3 рази на добу, діазепам 2 мг 3 рази на добу, оксазепам 15-30 мг 3-4 рази на добу [89].

В окремих випадках гострі напади паніки можуть вимагати негайного медикаментозного лікування. У цьому випадку за потреби можна призначати таблетки лоразепаму в дозі від 1,0 до 2,5 мг (до дози не вище 7,5 мг/добу) [67].

Відповідно до Державного формуляру лікарських засобів за 2022 рік для лікування тривожних станів рекомендується застосування гідазепаму, діазепаму та феназепаму, останнього на сьогоднішній день нема в реєстрі оптово-відпускних цін [90].

Згідно Державного реєстру лікарських засобів України на ринку зареєстровано 17 препаратів похідних бензодіазепінів за кодом АТС N05BA (анксіолітики похідні бензодіазепінів), з яких 15 в таблетованій формі (феназепам 0,5 мг, 1 мг, 2,5 мг ("ІНТЕРХІМ", Україна), гідазепам 20 мг, 50 мг ("ІНТЕРХІМ", Україна), діазепам 5 мг ("Харківське фармацевтичне підприємство "Здоров'я народу", Україна), 5 мг, 10 мг ("ІНТЕРХІМ", Україна), лоразепам 1 мг та 2,5 мг ("Харківське фармацевтичне підприємство "Здоров'я народу", Україна), алпразолам 0,25 мг та 5 мг ("Харківське фармацевтичне підприємство "Здоров'я народу", Україна)) та 2 – в ін'єкційній.

1.5 Обґрунтування доцільності застосування похідних триазолобензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів

Великий інтерес до синтезу нових біологічно активних речовин, що містять ядро 1,2,3-триазолу, виникає через їх високу хімічну стабільність, їхня розчинність у полярному біологічному середовищі та здатність імітувати інші групи, такі як амід, складні ефіри, гетероцикли (діазосполуки) [91, 92].

В останні роки гібриди, що містять триазольний фрагмент, завдяки їх чудовим пригнічуючим ефектам проти багатьох ракових клітин відіграють важливу роль в галузі протипухлинних досліджень. Наприклад, анастрозол, який містить 1,2,4-триазол, наразі схвалений для клінічного використання в лікуванні поширеного раку молочної залози [92]. Сполуки, що містять 1,2,3-триазол, такі як цефатризин і карбоксиамідотриазол, при застосуванні в лікуванні раку виявило суттєвий потенціал як протипухлинні препарати. Похідні карбазолу, що містять N-бензил-1,2,3-триазольний фрагмент, також виявляють значну антиацетилхолінестеразну активність [93]. Триазоли з оксазолідиноновими кільцями опосередковують інгібування моноаміноксидази (МАО) та присутність метильної групи в триазоловому кільці забезпечує селективність щодо ізоформи МАО-В, що в подальшому визначає ефективність при призначенні пацієнтам з атиповою депресією. При дослідженні фармакологічної активності 5'-4-алкіл/арил-1Н-1,2,3-триазолів на мишах було виявлено, що аполярна частина, присутня в триазолі в деяких з них, відіграє ключову роль у полегшенні руху сполук через ГЕБ, а також реалізації впливу на ЦНС, призводячи до пролонгування гіпнотичного стану, збільшення тривалості знаходження тварини на відкритому рукаві в тесті ПХЛ, що характерно для сполук з вираженою анксиолітичною активністю [94].

Руфінамід, похідне триазолу, використовується як протисудомний препарат за рахунок блокування натрієвих каналів в терапії для лікування синдрому Леннокса-Гасто та інших судомних розладів [95].

Флуконазол, ітраконазол та вориконазол широко застосовуються як протигрибкові засоби в клінічній практиці. Рибавірин (1-[(2R,3R,4S,5R)-3,4-дигідрокси-5-(гідроксиметил)оксолан-2-іл]-1Н-1,2,4-тріазол-3-карбоксамід) гальмує синтез вірусної ДНК та РНК, що забезпечує його використання як противірусного препарату, зокрема проти вірусу гепатиту С [96].

Ризатриптан (3-[2-(диметиламіно)етил]-5-(1,2,4-триазол-1-ілметил)індол), будучи агоністом серотонінових рецепторів та пригнічуючи вивільнення вазоактивних нейропептидів, виявляє протимігренозну дію [97].

В огляді наведено основні методи синтезу триазолових сполук та медичне значення в посиленні терапевтичних молекул. Визначено наявність протизапального, антидіабетичного, антибактеріального, протитуберкульозного ефектів, що свідчить про широту їхньої фармакологічної дії [98].

Під час доклінічних досліджень похідні триазолу виявили виражену знеболювальну активність на моделях оцтовокислих корчів та гарячої пластини [99]. Також в іншому дослідженні було показано, що поєднання піразолопохідних 1,2,4-тріазол-3-тіолу з 2,6-дихлорофенільним замісником, фрагментами насичених карбонових кислот і їхніх естерів створює умови для формування сполук з антиноцицептивною активністю [100]. Визначення фармакологічного ефекту похідних 5-тіоалкіл-1,3-діарил-1,2,4-тріазолу показали наявність вираженої аналгетичної дії в тесті «tail flick», хоч і поступалась препарату-порівняння морфіну [101].

Триазолобензодіазепіни є класом сполук, що поєднують у своїй структурі властивості як бензодіазепінів, так і триазолів. Ці сполуки демонструють широкий спектр фармакологічної активності, включаючи протівірусну, протизапальну, протипухлинну, аналгетичну, анксіолітичну, седативну, протисудомну та міорелаксуючу дію [102, 103]. Вони впливають на ЦНС, взаємодіючи з ГАМКА-рецепторами, що забезпечує їхню основну дію як модуляторів нервових сигналів [104]. Завдяки своїй унікальній структурі, триазолобензодіазепіни можуть бути більш селективними у своїй дії, що зменшує ризик побічних ефектів, таких як седативність та залежність.

До похідних триазолобензодіазепінів належать адіназолам, алпразолам, бромазолам, естазолам, запізолам, клоназолам, нітразолам, триазолам. Проте на фармацевтичному ринку України представлені лише декілька з них. Алпразолам володіє анксіолітичною, гіпноседативною, центральною міорелаксуючою та протисудомною властивостями, його часто призначають для лікування ПР і ТР [105]. Естазолам використовують для короточасного лікування порушень сну, підвищеного збудження, а також в якості

премедикації [106]. Клоназепам призначається пацієнтам як протисудомний препарат: його застосування збільшує рівень судомного порогу, запобігає виникненню загальних судомних нападів, а також полегшує перебіг епілептичних нападів [107].

Таким чином, похідні триазолобензодіазепінів чинять різноманітну фармакологічну активність, зокрема анксиолітичну, снодійну та протисудомну. Триазольні фрагменти можуть посилювати їхній вплив на організм і потенційно здійснювати аналгетичний ефект. Тому доцільним та перспективним є дослідження нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів з аналгетичною активністю.

Результати аналізу літературних джерел за темою дисертації наведено в таких публікаціях:

1. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Перспективи застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology* : матеріали Міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.56.

2. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. «*Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів*» : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

3. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.296-297.

4. Botsula I.V., Kireyev I.V. Use of benzodiazepines in patients with anxiety disorders and confirmed COVID-19. *Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects* : матеріали III науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 15-16 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. с.254.

5. Боцула І.В. Можливості використання нових похідних триазоло-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Youth Pharmacy Science: I* Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Харків, 27-29 квітня 2021 р. Харків : НФаУ. – доповідь.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Синтез 5 нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів було здійснено співробітниками лабораторії фізико-хімічних процесів ДНУ НТК «Інститут монокристалів» НАН України під керівництвом першого заступника генерального директора з наукової роботи, члена-кореспондента НАН України, професора В. А. Чебанова (табл. 2.1) [108]. Перед їх застосуванням у експериментах *in vivo* було проведено тритурацію похідних з лактозою у співвідношенні 1:1000.

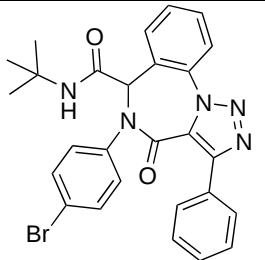
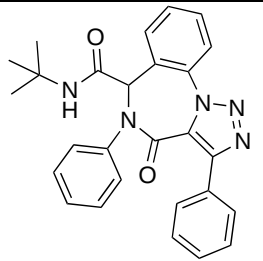
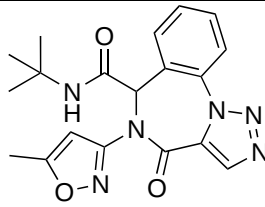
Дослідження токсичності та генотоксичності *in vitro* були проведені під керівництвом професора кафедри токсикології та броматології Grzegorz Nałęcz-Jawecki та професора кафедри органічної хімії Piotr Lulinski в рамках участі в програмі ERASMUS+ на базі Варшавського медичного університету (04.05.2022-31.07.2022).

Фармакологічні дослідження проводили на білих безпородних мишах та щурах, яких утримували в віварії Центральної науково-дослідної лабораторії Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету, в добре вентильованому приміщенні при звичному харчуванні, вільному доступі до їжі і води та забезпеченням відповідного для гризунів 12-годинного циклу. Експеримент проводили з дотриманням вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують в експерименті та інших наукових цілях», та дослідження схвалено комісією з біоетики НФаУ (протокол № 4 від 02.10.2020 та протокол №9 від 03.05.2023) [109, 110].

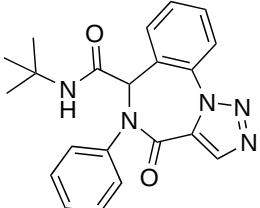
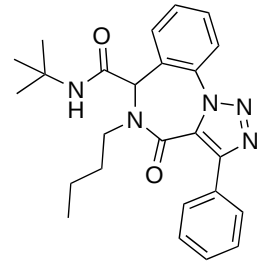
Технологію отримання нанониток, завантажених АФІ, шляхом ЕП, а також 3D-друку було опановано під керівництвом професорів Jutki Tarjo Heinämäki, Ain Raal, Кошового Олега Миколайовича та доцента Ivo Laidmäe на базі Тартуського університету, м. Тарту, Естонія в рамках програм ERASMUS+ (25.04.2023-06.05.2023, 04.09.2023-04.02.2024).

Таблиця 2.1

Хімічна характеристика похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів

Шифр похідного	Структурна формула	Брутто-формула	Молекулярна маса	Хімічна назва за номенклатурою ІЮПАК
1	2	3	4	5
МА-252		$C_{27}H_{24}BrN_5O_2$	502,95	5-(4-бромфеніл)-N-(<i>трет</i> -бутил)-4-оксо-3-феніл-5,6-дигідро-4Н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксамід
МА-253		$C_{27}H_{25}N_5O_2$	423,05	N-(<i>трет</i> -бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4Н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксамід
МА-254		$C_{19}H_{20}N_6O_3$	381,10	N-(<i>трет</i> -бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4Н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксамід

Продовж. табл.2.1

1	2	3	4	5
MA-255		$C_{21}H_{21}N_5O_2$	376,10	N-(<i>трет</i> -бутил)-4-оксо-5-феніл-5,6-дигідро-4Н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксамід
MA-261		$C_{25}H_{29}N_5O_2$	432,10	N-(<i>трет</i> -бутил)-5-бутил-4-оксо-3-феніл-5,6-дигідро-4Н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксамід

У дисертаційній роботі було використано низку препаратів порівняння:

1. Бензодіазепіновий анксіолітик гідазепам (Гідазепам ІС ®, таблетки 0,05 г, Інтерхім, Україна) у дозі 1 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) використовували як препарат-порівняння в тестах ПХЛ, темно-світлої камери, вертикальної сітки, ротарод-тесті, відкритого поля.

2. Іміпрамін («Меліпрамін®», таблетки 25 мг, ЗАТ Фармацевтичний завод ЕГІС, Угорщина) – застосовувався в/ш в дозі 25 мг/кг як референс-препарат за антидепресивною активністю в тесті плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст».

3. Диклофенак натрію («Вольтарен», Novartis Pharma AG, Швейцарія – таблетки 50 мг) на моделі гарячої пластини та оцтовокислих корчів в дозі 8 мг/кг в/ш.

4. Метамізол натрію («Анальгін-Здоров'я», таблетки 500 мг, ЗТ «Здоров'я», Україна) – застосовувався в/ш в дозі 50 мг/кг як препарат-порівняння за анальгетичною активністю на моделях оцтовокислих корчів та в тесті гарячої пластини.

5. Пірацетам («Пірацетам-Дарниця», Дарниця, Україна – таблетки 200 мг) у дозі 200 мг/кг в/ш у вигляді суспензії – при вивченні антигіпоксичної активності на моделі гострої нормобаричної гіперкапнічної гіпоксії.

У дослідженнях використано такі речовини-аналізатори:

1. Кофеїн-бензоат натрію («Кофеїн-бензоат натрію-Дарниця», Дарниця, Україна – розчин для ін'єкцій 100 мг/мл,) у дозі 20 мг/кг в/ш для визначення взаємодії зі сполуками стимулювальної дії в тесті відкритого поля.

2. Етанол (96 % розчин) – застосовувався в/о як 12,5 % розчин у дозі 5,5 г/кг для індукції наркозного сну.

При проведенні скринінгових досліджень тварин рандомним чином розподіляли на групи по 6 особин в кожній: контрольну, яка отримувала відповідний об'єм дистильованої води; дослідні групи, яким вводили водний розчин похідного триазолобензодіазепіну в дозах 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг та 1 мг/кг, а також групу-порівняння, тварини якої отримували гідазепам в дозі 1

мг/кг. Інтервал між введенням досліджуваного розчину та початком експерименту становив 1 годину для кожної миші. Поведінкові тести проводилися з 10:00 до 18:00, беручи до уваги хронофізіологічні аспекти поведінки тварин, у тихій кімнаті. Із урахуванням хронофармакологічного чинника всі експериментальні дослідження виконували одночасно з відповідним контролем.

Виходячи з мети і задач дисертаційної роботи, експериментальні дослідження були проведені в декілька етапів (рис. 2.1).

Експериментальні моделі, використані для досягнення мети та задач дисертаційного дослідження.

Для рецептор-орієнтованого гнучкого докінгу використовували пакет програм Autodock Vina. Підготовка лігандів проводилася за допомогою програми MGL Tools 1.5.6. Оптимізацію ліганду проводили за допомогою програми Avogadro. Вихідні формати даних про рецептор та ліганди конвертовано у спеціальний формат PDBQT у програмі Autodock 4.2. Як біологічна мішень для докінгу використано активний макромолекулярний центр (ділянка ($\alpha\gamma$) для зв'язування бензодіазепінів) рецептора ГАМК (PDB ID: 6HUP) з Protein Data Bank [111]. Карти рецепторів створено в програмах MGL Tools та AutoGrid. Молекули води, іони та ліганди були видалені з файлу PDB.

Встановлені наступні параметри докінгу, які були описані в попередніх дослідженнях [112]: крок поступального руху дорівнював 2 Å, коефіцієнт торсійної свободи 0,2983. Толерантність кластеру – 2 Å. Зовнішня енергія решітки - 1000, максимальна початкова енергія – 0, максимальне число спроб – 10 000. Кількість структур в популяції – 150, максимальне число етапів оцінки енергії – 2500000, максимальне число генерацій – 27 000, кількість структур, які переходять в наступну генерацію – 1, рівень генної мутації – 0,02, рівень кросовера – 0,8, спосіб кросовера – арифметичний. α -Параметр розподілу Гауса дорівнює 0, β -параметр розподілу Гауса – 1. Візуалізацію отриманих комплексів досліджуваних молекул в активному сайті рецептора проводили за допомогою програми Discovery Studio Visualizer.

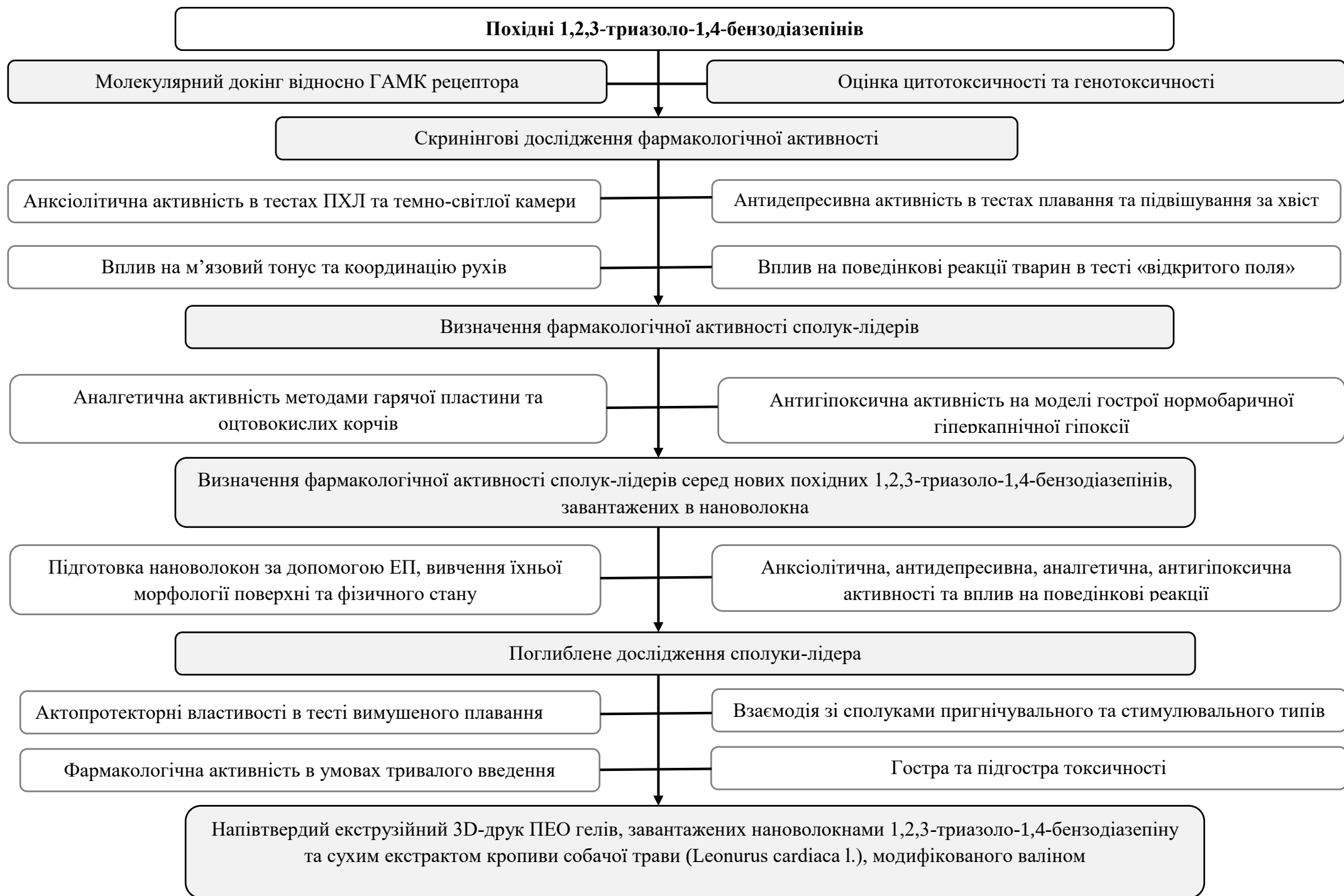


Рис. 2.1 Дизайн дослідження

Цитотоксичність. Підготовка досліджуваних розчинів. Попередньо нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів у зв'язку з практично нерозчинністю у воді розчиняли в 30% диметилсульфоксиді (ДМСО). Потім експериментальні розчини готували в PBS (фосфатно-сольовий буфер) через відносно високу чутливість клітин ссавців до змін осмолярності середовища [113].

Зразки опромінювали в симуляторі сонячного світла SUNTEST CPS + (Atlas) з ксеноновою лампою потужністю 1500 Вт і максимальним повітряним охолодженням. Лампа випромінювала світло в діапазоні довжин хвиль UV–Vis (300–800 нм), інтенсивність випромінювання становила 58 мВт/см². Зразки опромінювали в закупорених кварцових трубках.

MTT аналіз. МТТ-тест проводили на клітинах BALB/с 3Т3 для нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів у діапазоні концентрацій. Вимірювання життєздатності клітин у цьому аналізі ґрунтувалося на метаболічній активності клітин. Мітохондріальна сукцинатдегідрогеназа відновлювала водорозчинну сіль МТТ у життєздатних клітинах до фіолетового нерозчинного формазану, який можна було кількісно визначити колориметрично після розчинення в спирті. Клітини висівали в 96-лункові мікропланшети в поживне середовище Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM, з додаванням 10% телячої сироватки BCS, 100 МО/мл пеніциліну та 0,1 мг/мл стрептоміцину) та інкубували протягом 24 годин (5% CO₂, 37 °С, > 90% вологість). Потім кожний планшет досліджували під мікроскопом, щоб переконатися в зростанні клітин, які вони повинні утворити напівзлитий моношар. Згодом клітини обробляли досліджуваними похідними в різних концентраціях та інкубували ще протягом 24 годин. Після експозиції клітини промивали та обробляли середовищем, що містить МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід). Середовище, що містить барвник, видаляли через 2 години і замінювали ізопропанолом, який лізує та вивільняє формазан з клітин. Інтенсивність забарвлення, яка корелює з життєздатністю клітинної культури, оцінювали при 570 нм за допомогою

мікропланшетного спектрофотометра. PBS і Triton X-100 використовували як негативний і позитивний контролю відповідно.

Тест поглинання нейтрального червоного барвника. Тест ПНЧБ проводили на лінії клітин BALB/с 3Т3. Клітини BALB/с 3Т3, клон А31 ([ATCC] CCL-163, Manassas, VA, США) підтримували в інкубаторі при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5% CO₂. Клітини культивували з DMEM з додаванням 10,0% BCS і 1,0% розчину антибіотика, який містив пеніцилін і стрептоміцин.

Кількісну оцінку життєздатних клітин оцінювали на основі поглинання нейтрального червоного в порівнянні з негативним контролем. Клітини висівали та обробляли зразками, розведеними в середовищі обробки, як описано в тесті МТТ. Культуральне середовище замінювали досліджуваними зразками, змішаними з лікувальним середовищем протягом 24 год. Потім середовище обробки видаляли з пляшки; клітини промивали PBS і обробляли нейтральним червоним протягом 3 годин. Потім середовище було відібране; клітини знову промивали PBS і обробляли розчином десорбу, який складається з етанолу, розчину оцтової кислоти та води у співвідношенні 49:1:50. Кількість нейтрального червоного, що виділяється з клітин, оцінювали колориметрично при 540 нм. Як негативний і позитивний контролю використовували PBS і Triton X-100.

Цитотоксичність усіх зразків перевіряли в серії розведень 7 концентрацій. Діапазон досліджуваних концентрацій був від 0,78 мкМ/л до 50 мкМ/л для досліджуваних похідних відповідно. Крім того, зразки після фотодеградації були відібрані для дослідження в умовах ПНЧБ-тесту.

Зразки вважалися цитотоксичними, якщо вони знижували виживання клітин або метаболічну активність мітохондрій нижче 70%, порівняно з необробленими клітинами. Якщо життєздатність клітин BALB/с 3Т3 не знижувалася нижче 70% у всьому діапазоні перевірених розведень зразків, він вважався нецитотоксичним у цьому діапазоні концентрацій [114].

Уму-тест. *Salmonella typhimurium* (S. typhimurium) TA1535/pSK1002 було придбано у Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Und Zellkulturen GmbH, Німеччина. *Salmonella typhimurium* TA1535 модифікована та містить плазмиду pSK1002. Ця плазміда містить ген umuC, злитий з репортерним геном lacZ. Ген umuC індукується як частина бактеріальної відповіді SOS, коли відбувається генетичне пошкодження після впливу потенційно генотоксичних сполук. Злиття гена відповіді SOS-Umu з геном lacZ полегшує *Salmonella* генерувати β-галактозидазу, яка має здатність перетворювати орто-нітрофеніл-β-галактозид (ONPG) в орто-нітрофенол, що можна виявити за допомогою колориметричної зміни з субстрат ONPG (безбарвний) до 2-нітрофенолу (жовтий) [115, 116]. При дослідженні впливу нових похідних реєстрували фактор росту (G), активність β-галактозидази та коефіцієнт індукції (IR) [117]. Відносні одиниці були отримані при OD600 для фактора росту (G), OD600 і OD420 для активності β-галактозидази і OD420 для коефіцієнта індукції (IR). Критеріями якості для класифікації зразка як генотоксичного за порожнім і негативним контролем є $IR \geq 1,5$.

β-галактозидазну активність досліджуваної сполуки розраховували за формулою:

$$\text{од. } \beta\text{-галактозидази} = \text{OD420}_{\text{ЗРАЗОК/КОНТРОЛЬ}} / \text{OD600}_{\text{ЗРАЗОК/КОНТРОЛЬ}}, \quad (2.1)$$

де OD420 - поглинання при 420 нм вказує на інтенсивність ферментативної реакції;

OD600 – поглинання при 600 нм свідчить про ріст бактерій.

Вимірювання проводили за допомогою мікропланшетного спектрофотометра Asys UVM340 Hightech. Коефіцієнт індукції (IR) розраховували як активність β-галактозидази досліджуваної сполуки відносно негативного контролю:

$$IR = \text{од. } \beta\text{-галактозидази}_{\text{ЗРАЗОК}} / \text{од. } \beta\text{-галактозидази}_{\text{КОНТРОЛЬ}} \quad (2.2)$$

Ріст бактерій (G) оцінюють шляхом вимірювання оптичної щільності для визначення цитотоксичності досліджуваних зразків.

Антигенотоксичний потенціал оцінювали порівняно з генотоксичною дією двох відомих генотоксичних агентів 4-нітрохінолін оксиду (4-НХО) та 2-аміноантрацену (2-АА) за відсутності та присутності метаболічної активації з фракцією s9 печінки щурів відповідно [118].

Генотоксичність усіх зразків перевіряли в серії розведень 4 концентрацій. Діапазон досліджуваних концентрацій був від 6,25 мкМ/л до 50 мкМ/л для досліджуваних похідних відповідно.

Метод «піднесеного хрестоподібного лабіринту» є одним з найуживаніших тестів для визначення тривожної поведінки тварин [119]. Він базується на природньому страху відкритого простору та висоти у гризунів і прагненні до їхнього уникнення, а також на природній спонтанній дослідницькій поведінці в новому середовищі. Установка складається з 4 рукавів: 2 відкритих (моделюють потенційно небезпечний простір для тварини) та 2 закритих (забезпечують реалізацію ніркового рефлексу гризуна), які перетинаються під прямим кутом, в центрі формуючи область, котру можна вважати ще місцем прийняття рішення. Висота лабіринту становить близько метра від підлоги [120]. Кімната та установка освітлюються лампою 60 W. Через 5 хвилин у затемненій клітці тварину помістили в центр лабіринту головою до відкритого рукава [121]. Тестовий період тривав 3 хвилини. Реєстрували латентний період першого входу, тривалість перебування у відкритому рукаві, кількість переходів між рукавами лабіринту, кількість фекальних болюсів і сечовипускань.

Тест *«темно-світлої камери»* чутливий до застосування анксіолітиків та визначення їхньої протитривожної дії, часто використовується для валідації результатів, отриманих в тесті *«піднесеного хрестоподібного лабіринту»*. Прилад складається з темної камери та камери з яскравим освітленням [122]. Мишам дозволяли вільно пересуватися між двома камерами. Кількість входів у світлу камеру та тривалість перебування там вважаються показниками зменшення тривоги від знаходження на відкритому просторі у мишей.

Антидепресивну активність досліджували за допомогою поведінкового тесту «відчаю», призначеного для створення стресового стану у піддослідних тварин за тестом примусового плавання за Порсолт [123–125]. Мишей по одній поміщали у вузький циліндр діаметром 10 см і висотою близько 25 см, на 1/3 заповнений водою з температурою 20-24 °С, щоб тварина не торкалася дна задніми лапами або хвостом. За твариною спостерігали протягом 5 хвилин, протягом яких реєстрували такі поведінкові реакції, як латентний період першого зависання (більше 5 секунд), загальну тривалість іммобілізації (перебування в нерухомому стані), що трактується як прояв депресії [126]. Індекс депресії розраховували як відношення кількості епізодів іммобілізації до кількості періодів активного плавання [127]. Антидепресивну активність визначали за формулою:

$$АдА, \% = \frac{T_k - T_d}{T_k} \times 100 \% \quad (2.3)$$

де T_k – середнє значення тривалості іммобілізації тварин з контрольної групи;

T_d – середнє значення тривалості нерухомості дослідних тварин.

Тест *підвішування хвоста* є «сухим» аналогом тесту примусового плавання за Порсолт і як модель поведінки відчаю використовується для вивчення антидепресивної активності [125, 128]. Зазвичай для зниження ризику травмування тварин у тесті використовують мишей, які за масою тіла легші за щурів. Гризунів кріпили кінчиком хвоста до штатива за допомогою пластиру так, щоб відстань від поверхні столу до носа тварини становила близько 10 см [129]. Тривалість нерухомості характеризується нерухомим висінням тварини і латентний період першої нерухомості (проміжок часу від початку експерименту, коли тварина активно намагається втекти, до переходу в нерухоме положення) реєстрували протягом 5 хв. Крім того, підраховували кількість епізодів нерухомості. Збільшення загальної тривалості нерухомості та тривалості настання першого епізоду нерухомості свідчить про наявність антидепресивних властивостей досліджуваної сполуки [130, 131].

За допомогою *тесту «вертикальної сітки»*, що є одним з бліц-тестів для з'ясування наявності в сполук міорелаксуючих властивостей і здатності тварини витримувати статичні навантаження, проведено дослідження впливу нових похідних триазолобензодіазепінів на тонус скелетних м'язів у гризунів [132]. Тест заснований на спостереженні за тваринами, які при підсажуванні на металеву сітку, розміщену вертикально, здатні утримуватися на ній. Для цього тварину розміщували на металевому сітчастому екрані розміром 50 см х 20 см у горизонтальному положенні, потім переводили у вертикальному напрямку, тримаючи екран за край [133]. Реєстрували загальний час тримання на сітці та кількість дефекацій, що є проявом емоційної складової поведінкових реакцій гризуна.

Вивчення впливу досліджуваних сполук на м'язовий тонус та координацію рухів також проводили за допомогою *ротарод-тесту*. Даний тест запропонований Дунхам та Мією в 1957 році та вважається легким в використанні при вивченні наявності міорелаксантих якостей нових сполук, забезпечує швидку та просту першу оцінку їхнього впливу на поведінку тварин, нервово-м'язову координацію [134, 135]. Час, проведений на приладі, часто використовується як індекс атаксії або седації [136]. Прилад складається з дерев'яного стрижня діаметром 2 см завдовжки 75 см, розділеного на 6 окремих секцій пластиковими дисками та піднесеного над поверхнею столу на висоту 50 см з метою запобігання зістрибування тварин. Електромотор, вал якого кріпиться безпосередньо до стрижня, забезпечує його обертання з постійною швидкістю 10 обертів на хвилину. Критерієм оцінки впливу досліджуваних речовин на м'язовий тонус та координацію рухів обрано час утримання тварин на стрижні та кількість мишей, що за певні проміжки часу (до 1 хв, 2 хв, 3 хв, 4 хв) впали з нього.

Поведінкові реакції дослідних тварин оцінювали в тесті *«відкритого поля»* [137, 138]. «Відкрите поле» є білою квадратною платформою на ніжках розміром 20×20 см з бортами висотою 14 см, підлога якої поділена на 16 однакових квадратів (4×4) із отворами діаметром 2 см у центрі кожного

квадрата [139]. Тварину розміщували в центр поля та спостерігали протягом 3 хвилин. Реєстрували такі показники: кількість перетнутих квадратів, вертикальних стійок, заглядань у нірки, актів дефекацій, уринацій та вмивань [137, 140]. Тестовий апарат протирали 96 % етанолом, щоб запобігти будь-яким запахам попередньої тварини перед тестуванням наступної.

Для визначення впливу сполук на центральний механізм больової чутливості використовували тест «гаряча пластина» на приладі Hot/Cold Plate (Bioseb, США). Тварин поміщали на електронагрівальну поверхню приладу за температури +55 °C [141]. Реєстрували латентний період прояву поведінкової відповіді на ноцицептивну стимуляцію від моменту розміщення тварини на гарячій поверхні до облизування задньої лапи через 30 хв, 1, 2, 3 та 4 години від початку експерименту. Максимальний час утримання тварини прийняли за 30 с, у випадку відсутності реакції мишу виключали з дослідження, щоб уникнути опіку [142]. Гарячу пластину очищали 20 % етанолом після кожної миші [72, 143, 144]

Тест оцтовокислих корчів. Тест на звуження живота, викликане оцтовою кислотою, використовувався для оцінки антиноцицептивного потенціалу [145]. Мишам вводили похідні триазолобензодіазепіну внутрішньошлунково за 60 хвилин до введення флогогену (0,67% оцтова кислота; внутрішньоочеревинно) [146]. Загальну кількість «корчей», які виникають у відповідь на введення хімічного подразнюючого агента, підраховували протягом 15 хвилин [145]. Антиноцицептивну активність розраховували як відсоток інгібування скорочення черевних м'язів за формулою:

$$AA, \% = \frac{K_k - K_d}{K_k} \times 100 \% \quad (2.4)$$

де K_k – середня кількість корчів у тварин з контрольної групи;

K_d – середня кількість корчів у дослідних тварин.

Нормобарична гіпоксія з гіперкапнією. Антигіпоксичну активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів вивчали на моделі НГГГ. Мишей

по одній вміщували в гермокамеру об'ємом 200 см³ та герметично закривали. Реєстрували тривалість життя тварини до останнього агонального дихального руху [147, 148].

Створення нановолокон за допомогою електропрядіння, їхня характеристика [149]. ГПМЦ клас 60SH (Shin-Etsu Chemical, Токіо, Японія) використовувалася як полімер-носіє при створенні багатошарових нановолокнистих матів із завантаженням ліків у процесі ЕП. Водний розчин ГПМЦ готували шляхом спочатку диспергування порошку ГПМЦ в очищеній воді, а потім лишали його розчинятися протягом ночі за допомогою магнітної мішалки. Наступного дня додавали ацетон (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) для отримання 2% (мас./мас.) розчину ГПМЦ. Об'ємне співвідношення води до ацетону становило 6/4.

Для приготування розчину для ЕП АФІ (МА-252, МА-253 або МА-254) спочатку розчиняли в ацетоні в концентрації 5,47% (мас.), 4,75% (мас.) і 5,30% (мас.), відповідно. Дані розчини змішували протягом ночі в магнітній мішалці для забезпечення повного розчинення АФІ. Згодом розчин ГПМЦ, описаний вище, додавали до суміші для приготування остаточного розчину для ЕП. Кількість АФІ в розчинах ЕП становила 19,8% (мас./мас.) (МА-252), 17,5% (мас./мас.) (МА-253) і 18,5% (мас./мас.) (МА-254) на основі сухої ваги твердого матеріалу. Усі три розчини змішували щонайменше 30 хвилин за допомогою магнітної мішалки перед ЕП.

Для ЕП нановолокон використовували роботизовану систему ES ESR200RD (NanoNC, Сеул, Республіка Корея). Два набори по 10 мл (всього 20 мл) розчину завантажували в пластиковий шприц з тупою металевою голкою (21G), яка була безпосередньо підключена до високовольного (HV) електрода. Ключові параметри ЕП: висока напруга (ВН), відстань від наконечника до колектора (ВНК) і швидкість потоку (ШП) - були підібрані для кожного розчину окремо для створення стабільного конуса Тейлора (табл. 2.2) [150]. Нановолокна збирали на стаціонарний роликотворчий колектор (діаметром

90 мм, шириною 200 мм), покритий алюмінієвою фольгою. Усі експерименти проводили при кімнатній температурі та вологості.

Зображення емісійної скануючої електронної мікроскопії Hitachi S-4800 (Hitachi High-Technologies Corporation, Токіо, Японія) з п'ятьма різними збільшеннями (45 000 ×, 30 000 ×, 20 000 ×, 10 000 × і 4 000 ×)) використовували для дослідження розміру та морфології волокна. Діаметр нановолокон визначали за допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень ImageJ (версія 1.53k, National Institutes of Health, США, <https://imagej.nih.gov/ij/>) після просторового калібрування з використанням шкали масштабу кожного зображення. На кожному зображенні нановолокна вибирали випадковим чином і вимірювали шляхом вручну малювання ліній на кожному волокні.

Таблиця 2.2

**Параметри процесу, що використовуються для ЕП нановолокон,
завантажених АФІ (МА-252, МА-253, МА-254) і полімерним носієм
(ГПМЦ)**

Параметр ЕП	Незавантажена ГПМЦ	МА-252	МА-253	МА-254
Напруга (кВ)	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,1	18,3 ± 0,1	18,0 ± 0,1
Відстань від наконечника до колектора (ВНК) (см)	13,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0	17,0 ± 1,0	17,0 ± 1,0
Електричне поле (кВ/см)	1,54 ± 0,11	1,54 ± 0,11	1,08 ± 0,064	1,06 ± 0,063
Швидкість потoku (мл/г)	1,0 - 2,5	2,2	1,0 - 2,5	1,0

Рентгеноструктурний аналіз проводили на дифрактометрі Bruker D8 Advance (Bruker, Billerica MA., США) з випромінюванням CuKα та детектором LynxEye 1D (Bruker, Billerica MA., США). Для аналізу даних використовували

програмний пакет Bruker DIFFRAC.EVA та базу даних ICDD PDF-4+ версія 2023. Ступінь кристалічності розраховували за допомогою програмного забезпечення Topas 6 (Bruker, Billerica MA., США).

Фізико-хімічну структуру нановолокон і порошку ГПМЦ досліджували за допомогою інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є з ослабленим повним відображенням з використанням спектрофотометра IR Prestige-21 (Shimadzu Corp., Кіото, Японія) і Specac Golden Gate Single Reflection ATR crystal (Specac Ltd., Orpington, UK). Спектри були зібрані в діапазоні від 600 до 4000 cm^{-1} , і кожен спектр був середнім для 60 сканувань. Кристал ATR очищали етанолом, а між зразками проводили калібрувальне сканування. Спектри збирали за допомогою програмного забезпечення Shimadzu IRsolutions 1.5 (Shimadzu Corp., Кіото, Японія) та аналізували за допомогою MATLAB® (випуск: R2022b, версія: [9.13.0.2166757], MathWorks, Inf. MA, США).

Підготовка нановолокон з АФІ в формі олеогелю та тритурації з лактозою. Для приготування олеогелів нановолокна, отримані в процесі ЕП, завантажені похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, спочатку обережно знімали з алюмінієвої фольги. Олеогелі 2% готували з використанням соняшникової олії (B. Schell GmbH, Ліхтенау, Німеччина) з таким же об'ємом емульгатора SMO 20 (Cognis France, Мо Седекс, Франція). Нарешті, олеогелі гомогенізували (двічі) за допомогою вібраційного млина Retsch MM 400 (Retsch GmbH, Наан, Німеччина) з частотою 30/сек протягом 5 хв.

Для приготування сухих тритурацій нановолокон і лактози з лікарським засобом спочатку обережно видаляли нановолокна з алюмінієвої фольги, а потім змішували з моногідратом лактози (Fisher Scientific, Лафборо, Великобританія) у співвідношенні 1:100. Вібраційний млин Retsch MM 400 використовували для змішування (двічі) з частотою 30/с протягом 5 хв.

Етаноловий наркоз використовували для оцінки взаємодії похідного із речовинами пригнічувального типу дії. Мишам вводили 12,5 % (об./об.) розчин етанолу в/о (5,5 г абсолютного спирту на 1 кг маси тварини) та

реєстрували час наркозної фази з моменту прийняття тваринами бічного положення до пробудження [151].

Взаємодію сполуки-лідера зі сполуками стимулювального типу дії вивчали у *тесті відкритого поля на тлі кофеїну*, який вводили в/о у дозі 50 мг/кг через 60 хв після введення досліджуваного похідного [152].

Гостра токсичність. Гостру токсичність вивчали на безпородних білих мишах. Розчин досліджуваного похідного вводили внутрішньошлунково в дозі 2500 мг/кг (в інтервалі доз, характерного для IV класу токсичності за класифікацією Hodge та Sterner) [153]. Тварин розміщували у клітки по одній, та протягом 14 днів спостерігали за їхньою поведінкою та зовнішнім виглядом [154].

Вплив тривалого введення похідного. Щурів розділили на групи: інтактні та дослідні, що отримували похідне триазолобензодіазепіну, для кожної статті окремо, по 6 тварин у кожній. Введення здійснювали щодня протягом 28 днів та спостерігали за загальним фізичним станом гризунів, а також зважували на 1й, 8й, 15й, 22-й та 29й. Оцінку поведінкових реакцій в тесті ПХЛ, відкритого поля та примусового плавання з навантаженням здійснювали на 1й, 14й та 28й день від початку введення досліджуваної сполуки [155].

Вплив на фізичну витривалість щурів оцінювали в тесті плавання з навантаженням. Через 60 хв після введення похідного на корінь хвоста прикріплювали вантаж, що становив 10 % від маси тварини [143]. Гризуна поміщали в басейн з водою температури 24°C та реєстрували час плавання до моменту, доки тварина не могла самостійно випірнути з води протягом 10 с [156].

В останній день експерименту тварин піддавали евтаназії під ефірним наркозом згідно етичних норм поводження з тваринами та проводили подальші дослідження на встановлення впливу на стан внутрішніх органів гризунів. Вивчення біохімічних показників функціонального стану печінки та нирок проводили згідно інструкцій до кожного набору окремо [157].

Для комплексного патоморфологічного дослідження були вилучені печінка, головний мозок та нирки щурів. Після макроскопічного аналізу із органометрією внутрішні органи для фіксації були поміщені на 4 доби у 10% розчин забуференого нейтрального формаліну. Фіксований матеріал для дослідження заливали у парафінові блоки та робили фронтальні гістологічні зрізи товщиною 4-5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та еозином. Комплекс морфологічних досліджень проводили на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина) із використанням камери AxioCam (ERc 5s) (Carl Zeiss, Німеччина) для отримання цифрових знімків. При цьому за рекомендаціями [158] з кожного досліджуваного органа в кожній тварини виготовляли мінімум по 9 зрізів, на кожному з яких вивчали гістологічні зміни не менше, ніж у 5 полях зору при збільшенні $\times 10$ та не менше у 10 полях зору при збільшенні на $\times 40$. Особливості гістоструктури представляли в описовому вигляді.

Для об'єктивізації результатів дослідження користувалися морфометричним методом: в препаратах печінки, що були забарвлені гематоксиліном та еозином, із застосуванням відеомікроскопічної морфометрії за допомогою камери AxioCam (ERc 5s) (Carl Zeiss, Німеччина), вимірювали об'єм та площу ядра, цитоплазми та гепатоцита, обчислювали ядерно-цитоплазматичний індекс (ЯЦІ) та підраховували щільність розташування гепатоцитів в 1 м^2 (ЩРГ/м²). В мікропрепаратах нирок обчислювали середній діаметр капілярів клубочка, середній діаметр капсули нефрона, середній діаметр клубочка нефрона.

У програмі MedCalc 22.029 було побудовано первинні обчислювальні таблиці, в тому ж програмному забезпеченні були проведені власне розрахунки. Вибірки оцінювали на відповідність нормальності розподілу за критеріями Колмогорова-Смірнова і в разі нормального розподілу використовували методи параметричної статистики. Якщо група не відповідала критеріям нормальності варіантного розподілу, використовували непараметричні статистичні методи.

Напівтвердий екструзійний 3D друк.

Модифікація сухого екстракту кропиви собачої трави (Leonurus cardiaca L.) з валіном. Сухий екстракт отримували з настойки пустирника (партія UA/6543/01/01, ПрАТ «Фармацевтична фабрика «ВІОЛА», м. Запоріжжя, Україна). До 270 мл настойки додавали валін (540,0 мг) у потрібній еквімолярній кількості по відношенню до кількості фенольних сполук [159]. Розчин витримували протягом ночі при кімнатній температурі для отримання комплексів фенольних сполук з амінокислотою, після чого упарювали у вакуум-випарнику до сухого екстракту.

Приготування водних поліетиленоксидних гелів. Для приготування водних ПЕО-гелів, наповнених модифікованим валіном екстрактом кропиви собачої трави та нановолокнами, завантаженими 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіном (далі НПВ), були використані емульгатор СМО-20 (поліетиленгліколь 40 – гідрогенізована касторова олія, полісорбат 80) (LOT S721580003, Cognis, Франція), ПЕО (молекулярна маса прибіл. 900 000, Sigma-Aldrich, США), етанол (Peenviinavabrik, Естонія) і вода.

В якості напівтвердої платформи для напівтвердого екструзійного 3D-друку комбінації нановолокон і модифікованого екстракту було взято водний ПЕО гель (12%). Для приготування водних ПЕО-гелів ПЕО (1,2 г) розчиняли в дистильованій воді (об'єм 10 мл мінус об'єм етанолу для розчинення НПВ). Потім до розчину ПЕО додавали етанольну суміш НПВ (0,5 г, 1,0 г або 1,5 г НПВ, розчиненого в 1 мл етанолу) та емульгину (у співвідношенні емульгін-ПЕО 1:2). Суміш гомогенізували, а потім витримували при кімнатній температурі принаймні протягом 13-15 годин для утворення в'язкого гелю [160, 161].

Характеристика водних ПЕО гелів. В'язкість гелів визначали за допомогою реометра Physica MCR 101 (Anton Paar, Австрія) з використанням конусної тарілки за кімнатної температури (22 ± 2 °C). Вимірювання в'язкості проводили за допомогою випробування на обертальний зсув при швидкості зсуву 0,060 л/с. Структуру гелю та ступінь гомогенізації оцінювали за допомогою оптичної світлової мікроскопії (Magtex-T Dual Illum., Medline

Scientific, Сполучене Королівство), оснащеної цифровою камерою (Industrial Digital Camera UCMOS09000KPB (9,0 MP 1 / 2,4" ARTNA CMOS сенсор).

3D друк завантажених НПВ водних ПЕО гелів. ПЕО-гелі, завантажені НПВ, друкували за допомогою настільної системи 3D друку (System 30 M, Hyrel 3D, США). Друкуюча головка складається зі сталевго шприца з поршнем, з'єднаним із кроковим двигуном, де рух двигуна піднімає або опускає поршень, полегшуючи дозування вмісту зі шприца. Друкуючим соплом є тупа голка (калібр, 21G), з'єднана зі шприцом. Варто зазначити, що друкуюча головка, включаючи шприц і сопло, залишається ненагрітою. Під час процесу 3D-друку друкуюча головка рухається із заданою швидкістю вздовж осі X-Y (що називається швидкістю друку) і видавлює матеріал для друку через систему сопел із заданою швидкістю (що називається швидкістю екструзії) на друковану форму. Температура друкарської форми підтримується на рівні 30°C. Після друку кожного шару друкарська форма опускалася на задану відстань, відому як висота шару. Цей процес дозволив друкуючій голівці створити інший шар матеріалу поверх попередньо надрукованого об'єкта. Програмне забезпечення 3D-принтера (Repetrel, Rev3.083_K, Hyrel 3D, США) взяло на себе відповідальність за регулювання температури друкуючої головки та пластини, швидкості руху друкуючої головки, швидкості екструзії гелю та інших відповідних параметрів. Друкуюча головка працювала зі швидкістю 0,5 мм/с. Модельні решітки включали загалом вісім (8) друкованих шарів, тоді як препарати дисків круглої форми були структуровані загалом із п'яти (5) шарів [162].

Для перевірки якості 3D-друку була використана модель решітки 4×4 [161]. Тривимірна решітка квадратної форми мала розміри 30 x 30 x 0,5 мм. Оцінка можливості 3D-друку спиралася на вимірювання ваги та площі надрукованої решітки. Було проведено порівняння між теоретичною площею поверхні тривимірної решітки квадратної форми (324 мм²) і відповідними площами експериментально надрукованих на 3D-принтері решіток [161, 163]. Препарування диска круглої форми (діаметром 20 мм) було розроблено за

допомогою програмного забезпечення FreeCAD (версія 0.19 / дата випуску 2021).

3D-друковані решітки на основі ПЕО-гелю та препарати круглої форми зважували за допомогою аналітичних ваг (Scaltec SBC 33, Scaltec, Німеччина) і фотографували. Аналіз зображень проводився на фотографіях за допомогою програмного забезпечення ImageJ (версія 1.51k) від Національного інституту охорони здоров'я, США. Для 3D-друкованих решіток експериментальне значення площі поверхні порівнювали з відповідним теоретичним значенням розробленої решітки. Характеристики поверхні надрукованих на 3D-принтері препаратів дисків круглої форми досліджували за допомогою оптичної світлової мікроскопії (Magtex-T Dual Illum., Medline Scientific, Сполучене Королівство), оснащеної цифровою камерою (промислова цифрова камера UCMOS09000KPB, 9,0 МП 1 / 2,4 дюйма), датчик ARTINA CMOS).

Визначення флавоноїдів. Для кількісного визначення вмісту флавоноїдів в екстракті та його 3D-друкованих лікарських формах у перерахунку на сухий залишок та гіперозид використовували спектрофотометричний метод згідно з монографією «Настойка кропиви собачої» Державної фармакопеї України [164]. Оптичну густину розчинів вимірювали спектрофотометром Specol 1500 (Thermo Fisher Scientific, Базель, Швейцарія). Загальний вміст флавоноїдів визначали в перерахунку на гіперозид (при довжині хвилі 425 нм) після утворення комплексу з алюміній хлоридом [165].

Статистичну обробку результатів виконано із використанням пакету програм STATISTICA 12.0 із розрахунком середнього значення, стандартної похибки середнього, медіани, інтерквартильного розмаху [25%, 75%], довірчого інтервалу (p). Для з'ясування міжгрупових відмінностей у випадку нормального розподілу даних використовували t-критерій Стьюдента, за відсутності нормального розподілу використовували U-критерій Манна-Вітні. Статистично значущими вважали зміни при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

СКРИНІНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК IN VITRO ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4-БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ

3.1 Молекулярний докінг нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора

Молекулярний докінг дозволяє скоротити витрати коштів і часу за рахунок проведення процедури, аналогічної до високопродуктивного біологічного скринінгу. Дослідження проведено методом молекулярного докінгу як комп'ютерного підходу до пошуку молекул з афінитетом до визначеної біомішені. Досліджувані молекули **1-5** містять асиметричний атом Карбону з заміщенням в 6-положенні 1,4-бензодіазепінового каркасу, тому можуть існувати у вигляді двох енантіомерів, R і S (рис. 3.1). На етапі 3D оптимізації тестованих структур були створені відповідні конформації енантіомерів **1-5R** та **1-5S**.

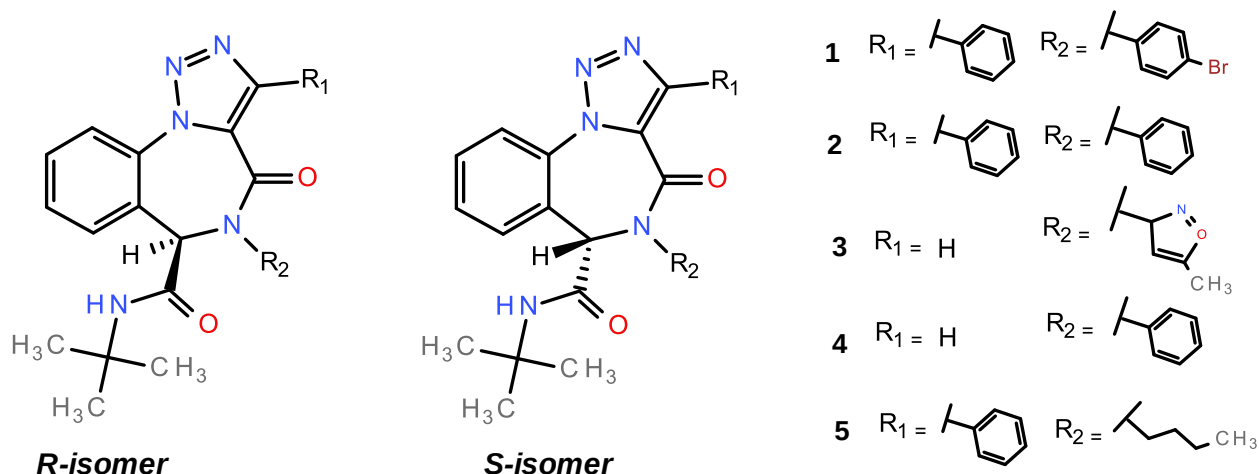


Рис. 3.1 R та S структури досліджуваних похідних

Для проведення молекулярного докінгу як біомішень нами обрана кристалографічна модель, яка має код PDB ID: 6HUP в базі даних Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org) (Рис. 3.2) [166]. Слід зазначити, що бензодіазепіновий сайт (між субодиницями α і γ) є загально відомою і добре задокументованою в науковій літературі ділянкою зв'язування відомих бензодіазепінів, тому процедуру стиковки проведено нами саме в цю ділянку рецептора ГАМК.

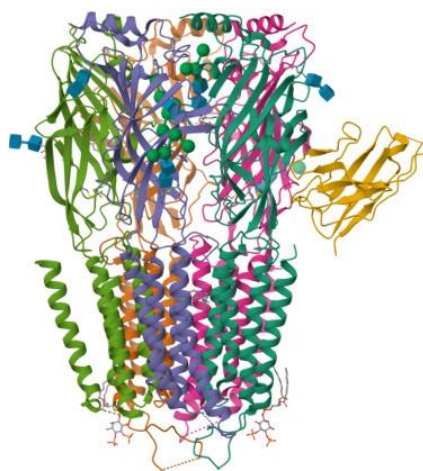


Рис. 3.2 Кристалографічна модель рецептора ГАМК PDB ID: 6HUP (спів кристалізована з діазепамом)

Як препарат порівняння нами був обраний діазепам, враховуючи, що в обраній нами кристалографічній моделі (PDB ID: 6HUP) саме він є співкристалізованою сполукою.

Окрім референс-препарату діазепаму, процедуру молекулярного докінгу нами було проведено для гідазепаму, враховуючи, що він обраний як препарат порівняння для фармакологічних досліджень. Визначали скорингову функцію, яка вказує ентальпійну складову у величину вільної енергії зв'язування (Affinity DG) для найкращих конформаційних положень тестованих сполук в бензодіазепіновому сайті ГАМК рецептора, а також величину вільної енергії зв'язування та константи зв'язування (EDoc kcal/mol і Ki μ M) для певних

конфірмаційних положень тестованих сполук. Ці значення дають змогу встановити ступінь спорідненості між тестованими молекулами та бензодіазепіновим сайтом ГАМК рецептора, а також оцінити стійкість утворених комплексів. Для порівняльної оцінки, окрім молекул нових сполук бензодіазепінової структури **1-5** (R та S енантіомери), нами були розраховані скорингові функції, енергії та константи зв'язування для діазепаму та гідазепаму (табл. 3.1). Одержані в результаті стиковки оціночні значення (скорингова функція, вільна енергія та константа зв'язування) діазепаму та гідазепаму були використані нами як стандартні.

Таблиця 3.1

Оціночні значення докінгу досліджуваних похідних в бензодіазепіновому сайті ГАМК рецептора

Молекула	Скорингова функція, ккал/моль	Вільна енергія зв'язування, ккал/моль	Константа зв'язування, μM
1-R	-8,0	-6,32	23,33
1-S	-9,0	-6,94	8,17
2-R	-7,6	-5,52	90,44
2- S	-10,1	-6,59	14,82
3-R	-7,4	-5,02	208,92
3- S	-8,6	-7,46	3,39
4-R	-7,7	-5,11	178,73
4- S	-7,6	-6,98	7,59
5-R	-6,8	-3,97	1220
5- S	-8,9	-6,40	20,49
Діазепам	-9,9	-7,00	7,40
Гідазепам	-8,9	-6,72	11,84

Згідно оціночних значень докінгу (табл. 3.1) серед тестованих R та S енантіомерів нових бензодіазепінів **1-5** найкращі (найнижчі) значення мали саме S-енантіомери. Серед них молекула **2-S** перевищувала абсолютне значення скорингової функції діазепаму і гідазепаму, хоча незначно поступалася їм за показниками вільної енергії та константами зв'язування. Проте було виявлено, що молекула **3-S** з помірним афінітетом, мала значення константи зв'язування в 2 і 3 рази кращі в порівнянні з діазепамом і гідазепамом відповідно. Значення константи зв'язування сполуки **4-S** краще в 1,5 рази за значення для гідазепаму. На рівні гідазепаму за скоринговою функцією були молекули **1-S і 5-S**, хоча мали не корелятивні значення ED₀₅ і K_i в порівнянні з референтними показниками.

