DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2021-25(1)-05

УДК: 547.857.4:615.015.1:616.8-085.21-092.9

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ТА ЖАРОЗНИЖУВАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІМОРФНОЇ МОДИФІКАЦІЇ ПОХІДНОГО N-(ТРИФЛУОРОМЕТИЛФЕНІЛ)-4-ГІДРОКСИ-2,2-ДІОКСО-1Н-2Λ⁶, 1-БЕНЗОТІАЗИН-3-КАРБОКСАМІДУ У ЩУРІВ

Бондаренко П. С., Волощук Н. І.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 210118)

Відповідальний за листування:
e-mail: voloshchuk@vnmdu.edu.ua

Статтю отримано 28 грудня 2020 р.; прийнято до друку 01 лютого 2021 р.

Анотація. Поліморфізм біологічно активних субстанцій є надзвичайно важливим фактором, що модифікує лікувальні властивості фармацевтичних субстанцій і лікарських форм, суттєво впливає на параметри їх біологічної активності, а також фармакокінетику. Хімічним синтезом серед похідних 4-R-2,2-діоксо-1Н-2Λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбонових кислот одержано сполуку-лідера N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2Λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксамід, кристалічний поліморф якого у вигляді пластинок (сполука В) володіє виразною знеболюючою активністю. Метою роботи стало дослідити протизапальну активність сполуки В за впливом на різні складові запальної реакції, а також жарознижуючу дію цієї сполуки у щурів. Антиальтеративну дію визначали на моделі площинних ран шкіри, антипроліферативну дію - на моделі ватної гранульоми, антиексудативну дію - на моделі токсичного набряку легень у щурів. Антипіретичну дію вивчали на моделі молочної лихоманки у щурів. Дослідження проведено на 91 білому щурі-самці лінії Вістар. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми "STATISTICA 6.1" методами варіаційної статистики з використанням параметричних та непараметричних методів. Результати показали, що поліморфна сполука В володіє протизапальною активністю на всі компоненти запальної реакції - альтерацію, ексудацію та проліферацію. За ефективністю на моделі експериментального запалення ця речовина перевершує мелоксикам, оскільки її ЕД50 при пероральному введенні становить 5,2 мг/кг, тоді як у референс-препарату - 9,1 мг/кг. Сполука В виявляє виражену антипіретичну дію на моделі молочної лихоманки у щурів. Тому саме поліморфна модифікація похідного карбоксаміду у вигляді пластинок є перспективною для подальших досліджень з метою створення на її основі лікарського засобу з анагезуючими, протизапальними та жарознижуючими властивостями.

Ключові слова: N-(трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2Λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксамід, протизапальна, жарознижуюча дія, набряк легень, загоєння ран, антипроліферативна активність, щури.

Вступ

Явище поліморфізму серед біологічно активних субстанцій займає одне з провідних місць в процесі створення лікарських засобів та, власне, фармацевтичної розробки лікарської форми. Станом на сьогоднішній день явище поліморфізму виявлено для більше, ніж 85% фармацевтичних субстанцій і процес відповідних досліджень триває [1, 6, 9]. У теперішній час поліморфізм виявлений у більш, ніж 70% лікарських засобів (ЛЗ) практично всіх фармакологічних 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. 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. Поряд із пошуком і розробкою нових ЛЗ, стає актуальним завдання удосконалення нових відомих ЛЗ, зокрема, за рахунок застосування лікарських препаратів на основі визначеної поліморфної модифікації діючої речовини. Це дозволяє покращити властивості, забезпечити на більш високому рівні якість і безпеку ЛЗ.

