

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОНДАРЕНКО Павло Сергійович

УДК:615/.212:546-3

ДИСЕРТАЦІЯ

**«Експериментальне дослідження фармакодинаміки та
фармакокінетики кристалічних форм похідних
4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»**

222 – Медицина
(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

 П. С. Бондаренко

Науковий керівник: Волощук Наталія Іванівна, доктор медичних наук,
професор

Вінниця – 2021

АНОТАЦІЯ

Бондаренко П. С. Експериментальне дослідження фармакодинаміки та фармакокінетики кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 – «Медицина». - Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, 2021.

Дослідження присвячене вирішенню актуального завдання фармакології - пошуку перспективних речовин з аналгетичною та протизапальною активністю серед похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот на підставі експериментальних досліджень фармакодинаміки та фармакокінетики різних кристалічних модифікацій найбільш активних сполук.

Доповнено наукові дані щодо можливості розробки нових потенційних аналгетичних та протизапальних засобів серед похідних 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти. Доведено можливість отримання її ефірів алкілуванням відповідної натрієвої солі. В процесі хімічного синтезу було виявлено, що гетерогенна кристалізація з етанолом призводить до утворення моноклінної поліморфної форми етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (сполука NI-75), тоді як гомогенна кристалізація - ромбічної форми (сполука NI-77). Отримані кристали ромбічної форми виявили помірну знеболюючу дію (66,0 %) і дуже слабку протизапальну дію (30,7 %), тоді як моноклінна форма – потужні аналгетичну та антиексудативну активності (90,6 та 85,8 %, відповідно), що перевищувало дію інших представників класу оксикамів ($p < 0,05$). Серед синтезованих за участі різних розчинників N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів отримано енантіоморфні (дзеркальні) різновиди, які відрізнялись силою аналгетичної та протизапальною дії. Сполука NI-34

мала більш потужні аналгетичні і відносно слабкі протизапальні властивості, які становили 64,7 та 22,1 % відповідно. Її дзеркальний поліморф (сполука NI-35) виявилась слабким аналгетиком (ця активність становила 26,3 %), з більш виразними протизапальними властивостями (антиексудативна активність становила 62,2 %).

В процесі хімічного синтезу N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду було виявлено, що кристалізація із етилацетату, мета-ксилолу або орто-ксилолу забезпечує утворення трьох видів кристалів з різним габітусом - довгих паличок квадратного перерізу (форма А, сполука NI-50), тонких долотоподібних пластин (форма В, сполука NI-51) або подовжених блоків (форма С, сполука NI-52), в яких зберігалась ідентичність всіх параметрів внутрішньої структури. Скринінгові дослідження на моделі карагенінового набряку у щурів показали, що всі зразки в дозі 20 мг/кг внутрішньочеревно зменшують гіперальгезію та набряк ураженої кінцівки, однак ступінь протизапального та знеболюючого ефектів був різний. Найбільшу активність показала сполука В, показники антифлогогенної та аналгетичної активності якої становили 85,2 та 93,5 %, що було вищим за всі інші сполуки та за препарати порівняння ($p < 0,05$). Сполука С поступалась силі цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі сполуки перевершували за своїми ефектами препарати порівняння.

Таким чином, лише кристалічні форми N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду одночасно виявляли виразні протизапальну та знеболюючу активності, тому для подальших поглиблених досліджень були обрані саме ці сполуки (А, В, та С).

Більш детальне вивчення аналгетичної властивості сполук А, В та С було проведено на п'яти моделях больової перцепції («оцтово-кислі корчі» у мишей, «гаряча пластинка», «tail-flick», електричне подразнення кореня хвоста та діабетична полінейропатія у щурів). Встановлено, що за внутрішньочеревного введення, серед трьох кристалічних форм сполука В найбільш ефективно усувала соматичний вісцеральний біль (аналгетична

активність (AA) становить 87,5 %), сполука С незначно поступалась їй (AA дорівнює 76,9 %), в той час як сполука А виявляла найменшу активність (AA становить 35,1 %). При зміні способу введення на пероральний, тенденція залишалась: $V \gg C > A$. При вивченні впливу кристалічних форм А, В і С на центральний компонент ноцицептивної реакції («гаряча пластина» та «tail-flick»), сполука В перевершувала інші за обох способів введення, але сполука А була більш ефективною за сполуку С. За цих умов при зміні внутрішньочеревного введення на пероральний прийом всі три зразки втрачали приблизно 30 % своєї аналгетичної активності. Дослідження на моделі електричного подразнення кореня хвоста щурів дозволили простежити тривалість розвитку аналгетичного ефекту кристалічних форм А, В та С. Було виявлено, що сполука В має потужний і швидкий знеболюючий ефект, який після 2-ї години експерименту починає помітно зменшуватися. Активність сполуки С була менш виражена, хоча також досягала свого максимуму на 2-й години з подальшим поступовим зменшенням. Сполука А, на відміну від інших двох кристалічних поліморфів, на першій годині досліду мала дуже низьку активність, яка потім поступово посилювалась і сягала свого піку лише на 4-й годині, і цей ефект зберігався більш тривало в порівнянні з іншими тест-зразками. Результати, отримані на моделі нейропатичного болювого синдрому, викликаного стрептозотоцин-індукованим діабетом у щурів, підтвердило лідерство за знеболюючою активністю саме кристалічної форми у вигляді паличок (сполука В).

Вперше проведена порівняльна оцінка ефективності та безпечності трьох кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду. За показником гострої токсичності (LD₅₀) кристалічні форми А, В і С за їх перорального введення розташувались: $C < B < A$, а за показником ульцерогенності (UD₅₀) - $B \ll C < A$. Розрахунок коефіцієнта безпечності (LD₅₀/UD₅₀) показав, що найкращий результат виявився у сполуки В (7,99), дещо нижчий – у сполуки А (5,88), а найнижчий – у сполуки С (4,97). За ефективністю аналгетичної дії

(показником ED₅₀) найкращі результати показала сполука В, оскільки її середня ефективна доза на моделі термічного подразнення «tail flick» становила $2,15 \pm 0,11$ мг/кг, тоді як для сполук С і А – $2,42 \pm 0,12$ та $3,19 \pm 0,16$ мг/кг, відповідно. Тобто, найбільш перспективною речовиною слід вважати кристалічну модифікацію похідного бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді пластин (сполука В).

Розширено наукові уявлення щодо особливостей фармакокінетики різних кристалічних форм біологічно активних сполук. Так, вперше визначений фармакокінетичний профіль поліморфних форм похідного бензотіазин-3-карбоксаміду за їх перорального введення *in vivo*. Методом високоефективної рідинної хроматографії в крові мишей визначено концентрацію сполук та розраховано основні параметри фармакокінетики. Виявлено, що у сполуки В константа абсорбції статистично переважає аналогічний показник у сполуки А на 12,1 %, а сполуки С – на 20,2 %, також у неї реєструється більш високий показник максимальної концентрації, який на 20,6 % переважає сполуку А ($p < 0,05$) та недостовірно ($p > 0,05$) - сполуку С, а час її досягнення у сполуки В був вдвічі швидшим, ніж у форми А. Поряд з цим, у сполуки В відмічається найбільша біодоступність (для сполуки В цей параметр був достовірно вищим на 12,5 та 2,6 % за такий у поліморфних форм А та С), швидка елімінація (константа елімінації сполуки В була в 1,48 рази більшою порівняно з сполукою А та С), найменший час напівелімінації (на 34,7-31,6 % менший за поліморфні форми А і С, ($p < 0,05$), а також найбільша величина загального кліренсу (на 18-25 %, більше, ніж у інших сполук). Виявлені особливості у фармакокінетиці кристалічних форм можуть пояснити отримані відмінності у фармакодинаміці цих композицій, що в сукупності дозволяє рекомендувати сполуку В для подальших поглиблених досліджень в якості протизапального та анагетичного засобу.

Отримано нові дані щодо протизапальної активності сполуки В у щурів. Показано, що N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід у формі паличок (сполука В) здатний зменшувати

всі компоненти запальної реакції – альтерацію, ексудацію та проліферацію. Так, антиексудативна активність сполуки В на моделі токсичного набряку легень, викликаного амонію хлоридом, становила 64,0 %, і була вірогідно більшою за дію мелоксикама ($p < 0,05$), антипроліферативна властивість сполуки В на моделі «ватної» гранульоми у щурів була помірно виражена (15,1 %), що однак не сягала статистично вірогідної різниці порівняно з референс-препаратом. Дослідження впливу сполуки В та мелоксикаму на альтеративний компонент запальної реакції (на моделі площинних ран шкіри), продемонструвало, що сполука В за здатністю зменшувати розміри ранового дефекту переважала мелоксикам на 5-ту та 21-шу добу експеримента ($p < 0,05$). Кількість тварин, у яких на 28-добу після нанесення рани спостерігалось повне рубцювання площинної рани, в групі контролю становило 42,8 %, тоді як на тлі введення сполуки В та мелоксикаму їх кількість становила 85,7 та 71,4 % відповідно ($p < 0,05$).

Дослідження антипіретичної дії на моделі молочної лихоманки у щурів показало, що сполука В та мелоксикам вірогідно знижували температуру тіла тварин, однак за вираженістю цього ефекта на 5-й годині після введення пірогену сполука В поступалась мелоксикаму, на 6-й годині – практично співставлялась, і на 7-й годині після моделювання пірогенної реакції – перевершувала препарат порівняння ($p < 0,05$).

На моделі хронічного автоімунного запального процесу (ад'ювантного артриту) показано, що лікувальне введення сполуки В зменшувало клінічні прояви запальної реакції, протидіяло змінам гематологічних показників (зростання ШОЕ та кількості лейкоцитів відносно контрольних тварин становило 13,3 та 3,92 %, відповідно проти 185 та 216 % у тварин з патологією без корекції), що було співставним з дією мелоксикаму. Дослідження біохімічних маркерів запального процесу у внутрішніх органах щурів з ад'ювантним артритом на прикладі слизової оболонки шлунка показало, що застосування сполуки В вірогідно зменшувало викликані запальним процесом елевацію рівня ІЛ-1 β та активності РgН-синтази (в 1,27 та 1,51 рази),

порівняно з нелікованими тваринами, $p < 0,05$). Крім того, введення тваринам сполуки В зменшувало гіперпродукцію прозапальних медіаторів – нітроген монооксиду (вміст нітратів та нітритів та сумарна активність NO-синтази зменшувались в 1,21 та 1,34 рази відповідно), та гідроген сульфід (рівень H_2S і активність ЦГЛ – зменшувались в 1,18 та 1,31 рази, відповідно ($p < 0,05$), відносно нелікованих тварин), що було статистично більш значущим, ніж за умов введення мелоксикаму ($p < 0,05$). Отже, протизапальна дія похідного карбоксаміду статистично переважала препарат порівняння.

Таким чином, нове оригінальне похідне N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді кристалічної форми – палички (сполука В) виявляє виразну аналгетичну, протизапальну, помірну антипроліферативну, антиальтеративну та антипіретичну дію, а низька гастротоксичність її дає підстави рекомендувати цю сполуку для подальших доклінічних досліджень як потенційного нестероїдного протизапального засобу.

Ключові слова: похідні 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот, кристалічна будова, поліморфні модифікації, аналгетична, протизапальна дія, ульцерогенність, гостра токсичність, фармакокінетика, гідроген сульфід, NO-синтаза, P_gH-синтаза, IL-β, щури.

ANNOTATION

Bondarenko P. S. Experimental study of pharmacodynamics and pharmacokinetics of 4-R-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acids crystalline forms. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree Doctor of Philosophy in «Health Care» in specialty 222 – “Medicine”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2021.

The study is devoted to solving the urgent problem of pharmacology - the search for promising substances with analgesic and anti-inflammatory activity among 4-R-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide derivatives based on

experimental studies of pharmacodynamics and pharmacokinetics of various crystalline modifications of the most active compounds.

Scientific data on the possibility of developing new potential analgesic and anti-inflammatory drugs among 4-methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acids derivatives have been supplemented. The possibility of obtaining its esters by alkylation of the corresponding sodium salt is proved. It was found by the process of chemical synthesis that heterogeneous crystallization from ethanol was revealed to result in a monoclinic polymorphic form of ethyl 4-methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate (compound NI-75), while the homogeneous crystallization results in its orthorhombic form (compound NI-77). The obtained crystals of rhombic form showed moderate analgesic effect (66.0 %) and very weak anti-inflammatory effect (30.7 %), while the monoclinic form - strong analgesic and anti-exudative activities (90.6 and 85.8 %, respectively), which exceeded the effect of other representatives of the class of oxicams ($p < 0,05$). The varieties of enantiomeric (mirror) compounds were obtained among the different solvents synthesized with the participation of various solvents N-(2,6-dimethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, which differed in analgesic and anti-inflammatory strength actions. Compound NI-34 had more pronounced analgesic and relatively weak anti-inflammatory properties, which were 64.7 and 22.1 %, respectively. Its mirror polymorph (compound NI-35) was a weak analgesic (this activity was 26.3 %), with more pronounced anti-inflammatory properties (anti-exudative activity was 62.2 %).

In the process of chemical synthesis of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide was found, crystallization of ethyl acetate, meta-xylene, or ortho-xylene provides the formation of three visually completely different types of colorless crystals — long sticks with a square cross-section (form A, compound NI-50), thin chisel-shaped plates (form B, compound NI-51) or elongated blocks without any particular geometric structure and similar to tree branches (form C, compound NI-52), respectively, in which the identity of all parameters of the internal structure was preserved. Screening studies

in carrageenan edema in rats showed that all samples at 20 mg/kg intraperitoneally reduced hyperalgesia and edema of the affected limb, but the degree of anti-inflammatory and analgesic effects was different. The highest activity was shown by compound B. The indicators of its antiphlogistic and analgesic activity were 85.2 and 93.5 %, which were higher than all other compounds and comparison drugs ($p < 0.05$). Compound C was inferior to these effects, and compound A was the least active, but all compounds were superior to comparators in their effects.

Thus, only crystalline forms of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide simultaneously showed pronounced anti-inflammatory and analgesic activities, so namely compounds A, B, and C were selected for further in-depth studies.

In more detail, the analgesic properties of compounds A, B, and C were performed on five models of pain perception ("acetic-acid-induced writhing" in mice, "hot plate", "tail-flick", tail electric stimulation, and diabetic neuropathy in rats). It was found that with intraperitoneal administration, among the three crystalline forms, compound B most effectively eliminated somatic visceral pain (analgesic activity (AA) is 87.5 %), compound C was slightly inferior to it (AA is 76.9 %), while compound A showed the lowest activity (AA is 35.1 %). The trend remains when changing the method of administration to oral: B >> C > A. In studying the effect of crystalline forms of A, B, and C on the central component of the nociceptive response ("hot plate" and "tail-flick"), compound B surpassed others in both routes of administration, but compound A was more effective than compound C. Under these conditions, when changing the intra-abdominal administration to oral administration, all three samples lost approximately 30% of their analgesic activity. Studies on the electrical stimulation of the root of the rat tail allowed us to trace the duration of the analgesic effect of crystalline forms A, B, and C. It was found that compound B has a powerful and rapid analgesic effect but after 2 hours of the experiment begins to decrease markedly. The activity of compound C was less pronounced, although it also reached its maximum at 2 hours with a subsequent gradual decrease. Compound A, in contrast to the other two crystalline polymorphs,

had very low activity in the first hour of the experiment, which then gradually increased and reached its peak only at 4 hours, and this effect persisted longer than other tests samples. The results obtained in the model of neuropathic pain syndrome caused by streptozotocin-induced diabetes in rats confirmed the leadership in the analgesic activity of the crystalline form in the form of rods (compound B).

For the first time, a comparative evaluation of the efficacy and safety of three crystalline modifications of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide was performed. According to the indicator of acute toxicity (LD₅₀) crystalline forms of A, B, and C placed in the following order in case of their oral administration: C < B < A, and according to the indicator of ulcerogenic action (UD₅₀) - B << C < A. The calculation of the safety factor (LD₅₀ / UD₅₀) showed, that the best result was found in compound B (7.99), slightly lower - in compound A (5.88), and the lowest - in compound C (4.97). Compound B showed the best analgesic efficacy (ED₅₀), as its average effective dose in the tail-flick thermal stimulation model was 2.15 ± 0.11 mg/kg, while for compounds C and A - 2.42 ± 0.12 and 3.19 ± 0.16 mg/kg, respectively. Thus, the most promising substance should be considered a crystalline modification of the benzothiazine-3-carboxamide derivative in the form of plates (compound B).

Scientific ideas on the pharmacokinetics of different crystalline forms of biologically active compounds have been expanded. Thus, for the first time, the pharmacokinetic profile of polymorphic forms of benzothiazine-3-carboxamide derivatives was determined by their oral administration in vivo. The concentration of compounds in the blood of mice was determined by the method of high-performance liquid chromatography and the main parameters of pharmacokinetics were calculated. It was found that the absorption constant of compound B is statistically superior to that of compound A by 12.1 %, and of compound C by 20.2 %, and it also has a higher maximum concentration, which is 20.6 % higher than compound A (p < 0.05) and insignificantly higher (p > 0.05) – than compound C. The time of its achievement in compound B was twice as fast as in form A. In addition, compound B has the highest bioavailability (for compound B the parameter

was significantly higher by 12.5 and 2.6 % than that of polymorphic forms A and C), rapid elimination (the elimination constant of compound B was 1.48 times higher than that of compounds A and C), the shortest half-life 34.7-31.6 % less than polymorphic forms A and C, ($p < 0.05$), as well as the largest value of total clearance (18-25 %, more than other compounds). These peculiarities of pharmacokinetics can explain the differences in the pharmacodynamics of these compositions, which in sum allow us to recommend compound B for further research as an anti-inflammatory and analgesic remedy.

New data on the anti-inflammatory activity of compound B in rats have been obtained. It has been shown that N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide in the form of rods (compound B) can reduce all components of the inflammatory reaction - alteration, exudation, and proliferation. Thus, the anti-exudative activity of compound B in the model of toxic pulmonary edema caused by ammonium chloride was 64.0 % and was probably greater than the effect of meloxicam ($p < 0.05$). The antiproliferative property of compound B in the model of "cotton" granuloma in rats was moderately expressed (15.1 %), which, however, did not reach a statistically significant difference compared with the reference drug. A study of compound B and meloxicam action on the alternative component of the inflammatory response (in the model of planar skin wounds) showed that compound B prevailed over meloxicam in its ability to reduce the size of the wound defect on the 5th and 21st days of the experiment ($p < 0.05$). The number of animals in which complete scarring of the planar wound was observed on the 28th day after wounding was 42.8 % in the control group, while in the case of compound B and meloxicam use their numbers were 85.7 and 71.4%, respectively ($p < 0.05$).

A study of antipyretic activity in a rat fever model showed that compound B and meloxicam were likely to reduce animal body temperature, however, at 5 hours after pyrogen administration, compound B was inferior to meloxicam, at 6 hours - almost comparable, and at 7 hours after simulation of the pyrogenic reaction - exceeded the comparison drug ($p < 0,05$).

The model of the chronic autoimmune inflammatory process (adjuvant arthritis) showed that the therapeutic administration of compound B reduced the clinical manifestations of the inflammatory response, counteracted changes in hematological parameters, ESR and white blood cell count compared to untreated animals were 13.3 and 3.92 %, respectively 185 and 216 % in untreated animals), which was comparable to the effect of meloxicam. A study of biochemical markers of the inflammatory process in the internal organs of rats with adjuvant arthritis on the example of gastric mucosa showed that the use of compound B significantly reduced inflammatory-induced elevation of IL-1 β and Pg H synthase activity (1.27 and 1.51 times), compared with untreated animals, $p < 0,05$). In addition, administration of compound B to animals reduced the overproduction of proinflammatory mediators - nitrogen monoxide (nitrate and nitrite content and total NO synthase activity decreased by 1.21 and 1.34 times, respectively), and hydrogen sulfide (H_2S levels and CSE activity - decreased in 1.18 and 1.31 times, respectively ($p < 0.05$), for untreated animals), which was statistically more significant than with meloxicam ($p < 0.05$). Therefore, the anti-inflammatory effect of the carboxamide derivative was statistically superior to the comparison drug.

Thus, the new original derivative of N- (4-trifluoromethylphenyl) -4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2 λ^6 ,1-benzothiazine-3-carboxamide in the form of a crystalline form - rod (compound B) shows a pronounced analgesic, anti-inflammatory, moderate antiproliferative, anti-alternative, and antipyretic action, and low gastrotoxicity gives grounds to recommend this compound for further preclinical studies as a potential non-steroidal anti-inflammatory drug.

Key words: 4-R-2,2-dioxo-1*H*-2 λ^6 ,1-benzothiazine-3-carboxylic acids derivatives, crystal structure, polymorphic modifications, analgesic, anti-inflammatory action, ulcerogenic action, acute toxicity, pharmacokinetics, hydrogen sulfide, NO- synthase, Pg H-synthase, IL- β , rats.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.

1. Bondarenko P. S. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / P. S. Bondarenko, N. I. Voloshchuk, V. B. Larionov, H. O. Fedoseenko // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51. DOI: <https://doi.org/10.31393/bba41-2020-08>

2. Бондаренко П. С. Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 27-32. DOI: [10.31393/reports-vnmedical-2021-25\(1\)-05](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2021-25(1)-05).

3. Бондаренко П. С. Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту / П. С. Бондаренко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15 №3. - С. 81-88 <https://doi.org/10.33250/15.03.181>

4. Bondarenko P. S. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Activity of Ethyl 4-Methyl-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate Polymorphic Forms / I. V. Ukrainets, A. A. Burian, V. N. Baumer, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, I. A. Tugaibei, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // Sci Pharm. – 2018. – Vol. 86(2). - P. 21. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm.86020021>. (Last accessed: 02.05.2021).

5. Bondarenko P. S. Biological properties of two enantiomorphic forms of N-(2,6-dimethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1*H*-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, a structural analogue of piroxicam / S. V. Shishkina, I. V. Ukrainets, O. V. Vashchenko, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko, L. A. Petrushova, G. Sim //

Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry. - 2020. – Vol.76 (Pt 1) – P. 69-74. doi: 10.1107/S2053229619016450.

6. Bondarenko P. S. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, G. Sim// Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001> (Last accessed: 02.05.2021).

7. Пат. № 118642 Україна UA C2 МПК C07D 279/02 (2006.01) A61K 31/5415 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01) Моноклінна кристалічна модифікація етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату, яка виявляє протизапальну та анальгетичну активність / І. В. Українець, Г. О. Бур'ян, С. В. Шишкіна, Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко; заявник і патентовласник Українець Ігор Васильович, вул. Кричевського, 40, кв. 11, м. Харків, 61027 (UA); заявл. 20.06.2018; опубл. 11.02.2019, Бюл.№ 3.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

8. Бондаренко П. С. Анальгетична активність різних кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко, І. В. Українець, Л. О. Петрушова // Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 22.

9. Бондаренко П. С. Поліморфні модифікації етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату та їх властивості / Г. О. Бур'ян, І. В. Українець, Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (12-13 квітня 2018 р., м. Харків). - Харків, 2018. - С. 22-23.

10. Бондаренко П. С. Дослідження гострої токсичності та ульцерогенної дії різних кристалічних модифікацій N-г-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2018» -18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця). - Вінниця, 2018. - С. 438.

11. Bondarenko P. S. Crystalline forms of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, their toxicity and ulcerogenic effect / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // 8th International Conference “Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles” in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (12-16 November, 2018 Kharkiv, Ukraine). - CNCH-2018. Book of Abstracts. - Kharkiv, 2018. - P. 146.

12. Бондаренко П. С. Дослідження анагетичної та протизапальної активності N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в експерименті / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук, О. М. Денисюк // Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). – Вінниця, 2019. - С 37-39.

13. Бондаренко, П. С. Експериментальне дослідження антиексудативної дії N-(4-трифлюорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XVIII Наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021» (15-17 квітня 2021 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2021. - С. 492.

ЗМІСТ

ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 ПОЛІМОРФІЗМ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ЙОГО РОЛЬ В СТВОРЕННІ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	29
1.1. Поліморфізм активних фармацевтичних субстанцій, його види та значення для клінічної медицини	29
1.2. Структурні модифікації кристалів нестероїдних протизапальних засобів.....	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	49
2.1. Характеристика тест-зразків.....	49
2.2. Характеристика лабораторних тварин	51
2.3. Експериментальні моделі оцінки фармакологічних ефектів.....	54
2.4. Біохімічні методи дослідження.....	64
2.5. Фармакокінетичні методи дослідження.....	66
2.6. Методи статистичної обробки цифрового матеріалу.....	70
РОЗДІЛ 3 СКРИНІНГ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 4-R-2,2-ДІОКСО-1H-2λ ⁶ ,1-БЕНЗОТІАЗИН-3- КАРБОНОВИХ КИСЛОТ.....	72
3.1. Оцінка протизапальної та аналгетичної активності похідних 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3- карбоксилату.....	73
3.2. Оцінка знеболюючої та протизапальної активності поліморфних модифікацій N-(2,6-діметилфеніл)-4- гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3- карбоксамідів	76
3.3. Оцінка знеболюючої та протизапальної активності похідних N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2- діоксо-1H-2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.....	79

РОЗДІЛ 4 ПОГЛИБЛЕНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛГЕТИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІМОРФНИХ ФОРМ N-(4-ТРИФТОРМЕТИЛФЕНІЛ)-4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДУ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ БОЛЬОВОЇ ПЕРЦЕПЦІЇ.....	85
4.1. Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі вісцерального больового синдрому.....	85
4.2 Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі термічного подразнення.....	87
4.3 Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі нейропатичного больового синдрому.....	95
4.4 Дослідження гострої токсичності кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.....	101
4.5 Дослідження ульцерогенного потенціалу кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.....	103
4.6 Дослідження середньої ефективної дози за аналгетичною активністю кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.....	105

РОЗДІЛ 5	ВИЗНАЧЕННЯ	ОСНОВНИХ	ПАРАМЕТРІВ	
	ФАРМАКОКІНЕТИКИ	ПОЛІМОРФНИХ	МОДИФІКАЦІЙ,	
	ЩО ДОСЛІДЖУЮТЬСЯ	(СПОЛУК А, В та С).....		113
5.1	Підбір умов кількісного визначення	<i>N</i> -(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.....		113
5.2	Фармакокінетика	<i>N</i> -(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у сироватці крові щурів після внутрішньовенного та перорального введення.....		116
РОЗДІЛ 6	ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ	ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ТА	ЖАРОЗНИЖУЮЧОЇ ДІЇ	СПОЛУКИ-ЛІДЕРА
	КРИСТАЛІЧНИХ	ПОЛІМОРФІВ	<i>N</i> -(ТРИФТОРМЕТИЛФЕНІЛ)-4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДУ	(СПОЛУКИ В).....
				127
6.1	Визначення умовно ефективних доз за протизапальною активністю для проведення фармакодинамічних досліджень.....			128
6.2	Вплив поліморфної модифікації похідного <i>N</i> -(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на загоювання ранових дефектів шкіри у щурів.....			129
6.3	Дослідження протизапальної поліморфної модифікації похідного <i>N</i> -(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В на) моделі токсичного набряку легень.....			129
6.4	Дослідження антипроліферативної активності поліморфної модифікації похідного <i>N</i> -			

	(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду сполуки В на моделі ватної гранульоми у щурів.....	131
6.5	Дослідження фармакодинаміки сполуки В на моделі хронічного запального процесу (ад'ювантного артриту) у щурів.....	132
6.5.1.	Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на клінічні та гематологічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту.....	133
6.5.2.	Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту.....	138
6.6	Дослідження жарознижуючої дії поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В)	140
РОЗДІЛ 7	АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	144
	ВИСНОВКИ.....	161
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	164
	ДОДАТКИ.....	193

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- АА – аналгетична активність
- АдА – ад'ювантний артрит
- АЕА – антиексудативна активність;
- в/оч – внутрішньочеревне введення;
- в/шл – внутрішньошлункове введення;
- в/в – внутрішньовенне введення;
- ВІ – виразковий індекс;
- ЛП – латентний період.
- НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби;
- ПБЧ – поріг больової чутливості;
- ПГ – простагландини;
- СОШ – слизова оболонка шлунка;
- ЦОГ – циклооксигеназа;
- ШОЕ – швидкість осідання еритроцитів
- ЦГЛ - цистатіонін-γ-ліаза
- ED₅₀ – середня ефективна доза
- H₂S – гідроген сульфід;
- IL – інтерлейкін
- LD₅₀ – середньосмертельна доза
- NO – нітроген монооксид;
- Pg - простагландин
- індекс ульцерогенності

ВСТУП

Актуальність теми. Явище поліморфізму (тобто здатність існувати в кількох кристалічних модифікаціях) є доволі розповсюдженим серед багатьох речовин, в тому числі серед біологічно активних субстанцій, і займає одне з провідних місць в процесі створення лікарських засобів, фармацевтичної розробки лікарської форми. Станом на сьогоднішній день явище поліморфізму виявлено для більше ніж 85 % фармацевтичних субстанцій і процес відповідних досліджень триває [15]. Поступове накопичення експериментального та клінічного матеріалу сприяло формуванню чіткого розуміння того, що поліморфізм є надзвичайно серйозною і важливою проблемою, що вимагає пильної уваги та всебічного вивчення. Як виявилось, різні кристалічні модифікації здатні кардинально змінювати (і не завжди на краще) технологічні, фармацевтичні чи фармакологічні характеристики відомих лікарських препаратів. Звідси стає зрозумілим прагнення розробників нових препаратів одержати та вивчити якомога більшу кількість модифікацій запропонованої ними біологічно активної субстанції ще до її виходу на фармацевтичний ринок [65, 108, 117, 127, 130, 165, 179].

Больовий синдром та його терапевтична корекція наразі є однією з провідних проблем сучасної медицини [30]. Наявні на сьогоднішній день анальгетики не завжди відповідають вимогам високої ефективності та безпечності [44, 50], у зв'язку з чим пошук нових сполук, які мають високу анальгетичну активність, є досить актуальним.

Завдяки ефективності зменшення болю та запалення, нестероїдні протизапальні препарати (НПЗЗ) є одними з найпопулярніших ліків, що підтверджує їх позицію у списку основних лікарських засобів ВООЗ [68, 187]. Однак дані численних плацебо-контрольованих досліджень та метааналізів демонструють несприятливі поліорганні впливи НПЗЗ (в тому числі серцево-судинні, печінкові, ниркові, церебральні та легеневі ускладнення) [68, 131].

Пошук та розробка структур-лідерів, їх наступна оптимізація та створення на їх основі нових ефективних та безпечних лікарських засобів для усунення болю (так званих «rain killers»), наразі залишається актуальною проблемою фармацевтичної та медичної науки. В якості ефективного та плідного шляху в цьому напрямку є концепція біоізостеричної заміни [24], що є потужним інструментом для цілеспрямованого синтезу біологічно активних речовин із необхідною фармакологічною активністю, а також із покращеними характеристиками в порівнянні з структурами-прототипами.

Похідні карбонових кислот – відомий клас хімічних сполук, серед представників якого є НПЗЗ. Експериментальні дослідження найближчих структурних аналогів піроксикаму [4-гідрокси-2-метил-N-(піридин-2-іл)-2*H*-бензо[*e*][1,2]тіазин-3-карбоксаміду 1,1-діоксид], 2,1-бензотіазинів довели, що вони володіють виразними аналгетичними, протизапальними та діуретичними властивостями [207, 227, 228, 230]. Аналіз кристалічної будови показав, що вони є дуже привабливими об'єктами для поліморфного скринінгу. Ці сполуки здатні утворювати кристалічні модифікації з різноманітними біологічними властивостями [207, 227, 228, 230].

Серед похідних 4-*R*-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот, синтезованих на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом д.хім.н., професора І. В. Українця, виявлені сполуки різної поліморфної будови. Дослідженню їх фармакологічних властивостей присвячена дана робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках планових НДР Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України: «Пошук та вивчення біологічно активних речовин серед природних сполук та продуктів хімічного синтезу» (№ держреєстрації 0118U001903 (2018-2022)). Дисертант є співвиконавцем зазначеної теми.

Мета дослідження: на підставі фармакодинамічних та фармакокінетичних досліджень кристалічних модифікацій похідних 4-*R*-2,2-

діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот виявити високоефективну та безпечну сполуку з метою розробки на її основі лікарського засобу із аналгетичними та протизапальними властивостями.

В зв'язку з цим планується вирішити такі **завдання**:

1. Провести скринінг аналгетичної та протизапальної активностей поліморфних модифікацій похідних похідних 4-*R*-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот

2. Оцінити аналгетичну активність найбільш перспективних сполук за внутрішньочеревного та внутрішньошлункового введенні на різних моделях больових синдромів

3. Порівняти гостру токсичність, ефективність та ульцерогенність поліморфних сполук *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.

4. Дослідити основні параметри фармакокінетики кристалічних модифікацій *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за їх внутрішньовенного та внутрішньошлункового введення.

5. Здійснити поглиблені дослідження протизапальної та жарознижуючої дії сполуки-лідера серед кристалічних модифікацій *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В).

Об'єкт дослідження: зв'язок між структурним поліморфізмом, фармакодинамікою і фармакокінетикою похідних бензотіазин-3-карбонових кислот.

Предмет дослідження: протизапальна, аналгетична активності та основні параметри фармакокінетики різних кристалічних модифікацій похідних 4-*R*-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.

Методи дослідження: фармакологічні (моделювання больових синдромів різного генезу, гострого та хронічного запального процесу, лихоманки, діабетичної полінейропатії, тощо), біохімічні, імуноферментні (маркери запалення, вміст нітратів та нітритів, сумарна активність NO-синтази,

вміст гідроген сульфідів та його ферменту-продуценту), фармакокінетичні, статистичні (програми Excel, Statistics 6.0, дисперсійний аналіз ANOVA, критерій Манна-Уїтні та Крускал-Уоліса).

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані результати доповнюють наукові дані щодо можливості розробки нових потенційних анальгетичних та протизапальних засобів серед похідних 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти. Вперше виявлено, що гетерогенна кристалізація етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату з етанолу призводить до утворення моноклінної поліморфної форми з потужною анальгетичною та антиексудативною активностями (90,6 та 85,8 %, відповідно), тоді як гомогенна кристалізація - ромбічної форми із помірно знеболюючою і слабкою протизапальною діями (Пат. України № 118642). Серед синтезованих за участі різних розчинників N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів отримано енантіоморфні (дзеркальні) різновиди, які відрізнялись силою анальгетичної та протизапальною дії.

Вперше в процесі хімічного синтезу N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду виявлено, що кристалізація із етилацетату, мета-ксилолу або орто-ксилолу забезпечує утворення трьох видів кристалів з різним габітусом - довгих паличок квадратного перерізу (форма А, сполука NI-50), тонких долотоподібних пластин (форма В, сполука NI-51) або подовжених блоків (форма С, сполука NI-52) в яких зберігалась ідентичність всіх параметрів внутрішньої структури. Найбільшу протизапальну та анальгетичну активність, вищу за всі інші сполуки та за препарати порівняння показала сполука В, сполука С поступалась силі цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі сполуки перевершували за своїми ефектами препарати порівняння.

Вперше досліджено анальгетичні властивості сполук А, В та С на різних моделях больової перцепції («оцтово-кислі корчі» у мишей, «гаряча пластинка», «tail-flick»), електричне подразнення кореня хвоста та діабетична

полінейропатія у щурів). Встановлено, що за внутрішньочеревного (в/оч) введення, серед трьох кристалічних форм, сполука В найбільш ефективно усувала больовий синдром, сполука С незначно поступалась їй, в той час як сполука А виявилась найменш ефективною. При зміні способу введення на пероральний, тенденція залишалась: $V \gg C > A$.

Вперше проведена порівняльна оцінка ефективності та безпечності трьох кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду. За показником гострої токсичності (LD₅₀) кристалічні форми А, В і С за їх перорального введення розташувались: $C < B < A$, а за показником ульцерогенності (UD₅₀) - $B \ll C < A$. За ефективністю анальгетичної дії найкращі результати показала сполука В, оскільки її середня ефективна доза на моделі «tail flick» становила $2,15 \pm 0,11$ мг/кг, тоді як для сполук С і А – $2,42 \pm 0,12$ та $3,19 \pm 0,16$ мг/кг, відповідно.

Розширено наукові уявлення щодо особливостей фармакокінетики різних кристалічних форм біологічно активних сполук за їх перорального введення *in vivo*. Виявлено, що сполука В відрізняється більшою константою абсорбції, показником максимальної концентрації та часу її досягнення, а також найвищим показником біодоступності та швидкістю елімінації.

Отримано нові дані про протизапальні та антипіретичні властивості сполуки-лідера (форма В). Показано, що похідне N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду пригнічує всі компоненти запальної реакції (альтерацію, проліферацію та ексудацію). При цьому за антиальтеративним ефектом на моделі площинних ран шкіри та антиексудативним ефектом на моделі токсичного набряку легень сполука В статистично переважає мелоксикам ($p < 0,05$), а за антипроліферативною активністю (на моделі «ватної гранульоми») - співставляється з препаратом порівняння. На моделі молочної лихоманки у щурів показано, що сполука В поступається мелоксикаму на перших годинах після введення пірогену, а в

подальшому – сягає співставних рівнів та переважає мелоксикам на пізніх етапах дослідження ($p < 0,05$).

Вперше на моделі хронічного автоімунного запального процесу (ад'ювантного артриту) доведено лікувальну дію сполуки В, про що свідчить зменшення клінічних та гематологічних ознак запальної реакції. Дослідження біохімічних маркерів запального процесу на прикладі слизової оболонки шлунка показало, що застосування сполуки В вірогідно зменшувало викликані запальним процесом елевацію рівня ІЛ-1 β та активності РgН-синтази (в 1,27 та 1,51 рази), порівняно з нелікованими тваринами, ($p < 0,05$), гіперпродукцію прозапальних медіаторів – нітроген монооксиду та гідроген сульфїду, що було статистично більш значущим, ніж за умов введення мелоксикаму ($p < 0,05$).

Практичне значення одержаних результатів.

Результати проведеного дослідження розширяють наші уявлення про залежність фармакологічної дії та фармакокінетики біологічно активних сполук від їх кристалічної будови.

Нове оригінальне похідне N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2 λ^6 ,1-бензотіазин-3-карбоксамїду у вигляді кристалічної форми – палички (сполука В) виявляє виразну аналгетичну, протизапальну, помірну антипроліферативну, антиальтеративну та антипіретичну дію, а низька гастротоксичність її дає підстави рекомендувати цю сполуку для подальших доклінічних досліджень як потенційного нестероїдного протизапального засобу.

Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри фармакології, кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології ВНМУ імені М. І. Пирогова МОЗ України, кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету, кафедри фармакології Дніпровського державного медичного університету, кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету, кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, науковий процес лабораторії фізико-

хімічної фармакології фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України, відділу медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведений аналіз літератури за темою дисертації, під керівництвом наукового керівника визначив мету, завдання роботи, здійснив патентно-інформаційний пошук та запланував тему дослідження. Самостійно засвоїв виконання необхідних експериментальних методів оцінки протизапальної та анальгетичної активності, гострої токсичності та інших методик, використаних в роботі. За безпосередньої участі автора були проведені фармакінетичні та біохімічні дослідження, автор виконав статистичну обробку цифрових даних, підготував розділи дисертації; аналіз та узагальнення отриманих результатів та висновки з роботи підготовлені дисертантом у співпраці з науковим керівником. Автор не запозичував ідей та/або результатів роботи інших співавторів в сумісних публікаціях.

Автор висловлює подяку за професору кафедри фармацевтичної хімії НФаУ д.хім. І.В. Українцю за створення та підготовку до дослідження тест-зразків; к.мед.наук, доценту кафедри фармакології ВНМУ імені М. І. Пирогова І. В. Тарану при проведенні фармакологічних досліджень, д.мед.н., професору кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ імені М. І. Пирогова А. В. Мельнику при проведенні біохімічних досліджень; а також д.біол. наук, старшому науковому співробітнику Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України, завідувачу лабораторії фізико-хімічної фармакології В. Б. Ларіонову за допомогу в проведенні та інтерпретації результатів фармакокінетичних досліджень.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційного дослідження оприлюднено та доповідались на V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченій 80-річчю з дня народження

доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (12-13 квітня 2018 р., м. Харків); 8th International Conference «Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles» in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (12-16 November, 2018 Kharkiv, Ukraine); XV Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку - 2018» (Вінниця, 2018); X Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.), XVIII Науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021» (15-17 квітня 2021 р., м. Вінниця).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць (з них 4 одноосібні). Серед них 6 статей опубліковано в наукових фахових журналах (3 входять до міжнародних наукометричних баз Scopus та Web of Science, 1 стаття опубліковані в закордонному періодичному фаховому виданні, 2 статті в фахових періодичних виданнях України, 1 патент України, 6 тез доповідей на наукових форумах.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 203 сторінках друкованого тексту (основна текстова частина - 161 сторінка) і включає анотацію, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 4 розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних літературних джерел, що включає 255 найменувань (52 кирилицею, 203 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 30 рисунками та 30 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ПОЛІМОРФІЗМ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ТА ЙОГО РОЛЬ В
СТВОРЕННІ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)1.1 Поліморфізм активних фармацевтичних субстанцій, його види та
значення для клінічної медицини

На сьогоднішній день спостерігається дуже динамічний розвиток фармацевтичного ринку. Враховуючи те, що більшість препаратів представлена не тільки брендами (створені на основі вперше отриманої активної лікарської субстанції та запатентовані), а й дженериками (непатентований препарат, відтворений з оригінального) постає питання фармацевтичної та біологічної еквівалентності [52, 103, 122]. Під фармацевтичною еквівалентністю розуміють, що препарати містять таку ж, як у бренда активну фармакологічну субстанцію в однаковій кількості і лікарській формі, при цьому технологія виготовлення та склад додаткових речовин може відрізнятися. Біологічна еквівалентність вказує на те, що препарати володіють подібною біодоступністю (швидкість та ступінь всмоктування лікарської речовини в системний кровотік) [23, 59, 172]. Їх необхідно враховувати при створенні нових лікарських засобів удосконаленні вже існуючих.

Оскільки основна маса препаратів, а також більшість сполук, які досліджуються в якості нових фармакологічних субстанцій, представлена у вигляді твердих лікарських форм, велике значення для фармацевтичної і біологічної еквівалентності має структурна однаковість активної речовини, оскільки відомо, що різне просторове (і не тільки просторове) розташування атомів у кристалі може призводити до зміни не тільки фізико-хімічних, а й фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей лікарських засобів. Найвагоміший вплив в даному випадку мають такі явища як поліморфізм і оптична ізомерія [4, 144, 205, 244, 247].

Отже, всі тверді лікарські речовини можуть перебувати в двох модифікаціях - аморфній або кристалічній [112].

1. Аморфні – це форми без регулярної кристалічної структури. Вони включають [114, 140]:

- класичні аморфні лікарські речовини;
- аморфні тверді дисперсії - суміш двох або більше компонентів у твердому стані, зазвичай складаються з аморфної фармакологічно активної речовини, диспергованої в гідрофільній/амфіфільній аморфній полімерній матриці (лікарська речовина + полімер);
- коаморфні системи (лікарська речовина + невелика молекула, наприклад амінокислоти). В останні роки коаморфні системи використовують як альтернативу аморфним твердим дисперсіям для покращення розчинення та біодоступності погано розчинних кристалічних лікарських субстанцій [182].

2. Кристалічні (поліморфні і псевдополіморфні) – це форми з певним розташуванням атомів у кристалічній решітці, які поділяються на [124, 164]:

- однокомпонентні, які представлені поліморфами та оптичними ізомерами;
- багатоконпонентні, які можуть бути стехіометричними та нестехіометричними, включаючи псевдополіморфи (гідрати, сольвати), солі, тверді розчини та різні види кокристалів (молекулярні, іонні, та їх сольватно-гідратні форми).

Більшість лікарських речовин є кристалічними системами, і лише незначна кількість представлені аморфними формами. Деякі лікарські засоби, представлені в кількох формах, наприклад, статини [143]. Також відомий протимікробний препарат хлорамфенікол пальмітат також має 3 кристалічних та 1 аморфну, при цьому остання не володіє біологічною активністю. Інший протимікробний засіб тетрациклін теж має 4 поліморфа, при цьому у нього найактивніша саме аморфна модифікація [51].

Як правило, кристалічні структури стабілізуються внутрішньомолекулярними та/або міжмолекулярними взаємодіями, такими як ван-дер-ваальсові зв'язки, водневі зв'язки, електростатичні взаємодії та ін. [66,

109]. Кристалічні структури речовин визначаються методом рентгеноструктурного аналізу та описуються комбінацією семи кристалографічних сингоній (триклінна, моноклінна, ромбічна, гексагональна, тригональна, тетрагональна, кубічна), параметрами кристалічного осередку (a , b , c – α , β , γ) та просторовою групою симетрії. Найчастіше зустрічаються речовини моноклінної системи 40%, дещо рідше ромбічної 28%, по 10% представлені триклінною і кубічною формами, менше гексагональної (7 %) та тетрагональної (5 %) [25, 48].

Тип кристалічної системи має суттєвий вплив на різноманітні характеристики лікарського засобу, а також на процес надання йому певної лікарської форми [25, 48]:

- на здатність до пресування і таблетування, так відомо, що лише речовини, які мають кубічну систему, безпосередньо пресуються у таблетки (прямим пресуванням) без грануляції та допоміжних речовин, таких як, наприклад, калію або натрію хлорид;
- на гідрофільність або ліофільність лікарського засобу, які безпосередньо залежать від структури та в подальшому визначають форми випуску та шлях введення препарату;
- на гігроскопічність субстанції, що в свою чергу обумовлює особливості виготовлення та зберігання (наприклад, якщо речовина сильно гігроскопічна, то це вимагає введення гідростимуляторів);
- на електричні характеристики кристала, які можуть мати суттєве значення при їх обробці та пресуванні, так, відомо, що всі асиметричні кристали (містять полярні групи) при механічному впливі (наприклад, пресування в таблетки) схильні до поляризації, а для неполярних речовин такий ефект не притаманний - поверхневі заряди не утворюються.

Від структури кристалічних ґраток та умов зростання частинок у процесі кристалізації залежить форма та розмір часточок у порошка, що також обумовлює ті чи інші властивості субстанції [25]. Більшість лікарських засобів має анізодіаметричні часточки, тобто несиметричні або різноосні, наприклад,

подовжені (палички, голочки та ін.) та пластинчасті (пластинки, лусочки та ін.). Деякі тверді порошкоподібні речовини мають ізодіаметричні часточки, тобто симетричні або рівноосні (глибки, багатогранники, кулясті утворення та ін.). Найчастіше зустрічаються палички, які характеризуються гарною ущільнюваністю та достатньою пористістю (анальгін, норсульфазол, та ін.).

На відміну від кристалічних модифікацій, аморфні форми лікарських засобів не мають точних фізичних характеристик, зокрема, характеризуються температурою склування, яка залежить від умов утворення та зберігання [248]. Проте аморфи характеризуються більш високою розчинністю та швидкістю розчинення, тоді як кристалічні форми демонструють більшу чистоту та стабільність при зберіганні [143]. Вибір між кристалічною чи аморфною формою препарату надзвичайно важливий для синтезу лікарської речовини, виготовлення лікарських засобів та, в кінцевому рахунку, для забезпечення ефективної та безпечної фармакотерапії.

Не менш важливим є врахування такого явища, як поліморфізм, який представляє собою здатність твердих речовин знаходитися в кількох формах (поліморфні модифікації), які мають різну кристалічну структуру і властивості (розчинність, швидкість розчинення, кінетика нуклеації та зростання, біодоступність, морфологія та простота виділення) при незмінному хімічному складі [81, 254]. Він притаманний більше, ніж 85 % активних фармацевтичних субстанцій і займає провідне місце в створенні лікарських засобів [51, 88].