Програмний пакет Autodock 4.2. передбачає проведення гнучкого рецепторно-орієнтованого молекулярного докінгу, який створює віртуальні умови, що дають змогу максимально наблизити утворення комплексу між досліджуваною молекулою та рецептором до умов, що існують у біологічних системах. В результаті проведення гнучкого докінгу референс-препаратів відносно обраної мішені і візуалізації утворених комплексів нами встановлено, що вони займають ділянку зв'язування бензодіазепінів на $\alpha 1/\gamma 2$ інтерфейсі, де утворюють цілий комплекс взаємодій з амінокислотними залишками сайту (рис. 3.3), що добре узгоджується з результатами кристалографічних досліджень [166].

Для оцінки типів зв'язування нових молекул відносно бензодіазепінового сайту нами було проведено детальний аналіз геометричного розташування енергетично вигідних позицій та проаналізовані всі утворені комплекси з досліджуваною мішенню.

Результати візуалізації свідчать, що усі R-енантіомери тестованих молекул **1-5** мають дещо інший режим зв'язування порівняно з класичними бензодіазепінами. Вони займають ділянку нижче від дна кишені, яка має обмеження залишком амінокислоти Asp60 ділянки $\gamma 2$, натомість взаємодії виникають з амінокислотним залишком Ser195 $\gamma 2$. Крім того, відбувається

занурення вглиб інтерфейсу $\alpha 1$ шляхом взаємодії з залишком Lys156, при чому частина амінокислотних залишків сайту залишається не змінною в порівнянні з класичним режимом зв'язування бензодіазепінів.

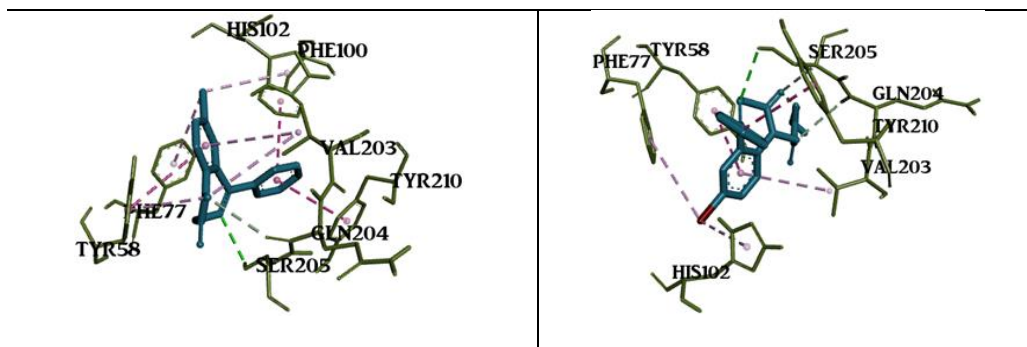
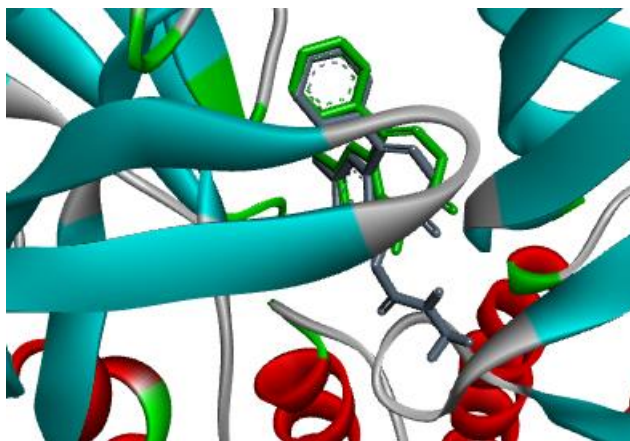


Рис. 3.3 Суперпозиції референс-препаратів (верхня панель) в канонічному сайті зв'язування бензодіазепінів на $\alpha 1/\gamma 2$ інтерфейсі: діазепам – зелений колір, гідазепам – синій колір. *Режими зв'язування зліва - діазепам, справа - гідазепам.*

Очікуваним результатом також є те, що сполуки **1-R**, **2-R** і **5-R** з фенільними радикалами в 1,2,3-триазольному фрагменті і з замісниками в 5 положенні бензодіазепінового каркасу мали однакові суперпозиції в сайті зв'язування (рис. 3.4). Специфічність зв'язування через амінокислотні залишки Ser195 та Lys156 підтверджується водневим зв'язком з атомом Нітрогену 1,2,3-триазольного фрагменту та π -катіонної взаємодії з 1,2,3-триазольним циклом, відповідно (рис. 3.4). Слід зауважити, що виникнення під час стиковки несприятливого зв'язку акцептор-акцептор молекули **2-R** може

негативно вплинути на прояв активності, що пояснюється силами відштовхування між бензодіазепіновим каркасом молекули та залишком Asn60 γ 2.

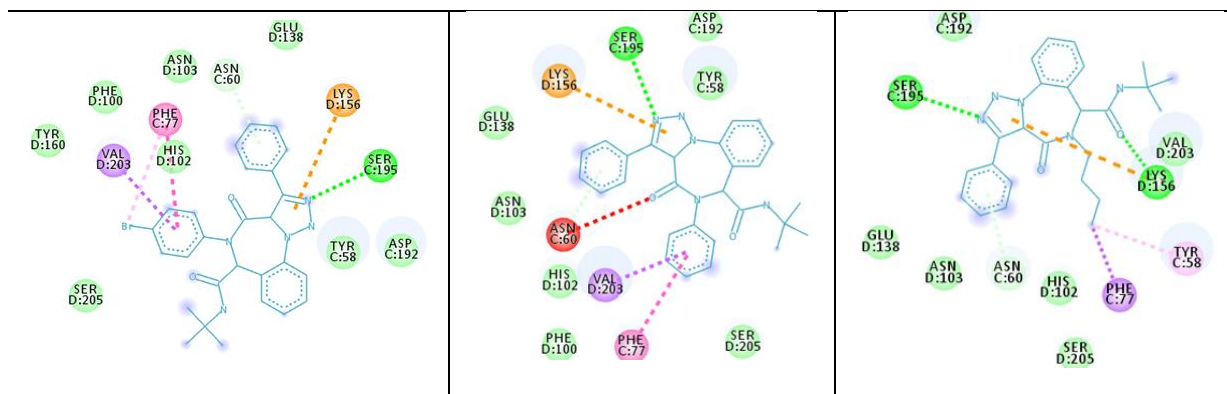
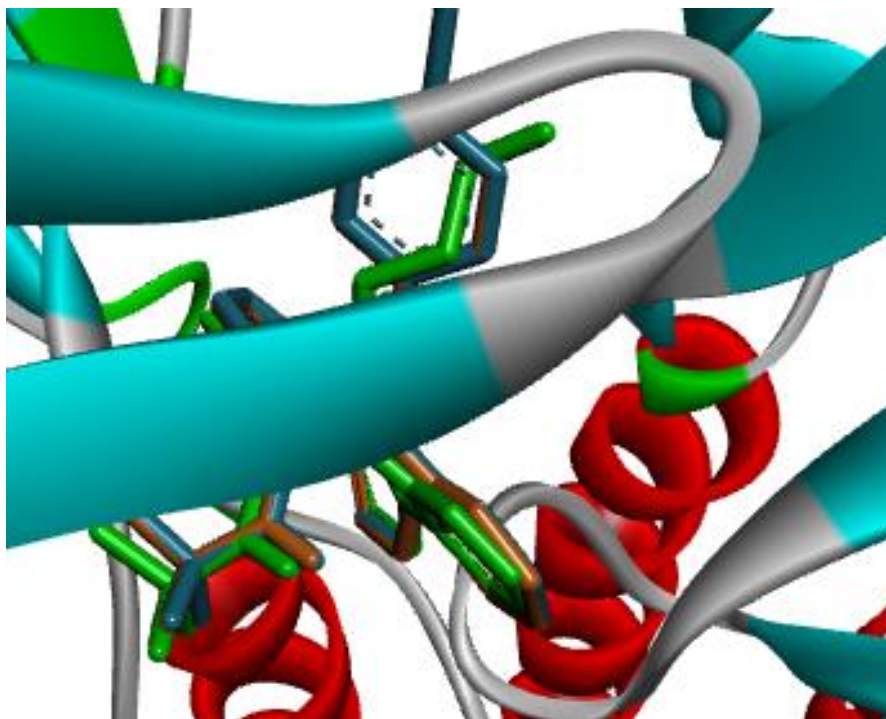


Рис. 3.4 Суперпозиції (верхня панель) молекул 1-R (синя), 2-R (оранжева) і 5-R (зелена)); діаграми міжмолекулярних взаємодій (нижня панель) молекул 1-R (зліва), 2-R (по центру) і 5-R (справа) в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора. Візуалізація зв'язків показана пунктирними лініями відповідного кольору: сили Вандер Ваальса – світло-зелений, водневі зв'язки – зелений, π -катіонна взаємодія – оранжевий, зв'язок акцептор-акцептор – червоний, π - σ зв'язок – бузковий, π - π взаємодія – фіолетовий, π -Alk взаємодія – рожевий.

Не заміщена в 5 положенні 1,2,3-триазольного циклу тестована молекула **4-R**, мала енергетично вигідну позицію в межах дна кишені зі зміщенням вглиб інтерфейсу $\alpha 1$. На відміну від неї, аналогічна за структурою молекула **3-R**, має характерні взаємодії з залишками амінокислот Ser195 та Lys156 (рис. 3.5).

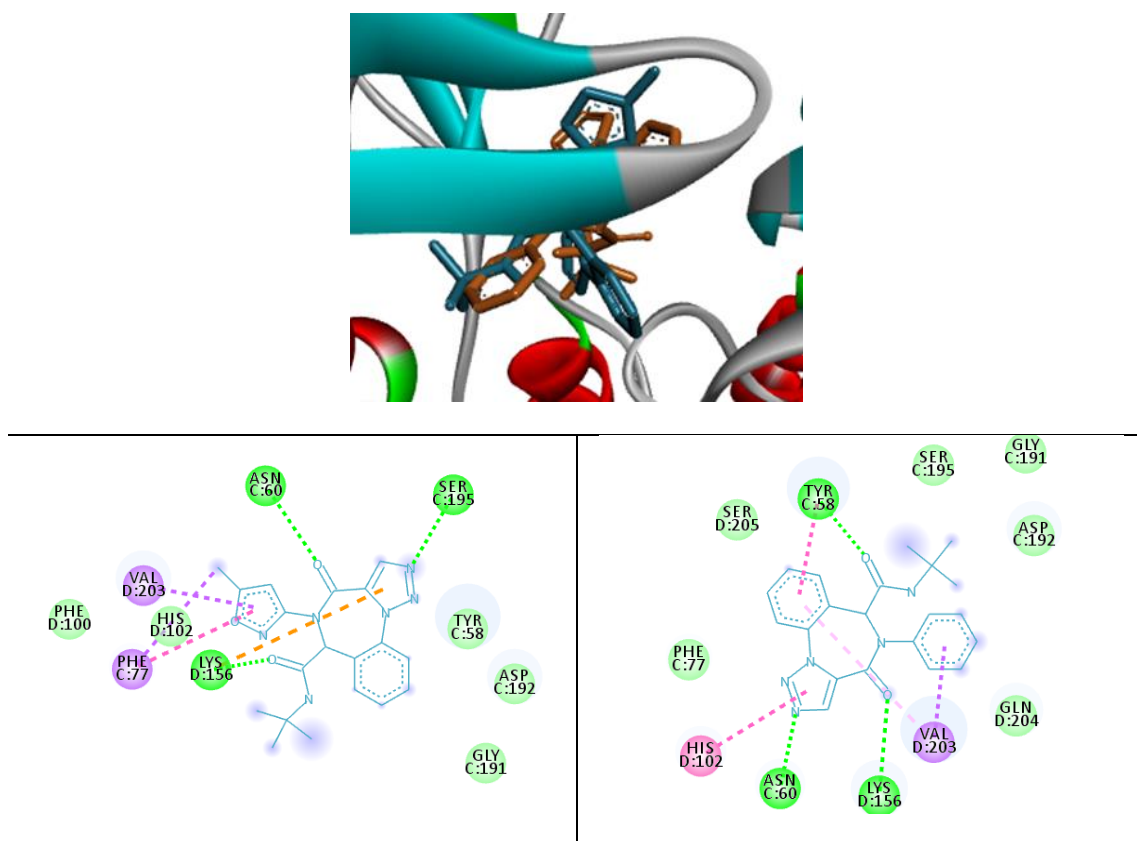


Рис. 3.5 Суперпозиції (верхня панель) молекул **3-R** (синя), **4-R** (оранжева); діаграми міжмолекулярних взаємодій (нижня панель) молекул **3-R** (зліва), і **4-R** (справа) в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора. Візуалізація зв'язків показана пунктирними лініями відповідного кольору: сили *Вандер Ваальса* – світло-зелений, водневі зв'язки – зелений, π -катіонна взаємодія – оранжевий, π - σ зв'язок – бузковий, π - π взаємодія – фіолетовий, π -Alk взаємодія – рожевий.

Детальний аналіз локації S-енантіомерів, які за обчисленими значеннями скорингової функції, вільної енергії та константи зв'язування (табл. 3.1) матимуть кращий афінитет відносно досліджуваної мішені, показав, що найкращі енергетично вигідні позиції цих ізомерів знаходяться в межах

зв'язування класичних бензодіазепінів (Рис. 3.6). Вийняток є молекула **1-S**, яка утворювала комплекс з сайтом подібним до сайту зв'язування R-енантіомерів.

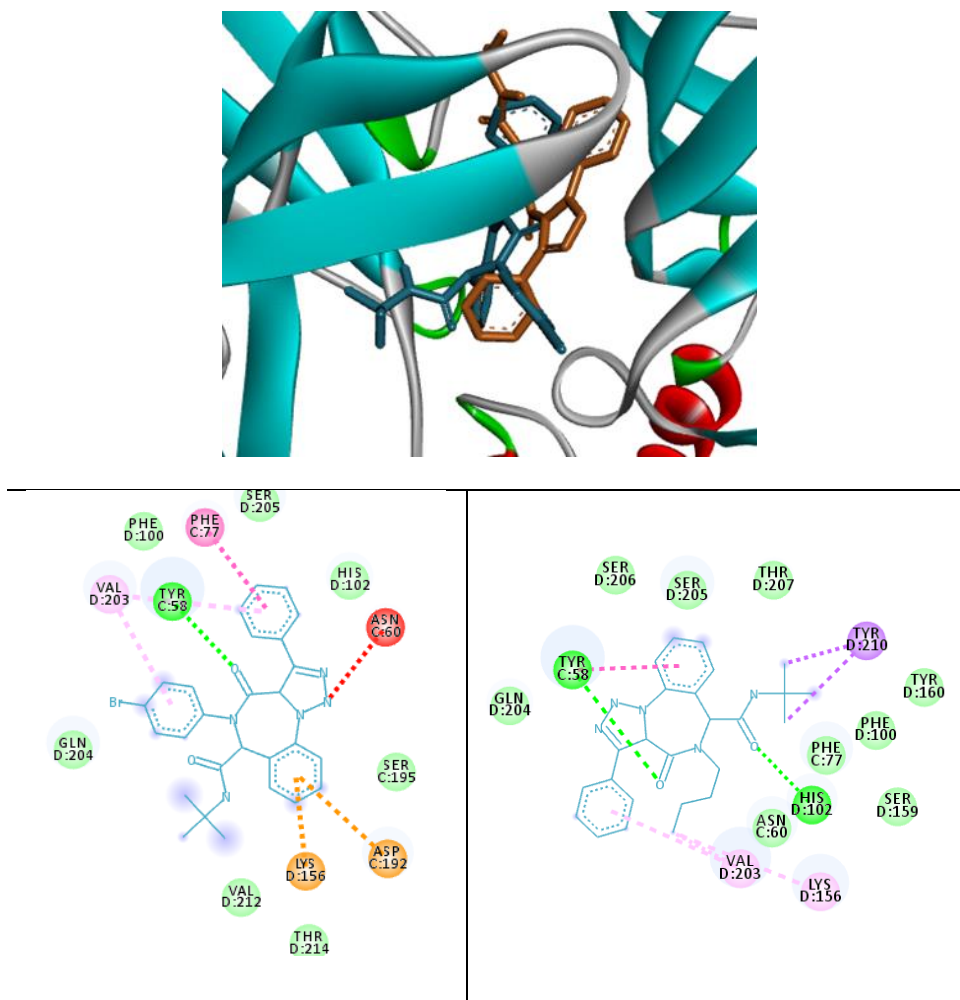


Рис. 3.6 Суперпозиції (верхня панель) молекул **1-S** (синя), **5-S** (оранжева); діаграми міжмолекулярних взаємодій (нижня панель) молекул **1-S** (зліва), і **5-S** (справа) в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора. Візуалізація зв'язків показана пунктирними лініями відповідного кольору: сили *Вандер Ваальса* – світло-зелений; водневі зв'язки – зелений; π -катіонна, π -катіонна взаємодії – оранжевий; π - σ зв'язок – бузковий; зв'язок донор-донор – червоний; π - π взаємодія – фіолетовий; π -Alk, Alk взаємодії – рожевий.

Підтвердженням цього припущення є наявність π -катионної взаємодії між молекулою та залишком Lys156 α 1 та Asp192 γ 2 і залишку Ser195 інтерфейсу субодиниці γ 2, яка в цьому комплексі виконує роль підсилювача диполів через сили Вандер Ваальса. Незважаючи на високі абсолютні оціночні значення стиковки і сприятливої константи зв'язування (Affinity $DG = -9.0$ ккал/моль, $E_{Doc} = -6.94$ ккал/моль, $K_i = 8.17 \mu M$), наявність небажаного зв'язку донор-донор між атомом Нітрогену 1,2,3-триазольного фрагменту і залишком Asp60, може призвести до нівелювання прогнозованого ефекту (рис. 3.6). В свою чергу, локація молекули 5-S має обмеження залишком Asn60 γ 2, але занурена вглиб інтерфейсу α 1 шляхом π -Alk взаємодії з фенільним фрагментом амінокислотного залишку Lys156.

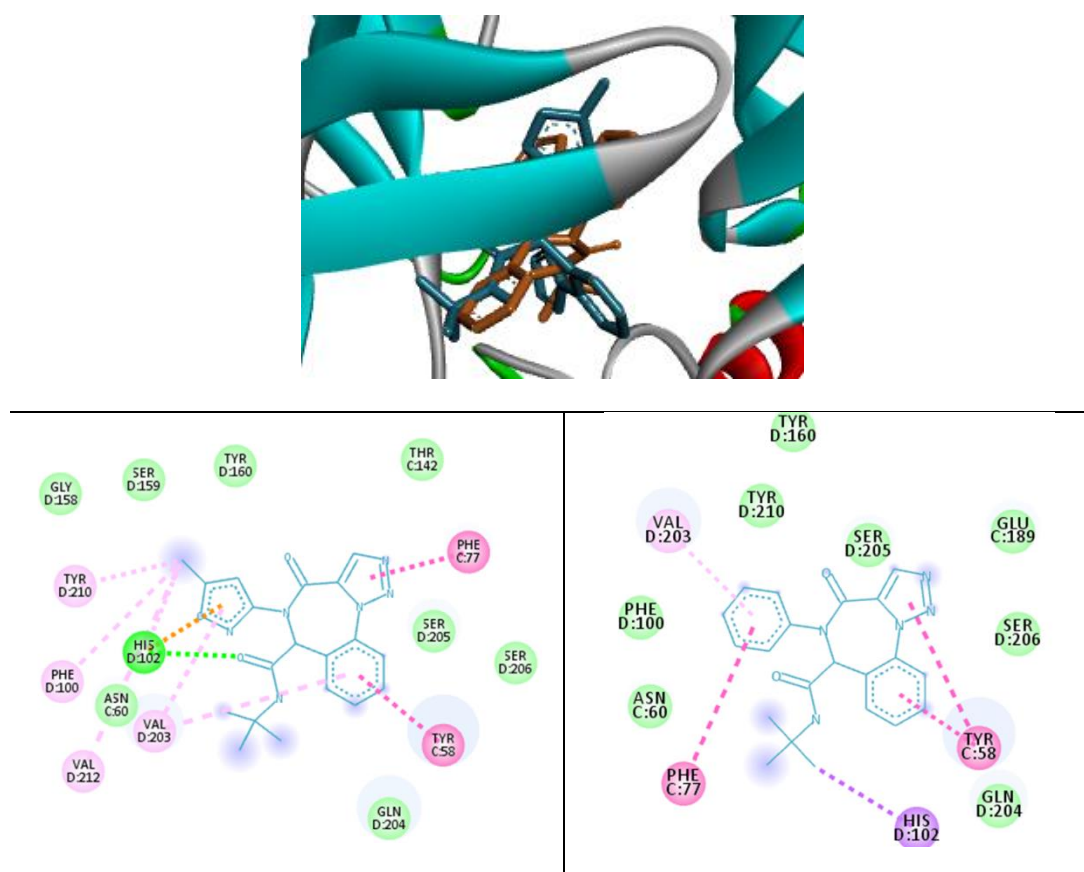


Рис. 3.7 Суперпозиції (верхня панель) молекул 3-S (синя), 4-S (оранжева); діаграми міжмолекулярних взаємодій (нижня панель) молекул 3-S (зліва), і 4-S (справа) в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора. Візуалізація зв'язків показана пунктирними лініями

відповідного кольору: сили Вандер Ваальса – світло-зелений; водневі зв'язки – зелений; π - σ зв'язок – бузковий; π - π взаємодія – фіолетовий; π -Alk, Alk взаємодії – рожевий.

Серед S-енантіомерів молекул **3** і **4**, які не мали заміщення в 1,2,3-триазольному циклі мали типовий для класичних бензодіазепінів тип зв'язування в алостеричному сайті рецептора ГАМК (рис. 3.7). Слід також зауважити, що при помірних значеннях скорингу і вільної енергії зв'язування (табл. 3.1), сполуки **3S** та **4S** мали кращі показники констант зв'язування в порівнянні з гідазепамом і діазепамом (3-S K_i = 3.39 μ M, 4-S K_i = 7.59 μ M). На рис. 3.7 наведені суперпозиції молекул в комплексі з мішенню, які утворюють стабільні комплекси шляхом міжмолекулярних взаємодій (водневого зв'язку та гідрофобних взаємодій) з амінокислотними залишками His102 Tyr58, Phe100, Phe77, Tyr210, Val203, Val212.

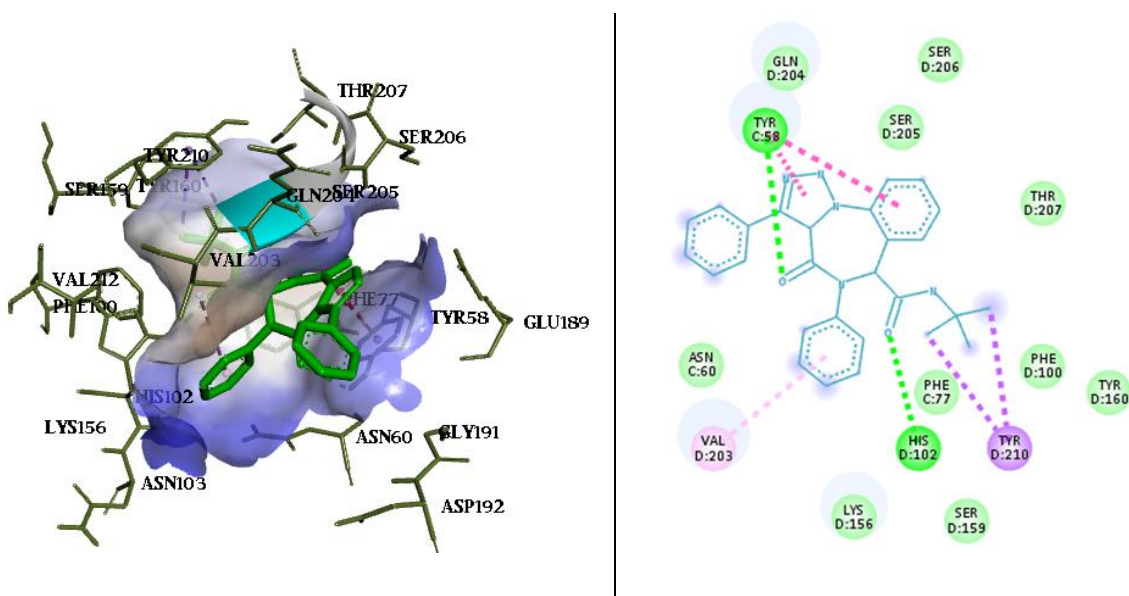


Рис. 3.8 Суперпозиції (ліва панель) молекули 2-S (молекула-хіт); діаграма міжмолекулярних взаємодій (права панель) в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора. Візуалізація зв'язків показана пунктирними лініями відповідного кольору: сили Вандер Ваальса – світло-зелений; водневі зв'язки – зелений; π - σ зв'язок – бузковий; π - π взаємодія – фіолетовий; π -Alk, взаємодія – рожевий.

За результатами докінгу найбільш перспективною є молекула **2-S**, яка мала вищі абсолютні значення скорингової функції порівняно з діазепамом і гідазепамом, хоча мала вільну енергію та константу зв'язування на рівні гідазепаму (Affinity DG = -10.1 ккал/моль, EDoc = -6.59 ккал/моль, Ki = 14.82 μM). На рис. 3.8 наведена суперпозиція і діаграма міжмолекулярних взаємодій найбільш перспективної молекули-хіта **2-S** в алостеричному сайті зв'язування бензодіазепінів ГАМК рецептора.

Слід також відзначити, що молекула-хіт має близький до класичних бензодіазепінів тип зв'язування в алостеричному сайті ГАМК рецептора. Вона утворює комплекс за рахунок двох π - π стейкінгових взаємодій між 5,6-дигідро-4H-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепіновим фрагментом та залишком Tyr58. Утворенню стабільного комплексу між сполукою та рецептором також сприяли два π - σ зв'язки між N-*трет*-бутильним замісником і залишком Tyr210, π -Alk взаємодія між заміщеним в 5 положенні фенільним замісником бензодіазепінового каркасу і амінокислотою Val203. Утворення такого роду взаємодій сприяє появі гідрофобної кишені, яку стабілізують два водневі зв'язки між атомом Оксигену 4-оксогрупи бензодіазепінового каркасу з залишком Tyr58 і атомом Оксигену заміщеної в 6 положенні карбоксамідної групи з амінокислотним залишком His102 (рис. 3.8).

3.2 Безпечність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах *in vitro* за показниками цитотоксичності та генотоксичності

Важливим етапом вивчення фармакологічної активності нових речовин є визначення токсикологічних характеристик, зокрема цитотоксичності та генотоксичності [167]. Також дослідження фоточутливості лікарських засобів є важливою частиною оцінки безпеки лікарських засобів. Вони використовуються для визначення потенційних ризиків, які можуть викликати ліки в поєднанні з впливом сонячного світла. У зв'язку з тим, що не всі пацієнти можуть сумлінно ставитися до правильного зберігання лікарського

засобу, а для анксиолітичних препаратів, зокрема похідних бензодіазепінів, характерна можливість утворення побічних продуктів під впливом сонячних променів, необхідно дослідити токсичність після фотодеградації.

3.2.1 Дослідження впливу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на життєздатність клітин у тестах МТТ та поглинання нейтрального червоного барвника

Визначення життєздатності клітин є критично важливим аспектом у багатьох біологічних та медичних дослідженнях для оцінки клітинної відповіді на дію зовнішніх факторів *in vitro*. Тест поглинання нейтрального червоного барвника (ПНЧБ) і аналіз МТТ найчастіше використовуються для виявлення життєздатності клітин після впливу токсичних речовин. Аналіз МТТ використовується для оцінки життєздатності/проліферації клітин на основі відновлення 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетранатрію броміду до фіолетових кристалів формагану метаболічно активними клітинами, тоді як тест ПНЧБ ґрунтується на здатності життєздатних клітин поглинати та зв'язувати нейтральний червоний барвник (НЧБ) [168–170]. НЧБ є катіонним барвником, який легко проникає через плазматичну мембрану та накопичується в лізосомах, де він утворює електростатичну взаємодію з негативно зарядженим лізосомальним матриксом. Вплив токсичних речовин може змінити клітинну мембрану або зокрема лізосомну мембрану, що призводить до крихкості лізосом та інших шкідливих змін, які поступово стають незворотними. Таким чином, загибель клітин та/або пригнічення їх росту призводять до зниження утримання нейтрального червоного в клітинній культурі.

Нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не впливають на мітохондріальну метаболічну активність клітин лінії BALB/c 3T3, не викликають їх пошкодження, не впливають на їхню життєздатність, а також демонструють клітинний ріст більше 70 %, що дозволяє вважати похідні 1,2,3-

триазоло-1,4-бензодіазепінів нетоксичними в умовах, використаних у тесті МТТ (рис. 3.9).

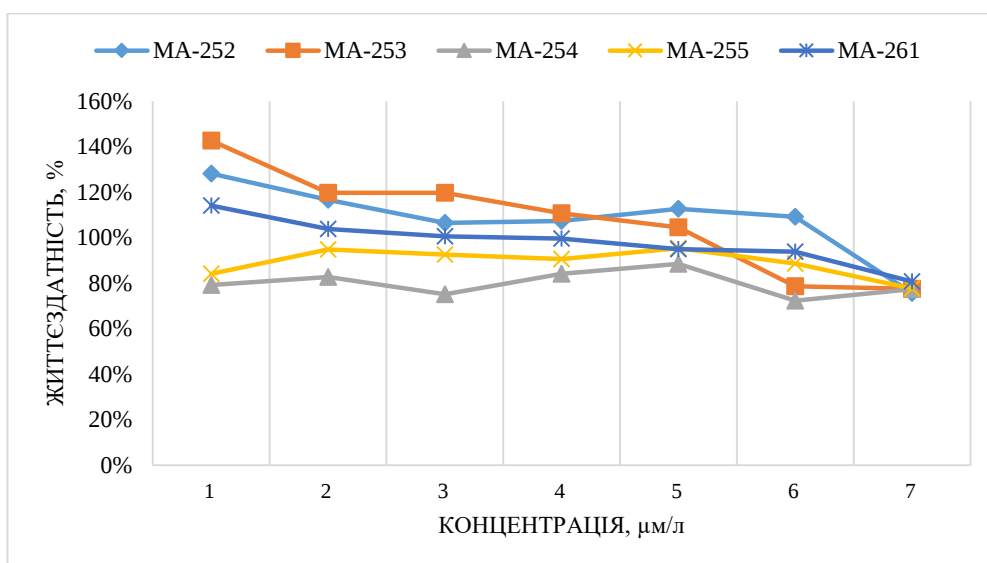


Рис. 3.9 Життєздатність клітин в умовах МТТ-тесту. *Примітка:* по вісі абсцис – концентрація (мМ/л) досліджуваних похідних: 1 – 0,78; 2 – 1,56; 3 – 3,125; 4 – 6,25; 5 – 12,5; 6 – 25; 7 – 50.

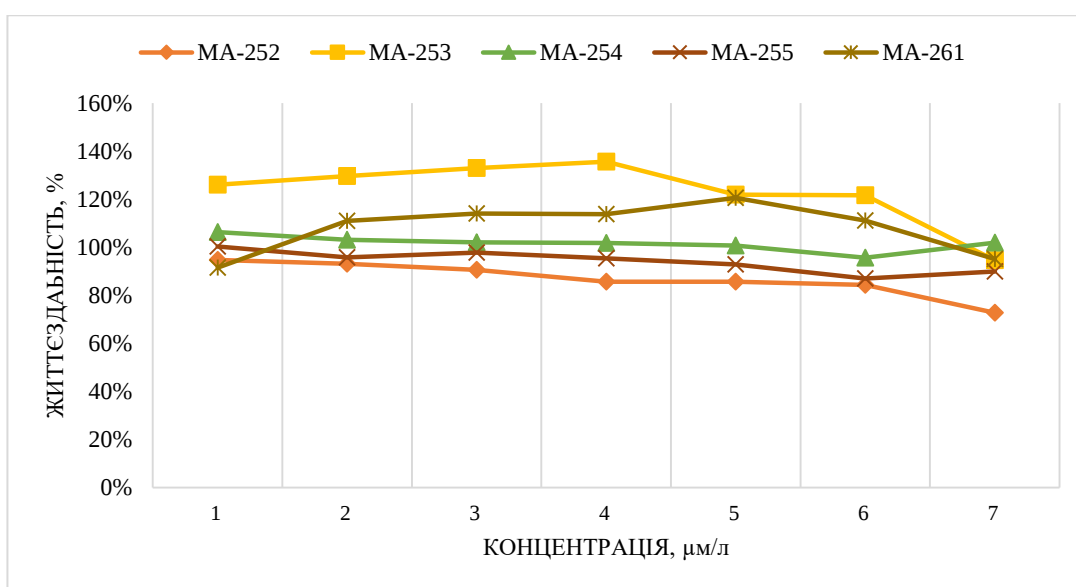


Рис. 3.10 Життєздатність клітин в умовах тесту ПНЧБ. *Примітка:* по вісі абсцис – концентрацію (мМ/л) досліджуваних похідних: 1 – 0,78; 2 – 1,56; 3 – 3,125; 4 – 6,25; 5 – 12,5; 6 – 25; 7 – 50.

Життєздатність клітин BALB/c 3T3 на тлі введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в умовах тесту ПНЧБ не опускалася нижче 70 % порівняно з контролем (рис. 3.10). Результати показали, що досліджувані зразки були нетоксичними і не викликали шкідливих ефектів в умовах, використаних у цьому тесті.

Для оцінки фототоксичності похідні МА-252, МА-253, МА-254, МА-255 і МА-261 утримували під ксеноновою лампою потужністю 1500 Вт, яка генерує УФ-випромінювання при 300-800 нм. Зразки розчиняли у фосфатно-сольовому буфері (PBS) і опромінювали протягом 2 годин, аліквоти відбирали через 1 і 2 години.

Аналіз ВЕРХ вихідних розчинів і зразків після 2 годин опромінення в SunTest CPS+ продемонстрував стабільність похідних МА-254 і МА-255. Розміри піків не змінилися, і жодних додаткових піків на хроматограмах не спостерігалось через 2 години опромінення (результати не показано). Спектри поглинання МА-252, МА-253 і МА-261 свідчать про те, що ці сполуки поглинають випромінювання до 325 нм (рис. 3.11). Тому вони можуть зазнавати фотоперетворень під впливом сонячного світла. Найбільше (у 5 разів) зменшилися площі піків після 2 годин опромінення для МА-261. Однак у випадку МА-252 і МА-253 їх концентрації зменшилися лише в 2 рази. Водночас на хроматограмах видні додаткові піки від фотопродуктів (рис. 3.12).

Нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів під шифром МА-252, МА-253 і МА-261 через появу фотопродуктів були досліджені на цитотоксичність у тесті ПНЧБ після 2 годин перебування під дією світла в видимому спектрі. Результати показали, що досліджувані зразки не здійснювали негативний вплив на стан культури клітин, суттєвих відмінностей у кількості живих клітин між зразком і негативним контролем не відзначали (рис. 3.13).

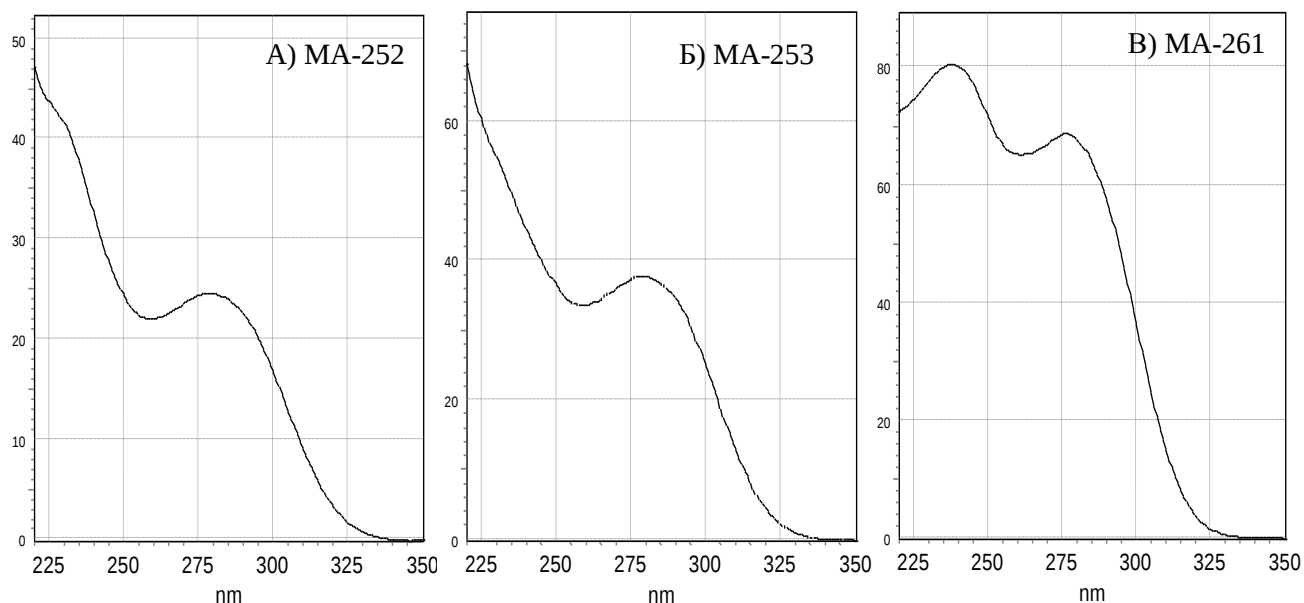


Рис. 3.11 Спектри поглинання сполук А) МА-252; Б) МА-253 і В) МА-261, отримані в діапазоні $\lambda = 220\text{-}350$ нм при HPLC-дослідженні.

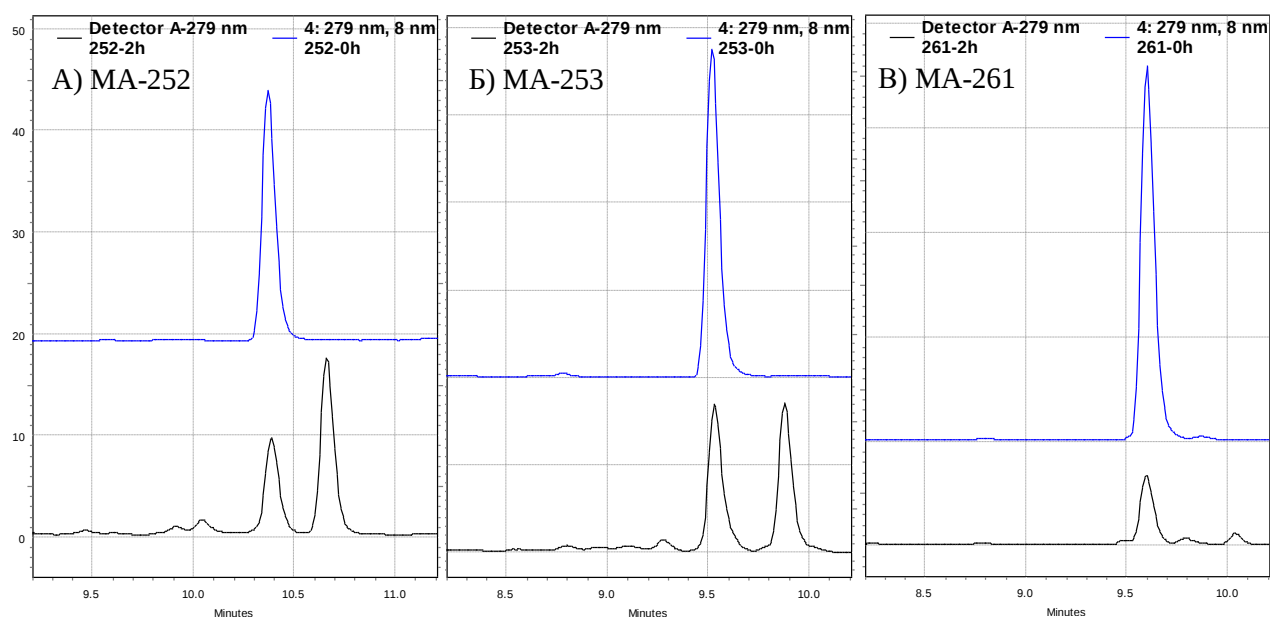


Рис. 3.12 Хроматограми А) МА-252; Б) МА-253 і В) МА-261 після 0 годин і 2 годин опромінення в SunTest CPS+.

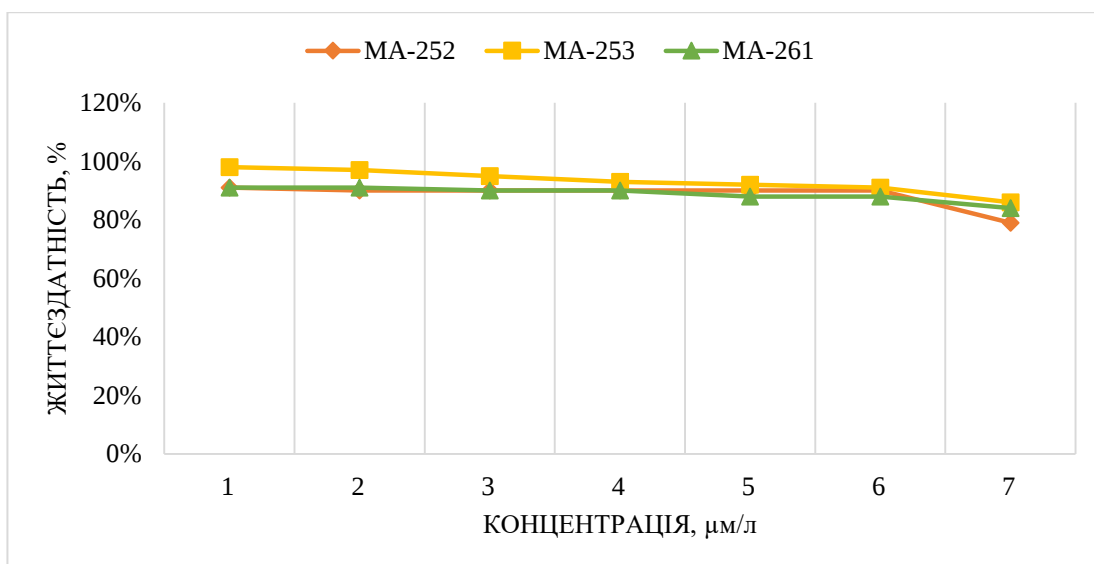


Рис. 3.13 Життєздатність клітин на тлі інкубації з похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів після фотодеградації в умовах тесту ПНЧБ. Примітка: по осі абсцис – концентрація (μм/л) досліджуваних похідних: 1 – 0,78; 2 – 1,56; 3 – 3,125; 4 – 6,25; 5 – 12,5; 6 – 25; 7 – 50.

Таким чином, результати тестів ПНЧБ та МТТ, що не виявили токсичної дії досліджуваних сполук на клітини, разом із відсутністю фототоксичних реакцій, дозволяють зробити висновок про їхню безпеку при звичайному використанні без впливу ультрафіолетового випромінювання. Це свідчить про те, що похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів можуть бути використані без значного ризику токсичних або фототоксичних реакцій, що є важливим для їх клінічного застосування.

3.2.2 Визначення генотоксичності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в умовах уму-тесту

Уму-тест є широко використовуваним методом для прогнозування та оцінки хімічних речовин, що пошкоджують ДНК, завдяки простоті, чутливості, швидкості та відтворюваності системи тестування. Він спирається на здатність агентів, що пошкоджують ДНК, стимулювати експресію гена *umiC*, який регулюється генами *lexA* і *recA* та відповідає за індукцію SOS-

реакції. У тесті *umu* використовуються системи аналізу *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, які засновані на реакції саморозщеплення білка-репресора *lexA* та злиття промотору, контрольованого *umu*, з геном-репортером *lacZ*, що кодує β -галактозидазу. Це злиття дозволяє колориметрично визначити активність β -галактозидази за допомогою кольорової реакції та оцінити генотоксичний потенціал досліджуваної сполуки [171].

Brambilla та співавтори зібрали інформацію про генотоксичну та/або канцерогенну дію 51 препаратів бензодіазепінової природи та їх аналогів [172]. Лише 8 із 41 представлених на ринку бензодіазепінів та їхніх аналогів мали всі необхідні дані відповідно до чинних інструкцій щодо фармацевтичного тестування. Таким чином, вивчення токсикологічних властивостей нових похідних триазолобензодіазепінів є актуальним для кращого розуміння безпеки та наявності побічних ефектів при їх застосуванні.

Бактеріальні культури інкубували з різними концентраціями похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів у присутності або відсутності метаболічної активаційної системи - фракції S9, що містить печінкові мікросоми. Така метаболічна активація потрібна для оцінки генотоксичності метаболітів досліджуваних похідних [173].

В *umu*-тесті з *S. typhimurium* жодна з концентрацій досліджуваних сполук не виявила генотоксичного ефекту з (+S9) або без (-S9) метаболічної активації ($IR < 1,5$) (табл. 3.2). Згідно з результатами, нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не впливали на фактор росту бактерій в умовах тесту, оскільки значення було не нижчим, ніж у групі негативного контролю.

Таблиця 3.2

**Оцінка генотоксичності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів
за значеннями фактора росту (G) та коефіцієнта індукції (IR)**

Речовина	Доза, μМ/л	-S9		+S9	
		G	IR	G	IR
1	2	3	4	5	6
МА-252	6,25	1,07±0,15	1,05±0,15	1,03±0,07	1,04±0,11
	12,5	1,14±0,21	0,97±0,15	1,07±0,08	1,15±0,11
	25	1,07±0,12	0,99±0,14	1,03±0,02	1,12±0,04
	50	1,13±0,12	1,03±0,15	1,10±0,08	1,34±0,17
МА-253	6,25	1,08±0,11	1,13±0,12	1,01±0,07	1,04±0,14
	12,5	1,26±0,07	0,89±0,07	1,10±0,06	1,03±0,10
	25	1,25±0,08	0,80±0,03	1,10±0,04	1,04±0,11
	50	1,04±0,12	1,00±0,03	1,11±0,04	1,22±0,06
МА-254	6,25	1,06±0,11	1,02±0,10	1,01±0,06	0,95±0,08
	12,5	1,15±0,09	0,99±0,07	1,06±0,04	1,12±0,26
	25	1,17±0,04	0,73±0,07	1,08±0,04	0,96±0,06
	50	1,15±0,05	0,78±0,07	1,15±0,05	1,05±0,08
МА-255	6,25	1,04±0,13	0,98±0,15	0,83±0,05	1,23±0,23
	12,5	0,99±0,07	1,00±0,16	0,89±0,04	1,27±0,18
	25	0,96±0,05	0,96±0,06	0,94±0,08	1,07±0,09
	50	0,92±0,05	1,19±0,13	1,01±0,04	1,16±0,20
МА-261	6,25	0,98±0,06	1,10±0,09	0,90±0,11	1,04±0,09

Продовж. табл.3.2

1	2	3	4	5	6
МА-261	12,5	0,98±0,05	1,15±0,17	1,10±0,03	1,07±0,09
	25	0,99±0,05	0,96±0,10	1,11±0,02	0,88±0,07
	50	0,95±0,04	1,09±0,20	1,03±0,07	0,99±0,10
НК	-	1,00±0,07	1,00±0,20	1,00±0,07	1,00±0,20
ПК	-	0,91±0,08	3,47±0,30	0,97±0,14	3,13±0,68
КР	-	0,96±0,04	1,09±0,06	0,99±0,09	1,21±0,17

Примітки:

1. НК – негативний контроль (вода);
2. ПК – позитивний контроль (-S9 – 4-НХО; +S9 – 2-АА);
3. КР – контроль розчинника (3% ДМСО)

Уму-тест також проводили після того, як досліджувані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів піддавали дії УФ-випромінювання та виявили, що речовини під шифром МА-252, МА-253 і МА-261 виявились нестабільними, а поява продуктів розкладання відбувалася через 1 і 2 години після початку тесту. Так як багато фототоксичних реакцій виникають внаслідок прямої взаємодії лікарських засобів або їхніх первинних метаболітів з ультрафіолетовим світлом, генотоксичний ефект можна досліджувати без метаболічної активації [114]. Ультрафіолетове випромінювання може безпосередньо збуджувати молекули лікарських засобів, які поглинають світло. Це призводить до утворення реактивних кисневих видів і подальшого пошкодження клітинних компонентів, таких як ліпіди, білки та ДНК, що викликає фототоксичні реакції. Тому для базового скринінгу фототоксичності часто достатньо оцінити прямий вплив ультрафіолетового світла на клітини або тканини в присутності лікарського засобу.

Зразки похідних МА-252, МА-253 та МА-261, відібрані через 2 години сонячного впливу, були проаналізовані за допомогою уму-тесту без метаболічної активації, результати наведені в табл. 3.3. Незважаючи на те, що фотопродукти з'явилися під впливом сонячного світла, досліджувані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не показали негативного ефекту на ріст бактеріальних колоній під час експерименту, при цьому змін індукційного коефіцієнта не відзначено в порівнянні з групою негативного контролю.

Таблиця 3.3

**Оцінка генотоксичної активності похідних
1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів після сонячного впливу**

Речовина	Доза, $\mu\text{M}/\text{л}$	-S9	
		G	IR
1	2	3	4
МА-252	6,25	$1,10 \pm 0,16$	$0,86 \pm 0,19$
	12,5	$1,22 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,12$
	25	$1,06 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,03$
	50	$1,07 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,13$
МА-253	6,25	$1,08 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,17$
	12,5	$1,13 \pm 0,06$	$0,95 \pm 0,08$
	25	$1,10 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,05$
	50	$1,03 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,04$
МА-261	6,25	$1,03 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,14$

Продовж. табл.3.3

1	2	3	4
МА-261	12,5	1,09±0,03	0,96±0,06
	25	1,10±0,02	0,90±0,04
	50	1,02±0,05	1,01±0,05
НК	-	1,00±0,04	1,00±0,07
ПК	-	1,06±0,07	4,97±0,58
КР	-	0,99±0,03	1,36±0,02

Примітки:

1. НК – негативний контроль (вода);
2. ПК – позитивний контроль (-S9 – 4-НХО);
3. КР – контроль розчинника (3% ДМСО).

Таким чином, в уму-тесті з *S. typhimurium* похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в усіх досліджуваних концентраціях не виявили генотоксичного ефекту з (+S9) або без (-S9) метаболічної активації (IR < 1,5). П'ять сполук, а також продукти розпаду трьох з них під дією сонячного проміння, не впливали на фактор росту бактерій в умовах тесту: значення було на рівні групи негативного контролю.

3.3 Скринінгові дослідження фармакологічної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів

3.3.1 Дослідження анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів методами піднесеного хрестоподібного лабіринту та темно-світлої камери

Модель піднесеного хрестоподібного лабіринту була обрана як базова для пошуку речовин, що виявляють протитривожну активність. Її широко застосовують у наукових дослідженнях завдяки великій кількості інформативних показників, які можна аналізувати як окремо, так і в сукупності, що дозволяє отримати детальну початкову картину досліджуваної активності.

Таблиця 3.4 підсумовує результати анксіолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на мишах. На рис. 3.14 представлено вплив нових похідних триазолобензодіазепінів на час, проведений мишами на відкритих руках, що вважається основним індексом тривожної поведінки у дослідних тварин. Введення нових похідних показало лінійну залежність показнику від дози у всіх групах тварин, а саме: збільшення тривалості перебування мишей у відкритому просторі досліджуваного апарату зі збільшенням дози [149]. У порівнянні з контрольною групою час перебування на відкритих рукавах збільшився у мишей, які отримували нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів під шифром МА-252, МА-253 і МА-254 у дозі 1 мг/кг на 86%, 160 % та 77 % відповідно ($p < 0,01$). Подовжені латентний період першого входу в закритий рукав приладу та час у центрі демонструють вплив на природню реакцію тварин, зменшуючи занепокоєння від перебування на відкритому просторі [174].

Крім того, емоційний компонент занепокоєння тварин змінився за рахунок зменшення кількості фекальних болюсів і сечовипускань у групах тварин, які отримували новосинтезовані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Поведінкові реакції в групі, яка отримувала МА-261, показали незначну тенденцію до наявності анксіолітичної активності (табл. 3.4). У мишей, які отримували препарат порівняння гідазепам, тривалість знаходження на відкритому рукаві був статистично значуще довшою (на 163%), а кількість переходів між рукавами приладу була значно вищою (у 3,4 рази) у порівнянні з відповідними значеннями, отриманими у тварин контрольної групи ($p < 0,01$). Миші, що отримували МА-253 у дозі 1 мг/кг, проводили на відкритому

просторі піднесеного хрестоподібного лабіринту на 1% менше порівняно з тваринами, які отримували гідазепам ($p>0,05$).

Таблиця 3.4

Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на поведінкові реакції мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Доза, мг/кг	Латентний період першого заходу, с	Час проведення в центрі, с	Кількість переходів між рукавами	Кількість фекальних болюсів	Кількість уринацій
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	-	16,5±0,9	8,0±0,7	3,7±0,3	2,5±0,3	1,0±0,3
МА-252	0,5	29,2±1,2* *	22,8±1,2* *,##	10,7±0,4* *	0,7±0,1*	0,0±0,0
	0,75	41,3±1,3* *,##	11,5±0,7	10,2±0,6* *	0,0±0,0**	0,7±0,1
	1,0	44,0±0,9* *,##	24,0±1,3* *,#	11,0±0,4* *	0,7±0,1*	0,3±0,1
МА-253	0,5	33,0±0,5* *,#	24,0±1,8* #	7,3±0,5* *,#	1,2±0,1	1,0±0,1 [#]
	0,75	42,7±0,8* *,##	11,2±1,6	12,3±0,6* *	0,7±0,1*	1,0±0,1 [#]
	1,0	46,8±1,0* *,##	15,2±0,7*	14,0±0,4* *	0,0±0,0*	0,0±0,0
МА-254	0,5	22,0±0,8	20,5±1,3* *,#	4,7±0,3 ^{##}	1,2±0,2	0,0±0,0
	0,75	27,7±0,5* *	11,8±1,3	7,2±0,3* *,##	0,7±0,1*	0,5±0,1

Продовж. табл. 3.4

1	2	3	4	5	6	7
МА-254	1,0	39,0±1,6* *,##	11,2±0,9	7,8±0,2**. ##	0,5±0,1*	0,7±0,1 [#]
МА-255	0,5	23,2±0,9	16,7±0,8* *	5,0±0,3 ^{##}	1,8±0,2	1,3±0,1 [#]
	0,75	28,5±0,6	14,5±1,1	9,5±0,2**. #	2,8±0,3	1,2±0,2 [#]
	1,0	29,0±0,6* *,#	10,7±0,8	8,7±0,2**. #	4,0±0,3 [#]	0,7±0,1 [#]
МА-261	0,5	15,2±0,7	28,3±1,3* *,##	3,5±0,1 ^{##}	1,7±0,1	0,7±0,1 [#]
	0,75	20,7±0,7	18,0±1,4*	6,8±0,3*,##	0,7±0,1*	0,0±0,0
	1,0	20,8±0,7	14,5±1,6	5,2±0,3 ^{##}	2,8±0,3	0,0±0,0
Гідазепам М	1,0	21,7±1,1	11,0±0,7	12,5±0,4* *	1,5±0,3	0,0±0,0

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$.

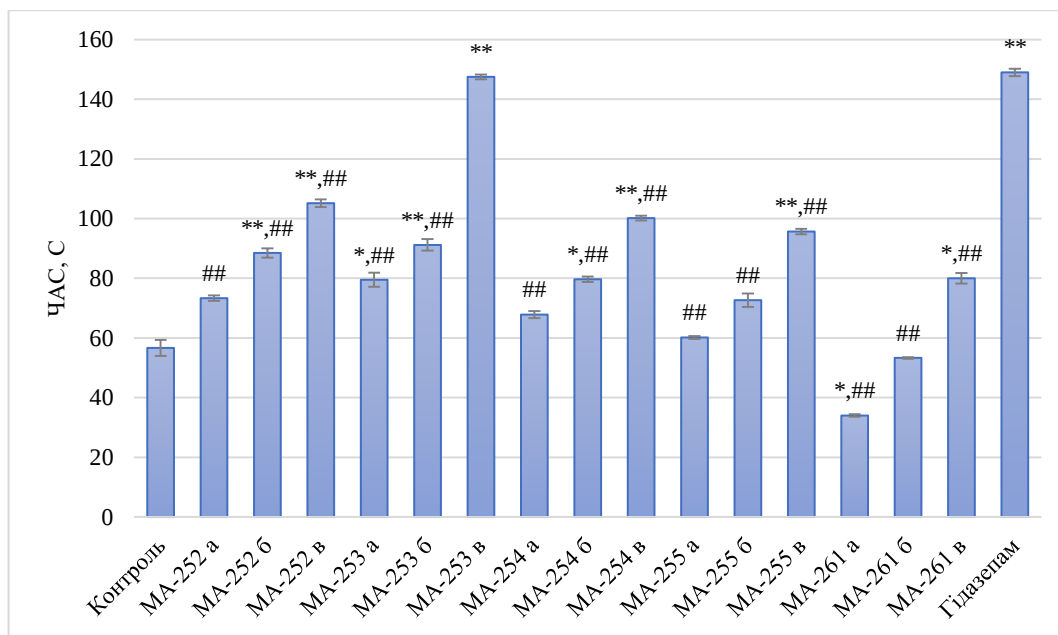


Рис. 3.14 Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на час, проведений мишами на відкритих рукавах у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту. Досліджувана доза похідного становила (а) 0,5 мг/кг, (б) 0,75 мг/кг і (в) 1 мг/кг. Примітки: * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$; # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$.

