

АНОТАЦІЯ

Мальченко О. В. Пошук нових аналгетиків серед N-арил(гетарил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів та їх структурно близьких аналогів (експериментальне дослідження). - 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 пошуку перспективних речовин з аналгетичною активністю серед нових оригінальних похідних N-арил(гетарил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, виявленню сполуки-лідера, конкурентноспроможної з сучасними аналогами для створення на її основі нового лікарського засобу.

В роботі вперше проведено первинний фармакологічний скринінг серед великої групи N-арил(гетарил)-заміщених 4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамідів, їх близьких структурних аналогів і деяких полімофних модифікацій, виявлено найбільш активні сполуки, які доцільно вивчати в якості засобів із аналгетичною та протизапальною діями. Серед сполук, які досліджували, найбільш виразну фармакологічну активність на моделі карагенінового набряку кінцівки у щурів виявили: N-(4-метилбензил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід (сполука NI-7), N-(4-метоксибензил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід (сполука NI-9), N-(5-метилпіридин-2-іл)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід (сполука NI-87), N-(5-метилпіридин-2-іл)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід (сполука NI-82), N-(тіофен-2-ілметил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксамід (сполука NI-30). За ступенем виразності антиноціцепції та протизапальній активності ці речовини в скринінговій дозі 20 мг/кг нутрішньочеревно співставлялись або перевершували препарати порівняння лорноксикам та

диклофенак. Оцінка гострої токсичності найбільш активних сполук за їх внутрішньочеревного введення мишам та внутрішньошлункового введення щурам показала, що найбільш безпечною серед всіх фармацевтичних композицій виявилась N-(4-метоксибензил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду (сполука NI-9), яка і була обрана в якості сполуки-лідера: її ЛД₅₀ за зазначених умов експерименту становив, відповідно 682,0 та 822,6 мг/кг, що було меншим ніж у диклофенаку та мелоксикаму за аналогічних режимів введення. За результатами молекулярного докінгу досліджуваної сполуки в активний сайт мелоксикаму спрогнозовано високу ступінь афінитету та значну вірогідність реалізації аналгетичного та протизапального ефектів за рахунок інгібування ензиму ЦОГ-2.

Вперше було визначено середню ефективну дозу (ЕД₅₀) за аналгетичною активністю сполуки-лідера (NI-9) на моделі tail-flick у щурів, яка становила 2,98±0,15 мг/кг внутрішньолунково. При порівнянні ефективності цієї сполуки з неселективними інгібіторами ЦОГ-1 та ЦОГ-2 диклофенаком і лорноксикамамом, а також селективним інгібітором ЦОГ-2 мелоксикамом, було встановлено, що NI-9 була більш ефективною, оскільки її ЕД₅₀ перевершувала референтні препарати диклофенак, лорноксикам та мелоксикам в 2,78, 1,70 та 1,57 рази, відповідно.

Отримано нові дані щодо фармакологічної активності N-(4-метоксибензил)-4-метил-2,2-діоксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду на різних моделях больових синдромів, які продемонстрували її здатність усувати біль соматичного походження (зменшує кількість оцтово-кислих корчів на 38,1 % (p<0,05), що співставно із дією мелоксикаму, однак поступається диклофенаку. На моделі центрального вісцерального болю (термічне подразнення) NI-9 незначно перевершувала мелоксикам та практично не відрізнялась за силою аналгезії від диклофенаку на 2-й годині експерименту, проте за тривалістю ефекту значно перевершувала обидва препарати (в 3,47 та 1,54 рази, відповідно на 6-й годині експерименту,

$p < 0,05$). На моделі периферичного больового синдрому запального походження (ад'ювантний артрит у щурів) сполука NI-9 більш ефективно зменшувала ознаки гіперальгезії, ніж селективний інгібітор ЦОГ-2 мелоксикам (в 1,37 рази), та неселективний інгібітор ЦОГ-1 та ЦОГ-2 диклофенак (в 1,46 рази). На моделі нейропатичного больового синдрому (діабетична нейропатія, викликана стрептозотоцином) сполука NI-9 статистично значуще підвищувала больовий поріг на 31,3 % ($p < 0,05$), що було більшим за дію референс-препарату мелоксикаму (26,0 %). Таким чином, за силою аналгетичного ефекту сполука з лабораторним шифром NI-9 переважає мелоксикам на всіх моделях больових синдромів, та диклофенак на моделі експериментального запалення (ад'ювантного артриту). Подальше поглиблене вивчення її фармакодинаміки та токсичності стане теоретичним підґрунтям для розробки на основі цієї біологічно активної сполуки оригінального лікарського засобу із знеболюючою та протизапальною активностями.

Дослідження ульцерогенного потенціалу сполуки N-(4-метоксибензил)-4-метил-2,2-діксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти довело її високий ступінь безпечності щодо шлунково-кишкового тракту, за яким вона перевершує референс-препарат мелоксикам: показники множинності і важкості виразкування у сполуки NI-9 були вірогідно на 54,2%, та 30,8 % меншими, ніж у мелоксикаму ($p < 0,05$).