Вперше поліморфізм описав німецький хімік М. Г. Клапорт у 1788 р., а для лікарського засобу вперше він був описаний для сульфаніlamіду Ван Зипом в 1938 році [12]. Сьогодні цей феномен зареєстрований для багатьох лікарських засобів, наприклад, для майже 25% гормонів, 60% барбітуратів і 70% сульфамідів [222]. Найчастіше зустрічається 2-3 поліморфні модифікації. Але існують сполуки з більшою кількістю поліморфних модифікацій: для тетракаїну – 4, тестостерону і фенобарбіталу по 6, а для аторвастатину - 19 [16, 51].

Для отримання поліморфних форм лікарських засобів використовуються різноманітні методи, включаючи одно- та багатосольвентну кристалізацію, ліофілізацію, сублімацію, сушіння розпиленням, сублімацію, подрібнення тощо [217].

Поліморфізм пояснюється спроможністю атомів однієї речовини утворювати різні варіанти стійких кристалічних решіток. Поліморфні модифікації прийнято позначати як α , β , γ і т. д. Відмінності між кристалічними структурами поліморфів лікарських засобів в разі «жорстких» молекул пояснюється різним укладанням (наприклад, для парацетамолу та сульфаніламідру) та/або для «гнучких» молекул - різною конформацією (пробукол). В залежності від цього всі випадки поліморфізму органічних речовин ділять на такі типи [149]:

- поліморфи мають практично однакову будову та укладені за однаковим законом;
- молекули з однаковою будовою, але укладені по-різному;
- будова молекул дещо відрізняється, але зберігається мотив їх укладання;
- молекули з різною будовою укладені за різними законами.

При цьому поліморфні модифікації можуть за певних умов (температура та тиск) переходити одна в одну. Такий тип носить назву енантіотропії. А деякі поліморфи не можуть переходити одна в одну і цей тип називається монотропія. Перехід однієї форми в іншу відбувається за зазначених вище умов поступово. Наприклад, метастабільні модифікації, легко утворюють гомогенні системи, наприклад, розчини, які в процесі зберігання переходять у більш важко розчинні стабільні модифікації, які, в свою чергу, утворюють гетерогенні системи (суспензії). Це може відбувати у мікстурах, розчинах, мазах. Кристали, що при цьому випали, призводять до браку продукції або появи нових властивостей. Крім того, перехід у стабільну форму призводить до зменшення біодоступності та зниження ефективності лікарського засобу. Одночасно може існувати не більш трьох модифікацій [51].

Відмінність поліморфів в кристалічній структурі обумовлює різницю лікарських речовин за різними показниками, а саме [16, 91, 145]:

- морфологія кристала - кристалічна структура, розмір граней, площа поверхні, прозорість, колір;
- механічні властивості - твердість, міцність на розрив, пористість, пресування, сипкість, змішуваність, адгезивні властивості;
- фізичні та термодинамічні властивості - щільність, електрична та термічна провідність, термодинамічна активність, теплоємність, температура плавлення, поверхневий натяг;
- кінетичні властивості – швидкість розчинення, взаємодії, деградації;
- хімічні властивості - гігроскопічність, розчинність, інертність/реакційність, стабільність;
- біологічні властивості - відмінність у біологічній активності.

Відомо, що фізико-хімічні характеристики кристалів визначають фармакотехнологічні та фармакокінетичні характеристики лікарських речовин, такі як здатність до пресування, гігроскопічність, хімічна стабільність та біодоступність, яка в свою чергу може визначати фармакологічну активність того чи іншого лікарського засобу [113, 114, 218]. Наприклад, кубічні кристали парацетамолу пресуються краще, ніж голчасті. Це можна пояснити їх легким перегрупуванням, виникненням кращого контакту та міцніших зв'язків. Відмінність у гігроскопічності може бути проілюстрована на прикладі леокаїну та тетракаїну, для яких втрата в масі при висушуванні становить до 3,5% і до 0,5% відповідно. Стабільність лікарського засобу при його зберіганні також може мінятися внаслідок поліморфізму. Наприклад, гомогенні лікарські форми можуть утворювати осад або перетворюватись в суспензії - гетерогенні системи, що призводить до появи небажаних наслідків [4, 15, 144, 205, 244, 247].

Відмінність у фізико-хімічних властивостях поліморфів може впливати на їх біодоступність. Це є дуже важливим, оскільки, згідно літературних даних, близько 90 % препаратів, що розробляються, і 40 % схвалених існуючих

лікв класифіковані як такі, що мають погану розчинність у воді та обмежену біодоступність при пероральному застосуванні через повільне і неповне розчинення препарату та повільне всмоктування у шлунково-кишковому тракті [198]. Як правило, менш стабільні полімерні модифікації (метастабільні) лікарських речовин мають кращу розчинність, більш високу здатність до абсорбції та більш високу біодоступність. Наприклад, рибофлавін має як стабільну фракцію, так і метастабільну. При цьому в 1 л дистильованої води перша розчиняється у кількості 60 мг, друга – 1200 мг і її біодоступність буде в рази вища. Вище зазначалося, що хлорамфеніколу пальмітат може перебувати у чотирьох поліморфних формах, з яких три – кристалічні (А, В, С) і одна аморфна. Найбільш стабільною є форма А, а найбільш активною – форма В. Суспензія цього препарату, яка складається з останньої забезпечує суттєво вищу концентрацію речовини, ніж аналогічна, яка містить форму А, оскільки стабільні форми мають меншу розчинність і, відповідно, меншу біодоступність [5]. Аналогічне явище характерне для ацетилсаліцилової кислоти, норсульфазолу та ін.

Поліморфи відрізняють також тривалістю дії. Наприклад, аморфний цинк-інсулін діє швидко і недовго, кристалічний всмоктується значно повільніше. Поєднання в ін'єкції обох форм забезпечує збалансоване надходження гормону в організм [110].

Поліморфізм впливає на безпечність лікарського засобу, наприклад, токсичність тетракаїну майже втричі перевищує токсичність його поліморфної β -форми, яка також набагато рідше викликає алергічні реакції. На основі цієї форми був розроблений новий місцевоанестезуючий засіб з назвою леокаїн [12, 32].

Поліморфні зміни лікарських засобів можуть бути причиною швидкої інактивації препаратів, зміни фізичних параметрів готових лікарських засобів, хімічної несумісності інгредієнтів в одній і тій самій лікарській формі [78]. Враховуючи такий вплив поліморфізму на властивості лікарських засобів в деяких країнах тести на поліморфізм включені до обов'язкових вимог

контролю за всіма етапами синтезу, застосування та зберігання нових лікарських засобів, затверджено набір методик його виявлення та вивчення. [12, 42, 86, 100].

Одним із варіантів поліморфізму можна вважати явище хіральності (оптичної ізомерії) як фундаментальної якості біологічних систем – здатність мати своє дзеркальне відображення (енантіомер). Лікарські речовини можуть існувати у вигляді оптичних ізомерів з однаковим атомарним складом та різним просторовим розташуванням. Так, на сьогоднішній день на фармацевтичному ринку приблизно 50% ліків є хіральною, і з них приблизно 50% є сумішами енантіомерів [137]. Хіральність у ліках найчастіше виникає від атома вуглецю, приєднаного до 4 різних груп, але можуть бути й інші джерела хіральності. Абсолютна конфігурація в хіральному центрі позначається як R (походить від латинського *rectus* і означає праворуч або за годинниковою стрілкою) або S (від латинського *sinister* «ліворуч» або проти годинникової стрілки), щоб описати 3-вимірну структуру молекули [169]. Хіральні молекули називають оптично активними, тому що вони по різному взаємодіють із поляризованим світлом. Якщо препарат складається з рівних кількостей дзеркальних ізомерів (енантіомерів), його називають рацемічним, якщо тільки з одного ізомера - оптично (енантіомерно) чистим. На сьогоднішній день на фармацевтичному ринку є достатня кількість ліво- або правобертальних енантіомерів різних лікарських засобів: левоцетиризин, декскетопрофен, дексипропрофен, левофлоксацин та ін. [99, 121, 138].

Добре відомо, що енантіомери хірально активних речовин відрізняються за фармакокінетичними, фармакодинамічними, метаболічними та токсичними властивостями [166, 208]. Цей факт, а також швидкий розвиток фармацевтичних технологій сприяє надходженню на ринок нових енантіомерно чистих хірально препаратів, а також удосконалити в енантіомерно чистій формі вже відомі, які раніше використовувалися як рацемати [79, 169]. Деякі препарати пропонуються як рацемічні, так і енантіомерно чисті. Останні є більш дорогими через значні терапевтичні

переваги – більшу терапевтичну ефективність, меншу токсичність та більш селективний фармакодинамічний профіль [126].

Доведено, що оптично активна лікарська речовина та її дзеркальний ізомер можуть значно відрізнятися за фармакологічною активністю, оскільки взаємодія активної речовини з рецепторами, іонними каналами та ін. визначається саме просторовою структурою субстанції і мішені. Наприклад, гіпоглікемічний препарат гліміпред може існувати у вигляді транс- і цис-форм. При цьому перша форма володіє виразною гіпоглікемічною дією, а друга – високотоксична. Деякі барбітурати в одній з форм виявляють седативну дію, а їх енантіомери можуть викликати судоми; один енантіомер синтетичного аналогу морфіну є потужним анальгетиком, а інший виявляє сильну протикашльову дію; S-енантіомер амлодипіну має в 1000 разів більшу здатність блокувати кальцієві канали L-типу, ніж з R(+)-ізомер; R-ізомер бронходилататора протеренола в 50 разів активніший за його S-ізомер; лівообертальний ізомер левоміцетину в 2 рази активніший за синтоміцин, який є рацематом, лівообертальний ізомер пропилнорадреналіну в 800 разів активніший за його правообертальний ізомер [1, 4, 42, 191]. Тому застосування лікарської речовини у вигляді чистого більш активного ізомеру замість рацемічної суміші може забезпечити використання значно меншої дози, що, в свою чергу, може суттєво зменшити його токсичність.

Різниця між оптичними ізомерами може виявлятися на різних стадіях проходження через організм людини: на етапі взаємодії з рецепторами та ферментами, при транспортуванні через мембрани, на етапі розподілу в тканинах. Прикладом таких відмінностей може слугувати блокатор кальцієвих каналів верапаміл. Так, доведено, що його лівообертальний ізомер, який фармакологічно в 8–10 разів активніший з правообертальний, набагато швидше метаболізується при першому проходженні через печінку. Такі розбіжності в біотрансформації енантіомерів приводять до того різної їх концентрації в плазмі крові: при пероральному прийомі співвідношення ізомерів складає 1 : 5, а при парентеральному застосуванні співвідношення

дорівнює двом. Це пояснює велику різницю між пероральними (80–160 мг) і внутрішньовенними (5–10 мг) дозами вірапаміла [42].

Цікавим є той факт, що хіральні молекули менш схильні до поліморфізму, ніж їхні ахіральні аналоги [93, 180]

Раніше чітко визначалося, що поліморфізм притаманний однокомпонентним системам [194, 196]. На сьогоднішній день доведена можливість поліморфізму і для багатоконпонентних систем (коккристалів), хоча вони мають значну меншу схильність до нього. Так, уже є більше 150 зареєстрованих поліморфних коккристалів [176]. Прикладом фармацевтичного коккристалічного поліморфу є поліморфний коккристал напроксен-пролін [223]. Поліморфи однокомпонентних кристалів демонструють незначну варіативність фізико-хімічних властивостей, на відміну від коккристалічного поліморфізму [101].

Отже, фармацевтичні коккристали - це нейтральні кристалічні однофазні структури, що складаються з двох або більше різних молекулярних та/або іонних сполук, з яких одна є активною фармакологічною субстанцією, що нековалентно пов'язана з кристалоутворювачем - фармацевтично прийнятним коформером. Останній використовується для вирішення питання розчинності, розчинення, механічних властивостей і стабільності ліків. Ці компоненти пов'язані водневими зв'язками у фіксованому стехіометричному співвідношенні в кристалічній ґратці [56, 144, 188]

Коккристалічна інженерія, концепцію якої в хімії твердого тіла ввів Пепінський Р. у 1955 р., стала перспективним підходом до покращення ефективності лікарських речовин шляхом модифікації їх небажаних фізико-хімічних властивостей, маскування смаку та розширення фармакологічних властивостей [69, 101, 129, 144, 189]. З розвитком цього напрямку фармакології вже схвалено та використовуються кілька фармацевтичних коккристалів, таких як Стіглатра (ертугліфлозин), Ентресто (вальсартан + сакубітрин) та інші, які проходять клінічні випробування [147, 173, 184, 237].

Кокристали отримують випаровуванням розчинника, подрібненням в твердому стані, кристалізацією розчину, перетворенням суспензії, кристалізацією розплаву, екструзією гарячого розплаву та розпилювальною кристалізацією [144]. В ході численних досліджень було виявлено міцні супрамолекулярні синтони, які відіграють важливу роль у дизайні кокристалів, найбільш вживаними серед них є карбонові кислоти, амідні та спирти [202, 238, 250]. Утворення кокристалів призводить до нової кристалічної структури, яка не залежить від вихідних матеріалів, і яка забезпечує набір нових фізико-хімічних властивостей. Інколи передбачити нову структуру та властивості неможливо.

Існує два основних види кокристалів – молекулярні і іонні. Молекулярні кокристали є багатокомпонентною кристалічною структурою двох або більше нейтральних складників у твердому стані у певному стехіометричному співвідношенні. Прикладом молекулярного кокристалу може бути кокристал ібупрофену-нікотинаміду [89, 185, 201].

Іонні кокристали – це багатокомпонентне кристалічне розташування органічних молекул і неорганічних солей, таких як галогеніди лугу або лужноземельних металів у стехіометричному відношенні. На відміну від молекулярних, ці кокристали підтримуються водневими зв'язками та/або координаційними зв'язками (координаційні полімери). Прикладом таких сполук є пірацетам- CaCl_2 та натрій-карбамазепін [73, 76].

Як уже говорилося вище, деяким кокристалам також притаманний поліморфізм. Наприклад, є кокристали різної стехіометрії з одним і тим же коформером, наприклад, кокристалічна система карбамазепін: 4-амінобензойна кислота, яка представлена в стехіометричних конфігураціях 1:1, 2:1 і 4:1, що обумовлює деякі відмінності між ними [155].

Кокристалізація, як і поліморфізм, може покращувати фізико-хімічні та фармакологічні властивості лікарського засобу. Наприклад, призводить до покращення фізичної стабільності лікарських речовин: точки плавлення, гігроскопічності, що може попереджувати зміни препарату при виготовленні

та зберіганні [128, 102]. Так, наркозний засіб пропофол випускається у вигляді олійної емульсії через низьку температуру плавлення (18 °C). Застосування препарату в такій формі призводить до його нестабільності та розитку гіперліпідемії, а також викликає болючість в місці введення. Було створено кокристал пропофолу з ізонікетамідом в якості коформера, який в результаті виявився твердою стабільною при кімнатній температурі формою, оскільки температура плавлення вже була на 50 °C вища, ніж у чистого пропофолу. Це дало змогу отримати цей препарат у твердому вигляді [170].

Також за допомогою створення кокристалів можна покращувати гігроскопічність та розчинність лікарських засобів. Остання може збільшити біодоступність препарату. Так, показано, що кокристали флавоноїду-теофіліну виявляли більшу стійкість до гідратації, ніж окремих теофілін [95, 102, 135, 216].

Кокристалізація, як і поліморфізм, не тільки змінює фізико-хімічні властивості лікарських речовин, а й змінює їх біодоступність. Під час розробки препарату на доклінічній стадії багато кандидатів на ліки зазнають невдачі саме через низьку біодоступність [113, 114, 218]. За останні десятиліття кокристалізація продемонструвала свій потенціал в якості засобу покращення лікувальних властивостей препаратів *in vivo* шляхом підвищення розчинності та біодоступності погано розчинних у воді ліків [87, 94, 136, 211, 255]. Ця стратегія особливо підходить для ліків, які не можуть утворювати солі через відсутність іонізованих функціональних груп. Наприклад, протигрибковий засіб кетоконазол має низьку біодоступність через його дуже низьку розчинність у воді. Кокристал кетоконазол-*p*-амінобензойної кислоти має у 10 разів вищу розчинність у воді та в 6,7 разів вищу біодоступність при пероральному прийомі, ніж кристалічний кетоконазол [168]. Кокристали карбамазепіну і бурштинової кислоти мають майже в 6 разів більшу біодоступність в порівнянні з чистим препаратом [58].

Також шляхом створення кокристалів можна впливати на тривалість дії препарату та зменшення його токсичності [57, 97, 212, 249, 253]. Наприклад,

лікування туберкульозу ізоніазидом потребує великої дози для тривалого лікування, що може викликати розвиток такого важкого побічного ефекту як гепатотоксичність, а також розвиток резистентності до препарату. Juan et al. [246] успішно розробили форму пролонгованого вивільнення ізоніазиду шляхом співкристалізації його з куркуміном, що дало змогу подовжити тривалість дії ізоніазиду до 48 год. А поєднання ізоніазиду з кверцетином сприяло суттєвому зменшенню гепатотоксичності першого, вірогідно більше, ніж використання суміші цих речовин [160].

Покращення фізико-хімічних властивостей та біодоступності кристалічних препаратів можна досягти шляхом їх нанонізації. При цьому отримані нанокристали, як і кристали звичайних розмірів, мають різні поліморфні форми з різними властивостями [88, 150, 161]. Пильна увага приділяється частинкам розміром менше 100 нм, для яких виявлена здатність проникати через різні біологічні бар'єри [209]. Донедавна різноманітні поліморфні модифікації лікарських засобів найчастіше одержували випарюванням розчинника або охолодженням розплаву [132]. Так, кріохімічна технологія була використана при синтезі наночасточок піроксикаму [178], андростендіолу [233], феназепаму [204].

Ще одним методом вдосконалення параметрів лікарських засобів є використання біоізостеризму. Біоізостер - це сполука, яка утворюється при заміні одного атому/групи атомів на інший атом/групу атомів, при збереженні біологічної активності вихідної сполуки [24]. Вперше концепцію ізостеризму висунув Ірвінг Ленгюмор у 1919 році, який вказав, що у таких речовин однакова кількість атомів та однакова кількість електронів, які однаково розташовані, і мають однакові фізико-хімічні властивості. Г. Фридман в 1951 р. зазначив, що такі речовини мають не тільки однакові фізико-хімічні властивості, а й той же тип біологічної активності, діють в організмі на одні «мішені», тому володіють фізіологічними властивостями, що співставляються [24, 157, 158, 171].

Біоізостери представлені двома типами:

- класичні – мають однаковий розмір, форму, конфігурацію зовнішнього електронного поля та подібні біологічні активності;
- некласичні – не володіють фізико-хімічними характеристиками класичних, проте мають подібну біологічну активність.

Одними із таких біоізостерів є діазепам і альпразолам, тіогуанін і 6-меркаптопурин [111].

Таким чином, зміни кристалічної структури лікарських речовин мають виняткове значення для клінічної практики з точки зору підвищення ефективності препаратів, оскільки від того, яка кристалічна модифікація субстанцій міститься у лікарському препараті, залежить його стабільність, ефективність, нівелювання їх побічних дій, а також скорочення економічних витрат. Тому стратегія використання кокристалів, як і поліморфів, вважається актуальним напрямком досліджень в сучасній фармації та фармакології [116, 159, 243].

1.2. Структурні модифікації кристалів нестероїдних протизапальних засобів

Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) є жарознижувальними, протизапальними та знеболюючими засобами, які зазвичай використовуються для лікування м'язового болю, дисменореї, ревматизму, пірексії, подагри, мігрені тощо. Застосування НПЗЗ з кожним роком збільшується [68, 187]. Оскільки вони є однією з найвживаних груп лікарських засобів у світі, представляє інтерес дослідити зазначену проблему і серед цих препаратів.

В літературі представлені дослідження поліморфів індометацину. Індометацин є класичним НПЗЗ, який продається з 1965 року. На сьогоднішній день існує кілька полімерних формах цього препарату, які відрізняються за певними фізико-хімічними та фармакокінетичними параметрами. Поліморфізм індометацину полягає в різних метастабільних конформаціях молекули, які є результатом різної орієнтації між двома ароматичними

індольним і феніловим кільцями [62]. Шляхом зміни рухливості молекул ліків при кристалізації метастабільних кристалічних поліморфів в олімерних матрицях отримано дві його ізоформи (α - або γ) у вигляді нової метастабільної форми, або суміші двох поліморфів у дисперсіях, що містять різну кількість лікарського засобів у поліетиленгліколі, поллоксамері або гелюцірі. Відомо, що низька молекулярна рухливість аморфного лікарського засобу сприяє кристалізації в термодинамічно стабільні форми, що забезпечує більшу стабільність при зберіганні лікарського засобу, тоді як метастабільні кристалічні поліморфи утворюються, коли молекулярна рухливість препарату досить висока. Метастабільні лікарські речовини мають більш високу фармакологічну активність [234].

Ще один поліморф індометацину (форма δ), був відкритий шляхом кристалізації як у розплаві, так і в розчині ще в 1974 році, при цьому вважали, що його структура незмінна в обох середовищах. Пізніше було доведено, що це не так, і він має різну кристалічну структуру у розчині та розплаві, тому цю ізоформу розділили на дві: δ - та θ -, відповідно. Цікаво, що обидві структури демонструють пластичну гнучкість, засновану на механізмі ковзання, що робить індометацин першим препаратом, який має два пластикові поліморфи. [156].

Індометацин проявляє конформаційний поліморфізм. Існуючі поліморфи, α - та γ -форми, розташовувалися в локальних мінімумах на енергетичній поверхні на основі двох двограних кутів їх молекулярної конформації. Розраховані енергії решітки демонструють, що α -форма більш стабільна, ніж γ -форма. [62]. А δ -поліморф індометацину демонструє значно підвищену швидкість розчинення порівняно з більш поширеними та краще вивченими α - та γ -поліморфами, що вказує на кращі біофармацевтичні властивості та перевагу для медичного застосування. Упаковка та конформація молекули дуже нагадують метиловий ефір індометацину та сольват індометацину метанолу [60].

На сьогоднішній день синтезовані і досліджують ще три поліморфні форми (ϵ , ζ , η) індометацину у вигляді аморфних суспензій [215].

Також були створені кокристали індометацину з сахарином вивчення яких показало, що кокристали індометацину-сахарину виявилися негігроскопічним (у середовищі з вологістю 98% його маса збільшилась лише на 0,5%) і мали значно більшу швидкість розчинення, ніж індометацин (γ -форма) [63, 90].

Лінг та ін. створили іонний кокрисстал індометацину з проліном для прискореної швидкості поглинання, оскільки відомо, що проникність препарату через біологічні мембрани є ключовим фактором, який впливає на всмоктування та розподіл для підтримки хорошого фармакокінетичного профілю препарату Розчинність кокристалу була в 2-3 рази вищою порівняно з індометацином. Крім того, кокрисстал показав максимальну розчинність при рН 6,8, що сприяє всмоктуванню препарату в тонкій кишці [242].

Вивченню поліморфів інших НПЗЗ і створенню на їх основі кокристалів присвячено цілу низку наукових робіт. Так, отримано кокристали S-ібупрофену/нікотинаміду та RS-ібупрофену/нікотинаміду шляхом спільного подрібнення, повільного випаровування розчинника та кристалізації з розплаву які виявляли покращені фізико-хімічні та фармакокінетичні властивості [125].

Отримані кокристали ацеклофенаку в порівнянні з чистим ацеклофенаком продемонстрували кращу розчинність і швидкість розчинення, що є дуже важливим, оскільки відомо, що застосування ефективного препарату ацеклофенак є досить проблематичним саме через його дуже низьку розчинність і швидкість розчинення. При цьому встановлено, що отримані кокристали стабільні та не гігроскопічні [151].

Аббас. та ін. досліджували порошок бінарного кокристала напроксен–нікотинамід з метою покращення таблетування нікетаміду, який має дуже низьку здатність до стискання. В результаті доведено, що даний кокристал демонструє набагато кращу здатність до ущільнення та може

використовуватись для прямого таблетування, що полегшує процес виготовлення [53].

Особливе місце серед НПЗЗ займає поняття хіральності. Відомо, що S-(+) енантіомер ібупрофену дексібупрофен є більш потужним, ніж його R-(-) форма, і має багато переваг перед рацемічною сумішшю ібупрофену: більша клінічна ефективність і менша мінливість терапевтичних ефектів, менша токсичність [121, 142, 193].

Інший препарат кетопрофен представляє собою суміш енантіомерів [106, 220]. Він має високу знеболюючу ефективність у випадку запального та ноцицептивного болю, запобігає розвитку опіоїдної гіпералгезії при одночасному застосуванні з опіоїдами. Проте має суттєві побічні ефекти, а його дуже сильна болючість при внутрішньовенному введенні суттєво обмежує його застосування цим шляхом. При цьому декскетопрофен, який є активним декс-енантіомером рацемічного кетопрофену, має аналогічну анальгетичну ефективність у співвідношенні дози 1:2, але викликає менше побічних ефектів, ніж рацемічний кетопрофен, та знаходить застосування для короткочасного лікування легкого та помірною болю [141, 221]. Також доведено, що він набагато рідше викликає біль при внутрішньовенному введенні і виразність цього ускладнення набагато менша, тому він може бути більш підходящим НПЗЗ для внутрішньовенного введення, ніж рацемат [210].

Є повідомлення про нову кристалічну форму декскетопрофену (β -форма), яка відрізняється за фізико-хімічними властивостями від вже відомої кристалічної α -форми декскетопрофену. При цьому серед цих форм знайдено ще різні конформери декскетопрофену [197].

Також відомі енантіомери і інших НПЗЗ: (R,S)-ібупрофен, S-ібупрофен, (R,S)-кетопрофен, S-кетопрофен, S-напроксен та (R,S)-локсопрофен натрію, які мають покращені фармакологічні властивості при більш безпечності [80]

Виявлені поліморфи і серед коксибів. Так, еторикоксиб має кілька поліморфних форм, серед яких форма I та форма V є енантіотропними. При

цьому форма V є більш стабільною, ніж форма I при кімнатній температурі, що є важливим чинником стабільності лікарського засобу при зберіганні [252].

Більшість коксидів (целексид, вальдексид, дераксид, рофексид) гідрофобні, що ускладнює виготовлення пероральних форм. Так, виникали проблеми при виготовленні лікарських форм відомого нині препарату целексид. Морфологічно целексид тяжіє до утворення кристалів у вигляді голок, які сплавляються у моноліт при формуванні таблеток і дуже погано змішуються з іншими речовинами. Це дуже ускладнювало виготовлення як монопрепаратів, так і композицій на його основі. В ході досліджень було створено і вивчено властивості кількох його кристалічних форм. Було встановлено, що більшою розчинністю володіють кристалічні форми I та II, що дозволило отримати ефективний лікарський засіб [51].

Цікавим є синтезований іонний кокристал целексиду та трамадолу у молекулярному співвідношенні 1 : 1. Він складається з двох фармакологічно активних речовин з чотирма механізмами знеболювальної дії, які доповнюють один одного: інгібування ЦОГ-2, агонізм μ -опіоїдних рецепторів, інгібування зворотного захоплення норадреналіну та зворотне захоплення серотоніну. В дослідженні було продемонстровано в 3 рази швидший початок дії, ніж у окремого целексиду, що свідчить про його підвищений потенціал абсорбції, та в 7 разів повільніше вивільнення трамадолу, що може свідчити про підвищену безпеку та кращу переносимість. На його основі планують створити таблетовану форму [115, 163].

Відмінності кристалічних структур і їх властивостей серед оксикамів також є предметом дослідницького інтересу на сьогоднішній день. Утворені кокристали мелоксикаму і карбонової кислоти [84]. Синтезовано та охарактеризовано поліморфи теноксикаму [200] та піроксикаму (I, II, III, IV, V форми) [118, 162, 241]. V форма піроксикаму була виявлена випадково під час підготовки кристалічних зразків піроксикаму для (14) N ядерного квадрупольного резонансу [152].

Лорноксикам, який має покращений профіль безпеки для шлунково-кишкового тракту ймовірно, завдяки короткому періоду напіввиведення, порівняно з іншими препаратами цієї групи, має обмежену розчинність, особливо в кислому середовищі [183]. На сьогоднішній день доведено, що його ромбічна форма має значно вищу розчинність, ніж триклинна, і вона взята за основу для приготування пероральних та ін'єкційних лікарських форм лорноксикаму [183, 251].

Синтезовано кілька кокристалів піроксикаму з різними коформерами та покращеними властивостями. Так, кокристалу піроксикаму з ацетатом натрію притаманний більш швидкий розпад і на 30% більша швидкість розчинення. На його основі було виготовлено таблетки, що диспергуються в ротовій порожнині, з покращеним часом розпаду (30 с) і швидкістю розчинення. [190]. Кокристали піроксикаму з бурштиною кислотою, резорцином, метилпарабеном та ваніліном, які показали набагато кращу розчинність, порівняно з чистим піроксикамом [104]. Лі та ін. повідомляють про кокристалічні сольвати піроксикаму-клоніксину, які мають підвищену гідратаційну стабільність, що важливо для комерційного дозування. Даний кокристал представлений у п'яти безводних формах та одній моногідратній формі [154]. Також експериментально продемонстровано, що користиали піроксикаму мають потенційну перевагу при комбіновані терапії: менший розвиток резистентності, менша кількість побічних ефектів, посилення синергічної дії ліків [203, 219].

Дуже близькими за хімічною будовою до групи оксикамів є похідні 2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазинів. Ці речовини не зустрічаються в природі, тобто є типовими ксенобіотиками.

Перші публікації, які стосувались синтезу цих сполук, з'явилися тільки в 60-х роках минулого століття. Але тоді хімія гетероциклічних сполук не була бурхливого розвитку у зв'язку із обмеженням в препаративних методах їх синтезу. Подальший розвиток науки дав змогу створити високоефективні методи хімічного синтезу, відтак вчені різних спеціальностей стали

проявляти великий інтерес до 2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазинів, насамперед як до джерела біологічно активних речовин.

Ця група сполук активно синтезується і вивчається на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Ігоря Васильовича Українця. Численні наукові праці свідчать, що цей хімічний клас є дуже сприятливим для створення на його основі нових сполук із аналгетичними, протизапальними, а також діуретичними, місцевоанестезуючими властивостями тощо. Хімічна та кристалічна будова нових молекул підтверджується високоінформативними сучасними методами аналізу. В процесі хімічного синтезу науковцями були отримані різні поліморфні модифікації різних похідних класу 2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазинів з різним ступерем біологічної активності.

Більш детальному дослідженню різних поліморфних форм сполук цього класу присвячена дана наукова праця.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика тест-зразків

В якості об'єктів дослідження було обрано ряд похідних *N*-*R*-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та їх поліморфних модифікацій, синтезованих на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Українця Ігоря Васильовича. Широкий фармакологічний потенціал сполук цього класу дає підставу сподіватись на наявність у них знеболюючої дії, що і стало підставою для проведення даного дослідження.

В дослідженні вивчались сполуки наступної хімічної будови (рис. 2.1 - 2.3):

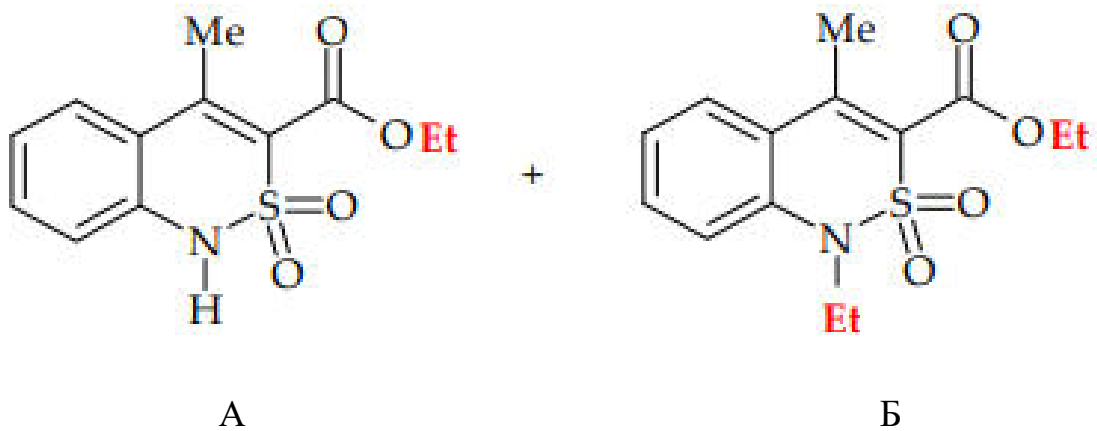


Рис. 2.1 Хімічна будова етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (А) та його 1-етилзаміщеного аналогу (Б).

Ці сполуки отримані шляхом алкілуванням натрієвої солі 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти йодетаном в диметилсульфоксиді (ДМСО) при кімнатній температурі. В результаті реакції утворювалось дві сполуки (див. рис. 2.1). Однак виявилось, що гетерогенна кристалізація з етанолу призводить до моноклінної поліморфної форми (М) етил 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату, тоді як

гомогенна кристалізація призводить до його орторомбічної форми (O). Молекулярну та кристалічну структуру обох форм було підтверджено рентгеноструктурним аналізом, а чистоту фази – порошковою дифракцією. Ці сполуки отримали лабораторні шифри NI-75, NI-77, та NI-79.

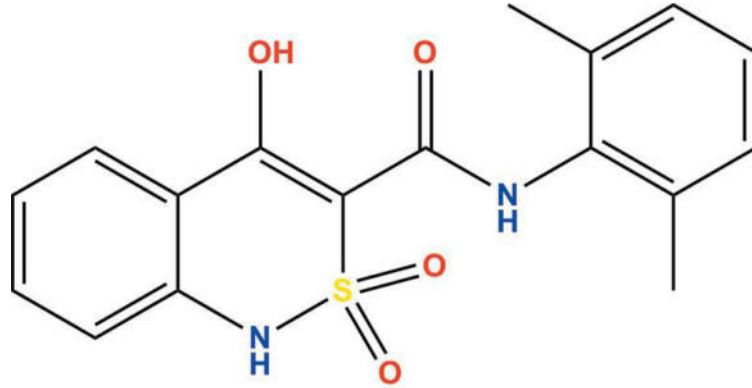


Рис. 2.2 Хімічна будова N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду.

Сполука цієї хімічної будови є дуже наближеною до структури піроксикаму ([4-гідрокси-2-метил-N-(піридин-2-іл)-2H-бензо[e][1,2]тіазин-3-карбоксамід 1,1-діоксид]) і, як інші представники 2,1-безотіазинів, може утворювати різні поліморфні форми. В процесі хімічного синтезу N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-1-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду хіміками-синтетиками було використано різні розчинники (етанол та метилен хлорид), що призвело до появи двох енантіоморфних кристалічних форм, молекулярна будова яких є дзеркальною. Ці поліморфи отримали лабораторні шифри NI-34 та NI-35.

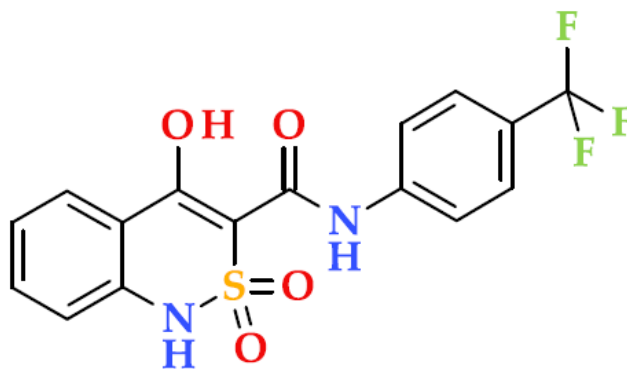


Рис. 2.3 Хімічна будова N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.

Сполуки цієї будови утворюють три різні кристалічні модифікації (сполуки з лабораторними шифрами NI-50, NI-51, NI-52), які мають абсолютно тотожну хімічну, просторову та кристалічну будову, і відрізняються лише зовнішньою формою: довгі палички, тонкі пластини або подовжені блоки.

Спектри ЯМР ^1H наведених вище сполук зареєстровано на приладі Varian Mercury-400 (робоча частота 400 МГц) у розчині ДМСО- d_6 , внутрішній стандарт ТМС. Елементний аналіз виконано на мікроаналізаторі EuroVector EA-3000. Температури плавлення визначені у капілярі на цифровому аналізаторі точки плавлення SMP10 Stuart.

Для беззаперечної характеристики всіх поліморфних модифікацій використано монокристалічні та порошкові рентгеноструктурні дослідження, а також біологічні методи аналізу, які були проведені в однакових умовах.

2.2 Характеристика лабораторних тварин

Експерименти були виконані на 270 білих нелінійних щурах та 347 мишах обох статей, розводки віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, а також 357 щурів-самців лінії Wistar, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», які утримувались в умовах віварію ВНМУ імені М. І. Пирогова. Дослідження проведені із дотриманням затвердженого плану та оформленням протоколів, в які були занесені результати досліджень. До початку експерименту тварини знаходились на карантині протягом 10 діб, в дослідження були відібрані тварини без зовнішніх ознак відхилень в стані здоров'я таким чином, щоб відхилення у вихідній масі в експериментальних групах не перевищував $\pm 10\%$. Тварини утримувались в стандартних умовах віварію згідно чинних санітарних норм на повноцінному харчовому раціоні збалансованому за всіма нутрієнтами з природнім освітленням (12 годин день/12 годин ніч) та доступом до води *ad libitum*. Температура повітря підтримувалась в межах 18-22 °С, відносна вологість повітря – $50 \pm 5\%$ [22,

27].

Експерименти проведені з урахуванням добових та сезонних ритмів переважно в весняно-літній період. Отримання біологічних рідин на гематологічні аналізи та забій тварин були проведені в полуденні години. До забору біологічного матеріалу або забою тварин, попередньо за 10-12 годин тварин позбавляли їжі та води. При проведенні досліджень обов'язковою умовою було гуманне відношення до тварин, яке відповідало рекомендаціям ДЕЦ МОЗ України «Доклінічні дослідження лікарських засобів» [43] та у відповідності до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, регламентованих положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [107] та Законом України № 3447-IV від 21.02.2006 р. зі змінами «Про захист тварин від жорстокого поводження». Забій виконували під легким ефірним наркозом в спеціальній камері в теплому приміщенні. Перед початком експерименту тварини були розподілені по групах. Кожна відібрана тварина була маркірована нанесенням кольорових міток на різні частини тіла.

Виконання досліджень було схвалено комісією з біоетики ВНМУ імені М.І. Пирогова (протокол № 4 від 13 травня 2021 р.), порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не було виявлено.

Відповідно до мети та завдань дослідження всі експериментальні тварини були поділені на такі групи (табл. 2.1).

В дослідженні використані такі речовини, препарати та реактиви:

Тест-зразки нових оригінальних похідних *N*-*R*-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, синтезованих на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. І. В. Українця.

Розподіл експериментальних тварин згідно етапів дослідження

№	Етапи дослідження	Щури	Миші
1	Скринінгові дослідження анагетичної та протизапальної активності 4-R-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбонових кислот	65	
2	Дослідження параметрів безпечності та ефективності найбільш активних сполук-похідних бензотіазин-3-карбоксамідів та референс-препаратів <ul style="list-style-type: none"> - Дослідження гострої токсичності сполук - Дослідження ульцерогенної дії сполук 	100	175
3	Дослідження середньої ефективної дози сполуки-лідера та референс-препаратів за анагетичною та протизапальною активністю	105	
4	Дослідження анагетичних властивостей кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду <ul style="list-style-type: none"> - Модель оцтово-кислих корчів - Модель «tail-flick» - Модель електричного подразнення кореня хвоста - Модель «гаряча пластинка» - Модель діабетичної нейропатії - Модель нейропатії на тлі перев'язки сідничного нерва 	49 49 49 49 42	60
5	Дослідження фармакокінетики кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду		112
6	Поглиблені дослідження фармакодинаміки сполуки-лідера N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1 <i>H</i> -2λ ⁶ ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука В) <ul style="list-style-type: none"> - Модель токсичного набряку легень - Модель ватної гранульоми - Модель площинних ран шкіри - Модель молочної лихоманки - Модель ад'ювантного артриту 	28 21 21 21 28	
	Всього	627	347

Досліджувани тест-зразки у вигляді водної суспензії стабілізованої 5 % водним розчином Tween-80 (Sigma, USA) вводили внутрішньочеревно (в/оч) або внутрішньошлунково (в/шл) в залежності від мети експерименту. Тварини контрольних груп отримували еквіоб'ємні кількості води та Tween-80.

В якості референс-препаратів використовували диклофенак-натрію («Вольтарен», Novartis), лорноксикам («Ксефокам», Takeda Austria GmbH, Austria.), мелоксикам («Моваліс», Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Germany), піроксикам (АТ «Софарма», Болгарія). В скринінгових дослідженнях використовували дозу 20 мг/кг, в подальшому – середні ефективні дози (ED₅₀), які були розраховані для кожного препарату.

Для моделювання запального процесу використовували субстанцію карагеніну (Sigma, USA), для моделювання ад'ювантного атрити використовували повний ад'ювант Фрейнда (Thermo Fisher scientific), для моделювання цукрового діабету – стрептозоточин (Sigma, USA).

2.3 Експериментальні моделі оцінки фармакологічних ефектів

Всі фармакологічні дослідження виконані на базі сертифікованої МОЗ України лабораторії кафедри фармакології ВНМУ ім. М. І. Пирогова (свідоцтво про переатестацію № 023/13 від 05.03.2013 р., свідоцтво про технічну компетентність №030/18 від 1 листопада 2018 р., чинне до 31 жовтня 2023 р.).

На першому етапі проводили скринінг протизапальної та знеболюючої активності на моделі запальної *гіпералгезії та ексудативної реакції, викликаній викликаного введенням 0,1 мл 1% розчину карагеніну* під подошвенний апоневроз правої задньої кінцівки щура [37, 43]. Ця модель використовується для виявлення та оцінки нових потенційних НПЗЗ. У відповідь на пошкодження тканин (альтерацію) розвивається ексудативна фаза запалення, яка відіграє важливу роль у розвитку всього комплексу тканинних змін при запаленні. Провідним механізмом у розвитку ексудативної реакції є

порушення проникності судин мікроциркуляторного русла, яке розвивається під дією медіаторів запалення. У перші 30-90 хв патогенезу розвитку карагенінового набряку приймають участь гістамін та серотонін, в інтервалі між 1,5-2,5 год – кініни, а між 2,5-5,5 год – простагландини. Щурам дослідних груп через 1 год після введення карагеніну в/оч вводили сполуки, що досліджували, або препарати порівняння в скринінговій дозі 20 мг/кг, тварини контрольної групи отримували еквіоб'ємну кількість розчинника.

Для визначення ступеню ноціцепції та **аналгетичної активності біологічно активних сполук** оцінювали величину порогу больової чутливості (ПБЧ) – мінімальний тиск на нижню поверхню стопи щура (г/мм^2), який викликав больову реакцію у тварини (вокалізацію та / або відсмикування лапки). Вимірювання проводили за допомогою долориметра (Dolorimeter Baseline, USA).

Ступінь **гіпералгезії** у тварин визначали за допомогою філаментів вон Фрея з використанням набору Semmes Weinstein (Stoelting, Dale Wood, IL, USA), який складається з 20 монофіламентів, що охоплюють широкий спектр сили тиску від 0,008 до 300 г. Тварину розміщали в прозорій плексигласовій камері, дно якої являло собою проволочну сітку. Після акліматизації в дослідному пристрої, коли тварина практично не рухалась, кінчик волокна певної довжини і діаметру притискали до шкіри під прямим кутом, поки волосок не почне згинатись, але не більше 3 с. Больова реакція тварини проявляється відсмикуванням лапи і/або вокалізацією болю. Дослідження починали з 10 номера монофіламента Фрея, і надалі збільшували або зменшували номер в залежності від отриманої відповіді. Кожній тварині проводили 5 спроб і визначали ПБЧ, який відповідав значенню відповіді на п'яту спробу з додаванням фіксованого поправочного коефіцієнта (0,5), як описано Bonin R.P., (2014) [71, 82].

Аналгетичну активність досліджуваних сполук та препаратів порівняння оцінювали за їх здатністю збільшувати ПБЧ у дослідних групах у порівнянні з групою контролю і виражали у відсотках; розрахунок проводили за формулою:

$$AA = \frac{(\text{ПБЧ}_{\text{контроль}} - \text{ПБЧ}_{\text{дослід}})}{\text{ПБЧ}_{\text{контроль}}}$$

де AA – аналгетична активність у %;

ПБЧ_{контр} – середній показник мінімального тиску, що викликав больову реакцію у тварин групи контролю;

ПБЧ_{дослід} – середній показник мінімального тиску, що викликав больову реакцію у тварин дослідної групи.

Виразність *запальної реакції* оцінювали через 3 год після індукції запалення (піку розвитку запального процесу), вимірювали об'єм здорової та набряклої кінцівки (мм³) за допомогою плетизмометра Plethysmometer (Ugo Basile, Italy). Антиексудативну активність визначали за ступенем зменшення набряку у дослідних тварин у порівнянні з тваринами групи контролю та виражали у відсотках і розраховували за формулою:

$$AEA = \frac{\Delta V_{\text{контроль}} - \Delta V_{\text{дослід}}}{\Delta V_{\text{контроль}}} \times 100$$

де AEA – антиексудативна активність у %;

$\Delta V_{\text{контроль}}$ – середня різниця в об'ємі між набряклою та ненабряклою лапами в групі контролю;

$\Delta V_{\text{дослід}}$ – середня різниця в об'ємі між набряклою та ненабряклою лапами в дослідній групі.

Для найбільш активних сполук, які за ступенем дієвості перевершували препарати порівняння, в подальшому визначали показники токсичності. Згідно рекомендацій із доклінічного дослідження біологічно активних речовин [14, 37, 43], для оцінки нешкідливості потенційних НПЗЗ необхідно визначити їх середню летальну дозу (LD₅₀), середню ефективну дозу (ED₅₀), середню ульцерогенну дозу (UD₅₀) та розрахувати широту терапевтичного індекса

Оскільки НПЗЗ зазвичай використовують для лікування больового синдрому слабкої та середньої сили, а також при хронічних болях, то найбільш доцільним шляхом введення їх є пероральний (внутрішньошлунковий). Іншим аргументом на користь такого шляху введення сполук є їх погана розчинність у воді. Тому гостру токсичність, середню ефективну та ульцерогенну дози сполук визначали за їх одноразового в/шл введення білим мишам з масою тіла 18-20 г, або щурам масою 190-210 г методом найменших квадратів за В. Б. Прозоровським та графічним методом [39]. Отримані результати порівнювали із такими у відомих препаратів – неселективних інгібіторів ЦОГ-1 та ЦОГ-2 диклофенаку, піроксикаму та лорноксикаму, а також селективного інгібітора ЦОГ-2 мелоксикаму.

Методика оцінки ульцерогенної дії сполук та UD_{50} . Оцінку здатності сполук-лідерів викликати характерне для НПЗЗ пошкодження слизової шлунка (т.з. ульцерогенну дію) визначали за одноразового в/ш введення сполук у вигляді водної суспензії на Твін-80 щурам, які за 16 годин до початку експерименту знаходились в стані повної харчової депривації і знаходились в клітках із решіткою, яка виключала споживання тирси та екскрементів. Через 3 години тварин піддавали евтаназії дислокацією хребців в шийному відділі під пропофоловим наркозом, розрізали передню черевну стінку вилучали шлунок, розсікали його по малій кривизні, промивали його в фізіологічному розчині для видалення вмісту, та проводили макроскопічну оцінку стану СОШ. Оцінку ульцерогенного ефекта проводили за 4-бальною шкалою: 0 - відсутність ушкоджень;

0,5 - гіперемія;

1 - одиничні незначні ушкодження (1 чи 2 точкових крововиливи);

2 - множинні пошкодження (ерозії, точкові крововиливи);

3 - значні та множинні пошкодження слизової (ерозії, крововиливи);

4 - грубі пошкодження, які охоплюють всю поверхню слизової (масивні крововиливи, ерозії, перфорації).