Отримані результати демонструють анксиолітичні властивості нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, проте суттєвий ефект спостерігався у мишей, яким вводили MA-252, MA-253 і MA-254 в дозі 1 мг/кг.

Тест темно-світлої камери зазвичай використовується для валідації результатів тесту піднесеного хрестоподібного лабіринту. Експериментальна установка дозволяє досліджувати поведінкові реакції гризунів на зміні умови освітлення, зокрема, оцінювати їхню перевагу між темрявою і світлом, а також вираженість і динаміку поведінки «виглядання». Результати цього тесту з мишами наведені в таблиці 3.5, згідно яких підтверджується наявність анксиолітичного ефекту у мишей, яким вводили нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (рис. 3.5 і табл. 3.5) [149]. Тривалість перебування у світлій частині тестового пристрою залежала від дози похідного 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, яку вводили мишам (рис. 3.15). У порівнянні з контрольною

групою час перебування у світлій частині досліджуваного апарату збільшився у мишей, які отримували похідне під шифром МА-253 у дозах 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг та 1 мг/кг на 91%, 113% (у 2,13 разів) та 214% (у 3,14 разів) відповідно ($p < 0,01$). Результати чисельного моделювання свідчать, що кількість стійок як маркера пошукової активності зросла в усіх групах. Порівняно з мишами, яким вводили гідазепам, даний показник у тварин, які отримували МА-252 і МА-253 в дозі 1 мг/кг, був більшим на 67,8% і 58,0% відповідно ($p < 0,01$).

Таблиця 3.5

Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на поведінкові реакції мишей у тесті темно-світлої камери ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Доза, мг/кг	Кількість переходів між камерами	Кількість фекальних болюсів	Кількість уринацій	Кількість стійок
1	2	3	4	5	6
Контроль	-	$2,8 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
МА-252	0,5	$3,3 \pm 0,2^{##}$	$1,5 \pm 0,2^{**}$	$0,5 \pm 0,1^*$	$10,5 \pm 0,5^{**}$
	0,75	$4,5 \pm 0,2^{*,##}$	$0,5 \pm 0,1^{**}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$11,0 \pm 0,5^{**}$
	1,0	$6,2 \pm 0,3^{**,##}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$18,8 \pm 0,5^{**, \#}$ #
МА-253	0,5	$3,7 \pm 0,2^{##}$	$1,7 \pm 0,1^{**}$	$0,7 \pm 0,1^{*, \#}$	$7,7 \pm 0,3^{**}$
	0,75	$4,0 \pm 0,2^{##}$	$1,5 \pm 0,1^{**, \#}$	$0,3 \pm 0,1^{**}$	$8,8 \pm 0,2^{**}$
	1,0	$8,0 \pm 0,2^{**, \#}$	$0,7 \pm 0,2^{**, \#}$	$0,2 \pm 0,1^{**}$	$17,7 \pm 0,5^{**, \#}$ #
МА-254	0,5	$3,7 \pm 0,2^{##}$	$0,5 \pm 0,1^{**}$	$1,2 \pm 0,1^{\#}$	$4,7 \pm 0,2^{**, \#}$

Продовж. табл. 3.5

1	2	3	4	5	6
МА-254	0,75	5,5±0,2 ^{**,##}	0,5±0,1 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	5,3±0,2 ^{**}
	1,0	5,7±0,1 ^{**,##}	0,0±0,0 ^{**}	0,7±0,1 ^{*,#}	5,0±0,2 ^{**,##}
МА-255	0,5	3,5±0,2 ^{##}	0,7±0,1 ^{**}	1,0±0,1 [#]	1,3±0,1 ^{*,##}
	0,75	3,7±0,2 ^{##}	1,0±0,1 ^{**}	1,0±0,1 [#]	4,8±0,2 ^{**,##}
	1,0	5,0±0,1 ^{**,##}	0,7±0,1 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	5,0±0,2 ^{**,##}
МА-261	0,5	2,3±0,1 ^{##}	0,0±0,0 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	0,7±0,1 ^{##}
	0,75	3,0±0,1 ^{##}	0,8±0,1 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	2,8±0,2 ^{**,##}
	1,0	3,2±0,1 ^{##}	0,0±0,0 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	1,3±0,1 ^{*,##}
Гідазепам	1,0	10,0±0,2 ^{**}	0,3±0,1 ^{**}	0,0±0,0 ^{**}	11,2±0,6 ^{**}

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$.

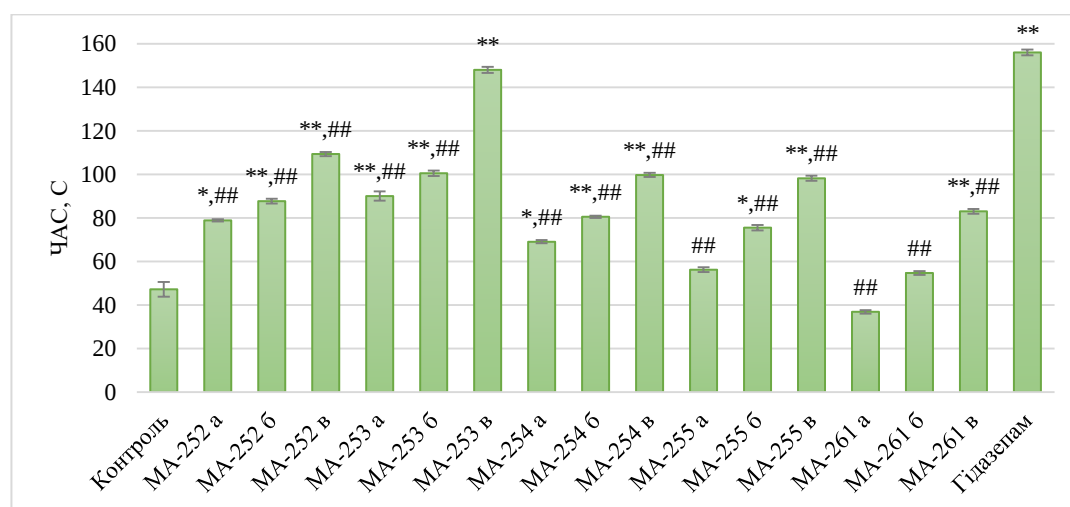


Рис. 3.15 Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на час, проведений мишами у світлій камері. Досліджувана доза препарату становила

(а) 0,5 мг/кг, (б) 0,75 мг/кг і (в) 1 мг/кг. Примітки: * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$; # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$.

Таким чином, результати тесту темно-світлої камери підтвердили наявність анксиолітичного ефекту у мишей на тлі похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

3.3.2 Вивчення антидепресивної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів методом плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст»

Тест примусового плавання є найпоширенішим та найчастіше використовуваним в доклінічних дослідженнях депресії. Він заснований на бажанні тварини уникнути стресової ситуації, що проявляється зменшенням часу нерухомої пози в циліндрі, наповненому водою. Більше того, даний тест здатний виявляти антидепресивну дію АФІ в умовах гострого введення, що дозволяє швидко проводити оцінку їхньої ефективності [175, 176].

Результати, отримані в тесті примусового плавання, наведено в табл. 3.6. Загалом під час дослідження відстежували зменшення загальної тривалості завмирання, основного показнику «відчаю» тварин, та збільшення латентного періоду першого зависання, що може свідчити про прояв антидепресивних властивостей нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів [177]. Показник антидепресивної активності, визначений за формулою (2.3), у групах тварин, яким вводили МА-253, МА-254 та МА-255 в усіх досліджуваних дозах, був вищим серед досліджуваних груп. Зі збільшенням дози відслідковували зростання ефекту, та в максимальній дозі він становив 73% (МА-253), 71% (МА-254) та 74% (МА-255) відносно групи контролю ($p < 0,05$). Застосування класичного антидепресанту іміпраміну пролонгувало

латентний період настання першої іммобільності тварини та достовірно зменшувало загальну тривалість іммобілізації ($p < 0,05$).

Таблиця 3.6

Вплив досліджуваних похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на показники тесту примусового плавання за Порсолт ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Доза, мг/кг	Латентний період першого зависання, с	Загальна тривалість іммобілізації, с	АдА, %
1	2	3	4	5
Контроль	-	$79,5 \pm 1,6$	$199,3 \pm 2,6$	-
МА-252	0,5	$90,2 \pm 1,4^{\#}$	$168,7 \pm 2,2^{*,\#}$	15%
	0,75	$89,2 \pm 1,6^{\#}$	$153,3 \pm 3,9^{*,\#}$	23%
	1,0	$94,3 \pm 1,1^*$	$119,7 \pm 1,3^{*,\#}$	40%
МА-253	0,5	$94,0 \pm 1,1^*$	$88,7 \pm 2,5^{*,\#}$	56%
	0,75	$125,7 \pm 1,2^{*,\#}$	$65,2 \pm 2,3^{*,\#}$	67%
	1,0	$126,2 \pm 1,2^{*,\#}$	$54,7 \pm 2,3^*$	73%
МА-254	0,5	$107,7 \pm 1,4^*$	$77,7 \pm 3,5^{*,\#}$	61%
	0,75	$111,8 \pm 1,2^{*,\#}$	$66,2 \pm 0,8^{*,\#}$	67%
	1,0	$119,7 \pm 1,5^{*,\#}$	$52,5 \pm 3,0^*$	71%
МА-255	0,5	$117,5 \pm 1,2^{*,\#}$	$60,7 \pm 2,5^*$	70%
	0,75	$122,3 \pm 1,1^{*,\#}$	$53,3 \pm 1,3^*$	73%
	1,0	$125,0 \pm 0,9^{*,\#}$	$51,5 \pm 3,6^*$	74%
МА-261	0,5	$86,2 \pm 1,3^{\#}$	$117,8 \pm 3,0^{*,\#}$	41%

Продовж. табл. 3.6

1	2	3	4	5
МА-261	0,75	$86,7 \pm 1,6^{\#}$	$65,7 \pm 1,3^{*,\#}$	67%
	1,0	$78,3 \pm 1,3^{\#}$	$75,5 \pm 2,4^{*,\#}$	62%
Іміпрамін	25,0	$101,3 \pm 1,3^*$	$47,8 \pm 0,9^*$	76%

Примітки:

1. * – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою контролю;
2. # – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою, що отримувала іміпрамін.

Індекс депресивності (рис. 3.16), що визначається співвідношенням кількості зависань до числа активних періодів плавання, був найнижчим при застосуванні похідних МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг, та статистично значуще не відрізнявся від такого у групі, що отримували іміпрамін в дозі 25 мг/кг.

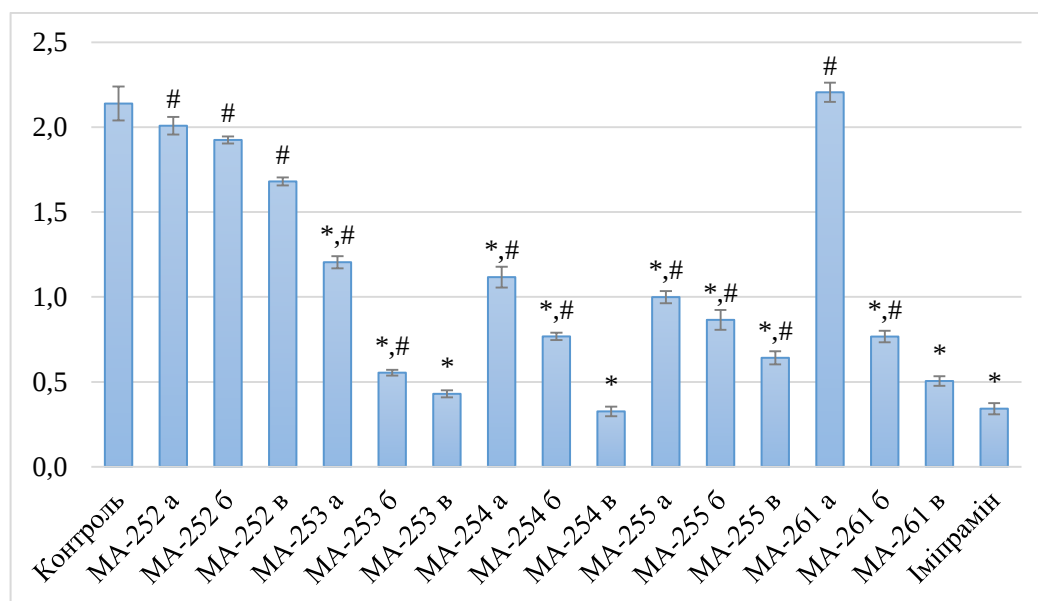


Рис. 3.16 Індекс депресивності тварин в тесті вимушеного плавання за Порсолт.

Примітки:

1. а – в дозі 0,5 мг/кг; б – в дозі 0,75 мг/кг; в – в дозі 1 мг/кг;
2. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$;
3. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала іміпрамін в дозі 25 мг/кг, $p < 0,05$.

Отже, в ході дослідження в умовах тесту примусового плавання за Порсолт встановлено, що похідні МА-253, МА-254 і МА-255 у дозах 1 мг/кг зменшують загальну тривалість нерухомості та мають низький індекс депресії, що демонструє наявність вираженої антидепресивної активності цих похідних на доклінічному рівні.

Тест «підвішування за хвіст» підтверджує гіпотезу, що тварина, яка перебуває у нерозв'язній ситуації проявляє два типи поведінки: занепокоєння та нерухомість (імобілізація), тобто пошукова поведінка характеризується інтенсивною руховою активністю та витратою енергії, і очікувальна поведінка з нерухомістю та енергозбереженням. Вважається, що антидепресантні засоби змінюють баланс між цими формами поведінки на користь пошуку [178]. Основним аспектом тесту є поведінкова оцінка відчуття безнадійності або безпорадності щодо втрати мотивації уникнення аверсивної ситуації, що відповідає депресивному стану у людини [179].

За результатами тесту «підвішування за хвіст» (табл. 3.7) похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-253, МА-254 та МА-255 продемонстрували помітне зменшення загальної тривалості імобілізації на 69,4%, 47,1% та 33,1% відповідно порівняно з групою контролю ($p < 0,05$), а також збільшення латентного періоду настання першого завмирання в декілька разів [177, 180]. Введення іміпраміну в дозі 25 мг/кг, в свою чергу, призвело до скорочення періоду нерухомого стану на 77,7% в порівнянні з показником групи контрольних тварин ($p < 0,05$).

Таблиця 3.7

Вплив досліджуваних похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на поведінку тварин у тесті «підвішування за хвіст» ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Доза, мг/кг	Латентний період першого зависання, с	Кількість актів іммобілізації	Тривалість іммобілізації, с
Контроль	-	$10,5 \pm 1,2$	$11,8 \pm 0,4$	$195,2 \pm 2,1$
МА-252	0,5	$28,7 \pm 0,6^{*,\#}$	$7,8 \pm 0,3^*$	$183,7 \pm 1,9^{\#}$
	0,75	$48,3 \pm 2,7^{*,\#}$	$9,0 \pm 0,3^*$	$179,8 \pm 4,6^{\#}$
	1,0	$29,2 \pm 0,9^{*,\#}$	$11,0 \pm 0,4^{\#}$	$175,8 \pm 1,0^{*,\#}$
МА-253	0,5	$29,8 \pm 1,4^{*,\#}$	$10,5 \pm 0,4^{\#}$	$151,8 \pm 4,3^{*,\#}$
	0,75	$47,3 \pm 2,2^{*,\#}$	$8,2 \pm 0,3^*$	$111,2 \pm 2,9^{*,\#}$
	1,0	$55,5 \pm 0,9^{*,\#}$	$6,2 \pm 0,6^*$	$59,8 \pm 3,7^*$
МА-254	0,5	$24,8 \pm 1,9^{*,\#}$	$16,8 \pm 0,5^{*,\#}$	$123,7 \pm 1,8^{*,\#}$
	0,75	$29,8 \pm 2,1^{*,\#}$	$11,5 \pm 0,6^{\#}$	$104,8 \pm 1,4^{*,\#}$
	1,0	$49,0 \pm 1,5^{*,\#}$	$8,0 \pm 0,4^*$	$103,2 \pm 1,4^{*,\#}$
МА-255	0,5	$39,2 \pm 2,2^{*,\#}$	$15,0 \pm 0,7^{\#}$	$136,8 \pm 2,4^{*,\#}$
	0,75	$24,8 \pm 0,4^{*,\#}$	$15,7 \pm 0,3^{*,\#}$	$135,5 \pm 3,0^{*,\#}$
	1,0	$37,2 \pm 1,4^{*,\#}$	$16,5 \pm 0,6^{*,\#}$	$132,5 \pm 1,1^{*,\#}$
МА-261	0,5	$16,0 \pm 0,6^{\#}$	$13,3 \pm 0,4^{\#}$	$148,8 \pm 1,2^{*,\#}$
	0,75	$21,3 \pm 0,5^{*,\#}$	$22,5 \pm 0,7^{*,\#}$	$181,0 \pm 2,7^{\#}$
	1,0	$20,5 \pm 0,7^{*,\#}$	$26,3 \pm 0,8^{*,\#}$	$176,8 \pm 2,2^{*,\#}$
Іміпрамін	25,0	$74,2 \pm 1,3^*$	$6,3 \pm 0,4^*$	$45,3 \pm 1,1^*$

Примітки:

1. * – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою контролю;

2. # – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою, що отримувала іміпрамін.

Таким чином, як і в попередньому дослідженні примусового плавання за Порсолт, в умовах тесту підвішування за хвіст тварини, що отримували похідні МА-253, МА-254 та МА-255 в дозі 1 мг/кг, продемонстрували статистично значуще скорочення тривалості нерухомого зависання, що є характерним для сполук з антидепресивною активністю.

3.3.3 Вплив похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на м'язовий тонус та координацію рухів у мишей

Підвищення м'язового тонусу є типовою ознакою станів тривоги у людей і може сприяти виникненню болю, включаючи головний біль, який часто турбує пацієнтів із ТР [181]. Згідно з отриманими результатами в тесті «вертикальної сітки» (Табл. 3.8), похідні в дозах 0,5 мг/кг та 0,75 мг/кг не здійснюють значущого впливу на скелетні м'язи мишей, так як не виявлено достовірних відмінностей у показнику даних експериментальних груп в порівнянні з групою контролю. Однак відстежується тенденція до прояву міорелаксантих властивостей зі збільшенням дози, введеної тваринам. При введенні похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг відзначалось зменшення часу знаходження тварини на вертикальній сітці на 23%, 27% та 33% відповідно в порівнянні з групою контролю ($p < 0,05$). Дане спостереження може свідчити про наявність м'якого впливу на тонус скелетних м'язів у гризунів. Гідазепам, відомий анксіолітик, в даному дослідженні продемонстрував наявність міорелаксантих ефекту у гризунів: тривалість утримання склала 11 секунд, що 28% менше за тривалість утримання тварин контролю ($p < 0,05$). Змін в емоційній компоненті, що визначається кількістю болюсів, не відзначалось ні в одній досліджуваній групі тварин в порівнянні з контролем ($p > 0,05$).

Згідно з результатами тесту стрижня, що обертається (Табл. 3.9), порушень координації рухів та м'язового тону не виявлено в усіх досліджуваних групах: тварини, що отримували похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, тримались на ротароді на рівні з тваринами групи контролю. Загальна тривалість утримання тваринами на приладі при введенні похідного МА-253 в дозі 1 мг/кг зросла на 30% в порівнянні з групою контрольних тварин, дані зміни є статистично значущими ($p < 0,05$) [182]. Водночас загальна тривалість утримання на приладі тваринами, що отримували гідазепам, була на рівні з контрольними тваринами.

Таблиця 3.8

Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на м'язовий тонус гризунів у тесті «вертикальної сітки» ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Доза, мг/кг	Час утримання на сітці, с	Кількість болюсів
1	2	3	4
Контроль	-	$15,3 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
МА-252	0,5	$14,0 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1$
	0,75	$13,7 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,1$
	1,0	$11,8 \pm 0,5^*$	$0,0 \pm 0,0$
МА-253	0,5	$14,5 \pm 0,6$	$0,0 \pm 0,0$
	0,75	$13,3 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,1$
	1,0	$11,2 \pm 0,3^*$	$0,3 \pm 0,1$
МА-254	0,5	$14,7 \pm 0,4$	$0,0 \pm 0,0$
	0,75	$14,3 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$
	1,0	$10,3 \pm 0,4^*$	$0,5 \pm 0,1$

Продовж. табл. 3.8

1	2	3	4
МА-255	0,5	$14,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$
	0,75	$14,2 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$
	1,0	$12,3 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,1$
МА-261	0,5	$15,0 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,1$
	0,75	$17,0 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$
	1,0	$15,5 \pm 0,7$	$0,0 \pm 0,0$
Гідазепам	1,0	$11,0 \pm 0,4^*$	$0,0 \pm 0,0$

Примітка: * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.

Судячи з розподілу тварин, які впали з приладу, видно, що гризуни, які отримували водний розчин похідного МА-253 в дозі 1 мг/кг, довше утримувались на ротароді (станом на 3 хв, де з 6 досліджуваних тварин тільки 2 не втримались). Тварини ні в одній групі не втримались довше 4 хв.

Таблиця 3.9

Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на координацію рухів та м'язовий тонус тварин у ротарод-тесті ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Доза, мг/кг	Загальна тривалість утримання, с	Кількість тварин, що впали з ротароду, абс/%			
			До 1 хв	До 2 хв	До 3 хв	До 4 хв
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	-	$144,3 \pm 5,6$	0/0%	1/16,7%	5/83,5%	6/100%
МА-252	0,5	$145,7 \pm 3,2$	0/0%	2/33,4%	5/83,5%	6/100%

Продовж. табл. 3.9

1	2	3	4	5	6	7
МА-252	0,75	147,5 ± 4,9	0/0%	2/33,4%	5/83,5%	6/100%
	1,0	159,5 ± 5,7	0/0%	1/16,7%	4/66,8%	6/100%
МА-253	0,5	166,8 ± 4,9	0/0%	0/0%	3/50,1%	6/100%
	0,75	181,7 ± 4,4	0/0%	2/33,4%	2/33,4%	6/100%
	1,0	187,8 ± 3,9*	0/0%	0/0%	2/33,4%	6/100%
МА-254	0,5	148,5 ± 3,9	0/0%	0/0%	5/83,5%	6/100%
	0,75	169,5 ± 5,1	0/0%	0/0%	4/66,8%	6/100%
	1,0	169,8 ± 3,2	0/0%	0/0%	4/66,8%	6/100%
МА-255	0,5	161,7 ± 4,8	0/0%	0/0%	4/66,8%	6/100%
	0,75	163,7 ± 3,8	0/0%	0/0%	4/66,8%	6/100%
	1,0	169,5 ± 3,7	0/0%	0/0%	3/50,1%	6/100%
МА-261	0,5	147,2 ± 4,2	0/0%	1/16,7%	5/83,5%	6/100%
	0,75	141,3 ± 5,1	0/0%	2/33,4%	5/83,5%	6/100%
	1,0	147,8 ± 5,2	0/0%	1/16,7%	5/83,5%	6/100%
Гідазепам	1,0	148,3 ± 4,9	0/0%	1/16,7%	5/83,5%	6/100%

Примітка: * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.

Таким чином, в ході проведення дослідження за допомогою ротарод-тесту встановлено, що тварини дослідних груп тримались на рівні з контрольною, більше того введення МА-253 в дозі 1 мг/кг суттєво підвищувало тривалість знаходження на приладі [183]. Результати дозволяють зробити висновок про відсутність негативного впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на м'язовий тонус та координацію рухів мишей.

3.3.4 Дослідження впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на поведінкові реакції дослідних тварин в тесті «відкритого поля»

Тест «відкритого поля» має велике значення для оцінки спонтанної рухової активності. Він дозволяє досліджувати природну поведінку гризунів у новому середовищі, що є важливим для розуміння їхньої реакції на стрес, тривогу та інші впливи [184].

Результати впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на рухову активність гризунів відображені на рис. 3.17. Статистично значущої різниці в кількості перетинань відкритого поля між групами тварин, які отримували досліджувані речовини МА-252 у дозі 0,5 мг/кг, МА-254, МА-255 та МА-261 у межах досліджуваних доз, не спостерігалось. Крім того, у дозі 0,5 мг/кг у всіх зазначених групах цей показник був майже таким самим, як у контрольній групі ($p > 0,05$). Рухова активність мишей, яким вводили МА-252 у дозах 0,75 мг/кг та 1 мг/кг, підвищувалась на 17% ($p < 0,05$) та 31% ($p < 0,01$) відповідно (порівняно з контрольною групою). Кількість перетнутих квадратів у тварин, які отримували МА-253, зростала з підвищенням дози: на 23% у дозі 0,5 мг/кг, 25% — 0,75 мг/кг та 31% — 1 мг/кг, ці зміни були статистично значущими ($p < 0,01$). Варто відзначити, що цей показник у групах мишей, які отримували МА-252 та МА-253 у найбільшій досліджуваній дозі, не відрізнявся від показника у групі тварин, яким вводили гідазепам у дозі 1 мг/кг, де він був на 22% вищим, ніж у контрольній групі [185].

Кількість перетнутих квадратів використовується як показник рівня рухової активності для оцінки ефектів седативних або анксиолітичних засобів, а також рівня занепокоєння у тварин [186]. Наприклад, Starchenko та співавтори [187] виявили, що екстракт вересу збільшував кількість перетнутих квадратів у тесті «відкритого поля», одночасно стимулюючи емоційну складову поведінки мишей. Вивчення впливу екстрактів кропиви собачої в комбінації з амінокислотами показало, що найактивнішими були екстракти кропиви собачої в комплексах з валіном, гліцином, аргініном і цистеїном, які

підвищували рухову та пошукову активність піддослідних щурів, знижуючи при цьому показники емоційного стану тварин [188]. Дослідження психо- та нейротропних властивостей нових 3-(NR,R'-амінометил)-2-метил-1Н-хінолін-4-онів показало, що деякі сполуки, зокрема сполука під шифром 2с, зменшували кількість перетинань, вказуючи на слабку седативну дію на мишей, тоді як інші, такі як 2g та 2f, проявляли стимулюючу дію, підвищуючи рухову активність [137]. Класичний анксиолітик бензодіазепінового ряду діазепам у дозі 1,5 мг/кг знижував показники загальної локомоції та дослідницької діяльності [189]. Проте інше дослідження діазепаму у цій же дозі показало відсутність впливу на кількість перетнутих квадратів; зниження цього показника спостерігали при дещо вищій дозі — 2-3 мг/кг [190].

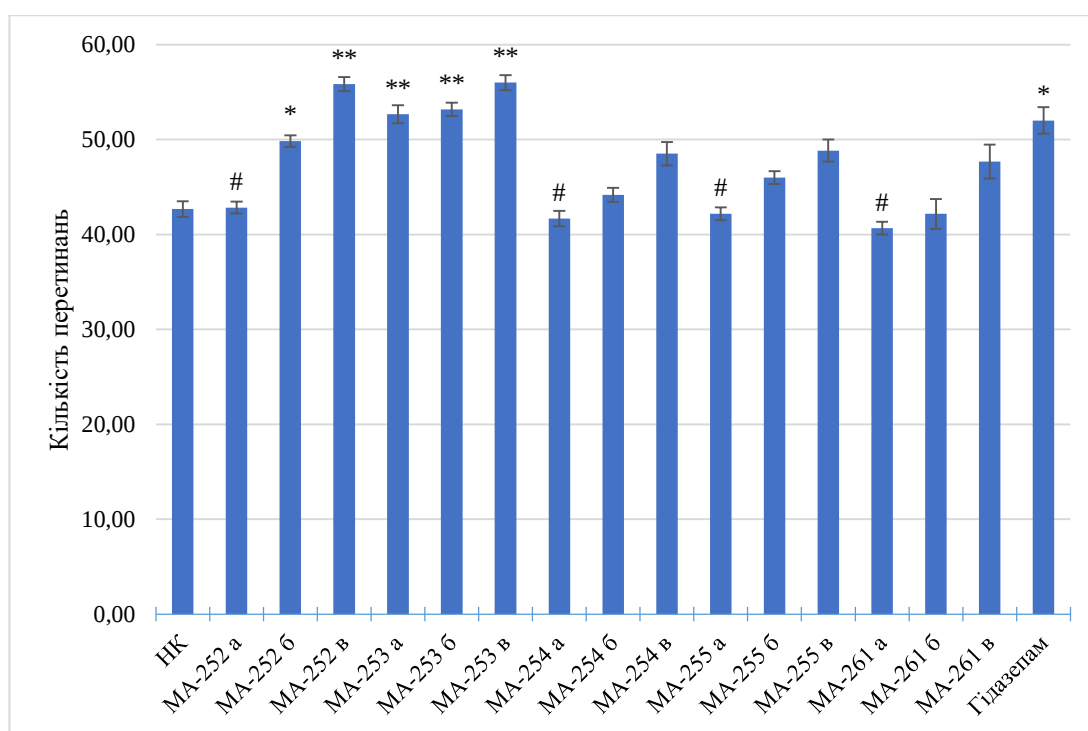


Рис. 3.17 Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на локомоторну активність гризунів в тесті «відкритого поля». *Примітки:* а – у дозі 0,5 мг/кг; б – в дозі 0,75 мг/кг; в – у дозі 1 мг/кг; * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$; ** – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,01$. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що

отримувала гідазепам, $p < 0,05$; ## – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,01$.

Проявом орієнтовно-дослідницької діяльності мишей є кількість вертикальних стійок, що оцінюється як природна поведінка тварини для орієнтування у просторі та оцінки навколишньої ситуації [191]. Як видно з отриманих результатів (рис. 3.18 А), тварини контрольної групи не дуже активно приймали позу з опорою на задні лапи. Найбільшу кількість стійок спостерігали у дослідних групах, які отримували похідні МА-253 та МА-255 у дозі 1 мг/кг, а також у групі, що отримувала препарат порівняння гідазепам. Різниця між цими групами та контролем виявилась значущою ($p < 0,05$). Kuniishi та співавтори [190] виявили, що кількість вертикальних стійок зменшувалась після введення діазепаму, проте зростала під час інтенсивного освітлення, що свідчить про анксиогенну дію у гризунів. Результати іншого дослідження [187] показали, що екстракт вересу звичайного стимулював орієнтовно-дослідницьку активність тварин, тоді як екстракт валеріани лікарської зменшував вертикальну складову орієнтовної активності, що вказує на гальмівний ефект на ЦНС тварин.

Іншим різновидом орієнтовно-дослідницької поведінки гризунів вважається кількість заглядань в нірки, що представляє прояв ніркового рефлексу тварини та відображає її здатність досліджувати простір [191]. Отримані результати впливу на даний показник (рис. 3.18 Б) продемонстрували зростання кількості обстежених нірок у багатьох досліджуваних групах, однак значущі зміни спостерігали лише в групах, які отримували похідне МА-253 та гідазепам у дозі 1 мг/кг. Загалом вважається, що занепокоєння пригнічує прагнення тварин досліджувати нове середовище, тоді як, навпаки, менш занепокоєні тварини досліджуватимуть його порівняно інтенсивніше [192].

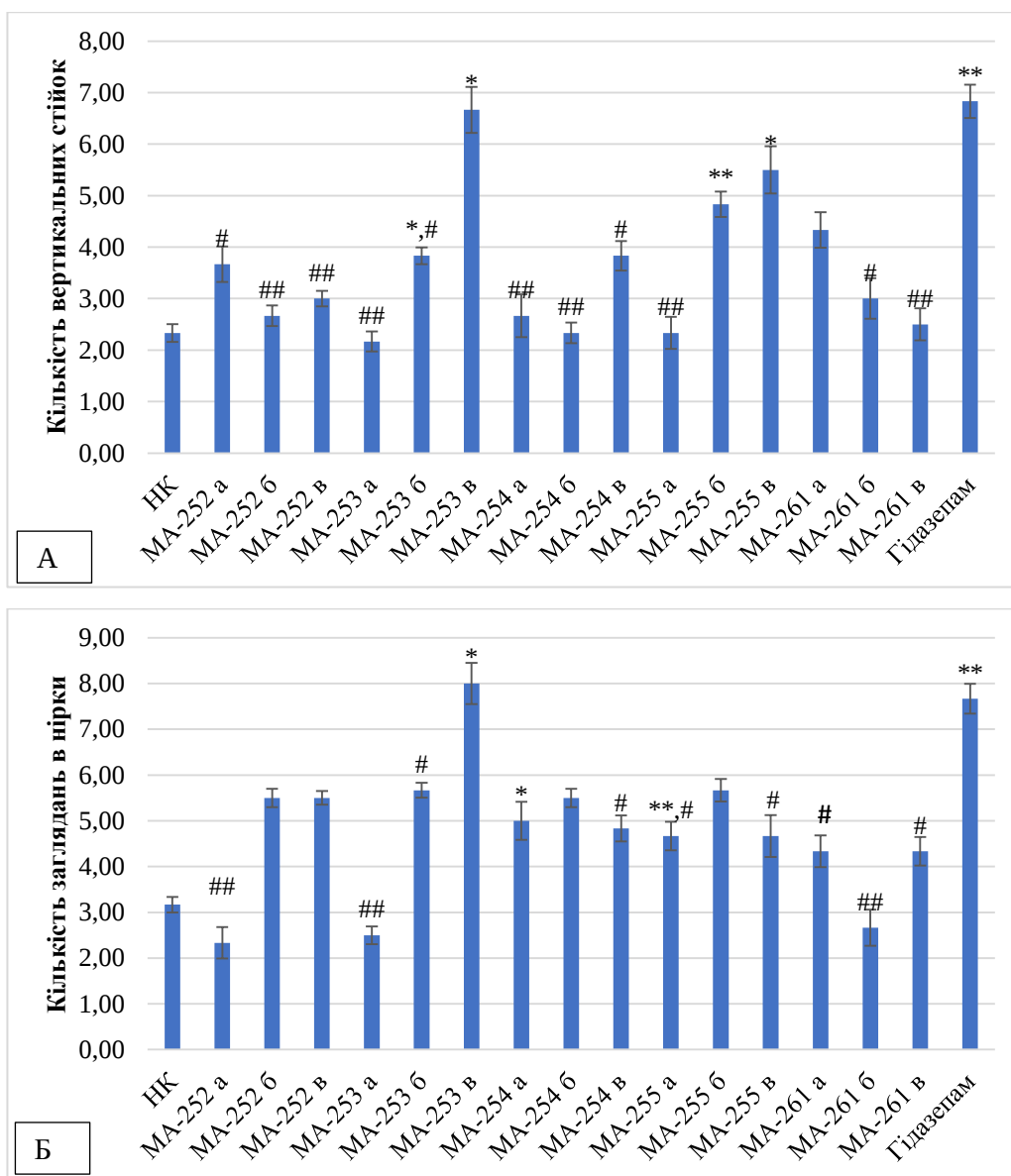


Рис. 3.18 Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на орієнтовно(А)-дослідницьку(Б) активність гризунів в тесті «відкритого поля». *Примітки:* а – в дозі 0,5 мг/кг; б – в дозі 0,75 мг/кг; в – в дозі 1 мг/кг; * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$; ** – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,01$. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,05$; ## – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,01$.

Важливим аспектом дослідження є визначення впливу нових похідних 1,2,3-триазолобензодіазепінів на емоційну компоненту поведінкових реакцій досліджуваних тварин у тесті «відкритого поля» (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на
емоційний стан тварин під час тесту «відкритого поля» ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Кількість дефекацій	Кількість уринацій	Кількість вмивань	Сума показників емоційного стану
Контроль	-	$2,17 \pm 0,22$	$0,00 \pm 0,00$	$1,67 \pm 0,14$	$3,83 \pm 0,29$
МА-252	0,5	$1,17 \pm 0,13$	$0,50 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,14$	$2,33 \pm 0,14$
	0,75	$0,83 \pm 0,13$	$0,50 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,09^{**}$	$1,67 \pm 0,09^{*}$
	1,0	$0,50 \pm 0,09^{*}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,50 \pm 0,09^{*}$	$1,00 \pm 0,15^{**}$
МА-253	0,5	$1,83 \pm 0,25$	$0,50 \pm 0,09$	$0,50 \pm 0,14^{*}$	$2,83 \pm 0,32$
	0,75	$0,50 \pm 0,09^{*}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00^{**}$	$0,50 \pm 0,09^{**}$
	1,0	$0,17 \pm 0,07^{*,\#}$	$0,17 \pm 0,07$	$0,00 \pm 0,00^{**}$	$0,33 \pm 0,09^{**,\#}$
МА-254	0,5	$0,83 \pm 0,13$	$0,50 \pm 0,14$	$0,50 \pm 0,09^{*}$	$1,83 \pm 0,27$
	0,75	$1,33 \pm 0,14$	$0,50 \pm 0,14$	$0,17 \pm 0,07^{**}$	$2,00 \pm 0,30$
	1,0	$0,33 \pm 0,09^{*}$	$0,17 \pm 0,07$	$0,33 \pm 0,09^{**}$	$0,83 \pm 0,13^{**}$
МА-255	0,5	$1,00 \pm 0,15$	$0,67 \pm 0,14$	$0,33 \pm 0,09^{**}$	$2,00 \pm 0,24$
	0,75	$0,67 \pm 0,14^{*}$	$0,00 \pm 0,00$	$0,67 \pm 0,14$	$1,33 \pm 0,25^{*}$
	1,0	$0,83 \pm 0,19$	$0,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,15$	$1,83 \pm 0,25$
МА-261	0,5	$1,50 \pm 0,25$	$0,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,11$	$2,50 \pm 0,35$
	0,75	$1,50 \pm 0,23$	$0,33 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,09^{*}$	$2,50 \pm 0,27$
	1,0	$0,83 \pm 0,13$	$0,00 \pm 0,00$	$0,83 \pm 0,13$	$1,67 \pm 0,20^{*}$
Гідазепам	1,0	$1,00 \pm 0,11$	$0,33 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,14$	$2,00 \pm 0,24$

Примітки:

1. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.

2. ** – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,01$.
3. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,05$.

Суттєвих змін вегетативних показників поведінки, зокрема кількості уринацій, у всіх дослідних групах порівняно з контрольними тваринами не спостерігалось. Проте у групах гризунів, яким вводили похідне МА-253 у дозах 0,75 мг/кг та 1 мг/кг, МА-252 та МА-254 у дозі 1 мг/кг, МА-255 у дозі 0,75 мг/кг, кількість дефекацій була меншою.

Грумінг у гризунів вважається адаптивною поведінкою при стресі та захисною реакцією відволікання [191, 193]. Результати наших досліджень не демонструють дозозалежного ефекту досліджуваних сполук, проте спостерігається істотне зменшення кількості вмивань у групах тварин, які отримували похідне МА-253 та МА-254 у всіх досліджуваних дозах, МА-252 у дозах 0,5 мг/кг та 0,75 мг/кг, МА-255 у дозі 0,5 мг/кг та МА-261 у дозі 0,75 мг/кг, порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$).

При аналізі суми показників емоційного стану тварини встановлено, що введення похідних МА-252 та МА-253 в дозах 0,75 мг/кг та 1 мг/кг, МА-254 та МА-261 в дозі 1 мг/кг, а також МА-255 в дозі 0,75 мг/кг впливає на даний інтегральний індекс, суттєво знижуючи його в порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Часте і коротке за часом «умивання» вважається тривожним грумінгом, а високий рівень дефекації водночас додатково вказує на тривожність тварини, її занепокоєння і страх. Зменшення емоційних показників поведінкових реакцій на тлі введення досліджуваних похідних може свідчити про зменшення рівня стривоженості та емоційного напруження гризунів в умовах використаного тесту.

Таким чином, встановлено, що найвиразніші зміни здійснює похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг, яке призводить до збільшення рухової та орієнтовно-дослідницької активності, при цьому зменшується сума емоційних проявів у тварин, що за характером впливу є подібним до препарату порівняння

гідазепаму. Така поведінка мишей може свідчити про зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження тварин.

Висновки до розділу 3

1. За результатами оціночних значень молекулярного докінгу нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора було виявлено, що найкращі енергетично вигідні позиції мали *S*-енантіомери. Згідно обчислених оціночних значень та детального аналізу локації було знайдено перспективну для експериментальних досліджень молекулу-хіт **2-S** (МА-253), яка мала вищі абсолютні значення скорингової функції порівняно з діазепамом і гідазепамом.

2. Результати досліджень *in vitro* свідчать про безпечність застосування 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів без значного ризику цитотоксичних або фототоксичних реакцій та генотоксичних ефектів, що є важливим для їх клінічного застосування.

3. Проведено скринінгове дослідження анксіолітичної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тестах піднесеного хрестоподібного лабіринту і темно-світлої камери та виявлено 3 з них (МА-252, МА-253 і МА-254 у дозі 1 мг/кг) з найвиразнішим ефектом.

4. В умовах тестів примусового плавання за Порсолт та «підвіщування за хвіст» встановлено, що похідні МА-253, МА-254 і МА-255 у дозах 1 мг/кг демонструють наявність вираженої антидепресивної активності, зменшуючи загальну тривалість нерухомості дослідних тварин.

5. При відтворенні тестів вертикальної сітки та «стержня, що обертається» не виявлено негативного впливу похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на координацію рухів, встановлено легкий міорелаксантийний ефект у деяких із них.

6. Найвиразніші зміни у тесті ВП здійснює похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг, яке призводить до збільшення рухової та орієнтовно-дослідницької активності, зменшення суми емоційних проявів у тварин, що може свідчити про зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження гризунів.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712> (Scopus, quartile 1)

2. Botsula I.V., Kireyev I.V., Koshovyi O.M., Chebanov V.A. The influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the muscle tone of rodents. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 217-222. URL: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.3.287999>.

3. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Кошовий О.М., Мазур М.О., Чебанов В.А. Поведінкові реакції гризунів після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тесті «відкритого поля». *Фармацевтичний часопис*. 2023. № 4. С. 70–77. URL: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.4.14297>.

4. Botsula I.V., Kireyev I.V., Mazur M.O., Chebanov V.A. The study of antidepressant properties of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *News of pharmacy*. 2024. № 1 (107). P. 136-143. URL: <https://doi.org/10.24959/nphj.24.144>.

5. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4H-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність: Патент України на корисну модель №155538: МПК:

A61K 31/5513 (2006.01); A61K 31/4192 (2006.01); A61P 25/22 (2006.01). Заяв. 25.09.2023; Опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10.

6. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність: Патент України на корисну модель №156108: МПК: A61K 31/5513 (2006.01); A61K 31/4192 (2006.01); A61P 25/22 (2006.01). Заяв. 01.12.2023; Опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19.

7. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Mazur M. O., Chebanov V. A. Influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives on spontaneous locomotor activity of rodents. «*Medicines for humans. Modern issues of pharmacotherapy and drugs prescription*»: materials VII International scientific-practical conference, Kharkiv, 21-22 March 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.13-14.

8. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Chebanov V. A. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on rodent muscle tone. Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку [Електронний ресурс] : тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, м. Одеса, 9–12 квітня 2024. Одеса: ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 324.

9. Botsula I. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the rodent coordination of movements. *Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024* : зб. тез доповідей 84 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 23 - 24 травня 2024 р. Запоріжжя : ЗДМФУ, 2024. с. 124-125.

РОЗДІЛ 4

ВИЗНАЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СПОЛУК- ЛІДЕРІВ СЕРЕД НОВИХ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4- БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ

Тривога та страх є еволюційними механізмами самозахисту та виживання в доповнення до ноцицептивної системи, яка виконує адаптаційно-обмежувальну функцію [194]. Вважається, що існує зворотний зв'язок між хронічним больовим синдромом і формуванням тривоги, депресії та порушення сну: для корекції цих станів необхідно комбінувати анальгетики та анксиолітики [195, 196]. ГАМК-А рецептори та рецептори гліцину є важливими компонентами спинального контролю ноцицепції та болю. Дисфункція цих двох систем передачі сприяє виникненню хронічних больових станів. Відновлення їх належної функції за допомогою позитивних алостеричних модуляторів повинно бути раціональним підходом до лікування хронічних больових синдромів, включаючи зниження гальмівного контролю спинального болю [197].

4.1 Вивчення аналгетичної активності сполук-лідерів методами гарячої пластини та оцтовокислих корчів

Гострий біль легко моделюється в експериментальних умовах як фізіологічна або поведінкова реакція на шкідливі подразники або пошкодження тканин [198]. Методи термічної ноцицептивної стимуляції є ключовими при вивченні аналгетичної активності в експериментах, надаючи можливість оцінювати ефективність потенційних знеболювальних засобів. Проте, варто зазначити, що методи термічної ноцицептивної стимуляції, включаючи тест гарячої пластини, не відображають повною мірою вісцеральний біль або ноцицепцію опорно-рухового апарату. Термостимуляція шкіри активує специфічні ланки ноцицептивної системи,

такі як терморцептори і ноцицептори, а також, можливо, рецептори «парадоксального холоду» [194, 199]. Тест гарячої пластини зазвичай використовується для оцінки центрального компонента анальгезії та є базовим методом для вимірювання порогу больової чутливості і потенційного анальгезуючого ефекту фармакологічних засобів у відповідь на термічне роздратування [200]. Облизування лап вважається швидкою реакцією на ноцицептивні термічні подразники та характеристикою больового порогу [201]. Стрибки характеризують більш складну реакцію із затримкою та включають емоційний компонент втечі [141].

Отримані в ході дослідження результати вивчення анальгетичної активності досліджуваних похідних наведені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Анальгетична активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепів у тесті «гаряча пластина» ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Доза, мг/кг	Час виникнення дискомфорту (секунди) / Анальгетична активність (%) по відношенню до [контролю] та (препарату порівняння) після введення через				
		30 хв	60 хв	120 хв	180 хв	240 хв
1	2	3	4	5	6	7
Контроль	-	$10,6 \pm 0,5$	$10,6 \pm 0,8$	$10,8 \pm 0,6$	$10,4 \pm 0,7$	$9,8 \pm 0,5$
МА-252	0,75	$11,3 \pm 0,5$ [7,1] (-25,8)#	$12,3 \pm 0,6$ [15,7] (-23,5) #	$11,8 \pm 1,2$ [6,6] (-29,1) #	$10,7 \pm 0,9$ [2,6] (-23,3) #	$11,2 \pm 0,8$ [14,3] (-5,0)
	1	$11,9 \pm 1,0$ [12,1] (-22,3) #	$13,1 \pm 0,8$ [23,3] (-18,5) #	$14,0 \pm 0,8$ [27,0]* (-15,5) #	$11,8 \pm 0,6$ [13,1] (-15,3)	$10,3 \pm 0,7$ [5,5] (-12,3)

1	2	3	4	5	6	7
МА-253	0,75	12,2 ± 1,2 [15,4] (-20,0)	13,2 ± 1,4 [24,7] (-17,6)	13,6 ± 0,8 [22,8]* (-18,4) #	12,2 ± 0,7 [17,1] (-12,4)	12,5 ± 0,8 [27,6]* (6,1)
	1	15,2 ± 0,2 [43,5]* (-0,5)	15,8 ± 0,3 [49,1]* (-1,5)	17,2 ± 0,5 [55,7]* (3,5)	15,1 ± 0,7 [45,4]* (8,8)	13,3 ± 0,7 [36,7]* (13,6)
МА-254	0,75	12,9 ± 0,5 [22,0]* (-15,4) #	11,8 ± 0,5 [11,3] (-26,4) #	11,6 ± 0,5 [4,7] (-30,4) #	11,0 ± 0,5 [5,4] (-21,1) #	10,0 ± 0,4 [2,9] (-14,5) #
	1	12,2 ± 0,7 [15,6] (-19,9) #	13,3 ± 1,3 [25,8] (-16,8)	15,0 ± 1,5 [35,7]* (-9,7)	12,9 ± 1,1 [23,9] (-7,3)	11,7 ± 1,0 [19,8] (-0,4)
МА-255	0,75	11,7 ± 0,8 [10,1]* (-23,7) #	11,7 ± 0,8 [12,1] (-27,1) #	10,8 ± 0,7 [0,2] (-33,4) #	9,5 ± 0,5 [0,8] (-24,6) #	9,2 ± 0,5 [1,0] (-16,0) #
	1	11,7 ± 0,7 [10,6] (-23,4) #	11,3 ± 0,3 [6,6] (-29,5) #	10,5 ± 0,4 [-0,5] (-33,8) #	9,7 ± 0,4 [0,3] (-24,9) #	9,2 ± 0,4 [2,2] (-15,0) #
Диклофен ак натрію	8	16,3 ± 0,5 [53,9]* (6,7)	16,7 ± 0,4 [57,4]* (4,1)	18,0 ± 0,6 [62,7]* (8,2)	14,5 ± 0,5 [39,7]* (4,6)	12,7 ± 0,2 [30,2]* (8,2) #
Метамізол	50	15,3 ± 0,2 [44,3]*	16,0 ± 0,3 [51,3]*	16,9 ± 0,2 [53,1]*	13,9 ± 0,1 [33,7]*	11,8 ± 0,3 [20,3]*

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала метамізол.

В результаті проведених фармакологічних досліджень встановлено, що серед нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів найбільш виражену анальгетичну активність в умовах тесту гарячої пластини проявляє МА-253 в дозі 1 мг/кг. Латентний період реакції на термічний подразник у групі, що отримувала дане похідне, через 30 хв після його введення був вищим на 43,5%, через 60 хв - на 49,1% в порівнянні з групою контролю. Час відповіді гризунів досягнув піку через 120 хв після введення МА-253 та сягав 17,2 с в середньому по групі, що на 55,7% вище за відповідну реакції у групі контролю. Анальгетична активність нового похідного через 180 хв зростала на 45,4%, та через 240 хв – на 36,7% проти групи контролю. Більше того цікавим виявилось спостереження, що латентний період в цих досліджуваних часових точках був вищим за показник у групах гризунів, котрі отримували диклофенак натрію чи метамізол, хоч різниця і була статистично незначущою. Максимальний анальгетичний ефект при застосуванні диклофенаку натрію та метамізолу відзначали через 2 години після їх введення дослідним тваринам, де він становив в середньому 18 та 16,9 с відповідно, що на 62,7% та 53,1% вище проти групи контролю.

Тільки через 120 хв після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252 та МА-254 в дозах 1 мг/кг відзначали достовірне зростання періоду з моменту поміщення дослідної тварини на гарячу поверхню приладу до появи поведінкової реакції на термічний стимул, де він сягав 14,0 с та 15,0 с відповідно ($p < 0,05$ проти контролю). Час відповіді тварини після введення МА-255 не відрізнявся від такого в порівнянні з групою контролю.

Результати проведеного експерименту свідчать про збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче подразнення

терморцепторів кінцівок мишей під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та наявність вираженого аналгетичного ефекту на тлі введення МА-253.

Для вивчення аналгетичної активності також відтворювали модель периферичного болю «оцтовокислих корчів» [202, 203]. Внутрішньоочеревинне введення розчину оцтової кислоти призводить до підвищення загальної активності ноцицептивної системи та локальне вивільнення брадикініну, серотоніну, гістаміну, простагландинів і лейкотриєнів, що призводить до розвитку мимовільних скорочень черевних м'язів живота, що супроводжуються витягуванням задніх кінцівок та вигинанням спини. Результати дослідження представлені в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Вплив досліджуваних похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на моделі «оцтовокислих корчів» ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Доза, мг/кг	Кількість корчів	Аналгетична активність до контролю, %
1	2	3	4
Контроль		$70,5 \pm 1,6$	-
МА-252	0,75	$59,8 \pm 4,8$ #,&	15,1
	1	$39,3 \pm 2,6$ *,#,&	44,2
МА-253	0,75	$57,0 \pm 1,8$ *,#,&	19,1
	1	$18,2 \pm 1,2$ *,#	74,2
МА-254	0,75	$53,3 \pm 3,9$ *,#,&	24,3
	1	$51,5 \pm 3,9$ *,#,&	27,0
МА-255	0,75	$70,0 \pm 3,0$ #,&	0,7

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4
МА-255	1	$69,7 \pm 2,3$ ^{#,&}	1,2
Метамізол натрію	50	$8,5 \pm 1,5$ *	87,9
Диклофенак натрію	8	$26,3 \pm 7,3$ *	62,6

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала метамізол.
3. & Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала диклофенак натрію.

У тесті «корчі, викликані оцтовою кислотою» знеболювальний ефект виражається у значному зменшенні проявів специфічної реакції на хімічне подразнення – кількості «корчів» порівняно з больовою чутливістю тварин контрольної патологічної групи. Відповідно до результатів, отриманих у цьому дослідженні, слід зазначити, що похідні під шифром МА-252 у дозі 1 мг/кг, МА-253 та МА-254 у дозах 0,75 та 1 мг/кг продемонстрували потенційне зниження кількості корчів порівняно з контрольною групою. Крім того, похідне МА-253 у дозі 1 мг/кг, як і препарати порівняння метамізол та диклофенак натрію, виявляло значний знеболювальний ефект, що становив 74,2 %, розрахований за формулою (2.4). Аналгетична активність диклофенаку натрію в цьому тесті становила 62,6 %, а метамізолу — 87,9 %.

Результати проведеного експерименту свідчать про зменшення кількості корчів на тлі МА-252, МА-253 та МА-254, що може свідчити про наявність аналгетичного ефекту в умовах даного тесту. Похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг

проявив значну аналгетичну активність, вищу за таку у тварин на тлі диклофенаку натрію та дещо нижчу, ніж у тварин, що отримували метамізол.

4.2 Визначення антигіпоксичної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів

Антигіпоксична активність характеризує здатність захищати клітини і тканини від шкідливого впливу низького рівня кисню. Бензодіазепіни можуть підвищити стійкість клітин до гіпоксії, потенційно роблячи їх важливими для лікування станів з наявною кисневою недостатністю. Їхня здатність модулювати різні біохімічні шляхи допомагає пом'якшити несприятливі наслідки гіпоксії, що робить їх цінними в медицині, де дефіцит кисню викликає занепокоєння [204].

Гіпоксія є критичним механізмом пошкодження ЦНС, коли підвищується продукція вільних радикалів, що, в свою чергу, пошкоджують клітинні мембрани, білки та ДНК, виникає метаболічний дисбаланс за рахунок накопичення молочної кислоти та зниження рН в клітинах, з'являється енергетичний дефіцит у зв'язку з відсутністю АТФ, накопичується кальцій в нейронах, спричинаючи активацію протеаз, а також вивільняються прозапальні медіатори. Ці процеси призводять до некрозу або апоптозу нейронів, що є основою багатьох неврологічних розладів. Тому доцільно на доклінічному етапі вивчити вплив нових 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних анксиолітичних засобів на чутливість головного мозку до нестачі кисню [147].

З питань біоетики вивчення антигіпоксичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів проводили у дозі 1 мг/кг, що показала себе як умовнотерапевтична доза у скринінгових фармакологічних дослідженнях. Результати наведені в табл. 4.3.

Таблиця 4.3

**Антигіпоксична активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на моделі гострої нормобаричної гіперкапнічної гіпоксії
($M \pm m$, n=6)**

Група	Доза, мг/кг	Середня тривалість життя мишей, хв	Антигіпоксична активність до контролю(%)
Контроль	-	$10,7 \pm 0,5$	-
МА-252	1	$11,2 \pm 0,8$	4,4
МА-253	1	$12,5 \pm 1,0$	17,0
МА-254	1	$13,5 \pm 0,4$ *	26,2
МА-255	1	$12,2 \pm 1,5$	13,4
Пірацетам	200	$15,4 \pm 1,5$ *	43,2

Примітка: * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

За умов нормобаричної гіпоксичної гіпоксії похідні МА-252, МА-253 та МА-255 не проявили антигіпоксичних властивостей. Однак у тварин, що отримували МА-254 у дозі 1 мг/кг, тривалість життя тварин в умовах реалізованої моделі подовжувалась на 26,2% відносно інтактного контролю ($p < 0,05$), що можна розцінити як потенційний антигіпоксичний ефект. Пірацетам проявляє виразну антигіпоксичну дію, пролонгуючи тривалість життя піддослідних тварин порівняно з контрольною групою в середньому на 43,2 %.

Таким чином, досліджувані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не продемонстрували антигіпоксичні властивості на моделі нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією.

Висновки до розділу 4

1. В умовах тесту гарячої пластини визначено збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче подразнення терморецепторів кінцівок щурів під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та наявність вираженого аналгетичного ефекту на тлі введення МА-253.

2. Результати тесту «оцтовокислих корчів» свідчать про зменшення кількості реакцій на тлі МА-252, МА-253 та МА-254, що може свідчити про наявність аналгетичного ефекту в умовах даного тесту. Похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг проявив значну аналгетичну активність, вищу за таку у тварин на тлі диклофенаку натрію та дещо нижчу, ніж у тварин, що отримували метамізол.

