

© 2023 by the author(s).

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>

УДК: 547.792.9+547.859+547.874+547.789.6):615.074:615.211-099

1-(5-АЦЕТИЛ-3-МЕТИЛ-6-ФЕНИЛ-5Н-[1,2,4]ТРИАЗОЛО [3,4-*b*][1,3,4]ТІАДІАЗИН-7-ІЛ)-ЕТАНОН: ДОЗОЗАЛЕЖНІСТЬ АНАЛГЕТИЧНОГО ЕФЕКТУ, ВІДСУТНІСТЬ ОПОЇДЕРГІЧНОГО МЕХАНІЗМУ ДІЇ, ВПЛИВ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ

Коваль А.Я.¹ ORCID: 0009-0004-3172-6477

Штриголь С.Ю.² ORCID: 0000-0001-6832-5643

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна
Кафедра менеджменту в охороні здоров'я, фармакотерапії і клінічної фармації

² Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна
Кафедра фармакології та фармакотерапії

Ключові слова: похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, знеболювальна дія, дозозалежність, механізм дії, гостра токсичність

Для цитування: Коваль А.Я., Штриголь С.Ю. 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло [3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон: дозозалежність анальгетичного ефекту, відсутність опіоїдергічного механізму дії, вплив на поведінкові реакції та гостра токсичність. Львівський медичний часопис. 2023. Т. 29. № 3-4. С. 192-203. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>

Для кореспонденції: Коваль Андрій Ярославович, магістр держ.упр., асистент кафедри менеджменту в охороні здоров'я, фармакотерапії і клінічної фармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, e-mail: andrij_koval@ukr.net

Стаття надійшла: 23.10.2023 **Прийнята до друку:** 19.11.2023

1-(5-ACETYL-3-METHYL-6-PHENYL-5H-[1,2,4]TRIAZOLO [3,4-*b*][1,3,4]THIADIAZIN-7-YL)-ETHANONE: DOSE-DEPENDENCE OF ANALGESIC EFFECT, LACK OF OPIOIDERGIC MECHANISM OF ACTION, EFFECT ON BEHAVIORAL REACTIONS AND ACUTE TOXICITY

Andriy Koval¹ ORCID: 0009-0004-3172-6477

Sergiy Shtrygol'² ORCID: 0000-0001-6832-5643

¹ Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine
Department of Healthcare Management, Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy

² National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy

Keywords: 5,7-diacyl-3-H(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine derivatives, analgesic effect, dose dependence, mechanism of action, acute toxicity

For citation: Koval A., Shtrygol' S. 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo [3,4-*b*][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone: dose-dependence of analgesic effect, lack of opioidergic mechanism of action, effect on behavioral reactions and acute toxicity. Acta Medica Leopoliensia. 2023;29(3-4):192-203.

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2023.3-4.192>

For correspondence: Andriy Yaroslavovych Koval, Master of Public Administration, assistant professor of the Department of Health Care Management, Pharmacotherapy and Clinical Pharmacy of Danylo Halytsky Lviv National Medical University, e-mail: andrij_koval@ukr.net

Received: October 23, 2023 **Accepted:** November 19, 2023

Реферат

Перспективними анальгетиками, що водночас виявляють протизапальні властивості, є похідні 5,7-діацил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину.

Мета. Оцінити дозозалежність знеболювального ефекту сполуки IFT₂₄₇, участь опіоїдергічної скла-

Abstract

Derivatives of 5,7-diacyl-3-H(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine.

Aim. To evaluate the dose dependence of the analgesic effect of the compound IFT₂₄₇, the participation of the opioidergic component in the mechanism of action of this compound, its influence on behavioral reactions in the

дової в механізмі дії цієї сполуки, її вплив на поведінкові реакції у тесті відкритого поля та визначити гостру токсичність.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження обрано сполуку IFT_247. У дослідженні використано 80 білих безпородних мишей самців. Дослідження соматичного болю проводили з використанням тесту "Гаряча пластина". Як конкурентний блокатор опіоїдних рецепторів використовували налоксон, а як препарат порівняння - метамізол натрію. Поведінкові реакції досліджували в тесті "відкрите поле". Гостру токсичність визначали *in vivo* за методом В.Б. Прозоровського. Результати обробляли за допомоги програми STATISTICA 10.0.

Результати й обговорення. Найменша з випробуваних доз сполуки IFT_247 5 мг/кг спричинила слабкий знеболювальний ефект на рівні тенденції (приріст 34,9%). Збільшення дози до 15 мг/кг спричинило більший ефект (приріст 68,1%, $p < 0,01$). Ефект дози 25 мг був найбільшим (приріст 149,6%, $p < 0,001$), а підвищення дози до 35 мг/кг не посилювало його (приріст 135,9%, $p < 0,001$). Отже, анагетична дія сполуки IFT_247 залежить від дози, а максимальною ефективною можна вважати дозу 25 мг/кг і саме її взято для наступних експериментів. Аналіз даних вивчення опіоїддергічного механізму сполуки IFT_247 демонструє, що блокатор опіоїдних рецепторів налоксон не вплинув на її знеболювальний ефект. Ця сполука *per se* збільшила ЛП облизування задньої лапи в середньому на 54%. На тлі дії налоксону ЛП ноцицептивної реакції зріс на 72,8%, відмінності з показником групи досліджуваної сполуки *per se* відрізняються на рівні тенденції. Для порівняння аналогічний експеримент виконано з класичним анагетиком-антипіретиком метамізолом натрію. Середній приріст ЛП ноцицептивної реакції за його використання *per se* становив 306,3%, а за попередньої блокади опіоїдних рецепторів налоксон - 204,4%, тобто зменшувався в середньому на третину, а медіана фінального латентного часу зменшилася в 2 рази при майже однаковому вихідному значенні. Отже, опіоїддергічний механізм, очевидно, не бере участі в анагетичній дії сполуки IFT_247, проте тонкий нейрохімічний механізм анагетичного ефекту сполуки IFT_247 потребує поглибленого з'ясування. У тесті відкритого поля не виявлено суттєвого впливу сполуки IFT_247 на поведінку мишей. Єдиною значущою відмінністю було збільшення кількості болюсів ($p < 0,05$), проте решта показників емоційних реакцій та їх вегетативного супроводу (грумінг, уринації) не відрізнялися від контрольних значень. Таким чином, досліджувана сполука не спричиняє ані стимулюючого, ані пригнічуючого впливу на ЦНС. При визначенні гострої токсичності сполуки IFT_247 доза 2000 мг/кг не викликала летального ефекту в жодній миші. Дози 2500 і 3980 мг/кг спричинили загибель 1 тварини, а доза 5010 мг/кг виявилася летальною для всіх мишей. На підставі цих результатів розраховано LD_{50} , що дорівнює 2840 ± 340 мг/кг. Отже,

open field test, and to determine acute toxicity.