В якості об'єктів дослідження взято сполуки - похідні

4-R-2,2-діоксо-1Н-2Λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбонових кислот, синтезовані на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету під керівництвом професора Українця Ігоря Васильовича [4]. Попередні результати довели наявність у похідних цього хімічного класу високу анагетичну активність та встановили сполуку-лідера, а саме N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2Λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксамід (рис. 1). У процесі хімічного синтезу шляхом кристалізації з органічних розчинників було одержано три зовні абсолютно різні типи безбарвних кристалів цієї сполуки різної форми у вигляді паличок, пластинок або блоків із різним ступенем виразності антиноціцептивної активності, які були умовно названі "сполука А", "сполука В" та "сполука С" відповідно. Детальні дослідження їх антиноціцептивної дії на п'яти моделях больової перцепції довели, що найбільш активною є сполука В [8]. Більш того, саме ця сполука виявилась більш безпечною в порівнянні з іншими кристалічними модифікаціями. Тому саме таку кристалічну модифікацію у формі пластинок було обрано для поглиблених досліджень в якості потенційного нестероїдного анагетичного лікарського засобу.

Мета роботи - дослідити протизапальну активність

Рис. 1. Хімічна формула N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду.

сполуки В за впливом на різні складові запальної реакції (альтерацію, ексудацію та проліферацію), а також жарознижувачу дію цієї сполуки у щурів.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 91 білому щурі-самці лінії Вістар в умовах науково-дослідної лабораторії доклінічного вивчення фармакологічних речовин кафедри фармакології ВНМУ. Тварини утримувались на стандартному раціоні віварію, доступом до води *ad libitum* та 12/12 режимом день/ніч. Усі дослідження виконані згідно вимог Гельсінської декларації щодо гуманного поводження з лабораторними тваринами [2]. Кристалічний поліморф (сполуку В) та препарат порівняння мелоксикам вводили внутрішньошлунково в середніх ефективних дозах за *антиексудативною* активністю, яка була розрахована на моделі карагенінового набряку і становила 5,2 мг/кг для сполуки В та 9,1 мг/кг для мелоксикаму. Досліджувані тварини масою 185-200 г були розподілені на групи по 7 щурів у кожній. Вивчення антиексудативних властивостей проводили на моделі гострого токсичного альвеолярного набряку легень у щурів, який моделювали внутрішньоочеревинним введенням 6% розчину NH₄Cl дозою 400 мг/кг [3, 5]. Протизапальну активність сполук оцінювали за виживанням тварин, масовим коефіцієнтом легень (МКЛ), антиексудативну активність (АЕА) визначали за формулою:

$$АЕА(\%) = 100 - \frac{100(MKЛ_d - MKЛ_i)}{MKЛ_k - MKЛ_i},$$

де МКЛ_д - масовий коефіцієнт легень у групі тварин, що одержували досліджувані сполуки; 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 [5]. Щурам під пропофоловим наркозом ("Fresenius Kabi", Австрія, 60 мг/кг в/оч) на попередньо депільованій поверхні шкірних покривів наносили рану розміром 1х1 см. Ранозагоювальну здатність визначали планіметрично за динамікою площі ран. Швидкість загоєння ран визначали за формулою:

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

де S_о - початкова площа рани, мм²;

S_т - площа рани у день вимірювання, мм².

Антипроліферативну активність досліджували на моделі "ватної" гранульоми у щурів [3]. Тваринам під пропофоловим наркозом ("Fresenius Kabi", Австрія, 60 мг/кг в/оч) моделювали хронічне проліферативне запалення шляхом імплантації стерильної ватної кульки масою 10 мг. На 8 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 сирові 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 [5]. Вимірювання ректальної температури тіла тварин електронним термометром проводили до введення пірогену та через 4, 5, 6 і 7 годин після його введення. 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:

$$ЖА = \frac{(\Delta T_{пк} - \Delta T_d)}{\Delta T_{пк}} \cdot 100,$$

ΔT_{пк} - приріст температури в групі позитивного контролю;

ΔT_д - приріст температури в групі досліджуваних тварин.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми "STATISTICA 6.1" методами варіаційної статистики з використанням параметричних та непараметричних методів. Достовірними вважали відмінності за p<0,05.