Доповнено наукові дані щодо молекулярних механізмів пошкоджуючого впливу похідних бензотіазин-3-карбонових кислот на ШКТ, які включали депримуєчий вплив на різні рівні захисту шлунка (зменшення продукції глікозаміногліканів (ГАГ), порушення фосфоліпідного шару, активація оксидативного стресу в слизовій шлунка (СОШ), зменшення продукції вазодилатуючих молекул (простагландинів, нітроген монооксиду та гідроген сульфід). Зменшення вмісту в СОШ ГАГ, зростання вмісту малонового діальдегіду (МДА) та карбонільних груп протеїнів (КГП) у тварин на тлі введення сполуки NI-9 були достовірно меншими, ніж на тлі дії

мелоксикаму. Порушення фосфоліпідного спектру СОШ не мали вірогідної різниці для обох сполук. Після введення сполуки NI-9 вміст нітратів і нітритів, рівень H_2S в СОШ вірогідно не змінювались, тоді як на тлі застосування мелоксикаму - достовірно знижувались. Поряд з цим, сполука NI-9 не впливала на чутливість мезентеріальних артерій до вазорелаксуючої дії H_2S : підвищення EC_{50} (H_2S) було недостовірним (8,10%, $p > 0,05$) В той же час, референс-препарат мелоксикам викликав суттєве зниження H_2S -індукованої вазодилатації: EC_{50} (H_2S) вірогідно зростала (на 21,2%, $p < 0,05$).

Вперше показано, що в механізмах антиноціцептивної дії сполуки NI-9 не залучена опіоїдергічна система, натомість доведена участь альфа-1 та альфа-2 адренорецепторів, оскільки блокатор альфа-1 адренорецепторів празозин статистично вірогідно зменшував антиноціцептивний ефект NI-9 на 2-й годині експерименту на 20,9% ($p < 0,05$). Стимулятор центральних альфа2-аденорецепторів клонідин посилював дію сполуки за рахунок власних ефектів, тоді як блокатор цих рецепторів йохімбін суттєво зменшував ефект похідного карбоксаміду на 1-й та 2-й годинах дослідження на 66,0 та 62,6 % ($p < 0,05$), дещо менше – на 28,7 % ($p < 0,05$) на 3-й годині, і практично не впливав на анагетичну дію на 4-й годині дослідження.

Згідно отриманих даних, до механізмів антиноціцептивної дії сполуки NI-9 не залучені бета-адренорецептори, оскільки агоніст (ізопротеренол) та блокатор (пропранолол) суттєво не змінювали її ефекту. Не було також отримано переконливих даних щодо участі ГАМК-ергічної системи в ефектах похідного карбоксаміду, оскільки на тлі дії флумазенілу ефект сполуки практично не змінювався, а комбінація з діазепамом викликала посилення анагезії на рівні сумації ефектів.

Виявлено, що знеболюючий ефект N-(4-Метоксибензил)-4-метил-2,2-діксо-1*H*-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду частково опосередковується через вплив на дофамінергічну та холінергічну систему, про що свідчить зменшення ступеня антиноціцепції за сумісного введення з блокатором дофамінових D_2 рецепторів хлорпромазином (в середньому в 1,25-1,79 рази)

та практичного нівелювання аналгетичного ефекту за сумісного введення зі специфічним антагоністом холінергічних рецепторів ніфедипіном (на пізніх термінах дослідження). Доказом участі NMDA-рецепторів в механізмах анальгезії є вірогідне зниження активності сполуки NI-9 на тлі введення мемантину в усі терміни дослідження на 23,9 - 52,6 %, ($p < 0,05$) у порівнянні з монотерапією сполукою, що досліджувалась.

Таким чином, наявність вираженого аналгетичного ефекту на тлі низької гастротоксичності дає підстави вважати сполуку NI-9 (N-(4-метоксибензил)-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти) перспективною речовиною для створення на їх основі нового ненаркотичного аналгетика та НПЗЗ, конкурентоспроможного з диклофенаком та мелоксикамом.

Ключові слова: похідні N-арил(гетарил)-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду, аналгетична, протизапальна дія, ульцерогенність, гостра токсичність, механізми дії, гідроген сульфід, нітроген монооксид, циклооксигеназа, миші, щури.

Список публікацій здобувача.