Materials and Methods. The compound IFT_247 was chosen as the object of research. 80 white outbred male mice were used in the study. Research on somatic pain was conducted using the "Hot Plate" test. Naloxone was used as a competitive opioid receptor blocker, and metamizole sodium was used as a comparison drug. Behavioral responses were studied in the open field test. Acute toxicity was determined *in vivo* according to the method of V.B. Prozorovsky. The results were processed using the STATISTICA 10.0 program.

Results and Discussion. The lowest tested dose of compound IFT_247, 5 mg/kg, produced a weak analgesic effect at the trend level (34.9% increase). Increasing the dose to 15 mg/kg produced a greater effect (68.1% increase, $p < 0.01$). The 25 mg dose effect was the largest (149.6% increase, $p < 0.001$), and increasing the dose to 35 mg/kg did not increase it (135.9% increase, $p < 0.001$). Therefore, the analgesic effect of the compound IFT_247 depends on the dose, and the maximum effective dose can be considered to be 25 mg/kg, it is this dose that was taken for the following experiments. Analysis of the data from the study of the opioidergic mechanism of the compound IFT_247 demonstrates that the opioid receptor blocker naloxone did not affect its analgesic effect. This compound *per se* increased hindpaw licking LP by an average of 54%. Against the background of the effect of naloxone, the LP of the nociceptive reaction increased by 72.8%, the differences with the indicator of the group of the studied compound *per se* differ at the level of the trend. For comparison, a similar experiment was performed with the classical analgesic-antipyretic sodium metamizole. The average increase in the LP nociceptive response during its use *per se* was 306.3%, and during the previous blockade of opioid receptors with naloxone - 204.4%, that is, it decreased on average by a third, and the median of the final latent time decreased by 2 times with almost the same initial value. Therefore, the opioidergic mechanism is not involved in the analgesic effect of the IFT_247 compound, however, the subtle neurochemical mechanism of the analgesic effect of the IFT_247 compound needs further clarification. In the open field test, no significant effect of the compound IFT_247 on the behavior of mice was found. The only significant difference was an increase in the number of boluses ($p < 0.05$), however, the remaining indicators of emotional reactions and their vegetative accompaniment (grooming, urination) did not differ from the control values. Thus, the studied compound does not cause either a stimulating or depressing effect on the CNS. When determining the acute toxicity of the compound IFT_247, a dose of 2000 mg/kg did not cause a lethal effect in any mouse. Doses of 2500 and 3980 mg/kg caused the death of 1 animal, and a dose of 5010 mg/kg was lethal in all mice. Based on these results, the LD_{50} was calculated, which is 2840 ± 340 mg/kg. Therefore, according to the

за результатами сполука IFT_247 належить до мало-токсичних речовин ($500 \text{ мг/кг} < \text{LD}_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$, IV клас токсичності за класифікацією Hoge та Sterner).

Висновки. Сполука IFT_247 чинить дозозалежний знеболювальний ефект, максимально ефективною є доза 25 мг/кг . У механізмі анальгетичної дії сполуки не бере участі опіоїддергичний вплив. Дана сполука не викликає змін поведінки мишей у тесті відкритого поля та належить до IV класу токсичності - мало-токсичні речовини.

Вступ

Значне поширення захворювань і патологічних станів, що супроводжуються больовим синдромом, вимагає поповнення та вдосконалення арсеналу знеболювальних засобів. Перспективними анальгетиками, що водночас виявляють протизапальні властивості, є похідні 5,7-діацил-3-*H*(алкіл)-6-арил-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазину, одним з найактивніших представників яких виявився 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон [1-3]. Постає питання щодо поглибленого дослідження цієї сполуки, в тому числі оцінка залежності ефекту від дози, з'ясування механізму дії, супутніх нейротропних ефектів, гострої токсичності.

Мета дослідження - оцінити дозозалежність знеболювального ефекту 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону, участь опіоїддергичної складової в механізмі дії цієї сполуки, її вплив на поведінкові реакції у тесті відкритого поля та визначити гостру токсичність цієї сполуки.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження обрано 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон, лабораторний шифр IFT_247 (Рис. 1). Сполуку синтезовано у відділі синтезу фізіологічно-активних речовин ДУ "Інститут фармакології та токсикології Національної Академії Медичних Наук України" під керівництвом д. фарм. наук., проф. Демченка А.М.

У дослідженні використано 80 білих безпородних мишей самців масою близько 30 г.

results, the compound IFT_247 belongs to low-toxic substances ($500 \text{ mg/kg} < \text{LD}_{50} < 5000 \text{ mg/kg}$, toxicity class IV according to Hoge and Sterner classification).

Conclusions. The IFT_247 compound exerts a dose-dependent analgesic effect, the maximum effective dose being 25 mg/kg . Opioidergic influence is not involved in the mechanism of analgesic action of the compound. This compound does not cause changes in the behavior of mice in the open field test and belongs to the IV toxicity class - low-toxic substances.

Тварин утримували в стандартних умовах віварію Навчально-наукового інституту прикладної фармації Національного фармацевтичного університету. Миші мали вільний доступ до їжі та води в контрольованих умовах (стала температура повітря на рівні $+21\text{-}22^\circ\text{C}$ і вологість 65%).