3. За результатами біологічних досліджень на антигіпоксичну дію встановлено, що досліджувані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів не продемонстрували антигіпоксичні властивості на моделі нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією. Введення похідного МА-254 у дозі 1 мг/кг збільшувала тривалість життя мишей на 26,2% відносно контролю.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. *«Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів»* : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

2. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.296-297.

РОЗДІЛ 5

ВИЗНАЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СПЛУК- ЛІДЕРІВ СЕРЕД НОВИХ ПОХІДНИХ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4- БЕНЗОДІАЗЕПІНІВ, ЗАВАНТАЖЕНИХ В НАНОВОЛОКНА

Багато дослідницьких робіт і ресурсів було спрямовано на пошук нових анксиолітичних агентів і систем доставки ліків (СДЛ) для онкологічних пацієнтів, щоб посилити цільову доставку ліків, зменшити їх побічні ефекти ліків і забезпечити знеболювальну дію [205–207]. Показано, що полімерні нановолокна, наповнені активними фармацевтичними інгредієнтами (АФІ), підвищують швидкість розчинення АФІ та покращують його транспортування (всмоктування) через кишкову стінку [207, 208]. Головною перевагою технології ЕП є можливість злиття малорозчинних речовин, завантажених у нановолокна, для посилення вивільнення ліків і біодоступності [209, 210]. ЕП використовує електростатичний потенціал, що характеризується високою напругою та дуже низьким струмом для створення надтонких волокон [211, 212]. Такі нановолокна, отримані за допомогою ЕП, мають винятково велике співвідношення площі поверхні до об'єму та діаметр волокна в субмікронному діапазоні (зазвичай 50-500 нм) [213, 214]. Таким чином, такі СДЛ на основі електропряденого нановолокна можуть бути рецептурою вибору для сучасних нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів для покращення їх розчинення, пероральної біодоступності та терапевтичної ефективності [149, 215].

5.1 Морфологія поверхні та фізичний стан нановолокон, створених за допомогою ЕП

Гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ) було обрано як полімер-носій для створення багатошарових нановолокнистих матів із завантаженням ліків у процесі ЕП. Параметри для ЕП підбирали для кожного розчину з похідним

1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну окремо з метою створення стабільного конусу Тейлора (табл. 2.2).

Для вивчення розміру (діаметра) електропрядених нановолокон і морфології поверхні та топології відповідного нановолокнистого мату було використано зображення сканувального електронного мікроскопу. Як видно на рис. 5.1, існувала лише незначна різниця у зовнішньому вигляді та розмірі волокна між еталонними (без навантаження) ГПМЦ нановолокнами (рис. 5.1A) і нановолокнами, завантаженими МА-252 (рис. 5.1B) і МА-253 (рис. 5.1C).

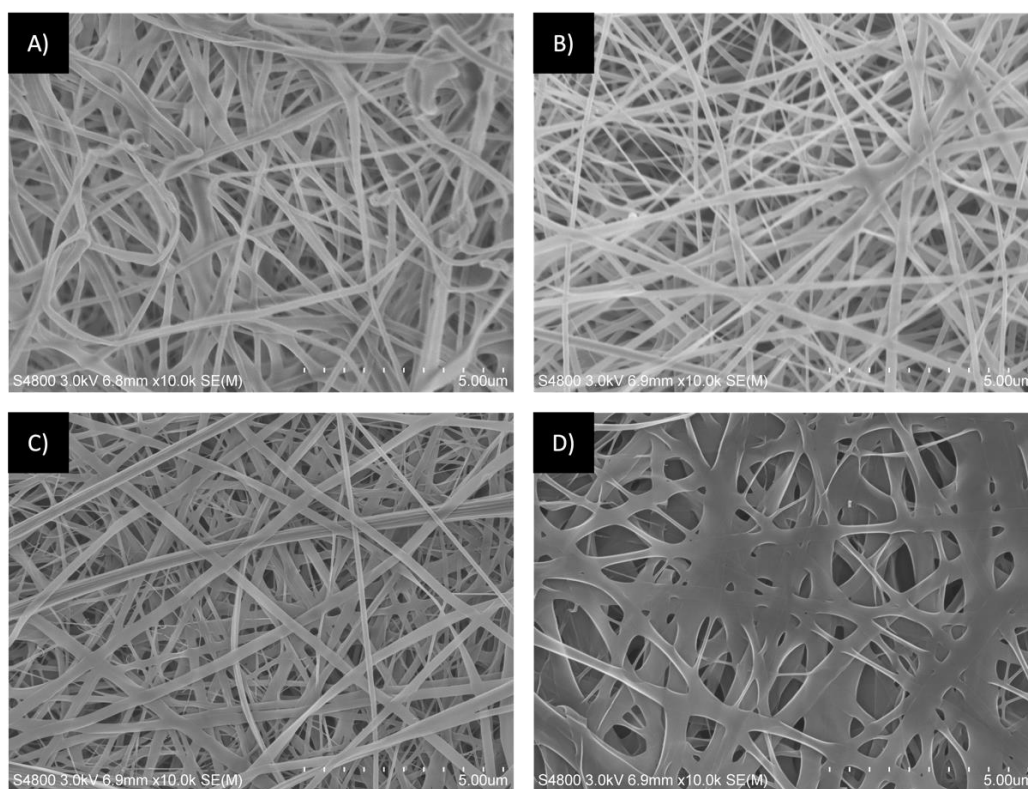


Рис. 5.1 Мікрофотографії нановолокон, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів за допомогою сканувального електронного мікроскопу. *Примітка:* (A) Еталонні (без навантаження) ГПМЦ нановолокна та ГПМЦ нановолокна, завантажені (B) МА-252, (C) МА-253 та (D) МА-254.

Усі ці мати на основі нановолокна склалися зі сферичних гладких нановолокон досить однакового розміру. Жодних пов'язаних з процесом

дефектів, таких як кульки, залишки крапель або пилкоподібні візерунки зубців, не спостерігалось (рис. 5.1А-С). Це свідчить про те, що завантаження невеликої кількості (терапевтичної дози) АФІ (МА-252 або МА-253) у ГПМЦ нановолокна, сформовані ЕП, не має особливого впливу на розмір і морфологію нановолокон. Проте у ході проведення дослідження несподівано було виявлено, що ГПМЦ нановолокна, завантажені МА-254, показали менш циліндричну/сферичну та більш плоску стрічкову структуру (рис. 5.1D). Поява таких плоских стрічкоподібних нановолоконних структур може бути пов'язана з використанням сильних електричних полів і високої концентрації полімеру в процесі ЕП [216].

На рис. 5.1 показано, що в нановолокнах, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, не було видно кристалів препарату (рис. 5.1В-С).

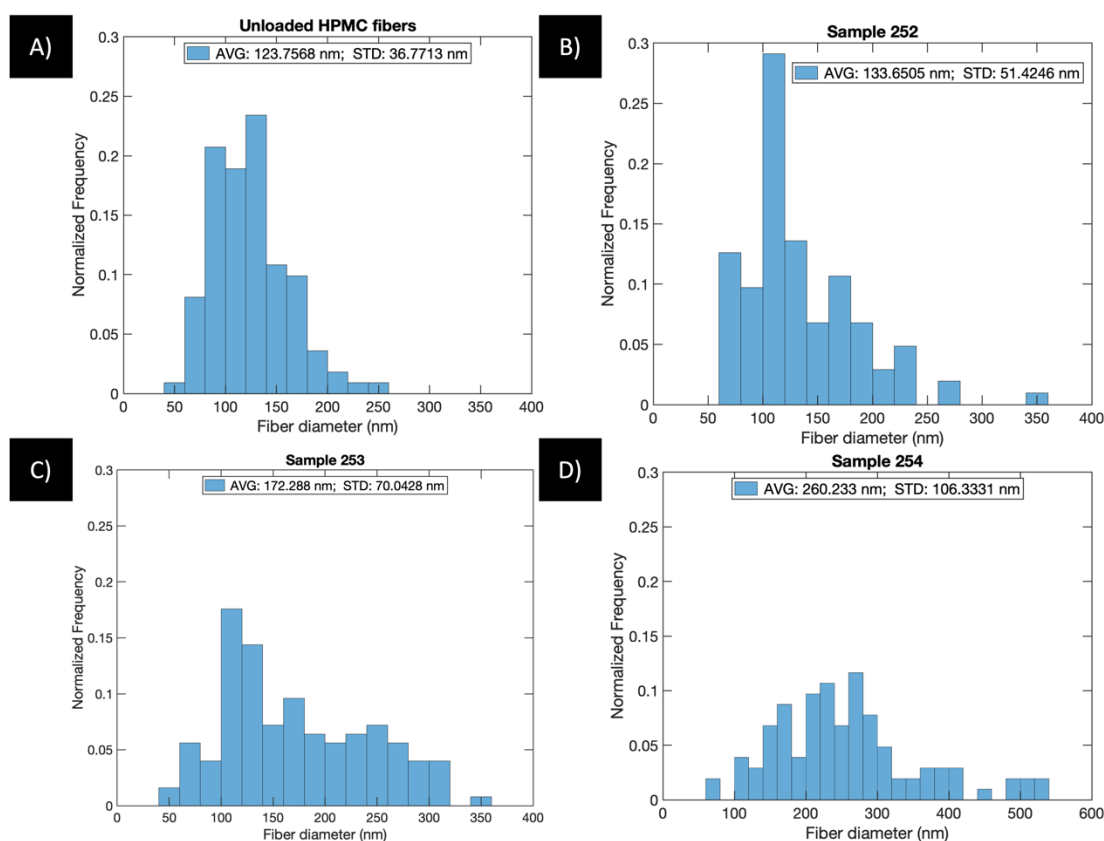


Рис. 5.2 Розмір (діаметр) і розподіл розмірів електропрядених нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів ($n = 100-200$). *Примітка:* (А) Еталонні (без навантаження) нановолокна та ГПМЦ

нановолокна, завантажені (B) MA-252, (C) MA-253 та (D) MA-254. Вимірювання розміру (діаметра) волокна базувалися на зображеннях сканувального електронного мікроскопа.

На рис. 5.2 показано розмір і розподіл за розміром ГПМЦ нановолокон, отриманих ЕП (без навантаження) (рис. 5.2A), і нановолокон, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (рис. 5.2B-D). Крім того, середній діаметр волокна (AVG) і стандартне відхилення (SD) представлені для всіх нанокомпозицій. Діаметр еталонних (ненавантажених) нановолокон НРМС та нановолокон з АФІ (MA-252, MA-253, MA-254) становив $123,8 \pm 36,7$ нм, $133,7 \pm 51,4$ нм, $172,3 \pm 70,0$ та $260,2 \pm 106,3$ нм відповідно. Результати показують великі варіації в окремих діаметрах волокон електропрядених нановолокон, завантажених MA-254. Крім того, зовнішній вигляд нановолокон, завантажених MA-254, значно відрізнявся від еталонних (незавантажених) нановолокон і від нановолокон, завантажених двома іншими похідними (як показано на рис. 5.1).

Для дослідження потенційних індукованих процесом перетворень (PITs) і взаємодії АФІ з полімером, пов'язаного з ЕП нановолокон, завантажених ними, було використано рентгеноструктурний аналіз. На рис. 5.3 показано рентгенограми похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (MA-252, MA-253 і MA-254) у формі порошку, еталонних (ненавантажених) ГПМЦ нановолокон і нановолокон, завантажених досліджуваними похідними.

Рентгенограми всіх трьох нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів у формі порошку показали численні чіткі піки, що вказує на кристалічну тверду форму. Аморфний полімер-носій (ГПМЦ) у вигляді порошку та відповідні еталонні (незавантажені) ГПМЦ нановолокна продемонстрували два широкі дифузні ореоли з максимумом приблизно $8,9^\circ 2\theta$ та $19,5^\circ 2\theta$ (рис. 5.3). Ці дві гало також були присутні в рентгенограммах електропрядених нановолокон, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Рентгенограма нановолокон, заповнених MA-254, була

подібною до тієї, що отримана з еталонними (без навантаження) нановолокнами, таким чином припускаючи, що АФІ знаходиться в аморфній формі в нановолокнах (лише крихітний дифракційний пік при $6,6^\circ 2\theta$ може спостерігатися). Рентгенограми для нановолокон, наповнених МА-252 і МА-253, показали найвищий ступінь кристалічності (11% і 8% відповідно). Рентгенограма для МА-252 показала безліч гострих дифракційних піків із різною інтенсивністю в діапазоні кутів $3^\circ 2\theta$ - $40^\circ 2\theta$. Найвиразніші дифракційні піки були присутні при $5,0^\circ 2\theta$ (17,6 Å), $9,9^\circ 2\theta$ (8,9 Å) і $20,4^\circ 2\theta$ (4,3 Å). Рентгенограма для нановолокон, заповнених МА-253, показала також численні чіткі піки в діапазоні кутів $6^\circ 2\theta$ - $21^\circ 2\theta$, що вказує на те, що АФІ знаходиться в кристалічній формі. Найпомітніші піки з'явилися при $9,4^\circ 2\theta$ (9,4 Å), $10,7^\circ 2\theta$ (8,3 Å) і $13,2^\circ 2\theta$ (6,7 Å). Таким чином, нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252 і МА-253 залишаються в кристалічному стані після процесу ЕП, тоді як тверда форма МА-254 змінюється з кристалічної форми на аморфну форму в процесі ЕП. Аморфний полімер-носіє (ГПМЦ) може бути використаний для створення електропрядених нановолокон для сучасних нових бензодіазепінів.

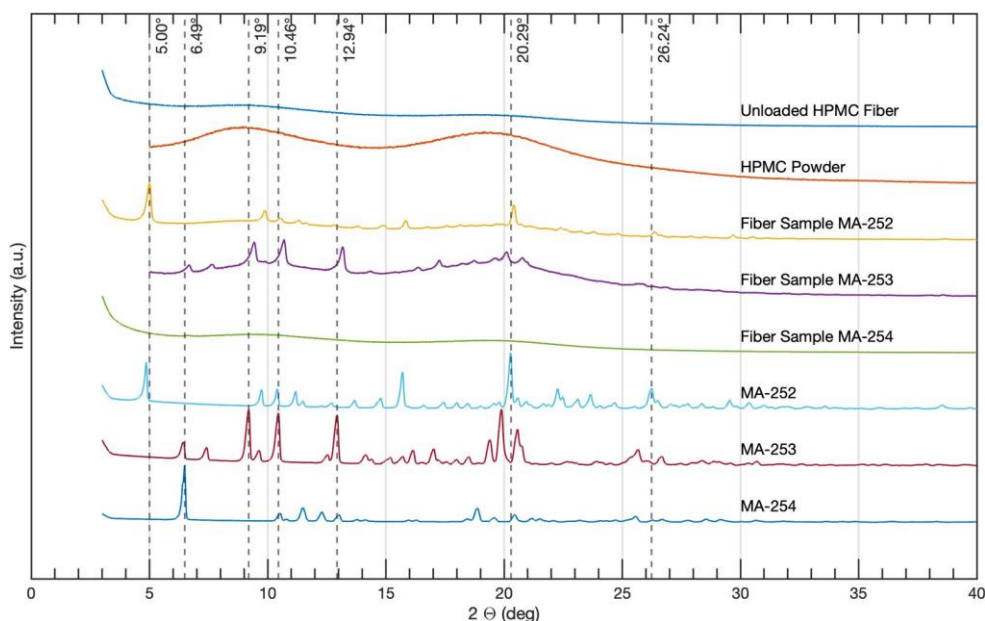


Рис. 5.3 Рентгенограми для похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254) у формі порошку, ГПМЦ у формі порошку,

еталонних (ненавантажених) ГПМЦ нановолокон та нановолокон, завантажених новими похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

Для дослідження потенційних взаємодій лікарського засобу (АФІ) та полімеру, пов'язаних із ЕП нановолокон, було використовували метод інфрачервоної спектроскопії з ослабленим повним відбиттям з перетворенням Фур'є (ATR-FTIR) [217]. На рис. 5.4 представлені ATR-FTIR-спектри для ГПМЦ у формі порошку, еталонних (ненавантажених) нановолокон ГПМЦ і нановолокон, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 або МА-254).

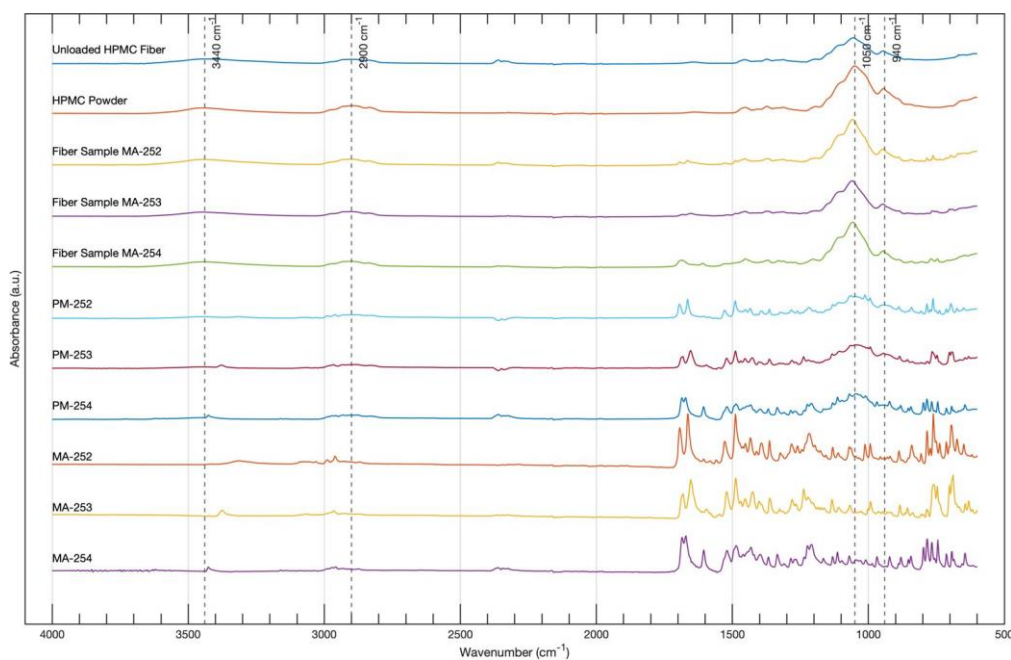


Рис. 5.4 ATR-FTIR-спектри ГПМЦ у формі порошку, еталонних (ненавантажених) ГПМЦ нановолокон, ГПМЦ нановолокон, наповнених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 або МА-254), похідними триазолобензодіазепінів (МА-252, МА-253 або МА-254) та фізичної суміші (РМ) ГПМЦ і похідного (МА-252, МА-253 або МА-254). Пунктирні вертикальні лінії вказують смуги вібрації, що представляють інтерес для ГПМЦ.

ATR-FTIR-спектри для всіх зразків показали характерні широкі смуги валентних коливань при 3400 см^{-1} і 2900 см^{-1} через валентні коливання гідроксильної групи (O–H) і метильної групи (C–H), відповідно. Смуга вібрації при 1450 см^{-1} приписується коливанням —CH_2 , а смуга коливань приблизно 1370 см^{-1} приписується вигину —OH . Найбільш інтенсивну вібраційну смугу можна побачити при 1050 см^{-1} і на плечі при 940 см^{-1} (рис. 7.4). Ці дві вібраційні смуги є характерними для ГПМЦ і пов'язані з коливаннями розтягування та згину ефірних зв'язків (C–O–C).

Смуги вібрації при приблизно 1640 см^{-1} і $600\text{--}800\text{ см}^{-1}$ відповідають смугам вібрації, що спостерігаються в спектрах чистого похідного 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну або в спектрах фізичної суміші похідного з ГПМЦ. Ці смуги вібрації є більш різкими (трохи інтенсивнішими) і множинними в спектрах нановолокон, наповнених препаратом, порівняно зі спектром еталонних (ненавантажених) нановолокон. Наявні смуги вібрації також відповідають смугам вібрації, отриманим з чистими похідними триазолобензодіазепіну та відповідними фізичними сумішами АФІ та ГПМЦ. Це свідчить про відсутність взаємодії препарат-полімер. Невеликі смуги вібрації на частоті близько 2350 см^{-1} , швидше за все, пов'язані з артефактом, спричиненим атмосферним вуглекислим газом (CO_2).

5.2 Дослідження анксиолітичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами піднесеного хрестоподібного лабіринту та темно-світлої камери

У табл. 5.1 показано вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254), на поведінку мишей у тесті піднесеного хрестоподібного лабіринту. Доза 1 мг/кг була обрана як умовнотерапевтична для похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів для введення мишам пероральним шляхом, визначена на основі результатів скринінгу фармакологічної активності до відтворення

нанотехнології. Ми припустили, що СДЛ на основі нановолокон, розроблена для перорального введення цих похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, дозволить підвищити швидкість розчинення та терапевтичний ефект цих АФІ та мінімізувати побічні ефекти. Таким чином, анксиолітичний ефект цих нових СДЛ на основі нановолокон вивчався на мишах у рамках доклінічних досліджень фармакологічної активності.

Таблиця 5.1

**Вплив СДЛ на основі нановолокон, заповнених похідними
1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на поведінкові реакції мишей у
тесті ПХЛ ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Латентний період першого входу, с	Час, проведений в центрі, с	Кількість переходів між рукавами	Кількість фекальних болюсів	Кількість уринацій
Контроль	-	$27,0 \pm 2,6$	$5,3 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$
МА-252	1,0 (о)	$50,8 \pm 3,3$ *	$9,2 \pm 0,6$	$5,2 \pm 0,2$ **, #	$0,3 \pm 0,1$ **	$0,3 \pm 0,1$
	1,0 (т)	$51,2 \pm 1,3$ *	$8,3 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,1$ **, #	$0,0 \pm 0,0$ **	$1,0 \pm 0,3$
МА-253	1,0 (о)	$62,8 \pm 1,9$ **, ##	$1,3 \pm 0,3$ *, ##	$2,0 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$ **	$0,0 \pm 0,0$
	1,0 (т)	$63,7 \pm 1,0$ **, ##	$2,0 \pm 0,4$ ##	$1,8 \pm 0,1$ [#]	$0,8 \pm 0,2$ **	$0,0 \pm 0,0$
МА-254	1,0 (о)	$32,2 \pm 1,8$ ##	$9,2 \pm 1,0$	$4,7 \pm 0,2$ **	$0,7 \pm 0,1$ **	$0,3 \pm 0,1$
	1,0 (т)	$30,7 \pm 1,7$ ##	$5,2 \pm 0,5$ *, ##	$4,2 \pm 0,2$ *	$0,5 \pm 0,1$ **	$0,5 \pm 0,1$
Гідазепам	1,0	$46,8 \pm 1,6$ *	$13,5 \pm 1,0$	$3,5 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$ **	$0,0 \pm 0,0$

Примітки:

1. Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$.
3. о – нановолокна, змішані з олеогелем;
4. т - нановолокна, розтерті з лактозою.

Ми не виявили жодної суттєвої різниці в поведінці між групами мишей, які отримували СДЛ на основі нановолокон з похідним у формі олеогелю або тритуrowаних з лактозою у тесті з припіднятим хрестоподібним лабіринтом лабіринтом (рис. 5.5, табл. 5.1). Нановолокна змішували з олеогелем або лактозним порошком перед пероральним введенням мишам. Період часу перебування на відкритому рукаві пристрою, що є маркером тривожної поведінки, збільшувався у мишей у всіх групах тварин, які отримували нановолокна з досліджуваною сполукою, і цей період часу був значно довшим, ніж у контрольній групі (Рис. 5.5). Цей показник також був вищим у групах, які отримували нановолокна, завантажені МА-253, на 30% порівняно з групою, яка отримувала гідазепам ($p < 0,01$). Час перебування мишей на відкритому рукаві тестового пристрою збільшився на 17%, 19% і 20%, оскільки вони отримували внутрішньошлунково нановолокна, завантажені МА-252, МА-253 і МА-254, відповідно, порівняно з попереднім скринінговим дослідженням анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Крім того, було встановлено, що введення нановолокон, завантажених похідними, зменшує емоційні реакції у мишей (дефекацію та сечовипускання), що вказує на позитивний анксиолітичний ефект в умовах використаного тесту.

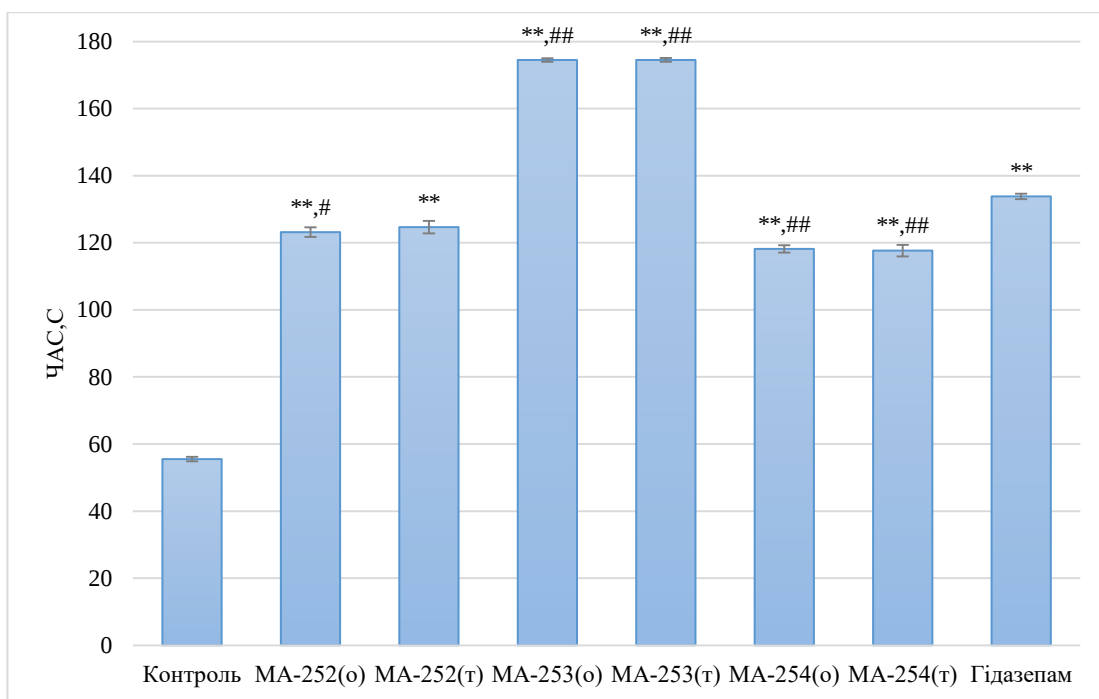


Рис. 5.5. Вплив систем доставки ліків на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на час, проведений мишами на відкритих руках у тесті припіднесеного хрестоподібного лабіринті.

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$;
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$;
3. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
4. т - нановолокна, розтерті з лактозою.

Таким чином, введені нановолокна, завантажені похідними 1,2,3-триазол-1,4-бензодіазепінів, змішані з олеогелем чи тритуrowані з лактозою, виявили суттєву анксиолітичну активність в умовах тесту піднесеного хрестоподібного лабіринту [218, 219].

Поведінкові реакції мишей, які отримували нановолокна, завантажені новими похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, також були досліджені шляхом проведення тесту «темно-світлої камери», та результати підсумовані

в табл. 5.2. Нановолокна змішували з олеогелем або тритурували з лактозою перед пероральним введенням мишам. При аналізі результатів не було виявлено жодних відмінностей у поведінці мишей після перорального введення нановолокон, завантажених похідними, змішаними з олеогелем або тритурованих з лактозою (рис. 5.6, табл. 5.2). Наприклад, мишам, яким вводили нановолокна з МА-252 попередньо змішаних з олеогелем або лактозою, період часу перебування в освітленій камері становив 128 секунд і 130 секунд відповідно (рис. 5.6). Миші ж, які отримували нановолокна з МА-253, проводили час на відкритому просторі 172 секунди та 173 секунди відповідно. Ці періоди у світлій камері в групах, які отримували нановолокна, завантажені МА-253 в олеогелевій та сухій формах, були довшими на 14% та 15% порівняно з групою, яка отримувала гідазепам ($p < 0,01$). Усі групи мишей, які отримували похідні триазолобензодіазепіну, проводили значно менше часу в темній камері боксу порівняно з мишами контрольної групи ($p < 0,05$).

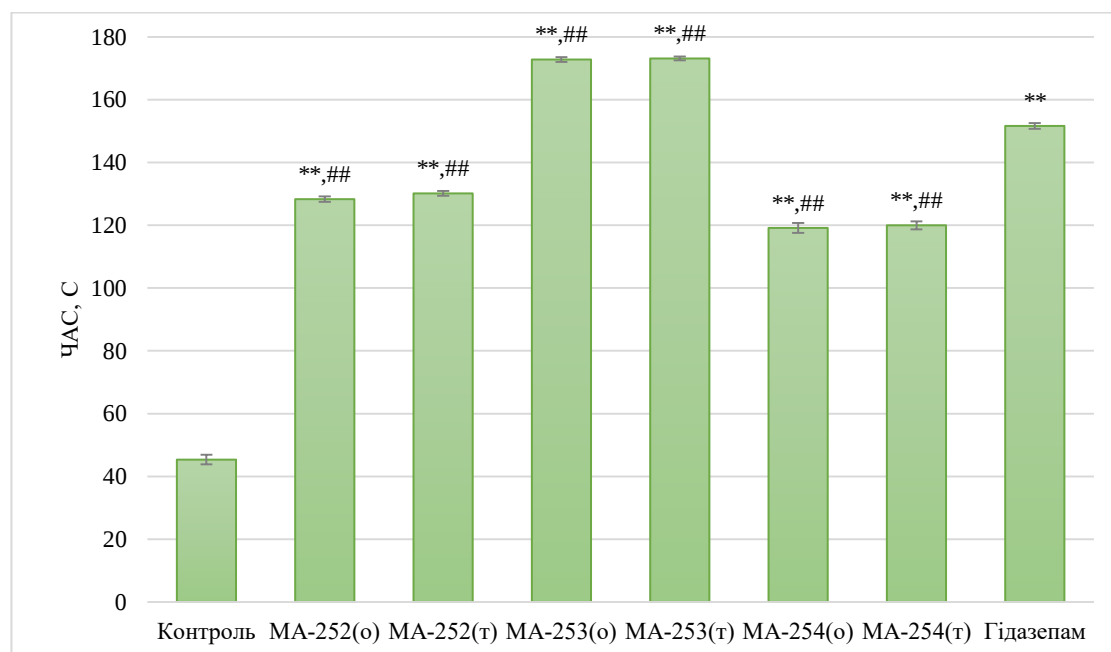


Рис. 5.6 Вплив систем доставки ліків на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на час, проведений мишами на відкритому просторі в тесті темно-світлої камери.

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$;
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$;
3. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
4. т - нановолокна, розтерті з лактозою.

Показник емоційної складової поведінкових реакцій мишей, а саме кількість фекальних болюсів, був суттєво меншим в усіх досліджуваних групах ($p < 0,05$ проти контролю), а кількість уринацій не відрізнялась протягом усього експерименту від групи контрольних тварин. Кількість стійок, що можна розцінювати як індекс орієнтувальної діяльності тварини в умовах тесту, зростала в порівнянні з контрольними тваринами, найбільший вплив виявили у групах тварин, що отримували нановолокна, завантажені МА-253, змішані з олеогелем, та тритуrowані з лактозою, що значуще перевищують за кількістю у групі контролю (15,3 та 14,7 стійок відповідно проти 0,7 стійки).

Таблиця 5.2

**Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними
1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на поведінкові реакції мишей
у тесті темно-світлої камери ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Кількість переходів між відсіками	Кількість фекальних болюсів	Кількість уринацій	Кількість стійок
1	2	3	4	5	6
Контроль	-	$3,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$

Продовж. табл. 5.2

1	2	3	4	5	6
МА-252	1,0 (о)	$4,8 \pm 0,2^{##}$	$0,2 \pm 0,1^{**}$	$0,3 \pm 0,1$	$11,5 \pm 0,3^{**}$
	1,0 (т)	$4,8 \pm 0,1^{##}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$0,3 \pm 0,1$	$11,7 \pm 0,3^{**}$
МА-253	1,0 (о)	$2,3 \pm 0,1^{##}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$0,0 \pm 0,0$	$15,3 \pm 0,5^{**,#}$
	1,0 (т)	$1,7 \pm 0,1^{##}$	$0,2 \pm 0,1^{**}$	$0,2 \pm 0,1$	$14,7 \pm 0,6^{**,#}$
МА-254	1,0 (о)	$4,5 \pm 0,3^{##}$	$0,0 \pm 0,0^{**}$	$0,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,4^{**,#}$
	1,0 (т)	$3,7 \pm 0,1^{##}$	$0,3 \pm 0,1^{*}$	$0,0 \pm 0,0$	$5,7 \pm 0,3^{**,,##}$
Гідазепам	1,0	$11,7 \pm 0,7^{**}$	$0,0 \pm 0,0^{*}$	$0,2 \pm 0,1$	$10,5 \pm 0,3^{**}$

Примітки:

1. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ** - при $p < 0,01$.
2. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала гідазепам; ## - при $p < 0,01$;
3. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
4. т - нановолокна, тритуровані з лактозою.

Таким чином, введені нановолокна, завантажені похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, у формі олеогелю та сухій формі, продемонстрували значний анксиолітичний ефект в умовах тесту темно-світлої камери.

5.3 Вивчення антидепресивної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст»

Скринінгові дослідження в умовах тесту примусового плавання за Порсолт виявили, що похідні МА-253 та МА-254 у дозі 1 мг/кг значно зменшували загальну тривалість нерухомості мишей та проявляли низький індекс депресії. Така поведінка тварин характеризується наявністю вираженої антидепресивної активності цих похідних. Важливо було перевірити вплив нановолокон, завантажених похідними, на тривалість іммобілізації в умовах даного тесту.

Результати, отримані в ході дослідження, наведені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на показники в тесті примусового плавання за Порсолт ($M \pm m$, $n=6$)

Група тварин	Доза, мг/кг	Латентний період першого зависання, с	Загальна тривалість іммобілізації, с	АДА, %
Контроль	-	$78,7 \pm 0,7$	$174,3 \pm 1,8$	-
МА-252	1,0 (о)	$107,8 \pm 1,1 *$	$104,8 \pm 1,0 *,\#$	39,9%
	1,0 (т)	$108,0 \pm 1,4 *$	$102,7 \pm 1,7 *,\#$	41,1%
МА-253	1,0 (о)	$134,0 \pm 0,8 *,\#$	$37,2 \pm 0,8 *$	78,7%
	1,0 (т)	$134,3 \pm 0,7 *,\#$	$35,7 \pm 0,7 *$	79,5%
МА-254	1,0 (о)	$108,8 \pm 0,9 *$	$35,2 \pm 0,8 *$	79,8%
	1,0 (т)	$111,2 \pm 0,7 *,\#$	$36,7 \pm 0,5 *$	79,0%
Іміпрамін	25,0	$104,5 \pm 0,9 *$	$33,0 \pm 1,9 *$	81,1%

Примітки:

1. * – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою контролю;
2. # – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою, що отримувала іміпрамін.
3. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
4. т - нановолокна, тритуровані з лактозою.

Загальна тривалість нерухомості, що виступає як критерій стану «відчаю» тварин, суттєво зменшувалась у всіх дослідних групах в порівнянні з тваринами контролю. При введенні нановолокон, завантажених похідним МА-252, змішаних з олеогелем, та тритурованих з лактозою, показник антидепресивної активності становив 39,9% та 41,1% відповідно в порівнянні з контрольною групою. Тривалість іммобілізації на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, становила 37,17 та 35,67 с ($p < 0,05$), тоді коли в ході скринінгових досліджень була 54,7 с. Подібний ефект спостерігали у тварин, які отримували нановолокна з МА-254: тривалість завмирання зменшилась на 79,8% (змішані з олеогелем) та 78,9% (тритуровані з лактозою) в порівнянні з контролем ($p < 0,05$).

Пролонгування латентного періоду першого зависання спостерігали в усіх групах, що може свідчити про наявність вираженої антидепресивної активності на тлі введення нановолокон, завантажених новими похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252, МА-253 та МА-254.

Як згадувалось раніше, індекс депресивності визначається співвідношенням кількості актів нерухомості до числа активних періодів плавання. Згідно отриманих результатів, він становив 0,33 і 0,31 для нановолокон, завантажених МА-253, та 0,28 і 0,25 для нановолокон, завантажених МА-254 (рис.5.7), що суттєво не відрізняється від показнику групи-порівняння. Таке спостереження може свідчити про потенційний антидепресивний ефект СДЛ на основі нановолокон.

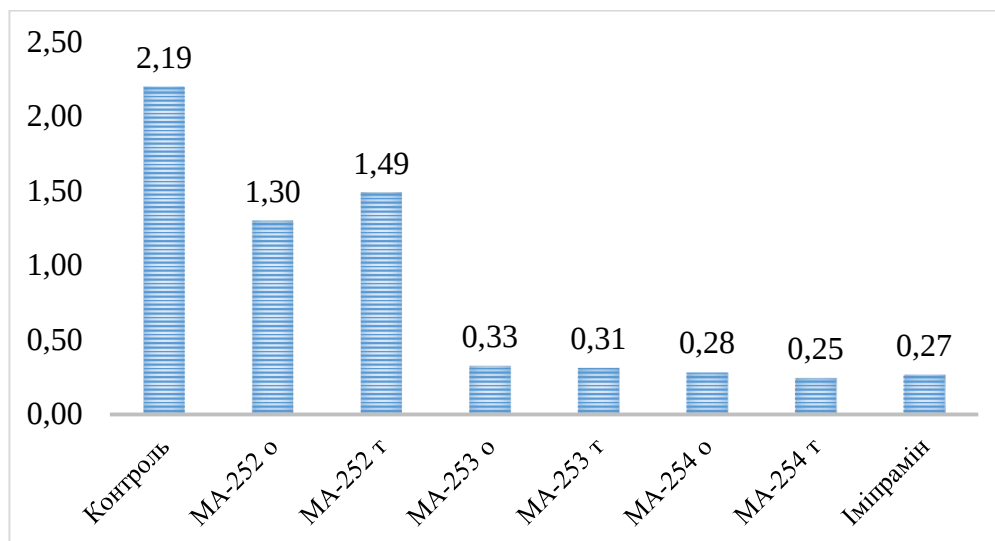


Рис. 5.7 Індекс депресивності тварин в тесті вимушеного плавання за Порсолт.

Примітки:

1. о- нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуrowані з лактозою;
3. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$;
4. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала іміпрамін в дозі 25 мг/кг.

Дане дослідження показало виражену антидепресивну активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажених в нановолокна, змішаних з олеогелем або тритурованими з лактозою, при чому вона була вища за таку при скринінговому вивченні сполук.

Результати тесту «підвішування за хвіст» в рамках скринінгових досліджень показали наявність антидепресивної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (табл. 5.4).

За результатами тесту» похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-253 та МА-254, завантажені в нановолокна, змішані з олеогелем або тритуровані з лактозою, призвели до вираженого зменшення загальної тривалості іммобілізації (на 53% та 55% для МА-253, 39% та 42% для МА-254 відповідно) та пролонгування латентного періоду настання першого зависання

тварини в декілька разів ($p < 0,05$). На тлі нановолокон, завантажених МА-252, загальний період завмирання скоротився на 25 %, та був меншим в порівнянні з результатами скринінгових досліджень, де даний показник відрізнявся лише на 10% від групи контролю.

Введення іміпраміну в дозі 25 мг/кг, в свою чергу, призвело до скорочення періоду нерухомого стану на 74,0 % в порівнянні з показником групи контрольних тварин ($p < 0,05$).

Таблиця 5.4

**Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними
1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на поведінку тварин у тесті
«підвішування за хвіст» ($M \pm m$, $n=6$)**

Група тварин	Доза, мг/кг	Латентний період першого зависання, с	Кількість активів іммобілізації	Тривалість іммобілізації, с
Контроль	-	$15,8 \pm 1,6$	$14,7 \pm 0,4$	$188,3 \pm 2,1$
МА-252	1,0 (о)	$33,3 \pm 2,0^{*,\#}$	$12,3 \pm 0,4^{\#}$	$142,2 \pm 1,2^{\#}$
	1,0 (т)	$38,3 \pm 1,1^{*,\#}$	$12,3 \pm 0,4^{\#}$	$140,5 \pm 1,3^{\#}$
МА-253	1,0 (о)	$43,7 \pm 0,8^{*,\#}$	$10,2 \pm 0,3^{*}$	$88,3 \pm 1,4^{*,\#}$
	1,0 (т)	$44,2 \pm 0,9^{*,\#}$	$9,7 \pm 0,3^{*}$	$84,8 \pm 1,4^{*,\#}$
МА-254	1,0 (о)	$40,0 \pm 0,8^{*,\#}$	$11,5 \pm 0,3^{*,\#}$	$115,2 \pm 3,2^{*,\#}$
	1,0 (т)	$42,2 \pm 0,8^{*,\#}$	$12,0 \pm 0,3^{\#}$	$109,2 \pm 1,6^{*,\#}$
Іміпрамін	25,0	$82,0 \pm 1,1^{*}$	$8,2 \pm 0,3$	$48,8 \pm 1,0$

Примітки:

1. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуrowані з лактозою;

3. * – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою контролю;
4. # – достовірні відмінності при $p < 0,05$ порівняно з групою, що отримувала іміпрамін.

Такі зміни в поведінці тварин в умовах тесту підвищування за хвіст можна оцінити як наявність вираженого антидепресивного ефекту у похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажених в нановолокна.

5.4 Вивчення аналгетичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, методами гарячої пластини та оцтовокислих корчів

Проведені скринінгові дослідження продемонстрували збільшення періоду реакції на болюче подразнення терморцепторів кінцівок гризунів під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та наявність вираженого аналгетичного ефекту на тлі введення МА-253. Результати вивчення впливу СДЛ на основі нановолокон у тесті гарячої пластини наведені у табл. 5.5.

Під час вивчення впливу вище зазначених похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на відповідь тварин на термоподразник в умовах тесту гарячої пластини нановолокна, завантажені МА-253, продемонстрували найбільшу аналгетичну активність. Максимальний ефект досягався на 120 хв після їхнього введення в формі олеогелю та тритурованих з лактозою, сягав 36,3% та 41,5% відповідно ($p < 0,05$ проти контролю).

Таблиця 5.5

**Аналгетична активність СДЛ на основі нановолокон,
завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, в тесті
«гаряча пластина» ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Час виникнення дискомфорту (секунди) / Анальгетична активність (%) по відношенню до [контролю] та (препарату порівняння) після введення через				
		30 хв	60 хв	120 хв	180 хв	240 хв
Контроль	-	10,6 ± 0,1	10,2 ± 0,2	9,7 ± 0,2	9,3 ± 0,2	9,2 ± 0,2
МА-252	1,0 (о)	11,5 ± 0,3 [8,8]* (-21,7)#	11,2 ± 0,2 [9,8]* (-21,5)#	11,7 ± 0,2 [20,5]* (-17,6)#	9,9 ± 0,2 [6,6]* (-21,8)#	9,4 ± 0,1 [2,0] (-22,9)#
	1,0 (т)	11,6 ± 0,4 [9,1]* (-21,4)#	11,4 ± 0,4 [11,5]* (-20,4)#	11,9 ± 0,3 [22,5]* (-16,2)#	10,5 ± 0,3 [12,5]* (-17,5)#	9,5 ± 0,5 [2,9] (-22,2)#
МА-253	1,0 (о)	13,4 ± 0,3 [26,8]* (-8,7)	13,0 ± 0,3 [27,2]* (-9,1)	13,2 ± 0,3 [36,3]* (-6,8)	12,6 ± 0,4 [34,9]* (-1,0)	11,7 ± 0,4 [27,4]* (-3,7)
	1,0 (т)	13,7 ± 0,3 [29,8]* (-6,6)	13,5 ± 0,4 [32,6]* (-5,3)	13,7 ± 0,4 [41,5]* (-3,3)	13,1 ± 0,3 [40,6]* (3,1)	12,4 ± 0,4 [35,4]* (2,3)
МА-254	1,0 (о)	10,7 ± 0,1 [1,1] (-27,2)#	10,3 ± 0,1 [1,0] (-27,8)#	11,0 ± 0,2 [13,9]* (-22,1)#	10,1 ± 0,2 [8,2]* (-20,6)#	9,7 ± 0,2 [5,6] (-20,2)#
	1,0 (т)	10,8 ± 0,1 [1,6] (-26,9)#	10,5 ± 0,2 [3,1] (-26,3)#	11,1 ± 0,2 [14,3]* (-21,9)#	10,2 ± 0,3 [10,7]* (-18,8)#	9,8 ± 0,3 [6,5] (-19,5)#
Метамізол	50,0	14,7 ± 0,5 [38,9]*	14,3 ± 0,5 [39,9]*	14,2 ± 0,4 [46,3]*	12,7 ± 0,7 [36,3]*	12,2 ± 0,7 [32,3]*

Примітки:

1. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуровані з лактозою;
3. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
4. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала анальгін.

Результати дослідження аналгетичної активності на моделі «оцтовокислі корчі» наведено в табл. 5.6. Аналгетичний ефект, що виражається як достовірне зниження кількості «корчів» порівняно з тваринами групи контролю, спостерігали в усіх досліджуваних групах тварин. Кількість вигинів тіла на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем чи тритутованих з лактозою, в умовах даного тесту в середньому становила 18 та 16,7 відповідно проти 76,7 в групі контролю, що демонструє виражену анальгетичну активність СДЛ. В свою чергу, препарат порівняння анальгін суттєво скоротив прояв больової реакції дослідних тварин.

Таблиця 5.6

Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на моделі оцтовокислих корчів ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Доза, мг/кг	Кількість корчів	Аналгетична активність до контролю, %
1	2	3	4
Контроль	-	$76,7 \pm 2,7$	
МА-252	1,0 (о)	$49,2 \pm 1,8$ *,#	35,9
	1,0 (т)	$43,7 \pm 3,1$ *,#	43,0

Продовж. табл. 5.6

1	2	3	4
МА-253	1,0 (о)	$18,0 \pm 1,6^{*,\#}$	76,5
	1,0 (т)	$16,7 \pm 1,4^{*,\#}$	78,3
МА-254	1,0 (о)	$53,2 \pm 2,5^{*,\#}$	30,7
	1,0 (т)	$52,5 \pm 3,2^{*,\#}$	31,5
Метамізол	50,0	$9,8 \pm 1,5^*$	87,2

Примітки:

1. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуровані з лактозою;
3. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою;
4. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала метамізол.

За результатами дослідження в тесті гарячої пластини та на моделі оцтовокислих корчів встановлено наявність анальгетичного ефекту похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажених в нановолокна, в формі олеогелю та тритурованих з лактозою. Найбільший ефект відзначали на тлі застосування СДЛ на основі нановолокон, завантажених МА-253.

5.5 Визначення антигіпоксичної активності нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів

Гіпоксичні стани головного мозку здійснюють негативний вплив на когнітивні функції і часто призводять до розвитку патологій [220]. Враховуючи це, доцільно було провести визначення антигіпоксичних властивостей СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінами, на моделі гострої нормобаричної

гіперкапнічної гіпоксії та порівняти з результатами попереднього дослідження (табл. 4.3).

Результати дослідження наведені в табл. 5.7.

Таблиця 5.7

**Антигіпоксична активність СДЛ на основі нановолокон,
завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на моделі
гострої нормобаричної гіперкапнічної гіпоксії ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Середня тривалість життя мишей, хв	Антигіпоксична активність до контролю (%)
Контроль	-	$11,5 \pm 0,4$	
МА-252	1,0 (о)	$12,3 \pm 0,7$	7,1
	1,0 (т)	$12,5 \pm 0,6$	8,8
МА-253	1,0 (о)	$13,6 \pm 0,8$ #	18,2
	1,0 (т)	$14,0 \pm 0,3$ *,#	21,6
МА-254	1,0 (о)	$14,3 \pm 0,3$ *	24,1
	1,0 (т)	$14,1 \pm 0,5$ *	22,6
Пірацетам	200	$16,3 \pm 0,6$ *	42,0

Примітки:

1. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуровані з лактозою;
3. * Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.
4. # Достовірно при $p < 0,05$ порівняно з групою, яка отримувала пірацетам.

Тривалість життя дослідних тварин на тлі застосування нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів за умов нормобаричної гіпоксичної гіпоксії була дещо вище за попередні результати (табл. 4.3). Проте дані результати демонструють відсутність антигіпоксичного ефекту. Препарат порівняння пірацетам подовжував період виживання в умовах тесту порівняно з контрольною групою в середньому на 42,0 %.

Таким чином, досліджувані похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажені в нановолокна, не продемонстрували виражених антигіпоксичних властивостей на моделі нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією.

5.6 Дослідження впливу нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на поведінкові реакції дослідних тварин в тесті «відкритого поля»

Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на локомоторну, орієнтовно-дослідницьку, емоційну активність та їх вегетативний супровід вивчали в тесті відкритого поля.

Кількість перетнутих квадратів, що виступає показником рухової діяльності гризунів в умовах тесту, статистично значуще відрізнялась лише у групі, що отримувала нановолокна, завантажені похідним МА-253, змішані з олеогелем або тритуrowані з лактозою, та була вище на 41% та 53% відповідно в порівнянні з групою контролю (рис. 7.8).

Орієнтовна активність дослідних тварин на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, в формі олеогелю або сухому вигляді, була в 2,6 та 2,8 рази вище відповідно проти групи контролю (рис. 5.9 А). Кількість вертикальних стійок в групі, яка отримувала СДЛ на основі нановолокон, завантажених МА-254, зростала на 63% та 95% залежно від форми введення ($p < 0,05$ проти контролю).

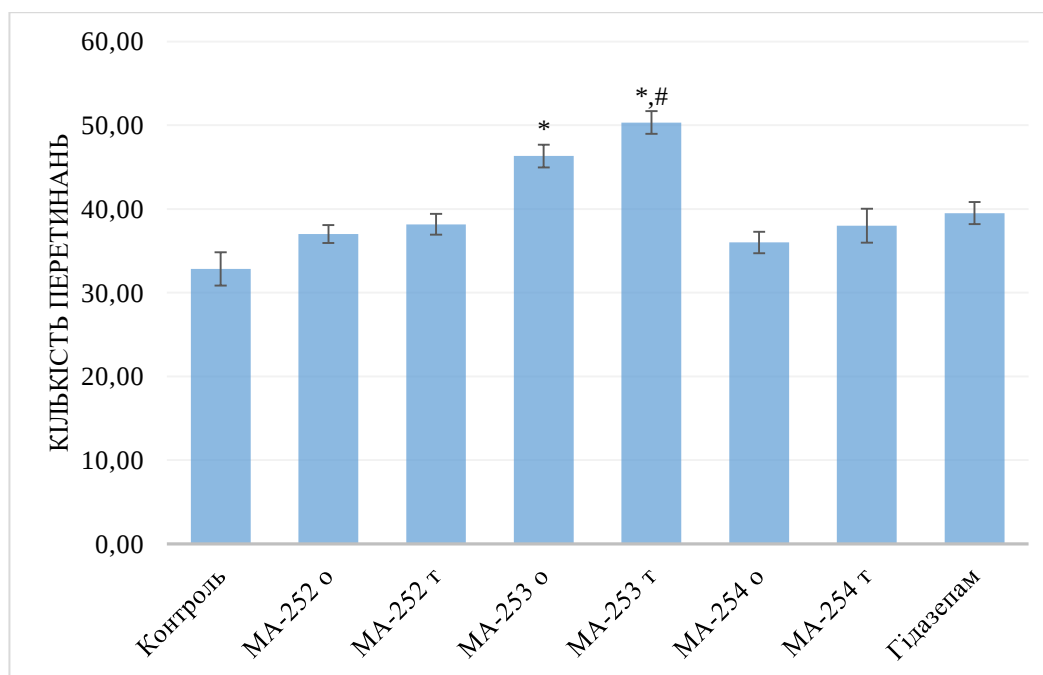


Рис. 5.8. Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на локомоторну активність гризунів в тесті «відкритого поля». *Примітки:* о - нановолокна, змішані з олеогелем; т - нановолокна, тритуrowані з лактозою; * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,05$.

Суттєвих змін на тлі введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, завантажених в нановолокна, на дослідницьку активність протягом тесту не відзначали, кількість обстежених нірок у всіх групах статистично значуще не відрізнялась від групи контролю (рис. 5.9 Б). Проте похідне МА-253, завантажене в нановолокна, тритуrowані з лактозою, тенденційно підвищувала дану активність на 52% ($p > 0,05$ проти контролю).

Результати впливу досліджуваних похідних на емоційний стан мишей в умовах тесту відкритого поля наведені в табл. 5.8. Як видно з результатів, сума вегетативних реакцій у всіх досліджуваних групах була меншою за показник в групі контролю ($p < 0,05$). Такі зміни свідчать про зниження стану тривожності тварин на тлі СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

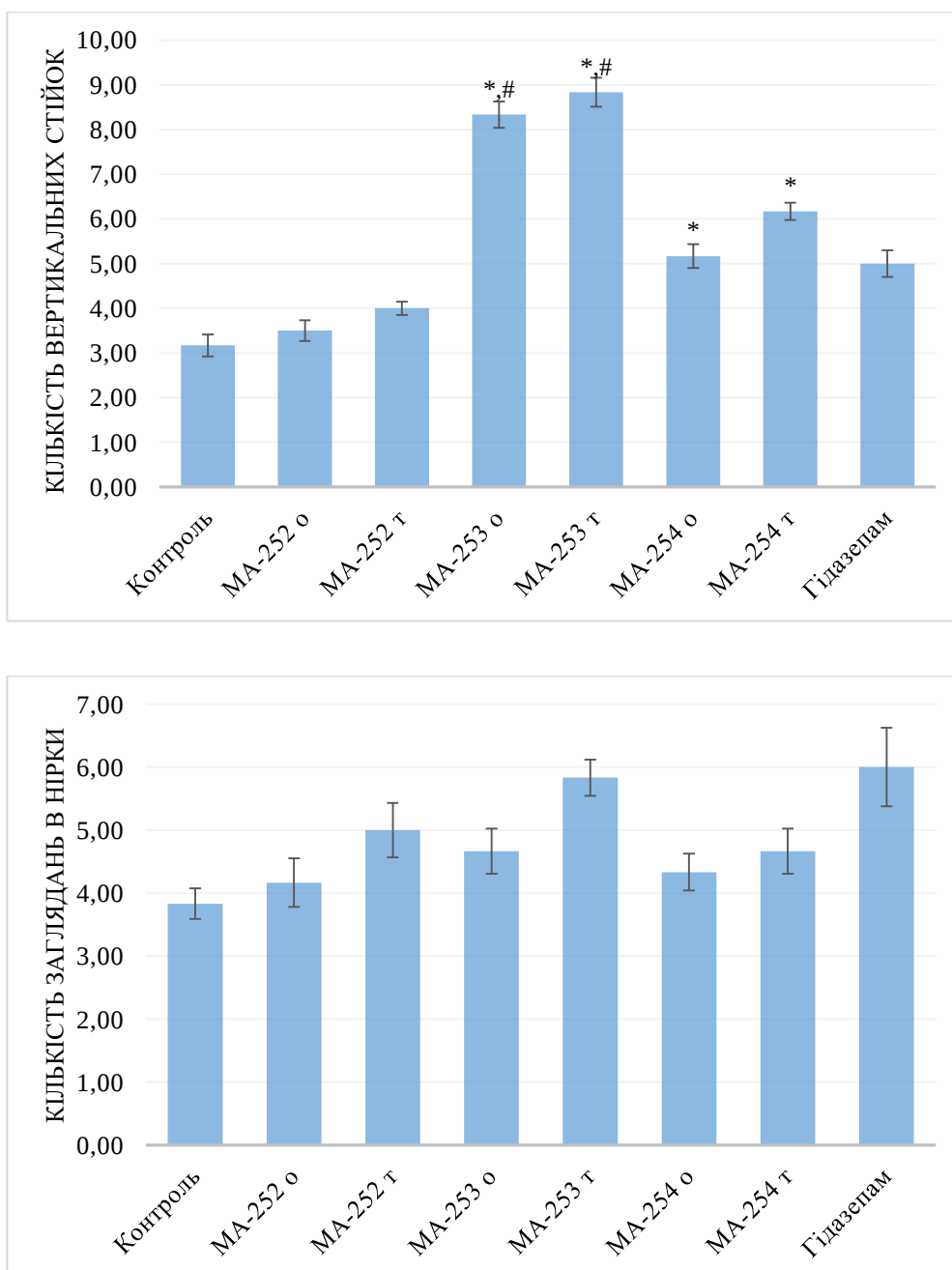


Рис. 5.9. Вплив СДІ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на орієнтовно (А)-дослідницьку (Б) активність гризунів в тесті «відкритого поля».