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Malchenko O. V. Investigation of 4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide derivative influence on the biochemical markers of gastric mucosa in rats / O. V. Malchenko, N. I. Voloshchuk, N. O. Pentuk // Biomedical and biosocial anthropology. - 2020. - № 41. – P. 36-40 DOI: <https://doi.org/10.31393/bba41-2020-06>. *(Здобувач здійснила опрацювання літературних джерел, моделювання та проведення експерименту, статистичну обробку отриманих даних, формування висновків та узагальнення; підготовка, оформлення статті виконано у співавторстві).*

2. Мальченко О. В. Експериментальне дослідження механізмів анальгезуючої дії похідного 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-

карбонової кислоти (сполука NI-9) у щурів / О. В. Мальченко, Н. І. Волощук, О. В. Грималовська // Вісник Вінницького Національного медичного університету імені М. І. Пирогова. - 2021. - №1 (25). - С. 12-17 DOI:10.31393/reports-vnmedical-2021-25(1)-02. *(Дисертант аналізувала літературні джерела, особисто здійснювала експериментальну частину, статистичну обробку отриманих даних, у співавторстві аналізувала отримані результати та формулювала висновки).*

3. Malchenko O. V. In-depth investigation of analgesic activity of N-(4-methoxybenzyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamide derivate on different models of pain perception / O. V. Malchenko // Biomedical and biosocial anthropology. - 2021. - № 42. – P. 57-63. DOI: 10.31393/bba42-2021-10.

4. Malchenko O. V. 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxylic Acid. Peculiarities of Preparation, Structure, and Biological Properties / I. V. Ukrainets, G. M. Hamza, A. A. Burian et al. // Sci. Pharm. – 2018. – Vol. 86, №1. - 9. – URL: <https://doi:10.3390/scipharm86010009> (Last accessed: 02.05.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертантом особисто виконано експериментальну частину щодо анальгетичної та протизапальної активності хімічних сполук; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

5. Malchenko O. V. Molecular Conformations and Biological Activity of N-Hetaryl(aryl)alkyl-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides / I. V. Ukrainets, G. M. Hamza et al. // Sci. Pharm. – 2018. – Vol. 86, №4. - 50.– URL: <https://doi:10.3390/scipharm86040050> (Last accessed: 03.05.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертант особисто провела всі експериментальні дослідження біологічної активності сполук, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

6. Malchenko O. V. The Crystal Structure of N-(1-Arylethyl)-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides as the Factor Determining

Biological Activity Thereof / I. V. Ukrainets, G. M. Hamza, A. A. Burian et al. // Sci. Pharm. – 2019. – Vol. 87, № 2. - 10. - URL: <https://doi:10.3390/scipharm87020010> (Last accessed: 12.05.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертантом особисто проведено дослідження фармакологічної активності бензотіазин-3-карбоксамідів, оброблено отримані дані; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

7. Malchenko O. V. Synthesis and Regularities of the Structure–Activity Relationship in a Series of N-Pyridyl-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2λ⁶,1-benzothiazine-3-carboxamides / I. V. Ukrainets, A. A. Burian, G. M. Hamza et al. // Sci. Pharm. – 2019. – Vol. 87, № 2. - 12. – URL: <https://doi.org/10.3390/scipharm87020012> (Last accessed: 02.06.2021). *(Видання включено до бази даних Scopus та Web of Science. Дисертантом особисто проведено виконання досліджень біологічної активності сполук, що досліджувались, обробка отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. Українець І. В. Скринінгові дослідження протизапальної та знеболюючої активності похідних N-r-4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / І. В. Українець, Н. І. Волощук, О. В. Мальченко // Тези доповідей V Національного з'їзду фармакологів України (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя). – Запоріжжя, 2017. – С. 19. *(Дисертант брала участь в експериментальних дослідженнях, аналізі та узагальненні отриманих даних, написання тез виконано у співавторстві).*

9. Особливості синтезу та просторової будови 4-метил-2,2-діоксо-1H-2λ⁶,1-бензотіазин-3-карбонової кислоти / І. В. Українець, Г. М. Хамза, Г. О. Бур'ян, О. В. Мальченко // 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. 121-122. *(Здобувачу*

належить аналіз даних літератури, дослідження біологічної активності сполук, статистична обробка отриманих результатів, оформлення та подача тез до друку).

10. Malchenko O. V. Peculiarities of structure and pharmacological properties of 4-Methyl-2,2-dioxo-1H-2^l,1-benzothiazine-3-carboxylic acid / O. V. Malchenko // Матеріали XV Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2018» (18-20 квітня 2018 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2018. - С. 436.

11. N-benzyl-4-methyl-2,2-dioxo-1H-2^l,1-benzo-thiazine-3 carboxamides as new analgesic and anti-inflammatory agents / I. V. Ukrainets, A. A. Burian, G. M. Hamza, N. I. Voloshchuk, O. V. Malchenko // 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. 147. *(Дисертант особисто виконала фармакологічні дослідження, їх статистичну обробку; написання тез виконано у співавторстві).*

12. Мальченко О. В. Експериментальне дослідження гострої токсичності та середньої ефективної дози N-піридил-4-метил-2,2-діоксо-1H-2^l,1-бензотіазин-3-карбоксаміду / О. В. Мальченко // Матеріали XVIII Наукової конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2021» (15-17 квітня 2021 р., м. Вінниця). – Вінниця, 2021. - С. 507.