Досліди виконано згідно з Директивою Європейського Союзу 2010/10/63 EU (2010 р.) щодо експериментів на тваринах. Під час усіх маніпуляцій з тваринами дотримувалися принципів біоетики, керуючись положеннями Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (1986 р.), а також Директиви Ради Європи 2010/63/EU (2010 р.).

Використовували базову модель дослідження соматичного болю - тест "Гаряча пластина" [4]. Зазначена модель ґрунтується на подразненні ноцицепторів шкіри лап помірно гарячою пластиною (прилад Hot/Cold Plate (Bioseb, USA) при температурі поверхні $+54^\circ\text{C}$. Реєстрували латентний період (ЛП) типової поведінкової відповіді на ноцицептивну стимуляцію - облизування задньої лапи, що є найбільш специфічним маркером больових почуттів [4, 5]. Перебування мишей

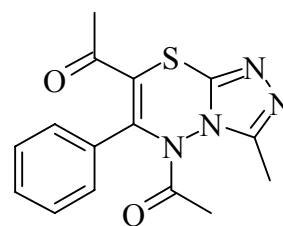


Рис. 1

Хімічна структура 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5*H*-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону (сполука IFT_247)

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

У першій серії дослідів визначали дозозалежність анагетичного ефекту. Після визначення вихідного ЛП мишам внутрішньошлунково (в/ш) вводили сполуку IFT_247 в дозах 5; 15; 25 і 35 мг/кг у вигляді водної суспензії, стабілізованої твіном-80, в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси. Через 60 хв повторювали визначення ЛП. Контрольним тваринам вводили в/ш еквівалентну кількість води.

У другій серії дослідів визначали можливу участь опіодергічного механізму в анагетичній дії сполуки IFT_247 у максимально ефективній дозі. Для цього тваринам після визначення вихідного ЛП у тесті "Гаряча пластина" вводили конкурентний блокатор опіодних рецепторів налоксон (Налоксон-ЗН, ТОВ "Здоров'я народу", Україна) внутрішньочеревинно (в/о) в дозі 5 мг/кг [6] за 30 хв до досліджуваної сполуки, а через 60 хв після її введення повторно вимірювали ЛП. Як препарат порівняння в цих дослідах використовували метамізол натрію, для якого доведено наявність опіодергічної ланки механізму дії. Цей анальгетик здійснює знеболювальну дію за участі кількох механізмів, з-поміж яких найкраще досліджено інгібування ЦОГ, уповільнення активації L-аргініну/NO/cGMP/K⁺-каналу на периферії та в спинному мозку, активація низхідної гальмівної системи контролю болю, взаємодія з глутаматергічною системою та вивільнення ендogenous опіодних пептидів [7]. Метамізол натрію (Анальгін, "Лекхім", Харків) вводили внутрішньочеревинно (в/о) в дозі 500 мг/кг у вигляді водного розчину в об'ємі 0,1 мл на 10 г маси. Частині мишей за 30 хв. до метамізолу вводили налоксон як описано вище. Контрольним тваринам у цьому експерименті в/о вводили розчинник (ізотонічний розчин NaCl в еквівалентному об'ємі). Додатково визначали кількість мишей з певними проявами реакцій

під час латентного періоду облизування лапи (стрибки, клімбінг, тощо).

Поведінкові реакції (локомоторну активність, орієнтовно-дослідницьку діяльність та емоційну сферу) досліджували в тесті "відкрите поле" [8]. Сполуку IFT_247 вводили мишам в/ш в дозі 25 мг/кг, як описано вище, одноразово (контрольним тваринам воду в аналогічному об'ємі). Через 1 год. тварин розміщували в центрі освітленого пристрою, що являє собою обмежений бортами майданчик із 16 квадратами 5×5 см, у середині яких наявні отвори діаметром 1,5 см. Протягом 3 хв оцінювали локомоторну активність за кількістю перетнутих квадратів, орієнтовно-дослідницьку діяльність за кількістю вертикальних стійок та обстежених отворів, а емоційний стан та його вегетативний супровід - за кількістю фекальних болюсів, уринацій та активів грумінгу. Додатково розраховували суми показників орієнтовно-дослідницької активності, вегетативного супроводу емоційних реакцій та суму всіх видів активності.

Гостру токсичність сполуки IFT_247 визначали *in vivo* за одноразового в/ш введення за методом В.Б. Прозоровського. Для цього використано дози 2000, 2500, 3980 і 5010 мг/кг, кожному з яких вводили мишам у шлунок.

Результати обробляли за допомоги програми STATISTICA 10.0. Статистичну значущість змін ЛП ноцицептивної реакції всередині групи в динаміці всередині групи визначали за парним критерієм Вілкоксона, міжгрупові відмінності - за t-критерієм Стьюдента за нормального розподілу та за критерієм Мана-Вітні за його відсутності, а у випадку обліку реакцій в альтернативній формі (наявність або відсутність певної ознаки) - за кутовим перетворенням Фішера. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати й обговорення

Анагетична дія сполуки IFT_247 залежить від дози (Табл. 1). Найменша з випробуваних доз 5 мг/кг спричинила слабкий знеболювальний ефект на рівні тенденції (приріст ЛП облизування задньої лапи склав у середньому

Таблиця 1

Дозозалежність знеболювальної дії 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону в тесті "Гаряча пластина" в мишей ($M \pm m$, $Me[Q25; Q75]$, $n=6-7$)