Примітки: о - нановолокна, змішані з олеогелем; т - нановолокна, тритуровані з лактозою; * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,05$.

Таблиця 5.8

**Вплив СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними
1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, на емоційний стан тварин під час
тесту «відкритого поля» ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Доза, мг/кг	Кількість дефекацій	Кількість уринацій	Кількість вмивань	Сума показників емоційного стану
Контроль	-	$1,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$
МА-252	1,0 (о)	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1 *$	$1,5 \pm 0,3 *$
	1,0 (т)	$0,3 \pm 0,1 *$	$0,0 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,8 \pm 0,2 *$
МА-253	1,0 (о)	$0,8 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1 *$	$1,7 \pm 0,2 *$
	1,0 (т)	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,3 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2 *$	$1,7 \pm 0,2 *$
МА-254	1,0 (о)	$0,3 \pm 0,1 *$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3 *$
	1,0 (т)	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,0 \pm 0,0$	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,9 \pm 0,1 *$
Гідазепам	1,0	$0,5 \pm 0,1 *$	$0,0 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,1 *$	$1,3 \pm 0,1 *$

Примітки:

1. о - нановолокна, змішані з олеогелем;
2. т - нановолокна, тритуровані з лактозою;
3. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.
4. # – відмінність достовірна щодо групи тварин, що отримувала гідазепам, $p < 0,05$

Результати дослідження у тесті ВП демонструє наявність активуючого впливу сполуки МА-253, завантаженого в нановолокна, на локомоторну орієнтовну активності. Зниження рівня емоційності в тесті ВП добре корелюється зі зниженням показників тривожності тварин у тесті ПХЛ та

свідчить на користь протитривожного ефекту досліджуваних похідних в умовах згаданих поведінкових тестів.

Висновки до розділу 5

1. За результатами фармакологічних досліджень відібрано 3 похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254) та сформовано СДЛ на основі нановолокон, завантажених ними. При аналізі морфології поверхні та фізичного стану нановолокон, створених за допомогою ЕП виявлено, що аморфний полімер-носії ГПМЦ є придатним для їх створення, визначено відсутність пов'язаних з процесом дефектів, таких як кульки, залишки крапель або пилкоподібні візерунки зубців.

2. Виявлено суттєву анксиолітичну активність нановолокна, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, змішаних з олеогелем чи тритуrowаних з лактозою, в умовах тестів піднесеного хрестоподібного лабіринту та темно-світлої камери.

3. У тестах примусового плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст» відзначено пролонгування латентного періоду першого зависання, а також скорочення загальної тривалості зависання в усіх групах, що може свідчити про наявність вираженої антидепресивної активності на тлі введення нановолокон, завантажених новими похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252, МА-253 та МА-254.

4. На моделі «оцтовокислих корчів» та в тесті «гаряча пластина» найбільша аналгетична активність продемонстрована групою тварин, яким вводили нановолокна, завантажені МА-253.

5. Досліджувані похідні, завантажені в нановолокна, не продемонстрували виражених антигіпоксичних властивостей на моделі нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією.

6. У тесті відкритого поля відзначено зниження стану тривожності тварин на тлі СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

7. В ході проведених досліджень встановлено сполуку-лідера – похідне МА-253, що проявило виразну фармакологічну активність в умовах обраних тестів.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712> (Scopus, quartile 1)

2. Iryna Botsula, Igor Kireyev. Nanofiber-based drug delivery system as a choice for enhancing the solubility of pharmaceutical compounds. *«Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології»* : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. с. 15-16.

3. Iryna Botsula, Johannes Schavikin, Ivo Laidmäe, Igor Kireyev, Jyrki Heinämäki, Oleh Koshovyi. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents*, Tartu, 12-13 October 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023. P. 29.

4. Iryna Botsula. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving pharmacological effect of new benzodiazepine derivatives in rodents. *Seminars in Pharmaceutical Sciences XI*, Tartu, 23 November 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023.

РОЗДІЛ 6

ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СПОЛУКИ-ЛІДЕРА

6.1 Дослідження актопротекторних властивостей МА-253 в тесті вимушеного плавання до виснаження

Підвищення фізичної витривалості та відновлення сил організму є актуальними завданнями сучасної фармакотерапії. Це зумовлює необхідність дослідження актопротекторних властивостей сполуки-лідера. Тест плавання з навантаженням використано з метою дослідження фізичної витривалості щурів. Результати експерименту наведено в табл. 6.1.

Таблиця 6.1

Вплив похідного МА-253, завантаженого у нановолокна, на фізичну витривалість щурів у тесті «плавання з навантаженням» ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Час плавання до виснаження, с	
	Самці	Самиці
Контроль	$125,2 \pm 3,4$	$116,7 \pm 10,0$
МА-253 о	$177,7 \pm 3,8$ *	$171,2 \pm 9,6$ *
МА-253 т	$179,3 \pm 5,5$ *	$176,5 \pm 5,9$ *

Примітки:

1. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.
2. о – нановолокна, завантажені МА-253, змішані з олеогелем.
3. т – нановолокна, завантажені МА-253, тритуровані з лактозою.

Час настання виснаження в тесті на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем був на 42% більше у самців та 47% у самиць в порівнянні з групами контрольних тварин ($p < 0,05$). Даний показник у групах, що отримували нанонитки, завантажені МА-253, тритуровані з лактозою був вище на 43% у самців та на 51% у самиць ($p < 0,05$).

проти контролю). Зазначені зміни фізичної витривалості тварин можуть бути ознакою наявності в похідного МА-253 актопротекторної активності.

Таким чином, похідне МА-253 здійснює сприятливий ефект на фізичну витривалість, незалежно від статті, підвищуючи її.

6.2 Взаємодія нановолокон, завантажених МА-253, зі сполуками пригнічувального типу дії

Для оцінки безпечності використання нового похідного 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну як потенційного лікарського засобу було важливо провести дослідження його можливої взаємодії з іншими речовинами, що впливають на ЦНС. Для цього використано метод визначення тривалості наркозного сну, викликаного етанолом.

Як видно з результатів дослідження (табл. 6.2), тварини у всіх досліджуваних групах відреагували на дію спирту, бічне положення настало у 100% задіяних мишей. Латентний період бічного положення у гризунів на тлі введення нанониток, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем чи тритурованих з лактозою статистично зачуже не відрізнявся порівняно з контрольною групою.

Введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем або тритурованих з лактозою, статистично значуще подовжувало тривалість бічного положення на 31,9% та 28,9% відповідно у порівнянні з тваринами контрольної групи. Гідазепам, в свою чергу, пролонгував тривалість наркозу на 69,9% ($p < 0,05$).

Етанол менш вибірковий щодо своїх молекулярних цілей на відмінну від, наприклад, діазепаму, котрий реалізовує фармакологічні ефекти через зв'язування з ГАМК-А рецептором, який, в свою чергу, містить $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - чи $\alpha 5$ субодиниці разом з γ -субодиницею. Крім ГАМК рецепторів, що містять δ -субодиниці, глутаматні рецептори, ГАМК-В рецептори та калієві канали є іншими пре- та постсинаптичними мішенями. Етанол впливає на

рецепторзв'язуючу властивість через зміни в передачі сигналу, наприклад, фосфорилювання NMDA-рецепторів, а також на синтез нейростероїдів [70, 221]. Також його ефект може бути зумовлений змінами міжнейрональних комунікацій через високий афінитет етанолу до мембранних ліпідів нейронів [152]. Така дія етанолу може призводити до виявленої суперадитивної дії його застосування з новим похідним.

Таблиця 6.2

Вплив похідного МА-253, завантаженого в нановолокна, на показники етанолового наркозу у мишей М [Q25; Q75]

Група	Кількість тварин, у яких настало бічне положення, %	Латентний час входу в наркоз, хв	Тривалість бічного положення, хв
Контроль	100	2,4 [2,1; 2,6]	83,0 [59,5; 94,5]
МА-253 о	100	2,2 [2,0; 2,3]	109,5 [88,8; 139,3] *
МА-253 т	100	2,1 [1,9; 2,2]	107,0 [106,0; 112,5] *
Гідазепам	100	2,2 [2,1; 2,3]	141,0 [129,0; 148,5] *

Примітки:

1. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.
2. о – нановолокна, завантажені МА-253, змішані з олеогелем.
3. т – нановолокна, завантажені МА-253, тритуровані з лактозою.

Таким чином, у тесті взаємодії з етанолом досліджуване похідне демонструє помірне потенціювання пригнічувального впливу на ЦНС.

6.3 Взаємодія нановолокон, завантажених МА-253, з речовинами, що збуджують ЦНС

Дослідження взаємодії похідного 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, а саме МА-253, з речовинами, що збуджують ЦНС, проведено в тесті відкритого поля на тлі введення кофеїн-бензоату натрію (табл. 6.3). Молекулярний механізм стимулювального впливу кофеїну зумовлений конкурентним антагонізмом з пуриновим нуклеотидом аденозином, який виступає нейромедіатором з пригнічуючою дією в організмі, а також блокування каналу ГАМК_A-рецептору [222, 223]. Молекула кофеїну структурно подібна до аденозину і здатна зв'язуватися з рецепторами аденозину A₁ та A_{2a} на поверхні клітин, не активуючи їх. Це впливає на настрій та когнітивні функції, а також тимчасово запобігає або зменшує сонливість, таким чином зберігаючи або відновлюючи бадьорість [223].

Кофеїн-бензоат натрію стимулював рухову активність мишей у ВП, кількість перетинань квадратів поля була вищою в 3,2 рази ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Кількість вертикальних стійок, що є компонентою орієнтовно-дослідницької діяльності тварини в умовах даного тесту, зростала в 2,1 рази ($p < 0,05$ проти контролю). В свою чергу, сума усіх видів активності була в 2,7 разів вище ($p < 0,05$ проти контролю). Кількість вегетативних реакцій як індекс емоційного стану у мишей на тлі кофеїн-бензоат натрію була дещо вищою за показник у групі контролю, проте зміни були статистично незначущими ($p > 0,05$). При застосуванні похідного МА-253, завантаженого в нановолокна, змішані з олеогелем або тритурованим з лактозою, на тлі кофеїну-бензоату натрію рухова активність зростала в 2,5 та 2,6 рази відповідно порівняно з групою контролю, та була меншою за показник в групі кофеїну-бензоату натрію. Така поведінка тварин може свідчити про нівелювання збуджувального ефекту кофеїну-бензоату натрію.

Таблиця 6.3

Вплив похідного МА-253 на поведінку мишей у тесті відкритого поля на тлі введення кофеїн-бензоату натрію ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Контроль	Кофеїн-бензоат	МА-253 о	МА-253 т
Кількість перетинань	$19,5 \pm 0,8$	$62,2 \pm 3,4 *$	$49,5 \pm 4,2 *$	$50,8 \pm 3,8 *$
Кількість вертикальних стійок	$2,3 \pm 0,3$	$7,2 \pm 0,6 *$	$5,2 \pm 0,4 *$	$9,5 \pm 0,9 *$
Кількість заглядань в нірки	$4,2 \pm 0,6$	$6,8 \pm 1,0$	$6,0 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,4$
Кількість дефекацій	$2,3 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,2$	$0,0 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,1$
Кількість уринацій	$0,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$0,0 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,2$
Кількість вмивань	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$
Сума показників емоційного стану	$3,8 \pm 1,1$	$4,8 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,4$
Сума активностей	$29,8 \pm 1,1$	$81,0 \pm 4,2 *$	$61,3 \pm 4,8 *$	$67,8 \pm 4,4 *$

Примітки:

1. * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$.
2. о – нановолокна, завантажені МА-253, змішані з олеогелем.
3. т – нановолокна, завантажені МА-253, тритуровані з лактозою.

Таким чином, похідне МА-253 виявляє антагонізм до кофеїну, очевидно, посилюючи гальмівні аденозинергічні впливи у ЦНС.

6.4 Дослідження фармакологічної активності похідного МА-253 за умов тривалого введення (протягом 28 днів)

Як відомо, для похідних бензодіазепінів характерним є розвиток толерантності, тобто зменшення ефективності їхньої дії при регулярному застосуванні впродовж кількох тижнів [224–226]. Тривала активація ГАМКА рецепторів ендogenousними та екзогенними модуляторами індукує адаптаційні зміни, що призводять до толерантності [227]. Було показано, що 28-денний режим застосування альпразоламу продемонстрував дозозалежний анксиолітичний ефект, а саме зниження рухової активності та дослідницької поведінки в тесті відкритого поля [228]. Тривале лікування бензодіазепінами може призвести до розвитку бензодіазепінової залежності [229]. Для з'ясування впливу тривалого введення похідного МА-253 на поведінкові реакції тварин використали тести піднесеного хрестоподібного лабіринту, відкритого поля та плавання з навантаженням. Результати дослідження зміни анксиолітичної активності на тлі введення сполуки-лідера протягом 28 днів наведені в табл. 6.4.

Латентний час першого входу та тривалість перебування у світлому рукаві у щурів обох статей як на перший день, так і двадцять восьмий день були довшими в декілька разів в порівнянні з контрольними тваринами, що розцінюється як збереження анксиолітичного ефекту протягом всього періоду застосування похідного МА-253.

Вплив введення МА-253 протягом 28 днів на поведінкові реакції тварин визначено в тесті відкритого поля (табл. 6.5). Суттєвих змін в поведінці щурів обох статей на тлі МА-253 не відзначали, проте прослідковували стимулювання діяльності за сумою показників локомоторно-дослідницької реакцій в умовах тесту, та зниження суми індексів емоційного стану.

Таблиця 6.4

Вплив похідного МА-253 при тривалому введенні на анксиолітичну активність щурів обох статей у тесті «ПХЛ» ($M \pm m$, $n=6$)

День експерименту	Група	Латентний період першого входу, с	Тривалість перебування у світлому рукаві, с	Кількість переходів між рукавами
1й	Контроль самці	$17,0 \pm 0,7$	$57,0 \pm 2,1$	$3,7 \pm 0,2$
	МА-253 самці	$43,2 \pm 1,0 *$	$141,8 \pm 0,9 *$	$12,8 \pm 0,5 *$
	Контроль самиці	$18,0 \pm 0,9$	$53,8 \pm 2,0$	$3,2 \pm 0,2$
	МА-253 самиці	$44,3 \pm 0,7 *$	$144,0 \pm 0,9 *$	$11,3 \pm 0,4 *$
14й	Контроль самці	$16,5 \pm 1,0$	$55,3 \pm 1,4$	$3,7 \pm 0,3$
	МА-253 самці	$44,5 \pm 1,1 *$	$144,7 \pm 0,7 *$	$12,7 \pm 0,5 *$
	Контроль самиці	$18,2 \pm 1,0$	$52,5 \pm 1,9$	$3,7 \pm 0,2$
	МА-253 самиці	$45,7 \pm 0,8 *$	$147,2 \pm 0,9 *$	$13,2 \pm 0,5 *$
28й	Контроль самці	$16,3 \pm 1,1$	$56,2 \pm 1,5$	$3,7 \pm 0,2$
	МА-253 самці	$45,2 \pm 0,9 *$	$146,0 \pm 1,0 *$	$12,8 \pm 0,5 *$
	Контроль самиці	$16,7 \pm 1,1$	$56,2 \pm 1,5$	$3,7 \pm 0,3$
	МА-253 самиці	$45,7 \pm 0,9 *$	$151,2 \pm 1,1 *$	$13,5 \pm 0,4 *$

Примітка: * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,01$.

Таблиця 6.5

Вплив МА-253 при тривалому введенні на поведінкові реакції щурів обох статей у тесті ВП (M±m, n=6)

День експерименту	Група	Кількість перетинань	Кількість вертикальних стійок	Кількість заглядань в нірки	Кількість дефекацій	Кількість уринацій	Кількість вмивань	Сума показників в ЕС	Сума ЛДР
1й	Контроль самці	13,2 ± 0,7	6,5 ± 0,7	0,7 ± 0,1	3,7 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	6,3 ± 0,3	20,3 ± 0,8
	МА-253 самці	17,2 ± 0,4	9,2 ± 0,6	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1 *	2,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1	4,0 ± 0,2 *	27,0 ± 0,4 *
	Контроль самиці	12,5 ± 0,8	4,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,5 ± 0,3	1,2 ± 0,3	6,5 ± 0,4	18,3 ± 0,9
	МА-253 самиці	16,3 ± 0,5	6,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1 *	0,5 ± 0,2*	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,2 ± 0,2 *	23,5 ± 0,4
14й	Контроль самці	12,2 ± 0,7	6,3 ± 0,6	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	4,5 ± 0,4	19,5 ± 1,1
	МА-253 самці	16,0 ± 0,2	9,5 ± 0,6	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,2 ± 0,1	2,5 ± 0,2	26,7 ± 0,8 *
	Контроль самиці	12,7 ± 0,8	3,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3	17,5 ± 0,7
	МА-253 самиці	16,5 ± 0,3	6,0 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	2,7 ± 0,2*	23,8 ± 0,3 *
28й	Контроль самці	12,3 ± 0,7	6,5 ± 0,4	1,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6	2,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	5,3 ± 0,6	20,0 ± 1,1
	МА-253 самці	16,5 ± 0,4	10,5 ± 0,4 *	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1	3,2 ± 0,3	28,7 ± 0,7 *
	Контроль самиці	14,0 ± 0,8	5,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,8 ± 0,2	20,3 ± 0,8
	МА-253 самиці	21,3 ± 0,7 *	8,7 ± 0,4 *	1,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	31,7 ± 0,7 *

Примітки: * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,05$; ЕС – емоційний стан; ЛДР – локомоторно-дослідницькі реакції.

Актопротекторна активність на тлі введення МА-253 протягом 28 днів визначена у тесті плавання до виснаження, результати якого представлені в табл. 6.6.

Таблиця 6.6

**Вплив похідного МА-253 при тривалому введенні на фізичну витривалість щурів обох статей у тесті «Плавання з навантаженням»
($M \pm m$, $n=6$)**

День проведення експерименту	Тривалість плавання, с			
	Самці		Самиці	
	Контроль	МА-253	Контроль	МА-253
1	134,3 ± 5,9	172,2 ± 9,9 *	131,2 ± 3,6	176,5 ± 7,8 *
14	131,5 ± 4,6	173,8 ± 7,7 *	133,5 ± 5,6	181,2 ± 6,7 *
28	141,0 ± 3,8	185,8 ± 7,4 *	136,8 ± 3,7	193,5 ± 6,1 *

Примітка: * – відмінність достовірна щодо групи контролю, $p < 0,01$.

Результати дослідження демонструють наявність актопротекторної активності похідного МА-253: час настання виснаження в тесті на перший, чотирнадцятий та двадцять восьмий дні був довше у щурів обох статей в порівнянні з групами контрольних тварин ($p < 0,05$). Тривалість плавання в досліджуваних групах на тлі введення МА-253 на 28й день була на 8% та 10% (у самців та самиць відповідно) вище за показник на 1й день експерименту, що свідчить про відсутність зниження ефекту протягом визначеного терміну застосування похідного у гризунів.

Таким чином, похідне МА-253 проявляє виражену анксиолітичну активність, стимулювальну дію на локомоторно-дослідницькі реакції та чинить позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох статей, не викликаючи толерантність в умовах відповідних тестів.

6.5 Вивчення гострої токсичності похідного МА-253

Визначення параметрів токсичності є обов'язковим етапом у доклінічному вивченні перспективних лікарських сполук. Гостру токсичність вивчали на безпородних білих мишах при введенні сполук перорально. Тварин розміщували у клітки по одній та протягом 14 днів спостерігали за їхньою поведінкою та зовнішнім виглядом.

Внутрішньошлункове введення досліджуваного похідного у дозі, що у 250 разів перевищує терапевтичну (2500 мг/кг), протягом 14 діб не призвело до загибелі тварин. Проявів інтоксикації не відзначали. Загальний стан та поведінка мишей відповідала фізіологічній нормі та не відрізнялась від такої у тварин контрольної групи. У тварин зберігалися нормальна координація рухів і тонус скелетних м'язів. Судом чи порушень дихання не відзначали. Акти дефекації та сечовиділення були в нормі. Тварини протягом всього періоду спостереження мали охайний зовнішній вигляд та були активними, що свідчить про відсутність токсичного впливу сполуки в обраній дозі за перорального шляху введення.

Відсутність смертності серед досліджуваних тварин дозволяє припустити, що значення LD_{50} перевищує 2500 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні. Похідне МА-253 може бути віднесене до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner [153].

6.6 Дослідження підгострої токсичності похідного МА-253

З метою оцінки токсичної дії МА-253 на організм тварин протягом тривалого введення (28 днів) проведено вимірювання зміни маси тіла гризунів. Встановлено, що динаміка маси тіла щурів обох статей, які отримували МА-253, перебувала в межах фізіологічної норми та не відрізнялась за показниками від груп інтактних тварин (табл. 6.7). За результатами дослідження встановлено, що тварини всіх дослідних груп мають позитивний приріст: у

самців групи інтакту на 16,4%, групи, що отримувала МА-253, на 24,5%, у самиць інтакту – на 14,2%, а дослідної групи, в свою чергу, на 17,5%, проте значущих змін між групами не виявлено ($p > 0,05$ проти контролю).

Таблиця 6.7

Динаміка маси тіла щурів обох статей при внутрішньошлунковому введенні МА-253 протягом 28 днів ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Маса тіла щурів, (г) на ... день				
	1-й	8-й	15-й	22-й	29-й
Самці					
Інтактні	210,3 $\pm$ 6,2	213,5 $\pm$ 6,1	221,8 $\pm$ 6,1	233,8 $\pm$ 7,0	244,8 $\pm$ 8,2
МА-253	211,0 $\pm$ 4,8	218,7 $\pm$ 4,3	237,7 $\pm$ 5,6	250,5 $\pm$ 6,5	262,8 $\pm$ 6,8
Самиці					
Інтактні	198,7 $\pm$ 5,6	203,0 $\pm$ 6,3	211,0 $\pm$ 5,8	219,8 $\pm$ 4,7	227,0 $\pm$ 4,5
МА-253	198,8 $\pm$ 3,9	203,2 $\pm$ 3,6	213,5 $\pm$ 3,8	223,7 $\pm$ 2,5	233,5 $\pm$ 4,3

Примітка: n – кількість тварин у групі.

В останній день експерименту тварин піддавали евтаназії під ефірним наркозом згідно етичних норм поводження з тваринами та проводили подальші дослідження на встановлення впливу на стан внутрішніх органів гризунів. При аналізі масових коефіцієнтів внутрішніх органів щурів самців та самиць після внутрішньошлункового введення МА-253 протягом 28 днів не відзначали статистично значущої різниці між ними в порівнянні з інтактною групою, що свідчить про відсутність патологічних змін у організмі експериментальних тварин (табл. 6.8).

Таблиця 6.8

**Масові коефіцієнти внутрішніх органів щурів (%) після
внутрішньошлункового введення МА-253 протягом 28 днів ($M \pm m$, $n=6$)**

Група	Самці		Самиці	
	Інтактні	МА-253	Інтактні	МА-253
Печінка	$3,44 \pm 0,11$	$3,65 \pm 0,13$	$3,06 \pm 0,05$	$3,09 \pm 0,12$
Нирки	$0,70 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,05$
Серце	$0,34 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,02$
Легені	$0,67 \pm 0,06$	$0,73 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,02$
Селезінка	$0,36 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,02$
Наднирники	$0,02 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,002$
Тімус	$0,11 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,005$	$0,11 \pm 0,04$
Сім'яники	$1,18 \pm 0,06$	$1,18 \pm 0,05$	-	-
Головний мозок	$0,71 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,01$

Примітка: n – кількість тварин у групі.

Для встановлення впливу нового похідного МА-253 на функціональний стан печінки використали ряд біохімічних аналізів (табл. 6.9). Повторне введення похідного протягом 28 днів не здійснювали статистично значущого впливу на такі біохімічні показники крові, як концентрацію холестерину, альбуміну, глюкози, загального білка, загального білірубіну та ферментативної активності АЛАТ і АсАТ. Вони знаходились в межах фізіологічної норми.

Таблиця 6.9

Вплив похідного МА-253 на біохімічні показники функціонального стану печінки щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Самці		Самиці	
	Інтактні	МА-253	Інтактні	МА-253
Холестерин, ммоль/л	2,45 $\pm$ 0,14	2,56 $\pm$ 0,34	2,78 $\pm$ 0,27	2,30 $\pm$ 0,13
Альбумін, г/л	31,63 $\pm$ 1,43	31,50 $\pm$ 0,89	34,60 $\pm$ 0,69	34,15 $\pm$ 1,14
АлАТ, мккат/л	0,30 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,02
АсАТ, мккат/л	0,55 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,03
Глюкоза, ммоль/л	7,03 $\pm$ 0,14	7,02 $\pm$ 0,13	6,48 $\pm$ 0,22	6,37 $\pm$ 0,24
Загальний білок, г/л	70,09 $\pm$ 1,59	69,05 $\pm$ 1,74	68,75 $\pm$ 2,01	66,07 $\pm$ 2,18
Загальний білірубін, ммоль/л	6,37 $\pm$ 1,05	9,84 $\pm$ 1,27	9,20 $\pm$ 0,97	9,63 $\pm$ 0,69

Примітка: n – кількість тварин у групі.

Результати оцінки біохімічних показників, які характеризують функціональний стан нирок, наведені в табл. 6.10.

Як видно з результати аналізу сечі щурів, зібраної протягом доби після останнього введення похідного МА-253, відзначали відсутність впливу використання досліджуваної речовини протягом 28 днів на показники діурезу, відносної щільності, рН сечі, вмісту білка, концентрації креатиніну порівняно з інтактним контролем. Глюкозу в сечі всіх дослідних тварин не виявили. Таким чином, показники функціонального стану печінки та нирок щурів обох

статей на тлі введенні похідного МА-253 протягом 28 днів знаходились в межах норми та не відрізнялась від таких у відповідних групах інтактних тварин.

Таблиця 6.10

Вплив похідного МА-253 на біохімічні показники функціонального стану нирок щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Група	Самці		Самиці	
	Інтактні	МА-253	Інтактні	МА-253
Діурез, мл / 100 г маси	$2,09 \pm 0,18$	$1,98 \pm 0,23$	$1,83 \pm 0,30$	$2,07 \pm 0,28$
рН	$7,17 \pm 0,17$	$7,00 \pm 0,26$	$6,67 \pm 0,49$	$6,33 \pm 0,42$
Відносна щільність, г/см ³	$1,003 \pm 0,001$	$1,002 \pm 0,001$	$0,999 \pm 0,003$	$1,000 \pm 0,002$
Білок, г/л	$0,004 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$
Креатинін в сечі, ммоль/л	$1,19 \pm 0,19$	$1,23 \pm 0,26$	$1,30 \pm 0,19$	$1,17 \pm 0,15$
Креатинін в сироватці, ммоль/л	$0,081 \pm 0,003$	$0,084 \pm 0,004$	$0,087 \pm 0,003$	$0,085 \pm 0,003$

Примітка: n – кількість тварин у групі.

Подальшим етапом дослідження впливу похідного на стан внутрішніх органів став патоморфологічний огляд внутрішніх органів.

При макроскопічному дослідженні стану печінки всіх тварин усіх досліджуваних груп не відмічено будь-яких патологічних змін. Виявлено, що печінка була вкрита тонкою блискучою напівпрозорою капсулою, паренхіма печінки мала однорідну еластичну консистенцію, що відображено на рис. 6.1.

На розрізі тканина печінки червонувато-коричневого кольору, однорідна, судини, що були перетнуті, нерівномірно наповнені кров'ю.

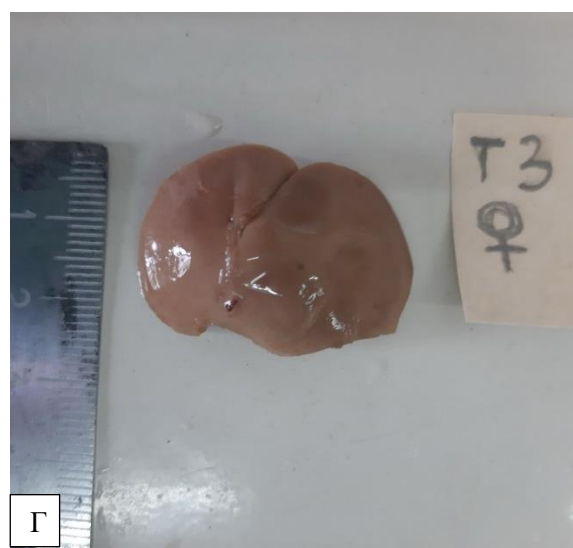
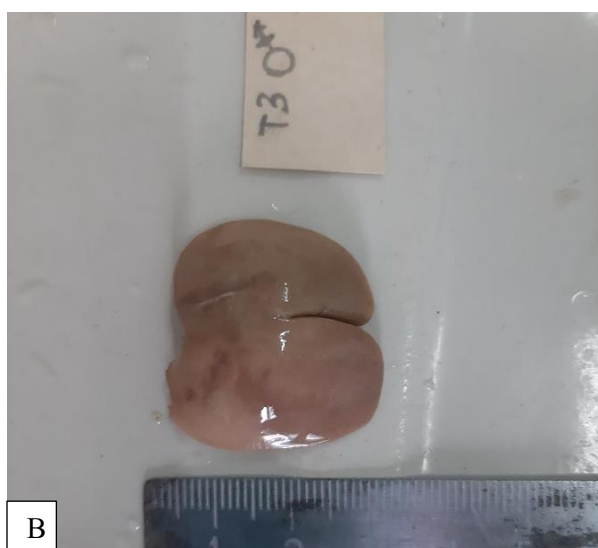
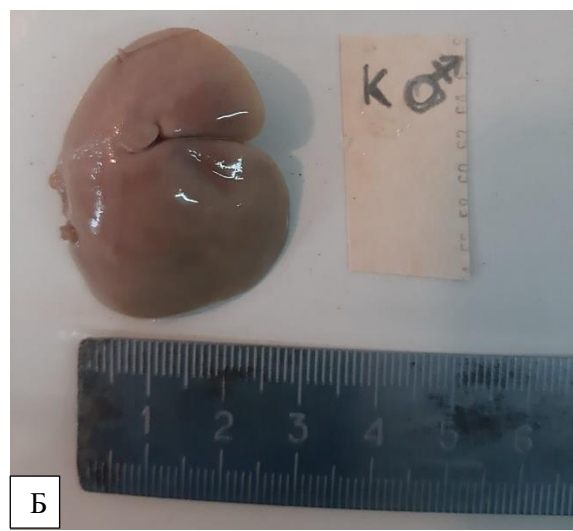


Рис. 6.1. Макропрепарати печінки досліджуваних щурів групи контролю (1А – самиці; 1Б-самця) та дослідної групи (1В – самця; 1Г-самиці).

При мікроскопічному дослідженні гістоархітектоніка печінки у всіх досліджуваних групах була збережена: балково-радіальна будова чітко простежувалася, гепатоцити у балках утворювали між собою тісні анастомози (рис. 6.2).

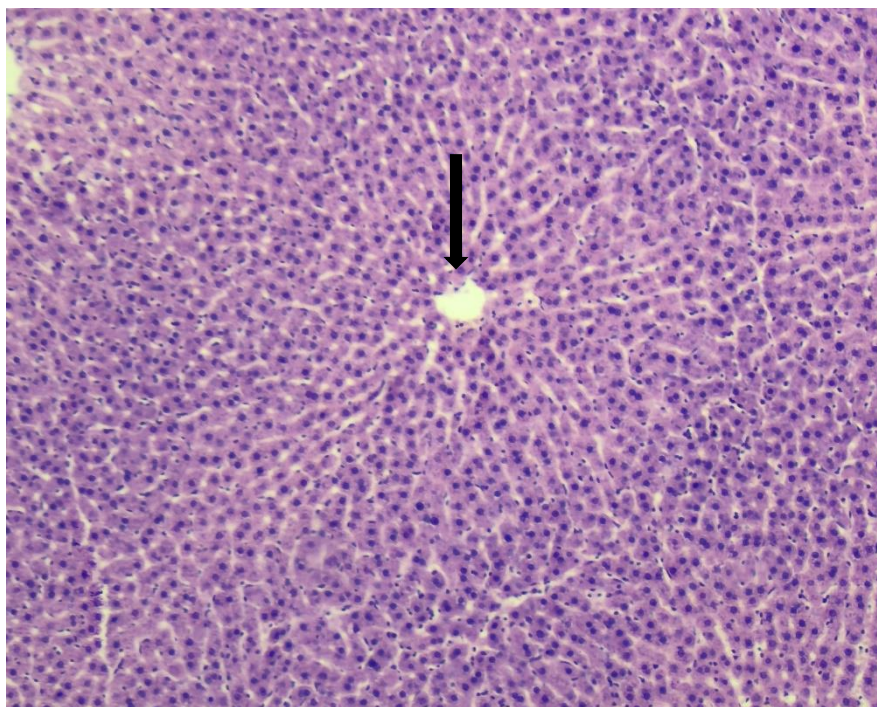


Рис. 6.2. Мікрофото печінки самиці із дослідної групи. Типова балково-радіальна структура печінки із центральною веною (відмічено стрілкою). Гематоксилін-еозин, зб. $\times 100$.

Гепатоцити в усіх досліджуваних випадках були традиційної полігональної форми із центрально розташованим округлим базофільним ядром та ацидофільною цитоплазмою навкруги із наявною в ній зернистістю (рис. 6.3). В окремих полях зору зустрічалися дещо збільшені в розмірах гепатоцити із двома ядрами.

Центральна вена печінкових часточок мала помірне кровонаповнення та широкий просвіт. Синусоїдні капіляри були вистелені ендотелієм і мали вигляд щілиноподібних просвітів між печінковими балками, містили невелику кількість формених елементів крові, переважно представлених еритроцитами.

Холангіоли мали щілиноподібний просвіт. Жовчні протоки на поперечному перерізі мали овальний або округлий просвіт, розташовані були у сполучній тканині портальних трактів, на межі печінкових часточок (рис. 6.4). Жовчні протоки вистелені низьким призматичним епітелієм.

Епітеліальні клітини мономорфні, із овальним або округлим ядром, забарвленим базофільно.

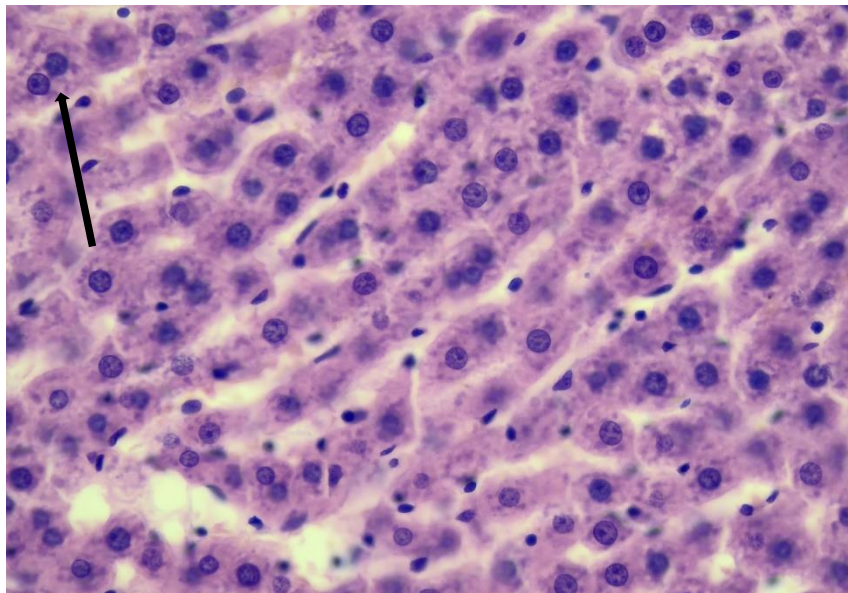


Рис. 6.3. Мікрофото клітин печінки самиці із дослідної групи. Типові гепатоцити із зернистістю цитоплазми. Двоядерний гепатоцит (показаний стрілкою). Гематоксилін-еозин, зб.×400.

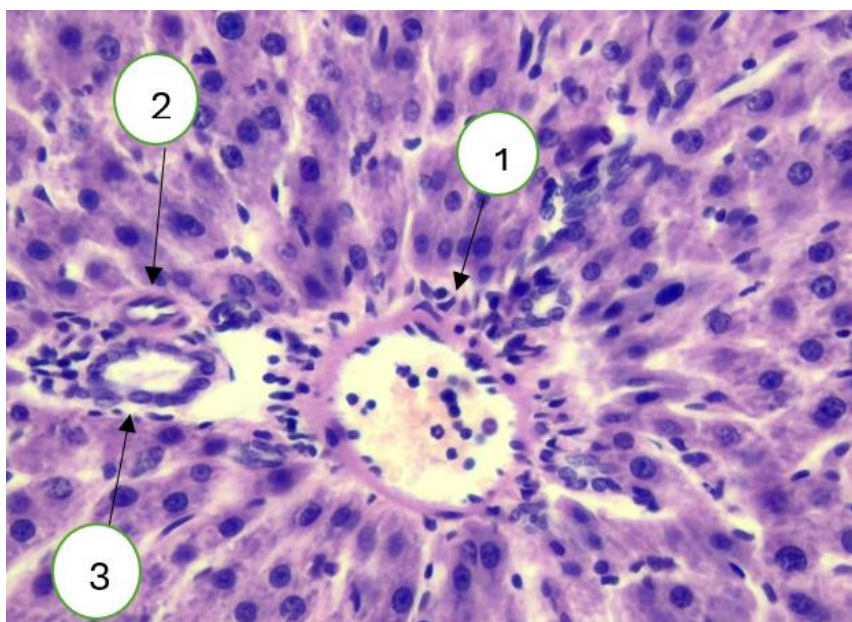


Рис. 6.4. Мікрофото печінки самця із дослідної групи. Представлена класична печінкова тріада: ворітна вена (1), жовчний проток (3) та печінкова артерія (2). Гематоксилін-еозин, зб.×200.

Для об'єктивізації даних, що дозволили б свідчити про вплив похідного МА-253, було розраховано ряд цитоморфометричних показників, числові значення яких представлені у табл. 6.11. При цьому не було знайдено достовірного зменшення або зростання жодного морфометричних показників у дослідній групі, порівняно з групою контролю.

Нирки щурів обох досліджуваних груп являли собою парний орган бобоподібної форми, що розташований заочеревинно та вкритий фіброзно-жировою капсулою (рис. 6.5).

Фіброзно-жирова капсула з нирок щурів знімалася легко, оголюючи дрібнозернисту поверхню органа коричневатого-рожеватого кольору. При гістологічному дослідженні суттєвих змін у будові нирок не виявлено в жодній з груп. Архітектоніка шарів збережена (рис. 6.6), паренхіма нирок складається з ниркових тілець, проксимальних та дистальних прямих та звивистих каналців. Корковий шар містить нефрони та проксимальні звивисті каналці. Мозковий шар представлений однією пірамідою. Піраміда включає зовнішній та внутрішній шар, який закінчується пірамідальним сосочком.

Ниркові тільця переважно овальної або кулястої форми, складаються з капілярного клубочка, порожнини клубочка та капсули клубочка (рис. 6.7). Стромальний компонент представлений пухкою сполучною тканиною. Канальцевий апарат нефрона утворений трубчастими структурами, що вистелені одношаровим епітелієм.

Таблиця 6.11

Цитоморфометричний аналіз гепатоцитів

Показник	Самці		Самиці		Самці, U, p	Самки, U, p
	Контроль (n=6)	МА-253 (n=6)	Контроль (n=6)	МА-253 (n=6)		
Площа гепатоцита, $\times 10^{-12} \text{ м}^2$	195,08 $\pm$ 2,34	194,11 $\pm$ 3,13	196,97 $\pm$ 1,73	198,08 $\pm$ 0,97	U=17, p=0,88	U=15, p=0,63
Площа ядра, $\times 10^{-12} \text{ м}^2$	69,67 $\pm$ 0,97	69,71 $\pm$ 1,42	70,93 $\pm$ 1,67	69,70 $\pm$ 1,37	U=16, p=0,82	U=8, p=0,13
Об'єм цитоплазми, $\times 10^{-18} \text{ м}^3$	1873,72 $\pm$ 44,50	1852,72 $\pm$ 13,54	1896,35 $\pm$ 45,15	1872,54 $\pm$ 36,39	U=11, p=0,26	U=13, p=0,42
Площа цитоплазми, $\times 10^{-12} \text{ м}^2$	129,62 $\pm$ 3,65	130,45 $\pm$ 2,39	128,76 $\pm$ 3,70	127,74 $\pm$ 4,19	U=16, p=0,75	U=17, p=0,87
Об'єм гепатоцита, $\times 10^{-18} \text{ м}^3$	2350,69 $\pm$ 79,45	2341,38 $\pm$ 79,35	2384,96 $\pm$ 54,69	2373,89 $\pm$ 80,76	U=17, p=0,87	U=16, p=0,75
Об'єм ядра, $\times 10^{-18} \text{ м}^3$	468,91 $\pm$ 10,05	453,68 $\pm$ 10,83	459,12 $\pm$ 8,46	462,08 $\pm$ 5,94	U=44, p=0,56	U=13, p=0,42
ЯЦІ	0,54 $\pm$ 0,003	0,53 $\pm$ 0,001	0,55 $\pm$ 0,001	0,55 $\pm$ 0,002	U=15, p=0,68	U=18, p=0,93
ЩРГ, $\times 10^6 \text{ екз./м}^2$	3370,55 $\pm$ 43,82	3388,84 $\pm$ 44,60	3401,63 $\pm$ 76,93	3415,27 $\pm$ 64,89	U=11, p=0,26	U=16, p=0,75

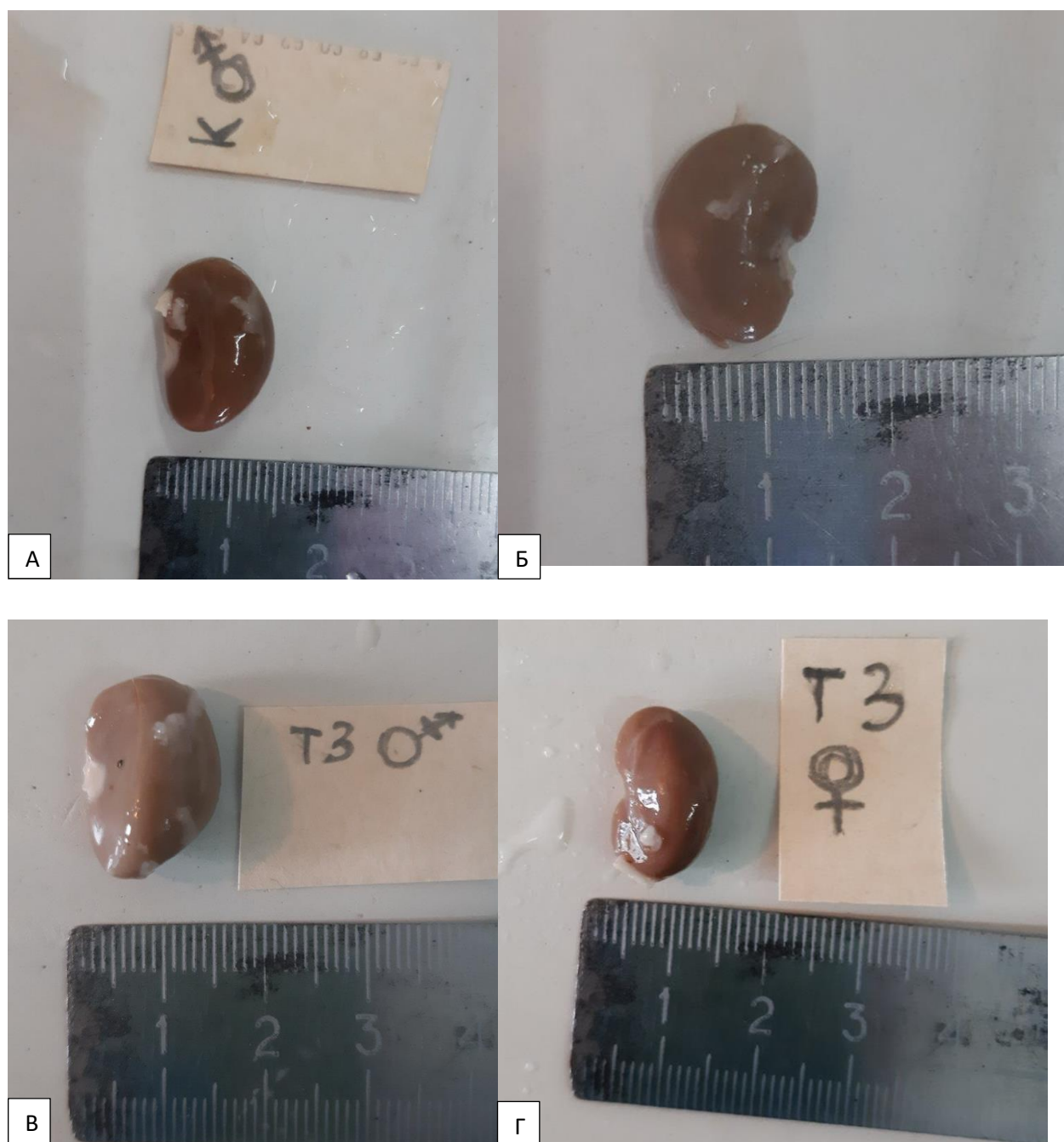


Рис. 6.5. Макропрепарати нирок досліджуваних щурів групи контролю (1А – самця; 1Б-самки) та дослідної групи (1В – самця; 1Г-самки).

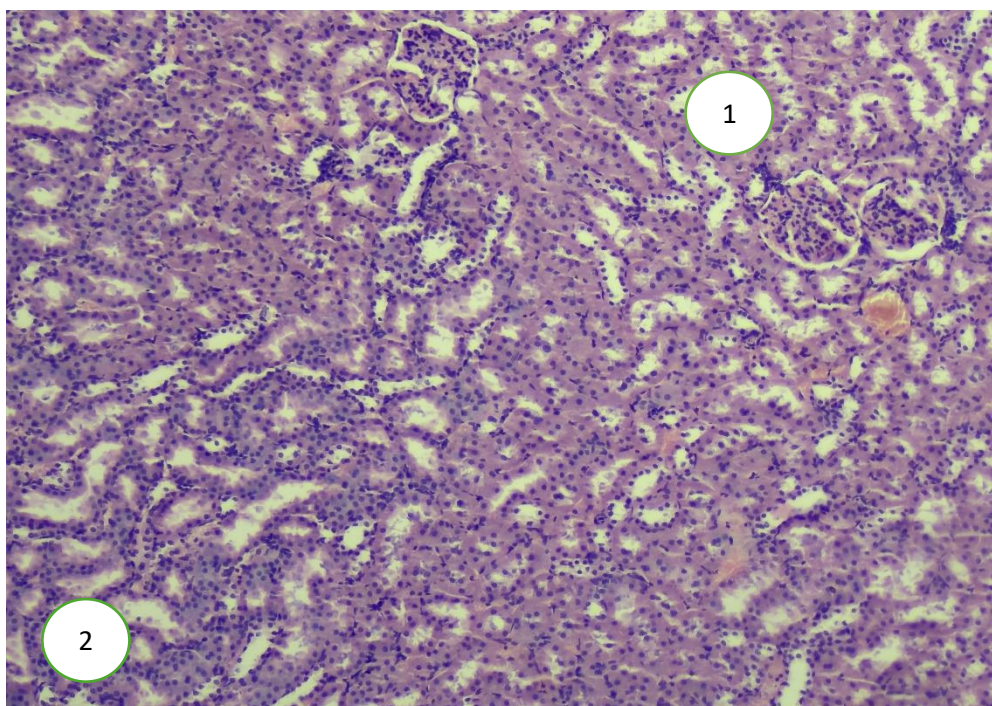


Рис. 6.6. Мікрофото нирки самця із дослідної групи. Загальний план гістологічної будови. Корковий шар та фрагмент зовнішнього шару мозкової речовини органа. Гематоксилін-еозин, зб.×200.

Аналіз діаметрів капілярів клубочка нефрона самиць показав, що в групі контролю показник коливався від 2,78 мкм до 6,32 мкм, а в дослідній групі від 3,76 мкм до 6,38 мкм, графічно дані зображені на рисунку 6.8А. Для самців з групи контролю значення коливалися від 2,48 мкм до 5,32 мкм, із дослідної групи – від 2,09 мкм до 5,73 мкм, що відображено на рисунку 6.8Б. Середні значення обчисленого параметра подано в табл. 6.12. Статистично не виявлено тенденції до зміни діаметру судинного клубочка після застосування похідного МА-253 ($U=8$, $p=0,13$) як в самиць, та і у самців.

При морфометричному аналізі вимірювали такі показники, як діаметр капілярів клубочка нефрона, діаметр капсули нефрона та власне діаметр клубочка нефрона.

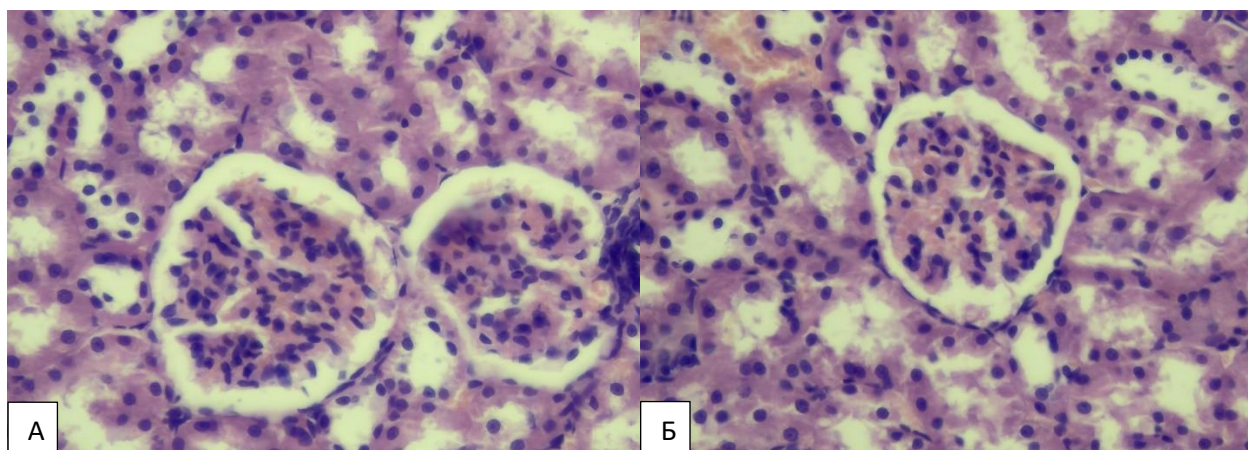


Рис. 6.7. Мікрофото нирок самиць із групи контролю (А) та дослідної групи (Б). Округлі ниркові тільця із порожнинами клубочка та оточені клубочковою капсулою. Гематоксилін-еозин, зб.×400.

При обчисленні діаметра капсули нефрона виявлено, що в самиць групи порівняння показник коливався від мінімального значення 47,99 мкм до максимального 92,23 мкм, в самиць з дослідної групи – від 70,89 мкм до 108,77 мкм (рис. 6.9 А). У самців дослідної групи значення діаметру капсули нефрона коливалися від 68,89 мкм до 94,70 мкм, в самців з групи контролю від 61,45 мкм до 91,47 мкм (рис. 6.9 Б). В групі самиць просліджувалася слабка тенденція до зменшення діаметру капсули клубочка після застосування похідного МА-253, в групі самців такої закономірності помічено не було.

Обчислення діаметру клубочка нефрона показало, що в дослідній групі самиць значення коливалися від 54,71 мкм до 90,54 мкм, а в самиць з групи контролю – від 53,93 мкм до 88,67 мкм (рис. 6.10 А). В самців дослідної групи діаметр клубочка нефрона коливався від до, в групі контролю – від 56,67 мкм до 77,30 мкм (рис. 6.10 Б). Середні значення показника для кожної з досліджуваних груп подані в таблиці 6.12. Статистично не виявлено достовірних відмінностей у зміні діаметра клубочка нефрона після застосування похідного МА-253 ні в групі самців, ні в групі самиць.

Таблиця 6.12

Цитоморфометричний аналіз складових частин нефронів

	Самці		Самиці		Самці, U, p	Самиці, U, p
	Контроль (n=6)	МА-253 (n=6)	Контроль (n=6)	МА-253 (n=6)		
Середній діаметр капілярів клубочка, мкм	4,35±1,02	3,52±1,26	3,95±1,40	5,01±0,87	U=10, p=0,2	U=8, p=0,13
Середній діаметр капсули нефрона, мкм	75,90±9,72	79,20±9,83	86,09±14,40	68,45±16,08	U=15, p=0,63	U=7, p=0,07
Середній діаметр клубочка нефрона, мкм	64,75±7,26	64,33±9,84	70,74±11,34	68,88±12,84	U=17, p=0,87	U=17, p=0,87

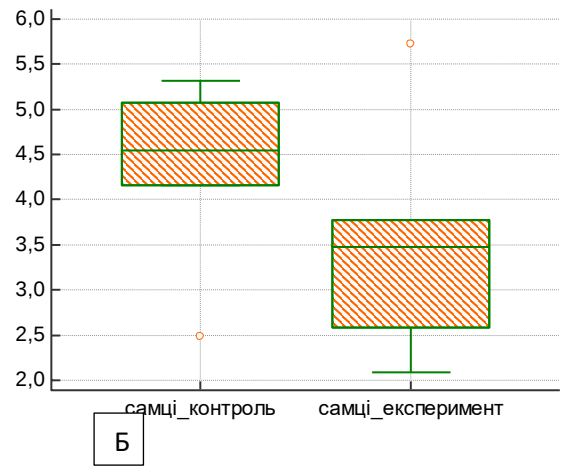
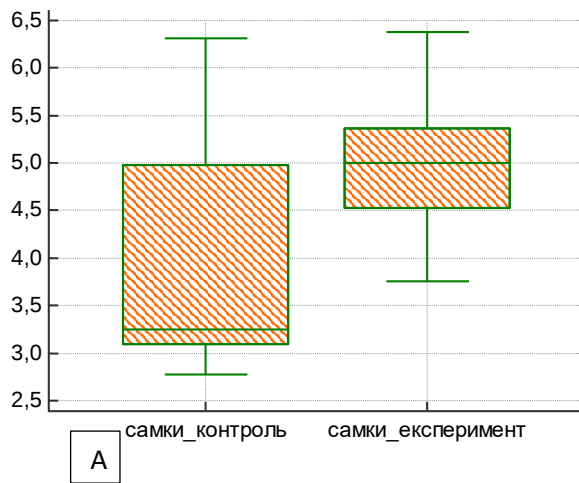


Рис. 6.8 Порівняльна діаграма морфометричних показників діаметрів капілярів клубочків нефронів самиць (А) та самців (Б).

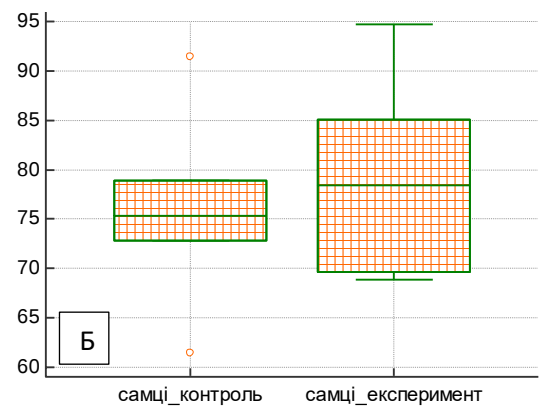
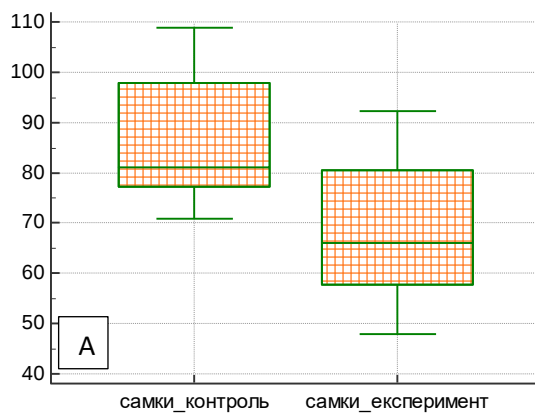


Рис. 6.9 Порівняльна діаграма морфометричних показників діаметрів капсули клубочків нефронів самиць (А) та самців (Б).

