



Вплив німесулідів та нового похідного 4-тіазолідинону на гематологічні параметри в умовах експериментального запального процесу

Т. М. Руминська^{1,2}
tanityshka.r@ukr.net



¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська 69, м. Львів, 79010, Україна

²Інститут біології тварин НААН, вул. Стуса 38, м. Львів, 79034, Україна

ORCID:

T. M. Rumynska <https://orcid.org/0000-0002-0669-5865>

Authors' Contributions:

RTM: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Writing — original draft, review & editing.

Declaration of Conflict of Interests:

None to declare.

Ethical approval:

A permission to conduct the research was obtained from the from the Committee on Ethics of scientific research, experimental developments and scientific works of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Protocol no. 10 from 20.12.2021, Lviv, Ukraine)

Acknowledgements:

The author is grateful to the Armed Forces of Ukraine for a possibility to continue a scientific research during the war.

The research was supported by the Ministry of Health of Ukraine (grant no. 0123U100153).

Метою роботи було виявити протизапальний ефект нового похідного з групи 4-тіазолідинонів — *Les6490*, для чого проведено порівняльне дослідження впливу двох засобів: сполуки *Les6490* і німесулідів, який належить до групи нестероїдних протизапальних препаратів з вираженою протизапальною, анальгезивною та жарознижувальною дією. Німесулідів зараховують до високоселективних інгібіторів циклооксигенази та її ізоферментів (ЦОГ-2) і використовують за різних патологій опорно-рухового апарату. Новосинтезована сполука *Les6490* належить до групи похідних 4-тіазолідинонів. Тіазолідинонове кільце входить до складу багатьох наявних потенційних антибактеріальних та протизапальних засобів, може комбінуватись з піразоловими фрагментами, які є фармакоформами тієї ж структури, і здатне сприяти підвищенню терапевтичної ефективності. У роботі досліджено особливості змін гематологічних показників у щурів за експериментального відтворення асоційованого запального процесу за використання моделі ад'ювант Фрейнда (ПАФ). У результаті дослідження протизапальної активності за гематологічними показниками препаратів — *Les6490* та німесулідів — виявлено їхню протизапальну активність, яку можна вважати співставною з незначною перевагою сполуки *Les6490*. При цьому, не виявляючи впливу на кількісний рівень еритроцитів за ізольованого введення, в умовах запального процесу німесулідів та *Les6490* спричиняли вірогідне збільшення загальної кількості еритроцитів порівняно групою з модельованим запаленням. Не виявлено жодного впливу на кількість гемоглобіну. За аналізу показників лейкоцитарної формули активність сполуки *Les6490* є схожою до німесулідів. Найбільш виражені зміни лейкоцитарної формули за АФ-індукованого запалення спостерігали з боку нейтрофілів: дія досліджуваної речовини *Les6490* була вираженішою порівняно з дією німесулідів. Введення сполуки *Les6490* частково спричиняло нормалізацію моноцитів, а за умов АФ-асоційованого запального процесу вірогідних змін не спостерігали.

Ключові слова: німесулідів, *Les6490*, 4-тіазолідинони, нестероїдні протизапальні препарати, еритроцити, гемоглобін, лейкоцити



Attribution 4.0 International
(CC BY 4.0)

Вступ

Дослідження впливу хімічних речовин на гематологічні показники є важливим аспектом первинного оцінювання біологічної активності препаратів і дає змогу визначити індукцію запальної реакції, алергенного впливу, цитотоксичності. Нашу увагу привернули похідні тіазолідинонів, які є перспективною групою речовин з огляду на їхню високу афінність до біологічних мішеней, залучених у процеси, пов'язані з ростом пухлинних клітин, життєвого циклу мікроорганізмів, розвитку запальних реакцій, а також вплив цих сполук на розвиток діабету II типу. Тіазолідинонове кільце входить до складу багатьох наявних потенційних антибактеріальних та протизапальних засобів, може комбінуватись з піразоловими фрагментами, які є фармакоформами тієї ж структури, і сприяти підвищенню терапевтичної ефективності. За результатами експериментальних досліджень на щурах, за дії препаратів групи тіазолідинонів виявлено цитоморфологічні зміни проапоптичного характеру [4], показано здатність вказаних похідних поглинати вільні радикали *in vitro*. Водночас похідні 4-тіазолідинону проявляють дегенеративні зміни через здатність блокувати множинне руйнування хряща в умовах остеоартритичного процесу [7]. Тож препарати, які входять до групи 4-тіазолідинонів, є політаргентними сполуками і перспективними для подальших досліджень з метою одержання ефективних лікувальних засобів [5]. Нестероїдний протизапальний препарат (НПЗП) порівняння німесулід є селективним інгібітором циклооксигенази 2-го типу, широко застосовується як протизапальний засіб та, подібно до препаратів-похідних 4-тіазолідинонів, виявляє помірний хондропротекторний вплив [2, 10]. Встановлено також його вплив на гематологічні параметри, тренд змін яких є дозозалежним [9, 11]. Окрім лікувальної дії, НПЗП можуть провокувати багато побічних ефектів, переважно з боку шлунково-кишкового тракту або серцево-судинної системи [1]. Тому існує необхідність розробляти нові препарати, які були б відносно безпечними.