Група, кількість тварин	Доза, мг/кг	Латентний час реакції, с		Динаміка, %
		вихідний	через 60 хв	
Контроль	-	13,3±0,99	12,9±0,79	-1,6±7,3
		13,0 [11,9; 14,7]	12,5 [12,1; 14,3]	+0,95 [-8,7; 6,7]
Сполука IFT_247	5	14,4±1,44	18,2±2,27	+34,9±24,3
		14,5 [11,1; 17,1]	18,1 [12,9; 20,3]	+12,1 [-1,8; 79,6]
	15	13,0±2,23	23,4±5,32 [^]	+68,1±14,5**
		11,8 [8,7; 13,5]	21,0 [12,2; 26,9]	+63,2 [37,0; 105,1]
	25	11,3±1,11	27,9±3,26 [^]	+149,6±18,1***
		11,55 [9,7; 18,1]	29,5 [20,2; 31,2]	+160,8 [144,4; 165,5]
	35	12,9±1,60	29,1±2,07 [^]	+135,9±20,8***
		12,1 [9,4; 15,9]	28,0 [25,2; 31,4]	+160,6 [77,4; 168,1]

Статистично значущі відмінності: [^] - з вихідним показником відповідної групи ($p < 0,05$) у динаміці; міжгрупові відмінності: ** - з контролем ($p < 0,01$); *** - з контролем ($p < 0,001$) на 60-й хвилині

34,9%). Збільшення дози до 15 мг/кг спричинило більший ефект (приріст ЛП дорівнював 68,1%, $p < 0,01$). Ефект дози 25 мг був найбільшим (приріст 149,6%, $p < 0,001$), а підвищення дози до 35 мг/кг не посилювало його (приріст 135,9%, $p < 0,001$). Отже, максимальною ефективною можна вважати дозу 25 мг/кг, і для наступних експериментів взято саме її.

Блокатор опіоїдних рецепторів налоксон не вплинув на знеболювальний ефект сполуки IFT_247 (Табл. 2). Ця сполука *per se* збільшила ЛП облизування задньої лапи в середньому на 54% (менший приріст порівняно з таким при визначенні дозозалежності, очевидно, пов'язаний з хронофармакологічним чинником, позаяк ці експерименти виконано в різні дні). На тлі дії налоксону ЛП ноци-

цептивної реакції зріс на 72,8%, відмінності з показником групи досліджуваної сполуки *per se* відрізняються на рівні тенденції. Отже, опіоїдний механізм, очевидно, не бере участі в анальгетичній дії зазначеної сполуки.

Для порівняння аналогічний експеримент виконано з класичним анальгетиком-антипиретиком метамізолом натрію (Табл. 2). Середній приріст ЛП ноцицептивної реакції за його використання *per se* становив 306,3%, а за попередньої блокади опіоїдних рецепторів налоксонем - 204,4%, тобто зменшувався в середньому на третину, а медіана фінального латентного часу зменшилася в 2 рази при майже однаковому вихідному значенні.

Це свідчить, що у знеболювальному ефекті метамізолу певна роль належить опіо-

Таблиця 2

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

Група, кількість тварин	Латентний час облизування задньої лапи, с			Кількість мишей з іншими поведінковими патернами, абс. і %	
	вихідний	через 60 хв	динаміка, %	клімбінг	стрибки
Контроль, $n=7$	15,1±1,72	11,6±2,12	-1,6±22,5	5/7	0/7
	15,5 [12,5; 18,6]	11,1 [6,9; 12,8]	-14,1 [-37,0; 11,8]	(71,4%)	(0%)
Метамізол натрію, $n=6$	12,4±2,39	41,3±6,68 [^]	+306,3±107,5**	3/6	1/6
	9,9 [8,7; 14,4]	40,2 [26,8; 60,0]	+235,9 [73,5; 589,7]	(50%)	(16,7%)
Налоксон + метамізол натрію, $n=5$	12,2±0,70	34,9±9,79 [^]	+204,4±99,5*	5/5	2/5
	11,9 [11,6; 13,6]	22,0 [17,5; 57,5]	+58,3 [45,4; 395,7]	(100%) [#]	(40%)**
IFT_247, $n=7$	17,6±3,88	27,5±7,57 [^]	+54,0±17,9*	6/7	0/7
	13,6 [10,6; 21,9]	23,0 [14,1; 27,2]	+43,0 [24,3; 82,7]	(85,7%)	(0%)
Налоксон + IFT_247, $n=7$	11,5±1,35	19,3±2,20 [^]	+72,8±13,0**	6/7	0/7
	11,1 [8,0; 14,2]	17,9 [12,9; 25,5]	+62,7 [56,3; 105,0]	(85,7%)	(0%)

[^] - статистично значущі відмінності з вихідним показником відповідної групи ($p < 0,05$), * - з контролем ($p < 0,05$), ** - з контролем ($p < 0,01$), # - з показником на тлі метамізолу натрію ($p < 0,05$)

їдергічним механізмом. Їх вивчено досить глибоко. З'ясовано, зокрема, що метамізол діє шляхом невибіркового пригнічення синтезу простагландинів завдяки інгібуванню насамперед ЦОГ-1 і ЦОГ-3, активує нейрони периакведуктального ядра, гальмуючі передачу больових імпульсів у спинному мозку, та безпосередньо пригнічує спинальні чутливі нейрони, перешкоджає участі глутамату в центральній ноцицепції, а на периферії стимулює NO-синтазу (підвищений рівень NO збільшує вміст циклічного GMP, що десенсибілізує ноцицептори). Показана також роль активації ендогенної канабіноїдної системи в механізмі дії цього анальгетика [9]. Доведено, що в ЦНС метамізол стимулює вивільнення ендогенних опіоїдів без безпосередньої активації опіоїдних рецепторів (μ , κ , δ), а налоксон при системному введенні або мікроін'єкції у відповідні структури головного мозку зменшує знеболювальний ефект метамізолу [10-12] і частково запобігає гострим антиноцицептивним ефектам комбінації морфіну з метамізолом. Опіодергічні механізми беруть участь у розвитку толерантності до метамізолу після його повторного введення [13]. При цьому метамізол не посилює викликаний морфіном закреп, що свідчить про часткову участь опіоїдної системи у спостережуваному синергізмі з опіоїдним анальгетиком [14]. Отже, наші результати щодо послаблення знеболювального ефекту метамізолу налоксоном відповідають даним інших авторів.