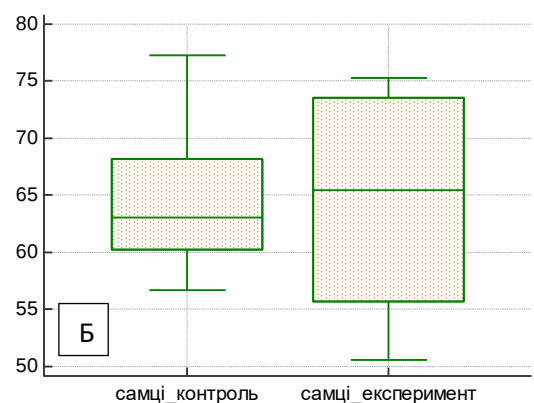
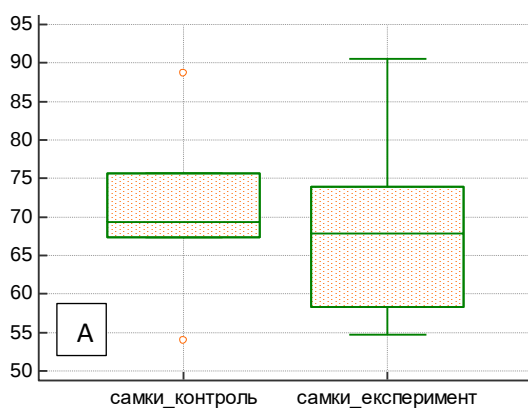


Рис. 6.10 Порівняльна діаграма морфометричних показників діаметрів клубочків нефронів самиць (А) та самців (Б).

При морфологічному дослідженні стану головного мозку щурів встановлено, що макроскопічно головний мозок щурів усіх досліджуваних груп не відрізнявся. Півкулі головного мозку та мозочку симетричні, блискучі, сірувато-рожеватого кольору. На розрізі кордон між сірою та білою речовиною збережений.

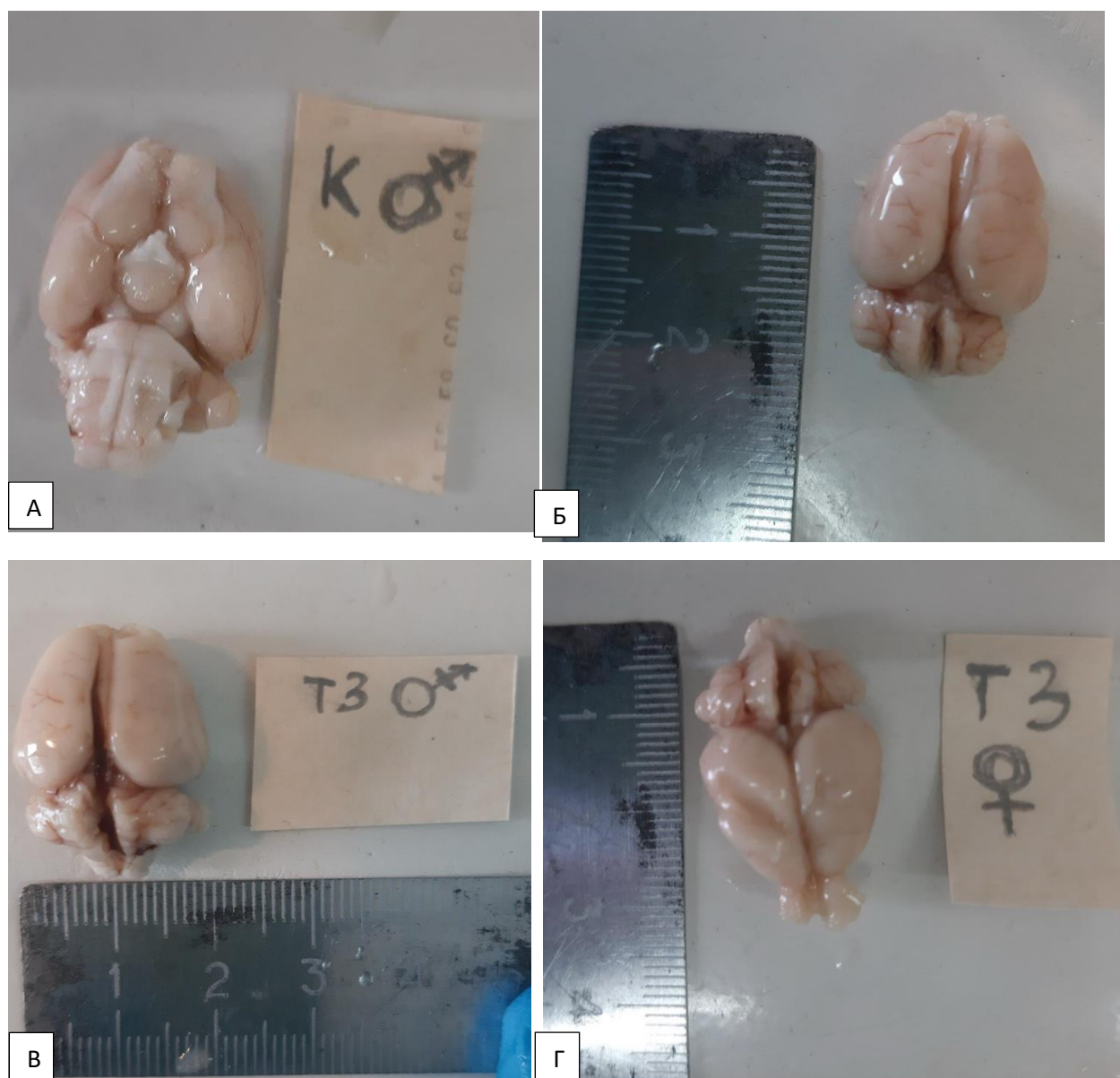


Рис. 6.11 Макропрепарати головного мозку досліджуваних щурів групи контролю (1А – самця; 1Б-самки) та дослідної групи (1В – самця; 1Г-самки).

Мікроскопічно також не знайдено будь-яких відмінностей – в усіх випадках візуалізуються чітко шари нервових клітин, що названі за

спрямуванням до поверхні головного мозку: поліморфний, внутрішній пірамідний, внутрішній зернистий, зовнішній пірамідний, зовнішній зернистий, молекулярний (рис. 6.12). Гістологічна будова мозочка в усіх досліджуваних випадках також відповідає нормі (рис. 6.13).

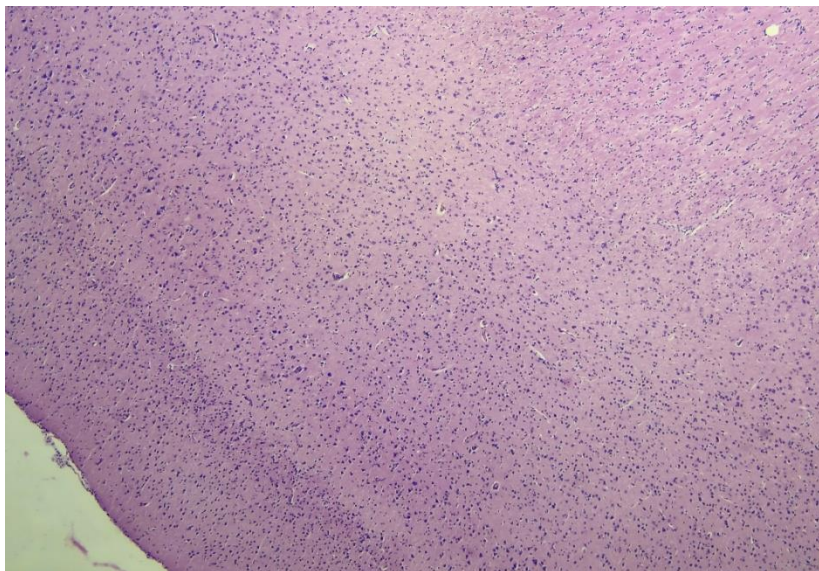


Рис. 6.12 Мікрофото головного мозку самця із дослідної групи. Загальний план гістологічної будови. Гематоксилін-еозин, зб.×100.

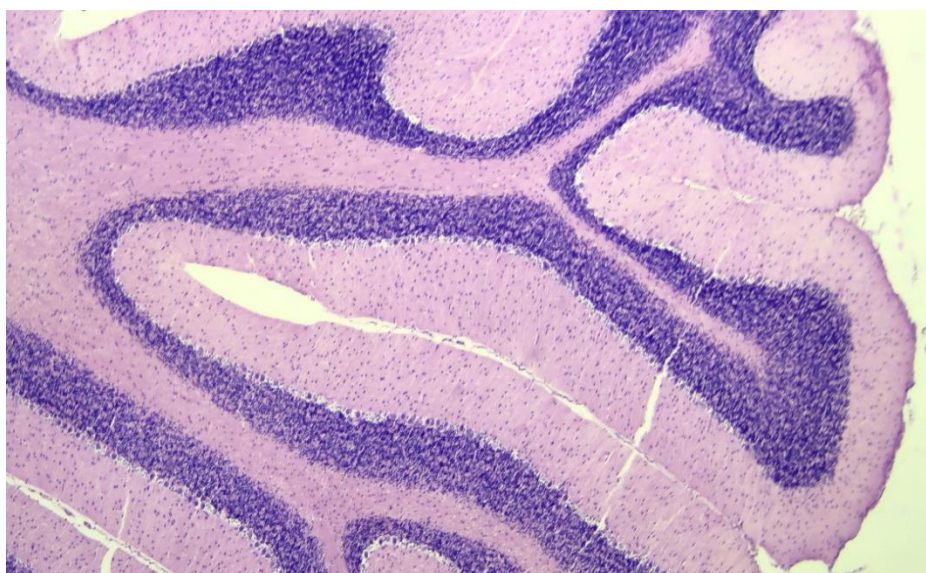


Рис. 6.13 Мікрофото мозочка самиці дослідної групи. Гістологічна будова збережена. Гематоксилін-еозин, зб.×100.

Таким чином, згідно з результатами вивчення підгострої токсичності МА-253 протягом 28 днів на щурах обох статей, встановлено, що похідне триазолобензодіазепіну загалом не здійснює токсичного впливу на загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок. Усі досліджувані показники були в межах значень групи інтактних тварин.

При морфологічному аналізі печінки, нирок та головного мозку не було виявлено будь-яких значимих відхилень гістологічної будови та морфометричних показників в дослідній групі та групі контролю, як серед самців, так і серед самиць. Проте, також було відмічено, що у групі самиць просліджувалася слабка тенденція до зменшення діаметру капсули клубочка після застосування похідного МА-253 ($p=0,07$). Для більш об'єктивного судження про можливість впливу похідного МА-253 на капсулу клубочка нефрона слід збільшити вибірку та проаналізувати даний параметр.

Висновки до розділу 6

1. Проведено дослідження актопротекторної активності сполуки-лідера. В умовах тесту вимушеного плавання з навантаженням МА-253, завантажений в нановолокна, здійснює сприятливий стимулюючий ефект на фізичну витривалість, незалежно від статті.

2. У тесті взаємодії з етанолом досліджуване похідне показало помірне потенціювання пригнічувального впливу на ЦНС: відзначали пролонгування тривалості бічного положення гризунів дослідних груп у порівнянні з контрольними тваринами.

3. Досліджено взаємодію МА-253 з речовиною стимулювального типу дії. Похідне виявляє антагонізм до кофеїну, очевидно, посилюючи гальмівні аденозинергічні впливи у ЦНС.

4. Задля встановлення наявності толерантності ефектів на тлі застосування МА-253 проведено ряд досліджень його впливу на поведінкові реакції при тривалому введенні (протягом 28 днів). Встановлено, що

досліджуване похідне проявляє виражену анксиолітичну активність, стимулювальну дію на локомоторно-дослідницькі реакції та чинить позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох статей, не викликаючи толерантність в умовах відповідних тестів.

5. При оцінці безпечності застосування похідного в умовах *in vivo* встановлено, що досліджувана речовина не спричиняє гострих токсичних реакцій за в/ш введення у дозі 2500 мг/кг та може бути віднесена до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner.

6. Похідне МА-253 при дослідженні підгострої токсичності при застосуванні протягом 28 днів не викликає достовірних відмінностей динаміки маси тіла, показників функціонального стану сечовидільної та гепатобіліарної систем, не впливає на масові коефіцієнти внутрішніх органів, їхню гістоструктуру, а, отже, не здійснює токсичного впливу на загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок. При макроскопічному дослідженні печінки, нирок та головного мозку не знайдено відмінностей між щурами групи контролю та дослідної групи. При гістологічному дослідженні із використанням методу цитоморфометрії не було встановлено достовірної різниці між станом органів до та після застосування похідного МА-253. На підставі морфологічного дослідження печінки, нирок та головного мозку можна судити про відсутність токсичного впливу похідного МА-253 на вказані органи.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. *«Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів»* : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

РОЗДІЛ 7
НАПІВТВЕРДИЙ ЕКСТРУЗІЙНИЙ 3D-ДРУК
ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНИХ ПОЛІЕТИЛЕНОКСИДНИХ ГЕЛІВ,
ЗАВАНТАЖЕНИХ НАНОВОЛОКНАМИ 1,2,3-ТРИАЗОЛО-1,4-
БЕНЗОДІАЗЕПІНУ ТА СУХИМ ЕКСТРАКТОМ КРОПИВИ СОБАЧОЇ
ТРАВИ (*LEONURUS CARDIACA L.*), МОДИФІКОВАНОГО ВАЛІНОМ

Використання нових комбінацій синтетичних і природних сполук у лікуванні захворювань може бути багатообіцяючим підходом до подолання проблем, пов'язаних із традиційною терапією одним препаратом. Поєднання синтетичних і місцевих активних інгредієнтів (таких як триазолобензодіазепіни та екстракти кропиви собачої при лікуванні ТР) може забезпечити синергічний ефект (підвищену терапевтичну ефективність) і зменшити ризик побічних ефектів через меншу дозу препарату [230, 231]. Також очевидно, що такі комбіновані системи доставки ліків здатні знизити толерантність до ліків і залежність від них, а отже, підвищити безпеку медикаментозного лікування. Попередні дослідження фармакологічної активності екстрактів кропиви собачої з додаванням амінокислот, особливо валіну, показали виражену протитривожну дію [188]. Екстракти трави кропиви собачої мають також антиоксидантні або протизапальні властивості [159]. Наша гіпотеза полягає в тому, що, включивши такі природні сполуки як доповнення до СДЛ із синтетичним препаратом, ми могли б покращити та забезпечити комплексний підхід до лікування ТР [232, 233].

Сучасні методи 3D-друку дозволяють створювати персоналізовані СДЛ на основі індивідуальних потреб пацієнта (тобто конкретних доз або комбінацій ліків) [234]. Крім того, 3D-друк дає змогу виготовляти складні СДЛ (такі як препарати з контрольованим вивільненням і препарати з кількома лікарськими засобами) [235], і таким чином підвищувати терапевтичну ефективність фармацевтичних препаратів та дотримання режиму лікування пацієнтів.

7.1 Фізичний вигляд і в'язкість ПЕО гелів, завантажених нановолокнами з похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну МА-253 та модифікованим валіном сухим екстрактом кропиви собачої трави

У табл. 7.1 наведено склад водних ПЕО-гелів, завантажених нановолокнами з похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну МА-253 та модифікованим валіном сухим екстрактом кропиви собачої трави, розробленим для напівтвердого екструзійного 3D-друку. Сухий екстракт кропиви собачої трави, модифікованого валіном, спочатку розчиняли в невеликій кількості етанолу, а потім додавали емульсію з нановолокнами, завантаженими МА-253, і ретельно перемішували з етанольною сумішшю. Даний розчин використовували для приготування остаточного водного ПЕО гелю. Наявні функціоналізовані гелі ПЕО являли собою однорідні помірно в'язкі маси коричневого кольору зі специфічним запахом.

Таблиця 7.1

Склад водних ПЕО гелів, наповнених нановолокнами з МА-253 та сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованого валіном

Зразок	Модифікований екстракт трави, г	Нановолокна змішані з олеогелем, г	Емульгін СМО20, г	ПЕО, г	Етанол, мл	Вода, мл
1	0,5	0,04	0,560	1,196	1,00	9,00
2	1,0	0,08	0,498	1,198	1,00	9,00
3	1,5	0,12	0,476	1,198	1,00	9,00

Оцінка в'язкості має вирішальне значення для напівтвердих речовин і гелів, призначених для 3D-друку, оскільки необхідно відрегулювати механіку

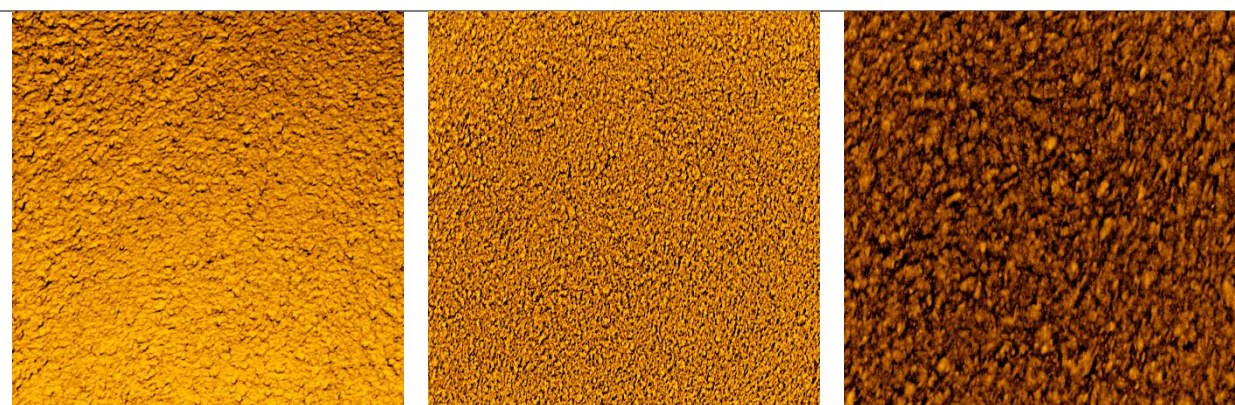
рідини, щоб узгодити рухи платформи принтера задля забезпечення найвищої якості 3D-друкованих об'єктів [236]. Табл. 7.2 показує результати вимірювань в'язкості для трьох досліджених функціоналізованих ПЕО гелів. Вимірювання в'язкості проводили при кімнатній температурі (22 ± 2 °C).

Таблиця 7.2

В'язкість водних ПЕО гелів, наповнених нановолокнами з МА-253 та сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованого валіном

Зразок	В'язкість, сП (швидкість 0,03 об/хв, швидкість зсуву 0,060 1/с, температура 22 ± 2 °C, n = 3)
1	147200 ± 16633
2	177000 ± 17985
3	259333 ± 9734

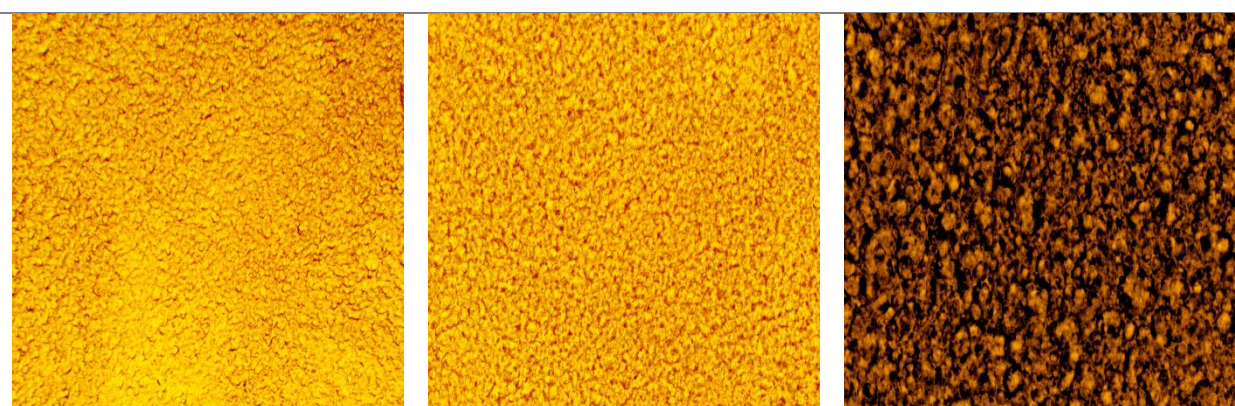
Фізичний вигляд і однорідність функціоналізованих ПЕО гелів вивчали за допомогою оптичного світлового мікроскопа, оснащеного цифровою камерою. Три ПЕО гелі, наповнені нановолокнами 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну та сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованого валіном, мали колір від жовтого до коричневого кольору та ступінь однорідності від середнього до практично однорідного (рис. 7.1).



Зразок 1. Збільшення 50×

Збільшення 100×

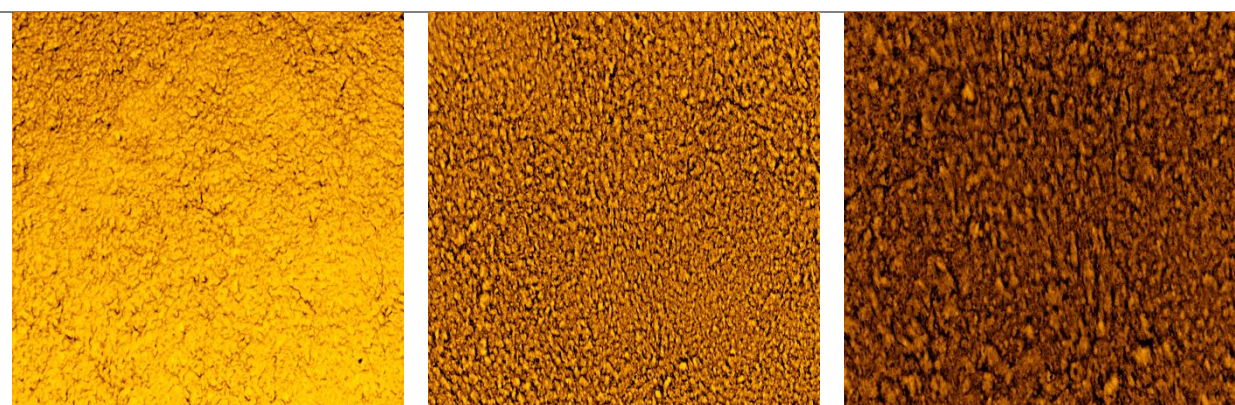
Збільшення 200×



Зразок 2. Збільшення 50×

Збільшення 100×

Збільшення 200×



Зразок 3. Збільшення 50×

Збільшення 100×

Збільшення 200×

Рис. 7.1 Зображення за допомогою оптичної світлової мікроскопії водних ПЕО гелів, завантажених нановолокнами 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну та сухим екстрактом кропиви собачої трави, модифікованим валіном.

7.2 Можливість напівтвердого екструзійного 3D-друку функціональних ПЕО гелів

Viidik та ін. [237] визначили та оптимізували ключові параметри напівтвердого екструзійного 3D-друку для водних ПЕО гелів. У цьому дослідженні ми покладалися на висновки Viidik та співавторів у виборі умов друку для наших функціоналізованих ПЕО гелів. Для напівтвердого екструзійного 3D-друку ПЕО гелів температура друкуючої головки (з тупою голкою) і друкарської форми підтримувалася на рівні 30 °С. Швидкість друкуючої головки була встановлена на 0,5 мм/с. Ефективність друку функціоналізованих ПЕО гелів досліджували шляхом друку квадратних тривимірних решіток стандартного розміру з постійними розмірами 30 x 30 x 0,5 мм, а потім оцінюючи якість кінцевих надрукованих СДЛ [238]. Табл. 9.3 підсумовує результати експериментів із 3D-друком та оцінку якості (тобто вага та площа поверхні 3D-друкованих решіток).

Таблиця 7.3

Вага та площа поверхні друкованих решіток шляхом напівтвердого екструзійного 3D-друку (n = 3)

Зразок	Вага, мг	Площа (S), mm ²	S практична / S теоретична
1	211,0 ± 7,1	390,2 ± 20,7	1,20
2	241,1 ± 10,5	347,6 ± 19,1	1,07
3	307,2 ± 5,7	412,5 ± 25,4	1,27

Для оцінки якості друку кінцевих СДЛ решітки та круглі диски були надруковані з функціональних ПЕО гелів. Фотографії таких друкованих решіток і дисках круглої форми показані на рис. 7.2 і 7.3 відповідно. Решітки друкували зі швидкістю друкуючої головки 0,5 мм/с, і було сформовано вісім

шарів (рис. 7.2). Решітки, надруковані на напівтвердому екструзійному 3D-принтері, показали помірну або хорошу якість друку та хорошу відтворюваність, таким чином припускаючи, що такі функціональні ПЕО гелі придатні для використання за призначенням.

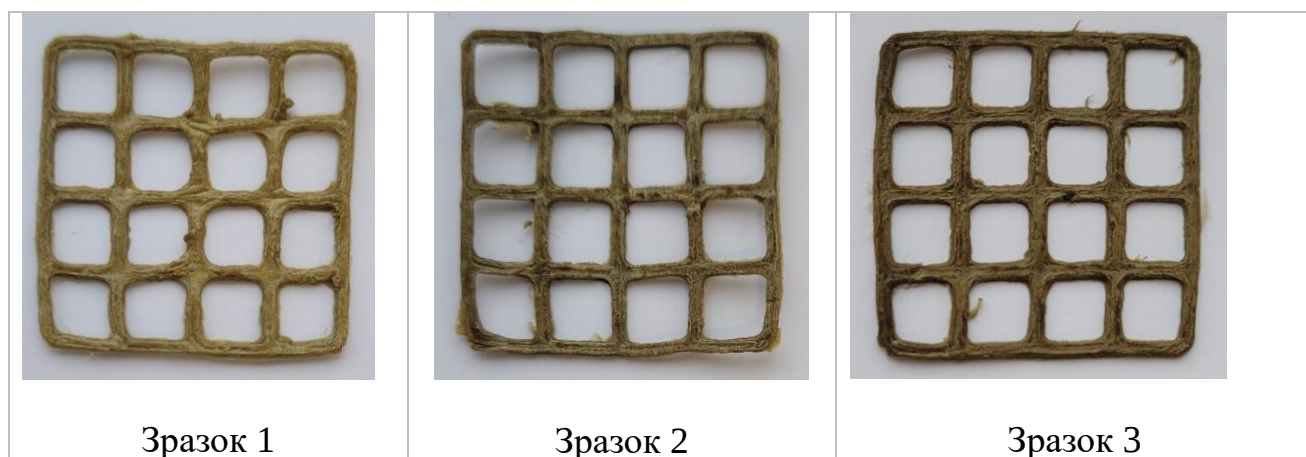


Рис. 7.2 Решітки, надруковані шляхом напівтвердого екструзійного 3D-друку (зразки 1-3).

На рис. 7.3 показано фотографії дисків округлої форми, надрукованих на напівтвердому екструзійному 3D-принтері, призначених для перорального введення (зразок 1 як приклад складу). Ці препарати склалися загалом із п'яти надрукованих шарів гелю, а диски були надруковані із постійною швидкістю друкуючої головки 0,5 мм/с. Середня вага 3D-друкованих дисків (зразок 1) становила $110,0 \pm 2,2$ мг.



Рис. 7.3 3D-друковані диски круглої форми ($n = 3$).

7.3 Розчинення *in vitro* решіток, надрукованих шляхом напівтвердого екструзійного 3D-друку

Тест на розчинення *in vitro* 3D-друкованих решіток проводили в очищеній воді (без перемішування та з перемішуванням) при кімнатній температурі навколишнього середовища (22 ± 2 °C). Поведінку розчинення друкованих решіток спостерігали візуально протягом 30 хвилин. Решітки, надруковані на 3D-принтері, повністю розпалися/розчинилися приблизно протягом 20 хвилин. Це свідчить про доцільність використання СДЛ, надрукованих на 3D-принтерах, для перорального введення з метою негайного вивільнення АФІ.

7.4 Спектрофотометричний аналіз флавоноїдів

Вміст флавоноїдів у лікарських препаратах, надрукованих на напівтвердим екструзійним 3D-друком (зразки 1-3), визначали за встановленим спектрофотометричним методом, описаним у Європейській фармакопеї [163–165]. Вміст флавоноїдів у надрукованих на 3D-принтерах СДЛ (зразки 1-3) становив $0,30 \pm 0,09\%$, $0,39 \pm 0,02\%$ та $0,46 \pm 0,03\%$ відповідно.

Висновки до розділу 7

1. Розроблено та оптимізовано для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку нові функціоналізовані формули ПЕО гелю, що поєднують нановолокна 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави.

2. Результати показують, що нановолокна, заповнені АФІ, можна однорідно змішувати з сухим екстрактом кропиви собачої трави в ПЕО-гелях. Функціоналізований ПЕО гель, що містить сухий екстракт кропиви собачої

трави 100 мг/мл, представляє найперспективнішу ефективність напівтвердого екструзійного 3D-друку. Надруковані 3D-зразки, розроблені в цьому дослідженні, придатні для перорального введення з негайним вивільненням.

3. Потрібні подальші дослідження для перевірки терапевтичної ефективності та безпеки сучасних композитних надрукованих на 3D-принтері СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та сухого екстракту кропиви собачої трави, модифікованого валіном, у медикаментозному лікуванні тривоги.

Результати експериментальних досліджень цього розділу наведено в таких публікаціях:

1. Botsula I., Kireyev I., Koshovyi O., Heinämäki J., Ain R., Mazur M., Chebanov V. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.299205>.

2. Botsula I., Koshovyi O., Kireyev I., Mazur M., Chebanov V., Heinämäki J., Raal A. 3D printing of functionalized polyethylene oxide (peo) gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* l.) dry extract using semi-solid extrusion technology. *Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin* : The Proceedings of the VI International Scientific and Practical Internet-Conference, Kharkiv, 12 April 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.12-13.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Незважаючи на те, що тривога є природною реакцією організму на стрес-фактори, тривалий та інтенсивний вплив таких чинників, як економічні або побутові проблеми, військові конфлікти, пандемії, онкологічні захворювання, безпліддя, може призвести до формування хронічного стресу, що сприяє розвитку тривожних станів. Епідеміологічні дослідження свідчать, що тривожні розлади входять до числа найбільш поширених психічних розладів та пов'язані з високим економічним тиском та психічними проблемами [239]. Ці розлади можуть впливати на осіб різного віку, статі та походження, але, найімовірніше, вони розвиваються у жінок [239, 240]. За даними ВООЗ, близько 275 млн людей у всьому світі страждають від ТР, що становить приблизно 3,6% населення світу [241].

Фармакологічна корекція тривожно-депресивних розладів має ключове значення для сучасної медицини, яка має великий арсенал різноманітних препаратів для профілактики та лікування нервово-психічних захворювань. Серед цих препаратів анксиолітики, зокрема похідні 1,4-бензодіазепіну (такі як діазепам, гідазепам, алпразолам, феназепам, лоразепам та інші), займають провідні позиції, незважаючи на можливі побічні ефекти [242, 243].

Сучасна фармакотерапія має завдання коригувати та поліпшувати психоемоційний стан людини, а також пошуку нових активних фармацевтичних інгредієнтів для створення ефективних протитривожних препаратів.

Доклінічне дослідження лікарських препаратів є важливою складовою процесу створення ліків. Результати цих досліджень, які встановлюють специфічну фармакологічну активність і безпеку застосування, а також оцінюють можливі віддалені наслідки, є ключовими факторами. Вони визначають можливість промислового виробництва лікарського засобу та доцільність його медичного використання [244].

На підставі огляду даних літератури та проведеного гнучкого рецепторно-орієнтованого молекулярного докінгу була показана перспективність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як сполук з потенційною протитривожною активністю.

Оцінка безпечності застосування нових сполук є обов'язковим важливим етапом фармакологічного дослідження. Цитотоксичність бензодіазепінів і похідних триазолобензодіазепіну може залежати від ряду факторів, включаючи конкретну досліджувану сполуку, тип клітин, що досліджується, і концентрацію сполуки. Було показано, що деякі бензодіазепіни та їх похідні індукують апоптоз (програмовану клітинну смерть) у певних типах ракових клітин, що свідчить про те, що вони можуть мати потенціал як протипухлинні агенти [170, 245, 246]. Алмейда та автори досліджували цитотоксичність седативного бензодіазепіну флунітразепаму (FNZ), який використовувався як снодійний та преанестетичний засіб, і результати показали відсутність цитотоксичної дії на клітини гепатом китайських хом'яків і щурів (*Rattus norvegicus*) [247]. Додавання FNZ у різних концентраціях (0,2, 1,0, 5,0 та 10,0 мкг/мл) не викликало пригнічення клітинної проліферації, крім того, стимулювало її. Цитотоксичність 14 бензодіазепінів, інкубованих із CYP2Cs у клітинах HepG2, досліджували для визначення індукованої лікарськими засобами гепатотоксичності [248]. Флунітразепам, німетазепам, нітразепам і клоназепам, які належать до групи нітробензодіазепінів і мають нітрогрупу в бічному ланцюзі, виявилися більш цитотоксичними, ніж інші 10 досліджених похідних бензодіазепіну.

Відомо, що тривале перебування на сонці пов'язане з розвитком деяких видів раку шкіри, старінням шкіри, пригніченням імунітету, захворюваннями очей [249]. Симптоми індукованої лікарськими засобами фоточутливості зазвичай з'являються через кілька годин після впливу сонячного світла та включають еритему, набряк, пухирі, ексудацію, лущення, печіння, свербіж та гіперпігментацію шкіри [250]. Бензодіазепіни, які зазвичай призначають для лікування тривоги та розладів сну, можуть бути не загальновідомою причиною

фоточутливості через їх низьку частоту (<1%), а в третинних джерелах бензодіазепіни не послідовно вказуються як потенційна причина фоточутливості. Крім того, дослідники показали, що алпразолам, тетразепам, клобазам і клоразепам індукують фототоксичні реакції [251, 252]. Тому важливо було визначити фототоксичність досліджуваних зразків.

Бензодіазепіни, такі як хлордіазепоксид і нітразепам, відомі своєю здатністю викликати фототоксичність. Ці препарати або їх метаболіти поглинають ультрафіолетове випромінювання, переходять у збуджений стан і генерують реактивні кисневі види, що призводить до окисного стресу і пошкодження клітин шкіри. У результаті може спостерігатися почервоніння, набряк, відчуття печіння і утворення пухирів на шкірі [253]. Відповідно до результатів, отриманих під час дослідження, нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіни не впливають негативно на проліферацію клітин до та після впливу сонячного світла, що можна вважати нефототоксичним. Життєздатність клітин BALB/c 3T3 на тлі досліджуваних похідних і метаболічна активність мітохондрій не падали нижче 70% порівняно з контролем.

Дослідження *in vitro*, проведені в рамках дисертаційної роботи, не продемонструвало наявності генотоксичного впливу досліджуваних похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в умовах уму-тесту. Визначення генотоксичного ефекту альпразоламу не показало значної індукції активності β-галактозидази, що свідчить про відсутність пошкоджень ДНК або мутагенного потенціалу у бактерій при тестуванні [254]. Подібні результати були отримані і для триазоламу, де не було виявлено вираженої генотоксичності у стандартних умовах уму-тесту [172].

Скринінгові дослідження анксиолітичної активності проводили в двох загально прийнятих тестах. Поведінка мишей у тестах ПХЛ і ТСК відображає конфлікт між перевагою мишами захищених зон (тобто закритих рукавів/темного відсіку) та їх вродженою мотивацією досліджувати нові середовища [255]. Протитривожний ефект препаратів пов'язаний зі

збільшенням періоду часу, проведеного на освітленому просторі (відкритому рукаві/світлому відсіку камери), та/або з кількістю входів між ними. Згідно з літературними даними, анксиолітична активність бензодіазепіну та його похідних у тесті ПХЛ часто є дозозалежною [256]. Менші дози бензодіазепінів можуть викликати легкий анксиолітичний ефект, тоді як більш високі дози демонструють вищу тенденцію до підвищення рухової активності, і, таким чином, тварини вважають за краще залишатися на відкритому просторі тестового пристрою [257]. Результати, про які повідомляються в літературі, також узгоджуються з результатами, отриманими в нашому дослідженні з похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Скринінгові дослідження продемонстрували наявність анксиолітичної активності 5 нових похідних в тестах ПХЛ та ТСК, що проявилось у збільшенні тривалості перебування мишей на відкритому просторі приладів, основного показнику тривожної поведінки тварин. Найвиразніше проявився ефект на тлі МА-253 в максимально досліджуваній дозі (1 мг/кг). У порівнянні з контрольною групою час перебування на відкритому просторі збільшився у мишей, які отримували похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів під шифром МА-252, МА-253 і МА-254 у дозі 1 мг/кг на 86%, 160 % та 77 % відповідно ($p < 0,01$). Подібний ефект відзначали і в тесті ТСК, де на тлі введення МА-253 у дозах 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг та 1 мг/кг час перебування у світлій частині досліджуваного апарату збільшився на 91%, 113% (у 2,13 разів) та 214% (у 3,14 разів) відповідно ($p < 0,01$). Відомо, що бензодіазепіни, клас препаратів, що включає похідні триазолобензодіазепінів, діють на ГАМК, підсилюючи її інгібуючий ефект і призводячи до зниження поведінкових реакцій, подібних до тривоги [258]. У зв'язку з наявністю анксиолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів можна припустити можливість реалізації такого ефекту за рахунок зв'язування з ГАМК-А рецептором.

Відомо, що у ряді випадків терапія депресивних станів піддається більш ефективному лікуванню при сумісному застосуванні антидепресантів з анксиолітичними препаратами [259]. Бензодіазепінові препарати

використовуються при лікуванні депресивних станів у зв'язку з тим, що їх дія зменшує прояви таких супутніх симптомів, як безсоння, занепокоєння, тривога, у ряді випадків спостерігається прискорення настання ремісії, а також відстежують швидший початок клінічного ефекту, що може бути використане на початковому етапі терапії депресивних розладів [243].

В рамках виконання дисертаційної роботи встановлено антидепресивну активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів: в умовах тесту примусового плавання за Порсолт похідні МА-253, МА-254 і МА-255 у дозах 1 мг/кг зменшують загальну тривалість нерухомості та мають низький індекс депресії, а в тесті «підвішування за хвіст» ці ж похідні продемонстрували помітне зменшення загального періоду іммобілізації порівняно з групою контролю.

Вплив нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів на м'язовий тонус та координацію рухів досліджено за допомогою тесту вертикальної сітки та ротарод-тесту та встановлено відсутність їхнього негативного впливу, продемонстровано тенденцію до прояву міорелаксантих властивостей зі збільшенням дози, на відміну від класичних бензодіазепінів.

В тесті ВП встановлено, що найвиразніші зміни здійснює похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг, яке призводить до збільшення рухової та орієнтовно-дослідницької активності, при цьому зменшується сума емоційних проявів у тварин, що за характером впливу є подібним до препарату порівняння гідазепаму. Така поведінка мишей може свідчити про зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження тварин, а також прояву анксиолітичних властивостей.

Як відомо, відмінності в ізоформах α -субодиниці, спорідненості до типу рецептора і розташуванні в ЦНС пояснюють різні ефекти різних бензодіазепінів. Рецептори, які містять α_2 -ізоформу, опосередковують анксиолітичну та, значною мірою, міорелаксуючу дію. Бензодіазепінові рецептори більш сконцентровані в таких областях, як лімбічна система, моторні нейрони та спинний ріг спинного мозку. Вважається, що анксиолітичні

ефекти бензодіазепінів опосередковані через бензодіазепіновий сайт на ГАМК-А рецепторі, розташовані в лімбічній системі, а міорелаксанти властивості опосередковані через α_2 -вмісні рецептори в спинному мозку та моторних нейронах [39]. Відзначається також роль субодиниці α_6 у опосередкуванні атаксії, спричиненої алкоголем і бензодіазепінами [260].

Нещодавні дослідження повідомляють, що не тільки ГАМК-А рецептори, що містять δ -субодиницю, але й інші підтипи ГАМК-А рецепторів, зокрема α_5 -субодиниця, були пов'язані з поведінкою, наприклад афективною та когнітивною функцією в моделі депресії [59].

Як вже зазначалось, ГАМК-А рецептори та рецептори гліцину відіграють важливу роль в спинальному контролі ноцицепції та болю. Їхня дисфункція передачі сприяє виникненню хронічних больових станів [197]. Для сполук бензодіазепінового ряду та ГАМК-ергічних речовин, зокрема діазепаму, зміни поведінки в тесті гарячої пластини пов'язують не з модуляцією болю, а з седативною та м'язово-релаксуючою дією. Тварини демонстрували збільшення локомоції, що було оцінено як втечу з аверсивної ситуації за рахунок зниження рівня тривожності, а не прояву анальгетичної активності [261].

У рамках дисертаційного дослідження при проведенні тесту «гаряча пластина» спостерігали збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче подразнення терморецепторів кінцівок мишей під впливом похідних МА-252, МА-253 та МА-254 в дозі 1 мг/кг та визначили наявність вираженого анальгетичного ефекту на тлі введення МА-253 через 2 години після його введення (на 55,7% більше за показник в групі контролю). Такі результати відрізняються від попередньої думки щодо реорганізації поведінки гризунів в умовах тесту у зв'язку з проявом седативних властивостей препарату та свідчать про те, що визначені похідні блокують ноцицептивні реакції на супраспинальному рівні.

На моделі «оцтовокислих корчів» похідні МА-252 у дозі 1 мг/кг, МА-253 та МА-254 у дозах 0,75 та 1 мг/кг продемонстрували потенційне зниження

кількості корчів порівняно з контрольною групою, що може свідчити про наявність аналгетичного ефекту. Крім того, похідне МА-253 у дозі 1 мг/кг, як і препарати порівняння метамізол та диклофенак натрію, виявляло значний знеболювальний ефект, що становив 74,2 %.

Експериментальні дані демонструють здатність деяких похідних бензодіазепінового ряду, зокрема діазепаму, клоназепаму, лоразепаму та мідазоламу, виявляти виразну антигіпералгезивну активність щодо запального та нейропатичного болю, діючи через α_2/α_3 субдиниці бензодіазепінових рецепторів, не викликаючи седацію, порушення рухової активності чи розвитку толерантності [262–264].

За умов нормобаричної гіпоксичної гіпоксії похідні МА-252, МА-253 та МА-255 не проявили антигіпоксичних властивостей, а похідне МА-254 виявило потенційну активність, пролонгуючи тривалість життя піддослідних тварин на 26,2 % ($p < 0,05$ проти контролю).

Мозок є найбільш захищеним органом від усіх інших різних органів тіла завдяки наявності гематоенцефалічного бар'єру, який зберігає його гомеостаз, перешкоджаючи потрапляння будь-яких збудників чи нейротоксичних речовин, та навіть ліків, коли молекула препарату завелика. У зв'язку з цим важливим завданням фармацевтичної індустрії стало пошук шляхів створення наноносіїв, які були безпечними, біосумісними та могли легко дифундувати між ендотеліальними клітинами через щільні з'єднання ГЕБ та активно доставляти препарат до мозку. Серед широкого розмаїття розроблених наносистем електросформовані нановолокна є багатообіцяючим інструментом для доставки ліків завдяки численним перевагам, таким як велике співвідношення поверхні до об'єму, висока ефективність завантаження ліків, біосумісність, хороша механічна гнучкість і простий метод приготування [265].

Три похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254) були відібрані для подальших фармакологічних досліджень анксиолітичної активності, та створення СДЛ на основі нановолокон,

завантажених ними, за допомогою ЕП. Гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ) є полімером-носієм, який використовується для створення пероральних твердих дозованих форм, а саме багат шарових нановолокнистих матів. Усі ці мати склалися зі сферичних гладких нановолокон досить однакового розміру. За допомогою сканувального електронного мікроскопу визначено відсутність пов'язаних з процесом дефектів, таких як кульки, залишки крапель або пилкоподібні візерунки зубців. Для дослідження потенційних індукованих процесом перетворень і взаємодії АФІ з полімером, пов'язаного з ЕП нановолокон, завантажених ними, було використано рентгеноструктурний аналіз та встановлено, що МА-252 і МА-253 залишаються в кристалічному стані після процесу ЕП, тоді як тверда форма МА-254 змінюється з кристалічної форми на аморфну форму в процесі ЕП. Аморфний полімер-носії (ГПМЦ) може бути використаний для створення електропрядених нановолокон для сучасних нових бензодіазепінів.

Для визначення впливу технології проведено фармакологічні дослідження *in vivo*. В тесті ПХЛ встановлено підвищення тривалості перебування мишей на відкритому рукаві тестового пристрою на тлі введення нановолокон, завантажених МА-252, МА-253 і МА-254, збільшився на 17%, 19% і 20%, відповідно, порівняно з попереднім скринінговим дослідженням анксиолітичної активності похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Таку ж тенденцію спостерігали в умовах тесту темно-світлої камери при їхньому введенні гризунам у формі олеогелю та сухій формі: тривалість знаходження у світлій камері був в 2,8 рази довше на тлі введення нановолокон з МА-252, в 3,8 рази – з МА-253 та в 2,6 рази – з МА-254 в порівнянні з групою контролю. Виразні анксиолітичні властивості досліджуваних похідних підтверджують провідну роль ГАМК-ергічного впливу в механізмі їхньої протитривожної дії.

У тестах примусового плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст» визначено виражену антидепресивну активність на тлі введення нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252, МА-253

та МА-254: спостерігали пролонгування латентного періоду першого зависання, а також скорочення загальної тривалості зависання в усіх групах.

Встановлено найбільшу аналгетичну активність на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, в умовах тестів гарячої пластини та оцтовокислих корчів. Такі зміни свідчать про вплив СДЛ на основі нановолокон на центральні та периферичні механізми розвитку болю у мишей.

Незважаючи на те, що тривалість життя тварин при введенні нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, була дещо вище за попередні результати, все ж дані свідчать про відсутність їхнього значущого антигіпоксичного ефекту.

В тесті ВП реєстровані зміни свідчать про зниження стану тривожності тварин на тлі СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

Проведено поглиблені дослідження похідного МА-253, який на основі найвиразніших змін фармакологічної активності у гризунів було визначено як сполуку-лідер. У тесті вимушеного плавання час настання виснаження в тесті на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем був на 42% більше у самців та 47% у самиць в порівнянні з групами контрольних тварин. Такі зміни фізичної витривалості тварин можуть бути ознакою наявності в актопротекторної активності.

Етанол здійснює виразні ефекти на ЦНС. Його введення гризунам призводить до зменшення латентного періоду настання сну та збільшує фазу глибокого сну. У реалізації седативної/гіпнотичної дії етанолу важливу роль відіграють ГАМК-, аденозінергічна з A_{2a} рецептором, а також гістамінергічна системи [266]. Кофеїн і етанол діють на аденозинову систему різними способами, що призводить до протилежних фізіологічних і поведінкових ефектів. Кофеїн є неселективним антагоністом аденозину, який діє головним чином на рецептори A_1 і A_{2A} , тоді як етанол підвищує аденозінергічний тонус шляхом інгібування ендонуклеотидного транспортера типу 1, таким чином, блокуючи поглинання аденозину, а також шляхом збільшення синтезу

аденозину під час метаболізму етанолу [267]. У тесті взаємодії з етанолом похідне МА-253, завантажене в нановолокна, демонструє помірне потенціювання пригнічувального впливу на ЦНС, статистично значуще подовжуючи тривалість бічного положення. При застосуванні похідного МА-253, завантаженого в нановолокна, змішаного з олеогелем або тритуrowаним з лактозою, на тлі кофеїну-бензоату натрію рухова активність гризунів зростала в 2,5 та 2,6 рази відповідно порівняно з групою контролю, та була меншою за показник в групі кофеїну-бензоату натрію. Така поведінка тварин може свідчити про нівелювання збуджувального ефекту кофеїну-бензоату натрію, похідне виявляє антагонізм до кофеїну, очевидно, посилюючи гальмівні аденозинергічні впливи у ЦНС.

Тривале використання препаратів бензодіазепінінової природи може призвести до різних побічних ефектів, включаючи падіння, дорожньо-транспортні пригоди, марення, когнітивні порушення та залежність [268]. Повідомлялося, що толерантність до фармакологічних ефектів може розвинути як ознака залежності протягом кількох тижнів [269, 270]. Тому було проведено дослідження фармакологічної активності похідного МА-253 за умов тривалого введення (протягом 28 днів), в ході якого встановлено його виражену анксиолітичну активність, стимулювальну дію на локомоторно-дослідницькі реакції та позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох статей за відсутності розвитку толерантності ефектів в умовах відповідних тестів.

Відсутність смертності серед досліджуваних тварин дозволяє припустити, що значення LD_{50} перевищує 2500 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні. Похідне МА-253 може бути віднесене до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner.

Згідно з результатами вивчення підгострої токсичності МА-253 протягом 28 днів на щурах обох статей, встановлено, що похідне триазолобензодіазепіну не здійснює токсичного впливу на загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок. Усі досліджувані показники були в межах

значень групи інтактних тварин. На підставі морфологічного дослідження печінки, нирок та головного мозку можна судити про відсутність токсичного впливу похідного МА-253 на вказані органи.

Напівтвердий екструзійний 3D-друк нещодавно привернув підвищену увагу через його застосування у фармацевтичній індустрії як потенційний метод дрібносерійного виробництва персоналізованих твердих лікарських форм задля забезпечення, зокрема, фармакокорекції больових синдромів, асоційованих з тривожним розладом та врахуванням фактору індивідуальної переносимості пацієнтом [271, 272]. Надрукована тверда лікарська форма для перорального застосування може мати різну геометричну форму, складну внутрішню структуру, а також задовольнити потреби різних пацієнтів завдяки гнучкому регулюванню дозування, що потенційно може підвищити безпеку та ефективність деяких ліків [238, 273]. Нами було розроблено та оптимізовано для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку нові функціоналізовані формули ПЕО гелю, що поєднують нановолокна, завантажені похідним МА-253, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави. Реологічні та механічні властивості гелів мають вирішальне значення для успішного 3D-друку. Результати показують, що нановолокна, заповнені АФІ, можна однорідно змішувати з сухим екстрактом кропиви собачої трави в ПЕО-гелях, більше того функціоналізований ПЕО гель, що містить сухий екстракт кропиви собачої трави 100 мг/мл, представляє найперспективнішу ефективність напівтвердого екструзійного 3D-друку. Надруковані 3D-зразки, розроблені в цьому дослідженні, придатні для перорального введення з негайним вивільненням.

Результати проведених експериментальних досліджень обґрунтовують перспективність подальшого вивчення похідного МА-253 з метою створення нового засобу з анксиолітичною та анагетичною діями для профілактики та лікування тривожних розладів, особливо в онкологічних пацієнтів в перед- та післяопераційний періоди, а також на тлі бойової травми чи травматичного досвіду в умовах військового конфлікту на території України.

ВИСНОВКИ

Поширеність та соціальна значущість психічної патології, пов'язаної зі стресом, наявність різних варіацій клінічних форм психоневротичних розладів потребує їх фармакокорекції з метою поліпшення стану пацієнта завдяки новим безпечним і високоактивним засобам, зокрема анксиолітичної дії. Перспективними сполуками залишаються похідні бензодіазепінів, які за рахунок своєї фармакологічної ефективності продовжують займати лідерські позиції по застосуванню в клінічній практиці. Дослідження останніх років свідчать про важливість вивчення та пошуку нових речовин на основі бензодіазепінів, зокрема триазолобензодіазепінів, для лікування тривожних станів та розладів, а також виявлення інших біологічних активностей цих сполук.

У дисертації представлено експериментальне обґрунтування доцільності застосування нових 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів для корекції тривожних станів. Результати фармакологічних досліджень дозволили виявити сполуку лідер серед досліджуваних похідних з вираженою анксиолітичною і анагетичною активностями та іншими фармакодинамічними ефектами.

1. В ході молекулярного докінгу нових 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (R та S енантіомерів) відносно бензодіазепінового сайту ГАМК рецептора було виявлено, що найкращі енергетично вигідні позиції мали S-енантіомери, коли, в свою чергу, R-енантіомери мали помірні значення афінітету. Згідно обчислених оціночних значень та детального аналізу локації було знайдено найбільш перспективну молекулу-хіт MA-253 з S-конфігурацією, яка мала вищі абсолютні значення скорингової функції порівняно з діазепамом і гідазепамом.

2. При оцінці безпечності застосування нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів щодо клітин BALB/c 3T3 в умовах *in vitro* в тестах ПНЧБ, МТТ та генотоксичність в уму-тесті з *S. typhimurium* встановлено відсутність потенційного токсичного впливу.

3. Результати скринінгових досліджень встановили наявність анксиолітичної активності 5 нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, що проявляється у збільшенні тривалості перебування мишей на відкритому просторі приладів в тестах ПХЛ та ТСК, що є основним показником тривожної поведінки тварин. У порівнянні з контрольною групою час перебування на відкритому просторі збільшився у мишей, які отримували нові похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів під шифром МА-252, МА-253 і МА-254 у дозі 1 мг/кг на 86%, 160 % та 77 % відповідно ($p < 0,01$). Подібний ефект відзначали і в тесті темно-світлої камери, де на тлі введення МА-253 у дозах 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг та 1 мг/кг час перебування у світлій частині досліджуваного апарату збільшився на 91%, 113% (у 2,13 разів) та 214% (у 3,14 разів) відповідно ($p < 0,01$). Встановлено антидепресивну активність похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в умовах тесту примусового плавання за Порсолт, де сполуки МА-253, МА-254 і МА-255 у дозах 1 мг/кг зменшують загальну тривалість нерухомості та мають низький індекс депресії, а також в тесті підвішування, де МА-253, МА-254 та МА-255 продемонстрували помітне зменшення загальної тривалості іммобілізації на 69,4%, 47,1% та 33,1% відповідно порівняно з групою контролю. Вплив нових сполук на м'язовий тонус та координацію рухів досліджено за допомогою тесту вертикальної сітки та ротарод-тесту та встановлено відсутність їхнього негативного впливу, продемонстровано тенденцію до прояву міорелаксантих властивостей зі збільшенням дози. В тесті відкритого поля встановлено, що найвиразніші зміни здійснює похідне МА-253 в дозі 1 мг/кг, яке призводить до збільшення рухової та орієнтовно-дослідницької активності, при цьому зменшується сума емоційних проявів у тварин, що за характером впливу є подібним до препарату порівняння гідазепаму. Така поведінка мишей може свідчити про зменшення рівня тривоги та психоемоційного напруження тварин.

4. У тесті «гаряча пластина» відзначали збільшення латентного періоду реакції поведінкової відповіді на болюче подразнення терморецепторів кінцівок мишей під впливом похідних МА-252, МА-253 та

МА-254 в дозі 1 мг/кг та наявність вираженого аналгетичного ефекту на тлі введення МА-253 через 2 години після його введення. На моделі «оцтовокислих корчів» похідні МА-252 у дозі 1 мг/кг, МА-253 та МА-254 у дозах 0,75 та 1 мг/кг продемонстрували потенційне зниження кількості корчів порівняно з контрольною групою, що може свідчити про наявність аналгетичного ефекту. За умов нормобаричної гіпоксичної гіпоксії похідні МА-252, МА-253 та МА-255 не проявили антигіпоксичних властивостей, а похідне МА-254 виявило потенційну активність, пролонгуючи тривалість життя піддослідних тварин порівняно з контрольною групою в середньому на 26,2 % ($p < 0,05$).

5. Три похідні 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів (МА-252, МА-253 і МА-254) були відібрані для подальших досліджень анксіолітичної активності, і сформульовані СДЛ на основі нановолокон за допомогою ЕП. ГПМЦ було обрано як полімер-носіє, призначений для пероральних твердих дозованих форм, для створення багатошарових нановолокнистих матів. Усі ці мати склалися зі сферичних гладких нановолокон досить однакового розміру без пов'язаних з процесом дефектів, таких як кульки, залишки крапель або пілкоподібні візерунки зубців. Аморфний полімер-носіє (ГПМЦ) може бути використаний для створення електропрядених нановолокон для сучасних нових бензодіазепінів.

В тесті ПХЛ встановлено, що час перебування мишей на відкритому рукаві тестового пристрою на тлі введення нановолокон, завантажених МА-252, МА-253 і МА-254, збільшився на 17%, 19% і 20%, відповідно, порівняно з попереднім скринінговим дослідженням анксіолітичної активності нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів. Також їхнє введення у формі олеогелю та сухій формі, продемонстрували значний анксіолітичний ефект в умовах тесту ТСК.

У тестах примусового плавання за Порсолт та «підвішування за хвіст» спостерігали пролонгування латентного періоду першого зависання, а також скорочення загальної тривалості зависання в усіх групах, що може свідчити

про наявність вираженої антидепресивної активності на тлі введення нановолокон, завантажених новими похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів МА-252, МА-253 та МА-254.

Встановлено найбільшу аналгетичну активність на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253. В умовах тесту гарячої пластини максимальний ефект досягався на 120 хв після їхнього введення. На моделі «оцтовокислих корчів» зменшувалась кількість вигинів тіла на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем чи з лактозою, на 76,5% та 78,3 % відповідно.

Попри те, що тривалість життя тварин при введенні нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, була дещо вище за попередні результати, все ж результати свідчать про відсутність їхнього значущого антигіпоксичного ефекту.

В тесті ВП реєстровані зміни свідчать про зниження стану тривожності тварин на тлі СДЛ на основі нановолокон, завантажених похідними 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

6. У тесті вимушеного плавання час настання виснаження в тесті на тлі введення нановолокон, завантажених МА-253, змішаних з олеогелем був на 42% більше у самців та 47% у самиць в порівнянні з групами контрольних тварин. Такі зміни фізичної витривалості тварин можуть бути ознакою наявності в похідного актопротекторної активності.