3

а

п

Поглиблені дослідження знеболюючої дії проводили на різних моделях больової перцепції. Досліджувані сполуки вводили внутрішньочеревно або внутрішньошлунково.

Корчі, викликані розчином *оцтової кислоти у мишей* [239]. В дослідгах на білих нелінійних мишах специфічну больову реакцію у вигляді «корчів», яка характеризувалась специфічними рухами тварин, які включали скорочення та розслаблення черевних м'язів, витягування задніх кінцівок і прогибання спини тварин викликали в/оч введенням 0,6 % розчину оцтової кислоти (0,1 мл/10 г миші). Сполуки, що досліджували, вводили за 60 хв до ін'єкції альгогену. Контрольним тварин отримували лише 0,6 % розчин оцтової кислоти в еквіоб'ємній кількості. Відразу після введення розчину оцтової кислоти, тварин розміщували на паперовій підстилці під скляним ковпаком з отвором для вільного доступу повітря. Здійснювали підрахунки числа корчів протягом 20 хв після введення альгогену. Критерієм наявності та ступеню виразності аналгетичного ефекту вважали відсоток інгібіції числа корчів відносно контролю.

Модель *електричного подразнення* слизової оболонки прямої кишки [14], відтворювали в спеціальній камері, використовували апарат ЭСЛ-2, який генерував електричні імпульси з частотою 100 Гц, тривалістю 5 мсек і затримкою 5 мсек. За поріг больової чутливості (ПБЧ) приймали таку напругу електричного струму, що викликала ноціцептивну реакцію у щурів, яку реєстрували по вокалізації, імерсії хвоста та (або) відсмикуванню лап від токопровідної поверхні дна камери. Порівнювали вихідні значення ПБЧ та зміни його через 1, 2, 4 та 6 годин після одноразового введення препаратів. Ця модель дозволила оцінити ступінь вираженості аналгетичної активності сполук, а також порівняти початок ефекту та тривалість їх дії.

Дослідження аналгетичної активності в тесті *«гаряча пластина»* [37, 43]. Цей тест базується на поведінкових реакціях, які контролюються супраспінальними структурами, у відповідь на больовий стимул. Тварину висаджували на термостатично контрольовану поверхню, яка нагрівалась до

49-52 °C (Ugo Basil, Hot Plate) і спостерігали за поведінковими реакціями, які проявлялись у вигляді 2 фаз: 1 фаза – руховий неспокій: підняття та облизування лапок, а також 2-га фаза – стрибки, відсмикування задніх лап. Дані реакції характеризуються складною організацією рефлексу із залученням кіркових та підкіркових структур головного мозку. Реєстрували латентний період (ЛП) больової реакції 1-ої (час до облизування лап) та 2-ої фази (час до першої спроби відірвати від поверхні всі чотири кінцівки), а також час сумарної латенції. Критерієм аналгетичного ефекта вважали статистично значуще подовження латентного періоду реакції після введення досліджуваних сполук в порівнянні з контрольними тваринами. Щурам дослідних груп за 1 год до початку експерименту вводили досліджувані сполуки, контрольні тварини отримували еквіоб'ємні кількості розчинників.

Ще однією моделлю термічного больового подразнення було використано тест *відсмикування хвоста від теплового опромінення («tail-flick»)*. Цей метод заснований на спінальному флексорному рефлексі у відповідь на прогресивне збільшення теплового впливу на шкіру хвоста. В цьому тесті відбувається послідовна активація терморецепторів, Ad та C-полімодальних ноціцепторів, високопорогових механорецепторів [139, 181]. Щурів вміщували в прозорий плексигласовий пенал, хвіст вільно розташовувався на поверхні приладу (аналгезиметр (Ugo Basile, Italy)). На верхню третину хвоста щурів наносили термічне подразнення за допомогою сфокусованого променя світла. Оцінювали латентний час відсмикування хвоста від джерела променя, виражений в секундах. Тварини були рандомізовані відносно вихідного значення латентного періоду, в дослід увійшли щури, у яких цей показник становив від 4 до 12 с. Виразність антиноцицептивного ефекту оцінювали за збільшенням тривалості ЛП. При підвищенні ЛП (порогу больової чутливості) більше 25 с, подальше дослідження припиняли для попередження термічного опіку тварини. Порівнювали вихідні показники тривалості ЛП та зміни його через 2 год після

введення досліджуваної сполуки та референс-препаратів у % відносно фонового показника, взятого за 100 %.

Моделювання *нейропатичного больового синдрому* здійснювали на двох моделях – перев'язка сідничного нерва та діабетична полінейропатія.

Модель нейропатичного болю відтворювали шляхом перев'язки сідничного нерва на рівні верхньої третини стегна на рівні підколінної ямки вище місця його трифуркації на n. Tibialis, n. Peroneus і n. Suralis [31]. Розвиток патологічного процесу тривав 14 днів. Виразність поведінкових проявів больового синдрому оцінювали за частотою приступів спонтанного болю, їх тривалості, відповідь на провокацію зони проекції болю (алодинії), рухової активності і вокалізації. Про появу неврогенного больового синдрому свідчила також поява аутономій на оперованій кінцівці [30]. Ступінь гіпералгезії визначали за допомогою долориметра (Dolorimeter Baseline, USA) шляхом визначення ПБЧ. Кожній тварині проводили 5 спроб, за порогове значення приймали таку силу тиску, яка викликала позитивну відповідь принаймні в одній спробі. Порівнювали ПБЧ на неушкодженій та ушкодженій кінцівках на 14 день після перев'язки (патологія без лікування), а також на ушкодженій кінцівці через 2 год (пік дії) після введення препаратів.

Діабетичну нейропатію у щурів відтворювали шляхом одноразового в/оч введення розчину стрептозотоцину дозою 60 мг/кг. Ця речовина містить метилнітрососечовину, яка зв'язана в С2 положенні із D-глюкозою. Стрептозотоксин викликає пряму токсичну дію на β -клітини, порушує структуру плазматичної мембрани, що приводить до морфологічних змін та змін клітинної проникності. Оскільки стрептозотоксин містить глюкозу, вважається, що він зв'язується із специфічними рецептором глюкози на мембрані і при цьому блокує глюкозостимулюємий викид інсуліну. Спостереження за тваринами проводили протягом 6 тижнів після моделювання патологічного стану [37]. Оцінювали зовнішній вигляд тварин, зміни харчової та водної поведінки. Фіксували виживаність тварин протягом всього терміну дослідження. Перед початком експерименту, а також кожні 7

днів у щурів визначали масу тіла, рівень глюкози в крові (за допомогою портативного глюкометра та тест-смужок), а також больову перцепцію за допомогою долориметра (Dolorimeter Baseline, USA) шляхом визначення ПБЧ. Крім того, візуально визначали стан ушкоджених кінцівок (ураження нігтів та фаланг пальців). Досліджувані сполуки вводили в/оч та в/шл на 60 добу після моделювання патологічного стану. Динаміку ПБЧ визначали на 1-шу, 2-гу, 4-ту та 6-ту години після їх введення.

Поглиблене дослідження фармакологічних ефектів сполуки-лідера проводили згідно методичних рекомендацій з доклінічного дослідження біологічно активних сполук [43]. Досліджувану сполуку та препарат порівняння мелоксикам («Моваліс», Boehringer Ingelheim) використовували в середніх ефективних дозах за антиексудативною активністю, яка була розрахована на моделі карагенінового набряку і становила 5,2 мг/кг для сполуки-лідера та 9,1 мг/кг для мелоксикаму. Вибір референтного препарату обумовлений хімічною подібністю будови цих сполук. Тварини контрольної групи отримували еквіоб'ємну кількість розчинника за аналогічними режимами та способами введення.

Вивчення *антиексудативних властивостей* проводили на моделі гострого токсичного альвеолярного набряку легень у щурів, який моделювали

в

н

у

т

р

і

ш

н

$$АЕА (\%) = 100 - \frac{100 \cdot (МКЛ_d - МКЛ_i)}{(МКЛ_k - МКЛ_i)}$$

де МКЛ_д – масовий коефіцієнт легень у групі тварин, що одержували досліджувані сполуки;

о

ч

е

р

МКЛ_к – масовий коефіцієнт легень у тварин з контрольною патологією; МКЛ_і – масовий коефіцієнт легень в інтактних щурів.

Вивчення *антиальтеративних властивостей* проводили на моделі експериментальних ран у щурів [43, 120]. Щурам під пропофоловим наркозом («Fresenius Kabi», Австрія, 60 мг/кг в/оч) в поперековій ділянці спини на попередньо депільованій поверхні і обробці операційного поля 10% розчином Декасану проводили маркування зони нанесення рани розмірами 1x1 см, та виконували надріз на шкіри по лінії маркування з подальшим видаленням шкірного лоскуту. Оцінку регенеративної активності проводили протягом 21 доби. Для цього тварин фіксували та проводили фотографування на камеру з роздільною здатністю 12 мегапікселів для подальшої обробки спеціальною комп'ютерною програмою для визначення площі (S) Universal desktop ruler, version 11 (UDR v.11). Площа рани забарвлювалась в рожевий колір і автоматично вираховувалась в мм². Досліджувані сполуки вводили щоденно починаючи з 1 доби після моделювання рани. Показниками антиальтеративної активності вважали площу ран (S) та швидкість загоєння (V). Швидкість загоєння ран визначали за формулою:

$$V = 100 \cdot \frac{S_o - S_t}{S_o},$$

де S_o – початкова площа рани, мм²;

S_t – площа рани у день вимірювання, мм².

Антипроліферативну активність досліджували на моделі «ватної» гранульоми у щурів [37]. Тваринам під пропофоловим наркозом («Fresenius Kabi», Австрія, 60 мг/кг в/оч) моделювали хронічне проліферативне запалення шляхом імплантації стерильної ватної кульки масою 10 мг. Досліджувану речовину та препарат порівняння вводили у лікувальному режимі за 1 год до операції та щоденно одноразово протягом 7 діб з моменту імплантації стерильної ватної кульки. На 8-му добу після операції здійснювали евтаназію тварин, видаляли ватну кульку з утвореною гранульомою, зважували та висушували до постійної маси при температурі 60°C. Проліферативну реакцію

оцінювали за приростом маси сухої гранульоми до маси ватної кульки, а ексудативну реакцію - за різницею маси сирії та висушеної гранульоми. Отримані дані виражали у відсотках відносно контролю.

Дослідження *жарознижувальної дії* проводили на *моделі молочної лихоманки*, яку викликали шляхом внутрішньом'язового введення знежиреного коров'ячого молока в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини [45]. Досліджувані речовини вводили в/шл на тлі максимального підвищення температури тіла (4 год). Вимірювання ректальної температури тіла тварин електронним термометром проводили до введення пірогену та через 4, 5, 6 і 7 год після його введення. Для вимірювання ректальної температури застосовували електронний термометр FT-15 («Beurer», Германія). Пік лихоманки, за даними літератури, на цій моделі спостерігається через 4 год після введення пірогена і триває до 5-ї год [45]. Антипіретичну активність (ЖА, %) визначали за здатністю досліджуваних речовин знижувати температуру тіла тварин дослідних груп у порівнянні з динамікою температури у тварин групи позитивного контролю і розраховували за формулою:

$$\text{ЖА} = \frac{(\Delta T_{\text{пк}} - \Delta T_{\text{д}})}{\Delta T_{\text{пк}}} \times 100$$

$\Delta T_{\text{пк}}$ – приріст температури в групі позитивного контролю;

$\Delta T_{\text{д}}$ – приріст температури в групі досліджуваних тварин.

Антипірогенну дію досліджували на щурах на моделі молочної

Ад'ювантний артрит (АДА) у щурів моделювали введенням під підошвенний апоневроз задньої правої лапи 0,1 мл повного ад'юванта Фрейнда

(
Т
h
e
r
m
o

процеса надали гематологічні маркери запалення – швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ) та кількість лейкоцитів в периферичній крові. Починаючи з 15 доби тварини були розподілені на 4 групи (по 7 тварин в кожній), перша група – умовно здорові щурі (позитивний контроль), друга група – тварини, з АДА без лікування (негативний контроль). До третьої та четвертої груп входили тварини, яким на тлі розвитку АДА вводили сполку, що досліджувалась та препарат порівняння в їх середніх ефективних дозах за антиексудативною активністю. Протизапальну активність речовин оцінювали за здатністю зменшувати набряк ураженої стопи, який визначали при порівнянні об'єму ураженої стопи з об'ємом неуразеної стопи у дослідних тварин та тварин контролю, а також за динамікою гематологічних показників.

По закінченні експерименту проводили евтаназію тварин та відбір матеріалу для біохімічних досліджень.

2.4 Біохімічні методи дослідження

Біохімічні дослідження виконані в науково-дослідній клініко-діагностичній лабораторії кафедри біологічної та загальної хімії ВНМУ імені М. І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р.; №049/15 від 02.03.2015 р.).

Матеріал для дослідження: пост'ядерний супернатант гомогенату СОШ, сироватка крові.

Досліджувані біохімічні показники:

1. Вміст інтерлейкіну 1 β в сироватці крові (IL-1 β , пг/мл)
2. Сумарна активність простагландин-ендопероксид синтази в СОШ (P_gH-синтаза, нмоль/хв•мг протеїна)
3. Сумарна активність NO-синтази в СОШ (пмоль/хв•мг протеїна)
4. Активність цистатіонін- γ -ліази в СОШ (ЦГЛ, нмоль/хв•мг протеїна)
5. Вміст гідроген сульфід у СОШ (H₂S, нмоль/мг протеїна)

6. Рівень стабільних метаболітів нітроген монооксиду - $\text{NO}^{2-} + \text{NO}^{3-}$ в СОШ (нмоль/г тканини)

Для проведення біохімічних досліджень тварин виводили з досліду за допомогою дислокації хребців в шийному відділі, набирали кров, вилучали шлунок, промивали його фізіологічним розчином, виділяли СОШ, перфузували холодним 1,15 % розчином KCl і гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % KCl (співвідношення 1:3). Гомогенати центрифугували протягом 30 хв при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при температурі 20 °С.

Сироватку крові отримували шляхом центрифугуванням крові при 1500 об/хв. протягом 20 хв. Аліквоти сироватки крові відбирали в мікропробірки Eppendorf і до проведення аналізу зберігали при – 20 °С.

Вміст білку оцінювали мікробіуретовим методом [29]. Активність простагландин-ендопероксид синтази (PGH-синтази, КФ 1.14.99.1) визначали спектрофотометричним методом за накопиченням окисленої форми донору електронів адреналіну [36]. Активність цистатіонін- γ -ліази (КФ 4.4.1.1) визначали за накопиченням H_2S після інкубації в середовищі 1 мл якого містив: піридоксальфосфат 0,67 мМ, L-цистеїн 3,3 мМ, трис-буфер 0,083 М (рН 8,5). [21]. Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS, КФ 1.14.13.39) визначали за накопиченням нітрит-аніону (NO_2^-) після інкубації в середовищі 1 мл якого містив 50 мМ KH_2PO_4 - NaOH -буфер (рН 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ NADPH , 2,2 мМ L-аргініну. До середовища додавали 0,2 мл проби, яка містила 8 мг протеїну постядерного гомогенату. Час інкубації становив 60 хв [19]. Вміст метаболітів оксиду азоту - нітритів та нітратів визначали за реакцією з реактивом Гріса - 0,2% на 12% розчині етанової кислоти [28], після попереднього осадження білків ацетонітрилом. Нітрати попередньо відновлювали до нітритів сумішшю, яка містила цинковий порошок та розчин аміаку. Вміст H_2S в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом, який оснований на утворенні тіоніну в реакції між сульфід аніоном

та пара-фенілендіаміном гідрохлориду у кислому середовищі в присутності іонів заліза (III) [20].

Вміст інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β) в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційного набору «ІЛ-1 β ELISA» («Diaclone», Франція) у відповідності до інструкції фірми-виробника. В лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла ІЛ-1 β , додавали по 100 мкл стандартних розчинів (з відомими концентраціями ІЛ-1 β), контрольних проб та проб сироватки крові, 50 мкл біотинолових антитіл. Інкубували 3 год при 18-25 °С. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл ензиму (стрептавідин – пероксидазу) та інкубували упродовж 30 хв при 18-25 °С для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ-ензим. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл ТМВ-субстрату (хромогену, який реагує зі зв'язаним на твердій фазі ензимом з утворенням забарвленої речовини), інкубували 15 хв при 18-25 °С, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS.

2.5 Фармакокінетичні методи дослідження

Дослідження фармакокінетичного профілю кристалічних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2 λ ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду проводили в лабораторії біохімічної фармакології Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України за консультативної допомоги старшого наукового співробітника, доктора біологічних наук В. Б. Ларіонова.

Побудова калібрувального графіку. Наважку 50,0 мг *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2 λ ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду переносили у мірну колбу на 50 см³, розчиняли у 10-15 см³ ацетонітрилу та доводили тим самим розчинником до мітки. Отриманий

розчин (Розчин 1) мав концентрацію 1000 мкг/см³. 12,5 см³ Розчину 1 переносили у мірну колбу на 25 см³ та доводили ацетонітрилом до мітки. Отриманий розчин (Розчин 2) мав концентрацію 500 мкг/см³. 0,25 см³ Розчину 1 переносили у мірну колбу на 25 см³ та доводили ацетонітрилом до мітки. Отриманий розчин (Розчин 3) мав концентрацію 10 мкг/см³.

Визначення вмісту досліджуваних сполук проводились на комбінованій системі ВЕРХ-МС – рідинний хроматограф 1260 Infinity та детектор 6530 Accurate Mass Q-TOF, «Agilent Technologies» за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 100 × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсілільним для хроматографії з розміром частинок 3,5 мкм;

- рухома фаза: ацетонітрил – 0,1% розчин водний мурашиної кислоти (50:50);

- швидкість елюювання: 0,5 мл/хв;

- температура колонки: 35 °С;

- об'єм інжекції: 5 мкл;

- час проведення аналізу: 10 хв;

- детектування: довжина хвилі $\lambda = 272$ нм.

Кількісне визначення кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2²,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполук А, В та С) у сироватці крові щурів. Сполуки вводили внутрішньовенно або перорально у вигляді суспензії, стабілізованої метилцелюлозою (0,5 %). Через певні проміжки часу після введення (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 год після внутрішньовенного введення та через 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 год після перорального) тварин піддавали хлороформному наркозу та декапітували, збираючи кров у центрифужні пробирки. Зразки крові витримували 0,5 год при 37 °С, сироватку крові відділяли центрифугуванням (15 хв, 6000 об/хв). До 200 мкл сироватки додавали 300 мкл суміші 7 % перхлорна кислота - ацетонітрил (60:40) для осадження білків, перемішували та центрифугували (8000 об/хв, 5

°C, 20 хв). Супернатант фільтрували через мікропористий фільтр (20 мкм), визначали вміст досліджуваної речовини методом ВЕРХ у зазначених умовах з об'ємом ін'єкції проби 20 мкл. Розрахунок концентрації сполуки у сироватці крові (C, мкг/см³) здійснювали за формулою:

$$C = Q \frac{(V1 + V2) * 1000}{V1 * V3}$$

де: Q - кількість сполуки, визначена у пробі інжекції за калібрувальним графіком;

V1 - об'єм сироватки крові, мкл;

V2 - об'єм розчину перхлорної кислоти з ацетонітрилом

V3 - об'єм ін'єкції, мкл;

1000 - фактор перерахунку на 1 см³.

Розрахунки параметрів фармакокінетики проводили у відповідності до однокарменої моделі розподілу речовин в організмі без всмоктування (за внутрішньовенного введення), або із всмоктуванням (за перорального введення) [26, 33, 49, 75].

Загальна схема представлена на рис. 2.4.

Лінеаризацією фармакокінетичних даних на термінальній ділянці концентраційної кривої у напівлогарифмічних координатах ($\ln C_t - t$) визначали величину константи елімінації, як кут нахилу прямої ($\text{tg } \alpha = k_{el}$).

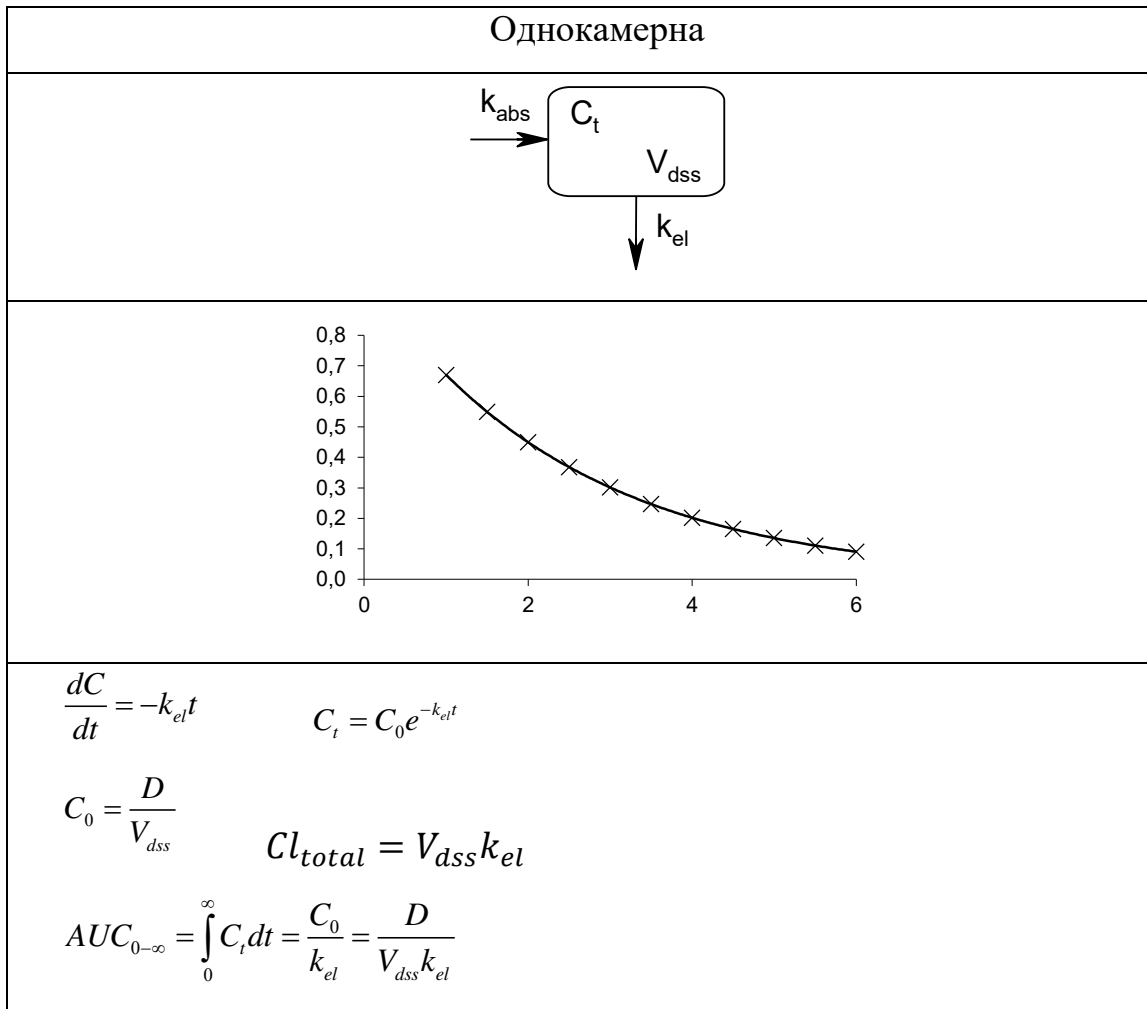


Рис. 2.4 Однокамерна модель розподілу речовини в організмі та розрахунки відповідних фармакокінетичних параметрів. Примітка: D – доза сполуки, V_{dss} – об'єм розподілу, k_{abs} – константа абсорбції, k_{el} – константа елімінації, C_t – концентрація сполуки в крові в момент часу t , C_0 – теоретично розрахована концентрація сполуки в крові в момент часу 0 , Cl_{total} – загальний кліренс.

При аналізі фармакокінетичних даних, коли виключений процес всмоктування (внутрішньовенне введення), відрізок на осі ординат дорівнює $\ln C_0$ (C_0 – теоретично розрахована концентрація сполуки в крові в початковий момент часу). Об'єм розподілу (V_{dss}) – фіктивний об'єм плазми, який необхідний для того, щоб розчинити дозу сполуки D до концентрації, яка визначається. Він визначається, як $V_{dss} = \frac{D}{C_0}$. Кліренс – умовний об'єм плазми/крові, що очищується від сполуки за одиницю часу.

Величину $AUC_{0-\infty}$ на підставі експериментальних даних визначали як суму площ під концентраційною кривою речовини в органі (чи тканині) протягом експерименту (розраховується методом трапецій) та площею під термінальною ділянкою кривої (як співвідношення термінальної концентрації речовини у органі до константи її елімінації, k_{el}):

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty} = C_{t_1}t_1 + \sum_{i=t_2}^t \frac{(C_{t_i} + C_{t_{i+1}})}{2} (t_{i+1} - t_i) + \frac{C_t}{k_{el}}$$

Площу під першим моментом фармакокінетичної кривої (Area under first-moment curve, AUMC) розраховували аналогічно методом трапецій під кривою $C_t * t - t$ до моменту часу t , та на термінальній ділянці, як $AUMC_{0-\infty} = \frac{C_t * t}{k_{el}} + \frac{C_t * t}{k_{el}^2}$. Співвідношення $\frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}} = MRT$, де MRT – середній час утримання сполуки в організмі (mean residence time).

Величину константи абсорбції розраховували з фармакокінетичних даних після перорального введення сполуки методом послідовного логарифмування.

Співвідношення повних площ під фармакокінетичними кривими сполуки в крові після перорального ($AUC^{p.o}$) та внутрішньовенного ($AUC^{i.v.}$) введень з урахуванням корекції доз дорівнює f – величині біодоступності сполуки при пероральному введенні.

2.6 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу

Статистичне оцінювання проводили згідно стандартних методів [17]. Визначення характеру розподілу ознак у виборці проводили за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для всіх кількісних даних вираховували середнє арифметичне (M) та стандартну похибку середнього (m). Статистичний аналіз проводили із використанням ліцензійної програми Statistica, ver.6.0. Для оцінки вірогідності різниці кількісних показників двох груп за умов нормального розподілу використовували t -критерію Ст'юдента. У випадку

ненормального розподілу для оцінки вірогідності різниці між двома незв'язаними виборками використовували U-критерій Mann-Whitney і Вілкоксона [40]. Достовірність відмінностей між трьома та більше групами даних оцінювали із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу за умов нормального розподілу, або із використанням непараметричного критерію Крускала-Уолліса в залежності від характеру розподілу величин параметрів в групі. Різницю між групами вважали вірогідною за рівня значущості 95% ($p < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

СКРИНІНГ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ 4-R-2,2-
ДІОКСО-1*H*-2λ⁶,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ

Проблема пошуку активних та безпечних лікарських засобів для лікування захворювань, які супроводжуються больовим та запальним синдромом, є одним з пріоритетних напрямків фармацевтичної хімії та фармакології. На сьогоднішній день відомі багато лікарських засобів з такою дією, які належать до різних хімічних класів, проте чільне місце займають похідні карбонових кислот. На кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету традиційно досліджуються похідні бензотіазин-3-карбонових кислот та продуктів їх хімічної модифікації, серед яких виявлені сполуки із потужними знеболюючими та протизапальними властивостями [231]. В продовження отриманих результатів були отримані ефіри та карбоксаміди 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонвої кислоти із різними замісниками, серед яких, за даними рентгеноструктурного аналізу, були виділені різні поліморфні кристалічні модифікації.

Метою цього розділу було провести скринінгові дослідження анагетичної та протизапальної активності серед похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот та їх поліморфних модифікацій.

Оскільки сполуки, що досліджуються, за своєю структурою є похідними оксикамів – відомого класу нестероїдних протизапальних засобів, скринінг їх базових фармакологічних ефектів проводили на моделі карагенінового набряку задньої кінцівки щура (див. розділ 2). Їх антигіпералгезивна та антифлогогенна дії порівнювали із першим препаратом цього класу – піроксикамом, а також найбільш подібними за хімічною будовою препаратми лорноксикамом та мелоксикамом. Всі препарати та сполуки досліджували в скринінговій дозі 20 мг/кг в/оч у вигляді водної суспензії після її стабілізації

Твін-80, а тварини контрольної групи отримували еквіоб'ємні кількості дистильованої води та Твін-80.

3.1 Оцінка протизапальної та аналгетичної активності похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату

Перша група сполук представляє собою складні ефіри 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти, які були отримані алкілюванням відповідної натрієвої солі йодетаном в ДМСО при кімнатній температурі. В результаті цих перетворень разом з атомом кисню карбоксильної групи алкілюється також гетероатом азоту. Продуктами досліджуваної реакції є суміш етил 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (основний продукт) та його 1-етилзаміщеного аналога (мінорна сполука). Крім того, було виявлено, що гетерогенна кристалізація з етанолу призводить до моноклінної поліморфної форми етил 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (2М), тоді як гомогенна кристалізація призводить до його ромбічної форми (2О). Будова молекули з нумерацією атомів представлена на рис. 3.1.

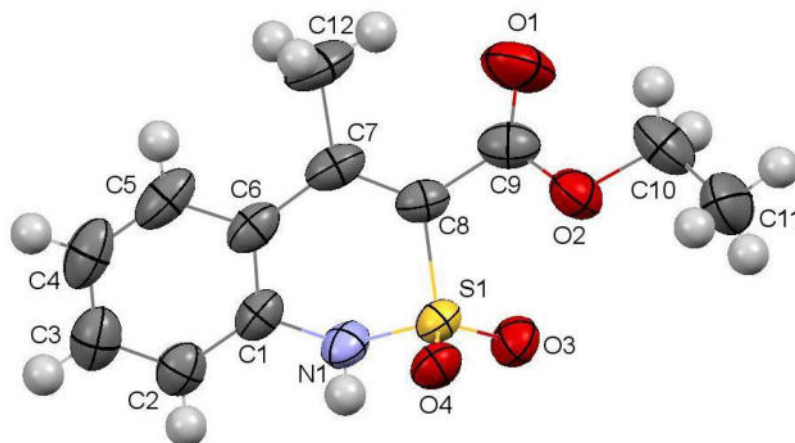


Рис. 3.1 Будова молекули етил 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату [227].

Результати дослідження протизапальної і анальгетичної активності етил 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин карбоксилату (сполуки NI-75, NI-77 та, NI-79), представлені в таблицях 3.1 і 3.2.

Таблиця 3.1

Протизапальна активність похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин карбоксилатів в порівнянні з референс-препаратами

($M \pm m$, $n = 5$)

Сполука, лабораторний шифр	R, форма	Об'єм ушкодженої кінцівки, (мм ³)	Об'єм неушкодженої кінцівки, (мм ³)	Приріст об'єму	АЕА (%)
NI-75	H (2M)	377,1 ± 29,9	318,3 ± 20,4	58,8 ± 5,81 ^{1,2,3}	85,8
NI-77	H (2O)	564,0 ± 23,3	449,5 ± 23,9	286,7 ± 8,64 ^{1,2,3}	30,7
NI-79	Et	643,5 ± 32,0	355,2 ± 21,2	288,2 ± 18,0 ^{1,2,3}	30,3
Піроксикам	-	566,7±160,4	342,8 ± 19,8	223,8 ± 6,13 ^{1,2,3}	45,9
Лорноксикам	-	360,5 ± 26,4	263,9 ± 19,8	96,58 ± 7,62 ^{1,3}	76,7
Мелоксикам	-	492,6 ± 39,3	361,2 ± 26,1	131,3 ± 8,05 ^{1,2}	68,3
Диклофенак	-	397,6 ± 11,9	306,6 ± 9,36	91,05 ± 5,52 ^{1,3}	78,0
Контроль	-	768,7 ± 27,3	354,9 ± 11,6	413,7 ± 32,2	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно мелоксикаму.

Таблиця 3.2

Аналгетична активність похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин карбоксилатів в порівнянні з референс-препаратами (M ± m, n = 5)

Сполука, лабораторний шифр	R, форма	ПБЧ на ушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	ПБЧ на неушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	Δ ПБЧ	АА, (%)
NI-75	H (2M)	370,0 ± 15,2	340,0 ± 17,03	30,0 ± 4,47 ^{1,2,3}	90,6
NI-77	H (2O)	344,0 ± 28,8	236,0 ± 11,4	108,0 ± 8,60 ^{1,2,3}	66,0
NI-79	Et	380,0 ± 10,5	220,0 ± 13,4	160,0 ± 10,5 ^{1,2,3}	49,7
Піроксикам	-	504,0 ± 18,1	340,0 ± 15,2	164,0 ± 8,12 ^{1,2,3}	48,4
Лорноксикам	-	441,0 ± 25,6	346,0 ± 23,4	95,0 ± 4,47 ^{1,2}	70,1
Мелоксикам	-	414,0 ± 19,6	326,0 ± 26,4	88,0 ± 11,6 ^{1,2}	72,3
Диклофенак	-	738,0 ± 18,3	679,0 ± 25,4	59,0 ± 9,27 ¹	81,4
Контроль	-	593,0 ± 56,3	275,0 ± 32,1	318,0 ± 34,9	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно мелоксикаму.

Аналіз результатів свідчить про те, що етил 1-етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилат (сполука NI-79), мало цікавий як об'єкт для подальшого фармакологічного дослідження. Підставою для такого висновку був дуже помірний аналгетичний і вкрай слабо виражений протизапальний ефект, продемонстрований цією сполукою (антиексуативна та аналгетична активності становили 49,7 та 30,3 %, відповідно, p > 0,05). Однак для розкриття закономірностей взаємозв'язку «структура–діяльність», які є

важливими для подальших цілеспрямованих пошуків нових біологічно активних речовин, така інформація також є цінною.

Водночас, отримані кристалічні модифікації етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (сполуки NI-75 та NI-77) показали досить різні біологічні властивості, хоча насправді це одна і та сама речовина. Так якщо ромбічна форма 2O (сполука NI-77) має достатньо вираженою знеболюючою дією (аналгетична активність 66,0 %), і дуже слабку протизапальну дію (антиексудативна активність 30,7 %), то моноклінна форма 2M (сполука NI-75) за тих же умов і в тій же дозі була одночасно потужним знеболюючим і антиексудативним засобом (її аналгетична та антиексудативна активності становили 90,6 та 85,8 %, відповідно), що значно перевищувало не тільки показники піроксикаму, а й більш активний за цими властивостями мелоксикам і лорноксикам ($p < 0,05$). Все це дає підстави стверджувати, що особливості кристалічної структури ефірів бензотіазин-3-карбонових кислот значною мірою зумовлює їх фармакодинамічні ефекти.

3.2 Оцінка знеболюючої та протизапальної активності поліморфних модифікацій N-(2,6-діметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів

Проведені хіміками-синтетиками попередні дослідження показали, що клас 2,1-бензотіазинів є дуже привабливим для поліморфного скринінгу та утворювати поліморфні модифікації з різні біологічними властивостями [207, 227, 230]. Будучи найближчими структурним аналогами піроксикаму [4-гідрокси-2-метил-N-(піридин-2-іл)-2*H*-бензо[*e*][1,2]тіазин-3-карбоксамід 1,1-діоксид], 2,1-бензотіазини володіють виразними знеболювальними, протизапальними та сечогінними активностями [207, 227, 229, 230].

Тому зрозумілим є подальший пошук біологічно активних молекул цього хімічного класу. Дослідження N-(2,6-діметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-

діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду показали, що в процесі органічного синтезу за допомогою різних розчинників отримано енантіоморфні різновиди цієї сполуки. Загальна хімічна формула та просторова будова наведена на рис. 3.2.

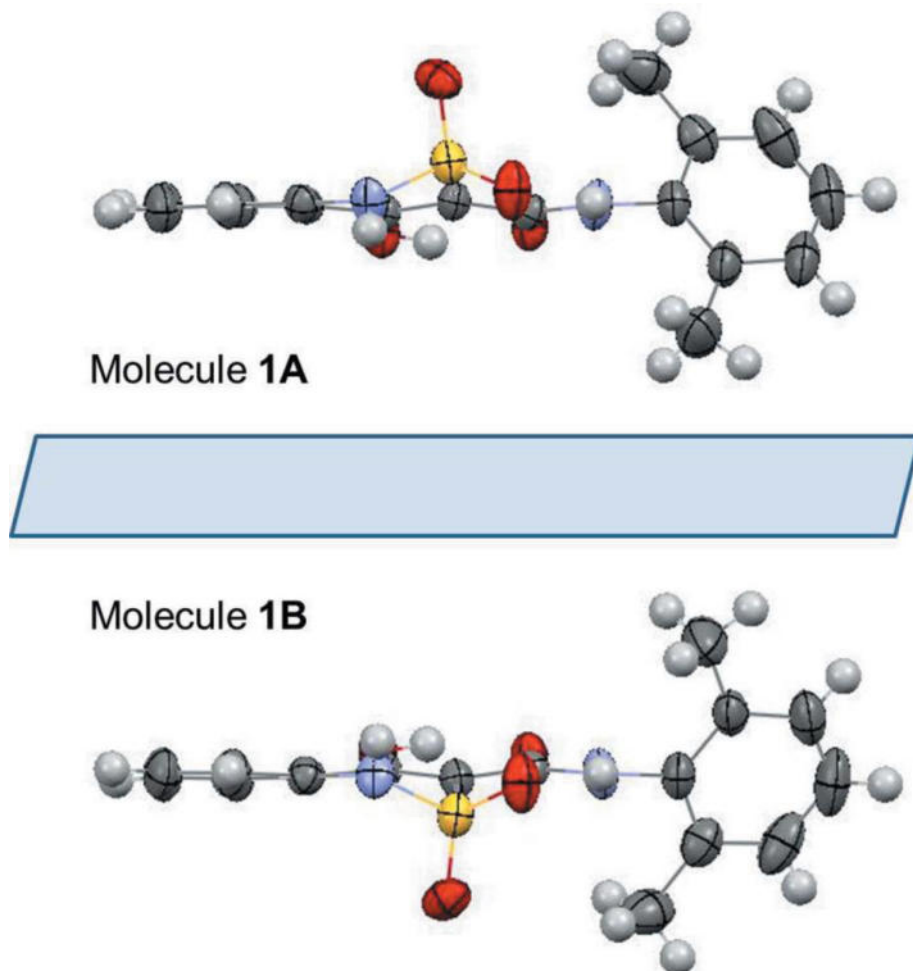


Рис. 3.2 Просторова будова N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду. Молекула 1A – сполука з лабораторним шифром NI-34, молекула 1B – сполука з лабораторним шифром NI-35. [206].

Виявлено, що ці сполуки є дзеркальними відображеннями один одного. Однак, дослідження біологічної активності показало, що ці сполуки відрізняються виразністю як знеболюючого, так і аналгетичного ефектів (табл. 3.3., 3.4).

Таблиця 3.3

Протизапальна активність енантіоморфних форм N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду та референтних препаратів ($M \pm m$, $n = 5$)

Сполука, лабораторний шифр	Об'єм ушкодженої кінцівки, (мм ³)	Об'єм неушкодженої кінцівки, (мм ³)	Приріст об'єму	АЕА (%)
NI-34	610,4 ± 53,3	386,8 ± 51,9	233,6 ± 27,5 ^{1,2}	22,1
NI-35	519,2 ± 33,0	405,7 ± 30,0	113,5 ± 23,7 ^{1,2}	62,2
Піроксикам	566,7±160,4	342,8 ± 19,8	223,8 ± 6,13 ^{1,2,3}	45,9
Лорноксикам	360,5 ± 26,4	263,9 ± 19,8	96,58 ± 7,62 ¹	76,7
Мелоксикам	492,6 ± 39,3	361,2 ± 26,1	131,3 ± 8,05 ^{1,2,3}	68,3
Диклофенак	397,6 ± 11,9	306,6 ± 9,36	91,05 ± 5,52 ¹	78,0
Контроль	768,7 ± 27,3	354,9 ± 11,6	413,7 ± 32,2	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно мелоксикаму.

Виявилося, що сполука NI-34 має більш потужні аналгетичні і відносно слабкі протизапальні властивості, які становили 64,7 та 22,1 % відповідно. На противагу, її дзеркальний поліморф (сполука NI-35) виявилась слабким аналгетиком (ця активність становила 26,3 %), і більш виразні протизапальні властивості (антиексудативна активність становила 62,2 %). Жодна з цих активностей у сполук цієї структури не сягали рівня диклофенаку, мелоксикаму або лорноксикаму, хоча подекуди перевершувала піроксикам.

Аналгетична активність енантіоморфних форм N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду та референтних препаратів (M ± m, n = 5)

Сполука, лабораторний шифр	ПБЧ на ушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	ПБЧ на неушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	Δ ПБЧ	АА, (%)
NI-34	428,0 ± 26,5	347,5 ± 20,7	80,5 ± 8,6 ^{1,2}	64,7
NI-35	431,0 ± 17,2	263,0 ± 14,6	168,0 ± 9,30 ^{1,2,3}	26,3
Піроксикам	504,0 ± 18,1	340,0 ± 15,2	164,0 ± 8,12 ^{1,2,3}	48,4
Лорноксикам	441,0 ± 25,6	346,0 ± 23,4	95,0 ± 4,47 ^{1,2}	70,1
Мелоксикам	414,0 ± 19,6	326,0 ± 26,4	88,0 ± 11,6 ^{1,2}	72,3
Диклофенак	738,0 ± 18,3	679,0 ± 25,4	59,0 ± 9,27 ^{1,3}	81,4
Контроль	593,0 ± 56,3	275,0 ± 32,1	318,0 ± 34,9	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно мелоксикаму.

3.3 Оцінка знеболюючої та протизапальної активності похідних N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду

В наступній серії дослідів було вивчено фармакологічну активність різних кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамиду. Причина вибору цієї сполуки в якості об'єкта дослідження була висока знеболююча активність, продемонстрована нею під час попередніх скринінгових тестувань [192].

В процесі хімічного синтезу були отримані різні кристалічні модифікації N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки з лабораторними шифрами NI-50, NI-51, NI-52) шляхом простої кристалізації з органічних розчинників, які широко використовуються і є фармацевтично прийнятними [92]. В результаті було виявлено, що кристалізація із етилацетату, мета-ксилолу або орто-ксилолу забезпечує утворення трьох візуально абсолютно різних видів безбарвних кристалів — довгих паличок квадратного перерізу (форма А), тонкі долотоподібні пластини (форма В) або подовжені блоки без певних геометричних структурою і схожі на гілки дерев (форма С) відповідно (рис. 3.3.).

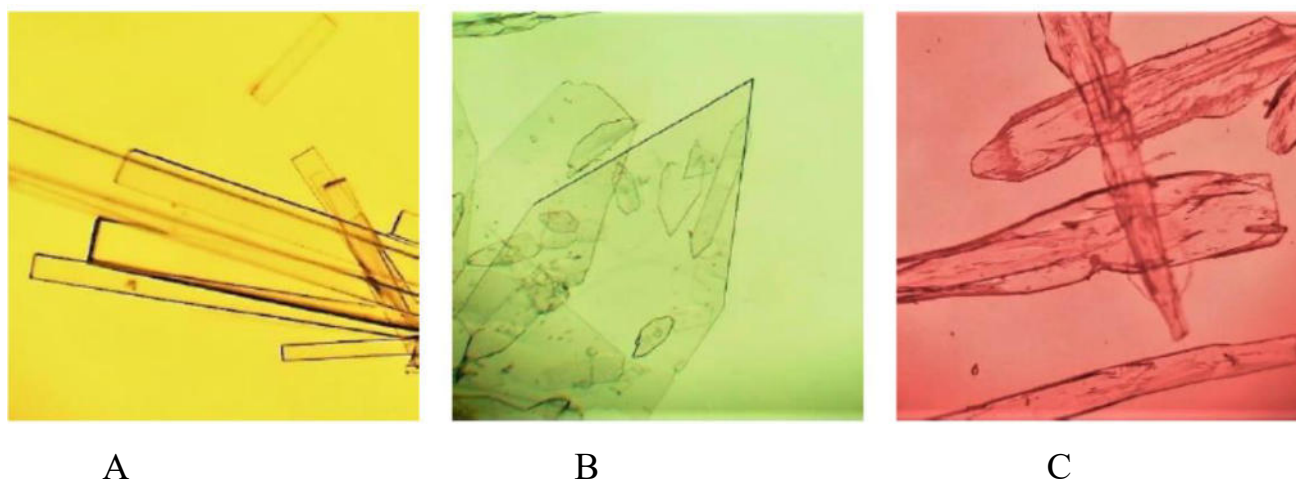


Рис. 3.3 Кристалічні поліморфи N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, отримані з етилацетату (форма А), мета-ксилолу (форма В) та орто-ксилолу (форма С) [224].

Результати дослідження їх базових фармакологічних ефектів наведені в табл. 3.5 та 3.6.

Протизапальна активність поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та референтних препаратів ($M \pm m$, $n = 5$)

Сполука, лабораторний шифр	Об'єм ушкодженої кінцівки, (мм ³)	Об'єм неушкодженої кінцівки, (мм ³)	Приріст об'єму	АЕА (%)
NI-50 (A)	502,7 ± 54,0	441,1 ± 35,3	61,7 ± 22,6 ^{1,2}	79,7
NI-51 (B)	560,8 ± 29,7	515,8 ± 27,9	45,0 ± 16,3 ^{1,2,3}	85,2
NI-52 (C)	453,8 ± 15,9	395,2 ± 28,7	58,1 ± 11,3 ^{1,2,3}	80,9
Піроксикам	566,7 ± 160,4	342,8 ± 19,8	223,8 ± 6,13 ^{1,2,3}	45,9
Лорноксикам	360,5 ± 26,4	263,9 ± 19,8	96,58 ± 7,62 ¹	76,7
Мелоксикам	492,6 ± 39,3	361,2 ± 26,1	131,3 ± 8,05 ^{1,2,3}	68,3
Диклофенак	397,6 ± 11,9	306,6 ± 9,36	91,05 ± 5,52 ¹	78,0
Контроль	768,7 ± 27,3	354,9 ± 11,6	413,7 ± 32,2	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно мелоксикаму.

Встановлено, що всі без винятку зразки мають потужний знеболюючий та протизапальний ефект, однак ступінь їх коливався. Найбільшу активність показала сполука NI-51 (сполука B), показники антифлогогенної та анальгетичної активності якої становили 85,2 та 93,5 %, що було вищим за всі інші сполуки та за препарати порівняння ($p < 0,05$). Сполука 52 (сполука C) поступалась силі цих ефектів, і найменш активно виявилась сполука NI-50 (сполука A). Їх анальгетичні активності були 92,6 та 82,2 %, відповідно, а протинабрякові активності – 80,9 та 79,7 %, відповідно. Обидві поліморфні форми перевершували за своєю дією не тільки піроксикам, але і інші представники НПЗЗ: лорноксикам, диклофенак та мелоксикам, взяті в аналогічних дозах.

Аналгетична активність поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та референтних препаратів ($M \pm m, n = 5$)

Сполука, лабораторний шифр	ПБЧ на ушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	ПБЧ на неушкодженій кінцівці, (г/мм ²)	Δ ПБЧ	АА, (%)
NI-50 (A)	506,2 ± 8,08	467,8 ± 15,3	38,38 ± 8,80 ^{1,2,3}	82,2
NI-51 (B)	528,00 ± 14,3	514,0 ± 14,0	14,00 ± 2,45 ^{1,2,3}	93,5
NI-52 (C)	454,0 ± 12,1	438,0 ± 12,0	16,00 ± 2,45 ^{1,2,3}	92,6
Піроксикам	504,0 ± 18,1	340,0 ± 15,2	164,0 ± 8,12 ^{1,2,3}	48,4
Лорноксикам	441,0 ± 25,6	346,0 ± 23,4	95,0 ± 4,47 ^{1,2}	70,1
Мелоксикам	414,0 ± 19,6	326,0 ± 26,4	88,0 ± 11,6 ^{1,2}	72,3
Диклофенак	738,0 ± 18,3	679,0 ± 25,4	59,0 ± 9,27 ^{1,3}	81,4
Контроль	593,0 ± 56,3	275,0 ± 32,1	318,0 ± 34,9	0

Примітки:

- ¹ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно диклофенаку;
- ³ - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно мелоксикаму.