Тонкий нейрохімічний механізм анальгетичного ефекту сполуки IFT_247 потребує поглибленого з'ясування. Проте на підставі відсутності зменшення цього ефекту під впливом налоксону можна припустити, що механізм дії досліджуваної сполуки дещо відрізняється від механізму класичного анальгетика-антипіретика метамізолу натрію. На різницю впливу досліджуваної сполуки та метамізолу натрію на ноцицептивну реакцію вказують і відмінності поведінкових патернів під час тестування на гарячій пластині (Табл. 2). У групі метамізолу кількість тварин, у яких спостерігали вертикальні стійки коло

бар'єру по периметру пластини (клімбінг), під впливом налоксону збільшилась удвічі (з 50% до 100%, $p < 0,05$) і достовірно перевищила контрольний показник (100% проти 71,4%, $p < 0,05$). На тлі метамізолу тенденційно, а за його комбінації з налоксоном статистично значуще (40% проти 0% у контролі, $p < 0,05$) збільшилася частка мишей, що підстрибували під час перебування на гарячій пластині. Під впливом сполуки IFT_247 та її комбінації з налоксоном поведінка мишей не відрізнялася від такої у контрольних тварин: клімбінг мав місце відповідно у 86,7% випадків проти 71,4%, стрибки не спостерігалися.

При цьому не виявлено суттєвого впливу сполуки IFT_247 на поведінку мишей у тесті відкритого поля (Табл. 3). Єдиною значущою відмінністю було збільшення кількості болосів ($p < 0,05$), проте решта показників емоційних реакцій та їх вегетативного супроводу (грумінг, уринації) не відрізнялися від контрольних значень. Таким чином, досліджувана сполука не спричиняє ані стимулюючого, ані пригнічуючого впливу на ЦНС.

При визначенні гострої токсичності сполуки IFT_247 доза 2000 мг/кг не викликала летального ефекту в жодній миші. Дози 2500 і 3980 мг/кг спричинили загибель 1 тварини, а доза 5010 мг/кг виявилася летальною для всіх мишей. На підставі цих результатів розраховано LD_{50} , що дорівнює 2840 ± 340 мг/кг. Отже, за результатами сполука IFT_247 належить до малотоксичних речовин (500 мг/кг $< LD_{50} < 5000$ мг/кг, IV клас токсичності за класифікацією Hoge та Sterner) [8].

Результати свідчать про перспективність подальшого дослідження 1-(5-ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанону, зокрема нейрохімічних механізмів знеболювальної дії.

Висновки

1. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-b][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон чинить дозозалежний знеболювальний ефект. На моделі соматичного болю (тест "Гаряча пластинка") за введення у шлунок у діапазоні

Таблиця 3

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

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

* - статистично значущі відмінності з контролем ($p < 0,05$)

доз 5-35 мг/кг максимально ефективною є доза 25 мг/кг.

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

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

4. 1-(5-Ацетил-3-метил-6-феніл-5H-[1,2,4]тріазоло[3,4-*b*][1,3,4]тіадіазин-7-іл)-етанон за введення у шлунок мишам належить до IV класу токсичності - малотоксичні речовини (LD_{50} не перевищує 5000 мг/кг).

1-(5-ACETYL-3-METHYL-6-PHENYL-5H-[1,2,4]TRIAZOLO [3,4-*b*][1,3,4]THIADIAZIN-7-YL)-ETHANONE: DOSE-DEPENDENCE OF ANALGESIC EFFECT, LACK OF OPIOIDERGIC MECHANISM OF ACTION, EFFECT ON BEHAVIORAL REACTIONS AND ACUTE TOXICITY

Introduction

The significant spread of diseases and pathological conditions accompanied by pain syndrome requires replenishment and improvement of the arsenal of painkillers. Derivatives of 5,7-diacyl-3-*H*(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine, one of the most active representatives of which turned out to be 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-yl)-ethanone [1-3]. The question arises regarding the in-depth study of this compound, including the evaluation of the

dependence of the effect on the dose, the clarification of the mechanism of action, accompanying neurotropic effects, and acute toxicity.

The study aims to evaluate the dose dependence of the analgesic effect of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazine-7-yl)-ethanone, the participation of the opioidergic component in the mechanism of action of this compound, its influence on behavioral responses in the open field test, and to determine the acute toxicity of this compound.

Materials and Methods

1-(5-Acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl) was chosen as the object of the study -ethanone, laboratory code IFT_247 (Fig. 1). The compound was synthesized in the Department of Synthesis of Physiologically Active Substances of the State University "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine" under the supervision of DSc, prof. Demchenko A.M.

The study used 80 white outbred male mice weighing about 30 g. The animals were kept under standard conditions in the vivarium of the Educational and Scientific Institute of Applied Pharmacy of the National Pharmaceutical University. Mice had free access to food and water under controlled conditions (constant air temperature at +21-22°C and 65% humidity).

Experiments were performed in accordance with the European Union Directive 2010/10/63 EU (2010) on animal experiments. During all manipulations with animals, bioethical principles were observed, guided by the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes (1986), as well as Council of Europe Directive 2010/63/EU (2010). The basic model of somatic pain research was used - the "Hot plate" test [4]. The specified model is based on irritation of nociceptors of the skin of the paws with a moderately hot plate (Hot/Cold Plate device (Bioseb, USA) at a surface temperature of +54°C. The latent period (LP) of a typical behavioral response to nociceptive stimulation was recorded - licking of the hind paw, which is the most a specific marker of pain sensations [4, 5]. The stay of mice

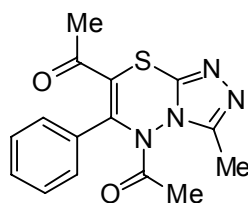


Fig. 1

Chemical structure of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)- of ethanone (compound IFT_247)

on the hot plate was limited to 60 s in order to avoid burns. If there was no reaction during this time, it was considered that the LP was equal to 60 s. Also, the number of animals with other standard behavior for this test was taken into account patterns (climbing, jumping).