Результати. Обговорення

На першому етапі нами було вивчено антиексудативну дію сполуки В. Дані, представлені в таблиці 1 свідчать, що сполука В має виразні протизапальні властивості, які були продемонстровані на моделі токсичного набряку легень, викликаного амонію хлоридом. Так, згідно отриманих результатів, у групі тварин, яким вводили сполуку В, залишались живими протягом 3-х годин експерименту 4 із 7-ми тварин у групі, тоді як у 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 1. Вплив похідного N-(трифлуорометилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксаміду на перебіг токсичного набряку легень у щурів (М ± m, n = 7).

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

Примітки: * - p<0,05 щодо інтактних тварин; ** - p<0,05 щодо контрольної патології.

Таблиця 2. Антипроліферативна активність похідного N-(трифлуорометилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксаміду у порівнянні з мелоксикамом на моделі "ватної" гранульоми у щурів (М ± m, n = 7).

Експериментальні групи	Доза, мг/кг	Маса грануляційної тканини, мг	Активність, %
Контрольна патологія	-	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 щодо 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 у групі, масова 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).

На наступному етапі було проведено дослідження

антипроліферативних властивостей сполуки В на моделі "ватної" гранульоми у щурів. Згідно отриманих результатів (табл. 2), сполука В показала помірну антипроліферативну активність, що підтверджувалось достовірними показниками пригнічення утворення грануляційної тканини у порівнянні з нелікованими щурами. Її антипроліферативна дія була більш виразною, ніж у препарату порівняння на 15,1%, однак ця різниця не сягала статистично вірогідних значень.

У подальшому ми дослідили вплив сполуки В та мелоксикаму на альтеративний компонент запальної реакції. Антиальтеративну дію було оцінено на моделі площинних ран шкіри. Результати, які наведені в таблиці 3, свідчать, що сполуки, які досліджували, зменшують площу рани в усі 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.

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 [7]. Встановлено, що після введення пірогену в тварин контрольної

Таблиця 3. Вплив похідного N-(трифлуорометилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксаміду та мелоксикаму на загоювання шкірних дефектів щурів, М±m, n=7.

Умови досліджу	Площа ран (мм²) 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)
Мелоксикам	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: * - p<0,05 щодо контролю; # - p<0,05 щодо мелоксикаму.

Таблиця 4. Динаміка жарознижувальної активності похідного N-(трифлуорометилфеніл-4-гідрокси-2,2-діоксо-1Н-2λ⁶, 1-бензотіазин-3-карбоксаміду та мелоксикаму на моделі молочної лихоманки у щурів, n = 7, М±m.

Групи тварин	Терміни вимірювання (години)											
	Вихідні дані, Т°С	4 години		5 годин			6 годин			7 годин		
		Т°С	Δ t°С	Т°С	Δ t°С	%	Т°С	Δ t°С	%	Т°С	Δ t°С	%
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: * - p<0,05 щодо вихідного рівня; # - p<0,05 щодо контролю у відповідні терміни.

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. Аналогічний ефект мелоксикаму на таких самих термінах дослідження був 33,3%, 34,6% та 16,4% відповідно (табл. 4). 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.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлено, що поліморфна сполука N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду володіє протизапальною ак-

тивністю на всі компоненти запальної реакції - альте-рацію, ексудацію та проліферацію. За ефективністю на моделі експериментального запалення ця речовина перевершує хімічно близький аналог мелоксикам, оскільки її ЕД₅₀ при пероральному введенні становить 5,2 мг/кг, тоді як у референс-препарату - 9,1 мг/кг.

2. 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 (p<0,05).

Враховуючи вищезазначене саме поліморфна модифікація N-(4-трифлуорометилфеніл)-4-гідрокси-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду у вигляді пластинок є перспективною для подальших досліджень з метою створення на її основі лікарського засобу з анальгезуючими, протизапальними та жарознижувальними властивостями.