Таким чином, серед досліджених сполук лише у похідних N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду виявлені потужні знеболюючі та антифлогогенні ефекти, які за ступенем виразності на моделі карагенінового набряку перевершували всі препарати порівняння. За спроможністю усувати запальну гіпералгію їх можна розташувати в наступній послідовності сполука В > сполука С > сполука А.

Висновок до розділу 3

Серед похідних 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти хімічним синтезом було отримано моноклінну та ромбічну

поліморфної форми етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату (сполука NI-75 та сполука NI-77). Отримані кристали ромбічної форми виявили помірну знеболюючу дію (66,0 %), і дуже слабку протизапальну дію (30,7 %), тоді як моноклінна форма – потужні анальгетичну та антиексудативну активності (90,6 та 85,8 %, відповідно), що перевищувало дію інших представників класу оксикамів ($p < 0,05$).

Серед синтезованих за участі різних розчинників *N*-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів отримано енантіоморфні (дзеркальні) різновиди (сполука NI-34, сполука NI-35), які відрізнялись силою анальгетичної та протизапальною дії. Перша мала більш потужні анальгетичні і відносно слабкі протизапальні властивості, які становили 64,7 та 22,1 % відповідно, натомість її дзеркальний поліморф виявилась слабким анальгетиком (26,3 %) з більш виразними протизапальними властивостями (62,2 %).

В процесі хімічного синтезу *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду з різних розчинників було отримано три видів кристалів, ідентичних за всіма параметрами внутрішньої структури, які розрізнялись лише габітусом — палички (форма А, сполука NI-50), пластини (форма В, сполука NI-51) та блоки (форма С, сполука NI-52). Скринінгові дослідження на моделі карагенінового набряку у щурів показали, що всі зразки в дозі 20 мг/кг внутрішньочеревно зменшують гіперальгезію та набряк ураженої кінцівки. Найбільшу активність показала сполука В, показники антифлогогенної та анальгетичної активності якої становили 85,2 та 93,5 %, що було вищим за всі інші сполуки та за препарати порівняння ($p < 0,05$). Сполука С поступалась силі цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі сполуки перевершували за своєю активністю препарати порівняння.

Таким чином, лише кристалічні форми *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду одночасно

виявляли виразні протизапальну та знеболюючу активності, тому для подальших поглиблених досліджень були обрані саме ці сполуки (А, В, та С).

Результати цього розділу опубліковані в наступних працях: [7, 11, 13, 47, 206, 224, 225, 227].

РОЗДІЛ 4

ПОГЛИБЛЕНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛГЕТИЧНОЇ ДІЇ ПОЛІМОРФНИХ
ФОРМ N-(4-ТРИФТОРМЕТИЛФЕНІЛ)-4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1*H*-2λ⁶,1-
БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДУ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ БОЛЬОВОЇ
ПЕРЦЕПЦІЇ

Результати, наведені в попередньому розділі, переконливо засвідчили, що саме сполукам цієї хімічної будови слід приділити більше уваги на предмет виявлення серед них найбільш активної композиції із знеболюючою та протизапальною діями з метою створення на її основі нового лікарського засобу із зазначеними ефектами.

Для відповіді на це питання в цій частині роботи було досліджено антиноціцептивну дію трьох різних кристалічних форм (сполука А, сполука В та сполука С) в скринінговій дозі 20 мг/кг за різних режимів введення (перорального та внутрішньочеревного) на моделях соматичного, вісцерального та нейрогенного больового синдрому.

Враховуючи погану розчинність досліджуваних зразків в воді, їх досліджували у вигляді водної суспензії після стабілізації Твін-80.

4.1 Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі вісцерального больового синдрому

Для відтворення вісцерального больового синдрому згідно методичних рекомендацій з доклінічних досліджень, було обрано модель хімічної стимуляції ноціцепторів очеревини оцтовою кислотою (модель «оцтово-кислих корчів» у мишей. Ця модель дозволяє оцінити периферичний компонент у механізмі знеболюючого ефекту досліджуваних зразків [83].

Детальний опис експерименту наведений в розділі 2. Досліджувані зразки вводили в/оч зв 30 хв до введення подразника або в/шл за 60 хв до індукції корчів. Спостереження за тваринами проводили протягом 20 хв. Результати наведені на рис. 4.1. та в табл. 4.1.

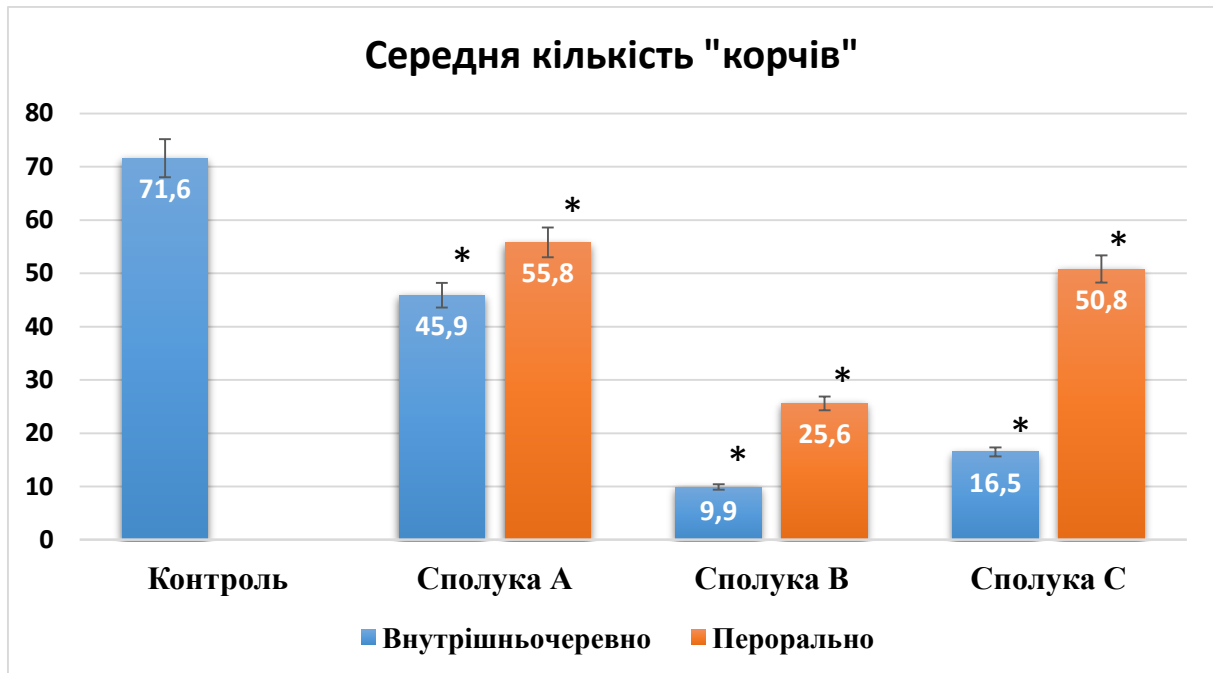


Рис. 4.1 Кількість спастичних скорочень черевних м'язів тварин на тлі введення кристалічних форм (сполуки А, В та С), (n=10). Примітка: * – статистично значуще зменшення кількості корчів щодо контролю

Показано, що в групі контролю у всіх тварин введення оцтової кислоти викликало характерні скорочення абдомінальних м'язів із їх подальшим розслабленням, вигинання спини, витягування кінцівок. За період спостереження кількість таких рухів становила в середньому 71,6. Попереднє введення тест-зразків, що досліджувались, статистично вірогідно зменшувало кількість больових реакцій. При в/оч введення, всіх трьох кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, кількість корчів статистично вірогідно зменшувалась, однак сила їх знеболюючого ефекту сильно варіює і зменшується в такому порядку: В > С >> А. Іншими словами, пластили (сполука В) усувають соматичний вісцеральний біль найбільш ефективно (87,5 %). Блоки (сполука С) трохи

поступаються їм (76,9 %) за цим показником, в той час як палички (сполука А зменшують) кількість «корчів» лише на 35,1 %, що дозволяє вважати цю кристалічну форму бензотіазин-3-карбоксаміду помірно діючим анальгетиком.

Таблиця 4.1

Аналгетична активність сполук А, В та С за різних шляхів введення у на моделі «оцтово-кислих корчів» мишей (%)

Експериментальні групи	Внутрішньочеревне введення	Внутрішньошлункове введення
	Відсоток інгібіції числа «корчів»	
Сполука А	35,1	21,1
Сполука В	87,5	67,6
Сполука С	76,9	29,1

При зміні способу введення на внутрішньо шлунковий сила дії всіх сполук зменшувалась (див. рис. 4.1. та табл. 4.1), однак тенденція переважання сполуки В не змінилась: $V \gg C > A$, однак за цих умов експерименту сполука С виявила слабкий аналгетичний ефект (показник її знеболювальної дії наближався до такого у сполуки А - 29,1 %).

4.2 Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі термічного подразнення

В дослідженні використано три моделі, які дозволяють оцінити центральний компонент больової чутливості. Перша з них – тест «гаряча пластина». Досліди виконані на самцях білих щурів лінії Wistar. Досліджувани

тест-зразки вводили за двох режимів (див. вище) за 1 год до термічного стимулу. Результати наведені в табл. 4.2.

Виявлено, що всі три сполуки виявляли знеболюючий ефект як за в/оч, так і за в/шл введення тваринам, про що свідчить подовження тривалості латентного періоду больової реакції.

Таблиця 4.2

Влив кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на тривалість латентного періоду больової реакції в тесті «гаряча пластина» (M ± m, n = 7)

Експериментальні групи	Латентний період больової реакції, сек		
	I фаза	II фаза	Загальна тривалість латенції
Сполука А (в/оч)	11,87 ± 0,65 ^{1,2}	12,46 ± 0,57 ^{1,2}	24,33 ± 0,68 ^{1,2}
Сполука А (в/шл)	13,15 ± 0,82 ^{1,3}	10,42 ± 0,32 ^{1,3}	23,56 ± 0,97 ¹
Сполука В (в/оч)	16,87 ± 0,49 ¹	15,75 ± 0,63 ¹	32,62 ± 0,46 ¹
Сполука В (в/шл)	12,89 ± 0,45 ^{1,3}	11,60 ± 0,79 ^{1,3}	24,49 ± 0,69 ^{1,3}
Сполука С (в/оч)	10,61 ± 0,53 ^{1,2}	10,60 ± 1,26 ^{1,2}	21,20 ± 1,59 ^{1,2}
Сполука С (в/шл)	10,21 ± 0,55 ^{1,2,3}	11,07 ± 1,51 ¹	21,29 ± 1,70 ^{1,2,3}
Контроль	8,05 ± 0,82	7,08 ± 1,24	15,13 ± 1,34

Примітки:

- ¹ – статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю;
- ² - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення;
- ³ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно в/оч введення.

Було виявлено, що сполука В вірогідно збільшувала тривалість латентного періоду обох фаз больової реакції (облизування лап та підстрибування тварин) в 2,09 та 2,22 рази порівняно з контролем за в/оч введення і в 1,60 і 1,63 рази за в/шл введення. Саме ця сполука зберігала свої лідируючі позиції як знеболюючий засіб. Загальна тривалість латентного

періоду порівняно з групою контрольних тварин збільшилась в 2,15 та 1,62 рази ($p < 0,05$). Що стосується сполуки С, то вона дещо втратила свої позиції і за ступенем знеболення поступилися місцем сполуці А. На даній моделі експерименту анальгетична дія сполуки С та сполуки А практично не змінилися за перорального та парентерального введення, тобто їх ефект практично не залежав від шляху потрапляння в організм тварини, тоді як в у випадку форми В при пероральному прийомі вона значно зменшується (рис. 4.2).

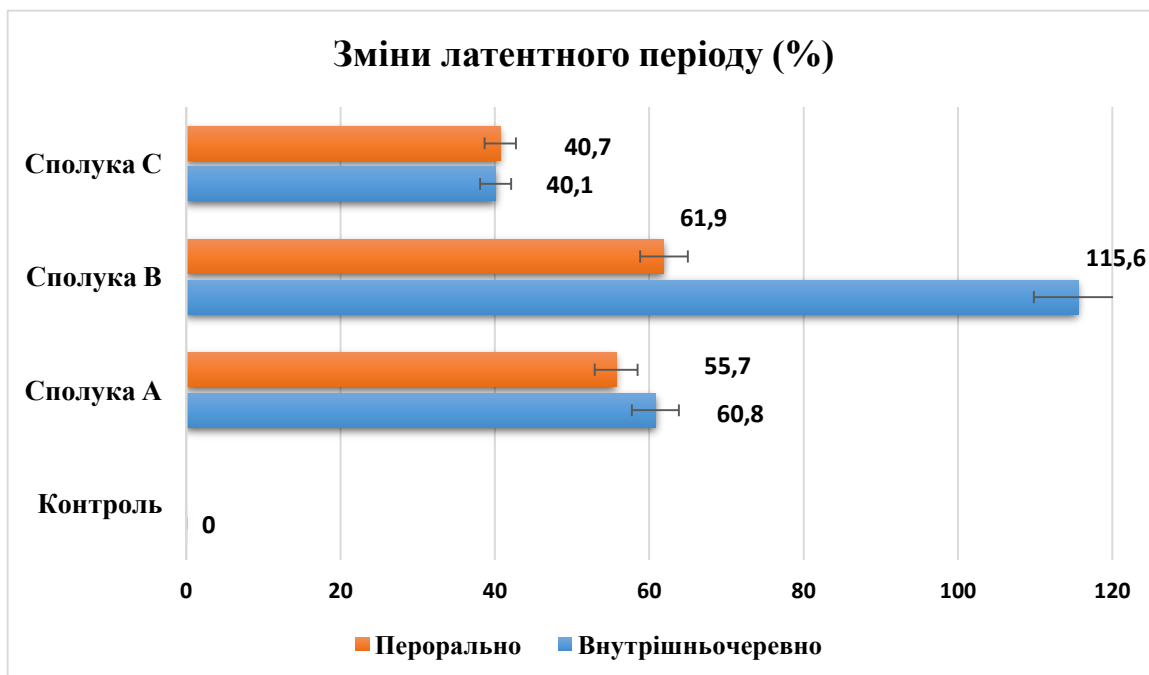


Рис. 4.2 Подовження латентного періоду больової реакції в тесті «гаряча пластина» у щурів на тлі введення кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.

Таким чином, кристалічні форми розташувались наступним чином: В > С > А.

Наступною експериментальною моделлю для оцінки дієвості сполук була модель термічного соматичного болю, а саме «tail-flick», яка базується на спинильному флексорному рефлексі у відповідь на прогресивно зростаючу дію теплового випромінювання. В цьому тесті послідовно активуються терморцептори, С- та Ad- волокна полімодальних ноціцепторів, а також

високопорогові механорецептори [37]. Результати дослідження активності сполук А, В та С за різних шляхів введення наведені в табл. 4.3. та рис. 4.3.

Таблиця 4.3

Влиw кристалічних модифікацій похідного N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на тривалість латентного періоду больової реакції в тесті «tail-flick» (M ± m, n = 7)

Експериментальні групи	Латентний період больової реакції, сек	
	Вихідний рівень	Через 1 годину після введення сполук
Сполука А (в/оч)	2,07 ± 0,13 ^{1,2}	2,86 ± 0,21 ^{1,2}
Сполука А (в/шл)	2,21 ± 0,10 ^{1,3}	2,84 ± 0,28 ¹
Сполука В (в/оч)	1,86 ± 0,14 ¹	3,71 ± 0,18 ¹
Сполука В (в/шл)	1,84 ± 0,12 ^{1,3}	3,14 ± 0,21 ^{1,3}
Сполука С (в/оч)	1,96 ± 0,23 ^{1,2}	3,07 ± 0,44 ^{1,2}
Сполука С (в/шл)	1,93 ± 0,17 ^{1,2,3}	2,71 ± 0,32 ^{1,2,3}
Контроль	1,85 ± 0,14	1,85 ± 0,15

Примітки:

1. ¹ – статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю;
2. ² - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення;
3. ³ - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно в/оч введення.

Було встановлено, що всі три сполуки здатні статистично вірогідно збільшувати тривалість латентного періоду відсмикування хвоста, однак ступінь виразності антиноцицепції була різною. Так, за в/оч введення найбільшу активність продемонструвала сполука В (її антианалгетична активність становила 100,3 %, що було вищим за показник сполуки С та А (їхня активність була 56,6 та 38,8 %, відповідно). Зміна способу введення на в/шл у всі трьох тест-зразків супроводжувалась втратою аналгезуючої активності приблизно на 30 % від попереднього значення.

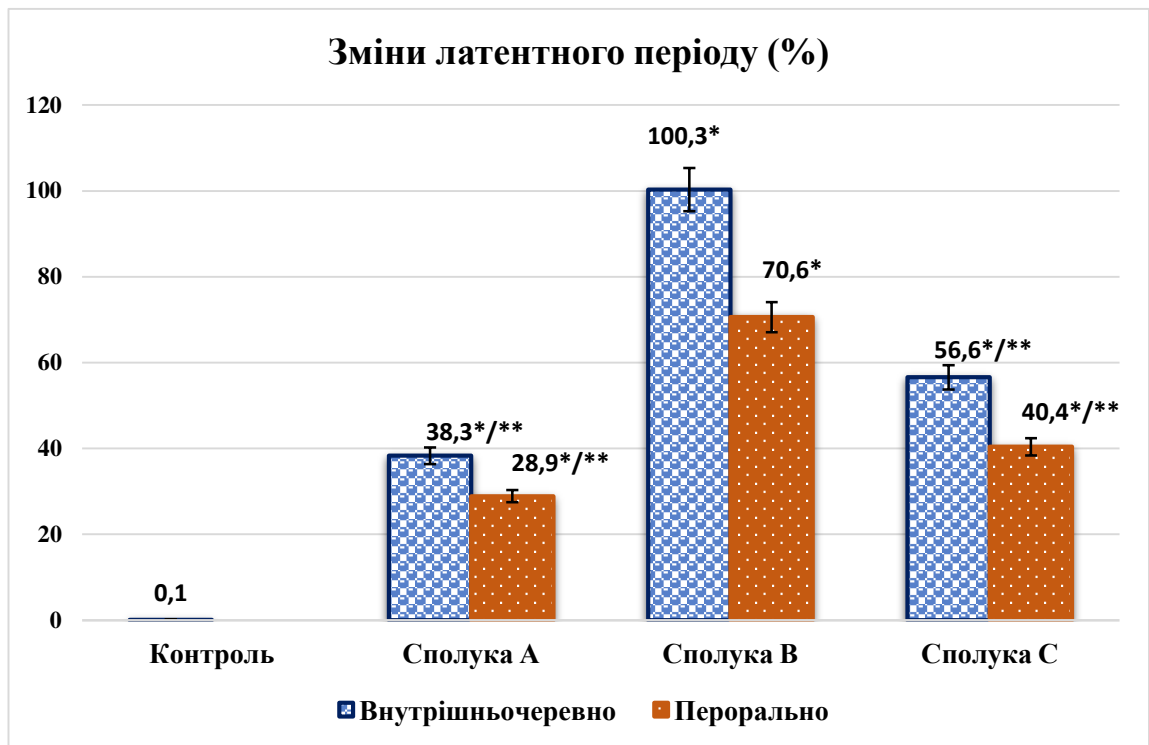


Рис. 4.3 Аналгетична дія кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі термічного подразнення «tail-flick» у щурів (n = 7).

Примітки: * - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю; ** - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

Наступна модель цієї серії дослідів – тест електричної стимуляції кореня хвоста у щурів – дозволила простежити швидкість розвитку та тривалість аналгетичного ефекту кристалічних форм А, В та С N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду. Отримані результати наведені в табл. 4.4. та рис. 4.4 та 4.5.

Можна відмітити, що за обох шляхів введення поліморфна форма у вигляді пластин (сполука В) виявляє швидкий і потужний знеболюючий ефект, який після другої години експерименту починає помітно зменшуватися. Активність сполуки С менш виражена, хоча також досягає свого максимуму на 2-й годині, причому подальше зниження її аналгетичної дії відбувається не так стрімко, як у попереднього кристалічного поліморфу.

Таблиця 4.4

Аналгетична активність кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за різних шляхів введення у на моделі електричного подразнення кореня хвоста щурів ($M \pm m, n = 7$)

Експериментальні групи	Динаміка ПБЧ після введення сполук (mV)				
	Вихідний рівень	1 година	2 години	4 години	6 годин
Сполука А (в/оч)	3,07 ± 0,13	4,23 ± 0,15 */**	4,33 ± 0,20 */**	5,16 ± 0,09 */**	4,31 ± 0,19 */**
Сполука А (per os)	2,93 ± 0,13	3,79 ± 0,15 */**	4,14 ± 0,14 */**	4,33 ± 0,15 *	4,14 ± 0,15 */**
Сполука В (в/оч)	2,79 ± 0,15	5,57 ± 0,35 *	5,77 ± 4,70 *	3,94 ± 0,23 *	3,10 ± 0,17
Сполука В (per os)	3,01 ± 0,18	4,76 ± 0,30 *	5,11 ± 0,31 *	4,29 ± 0,32 *	3,84 ± 0,27 *
Сполука С (в/оч)	3,21 ± 0,15	4,48 ± 0,13 */**	6,04 ± 0,26 */**	5,73 ± 0,32 **/**	3,94 ± 0,22 */**
Сполука С (per os)	3,07 ± 0,23	4,86 ± 0,32 *	5,00 ± 0,35 *	4,43 ± 0,34 *	3,89 ± 0,33*
Контроль	3,00 ± 0,22	3,07 ± 0,17	2,86 ± 0,18	3,07 ± 0,20	2,93 ± 0,20

Примітки:

1. * – статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня;
2. ** - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

Цікаві результати показала поліморфна форма у вигляді паличок (сполука А). На початку дослідження вона виявляла помірну знеболюючу дію, яка почала помітно зростати поступово, і сягала піку своєї активності на 4-ій годині експерименту. Потім зафіксовано поступове зниження її дії, проте навіть після 6-ї години експерименту сполука А зберігала досить високий

рівень активності і залишалась найпотужнішим анальгетиком серед всіх досліджуваних поліморфних форм.

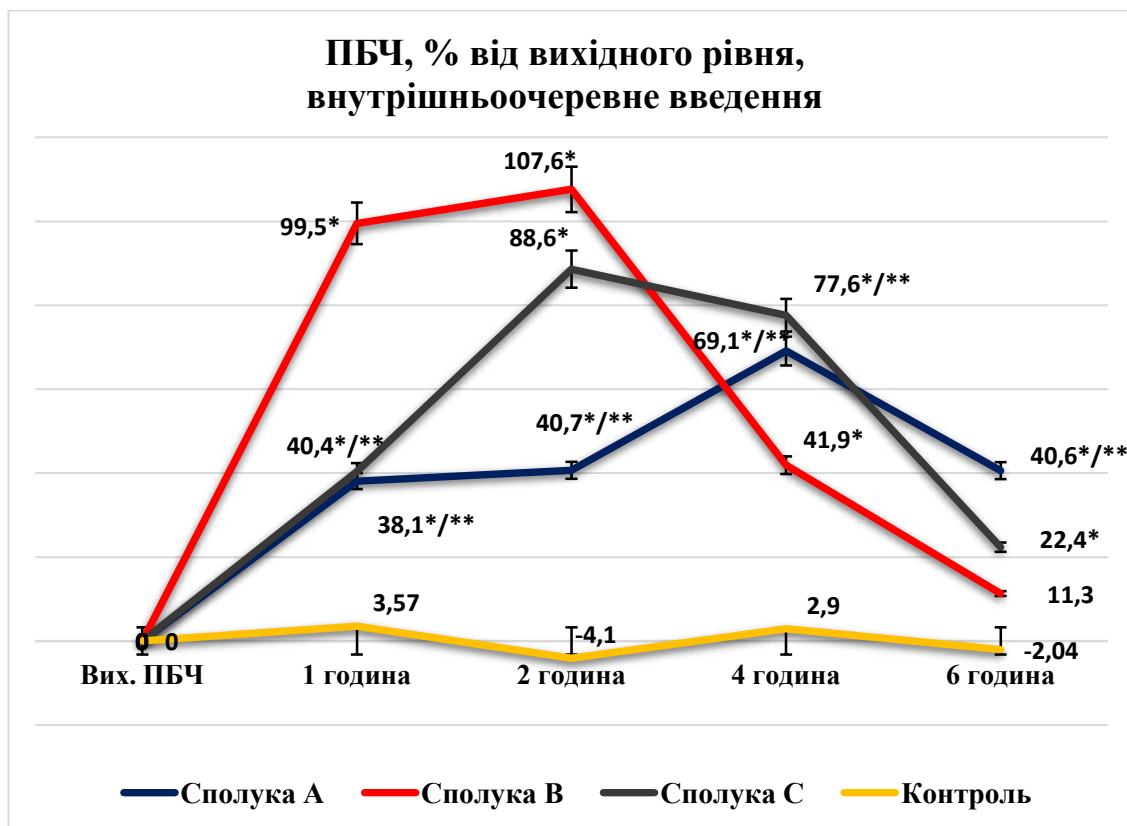


Рис. 4.4 Анальгетична дія кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за їх в/оч введення на моделі електричного подразнення кореня хвоста у щурів (n = 7). Примітки: * - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю; ** - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

Так, на 2-й годині після в/оч введення анальгетична дія сполуки В була в 2,64 та 1,21 рази більшою за сполуки А та С, а на 4-й та 6-й годинах – навпаки, поступалась сполуці А в 1,6 та 3,59 рази, а сполуці С - в 1,12 та 1,98 рази відповідно.

За перорального введення сполуки В і С практично співставлялись за ступенем антиноцицептивної дії у всі терміни дослідження (з незначною

перевагою сполуки В), тоді як сполуки А на 1-й та 2-й годинах поступалась їм приблизно в 1,6-2,0 рази, а на 4-й та 6-й годинах – перевершувала їх активність приблизно в 1,18-1,62 рази, відповідно.

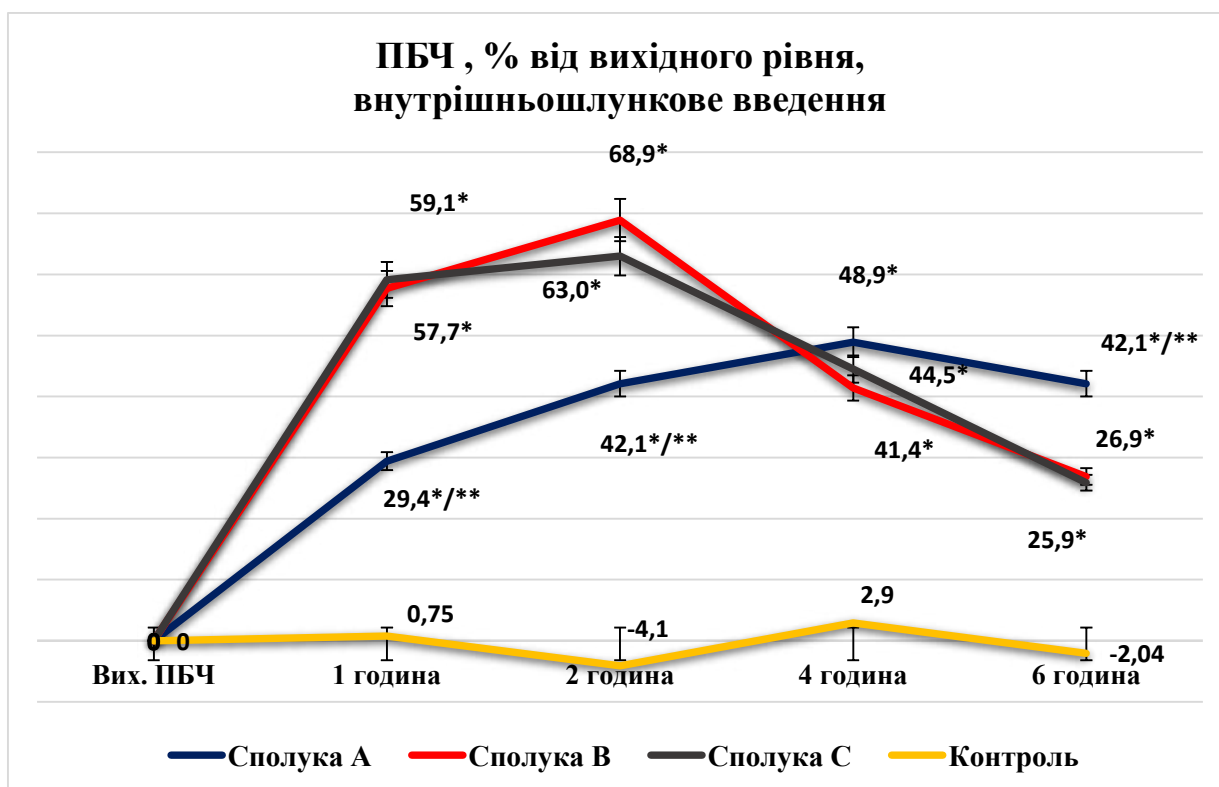


Рис. 4.5 Аналгетична дія кристалічних поліморфів N-(4-рифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за їх перорального введення на моделі електричного подразнення кореня хвоста у щурів (n = 7). Примітки: * - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю; ** - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

Ефекти, які спостерігаються в цій моделі, можуть бути наслідком різної біодоступності досліджуваних кристалічних форм. Навіть без будь-яких розрахунків зрозуміло, що при однаковій масі площа поверхні (і, очевидно, біодоступність) пластинчастих кристалів В буде помітно вище, ніж у блоків С і набагато вище, ніж у паличок А. Отже, форма В має виразний і швидкий, але відносно короткий знеболюючий ефект. Компактні палички А, мабуть, всмоктуються повільніше і тому мають тривалішу, але менш виражену

аналгезію. За площею поверхні та характером впливу на больовий поріг за обох шляхів введення блоки С займають проміжне місце між пластинами В і паличками А. Однак для більш аргументованого висновку необхідні окремі дослідження фармакокінетики цих сполук, що і буде наведено в наступних розділах.

4.3 Дослідження аналгетичної активності поліморфних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на моделі нейропатичного больового синдрому

Важливою складовою дієвості аналгетичних засобів є їхня здатність усувати больовий синдром нейропатичного генезу. Біль цього типу може бути викликаний різними патологічними процесами в периферичній і центральній нервовій системі; їх причинами часто є цукровий діабет, герпесвірусні інфекції, онкологічні захворювання, травми спинного мозку тощо.

Першою моделлю периферичного нейропатичного больового синдрому є такий, що виникає при перев'язки сідничного нерва у наркотизованих тварин на рівні підколінної ямки вище місця його трифуркації [37]. Детальне описання операції наведено в розділі 2, та зображені на рис.4.6.



А



Б



С

Д

Рис 4.6 Результати моделювання неропатичного больового синдрому шляхом перев'язки сідничного нерва щура. А - задня кінцівка здорового щура. Б - кінцівка щура на 14-ту добу після перев'язки нерва. В - загальний вигляд щура після операції. Довільні рухи кінцівки майже відсутні. Тварина відчуває біль навіть при легкому дотику. Г – Кінцівка щура після 14-ї доби після оперативного втручання. Наявні ознаки аутономій.

Після моделювання патологічного стану, який верифікували за статистичним зниження порогу больової чутливості (табл. 4.5), частині тварин вводили зазначені сполуки в/оч, а іншій частині – в/шл. Зміни больового порогу визначали через 2 години після введення. Отримані результати свідчать про те, що через 2 тижня після оперативного втручання у тварин зареєстровано статистично вірогідне зниження больового порогу (на 51-67 %, $p < 0,05$). Найкращий лікувальний ефект всі сполуки виявили за їх внутрішньочеревного введення. Як і на попередніх моделях, кристалічна форма у вигляді пластинок (сполука В) на цій моделі виявилась беззаперечним лідером. За умов перорального введення блоки (сполука С) практично співпадають за активністю із сполукою В, однак поступаючись їм при парентеральному введенні. Кристалічна форма у вигляді паличок (сполука А) на цій моделі була найменш ефективною.

Таблиця 4.5

Аналгетична активність сполук А, В та С за різних шляхів введення у на моделі нейропатичного больового синдрому при перев'язці сідничного нерва
($M \pm m$, $n = 7-14$)

Експериментальні групи	Поріг больової чутливості				
	Початковий рівень, г/мм ²	14-та доба після операції без лікування		Після введення сполук	
		г/мм ²	%	г/мм ²	%
Сполука А (в/оч)	458,6 ± 12,8	151,4 ± 31,3	-67,0	174,3 ± 25,2	+ 15,1
Сполука А (в/шл)				162,9 ± 30,1	+ 7,5
Сполука В (в/оч)	395,7 ± 23,3	162,9 ± 28,5	-58,8	225,7 ± 36,4	+ 38,6
Сполука В (в/шл)				196,2 ± 37,0	+ 20,5
Сполука С (в/оч)	402,9 ± 24,5	197,1 ± 40,8	-51,1	248,6 ± 24,2	+ 26,1
Сполука С (в/шл)				237,1 ± 32,4	+ 20,3

Примітки:

- * – статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня;
- ** - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

В роботі оцінена знеболююча активність сполук, що вивчались, на моделі больового синдрому, який розвивається за діабетичної полінейропатії у щурів. Експериментальний діабет відтворювали одноразовим в/оч введенням стрептозотоцину (60 мг/кг)

Ця частина роботи виконана на 49 щурах-самцях лінії Вістар, отриманих з Інституту фармакології та токсикології НАМН України. У всіх тварин вимірювали вихідну масу тіла та рівень глікемії (за допомогою глюкометра), визначали поріг больової чутливості. Після введення стрептозотоцину у

тварин розвивався цукровий діабет 1 типу, який проявлявся клінічними ознаками (полідипсією, поліурією), а також підтверджувався об'єктивно – розвитком гіперглікемії, а також зменшенням маси тіла.

Згідно літератури, поява полінейропатії у тварин на цій моделі спостерігається через через 6-8 тижнів [37]. Тому в цій частині роботи порівнювали вищевказані показники із такими на 6-му тижні після введення стрептозотоцину. Результати змін маси тіла та рівня глюкози крові наведені в табл. 4.6. Виявлено, що одноразове введення стрептозотоцину викликало розвиток експериментального цукрового діабету. Протягом всього терміну спостереження (6 тижнів) тварини споживали значно більшу кількість води (полідипсія), суттєво збільшилось сечовиділення (поліурія), тварини ставали млявими, погано споживали корм, втрачали вагу. Спостерігались випадки загибелі тварин. Це супроводжувалось статистично вірогідним збільшенням рівня глюкози (майже в 3 рази порівняно з вихідним значенням).

Таблиця 4.6

Зміни маси тіла та глікемії у щурів на тлі моделювання стрептозоточин-індукованого цукрового діабета ($M \pm m$)

Показники Групи	Рівень глюкози, ммоль/л		% відносно вихідного рівня	Маса тіла, г		% відносно вихідного рівня
	Вихідний рівень	6-й тиждень		Вихідний рівень	6-й тиждень	
Контроль (n = 7)	4,3 ± 0,13	4,4 ± 0,12	+ 1,32	242,9 ± 4,21	272,1 ± 10,17	+16,2
Стрептозо- тоцин (n = 42)	4,27 ± 0,60	16,9 ± 2,47*/**	+ 298,1	264,0 ± 6,82	213,3 ± 7,01*/**	-19,2

Примітки:

- * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) щодо вихідного рівня;
- ** - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) щодо контролю.

Для проведення подальших досліджень тварини були поділені на групи. 1 група (n = 7) – контрольні тварини (отримували розчинники), тваринам 2, 3 та 4 груп в/оч вводили досліджувані поліморфні форми (сполуки А, В та С) в скринінговій дозі 20 мг/кг. Тваринам 5 та 6 груп вводили референтні препарати – лорноксикам та диклофенак в аналогічних дозах та режимах введення. Вимірювали гіпералгезію на 1-й, 2-й, 4-й та 6-й годинах після введення фармацевтичних сполук. Результати наведені в табл. 4.7 та на рис. 4.7.

Таблиця 4.7

Аналгезуюча дія кристалічних поліморфних форм та референс-препаратів за їх внутрішньочеревного введення (20 мг/кг) на тлі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабета ($M \pm m$)

Експериментальні групи	Динаміка ПБЧ після введення сполук ПБЧ, г/мм ²				
	Вихідний рівень	1 год	2 год	4 год	6 год
Сполука А	191,4±14,1	214,3±13,4**/**	229,3±15,5**/**/**	410,0±20,7**	328,6±15,7**
Сполука В	151,4±11,0	207,1±17,6**/**/**	310,0±16,3**	267,1±21,0**/**/**	197,1±17,1**/**/**
Сполука С	192,9±20,2	245,7±12,9**/**/**	320,0±14,6**/**	307,1±13,9**/**	220,7±12,1**/**
Диклофенак	162,9±8,65	328,6±13,5**/**	281,4±15,9**/**	252,1±12,0**/**	210,0±11,6**/**
Лорноксикам	178,6±8,84	314,3±20,3*	395,7±28,4**	357,1±19,1**	290,0±13,1*
Контроль	180,0±16,5	182,9±17,6	185,7±16,7	183,6±16,4	181,4±15,8

Примітки:

1. * - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) щодо вихідного рівня
2. ** - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) щодо диклофенаку
3. *** - вірогідні відмінності ($p < 0,05$) щодо лорноксикаму

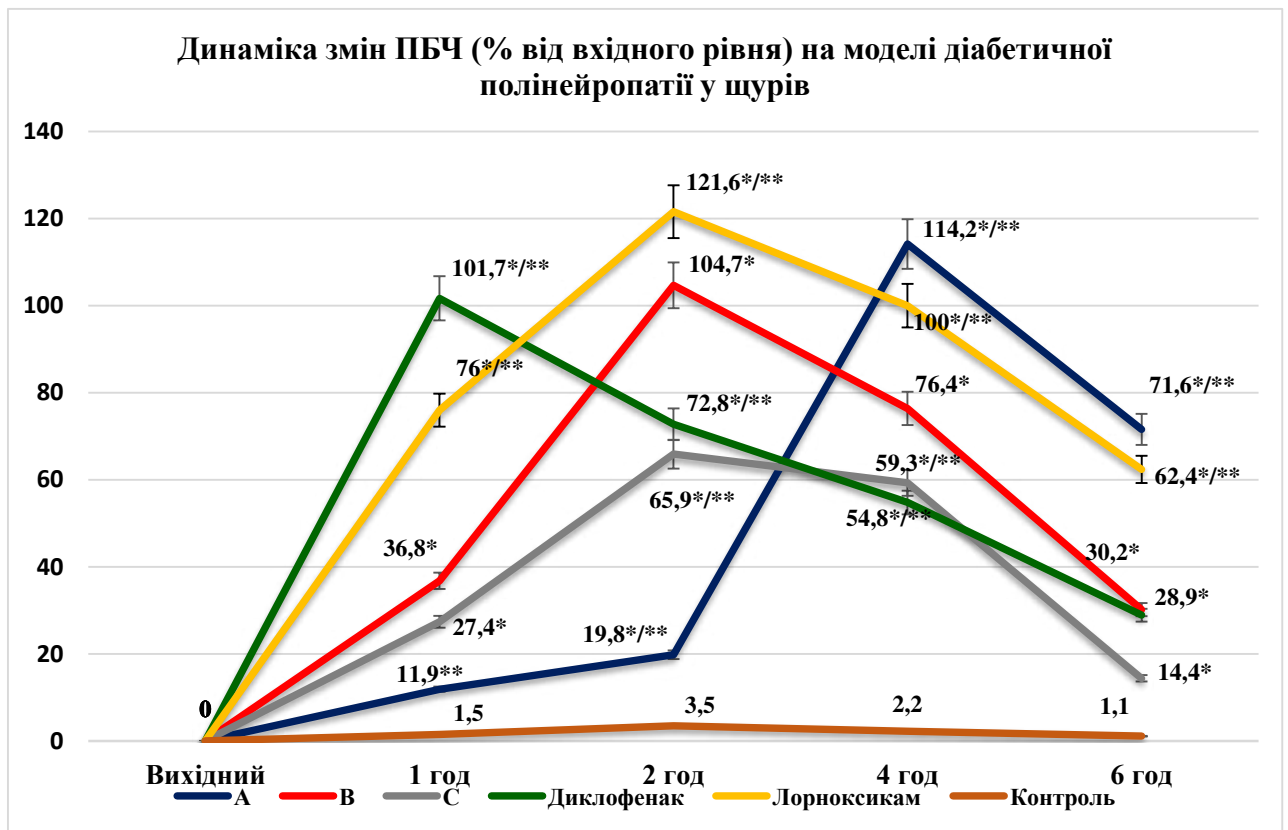


Рис. 4.7 Аналгетична дія кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за їх внутрішньо-черевного введення на моделі діабетичної полінейропатії у щурів (n = 7). Примітки: * - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно контролю; ** - статистично вірогідні відмінності (p < 0,05) відносно сполуки В за аналогічного шляху введення.

Можна відмітити, що всі три кристалічні форми володіють здатністю зменшувати гіперальгезію за даної експериментальної моделі. У сполук В і С пік дії спостерігався на 2-й годині після введення, коли вони значно перевершували сполуку А, а також препарат порівняння диклофенак (сполука В), але обидві ці форми поступались лорноксикаму. На 4-й годині експерименту картина змінилась. Дія сполук В, С, диклофенаку та лорноксикаму почала поступово знижуватись, тоді як у сполуки А – навпаки, сягала пікових значень, перевершуючи всі інші композиції, зберігаючи своє лідерство і на 6-й годині після введення.

4.4 Дослідження гострої токсичності кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду

Як продемонстрували результати, викладені в попередніх розділах, всі три кристалічних поліморфи виявили високий ступінь анагетичної дії за різних моделей больової перцепції як за парентерального, так і за перорального введення. На більшості моделей лідером була сполука В, однак її дія починалась більш швидко, але тривала недовго. Близький до неї патерн анагетичної активності показала кристалічна форма С. Натомість для сполуки А характерним було повільний початок дії, але більша тривалість.

Ці речовини співставлялись або перевершували препарати порівняння лорноксикам та диклофенак за ступенем виразності антиноцицепції.

Для вибору найбільш перспективної сполуки для подальших поглиблених досліджень необхідно було визначити параметри їх безпечності шляхом встановлення показника гострої токсичності (LD₅₀) цих речовин. Враховуючи погану розчинність цих сполук в воді та беручи до уваги той факт, що переважна більшість НПЗЗ вживається тривало в лікуванні хронічних больових станів або при гострих помірно виражених больових синдромах, найбільш оптимальним ми вважали їх пероральний (внутрішньошлунковий) спосіб застосування (табл. 4.8).

Досліди виконані на білих нелінійних мишах обох статей масою 20-22 г віварію Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Під час експериментів тварин утримували на звичайному раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Гостра токсичність досліджуваних сполук при внутрішньошлунковому введенні мишей (M = 7-10)

Доза, мг/кг	Сполука А		Сполука В		Сполука С	
	К-ть тварин в групі	К-ть летальних випадків	К-ть тварин в групі	К-ть летальних випадків	К-ть тварин в групі	К-ть летальних випадків
350	10	1	-	-	-	-
400	8	2	10	-	10	-
450	8	4	10	1	10	1
500	9	6	9	3	10	1
550	8	6	7	4	8	2
600	8	7	9	6	8	3
800	8	8	8	6	9	6
1000	-	-	8	8	9	9
Розраховані значення	LD ₁₆ = 263,79 LD₅₀ = 419,35 LD ₈₄ = 574,90 LD ₁₀₀ = 652,68		LD ₁₆ = 362,02 LD₅₀ = 586,47 LD ₈₄ = 810,93 LD ₁₀₀ = 923,15		LD ₁₆ = 499,17 LD₅₀ = 699,26 LD ₈₄ = 899,36 LD ₁₀₀ = 999,41	

Параметри гострої токсичності визначали методом пробіт-аналізу. Досліджувані сполуки розчиняли в Твин-80 та дистильованій воді, вводили в/шл. Спостереження за тваринами проводили протягом 14 днів. Оцінювали виживаність тварин, а також особливості їх поведінки, стан шкірних покривів, споживання їжі та води, стан ШКТ, ЦНС та ін.

Результати показали, що найменш токсичною виявилась сполука С – показник її LD₅₀ становив 699,3 ± 34,9 мг/кг. Натомість токсичність сполуки В та сполуки А виявилась більшою: показники середньосмертельних доз їх виявились 586,5 ± 29,3 та 419,3 ± 20,9 мг/кг, відповідно. Варто зазначити, що найбільший показник смертності тварин спостерігався протягом перших 3-х днів. Тварини погано споживали корм, у них розвивались порушення

нормального стану шерсті, млявість, порушення дихання, виникали судоми. На розтині загиблих мишей виявлялись гепатомегалія, численні виразкові дефекти шлунка та кишечника. Тобто за токсичністю сполуки розташувались наступним чином: $C < B < A$.

4.5 Дослідження ульцерогенного потенціалу кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду

Оскільки ці речовини є продуктами біоізостеричної заміни в молекулі мелоксикаму, тобто нестероїдних протизапальних засобів, то згідно методичних рекомендацій з доклінічного дослідження біологічно активних сполук як потенційних нестероїдних протизапальних засобів, надзвичайно важливим інтегральним показником, який характеризує нешкідливість сполуки, що досліджується, є її показник UD_{50} , тобто доза, яка після одноразового введення викликає у піддослідних тварин ульцерогенний ефект, який дорівнює 2 балам [37]. Ця частина експеримента була виконана на білих самцях щурів лінії Wistar, в умовах лабораторії кафедри фармакології. Методика введення сполук описана вище. Спостереження за тваринами тривало 3 год, після чого тваринам виконували евтаназію, вилучали шлунок і проводили його візуальний огляд. Результати наведені в табл. 4.9. Виявлено, що за ступенем ульцерогенності у порядок розташування кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду відрізняється від такого, що був отриманий за результатами гострої токсичності. Так, найменшу ушкоджуючу дію на шлунок виявила сполука B ($UD_{50} = 117,9 \pm 5,89$ мг/кг), тоді як у сполуки C цей показник становив $87,5 \pm 4,39$ мг/кг. А найбільшу ульцерогенність проявила сполука A ($UD_{50} = 71,4 \pm 3,57$ мг/кг). Це дозволило розташувати сполуки за зменшенням гастротоксичності наступним чином: $B < C < A$.

Показник ульцерогенності (UD50) досліджуваних сполук при
внутрішньошлунковому введенні у щурів (М = 7-10)

Доза, мг/кг	К-ть тварин в групі	К-ть тварин з виразками 2 ступеня	Розраховані значення
Сполука А			
20	5	1	UD ₁₆ = 21,050
40	8	2	UD₅₀ = 71,465
60	10	4	UD ₈₄ = 121,88
80	5	2	UD ₁₀₀ = 147,08
100	7	6	
Сполука В			
20	5	0	UD ₁₆ = 62,843
40	10	1	UD₅₀ = 117,96
80	7	1	UD ₈₄ = 173,09
160	6	1	UD ₁₀₀ = 200.65
320	7	3	
Сполука С			
20	5	0	UD ₁₆ = 58,908
40	5	0	UD₅₀ = 87,509
80	6	1	UD ₈₄ = 116,11
160	5	2	UD ₁₀₀ = 130,41
320	9	6	

Таким чином, наші результати показали, що сполука А має найбільший показник гострої токсичності та ульцерогенності серед всіх поліморфних модифікацій похідного карбоксаміду. Сполука С виявилась менш токсичною за показником середньосмертельної дози, однак більш виразну пошкоджуючу дію на шлунок, тоді як сполука В – помірну гостру токсичність та найменший ступінь ушкодження шлунка.