In the first series of experiments, the dose dependence of the analgesic effect was determined. After determining the initial LP, the compound IFT_247 was injected intragastrically (intravenously) into mice in doses of 5; 15; 25 and 35 mg/kg in the form of an aqueous suspension stabilized by Tween-80 in a volume of 0.1 ml per 10 g of weight. After 60 minutes, determination of LP was repeated. An equivalent amount of water was administered intravenously to control animals.

In the second series of experiments, the possible participation of the opioidergic mechanism in the analgesic effect of the IFT_247 compound at the maximum effective dose was determined. To do this, after determining the initial LP in the "Hot plate" test, the competitive opioid receptor blocker naloxone (Naloxon-ZN, LLC "Zdorovya narodu", Ukraine) was injected intraperitoneally (in/o) at a dose of 5 mg/kg [6] according to 30 min before the test compound, and 60 min after its introduction, LP was measured again. Metamizole sodium was used as a comparison drug in these experiments, for which the presence of an opioidergic link in the mechanism of action was proven. This analgesic exerts an analgesic effect with the participation of several mechanisms, among which the best-studied inhibition of COX, slowing of the activation of the L-arginine/NO/cGMP/K⁺ channel in the periphery and in the spinal cord, activation of the descending inhibitory system of pain control, interaction with the glutamatergic system and the release of endogenous opioid peptides [7]. Metamizole sodium (Analgin, "Lekhim", Kharkiv) was administered intraperitoneally (in/o) at a dose of 500 mg/kg in the form of an aqueous solution in a volume of 0.1 ml per 10 g of weight. Part of the mice in 30 min. naloxone was administered to metamizole as described above. The control animals in this experiment were injected

intraperitoneally with a solvent (isotonic NaCl solution in an equivalent volume). In addition, the number of mice with certain manifestations of reactions during the latent period of paw licking (jumping, climbing, etc.) was determined.

The acute toxicity of the compound IFT_247 was determined in vivo with a single intravenous injection according to the method of V.B. Prozorovsky. For this, doses of 2000, 2500, 3980 and 5010 mg/kg were used, each of which was injected into the stomach of mice.

The results were processed using the STATISTICA 10.0 program. The statistical significance of changes in the LP nociceptive response within the group in the dynamics within the group was determined by the paired Wilcoxon test, between-group differences - by the Student's t-test for normal distribution and by the Mann-Whitney test in its absence, and in the case of recording reactions in an alternative form (presence or absence of a certain feature) - according to Fisher's angular transformation. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Table 1 demonstrates that the analgesic effect of the compound IFT_247 depends on the dose. The lowest tested dose, 5 mg/kg, produced a weak analgesic effect at the trend level (increase in hindpaw licking LP was 34.9% on average). Increasing the dose to 15 mg/kg caused a greater effect (increase in LP was equal to 68.1%, $p < 0.01$). The 25 mg dose effect was the largest

(149.6% increase, $p < 0.001$), and increasing the dose to 35 mg/kg did not increase it (135.9% increase, $p < 0.001$). Therefore, the maximum effective dose can be considered 25 mg/kg, and it was taken for the following experiments.

Analysis of Table 2 data demonstrates that the opioid receptor blocker naloxone did not affect the analgesic effect of the compound IFT_247. This compound per se increased hindpaw licking LP by an average of 54% (the smaller increase compared to that in the dose-dependent assay is apparently due to a chronopharmacological factor, as these experiments were performed on different days). Against the background of the action of naloxone, the LP of the nociceptive reaction increased by 72.8%, the differences with the indicator of the group of the studied compound per se differ at the level of the trend. Therefore, the opioidergic mechanism is obviously not involved in the analgesic effect of the specified compound.

For comparison, a similar experiment was performed with the classic analgesic-antipyretic sodium metamizole (Table 2). The average increase in the LP of the nociceptive reaction with its use *per se* was 306.3%, and with the previous blockade of opioid receptors with naloxone - 204.4%, that is, it decreased on average by a third, and the median of the final latent time decreased by 2 times with almost the same initial value.

This indicates that opioidergic mechanisms play a role in the analgesic effect of metamizole. They have been studied quite deeply. It was found out, in particular, that metamizole acts by

Table 1

Dose dependence of the analgesic effect of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone in the "Hot plate" test in mice (($M \pm m$, $Me[Q25; Q75]$, $n=6-7$)

Group, number of animals	Dose, mg/kg	Latent reaction time, p		Dynamics, %
		opening	after 60 min	
Контроль	-	13.3±0.99	12.9±0.79	-1.6±7.3
		13.0 [11.9; 14.7]	12.5 [12.1; 14.3]	+0.95 [-8.7; 6.7]
Compound IFT_247	5	14.4±1.44	18.2±2.27	+34.9±24.3
		14.5 [11.1; 17.1]	18.1 [12.9; 20.3]	+12.1 [-1.8; 79.6]
	15	13.0±2.23	23.4±5.32 [^]	+68.1±14.5**
		11.8 [8.7; 13.5]	21.0 [12.2; 26.9]	+63.2 [37.0; 105.1]
	25	11.3±1.11	27.9±3.26 [^]	+149.6±18.1***
11.55 [9.7; 18.1]		29.5 [20.2; 31.2]	+160.8 [144.4; 165.5]	
35	12.9±1.60	29.1± 2.07 [^]	+135.9±20.8***	
	12.1 [9.4; 15.9]	28.0 [25.2; 31.4]	+160.6 [77.4; 168.1]	