Для виявлення потенційних протизапальних ефектів у нового похідного з групи 4-тіазолідинонів ми провели порівняльне дослідження впливу *Les6490* і нестероїдного протизапального засобу німесуліді на моделі ад'ювант Фрейнда-асоційованого запального процесу в щурів.

Матеріали і методи

Для первинного скринінгу біологічної активності сполуки *Les6490* (5-(Z)-((1,3-дифеніл-1H-піразол-4-іл)метил)-2,4-тіазолідинон), зокрема його протизапальної дії, досліджено гематологічні показники в умовах експериментального запального процесу, індукованого ад'ювантом Фрейнда (АФ). Індукцію запального процесу провели за стандартною методи-

кою [6] — введенням 0,1 мл повного АФ підшкірно у підшовну частину задньої кінцівки. Дослід проводили на статевозрілих нелінійних білих щурах обох статей з вихідною масою $220 \pm 5,1$ г, отриманих з віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Експеримент проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Директиви Ради Європи №2010/63/ЄС та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» зі змінами 440-IX від 14.01.2020, згідно з протоколом №10 від 20.12.2021 р. засідання комісії з питань етики наукових досліджень, експериментальних розробок і наукових творів ЛНМУ імені Данила Галицького.

У дослідженні використано 60 щурів, розділених на 6 груп по 10 тварин: група 1 (К) — контроль (інтактні тварини); група 2 (А) — тваринам з метою індукування запального процесу вводили АФ; група 3 (*Les6490*) — тварини, які отримували новосинтезовану речовину *Les6490*; група 4 — тварини, яким вводили *Les6490* на тлі індукованого запалення; група 5 (N) — тварини, які отримували німесулід; група 6 — щури з індукованим запаленням, ліковані німесулідом. Досліджувані речовини розчиняли у *Twin 80* та вводили щурам внутрішньошлунково по 1 мл у дозі 15 мг/кг (німесулід, «Лекхім») і 10 мг/кг (*Les6490*) щодня вранці перед прийомом їжі протягом 14 днів. Зразки крові брали після декапітації щурів у пробірки з попередньо внесеним антикоагулянтом. У зразках крові визначали кількість еритроцитів, лейкоцитів, вміст гемоглобіну на гематологічному аналізаторі *Mythic18* (*Cormay Diagnostics*, Польща) та лейкограму методом мікроскопії, фарбування за Романовським-Гімзою [8].

Статистичну обробку одержаних результатів проводили методом варіаційної статистики з використанням *t*-критерію Стьюдента з допомогою прикладної програми для роботи з електронними таблицями *Microsoft Office Excel* (2003, 2013).

Результати й обговорення

Як показали результати наших досліджень, наведені у табл. 1, очікуваним ефектом впливу АФ (дослідна група 2) на гематологічний профіль порівняно з контрольною групою 1 було зростання загальної кількості лейкоцитів в 1,7 раза, що свідчить про активний запальний процес [12], на тлі зниження кількості еритроцитів в 1,4 та гемоглобіну в 1,1 раза ($P < 0,001$).

Введення сполуки *Les6490* і німесуліді окремо (групи 3 і 5) не спричиняло вірогідних змін з боку вказаних показників порівняно з контролем. Проте після введення тваринам зі спровокованим запальним процесом дія *Les6490* супроводжувалася вірогідним поверненням показника кількості лейкоцитів практично до контрольних цифр ($P < 0,001$).

Таблиця 1. Гематологічні параметри крові щурів за умов АФ-асоційованого запалення і дії сполуки *Les6490* та німесуліді ($M \pm m$, $n=10$)
Table 1. Hematological indices of rat blood after FA-induced inflammation and action of *Les6490* and nimesulide ($M \pm m$, $n=10$)

Показники Indices	група 1 group 1	група 2 group 2	група 3 group 3	група 4 group 4	група 5 group 5	група 6 group 6
	К	А	<i>Les6490</i>	<i>A+Les6490</i>	Nimesulide	<i>A+Nimesulide</i>
Лейкоцити, Г/л / Leucocytes, g/l	10,03±0,8	17,15±0,7*	9,55±2,5	11,4±1,4*	10,55±1,0	11,1±1,6*
Еритроцити, Т/л / Erythrocytes, t/l	8,7±0,32	6,11±0,3*	8,4±0,7	7,8±0,48*	8,6±0,42	7,12±0,67
Гемоглобін, г/л /Haemoglobin, g/l	137±1,75	127,3±2,4	138,3±5,2	127,3±5,6	138,6±2,4	132,7±3,7

Примітка. Тут і в наступній таблиці вірогідність * — $P \leq 0,001$.
Note. Here and in the following table the significance is * — $P \leq 0,001$.