Список посилань - References

- [1] Gildeeva, G. N. (2017). Полиморфизм: влияние на качество лекарственных средств и актуальные методы анализа [Polymorphism: Impact on Drug Quality and Current Analysis Methods]. *Качественная клиническая практика - Good clinical practice*, 1, 56-60.
- [2] Kozhemyakin, Yu. M., Khromov, O. S., Filonenko, M. A., & Saifetdinova, G. A. (2002). Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them]. *Державний фармакологічний центр МОЗ України. Київ - State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine. Kiev.*
- [3] Mironov, A. N. (Ed.). (2012). *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. (Ч. первая) [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. (Part one)]*. Москва: Гриф и К - Moscow: Grif and K.
- [4] 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-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acids trifluoromethyl-substituted anilides. *J. Org. Pharm. Chem.*, 13, 1(49), 44-48. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.15.826>
- [5] Stefanov, O. V. (Ed.). (2001). *Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) [Preclinical studies of drugs (guidelines)]*. Київ: Авіцена - Kyiv: Avicenna.
- [6] Tian, B., Ding, Z., Zong, S., Yang, J., Wang, N., Wang, T., ... & Hao, H. (2020). Manipulation of Pharmaceutical Polymorphic Transformation Process Using Excipients. *Curr Pharm Des.*, 26(21), 2553-2563. doi: 10.2174/1381612826666200213122302
- [7] Trinus, F. P., Klebanov, B. M., & Mohort, N. A. (1974). *Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ (методические рекомендации) [Methods of screening and pharmacological study of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic substances (guidelines)]*. Киев - Kiev.
- [8] 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-Benzothiazine-3-Carboxamide. *Scientia Pharmaceutica*, 88(1), (45-60). <https://doi.org/10.3390/scipharm88010001>
- [9] Zhou, Y., Wang, J., Xiao, Y., Wang, T., & Huang X. (2018). The Effects of Polymorphism on Physicochemical Properties and Pharmacodynamics of Solid Drugs. *Curr Pharm Des.*, 24(21), 2375-2382. doi: 10.2174/1381612824666180515155425

INVESTIGATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC ACTIVITY OF POLYMORPHIC MODIFICATION OF N-(TRIFLUOROMETHYLPHENYL)-4-HYDROXY-2,2-DIOXO-1H-2λ⁶,1-BENZOTHAZINE-3-CARBOXAMIDE DERIVATIVE IN RATS Bondarenko P. S., Voloshchuk N. I.

Annotation. Polymorphism among biologically active substances is an extremely important factor that modifies the therapeutic properties of pharmaceutical substances and dosage forms, significantly affects the parameters of their biological activity and pharmacokinetics. Chemical synthesis among the derivatives of 4-R-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic acids gave the leader compound N-(4-trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, the crystalline polymorph of which in the form of plates has a pronounced analgesic activity. The aim of the study was to investigate the anti-inflammatory activity of compound B by its effect on various components of the inflammatory reaction, as well as the antipyretic effect of this compound in rats. The anti-alterative activity was determined on the model of planar skin wounds, the antiproliferative effect - on the model of cotton granuloma, the anti-exudative effect - on the model of toxic pulmonary edema in rats. The antipyretic effect was studied in a model of milk fever in rats. The study was performed on 91 white male Wistar rats. Statistical processing of the obtained results was performed using the program "STATISTICA 6.1" by methods of variation statistics using parametric and nonparametric methods. The results showed that the polymorphic compound B has anti-inflammatory activity on all components of the inflammatory reaction - alteration, exudation and proliferation. In terms of efficacy in the model of experimental inflammation, this substance is superior to meloxicam, as its ED₅₀ when administered orally is 5.2 mg/kg, while the reference drug - 9.1 mg/kg. Compound B exhibits a pronounced antipyretic

effect in a rat fever model. Therefore, the polymorphic modification of the carboxamide derivative in the form of plates is promising for further research in order to create on its basis a drug with analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties.

Keywords: *N-(trifluoromethylphenyl)-4-hydroxy-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide, anti-inflammatory, antipyretic activity, lung edema, wound healing, antiproliferative activity, rats.*