Statistically significant differences: [^] - with the original indicator of the corresponding group ($p < 0.05$) in dynamics; intergroup differences: ** - with control ($p < 0.01$); *** - with control ($p < 0.001$) at the 60th minute

indiscriminately inhibiting the synthesis of prostaglandins due to the inhibition of COX-1 and COX-3, activates the neurons of the periaqueductal nucleus, which inhibit the transmission of pain impulses in the spinal cord, and directly inhibits spinal sensory neurons, prevents the participation of glutamate in the central nociception, and on the periphery it stimulates NO-synthase (an increased level of NO increases the content of cyclic GMP, which desensitizes nociceptors). The role of endogenous cannabinoid system activation in the mechanism of action of this analgesic is also shown [9]. It has been proven that in the central nervous system metamizole stimulates the release of endogenous opioids without direct activation of opioid receptors (μ , κ , δ), and naloxone when administered systemically or microinjected into the corresponding structures of the brain reduces the analgesic effect of metamizole [10-12] and partially prevents acute antinociceptive effects of the combination of morphine with metamizole. Opioidergic mechanisms are involved in the development of tolerance to metamizole after its repeated administration [13]. At the same time, metamizole does not increase the constipation caused by morphine, which indicates the partial participation of the opioid system in the observed synergism with the opioid analgesic [14]. Therefore, our results regarding the attenuation of the analgesic effect of metamizole by

naloxone correspond to the data of other authors. The subtle neurochemical mechanism of the analgesic effect of the compound IFT_247 requires in-depth clarification. However, based on the lack of reduction of this effect under the influence of naloxone, it can be assumed that the mechanism of action of the studied compound is somewhat different from the mechanism of the classic analgesic-antipyretic, metamizole sodium. Differences in the effects of the studied compound and metamizole sodium on the nociceptive reaction are also indicated by differences in behavioral patterns during testing on a hot plate (Table 2). In the metamizole group, the number of animals in which vertical stands around the barrier around the perimeter of the plate (climbing) were observed under the influence of naloxone doubled (from 50% to 100%, $p < 0.05$) and significantly exceeded the control indicator (100% vs. 71.4%, $p < 0.05$). Against the background of metamizole, the proportion of mice jumping while on the hot plate increased in a tendency, and when it was combined with naloxone, it was statistically significant (40% vs. 0% in the control, $p < 0.05$). Under the influence of the compound IFT_247 and its combination with naloxone, the behavior of mice did not differ from that of control animals: climbing took place in 86.7% of cases versus 71.4%, jumping was not observed.

At the same time, no significant influence of the compound IFT_247 on the behavior of

Table 2

Effect of naloxone on the analgesic effect of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone (25 mg/kg) and sodium metamizole (500 mg/kg) in the "Hot plate" test in mice (M±m, Me[Q25; Q75], %)

Group, number of animals	Latent time of licking the hind paw, s			Number of mice with other behavioral patterns, abs. and %	
	opening	after 60 min	Dynamics, %	climbing	jumps
Control n=7	15.1±1.72 15.5[12.5; 18.6]	11.6±2.12 11.1[6.9; 12.8]	-1.6±22.5 -14.1 [-37.0; 11.8]	5/7 (71.4%)	0/7 (0%)
Metamizole sodium, n=6	12.4±2.39 9.9[8.7; 14.4]	41.3±6.68 [^] 40.2[26.8; 60.0]	+306.3±107.5** +235.9 [73.5; 589.7]	3/6 (50%)	1/6 (16.7%)
Naloxone + sodium metamizole, n=5	12.2±0.70 11.9[11.6; 13.6]	34.9±9.79 [^] 22.0[17.5; 57.5]	+204.4±99.5* +58.3 [45.4; 395.7]	5/5 (100%) [#]	2/5 (40%)**
IFT_247, n=7	17.6±3.88 13.6[10.6; 21.9]	27.5±7.57 [^] 23.0[14.1; 27.2]	+54.0±17.9* +43.0 [24.3; 82.7]	6/7 (85.7%)	0/7 (0%)
Naloxone + IFT_247, n=7	11.5±1.35 11.1[8.0; 14.2]	19.3±2.20 [^] 17.9[12.9; 25.5]	+72.8±13.0** +62.7 [56.3; 105.0]	6/7 (85.7%)	0/7 (0%)

[^] - statistically significant differences with the initial indicator of the corresponding group ($p < 0.05$),
* - with the control ($p < 0.05$), ** - with the control ($p < 0.01$), # - with the indicator against the background of metamizole sodium ($p < 0.05$)

Table 3

The effect of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone (25 mg/kg) on the behavioral reactions of mice in the "Open field" test ($M \pm m$, $Me[Q25; Q75]$)

Subtests		Control (n=6)	Compound IFT_247, 25 mg/kg (n=8)
Locomotor activity (crossed squares)		51.3±5.30 54.5 [44; 56]	44.3±5.06 45 [35.5; 54]
Tentative research activity	Stands	1.67±0.61 1.5 [1; 3]	2.63±1.28 1.5 [0.5; 3]
	Examined holes	29.7±2.59 31 [22; 34]	29.5±2.05 29.5 [26.5; 32]
	Sum	31.3±2.78 32.5 [26; 36]	32.1±2.95 30.5 [27.5; 38.5]
Emotional reactions and their vegetative support	Boluses	0.50±0.34 0 [0; 1]	1.75±0.31* 1.50 [1; 2.5]
	Urination	0 0 [0; 0]	0.13±0.12 0 [0; 0]
	Grooming	1.33±0.71 0.50 [0; 3]	0.25±0.16 0 [0; 0.5]
	Sum	1.83±1.01 0.50 [0; 5]	2.13±0.29 2 [1.5; 3]
The sum of all activities		84.3±6.22 85.5 [84; 92]	78.5±5.06 81.5 [73; 89.5]

* - statistically significant differences with the control ($p < 0.05$)

mice in the open field test was found (Table 3). The only significant difference was an increase in the number of boluses ($p < 0.05$), however, the remaining indicators of emotional reactions and their vegetative accompaniment (grooming, urination) did not differ from the control values. Thus, the studied compound does not cause either a stimulating or depressing effect on the CNS.

While determining the acute toxicity of the compound IFT_247, a dose of 2000 mg/kg did not cause a lethal effect in any mouse. Doses of 2500 and 3980 mg/kg caused the death of 1 animal, and a dose of 5010 mg/kg was lethal in all mice. Based on these results, the LD_{50} was calculated, which is 2840 ± 340 mg/kg. Therefore, according to the results, the compound IFT_247 belongs to low-toxic substances ($500 \text{ mg/kg} < LD_{50} < 5000 \text{ mg/kg}$, toxicity class IV according to Hoge and Sterner classification) [8].