4.6 Дослідження середньої ефективної дози за анальгетичною активністю кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду

Для того, щоб остаточно в'яснити, яку саме поліморфну модифікацію можна вважати сполукою-лідером за анальгетичною активністю, необхідно було визначити середню ефективну дозу (ED₅₀) сполук А, В та С, а також порівняти ці результатами із референтними препаратами – «золотим стандартом» НПЗЗ диклофенаком, а також основними представниками класу оксикамів – неселективними інгібіторами ЦОГ-1 та ЦОГ-2 піроксикамом та лорноксикамом та селективним інгібітором ЦОГ-2 мелоксикамом.

Для цього було обрано модель термічного подразнення (тест «tail-flick»). Всі сполуки та препарати порівняння вводили в 5 дозах (0,5, 1,0, 5, 10 та 20 мг/кг). Методики приготування розчинів описані в розділі 2. Визначали латентний період (ЛП) відсмикування хвоста перед введенням сполук, а також через 2 год після їх в/шл введення. Середню ефективну дозу визначали за методом найменших квадратів. Результати дослідження представлені в табл. 4.10 та на рис. 4.8 - 4.10.

Отримані дані свідчать, що на даній моделі найбільшу ефективність має сполука В (її ED₅₀ становило приблизно 3,5 м/кг (3,54±0,18 мг/кг). За цим показником сполука В перевершила дві інші кристалічних модифікації – сполуку С та сполуку А, медіанна ефективна доза яких була більшою на 26,8 та 84,5 %, відповідно (p < 0,05).

Середня ефективна доза (ED_{50}) сполук А, В та С за анальгетичною активністю у щурів ($M \pm m, n = 7$)

Доза, мг/кг внутрішньо- шлунково	Латентний період відсмикування хвоста (с)			ED_{50}
	Вихідний рівень	Після введення сполуки*	Зміни відносно вихідного рівня, %	
Сполука А				
0,5	$6,45 \pm 0,59$	$8,17 \pm 0,55$	$28,2 \pm 4,39$	$6,53 \pm 0,33$ мг/кг
1,0	$7,00 \pm 0,60$	$9,24 \pm 0,59$	$33,5 \pm 4,11$	
5,0	$4,55 \pm 0,23$	$6,57 \pm 0,27$	$45,3 \pm 4,91$	
10,0	$4,39 \pm 0,38$	$7,66 \pm 0,66$	$74,7 \pm 4,56$	
20,0	$4,83 \pm 0,36$	$8,42 \pm 0,69$	$73,7 \pm 4,83$	
Сполука В				
0,5	$5,48 \pm 0,23$	$7,24 \pm 0,55$	$31,6 \pm 2,97$	$3,54 \pm 0,18$ мг/кг
1,0	$5,40 \pm 0,27$	$7,66 \pm 0,43$	$42,2 \pm 4,74$	
5,0	$5,94 \pm 0,27$	$9,35 \pm 0,41$	$57,4 \pm 2,15$	
10,0	$6,15 \pm 0,32$	$10,96 \pm 0,55$	$78,6 \pm 4,23$	
20,0	$5,43 \pm 0,28$	$10,77 \pm 0,57$	$98,5 \pm 4,07$	
Сполука С				
0,5	$8,07 \pm 1,02$	$9,84 \pm 1,31$	$21,6 \pm 2,67$	$4,49 \pm 0,22$ мг/кг
1,0	$6,30 \pm 0,38$	$8,60 \pm 0,79$	$35,4 \pm 4,01$	
5,0	$4,93 \pm 0,31$	$8,16 \pm 0,50$	$66,2 \pm 5,19$	
10,0	$5,19 \pm 0,28$	$9,07 \pm 0,44$	$75,4 \pm 4,77$	
20,0	$5,00 \pm 0,38$	$9,48 \pm 0,64$	$90,3 \pm 3,47$	

Примітка: * - час після введення сполуки відповідав максимальному ефекту (для сполук В та С – 120 хв, для сполуки А – 240 хв).

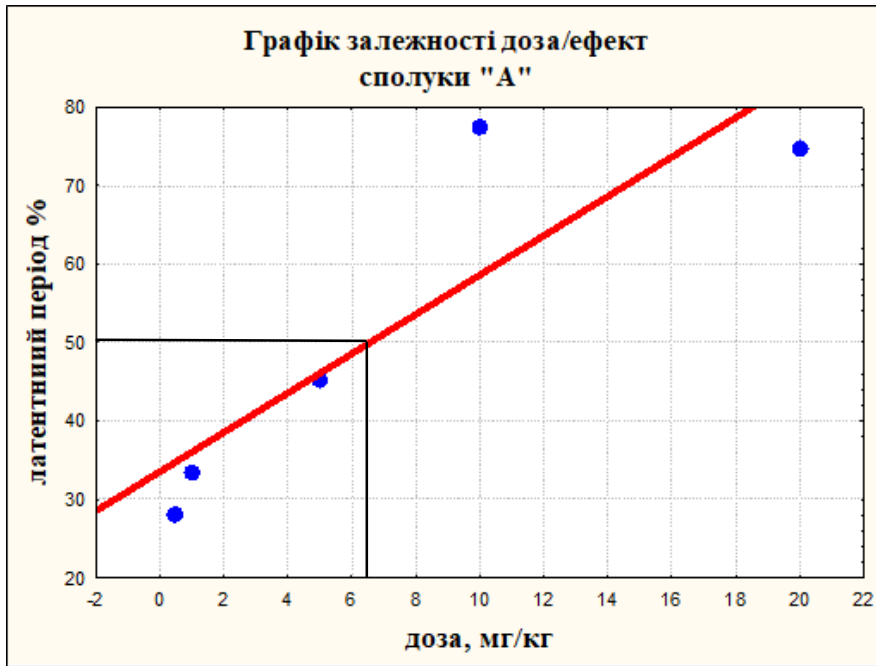


Рис. 4.8 Графічне визначення середньої ефективної дози (ED_{50}) за аналгетичною активністю кристалічного поліморфу (сполуки А) на моделі «tail-flick» у щурів

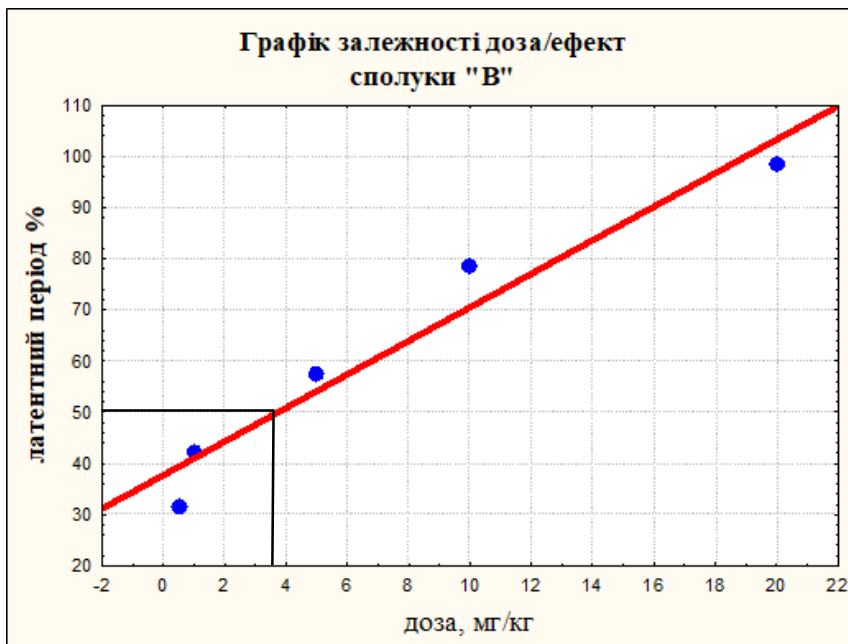


Рис. 4.8 Графічне визначення середньої ефективної дози (ED_{50}) за аналгетичною активністю кристалічного поліморфу (сполуки В) на моделі «tail-flick» у щурів

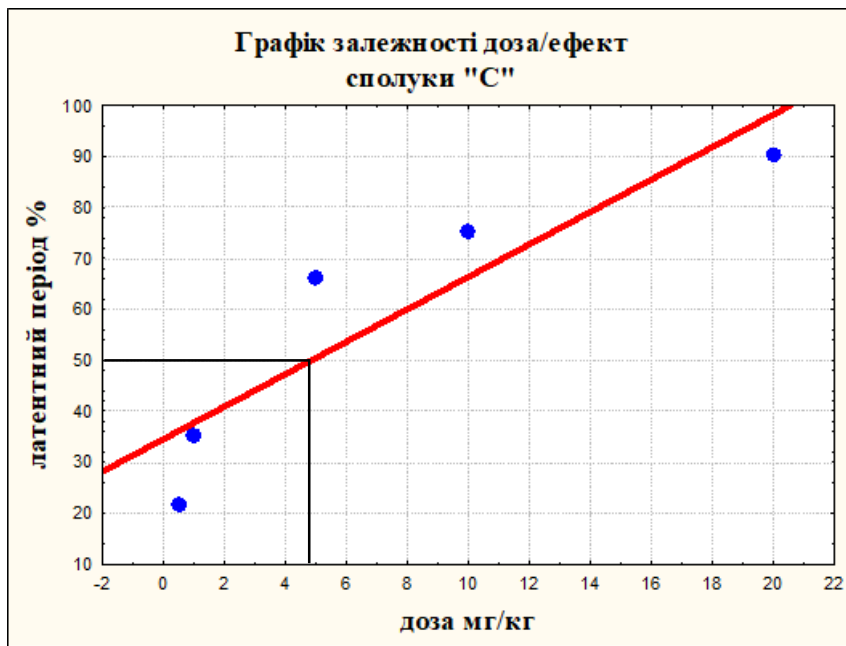


Рис. 4.8 Графічне визначення середньої ефективної дози (ED_{50}) за аналгетичною активністю кристалічного поліморфу (сполуки С) на моделі «tail-flick» у щурів

Порівняння ефективності досліджуваних похідних карбоксаміду із іншими представниками класу НПЗЗ показало, що всі три форми N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду були більш ефективні за диклофенак та значно перевершували піроксикам. Кристалічна форма А поступалась за показником ED_{50} мелоксикаму та лорноксикаму, кристалічна форма С – практично співставлялась з цими препаратами, і лише кристалічна форма В була більш ефективною за всі препарати порівняння, оскільки її ефективність була на 31,9 та 43,5 % більшою порівняно з лорноксикамом та мелоксикамом (табл. 4.11, рис. 4.9).

Середня ефективна доза (ED₅₀) препаратів порівняння за анальгетичною активністю у щурів (M ± m, n = 7)

Доза, мг/кг внутрішньо- шлунково	Латентний період відсмикування хвоста (с)			ED ₅₀
	Вихідний рівень	Після введення препаратів	Зміни відносно вихідного рівня, %	
Диклофенак				
0,5	6,06 ± 0,16	7,53 ± 0,22	24,3 ± 2,51	8,29 ± 0,41 мг/кг
1,0	5,57 ± 0,24	7,69 ± 0,28	38,4 ± 2,86	
5,0	5,71 ± 0,14	8,07 ± 0,18	41,5 ± 2,48	
10,0	7,09 ± 0,37	10,29 ± 0,30	46,9 ± 6,73	
20,0	6,40 ± 0,25	11,60 ± 0,44	81,5 ± 1,59	
Піроксикам				
0,5	6,06 ± 0,16	6,38 ± 0,15	5,5 ± 0,80	21,0 ± 1,05 мг/кг
1,0	6,41 ± 0,11	7,71 ± 0,27	20,2 ± 3,24	
5,0	5,66 ± 0,18	7,12 ± 0,14	26,3 ± 2,92	
10,0	6,97 ± 0,19	9,64 ± 0,27	38,3 ± 1,60	
20,0	6,75 ± 0,18	9,99 ± 0,12	48,4 ± 2,87	
Лорноксикам				
0,5	6,67 ± 0,33	9,28 ± 0,40	39,5 ± 2,15	4,67 ± 0,23 мг/кг
1,0	7,18 ± 0,23	10,10 ± 0,22	41,8 ± 6,27	
5,0	6,41 ± 0,57	9,47 ± 0,49	50,7 ± 5,91	
10,0	6,69 ± 0,25	11,26 ± 0,28	69,3 ± 5,54	
20,0	5,90 ± 0,17	10,3 ± 0,34	70,1 ± 3,76	
Мелоксикам				
0,5	5,78 ± 0,29	7,23 ± 0,37	25,4 ± 2,80	5,08 ± 0,25 мг/кг
1,0	5,43 ± 0,35	7,75 ± 0,19	45,2 ± 6,82	
5,0	5,09 ± 0,15	8,12 ± 0,15	60,1 ± 3,59	
10,0	6,42 ± 0,34	10,48 ± 0,52	63,7 ± 3,40	
20,0	5,40 ± 0,09	9,30 ± 0,23	72,3 ± 2,84	

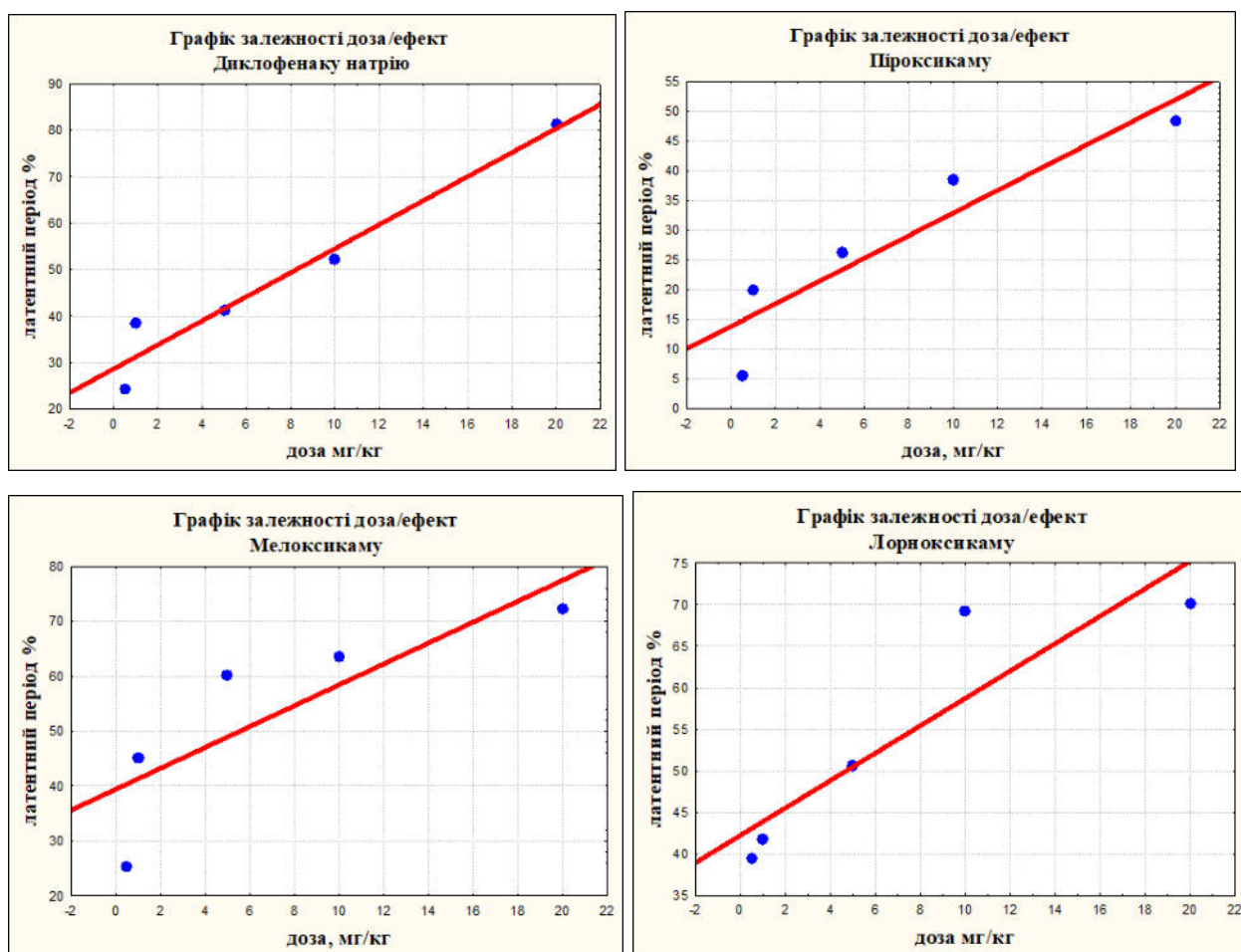


Рис. 4.9 Графічне визначення середньої ефективної дози (ED_{50}) за анальгетичною активністю референс-препаратів на моделі «tail-flick» у щурів

Тобто, найбільш ефективною та безпечною щодо шлунка сполукою серед кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду виявилась сполука В (полімофна форма у вигляді пластинок), яка може вважатись сполукою-лідером і представляє інтерес для подальших поглиблених досліджень в якості потенційного НПЗЗ.

Висновок до розділу 4

В цій частині роботи було проведено порівняння знеболюючої активності трьох різних кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука А, сполука В та сполука С) в скринінговій дозі 20 мг/кг на моделях соматичного,

вісцерального та нейрогенного больового синдромів за перорального (внутрішньошлункового) та парентерального (внутрішньочеревного) введення.

Встановлено, що на всіх моделях больової перцепції сполука В за аналгетичною активністю перевершувала дві інші поліморфні форми (сполуки А та С). Така залежність спостерігалась на моделях периферичного вісцерального болю (оцтово-кислі корчі у мишей), моделюванні центрального компонента больової перцепції (гаряча пластинка, «tail-flick» у щурів), а також нейропатичного больового синдрому синдрому (діабетична полінейропатія та невралгічна гіперальгезія після перев'язки сідничного нерва). Виразність антиноціцепції була більшою за внутрішньочеревного введення, а зміна режиму призначення супроводжувалась частковою втратою знеболюючого потенціалу (близько 30 %).

В тесті електричного подразнення кореня хвоста відстежено динаміку розвитку та тривалість аналгетичної дії сполук. За обох шляхів введення поліморфна форма у вигляді пластин (сполука В) виявляє швидкий і потужний знеболюючий ефект, який після другої години експерименту починає помітно зменшуватися. Активність сполуки С менш виражена, хоча також досягає свого максимуму на 2-й годині, причому подальше зниження її аналгетичної дії відбувається не так стрімко, як у попереднього кристалічного поліморфу. Натомість сполука А спочатку виявляє помірну знеболюючу дію, яка поступово зростає, досягає піку на 4-й годині експерименту і зберігає виразний ефект навіть після 6-ї години експерименту. Аналогічні патерн дії отриманий і на моделі діабетичної полінейропатії, де сполука В на 2-й годині після введення переважала дієвість інших поліморфів, а також диклофенаку, незначно поступалась лорноксикаму, тоді як на 4-й та 6-й годині лідувачі позиції займала сполука А.

Тобто, за аналгетичною активністю досліджувані поліморфи розташовані наступним чином: $B > C > A$.

Оцінка гострої токсичності сполук за їх внутрішньочеревного введення мишам показала, що найбільш безпечним серед всіх фармацевтичних композицій виявилась сполука С – показник її LD_{50} становив $699,3 \pm 34,9$ мг/кг. Натомість токсичність сполуки В та сполуки А виявилась більшою: показники середньосмертельних доз їх були $586,5 \pm 29,3$ та $419,3 \pm 20,9$ мг/кг, відповідно. За токсичністю сполуки розташовані: $C > B > A$.

Оцінка безпечності похідних карбоксаміду щодо шлунка, яку визначали за показником UD_{50} , показала, що найменшу ушкоджуючу дію виявила сполука В ($UD_{50} = 117,9 \pm 5,89$ мг/кг), тоді як у сполуки С цей показник становив $87,5 \pm 4,39$ мг/кг. А найбільшу ульцерогенність проявила сполука А ($UD_{50} = 71,4 \pm 3,57$ мг/кг). Це дозволило розташувати сполуки за зменшенням гастротоксичності наступним чином: $B < C < A$.

Порівняння ефективності трьох поліморфів, яку розраховували за показником ED_{50} підтвердив лідерство сполуки В, яка за внутрішньошлункового введення перевершувала ефективність інших кристалічних модифікацій N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та була більш дієвою за препарати порівняння (еталонний НПЗЗ диклофенак) та інші представники класу оксикамів (піроксикам, мелоксикам та лорноксикам). За цим параметром сполуки розташовані наступним чином: $B > C = \text{лорноксикам} > \text{мелоксикам} > A > \text{диклофенак} > \text{піроксикам}$.

Результати цього розділу опубліковано в наступних працях: [6, 7].

РОЗДІЛ 5

ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ ПАРАМЕТРІВ ФАРМАКОКІНЕТИКИ
ПОЛІМОРФНИХ МОДИФІКАЦІЙ, ЩО ДОСЛІДЖУЮТЬСЯ
(СПОЛУК А, В та С)

В попередньому розділі було показано, що три кристалічних поліморфних форми *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, які є абсолютно ідентичними за всіма структурними параметрами, і відрізняються лише габітусом утворених кристалів – палички (сполука А), пластинки (сполука В) та блоки (сполука С) володіють потужними болетамуючими та протизапальними властивостями.

Детальний аналіз знеболюючої дії на різних експериментальних моделях за різних шляхів введення трьох сполук показав, що ступінь виразності, початок дії та тривалість ефекту у цих кристалічних форм була різною. Найбільшу активність продемонструвала сполука В.

Крім того, вказані поліморфні форми відрізнялись за гострою токсичністю, ульцерогенністю, а також медіанною ефективною дозою за

а
н Для пояснення цих розбіжностей нами висунута робоча гіпотеза, що їх існування зумовлено особливостями фармакокінетичного профілю, особливо на перших етапах – всмоктування, депонування тощо. Перевірці цієї гіпотези присвячений цей розділ дослідження.

е

Г 5.1 Підбір умов кількісного визначення *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-
ґідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду

ч

н

о

ю

а

З метою вибору найбільш прийнятної довжини хвилі УФ детектора було попередньо досліджено залежність поглинання розчину похідного бензотіазин-3-карбоксаміду (рис. 5.1).

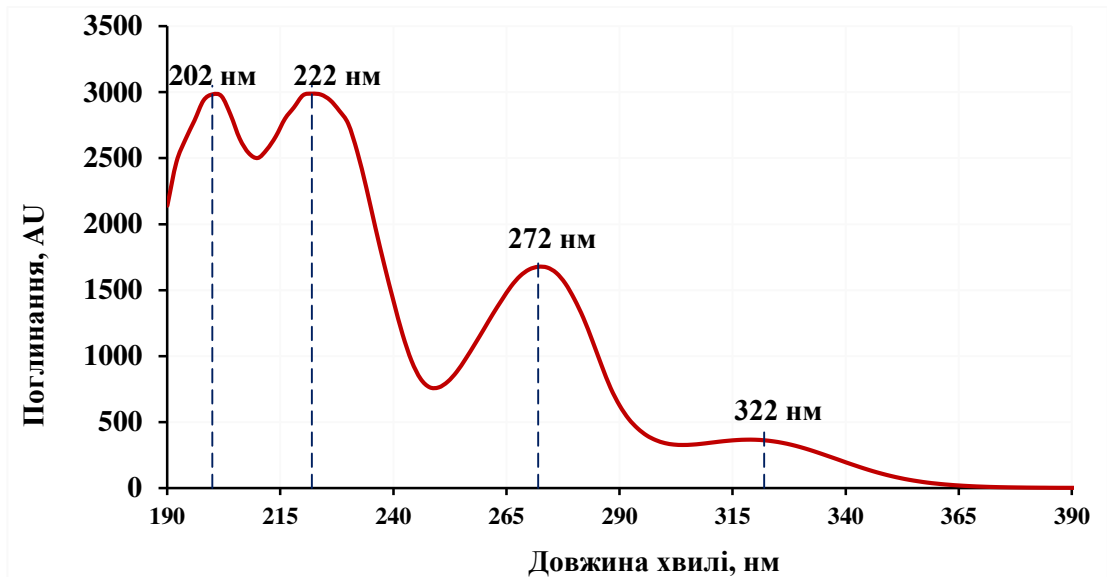


Рис. 5.1 Спектр поглинання *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (розчин у системі для хроматографування).

У спектрі поглинання *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду визначається чотири максимуми з довжинами хвиль 202 нм, 222 нм, 272 нм та 322 нм відповідно. Проте два максимуми з високими показниками екстинкції (202 нм, 222 нм) знаходяться у короткохвильовій ультрафіолетовій області та не є специфічними, оскільки багато речовин також можуть поглинати у цій області. Приймаючи до уваги, що подальше визначення сполуки проводитиметься у біологічному матеріалі, не виключним є вплив ендогенних сполук, що можуть екстрагуватись з сироватки.

Максимум поглинання при 322 нм характеризується вельми низькою величиною екстинкції та широкою полосою поглинання, що може знижувати селективність з урахуванням можливої присутності ендогенних сполук. Навпаки, при довжині хвилі 272 нм пік сполуки N19 є досить вузьким та

демонструє задовільну величину екстинкції для забезпечення чутливості методу її визначення за допомогою УФ детектора.

Для побудови калібрувального графіка було обрано широкий інтервал концентрацій *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду від 10 до 1000 мкг/см³, для того, щоб охопити якомога широкий інтервал можливих концентрацій сполуки в сироватці крові.

У межових концентраціях (10 мкг/см³ та 1000 мкг/см³) а також у концентраційній точці, що відповідає середині діапазону (500 мкг/см³) зберігається пропорційність між номінальним вмістом сполуки у пробі та аналітичним відкликом (одиниці поглинання) (рис. 5.2), що передбачає лінійність залежності між концентрацією та аналітичним сигналом, що визначається. Час утримання сполуки (3,76 хв) не зазнає зміни із збільшенням її кількості у пробі.

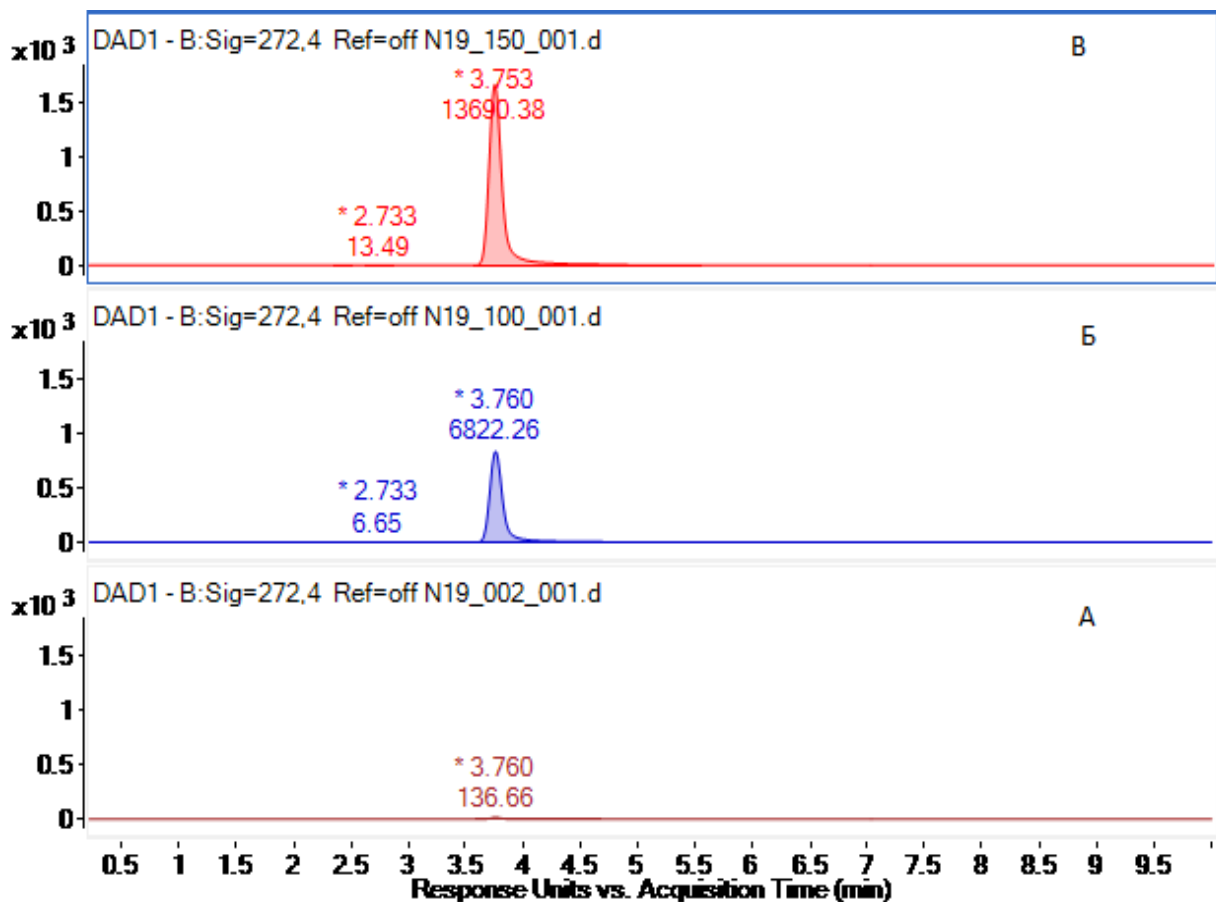


Рис. 5.2 Хроматограми калібрувальних розчинів *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду з концентраціями 10 (А), 500 (Б) та 1000 мкг/см³ (В).

Калібрувальний графік для сполуки, що вивчалась (рис. 5.3) є лінійним в інтервалі концентрацій -10-1000 мкг/см³ з величиною коефіцієнту кореляції близьким до 1,0.

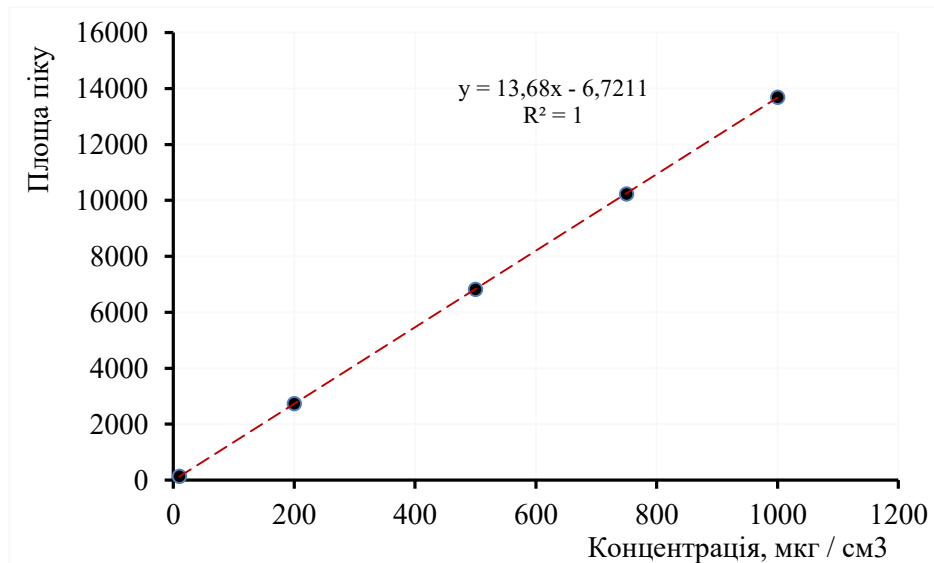


Рис. 5.3 Калібрувальний графік визначення сполуки N19 методом ВЕРХ.

Визначені параметри хроматографування були застосовані при визначенні вмісту сполуки N19 у сироватці крові щурів.

5.2 Фармакокінетика *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у сироватці крові щурів після внутрішньовенного та перорального введення

Первинні фармакокінетичні параметри *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду було визначено при її внутрішньовенному введенні (в/в) з метою встановлення характеру розподілу та параметрів елімінації за умов виключення процесів абсорбції, ефекту первинного проходження через печінку та для отримання даних, що дозволяють встановити можливий вплив кристалічної форми на фармакокінетику при пероральному введенні.

Слід відзначити, що після у плазмі крові мишей після в/в *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-

карбоксаміду реєструються досить високі концентрації (табл. 5.1), а концентраційний профіль задовільно описується однокамерною моделлю (рис. 5.4) із експоненціальним зниженням протягом 8 годин після одноразового внутрішньовенного введення в дозі 10 мг/кг.

Таблиця 5.1

Зміна вмісту *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у плазмі крові мишей після його в/в введення
($M \pm m$, $n = 4$, 10 мг/кг)

Час, год	Концентрація, мкг/мл,
0,25	10779 ± 1475,2
0,5	10305,8 ± 1313,7
1,0	8309,1 ± 650,3
2,0	4014,9 ± 241,1
3,0	3167,6 ± 426,5
4,0	2097,2 ± 300,4
5,0	1334 ± 147,7
6,0	651,1 ± 69,7
8,0	281,8 ± 26,9

Певні коливання концентрації в першу годину після введення (рис. 5.4) обумовлені досягненням рівноваги процесу розподілу *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду після болюсного в/в введення та у подальшому процес елімінації відбувається з постійною інтенсивністю.

На підставі припущення про однокамерний характер розподілу похідного бензотіазин-3-карбоксаміду після його в/в введення було визначено низку фармакокінетичних параметрів (табл. 5.2) для характеристики біокінетичної поведінки сполуки в організмі.

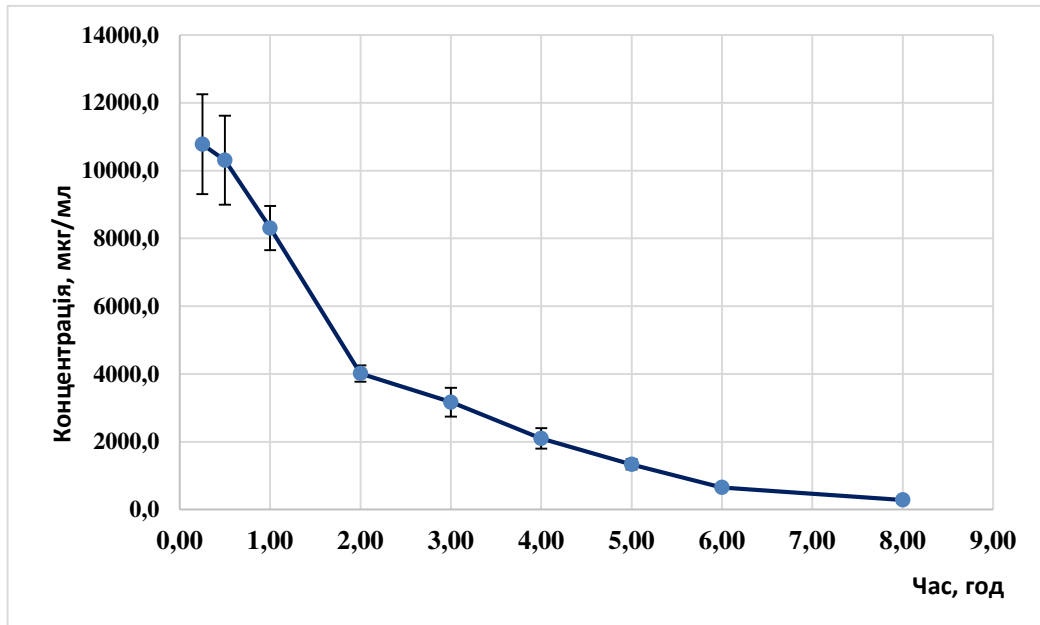


Рис. 5.4 Концентраційний профіль *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду після в/в введення (10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$)

N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід характеризується досить високою величиною константи елімінації ($k_{el} = 0,511 \pm 0,068 \text{ год}^{-1}$) та, відповідно, високою швидкістю елімінації з центральної камери (плазма крові) з часом напіввиведення ($T_{el}^{1/2}$) $1,4 \pm 0,2$ год. Приймаючи до уваги величину сталого об'єму розподілу ($V_{dss} = 6,3 \pm 0,8 \text{ г/кг}$) можливо припустити, що завдяки гідрофільності сполуки (яка в умовах рН організму існує у вигляді іонізованої форми) центральною камерою виступає саме плазма крові із малим внеском ліпофільних структур (мембрани еритроцитів, жирова тканина, інші ліпофільні структури організму) у загальний процес її розподілу. Відповідно, загальний кліренс сполуки ($Cl_{зар.}$), який є мірою швидкості видалення сполуки з центральної камери, становить $2,771 \pm 0,52 \text{ л*год/кг}$, що є співставним із швидкістю клубочкової фільтрації. На підставі цього можна очікувати, що сполуці переважно притаманній нирковий шлях елімінації з організму (із сечею) - або у незмінному вигляді, або у вигляді суми метаболітів.

Визначені немодельним методом показники площі під фармакокінетичною кривою («концентрація – час», $AUC_{0-\infty}$) та під першим

моментом фармакокінетичної кривої («концентрація*час – час», $AUC_{0-\infty}$) дозволяють розрахувати середній час утримання (MRT) сполуки N19 в організмі після внутрішньовенного введення, який складає $2,26 \pm 0,63$ год й також характеризує загальний процес перебування в організмі, як досить швидкий.

Таблиця 5.2

Фармакокінетичні параметри сполуки N19 після її в/в введення
(10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$).

Фармакокінетичний параметр	Значення
Константа елімінації, k_{el} , год ⁻¹	$0,511 \pm 0,068$
Сталий об'єм розподілу, V_{dss} , л/кг	$6,3 \pm 0,8$
Площа під фармакокінетичною кривою, $AUC_{0-\infty}$, мкг*год/мл	$27836,9 \pm 5510,1$
Площа під першим моментом фармакокінетичної кривої, $AUMC_{0-\infty}$, мкг*год ² /мл	$62932,6 \pm 12536,2$
Середній час утримання в організмі, MRT, год	$2,26 \pm 0,63$
Загальний кліренс, $Cl_{заг.}$, л*год/кг	$2,771 \pm 0,52$
Час напівелімінації, $T_{el}^{1/2}$, год	$1,4 \pm 0,2$

Загалом, розподіл *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в організмі мишей після його внутрішньовенного болюсного введення характеризується однокамерним характером розподілу (величина питомого об'єму розподілу сполуки дозволяє припустити переважне знаходження сполуки у плазмі крові) із досить швидким процесом її елімінації.

Сполуки, що вивчались, є продуктами біоізостеричної заміни в молекулі відомого класу нестероїдних протизапальних засобів – оксикамів, відтак потенційний спектр їх застосування – лікування станів, які супроводжуються

больовим синдромом та запаленням. За таких умов, а також враховуючи можливість тривалого курсу лікування цими сполуками, найбільш доцільним є пероральний шлях їх введення, який є більш зручним для пацієнта. Ще одним аргументом на користь такого шляху введення цих сполук є їхня погана розчинність у воді. Тому наступним кроком було визначення особливостей фармакокінетики сполук А, В та С за їх перорального одноразового введення.

Після перорального введення похідного бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді різних поліморфних форм, вміст його у плазмі крові визначається у досить великих концентраціях, а концентраційний профіль відповідає кінетиці розподілу відповідно до однокамерної моделі із всмоктуванням. Слід, однак, відмітити, що вид концентраційних кривих вмісту сполуки А, В та С після введення у вигляді поліморфних форм, досить різняться як по формі, так й по величинам визначених концентрацій (рис. 5.5 – 5.7). Так, введення поліморфної форми В призводить до більш високих концентрацій її у плазмі крові (рис. 5.6) у порівнянні із введенням поліморфної форми А (рис. 5.5). Також для поліморфної форми В відмічається більш вузький пик досягнення максимальної концентрації із, відповідно, більш високими показниками вмісту сполуки у плазмі крові, ніж для поліморфної форми А. Щодо форми С, то її концентраційний профіль (рис.5.7), демонструє проміжні показники, які нагадують такі, що можуть бути отримані при введенні суміші поліморфних форм А та В та притаманні адитивності процесів масопереносу сполуки в організмі.

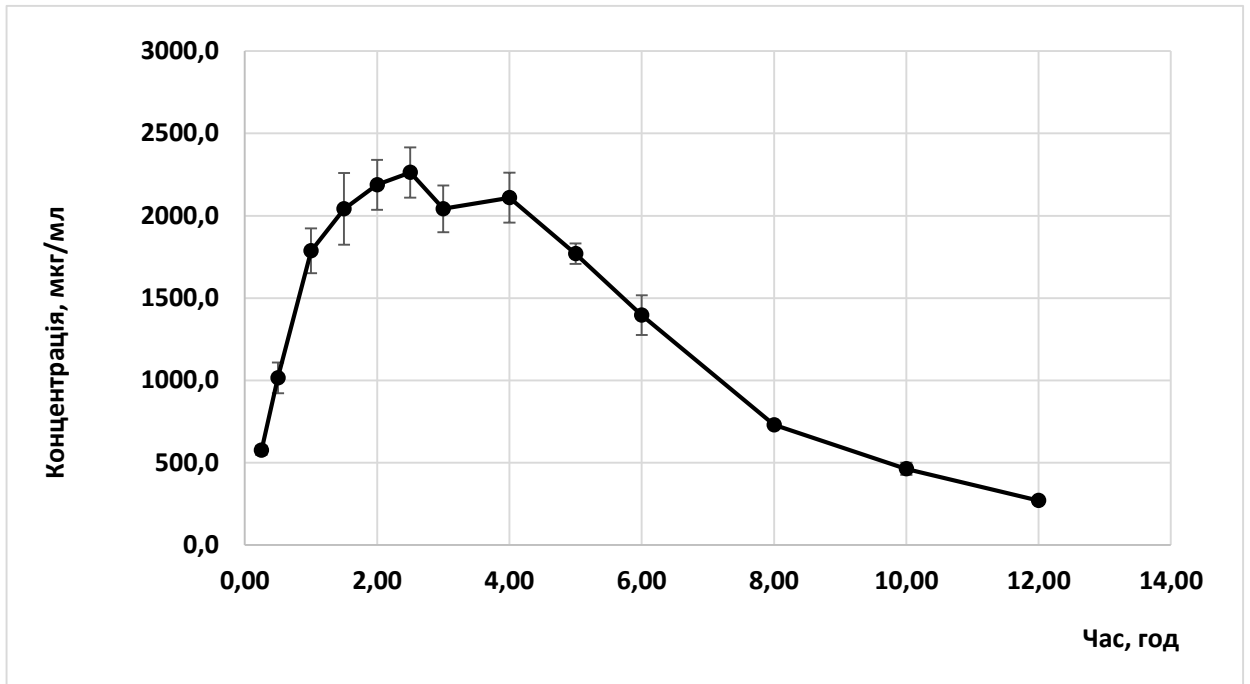


Рис. 5.5 Концентраційний профіль *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (форма А) після її перорального введення (10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$).

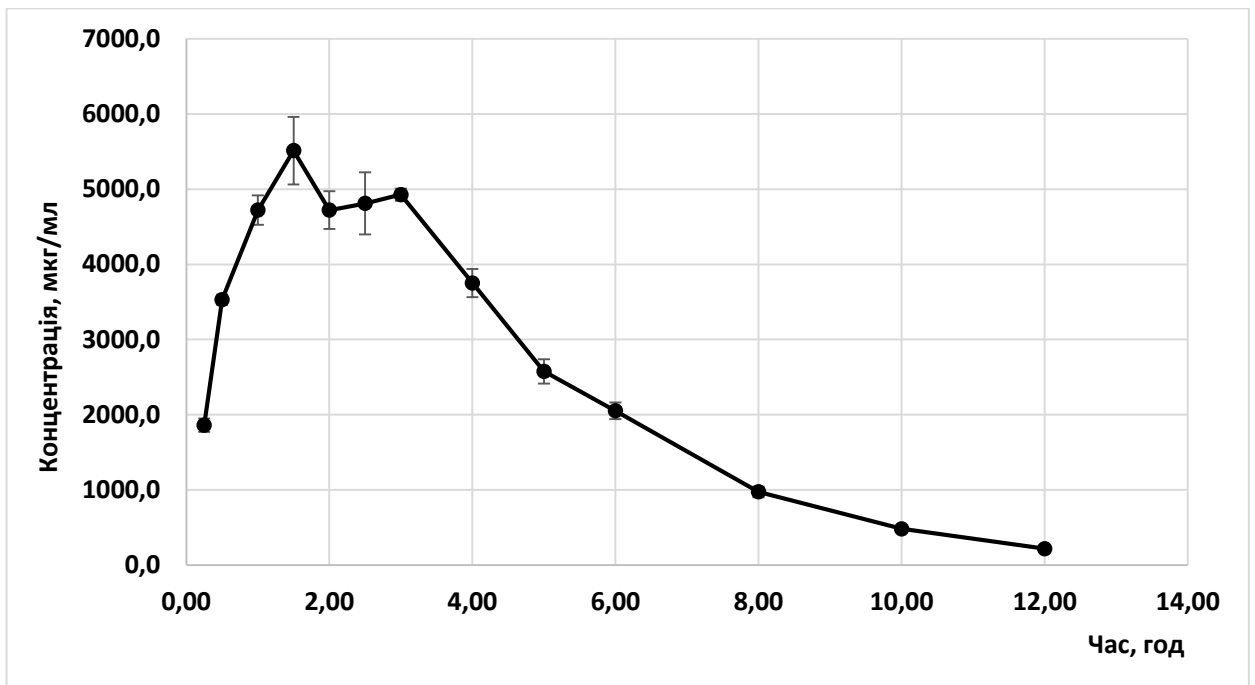


Рис. 5.6 Концентраційний профіль *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (форма В) після її перорального введення (10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$).

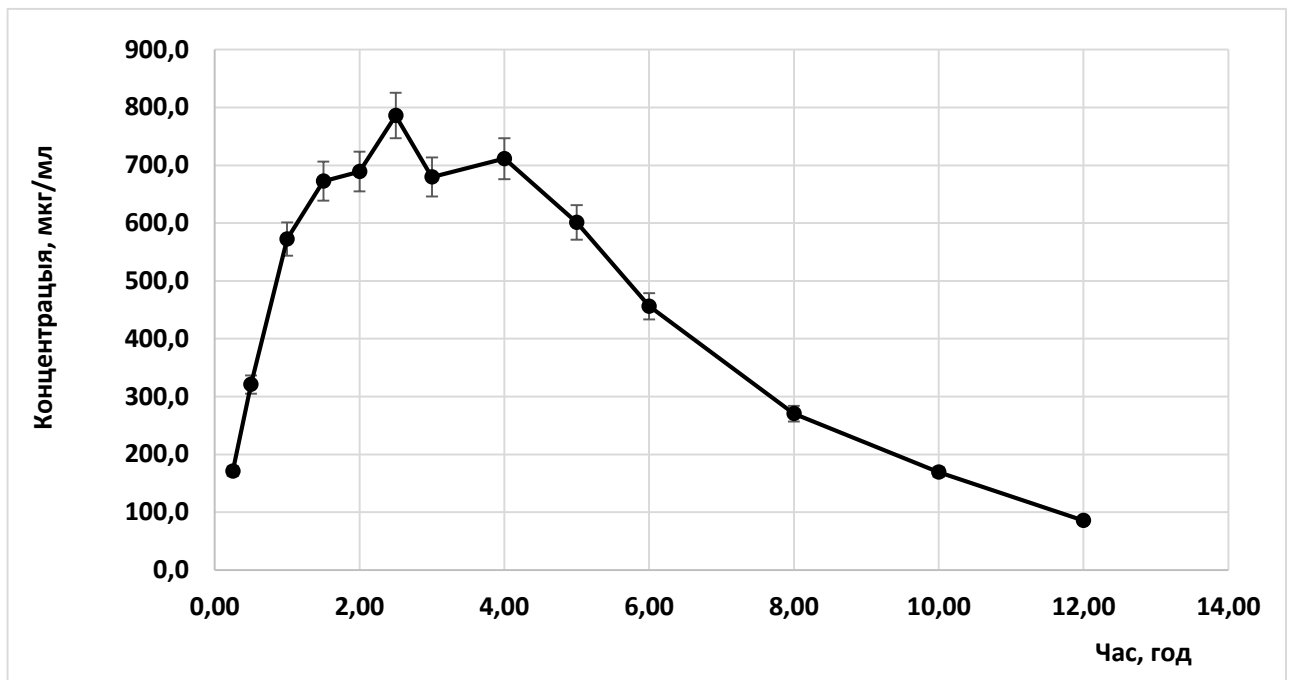


Рис. 5.7 Концентраційний профіль *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (форма С) після її перорального введення (10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$).