Таблиця 2. Лейкоцитарна формула крові щурів за умов АФ-асоційованого запалення і дії *Les6490* та німесуліді ($M \pm m$, $n=10$)
Table 2. Leukogram of rats' blood after FA-induced inflammation and action of *Les6490* and nimesulide ($M \pm m$, $n=10$)

Показники, % Indices, %	група 1 group 1	група 2 group 2	група 3 group 3	група 4 group 4	група 5 group 5	група 6 group 6
	К	А	<i>Les6490</i>	<i>A+Les6490</i>	Nimesulide	<i>A+Nimesulide</i>
Базофіли / Basophils	0,5±0,54	0,3±0,51	0,33±0,5	0,33±0,5	0,5±0,54	0,5±0,54
Еозинофіли / Eosinophils	3,5±0,83	3,0±0,89	3,0±0,89	3,0±0,89	3,67±1,36	2,7±1,2
Нейтрофіли / Neutrophils	25±3,2	38,7±3,38	16,8±5,6	29,7±2,3*	17,5±2,6	32,3±6,1
Моноцити / Monocytes	6,8±0,31	10,5±2,7	8,3±1,2	9,8±1,83	9,2±0,76	10,8±2,7
Лімфоцити / Lymphocytes	64,2±1,9	47,5±2,1*	71,5±7,12	57,1±2,0*	69,2±2,3	53,7±4,2

Встановлено, що розвиток запалення у щурів (до-слідна група 2) супроводжується статистично вірогідним ($P < 0,001$) зниженням кількості еритроцитів щодо контрольної групи на 29%. Це може свідчити про здатність прозапальних цитокінів порушувати утворення еритроцитів. Згідно з літературними даними, запалення може порушувати метаболізм заліза, що призводить до розвитку анемії [3]. Зі свого боку, введення німесуліді та новосинтезованої сполуки за умов моделювання запального процесу призвело до збільшення кількості еритроцитів (група 4 та 6) порівняно з групою 2. Вміст гемоглобіну залишається в межах норми, що може вказувати на підтримку сталості дихальної функції крові.

Зміни лейкоцитарної формули за АФ-індукованого запалення (табл. 2) очікувано полягали у зсуві показників вліво і супроводжувалися зростанням процентного вмісту нейтрофілів з різницею 35%.

За дії препаратів *Les6490* та німесуліді з боку морфологічного складу периферичної крові, навпаки, зафіксовано деякий зсув формули вправо, відносний моноцитоз, проте зміни не були вірогідно значимими порівняно з контролем.

За умов АФ-асоційованого запального процесу введення сполуки *Les6490* не спричиняло вірогідних змін з боку процентного вмісту моноцитів, але мало деякий тренд до нормалізації показників. Дія німесуліді менше впливала на загальну кількість нейтрофілів, оскільки за умов АФ-індукованого запалення їхня відносна кількість становила 38,7%, а за додаткового

введення німесуліді знизилася лише на 6,4%, а також закріплювався ефект зростання відносної кількості моноцитів.

За результатами дослідження протизапальної активності за гематологічними показниками похідної 4-тіазолідинонів та НПЗП німесуліді виявлено їхню протизапальну активність, яку можна вважати співставною з *Les6490*. Причому, не виявляючи впливу на кількісний рівень еритроцитів за ізольованого введення, виявлено пізвищення рівня еритроцитів в умовах запального процесу. Впливу сполуки *Les6490* на кількість гемоглобіну не виявлено.

За показниками лейкоцитарної формули новий похідний з групи 4-тіазолідинонів проявляє схожу активність, як і препарат німесуліді.

Джерела

1. Araújo PHF, Ramos RS, da Cruz JN, Silva SG, Ferreira EFB, de Lima LR, Macêdo WJC, Espejo-Román JM, Campos JM, Santos CBR. Identification of potential COX-2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases using molecular modeling approaches. *Molecules*. 2020; 25(18): 4183. DOI: 10.3390/molecules25184183.
2. Caiazza E, Ialenti A, Ciccalà C. The relatively selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide: What's going on? *Eur. J. Pharmacol.* 2019; 848: 105–111. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.044.
3. Chen Y, Xu W, Yang H, Shao M, Xu S, Deng J, Gao X, Liu H, Shuai Z, Xu S, Pan F. Serum levels of hepcidin in rheumatoid arthritis and its correlation with disease activity and anemia:

- A meta-analysis. *Immunolog. Invest.* 2021; 50 (2–3): 243–258. DOI: 10.1080/08820139.2020.1742731.
- Kobylinska L, Klyuchivska O, Lesyk R, Stoika R. Targeting of the pro-oxidant/antioxidant balance *in vitro* and *in vivo* by 4-thiazolidinone-based chemotherapeutics with anticancer potential. *Ukr. Biochem. J.* 2019; 91 (2): 7–17. DOI: 10.15407/ubj91.02.007.
 - Manjal SK, Kaur R, Bhatia R, Kumar K, Singh V, Shankar R, Kaur R, Rawal RK. Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: A review. *Bioorg. Chem.* 2017; 75: 406–423. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.10.014.
 - McCarson KE, Fehrenbacher JC. Models of inflammation: carrageenan- or complete Freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr. Prot.* 2021; 1 (7): e202. DOI: 10.1002/cpz1.202.
 - Panico A, Maccari R, Cardile V, Crasci L, Ronsisvalle S, Ottanà R. 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives active as antidegenerative agents on human chondrocyte cultures. *Med. Chem.* 2013; 9 (1): 84–90. DOI: 10.2174/157340613804488378.
 - Vlizlo V, Fedoruk R, Makar I. *Physiological and Biochemical Methods of Investigation in Biology, Livestock and Veterinary Medicine.* Lviv, 2004: 400 p. (in Ukrainian)
 - Wang Y, Liu Z, Li T, Chen L, Lyu J, Li C, Lin Y, Hao N, Zhou M, Zhong Z. Enhanced therapeutic effect of RGD-modified polymeric micelles loaded with low-dose methotrexate and nimesulide on rheumatoid arthritis. *Theranostics.* 2019; 9 (3): 708–720. DOI: 10.7150/thno.30418.
 - Wei W, Evseenko VI, Khvostov MV, Borisov SA, Tolstikova TG, Polyakov NE, Dushkin AV, Xu W, Min L, Su W. Solubility, permeability, anti-inflammatory action and *in vivo* pharmacokinetic properties of several mechanochemically obtained pharmaceutical solid dispersions of nimesulide. *Molecules.* 2021; 26 (6):1513. DOI: 10.3390/molecules26061513.
 - Wildfeuer A. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human leucocytes. *Z. Rheumatol.* 1983; 42 (1):16–20. PMID: 6845886.
 - Zalyubovska O, Zlenko V, Litvynova O. *The Effect of Drugs on Laboratory Indicators.* Kharkiv, 2014: 97 p. (in Ukrainian)

The effect of the nimesulide and a new 4-thiazolidinone derivative on hematological parameters in the conditions of an experimental inflammatory process

T. M. Rumynska^{1,2}
tanityshka.r@ukr.net

¹Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69 Pekarska str., Lviv, 79010, Ukraine

²Institute of Animal Biology NAAS, 38 V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine

The aim of the work was to identify the anti-inflammatory effect of a newly synthesized drug from the group of 4-thiazolidinones. Thus, a comparative study of the effect of two agents was conducted: the drug *Les6490* and the non-steroidal anti-inflammatory drug nimesulide. This drug belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which have pronounced anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects. Nimesulide belongs to highly selective inhibitors of cyclooxygenase and its isoenzymes (COX-2) and is used for treatment in various pathologies of the musculoskeletal system. The newly synthesized compound *Les6490* belongs to the group of 4-thiazolidinone derivatives. The thiazolidinone ring is part of many existing potential antibacterial and anti-inflammatory agents, and can be combined with pyrazole fragments, which are pharmacophores of the same structure, and can contribute to increased therapeutic efficacy. The study of the peculiarities of hematological changes in rats during the experimental reproduction of the associated inflammatory process using the Freund's adjuvant model has been conducted. As a result of the study of anti-inflammatory activity based on hematological indicators of the drugs — a new synthesized derivative of 4-thiazolidinones and a nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide — their anti-inflammatory activity was revealed, which can be considered comparable to the slight advantage of the drug *Les6490*. At the same time, without affecting the quantitative level of erythrocytes with isolated administration, under the conditions of the inflammatory process, nimesulide and *Les6490* caused a significant increase in the total number of erythrocytes. No effect on the amount of erythrocytes was found. The analysis of leukocyte formula suggests the evidence that the activity of *Les6490* from the group of 4-thiazolidinones is to some extent more pronounced than the activity of nimesulide. The most pronounced changes in the leukocyte formula during AF-induced inflammation were observed on the part of neutrophils: the effect of the studied substance *Les6490* was more pronounced compared to the effect of nimesulide. The introduction of the new compound *Les6490* partially caused the normalization of monocytes, and under the conditions of the AF-associated inflammatory process, no significant changes were observed.

Key words: nimesulide, *Les6490*, 4-thiazolidinones, non-steroidal anti-inflammatory drugs, erythrocytes, hemoglobin, leukocytes