The results indicate the prospects for further research of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone, in particular neurochemical mechanisms of analgesic action.

Conclusions

1. 1-(5-Acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]

triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone makes dose-dependent analgesic effect. In the model of somatic pain (the "Hot plate" test), the dose of 25 mg/kg is the most effective when administered into the stomach in the dose range of 5-35 mg/kg.

2. In the mechanism of analgesic action of 1-(5-acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone is not involved in the opioidergic effect, which is proven by the absence of changes in the analgesic effect against the background of the action of naloxone (unlike sodium metamizole, the analgesic effect of which is reduced by naloxone).

3. 1-(5-Acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone not causes changes in the behavior of mice in the open field test.

4. 1-(5-Acetyl-3-methyl-6-phenyl-5H-[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazin-7-yl)-ethanone by administration to the stomach of mice belongs to the IV class of toxicity - low-toxic substances (LD_{50} does not exceed 5000 mg/kg).

References

1. Yadlovskiy O.Y., Koval' A.Ya., Serebinska N.M., Bukhtiarova T.A., Bershova T.A., Demchenko D.A.,

- Bobkova L.S., Demchenko A.M. Analgesic and anti-inflammatory activity of 5,7-diacetyl-3-h(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazin derivatives. *Medical and Clinical Chemistry*. 2015; 17(2): 33-38. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866>. Ukrainian (Ядловський О.Є., Коваль А.Я., Серединська Н.М., Бухтіарова Т.А., Бершова Т.А., Демченко Д.А., Бобкова Л.С., Демченко А.М. Анальгезивна та протизапальна дії похідних 5,7-діацетил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазину. *Медична та клінічна хімія*. 2015; 17(2): 33-38. doi:10.11603/mcch.2410-681X.2015.v17.i2.4866).
2. Yadlovskiy O.Y., Koval' A.Ya., Bukhtiarova T.A., Khomenko V.S., Omelianenko Z.P., Bobkova L.S., Demchenko D.A., Demchenko A.M. Search of new Analgesic and anti-inflammatory substances among 5,7-diacetyl-3-h(alkyl)-6-aryl-5H-[1,2,4]triazol[3,4-b][1,3,4]thiadiazin derivatives. *Acta Medical Leopoliensia*. 2015; 21(4): 59-63. Ukrainian (Ядловський О.Є., Коваль А.Я., Бухтіарова Т.А., Хоменко В.С., Омеляненко З.П., Бобкова Л.С., Демченко Д.А., Демченко А.М. Пошук нових знеболювальних та протизапальних засобів серед похідних 5,7-діацетил-3-Н(алкіл)-6-арил-5Н-[1,2,4]тріазоло[3,4-б][1,3,4]тіадіазину. *Acta Medica Leopoliensia*. 2015; 21(4): 59-63).
 3. Koval A., Lozynskiy A., Shtrygol' S., Lesyk R. An overview on 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anesthetic and anti-inflammatory agents. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022; 36(2): 10-17. doi:10.15587/2519-4852.2022.255276.
 4. Yadlovskiy O.E., Suvorova Z.S., Naumenko M.V. Particular features of the use of "Hot plate" test in pharmacological researches. *Pharmacology and Drug Toxicology*. 2020; 14(3): 177-184. doi:10.33250/14.03.177. Ukrainian (Ядловський О.Є., Суворова З.С., Науменко М.В. Особливості застосування методу "Гаряча пластина" у фармакологічних дослідженнях. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2020; 14(3): 177-184. doi:10.33250/14.03.177).
 5. Huang J. Sweating guarded hot plate test method. *Polymer Testing*. 2006; 25(5): 709-716. doi:10.1016/j.polymertesting.2006.03.002.
 6. Podolsky I.M., Shtrygol' S.Yu. The role of opioidergic mechanisms in analgesic action of atristamine. *Pharmacology and Drug Toxicology*. 2017; 11(6): 23-30. Ukrainian (Подольський І.М., Штриголь С.Ю. Роль опіоїдергічної ланки антиноцицептивної системи в механізмі анальгетичної дії атристаміну. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017; 11(6): 23-30).
 7. Nikolova I., Petkova V., Tencheva J., Niko Benbasat M., Voinikov J., Danchev N. Metamizole: A Review Profile of a Well-Known "Forgotten" Drug. Part II: Clinical Profile. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2013; 27(2): 3605-3619. doi:10.5504/bbeq.2012.0135
 8. Preclinical trials (practical guidelines) / Ed. by Corresponding Member of the Academy of Medical Sciences of Ukraine Stefanov O.V. Kyiv: Avicena. 2001: 528. Ukrainian (Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. К.: Авіцена. 2001: 528).
 9. Escobar W., Ramirez K., Avila C., Limongi R., Vanegas H., Vazquez E. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *European J of Pain*. 2012; 16(5): 676-689. doi: 10.1002/j.1532-2149.2011.00057.x
 10. Tortorici V., Vanegas H. Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *European Journal of Neuroscience*. 2000; 12(11): 4074-4080. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2000.00295.x
 11. Vazquez E., Hernandez N., Escobar W., Vanegas H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Research*. 2005. 1048(1-2): 211-217. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.083.
 12. Jasięcka A., Maslanka T., Jaroszewski J.J. Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2014; 17(1): 207-214. doi:10.2478/pjvs-2014-0030
 13. Garcia Mayorga E.A., Rocha Aguirre L.L., Castro Lugo M.P., Hernandez Degadillo G.P., Lugo Garcia A.D. Evaluation of Analgesic Tolerance Induced by Metamizole in the Writhing Test Model. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*. 2023; 7(5): 3494-3520.
 14. Hernandez-Delgadillo G.P., Martinez R.V., Diaz Reval I., Dominguez Ramirez A.M., Lopez-Munoz F.J. Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 441(3): 177-183. doi:10.1016/s0014-2999(02)01344-4