Для кількісної характеристики фармакокінетичних процесів поліморфних форм були розраховані відповідні фармакокінетичні параметри для поліморфних форм А, В та С після їх одноразового перорального введення (табл. 5.3).

Більшість фармакокінетичних параметрів, що характеризують процеси розподілу та елімінації сполуки, є досить подібними та не зазнають статистично вірогідної різниці для всіх трьох форм (див. табл. 5.3).

Показник величини сталого об'єму розподілу (V_{dss}) для поліморфних форм не мав статистично значущої різниці, хоча і була зареєстрована різниця між формою В та поліморфами А та С на рівні тенденції. Це демонструє відсутність впливу поліморфної модифікації на процеси розподілу сполуки в організмі.

Величина константи елімінації з плазми крові зазвичай є наслідком подібності фізико-хімічних властивостей самої сполуки (розчинність у воді, реакційноздатність, зв'язування з білками плазми крові тощо). Наші результати показали, що константа елімінації для поліморфної форми В при пероральному введенні була в 1,48 рази більшою порівняно з формою А та С, а час напівелімінації форми В на 34,7-31,6 % був меншим за інші поліморфні форми ($p < 0,05$), що свідчить про більшу швидкість виведення сполуки В з організму. Ці показники є меншими за аналогічний показник для сполуки при її внутрішньовенному введенні, яка становила $0,511 \pm 0,068 \text{ год}^{-1}$, однак різниця не є статистично вірогідною та обумовлена, ймовірно, відсутністю процесу всмоктування при внутрішньовенному введенні. Іншим фактором, що призводить до часткового зниження швидкості елімінації сполуки, також може бути поєднаність активного транспорту та пасивної дифузії у загальному процесі елімінації, завдяки чому при високих концентраціях у плазмі крові сполука що вивчається, екскретується обома цими механізмами, тоді як при менших концентраціях, які досягаються після перорального введення, значний внесок обумовлений лише активним транспортом. Відповідно, також близькими є значення часу напівелімінації ($T_{el}^{1/2}$) сполуки з організму.

Величина загального кліренсу, який залежить від величин об'ємів розподілу та процесу елімінації сполук у сполуки В також був меншим порівняно з двома іншими формами (на 18-25 % в середньому), але ця різниця також не сягала статистично вірогідних значень.

В той же час слід відмітити, що процес абсорбції поліморфних форм значно відрізняється, що відображується у показниках відповідних фармакокінетичних параметрів. Перш за все помітно (див. табл. 5.3), що процес абсорбції *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у поліморфній формі В відбувається із значно більшою швидкістю, ніж у вигляді поліморфної форми А, оскільки константа абсорбції форми В статистично переважає аналогічний показник сполуки А на

12,1 %, а сполуки С – на 20,2 %. Відповідно, середній час напівабсорбції ($T_{abs}^{1/2}$) є меншим для поліморфної форми В у середньому на 11,5 %, порівняно з двома іншими формами кристалів. Менший час всмоктування для форми В обумовлює й загальний менший час перебування цієї сполуки в організмі (на 43,0 %) в порівнянні з формами А та С. Швидкість всмоктування та співвідношення констант абсорбції і елімінації, як відомо, впливають також й на величину ($C_{макс}$, мкг/мл) та час ($T_{макс}$, год) досягнення максимальної концентрації. Поліморфна форма В похідного бензотіазин-3-карбоксаміду демонструє більш високий показник максимальної концентрації, що на 20,56 % переважає форму А ($p < 0,05$) та нестатистично ($p > 0,05$) сполуку С, а час досягнення максимальної концентрації сполуки В був вдвічі швидшим, ніж у форми А (див. табл.5.3).

Завдяки більшій швидкості всмоктування сполуки *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді поліморфної форми В, суттєво збільшується кількість речовини, що потрапляє до внутрішнього середовища організму - інтегральна величина кількості сполуки, що потрапила до крові (площа під фармакокінетичною кривою “концентрація-час”, $AUMC_{0-\infty}$) складає $4280,9 \pm 585,6$ мкг*год²/мл, тоді як для форми А - $4686,7 \pm 798$ мкг*год²/мл.

Більш висока швидкість всмоктування зумовлює й очікувано підвищену біодоступність (*f*) для поліморфної форми В - дійсно, для форми В цей показник був статистично вірогідно вищим на 12,5 та 24,6 % за такий у поліморфних форм А та С. Це свідчить, що форма В має більшу біодоступність за рахунок більш високого ступеня абсорбції.

Таблиця 5.3

Фармакокінетичні параметри *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду після її перорального введення у виді поліморфів А, В та С (10 мг/кг, $M \pm m$, $n = 4$).

Фармакокінетичний параметр	Форма А	Форма В	Форма С
Константа абсорбції, k_{abs} , год ⁻¹	0,669 ± 0,067	0,750 ± 0,077*/**	0,624 ± 0,081
Константа елімінації, k_{el} , год ⁻¹	0,270 ± 0,018	0,401 ± 0,024*/**	0,274 ± 0,017
Сталий об'єм розподілу, V_{dss} , л/кг	6,00 ± 1,31	4,61 ± 0,48	5,612 ± 1,42
Максимальна концентрація, C_{max} , мкг/мл	671,4 ± 21,8	809,5 ± 71,4*	786,1 ± 10,1
Час досягнення максимальної концентрації, T_{max} , год	3,00	1,50	2,51
Площа під фармакокінетичною кривою, $AUC_{0-\infty}$, мкг*год/мл	4686,7 ± 798	4280,9 ± 585,6	5307,7 ± 720,1
Площа під першим моментом фармакокінетичної кривої, $AUMC_{0-\infty}$, мкг*год ² /мл	35529,3 ± 8882,2	18494,8 ± 1754,9	40151,5 ± 3988,6
Середній час утримання в організмі, MRT , год	7,58 ± 2,29	4,32 ± 0,72*	7,58 ± 2,29
Загальний кліренс, $Cl_{заг.}$, л/кг*год	1,61 ± 0,22	1,90 ± 0,21	1,51 ± 0,40
Час напівелімінації, $T_{el}^{1/2}$, год	2,62 ± 0,21	1,71 ± 0,12*/**	2,50 ± 0,20
Час напівабсорбції, $T_{abs}^{1/2}$, год	1,04 ± 0,11	0,92 ± 0,09	1,11 ± 0,14
Біодоступність, f	0,72 ± 0,16	0,81 ± 0,18*/**	0,65 ± 0,12

Примітки:

1. * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно форми А;
2. ** - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно форми С.

Висновок до розділу 5

Результати проведеного дослідження розширюють уявлення про роль просторової будови в проявах фармакологічної активності та безпеки лікарських засобів. На підставі аналізу фармакокінетичних параметрів кристалічних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду можна заключити, що поліморфна форма у вигляді пластинок (сполука В), має найбільшу площу поверхні кристала, що впливає переважно на процеси всмоктування (константа абсорбції сполуки В статистично переважає аналогічний показник сполуки А на 12,1 %, а сполуки С – на 20,2 %) , більш високий показник максимальної концентрації (на 20,6 % більше за форму А ($p < 0,05$) та невірогідно ($p > 0,05$ - за форму С), а також вдвічі більш швидкий час досягнення максимальної концентрації, ніж у форми А. Більш високий ступінь абсорбції сполуки В зумовлює її більшу біодоступність, яка статистично переважає таку у поліморфних форм А та С на 12,5 та 24,6 % відповідно. Водночас сполука В відрізняється від інших поліморфів більш швидкою елімінацією. Константа елімінації для сполуки В при пероральному введенні була в 1,48 рази більшою порівняно з формою А та С, а час напівелімінації форми В на 34,7-31,6 % був меншим за інші поліморфні форми ($p < 0,05$), час перебування цієї сполуки В в організмі був на 43,0 % меншим порівняно з формами А та С, що свідчить про більшу швидкість виведення сполуки В з організму.

На підставі аналізу фармакокінетичних параметрів поліморфних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду можна заключити, що поліморфна форма впливає переважно на процеси всмоктування сполуки із відповідними змінами у показниках величин максимальної концентрації та часу її досягнення. Зазначене можна у подальшому використовувати для оптимізації фармакотерапевтичного впливу сполук з урахуванням різних патологічних станів.

Результати цього розділу відображені в наступних публікаціях: [70].

РОЗДІЛ 6

ПОГЛИБЛЕНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ТА
ЖАРОЗНИЖУЮЧОЇ ДІЇ СПОЛУКИ-ЛІДЕРА СЕРЕД КРИСТАЛІЧНИХ
ПОЛІМОРФІВ *N*-(ТРИФТОРМЕТИЛФЕНІЛ)-4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1*H*-
2*λ*⁶,1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДУ (СПОЛУКА В)

В попередніх розділах було показано, що в процесі хімічного синтезу одержано три кристалічні форми похідного *N*-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2*λ*⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти, які на скринінговій моделі карагенінового набряку у щурів продемонстрували виразні анагетичні та антифлогогенні властивості, ступінь виразності яких перевершували препарати порівняння. Подальші поглиблені дослідження знеболюючої дії трьох сполук за їх в/шл та в/оч введення дозволили виявити найбільш активну форму – сполуку В (кристалічний поліморф у вигляді пластинок). Лідерство цієї композиції підтвердив аналіз її безпечності та ефективності.

Оскільки клас бензотіазин-3-карбонових кислот, до яких належать отримані похідні, є джерелом численних нестероїдних протизапальних засобів, то було доцільно перевірити фармакологічну активність сполуки В за схемою, яка традиційно рекомендована для потенційних НПЗЗ [37, 43]. Вона включає дослідження протизапальної та жарознижуючої дії сполуки в порівнянні з найбільш подібним за хімічною структурою лікарським засобом.

Мета – дослідити протизапальну активність сполуки В за впливом на різні складові запальної реакції (альтерацію, ексудацію та проліферацію), а також жарознижуючу дію цієї сполуки у щурів.

6.1 Визначення умовно ефективних доз за протизапальною активністю для проведення фармакодинамічних досліджень

На першому етапі необхідно було визначити середню ефективну дозу за протизапальною активністю для сполуки В та препарату порівняння. Моделлю запального процесу взято карагеніновий набряк кінцівки щура. Досліджувану сполуку та референс-препарат мелоксикам вводили в/шл, оскільки цей шлях найбільш зручно використовувати при лікуванні хронічних больових синдромів, а також враховуючи погану розчинність *N*-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в воді.

Результати наведені в таблиці 6.1. Виявлено, що за своєю ефективністю сполука В перевершує мелоксикам, оскільки її медіанна ефективна доза була в 1,75 рази меншою за еталонний оксикам.

Таблиця 6.1

Середня ефективна доза (ED₅₀) сполуки В та мелоксикаму за протизапальною активністю у щурів (M ± m, n = 7)

Сполука В			Мелоксикам		
Доза, мг/кг в/шл	Анти-ексудативна активність, %	ED ₅₀	Доза, мг/кг в/шл	Анти-ексудативна активність, %	ED ₅₀
1,0	21,3 ± 3,73	5,21 ± 0,26* мг/кг	1,0	25,4 ± 6,12	9,11 ± 0,46 мг/кг
3,0	38,4 ± 3,87		3,0	26,4 ± 9,15	
5,0	50,6 ± 9,11		5,0	36,8 ± 9,07	
7,5	65,4 ± 6,36		7,5	48,6 ± 4,17	
10,0	75,1 ± 8,84		10,0	50,3 ± 5,55	

Примітка: * - статистично вірогідні відмінності відносно мелоксикаму (p < 0,05).

Тобто, для подальших досліджень сполуку В і мелоксикам вводили тваринам внутрішньошлунково у вигляді водної емульсії після стабілізації Твін-80 в дозах 5,2 та 9,1 мг/кг відповідно.

6.2 Вплив поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на загоювання ранових дефектів шкіри у щурів

В подальшому ми дослідили вплив сполуки В та мелоксикаму на **альтеративний** компонент запальної реакції [43]. Антиальтеративну дію було оцінено на моделі площинних ран шкіри. Результати, які наведені в таблиці 6.2., свідчать, що сполуки, що досліджувались, зменшують площу рани у всі терміни дослідження. При цьому сполука В зменшувала розміри ранового дефекта на 11,6, 23,6, 46,0, 54,2, 49,4 та 57,3% на 2, 3, 5, 7, 14 та 21 добу відповідно. За цими властивостями вона переважала препарат порівняння мелоксикам, що було особливо значущим на 5-ту та 21-шу добу експеримента. Кількість тварин, у яких на 28-добу після нанесення рани спостерігалось повне рубцювання площинної рани, в групі контролю становило 42,8%, тоді як на тлі введення сполуки В та мелоксикаму їх кількість становила 85,7 та 71,4% відповідно.

6.3 Дослідження протизапальної поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В на) моделі токсичного набряку легень

Вивчення **антиексудативних** властивостей проводили на моделі гострого токсичного альвеолярного набряку легень у щурів, який моделювали в/оч уведенням 6 % розчину NH₄Cl дозою 400 мг/кг [37, 43].

Результати, представлені в таблиці 6.3 свідчать, що сполука В має виразні протизапальні властивості. Так, згідно отриманих результатів, в групі тварин, яким вводили сполуку В, залишались живими протягом 3-х годин експерименту 4 із 7-ми тварин в групі, тоді як в групі нелікованих тварин всі тварини загинули. Масовий коефіцієнт легень у щурів на тлі лікування сполукою В, був в 1,3 рази нижчим, ніж у контрольних щурів ($p < 0,05$). Антиексудативна активність становила 64,0%.

Таблиця 6.2

Вплив похідного N-(трифторметилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та мелодоксиаму на загоєвання шкірних дефектів шурів, M ± m, n = 7

Умови досліджу	Площа ран (мм ²) за термінами спостереження						К-ть тварин з повним загоєнням ран на 28 добу, %
	2 доба	3 доба	5 доба	7 доба	14 доба	21 доба	
Контроль	101,6±0,27	105,1±1,44	98,6±1,35	76,7±1,33	46,1±1,25	24,4±1,24	3 (42,8)
Сполука В	89,8±2,7*	80,3±2,76**	53,2±1,75*#	35,1±1,65**	23,3±2,85**	10,4±0,29**	6 (85,7)
Мелодоксиам	96,1±2,2*	85,4±3,76*	60,8±2,69*	37,5±2,42*	27,5±1,67*	15,2±0,36*	5 (71,4)

Примітки:

1. * - p < 0,05 відносно контролю;
2. # - p < 0,05 відносно мелодоксиаму.

Таблиця 6.3

Вплив похідного N-(трифторметилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2*λ*⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на перебіг токсичного набряку легень у щурів

($M \pm m$, $n = 7$)

Експериментальні групи	Доза, мг/кг	Виживаність тварин, %	МКЛ, %	АЕА, %
Інтактні тварини	–	100	$0,75 \pm 0,04$	–
Контрольна патологія	–	0	$1,21 \pm 0,05^*$	0
Сполука В	5,2	57,1	$0,91 \pm 0,02^{**/**}$	64,0
Мелоксикам	9,1	42,8	$0,93 \pm 0,04^{**/**}$	60,9

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ відносно інтактних тварин;
2. ** – $p < 0,05$ відносно контрольної патології.

За цими параметрами сполука В перевершувала препарат порівняння мелоксикам, оскільки у тварин, яким вводили цей препарат, виживаність тварин становила лише 3 із 7 щурів в групі, антиексудативна активність склала 60,9 %. Проте різниця масових коефіцієнтів легень між мелоксикамом і сполукою В не сягала статистично вірогідних значень, хоча і вірогідно переважала групу контрольної патології ($p < 0,05$).

6.4 Дослідження антипроліферативної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2*λ*⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду сполуки В на моделі ватної гранульоми у щурів

Антипроліферативну активність досліджували на моделі «ватної» гранульоми у щурів [37]. Отримані результати засвідчили, що маса

грануляційної тканини у щурів групи контролю (які отримували розчинники), становила в середньому 48,7 г, тоді як обидва препарати вірогідно зменшували процеси проліферації (табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Антипроліферативна активність похідного N-(трифторметилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2*Λ*⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у порівнянні з мелоксикамом на моделі «ватної» гранульоми у щурів ($M \pm m$, $n = 7$)

Експериментальні групи	Доза, мг/кг	Маса грануляційної тканини, мг	Активність, %
Контрольна група	–	48,7 ± 0,95	–
Сполука В	17,8	41,3 ± 1,25*	15,2 ± 3,70
Мелоксикам	11,0	42,4 ± 1,72*	12,9 ± 2,39

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно контрольної патології

Так, сполука В показала помірну антипроліферативну активність, що підтверджувалось достовірними показниками пригнічення утворення грануляційної тканини у порівнянні з нелікованими щурами (15,2 %). Цей показник був більшим, ніж у препарата порівняння (12,9 %), однак ця різниця не сягала статистично вірогідних значень.

6.5 Дослідження фармакодинаміки сполуки В на моделі хронічного запального процесу (ад'ювантного артриту) у щурів

Досліди виконані на 28 щурах-самцях лінії Вістар з початковою масою 200-220 г. Щури були поділені на 4 групи. Тваринам 1-ї групи (позитивний контроль вводили 0,9 % розчин натрію хлориду, тваринам 2,3 та 4-ї груп суплантажно вводили в ліву задню кінцівку 0,1 мл повного ад'юванту Фрейнда (Thermo Fisher scientific). Через 14 днів на піку розвитку автоімунного

запалення [43], протягом 2 тижнів тваринам 3-ї та 4-ї груп починали в/шл вводили сполуку В та мелоксикам в їх середніх ефективних дозах (ED_{50}) за протизапальною активністю (див. розділ 6.1), тоді як тваринам 1-ї та 2-ї груп – еквіоб'ємні кількості розчинників. Оцінювали загальний стан тварин, клінічні, гематологічні та біохімічні ознаки запального процесу. Детальний опис експерименту наведено в розділі 2.

6.5.1. Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на клінічні та гематологічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту

Як засвідчили отримані результати, на третю добу після введення ад'юванту Фрейнда в усіх тварин розвивалась первинна запальна реакція: швидкий розвиток гіперемії і набряку ураженої кінцівки, збільшенням її розміру та болісністю при напружуванні. Максимальний прояв ознак спостерігався на 14 день експерименту. Тварини були менш рухливими, знижувалися споживання їжі та води і їх загальна активність протягом дня.

У більшості тварин групи з АДА з 14-ї по 28-му добу дослідження з'являлися ознаки вторинного запалення - генералізованого артриту, які проявлялися ураженням другої лапи, що свідчить про розвиток системного запального процесу. Починаючи з 15 доби експерименту тваринам експериментальних груп почали вводити препарати лікування.

Об'єм кінцівки на 14-ту та 28-му добу експерименту у тварин контрольної групи суттєво не змінився, тоді як у дослідних тварин на 14-ту добу після введення ад'юванта – статистично вірогідно збільшився в середньому на 70 % ($p < 0,05$) (табл. 6.5, рис. 6.1). У тварин без фармакологічної корекції в подальшому на 28-му добу спостерігалось

стабілізація утвореного набряку, вочевидь завдяки пристосувально-компенсаторним процесам.

Таблиця 6.5

Динаміка об'єму ураженої кінцівки щурів з ад'ювантним артритом на тлі лікування сполукою В та мелоксикамом ($M \pm m$, $n = 7$)

Дослідна група	Об'єм кінцівки, мм ³		
	вихідні дані	14 доба	28 доба
Позитивний контроль	518,1 ± 7,63	520,6 ± 7,33	522,1 ± 8,15
Негативний контроль (АДА без лікування)	468,3 ± 9,60	941,0 ± 11,1	921,6 ± 13,9*
АДА + Сполука В	541,9 ± 6,44	944,9 ± 5,65#	780,0 ± 6,93*#°
АДА + Мелоксикам	533,8 ± 8,69	927,3 ± 5,47#	821,9 ± 8,31*#°

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно вихідного значення;
2. # - $p < 0,05$ тварин з АА без лікування у відповідний термін;
3. ° - $p < 0,05$ відносно 14-ї доби.

На противагу цьому, у тварин, яким протягом 2-х тижнів вводили сполуку В, об'єм ураженої кінцівки на 28 добу перевищував вихідний показник лише на 44,2 % (проти 74,4 % на 14-ту добу, $p < 0,05$). Аналогічний параметр кінцівки щурів, лікованих мелоксикамом, в середньому був на 54,2 % більшим за вихідний рівень (проти 74,2 % на 14-ту добу, $p < 0,05$).

Розрахунок антиексудативної активності показав, що для сполуки В цей показник становив 38,9 %, що було більше, ніж у мелоксикаму – 26,1 %.

Розвиток системного запального процесу супроводжувався зменшенням приросту маси тіла тварин, що чітко спостерігалось у тварин групи «АДА без лікування» (табл. 6.6, рис. 6.1). Якщо у тварин позитивного контролю середній приріст маси тіла становив 12,6 %, то у тварин з АДА без корекції – лише 2,36

Динаміка маси тіла щурів з ад'ювантним артритом
на тлі лікування сполукою В та мелоксикамом ($M \pm m, n = 7$)

Дослідна група	Маса тіла, г		
	вихідні дані	14 доба	28 доба
Позитивний контроль	203,5 ± 1,43	218,1 ± 1,90*	229,1 ± 1,24*#
Негативний контроль (АДА без лікування)	201,4 ± 13,22	203,0 ± 2,39	206,0 ± 1,70
АДА + Сполука В	197,9 ± 3,76	210,7 ± 1,94*#	224,4 ± 2,15*#
АДА + Мелоксикам	202,9 ± 2,13	213,1 ± 1,51*#	226,7 ± 4,60*#

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно вихідного рівня;
2. # - $p < 0,05$ відносно тварин з АДА без лікування у відповідний термін.

Динаміка маси тіла щурів, наведена в таблиці 6.6, свідчить про вірогідне зниження маси тіла тварин з АДА у порівнянні з щурами групи позитивного контролю.



Рис. 6.1 Вплив сполуки В та мелоксикаму на динаміку клінічної картини запальної реакції щурів з АДА на 28 добу ($M \pm m, n = 7$). Примітки: * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно АДА без лікування; ** - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно лікування мелоксикамом.

Лікування сполукою В, подібно до мелоксикаму, на 28 добу експерименту не стримувало природного набору маси тіла тваринами (на відміну від Ада без лікування). За цим показником були зафіксовані статистично вірогідні відмінності щодо групи негативного контролю ($p < 0,05$). Водночас середній показник маси тіла тварин лікованих груп не мав статистично вірогідної різниці між собою: приріст маси тіла у тварин, лікованих сполукою В і мелоксикамом становив 13,6 та 11,7 %, відповідно.

Тобто, наші результати показали, що N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука В) володіє виразною протинабряковою дією на експериментальній моделі хронічного запального процесу суглобів у щурів. За ступенем виразності протизапальний ефект переважає такий мелоксикаму.

Розвиток генералізованої запальної реакції при Ада викликав суттєві зміни картини периферичної крові у нелікованих тварин: зареєстровано статистично вірогідне збільшення показників ШОЕ (в 1,85 рази) та лейкоцитозу (в 2,16 рази) порівняно з вихідними показниками до початку моделювання патології (табл. 6.7, рис. 6.2).

Таблиця 6.7

Зміни показників клінічного аналізу крові щурів з ад'ювантним артритом під впливом сполуки В та мелоксикаму ($M \pm m, n = 7$)

Дослідна група	Лейкоцити, 10 ⁹ /л		ШОЕ, мм/год	
	1 доба	28 доба	1 доба	28 доба
Позитивний контроль	10,05 ± 0,27	10,33 ± 0,28	5,90 ± 0,21	5,95 ± 0,19
Негативний контроль (Ада без лікування)	9,80 ± 0,35	21,16 ± 0,82*	5,18 ± 0,14	9,61 ± 0,27*
Ада+Сполука В	9,97 ± 0,28	11,3 ± 0,42 #	5,61 ± 0,18	6,06 ± 0,20#
Ада+Мелоксикам	9,75 ± 0,21	10,95 ± 0,14#	5,80 ± 0,21	6,38 ± 0,19#

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно групи позитивного контролю;
2. # - $p < 0,05$ відносно тварин з АА без лікування.

Лікування сполукою В не повністю усувало зростання показників запалення, проте збільшення ШОЕ та кількості лейкоцитів в цій групі було значно менш виразним (на 13,3 та 3,92 %, відповідно) порівняно з вихідними значеннями. Таке зростання було статистично вірогідно меншим, ніж у нелікованих тварин ($p < 0,05$). Введення референс-препарату також вірогідно стримувало ескалацію гематологічних показників запального процесу ($p < 0,05$). ШОЕ зростала на 10,0 %, а лейкоцитоз – на 12,6 %, що практично співставлялось із вивчаємим похідним карбоксаміду (див. табл. 6.7, рис. 6.2).

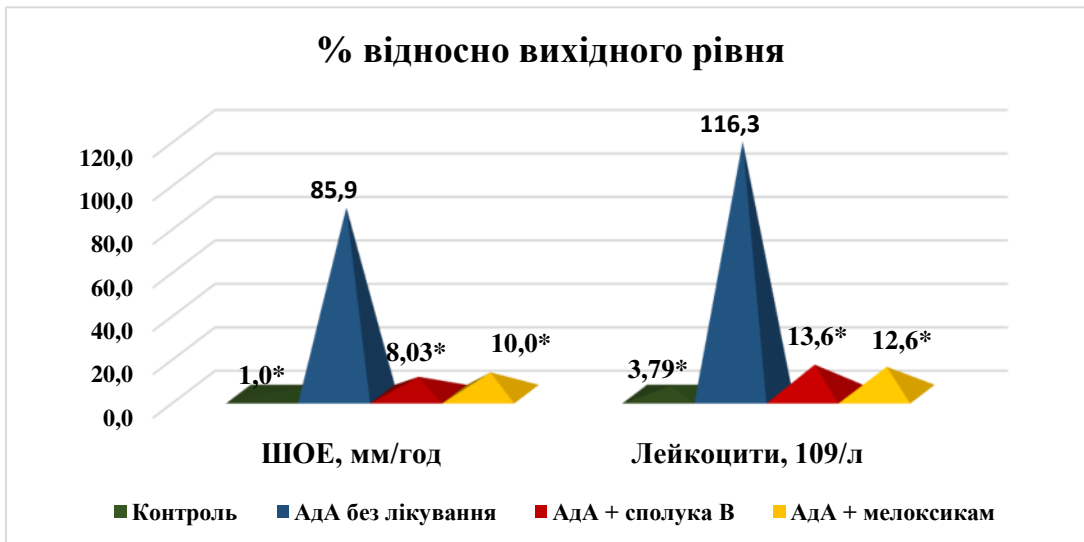


Рис. 6.2 Вплив сполуки В та мелоксикаму на динаміку показників запальної реакції в периферичній крові щурів з АДА на 28 добу, ($M \pm m$, $n = 7$).

Примітки: * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно АДА без лікування; ** - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно лікування мелоксикамом.

Таким чином, ми отримали докази, що нове оригінальне похідне N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука В) виявляє виразну протизапальну дію на моделі системного автоімунного запального процесу у щурів, за ступенем виразності якого воно співставляється з препаратом порівняння мелоксикамом.

6.5.2. Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В) на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту

Добре відомо, що головним механізмом протизапальної активності НПЗЗ є їх антицитокінова та антипростагландинова дія [61, 235, 236], тому ми дослідили зміни вмісту прозапального інтерлейкіну ІЛ-1 β та РgН-синтази в гомогенаті СОШ щурів. Встановлено, що Ада супроводжувався статистичним зростанням (в 1,90 та 1,75 разів) зазначених показників, що цілком відповідає іншим макроскопічним та біохімічним змінам (табл. 6.8). Застосування мелоксикаму та сполуки В також викликало зростання ІЛ-1 β та РgН-синтази, проте масштабність цих змін була меншою, ніж у тварин без лікування (1,81 та 1,50 разів щодо ІЛ-1 β, та 1,39 та 1,16 разів щодо РgН-синтази, відповідно). Тобто, протизапальна дія похідного карбоксаміду статистично переважала препарат порівняння.

Таблиця 6.8

Вплив сполуки В та мелоксикаму на вміст ІЛ-1 β в сироватці крові та активність РgН-синтази в СОШ за ад'ювантного артриту у щурів (M ± m, n = 7)

Групи щурів	ІЛ-1 β, пг/мл	РgН-синтаза, нмоль/хв•мг протеїна
Позитивний контроль	132 ± 5,79	0,422 ± 0,029
Негативний контроль (Ада без лікування)	251 ± 6,68* 1,90 рази	0,739 ± 0,033* 1,75 рази
Ада+ сполука В	198 ± 6,43*#& 1,50 рази	0,491 ± 0,024*#& 1,16 рази
Ада+Мелоксикам	240 ± 6,71* 1,81 рази	0,589 ± 0,037*# 1,39 рази

Примітки:

1. * - p < 0,05 відносно групи позитивного контролю;
2. # - p < 0,05 відносно тварин з Ада без лікування;
3. & – p < 0,05 відносно тварин, що отримували мелоксикам.

Вплив на патобіохімічні показники запального процесу групи НПЗЗ не обмежуються лише описаними діями. Добре відомо, що їх протизапальна активність реалізується за рахунок впливу на індукбельну ізоформу NO-синтази, та також, як стало нещодавно відомо, і на систему гідроген сульфід [67, 240]. Наші результати показали, що експериментальний запальний процес викликає зростання сумарного вмісту нітратів та нітритів (на 52,94 %) та сумарної активності NO-синтази (на 61,90 %) в порівнянні з тваринами групи позитивного контролю (табл. 6.9). Це супроводжувалось суттєвим зростанням рівня H_2S та активності його фермента-продуцента (в 1,43 та 1,52 рази, відповідно) (табл. 6.10). Лікування тварин мелоксикамом практично не впливало на елевацію даних показників, тоді як введення тваринам сполуки В – стримувало надмірну продукцію прозапальних маркерів (рівень нітратів та нітритів і NO-синтази збільшувався лише на 58,8 та 54,7 %, відповідно, а гідроген сульфід і ЦГЛ – в 1,49 та 1,47 рази, відповідно ($p < 0,05$). Вплив сполуки В статистично відрізнявся від препарату порівняння.

Таблиця 6.9

Вплив сполуки В та мелоксикаму на вміст метаболітів нітроген монооксиду, активність NO-синтази в СОШ за ад'ювантного артриту у щурів

($M \pm m, n = 7$)

Групи щурів	$NO_2^- + NO_3^-$, нмоль/г тканини	NO-синтаза, пмоль/хв•мг протеїна
Позитивний контроль	$2,21 \pm 0,14$	$1,68 \pm 0,14$
Негативний контроль (АДА без лікування)	$3,38 \pm 0,16^*$	$2,72 \pm 0,19^*$
АДА+ сполука В	$2,80 \pm 0,15^*\#\&$	$2,03 \pm 0,14^*\#\&$
АДА+Мелоксикам	$3,51 \pm 0,17^*$	$2,60 \pm 0,18^*$

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ відносно контрольної групи тварин;
2. # - $p < 0,05$ відносно тварин з АА;
3. & - $p < 0,05$ відносно тварин, які отримували мелоксикам.

Вплив сполуки В та мелоксикаму на вміст H₂S та активність ЦГЛ в СОШ за ад'ювантного артриту у щурів (M ± m, n = 7)

Групи щурів	H ₂ S, нмоль/мг протеїна	ЦГЛ, нмоль/хв•мг протеїна
Позитивний контроль	1,74 ± 0,09	0,155 ± 0,013
Негативний контроль (АДА без лікування)	2,49 ± 0,10*	0,236 ± 0,014*
АДА+ сполука В	2,10 ± 0,09*#&	0,180±0,015*#&
АДА+Мелоксикам	2,60 ± 0,13*	0,228 ± 0,017*

Примітки:

1. * - p < 0,05 відносно контрольної групи тварин;
2. # - p < 0,05 відносно тварин з АА;
3. & - p < 0,05 відносно тварин, які отримували мелоксикам.

Тобто, результати досліджень показали, що сполука В володіє виразною протизапальною активністю, яка включає в себе вплив на всі три компоненти запальної реакції – альтерацію, проліферацію та ексудацію.

6.6 Дослідження жарознижуючої дії поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполуки В)

Ще одним необхідним кроком для оцінки фармакодинаміки потенційних нестероїдних протизапальних засобів є визначення антипіретичних властивостей. Тому в подальшому ми дослідили **жарознижувальну дію** сполуки В на моделі молочної лихоманки у щурів на фоні максимального підвищення температури [45]. Встановлено, що після введення пірогену в групі тварин контрольної групи ректальна температура вірогідно збільшувалась на 2,13, 2,23, 2,27 та 1,84 градуси на 4, 5, 6 та 7-му годину,

відповідно. Застосування на тлі лихоманки досліджуваних речовин приводило до вірогідного зниження температури тіла тварин. Жарознижувальна активність сполуки В на 5-й, 6-й та 7-й годинах становили 21,2, 39,6 та 39,3 %, відповідно (табл. 6.10). Аналогічний ефект мелоксикаму на таких самих термінах дослідження був 33,3, 34,6 та 16,4 %, відповідно. Тобто, антипіретична дія сполуки В на 5-й годині після введення пірогену поступалась мелоксикаму. На 6-й годині – практично співставлялась, і на 7-й годині після моделювання пірогенної реакції – перевершувала препарат порівняння.

Підсумовуючи отримані дані, можна відмітити, що сполуці В притаманні всі базові фармакологічні ефекти, властиві НПЗЗ – болетамуючий, жарознижуючий та протизапальний.

Висновок до розділу 6

Таким чином, характеризуючи результати проведеного дослідження, можна зазначити, що поліморфна сполука *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду володіє протизапальною активністю на всі компоненти запальної реакції – альтерацію, ексудацію та проліферацію. За ефективністю на моделі експериментального запалення ця речовина перевершує хімічно близький аналог мелоксикам, оскільки її ED₅₀ при пероральному введенні становить 5,2 мг/кг, тоді як у референс-препарату – 9,1 мг/кг.

Результати показали, що сполука В виявляє виражену антипіретичну дію на моделі молочної лихоманки у щурів, ступінь виразності якої на 6-й годині співставляється з мелоксикамом, перевершуючи його на 7-й годині в 2,39 рази

Похідне *N*-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука В) виявляє виразну протизапальну дію на моделі хронічного запального процесу - ад'ювантного артриту у щурів, про що свідчить збереження приросту маси тіла та зменшення набряку ураженої кінцівки на 28-му добу в 1,21 рази порівняно з 14-ю добою ($p < 0,05$).

Референтний препарат мелоксикам за аналогічних умов експерименту також зменшував набряк ураженої кінцівки в 1,12 рази, однак цей показник статистично поступався сполуці В. Протизапальна активність сполуки В та мелоксикаму на цій моделі патологічного процесу становила 38,9 та 26,1 %, відповідно.

Експериментальна терапія АдА сполукою В, подібно до мелоксикаму викликала зменшення ознак запальної реакції за гематологічними показниками, про що свідчило вірогідне зменшення показника ШОЕ (в 1,58 та 1,50 рази, відповідно), кількості лейкоцитів в периферичній крові (відповідно на 46,6 % та 48,3 % ($p < 0,05$)). При цьому, за виразністю лікувального ефекту зазначені сполуки були співставними.

АдА супроводжувався статистичним зростанням (в 1,90 та 1,75 рази) ІЛ-1 β та РgН-синтази в гомогенаті СОШ щурів. Обидві сполуки зменшували масштабність змін цих біомаркерів, однак дієвість похідного карбоксаміду була суттєвішою, оскільки зростання ІЛ-1 β та РgН-синтази були в 1,50 та 1,16 рази на тлі введення сполуки В ($p < 0,05$), та в 1,81 та 1,39 рази на тлі лікування мелоксикамом ($p < 0,05$). Водночас мелоксикам практично не впливав на підвищення прозапальних маркерів – вмісту нітратів та нітритів та сумарної активності NO-синтази, спричинених ад'ювантним артритом, а також зростання рівня H_2S і активності ЦГЛ в СОШ, тоді як введення сполуки В стримувало надмірну продукцію прозапальних маркерів (рівень нітратів та нітритів і NO-синтази збільшувався лише на 58,8 та 54,7 %, відповідно, а гідроген сульфід і ЦГЛ – в 1,49 та 1,47 рази, відповідно ($p < 0,05$)).

Результати цього розділу опубліковані в наступних працях: [8, 9, 10].

Таблиця 6.10

Динаміка жарознижжучої активності похідного N-(трифторметилфеніл-4-гідроксн-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензоліазин-3-

карбоксаміду та мелоксикаму на моделі молочної лихоманки у щурів, n = 7, M ± m

Групи тварин	Вихідні дані, T ⁰ C	Терміни вимірювання (години)											
		4 години			5 години			6 години			7 годин		
		T ⁰ C	Δt ⁰ C	%	T ⁰ C	Δt ⁰ C	%	T ⁰ C	Δt ⁰ C	%	T ⁰ C	Δt ⁰ C	%
контроль	38,10± 0,13	40,20± 0,23*	2,13± 0,05	40,14± 2,05*	2,07± 0,05	-	39,94± 1,04*	1,87± 0,04	-	39,36± 0,23*	1,29± 0,24	-	
Сполука В	38,04± 0,28	39,89± 0,10*	1,84± 0,10#	39,80± 1,05*	1,76± 0,13#	15,2	39,41± 1,10	1,37± 0,13#	26,7	39,10± 0,28*	1,06± 0,19	17,8	
Мелоксикам	38,17± 0,48	40,13± 0,13*	1,96± 0,14	39,66± 0,28*	1,49± 0,07#	28,3	39,51± 0,16*	1,49± 0,08#	20,6	39,36± 0,18*	1,19± 0,18	7,8	

Примітки:

1. * - p < 0,05 відносно вихідного рівня;
2. # - p < 0,05 відносно контролю у відповідні терміни.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Властивий багатьом речовинам, в тому числі й біологічно активним, поліморфізм – надзвичайно серйозна проблема, яка потребує пильної уваги і всебічного вивчення. Явище поліморфізму пояснюється тим, що одні й ті самі атоми речовини можуть створювати різні стійкі кристалічні решітки. Вперше це явище описав в 1788 р. німецький хімік М. Г. Клапорт. В 1942 р. було відомо більше 1200 органічних поліморфних сполук, натеper їх нараховують більше 10 000. Поліморфні зміни лікарських засобів можуть бути причиною швидкої інактивації препаратів, зміни фізичних параметрів готових лікарських засобів, хімічної несумісності інгредієнтів в одній і тій самій лікарській формі. Змінюючи фармакокінетику лікарського засобу, поліморфізм може впливати на його токсичність. Фармацевтичні субстанції мають властивість утворювати поліморфні модифікації, що відрізняються одна від одної кристалографічними параметрами, фізико-хімічними властивостями тощо. Різні за силою дії та токсичністю різні поліморфи та стереоізомери здатні утворювати антибактеріальні препарати (хлорамфенікол, ампіцилін, тетрациклін), місцеві анестетики та анагетіки (ібупрофен, кетопрофен), гормональні та серцево-судинні засоби метилпреднізолон, інсулін та прогестерон та ін. [2, 34, 77, 133, 245].

Дослідження присвячене вирішенню актуального завдання фармакології - пошуку перспективних речовин з анагетичною та протизапальною активністю серед похідних 4-R-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот на підставі експериментальних досліджень фармакодинаміки та фармакокінетики різних кристалічних модифікацій найбільш активних сполук.

Дослідження залежності фармаколодинамічних та фармакокінетичних особливостей поліморфних речовин різної кристалічної будови було досліджено на прикладі трьох хімічних сполук.

Першу групу поліморфів було отримано в результаті перетворення 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти в складний ефір. У результаті як продукти досліджуваної реакції виділено два ефіри - етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилат та його 1-етилзаміщений аналог. Аналіз результатів наших випробувань (табл. 3.1-3.2) свідчить про те, що продукт діалкілування солі (див. рис. 2.1), тобто етил 1-етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилат (сполука NI-79), мало цікавий як об'єкт для подальшого фармакологічного дослідження. Підставою для такого висновку був дуже помірний аналгетичний і вкрай слабкий протизапальний ефект, що було продемонстровано на моделі карагенінового набряку у щурів. Однак для розкриття закономірностей взаємозв'язку «структура-діяльність», які є важливими для подальших цілеспрямованих пошуків нових біологічно активних речовин, така інформація також є цінною. Значно більше уваги заслуговує порівнянні біологічних властивостей різних кристалічних модифікацій ефіру (див. рис. 2.2). Отримані кристалічні модифікації етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату були дуже різними за своїми біологічними властивостями (див. табл. 3.1 та 3.2), хоча насправді це одна і та ж речовина. Так, якщо ромбічна форма 2O (сполука NI-77) з достатньо вираженою знеболюючою дією мала дуже слабку протизапальну дію, то моноклінна форма 2M (сполука NI-75) за тих же умов і в тій же дозі була одночасно потужним знеболюючим і антиексудативним засобом, що значно перевищував не тільки піроксикам, а й більш активний за цими показниками аналог мелоксикам. Ми дійшли висновку, що ця різниця зумовлена різною кристалічною будовою молекул, оскільки просторова структура сполук NI-75 та NI-77 була майже однаковою у двох поліморфних модифікацій. Подібна залежність була зареєстрована і у випадку *N*-бензил-4-гідрокси-1-метил-2,2-

діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та сольватів його 4-O-натрієвої солі [226].

Дослідження кристалічної будови показало, що у моноклінних кристалах молекули етил 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилат (сполука NI-75) утворює нескінченні ланцюги (рис. 7.1 А) вздовж кристалографічного напрямку. Молекули всередині ланцюга зв'язані між собою та не мають зв'язків із сусідніми ланцюгами. У орторомбичній формі (сполука NI-77) (рис. 7.1 Б), молекули ефіру також утворюють нескінченні ланцюги у кристалографічному напрямку і пов'язані не лише між собою, але і із сусідніми ланцюгами, причому сила зв'язків порівняно з моноклінною формою, сильніша. Крім того, ці поліморфи відрізняються типом упаковки молекул в кристалах.

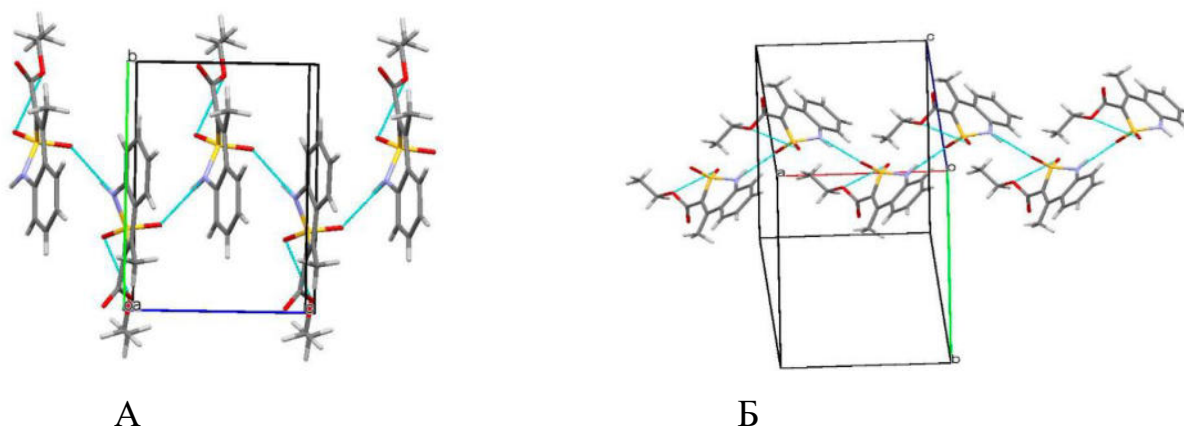


Рис. 7.1 Кристалічна будова моноклінної (А) та орторомбичної поліморфних форм етил 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату [227].

Тобто, різна активність двох поліморфних модифікацій сполук із однаковою просторовою структурою може бути викликана різною швидкістю руйнування кристалічної структури і тому залежить від взаємодій між молекулами.

Наступним похідним бензотіазин-3-карбонових кислот були похідні N-(2,6-диметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, які ще на етапі попереднього скринінгу володіє високою анальгетичною активністю, співставною з мелоксикамом [229]. В процесі хімічного синтезу з використанням різних розчинників було отримано дві

енантіоморфні форми із дзеркальним розташуванням атомів (сполука NI-34 та сполука NI-35). Скринінгові дослідження їх фармакологічних властивостей продемонстрували суттєві відмінності між ними (див. табл. 3.3 та 3.4). Виявилося, що форма 1A (NI-34) має дуже сильний анальгетик властивості, але відносно слабкі протизапальні властивості. Навпаки, форма 1B (NI-35) є слабким анальгетиком, але має виразні протизапальні властивості. Ми думаємо, що така різниця викликана молекулярною структурою досліджуваної сполуки. Формально молекула не містить стереогенних атомів. Але два атоми O сульфонільної групи не є рівними в утворенні водневих зв'язки. Лише один з них є акцептором протонів у внутрішньо- і міжмолекулярних водневих зв'язках одночасно. В результаті ці атоми O не є еквівалентними і атом S стає псевдоасиметричним. Враховуючи це, ми можемо розглядають конформери сполуки NI-34 та NI-35 як справжні енантіомери. Подібні властивості зареєстровані і для інших відомих сполук таких як гідрохлоротіазид [199], піроксикам [175] та лорноксикам [214].

Ще однією структурою, яка в процесі синтезу утворює різні кристалічні поліморфи, є N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід. Як і в попередньому випадку, вибір цієї сполуки в якості об'єкта дослідження зумовлений високою знеболюючою активністю, продемонстрована нею під час попередніх скринінгових тестувань [226]. Хімічна будова цієї сполуки наведена на рис. 2.3.

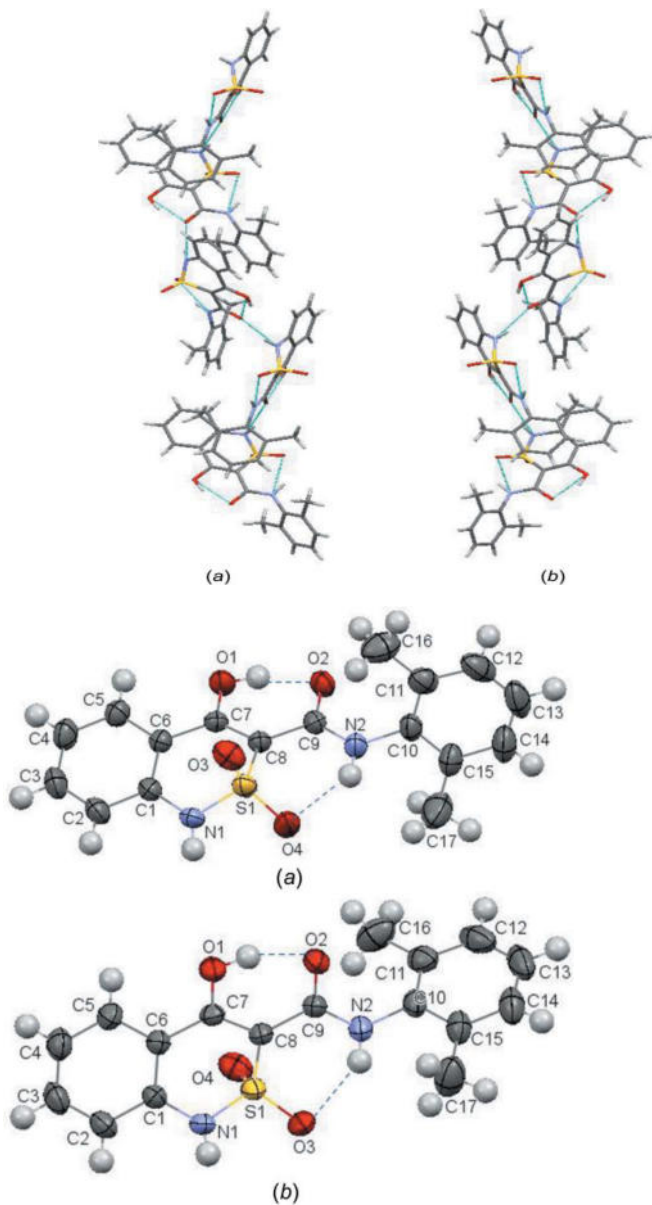


Рис. 7.2 Кристалічна та просторова будова енантіоморфних молекул сполук NI-34 та NI-35 [206].