У тесті взаємодії з етанолом похідне МА-253 демонструє помірне потенціювання пригнічувального впливу на ЦНС, а в тесті з кофеїн-бензоатом натрію встановлено нівелювання його збуджувального ефекту. Похідне виявляє антагонізм до кофеїну, очевидно, посилюючи гальмівні аденозинергічні впливи у ЦНС.

Проведено дослідження фармакологічної активності похідного МА-253 за умов тривалого введення (протягом 28 днів), в ході якого встановлено його виражену анксиолітичну активність, стимулювальну дію на локомоторно-дослідницькі реакції та позитивний ефект на фізичну витривалість щурів обох

статей за відсутності розвитку толерантності ефектів в умовах відповідних тестів.

7. Відсутність смертності серед досліджуваних тварин дозволяє припустити, що значення LD_{50} перевищує 2500 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні. Похідне МА-253 може бути віднесене до IV класу – малотоксичних речовин за класифікацією Hodge та Sterner.

Згідно з результатами вивчення підгострої токсичності МА-253 протягом 28 днів на щурах обох статей, встановлено, що похідне триазолобензодіазепіну загалом не здійснює токсичного впливу на загальнотрофічні процеси, функції печінки та нирок. Усі досліджувані показники були в межах значень групи інтактних тварин. При макроскопічному та гістологічному дослідженнях печінки, нирок та головного мозку із використанням методу цитоморфометрії не знайдено відмінностей між щурами групи контролю та дослідної групи, що свідчить про відсутність токсичного впливу похідного МА-253 на вказані органи.

8. Розроблено та оптимізовано для фармацевтичного напівтвердого екструзійного 3D-друку нові функціоналізовані формули ПЕО гелю, що поєднують нановолокна, завантажені похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави (100 мг/мл). Результати показують, що нановолокна, заповнені АФІ, можна однорідно змішувати з сухим екстрактом кропиви собачої трави в ПЕО-гелях. Надруковані 3D-зразки, розроблені в цьому дослідженні, придатні для перорального введення з негайним вивільненням.

9. Результати проведених експериментальних досліджень обґрунтовують перспективність подальшого вивчення похідного МА-253 з метою створення нового лікарського засобу з анксиолітичною та анагетичною діями для профілактики та лікування тривожних розладів, особливо в онкологічних пацієнтів в перед- та післяопераційний періоди, а також на тлі бойової травми чи травматичного досвіду в умовах військового конфлікту на території України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010 / H. U. Wittchen et al. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2011. Vol. 21. № 9. P. 655–679. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018.
2. Depression and other common mental disorders: global health estimates. Global Health Estimates / World Health Organization. Geneva, 2017. 24 p.
3. Assessment of the anxiolytic, antidepressant, and antioxidant potential of *Parquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock in Wistar rats / A. A. Akinduko et al. *Journal of Ethnopharmacology*. 2024. Vol. 322. P. 117597. DOI: 10.1016/j.jep.2023.117597.
4. Ströhle A., Gensichen J., Domschke K. The diagnosis and treatment of anxiety disorders. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2018. Vol. 115. № 37. P. 611–620. DOI: 10.3238/arztebl.2018.0611.
5. Epidemiology of psychiatric and alcohol disorders in Ukraine: findings from the Ukraine World Mental Health survey / E. J. Bromet et al. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*. 2005. Vol. 40. № 9. P. 681–690. DOI: 10.1007/s00127-005-0927-9.
6. Кількість внутрішньо переміщених осіб в Україні знову зростає. *IOM Ukraine*. 2022. URL: <https://ukraine.iom.int/uk/news/kilkist-vnutrishno-peremishchenykh-osib-v-ukrayini-znovu-zrostaye-dani-mom> (дата звернення: 12.12.2023).
7. Внутрішні вимушені переміщення: обсяги, проблеми та способи їх вирішення. *Національний інститут стратегічних досліджень*. 2023. URL: <https://niss.gov.ua/news/komentari-ekspertiv/vnutrishni-vymusheni-peremishchennya-obsyahu-problemy-ta-sposoby-yikh> (дата звернення: 01.02.2024).
8. Lohvynova M.O. Internally displaced persons as a category of forced migrants: concept and signs. *Scientific Bulletin of Kherson State University. Series*

Geographical Sciences. 2019. Vol. 11. P. 44–50. DOI:10.32999/ksu2413-7391/2019-11-6.

9. The Mental Health of IDPs and the general population in Ukraine / I. Kuznetsova et al. *Zenodo*. 2019. № 2. DOI: 10.5281/zenodo.2585564.

10. Hilditch S. Hidden burdens of conflict: Issues of mental health and access to services among internally displaced persons in Ukraine. *International Alert*. 2017. URL: <https://www.international-alert.org/publications/hidden-burdens-of-conflict/> (дата звернення: 12.12.2023).

11. Anxiety and depression in adult cancer patients: ESMO Clinical Practice Guideline / L. Grassi et al. *ESMO Open*. 2023. Vol. 8. № 2. P. 101155. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.101155.

12. Anxiety and depression after cancer diagnosis: prevalence rates by cancer type, gender, and age / W. Linden et al. *Journal of Affective Disorders*. 2012. Vol. 141, № 2–3. P. 343–351. DOI: 10.1016/j.jad.2012.03.025.

13. Prevalence of depression, anxiety, and adjustment disorder in oncological, haematological, and palliative-care settings: a meta-analysis of 94 interview-based studies / A. J. Mitchell et al. *The Lancet. Oncology*. 2011. Vol. 12. № 2. P. 160–174. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70002-X.

14. GBD 2021 Diseases and Injuries Collaborators. Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability-adjusted life-years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet (London, England)*. 2024. Vol. 403. № 10440. P. 2133–2161. DOI: 10.1016/S0140-6736(24)00757-8.

15. Diazepam effects on anxiety-related defensive behavior of male and female high and low open-field activity inbred mouse strains / E. A. Mehrhoff et al. *Physiology & Behavior*. 2023. Vol. 271. № 114343. DOI: 10.1016/j.physbeh.2023.114343.

16. Fear and anxiety in COVID-19: preexisting anxiety disorders / R. Shafran et al. *Cognitive and Behavioral Practice*. 2021. Vol. 28. № 4. P. 459–467. DOI: 10.1016/j.cbpra.2021.03.003.
17. Botsula I.V., Kireyev I.V. Use of benzodiazepines in patients with anxiety disorders and confirmed COVID-19. *Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects* : матеріали III науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 15-16 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. с.254.
18. COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide. *World Health Organization*. 2022. URL: <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-covid-19-pandemic-triggers-25-increase-in-prevalence-of-anxiety-and-depression-worldwide> (дата звернення: 12.12.2023).
19. Mental Health and COVID-19: Early evidence of the pandemic's impact. *Mental Health and COVID-19: Scientific brief*. 2022. URL: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/352189/WHO-2019-nCoV-Sci-Brief-Mental-health-2022.1-eng.pdf?sequence=1> (дата звернення: 12.12.2023).
20. Mental health. *World Health Organization*. 2023. URL: https://www.who.int/health-topics/mental-health#tab=tab_2/ (дата звернення: 12.12.2023).
21. Challenges to implementing opioid substitution therapy in ukrainian prisons: personnel attitudes toward addiction, treatment, and people with HIV/AIDS / M. Polonsky et al. *Drug and alcohol dependence*. 2015. Vol. 148. P. 47–55. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2014.12.008.
22. Colborne M. Ukraine struggles with rise in PTSD. *Canadian Medical Association Journal*. 2015. Vol. 187. № 17. P. 1275–1275. DOI: 10.1503/cmaj.109-5160.
23. Безшийко В. Г. Терапія тривожних розладів: сучасний погляд на проблему. *MozOK*. URL: <https://mozok.ua/anxietydisorder/article/3184-terapiya-trivozhnih-rozladv-suchasnij-poglyad-na-problemu> (дата звернення: 06.06.2024).

24. Колесник М. Тривога та депресія очима фахівців різних спеціальностей. *Український Медичний Часопис*. 2019. URL: <https://umj.com.ua/uk/publikatsia-163496-trivoga-ta-depresiya-ochima-fahivtsiv-riznih-spetsialnostej> (дата звернення: 12.12.2023).
25. Nemchenko A. S., Lyadenko A. V. Analysis of the epidemiological state of mental disorders and pharmaceutical provision of patients with medicines by the government of Ukraine. *Farmatsevtychnyi zhurnal*. 2022. Vol. 1. P. 40–49. DOI: 10.32352/0367-3057.1.22.04.
26. Comprehensive Mental Health Action Plan 2013-2030. WHO. 2021. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240031029> (дата звернення: 20.04.2022).
27. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders / A. Tsang et al. *The Journal of Pain*. 2008. Vol. 9. № 10. P. 883–891. DOI: 10.1016/j.jpain.2008.05.005.
28. Центр організації психіатричної допомоги. Статистика / Державна установа «Інститут судової психіатрії Міністерства охорони здоров'я України». 2021. URL: <https://cmhmda.org.ua/statistics/> (дата звернення: 20.04.2022).
29. Chand S. P., Marwaha R. Anxiety. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2023. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470361/> (дата звернення: 20.04.2023).
30. The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing / O. K. Faull et al. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2019. Vol. 98. P. 135–144. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.12.020.
31. Prepronociceptin-expressing neurons in the extended amygdala encode and promote rapid arousal responses to motivationally salient stimuli / J. Rodriguez-Romaguera et al. *Cell Reports*. 2020. Vol. 33. № 6. P. 108362. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108362.

32. Копчак О.О. Сучасні уявлення про патогенез і лікування тривожних розладів. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018. № 2 (96). Р. 45–51. DOI: 10.22141/2224-0713.2.96.2018.130482.
33. Neurostructural abnormalities associated with axes of emotion dysregulation in generalized anxiety / E. Makovac et al. *NeuroImage : Clinical*. 2015. Vol. 10. Р. 172–181. DOI: 10.1016/j.nicl.2015.11.022.
34. Hellwig S., Domschke K. Anxiety in late life: an update on pathomechanisms. *Gerontology*. 2019. Vol. 65. № 5. Р. 465–473. DOI: 10.1159/000500306.
35. Потенційні патологічні механізми тривожних розладів в осіб похилого віку. *НейроNEWS: психоневрологія та нейропсихіатрія*. 2021. № 1. С. 32–37. URL: <https://neuronews.com.ua/ua/archive/2021/1/pages-32-37/potenciynni-patologichni-mehanizmi-trivozhnih-rozladiv-v-osib-pohilogo-viku#h3-6> (дата звернення: 14.12.2023).
36. Nieuwenhuys A., Oudejans R. R. D. Anxiety and perceptual-motor performance: toward an integrated model of concepts, mechanisms, and processes. *Psychological Research*. 2012. Vol. 76, № 6. Р. 747–759. DOI: 10.1007/s00426-011-0384-x.
37. Матвієнко Ю. Доказова фармакотерапія генералізованого тривожного розладу. *Медицина світу*. 2012. Т. 33, № 10. URL: <http://msvitu.com/archive/2012/october/article-1.php>. (дата звернення: 14.12.2023).
38. Yu Y. Pathogenesis of anxiety disorders. *Calgary Guide*. 2015. URL: <https://calgaryguide.ucalgary.ca/pathogenesis-of-anxiety-disorders/> (дата звернення: 14.12.2022)
39. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects / C. E. Griffin et al. *The Ochsner Journal*. 2013. Vol. 13. № 2. Р. 214–223.
40. Smoller J. W. The genetics of stress-related disorders: PTSD, depression, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2016. Vol. 41. № 1. Р. 297–319. DOI: 10.1038/npp.2015.266.

41. Synthesis and biological evaluation of benzazepine oxazolidinone antibacterials / P. D. Johnson et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003. Vol. 13. № 23. P. 4197–4200. DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.07.017.
42. Synthesis of benzoazepine derivatives via azide rearrangement and evaluation of their antianxiety activities / O. Reamtong et al. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2021. Vol. 12. № 9. P. 1449–1458. DOI: 10.1021/acsmchemlett.1c00275.
43. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological activities of 1-benzazepine derivatives containing a sulfoxide moiety / M. Seto et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005. Vol. 13, № 2. P. 363–386. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.10.021.
44. Cyclization of the semicarbazone template of aryl semicarbazones: synthesis and anticonvulsant activity of 4,5-diphenyl-2H-1,2,4-triazol-3(4H)-one / M. Shalini et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. 2009. Vol. 63, № 3. P. 187–193. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.04.002.
45. Перехода Л. О. Антиконвульсанти, що мають ГАМК-ергічний механізм дії. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 2. DOI: 10.11603/2312-0967.2015.2.4794.
46. Pharmacotherapy of anxiety disorders: current and emerging treatment options / A. Garakani et al. *Frontiers in Psychiatry*. 2020. Vol. 11. P. 595584. DOI: 10.3389/fpsyt.2020.595584.
47. Involvement of GABAA receptors in the anxiolytic-like effect of hydroxycitronellal / J. C. Andrade et al. *BioMed Research International*. 2021. Vol. 2021. P. 1–17. DOI: 10.1155/2021/9929805.
48. Olsen R. W., Sieghart W. International union of pharmacology. Lxx. Subtypes of γ -aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological reviews*. 2008. Vol. 60, № 3. P. 243–260. DOI: 10.1124/pr.108.00505.

49. Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABAA receptor subtypes / E. Sanna et al. *European Journal of Pharmacology*. 2002. Vol. 451, № 2. P. 103–110. DOI: 10.1016/S0014-2999(02)02191-X.

50. Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety / X. Chen et al. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019. Vol. 40, № 5. P. 571–582. DOI: 10.1038/s41401-018-0185-5.

51. Sigel E., Steinmann M. E. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287, № 48. P. 40224–40231. DOI: 10.1074/jbc.R112.386664.

52. Edwards Z., Preuss C. V. GABA Receptor Positive Allosteric Modulators. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2024. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554443/> (Date of access: 02.04.2024).

53. Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects / ed. by S. G. J. 7th ed. Amsterdam : Elsevier, 2006. 992 p. URL: http://archive.org/details/basicneurochemis0000unse_y3l1 (Date of access: 15.12.2023).

54. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.296-297.

55. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів» : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

56. Allosteric GABAA receptor modulators—A review on the most recent heterocyclic chemotypes and their synthetic accessibility / B. A. Vega Alanis et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 4. P. 999. DOI: 10.3390/molecules25040999.

57. Selective, orally active γ -aminobutyric acid $\alpha 5$ receptor inverse agonists as cognition enhancers / F. Sternfeld et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004. Vol. 47, № 9. P. 2176–2179. DOI: 10.1021/jm031076j.

58. Antinociceptive effects of $\alpha 2/\alpha 3$ -subtype selective GABAA receptor positive allosteric modulators KRM-II-81 and NS16085 in rats: behavioral specificity / L. A. Lewter et al. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2024. Vol. 390, № 2. DOI: 10.1124/jpet.123.002070.

59. Distinct mechanisms of allopregnanolone and diazepam underlie neuronal oscillations and differential antidepressant effect / K. Takasu et al. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2024. Vol. 17. P. 1274459. DOI: 10.3389/fncel.2023.1274459.

60. Subtype selective γ -aminobutyric acid type A receptor (GABAAR) modulators acting at the benzodiazepine binding site: an update / S. Maramai et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 63, № 7. P. 3425–3446. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01312.

61. Wieland H. A., Lüddens H., Seeburg P. H. A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992. Vol. 267, № 3. P. 1426–1429.

62. Tan K. R., Rudolph U., Lüscher C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends in neurosciences*. 2011. Vol. 34, № 4. P. 188–197. DOI: 10.1016/j.tins.2011.01.004.

63. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Перспективи застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology* : матеріали Міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.56.

64. Benzodiazepines and anterior pituitary function / E. Arvat et al. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2002. Vol. 25, № 8. P. 735–747. DOI: 10.1007/BF03345110.

65. The mechanisms of depression by benzodiazepines, barbiturates and propofol of excitatory synaptic transmissions mediated by adenosine neuromodulation / E. Narimatsu et al. *Masui. The Japanese Journal of Anesthesiology*. 2006. Vol. 55, № 6. P. 684–691.
66. Dubovsky S. L., Marshall D. Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice. *Psychotherapy and Psychosomatics*. 2022. Vol. 91, № 5. P. 307–334. DOI: 10.1159/000524400.
67. Bandelow B., Michaelis S., Wedekind D. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2017 Vol. 19, № 2. P. 93–107. DOI: 10.31887/DCNS.2017.19.2/bbandelow.
68. Long-term use of benzodiazepines: Definitions, prevalence and usage patterns – a systematic review of register-based studies / T. A. Kurko et al. *European Psychiatry*. 2015. Vol. 30, № 8. P. 1037–1047. DOI: 10.1016/j.eurpsy.2015.09.003.
69. Lobo I. A., Harris R. A. GABAA receptors and alcohol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2008. Vol. 90, № 1. P. 90–94. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.03.006.
70. Diazepam and ethanol differently modulate neuronal activity in organotypic cortical cultures / M. Kreuzer et al. *BMC Neuroscience*. 2019. Vol. 20, № 1. P. 58. DOI: 10.1186/s12868-019-0540-6.
71. Role of prelimbic GABAergic circuits in sensory and emotional aspects of neuropathic pain / Z. Zhang et al. *Cell Reports*. 2015. Vol. 12, № 5. P. 752–759. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.001.
72. İnaltekin A., Kivrak Y. Evaluation of the effect of vortioxetine on pain threshold by hot-plate test in mice. *Archives of Neuropsychiatry*. 2021. Vol. 58, № 4. P. 274–277. DOI: 10.29399/npa.27462.
73. Cox R. F., Collins M. A. The effects of benzodiazepines on human opioid receptor binding and function. *Anesthesia & Analgesia*. 2001. Vol. 93, № 2. P. 354–358. DOI: 10.1213/00000539-200108000-00024.
74. Efficacy of novel sedation using the combination of dexmedetomidine and midazolam during endoscopic submucosal dissection for esophageal squamous

cell carcinoma / T. Yoshio et al. *Esophagus: Official Journal of the Japan Esophageal Society*. 2019. Vol. 16, № 3. P. 285–291. DOI: 10.1007/s10388-019-00666-z.

75. Premedication to reduce anxiety in patients undergoing coronary angiography and percutaneous coronary intervention / W. Vlastra et al. *Open Heart*. 2018. Vol. 5, № 2. P. e000833. DOI: 10.1136/openhrt-2018-000833.

76. Navigating the complex landscape of benzodiazepine- and Z-drug diversity: insights from comprehensive FDA adverse event reporting system analysis and beyond / F. Koniuszewski et al. *Frontiers in Psychiatry*. 2023. Vol. 14. P. 1188101. DOI: 10.3389/fpsyt.2023.1188101.

77. ATCDDD - ATC/DDD Index. *Norwegian Institute of Public Health*. URL: https://atcddd.fhi.no/atc_ddd_index/?code=N05&showdescription=yes (Date of access: 05.05.2024).

78. The Top 300 of 2022. *ClinCalc.com*. URL: <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx> (Date of access: 05.05.2024).

79. Про затвердження клінічних протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю “Психіатрія.” : Наказ Міністерства охорони здоров’я України від 05.02.2007 р. № 59. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0059282-07#Text> (дата звернення: 20.04.2022).

80. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Депресія (легкий, помірний, тяжкий депресивні епізоди без соматичного синдрому або з соматичним синдромом, рекурентний депресивний розлад, дистимія» : Наказ Міністерства охорони здоров’я України від 25 грудня 2014 року №1003. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2014_1003_ykpmdd_depresiya.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

81. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги

(УКПМД) «Реакція на важкий стрес та розлади адаптації. Посттравматичний стресовий розлад» : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 23.02.2016 № 121. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2016_121_ukpmd_ptsr.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

82. Уніфікований клінічний протокол первинної, екстреної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги “Епілепсія у дорослих.” : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 17.04.2014 № 276. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2014_276_ukpmd_epilepsiya_dorosli.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

83. Уніфікований клінічний протокол первинної, екстреної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги “Епілепсії у дітей.” : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 17.04.2014 № 276. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2014_276_ukpmd_epilepsiya_dity.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

84. Екстрена медична допомога: догоспітальний етап. Новий клінічний протокол : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05.06.2019 № 1269. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2020/07/2019_1269_nkp_ekstren_ditdor.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

85. Уніфікований клінічний протокол паліативної медичної допомоги при хронічному больовому синдромі : Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 25.04.2012 р. № 311. URL: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/dod_311_2ukpmd.pdf (дата звернення: 20.04.2022).

86. Anxiety and Depression Association of America, ADAA. *Anxiety and Depression Association of America, ADAA*. URL: <https://adaa.org/resources-professionals/practice-guidelines-gad> (дата звернення: 12.12.2023).

87. Canadian clinical practice guidelines for the management of anxiety, posttraumatic stress and obsessive-compulsive disorders / M. A. Katzman et al. *BMC Psychiatry*. 2014. Vol. 14, № 1. DOI: 10.1186/1471-244X-14-S1-S1.
88. Clinical practice guidelines for the management of generalised anxiety disorder (GAD) and panic disorder (PD) / S. Gautam et al. *Indian Journal of Psychiatry*. 2017. Vol. 59, № 1. P. S67–S73. DOI: 10.4103/0019-5545.196975.
89. Generalised anxiety disorder and panic disorder in adults: management | Guidance. *NICE*. 2021. URL: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg113> (Date of access: 12.12.2023).
90. Державний формуляр лікарських засобів. Вип. 14. Київ, 2022. 1277 с.
91. Bioactive 1,2,3-triazoles: an account on their synthesis, structural diversity and biological applications / L. Da S. M. Forezi et al. *The Chemical Record*. 2021. Vol. 21, № 10. P. 2782–2807. DOI: 10.1002/tcr.202000185.
92. Structural modification strategies of triazoles in anticancer drug development / Q. Guan et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2024. Vol. 275. 116578. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116578.
93. 9H-carbazole derivatives containing the N-benzyl-1,2,3-triazole moiety as new acetylcholinesterase inhibitors / H. Akrami et al. *Archiv Der Pharmazie*. 2015. Vol. 348, № 5. P. 366–374. DOI: 10.1002/ardp.201400365.
94. The hypnotic, anxiolytic, and antinociceptive profile of a novel μ -opioid agonist / G. C. Montes et al. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*. 2017. Vol. 22, № 5. DOI: 10.3390/molecules22050800.
95. Xu Z., Zhao S.-J., Liu Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. Vol. 183. P. 111700. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111700.
96. Synthesis methods of 1,2,3-/1,2,4-triazoles: A review / J. Dai et al. *Frontiers in Chemistry*. 2022. Vol. 10. P. 891484. DOI: 10.3389/fchem.2022.891484.

97. Савустьяненко А. В. Ризатриптан у боротьбі з симптомами мігрені. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2018. № 2 (96). С. 62–68. DOI: 10.22141/2224-0713.2.96.2018.130484.
98. Biological importance and synthesis of 1,2,3-triazole derivatives: a review / M. J. Vaishnani et al. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2024. Vol. 17, № 1. P. 2307989. DOI: 10.1080/17518253.2024.2307989.
99. Демченко С. А., Бобкова Л. С., Ядловський О. Є. Потенційні протизапальні й аналгетичні засоби в ряду похідних триазолу: проблеми та перспективи. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 15 (4). С. 239–248. DOI: 10.33250/15.04.239.
100. Fedotov S. O., Hotsulia A. S., Karpenko Yu. V. Synthesis and analgesic activity of new pyrazole-containing derivatives of 1,2,4-triazole-3-thiol. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 205–212. DOI: 10.14739/2409-2932.2023.3.288364.
101. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of new 1,2,4-triazole derivatives / F. Ahmadi et al. *Medicinal Chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*. 2014. Vol. 11, № 1. P. 69–76. DOI: 10.2174/1573406410666140613154507.
102. Padhyar K. T., Patil R. S., Wadwale N. B. A brief review on triazole and its pharmacological application. *International Journal of Current Science Research and Review*. 2022. Vol. 5, № 1. DOI: 10.47191/ijcsrr/V5-i1-25.
103. Kharb R., Sharma P. C., Yar M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2011. Vol. 26, № 1. P. 1–21. DOI: 10.3109/14756360903524304.
104. Synthesis, molecular docking and in vivo biological evaluation of iminostilbene linked 1,2,3-triazole pharmacophores as promising anti- anxiety and anti-inflammatory agents / K. N. Ankali et al. *Medicinal Chemistry (Shariqah (United Arab Emirates))*. 2022. Vol. 18, № 2. P. 260–272. DOI: 10.2174/1573406417666210608141746.

105. Alprazolam - StatPearls - NCBI Bookshelf. *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538165/> (дата звернення: 05.05.2024).

106. Естазолам. Інструкція. Застосування препарату Естазолам. Таблетки по 2 мг № 20. *Нормативно-директивні документи МОЗ України*. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=7781> (дата звернення: 05.05.2024).

107. Клоназепам. Інструкція. Застосування препарату Клоназепам. Таблетки по 2 мг № 30. *Нормативно-директивні документи МОЗ України*. URL: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=6118> (дата звернення: 05.05.2024).

108. Effective microwave-assisted approach to 1,2,3-triazolobenzodiazepinones via tandem Ugi reaction/catalyst-free intramolecular azide-alkyne cycloaddition / M. O. Mazur et al. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2021. Vol. 17. P. 678–687. DOI: 10.3762/bjoc.17.57.

109. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities*. 2010. L 256. P. 33–79.

110. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington, D.C. : National Academies Press, 2011. DOI: 10.17226/12910.

111. RCSB PDB - 6HUP: CryoEM structure of human full-length alpha1beta3gamma2L GABA(A)R in complex with diazepam (Valium), GABA and megabody Mb38. *RCSB PDB: Homepage*. URL: <https://www.rcsb.org/structure/6hup> (Date of access: 14.01.2022).

112. Computational investigations of three main drugs and their comparison with synthesized compounds as potent inhibitors of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): DFT, QSAR, molecular docking, and in silico toxicity analysis / R. K. Mohapatra et al. *Journal of King Saud University. Science*. 2021. Vol. 33, № 2. P. 101315. DOI: 10.1016/j.jksus.2020.101315.

113. Development of photoprotective, antiphototoxic, and antiphotogenotoxic formulations of ocular drugs with fluoroquinolones / A. Zgadzaj et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018. Vol. 178. P. 201–210. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.011.

114. OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development*. 2019. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en (Date of access: 06.05.2022).

115. Detection of low levels of genotoxic compounds in food contact materials using an alternative HPTLC-SOS-Umu-C assay / D. Meyer et al. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation*. 2021. Vol. 38, № 3. P. 387–397. DOI: 10.14573/altex.2006201.

116. Molecular Toxicology Inc. – *MOLTOX*. URL: <https://moltox.com/categories.php?parent=54&name=UMU%20Genotoxicity%20Test%20Kit&cat=54> (Date of access: 06.07.2022).

117. Antigenotoxic, anti-photogenotoxic and antioxidant activities of natural naphthoquinone shikonin and acetylshikonin and *Arnebia euchroma* callus extracts evaluated by the umu-test and EPR method / A. Skrzypczak et al. *Toxicology in Vitro*. 2015. Vol. 30, № 1. P. 364–372. DOI: 10.1016/j.tiv.2015.09.029.

118. Toxicological evaluation of thermal treatment of drilling waste from shale gas exploration in Poland / P. Drzewicz et al. *Ecological Chemistry and Engineering S*. 2019. Vol. 26, № 1. P. 45–57. DOI: 10.1515/eces-2019-0004.

119. Pre-clinical models / Ed. P. C. Guest. New York : Springer New York, 2019. p. 69–74. DOI: 10.1007/978-1-4939-8994-2.

120. Bailey K. R., Crawley J. N. Chapter 5. Anxiety-Related Behaviors in Mice. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (2nd ed.). Boca Raton (FL) : CRC Press/Taylor & Francis, 2006. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/> (Date of access: 10.09.2021).

121. Slobodyan Z. H., Savytskyi, I. V. Study of characteristics of behavioral reactions of rats under the conditions of experimental stroke with anxiety-depressive

disorders. *Medical Science of Ukraine (MSU)*. 2023. Vol. 19, № 1. P. 32–38. DOI: 10.32345/2664-4738.1.2023.05.

122. Serchov T., Calker D., Biber K. Light/dark transition test to assess anxiety-like behavior in mice. *BIO-PROTOCOL*. 2016. Vol. 6, № 19. P. e1957. DOI: 10.21769/BioProtoc.1957.

123. Podolsky I. M. The dynamics of the antidepressant effect of atristamine in the repeated dose study. *Clinical pharmacy*. 2019. Vol. 23, № 1. P. 19–25. DOI: 10.24959/cphj.19.1488.

124. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments / R. D. Porsolt et al. *European Journal of Pharmacology*. 1978. Vol. 47, № 4. P. 379–391. DOI: 10.1016/0014-2999(78)90118-8.

125. Effect of simultaneous testing of two mice in the tail suspension test and forced swim test / H. Ueno et al. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12. P. 9224. DOI: 10.1038/s41598-022-12986-9.

126. Дослідження антидепресивної активності похідних 2-оксоіндолін-3-гліоксилової кислоти в тесті Порсолта / Р. В. Луценко та ін. *Клінічна фармація*. 2009. №1. С. 47-49.

127. Пругло Є. С. Антидепресивна активність бензиліденових похідних 4-аміно-5-(алкіл-, арил-, гетерил)-1,2,4-тріазол-3-тіонів. *Актуальні проблеми фармації та медицини: наука і практика*. 2018. Т. 11, № 3. С. 296-302. DOI: 10.14739/2409-2932.2018.3.145228.

128. Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model / S. Liu et al. *Medical Science Monitor*. 2018. Vol. 24. P. 7646–7653. DOI: 10.12659/MSM.908422.

129. In vivo neuropharmacological effects of neophytadiene / M. L. Gonzalez-Rivera et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 8. P. 3457. DOI: 10.3390/molecules28083457.

130. An antidepressant-related pharmacological signature for positive allosteric modulators of $\alpha 2/3$ -containing GABAA receptors / K. R. Methuku et al.

Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2018. Vol. 170. P. 9–13. DOI: 10.1016/j.pbb.2018.04.009.

131. Antidepressant activities of synthesized benzodiazepine analogues in mice / F. U. Haq et al. *Brain Sciences*. 2023. Vol. 13, № 3. P. 523. DOI: 10.3390/brainsci13030523.

132. Deacon R. M. J. Measuring the strength of mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2013. Vol. 76. P. e2610. DOI: 10.3791/2610.

133. The prevention of home-cage grid climbing affects muscle strength in mice / H. Ueno et al. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 15263. DOI: 10.1038/s41598-022-19713-4.

134. Castagné V., Hernier A. M., Porsolt R. D. CNS Safety Pharmacology. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014. (p. B978012801238304931X). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.04931-X.

135. Rustay N. R., Wahlsten D., Crabbe J. C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behavioural Brain Research*. 2003. Vol. 141, № 2. P. 237–249. DOI: 10.1016/S0166-4328(02)00376-5.

136. Compton D. R., Hudzik T. J. Neurochemistry of abuse liability assessment and primary behavioral correlates / *Nonclinical Assessment of Abuse Potential for New Pharmaceuticals*. Elsevier. 2015. P. 9–48. DOI: 10.1016/B978-0-12-420172-9.00002-3.

137. Podolsky I. M., Shtrygol' S. Yu., Zubkov V. O. (2018). The psycho- and neurotropic profiling of novel 3-(N-R,R'-aminomethyl)-2-methyl-1H-quinolin-4-ones in vivo. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ*. 2018. Vol. 26, № 1. P. 107–114. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.10.005.

138. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Київ : Авіценна, 2021. 588 с.

139. Seibenhener M. L., Wooten M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2015. Vol. 96. P. 52434. DOI: 10.3791/52434.

140. Залевський С. В., Штриголь С. Ю., Штриголь Д. В. Психотропні властивості та гостра токсичність 2-(2,4-діоксо-1,4-дигідрокіназолін-3(2H)-іл)-N-[(2,4-дихлорофеніл)метил]-ацетаміду — перспективного антиконвульсанта. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 15(6). С. 363–371. DOI: 10.33250/15.06.363.

141. Deuis J. R., Dvorakova L. S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017. Vol. 10. P. 284. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00284.

142. Characterization of the anticonvulsant, behavioral and pharmacokinetic interaction profiles of stiripentol in combination with clonazepam, ethosuximide, phenobarbital, and valproate using isobolographic analysis / J. J. Luszczki et al. *Epilepsia*. 2006. Vol. 47, № 11. P. 1841–1854. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.00825.x.

143. Порівняльні психотропні та знеболювальні властивості інгібіторів натрійзалежного котранспортера глюкози 2 типу (SGLT2) дапагліфлозину й емпагліфлозину / В. В. Цивунін та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. № 16 (3). С. 147–158. DOI: 10.33250/16.03.147.

144. Methanol extract of dicranopteris linearis leaves attenuate pain via the modulation of opioid/NO-mediated pathway / Z. A. Zakaria et al. *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, № 2. P. 280. DOI: 10.3390/biom10020280.

145. Synthesis of new 3-morpholy-substituted 4-aryl-2-arylimino-2,3-dihydrothiazole derivatives and their anti-inflammatory and analgesic activity / I. Drapak et al. *Chemistry & Chemical Technology*. 2022. Vol. 16, № 4. P. 532–542. DOI: 10.23939/chcht16.04.532.

146. Аналгетична активність S-похідних 5-гетерил-4-(R-аміно)-1, 2, 4-триазол-3-тіолів / А. А. Сафонов та ін. *Фармацевтичний журнал*. 2013. № 2. С. 84–87.

147. Дослідження антигіпоксичної активності 2-метил-3-феніламінометилхінолін-4-ону — перспективного антидепресанта з

ноотропними властивостями / І. М. Подольський та ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2013. № 2. С. 46–49.

148. Karpun E. O., Parchenko V. V. Synthesis, physicochemical properties and antigypoxic activity of some S-derivatives of 4-alkyl-5-(((3-(pyridin-4-yl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl)thio)methyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. *Farmatsevtichnyi zhurnal*. 2020. Vol. 6. P. 56–64. DOI: 10.32352/0367-3057.6.20.06.

149. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives / I. Botsula et al. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. DOI: 10.1016/j.ejps.2024.106712.

150. Dzierzkowska E., Stodolak-Zych E. Electrospinning for drug delivery systems: potential of the technique. *Engineering of Biomaterials*. 2019. Vol. 149. P. 10–14.

151. Гаврилов І. О., Штриголь, С. Ю. Фармакодинамічна взаємодія модифікованого аналога кінцевого фрагмента нейропептиду Y з речовинами, що пригнічують або збуджують центральну нервову систему. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 15 (1). С. 3–9. DOI: 10.33250/15.01.003.

152. Міщенко М. В., Штриголь С. Ю. Дослідження взаємодії потенційного антиконвульсанту 5-[(Z)-(4-нітробензиліден)]-2-(тіазол-2-іліміно)-4-тіазолідинону з речовинами стимулювальної та пригнічувальної дії на центральну нервову систему. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 15 (5). С. 291–297. DOI: 10.33250/15.05.291.

153. Hodge H. C., Sterner J. H. Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*. 1949. Vol. 10, № 4. P. 93–96. DOI: 10.1080/00968204909344159.

154. Подольський, І. М., Литкін, Д. В., Штриголь, С. Ю. Дослідження гострої та підгострої токсичності перспективного антидепресанту атристаміну на щурах. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2020. № 14 (1). С. 53–62. DOI: 10.33250/14.01.053.

155. Buccafusco J. J. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, Second Edition. *Taylor & Francis Group*. 2008. 360 p. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5228/> (Date of access: 11.04.2024).
156. Tovchiga O. V., Shtrygol' S. Y., Gorbach T. V. Behavioural reactions of random-bred mice under the influence of hypouricemia and aegopodium podagraria l. Preparations. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 4, № 3. P. 1–17. DOI: 10.9734/AJRIMPS/2018/42362.
157. Філісит-Діагностика. Інструкції. URL: <http://felicit.com.ua/instructions/?lang=uk> (дата звернення: 13.04.2024).
158. Baak J. P. A. Basic points in and practical aspects of the application of diagnostic morphometry. *Pathology - Research and Practice*. 1984. Vol. 179, № 2. P. 193–199. DOI: 10.1016/S0344-0338(84)80127-2.
159. Wojtyniak K., Szymański M., Matławska I. Leonurus cardiaca L. (motherwort): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy research: PTR*. 2013. Vol. 27, № 8. P. 1115–1120. DOI: 10.1002/ptr.4850.
160. Polymers for extrusion-based 3D printing of pharmaceuticals: A Holistic Materials–Process Perspective / M. A. Azad et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, № 2. P. 124. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020124.
161. Semi-solid extrusion 3D-printing of eucalypt extract-loaded polyethylene oxide gels intended for pharmaceutical applications / O. Koshovyi et al. *Annals of 3D Printed Medicine*. 2023. Vol. 12. P. 1-10. DOI: 10.1016/j.stlm.2023.100123.
162. Effects of crosslinking on the physical solid-state and dissolution properties of 3D-printed theophylline tablets / H. Anderspuk et al. *Annals of 3D Printed Medicine*. 2021. Vol. 4. P. 100031. DOI: 10.1016/j.stlm.2021.100031.
163. Standardization parameters of modified extracts from leonurus cardiaca herb / Y. Romanenko et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2019. Vol. 1, № 17. P. 17–23. DOI: 10.15587/2519-4852.2019.157996.

164. Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Drugs Quality. *State Pharmacopoeia of Ukraine* (2nd ed.). Kharkiv, Ukraine. 2015.
165. European Pharmacopoeia. (11th ed.). Strasbourg: Council of Europe. 2022. 1320 p.
166. GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology / S. Masiulis et al. *Nature*. Vol. 565 (7740). P. 454–459. DOI: 10.1038/s41586-018-0832-5.
167. Куликовська К. Ю., Журавель І. О. Визначення цитотоксичності похідних [1,2,4]тріазоло[4,3-а]піразину. *ScienceRise*. 2015. № 11 (4). С. 59–63. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.54989.
168. The MTT Assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis / M. Ghasemi et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 23. P. 12827. DOI: 10.3390/ijms222312827.
169. Neutral red uptake assay to assess cytotoxicity in vitro / R. M. Rodrigues et al. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2023. Vol. 2644. P. 237–245. DOI: 10.1007/978-1-0716-3052-5_15.
170. Singh R. K., Prasad D. N., Bhardwaj T. R. Design, synthesis and in vitro cytotoxicity study of benzodiazepine-mustard conjugates as potential brain anticancer agents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2017. Vol. 21. P. S86–S93. DOI: 10.1016/j.jscs.2013.10.004.
171. Oda Y. Development and progress for three decades in umu test systems. *Genes and Environment*. 2016. Vol. 38, № 1. 24 p. DOI: 10.1186/s41021-016-0054-8.
172. Brambilla G., Carrozzino R., Martelli A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of benzodiazepines. *Pharmacological Research*. 2007. Vol. 56, № 6. P. 443–458. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.08.006.
173. Genotoxicity of 12 Mycotoxins by the SOS/umu Test: Comparison of Liver and Kidney S9 Fraction / M. Alonso-Jauregui et al. *Toxins*. 2022. Vol. 14, № 6. P. 400. DOI: 10.3390/toxins14060400.

174. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність : пат. 155538 України. № u202304531 ; заявл. 25.09.2023 ; опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10.

175. Cryan J. F., Mombereau C., Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005. Vol. 29, № 4. P. 571–625. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.

176. Preclinical screening for antidepressant activity – shifting focus away from the Forced Swim Test to the use of translational biomarkers / F. Sewell et al. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021. Vol. 125. P. 105002. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105002.

177. The study of antidepressant properties of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives / I. V. Botsula et al. *News of pharmacy*. 2024. № 1 (107). P. 136-143. DOI: 10.24959/nphj.24.144.

178. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice / L. Steru et al. *Psychopharmacology*. 1985. Vol. 85, № 3. P. 367–370. DOI: 10.1007/BF00428203.

179. Sahin Z. Assessment of commonly used tests in experimental depression studies according to behavioral patterns of rodents. *Medical Review*. 2023. Vol. 3, № 6. P. 526–531. DOI: 10.1515/mr-2023-0018.

180. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність : пат. 156108 України. № u202305801 ; заявл. 01.12.2023 ; опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19.

181. The influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the muscle tone of rodents / I. V. Botsula et al. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 217-222. DOI: 10.14739/2409-2932.2023.3.287999.

182. Botsula I. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the rodent coordination of movements. *Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024* : зб. тез доповідей 84 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 23 - 24 травня 2024 р. Запоріжжя : ЗДМФУ, 2024. с. 124-125.

183. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on rodent muscle tone / I Botsula et al. *Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку* : тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, м. Одеса, 9–12 квітня 2024. Одеса: ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 324.

184. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova et al. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013. Vol. 6, № 3. P. 126–135. DOI: 10.2478/intox-2013-0020.

185. Поведінкові реакції гризунів після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тесті «відкритого поля» / І. В. Боцула та ін. *Фармацевтичний часопис*. 2023. № 4. С. 70–77. DOI: 10.11603/2312-0967.2023.4.14297.

186. Harro J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. *Behavioural Brain Research*. 2018. Vol. 352. P. 81–93. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.10.016.

187. Phytochemical profile and pharmacological activities of water and hydroethanolic dry extracts of *Calluna vulgaris* (L.) hull. Herb / G. Starchenko et al. *Plants-Basel*. 2020. Vol. 9, № 6. DOI: 10.3390/plants9060751.

188. Phytochemical and psychotropic research of motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) modified dry extracts / O. Koshovyi et al. *Plants*. 2021. Vol. 10, № 2. P. 230. DOI: 10.3390/plants10020230.

189. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field / T. Choleris et al. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2001. Vol. 25, № 3. P. 235–260. DOI: 10.1016/S0149-7634(01)00011-2.

190. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats / H. Kuniishi et al. *Neuroscience Research*. 2017. Vol. 123. P. 27–35. DOI: 10.1016/j.neures.2017.04.012.

191. Муквич В. В., Ляшенко В. П., Лукашов, С. М. Вікові зміни поведінкових реакцій самців та самок щурів у тесті відкрите поле. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2017. № 2. С. 75–78.

192. Reliability of common mouse behavioural tests of anxiety: A systematic review and meta-analysis on the effects of anxiolytics M. Rosso et al. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2022. Vol. 143. P. 104928. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2022.104928.

193. Тозюк О. Ю. Характеристика емоційно-поведінкових реакцій щурів в умовах хронічного іммобілізаційного стресу на тлі дії похідного 5-R-тіо-тетразоло (1,5-с) хіназоліну. *Запорізький медичний журнал*. 2013. № 5. С. 57–59.

194. Morrison I. Facets and mechanisms of adaptive pain behavior: predictive regulation and action. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013. Vol. 7. 11 p. DOI: 10.3389/fnhum.2013.00755.

195. Anxiety and depression - the role of blood-brain barrier integrity / Z. Gal et al. *Neuropsychopharmacologia Hungarica: A Magyar Pszichofarmakologiai Egyesulet Lapja = Official Journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology*. 2019. Vol. 21, № 1. P. 19–25.

196. Pregabalin and gabapentin in neuropathic pain management after spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis / M. Davari et al. *The Korean Journal of Pain*. 2020. Vol. 33, № 1. P. 3–12. DOI: 10.3344/kjp.2020.33.1.3.

197. Zeilhofer H. U., Neumann E., Munro G. Spinal GABAA receptors for pain control: back to the future? *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2019. Vol. 123, № 2. P. e176–e179. DOI: 10.1016/j.bja.2019.01.030.

198. Mifflin K. A., Kerr B. J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems interact. *Canadian Journal of*

Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie. 2004. Vol. 61, № 2. P. 112–122. DOI: 10.1007/s12630-013-0087-4.

199. Kava T. V., Yadlovskiy O. E. Tail-flick-test – aspects use in pharmacological researches. *Farmatsevtichnyi zhurnal*. 2018. Vol. 1–2. P. 61–67. DOI: 10.32352/0367-3057.1-2.18.07.

200. Еберле Л. В., Коберник А. О., Кравченко І. А. Аналгетична активність густого екстракту імбиру (*Zingiber officinale*). *Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія*. 2017. № 4. С. 120–125.

201. Chalcone derivatives: synthesis, in vitro and in vivo evaluation of their anti-anxiety, anti-depression and analgesic effects / J. Higgs et al. *Heliyon*. 2019. Vol. 5, № 3. P. e01376. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01376.

202. Міщенко О. Я., Кириченко І. В. Аналгетичні властивості екстрактів трави пижми дівочої (*Tanacetum parthenium L.*). *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. № 16 (3). С. 167–175. DOI: 10.33250/16.03.167.

203. Achar K. C. S., Hosamani K. M., Seetharamareddy H. R. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2010. Vol. 45, № 5. P. 2048–2054. DOI:10.1016/j.ejmech.2010.01.029.

204. Advancements in synthesis and application of 1,5-benzodiazepines a privileged scaffold with a wide scope of bioactivities / S. A. Dhabale et al. *Current Organic Chemistry*. 2023. Vol. 27, № 17. P. 1471–1483. DOI: 10.2174/0113852728274525231011054716.

205. An overview of biopolymeric electrospun nanofibers based on polysaccharides for wound healing management / A. Iacob et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, № 10. P. 983. DOI: 10.3390/pharmaceutics12100983.

206. Shetty K., Bhandari A., Yadav K. S. Nanoparticles incorporated in nanofibers using electrospinning: A novel nano-in-nano delivery system. *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 350. P. 421–434. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.08.035.

207. A summary of electrospun nanofibers as drug delivery system: drugs loaded and biopolymers used as matrices / E. J. Torres-Martinez et al. *Current Drug Delivery*. 2018. Vol. 15, № 10. P. 1360–1374. DOI: 10.2174/1567201815666180723114326.

208. Recent advances in electrospun nanofibers for some biomedical applications / S. Sabra et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Vol. 144. P. 105224. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105224.

209. Electrospun nanofiber drug delivery systems and recent applications: An overview / S. Muratoglu et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024. Vol. 92. P. 105342. DOI: 10.1016/j.jddst.2024.105342.

210. Zare M., Ramakrishna S. Current progress of electrospun nanocarriers for drug delivery applications. *Proceedings*. 2020. DOI: 10.3390/IECP2020-08790.

211. Luraghi A., Peri F., Moroni L. Electrospinning for drug delivery applications: A review. *Journal of Controlled Release*. 2021. Vol. 334. P. 463–484. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.03.033.

212. Electrospun Nanofibers for Drug Delivery and Biosensing / C. Cleeton et al. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019. Vol. 5, № 9. P. 4183–4205. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b00853.

213. Electrospun nanofibers as a potential controlled-release solid dispersion system for poorly water-soluble drugs / U. Paaver et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015. Vol. 479, № 1. P. 252–260. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.12.024.

214. Thakkar S., Misra M. Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 107. P. 148–167. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.001.

215. Botsula I., Kireyev I. Nanofiber-based drug delivery system as a choice for enhancing the solubility of pharmaceutical compounds. «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня

народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. с. 15-16.

216. Topuz F., Uyar T. Electrospinning of gelatin with tunable fiber morphology from round to flat/ribbon. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 2017. Vol. 80. P. 371–378. DOI: 10.1016/j.msec.2017.06.001.

217. Infrared spectroscopy and its application in medical and biological research / V. Sheiko et al. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. 2023. Vol. 23, № 3. P. 265–269. DOI: 10.31718/2077-1096.23.3.265.

218. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity / I. Botsula et al. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents*, Tartu, 12-13 October 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023. P. 29.

219. Botsula I. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving pharmacological effect of new benzodiazepine derivatives in rodents. *Seminars in Pharmaceutical Sciences XI*, Tartu, 23 November 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023

220. Міщенко О. Я., Палагіна Н. Ю. Вплив сполук-лідерів за антиамнестичною активністю серед похідних 4-амінобутанової кислоти на функціональний стан центральної нервової системи та їхня антигіпоксична активність. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Vol. 15, № 2. P. 75–81. DOI: 10.33250/15.02.075.

221. Little H. J. The contribution of electrophysiology to knowledge of the acute and chronic effects of ethanol. *Pharmacology & Therapeutics*. 1999. Vol. 84, № 3. P. 333–353. DOI: 10.1016/s0163-7258(99)00040-6.

222. Кофеїн: фізіологічні, біохімічні та квантово-фармакологічні властивості / І. Чекман та ін. *Вісник фармакології та фармації*. 2009. № 6. С. 1–7.

223. The effect of caffeine to increase reaction time in the rat during a test of attention is mediated through antagonism of adenosine A2A receptors / G. A. Higgins et al. *Behavioural Brain Research*. 2007. Vol. 185, № 1. P. 32–42. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.07.013.

224. Gravielle M. C. Activation-induced regulation of GABAA receptors: Is there a link with the molecular basis of benzodiazepine tolerance? *Pharmacological Research*. 2016. Vol. 109. P. 92–100. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.12.030.

225. Pharmacological treatments in panic disorder in adults: a network meta-analysis / G. Guaiana et al. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2023. Vol. 11, № 11. P. CD012729. DOI: 10.1002/14651858.CD012729.pub3.

226. Inhibitory and excitatory synaptic neuroadaptations in the diazepam tolerant brain / J. M. Lorenz-Guertin et al. *Neurobiology of Disease*. 2023. Vol. 185. P. 106248. DOI: 10.1016/j.nbd.2023.106248.

227. Benzodiazepine exposure induces transcriptional down-regulation of GABAA receptor $\alpha 1$ subunit gene via L-type voltage-gated calcium channel activation in rat cerebrocortical neurons / M. F. Foitzick et al. *Neuroscience Letters*. 2020. Vol. 721. P. 134801. DOI: 10.1016/j.neulet.2020.134801.

228. Differential effects of alprazolam against methylphenidate-induced neurobehavioral alterations / M. Dutt et al. *Physiology & Behavior*. 2020. Vol. 222. P. 112935. DOI: 10.1016/j.physbeh.2020.112935.

229. Vinkers C. H., Olivier B. Mechanisms underlying tolerance after long-term benzodiazepine use: a future for subtype-selective receptor modulators? *Advances in Pharmacological Sciences*. 2012. P. 416864. DOI: 10.1155/2012/416864.

230. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam / S. P. Fernández et al. *European Journal of Pharmacology*. 2005. Vol. 512, № 2–3. P. 189–198. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.02.039.

231. Axial chirality and affinity at the GABAA receptor of triazolobenzodiazepines / R. Tanaka et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2022. Vol. 64. P. 116758. DOI: 10.1016/j.bmc.2022.116758.

232. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract / I. Botsula et al. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48. DOI: 10.15587/2519-4852.2024.299205.

233. 3D printing of functionalized polyethylene oxide (PEO) gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* l.) dry extract using semi-solid extrusion technology / I. Botsula et al. *Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin* : The Proceedings of the VI International Scientific and Practical Internet-Conference, Kharkiv, 12 April 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.12-13.

234. Quality attributes for printable emulsion gels and 3D-printed tablets: Towards production of personalized dosage forms / J. Johannesson et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023. Vol. 646. P. 123413. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123413.

235. 3D printed matrix solid forms: Can the drug solubility and dose customisation affect their controlled release behaviour? / J. dos Santos et al. *International Journal of Pharmaceutic*. 2022. Vol. 5. P.100153. DOI: 10.1016/j.ijpx.2022.100153.

236. Towards more homogeneous character in 3D printed photopolymers by the addition of nanofillers / M. Robakowska et al. *Polymer Testing*. 2023. Vol. 129. P. 108243. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2023.108243.

237. 3D-printability of aqueous poly(ethylene oxide) gels / L. Viidik et al. *European Polymer Journal*. 2019. Vol. 120. P. 109206. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2019.08.033.

238. Wang N., Shi H., Yang S. 3D printed oral solid dosage form: Modified release and improved solubility. *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 351. P. 407–431. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.023.

239. Bandelow B., Michaelis S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2015. Vol. 17, № 3. P. 327–335.
240. Christiansen D. M. Examining sex and gender differences in anxiety disorders. *A Fresh Look at Anxiety Disorders* / ed. by Federico Durbano. 2015. DOI: 10.5772/60662.
241. World mental health report: Transforming mental health for all. *World Health Organization*. 2022. URL: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240049338> (Date of access: 15.04.2024).
242. Brett J., Murnion B. Management of benzodiazepine misuse and dependence. *Australian Prescriber*. 2015. Vol. 38, № 5. P. 152–155. DOI: 10.18773/austprescr.2015.055.
243. Benzodiazepine usage and patient preference for alternative therapies: A descriptive study / F. Sake et al. *Health Science Reports*. 2019. Vol. 2, № 5. P. e116. DOI: 10.1002/hsr2.116.
244. Доклінічне дослідження наночастинок купруму / Я. С. Стравський та ін. *Медична та клінічна хімія*. 2020. № 3 (22). С. 99–106. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2020.v.i3.11546.
245. Novel 1,4-benzodiazepine derivatives with antiproliferative properties on tumor cell lines / J. Dourlat et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007. Vol. 17, № 9. P. 2527–2530. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.02.016.
246. Identification of cytotoxic, T-cell-selective 1,4-benzodiazepine-2,5-diones / T. M. Francis et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006. Vol. 16, № 9. P. 2423–2427. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.01.113.
247. Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of the benzodiazepine flunitrazepam in vitro and in vivo / I. V. Almeida et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 50, № 2. P. 251–256. DOI: 10.1590/S1984-82502014000200003.
248. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4 / K. Mizuno et al. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 2009. Vol. 37, № 2. P. 345–351. DOI: 10.1124/dmd.108.024521.

249. Hofmann G. A., Weber B. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, potential mechanisms and clinical consequences. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2021. Vol. 19, № 1. P. 19–29. DOI: 10.1111/ddg.14314.

250. Drug-induced photosensitivity - From light and chemistry to biological reactions and clinical symptoms / J. Kowalska et al. *Pharmaceuticals*. 2021. Vol. 14, № 8. P. 723. DOI: 10.3390/ph14080723.

251. Benzodiazepine-induced photosensitivity reactions: A compilation of cases from literature review with Naranjo causality assessment / N. Momin et al. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2021. Vol. 37, № 6. P. 505–510. DOI: 10.1111/phpp.12691.

252. Degradation of 17 benzodiazepines by the UV/H₂O₂ treatment / W.-D. You et al. *Frontiers in Environmental Science*. 2021. Vol. 9. P. 764841. DOI: 10.3389/fenvs.2021.764841.

253. Drug-induced photosensitivity: clinical types of phototoxicity and photoallergy and pathogenetic mechanisms / L. Di Bartolomeo et al. *Frontiers in Allergy*. 2022. Vol. 3. P. 876695. DOI: 10.3389/falgy.2022.876695.

254. Removal of 30 active pharmaceutical ingredients in surface water under long-term artificial UV irradiation / K. M. Blum et al. *Chemosphere*. 2017. Vol. 176. P. 175–182. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.063.

255. Walf A. A., Frye C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*. 2007. Vol. 2, № 2. P. 322–328. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.

256. Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females / M. A. Wilson et al. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2004. Vol. 78, № 3. P. 445–458. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.04.017>.

257. Imidazenil and diazepam increase locomotor activity in mice exposed to protracted social isolation / G. Pinna et al. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America. 2006. Vol. 103, № 11. P. 4275–4280. DOI: 10.1073/pnas.0600329103.

258. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol / D. L. Gebauer et al. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 2011. Vol. 99, № 3. P. 480–486. DOI: 10.1016/j.pbb.2011.04.021.

259. The antidepressant effect of repeat dose intravenous ketamine is delayed by concurrent benzodiazepine use / C. S. Albott et al. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2017. Vol. 78, № 3. P. 1863. DOI: 10.4088/JCP.16l11277.

260. Humulone modulation of GABAA receptors and its role in hops sleep-promoting activity / A. Y. Benkherouf et al. *Frontiers in Neuroscience*. 2020. Vol. 14. P. 594708. DOI: 10.3389/fnins.2020.594708.

261. The effects of diazepam on the behavioral structure of the rat's response to pain in the hot-plate test: anxiolysis vs. pain modulation / M. Casarrubea et al. *Neuropharmacology*. 2012. Vol. 63, № 2. P. 310–321. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.026.

262. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes / J. Knabl et al. *Nature*. 2008. Vol. 451 (7176). P. 330–334. DOI: 10.1038/nature06493.

263. Wright S. L. Limited utility for benzodiazepines in chronic pain management: a narrative review. *Advances in Therapy*. 2020. Vol. 37, № 6. P. 2604–2619. DOI: 10.1007/s12325-020-01354-6.

264. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists / H. U. Zeilhofer et al. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009. Vol. 30, № 8. P. 397–402. DOI: 10.1016/j.tips.2009.05.007.

265. Investigating the potential of highly porous zopiclone-loaded 3D electrospun nanofibers for brain targeting via the intranasal route / E. Taha et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2024. Vol. 660. P. 124230. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.124230.