Кристалічні форми А, В і С N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду представлені в нашій роботі унікальні тим, що відрізняються один від одного лише зовнішнім виглядом, зберігаючи ідентичність всіх параметрів внутрішньої структури (рис. 7.3). Дифракторний аналіз підтвердив повну ідентичність атомної структури для всіх трьох зразків, які відрізняються лише зовнішньою формою кристалів. Завдяки цьому вони незвичайні і дуже цікаві об'єкти для фармакологічних досліджень.

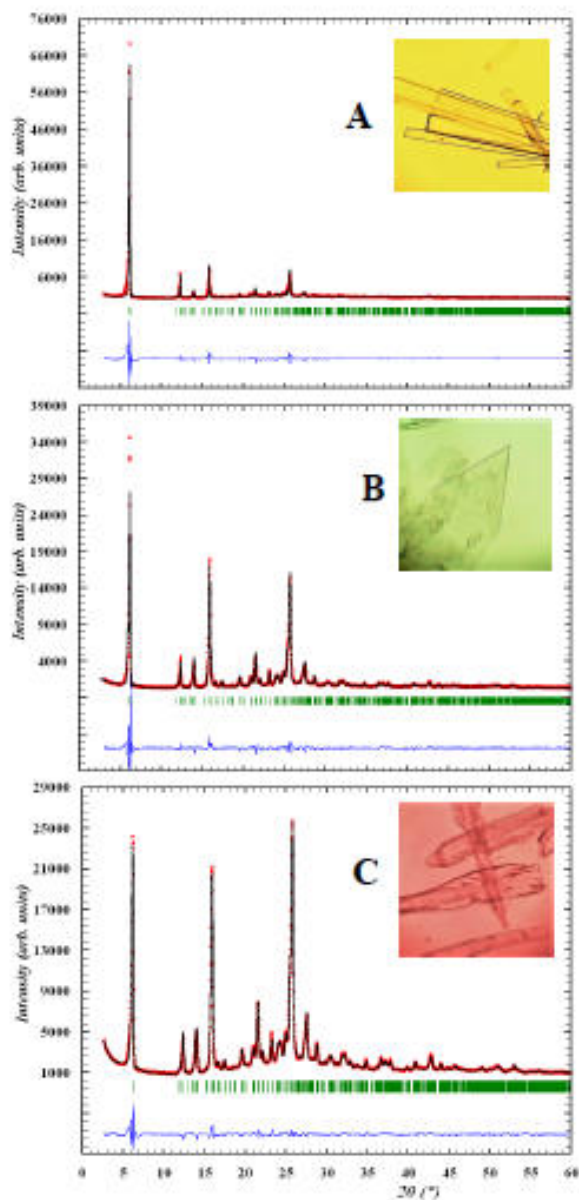


Рис. 7.3 Рентгеноскопічні зображення кристалічних поліморфів N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду [225].

Скринінгові дослідження їх знеболюючого та протизапального ефектів на моделі карагенінового набряку у щурів в дозі 20 мг/кг в/оч показали, що всі сполуки зменшують гіпералгію та набряк ураженої кінцівки. Найбільшу активність показала сполука В, показники антифлогогенної та анальгетичної активності якої становили 85,2 та 93,5 %, що було вищим за всі інші сполуки та за препарати порівняння ($p < 0,05$). Сполука С поступалась силі цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі вони перевершували за

своєю активністю препарати порівняння лорноксикам, диклофенак та мелоксикам, взяті в аналогічних дозах.

Протягом багатьох років розмір частинок фармацевтичних речовин вважався ключовим параметром що забезпечує повний спектр їх властивостей як лікарських засобів [105, 123, 174, 186]. Тому й не дивно цей параметр ретельно контролювався на різних етапах роботи з препаратами від їх дослідження до промислового виробництва. Але ще більш важливим є медичний аспект цієї проблеми, оскільки в літературі зустрічаються випадки, коли лікарський препарат, який вже вийшов на ринок, раптово зазнає спонтанної структурної трансформації в нову кристалічну модифікацію - більш стабільна, але набагато менш активну або навіть небезпечну [64, 177, 195, 232]. Подібні проблеми можуть виникати також і при створенні генеричних лікарських засобів.

Тому на наступному етапі роботи було проведено поглиблені дослідження одного із базових фармакологічних ефектів, притаманних класу нестероїдних протизапальних лікарських засобів – аналгетичної дії трьох поліморфних модифікацій *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (див. розділ 4).

Цікаві результати показав наш перший експеримент, проведений на класичній моделі «оцтово-кислих корчів» у білих мишей. Ця модель заснована на хімічній стимуляції болю і дозволяє оцінити периферичний компонент у механізмі знеболюючого ефекту досліджуваних зразків [239]. При в/оч введенні всі три кристалічні форми *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду значно зменшують кількість «корчів» порівняно з контрольними тваринами. Однак сила їх знеболюючого ефекту сильно варіює і зменшується в в такому порядку: В > С >> А. Іншими словами, пластини В усувають соматичний вісцеральний біль найбільш ефективно (87,5 %). Блоки С трохи поступаються їм (76,9 %) за цим показником, в той час як палички А зменшують кількість «корчів» лише на 35,1 %, що фактично перетворює цю кристалічну форму в помірний

анальгетик. При зміні способу введення на per os (в/шл), в принципі, та ж тенденція залишається: $V \gg C > A$, з тією лише різницею, що тепер блоки С знаходяться в категорії помірних анальгетиків. При вивченні дії кристалічних форм А, В і С на центральний компонент ноцицептивної системи були використані три експериментальні моделі. Перший з них - «гаряча пластина» - показав, що пластини (сполука В) значно збільшують тривалість обох фаз латентного періоду при в/оч та в/шл, і таким чином зберігають своє лідерство як знеболюючого засібу. Що стосується блоків (сполука С), то вони дещо втрачають свої позиції і поступаються місцем паличкам (сполука А). Можна відмітити, що сила знеболюючого ефекту кристалічних форм А і С практично не залежить від шляху потрапляння в організм тварини, тоді як в у випадку форми В при пероральному прийомі вона помітно зменшується.

Друга експериментальна модель - термічне подразнення кінчика хвоста «tail-flick» у щурів у відповідь на фокусованого променю світла - також продемонструвала значну перевагу пластинчастого кристала форми В у здатність блокувати больову реакцію вона в цьому випадку перевершувала форми С і А майже в 2 і 3 рази, відповідно. Примітно, що на цій моделі при зміні внутрішньочеревного введення на пероральний, всі три зразки втрачають приблизно 30 % своєї анальгетичної активності. Третя модель цієї серії - «електростимуляція хвоста» у щурів - дозволила простежити розвиток та тривалість ефекту знеболювального ефекту, який надають кристалічні форми А, В і С *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду. Результати засвідчили, що пластини В виявляють потужний і швидкий знеболюючий ефект, який після другої години експеримент починає помітно зменшуватися. Активність блоків С менш виражена, хоча також досягає свого максимуму до другої години і подальше його зниження не таке різке. Окрему позицію займають палички (форма А). Їх спочатку помірна знеболювальна дія поступово посилюється і досягає свого піку лише на четверту годину. Потім відбувається поступове зниження анальгезії. Проте навіть після шостої годин експерименту палички (сполука А)

зберігають досить високий рівень активності і залишаються найбільш потужними анальгетиками серед всіх досліджуваних груп. Ефекти, які спостерігаються в цій моделі, напевно, можуть бути наслідком різної біодоступності досліджених кристалічних форм, що і стане предметом подальших досліджень.

Вплив речовин А, В і С на периферичний і центральний компонент ноцицептивної системи оцінювали на моделі «нейропатичного болю» у щурів на двох моделях: перев'язка сідничного нерва та полінейропатія за стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. Біль цього типу може бути викликана різними патологічними процесами в периферичній і центральній нервовій системі; її причинами часто є цукровий діабет, герпес-вірусні інфекції, онкологічні захворювання, травми спинного мозку тощо. Отримані результати свідчать про те, що пластини В безумовно залишаються провідною кристалічною формою. Завдяки своїй здатності підвищувати больовий поріг, блоки С за перорального шляху практично не поступаються сполуці В, тоді як палички (сполука А) на цих моделях були найменш ефективними. Оцінка тривалості дії сполук за перорального шляху на моделі діабетичної нейропатії також підтвердила, що сполука В має коротку та потужну дію, сполука А – навпаки, повільну та тривалу. Сполука С займає проміжну позицію.

Не менш важливими ніж фармакологічна активність, є токсикологічні параметри біологічно активних сполук. Тому наступним кроком нашої роботи стало проведення порівняльної оцінки їх ефективності та безпечності. Детальний опис експерименту наведений в розділі 4.4-4.6, узагальнені дані наведені в таб. 7.1. Підрахунки свідчать, що за показником гострої токсичності (LD_{50}) найбільш безпечною є сполука С, незначно поступається їй сполука В. За показником ефективності (ED_{50}) – протилежна картина, сполука В незначно переважає. Проте остаточно переваги сполуки В визначені при дослідженні ульцерогенного потенціалу (UD_{50}) оскільки цей показник у неї кращий за сполуки С та А в 1,34 та 1,65 рази. Таким чином, сполука В відрізняється від інших поліморфів більш широким терапевтичним індексом та коефіцієнтом

безпечності. Дещо поступається їй сполука С (відповідні показники якої менші в 1,06 та 1,71 рази), тоді як сполука А виявилась найменш ефективною та найбільш токсичною (її терапевтичний індекс та коефіцієнт безпечності були в 2,58 та 3,05 рази меншими за аналогічні параметри сполуки В).

Таблиця 7.1

Оцінка ефективності та безпечності трьох кристалічних поліморфних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду за їх перорального введення у щурів

Параметри	Сполука А	Сполука В	Сполука С
LD ₅₀ , мг/кг	419,3 ± 20,9*	586,5 ± 29,3	699,3 ± 34,9
ED ₅₀ , мг/кг	6,53 ± 0,33*	3,54 ± 0,18	4,49 ± 0,22
UD ₅₀ , мг/кг	71,4 ± 3,57*	117,9 ± 5,89	87,5 ± 4,39
Терапевтичний індекс LD ₅₀ / ED ₅₀	64,21	165,67	155,75
Коефіцієнт безпечності UD ₅₀ / ED ₅₀	10,90	33,30	19,49

Примітка: * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) відносно сполуки В.

Отримані дані викликають логічне питання: що лежить в основі виявлених відмінностей? В якості робочої гіпотези ми вважали, що це може бути спричинене фармакокінетичними особливостями цих кристалічних форм. Для підтвердження її наступним етапом було проведення фармакокінетичних досліджень і розрахунок основних параметрів, що характеризують всмоктування, розподіл, та екскрецію препаратів з крові.

Поліморфізм активної фармацевтичної субстанції досить часто є причиною фармацевтичної нееквівалентності і, як наслідок, фармакокінетичної і терапевтичної нееквівалентності препаратів у твердій лікарській формі. Наявні істотні відмінності в розчинності поліморфних модифікацій АФС можуть привести до різниці кінетики їх розчинення *in vivo* і, як наслідок, - біодоступності лікарських засобів. Біодоступність / біоеквівалентність ЛЗ залежить від ряду факторів, що визначають швидкість і

ступінь їх абсорбції, таких як кінетика розчинення і проникаюча здатність через мембрани клітин, гастроінтестинальна рухливість, метаболізм. Ці фактори враховуються в концепції біофармацевтичної класифікаційної системи активних фармацевтичних субстанцій, яка вже прийнята в посібниках регулюючих органів в промислово розвинених країнах [55].

В теперішній час поліморфізм виявлений у більш ніж 70-80 % лікарських засобів практично всіх лікарських груп. Він є надзвичайно важливим фактором, що модифікує лікувальні властивості фармацевтичних субстанцій і лікарських форм, суттєво впливає на параметри їх біологічної активності, а також фармакокінетику. Однак останніми роками все більше уваги приділяється такій важливій характеристиці біологічно активних речовин, яка також істотно впливає на їх властивості, як форма частинок або їхній габітус (голки, пластини, кубики, призми, безформні кристали тощо). Як виявилось, цей фактор є основною причиною багатьох технологічних проблем. Фармацевти, фармакологи та виробники ліків давно помітили, що зразки вихідної речовини, які відрізняються за зовнішнім виглядом, можуть сильно відрізнитися за змочуваністю, стисливістю, абразивністю, гігроскопічністю, стабільністю, розчинністю та інші фізико-хімічними властивостями. Всі ці параметри неминуче впливають на якість кінцевого продукту. Тому, мабуть, їх вивченню надається підвищена увага [74, 77, 85, 134, 153, 213, 245].

Кристалічні модифікації *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, представлені у цій роботі, є унікальними завдяки тому, що вони відрізняються лише зовнішнім виглядом, тоді як рентгенівський дифракційний аналіз показав їх однакову молекулярну та кристалічну структуру. Ці кристали відрізняються між собою лише деякими геометричними характеристиками досліджуваних молекул – довжиною

з

в Результати показали, що різниця в швидкості настання ефекту, виявлена при дослідженні фармакодинаміки, зумовлена обумовлена різною швидкістю

я

з

к

всмоктування в шлунково-кишковому тракті та більшою біодоступністю кристалічною форми В у порівнянні з іншими двома [70]. Враховуючи шлях введення сполуки, а також факт того, що вона вводилась у вигляді поліморфів та в умовах, що забезпечують зберігання кристалічної решітки, можливо припустити, що саме тип поліморфу та вплив, який він має на біофармацевтичну фазу (процес розчинення після перорального введення та подальшого всмоктування у ШКТ) обумовлюють різницю у фармакокінетичних параметрах та, відповідно, у прояві фармакологічних ефектів. Приймаючи до уваги, що дані поліморфи отримують кристалізацією з різних розчинників, можна припустити, що кристалічні структури, які утворюються, у різному ступені схильні до змочування гідрофільним водним середовищем та утворенням водневих зв'язків з розчинником, що передує їх подальшому розчиненню. Відповідно, кристалічна поліморфна форма В, що більш швидко розчиняється у ШКТ, з більшою швидкістю (та ступенем абсорбції) всмоктується у кишечнику та проявляє фармакологічний ефект. Завдяки більшій швидкості всмоктування сполуки *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді поліморфної форми В, суттєво збільшується кількість речовини, що потрапляє до внутрішнього середовища організму, про що свідчить більша площа під фармакокінетичною кривою «концентрація-час» (у сполуки В $4280,9 \pm 585,6$ мкг*год²/мл, тоді як для форми А - $4686,7 \pm 798$ мкг*год²/мл).

Більш висока швидкість всмоктування поліморфної форми В зумовлює підвищену біодоступність, яка у сполуки В статистично переважала такий у поліморфних форм А та С на 12,5 та 24,6 % ($p < 0,05$). Це свідчить, що форма В має більшу біодоступність за рахунок більш високого ступеня абсорбції. Однак слід відмітити, що фармакокінетичні параметри, що характеризують процеси розподілу, є досить подібними для всіх трьох форм, що підтверджує показник величини сталого об'єму розподілу. Це демонструє відсутність впливу поліморфної модифікації на процеси розподілу сполуки в організмі.

Величина константи елімінації з плазми крові зазвичай є наслідком подібності фізико-хімічних властивостей самої сполуки. Виявлено, що константа елімінації для сполуки В при пероральному введенні була в 1,48 рази більшою порівняно з формою А та С, а час напівелімінації форми В на 34,7-31,6 % був меншим за інші поліморфні форми ($p < 0.05$), що свідчить про більшу швидкість виведення сполуки В з організму. Величина загального кліренсу сполуки В статистично не відрізнялась від інших двох форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, що може бути зумовлено тим, що цей показник залежить від величин об'ємів розподілу та процесу елімінації сполук.

На підставі отриманих даних та співставлення їх із фармакодинамічними характеристиками трьох поліморфних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, найбільш цікавим для подальших досліджень виявилась сполука В.

Подальші дослідження (див. розділ 6) проведені в рамках необхідних досліджень для потенційних нестероїдних протизапальних засобів [43], і включали дослідження протизапальної та жарознижуючої активності сполуки В. В якості референс-препарату було взято найбільш близький за хімічною будовою препарат – мелоксикам. Обидві речовини вводили перорально, оскільки саме такий шлях є найбільш раціональним та комплаєнтним для пацієнтів із хронічними захворюваннями, а дози для цього блоку досліджень відповідали медіанним ефективним (ED_{50}) за антифлогогенною активністю, визначеним на моделі карагенінового набряку у щурів (5,2 та 9,1 мг/кг відповідно). Протинабрякову активність оцінювали на моделі токсичного набряку легень, антипроліферативну – на моделі «ватної» гранульоми, антиальтеративну – на моделі асептичних площинних ран шкіри.

Характеризуючи результати проведеного дослідження, можна зазначити, що поліморфна сполука *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду володіє протизапальною активністю та здатна стримувати розвиток всіх складових компонентів

запальної реакції – альтерації, ексудації та проліферації. За ступенем дієвості ця сполука співставлялась з препаратом порівняння, а за деякими параметрами – переважала його. Так, наприклад, сполука В сприяла більш швидкому загоєнню ран, ніж мелоксикам, її антиексудативна дія також переважала препарат порівняння (виживаність тварин з токсичним набряком легень на тлі її введення також була більшою, хоча різниця в масових коефіцієнтах легень не сягала статистично вірогідних значень). Більш виразною була також і антипроліферативна активність (15,2 проти 12,9 % у мелоксикаму), хоча і на цій моделі не було отримано статистично вірогідної різниці. Жарознижуюча активність сполуки В, яку визначали на моделі молочної лихоманки, на початку експерименту поступалась мелоксикаму, на 4-6-й годинах була співставною з ним, а на пізніх термінах дослідження (7-й годині - переважала його в 2,39 рази ($p < 0,05$)).

Фармакологічна група НПЗЗ є найбільш широко вживаними препаратами для лікування запальних та автоімунних захворювань, серед яких чільне місце посідає ревматоїдний артрит [38]. Ревматоїдний артрит – гетерогенне автоімунне захворювання, яке характеризується ураження синовіальної оболонки суглобів, її гіперплазія і швидке збільшення об'єму синовіальної тканини з прогресуючою деструкцією хрящової та кісткової тканини. Найбільш визнаною експериментальною моделлю цього захворювання у тварин є ад'ювантний артрит (АДА), викликаний повним ад'ювантом Фрейнда [3, 35]. Ця модель характеризується комплексом запальних змін з переважанням проліферативного компонента, які локалізуються в суглобах, навколишніх тканинах, внутрішніх органах, шкірі, лімфоїдній тканині [18, 146]. Попередні дослідження фармакодинаміки похідного бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука В) показало цілий спектр ефектів, які співставляються з патогенезом больових та запальних захворювань різного походження. Тому доцільно було підтвердити ефективність сполуки В на моделі хронічного автоімунного запального процесу (ад'ювантного артриту) у щурів. (див. розділ 6.5).

Результати підтвердили наявність у сполуки В протизапальної дії, про що доказово свідчили збереження приросту маси тіла та зменшення набряку ураженої кінцівки на 28-му добу експерименту у щурів, лікованих похідним бензотіазин-3-карбоксаміду. Крім того, стабілізація гематологічних маркерів запальної реакції (ШОЕ та кількість лейкоцитів в периферичній крові) також доводять протизапальний ефект цієї сполуки. Порівняння динаміки клінічних та гематологічних ознак запального процесу на тлі лікування похідним *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду з референтним препаратом, можна відмітити що за клінічними ознаками сполука В переважала препарат порівняння, а за впливом на гематологічні показники – не поступалась мелоксикаму.

Наступним кроком дослідження стало визначення біохімічних маркерів запального процесу у внутрішніх органах щурів з АДА, оскільки цей процес зазвичай характеризується системним запаленням та охоплює практично всі системи організму [43]. Нами було обрано слизову оболонку шлунка. Це зумовлено, з одного боку тим, що зміни біохімічних маркерів запалення у шлунку є подібними до таких в інших органах при автоімунному запальному процесі, а з іншого боку – саме шлунок є головним органом-мішенню негативного впливу нестероїдних протизапальних засобів, в тому числі і селективних інгібіторів ЦОГ-2 (таких як мелоксикам), і так звана НПЗЗ-гастропатія характеризується ознаками місцевого запалення навіть за відсутності системного запального процесу [131, 148].

Дані, отримані в роботі свідчать, що обидві досліджувані сполуки зменшували масштабність змін біохімічних маркерів запального процесу (IL-1 β та P*g*H-синтази в гомогенаті СОШ щурів), які суттєво зростали на тлі моделювання патологічного процесу, однак дієвість похідного карбоксаміду була суттєвішою, оскільки зростання IL-1 β було в 1,50 та 1,16 рази на тлі введення сполуки В ($p < 0,05$), та в 1,81 та 1,39 рази на тлі лікування мелоксикамом ($p < 0,05$), тоді як у нелікованих тварин елевація цих показників становила 1,90 та 1,75 рази, відповідно ($p < 0,05$). Водночас мелоксикам

практично не впливав на підвищення таких прозапальних маркерів як вміст нітратів та нітритів та сумарну активність NO-синтази в СОШ, підвищення яких було зафіксовано у щурів з ад'ювантним артритом без курації. Класичний НПЗЗ також не виявив здатності до протидії зростанню рівня H_2S і активності його фермента-продуцента (цистатіонін гама-ліази, ЦГЛ) в СОШ, тоді як введення сполуки В стримувало надмірну продукцію прозапальних маркерів (рівень нітратів та нітритів і NO-синтази збільшувався лише на 58,8 та 54,7%, відповідно, а гідроген сульфід і ЦГЛ – в 1,49 та 1,47 рази, відповідно ($p < 0,05$)).

Враховуючи відомі дані, що гіперпродукція монооксиду азоту та гідроген сульфід залучені в патогенезі запальної реакції, а також розвитку НПЗЗ-індукованих гастропатій [131], отримані нами результати свідчать про більший ступінь протизапальної дії *N*-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в порівнянні з референтним препаратом мелоксикамом, а також можуть свідчити на користь більшої безпеки щ

о Підсумовуючи вищевикладене, слід зазначити, що серед похідних 4-*R*-*Δ*,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот виявлені хімічні ополуки, які представляють інтерес для подальшого їх вивчення з метою отримання нових біологічно активних сполук із протизапальними та ~~ан~~налгетичними властивостями, серед яких найбільш активною виявився *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід. В процесі хімічного синтезу цієї сполуки шляхом кристалізації із ~~ва~~гално прийнятних органічних розчинників (етилацетату, мета-ксилолу та ~~ор~~рто-ксилолу) було одержано три зовні абсолютно типи абсолютно різних ~~б~~езбарвних кристалів – довгих паличок з квадратним перетином (форма А), тонких долотоподібних пластин (форма В) або подовжених блоків без чіткої ~~ге~~ометричної форми (форма С), відповідно. Рентгенографічний аналіз показав, що всі досліджені форми мають ідентичну молекулярну та кристалічну ~~ст~~руктуру незважаючи на значні відмінності у зовнішньому вигляді.

і

є

ї

Дослідження фармакодинаміки всіх форм показало значні відмінності в знеболюючій активності цих тест-зразків, а також їх гострої токсичності та ушкоджуючого впливу на шлунок.

Аналіз фармакокінетичних параметрів кристалів довів, що поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), маючи найбільшу площу поверхні кристала, впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, і як наслідок, найкращі фармакологічні та токсикологічні характеристики.

В результаті поглиблених досліджень саме поліморфна модифікація *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді пластинок є найбільш перспективною сполукою для подальших досліджень з метою створення на її основі лікарського засобу з анальгезуючими, протизапальними та жарознижуючими властивостями.

Таким чином, було доведено, що габітус кристалів є важливою характеристикою лікарська речовина і здатна мати помітний вплив на її біологічні властивості. Зміни габітусу слід розглядати як керівництво до обов'язкової перевірки принаймні основних фармакологічних параметри нової форми незалежно від того, чи змінюється молекулярна та кристалічна структура.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення актуального завдання фармакології - на підставі фармакодинамічних та фармакокінетичних досліджень кристалічних модифікацій похідних 4-R-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот виявити високоефективну та безпечну сполуку з метою розробки на її основі лікарського засобу із анальгетичними та протизапальними властивостями

1. Одноразове внутрішньоочеревне введення щурам похідних 4-R-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот в скринінговій дозі 20 мг/кг на моделі карагенінового набряку супроводжується зменшенням гіперальгезії та об'єму ушкодженої кінцівки тварин. Серед вказаних похідних найвищу анальгетичну та протизапальну активності продемонстрували кристалічні модифікації N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, які розрізнялись лише габітусом — палички (форма А, сполука NI-50), пластини (форма В, сполука NI-51) та блоки (форма С, сполука NI-52). Найбільш активною виявилась сполука В (антифлогогенна та анальгетична активності якої становили 85,2 та 93,5 % і були вищими за всі інші сполуки). Сполука С поступалась за силою цих ефектів, і найменш активною виявилась сполука А, однак всі сполуки перевершували за своєю активністю препарати порівняння ($p < 0,05$).

2. Дослідження антиноціцептивної дії кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполук А, В та С) в дозі 20 мг/кг за перорального та внутрішньоочеревного введення показало, що на моделях соматичного, вісцерального та нейрогенного больового синдромів сполука В перевершувала дві інші поліморфні форми. Виразність антиноціцепції була більшою за

внутрішньочеревного введення, а зміна режиму призначення супроводжувалась зменшенням знеболюючого потенціалу (близько 30 %).

На моделі термічного та неврогенного больового подразнення встановлено, що сполука В за внутрішньошлункового та внутрішньочеревного введення виявляє швидкий і потужний знеболюючий ефект, який значно зменшується на 6-у годину дослідження. В той же час сполука А виявляє помірну знеболюючу дію, яка досягає піку на 4-й годині експерименту і зберігає виразний ефект навіть після 6-ї години експерименту. Сполука С за виразністю та тривалістю антиноціцептивної дії займає проміжну позицію між сполуками В та С.

3. Оцінка гострої токсичності сполук за їх внутрішньочеревного введення мишам показала, що найбільш безпечною серед всіх фармацевтичних композицій виявилась сполука С (LD_{50} становила $699,3 \pm 34,9$ мг/кг проти $586,5 \pm 29,3$ та $419,3 \pm 20,9$ мг/кг для сполук В та А, відповідно). Найменш ушкоджуючу дію на шлунок виявила сполука В (UD_{50} становила $117,9 \pm 5,89$ мг/кг проти $87,5 \pm 4,39$ та $71,4 \pm 3,57$ мг/кг у сполук С та А, відповідно). Найвищу ефективність продемонструвала сполука В (терапевтичний індекс для сполук А, В та С становив 64,2, 165,7 та 155,7, відповідно).

4. Аналіз фармакокінетичних параметрів показав, що у сполуки В реєструється статистично вірогідно більший ступінь абсорбції (константа абсорбції сполуки переважає аналогічний показник сполуки А на 12,1 %, а сполуки С – на 20,2 %), вищий показник максимальної концентрації (на 20,6 % більше, ніж у форми А ($p < 0,05$) та невірогідно ($p > 0,05$) - у форми С), більш швидкий час досягнення максимальної концентрації та більшу біодоступність (на 12,5 та 24,6 % порівняно з формами А та С відповідно). Водночас, сполука В відрізняється більш швидкою елімінацією (константа елімінації при пероральному введенні в 1,48 рази більша за форми А та С, а час напівелімінації - на 34,7-31,6 % менший за інші поліморфні форми, $p < 0,05$).

5. Поліморфна сполука В у середньоефективній дозі за антифлогогенною активністю (ЕД₅₀ 5,2 мг/кг внутрішньошлунково) здатна усувати всі компоненти запальної реакції (альтерацію, ексудацію та проліферацію) і за ефективністю співставляється, а подекуди перевершує референс-препарат мелоксикам (ЕД₅₀ 9,1 мг/кг внутрішньошлунково, $p < 0,05$).

На моделі ад'ювантного артриту двотижневе введення сполуки В супроводжувалось зменшенням набряку ураженої кінцівки (в 1,21 рази проти 1,12 рази у мелоксикаму), зниженням гематологічних ознак запалення (ШОЕ та лейкоцитозу в 1,58 та 1,47 рази, відповідно, що було співставно з мелоксикамом). Поряд з цим застосування сполуки В супроводжувалось статистично вірогідним зменшенням рівня прозапального медіатора ІЛ-1 β та активності РgН-синтази (співставно з мелоксикамом, $p > 0,05$), а також зниженням продукції прозапальних газотрансмітерів нітроген монооксиду та гідроген сульфід у гомогенаті СОШ (більш виразне ніж на тлі дії мелоксикаму, $p < 0,05$).

6. Проведене дослідження показало, що габітус кристалів є важливою характеристикою лікарської речовини, здатною помітно впливати на її біологічні властивості. Поліморфна модифікація *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2 λ^6 ,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді пластинок є найбільш перспективною сполукою для подальших досліджень з метою створення на її основі лікарського засобу з анальгезуючими, протизапальними та жарознижуючими властивостями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Арсеньева, К. Е. (2009). Применение амлодипина в кардиологической практике. *Российский медицинский журнал*, 17(8), 610-613.
2. Бабілев, Ф. В., & Анронік, І. Я. (1981). *Полиморфизм лекарственных веществ*. Кишинев: Штиинца.
3. Бадмаева, К. Е., Абушинова, Н. Н., & Теплый, Д. Л. (2019). Противовоспалительные эффекты илово-сульфидных пелоидов на экспериментальной модели адьювантного артрита у крыс. *Медицинский вестник Северного Кавказа*, 14(2), 152-155.
4. Бездетко, Н. В. (2014). Генерики и оригінальні препарати: вигляд фармаколога. *Аптека.ua.on-line*, 28 (949). Відновлено з <https://www.apteka.ua/article/298852#list>.
5. Берштейн, Дж. (2007). *Полиморфизм молекулярных кристаллов*. Москва: Наука.
6. Бондаренко, П. С. (2018). *Дослідження гострої токсичності та ульцерогенної дії різних кристалічних модифікацій N-r-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду* Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2018». Вінниця.
7. Бондаренко, П. С., Волощук, Н. І., & Денисюк О. М. (2019). *Дослідження анагетичної та протизапальної активності N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в експерименті*. Матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини», Вінниця.
8. Бондаренко, П. С. (2021). Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 15 (3), 81-88.

9. Бондаренко, П. С. (2021). / *Експериментальне дослідження антиексудативної дії N-(4-трифлюорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду*. Матеріали XVIII Наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021». Вінниця.
10. Бондаренко, П. С. & Волощук, Н. І. (2021). Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів. *Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова*, 1(25), 27-32.
11. Бур'ян, Г. О., Українець, І. В., Волощук, Н. І., & Бондаренко, П. С. (2018). *Поліморфні модифікації етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду та їх властивості*. Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича. Харків.
12. Василькин, Д. А., Поцелуева, Л. А., Литвинов, И. А., & Губайдуллин, А. Т. (2010). Фармакотерапевтическая эффективность лекарственных веществ во взаимосвязи с их полиморфизмом как фармацевтическим фактором. Сообщение I. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*, 1, 166-174.
13. Волощук, Н. І., Бондаренко, П. С., Українець, І. В., & Петрушова, Л. О. (2018). *Анальгетична активність різних кристалічних форм N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ6,1-бензотіазин-3-карбоксаміду*. Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України. Запоріжжя.
14. Гацура, В. В. (1974). *Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ*. Москва: Медицина.

15. Гильдеева, Г. Н. (2017). Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и актуальные методы анализа. *Качественная клиническая практика, 1*, 56-60.
16. Гильдеева, Г. Н., Гуранда, Д. Ф. (2009). Структурные аспекты полиморфизма лекарственных веществ. *Вестник РГМУ, 6*, 74-79.
17. Гланц, С. (1998). *Медико-биологическая статистика*. Москва: «Практика».
18. Громько, М. В. , & Грицук, А. И. (2012). Экспериментальные модели ревматоидного артрита. *Проблемы здоровья и экологии, 2*, 115-118.
19. Гула, Н. М., Косякова, Г. В., & Бердишев, А. Г. (2007). Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом. *Український біохімічний журнал, 79(5)*, 153-158.
20. Заїчко, Н. В., Пентюк, Н. О., & Мельник, А. В. (2009). Патент України на корисну модель №52136 U МПК G01N 33/68. Вінниця: Державне патентне відомство України.
21. Заїчко, Н. В., Мельник, А. В., Ольховський, О. С., & Заїчко, К. О. (2012). Вінниця: Державне патентне відомство України.
22. Западнюк, И. П., Западнюк, Б. В., Западнюк, В. И., & Захария, Е. А. (1983). *Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте*. Киев: Вища школа.
23. Закотей, П. М. (2002). Особенности проведения фармако-технологических испытаний согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины. *Провізор, 10*, 8-17.
24. Зефирова, О. Н., & Зефиров, Н. С. (2002). Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма. *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия, 43(4)*, 251-256.
25. Зиман, З. З. (2008). *Основи структурної кристалографії*. Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна.

26. Каркищенко, Н. Н., Хоронько, В. В., & Сергеева, С. А. (2001). Фармакокинетика. Ростов-на-Дону: Феникс.
27. Кожем'якін, Ю. М., Хромов, О. С., Філоненко, М. А., & Сайфетдінова, Г. А. (2002). *Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними; Державний фармакологічний центр МОЗ України*. Київ: Видавничий дім «Авіцена».
28. Коренман И.М. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. - М. : Химия, 1975. - 360с.
29. Кочетов, Г. А. (1980). *Практическое руководство по энзимологии*. Москва: Высшая школа.
30. Кукушкин, М. Л., Табеева, Г. Р., & Подчуфарова, Е. В. (2011). Болевой синдром: патогенез, клиника, лечение. Москва: ИМА-Пресс.
31. Кукушкин, М. Л., & Смирнова, В. С. (1993). Значение функционального состояния седалищного нерва в момент его перерезки для последующего развития болевого синдрома у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, 1, 7-8.
32. Леонидов, Н. Б., Селезнев, Н. Г., & Успенская, С. И. (1997). Физико-химические свойства леокаина т особенности его биологической активности в сравнительном аспекте с дикаином. *Российский химический журнал*, 5, 53-60.
33. Лук'янчук, В. Д., & Кравець, Д. С. (2004). *Введення до загальної фармакокінетики*. Луганськ: ВАТ «Луганська обласна друкарня».
34. Лутай, М. І., Лисенко, А. Ф., & Моїсеєнко, О. І. (2009). Использование оптических изомеров известных сердечно-сосудистых средств – путь к повышению их эффективности и переносимости. *Український кардіологічний журнал*, 4, 13-20.
35. Матюшкин, А. И., Иванова, Е. А., Алексеева, С. В., Качалов, К. С., Воронина, Т. А. (2019). Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адьюванта Фрейнда. *Биомедицина*, 2, 75-87.

36. Мевх А. Т., Басевич В. В., & Варфоломеев С. Д. (1982). Изучение эндопероксидпростагландинсинтетезы микросомной фракции тромбоцитов человека. *Биохимия*, 47(10), 1635-1639.
37. Миронов, А. Н. (2012). *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (ч. 1)*. Москва: Гриф и К.
38. Олюнин, Ю. А., & Никишина, Н. Ю. (2016). Ревматоидный артрит. Современные алгоритмы лечения. *РМЖ «Медицинское обозрение»*, 26, 1765-1771
39. Прозоровский, В. Б. (1962). Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности. *Фармакология и токсикология*, 1, 115-119.
40. Реброва, О. Ю. (2002). *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA*. Москва: «МедиаСфера».
41. Саратиков, А. С., Венгеровський, А. И., & Прищеп, Т. П. (1983). *Адьювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия)*. Томск: Издательство Томского университета.
42. Смирнова, И. Г., Гильдеева, Г. Н., & Чистяков, В. В. (2012). Анализ кристаллической и пространственной структуры лекарственных веществ. *Вестник Московского университета, серия 2, Химия*, 53(4), 234-240.
43. Стефанов, О. В. (2001). *Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації)*. Київ: Видавничий дім «Авіцена».
44. Страчунский, Л. С., & Козлов, С. Н. (2009). *Нестероидные противовоспалительные средства: методическое пособие*. Відновлено з: <http://www.antibiotic.ru/rus/all/metod/npvs/npvs.shtml>.
45. Тринус, Ф. П., Клебанов, Б. М., & Мохорт, Н. А. (1974). *Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ*. Киев.

46. Триняк, В. Г. (1986). Особенности развития и течения острого отека легких в условиях гипер- и гипотермии на фоне эфирного наркоза *Бюллетень экспериментальной медицины и биологии*, 7, 40-41.
47. Українець І. В., Бур'ян Г. О., Шишкіна С. В., Волощук Н. І., & Бондаренко, П. С. (2018). Патент України № 118642 UA C2 МПК C07D 279/02 (2006.01) A61K 31/5415 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01) Харків, Державне патентне відомство України.
48. Урусов, В. С. (1987). *Теоретическая кристаллохимия*. Москва: Изд-во МГУ.
49. Холодов, Л. Е., & Яковлев, В. П. (1985). Клиническая фармакокінетика. Москва: Медицина.
50. Чурюканов, В., & Чурюканов, М. (2002). Фармакологія болеутоляючих средств. *Врач*, 4, 29-33.
51. Шиловський, Л., & Костін, І. (2011). Вплив поліморфізму діючих речовин на фармацевтичну розробку лікарських засобів. Державна реєстрація препаратів-двійників в Україні. Відновлено з <https://www.legalalliance.com.ua/rus/publika>
52. Штриголь, С. Ю. (2012). Оригінальні та генеричні препарати. *Раціональна фармакотерапія*, 4(25), 15-18.
53. Abbas, N., Latif, S., Afzal, H., Arshad, M. S., Hussain, A., Sadeeqa, S., & Bukhari, N. I. (2018). Simultaneously Improving Mechanical, Formulation, and In Vivo Performance of Naproxen by Co-Crystallization. *AAPS PharmSciTech*, 19(7), 3249-3257.
54. Acebedo-Martinez, F. J., Alarcon-Payer, C., Frontera, A., Barbas, R., Prohens, R., Di Crisci ... Choquesillo-Lazarte, D. (2021). Novel Polymorphic Cocrystals of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Niflumic Acid: Expanding the Pharmaceutical Landscape. *Pharmaceutics*, 13(12), 2140.

55. Ahr, G., Voith, B., & Kuhlmann, J. (2000). Guidances related to bioavailability and bioequivalence: European industry perspective. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 25(1), 25-27.
56. Aitipamula, S., Wong, A. B. H., Chow, P. S. & Tan, R. B. H. (2014). Pharmaceutical salts of haloperidol with some carboxylic acids and artificial sweeteners: hydrate formation, polymorphism, and physicochemical properties. *Crystal Growth & Design*, 14(5), 2542-2556.
57. Aitipamula, S., Cadden, J., & Chow, P. S. (2018). Cocrystals of zonisamide: physicochemical characterization and sustained release solid forms. *CrystEngComm*, 20, 2923-2931.
58. Alhalaweh, A., Ali, H. R. H., & Velaga, S. P. (2014). Effects of polymer and surfactant on the dissolution and transformation profiles of cocrystals in aqueous media. *Crystal Growth & Design*, 14, 643-648.
59. Andrade, C. (2015). Bioequivalence of generic drugs. *The Journal of clinical psychiatry*, 76(9), 1130-1131.
60. Andrusenko, I., Hamilton, V., Lanza, A. E., Hall, C. L., Mugnaioli, E., Potticary ... Gemmi, M. (2021). Structure determination, thermal stability and dissolution rate of δ -indomethacin. *International journal of pharmaceutics*, 608, 121067.
61. Atkinson, T. J., & Fudin, J. (2020). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs for Acute and Chronic Pain. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 31(2), 219-231.
62. Aubrey-Medendorp, C., Swadley, M. J., & Li, T. (2008). The polymorphism of indomethacin: an analysis by density functional theory calculations. *Pharmaceutical research*, 25(4), 953-959.
63. Basavoju, S., Boström, D., & Velaga, S. P. (2008). Indomethacin-saccharin cocrystal: design, synthesis and preliminary pharmaceutical characterization. *Pharmaceutical research*, 25(3), 530-541.
64. Bernstein, J. (2002). *Polymorphism in Molecular Crystals*: New York, NY: Oxford University Press.

65. Bernstein, J. (2011). Polymorphism - a perspective. *Crystal Growth & Design*, *11*, 632-650.
66. Berry, D. J., & Steed, J. W. (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design. *Advanced drug delivery reviews*, *117*, 3-24.
67. Bertolini, A., Ottani, A., & Sandrini, M. (2001). Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacological research*, *44*(6), 437-450.
68. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, *180*, 114147.
69. Bolla, G., & Nangia, A. (2016). Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. *Chemical communications (Cambridge, England)*, *52*(54), 8342-8360.
70. Bondarenko, P. S., Voloshchuk, N. I., Larionov, V. B., & Fedoseenko, H. O. (2020). Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ6,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo. *Biomedical and biosocial anthropology*, *41*, 46-51.
71. Bonin, R. P., Bories, C., & De Koninck, Y. (2014). A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Molecular pain*, *10*, 26.
72. Boyd, B. J., Bergstrom, C., Vinarov, Z., Kuentz, M., Brouwers, J., Augustijns, P. ... Jannin, V. (2019). Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *137*, 104967.
73. Braga, D., Grepioni, F., Maini, L., Prosperi, S., Gobetto, R., & Chierotti, M. R. (2010). From unexpected reactions to a new family of ionic co-crystals: the case of barbituric acid with alkali bromides and caesium iodide. *Chemical communications (Cambridge, England)*, *46*(41), 7715-7717.

74. Brittain, H.G. (1999). *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; New York, NY: Marcel Dekker.
75. Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., & Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicology and industrial health*, *13*(4), 407-484.
76. Buist, A. R., & Kennedy A. R. (2014). Ionic cocrystals of pharmaceutical compounds: sodium complexes of carbamazepine. *Crystal Growth & Design*, *14*, 6508-6513
77. Bukovec, P., Benkic, P., Smrkolj, M., & Vrecer, F. (2016). Effect of crystal habit on the dissolution behavior of simvastatin crystals and its relationship to crystallization solvent properties. *Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *71*(5), 263-268.
78. Byrn, S., Pfeiffer, R., Ganey, M., Hoiberg, C., & Poochikian, G. (1995). Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. *Pharmaceutical research*, *12*(7), 945-954.
79. Calcaterra, A., & D'Acquarica, I. (2018). The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *147*, 323-340.
80. Cao, S., Xie, C., Ma, Q., Wang, S., Zhang, J., & Wang, Z. (2021). Enantioselective separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with amylose tris(3-chloro-5-methylphenylcarbamate) stationary phase in HPLC with a focus on enantiomeric quality control in six pharmaceutical formulations containing racemic mixtures or single stereoisomers. *Chirality*, *33*(12), 938-950.
81. Censi, R., & Di Martino, P. (2015). Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *20*(10), 18759-18776.
82. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of neuroscience methods*, *53*(1), 55-63.

83. Chapter, H. (2008). Analgesic, anti-inflammatory, and anti-pyretic activity. In Schleyerbach, R., Weithmann, K.U., Bartlett, R.R., Vogel, H.G., (Eds), *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* (pp. 983-1116). Berlin, Germany: Springer.
84. Cheney, M. L., Weyna, D. R., Shan, N., Hanna, M., Wojtas, L., & Zaworotko, M. J. (2010). Supramolecular architectures of meloxicam carboxylic acid cocrystals, a crystal engineering case study. *Crystal Growth & Design*, *10*, 4401-4413.
85. Chernyshev, V. V., Morozov, Y. N.; Bushmarinov, I. S., Makoed, A. A., & Sergeev, G. B. (2016)) New polymorph of dehydroepiandrosterone obtained via criomodification. *Crystal Growth & Design*, *16*, 1088-1095.
86. Chieng, N., Rades, T., & Aaltonen, J. (2011). An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *55*(4), 618-644.
87. Childs, S. L., Kandi, P., & Lingireddy, S. R. (2013). Formulation of a danazol cocrystal with controlled supersaturation plays an essential role in improving bioavailability. *Molecular pharmaceutics*, *10*(8), 3112–3127.
88. Chistyakov, D., & Sergeev, G. (2020). The Polymorphism of Drugs: New Approaches to the Synthesis of Nanostructured Polymorphs. *Pharmaceutics*, *12*(1), 34.
89. Chow, S. F., Chen, M., Shi, L., Chow, A. H., & Sun, C. C. (2012). Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide. *Pharmaceutical research*, *29*(7), 1854-1865.
90. Chun, N. H., Wang, I. C., Lee, M. J., Jung, Y. T., Lee, S., Kim, W. S., & Choi, G. J. (2013). Characteristics of indomethacin-saccharin (IMC-SAC) co-crystals prepared by an anti-solvent crystallization process. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik*, *85*(3), 854-861.

91. Coquerel, G. (2018). Thermodynamics of Polymorphs and Solvates. In: Hilfiker R., von Raumer M. (eds). *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry* (pp. 91-132)/ Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
92. Council of Europa. (2007). Residual solvents. In *European Pharmacopoeia*, 6th ed. (Vol. 1, pp. 601-610). Strasbourg, France.
93. Cruz-Cabeza, A. J., Reutzel-Edens, S. M., & Bernstein, J. (2015). Facts and fictions about polymorphism. *Chemical Society reviews*, 44(23), 8619-8635.
94. Dai, X. L., Li, S., Chen, J. M., & Lu, T. B. (2016). Improving the membrane permeability of 5-fluorouracil via cocrystallization. *Crystal Growth & Design*, (16), 4430-4438.
95. Deng, J. H., Lu, T. B., Sun, C. C., & Chen, J. M. (2017). Dapagliflozin-citric acid cocrystal showing better solid state properties than dapagliflozin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 104, 255-261.
96. Deng, Y., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, M., & Lou, B. (2018). Preparation, crystal structures, and oral bioavailability of two cocrystals of emodin with berberine chloride. *Crystal Growth & Design* 18, 7481-7488.
97. Deng, Y., Sa, R., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, M. & Lou, B. (2018). Novel Salt Cocrystal of Chrysin with Berberine: Preparation, Characterization, and Oral Bioavailability. *Crystal Growth & Design* , 18 (8), 4724-4730.
98. Dengale, S. J., Grohganz, H., Rades, T., & Lobmann, K. (2016). Recent advances in co-amorphous drug formulations. *Advanced drug delivery reviews*, 100, 116–125.
99. Devillier, P., Roche, N., & Faisy, C. (2008). Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of desloratadine, fexofenadine and levocetirizine : a comparative review. *Clinical pharmacokinetics*, 47(4), 217-230.
100. Doelker E. (2002). Crystalline modifications and polymorphism changes during drug manufacture. *Annales pharmaceutiques francaises*, 60(3), 161-176.