266. Ethanol induces sedation and hypnosis via inhibiting histamine release in mice / Z. Ma et al. *Neurochemical Research*. 2019. Vol. 44, № 7. P. 1764–1772. DOI: 10.1007/s11064-019-02813-5.

267. Ethanol and caffeine effects on social interaction and recognition in mice: involvement of adenosine A2A and A1 receptors / L. López-Cruz et al. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2016. Vol. 10. P. 206. DOI: 10.3389/fnbeh.2016.00206.

268. Comparison of short- and long-acting benzodiazepine-receptor agonists with different receptor selectivity on motor coordination and muscle relaxation following thiopental-induced anesthesia in mice / M. Tanaka et al. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008. Vol. 107, № 3. P. 277–284. DOI: 10.1254/jphs.FP0071991.

269. Exploring clinical applications and long-term effectiveness of benzodiazepines: An integrated perspective on mechanisms, imaging, and personalized medicine / Y. Chang et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024. Vol. 173. P. 116329. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116329.

270. Prolonged alprazolam treatment alters components of glutamatergic neurotransmission in the hippocampus of male wistar rats—the neuroadaptive changes following long-term benzodiazepine (mis)use / M. Zariv Kontic et al. *Pharmaceuticals*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 331. DOI: 10.3390/ph16030331.

271. Quality attributes for printable emulsion gels and 3D-printed tablets: Towards production of personalized dosage forms / J. Johannesson et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023. Vol. 646. P. 123413. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.123413.

272. An investigation into the effects of ink formulations of semi-solid extrusion 3D printing on the performance of printed solid dosage forms / B. Zhang et al. *Journal of Materials Chemistry. B*. 2023. Vol. 12, № 1. P. 131–144. DOI: 10.1039/d3tb01868g.

273. Development of immediate release 3D-printed dosage forms for a poorly water-soluble drug by fused deposition modeling: Study of morphology, solid state

and dissolution / M. Fanous et al. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. Vol. 599. P. 120417. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120417.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712> (Scopus, quartile 1) (*Особистий внесок здобувача* – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; J. Schavikin – проведено частину дослідження, здійснено опис результатів; J. Heinämäki – формулювання цілей та задач дослідження, редагування та подача статті; I. Laidmäe – допомога в проведенні експериментального дослідження; Мазур М. О. – здійснено синтез досліджуваних сполук; А. Raal – допомога в проведенні експериментального дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні експериментального дослідження; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження; Чебанов В. А. – синтез сполук, формулювання цілей та задач дослідження).
2. Botsula I., Kireyev I., Koshovyi O., Heinämäki J., Ain R., Mazur M., Chebanov V. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.299205> (Scopus, quartile 3) (*Особистий внесок здобувача* – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні експериментального дослідження; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, допомога в проведенні

експериментального дослідження; J. Heinämäki – формулювання цілей та задач дослідження; A. Raal – формулювання цілей та задач дослідження; Мазур М. О. – аналіз результатів; Чебанов В. А. – формулювання цілей та задач дослідження).

3. Botsula I.V., Kireyev I.V., Koshovyi O.M., Chebanov V.A. The influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the muscle tone of rodents. *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. 2023. Vol. 16, № 3. P. 217-222. URL: <https://doi.org/10.14739/2409-2932.2023.3.287999> (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, аналіз результатів; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження; Чебанов В. А. – формулювання цілей та задач дослідження).

4. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Кошовий О.М., Мазур М.О., Чебанов В.А. Поведінкові реакції гризунів після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тесті «відкритого поля». *Фармацевтичний часопис*. 2023. № 4. С. 70–77. URL: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.4.14297> (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Кошовий О. М. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Мазур М. О. – узагальнення фізико-хімічних даних; Чебанов В. А. – узагальнення фізико-хімічних даних).

5. Botsula I.V., Kireyev I.V., Mazur M.O., Chebanov V.A. The study of antidepressant properties of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *News of pharmacy*. 2024. № 1 (107). P. 136-143. URL: <https://doi.org/10.24959/nphj.24.144> (Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення експериментальних досліджень,

статистична обробка даних, аналіз результатів, підготовка статті до друку; Кіреєв І. В. – формулювання цілей та задач дослідження, формулювання висновків; Мазур М. О. – проведений синтез вихідних сполук, узагальнення фізико-хімічних даних; Чебанов В. А. – проведений синтез вихідних сполук, узагальнення фізико-хімічних даних).

6. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність: Патент України на корисну модель №155538: МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 25.09.2023; Опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10 (*Особистий внесок здобувача: проведення інформаційно-патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів та оформлення патенту*).

7. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання N-(*трет*-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність: Патент України на корисну модель №156108: МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 01.12.2023; Опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19 (*Особистий внесок здобувача: проведення інформаційно-патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів та оформлення патенту*).

8. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Перспективи застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Modern approach of experimental and preclinical pharmacology* : матеріали Міжнародної дистанційної науково-практичної конференції, м. Харків, 19 лютого 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.56.

9. Боцула І.В., Кіреєв І.В. Залежність фармакодинамічного впливу похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування. *«Ліки – людині»*.

Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів» : матеріали V Міжнародної науково-практичної конференції, м. Харків, 11-12 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.267.

10. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development* : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка, м. Харків, 18-19 березня 2021 року. Харків : НФаУ, 2021. с.296-297.

11. Botsula I.V., Kireyev I.V. Use of benzodiazepines in patients with anxiety disorders and confirmed COVID-19. *Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects* : матеріали III науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, м. Харків, 15-16 квітня 2021 р. Харків : НФаУ, 2021. с.254.

12. Боцула І.В. Можливості використання нових похідних триазоло-бензодіазепінів як протитривожних засобів. *Youth Pharmacy Science: I* Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Харків, 27-29 квітня 2021 р. Харків : НФаУ. – доповідь.

13. Iryna Botsula, Igor Kireyev. Nanofiber-based drug delivery system as a choice for enhancing the solubility of pharmaceutical compounds. *«Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології»* : матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала, м. Харків, 24 листопада 2023 р. Харків : НФаУ, 2023. с. 15-16.

14. Iryna Botsula, Johannes Schavikin, Ivo Laidmäe, Igor Kireyev, Jyrki Heinämäki, Oleh Koshovyi. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents*, Tartu, 12-13 October 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023. P. 29.

15. Iryna Botsula. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving pharmacological effect of new benzodiazepine derivatives in rodents.

Seminars in Pharmaceutical Sciences XI, Tartu, 23 November 2023. Tartu, Estonia, : University of Tartu, 2023.

16. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Mazur M. O., Chebanov V. A. Influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives on spontaneous locomotor activity of rodents. *«Medicines for humans. Modern issues of pharmacotherapy and drugs prescription»* : materials VII International scientific-practical conference, Kharkiv, 21-22 March 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.13-14.

17. Botsula I. V., Kireyev I. V., Koshovyi O. M., Chebanov V. A. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on rodent muscle tone. Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку [Електронний ресурс] : тези допов. всеукр. наук.-практич. конф. з міжнарод. участю, м. Одеса, 9–12 квітня 2024. Одеса: ОНУ ім. І. І. Мечникова, 2024. С. 324.

18. Botsula I., Koshovyi O., Kireyev I., Mazur M., Chebanov V., Heinämäki J., Raal A. 3D printing of functionalized polyethylene oxide (peo) gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* l.) dry extract using semi-solid extrusion technology. *Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin* : The Proceedings of the VI International Scientific and Practical Internet-Conference, Kharkiv, 12 April 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.12-13.

19. Botsula I. The impact of novel 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on the rodent coordination of movements. *Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024* : зб. тез доповідей 84 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, м. Запоріжжя, 23 - 24 травня 2024 р. Запоріжжя : ЗДМФУ, 2024. с. 124-125.

Продовж. дод. А

Апробація результатів дисертації

1. Міжнародна дистанційна науково-практична конференція «Modern approach of experimental and preclinical pharmacology» (м. Харків, 19 лютого 2021 року, форма участі – публікація тез);
2. V Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів» (м. Харків, 11-12 березня 2021 року, форма участі – доповідь, публікація тез);
3. XXVIII Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених та студентів, присвячена 150-річчю з дня народження М.О. Валяшка «Topical issues of new medicines development» (м. Харків, 18-19 березня 2021 року, форма участі – публікація тез);
4. III науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Pharmaceutical science and practice: problems, achievements, prospects» (м. Харків, 15-16 квітня 2021 р., форма участі – публікація тез);
5. I Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Youth Pharmacy Science» (м. Харків, 27-29 квітня 2021 р, форма участі – усна доповідь);
6. III Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 100-річчю з Дня народження Д. П. Сала «Фундаментальні та прикладні дослідження у галузі фармацевтичної технології» (м. Харків, 24 листопада 2023 р, форма участі- публікація тез);
7. Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023 (Tartu, Estonia, 12-13 October 2023, форма участі – постерна доповідь, публікація тез);
8. Seminars in Pharmaceutical Sciences XI (Tartu, Estonia, 23 November 2023, форма участі – усна доповідь);
9. VII International scientific-practical conference «Medicines for humans. Modern issues of pharmacotherapy and drugs prescription» (Kharkiv, March 21-22, 2024, форма участі – постерна доповідь, публікація тез);

10. Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (м. Одеса, 9–12 квітня 2024, , форма участі – постерна доповідь, публікація тез);

11. VI International Scientific and Practical Internet-Conference «Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin» (Kharkiv, 12 April 2024, форма участі – публікація тез);

12. 84 Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної медицини та фармації – 2024» (м. Запоріжжя, 23 - 24 травня 2024 р., форма участі – публікація тез).

Продовж. дод. А

Міністерство охорони здоров'я України
Харківська міська рада Харківської області
Департамент охорони здоров'я
Національний фармацевтичний університет
Навчально-науковий інститут прикладної фармації

ПРОГРАМА

V Міжнародної науково-практичної конференції
«Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії та призначення лікарських засобів»

*(Реєстраційне посвідчення УкрІНТЕІ № 352
від 31 серпня 2020 р.)*

11-12 березня 2021 року, м. Харків

Продовж. дод. А

настоянки ехінацеї пурпурової на функціональний стан центральної нервової системи у тварин з різним типом ацетилювання за умов нітратно-кадмієвої інтоксикації.

16:30-16:50 Pantea Valeriana - scientific researcher, PhD student of Laboratory of Biochemistry "Nicolae Testemitanu" State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, the Republic of Moldova. The effect of local biologically active compounds on liver biochemical markers in blood serum in rats in vivo.

16:50-17:10 Толмачова Карина Станіславівна - асистент кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету. Вивчення механізму протизапальної дії новогаленового фітокомплексу пагонів багна звичайного.

17:10-17:30 Бакуменко Марина Григорівна – заслужений лікар України, к. мед. н., головний лікар Комунального некомерційного підприємства «Міська студентська лікарня» Харківської міської ради. Кніженко Інна Борисівна - заступник головного лікаря з медичної частини Комунального некомерційного підприємства «Міська студентська лікарня» Харківської міської ради. Сучасна фармакотерапія цитокінового шторму моноклональними антитілами до інтерлейкіну-6.

17:30-17:50 Боцула Ірина Валеріївна – аспірант кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету. Залежність фармакодинамічного ефекту похідних бензодіазепінів від їх рецепторів зв'язування.

17:50-18:10 Сулейманов Сулейман Файзуллаєвич – к. мед. н., доцент, старший научный сотрудник кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Бухарского государственного медицинского института. Изучение влияния тимоптина на систему иммунитета у больных с хронической воспалительной патологией панкреатодуоденальной зоны.

18:10-18:30 Цеменко Карина Володимирівна – завідувачка Навчально-наукової тренінгової лабораторії медико-біологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації, асистент кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету. Вивчення анальгетичної активності комплексу глікозидів фенольних сполук в комбінації з амінокислотою аргінін на моделі «гаряча пластинка».

ЗАВЕРШЕННЯ КОНФЕРЕНЦІЇ

Продовж. дод. А

FARMAATSIA TEADUSSEMINARID

Seminars in Pharmaceutical Sciences XI

ARFA.02.159

SÜGIS / AUTUMN 2023

Ettekanded toimuvad neljapäeviti kell 16.15, kui pole teisiti ette teatatud (aud. 702 või 707) / Seminars will be held on Thursdays starting at 16.15, unless otherwise mentioned (Aud. 702 or 707).

- | | |
|--------------------------|--|
| N/Thu 21.09.
Aud. 702 | Multifunctional nanofibers for oral drug delivery
Professor Jyrki Heinämäki (University of Tartu) |
| N/Thu 28.09.
Aud. 702 | Tuning the surface chemistry of biomaterials for nanomedicine applications
PhD student Aygenur Pamukçu (Turkey) |
| N/Thu 19.10.
Aud. 707 | Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy and non-linear optical imaging
Dr. Jukka Saarinen (University of Helsinki, Finland) |
| N/Thu 26.10.
Aud. 707 | CESPT 2023 - The 14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology
Kaasprofessor Urve Paaver ja doktorant Kristiine Roostar (TÜ) |
| N/Thu 09.11.
Aud. 707 | Ravimite taantamine
Kaasprofessor Daisy Volmer (Tartu Ülikool) |
| N/Thu 16.11.
Aud. 707 | Nanocosmetics – A critical science-based overview
Professor Jyrki Heinämäki (University of Tartu) |
| N/Thu 23.11.
Aud. 707 | Pharmacognostic study of <i>Cetraria islandica</i> (L.) Ach. thalli as the raw material with a topical pharmacological activity
PhD student Alina Shpychak |
| | Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving pharmacological effect of new benzodiazepine derivatives in rodents
PhD student Iryna Botsula
(National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine) |
| N/Thu 30.11. | Tühistatud / Cancelled |
| N/Thu 14.12.
Aud. 707 | American cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton) leaf extract and its 3D-printed food supplements
Professor Oleh Koshovyi (National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine) |
| N/Thu 21.12.
Aud. 707 | Värska mineraalvesi ja tervis
Professor Ain Raal (Tartu Ülikool) |

Lisainfo / For more information, please visit: www.med.ut.ee/farmaatsia
Kui soovid oma töö tulemusi näidata või konverentsi ettekannet harjutada/esitada, siis palun võta ühendust seminaride läbiviijaga (jyrki.heinamaki@ut.ee)

Vers. 27.11.2023/JH



Photo: M. Rejzner

Продовж. дод. А'



TARTU ÜLIKOOL

Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents 2023

Eesti Arst

Eesti Arst 2023;102(Lisa 1):1-72

Продовж. дод. А

AJAKAVA

TÜ arstiteaduskonna aastapäeva kava

12. OKTOOBER

TEADUSKONVERENTS

Biomeedikum (Ravila 19, Tartu)

08.30–09.00	Kogunemine ja hommikukohv
09.00–09.15	<i>Avasõnad</i>
09.15–11.00	Doktorantide sessioon (Ravila 19-1006)
11.00–11.30	Kohvipaus
11.30–13.15	Õnõpilaste sessioon (Ravila 19-1006)
13.15–13.45	Kohvipaus
13.45–15.30	Arst-residentide, arstide ja teadurite sessioon (Ravila 19-1006)
15.30–16.30	Stendietekanded: autorid tutvustavad tunni aja jooksul stendide juures oma postreid

13. OKTOOBER

ARSTITEADUSKONNA AASTAPÄEVA TEEMAKONVERENTS
„Tulevikumediitsiin, innovatsioon ja kestlik areng“*Biomeedikumi auditoorium 1006 (Ravila 19, Tartu)*

9.30–10.00	Kogunemine ja hommikukohv
10.00–10.15	<i>Avasõnad</i>
10.15–11.00	Professor Mats Mälvqvist (Uppsala Ülikooli Kestlikkuse Õppe- ja Teaduskeskuse Swedesd juht, Rootsi) „Health, Sustainability and Transformation – a New Narrative for Global Health“
11.00–11.20	Janika Kõrv (kliinilise meditsiini instituudi närvikliinik, TÜ) „Insuldiravi Eestis: kuidas edasi?“
11.20–11.40	Marlo Plaas (bio- ja siirdemediitsiini instituudi katseloomakeskus, TÜ) „Teada-tuntud diabeediravimite ja toidulisandite kasutamine harvikaiguse Wolframi sündroomi raviks“
11.40–12.00	Veiko Vengerfeldt (hambaarstiteaduse instituut, TÜ) „Tulevik hambaravis“
12.00–12.40	Kohvipaus
12.40–13.00	Tambet Teesalu (bio- ja siirdemediitsiini instituudi biomeditsiini osakond, TÜ) „Ravimite täppis-suunamine kullerpeptiidide abil: laborikatsetest kliinilise uuringuteni“
13.00–13.20	Jana Lass (farmaatsia instituut, TÜ) „Ravimvorm kui rätsepaülikond – ravimite 3D-printimine apteegis“
13.20–13.40	Tiina Kahre (kliinilise meditsiini instituudi kliinilise geneetika keskus, TÜ) „Onkogenoomika – teadusest praktikasse“
13.40–14.00	Jarek Mäestu (sporditeaduste ja füsioteraapia instituudi spordibioloogia osakond, TÜ) „Liikudes kestlikuma tervise poole“
14.00–14.20	Alme Kels (peremeditsiini ja rahvatervishoiu instituudi rahvatervishoiu õppetool, TÜ) „Innovatsioon meditsiinis – terved haiged“
14.20–14.30	Konverentsi lõpetamine
15.15–16.00	Professor Konstantin Koniku mälestusmärgi avamine Tartu Ülikooli raamatukogu (Wilhelm Struve 1) kõrval
19.00–23.00	DEKAANI VASTUVÕTT (<i>Eesti Rahva Muuseum, Muuseumi tee 2, Tartu</i>) Arstiteaduskonna medalite kätteandmine Teaduskonverentsi parimate autasustamine Stipendiumite kätteandmine Arst-residentide lõputunnistuste kätteandmine

- P4. Transkriptoomi analüüs süsteemse erüttematoosse luupusega patsientide eristamiseks**
Liis Haljasmägi^{1,2}, Sandra Meisalu^{1,3,4}, Martti Vanker^{2,3}, Kai Kisand² – ¹ doktorant, ² arstiteaduse üliõpilane, ³ TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituut, ⁴ Ida-Tallinna Keskhaigla reumatoloogiakeskus
- P5. Chronic stress fine-tunes the transcriptomics of aging T cells**
Chinna Susan Philip^{1,2}, Uku Haljasorg², Ihor Filippov^{1,2,3}, Pärt Peterson² – ¹ PhD student, University of Tartu, Estonia, ² Molecular Pathology Research Group, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of Tartu, Estonia, ³ QIAGEN Aarhus A/S, Denmark
- P6. In vitro haava polüakteriaalse biofilmi mudeli väljatöötamine**
Kelli Randmäe^{1,2}, Kairi Lorenz^{1,2}, Kaisa Põhako-Palu^{1,2}, Marta Putrin^{2,3}, Tanel Tenson³, Karin Kogermann² – ¹ doktorant, ² TÜ farmaatsia instituut, ³ TÜ tehnoloogiainstituut
- P7. HIV-1 ülekantud ravimiresistentsus Eestis 2020. aastal: esimene integraasi inhibitorite resistentsuse juhtum Eestis**
Arina Sablinskaja^{1,2}, Merit Pauskar², Ene-Ly Jõgeda², Hiie Soeorg², Heli Rajasaar², Eveli Kallas², Egert Närep³, Ruth Kõusmaa³, Jekaterina Tabri³, Pilleriin Soodla⁴, Taavi PõlP, Kristi Rüütel⁵, Irja Lutsar⁶, Radko Avi², Kristi Huik² – ¹ doktorant, ² TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituut, ³ Lääne-Tallinna Keskhaigla diagnostikakliinik, ⁴ TÜ Kliinikumi sisekliinik, ⁵ Tervise Arengu Instituut
- P8. Emakakaelavähi sõeluuringu kodustestide pakkumine apteekides: pilootuuring Ida-Virumaal 2022**
Reeli Hallik^{1,2,3}, Kaire Innos³, Jaak Jänes², Piret Veerus² – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituut, ³ Tervise Arengu Instituut
- P9. Alajäsemete krooniline isheemia: lokaalsete metaboolomilliste kõrvalekallete uurimine arteriovenoossete gradientide kaudu**
Tuljo Ööbik^{1,2}, Jaak Kals^{1,4,5}, Jaan Eha^{2,6}, Mihkel Zilmer⁵, Kalle Kiik⁵, Kaido Paapstel^{2,6} – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituudi südamekliinik, ³ TÜ kliinilise meditsiini instituudi kirurgikliinik, ⁴ TÜ Kliinikumi kirurgikliinik, ⁵ TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituut, ⁶ TÜ Kliinikumi südamekliinik
- P10. Perinataalse insuldi järel tekkinud epilepsia lastel on talamus ja basaaltuumad väiksemamahulised**
Ulvi Vahter^{1,2,3}, Norman Ilves^{1,2,4}, Nigul Ilves^{1,2,4}, Rael Laugesaar^{2,3,5}, Mairi Männamaa^{2,3}, Dagmar Loorits⁴, Pille Kool², Päivi Ilves^{2,4} – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituudi radioloogikliinik, ³ TÜ Kliinikumi lastekliinik, ⁴ TÜ Kliinikumi radioloogikliinik, ⁵ TÜ kliinilise meditsiini instituudi lastekliinik
- P11. Metüülfenidaadi ja atomoksetiini mõju DNA metüülatsoonimustrile muutustele inimese perifeerse vere mononukleaarsetes rakkudes**
Kerda Pulk^{1,2}, Kaili Anier², Anti Kalda² – ¹ doktorant, ² TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituudi farmakoloogia osakond
- P12. Discovering new phenolic compounds in the dry extracts of *Matricaria chamomilla* flowers and *Matricaria discoidea* herb**
Janne Sepp^{1,2}, Oleh Koshoviy^{2,3}, Jyrki Heinämäki², Ain Raal² – ¹ PhD student, University of Tartu, Estonia, ² Department of Pharmacy, University of Tartu, Estonia, ³ National University of Pharmacy, Ukraine
- P13. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity**
Iryna Botsula^{1,2}, Johannes Schavikin², Ivo Laidmäe⁴, Igor Kireyev², Jyrki Heinämäki⁴, Oleh Koshoviy^{2,4} – ¹ PhD student, ² National University of Pharmacy, Ukraine, ³ Electronics Research Laboratory, Department of Physics, University of Helsinki, Finland, ⁴ Institute of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tartu, Estonia
- P14. Obstruktiivse uneapnoega sümptomaatiliste patsientide metaboolomil sugudevahelised erinevused**
Ott Kiens^{1,2,3}, Egon Taalberg^{1,4,5}, Viktoria Ivanova³, Ketlin Veevälj⁶, Triin Laurits⁶, Ragne Tamm⁶, Aigar Ottas^{4,5}, Kalle Kiik^{4,5}, Ursel Soomets^{4,5}, Alan Altraja^{2,3} – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituudi kopsukliinik, ³ TÜ Kliinikumi kopsukliinik, ⁴ TÜ bio- ja siirdemeditsiini instituut, ⁵ TÜ genoomika ja siirdemeditsiini tippkeskus, ⁶ TÜ Kliinikumi psühhiaatriakliinik
- P15. Veebipõhise orofatsiaalse-müofunktsionaalse teraapia harjutusprogrammi tõhusus kerge kuni mõõduka raskusastmega obstruktiivse uneapnoega patsientidele**
Andres Köster^{1,2,3}, Heisl Vahter^{2,4}, Triin Jagomägi^{2,3} – ¹ doktorant, ² TÜ hambaarstiteaduse instituut, ³ TÜ Kliinikumi stomatoloogia kliinik, ⁴ Erakliinik Fertilitas, ⁵ Põhja-Eesti Regionaalhaigla
- P16. Patsiendihotuskuultuuri mõõdikute HSOPSC 2.0 ja SA Q kultuuriline adapteerimine ja valideerimine Eesti konteksti**
Signe Asi^{1,2}, Hiske Calsbeek³, Mari Katariina Kangasniemi⁴, Mare Vähi⁵, Tatjana Kanaš⁵, Mari-Liis Ööpik-Loks⁷, Saima Hinn⁸, Kaja Põlluste² – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituut, ³ Radboudi Ülikooli meditsiinikeskus, Holland, ⁴ TÜ peremeditsiini ja rahvatervishoiu instituut, ⁵ TÜ matemaatilise statistika instituut, ⁶ Narva Haigla, ⁷ Haapsalu Neuroloogiline Rehabilitatsioonikeskus, ⁸ Viljandi Haigla
- P17. Kopsuvähi sõeluuringu kulutõhusus Eestis**
Kadi Kallavus^{1,2}, Janika Alloja³, Tanel Laisaar², Eva Juus³, Mariliis Põld³, Mikk Jürisson² – ¹ doktorant, ² TÜ kliinilise meditsiini instituudi kopsukliinik, ³ TÜ peremeditsiini ja rahvatervishoiu instituut
- P18. Patsiendihotusjuhtumitest teavitamise infosüsteemides kirjeldatud parendustegevused: dokumendianalüüs**
Ere Uibu^{1,2}, Kaja Põlluste³, Margus Lember³, Karolin Toompere², Mari Kangasniemi^{2,4} – ¹ doktorant, ² TÜ peremeditsiini ja rahvatervishoiu instituut, ³ TÜ kliinilise meditsiini instituut, ⁴ Turu Ülikooli õendusteaduse osakond, Soome

Продовж. дод. А

Міністерство охорони здоров'я України
Харківська міська рада
Департамент охорони здоров'я Харківської міської ради
Національний фармацевтичний університет

ПРОГРАМА

VII Міжнародної науково-практичної конференції
«Ліки – людині»

*(Реєстраційне посвідчення УкрІНТЕІ № 593
Від 11 грудня 2023 р.)*

21-22 березня 2024 року, м. Харків

Продовж. дод. А

ПОСТЕРНІ ДОПОВІДІ:

I. V. Botsula, I. V. Kireyev, O. M. Koshovyi, M. O. Mazur, V. A. Chebanov – National University of Pharmacy, Department of Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy; Division of Chemistry of Functional Materials, State Scientific Institution “Institute for Single Crystals” of National Academy of Sciences of Ukraine; Department of Chemistry, V. N. Karazin Kharkiv National University. **Influence of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives on spontaneous locomotor activity of rodents.**

Гринь К.В. - к.мед.н., доцент, Полтавський державний медичний університет, Формування ефективних стратегій лікування розладів, пов'язаних зі стресом.

Olena Klenina, Laura Márquez Cantudo, Claire Coderch, Beatriz de Pascual-Teresa Fernandez - Department of General, Bioinorganic, Physical and Colloidal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine;

Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Urbanización Montepríncipe, 28668 Boadilla del Monte, España. **Molecular dynamics and conformational clustering of dual ck2/hdac inhibitors.**

Печенюк В.І. - аспірант кафедри фармацевтичного управління, технології ліків та фармакогнозії Івано-Франківського національного медичного університету. Вплив продуктів ріпаку на ліпідний обмін.

Підгайна В.В. – доктор філософії, асистент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації Національного фармацевтичного університету. Фармакологічна активність крему з екстракту кори верби білої та цинку за умови алергічного контактного дерматиту.

Цеменко К.В. – асистент кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету. Роль фармацевта в профілактиці остеопорозу.

<https://drive.google.com/drive/folders/lux3ar7T4dypuUHnWNUweJjDWD096z7Vp>

Продовж. дод. А




Міністерство освіти і науки України
Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія медичних наук України
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України
Одеський національний медичний університет
ТДВ «ІНТЕРХІМ»

**Сучасна фармація:
реалії сьогодення та
перспективи розвитку**

ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ
Всеукраїнської науково-практичної
конференції з міжнародною участю

9-12 квітня 2024, Одеса

Продовж. дод. А

5. Михайлова К. І., здобувач вищої освіти Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «The perspective of creating a moisturizing cream for dry skin»
6. Підрушняк М. В., здобувач вищої освіти Національного медичного університету імені О. О. Богомольця «Prospects for the creation of a mild medicinal product for the treatment and prevention of acne».
7. Добрянська І. М., здобувач вищої освіти Ужгородського національного університету «Вивчення хімічної взаємодії нестероїдних протизапальних засобів з кофеїновмісними напоями».

СТЕНДОВІ ДОПОВІДІ:

1. Богущька О. Є., Херсонський державний університет, м. Івано-Франківськ, Україна «СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПОПИТУ У ЗАСОБАХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГОСТРИХ РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ».
2. Будняк Л., Михайлюк Г., Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, Україна «ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ВИТЯЖЦІ З ТРАВИ ЩАВНАТУ».
3. Будняк Л., Сторожук О., Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, Україна «ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ГУСТОМУ ЕКСТРАКТІ ТРАВИ АЙСТРИ НОВОБЕЛЬГІЙСЬКОЇ МЕТОДОМ ВЕРХ».
4. Будняк Л., Кривош П., Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, Україна «ВИЗНАЧЕННЯ ГІДРОКСИКОРИЧНИХ КИСЛОТ У ВИТЯЖЦІ З ТРАВИ ЗОЛОТОТИСЯЧНИКА ЗВИЧАЙНОГО».
5. Ситник М., Будняк Л., Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль, Україна «АНАЛІЗ АСОРТИМЕНТУ РОСЛИННИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ МІСЦЕВОГО ЗАСТОСУВАННЯ В СТОМАТОЛОГІЧНІЙ ТА ЛОР-ПРАКТИЦІ».
6. Шкодовська А. М. І., Ішков Ю. В., Одеський Національний Університет імені І. І. Мечникова, м. Одеса, Україна «СИНТЕЗ АЛКІЛОВАНІХ ПОХІДНИХ ПОБАРЫТУРОВОЇ КИСЛОТИ З МОРФОЛІНОВИМ ФРАГМЕНТОМ».
7. Botsula I. V.¹, Kireyev I. V.¹, Koshovyi O. M.¹, Chebanov V. A.^{2,3}, ¹ National university of pharmacy, Kharkiv, Ukraine; ² Division of chemistry of functional

Продовж. дод. А

materials, state scientific institution «Institute for single crystals» of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine; ³ Department of chemistry, V. N. Karazin Kharkiv National University Kharkiv, Ukraine «**THE IMPACT OF NOVEL 1,2,3-TRIAZOLO-1,4-BENZODIAZEPINE DERIVATIVES ON RODENT MUSCLE TONE**».

8. *Filipets N. D., Gerush O. V., Filipets O. O.*, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine «**PROTEOLYTIC ACTIVITY OF A FLUORINE-CONTAINING ACTIVATOR OF ATP-SENSITIVE POTASSIUM CHANNELS IN KIDNEY DAMAGE**».
9. *Tovchiga O. V.¹, Inkielewicz-Stepniak I.¹, Shtrygol' S. Yu.²*. ¹Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, the Republic of Poland; ²Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine «**URIC ACID AS A POSSIBLE MEDIATOR IN NEUROPROTECTION AND A TARGET IN DRUG DISCOVERY**».

Усі надіслані на конференцію стендові доповіді можна переглянути за [ПОСИЛАННЯМ](#).

Додаток Б



Продовж. дод. Б



Продовж. дод. Б

Форма В4



МІНЕКОНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
«УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ»
(УКРНОІВІ)

вул. Дмитра Гудзенка, 1, м. Київ, 01601, тел.: +380 44 209-27-06, +380 67 501-05-95
e-mail: office@nipo.gov.ua, http://www.nipo.gov.ua, код згідно з ЄДРПОУ 44673629

29.09.2023 № 16357/3А/23

Стосується заявки № а 2023 04532
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Національний фармацевтичний університет,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002



Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)

(21) Реєстраційний номер заявки а 2023 04532

(71) Заявник(и)
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(54) Назва винаходу
N-(ТРЕТ-БУТИЛ)-4-ОКСО-3,5-ДИФЕНІЛ-5,6-ДИГІДРО-4Н-
БЕНЗО[F][1,2,3]ТРИАЗОЛО[1,5-A][1,4]ДІАЗЕПІН-6-КАРБОКСАМІД, ЯКИЙ
ВИЯВЛЯЄ АНКСІОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ

Матеріали заявки відповідають вимогам статті 13 Закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі» (далі – Закон) щодо встановлення дати подання заявки на дату одержання Державною організацією «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»:

- матеріалів заявки

Дата подання заявки 25.09.2023

Начальник сектору встановлення дати подання заявок

Любов ЛУЦЕНКО

Телефон 494-05-98

Провідний експерт

Людмила ЯВОРСЬКА

Продовж. дод. Б

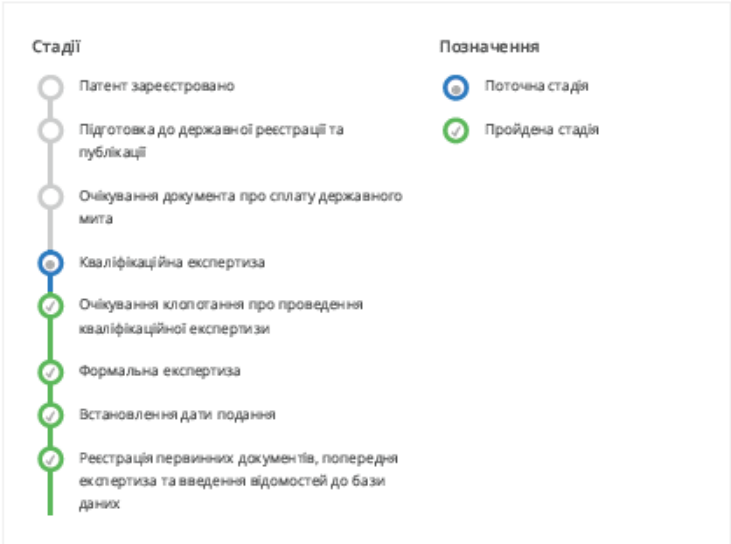
а202304532

Заявка на винахід

Головна / Заявка № а202304532

- Бібліографічні дані
- Формула
- Опис
- Опублікований опис
- Реферат (UA)
- Реферат (RU)
- Реферат (EN)
- Стан діловодства
- Словіщення

Стан діловодства



Документи

#	Дата реєстрації	Дата відправки	Назва документа	Реєстраційний номер
1	25.09.2023		[K51] Опис винаходу (КМ)	23/3A/B x/№1 4553
2	25.09.2023		[K50] Формула винаходу (КМ)	23/3A/B x/№1 4557
3	25.09.2023		[K52] Реферат	23/3A/B x/№1 4558
4	25.09.2023		[E4] Квитанція	23/3A/B x/№1 4556
5	25.09.2023		[K71] Заява на видачу патенту на винахід (КМ)	23/3A/B x/№1 4552
6	25.09.2023		[E21] Документ, що підтверджує неприбутковість особи	23/3A/B x/№1 4555
7	25.09.2023		[Б1-В] Клопотання про зміну адреси для листування	23/3A/B x/№1 4554
8	29.09.2023	11.10.2023	[B4] Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)	16357/3A/23
9	29.09.2023	04.10.2023	[B15] Повідомлення по заявці на винахід (корисну модель)	16355/3A/23
10	02.01.2024	02.01.2024	[B6] Повідомлення про завершення формальної експертизи за заявкою на винахід	57/3A/24

Продовж. дод. Б

#	Дата реєстрації	Дата відправки	Назва документа	Реєстраційний номер
11	05.02.2024		[К1] Клопотання про проведення кваліфікаційної експертизи на винахід	Вх-2163-Е/2024
12	05.02.2024		[Е32] Документ, що підтверджує сплату збору	Вх-2163-Е/2024
13	05.02.2024		[АО-19] Електронний лист	Вх-2163-Е/2024
14	22.02.2024	22.02.2024	[В43] Повідомлення щодо заяви про проведення кваліфікаційної експертизи	4639/ЗА/24

Збори

#	Код збору	Початок очікування	Планова дата отримання	Фактична дата отримання	Назва документа
1	11600	25.09.2023	25.09.2026	05.02.2024	За проведення кваліфікаційної експертизи заявки на винахід
2	10100	29.09.2023	29.11.2023	13.09.2023	За подання заявки (міжнародної заявки) на винахід (корисну модель), формула якого містить не більш як 3 пункти

Платежі (зараховані)

#	Сума оплати	Номер платежу	Дата отримання	Назва платежу
1	320 UAH	228265029	13.09.2023	Платіжне доручення
2	720 UAH	@2PL854933	05.02.2024	Електронний платіжний документ



Спеціальна інформаційна система УКРНО ІВІ (CIC).
Сервіс створено для пошуку відомостей про об'єкти промислової власності.

МЕНЮ

- Простий пошук >
- Розширений пошук >
- Пошук по словіщениам >
- Бюлетень >
- Допомога >
- Зворотній зв'язок >

Продовж. дод. Б

Форма В4



МІНЕКОНОМІКИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
«УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ»
(УКРНОІВІ)

вул. Дмитра Годзєнка, 1, м. Київ, 01601, тел.: +380 44 209-27-06, +380 67 501-05-95
e-mail: office@nipo.gov.ua, http://www.nipo.gov.ua, код згідно з ЄДРПОУ 44673629



08.12.2023 № 22007/3А/23

Стосується заявки № а 2023 05807
/ при листуванні просимо посилатися на цей № /

Адреса для листування
Національний фармацевтичний університет,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002

Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)

(21) Реєстраційний номер заявки а 2023 05807

(71) Заявник(и)
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(54) Назва винаходу
N-(ТРЕТ-БУТИЛ)-5-(5-МЕТИЛІЗОКСАЗОЛ-3-ІЛ)-4-ОКСО-5,6-ДИГІДРО-4Н-БЕНЗО[F][1,2,3]ТРИАЗОЛО[1,5-А][1,4]ДІАЗЕПІН-6-КАРБОКСАМІД, ЯКИЙ ВІЯВЛЯЄ АНТИДИПРЕСИВНУ АКТИВНІСТЬ

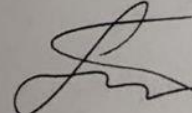
Матеріали заявки відповідають вимогам статті 13 Закону України «Про охорону прав на винаходи і корисні моделі» (далі – Закон) щодо встановлення дати подання заявки на дату одержання Державною організацією «Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій»:

- матеріалів заявки

Дата подання заявки 01.12.2023

Начальник сектору встановлення дати подання заявок  Любов ЛУЦЕНКО

Телефон 494-05-98

Провідний експерт  Тетяна ІГНАТЬЄВА

Телефон 494-05-98

Продовж. дод. Б

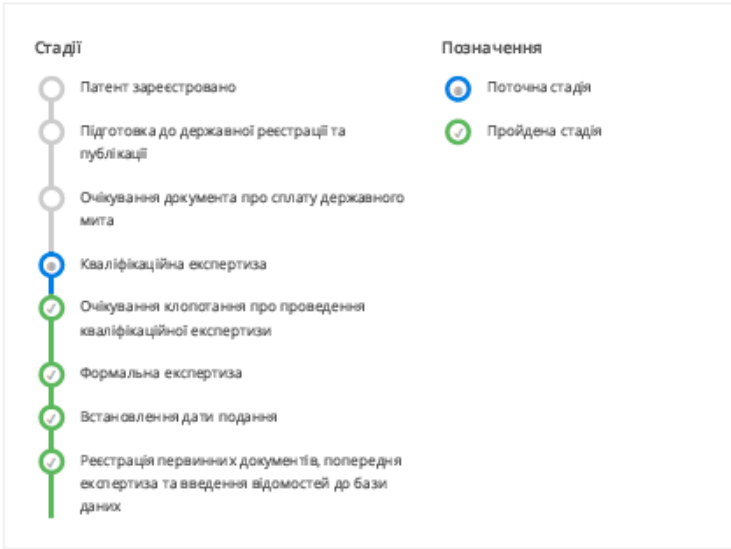
а202305807

Заявка на винахід

Головна / Заявка № а202305807

- Бібліографічні дані
- Формула
- Опис
- Опублікований опис
- Реферат (UA)
- Реферат (RU)
- Реферат (EN)
- Стан діловодства
- Словіщення

Стан діловодства



Документи

#	Дата реєстрації	Дата відправки	Назва документа	Реєстраційний номер
1	01.12.2023		[K51] Опис винаходу (KM)	23/3A/Bx№1 7220
2	01.12.2023		[K50] Формула винаходу (KM)	23/3A/Bx№1 7221
3	01.12.2023		[K52] Реферат	23/3A/Bx№1 7222
4	01.12.2023		[E4] Квитанція	23/3A/Bx№1 7224
5	01.12.2023		[K71] Заява на видачу патенту на винахід (KM)	23/3A/Bx№1 7219
6	01.12.2023		[E11] Лист	23/3A/Bx№1 7225
7	01.12.2023		[E21] Документ, що підтверджує неприбутковість особи	23/3A/Bx№1 7223
8	08.12.2023	13.12.2023	[B4] Повідомлення про встановлення дати подання заявки на винахід (корисну модель)	22007/3A/23
9	20.03.2024	25.03.2024	[B6] Повідомлення про завершення формальної експертизи за заявою на винахід	6676/3A/24
10	18.04.2024		[K1] Клопотання про проведення кваліфікаційної експертизи на винахід	Вх-7207-Е/2024
11	18.04.2024		[E32] Документ, що підтверджує сплату збору	Вх-7207-Е/2024

Продовж. дод. Б

#	Дата реєстрації	Дата відправки	Назва документа	Реєстраційний номер
12	18.04.2024		[АО-19] Електронний лист	Вх-7207-Е/2024
13	24.04.2024	25.04.2024	[В43] Повідомлення щодо заяви про проведення кваліфікаційної експертизи	9442/ЗА/24
14	28.06.2024		[АО-19] Електронний лист	Вх-11813-Е/2024
15	28.06.2024		[БІ-8] Клопотання про зміну адреси для листування	Вх-11813-Е/2024
16	03.07.2024	03.07.2024	[В15] Повідомлення по заявці на винахід (корисну модель)	14101/ЗА/24

Збори

#	Код збору	Початок очікування	Планова дата отримання	Фактична дата отримання	Назва документа
1	10100	01.12.2023	01.02.2024	12.11.2023	За подання заявки (міжнародної заявки) на винахід (корисну модель), формула якого містить не більш як 3 пункти
2	11600	01.12.2023	01.12.2026	17.04.2024	За проведення кваліфікаційної експертизи заявки на винахід

Платежі (зараховані)

#	Сума оплати	Номер платежу	Дата отримання	Назва платежу
1	192 UAH	239261737	12.11.2023	Електронний платіжний документ
2	720 UAH	@2PL600897	17.04.2024	Електронний платіжний документ



Спеціальна інформаційна система УКРНО ІВІ (CIS).
Сервіс створено для пошуку відомостей про об'єкти промислової власності.

МЕНЮ

- Простий пошук >
- Розширений пошук >
- Пошук по словіщеним >
- Бюлетень >
- Допомога >
- Зворотній зв'язок >

Додаток В



Medical University of Warsaw
International Relations Office

61, Żwirki i Wigury St.
 02-091 Warsaw, Poland

Phone: +48 22 57 20 348
 Fax: +48 22 57 20 449

Warsaw, 13th October 2022

TRAINING CONFIRMATION

TRANSCRIPT OF RECORDS

'within the framework of Erasmus Student Mobility'

I, hereby certify that **Ms. Iryna Botsula** – a Phd student of the National University of Pharmacy in Kharkiv, has worked on a research project titled: "*Evaluation of toxicity of new derivatives of 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines in vitro*". at the Faculty of Pharmacy of the Medical University of Warsaw in the summer semester of the academic year 2021/22, between 04.05.2022 and 31.07.2022.

The training has been successfully completed with the overall grade **5,0 / A**.

Signature

..... **Departmental Coordinator**

Seal of the host institution



Продовж. дод. В



UNIVERSITY OF TARTU

In Tartu, Estonia May 18, 2023

Reference: The Erasmus+ mobility visit of *Iryna Botsula* to the Institute of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Tartu, Estonia.

To Whom It May Concern

It is certified that *Iryna Botsula* from the National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine made her Erasmus+ mobility visit within April 25 – May 6, 2023 to the Institute of Pharmacy, University of Tartu, Estonia. During her 2-week visit, she participated in the following study activities:

- ARFA.02.141 ENG Pharmaceutical nanotechnology
 - Participation in the lecture entitled "Cancer therapy and diagnosis" (May 2)
- ARFA.02.126 Granulation and tableting technology
 - Participation in the final seminar of the lecture course (April 25)
- ARFA.02.160 Seminars in Pharmaceutical Sciences XII
 - Own seminar entitled "*Study of pharmacological activities of new derivatives of 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines*" (April 28, 2023)
 - Participation in four other seminars (April 26, April 27 and April 28, 2023)
 - Excursion visits to hospital pharmacy and community pharmacy in Tartu
- ARFA.02.133 Student research in Pharmacy IV (laboratory work period related to the doctoral research work)
 - The laboratory research work on the electrospinning of pharmaceutical nanofibers related to her doctoral work

In addition, *Iryna Botsula* participated actively in the discussion meetings on higher-education and research work in Pharmacy both in Ukraine and Estonia. In summary, the learning goals (including laboratory research training) set for the present 2-week Erasmus+ mobility, were achieved. The participation of *Iryna Botsula* in the present mobility visit can be considered as valuable for her to further develop as a scientist and to support her future researcher career.

Sincerely,

Jyrki Heinämäki, PhD(Pharm)
 Professor of Pharmaceutical nanotechnology,
 Faculty of Medicine, Institute of Pharmacy,
 University of Tartu,
 Nooruse 1, EE-50411 Tartu
 Estonia
 Tel. +372 737 5281
 Email jyrki.heinamaki@ut.ee

Продовж. дод. В



ERASMUS+

Letter of Confirmation

Date: 06.05.2023

This is to confirm that **Ms Iryna Botsula** from National University of Pharmacy, Kharkiv Ukraine has taken part in ERASMUS+ International Credit Mobility for Training at the Institute of Pharmacy, University of Tartu during the following dates: 25/04/2023 and 06/05/2023 (+2 travel days).

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Kadri Veeperv", written over a horizontal line.

Signature



Kadri Veeperv
Academic Affairs Specialist
Dean's Office, Faculty of Medicine

Продовж. дод. В



UNIVERSITY OF TARTU

30.01.2024 No 7-27/MV-346-H

TRANSCRIPT OF RECORDS

IRYNA BOTSULA, (born 01.09.1993) was enrolled in the Faculty of Medicine, University of Tartu, from 04.09.2023 to 04.02.2024 as a visiting student and passed the following courses:

Subject code	Subject	ECTS	Date	Result	Teaching staff member
University of Tartu					
HVLC.09.029	Estonian for Beginners I (100% Web-Based). Level 0 > A1.1	6.00	19.12.2023	A - Excellent	S. Salusoo
ARFA.02.132	Pharmaceutical Film and Nano-coatings	2.00	25.01.2024	A - Excellent	J. T. Heinämäki
ARFA.00.057	Research Work	6.00	29.01.2024	Pass	A. Raal

Total: 14.00

Total amount of studies is measured in credit points (ECTS). One ECTS corresponds to 26 hours of studies performed by a student. One academic year consists of 60 ECTS.

Courses in all subjects must end with an examination or pass/fail evaluation. There may be several independent examinations in separate parts of a subject.

Grading Scheme until August 29, 1999

Positive grades were:

Excellent (5) - used to express outstanding knowledge about the subject;

Good (4) - used to express fair knowledge about the subject, whereas errors were of formal character or of trivial scope;

Satisfactory (3) - used to express knowledge of the core content of the subject, whereas the few errors were of principal character and concerned the content of the subject.

The negative grade was:

Fail (2) - used to express insufficient knowledge of the core content of the subject.

Pass/fail evaluation was expressed in words: the positive result was defined as "Pass" and the negative result as "Fail". The pass/fail evaluations may have been graded.

In the case, the learning outcomes of the period prior to 30 August 1999 had been accredited pursuant to the Rules of the Accreditation of Prior Learning and Work Experience, the grades received were converted to the grading system valid since 30 August 1999. Starting from 1 January 2016, the grades received before 30 August 1999 will be converted to non-differentiated grading system.

Grading scheme since August 30, 1999

Differentiated assessment of students' academic results in a subject or its parts is conducted using a six-grade assessment system (supplemented by the verbal counterpart and the description of meaning of every grade) as follows:

1) Grade "A" - "Excellent";

2) Grade "B" - "Very good";

3) Grade "C" - "Good";

4) Grade "D" - "Satisfactory";

5) Grade "E" - "Sufficient";

6) Grade "F" - "Insufficient".

The examination or pass/fail evaluation is considered passed upon its grading in the range from "E" to "A". In calculating the average grade the following correspondences are applied: A = 5, B = 4, C = 3, D = 2, E = 1, F = 0.

Non-differentiated assessment of academic results is conducted using a system whereby the positive result is defined as "Pass" and the negative result as "Fail".

Kadri Veeperv

Academic Affairs Specialist



Ülikooli 18, 50090 Tartu, Estonia | +372 737 5100 | info@ut.ee | www.ut.ee | Registry code 74001073

Додаток Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
ННУ «Київський медичний
університет»,
Доктор медичних наук, доцент
Пятницький Ю.С.
05 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Можливості покращення цільової доставки похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів за допомогою технології електропрядіння та їх 3Д друку в перспективі створення персоналізованої лікарської форми.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Боцула І.В.

3. Джерела інформації:

1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712>
2. Botsula I., Kireyev I., Koshovyi O., Heinämäki J., Ain R., Mazur M., Chebanov V. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48. URL: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2024.299205>
3. Боцула І.В., Кіресв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання п-(трет-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4н-бензо[*f*][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність: Патент України на корисну модель №155538; МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 25.09.2023; Опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10.
4. Боцула І.В., Кіресв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання п-(трет-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4н-бензо[*f*][1,2,3]триазоло[1,5-а][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність: Патент України на корисну модель №156108; МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 01.12.2023; Опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19 (Особистий внесок здобувача: проведення інформаційно-патентного пошуку, проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів та оформлення патенту).
5. Botsula I.V. Current trends in the use of 1,4-benzodiazepine derivatives in medical practice. *Topical issues of new medicines development : матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О. Валишка (18-19 березня 2021 року)*. Х. : НФаУ, 2021. с.296-297.

4. Впроваджено: В навчальний процес кафедри хімії з « 30 » травня 2024 р.

Продовж. дод. Г

5. Результат впровадження: інформація для студентів для підвищення їх обізнаності про фармакологічні властивості, можливості застосування технології електропрядіння та 3Д друку для похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів з метою підвищення біодоступності АФІ та подальшої розробки персоналізованої лікарської форми.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри хімії ПВНЗ «Київський медичний університет».

Протокол № 10 від « 30 » травня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри хімії,
доктор фармацевтичних наук, доцент

А. В. Гудзенко

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

Проректор науково-педагогічної
роботи Ірина КНЯЗЬКОВА
Харківського національного
медичного університету
«31» травня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Поглиблення знань про антидепресивні властивості похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Боцула І.В.

3. Джерела інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.) – стаття та Патент України на корисну модель:

Botsula I.V., Kireyev I.V., Mazur M.O., Chebanov V.A. The study of antidepressant properties of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *News of pharmacy*. 2024. № 1 (107). P. 136-143. URL: <https://doi.org/10.24959/nphj.24.144>.

Боцула І.В., Кіреєв І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання n-(трет-бутил)-5-(5-метилізоксазол-3-іл)-4-оксо-5,6-дигідро-4h-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє антидепресивну активність: Патент України на корисну модель №156108; МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 01.12.2023; Опубл. 08.05.2024, Бюл. №. 19.

4. Де і коли впроваджено: кафедра клінічної фармакології та внутрішньої медицини Харківського національного медичного університету.

5. Результати застосування методу за період 2023 –2024 навчальні роки. Матеріали використовуються в науково-педагогічному процесі кафедри клінічної фармакології та внутрішньої медицини ХНМУ.

6. Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє покращити і поглибити знання здобувачів вищої медичної освіти з особливостей фармакологічні властивості похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів.

7. Зауваження, пропозиції: рекомендується для впровадження в науково-педагогічну та лікувальну роботи кафедри клінічної фармакології та внутрішньої медицини ХНМУ

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної фармакології та внутрішньої медицини Харківського національного медичного університету, протокол № 17 від «31» травня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри клінічної фармакології та внутрішньої медицини,
доктор медичних наук, професорка



Ірина КНЯЗЬКОВА

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор
 Полтавського державного медичного
 університету
 доктор медичних наук, професор
 Валентин ДВОРНИК
 «14» червня 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Обґрунтування доцільності застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Боцула І.В.

3. Джерела інформації:

Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712>

Боцула І.В., Кіресев І.В., Чебанов В.А., Мазур М.О., Кошовий О.М. Спосіб одержання n-(трет-бутил)-4-оксо-3,5-дифеніл-5,6-дигідро-4н-бензо[f][1,2,3]триазоло[1,5-a][1,4]діазепін-6-карбоксаміду, що виявляє анксиолітичну активність: Патент України на корисну модель №155538: МПК: А61К 31/5513 (2006.01); А61К 31/4192 (2006.01); А61Р 25/22 (2006.01). Заяв. 25.09.2023; Опубл. 06.03.2024, Бюл. №. 10.

4. Впроваджено: В навчально-науковий процес кафедри фармакології, клінічної фармакології та фармації з «15» червня 2024 р.

5. Результат впровадження: інформація для студентів про анксиолітичні властивості нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, що сприяє підвищенню рівня знань у галузі протитривожних засобів.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, клінічної фармакології та фармації Полтавського державного медичного університету

Протокол № 20 від «14» червня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
 фармакології, клінічної фармакології та фармації
 доктор медичних наук, професор



Р. В. Луценко

Продовж. дод. Г

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор закладу вищої освіти з наукової
роботи Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф. І. М. Кліш

« 19 » « 06 » 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Можливості 3Д друку формул ПЕО гелю, що поєднують нановолокна, завантажені похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави для подальшої перспективи створення персоналізованої лікарської форми.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Боцула І.В.

3. Джерела інформації:

Botsula I., Kireyev I., Koshovyi O., Heinämäki J., Ain R., Mazur M., Chebanov V. Semi-solid extrusion 3D printing of functionalized polyethylene oxide gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2024. Vol. 1, № 47. P. 40–48.

Iryna Botsula, Johannes Schavikin, Ivo Laidmäe, Igor Kireyev, Jyrki Heinämäki, Oleh Koshovyi. Development of nanofiber-based drug delivery systems for new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepines derivatives with anxiolytic activity. *Tartu Ülikooli arstiteaduskonna aastapäeva teaduskonverents*, Tartu, 12-13 October 2023. Tartu, Estonia : University of Tartu, 2023. P. 29.

Botsula I., Koshovyi O., Kireyev I., Mazur M., Chebanov V., Heinämäki J., Raal A. 3D printing of functionalized polyethylene oxide (peo) gels loaded with 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine nanofibers and valine-modified motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) dry extract using semi-solid extrusion technology. *Current approaches of pharmaceutical science in development and standardization of medicines and dietary supplements that contain components of natural origin* : The Proceedings of the VI International Scientific and Practical Internet-Conference, Kharkiv, 12 April 2024. Kharkiv : NUPh, 2024. P.12-13.

4. Впроваджено: В навчальний процес кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою з «20» січня 2025 р.

5. Результат впровадження: розширено уявлення та загальну обізнаність у студентів про можливості 3Д друку ПЕО гелів, до складу яких входять нановолокна, завантажені похідним 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепіну, та модифікований валіном сухий екстракт кропиви собачої трави, що демонструє перспективу створення персоналізованої лікарської форми.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри, протокол № 7 від «19» червня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакогнозії
з медичною ботанікою,
доктор фармацевтичних наук, професор



С. М. Марчишин

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Директор з науково-педагогічної роботи
 Одеського національного медичного
 університету, д. мед. н., професор
 Світлана КОТЮЖИНСЬКА
 06 2024 р.


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Обґрунтування доцільності застосування похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів як потенційних протитривожних засобів.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації, 61002, м. Харків, вул. Григорія Сковороди, 27, аспірантка Боцула І.В.

3. Джерела інформації:
 1. Botsula I., Schavikin J., Heinämäki J., Laidmäe I., Mazur M., Raal A., Koshovyi O., Kireyev I., Chebanov V. Application of nanofiber-based drug delivery systems in improving anxiolytic effect of new 1,2,3-triazolo-1,4-benzodiazepine derivatives. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 195. P. 106712. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106712>
 2. Боцула І.В., Кіреєв І.В., Кошовий О.М., Мазур М.О., Чебанов В.А. Поведінкові реакції гризунів після введення похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів в тесті «відкритого поля». *Фармацевтичний часопис*. 2023. № 4. С. 70–77. URL: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2023.4.14297>.

4. Впроваджено: В навчальний процес кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії з «20» червня 2024 р.

5. Результат впровадження: інформація для студентів про анксиолітичні властивості нових похідних 1,2,3-триазоло-1,4-бензодіазепінів, що сприяє підвищенню рівня знань з питань можливої фармакокорекції тривожних станів.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету
 Протокол № 11 від «20» червня 2024 р.

Відповідальний за впровадження:
 Завідувач кафедри загальної і клінічної
 фармакології та фармакогнозії,
 доктор медичних наук, професор


 Я. В. Рожковський