101. Duggirala, N. K., Perry, M. L., Almarsson, O., & Zaworotko, M. J. (2016). Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 52(4), 640-655.
102. Duggirala, N. K., Smith, A. J., Wojtas, L., Shytle, R. D., & Zaworotko, M. J. (2014). Physical stability enhancement and pharmacokinetics of a lithium ionic cocrystal with glucose. *Crystal Growth & Design*, 14, 6135-6142.
103. Dusetzina, S. B., Cubanski, J., Roberts, A. W., Hoadley, J., True, S., Nshuti, L., & Neuman, T. (2021). Trends in Medicare Part D coverage of generics with equivalent brand-name drugs. *The American journal of managed care*, 27(7), 283-288.
104. Emami, S., Adibkia, K., Barzegar-Jalali, M., & Siahi-Shadbad, M. (2019). Piroxicam cocrystals with phenolic coformers: preparation, characterization, and dissolution properties. *Pharmaceutical development and technology*, 24(2), 199-210.
105. Emshanova, S. V., Sadchikova, N. P. & Zuev, A. P. (2007). Drug particle shape and size control: A necessary factor for high-quality drug production. *Pharmaceutical chemistry journal*, 41, 40-49.
106. Estrada-Valenzuela, D., Ramos-Sanchez, V. H., Zaragoza-Galan, G., Espinoza-Hicks, J. C., Bugarin, A., & Chavez-Flores, D. (2021). Lipase Assisted (S)-Ketoprofen Resolution from Commercially Available Racemic Mixture. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(10), 996.
107. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. (1986). Strasburg: Council of Europe, 123.
108. Fandaruff, C., Segatto Silva, M. A., Galindo Bedor, D. C., de Santana, D. P., Rocha, H. V., Rebuffi, L. ... Cuffini, S. L. (2015). Correlation between microstructure and bioequivalence in anti-HIV drug efavirenz. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 91, 52-58.

- 109.FDA, U. (2018). Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals Guidance for Industry. US FDA: Silver Spring, MD, USA
- 110.Feldmeier, H. G., Rahn, H. W., & Wolf, I. (1991). Quantitative determination of crystallin insulin in insulin-zinc suspensions as an in-process control. *Die Pharmazie*, 46(7), 517-519.
- 111.Fischer, J., Robin, G., & Rotella D. P. (2012). *Analogue-based Drug Discovery III*. Hoboken : John Wiley and Sons.
- 112.Food and Drug Administration, HHS (2000). International Conference on Harmonisation; guidance on Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. Notice. *Federal register*, 65(251), 83041-83063.
- 113.Gadade, D. D., & Pekamwar, S. S. (2016). Pharmaceutical Cococrystals: Regulatory and Strategic Aspects, Design and Development. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(4), 479-494
- 114.Garg, U., & Azim, Y. (2021). Challenges and opportunities of pharmaceutical cococrystals: a focused review on non-steroidal anti-inflammatory drugs. *RSC medicinal chemistry*, 12(5), 705-721.
- 115.Gascon, N., Almansa, C., Merlos, M., Miguel Vela, J., Encina, G., Morte, A. ... Plata-Salamán, C. (2019). Co-crystal of tramadol-celecoxib: preclinical and clinical evaluation of a novel analgesic. *Expert opinion on investigational drugs*, 28(5), 399-409.
- 116.Gautam, M. K., Besan, M., Pandit, D., Mandal, S., & Chadha, R. (2019). Cococrystal of 5-Fluorouracil: Characterization and Evaluation of Biopharmaceutical Parameters. *AAPS PharmSciTech*, 20(4), 149.
- 117.Gelbrich, T., Meischberger, I., & Griesser, U. J. (2015). Two polymorphs of 5-cyclohexyl-5-ethylbarbituric acid and their packing relationships with other barbiturates. *Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry*, 71(3), 204-210.
- 118.Ghan, G. A., & Lalla, J. K. (1992). Effect of compressional forces on piroxicam polymorphs. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 44(8), 678-681.

119. Gigliobianco, M. R., Casadidio, C., Censi, R., & Di Martino, P. (2018). Nanocrystals of Poorly Soluble Drugs: Drug Bioavailability and Physicochemical Stability. *Pharmaceutics*, *10*(3), 134.
120. Ginestal, R., Perez-Kohler, B., Perez Lopez, P., Rodriguez, M., Pascual, G., Cebrian, D., ... Moreno F.G. (2019). Comparing the influence of two immunosuppressants (fingolimod, azathioprine) on wound healing in a rat model of primary and secondary intention wound closure. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *27*(1), 59-68
121. Gliszczynska, A., & Sanchez-Lopez, E. (2021). Dexibuprofen Therapeutic Advances: Prodrugs and Nanotechnological Formulations. *Pharmaceutics*, *13*(3), 414.
122. Grabowski, H., Long, G., Mortimer, R., & Bilginsoy, M. (2021). Continuing trends in U.S. brand-name and generic drug competition. *Journal of medical economics*, *24*(1), 908-917.
123. Gratton, S. E., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., & DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(33), 11613-11618.
124. Grothe, E., Meekes, H., Vlieg, E., ter Horst, J. H., & de Gelder R. (2016). Solvates, salts, and cocrystals: a proposal for a feasible classification system. *Crystal Growth & Design*, *16*, 3237-3243.
125. Guerain, M., Guinet, Y., Correia, N. T., Paccou, L., Danede, F., & Hedoux, A. (2020). Polymorphism and stability of ibuprofen/nicotinamide cocrystal: The effect of the crystalline synthesis method. *International journal of pharmaceutics*, *584*, 119454.
126. Gumustas, M., Ozkan, S. A., & Chankvetadze, B. (2018). Analytical and preparative scale separation of enantiomers of chiral drugs by chromatography and related methods. *Current medicinal chemistry*, *25*(33), 4152-4188.

127. Gunn, E., Guzei, I. A., Cai, T., & Yu, L. (2012). Polymorphism of Nifedipine: Crystal structure and reversible transition of the metastable beta polymorph. *Crystal Growth & Design*, *12*, 2037-2043.
128. Guo, C., Zhang, Q., Zhu, B., Zhang, Z., & Mei, X. (2020). Drug–drug cocrystals provide significant improvements of drug properties in treatment with progesterone, *Crystal Growth & Design*, *20*, 3053-3063.
129. Guo, M., Sun, X., Chen, J., & Cai, T. (2021). Pharmaceutical cocrystals: A review of preparations, physicochemical properties and applications. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, *11*(8), 2537-2564.
130. Haleblan J. K. (1975). Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. *Journal of pharmaceutical sciences*, *64*(8), 1269-1288.
131. Harirforoosh, S., Asghar, W., & Jamali, F. (2013). Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, *16*(5), 821-847.
132. Higashi, K., Ueda, K., & Moribe, K. (2017). Recent progress of structural study of polymorphic pharmaceutical drugs. *Advanced drug delivery reviews*, *117*, 71-85.
133. Hilfiker, R. (2006). *Polymorphism in pharmaceutical industry*. Weinheim: Wiley-VCH.
134. Hooper, D., Clarke, F. C., Docherty, R., Mitchell, J. C., & Snowden, M. J. (2017). Effects of crystal habit on the sticking propensity of Ibuprofen – A case study. *International journal of pharmaceutics*, *531*(1), 266-275.
135. Huang, S., Xue, Q., Xu, J., Ruan, S., & Cai, T. (2019). Simultaneously Improving the Physicochemical Properties, Dissolution Performance, and Bioavailability of Apigenin and Daidzein by Co-Crystallization With Theophylline. *Journal of pharmaceutical sciences*, *108*(9), 2982-2993.

136. Huang, Y., Zhang, B., Gao, Y., Zhang, J., & Shi, L. (2014). Baicalein-nicotinamide cocrystal with enhanced solubility, dissolution, and oral bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(8), 2330-2337.
137. Hutt, A. J. (2002). The development of single-isomer molecules: why and how. *CNS spectrums*, 7(4 Suppl 1), 14-22.
138. Ino, H., Shiramoto, M., Eto, T., Haranaka, M., Irie, S., Terao, T. ... Nakano, A. (2020). Levocetirizine Oral Disintegrating Tablet: A Randomized Open-Label Crossover Bioequivalence Study in Healthy Japanese Volunteers. *Clinical pharmacology in drug development*, 9(7), 805-812.
139. Jensen, T. S., & Yaksh, T. L. (1986). Comparison of the antinociceptive action of mu and delta opioid receptor ligands in the periaqueductal gray matter, medial and paramedial ventral medulla in the rat as studied by the microinjection technique. *Brain research*, 372(2), 301-312.
140. Jermain, S. V., Brough, C., & Williams, R. O., 3rd (2018). Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water-soluble drug delivery - An update. *International journal of pharmaceutics*, 535(1-2), 379-392.
141. Jose, C., Toledo, M. V., & Briand, L. E. (2016). Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. *Critical reviews in biotechnology*, 36(5), 891-903.
142. Kaehler, S. T., Phleps, W., & Hesse, E. (2003). Dexibuprofen: pharmacology, therapeutic uses and safety. *Inflammopharmacology*, 11(4), 371-383.
143. Karazniewicz-Lada, M., Baba, K., Dolatowski, F., Dobrowolska, A., & Rakicka, M. (2018). The polymorphism of statins and its effect on their physicochemical properties. *Polimery w medycynie*, 48(2), 77-82.
144. Karimijafari, M., Padrela, L., Walker, G., & Croker D. (2018). Creating cocrystals: a review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications. *Crystal Growth & Design*, 18 (10), 6370-6387.
145. Karpinski, P. H. (2006). Polymorphism of Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemical Engineering & Technology*, 29, 233-237.

146. Kim, E. Y., & Moudgil, K. D. (2009). The determinants of susceptibility/resistance to adjuvant arthritis in rats. *Arthritis research & therapy*, *11*(4), 239.
147. Kimoto, K., Yamamoto, M., Karashima, M., Hohokabe, M., Takeda, J., Yamamoto, K. (2020). Pharmaceutical cocrystal development of TAK-020 with enhanced oral absorption. *Crystals*, *10*, 211-229.
148. Khalil, N. Y., & Aldosari, K. F. (2020). Meloxicam. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*, *45*, 159-197.
149. Kratochvil, B. (2011). *Glassy, amorphous and nano-crystalline materials, hot topics in thermal analysis and calorimetry*. Dordrecht, London, Heidelberg, New York: Springer.
150. Kumar, A., & Nanda, A. (2021). Nano Cocrystals: Crystal Engineering from a Nanotechnological Perspective. *Current pharmaceutical design*, *27*(21), 2445-2453.
151. Kumar, S., Gupta, A., Prasad, R., & Singh, S. (2021). Novel Aceclofenac Cocrystals with L-Cystine: Virtual Coformer Screening, Mechanochemical Synthesis, and Physicochemical Investigations. *Current drug delivery*, *18*(1), 88-100.
152. Lavric, Z., Pirnat, J., Luznik, J., Puc, U., Trontelj, Z., & Srcic, S. (2015). (14) N nuclear quadrupole resonance study of piroxicam: confirmation of new polymorphic form V. *Journal of pharmaceutical sciences*, *104*(6), 1909-1918.
153. Leuner, C., & Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *50*(1), 47-60.
154. Li, D., Li, J., Deng, Z., & Zhang, H. (2019). Piroxicam-clonixin drug-drug cocrystal solvates with enhanced hydration stability *Chemical Engineering & Technology*, *21*, 4145-4149.

155. Li, Z., & Matzger, A. J. (2016). Influence of Cofomer Stoichiometric Ratio on Pharmaceutical Cocrystal Dissolution: Three Cocrystals of Carbamazepine/4-Aminobenzoic Acid. *Molecular pharmaceuticals*, *13*(3), 990-995.
156. Lightowler, M., Li, S., Ou, X., Zou, X., Lu, M., & Xu, H. (2022). Indomethacin Polymorph δ Revealed To Be Two Plastically Bendable Crystal Forms by 3D Electron Diffraction: Correcting a 47-Year-Old Misunderstanding. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *61*(7), e202114985.
157. Lima, L. M., & Barreiro, E. J. (2005). Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current medicinal chemistry*, *12*(1), 23-49.
158. Lipinski, C. A. (1986). Bioisosterism in drug design. *Annual reports in medicinal chemistry*, *21*, 283-291.
159. Liu, F., Wang, L. Y., Li, Y. T., Wu, Z. Y., & Yan, C. W. (2018). Protective effects of quercetin against pyrazinamide induced hepatotoxicity via a cocrystallization strategy of Ccomplementary advantages. *Crystal Growth & Design*, *18*, 3729-3733.
160. Liu, F., Wang, L. Y., Yu, M. C., Li, Y. T., Wu, Z. Y., & Yan, C. W. (2020). A new cocrystal of isoniazid-quercetin with hepatoprotective effect: The design, structure, and in vitro/in vivo performance evaluation. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, *144*, 105216.
161. Liu, T., Muller, R. H., & Moschwitz, J. P. (2015). Effect of drug physico-chemical properties on the efficiency of top-down process and characterization of nanosuspension. *Expert opinion on drug delivery*, *12*(11), 1741-1754.
162. Liu, W., Wang, W. D., Wang, W., Bai, S., & Dybowski, C. (2010). Influence of structure on the spectroscopic properties of the polymorphs of piroxicam. *The journal of physical chemistry. B*, *114*(49), 16641-16649.
163. Lopez-Cedrun, J., Videla, S., Burgueno, M., Juarez, I., Aboul-Hosn, S., Martin-Granizo, R. ... Monner, A. Co-Crystal of Tramadol-Celecoxib Team (2018). Co-crystal of Tramadol-Celecoxib in Patients with Moderate to Severe Acute

- Post-surgical Oral Pain: A Dose-Finding, Randomised, Double-Blind, Placebo- and Active-Controlled, Multicentre, Phase II Trial. *Drugs in R&D*, 18(2), 137-148.
164. Lusi, M., Vitorica-Yrezabal, I. J., & Zaworotko, M. J. (2015). Expanding the Scope of Molecular Mixed Crystals Enabled by Three Component Solid Solutions. *Crystal Growth & Design*, 15, 4098-4103.
165. Lutker, K. M., Quinones, R., Xu, J., Ramamoorthy, A., & Matzger, A. J. (2011). Polymorphs and hydrates of acyclovir. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(3), 949-963.
166. Maisuradze, M., Sheklashvili, G., Chokheli, A., Matarashvili, I., Gogatishvili, T., Farkas, T., & Chankvetadze, B. (2019). Chromatographic and thermodynamic comparison of amylose tris(3-chloro-5-methylphenylcarbamate) coated or covalently immobilized on silica in high-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of select chiral weak acids. *Journal of chromatography*, 1602, 228-236.
167. Manchanda, D., Kumar, A., & Nanda, A. (2021). Recent Advancements in Pharmaceutical Cocrystals, Preparation Methods, and their Applications. *Current pharmaceutical design*, 27(44), 4477-4495.
168. Martin, F., Pop, M., Kacso, I., Grosu, I. G., Miclaus, M., Vodnar, D. ... Bâldea, I. (2020). Ketoconazole-p-aminobenzoic acid cocrystal: revival of an old drug by crystal engineering. *Molecular pharmaceuticals*, 17(3), 919-932.
169. McConathy, J., & Owens, M. J. (2003). Stereochemistry in Drug Action. *Primary care companion to the journal of clinical psychiatry*, 5(2), 70-73
170. McKellar, S. C., Kennedy, A. R. McCloy, N. C., McBride, E., Florence, A. J. (2014), Formulation of liquid propofol as a cocrystalline solid. *Crystal Growth & Design*, 14, 2422-2430.
171. Meanwell, N. A. (2013). The influence of bioisosteres in drug design: tactical applications to address developability problems. *Topics in Medicinal Chemistry*, 9.

172. Mehta, M., Blume, H., Beuerle, G., Tampal, N., Schug, B., Potthast, H., Jiang, W., & Wilson, C. (2020). The global bioequivalence harmonisation initiative: Report of EUFEPS/AAPS third conference. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European federation for pharmaceutical sciences*, *151*, 105383.
173. Merck Sharpe & Dohme Corp. Drug trials snapshots: STEGLATRO. Approval date: December 19 (2017).
174. Minkov, V. S., Drebuschak, V. A., Ogienko, A. G., & Boldyreva, E. V. (2011). Decreasing particle size helps to preserve metastable polymorphs. A case study of DL-cysteine. *CrystEngComm*, *13*, 4417-4426.
175. Mishnev, A. & Kiselovs, G. (2013). New crystalline forms of piroxicam Z. *Naturforsch*, *68*, 168-174.
176. Mnguni, M. J., Michael, J. P., & Lemmerer, A. (2018). Binary polymorphic cocrystals: an update on the available literature in the Cambridge Structural Database, including a new polymorph of the pharmaceutical 1:1 cocrystal theophylline-3,4-dihydroxybenzoic acid. *Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry*, *74*(Pt 6), 715-720.
177. Morissette, S. L., Soukasene, S., Levinson, D., Cima, M. J., & Almarsson, O. (2003). Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(5), 2180-2184.
178. Morozov, Y. N., Fedorov, V. V., Shabatin, V. P., Vernaya, O. I., Chernyshev, V. V., Abel, A. S. ... Sergeev, G. B. (2016). Cryochemical modification of drugs: Nanosized form III piroxicam and its physical and chemical properties. *Moscow University Chemistry Bulletin*, *71*, 287-294.
179. Muresan-Pop, M., Braga, D., Pop, M. M., Borodi, G., Kacso, I., & Maini, L. (2014). Crystal structure and physicochemical characterization of ambazone monohydrate, anhydrous, and acetate salt solvate. *Journal of pharmaceutical sciences*, *103*(11), 3594-3601.

180. Nangia, A. (2008). Conformational polymorphism in organic crystals. *Accounts of chemical research*, 41(5), 595–604.
181. Ness, T. J., Jones, S. L., & Gebhart, G. F. (1987). Contribution of the site of heating to variability in the latency of the rat tail flick reflex. *Brain research*, 426(1), 169-172.
182. Newman, A., Reutzel-Edens, S. M., & Zografi, G. (2018). Coamorphous Active Pharmaceutical Ingredient-Small Molecule Mixtures: Considerations in the Choice of Coformers for Enhancing Dissolution and Oral Bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(1), 5-17.
183. Nijhawan, M., Santhosh, A., Babu, P. R., & Subrahmanyam, C. V. (2014). Solid state manipulation of lornoxicam for cocrystals-physicochemical characterization. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(9), 1163-1172.
184. Novartis Pharmaceuticals Corporation. Drug trials snapshot: ENTRESTO. Approval date: July 7.(2015).
185. Ogienko, A. G., Myz, S. A., Ogienko, A. A., Nefedov, A. A., Stoporev, A. S., Mel'Gunov, M. S. ... Boldyreva, E. V. (2018)/ Cryosynthesis of Co-Crystals of Poorly Water-Soluble Pharmaceutical Compounds and Their Solid Dispersions with Polymers. the “meloxicam-Succinic Acid” System as a Case Study. *Crystal Growth & Design*, 18, 7401-7409.
186. Onischuk, A. A., Tolstikova, T. G., Sorokina, I. V., Zhukova, N. A., Baklanov, A. M., Karasev, V. V. ... Fomin, V. M. (2009). Analgesic effect from Ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 22(3), 245-253.
187. Palmer, G. M. (2016). Pain management in the acute care setting: Update and debates. *Journal of paediatrics and child health*, 52(2), 213-220.
188. Panzade, P. S., & Shendarkar, G. R. (2017). Pharmaceutical Cocrystal: An Antique and Multifaceted Approach. *Current drug delivery*, 14(8), 1097-1105.

189. Panzade, P. S., & Shendarkar, G. R. (2020). Pharmaceutical cocrystal: a game changing approach for the administration of old drugs in new crystalline form. *Drug development and industrial pharmacy*, 46(10), 1559-1568.
190. Panzade, P., Shendarkar, G., Shaikh, S., & Balmukund Rathi, P. (2017). Pharmaceutical Cocrystal of Piroxicam: Design, Formulation and Evaluation. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(3), 399-408.
191. Pathare, D., Jadhav, A., & Shingare, M. (2007). RP-LC Determination of the cis-isomer of Glimipride in a Bulk Drug Substances, *Chromatographia*, 66(7-8), 639-641.
192. Petrushova, L. A., Ukrainets, I. V., Dzyubenko, S. P., & Grinevich, L. A. (2015). Synthesis and the biological activity of 4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2_6,1-benzothiazin-3-carboxylic acids trifluoromethyl-substituted anilides. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 13, 44-48.
193. Rainsford, K. D. (2009). Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology*, 17(6), 275-342.
194. Raza, K., Ratan, S., Kumar, M., Kumar, P., Chaturvedi, S., & Katare, O. P. (2017). Aceclofenac polymorphs: Preparation, characterization and intestinal permeation studies. *Journal of drug delivery science and technology*, 39, 69-74.
195. Rietveld, I. B., & Céolin, R. (2015). Rotigotine: Unexpected Polymorphism with Predictable Overall Monotropic Behavior. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(12), 4117-4122.
196. Riggins, G., Bai, R., Staedtke, V., Joshi, A. & Williamson, T. Mebendazole Polymorph for Treatment and Prevention of Tumors, World Patent, WO2016127168A2 2018.
197. Rossi, P., Paoli, P., Ienco, A., Biagi, D., Valleri, M., & Conti, L. (2019). A new crystal form of the NSAID dexketoprofen. *Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry*, 75(Pt 6), 783-792.
198. S'ari, M., Blade, H., Cosgrove, S., Drummond-Brydson, R., Hondow, N., Hughes, L. P., & Brown, A. (2021). Characterization of Amorphous Solid

- Dispersions and Identification of Low Levels of Crystallinity by Transmission Electron Microscopy. *Molecular pharmaceuticals*, 18(5), 1905-1919.
- 199.Saini, A., Chadha, R., Gupta, A., Singh, P., Bhandari, S., Khullar, S., Mandal, S., & Jain, D. S. (2016). New conformational polymorph of hydrochlorothiazide with improved solubility. *Pharmaceutical development and technology*, 21(5), 611-618.
- 200.Salem, M. S., Alkaysi, H. N., Gharaibeh, A. M., Gharaibeh, N. M., & Badwan, A. A. (1994). Bioequivalence of two oral dosage forms prepared from different polymorphic modifications of tenoxicam. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 19(3), 203–207.
- 201.Sathisaran, I., & Dalvi, S. V. (2018). Engineering Cocrystals of Poorly Water-Soluble Drugs to Enhance Dissolution in Aqueous Medium. *Pharmaceutics*, 10(3), 108.
- 202.Schultheiss, N., & Newman, A. (2009). Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Crystal Growth & Design*, 9(6), 2950-2967.
- 203.Sekhon, B. S. (2012). Drug-drug co-crystals. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 20(1), 45.
- 204.Sergeev, G. B., Sergeev, B. M., Morosov, Y. N., & Chernyshev, V. V. (2010). β -Polymorph of phenazepam: a powder study. *Acta crystallographica. Section E, Structure reports online*, 66(Pt 10), o2623.
- 205.Shi, Q., Chen, H., Wang, Y., Xu, J., Liu, Z., & Zhang, C. (2022). Recent advances in drug polymorphs: Aspects of pharmaceutical properties and selective crystallization. *International journal of pharmaceuticals*, 611, 121320.
- 206.Shishkina S. V., Ukrainets, I. V., Vashchenko, O. V., Voloshchuk, N. I., Bondarenko, P. S., Petrushova, L. A., & Sim, G. (2020). Biological properties of two enantiomeric forms of N-(2, 6-dimethylphenyl)-4-hydroxy-2, 2-dioxo-1H-2λ6,1-benzothiazine-3-carboxamide, a structural analogue of piroxicam. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, 76 (Pt 1), 69-74.

207. Shishkina, S. V., Levandovskiy, I. A., Ukrainets, I. V., Sidorenko, L. V., Grinevich, L. A., & Yanchuk, I. B. (2018). Polymorphic modifications of a 1H-pyrrolo[3,2,1-ij]quinoline-5-carboxamide possessing strong diuretic properties. *Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry*, 74(Pt 12), 1759-1767.
208. Silva, B., Fernandes, C., Guedes de Pinho, P., & Remião, F. (2018). Chiral Resolution and Enantioselectivity of Synthetic Cathinones: A Brief Review. *Journal of analytical toxicology*, 42(1), 17-24.
209. Sinha, B., Müller, R. H., & Möschwitzer, J. P. (2013). Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *International journal of pharmaceutics*, 453(1), 126-141.
210. Sjøvall, S., Kokki, M., Nokela, A., Halinen, L., Turunen, M., & Kokki, H. (2015). Intravenous dexketoprofen induces less injection pain than racemic ketoprofen. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 40(4), 431-435.
211. Smith, A. J., Kavuru, P., Wojtas, L., Zaworotko, M. J., & Shytle, R. D. (2011). Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability. *Molecular pharmaceutics*, 8(5), 1867-1876.
212. Somphon, W., Prasertsabw, A., & Jarussophon, N. (2019). Novel cogrinding of donepezil with neurotransmitters and coumarins: characterization, physical properties and in vitro drug release study. *Materials Today: Proceedings*, 17, 1887-1897.
213. Stoica, C., Verwer, P., Meekes, H., Van Hoof, P. J., Kaspersen, C. M., & Vlieg, E. (2004). Understanding the effect of a solvent on the crystal habit. *Crystal Growth & Design*, 4, 765-768.
214. Suresh, K. & Nangia, A. (2014). Lornoxicam salts: crystal structures, conformations, and solubility *Crystal Growth & Design*, 14, 2945-2953.
215. Surwase, S. A., Boetker, J. P., Saville, D., Boyd, B. J., Gordon, K. C., Peltonen, L., & Strachan, C. J. (2013). Indomethacin: new polymorphs of an old drug. *Molecular pharmaceutics*, 10(12), 4472-4480.

216. Syed, T. A., Gaikar, V. G., & Mukherjee, S. (2019). Stability of co-crystals of caffeine with gallic acid in presence of coformers. *Journal of Food Process Engineering*, 42, Article e13066.
217. Tandon, R., Tandon, N.; Gupta, N., & Gupta, R. (2018). Art of synthesis of desired polymorphs: A review. *Asian Journal of Chemistry*, 30, 5-14.
218. Taylor, D. (2015). The Pharmaceutical Industry and the Future of Drug Development, in: Hester, R. E., Harrison, R. M. (Eds.), *Pharmaceuticals in the Environment* (pp. 1-33)., Cambridge: /The Royal Society of Chemistry
219. Thipparaboina, R., Kumar, D., Chavan, R. B., & Shastri, N. R. (2016). Multidrug co-crystals: towards the development of effective therapeutic hybrids. *Drug discovery today*, 21(3), 481-490.
220. Tok, K. C., Gumustas, M., Jibuti, G., Suzen, H. S., Ozkan, S. A., & Chankvetadze, B. (2020). The Effect of Enantiomer Elution Order on the Determination of Minor Enantiomeric Impurity in Ketoprofen and Enantiomeric Purity Evaluation of Commercially Available Dexketoprofen Formulations. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5865.
221. Toledo, M. V., & Briand, L. E. (2018). Relevance and bio-catalytic strategies for the kinetic resolution of ketoprofen towards dexketoprofen. *Critical reviews in biotechnology*, 38(5), 778-800.
222. Tripathi, R., Biradar, S. V., Mishra, B., & Paradkar, A. R. (2010). Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1493-1498.
223. Tumanova, N., Tumanov, N., Fischer, F., Morelle, F., Ban, V., Robeyns, K. ... Leyssens, T. (2018). Exploring polymorphism and stoichiometric diversity in naproxen/proline cocrystals. *CrystEngComm*, 20, 7308-7321.
224. Ukrainets, I. V., Petrushova, L. A., Voloshchuk, N. I., & Bondarenko, P. S. (2018). *Crystalline forms of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ6,1-benzothiazine-3-carboxamide, their toxicity and ulcerogenic effect. 8th International Conference "Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles" in memoriam of Prof. Valeriy Orlov 2018. Kharkiv.*

225. Ukrainets, I. V., Petrushova, L. A., Fedosov, A. I., Voloshchuk, N. I., Bondarenko, P. S., Shishkina, S. V., ... Sim G. (2020). Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-Hydroxy-2, 2-Dioxo-1H-2λ₆, 1-B
226. Ukrainets, I. V., Petrushova, L. A., Shishkina, S. V., Grinevich, L. A., & Sim, G. (2016). Synthesis, Spatial Structure and Analgesic Activity of Sodium 3-Benzylaminocarbonyl-1-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ₆,1-benzothiazin-4-olate Solvates. *Scientia pharmaceutica*, 84(4), 705-714.
227. Ukrainets, I. V., Burian, A. A., Baumer, V. N., Shishkina, S. V., Sidorenko, L. V., Tugaibei, I. A., Voloshchuk, N. I., & Bondarenko, P. S. (2018). Synthesis, Crystal Structure, and Biological Activity of Ethyl 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2λ₆,1-benzothiazine-3-carboxylate Polymorphic Forms. *Scientia pharmaceutica*, 86(2), 21.
228. Ukrainets, I. V., Hamza, G. M., Burian, A. A., Shishkina, S. V., Voloshchuk, N. I., & Malchenko, O. V. (2018). 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2λ₆,1-benzothiazine-3-carboxylic Acid. Peculiarities of Preparation, Structure, and Biological Properties. *Scientia pharmaceutica*, 86(1), 9.
229. Ukrainets, I. V., Petrushova, L. A., Sidorenko, L. V., Davidenko, A. A., & Duchenko, M. A. (2016). The Study of Structure-Analgesic Activity Relationships in a Series of 4-Hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ₆,1-benzothiazine-3-carboxylic Acid Toluidides and Xylidides. *Scientia pharmaceutica*, 84(3), 497-506.
230. Ukrainets, I. V., Shishkina, S. V., Baumer, V. N., Gorokhova, O. V., Petrushova, L. A., & Sim, G. (2016). Two pseudo-enantiomeric forms of N-benzyl-4-hydroxy-1-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ(6),1-benzothiazine-3-carboxamide and their analgesic properties. *Acta crystallographica. Section C, Structural chemistry*, 72(Pt 5), 411-415.
231. Ukrainets, I. V., Mospanova, E. V., Savchenkova, L. V., & Yankovich, S. I. (2011). 4-Hydroxy-2-quinolones. 195. Synthesis of novel, potential analgesics
- e
- .

- based on 4-(hetarylmethyl)amino-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 47, 67-73/
232. Ukrainets, I. V., Mospanova, O. V., Bereznyakova, N. L., & Davidenko, O. O. (2015). Polymorphism and the analgesic activity of N-(3-pyridylmethyl)-4-hydroxy-2-oxo-1,2,5,6,7,8-hexahydroquinoline-3-carboxamide. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 13, 41-46.
233. Utehina, A. Y., Moscovia, A. A., Morozov, Y. N., Kolotilov, P. N., Sergeev, B. M., & Sergeev, G. B. (2011). Cryosynthesis and physico-chemical properties of hormone Δ^5 -androstenediol-3 β ,17 β nanoparticles. *Butlerov communications*, 25, 71-76.
234. Van Duong, T., Lüdeker, D., Van Bockstal, P. J., De Beer, T., Van Humbeeck, J., & Van den Mooter, G. (2018). Polymorphism of indomethacin in semicrystalline dispersions: formation, transformation, and segregation. *Molecular pharmaceutics*, 15(3), 1037-1051.
235. Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 47 Suppl 2, S78-S87.
236. Varrassi, G., Pergolizzi, J. V., Dowling, P., & Paladini, A. (2020). Ibuprofen Safety at the Golden Anniversary: Are all NSAIDs the Same? A Narrative Review. *Advances in therapy*, 37(1), 61-82.
237. Videla, S., Lahjou, M., Vaque, A., Sust, M., Encabo, M., Soler, L. ... Plata-Salaman, C. (2017). Single-dose pharmacokinetics of co-crystal of tramadol-celecoxib: Results of a four-way randomized open-label phase I clinical trial in healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*, 83(12), 2718-2728.
238. Vishweshwar, P., McMahon, J. A., Peterson, M. L., Hickey, M. B., Shattock, T. R., & Zaworotko, M. J. (2005). Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 36, 4601-4603.
239. Vogel, H. G. (2008). *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays* (pp. 1103-1106). Berlin: Springer.

240. Voloshchuk, N., Taran, I., & Pashynska, O. (2020). The role of hydrogen sulfide in gastrointestinal tract functioning, *Current issues in pharmacy and medical sciences*, 1(33), 45-50.
241. Vrečer, F., Vrbinc, M., & Meden, A. (2003). Characterization of piroxicam crystal modifications. *International journal of pharmaceutics*, 256(1-2), 3–15.
242. Wang, L.-Y., Yu, Y.-M., Jiang, F.-B., Li, Y.-T., Wu, Z.-Y., & Yan, C.-W. (2020). The first zwitterionic cocrystal of indomethacin with amino acid showing optimized physicochemical properties as well as accelerated absorption and slowed elimination *in vivo*. *New Journal of Chemistry*, 44, 3930-3939.
243. Wang, L. Y., Bu, F. Z., Li, Y. T., Wu, Z. Y., & Yan, C. W. (2020). A sulfathiazole–amantadine hydrochloride cocrystal: the first codrug simultaneously comprising antiviral and antibacterial components *Crystal Growth & Design*, 20, 3236-3246.
244. Wang, N., Xie, C., Lu, H., Guo, N., Lou, Y., Su, W., & Hao, H. (2018). Cocrystal and its Application in the Field of Active Pharmaceutical Ingredients and Food Ingredients. *Current pharmaceutical design*, 24(21), 2339–2348.
245. Watanabe, A., Yamaoka, Y., & Takada, K. (1982). Crystal habits and dissolution behavior of aspirin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(8), 2958-2963.
246. Xuan, B., Wong, S. N., Zhang, Y., Weng, J., Tong, H. H. Y., Wang, C., Chow, S. F. (2020). Extended release of highly water soluble isoniazid attained through cocrystallization with curcumin. *Crystal Growth & Design*, 20, 1951-1960.
247. Yousef, M. A. E., & Vangala, V. R. (2019). Pharmaceutical co-crystals: molecules, crystals, formulations, medicines. *Crystal Growth & Design*, 19, 7420-7438.
248. Yu, L. (2001). Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced drug delivery reviews*, 48(1), 27-42.

249. Yu, X. Z., Wang, L. Y., Liu, F., Li, Y. T., & Yan, C.W. (2020). A sustained-release dual-drug ternary salt cocrystal of piperazine ferulate with pyrazinamide: the synthesis, structure and Hirshfeld surface analysis. *Crystal Growth & Design*, 20, 2064-2073.
250. Zaworotko, M. J. (2007). Molecules to crystals, crystals to molecules ... and back again? *Crystal Growth & Design*, 7, 4-9.
251. Zhang, J., Tan, X., Gao, J., Fan, W., Gao, Y., & Qian, S. (2013). Characterization of two polymorphs of lornoxicam. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 65(1), 44-52.
252. Zhang, T., Wang, L., Bao, Y., Yang, Q., Zhou, L., Hao, H., & Xie, C. (2018). Confirmation of More Stable Polymorphic Form of Etoricoxib at Room Temperature. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(7), 1903-1910.
253. Zhou, J., Li, L., Zhang, H., Xu, J., Huang, D., Gong, N. ... Zhou, Z. (2020). Crystal structures, dissolution and pharmacokinetic study on a novel phosphodiesterase-4 inhibitor chlorbipram cocrystals. *International journal of pharmaceutics*, 576, 118984.
254. Zhou, Y., Wang, J., Xiao, Y., Wang, T., & Huang, X. (2018). The Effects of Polymorphism on Physicochemical Properties and Pharmacodynamics of Solid Drugs. *Current pharmaceutical design*, 24(21), 2375-2382.
255. Zhu, B., Zhang, Q., Wang, J. R., & Mei, X. (2017). Cocrystals of baicalein with higher solubility and enhanced bioavailability. *Crystal Growth & Design*, 17, 1893-1901.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації.

1. Bondarenko, P. S. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51. DOI: <https://doi.org/10.31393/bba41-2020-08> (*Дисертанту належить огляд літератури, виконання експерименту, статистичну обробку отриманих даних, формування висновків та узагальнення; підготовка, оформлення статті виконано у співавторстві*)
2. Бондаренко, П. С. Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 27-32. DOI: [10.31393/reports-vnmedical-2021-25\(1\)-05](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2021-25(1)-05). (*Здобувач особисто виконав дослідження фармакологічної активності сполуки, що вивчалась, провів статистичну обробку результатів, у співавторстві аналізував отримані результати та формулював висновки*).
3. Бондаренко, П. С. Дослідження впливу N-(трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на біохімічні показники запальної реакції у щурів за умов ад'ювантного артриту / П. С. Бондаренко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15 №3, С. 81-88 <https://doi.org/10.33250/15.03.181>

4. Bondarenko, P. S. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Activity of Ethyl 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylate Polymorphic Forms / I. V. Ukrainets, A. A. Burian, V. N. Baumer, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, I. A. Tugaibei, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // Sci Pharm. – 2018. – Vol. 86(2). – 21. – URL: [https://doi: 10.3390/scipharm 86020021](https://doi.org/10.3390/scipharm86020021). (Last accessed: 02.05.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертантом особисто виконано експерименти з визначення протизапальної і знеболюючої дії хімічних сполук; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

5. Bondarenko, P. S. Biological properties of two enantiomeric forms of N-(2, 6-dimethylphenyl)-4-hydroxy-2, 2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, a structural analogue of piroxicam / S. V. Shishkina, I. V. Ukrainets, O. V. Vashchenko, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko, L. A. Petrushova, G. Sim. // Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry.- 2020. – Vol.76 (Pt 1) – P. 69-74. doi: 10.1107/S2053229619016450. *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертант особисто провів експериментальні дослідження біологічної активності поліморфних сполук; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

6. Bondarenko, P. S. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, Voloshchuk, P. S. Bondarenko, S. V. Shishkina, L. V. Sidorenko, G. Sim.// Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001> (Last accessed: 02.05.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертант здійснював експериментальні дослідження біологічної активності хімічних сполук; у співавторстві формулював висновки та оформлював статтю).*

7. Пат. № 118642 Україна UA C2 МПК C07D 279/02 (2006.01) A61K 31/5415 (2006.01) A61P 29/02 (2006.01) Моноклінна кристалічна модифікація етил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин3-карбоксилату, яка виявляє

протизапальну та анальгетичну активність / Українець І. В., Бур'ян Г. О., Шишкіна С. В., Волощук Н. І., Бондаренко П. С.; заявник і патентовласник Українець Ігор Васильович, вул. Кричевського, 40, кв. 11, м. Харків, 61027 (UA); заявл. 20.06.2018; опубл. 11.02.2019, Бюл.№ 3. *(Дисертант особисто провів експериментальні дослідження біологічної активності поліморфних сполук; написання та оформлення патенту виконано у співавторстві)*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації.

1. Анальгетична активність різних кристалічних форм *N*-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко, І. В. Українець, Л. О. Петрушова // Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 22. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі та узагальненні отриманих даних, написання тез виконано у співавторстві).*

2. Поліморфні модифікації етил-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксилату та їх властивості / Г. О. Бур'ян, І. В. Українець, Н. І. Волощук, П. С. Бондаренко // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій», присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича (12-13 квітня 2018 р., м. Харків). - Харків, 2018. - С. 22-23. *(Здобувач проводив аналіз даних літератури, дослідження біологічної активності сполук, статистичну обробку отриманих результатів, оформлення та подачу тез до друку).*

3. Бондаренко, П. С. Дослідження гострої токсичності та ульцерогенної дії різних кристалічних модифікацій *N*-*r*-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2018» 18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця, с. 438.

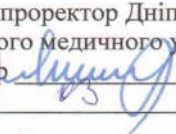
4. Crystalline forms of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, their toxicity and ulcerogenic effect / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, N. I. Voloshchuk, P. S. Bondarenko // 8th International Conference “Chemistry of Nitrogen Containing Heterocycles” in memoriam of Prof. Valeriy Orlov (12-16 November, 2018 Kharkiv, Ukraine). - CNCH-2018. Book of Abstracts. - Kharkiv, 2018. - P. 146. *(Дисертант особисто виконав фармакологічні дослідження, їх статистичну обробку; написання тез виконано у співавторстві).*

5. Бондаренко, П. С. Дослідження аналгетичної та протизапальної активності N-(4-трифторметилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду в експерименті / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук, О. М. Денисюк // Матеріали Х Всеукраїнської науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів з клінічної фармакології «Сучасна клінічна фармакологія в фармакотерапії та профілактиці захворювань з позицій доказової медицини» (Вінниця, 7–8 листопада 2019 р.). – Вінниця, 2019. - С 37-39. *(Здобувачу належить виконання фармакологічних досліджень, статистичну обробку результатів; написання тез виконано у співавторстві).*

6. Бондаренко, П. С. Експериментальне дослідження антиексудативної дії N-(4-трифлюорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / П. С. Бондаренко // Матеріали XVIII Наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021» (15-17 квітня 2021 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2021. - С. 492.

Додаток Б

Акти впровадження

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Перший проректор Дніпровського
 державного медичного університету
 професор  Ігор ШПОНЬКА
 «27» березня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Знеболююча та протизапальна активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»

2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волошук Наталія Іванівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedosenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.
3. Бондаренко, П. С. Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів / П. С. Бондаренко, Н. І. Волошук // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 27-32.

4. **Де і коли впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедри фармакології Дніпровського державного медичного університету з «20» березня 2021 р.

5. **Результат впровадження:** Серед похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними аналгетичними та знеболюючими властивостями, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), виявляє найбільш виразні протизапальну, знеболюючу та жарознижувальну дію, відрізняється фармакокінетичними параметрами та є найменш токсичною серед інших кристалічних форм цієї сполуки. Отримана інформація дозволить розширити знання студентів про нові розробки перспективних аналгетичних та протизапальних засобів.

6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології і клінічної фармакології Дніпровського державного медичного університету протокол № 9 від « 26 » березня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

зав. кафедри фармакології
 і клінічної фармакології
 Дніпровського державного медичного
 університету, професор



Володимир ЖИЛЮК



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної (навчальної) роботи
Вінницького національного медичного університету ім.
М.І. Пирогова
проф. Гумінський Ю.Й.

„24” „09” 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Експериментальне дослідження знеболюючої та протизапальної активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
 2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова з „01” 2021 р.

Результат впровадження: шляхом біоізоостеричної заміни в молекулі 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними анагетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), маючи найбільшу площу поверхні кристала, впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин абсорбції, максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, та швидку елімінацію, що корелює із найкращі фармакологічними та токсикологічними характеристиками. Отримана інформація поглиблює знання студентів про вплив поліморфної форми кристалів на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, протокол № 13 від „23” 04 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри фармакології
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова
д.мед.н., проф.

Н.І. Волощук

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор з науково педагогічної
роботи Національного фармацевтичного
університету

доц. Федосов А.І.

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Експериментальне дослідження знеболюючої та протизапальної активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»

2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волощук Наталія Іванівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.

1. **Де і коли впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету з «18» травня 2021 р.

5. **Результат впровадження:** шляхом біоізоостеричної заміни в молекулі 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними анагетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), маючи найбільшу площу поверхні кристала, впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин абсорбції, максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, та швидку елімінацію, що корелює із найкращі фармакологічними та токсикологічними характеристиками. Отримана інформація поглиблює знання студентів про вплив поліморфної форми кристалів на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.

2. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету протокол № 21 від «18» травня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри фармакології та фармакотерапії
Національного фармацевтичного університету
д. мед.н., проф.

С.Ю. Штриголь

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Вінницького національного
медичного університету

ім. М.І. Пирогова,

акад. НАМНУ, д. мед. н., проф.

 В.М. Мороз

«19» 05 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Експериментальне дослідження знеболюючої та протизапальної активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»

2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волощук Наталія Іванівна.

3. **Джерела інформації:**

1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.

4. **Де і коли впроваджено:** в науково-педагогічний процес кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова з «05» січня 2021 р.

5. **Результат впровадження:** шляхом біоістеричної заміни в молекулі 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними анальгетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), маючи найбільшу площу поверхні кристала, впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин абсорбції, максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, та швидку елімінацію, що корелює із найкращі фармакологічними та токсикологічними характеристиками. Отримана інформація поглиблює знання студентів про вплив поліморфної форми кристалів на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.

6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова. Протокол №20 від «18» травня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
д. мед.н., проф.


О.О. Яковлева

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського
МОЗ України

д.біол.н., проф. І.М. Кліва

„14”

2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів дисертаційного дослідження аспіранта кафедри фармакології
Бондаренка Павла Сергійовича

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** «Експериментальне дослідження знеболюючої та протизапальної активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
- 3. Джерела інформації:**

1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.

4. Де і коли впроваджено у науково-педагогічний процес кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського з «1» вересня 2021 р.

5. Результат впровадження: шляхом біоізоостеричної заміни в молекулі 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними анальгетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин абсорбції, максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, та швидко елімінацію, що корелює із найкращими фармакологічними та токсикологічними характеристиками. Отримана інформація поглиблює знання студентів про вплив поліморфної форми кристалів на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського протокол № 5 від «13» травня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

зав. кафедри фармакології з клінічною фармакологією
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
д. мед. н., проф.

О. О. Олещук

О.М. Олещук

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Буковинського державного медичного університету
 доц. І.В. Геруш

_____ 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Знеболююча та протизапальна активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волощук Наталія Іванівна.
3. **Джерела інформації:**
 1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
 2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedoseenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.
 3. Бондаренко, П. С. Дослідження протизапальної та жарознижувальної активності поліморфної модифікації похідного N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у щурів / П. С. Бондаренко, Н. І. Волощук // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 27-32.
4. **Де і коли впроваджено:** у науково-педагогічний процес кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету з „01” вересня 2021 р.
5. **Результат впровадження:** Серед похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними аналгетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), виявляє найбільш виразні протизапальну, знеболюючу та жарознижувачу дії, відрізняється фармакокінетичними параметрами та є найменш токсичною серед інших кристалічних форм цієї сполуки. Отримана дозволить розширити знання студентів про нові розробки перспективних аналгетичних та протизапальних засобів.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
 Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету, протокол № 1 від „25” серпня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

зав. кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету,
 професор

І.І. Заморський



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора з наукової роботи
Фізико-хімічного інституту
ім. О.В. Богатського НАН України
д.б.н., професор І.І. Романовська

_____ 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** «Експериментальне дослідження знеболюючої та протизапальної активності різних кристалічних форм похідних 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот»
 2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедра фармакології, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, аспірант Бондаренко Павло Сергійович, професор Волошук Наталія Іванівна.
 3. **Джерела інформації:**
 1. Crystal Habits and Biological Properties of N-(4-Trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide / I. V. Ukrainets, L. A. Petrushova, A. I. Fedosov, et al. // Sci. Pharm. – 2020. - Vol. 88 (1). – 1. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
 2. Investigation of pharmacokinetics of N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide various crystalline modifications in vivo / Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I., Larionov V. B., Fedosenko H. O. // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 46-51.
 4. **Де і коли впроваджено:** у науковий процес лабораторії фізико-хімічної фармакології з № 2 від „ 26 ” травня 2021 р.
 5. **Результат впровадження:** шляхом біоістеричної заміни в молекулі 4-R-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонових кислот отримано сполуку з виразними анальгетичними та знеболюючі властивості, що переважають структурні аналоги. Серед трьох кристалічних модифікацій цієї сполуки, поліморфна форма у вигляді пластинок (форма В), маючи найбільшу площу поверхні кристала, впливає переважно на процеси всмоктування із відповідними змінами у показниках величин абсорбції, максимальної концентрації та часу її досягнення, має найбільшу біодоступність, та швидко елімінацію, що корелює із найкращі фармакологічними та токсикологічними характеристиками.
 6. **Ефективність впровадження за критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3)** Отримана інформація поглиблює знання студентів про вплив поліморфної форми кристалів на фармакокінетику та фармакодинаміку лікарських засобів.
 7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
- Обговорено та затверджено на засіданні лабораторії фізико-хімічної фармакології, протокол № 2 від „ 26 ” травня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач лабораторії фізико-хімічної фармакології,
д.біол.наук

В.Б. Ларіонов